

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Prof. Dr. med. M. P. Schön)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**In-vivo-konfokale Laserscanmikroskopie:
Diagnostische Kriterien für die Differenzierung
vesikulöser/ bullöser Dermatosen**

- INAUGURAL - DISSERTATION -

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kinga Timea Samhaber

aus Sathmar/ Rumänien

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: PD Dr. med. H. Hänßle

II. Berichterstatter/in: PD Dr. med. Jürgen Becker

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
I. Einleitung und Zielsetzung	1
1. Einführung in die Problematik	1
1.1 Das akute allergische Kontaktekzem	2
1.1.1 Klinik und Diagnostik des allergischen Kontaktekzems	2
1.1.2 Histologie des allergischen Kontaktekzems	3
1.1.3 Differentialdiagnosen des allergischen Kontaktekzems	4
1.2 Varizella-Zoster-Virus-Infektion	4
1.2.1 Klinik und Diagnostik der Varizella-Zoster-Virus-Infektion	5
1.2.2 Histologie der Varizella-Zoster-Virus-Infektion	6
1.2.3 Differentialdiagnosen der Varizella-Zoster-Virus-Infektion	6
1.3 Das bullöse Pemphigoid	6
1.3.1 Klinik und Diagnostik des bullösen Pemphigoids	7
1.3.2 Histologie des bullösen Pemphigoids	8
1.3.3 Differentialdiagnosen des bullösen Pemphigoids	8

1.4 Konfokale Laserscanmikroskopie	9
1.4.1 Geschichte	9
1.4.2 Technisches Prinzip	10
1.4.3 Anwendungsgebiete in der Dermatologie	13
1.4.4 Morphologische Merkmale gesunder Haut in der KLSM	16
II. Material und Methodik	23
2.1 Konfokale Laserscanmikroskopie	23
2.2 Rahmenbedingungen, Patientendaten und -kollektiv	29
2.3 Strategie der KLSM-Aufnahmen	30
2.3.1 Epikutantestungen	31
2.4 Strategien der Auswertung des konfokalen Bildmaterials	34
2.4.1 Morphologie ausgewählter pathologischer KLSM-Kriterien – Auszüge aus der Literatur	34
2.5 Methodik der statistischen Analyse	36
2.5.1 Univariate statistische Analyse	37
2.5.2 Multivariate statistische Analyse	38
III. Ergebnisse	39
3.1 Deskriptive Analyse morphologischer KLSM-Kriterien	39
3.1.1 Patientenkollektiv beim allergischen Kontaktekzem	39
3.1.2 Morphologische Kriterien des allergischen Kontaktekzems in der KLSM	39
3.1.3 Patientenkollektiv bei der Varizella-Zoster-Infektion	43

3.1.4 Morphologische Kriterien der Varizella-Zoster-Infektion in der KLSM	43
3.1.5 Patientenkollektiv beim bullösen Pemphigoid	48
3.1.6 Morphologische Kriterien des bullösen Pemphigoids in der KLSM	48
3.2 Resultate der statistischen Analyse	60
IV. Diskussion	65
4.1 Die In-vivo-konfokale Laserscanmikroskopie in der Diagnostik vesikulobullöser und inflammatorischer Dermatosen	65
4.1.1 Das allergische Kontaktekzem in der konfokalen Laserscanmikroskopie	67
4.1.2 Die Varizella-Zoster-Infektion in der konfokalen Laserscanmikroskopie	69
4.1.3 Das bullöse Pemphigoid in der konfokalen Laserscanmikroskopie	71
4.1.4 Die Differenzierbarkeit der drei untersuchten vesikulobullösen Krankheitsentitäten mittels der In-vivo-konfokalen Laserscanmikroskopie	71
4.2 Mögliche Limitationen der vorliegenden Arbeit	73
4.3 Grenzen der konfokalen Laserscanmikroskopie	74
4.4 Ausblick	75
V. Zusammenfassung	79
VI. Literaturverzeichnis	81

Abkürzungsverzeichnis

AKE	akutes allergisches Kontaktekzem
AUC	<i>area under the curve</i>
BP	bullöses Pemphigoid
CDRH	Center for Devices and Radiological Health
DEJ	dermoepidermale Junktionszone
DKG	Deutsche Kontaktallergie-Gruppe
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ICDRG	International Contact Dermatitis Research Group
KLSM	konfokales Laserscanmikroskop
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NAP-Komplex	Nekrose-Akantholyse-pleomorpe Keratinozyten-Komplex
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pleom. K.	pleomorphe Keratinozyten
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
RZ	Riesenzellen
SIV-Komplex	Spongiose-Inflammation-Vesikel-Komplex
Str.	Stratum
VZV	Varizella-Zoster-Virus
VZVI	Varizella-Zoster-Virus-Infektion

Abbildungsverzeichnis

1	Schematischer Aufbau des konfokalen Laserscanmikroskopes	11
2	Optisches Prinzip eines KLSM	12
3	Vergleich eines histologischen Schnittbildes der menschlichen Haut mit einer Aufnahme mit dem KLSM	15
4	Stratum corneum	17
5	Zellen des Stratum granulosum	17
6	Stratum spinosum mit typischem <i>honeycomb-pattern</i>	18
7	Hoch refraktile Zellnester mit <i>cobblestone-pattern</i> im Str. spinosum	19
8	Papillenspitzen mit umgebenden Basalzellen im Pflastersteinrelief	20
9	Kollagenfasern und Bündel im netzartigen Muster im Stratum papillare	21
10	Zwei Haarschäfte	22
11	VivaScope® 1500 und 3000 inkl. Gerätewagen	26
12	Handgerät VivaScope® 3000	26
13	Wiederverwertbarer Gewebebring aus rostfreiem Edelstahl (MAVIG, München)	27
14	Das Klebeplastikfenster, mit Hilfe dessen der Gewebering auf der Haut befestigt wird (Lucid Inc. Rochester, New York, USA)	27

15	Der mit einem Klebefenster versehener Metallring auf der gewünschten Hautpartie	27
16	Schwenkbarer Kopf des Vivascope® 1500 mit dem Gewebekegel und dem Lasertubus	28
17	Übersichtsbild einer Bulla in der Ebene des Stratum granulosum	28
18	Epikutantestung: Beispiel einer 2-fach positiven Reaktion bei durchgeführter Epikutantestung auf die Testsubstanz Methylisothiazolinon (Übersichtsbild)	41
19	Epikutantestung: Beispiel einer 2-fach positiven Reaktion bei durchgeführter Epikutantestung auf die Testsubstanz Methylisothiazolinon (Nahaufnahme)	41
20	Übersichtsbild des KLSM (4x4 mm) aus dem Bereich des Str. granulosum mit zahlreichen Mikrovesikeln	42
21	Vergrößerter Ausschnitt des Übersichtsbildes (Abb. 20) aus dem Bereich des Str. granulosum mit parakeratotischen Zellen	42
22	Mikrovesikel mit inflammatorischen Zellen im Bereich des oberen Str. spinosum sowie Spongiose	43
23	VZVI im Dermatom C7/ C8 rechts. Übersichtsaufnahme des rechten Ellenbogens	45
24	VZVI im Dermatom C7/ C8 rechts. Dermatoskopische Darstellung der Läsion mit Krusten und Bläschen	45
25	VZVI im klinischen Anfangsstadium. Übersichtsbild aus dem Bereich des Str. spinosum ...	45
26	VZVI im klinischen Anfangsstadium. Vergrößerte Aufnahme aus dem Inneren des Vesikels (Einzelbild aus einem Stack des Übersichtsbildes von Abb. 25)	46
27	VZVI. Übersichtsbild aus dem oberen Str. spinosum mit Strukturdefekten/ Vesikeln	47

28	VZVI. Übersichtsbild aus dem Bereich des unteren Str. spinosums bzw. des Str. basale	47
29	Vergrößerte Aufnahme aus dem Bereich des Str. spinosum	48
30	Multiple, teils hämorrhagische Bullae am rechten Arm einer 76-jährigen Frau bei bullösem Pemphigoid	50
31	Ausschnitt aus einem 4x4 mm Übersichtsbild im Bereich des Str. corneum am Übergang zum Str. granulosum	50
32	Detailbilder aus dem Übergang vom Str. corneum in das Str. granulosum	51
33	Detailbilder aus dem Bereich des Str. spinosum	51
34	Unteres Str. spinosum am Übergang zum Str. basale mit Spongiose und beginnender Vesikelbildung	51
35	Vergrößerter Ausschnitt eines Vesikels aus Abb. 34	51
36	Ausschnitt aus einem Übersichtsbild einer größeren Bulla im Bereich der DEJ	52
37	Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 36	52
38	Korrespondenz-Analyse	61
39	Vorhersagewahrscheinlichkeit bezüglich Vesikel/ Bullae und Tiefe	61
40	Vorhersagewahrscheinlichkeit bezüglich pleomorphen Keratinozyten/ mehr- kernigen Riesenzellen	63
41	Diagramm: Vorhersagewahrscheinlichkeit bezüglich Alter	64

Tabellenverzeichnis

1 Alter und Geschlecht (s =Standardabweichung)30

2 Anzahl Untersuchungen je Patient31

3 Beurteilung von Epikutantestungen nach Empfehlungen der ICDRG (Fuchs Th 2007)33

4 Einzelbeobachtungen52

5 Homogenität der Verteilung der 19 Klassifikatoren (sowie Alter und Geschlecht) zwischen den drei Krankheitsentitäten (AKE, BP, VZVI)57

6 AUC je Klassifikator (multi-class AUC/ ROC) für 18 Klassifikatoren sowie Alter und Geschlecht der 3 Krankheitsentitäten (AKE, BP, VZV)58

7 Anzahl Beobachtungen im NAP-Komplex62

I. Einleitung und Zielsetzung

1. Einführung in die Problematik

Die In-vivo-konfokale Laserscanmikroskopie ist eine moderne Methode zur nicht-invasiven Untersuchung epidermaler und dermaler Läsionen in hoher zellulärer Auflösung. Sie ist bereits eine etablierte Technik für die *bedside*-Diagnostik und Differentialdiagnostik benigner und maligner Hauttumoren, insbesondere melanozytären Ursprungs, da sie eine sehr gute Korrelation zur konventionellen Histologie zeigt. Eine schnelle, nicht-invasive Diagnosefindung bei inflammatorischen und bullösen Hauterkrankungen mittels der konfokalen Mikroskopie rückt jedoch ebenso immer mehr in das Zentrum des klinischen Interesses.

Vesikulobullöse Dermatosen sind klinisch gekennzeichnet durch Bildung von Blasen und Bläschen auf der Hautoberfläche, welche durch lokale Kontinuitätsunterbrechungen in der Epidermis und Dermis bedingt werden (Hertl und Wolff 2012, Kershenovich et al. 2014). Die Diagnose dieser Hauterkrankungen beruht in der Regel auf dem klinischen Bild und der histologischen Untersuchung eines Gewebeschnittes, wobei letzteres einen invasiven Eingriff mit Verletzung der Haut oder Schleimhaut erfordert. Im Falle von autoimmunbullösen Dermatosen sind weiterhin die Durchführung von direkter und indirekter Immunfluoreszenz, ggf. auch eines Immunoblots, einer Immunpräzipitation oder auch einer immunelektronenmikroskopischen Untersuchung notwendig (Buch et al. 2014, Kershenovich et al. 2014, Kirtschig und Wojnarowska 1994). Auch hierfür ist die invasive Gewinnung von Material (Blut oder Gewebe) erforderlich. Alle oben genannten diagnostischen Maßnahmen sind in der Regel zeitaufwendig in der Durchführung und bieten frühe Ergebnisse oft erst Tage nach der Probengewinnung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, im Rahmen einer retrospektiven Analyse typische bildmorphologische Kriterien der konfokalen Laserscanmikroskopie für drei ausgewählte vesikulobullöse Krankheitsentitäten zu definieren, um diese im Sinne ihrer Brauchbarkeit für eine schnelle *bedside*-Diagnostik auszuwerten. Bei den drei Krankheitsentitäten handelte es sich um das akute allergische Kontaktekzem (AKE), die Varizella-Zoster-Virus-Infektion (VZVI) und das bullöse Pemphigoid (BP).

1.1 Das akute allergische Kontaktekzem

Das akute allergische Kontaktekzem (AKE) ist eine inflammatorische Dermatitis, die auf einer allergischen, zellvermittelten Immunreaktion vom Spättyp (Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell) beruht. Die Hautreaktion tritt dabei frühestens nach 4-8 Stunden, meist erst 24-48 Stunden nach Einwirkung des Allergens auf. Voraussetzung für das Entstehen eines Kontaktekzems ist eine initiale Sensibilisierung durch spezifische, in der Regel exogene, mit der Haut in Kontakt tretende Allergene, meist niedermolekularen Ursprungs, in dafür prädisponierten Individuen. Bei wiederholter oder dauerhafter Exposition mit dem Allergen kann ein akutes Kontaktekzem in ein chronisches Kontaktekzem übergehen. Der Pathomechanismus der Entstehung eines AKEs beruht zunächst auf der Aufnahme von niedermolekularen, inkompletten Antigenen, den Haptenen, in die Haut. Im Rahmen der initialen Sensibilisierung erfolgen die Internalisierung und schließlich die MHC-II-Komplex-gebundene Präsentation durch dendritische Zellen der Haut (Langerhans-Zellen) an T-Lymphozyten. Dies löst eine Proliferation antigenspezifischer Memory-T-Zellen aus, die bei erneutem Kontakt mit dem Allergen eine allergische Reaktion des Immunsystems bedingen können. Die Entwicklung einer Kontaktsensibilisierung benötigt dabei mehrere Tage (Enk und Knop 2007, Fyhrquist et al. 2014, Ruëff und Przybilla 2012).

Die Prävalenz der Kontaktsensibilisierungen bei Erwachsenen in Europa liegt bei ca. 20 bis 30%. Häufige Kontaktallergene finden sich vor allem in Kosmetika, Bekleidung, Pflanzen, Schmuck und berufstypischen Stoffen (Fyhrquist et al. 2014, Ruëff und Przybilla 2012).

1.1.1 Klinik und Diagnostik des allergischen Kontaktekzems

Typischerweise zeigt das AKE eine sehr große klinische Erscheinungsvielfalt. Frühestens 4–8 Stunden, gewöhnlich aber 24–48 Stunden nach Kontakt des auslösenden Agens entsteht an der Kontaktstelle zunächst ein Erythem mit einem lokalen Ödem, dabei können auch Papeln und kleinste Bläschen auftreten, die mit bloßem Auge und bei geringer Ausprägung nicht immer gut zu erkennen sind. Bei schwer ausgeprägten Reaktionen kann es zur Bildung größerer Blasen, zur Exsudatbildung und schließlich auch zu Erosionen kommen. Nicht selten sind Streuphänomene zu

beobachten, bei denen Hautveränderungen auch an Körperarealen auftreten, die mit dem auslösenden Stoff nicht in Kontakt getreten sind (Szliska 2007).

Die Diagnose eines AKE wird meist klinisch gestellt, d.h. durch die Untersuchung der Haut mit dem bloßen Auge. In unklaren Fällen kann eine histologische Untersuchung oder nach Abklingen der akuten Symptomatik ein Epikutantest durchgeführt werden. Letzterer ist der Goldstandard für das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf das Vorliegen einer Kontaktallergie. Dieser kann jedoch nicht in der akuten Krankheitsphase durchgeführt werden, da es sonst zu falsch positiven Ergebnissen kommen könnte. Damit der betroffene Patient „testfähig“ wird, müssen zunächst alle Symptome des Kontaktekzems stabil abgeklungen sein. Beim Epikutantest wird unter standardisierten Bedingungen das vermutete auslösende Agens zur Bestätigung oder zum Ausschluss einer Spättypallergie auf ein kleines Hautfeld unter Okklusion aufgebracht und dort üblicherweise 24 bis 48 Stunden belassen. Die erste Ablesung erfolgt ca. 30 Minuten nach Abnahme des Pflasters, weitere Ablesungen in der Regel 48, 72, 96 und manchmal auch 120 Stunden oder länger nach Aufbringen des Kontaktallergens. Die Auswertung der Testreaktionen sollte nach einer festgelegten Wertungsskala erfolgen, welche den Empfehlungen der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG) bzw. der International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) entspricht (Tabelle 3) (Fuchs 2007, Mahler et al. 2014).

1.1.2 Histologie des allergischen Kontaktekzems

Histologisch finden sich beim AKE charakteristischerweise erweiterte Blutgefäße im Stratum papillare mit einem Ödem v.a. im Bereich der Papillen sowie einem perivaskulären inflammatorischen Infiltrat. In den oberen Epidermisschichten sieht man entweder eine fokal auftretende oder diffus konfluierende Spongiose (Erweiterung des Interzellularraumes in der Epidermis), welche am stärksten ausgeprägt im Zentrum der Ekzemeffloreszenzen zu sehen ist, sowie diskret verstreute, eingewanderte lymphozytäre Zellen im Interzellularraum (Exozytose). Weiterhin werden oft intraepidermale, flüssigkeitsgefüllte Vesikel und Mikrovesikel beobachtet, die durch das Aufreißen interzellulärer desmosomaler Verbindungen entstehen. Seltener zeigt sich eine leichte Parakeratose, d.h. kernhaltige Keratinozyten bis in die obere Epidermis bzw. ins

Stratum corneum reichend, mit Exsudateinschlüssen (Hödl 2007, Kempf et.al. 2011, Ruëff und Przybilla 2012, Swindells et al. 2004).

1.1.3 Differentialdiagnosen des allergischen Kontaktekzems

Abzugrenzen sind das toxisch irritative Kontaktekzem, eine initiale Herpes-Zoster-Infektion, ein Erysipel und je nach Lokalisation auch ein systemischer Lupus erythematoses, eine Dermatomyositis oder ein Quincke-Ödem (Ruëff und Przybilla 2012).

1.2 Varizella-Zoster-Virus-Infektion

Infektionen mit dem Varizella-Zoster-Virus (VZV), welches in die Gruppe der α -Herpesviridae gehört, können als Primärerkrankung die Varizellen hervorrufen. Bei insgesamt hoher Kontagiosität erfolgt die Übertragung direkt über Kontakt mit Bläscheninhalt oder über eine Tröpfcheninfektion. Der Zoster stellt eine Sekundärerkrankung dar, da die Viren in den sensiblen Ganglien lebenslang persistieren und durch eine endogene Reaktivierung die Zoster-typische Klinik erzeugen können. Letztere tritt meist im fortgeschrittenen Alter oder unter Immunsuppression auf (WHO 2014, Nagel und Gilden 2013).

Vor Einführung der VZV-Impfung wurden jährlich ca. 750 000 Varizellenfälle in Deutschland pro Jahr verzeichnet (Wutzler et al. 2002). Nach Einführung der Impfung im Jahr 2004 zeigte sich im Verlauf ein deutlicher Rückgang der Erkrankungshäufigkeit. Die Rate der Zoster-Erkrankungen nahm zuletzt noch mit einer jährlichen Inzidenz von 5,3 - 5,5/ 1000 Einwohner in Deutschland zu (Hillebrand et al. 2015). Auch nach Untersuchungen des Robert Koch-Instituts konnte bislang noch kein Rückgang der Zoster-Inzidenz seit der Einführung der Varizellenimpfung nachgewiesen werden (Siedler et al. 2013).

1.2.1 Klinik und Diagnostik der Varizella-Zoster-Virus-Infektion

Varizellen zeigen sich nach einer Inkubationszeit von ca. 2 Wochen in Form eines Exanthems, welches erst aus roten Makulae besteht, die sich im Verlauf zu Papeln und schließlich zu wasserklaren Bläschen wandeln. In der Regel besteht ein buntes Bild aus den verschiedenen Stadien der Effloreszenzen mit einem Nebeneinander von Makulae, Papeln und Bläschen (Heubnersche Sternkarte). Auch die Schleimhäute sind regelmäßig betroffen (Lautenschlager 2012, WHO 2014).

Das typische klinische Bild der Zoster-Infektion (Gürtelrose) zeichnet sich aus durch gruppierte, teils einzeln stehende, teils konfluierende wasserklare Bläschen mit umgebendem Erythem im Verlauf eines oder mehrerer Nervensegmente. Der Befall ist in der Regel streng einseitig. Gelegentlich, häufiger unter Immunsuppression, treten aberrante Bläschen auf, die auch in eine Dissemination des Krankheitsbildes mit Ausbreitung auf das gesamte Integument übergehen können. Den Hautveränderungen gehen meist typische neuralgiforme Schmerzen im entsprechenden Dermatom voraus, welche oft zu Fehldiagnosen führen können. Die Abheilung zeichnet sich durch die Austrocknung der Bläschen mit Bildung von Krusten aus (WHO 2014, Lautenschlager 2012).

Die Diagnose wird meist klinisch gestellt. In unklaren Fällen kann die Durchführung einer PCR-Diagnostik (Polymerasekettenreaktion), z.B. aus Bläscheninhalt zum Nachweis von VZV-DNA, eine Kultur oder eine histologische Untersuchung einer Hautprobe erfolgen (Lautenschlager 2012, Leung et al. 2010, Weinmann et al. 2008). Bei der am häufigsten angewandten diagnostische Methode, der PCR, erfolgt der Nachweis spezifischer DNA von Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten, aber auch der Nachweis von z.B. spezifischen Tumorantigenen mittels der Amplifikation von DNA-Fragmenten direkt aus Gewebematerial. Mit der real-time PCR kann die Anzahl der Genkopien bestimmt werden und so eine quantitative Beurteilung erfolgen (Braun-Falco und Ruzicka 2012, Leung et al. 2010).

1.2.2 Histologie der Varizella-Zoster-Virus-Infektion

Histologisch zeigt sich bei einer Varizella-Zoster-Infektion eine epidermale Nekrose mit Akantholyse und intraepidermaler Vesikelbildung. Die Basalzellschicht erscheint mit einer ballonierenden Degeneration und mehrkernigen Riesenzellen. Weiterhin sieht man ausgeprägte, oft bis ins tiefe Korium reichende, perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate (Lautenschlager 2012, Kempf et al. 2011).

1.2.3 Differentialdiagnosen der Varizella-Zoster-Virus-Infektion

Differentialdiagnostisch muss bei der VZVI auch an einen Herpes simplex, ein Ekzema herpeticatum, eine akute Kontaktdermatitis, autoimmunbullöse Dermatosen oder auch an ein bullöses Erysipel gedacht werden (Lautenschlager 2012).

1.3 Das bullöse Pemphigoid

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist eine autoimmunbullöse Dermatose bislang unbekannter Ätiologie, die sich durch eine subepidermale Blasenbildung auszeichnet und durch das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen BP180 und BP230, welche hemidesmosomale Strukturproteine innerhalb der Basalmembran der Haut darstellen, charakterisiert ist (Schmidt und Zillikens 2013). Mit Bindung der Autoantikörper wird eine Entzündungsreaktion induziert, die mit Einwanderung von Leukozyten in die dermo-epidermale Junktionszone und Freisetzung von Proteasen einhergeht, was wiederum eine subepidermale Spaltbildung innerhalb der Lamina lucida bedingt (Fuertes de Vega et al. 2014, Kirtschig und Wojnarowska 1994, Zillikens 2012).

Das BP ist die häufigste blasenbildende Autoimmunerkrankung in Mitteleuropa. Die ab dem 60. Lebensjahr und in Deutschland seit zehn Jahren deutlich zunehmende Inzidenz beträgt 13- 14/ 1 Millionen Einwohner pro Jahr (Zillikens 2012, Schmidt und Zillikens 2013). Sehr selten zeigt sich die Erkrankung auch bei jungen Kindern, eine ethnische Prävalenz besteht nicht. Eine Induzierbarkeit des bullösen Pemphigoids durch Verbrennungen, UV-Exposition und

Röntgenstrahlen, sowie durch Medikamente und Impfungen ist zwar beschrieben, jedoch nicht regelmäßig als ursächlicher Auslöser eruierbar (Fuertes de Vega et al. 2014, Kirtschig und Wojnarowska 1994, Zillikens 2012, Schmidt und Zillikens 2013).

1.3.1 Klinik und Diagnostik des bullösen Pemphigoids

Typischerweise zeigen sich pralle Blasen, bis maximal 2-3 cm, mit serösem oder hämorrhagischem Inhalt, vor allem an der Innenseite der Oberschenkel, den Ellenbeugen, den Intertrigines und am Unterbauch. Häufig ist jedoch auch das gesamte Integument betroffen. Nicht selten sieht man zahlreiche Krusten, Kratzexkoriationen und Erosionen sowie Erytheme an Lokalisationen ehemals aufgeplatzter, aufgekratzter oder bereits abgeheilter Blasen. Die Effloreszenzen können somit auch dem Bild eines Ekzems sehr ähnlich sein. Bei vielen Patienten zeigt sich vor der Entwicklung manifester Blasen ein prämonitorisches Stadium mit urtikariellen, stark juckenden Erythemen. Die Erkrankung geht insgesamt (auch im Stadium manifester Blasen) mit starkem Juckreiz einher. Die Schleimhäute, hauptsächlich die Mundschleimhaut, sind bei ca. 10-20% der Betroffenen mitbefallen (Kirtschig und Wojnarowska 1994, Mihályi et al. 2012, Schmidt und Zillikens 2013).

Um ein BP eindeutig zu diagnostizieren, sind neben der Histologie die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz unerlässlich. Bei der direkten Immunfluoreszenz, die eine Hautbiopsie voraussetzt, werden die spezifischen Antikörper für das zu untersuchende Protein mit einem Fluorochrom gekoppelt. Die so auf das zu untersuchende patienteneigene Gewebematerial aufgetragenen markierten Antikörper binden spezifisch an die gesuchten Antigene. Nicht gebundene Antikörper lassen sich wieder auswaschen. Das Fluoreszenzmikroskop kann die gebundenen Antikörper über ihren gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff sichtbar machen, sodass eine Lokalisation der gesuchten Proteine in Relation zur subepidermalen Spaltbildung in der Haut erfolgen kann (Volgger 2008). Im Falle des BPs zeigen sich in periläsionaler Haut lineare C3-, IgG-, IgA- oder IgM-Ablagerungen an der dermoepidermalen Junktionszone (Fuertes de Vega et al. 2014, Kirtschig und Wojnarowska 1994, Mihályi et al. 2012, Schmidt und Zillikens 2013, Zillikens 2012).

Die indirekte Immunfluoreszenz, welche mit Patientenserum durchgeführt wird, zielt auf den Nachweis der spezifischen BP-Antikörper im Patientenserum durch Inkubation auf Gewebe des Affenösophagus. Dabei ist der spezifische Antikörper, der an das zu untersuchende Protein bindet, unmarkiert. In einem zweiten Schritt wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper auf die Probe aufgebracht, der dann spezifisch an den ersten Antikörper bindet (Volgger 2008). Hierbei lassen sich meist zirkulierende IgG- oder IgA-Autoantikörper nachweisen, die an der epidermalen Seite von Affenösophagus oder alternativ an humaner, vorinkubierter Spalthaut binden. Mittels Immunoblot- und ELISA-Verfahren lassen sich darüber hinaus auch die Serumspiegel der IgG-Autoantikörper gegen BP180 und gegen BP230 einzeln nachweisen. Erstere korrelieren mit der Krankheitsaktivität (Fuertes de Vega et al. 2014, Kirtschig und Wojnarowska 1994, Schmidt und Zillikens 2013, Zillikens 2012).

1.3.2 Histologie des bullösen Pemphigoids

Das BP zeigt sich histologisch durch eine subepidermale Blase. Um ein BP histologisch erkennen zu können, muss die Probenbiopsie im Bereich einer Blase mit erhaltenem Blasendach entnommen werden. Nur so lässt sich am Präparat erkennen, dass die Blasendecke von der gesamten Epidermis gebildet wird. Sehr häufig sieht man perivaskuläre Infiltrate aus Lymphozyten, neutrophilen und vor allem eosinophilen Granulozyten, aber auch eine Exozytose von Entzündungszellen. In der Epidermis findet sich eine Spongiose, im oberen Korium ein Ödem. Im Blasenlumen befinden sich Fibrin und eosinophile sowie neutrophile Granulozyten (Kempf et.al. 2011, Kirtschig und Wojnarowska 1994, Mihályi et al. 2012).

1.3.3 Differentialdiagnosen des bullösen Pemphigoids

Abzugrenzen sind zunächst unspezifische juckende Ekzemerkrankungen, Insektenstichreaktionen, Skabies-Infektionen, eine bullöse Kontaktdermatitis aber auch ein Erythema exsudativum multiforme. Weiterhin muss an andere Autoimmundermatosen wie die

Epidermolysis bullosa acquisita, die lineare IgA-Dermatose und den Pemphigus vulgaris gedacht werden (Fuertes de Vega et al. 2014, Mihályi et al. 2012, Zillikens 2012).

1.4 Konfokale Laserscanmikroskopie

1.4.1 Geschichte

Das heute kommerziell vertriebene konfokale Laserscanmikroskop (KLSM) beruht auf einer Entwicklung von Marvin Minsky. Der am 9. August 1927 in New York geborene US-amerikanische Professor studierte Biologie und Mathematik, promovierte im letztgenannten Fachgebiet in Princeton und ist seit 1958 Mitglied im MIT (Massachusetts Institute of Technology) wo er auf dem Gebiet der künstlichen Intelligenz forscht (Minsky 1988, Paddock 2000).

1955 kam Minsky mit der Zielsetzung, neuronale Netzwerke im menschlichen Gehirn *in vivo* sichtbar zu machen, auf die Idee, eine Methode zu entwickeln, mit der man das bei jedem mikroskopischem Gerät entstehende Streulicht vermeiden kann. Streulicht führt als unerwünschtes Nebenprodukt zu einer Unschärfe in der Abbildung des zu untersuchenden Objektes und wirkt sich somit begrenzend für die optische Auflösung aus. Diese Entwicklung konnte damals - und auch noch heute - als eine Aufwertung des Lichtmikroskops gesehen werden. Bereits in dem ursprünglichen konfokalen Mikroskop von Minsky bestand das Prinzip darin, Streustrahlung mithilfe von zwei Lochblenden zu eliminieren, sodass sie nicht vom Detektor wahrgenommen wird. Dafür wurde damals einer Zirkonium-Lichtquelle eine Lochblende vorgesetzt, wodurch das Licht mittels einer Objektivlinse auf das zu untersuchende Material fokussiert wurde. Die vom Objekt reflektierten Lichtstrahlen wurden schließlich über eine weitere Objektivlinse in eine zweite Lochblende gebündelt, welche den gleichen Fokus hatte, wie die erste und mit ihr somit konfokal war (Minsky 1988).

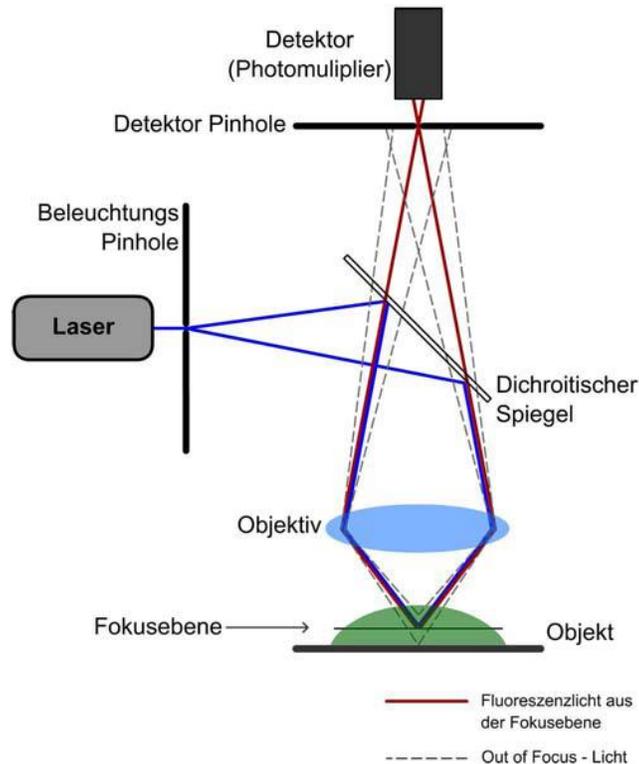
Eine immense Verbesserung der optischen Auflösung war die Folge, was in den 50-er Jahren allerdings noch keine große Bewunderung fand, da die technischen Möglichkeiten in der bildlichen Darstellung begrenzt waren. Die konfokal von Streulicht befreiten Lichtstrahlen wurden von einem Photoelektronenvervielfacher aufgefangen. Das endgültige Bild wurde auf einem Radar-Oszilloskop-Bildschirm rekonstruiert, welches Minsky aus einem Überschuss des

amerikanischen Militärs bezogen hatte. Ein weiteres Problem stellte die Scan-Zeit des Materials dar. Da es damals noch keine Laser-Lichtquellen gab, dauerte der Scan-Vorgang extrem lange. Punkt für Punkt musste während des Scannens abgewartet werden, bis sich die Zeitintervalle der Beleuchtung, von der im Vergleich zum Laser nicht sehr hellen Zirkonium-Lichtquelle, addierten und genügend Licht für die Reflexion „gesammelt“ war (Minsky 1988, Rajadhyaksha 1995).

Im Laufe der folgenden Jahrzehnte konnte das konfokale Mikroskop mit Hilfe digitaler Technik, modernen Softwaresystemen und fein abgestimmten Laser-Vorrichtungen zu dem heute sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Technik und Wissenschaft viel genutzten und leicht zu bedienenden hochauflösenden Gerät weiterentwickelt werden.

1.4.2 Technisches Prinzip

Das heute kommerziell erhältliche und von uns in der vorliegenden Arbeit verwendete konfokale Laserscanmikroskop (KLSM) - VivaScope® 1500 und 3000 - basiert u.a. auf einem 1995 von Rajadhyaksha et al. an der Harvard Medical School entwickelten ersten Prototyp und auf einer ebenfalls durch Rajadhyaksha et al. 1999 entstandenen Weiterentwicklung des Gerätes. Es besteht aus einem 830 nm Laser welcher als Lichtquelle dient, einer konfokalen Beleuchtungslochblende, einem Farbteiler, Scan-Spiegeln, Objektivlinsen, einer konfokalen Detektionslochblende, einem Detektor und einem digitalem Kontrollsystem. Diese Bestandteile sind, mit Ausnahme des Kontrollsystems, in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Der entscheidende Unterschied zwischen einem Lichtmikroskop und einem KLSM besteht darin, dass zusätzlich zwei zur Fokusebene konfokale Lochblenden in den Strahlengang eingebracht werden. Sie verhindern, dass Licht, welches außerhalb der Brennebene des Laserstrahls liegt, den Detektor erreicht. Dadurch erhöht sich die Auflösung. Die Schärfentiefe wird verringert. Dies wird in Abbildung 2 genauer verdeutlicht (Calzavara-Pinton et al. 2008, Paddock 2000, Gareau et al. 2008, Volgger 2008).

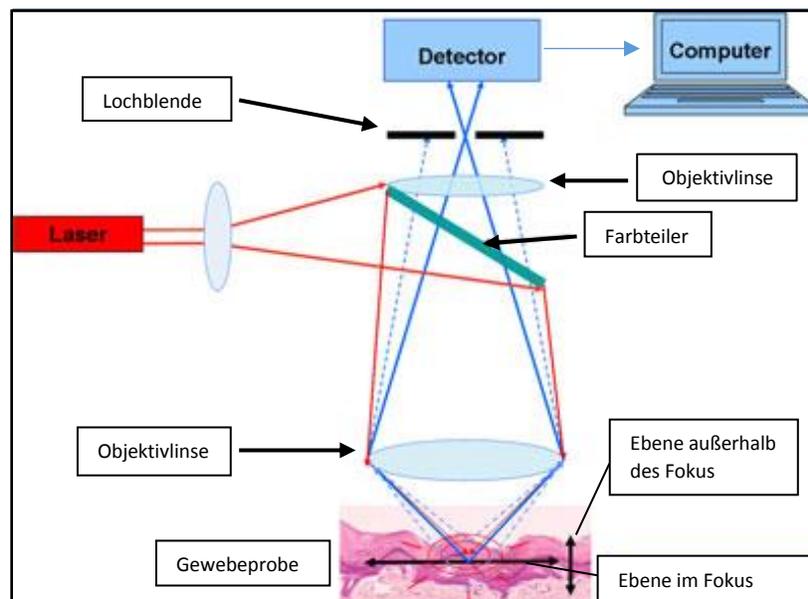


Quelle: Volgger 2008, S. 196. Mit freundlicher Genehmigung der Herausgeberin (ao. Univ.-Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl)

Abb. 1: Schematischer Aufbau des konfokalen Laserscanmikroskopes

Der Laserstrahl passiert eine Objektivlinse, wird dann durch dichroitische Spiegel reflektiert und durch ein zweites Objektiv auf das Objekt gelenkt. Dichroitische Spiegel sind spezielle Filter, die Anregungs- und Emissionslicht voneinander trennen. Das vom Objekt kommende Reflexionslicht wird wieder durch das Objektiv gesammelt, über einen Spiegel zurück auf dem Farbteiler (dichroitischer Spiegel) abgebildet und durch eine Detektionslochblende geleitet, welche sich direkt vor dem Detektor, einem Photoelektronenvervielfacher (Photomultiplier), befindet. Der Photomultiplier sammelt die einfallenden Photonen und verstärkt diese. Das Bild wird so punktwise abgebildet. Dies geschieht durch ein angeschlossenes Computersystem. Die Lochblende kann stufenlos in seiner Blendenöffnung verstellt werden. Je kleiner die Blende, desto schärfer ist das Bild, allerdings nimmt auch die Helligkeit des Bildes mit der Blendenöffnung ab.

Der Durchmesser der Lochblende ist daher immer an das verwendete Objektiv angepasst. Damit ein Bild des gesamten Objektes entstehen kann, wird der Laserstrahl in zwei Ebenen über das Objekt geführt. Es erfolgt nur die Detektion der Lichtsignale, die sich genau in der Bildebene des Lasers befinden, ihren Brennpunkt somit an der Lochblende haben. Alle anderen Lichtstrahlen, die einen tieferen oder höheren Ursprung haben, werden ausgeblendet (Abbildung 2). So können verschiedene Ebenen des Objektes nacheinander aufgenommen werden. Eine digitale Rekonstruktion eines zweidimensionalen Schnittbildes gelingt mittels des mit dem Detektor verbundenen Softwaresystems und eines hochauflösenden Bildschirms (Gareau et al. 2008, Rajadhyaksha et al. 1995, Rajadhyaksha et al. 1999, Voggl 2008, www.vivascope.de). Die dargestellte Bildauflösung beträgt dabei 1000 x 1000 Pixel (www.vivascope.de).



Quelle: Calzavara-Pinton et al. 2008, Seite 1422 (modifiziert). Mit freundlicher Genehmigung des Autors.

Abb. 2: Optisches Prinzip eines KLSM zur Verdeutlichung der Rolle der Lochblende und des abgefangenen Streulichtes: die roten Linien veranschaulichen die Lichtstrahlen, die von der Lichtquelle ausgesendet werden, die blauen Linien stellen die vom Objekt reflektierten Strahlen dar. Die durchgezogenen blauen Linien liegen im Fokus der Lochblende. Die gestrichelten blauen Linien können die Blende nicht passieren, da der Fokus nicht exakt auf Höhe der Blende liegt.

1.4.3 Anwendungsgebiete in der Dermatologie

Das KLSM findet heutzutage bereits in vielen wissenschaftlichen und technischen Arbeitsgebieten Anwendung, so in den Bereichen der Biotechnik, der Biomedizin aber auch in der experimentellen und der klinischen Medizin (Paddock 2000). Insbesondere seit den Arbeiten von Rajadhyaksha et al. (1995 und 1999) findet das KLSM auch in der Dermatologie bei der hochauflösenden Darstellung von Gewebe *in vivo* und *in vitro* zahlreiche Einsatzgebiete. Im Bereich der Früherkennung von melanozytären und epithelialen Hauttumoren fand die konfokale Laserscanmikroskopie bereits Eingang in die S1-Leitlinie des AWMF-Registers (Welzel et al. 2011). Auch die *ex-vivo* Untersuchung von histologischen Schnellschnittpräparaten zur Schnittrandkontrolle von melanozytären und epithelialen Tumoren im Sinne der mikrographisch kontrollierten Chirurgie und die In-vivo-Schnittrandkontrolle von Hauttumoren bergen das Potenzial, in Zukunft eine praktikable Alternative zur zweizeitigen Chirurgie darzustellen (Astner und Ulrich 2010, Chung et al. 2004, González 2009, Horn et al. 2007, Käß 2012). Nicht zuletzt bietet der Einsatz des KLSM bei oberflächlichen inflammatorischen Hauterkrankungen sowie im Bereich der ästhetischen Medizin vielfältige Möglichkeiten in der nicht-invasiven Diagnostik, der Verlaufsbeobachtung und in der Dokumentation von Therapieeffekten. Zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen und Arbeiten finden sich unter anderem bereits zum allergischen und irritativen Kontaktekzem (z.B. Astner et al. 2005 a und b, Astner et al. 2006, Astner 2008, González et al. 1999, Swindells et al. 2004) zum diskoiden Lupus erythematoses (z.B. Ardigò et al. 2007 a, Koller et al. 2009, Wassef et al. 2012) und zur Psoriasis (z.B. Ardigò et al. 2013, Başaran et al. 2015, Wolberink et al. 2011, Wolberink et al. 2014).

Durch die oben beschriebenen technischen Eigenschaften des KLSM lassen sich von der Epidermis der menschlichen Haut virtuelle schwarz-weiß-Bilder erzeugen, die Echtzeit-Schnittbilder aus unterschiedlichen Epidermisschichten parallel zur Hautoberfläche darstellen. Die Aufnahmen sind mit einer lateralen Auflösung von 0.1–1 µm und einer axialen Auflösung von 1-5 µm (Schichtdicke) mit histologischen Schnittbildern vergleichbar (Gareau et al. 2008, Rajadhyaksha et al. 1995). Der Unterschied zur Histologie besteht unter anderem in der horizontalen Darstellung der einzelnen Bilder, während die histologischen Schnitte einen vertikalen Blick in das Gewebe ermöglichen (Abbildung 3). Die Beurteilbarkeit bioptischer Schnitte bis hin zur Subkutis

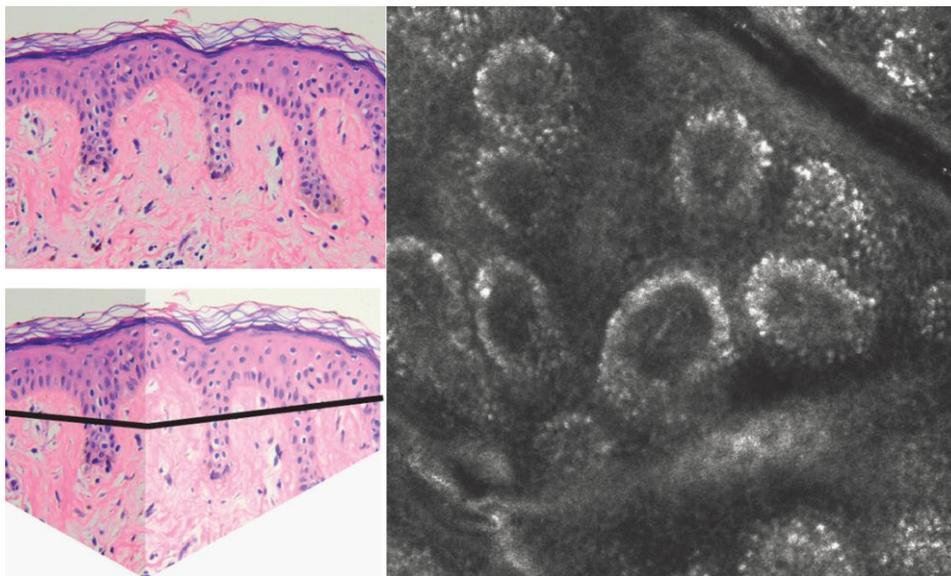
bleibt dabei ein Vorteil der histologischen Diagnostik. Die maximale Eindringtiefe des KLSM beträgt 150-350 µm, je nach Gewebebeschaffenheit, sodass man beim Scannen von dünner Haut, wie sie z.B. an der Beugeseite des Unterarmes zu finden ist, maximal bis in das obere Stratum reticulare der Dermis blicken kann. Mit Hilfe der integrierten Software kann ein Übersichtsbild aus den einzelnen 500x500 µm großen Bildern aufgebaut werden. Hierzu werden Einzelbilder seriell aufgenommen und zu einem Mosaik mit einer Gesamtbildgröße von 1x1 mm bis maximal 8x8 mm zusammengesetzt (Calzavara-Pinton et al. 2008, Gareau et al. 2008, Huzaira et al. 2001). Auch die Aufnahme von kleinen Videosequenzen ist möglich. Damit lässt sich in Kapillaren ein Blutfluss oder auch die Migration von Entzündungszellen aus den Kapillaren in das umliegende Gewebe in Echtzeit darstellen (Altintas et al. 2010).

Das VivaScope® 1500 und 3000 (MAVIG, München; entwickelt von Lucid Inc. Rochester, New York, USA), verwendet einen Diodenlaser mit einer Wellenlänge im nahen Infrarotbereich (830 nm) und ein Wasser-Immersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0,9 womit die oben genannte hohe Auflösung erreicht wird. Der Laser hat die CDRH- (Center for Devices and Radiological Health) Klasse 1M. Die dabei auf die Haut freigesetzte Energie beträgt weniger als 30 mW und führt daher zu keinem Schaden des zu untersuchenden Gewebes oder der Augen (Branzan et al. 2007, González 2009, Rajadhyaksha et al. 1999).

Durch Unterschiede in der Reflexion des Laserstrahls an endogenen intraepidermalen Substanzen wie z.B. Melanin, Hämoglobin, Keratin und Kollagen wird eine Kontrastierung der schwarz-weiß-Bilder erzeugt. Strukturen die hell im Bild erscheinen haben einen hohen Refraktionsindex. Dunkel pigmentierte Haut (Hauttyp III-IV nach Fitzpatrick) ergibt deutlich hellere Aufnahmen als kaum pigmentierte (Hauttyp I-II nach Fitzpatrick). Dabei kommt es, unabhängig vom Hauttyp, ab dem Stratum granulosum mit zunehmender Tiefe der Hautschicht zu einer Zunahme der Kontrastierung. Dies ist auf den besonders hohen Refraktionsindex des Melanins, welches insbesondere in den Zellen der Basalzellschicht in den sogenannten supranukleären Melaninkappen zu finden ist, im Vergleich zum umgebenden Zytoplasma zurückzuführen. Dieser Umstand bedingt die besondere Bedeutung des KLSM in der Diagnostik pigmentierter Hautveränderungen (Rajadhyaksha et al. 1995).

Neben Melanin haben auch Kollagen und Keratin hohe Refraktionsindices. Auch das Zytoplasma erscheint im Vergleich zum Nukleus heller, was durch die Inhomogenität des Zytoplasmas, hervorgerufen durch darin enthaltene Zellorganellen (Lysosomen, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum etc.) bedingt wird (Rajadhyaksha et al. 1995).

Ein weiterer Faktor, welcher das Reflexionsvermögen von zellulären und interzellulären Strukturen bestimmt, ist das Verhältnis der Größe der zu scannenden Struktur zur Wellenlänge der Lichtquelle. Strukturen die ähnlich groß sind wie die verwendete Wellenlänge, erscheinen hell im Bild. Werden somit Laser mit einer Wellenlänge größer als 1064 nm verwendet, hat dies eine Abnahme der lateralen Auflösung zur Folge (Branzan et al. 2007, Calzavara-Pinton et al. 2008, González et al. 2009, Rajadhyaksha et al. 1995).



Quelle: Lieb et al. 2008, S. 14. Mit freundlicher Genehmigung des *Taylor & Francis Group*-Verlages

Abb. 3: Links im Bild sind histologische Schnittbilder der menschlichen Haut dargestellt, wobei im unteren Bild die horizontale Schnittebene des KLSM markiert ist. Das rechte Bild zeigt eine Aufnahme mit dem KLSM korrelierend zur markierten Schnittebene, welche die dermoepidermale Junktionszone abbildet.

1.4.4 Morphologische Merkmale gesunder Haut in der KLSM

Bei der Untersuchung der normalen Haut mit dem KLSM kommen die verschiedenen Epidermisschichten durch das rasterförmige Abscannen einzelner Ebenen horizontal zur Darstellung. Dabei kann die Schichtdicke der Ebenen in 1,5 µm bis 4,5 µm -Schritten vom Untersucher über die Software eingestellt werden. Bedingt durch die hohe Ortsauflösung des KLSM können die unterschiedlichen Schichten und ihre zellulären Bestandteile bis zu einer maximalen Tiefe von 350 µm außerordentlich gut voneinander unterschieden werden. Ebenso besteht eine sehr gute Korrelation zu histologischen Schnittbildern (Branzan et al. 2007, Rajadhyaksha et al. 1999).

Der Scanvorgang beginnt stets an der Hautoberfläche. Hier stellt sich das **Stratum corneum** in Form von hellen polygonalen Flächen dar, welche durch schwarz erscheinende Linien bzw. Furchen getrennt werden (Abbildung 4). Diese dunklen Linien kommen durch die Hautfalterung zustande und sind auch noch in tieferen Epidermisschichten, seltener auch in der Dermis, je nach Hautbeschaffenheit, sichtbar. Die helle Erscheinung des Stratum corneum bedingt sich durch den Unterschied im Brechungsindex des Immersionsmediums zur Haut und durch das hohe Brechungsvermögen des Keratins, welches in den abgeflachten kernlosen Korneozyten angereichert ist. Je nach Hauttopographie zeigt diese Schicht eine unterschiedliche Dicke von bis zu 15 µm (González 2009, Lieb et al. 2008).

Das **Stratum granulosum** ist charakterisiert durch 25-35 µm große polygonale Zellen, die ein helles, gekörntes, jedoch schmales Zytoplasma und große dunkle ovale bis rundliche Nuklei mit einem sichtbaren, hell erscheinendem zentralen Nukleolus aufweisen. Diese Epidermisschicht besteht aus 2 bis 4, maximal (an den Palmae und Plantae) aus bis zu 10 Zelllagen (Abbildung 5) (Brazan et al. 2007, Huzaira et al. 2001, Lieb et al. 2008, Rajadhyaksha et al. 1999).

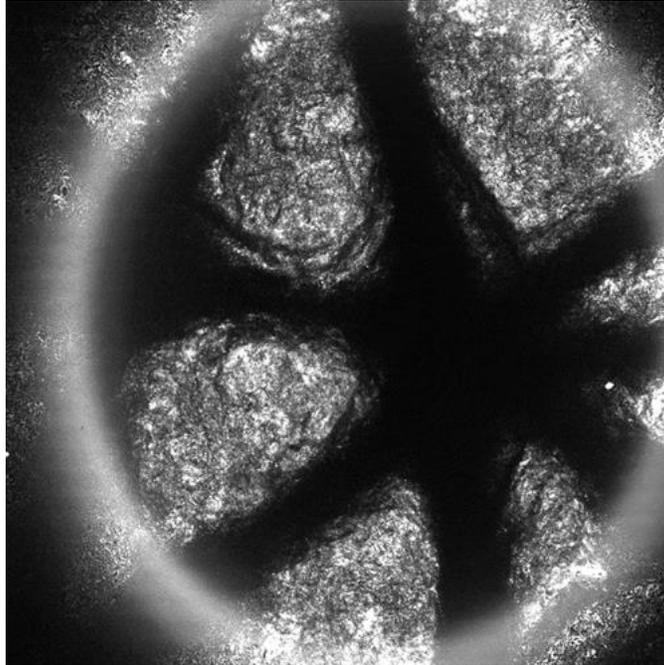
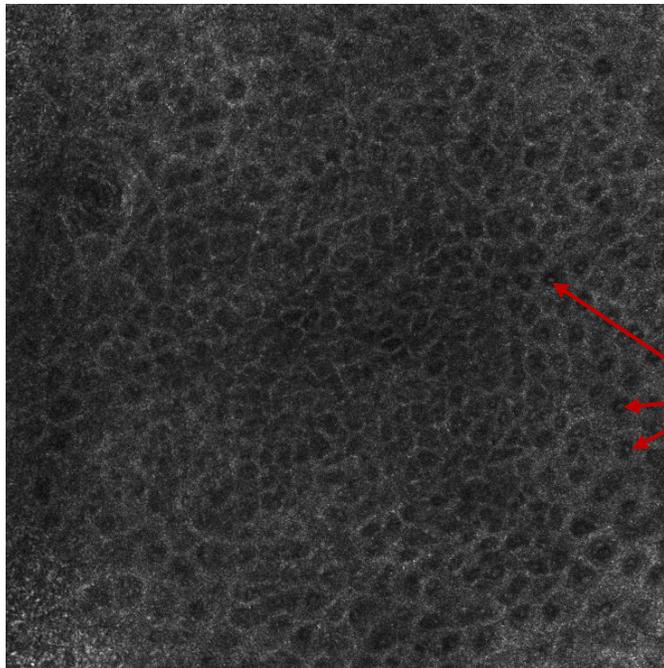


Abb. 4: Stratum corneum (Bildgröße 500x500 μm , Hauttyp II nach Fitzpatrick)



Zellen des Stratum granulosum mit dunklen Nuklei, die einen hellen Punkt in der Mitte aufweisen, welcher dem Nukleolus entspricht (Pfeilspitzen).

Abb. 5: Im Bildrandbereich sind Zellen des Stratum granulosum mit sichtbaren Nukleoli (Pfeile) zu sehen. (Bildgröße 500x500 μm , Hauttyp II nach Fitzpatrick)

Das **Stratum spinosum**, welches in einer Tiefe von 20-100 μm zu finden ist, weist ebenfalls polygonale Zellen auf, die jedoch mit einer Zellgröße von 15–25 μm kleiner sind als jene im Stratum granulosum und mit zunehmender Tiefe auch flacher werden. Der Nukleus erscheint dunkler als das Zytoplasma, welches hier etwas deutlicher die polygonalen Zellformen abgrenzt, wodurch sich insgesamt die Anordnung der Zellen in einem sogenannten Honigwabemuster (*honeycomb-pattern*) klar erkennen lässt (Abbildung 6). Die Nukleoli sind im Stratum spinosum in der Regel nicht sichtbar. Eine Dicke von vier bis zehn Zelllagen ist typisch für diese Zellschicht (Branzan et al. 2007, Lieb et al. 2008).

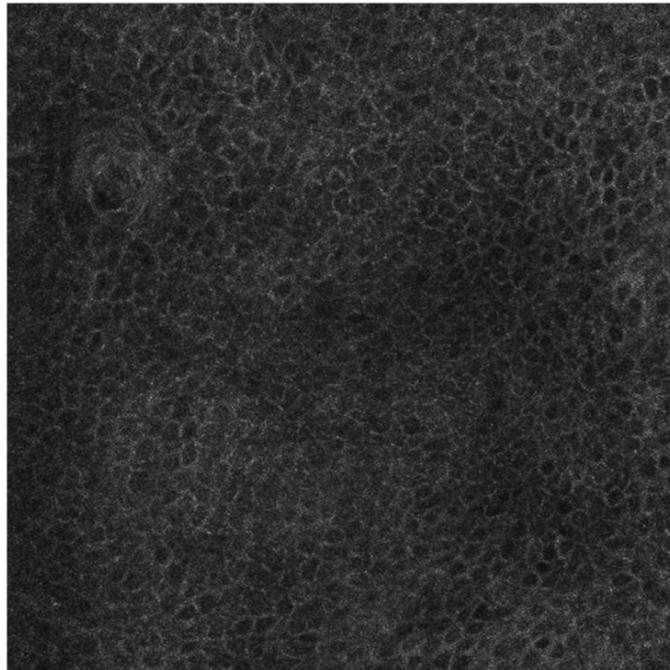


Abb. 6: Stratum spinosum mit dem typischen honeycomb-pattern. (Bildgröße 500x500 μm , Hauttyp II nach Fitzpatrick)

In den tieferen Ebenen des Stratum spinosum tritt das **Stratum basale** bereits in Form von einzelnen, hell erscheinenden Zellnestern in Erscheinung (Abbildung 7). Der hohe Reflexionsindex der Basalzellen bedingt sich durch ihre supranukleären Melaninkappen. Dementsprechend ist die Helligkeit dieser Zellnester abhängig vom Hauttyp. Je dunkler die Hautpigmentierung, desto

ausgeprägter die Reflexion (Rajadhyaksha et al. 1995, Rajadhyaksha et al. 1999). Das Muster dieser Zellnester wird auch als Pflastersteinrelief (*cobblestone-pattern*) bezeichnet (Abbildung 7). Die Basalzellschicht, die sich in einer Tiefe von 40-130 μm befindet, besteht aus nur einer Zellschicht von rundlichen Basalzellen, die eine Größe von 7–12 μm aufweisen. Mit zunehmender Tiefe, im Bereich der **dermo-epidermalen Junktionszone**, formen sich in den konfokalen Aufnahmen die hellen Zellnester zu Ringen, die weiterhin von Zellen des Stratum spinosum umgeben sind. Innerhalb der Ringformation kann man bereits in, die im Verhältnis dunkel erscheinende, papilläre Dermis blicken, da hier die Papillenspitzen, die horizontal angeschnitten sind, sichtbar werden (Abbildung 8). Zentral finden sich oft angeschnittene Kapillaren, häufig mit darin sichtbaren Erythrozyten (Branzan et al. 2007, Calzavara-Pinton et al. 2008, González 2009, Huzaira et al. 2001, Lieb et al. 2008).

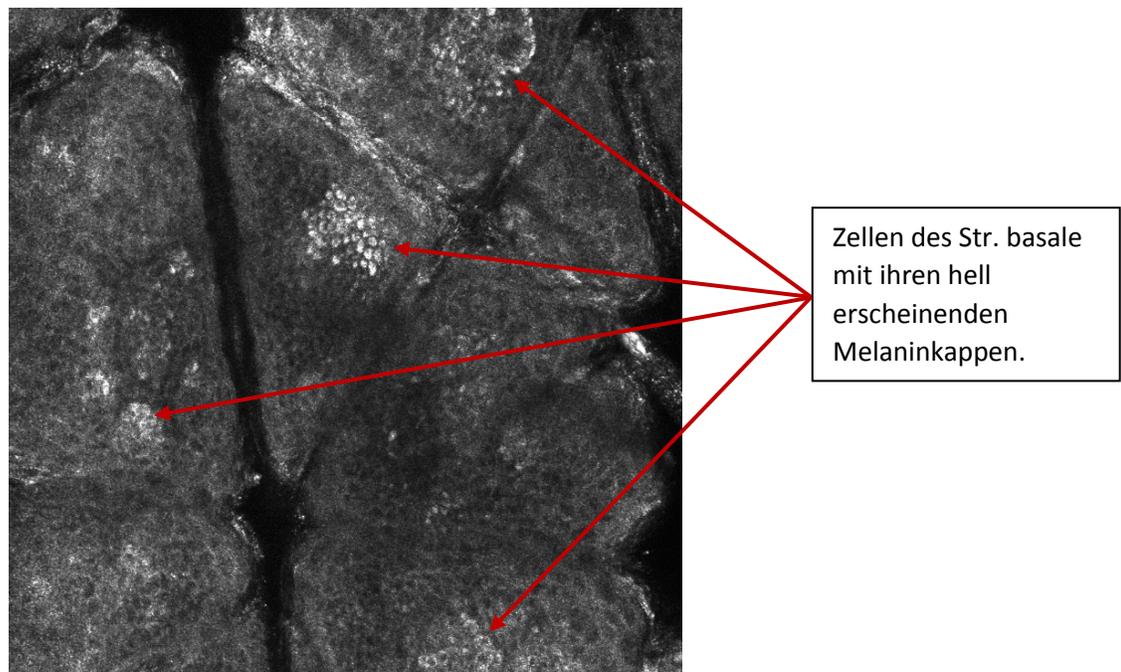


Abb. 7: Hoch refraktile Zellnester (Pfeile) mit dem typischen cobblestone-pattern, welche umgeben sind von den Zellen des Str. spinosum. (500x500 μm , Hauttyp II nach Fitzpatrick)

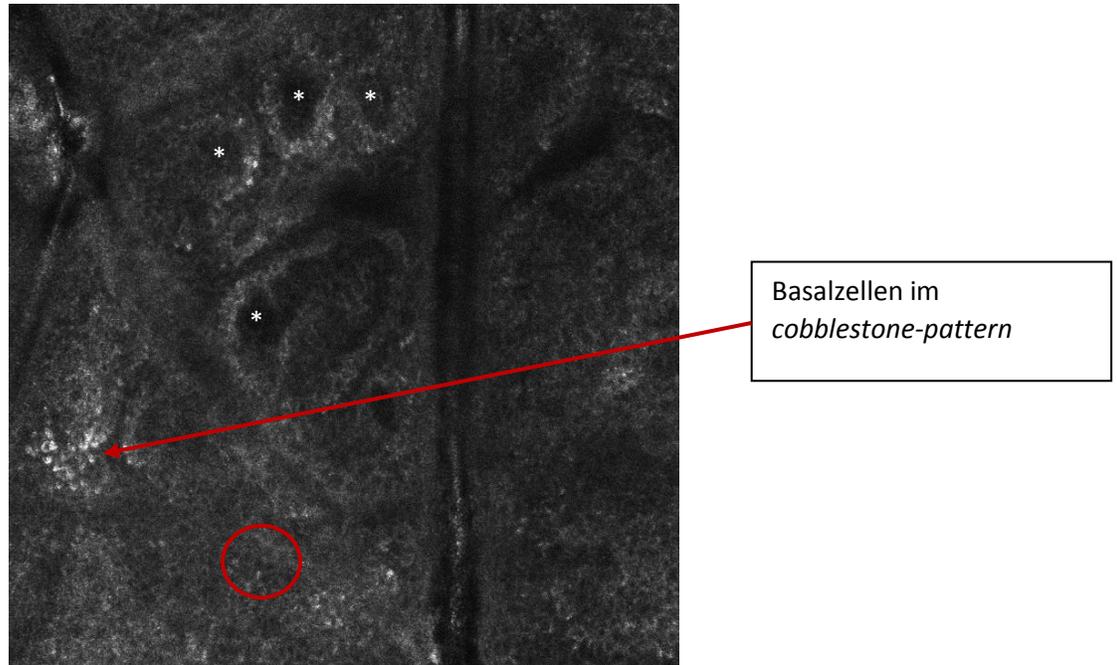


Abb. 8: Papillenspitzen (weiße Sterne) mit den sie ringförmig umgebenden Basalzellen. In der unmittelbaren Umgebung sind weiterhin noch die Zellen des Str. spinosum sichtbar (Kreis) sowie im linken Bildrand das Pflastersteinrelief der Basalzellen (Pfeil). (Größe 500x500 µm, Hauttyp II nach Fitzpatrick)

Im Bereich der oberflächlichen Dermis, welche als sogenannte **papilläre Dermis** bereits zwischen den Reteleisten sichtbar ist, zeigt sich ein insgesamt eher dunkles Bild mit unterschiedlichen Grauabstufungen. Hier können, außer den o.g. Kapillaren, auch Kollagenfasern und -bündel als helle fadenartige Strukturen mit einer unscharfen Begrenzung beobachtet werden (Abbildung 9). In Arealen sehr dünner Haut können ab einer Tiefe von ca. 150 µm auch die dicht gewobenen Kollagenfasern und elastischen Fasern der oberen retikulären Dermis in einem gebündelten Muster sichtbar werden (González 2009, Huzaira et al. 2001, Lieb et al. 2008).

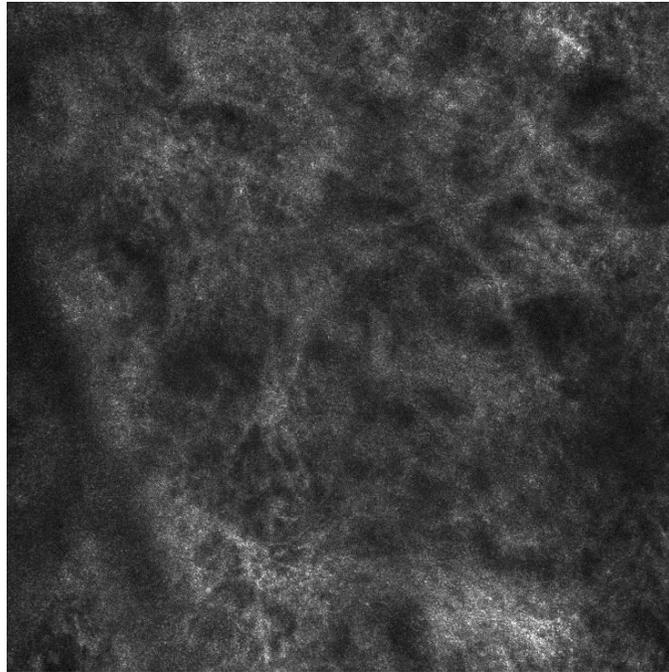


Abb. 9: Kollagenfasern und Bündel im netzartigen Muster im Stratum papillare am Übergang zum Stratum reticulare der Dermis. (Bildgröße 500x500 μm , Hauttyp II nach Fitzpatrick)

Hautanhangsgebilde wie Ausführungsgänge ekkriner Drüsen, Talgdrüsen und Haarfollikel können mit dem KLSM in ihren oberflächlich gelegenen Anteilen visualisiert werden. Tiefer liegende Anteile wie zum Beispiel die Haarfollikel, und die Wurzelscheiden sind nicht sichtbar. Dabei erscheint ein Haar, bei vorliegendem Melaninanteil, als gerade verlaufende, helle Struktur (Abbildung 10), manchmal umgeben von einer spiralartigen dunklen Formation, welche eine Talgdrüse darstellt. Apokrine Drüsen und ihre Ausführungsgänge sind - bis auf wenige Regionen wie die Axilla - in der Regel ebenfalls nicht sichtbar, da sie unterhalb des Haarinfundibulums im Haarfollikel münden.

Talgdrüsen, rundliche spulenartige Gebilde in der Nähe von Haarfollikeln, findet man mit dem KLSM vor allem im Gesichtsbereich, hier können sie insbesondere bei bestehender Talgdrüsenhyperplasie dargestellt werden (Lieb et al. 2008).

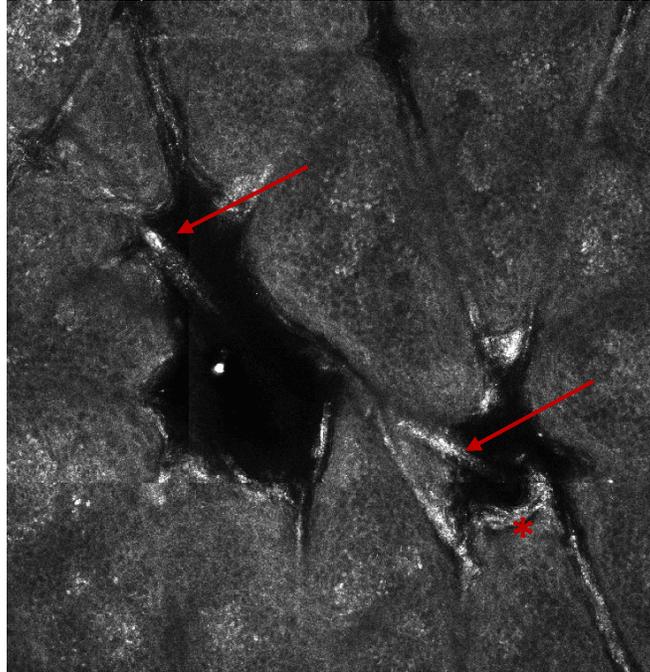


Abb. 10: Zwei Haarschäfte (rote Pfeile), die auf der Ebene der Basalzellschicht aus einem Kreuzungspunkt der Hautfurchen entspringen. Bei dem rechts im Bild gelegenen Haar ist halbringförmig ein Haarfollikel mit angeschnitten (). (Bildgröße 500x500 μm , Hauttyp II nach Fitzpatrick)*

II. Material und Methodik

2.1 Konfokale Laserscanmikroskopie

Für die konfokalen Laserscanmikroskopie-Aufnahmen verwendeten wir das kommerziell erhältliche konfokale Laserscanmikroskop VivaScope® 1500, kombiniert mit dem Handstück Vivascope® 3000, vertrieben von der Firma MAVIG GmbH, München Deutschland (entworfen von Lucid Inc. Rochester, New York, USA), (Abbildung 11).

Sowohl das VivaScope® 1500 als auch das VivaScope® 3000 arbeiten nach demselben technischen Prinzip und sind mit einem Diodenlaser der Wellenlänge 830 nm, einer maximalen Leistung von 22 mW sowie jeweils einem Wasser-Immersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0,9 ausgestattet. Die laterale Auflösung der Mikroskope beträgt $< 1,25 \mu\text{m}$, die axiale Auflösung $< 5 \mu\text{m}$. Der Laser ist mit der CDRH-Schutzklasse 1M ausgezeichnet. Die maximale Eindringtiefe in das Gewebe beträgt $350 \mu\text{m}$ (www.vivascope.de). Mit der integrierten Software VivaScan® Version 7, welche auf einer Windows XP-basierenden Application-Software beruht, können Patientendaten wie Geburtsdatum, Datum der konfokalen Untersuchung, Diagnose und Lokalisation der aufgenommenen Effloreszenz gespeichert werden. Ein so erstelltes Patientenarchiv beinhaltet die Aufnahmen der einzelnen Imaging-Sessions und die unterschiedlichen Aufnahmen von Läsionen, auf die jederzeit zugegriffen werden kann (www.vivascope.de).

Das VivaScope® 1500 besteht aus einem Gerätewagen, welcher die PC-Festplatte, den Monitor, die Tastatur, die Maus und den flexiblen Schwenkarm mit dem integrierten Laser trägt. Zusätzlich befindet sich am Gerätewagen eine Halterung für das Handgerät, VivaScope® 3000 (Abbildungen 11 und 12).

Mit dem Handgerät können - aufgrund seiner Kompaktheit und leichten Handhabung bei insgesamt geringem Gewicht - in schwer erreichbaren oder verwinkelten Hautarealen, wie z.B. dem Zehenzwischenraum oder im Gesicht, Aufnahmen schneller und komfortabler durchgeführt werden als mit dem VivaScope® 1500, da jegliche vorhergehende Befestigung entfällt. Das Handgerät wird allein durch die Hand des Untersuchers fixiert. Somit ist es flexibel einsetzbar, allerdings können mit dem VivaScope® 3000 keine größeren Übersichtsaufnahmen angefertigt

werden. Das Handgerät scannt in dem vom Untersucher fokussierten Areal Einzelbilder mit einer Größe von 1000x1000 μm bis zu einer Tiefe von 200 μm . Bei diesen sogenannten VivaStacks® kann der vertikale Abstand der einzelnen Ebenen zueinander vom Untersucher eingestellt werden. Dabei können drei Schichtdicken gewählt werden: 3 μm , 3,2 μm und 5,2 μm . Eine Bewegung in der horizontalen x-y-Achse ist nicht möglich. Sollen größere Areale (z.B. 4x4 oder 8x8 mm) gescannt werden, so muss der Untersucher eigenständig das Handgerät Millimeter um Millimeter verschieben und immer wieder neue Stacks generieren (www.vivascope.de). Vor Beginn der Aufnahmen muss nach Abschrauben der vorderen Kappe ein Tropfen Ultraschallgel in diese eingebracht werden. Anschließend wird die Kappe wieder angeschraubt. Das Gerät ist nun betriebsbereit. Auf die zu untersuchende Hautregion wurde vor Auflegen des Gerätes ein Tropfen Crodamol-Öl (MAVIG, München) gegeben, welches als Immersionsflüssigkeit dient.

Für die Aufnahmen mit dem schwenkbaren Kopf des VivaScope® 1500 waren im Vorfeld Vorbereitungen für dessen Kopplung an das zu scannende Hautareal notwendig. Zunächst wurde ein Edelstahlring (Abbildung 13) mit einem Klebefenster aus Polycarbonat (Lucid Inc. Rochester, New York, USA) (Abbildung 14) versehen. Das Klebefenster, welches eine doppelseitige Klebevorrichtung besitzt, wurde nun zusammen mit dem Metallring an die Patientenhaut adaptiert (Abbildung 15). Um die hohe Lichtbrechung an der Hautoberfläche zu reduzieren, welche durch den spezifischen Brechungsindex des Stratum corneum bedingt wird, erfolgte zwischen der Haut und dem Klebering das Aufbringen eines Tropfens Crodamol-Öl (MAVIG, München), welches als Immersionsflüssigkeit diente. Dabei ist bei der Adaptation darauf zu achten, dass das Öl zwischen Haut und Klebefenster einen dünnen, luftblasenfreien Film bildet, da ansonsten Artefakte die Beurteilbarkeit des Bildes einschränken können. Auf die zweite Seite des Klebefensters wurde ein weiteres Immersionsmedium, in diesem Fall wasserhaltiges Ultraschallgel (Asmuth Medizintechnik, Minden), gegeben. An den so vorbereiteten Metallring wurde der schwenkbare KLSM-Kopf mit dem integrierten Wasserimmersionsobjektiv und dem Lasertubus angedockt. Mit dem ihn umgebenden sogenannten Gewebekegel rastete der Lasertubus mit Hilfe eines Magneten im Metallring ein (Abbildung 16) (Vivascope 1500® Bedienungsanleitung 2011). Der Gewebekegel, der mittels des Metallringes an der Haut angedockt war, bewegte die Haut in der horizontalen x-y-Achse in einer vorher festgelegten

Ausdehnung bis maximal 8x8 mm, sodass der stationäre Laser während dieser Bewegung die Ebene gleichzeitig Pixel für Pixel scannen konnte. Durch die Bewegung des Objektivs in der vertikalen z-Achse, konnten unterschiedliche Ebenen in der Tiefe der Haut gescannt werden. Mit Hilfe der integrierten Software konnten Übersichtsaufnahmen, sogenannte VivaBlocks[®], von einer Ebene, die bei einer eingestellten Aufnahmefläche von 4x4 mm aus 8x8 Einzelbildern mit einer Größe von 500x500 µm bestehen, mosaikartig erstellt werden (Abbildung 17). In der vertikalen z-Achse konnte aus diesem Mosaik schließlich ein Einzelbild ausgewählt werden. Ausgehend von diesem Einzelbild konnten nun VivaStacks[®], einzelne vertikale Ebenen in der z-Achse bis zu einer Tiefe von maximal 350 µm, aufgenommen werden. Bei diesen sogenannten VivaStacks[®] kann der vertikale Abstand der einzelnen Ebenen zueinander vom Untersucher in 1,5 µm-Schritten von 1,5 bis 4,5 µm verändert werden. Alle Bilder wurden digital im BMP-Fileformat in einer Auflösung von 1000 x 1000 Pixel gespeichert.

Zum Abschluss der Untersuchung wurde der Scanvorgang über die Software beendet, der Metallring wurde vom Gewebekonus gelöst und von der Haut des Patienten befreit. Rückstände der Immersionsflüssigkeit sowie vom Klebering an der Haut konnten durch einfaches Abwischen mit etwas Wasser oder handelsüblichen Hautdesinfektionsmitteln entfernt werden. Im Anschluss erfolgte die Reinigung des Metallringes (z.B. mit Wasser und Desinfektionsmittel). Der Klebering wurde entsorgt.

Die konfokalen Aufnahmen erfolgten hauptsächlich an Körperarealen, die gut zugänglich waren, wie den Oberschenkeln, Unterschenkeln, Oberarmen, Unterarmen, am Rücken und an der Brust. Alle Aufnahmen wurden mit dem VivaScope[®] 1500 durchgeführt, in einem Fall wurde auch das Handgerät VivaScope[®] 3000 angewendet.



Abb. 11: VivaScope® 1500 und 3000 inkl. Gerätewagen. Standort: Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung Dermatologie, Allergologie, Venerologie.



Abb. 12: Handgerät VivaScope® 3000. Standort: Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung Dermatologie, Allergologie, Venerologie.



Abb. 13: Wiederverwertbarer Gewebebring aus rostfreiem Edelstahl (MAVIG, München).



Abb. 14: Das Klebplastikfenster, mit Hilfe dessen der Ring auf der Haut befestigt wird, ist ein hygienischer Einmalartikel und wird nach der Untersuchung entsorgt (Lucid Inc. Rochester, New York, USA).

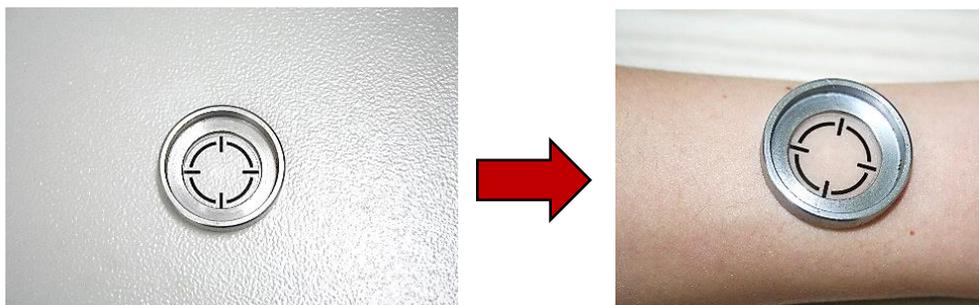


Abb. 15: Der mit einem Klebefenster versehener Metallring wird auf die gewünschte Hautpartie aufgesetzt, auf welche vorher ein Tropfen Öl aufgebracht wurde.



Abb. 16: Schwenkbarer Kopf des Vivascope® 1500 mit dem Gewebekegel (roter Pfeil) und dem Lasertubus (weißer Stern).

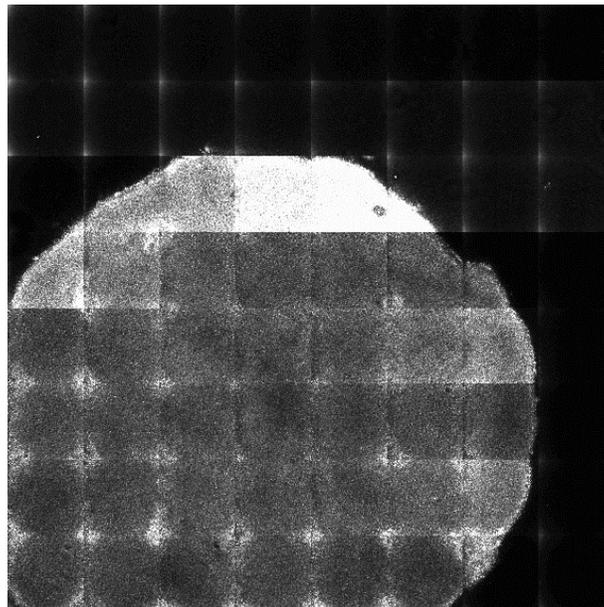


Abb. 17: Übersichtsbild einer Bulla in der Ebene des Stratum granulosum. Hier lässt sich der mosaikartige Aufbau des Bildes erkennen, welches aus 8x8 Einzelbildern mit einer Größe von jeweils 500x500 µm zusammengesetzt ist. Insgesamt ist hier eine Fläche von 4x4mm dargestellt.

2.2 Rahmenbedingungen, Patientendaten und -kollektiv

Die untersuchten Patienten, insgesamt 24 hautkranke Personen, davon je 12 Männer und 12 Frauen im Alter zwischen 7 und 90 Jahren (mittleres Alter 60 Jahre) (Tabelle 1), wurden als Patienten der Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung Dermatologie, Allergologie und Venerologie im Zeitraum vom 15.02.2013 bis 21.11.2013 im Rahmen der Behandlung bzw. Diagnostik ihrer Hauterkrankung sowohl unter ambulanten als auch unter stationären Bedingungen mit dem konfokalen Laserscanmikroskop untersucht (VivaScope® 1500 und 3000, MAVIG, München Deutschland). Die eigentliche Untersuchung mit dem auf dem deutschen und europäischen Markt zugelassenen VivaScope® 1500 und 3000 erfolgte dabei nach schriftlicher Anfrage bei der zuständigen lokalen Ethikkommission im Rahmen der klinischen Routinediagnostik. Bei 12 Patienten bestand die Diagnose eines akuten Kontaktekzems, welches durch einen standardisierten Epikutantest diagnostiziert wurde. Insgesamt 6 Patienten litten an einer lokalisierten bzw. generalisierten Varizella-Zoster-Infektion. Die Diagnose wurde bei 4 Patienten mittels Nachweis von Varizella-Zoster-DNA im Bläscheninhalt mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) bestätigt und bei 2 Patienten klinisch gestellt. Bei den Patienten mit bullösem Pemphigoid erfolgte die Diagnosestellung in allen 6 Fällen mittels der Histologie sowie der indirekten Immunfluoreszenz. In 5 Fällen wurde auch eine direkte Immunfluoreszenz durchgeführt.

Zusätzlich erfolgte bei allen oben genannten Patienten im Rahmen der klinischen Routinediagnostik auch eine Fotodokumentation durch die Fotoabteilung der Hautklinik.

	Gesamt			AKE		BP		VZVI	
Alter bei Diagnose	Mittelwert	min.	max.	Mittelwert	s	Mittelwert	s	Mittelwert	S
	60	7	90	44	19.9	80	6.9	74	4.5
Geschlecht	N	%		N	%	N	%	N	%
Mann	12	50		4	33	3	25	5	42
Frau	12	50		8	67	3	25	1	8
Gesamt	24	100		12	50	6	25	6	25

Tabelle 1: Alter und Geschlecht (s=Standardabweichung).

2.3 Strategie der KLSM-Aufnahmen

Die Untersuchung mit dem KLSM erfolgte bei 14 Patienten im Bereich einer einzigen Hautveränderung, bei 5 Patienten im Bereich von zwei räumlich verschiedenen Hautläsionen, bei 4 Patienten wurden 3 und bei einem Patienten 4 Hautveränderungen aufgenommen (siehe Tabelle 2). Bei den Mehrfachuntersuchungen wurde jeweils eine krankheitsspezifische Hauteffloreszenz an unterschiedlicher Lokalisation analysiert. Insgesamt wurden 24 Untersuchungen an der Rückenhaut, je 4 Untersuchungen an Oberschenkel, Unterarm und Brustbereich und je 2 an Oberarm und Unterschenkel durchgeführt. Daraus ergaben sich Untersuchungen von insgesamt 40 einzelnen Effloreszenzen, davon jeweils 9 der Krankheitsentitäten bullöses Pemphigoid und Herpes Zoster. Bei diesen beiden Krankheitsentitäten wurden sowohl Effloreszenzen, die mit einem Erythem und diskreten, noch mit bloßem Auge sichtbaren Vesikeln einhergingen, als auch große Bullae konfokal aufgenommen. Insgesamt 22 Effloreszenzen wurden bei der Krankheitsentität allergisches Kontaktekzem untersucht (siehe Tabelle 2). Hierbei wurden positive Reaktionen der Epikutantestung analysiert, wobei alle Reaktionstypen, von fraglich positiven beziehungsweise

einfach positiven Testergebnissen (Erythem) bis hin zu dreifach positiven Testergebnissen (Erythem, Infiltrat, Papeln, Vesikel), berücksichtigt wurden.

Die statistische Auswertung der Bilddateien des VivaScope® 1500 und 3000 erfolgte retrospektiv, nach Einholung einer Genehmigung durch die zuständige lokale Ethikkommission, mit pseudonymisierten Datensätzen. In der weiteren Folge fand der Vergleich der Ergebnisse mit anderen vorliegenden krankheitsbezogenen und diagnostischen Daten aus der klinischen Falldokumentation in den Krankenakten statt (je nach Krankheitsentität: Ergebnisse der Histologie, direkter und indirekter Immunfluoreszenz, PCR-Diagnostik und der Epikutantestung).

Alle untersuchten Patienten entsprachen dem Lichttyp II nach Fitzpatrick.

	Gesamt	AKE	BP	VZVI
gesamt	40	22	9	9
1x	14	7	4	3
2x	5	1	1	3
3x	4	3	1	-
4x	1	1	-	-

Tabelle 2: Anzahl Untersuchungen je Patient

2.3.1 Epikutantestungen

Die Epikutantestungen wurden als örtlich und zeitlich begrenzte Expositionsversuche auf der gesunden Rückenhaut der Patienten mit Verdacht auf Kontaktsensibilisierung im Rahmen der klinischen Routinediagnostik durchgeführt. Die Substanzen wurden gemäß den Richtlinien der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG) und der International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) zur Anwendung gebracht und 24 Stunden auf der Haut belassen. Die Bewertung

der Testreaktionen erfolgte nach einer Wertungsskala, welche weitgehend den Empfehlungen der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG) entspricht (Tabelle 3). Die Testablesung erfolgte immer nach 24, 48, 72 und 96 Stunden, in je einem Fall zusätzlich auch im Rahmen von weiteren Spätablesungen nach 144 Stunden und 192 Stunden, in 2 Fällen nach 168 Stunden und in einem Fall auch nach 5 Wochen (prolongierte Reaktion). Die Aufnahmen mit dem KLSM erfolgten an den Tagen der jeweiligen Ablesezeiten aber nicht zu jeweils allen Ablesezeiten. Bei 2 Patienten erfolgten die KLSM-Aufnahmen ein und desselben Testfeldes an zwei unterschiedlichen Ablesetagen. Dies war der Fall bei den Testsubstanzen Methylisothiazolinon, nach 48 (1. Ablesung) und nach 72 (2. Ablesung) Stunden sowie Lyral, nach 72 (2. Ablesung) und nach 168 (4. Ablesung) Stunden.

Die Aufnahmen mit dem KLSM erfolgten bei positiver Testreaktion auf folgende Substanzen: Nickel-(II)-Sulfat (n=3), Ylang-Ylang (n=1), Methylisothiazolinon (n=1), Lyral (n=1), Citral (n=1), Duftstoffmix (n=2), Quecksilber(II)-amid-chlorid (n=1), Dexpanthenol (n=1), Kolophonium (n=1), tert.-Butylhydrochinon (n=1), Tetramethylthiuramdisulfid (n=1), Kobalt(II)-chlorid (n=1), Natriumlaurylsulfat (n=1), Eigensubstanzen (Diltiazemhydrochlorid 2%, Lidocain, Bepanthen) (n=1), , Betaman-Augentropfen (Metipranolol-HCl) (n=1), Iodpropinylbutylcarbammat (n=1), und Timolol Augentropfen (n=1).

Außer bei den von den Patienten selbst mitgebrachten Eigensubstanzen kamen die Epikutantestreihen der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG) zur Anwendung.

Symbol für Reaktionsstärke	Erläuterung der Symbole
--	keine/negative Reaktion
?	zweifelhafte Reaktion: nur schwaches fleckförmiges Erythem, kein Infiltrat (allergisch, irritativ oder unklar)
F	wenige folliculäre Papeln (allergisch, irritativ oder unklar)
+	einfach positive allergische Reaktion: Erythem, Infiltrat, ev. diskrete Papeln
++	zweifach positive allergische Reaktion: Erythem, deutliches Infiltrat mit Vesikeln
+++	dreifach positive allergische Reaktion: Erythem, Infiltrat, dichtstehende, konfluierende Bläschen; evtl. größere Blasen, über den Testbezirk hinausgehend, evtl. kleine papulöse Satelliten in der Umgebung, Pusteln
IR	irritative Reaktion unterschiedlicher Qualität (Seifeneffekt, Ringeffekt, Blase, Nekrose)
Nt	in einem Testblock enthaltenes, aber nicht getestetes Allergen

Tab. 3: Beurteilung von Epikutantestungen nach Empfehlungen der ICDRG (Fuchs T 2007).

2.4 Strategien der Auswertung des konfokalen Bildmaterials

Bei allen drei Krankheitsentitäten erfolgte in allen Epidermisschichten bis hin zur oberen papillären Dermis die Untersuchung des konfokalen Bildmaterials auf Abweichungen von der Morphologie der gesunden Haut. Die konfokalen Bilder wurden dabei nicht direkt mit den histologischen Bildern verglichen, da nur bei 6 Fällen eine vergleichende Histologie vorlag. Des Weiteren war es nicht die Absicht dieser Arbeit einen direkten Vergleich der konfokalen Aufnahmen mit histologischen Schnittbildern durchzuführen. Dennoch wurden bei der Auswertung bekannte, für die jeweilige Krankheitsentität typische, histologische und konfokale Merkmale berücksichtigt. Für die Unterscheidung der drei vesikulobullösen Entitäten (AKE, VZVI, BP) und zur besseren Auswertbarkeit der Bilder, legten wir acht morphologische KLSM-Parameter fest, nach denen das Bildmaterial gesichtet wurde: pleomorphe Keratinozyten bzw. multinukleäre Riesenzellen, inflammatorisches Infiltrat bzw. inflammatorische Zellen, Parakeratose, Spongiose, Akantholyse, Nekrose, Vesikel bzw. Bullae und Vaskularisation bzw. erweiterte Kapillaren in den Papillenspitzen. Die Auswahl dieser Kriterien erfolgte zunächst anhand bekannter histologischer Kriterien der jeweiligen Erkrankung. Mit gleicher Gewichtung orientierten wir uns jedoch auch an bereits vorhandenen Publikationen, in denen einzelne der genannten morphologischen KLSM-Merkmale der drei Krankheitsentitäten bereits beschrieben worden waren.

Alle relevanten Daten dieser Untersuchungen wurden pseudonymisiert in einer Microsoft Access®-Datenbank (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) erfasst.

2.4.1 Morphologie ausgewählter pathologischer KLSM-Kriterien – Auszüge aus der Literatur

Pleomorphe Keratinozyten und multinukleäre Riesenzellen in der KLSM wurden von Abraham et al. (2012) als dezent hell erscheinende Strukturen mit multiplen, dunklen bis schwärzlichen, runden Elementen im Innern beschrieben. In ähnlicher Weise wurden sie als große, manchmal lobulierte Zellen, die mehrere dunkle rundliche Strukturen beeinhalteten auch von Debarbieux et al. (2013) beschrieben.

Inflammatorische Zellen in der KLSM erscheinen in der Regel als helle, runde (González et al. 1999) oder ovale Strukturen (Ardigó et al. 2007 a, Ardigó et al. 2009 b) mit einer Größe von ca. 9 bis 12 µm, die zwischen den Keratinozyten sichtbar werden (Kurzeja et al. 2014, Swindells et al. 2004). Ardigò et al. (2012) beschrieben sie in der KLSM der allergischen Kontaktdermatitis als helle runde zelluläre Strukturen, mit einem kleineren Durchmesser als Keratinozyten. In ihrer neusten Arbeit berichten Ardigò et al. (2014), dass inflammatorische Zellen beim bullösen Pemphigoid in Form von hellen, kleinen, zellulären Strukturen, ohne sichtbare Nuklei, in der papillären Dermis und in der Umgebung von dermalen Gefäßen zu finden sind. Einzelne Leukozyten-Subtypen können mittels der KLSM voneinander nicht unterschieden werden (Longo et al. 2012 a).

In pustulösen Psoriasisläsionen konnten Debarbieux et al. (2013) jedoch neutrophile Granulozyten als gelappte oder gekörnt erscheinende, nicht ganz scharf begrenzte, helle Strukturen von Lymphozyten unterscheiden. Letztere definierten sie als homogene, hell erscheinende Partikel.

Die **Parakeratose** ist definiert als gestört ablaufende Verhornung, bei der Zellkernreste in den Keratinozyten im Stratum corneum verbleiben. Sie wurde in der KLSM von Wolberink et al. (2011) und González et al. (1999) interpretiert als das Vorhandensein von einzelnen Arealen im Stratum corneum, welche helle, hochrefraktive Strukturen beinhalten. Diese Strukturen stellten die Zellkerne dar. Branzan et al. (2007) beschrieben die Zellkerne im Stratum corneum wiederum als dunkle Strukturen. Swindells et al. (2004) haben in ihrer vergleichenden Arbeit zu morphologischen Unterschieden beim allergischen und irritativen Kontaktekzem sowohl helle als auch dunkle Strukturen als Zellkerne im Sinne einer Parakeratose gesehen. Sie erklärten die helle Erscheinung der Nuklei durch eine Interaktion der Testsubstanz Natriumlaurylsulfat mit den Keratinozyten, durch welche vermutlich der Brechungsindex der Zellkerne verändert wird.

Die **Spongiose** ist eine Auflockerung der Zellgrenzen innerhalb der Epidermis. Ardigò et al. (2007 a, 2012 und 2014) beschrieben sie als Areale im Stratum spinosum und Stratum granulosum, die im Kontrast zum umgebenden Epithel insgesamt dunkler erscheinen und erweiterte Interzellulärräume aufweisen.

Die als Lösung des Zellverbandes der Keratinozyten und somit als dem Auftreten von einzeln stehenden Keratinozyten innerhalb der Epidermis bezeichnete **Akantholyse** wurde im Rahmen der Impetigenisierung der pustulösen Psoriasis von Debarbieux et al. (2013) mit dem Vorhandensein von großen, runden bis polygonal geformten, weniger hell erscheinenden Zellen, definiert.

Die **Nekrose** beziehungsweise nekrotische Zellen stellen sich in der KLSM als Aggregate heller zellulärer Strukturen (Abraham et al. 2012), respektive als blass erscheinende, unscharf begrenzte, rundliche bis polygonale Zellen, die zwischen dem Zellverband der Keratinozyten zu finden sind, dar (Ardigò et al. 2007 a).

Vesikel bzw. Bullae wurden von Ardigò et al. (2014) beim bullösen Pemphigoid als scharf begrenzte, dunkle Areale, die hell erscheinende, runde zelluläre Strukturen ohne sichtbaren Nukleus beinhalten, beschrieben.

Ardigò et al. (2007 a) berichteten bei der Untersuchung von Läsionen des Lupus erythematoses über prominente, rundliche oder lineare, dunkle kanalikuläre Strukturen innerhalb der dermalen Papillen, die in Korrelation zur Histologie, **erweiterte Blutgefäße** im Bereich der superfiziellen Dermis darstellen.

2.5 Methodik der statistischen Analyse

Im Rahmen der statistischen Auswertung der konfokalen Aufnahmen wurden die acht oben genannten morphologischen Parameter jeweils in drei verschiedenen Kategorien (Tiefe, Score und Verteilung) bewertet. Dabei wurde zwischen ihrem Vorhandensein in den einzelnen Epidermisschichten (**Tiefe**), ihrer Ausprägung insgesamt und in der einzelnen Epidermisschicht (**Score**) sowie ihrer **Verteilung** in der am meisten betroffenen Epidermisschicht unterschieden. Um Gruppen an Klassifikatoren zu identifizieren, die ähnliche Informationen pro Untersuchung beinhalten bzw. eine signifikante Korrelation untereinander zeigten, wurde die paarweise Rang-Korrelation nach Spearman berechnet. Somit ergaben sich als Basis der statistischen Auswertung 19 verschiedene morphologische Klassifikatoren (z.B. „Spongiose mäßig ausgeprägt“ oder

„inflammatorisches Infiltrat im Stratum spinosum“) desweiteren Angaben bezüglich Alter und Geschlecht, sodass in der Summe 21 Klassifikatoren in die statistische Auswertung einbezogen wurden (Tabelle 5).

Mittels einer semiquantitativen Wertungsskala wurde die **Verteilung** der morphologischen Veränderungen bewertet als: 0= 'nicht vorhanden', 1= 'spärlich', 2= 'mäßig dicht liegend', 3= 'sehr dicht liegend'.

Der **Score** (Ausprägung des jeweiligen morphologischen Parameters) wurde bewertet als: 0= 'nicht vorhanden', 1= 'gering', 2= 'mäßig', 3= 'stark'.

Die **Tiefe** wurde bewertet als: 1= Str. corneum, 1-2= Str. corneum/ granulosum, 2= Str. granulosum, 2-3= Str. granulosum/ spinosum, 3= Str. spinosum, 3-4= Str. spinosum/ basale, 4= Str. basale, 4-5= Str. basale/ dermoepidermale Junktionszone (DEJ), 5= dermoepidermale Junktionszone (DEJ). Da die einzelnen Parameter in mehreren Regionen der Epidermis beobachtet werden konnten, wurde für die Datenauswertung die mittlere Tiefe je Parameter berechnet, wobei die hauptsächlich betroffene Epidermisschicht mit doppeltem Gewicht berücksichtigt wurde. Eine Übersicht über die morphologischen Parameter sowie die Klassifikatoren und deren Signifikanz ist in Tabelle 5 dargestellt. Zur Bestimmung der Homogenität der Verteilung der Klassifikatoren und des Geschlechtes wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Zur Bestimmung der Homogenität des Alters wurde Fishers exakter Test durchgeführt.

2.5.1 Univariate statistische Analyse

Zur univariaten Prüfung der diagnostischen Güte der einzelnen Klassifikatoren wurde die Fläche unter einer ROC-Kurve (AUC: *area under the curve*) mittel logistischer Regression geschätzt (Fawcett 2006). Dabei wurde sowohl jeweils eine Erkrankung versus der beiden anderen, als auch eine „Three-Way-ROC“ bestimmt (Dreiseitl et al. 2000, Mossman 1999) (Tabelle 6). Erstere kann darauf hinweisen, ob die Ausprägung eines Klassifikators einen speziellen Hinweis auf eine der Krankheitsentitäten gibt. Die „Three-Way ROC“ kann darauf hinweisen, ob die Ausprägung eines Klassifikators zur Unterscheidung aller drei Krankheitsentitäten geeignet ist.

Die a posteriori-Vorhersage-Wahrscheinlichkeit der Erkrankungen wurde aus dem Model berechnet, gegeben dass alle drei Erkrankungen a priori gleich wahrscheinlich sind.

2.5.2 Multivariate statistische Analyse

Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden Klassifikatoren identifiziert, die durch Vorwärtsselektion bei einer geringen Eintrittsschranke ($p < 0.5$) in ein multinomiales Diagnosemodell eingefügt werden konnten. Dieser Schritt wurde eingebettet in einen Bootstrap Algorithmus, d.h. er wurde 1000-mal wiederholt, wobei aus den beobachteten Werten eine Zufalls-Stichprobe derselben Größe (Resampling) gezogen wurde. Die Häufigkeit jedes einzelnen Klassifikators beim Resampling ins Diagnosemodell aufgenommen zu werden, diente als Analyseergebnis. Die multidimensionale Struktur der Klassifikatoren wurde zusätzlich mittels Korrespondenz-Analyse untersucht und visualisiert.

Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der SAS-Software, Version 9.3 (SAS (Statistical Analysis System) Institute Inc., Cary, NC, USA).

III. Ergebnisse

3.1 Deskriptive Analyse morphologischer KLSM-Kriterien

3.1.1 Patientenkollektiv beim allergischen Kontaktekzem

Es wurden 12 Patienten nach durchgeführter Epikutantestung und positivem Testergebnis im Sinne einer kontaktallergischen Reaktion mit dem KLSM untersucht. Bei Patienten, die auf mehrere Substanzen in der Testung positiv reagierten, wurden die konfokalen Aufnahmen jeweils auf den einzelnen positiven Testfeldern durchgeführt. Es wurden nicht mehr als 4 positive Epikutantestreaktionen pro Patient konfokal aufgenommen. In der Summe ergaben sich dabei 22 einzelne KLSM-Aufnahmen von positiven Testreaktionen (Tabelle 2).

Innerhalb von 6 der 22 mit dem KLSM aufgenommenen Testfeldern zeigten sich klinisch schwache Reaktionen mit einem Erythem ohne sichtbare Papeln, Bläschen oder Infiltrat. Bei 10 der aufgenommenen Testfelder war eine einfach positive allergische Reaktion mit einem Erythem, Infiltrat und diskreten Papeln erkennbar. Zweifach positive allergische Reaktionen mit einem Erythem sowie einem deutlichen Infiltrat mit Vesikeln wurden bei 5 verschiedenen Patienten, eine dreifach positive allergische Reaktion, die sich mit einem Erythem, deutlichem Infiltrat und dichtstehenden, konfluierenden, über den Testbezirk hinausgehenden Bläschen darstellte, wurde bei einem Patienten konfokal aufgenommen (Abbildungen 18 und 19).

3.1.2 Morphologische Kriterien des allergischen Kontaktekzems in der KLSM

Die allergische Kontaktdermatitis war zunächst gekennzeichnet durch ein intaktes Stratum corneum. In 8 von 22 Fällen (36,4 %), unabhängig vom klinischen Schweregrad der Reaktion, zeigte sich eine gering bis mäßig ausgeprägte Parakeratose im Sinne von sichtbaren Nuklei in den hier normalerweise zellkernlosen Korneozyten (Abbildungen 20 und 21).

Ein inflammatorisches Infiltrat ließ sich in allen 22 Fällen nachweisen. Dabei waren die Entzündungszellen in 16 Fällen (72,7 %) spärlich, in 4 Fällen (18,2 %) mäßig dicht liegend und in 2 Fällen (9,1 %) sehr dicht liegend verteilt. Insgesamt fanden sich inflammatorische Zellen

(Abbildung 22) am häufigsten im Bereich des Stratum granulosum und des Stratum spinosum, wobei sich die maximale Ausprägung im Stratum spinosum zeigte.

In 8 von 22 Fällen (36,4 %) fand sich eine gering ausgeprägte und in 10 Fällen (45,5 %) eine mäßig ausgeprägte Spongiose. Nur in 4 Fällen (18,2 %) ließ sich eine deutliche (starke) Spongiose detektieren. Die maximale Ausprägung der Spongiose war dabei im Übergangsbereich vom Stratum granulosum zum Stratum spinosum, also bei allen untersuchten Testfeldern, deutlich in den oberen Epidermisschichten zu finden.

Auch wenn die Reaktion klinisch als zweifach oder dreifach positiv bewertet wurde (in 6 von 22 Fällen) ließ sich eine eindeutige Korrelation der Ausprägung und Verteilung des inflammatorischen Infiltrates sowie der Spongiose in dem hier zur Verfügung stehenden Kollektiv nicht feststellen.

In 5 von 22 Fällen fanden sich beim allergischen Kontaktekzem keine Vesikel in den konfokalen Aufnahmen. Diese 5 Fälle waren klinisch geprägt von einem Erythem, welches jedoch nur wenig bis kaum infiltriert war und auch in der klinischen Untersuchung mit dem bloßen Auge keine Vesikel erkennen ließ.

Waren Mikrovesikel in den KLSM-Aufnahmen vorhanden, zeigten sich diese streng intraepidermal und überwiegend im Stratum granulosum und Stratum spinosum (Abbildungen 20 und 22). In 9 von 22 Fällen (40,9 %) waren die Vesikel mäßig bis sehr dicht liegend verteilt. In 5 dieser 9 Fälle (55,5 %) zeigte sich auch klinisch eine deutliche zwei- bis dreifach positive Reaktion. In den übrigen 4 Fällen war klinisch eine einfach positive Reaktion mit Erythem und diskretem Infiltrat zu sehen. In 8 von 22 Fällen fand sich eine spärliche Verteilung der Mikrovesikel. Die Hälfte dieser Fälle zeichnete sich durch eine sehr schwache klinische Reaktion aus (nur Erythem, kein Infiltrat). Bei 3 der 8 Fälle zeigte sich eine einfach positive (Erythem, geringes Infiltrat und diskreten Papeln), in einem Fall eine zweifach positive Reaktion (Erythem, deutliches Infiltrat mit Vesikeln).

Somit lag eine gute Korrelation zwischen der quantitativen Ausprägung sowie Verteilungsdichte der Mikrovesikel einerseits und der klinischen Ausprägung der allergischen Reaktion andererseits vor.

Ergebnisse

In allen Fällen fand sich eine gesteigerte Vaskularisation, die in 2 von 22 Fällen deutlich bzw. stark ausgeprägt war. Eine eindeutige Korrelation der Ausprägung der Vaskularisation mit der klinischen Reaktion konnte nicht gesehen werden.

Akantholyse, Nekrose, Riesenzellen oder andere epidermale Veränderungen waren beim AKE nicht signifikant vertreten (Tabelle 4).

Zusammenfassend ließ sich eine Korrelation der AKE mit einem geringen Score bei Entzündung, Spongiose und Parakeratose sowie mit intraepidermalen, vorwiegend im Stratum spinosum lokalisierten Mikrovesikeln feststellen. Weiterhin war die Diagnose eines allergischen Kontaktekzems im beobachteten Kollektiv mit einem Alter unter 65 Jahren assoziiert (Tabelle 5).

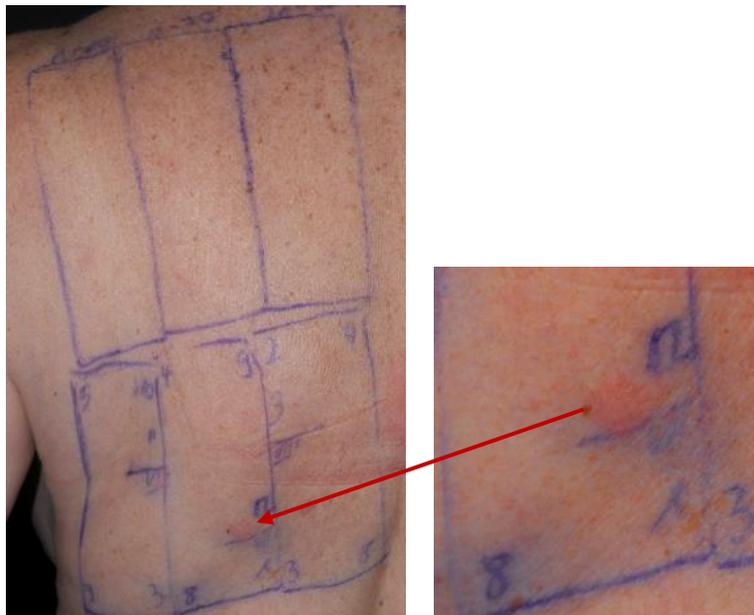


Abb. 18 und 19: Epikutantestung am Rücken einer Patientin aus dem oben genannten Kollektiv.

Beispiel einer zweifach positiven Reaktion mit Erythem, Infiltrat und diskreten Papeln bei durchgeführter Epikutantestung auf die Testsubstanz Methylisothiazolinon, hier im Testfeld 12 zu sehen.

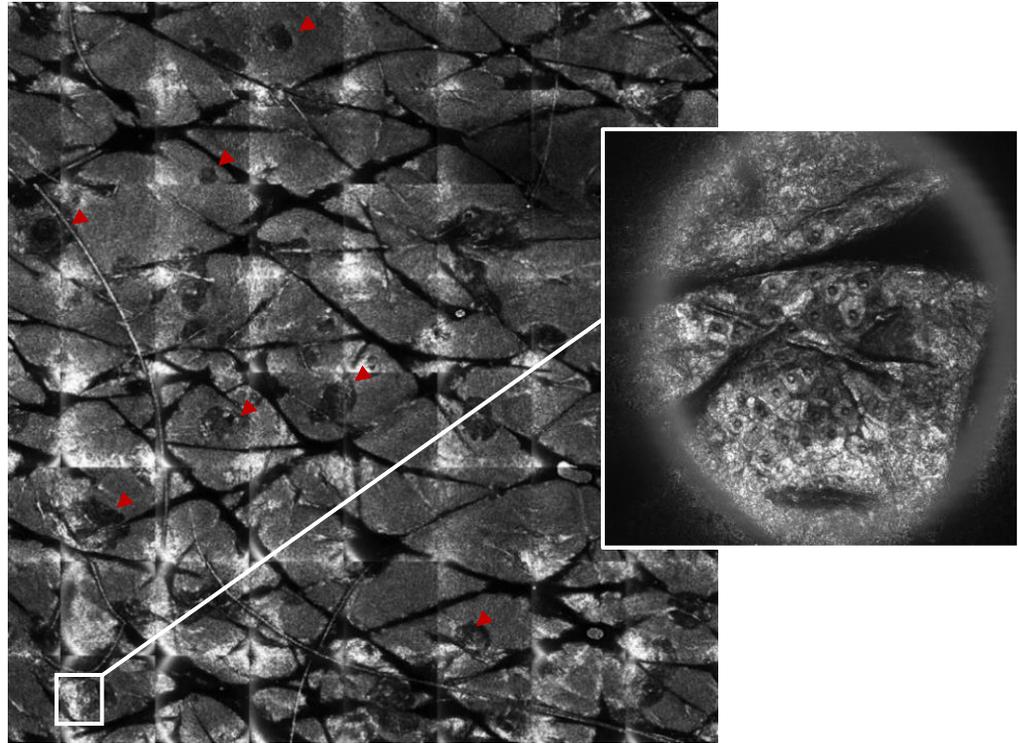


Abb. 20 und 21: Übersichtsbild (4 x 4 mm) aus dem Bereich des Str. granulosum mit zahlreichen Mikrovesikeln (Pfeilköpfe) (linkes Bild). Im linken unteren Bildrand, im hier mit angeschnittenem Str. corneum, sieht man parakeratotische Zellen mit erhaltenem Zellkern (verdeutlicht in der Vergrößerung, Bildgröße 500x500 µm, im rechten Bild).

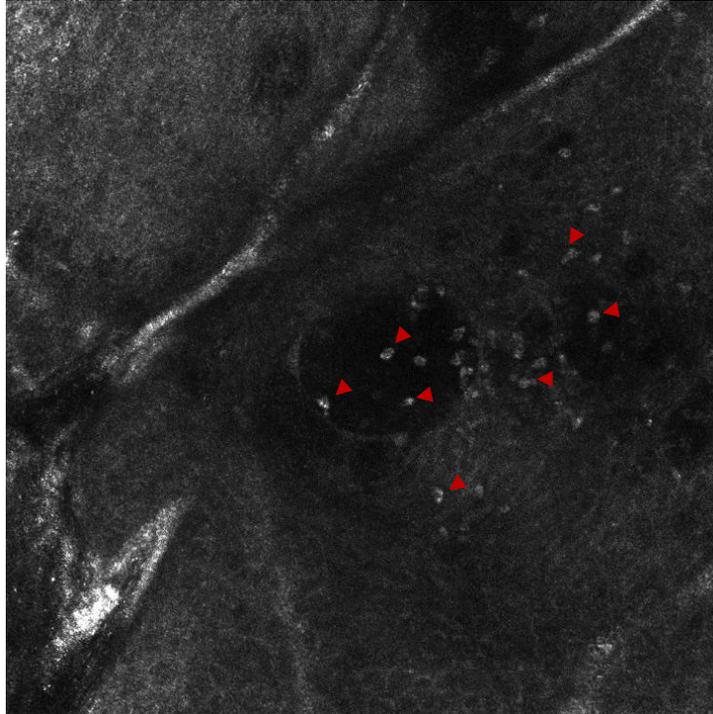


Abb. 22: Mikrovesikel (Bildmitte) mit umgebenden und intrakavalen inflammatorischen Zellen (Pfeilköpfe) im Bereich des oberen Str. spinosum. Die Zellgrenzen des Str. spinosum sind verwaschen im Sinne einer Spongiose (Bildgröße 500 x 500 μm).

3.1.3 Patientenkollektiv bei der Varizella-Zoster-Infektion

Insgesamt 6 Patienten mit einer Varizella-Zoster-Infektion wurden mit dem KLSM untersucht. Bei der Hälfte der Patienten erfolgten jeweils 2 konfokale Aufnahmen unterschiedlich lokalisierter Läsionen. Somit ergaben sich 9 KLSM-Aufnahmen von zostertypischen Effloreszenzen (Abbildungen 23 und 24, Tabelle 2).

3.1.4 Morphologische Kriterien der Varizella-Zoster-Infektion in der KLSM

Die Varizella-Zoster-Infektion zeichnete sich in der konfokalen Mikroskopie in allen Fällen durch intraepidermale Strukturdefekte aus, die wir nachfolgend als vesikuläre Defekte bzw. Vesikel bezeichnen werden (Abbildungen 25, 27 und 28). Diese Vesikel konfluieren in den betroffenen

Hautarealen unterhalb eines intakten Stratum corneum in allen weiteren Schichten der Epidermis teils zu größeren Hohlräumen. In den ausnahmslos streng intraepidermalen Vesikeln fanden sich mehrkernige vergrößerte Keratinozyten, sogenannten Riesenzellen, sowie ballonierte, nekrotische und akantholytischen Keratinozyten (Abbildungen 26 und 29). Diese waren, außer im Stratum corneum, in allen Epidermisschichten mäßig bis sehr dicht liegend vorhanden, wobei die maximale Ausprägung im Stratum spinosum und Stratum basale zu finden war.

Überwiegend dicht liegende inflammatorische Zellen, mit einer Häufung im unteren Bereich des Stratum spinosum, waren zwischen den nekrotischen Keratinozyten, dem Zelldebris und den Riesenzellen sichtbar (Abbildungen 26 und 29). Eine Spongiose ließ sich in 7 von 9 Fällen (77,8 %), davon in 5 von 7 Fällen mäßig ausgeprägt, in einem Fall stark und in einem Fall gering ausgeprägt, vor allem im Bereich des Stratum spinosum ausmachen (Tabelle 4).

Eine stark gesteigerte Vaskularisation ließ sich nicht detektieren. Jedoch waren in 5 von 9 Läsionen leicht bis mäßig erweiterte Gefäße sichtbar.

In 2 der 9 Fälle lag ein sehr frühes Stadium der Infektion vor. Klinisch waren hier kaum Vesikel zu sehen, jedoch bereits ein Erythem. Diese beiden Fälle zeigten interessanterweise in der KLSM dieselbe, oben beschriebene Morphologie jedoch mit insgesamt kleineren, noch nicht konfluierenden intraepidermalen Vesikeln, einer gering bis mäßig ausgeprägten Spongiose in der unmittelbaren Umgebung der Vesikel sowie ein eher spärliches inflammatorisches Infiltrat. Akantholyse, Nekrose sowie die Verteilung der pleomorphen Riesenzellen waren jedoch innerhalb der vorhandenen Vesikel vergleichbar stark ausgeprägt wie in den klinisch fortgeschrittenen Zoster-Stadien (Abbildungen 25 und 26).

Zusammenfassend betrachtet war die Varizella-Zoster-Infektion charakterisiert durch das Vorhandensein von intraepidermaler Akantholyse, Nekrose und Pleomorphen Keratinozyten bzw. Riesenzellen.

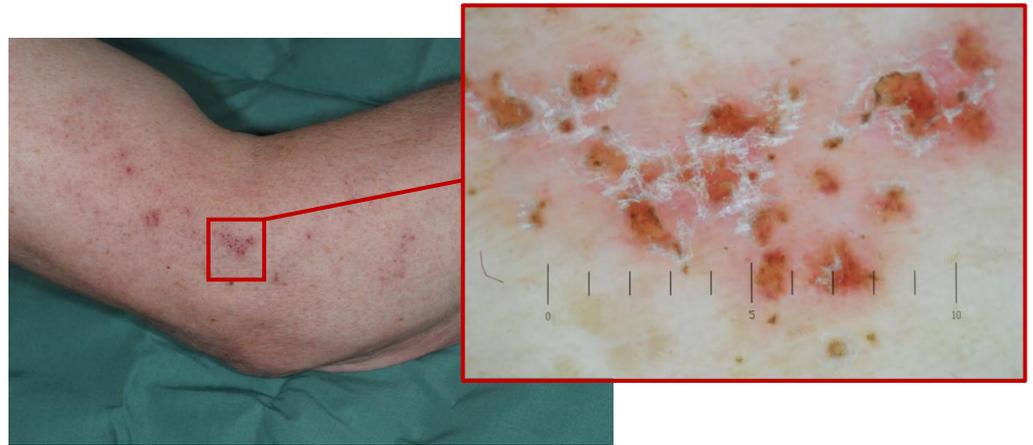


Abb. 23 und 24: VZVI im Dermatome C7/ C8 rechts. Das linke Bild zeigt eine Übersichtsaufnahme des rechten Ellenbogens, das rechte Bild die dermatoskopische Darstellung der Läsion mit Krusten und Bläschen.

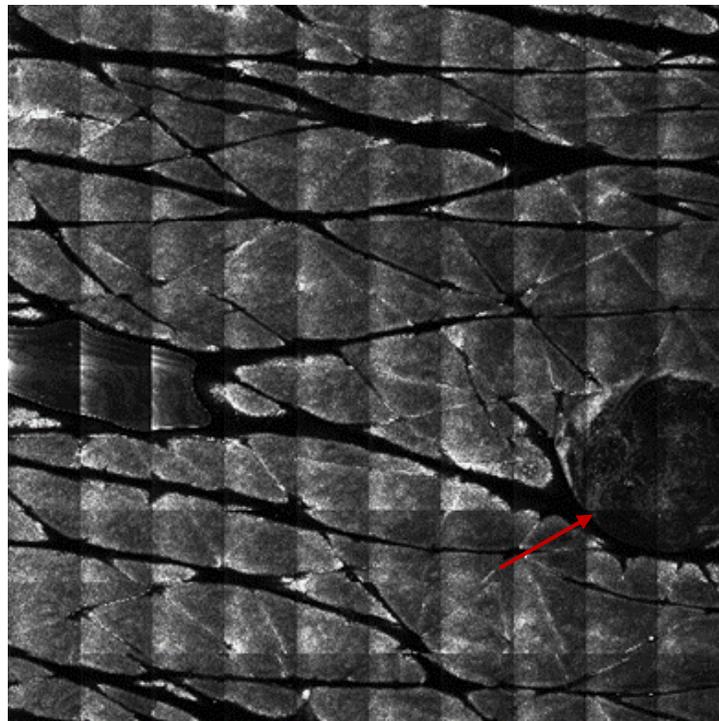


Abb. 25: VZVI im klinischen Anfangsstadium. Übersichtsbild (Bildgröße 4 x 4 mm). aus dem Bereich des Str. spinosum. Ganz rechts im Bild (roter Pfeil) ist ein Vesikel zu sehen, die Entzündungszellen, akantolytische und nekrotische Zellen, pleomorphe Riesenzellen und Zelldetritus beinhaltet (siehe dafür auch Abb. 26).

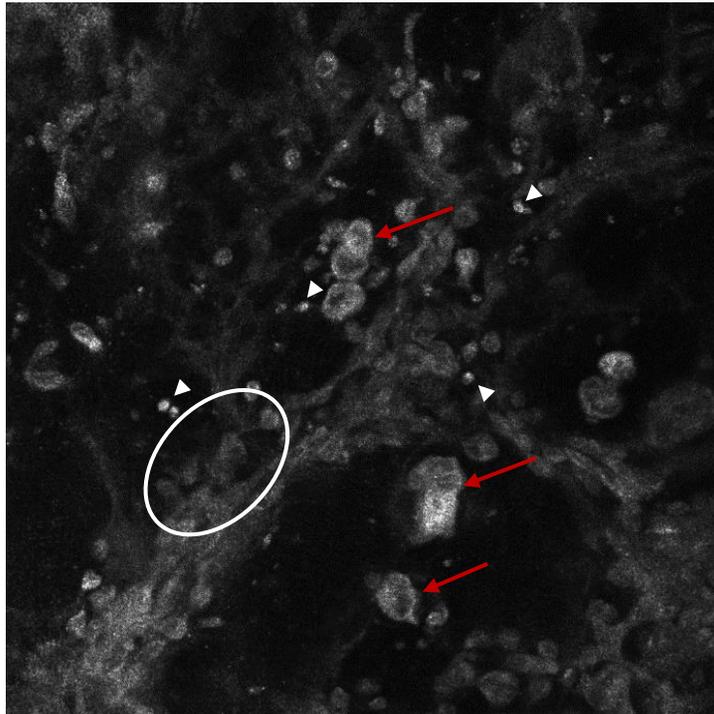


Abb. 26: VZVI im klinischen Anfangsstadium. Vergrößerte Aufnahme aus dem Inneren des Vesikels (Einzelbild aus einem Stack des Übersichtsbildes von Abb. 25), Bildgröße 500x500 μm . Die roten Pfeile markieren mehrkernige Riesenzellen, die weißen Pfeilköpfe inflammatorische Zellen. Innerhalb der Ellipse sind akantholytische und nekrotische Zellen zu sehen.

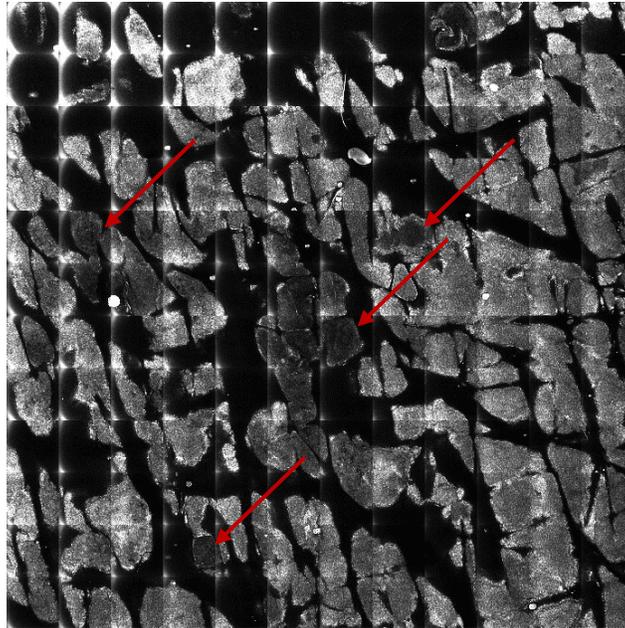


Abb. 27: VZVI. Übersichtsbild aus dem oberen Str. spinosum mit Strukturdefekten/ Vesikeln (Pfeile) als Inseln zwischen spongiosisch aufgelockerten Zellgrenzen. Bildgröße 4x4 mm.

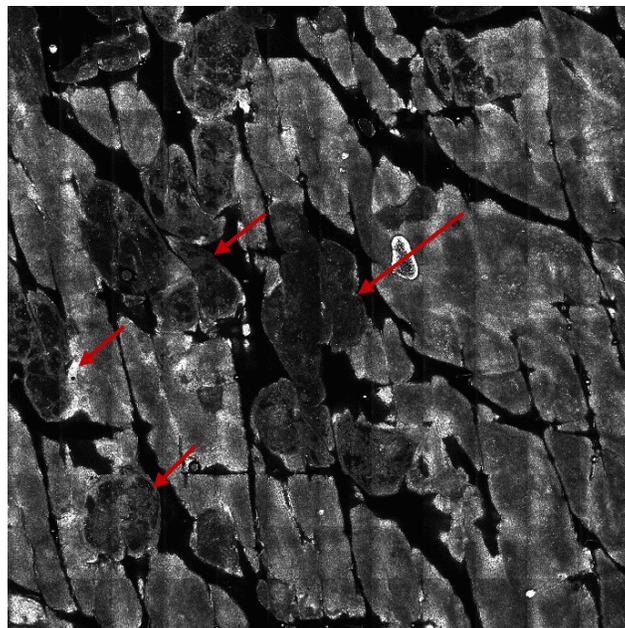


Abb. 28: VZVI. Übersichtsbild aus dem Bereich des unteren Str. spinosum bzw. des Str. basale mit sich hier deutlicher demarkierenden Strukturdefekten bzw. Vesikeln (Pfeile). Bildgröße 4x4 mm.

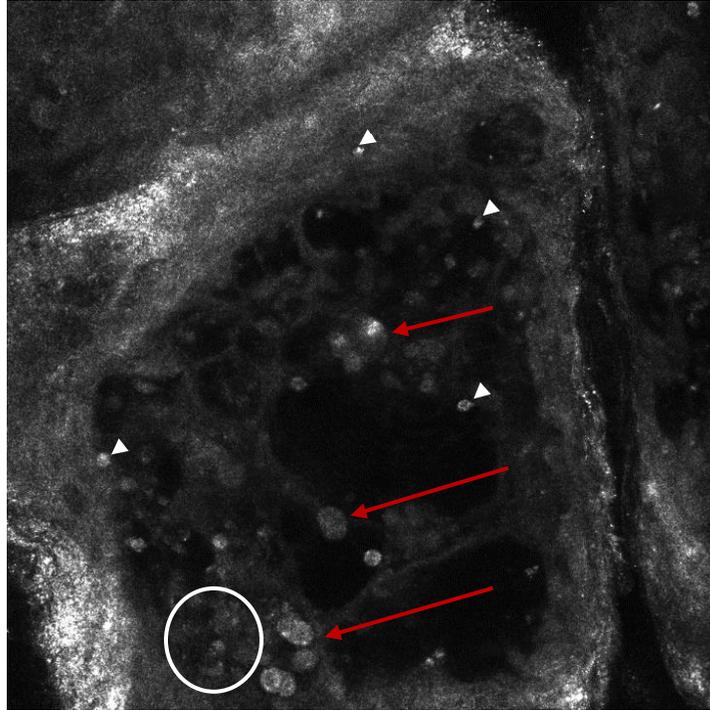


Abb. 29: Vergrößerte Aufnahme (Einzelbild aus einem Stack) aus dem Bereich des Str. spinosum. Der gekammerte Hohlraum (Vesikel) enthält ballonierte, akantholytische Keratinozyten, mehrkernige Riesenzellen (rote Pfeile), nekrotische Zellen (weißer Kreis) sowie Entzündungszellen (weiße Pfeilköpfe). Bildgröße 500x500 μm .

3.1.5 Patientenkollektiv beim bullösen Pemphigoid

Es wurden insgesamt 9 intakte Vesikel bei 6 Patienten mit bullösem Pemphigoid mittels des KLSM untersucht (Abbildung 30). Bei 4 Patienten wurde jeweils eine Läsion, bei einem Patienten 2 Läsionen und bei einem Patienten 3 Läsionen konfokal aufgenommen (Tabelle 2).

3.1.6 Morphologische Kriterien des bullösen Pemphigoids in der KLSM

Charakteristischerweise fanden sich beim bullösen Pemphigoid in 100 % der Fälle ein vollkommen intaktes Stratum corneum und Stratum granulosum. Auch das obere Stratum spinosum zeigte ein durchgehendes Honigwabenmuster (Abbildungen 31 bis 33), welches in tiefer liegenden

Schichten jedoch bereits ödematös aufgelockerte Zellgrenzen im Sinne einer Spongiose aufwies (Abbildung 35). Die Spongiose war in 5 von 9 Fällen mäßig und in 4 von 9 Fällen stark ausgeprägt. Auch inflammatorische Zellen im Sinne einer Exozytose waren sichtbar, mit maximaler Ausprägung im Bereich des Stratum basale (Abbildungen 36 und 37). Die Ausprägung des inflammatorischen Infiltrates variierte dabei von gering bis zu mäßig und stark (jeweils 1/3 der Fälle). In 8 von 9 Fällen waren die inflammatorischen Zellen mäßig dicht bis sehr dicht liegend verteilt, nur in einem Fall zeigte sich eine spärliche Verteilung.

Im Übergang vom tiefen Stratum spinosum zum Stratum basale sah man regelmäßig ein deutlich zunehmendes interzelluläres Ödem (Abbildungen 34 und 35). Bei klinisch deutlich sichtbaren Blasen im gescannten Areal war in 9 von 9 KLSM-Aufnahmen ab dem Stratum basale eine Blasenbildung bzw. ödematöse Auflockerung der Zellgrenzen sichtbar. In 6 von 9 Fällen (66,7%) zeigten sich mit zunehmender Scan-Tiefe teilweise große, teils konfluierende, flüssigkeitsgefüllte Hohlräume. Innerhalb der Vesikel und Bullae fanden sich zahlreiche inflammatorische Zellen sowie auch Zelldetritus (Abbildungen 36 und 37).

Eine gering bis mäßig gesteigerte Vaskularisation konnte in 6 von 9 Fällen gesehen werden, eine stark ausgeprägte Vaskularisation in 1 Fall. Aufgrund ausgeprägter Strukturdefekte im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone und der damit aufgehobenen Papillen- bzw. Reteleistenformation konnte die Vaskularisation in 2 Fällen nicht beurteilt werden.

In 2 von 9 Fällen fand sich eine gering ausgeprägte Parakeratose. Eine Akantholyse sowie eine Nekrose fanden sich jeweils nur in einem von 9 Fällen. Pleomorphe Keratinozyten wurden in 9 von 9 Fällen nicht beobachtet (Tabelle 4).

Fasst man zusammen, so war das bullöse Pemphigoid durch das Vorhandensein von Entzündungszellen, einer Spongiose sowie von Vesikeln und Bullae in den tiefen Epidermisschichten bzw. in der dermoepidermalen Junktionszone charakterisiert.



Abb. 30: Multiple, teils hämorrhagische Bullae am rechten Arm einer 76-jährigen Frau bei bullösem Pemphigoid.

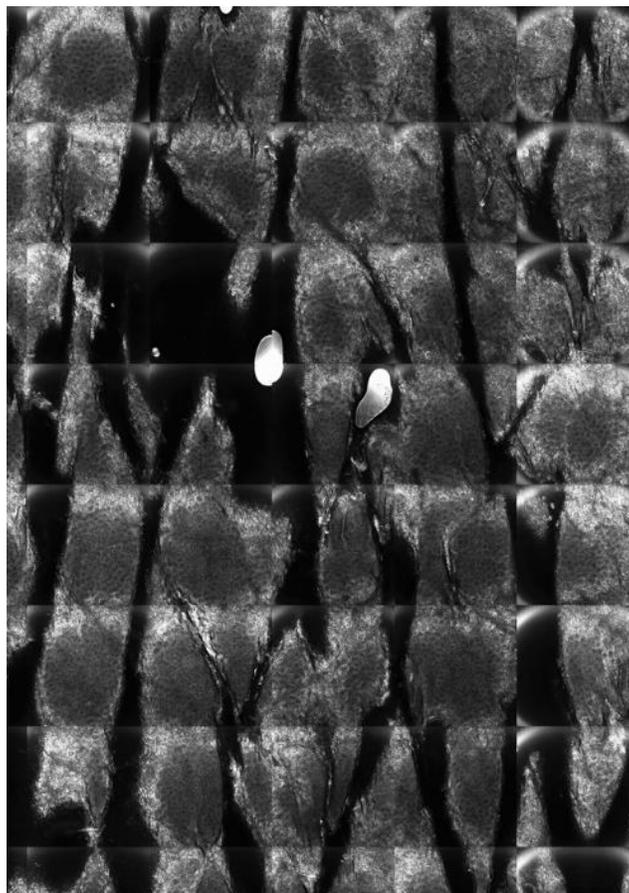


Abb. 31: Ausschnitt aus einem 4x4 mm Übersichtsbild im Bereich des Str. corneum am Übergang zum Str. granulosum mit erhaltenem Honigwabenmuster des Str. granulosum.

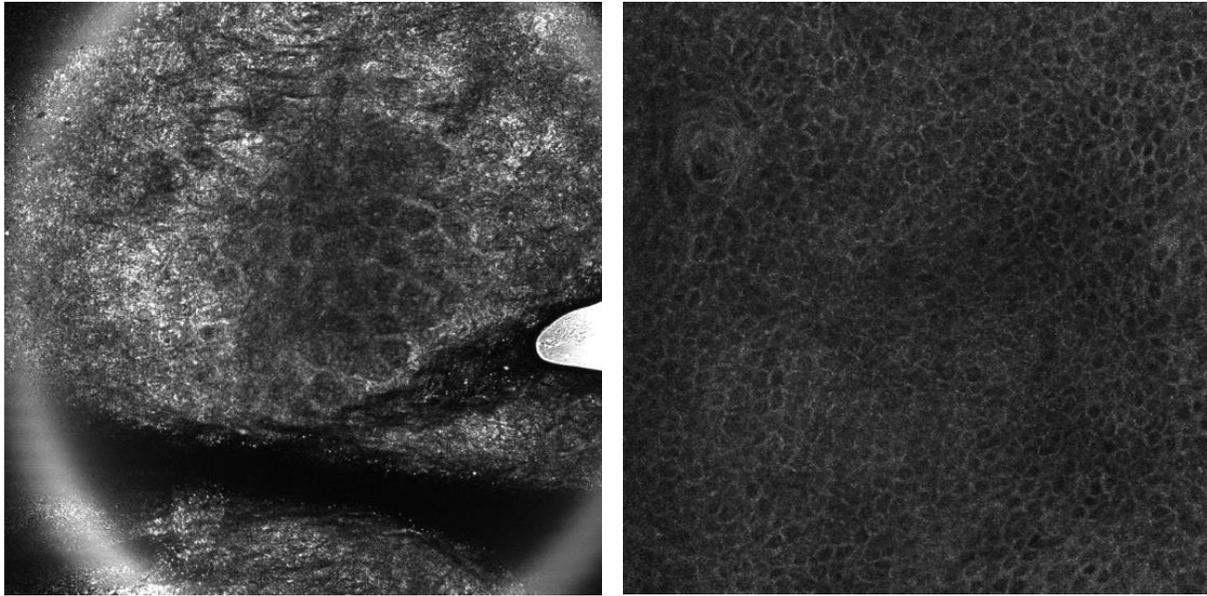


Abb. 32 und 33: Detailbilder aus dem Übergang vom Str. corneum in das Str. granulosum (li. Bild) sowie aus dem Bereich des Str. spinosum (re. Bild) mit jeweils erhaltener Zellformation und intakten Zellgrenzen. Zeichen der Spongiose sind nicht zu erkennen. Bildgröße 500x500 μ m.

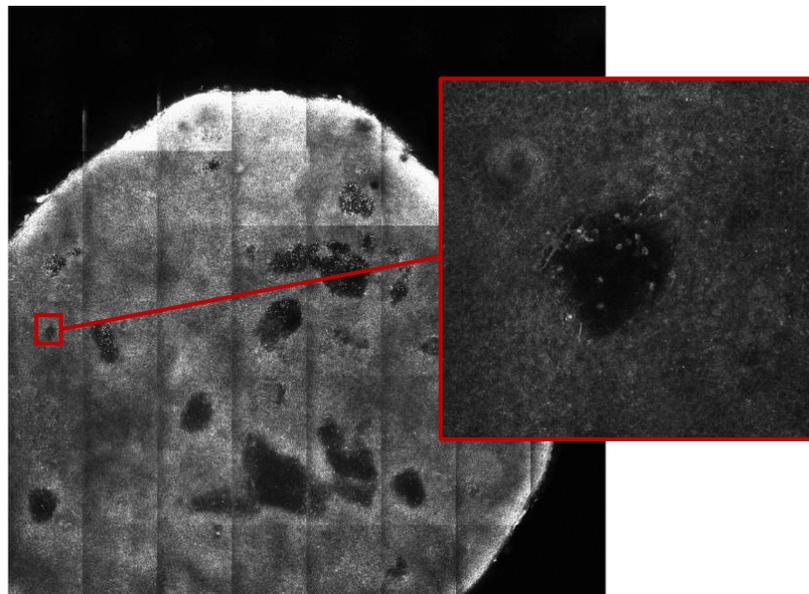


Abb. 34 und 35: Im Bereich des unteren Str. spinosum am Übergang zum Str. basale aus der deutlich ausgeprägten Spongiose ausgehende ödematöse epidermale Auflockerung mit beginnender Vesikelbildung. Innerhalb der Vesikel zahlreiche inflammatorische Zellen. Bildgröße links 4x4 mm, rechts 500x500 μ m.

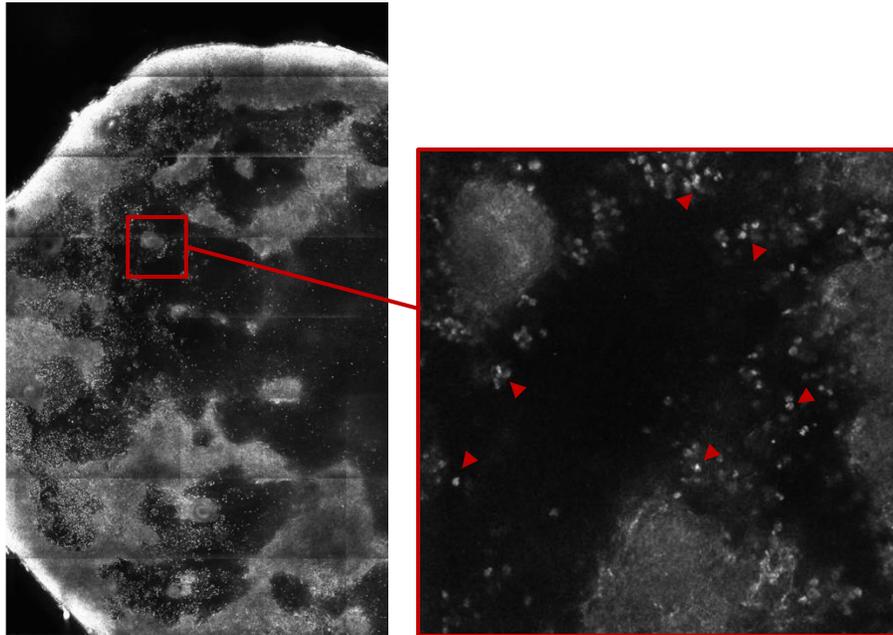


Abb. 36 und 37: Ausschnitt aus einem Übersichtsbild (4x4 mm) einer größeren Bulla im Bereich der DEJ (linkes Bild) mit großen, flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen, in denen zahlreiche inflammatorische Zellen (Pfeilköpfe im rechten Bild) sowie Zelldebris zu sehen sind. Das rechte Bild stellt einen 500x500 μm großen Ausschnitt aus dem Übersichtsbild dar.

	AKE	BP	VZVI	Summe
Entzündungs-Score				
Gering	15	3	2	20
Mäßig	7	3	4	14
Stark	0	3	3	6
Summe	22	9	9	40

	AKE	BP	VZVI	Summe
Entzündungs-Verteilung				
spärlich	16	1	1	18
mäßig dicht liegend	4	4	6	14
sehr dicht liegend	2	4	2	8
Summe	22	9	9	40
Spongiose-Score				
nicht vorhanden	0	0	2	2
gering	8	0	1	9
mäßig	10	5	5	20
stark	4	4	1	9
Summe	22	9	9	40
Parakeratose-Score				
nicht vorhanden	14	7	8	29
gering	6	2	1	9
mäßig	2	0	0	2
Summe	22	9	9	40
Vesikel/ Bullae-Verteilung				
nicht vorhanden	5	0	0	5
spärlich	8	3	5	9
mäßig dicht liegend	8	5	2	15

	AKE	BP	VZVI	Summe
sehr dicht liegend	1	1	2	11
Summe	22	9	9	40
Nekrose-Score				
nicht vorhanden	21	8	0	29
gering	1	0	0	1
mäßig	0	1	5	6
stark	0	0	4	4
Summe	22	9	9	40
Akantholyse-Score				
nicht vorhanden	21	8	0	29
gering	0	1	0	1
mäßig	1	0	1	2
stark	0	0	8	8
Summe	22	9	9	40
Pleom. Keratinozyten/ Riesenzellen-Verteilung				
nicht vorhanden	22	9	0	31
spärlich	0	0	2	2
mäßig dicht liegend	0	0	5	5
sehr dicht liegend	0	0	2	2
Summe	22	9	9	40

	AKE	BP	VZVI	Summe
Entzündungs-Tiefe				
Str. granulosum/ spinosum	8	0	3	11
Str. spinosum	12	0	5	17
Str. spinosum/ basale	2	0	1	3
Str. basale	0	8	0	8
Str. basale/ DEJ	0	1	0	1
Summe	22	9	9	40
Spongiose-Tiefe				
nicht vorhanden	0	0	2	2
Str. granulosum/ spinosum	13	0	2	15
Str. spinosum	8	0	5	13
Str. spinosum/ basale	1	7	0	8
Str. basale	0	1	0	1
Str. basale/ DEJ	0	1	0	1
Summe	22	9	9	40
Nekrose-Tiefe				
nicht vorhanden	21	8	0	29
Str. corneum	1	0	0	1
Str. granulosum/ spinosum	0	0	3	3
Str. spinosum	0	0	4	4

	AKE	BP	VZVI	Summe
Str. spinosum/ basale	0	1	2	3
Summe	22	9	9	40
Akantholyse-Tiefe				
nicht vorhanden	21	8	0	29
Str. granulosum/ spinosum	0	0	2	2
Str. spinosum	1	1	7	9
Summe	22	9	9	40
Pleom. Keratinozyten/ Riesenzellen-Tiefe				
nicht vorhanden	22	9	0	31
Str. granulosum/ spinosum	0	0	3	3
Str. spinosum	0	0	2	2
Str. spinosum/ basale	0	0	4	4
Summe	22	9	9	40

Tabelle 4: Einzelbeobachtungen

Ergebnisse

Morphologische Parameter	Variable Klassifikatoren	p-Wert* der Klassifikatoren
Parakeratose	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.798
Spongiose	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.050
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	<0.001
Mikrovesikel/ Vesikel/ Bullae	Verteilung (spärlich/ mäßig dicht liegend/ sehr dicht liegend)	0.018
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	0.018
Akantholyse	vorhanden/ nicht vorhanden	<0.001
	Score (gering/ mäßig/ stark)	<0.001
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	<0.001
Epidermale Nekrose	vorhanden/ nicht vorhanden	<0.001
	Score (gering/ mäßig/ stark)	<0.001
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	<0.001
Pleomorphe, ballionierte Keratinozyten/ multinukleäre Riesenzellen	vorhanden/ nicht vorhanden	<0.001
	Verteilung (spärlich/ mäßig dicht liegend/ sehr dicht liegend)	<0.001
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	<0.001
Inflammatorisches Infiltrat	Verteilung (spärlich/ mäßig dicht liegend/ sehr dicht liegend)	<0.001
	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.011
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	<0.001

Morphologische Parameter	Variable Klassifikatoren	p-Wert* der Klassifikatoren
gesteigerte Vaskularisation	hauptsächlich betroffene Epidermisschicht (Str. corneum – DEJ)	0.002
	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.080
Alter		0.001#
Geschlecht	männlich/ weiblich	0.170

Tab. 5: Homogenität der Verteilung der 19 Klassifikatoren (sowie Alter und Geschlecht) zwischen den drei Krankheitsentitäten (AKE, BP, VZVI). (*Kruskal-Wallis-Test, sonst Fishers exakter Test#.)
(Fettgedruckte p-Werte= keine Signifikanz)

Morphologische Parameter	Variable Klassifikatoren	AUC*	p-Wert
Parakeratose	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.5855	0.0785
Spongiose	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.6474	1.0000
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	0.7974	0.6676
Mikrovesikel/ Vesikel/ Bullae	Verteilung (spärlich/ mäßig dicht liegend/ sehr dicht liegend)	0.5611	0.6011
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	0.7586	0.0044
Akantholyse	vorhanden/ nicht vorhanden	0.7717	<0.001

Morphologische Parameter	Variable Klassifikatoren	AUC*	p-Wert
Epidermale Nekrose	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.7953	<0.001
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	0.7717	<0.001
	vorhanden/ nicht vorhanden	0.7838	<0.001
	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.7899	<0.001
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	0.7768	<0.001
Pleom. Keratinocyten/ multinukleäre Riesenzellen	vorhanden/ nicht vorhanden	0.7321	<0.001
	Verteilung (spärlich/ mäßig dicht liegend/ sehr dicht liegend)	0.7984	<0.001
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	0.7984	<0.001
Inflammatorisches Infiltrat	Verteilung (spärlich/ mäßig dicht liegend/ sehr dicht liegend)	0.7525	0.0015
	Score (gering/ mäßig/ stark)	0.7057	0.0018
	Tiefe (Str. corneum – DEJ)	0.7982	0.0939
gesteigerte Vaskularisation	Score (gering/ mäßig/ stark)	0,68	0,0275
Alter		0.7994	<0.001
Geschlecht	männlich/ weiblich	0.6759	0.0047

Tab. 6: AUC je Klassifikator (multi-class AUC/ ROC) für 18 Klassifikatoren sowie Alter und Geschlecht der 3 Krankheitsentitäten (AKE, BP, VZV). (*Multi-class AUC).

3.2 Resultate der statistischen Analyse

Nur bei drei (Parakeratose, Vaskularisation und Geschlecht) der 21 Klassifikatoren konnten mittels der univariaten Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Erkrankungen beobachtet werden (Tabellen 5 und 6). Dadurch wurde eindrucksvoll demonstriert, dass sich die drei Krankheitsentitäten deutlich durch die oben genannten morphologischen KLSM-Parameter unterscheiden lassen, und dies obwohl das Patientenkollektiv einen relativ geringen Umfang hatte.

Zur Differenzierung aller drei Krankheitsentitäten wurden mittels der multivariaten Analyse die Klassifikatoren „Tiefe der Entzündung“ (zu 75%), „Nekrose vorhanden/ nicht vorhanden“ (zu 59%) und „Akantholyse vorhanden/ nicht vorhanden“ (zu 33%) ins Diagnosemodell aufgenommen. In 85% wurden in das multinomiale Modell zwei, in 14 % drei Klassifikatoren zur Unterscheidung der Erkrankungen aufgenommen. Um die Multidimensionalität zu reduzieren und um eine vereinfachte Sicht in die Komplexität der 19 Klassifikatoren zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine Korrespondenz-Analyse erstellt. Die graphische Visualisierung der Korrespondenz-Analyse in Abbildung 38 zeigt anschaulich, welche Klassifikatoren Hinweise auf das Vorliegen der einzelnen Krankheitsentitäten liefern können.

In den drei untersuchten Krankheitsentitäten zeigten einige der Klassifikatoren eine signifikante Korrelation untereinander. Die Tiefe von **Spongiose** und **Vesikel/ Bullae** sind mit der **Tiefe** des **inflammatorischen Infiltrates moderat** aber signifikant korreliert (**SIV-Tiefe**-Komplex) ($\rho \sim 0.6$, $p < 0.0001$, paarweise Rang-Korrelation nach Spearman). Befand sich der SIV-Komplex im Bereich des Stratum basale bzw. dermoepidermalen Junktionszone, war dies hinweisend auf die Diagnose eines bullösen Pemphigoids. Für alle Klassifikatoren der SIV-Tiefe (Spongiose-Inflammation-Vesikel-Tiefe) konnte eine AUC bezüglich des BP von 1.00 und somit eine eindeutige Vorhersagbarkeit beobachtet werden. Jedoch nur für den Klassifikator Vesikel/ Bullae-Tiefe war die AUC der „Three- Way ROC“ mit 0.76 auch statistisch signifikant ($p = 0.0044$). In Abbildung 39 ist zu erkennen, dass Vesikel die zwischen Stratum basale und der dermoepidermalen Junktionszone gefunden wurden eindeutig einem BP zugeordnet werden konnten. Vesikel in höheren Epidermisschichten hingegen waren ein Indikator für ein AKE.

Ergebnisse

Des Weiteren waren die beobachteten Werte von **Nekrose**, **Akantholyse** und **pleomorphen Keratinozyten/ mehrkernigen Riesenzellen** untereinander hoch korreliert (**NAP-Komplex**) ($r_{oh} > 0.8$, $p < 0.001$). Das Auftreten des NAP-Komplexes war stets assoziiert mit der Diagnose einer Varizella-Zoster-Infektion (Tabelle 7). Insbesondere der Klassifikator „pleomorphe Keratinozyten/ mehrkernige Riesenzellen“ bezüglich Tiefe und bezüglich Verteilung war mit einer AUC= 1 ein geeigneter Indikator für die Diagnose einer VZV-Infektion. Die „Three-Way- ROC“ erreichte zwar nur eine AUC von 0.8, diese war aber mit $p < 0.001$ hoch signifikant. Nur unter den Herpes-Zoster-Infizierten wurden mäßig bis sehr dicht liegende pleomorphen Keratinozyten/ mehrkernigen Riesenzellen, alle im Bereich des Stratum spinosum, gefunden.

Die Abbildung 40 zeigt exemplarisch die a posteriori-Vorhersagewahrscheinlichkeit bezüglich der Tiefe von pleomorphen Keratinozyten/ mehrkernigen Riesenzellen in der Epidermis.

Das Fehlen eines NAP-Komplexes in Kombination mit dem Vorhandensein eines SIV-Komplexes in den oberen Epidermisschichten war dagegen hinweisend auf die Diagnose einer AKE.

Diagnose	Akantholyse	Nekrose	pleom.K./RZ	n	%
AKE	nein	Nein	nein	21	53%
	ja	Nein	nein	1	3%
BP	nein	Nein	nein	8	20%
	ja	Ja	nein	1	3%
VZVI	ja	Ja	ja	9	23%

Tab. 7: Anzahl Beobachtungen im NAP-Komplex

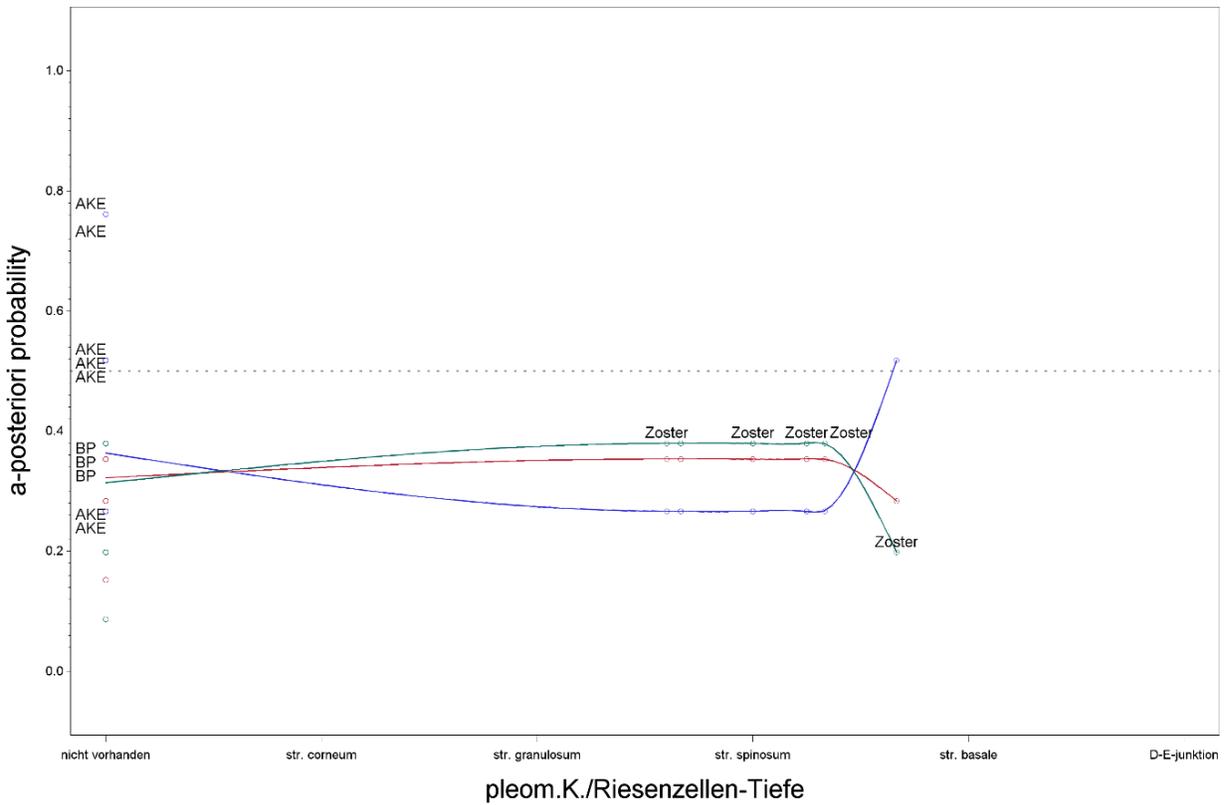


Abb. 40: Vorhersagewahrscheinlichkeit bezüglich pleomorphen Keratinozyten/ mehrkernigen Riesenzellen.

Als nicht-morphologischer Faktor wurde für das Patientenalter eine „Three-Way-ROC“ von 0.80 als bester Klassifikator identifiziert. Bei allen Patienten jünger als 60 Jahren wurde ein AKE diagnostiziert. Abbildung 41 zeigt die a posteriori-Vorhersagewahrscheinlichkeit bezüglich des Alters.

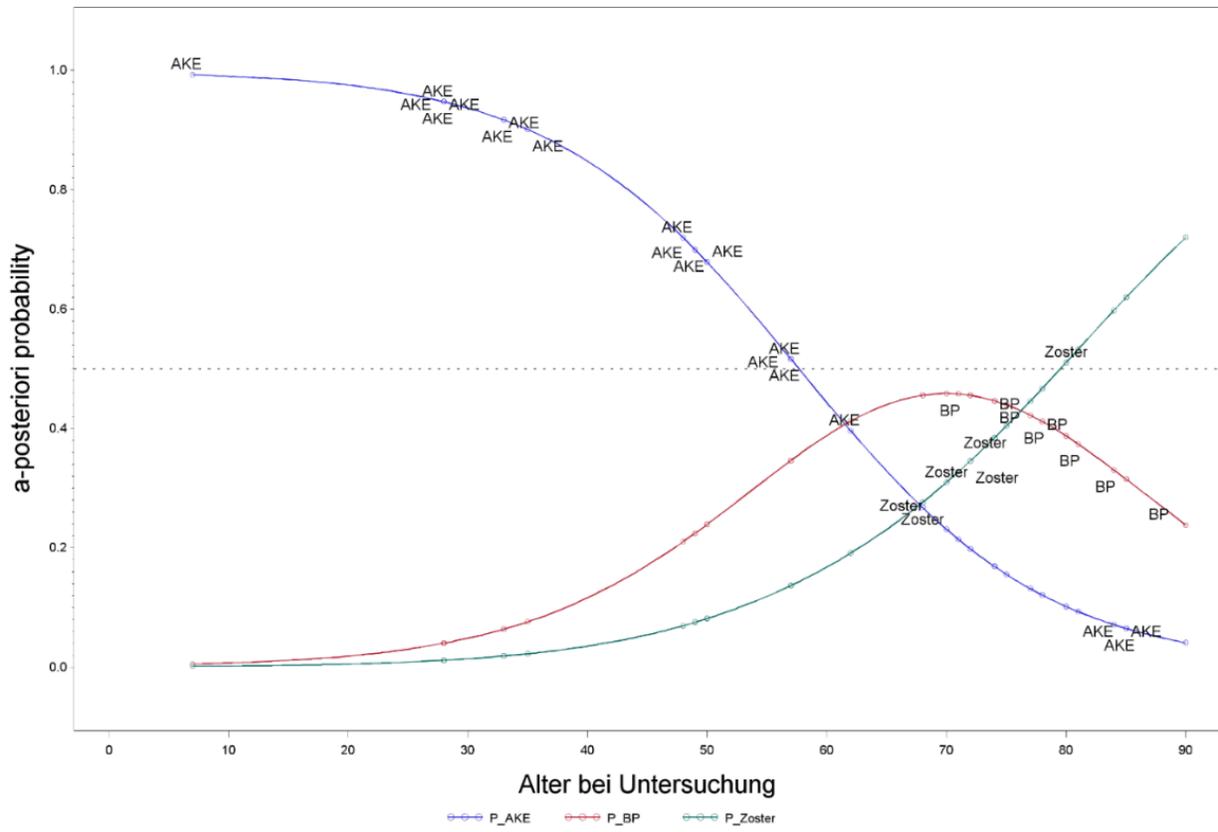


Abb. 41: Vorhersagewahrscheinlichkeit bezüglich Alter

IV. Diskussion

4.1 Die In-vivo-konfokale Laserscanmikroskopie in der Diagnostik vesikulobullöser und inflammatorischer Dermatosen

Die Diagnose inflammatorischer Hauterkrankungen kann, insbesondere bei untypischer Klinik, häufig auch für erfahrene Dermatologen eine Herausforderung darstellen (Drago et al. 2002). Die Notwendigkeit einer schnellen Diagnosefindung zur unmittelbaren und zielgerichteten Therapie ist jedoch in einigen Fällen, vor allem z.B. bei Kindern, bei immunsupprimierten Patienten oder bei Patienten in intensivmedizinischer Versorgung, unabdingbar. Bei häufig mehreren in Frage kommenden Differentialdiagnosen ist der klinische Blick allein nicht immer ausreichend, sodass auf weiterführende Untersuchungen wie laborchemische Tests und die Histologie zurückgegriffen werden muss. Diese sind indessen zeitaufwendig, und oft sind erste Ergebnisse frühestens nach ein bis zwei Tagen, bei Untersuchungen mit speziell anzufertigenden Färbungen oder Markierungen, wie z.B. bei der Histologie oder der direkten Immunfluoreszenz, auch erst nach mehreren Tagen oder Wochen zu erwarten (Buch et al. 2014, Kirtschig und Wojnarowska 1994). Zudem haben diese Verfahren den Nachteil der Invasivität, häufig verbunden mit Schmerzen und einer Narbenbildung durch die Gewebeentnahme.

Die In-vivo-konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM) hat das Potential, einen wertvollen Beitrag zur Diagnosefindung auch inflammatorischer Hautkrankheiten zu leisten. Sie ist nicht invasiv - somit schmerzfrei und nicht gewebeschädigend. Mögliche Artefakte, wie sie z.B. bei der Entnahme und nachfolgenden Fixierung von Gewebe entstehen können, werden durch die Untersuchung mit dem KLSM nicht hervorgerufen. Da folglich auch keine Narben nach der Untersuchung entstehen, kann dasselbe Hautareal mehrfach zu unterschiedlichen Zeitpunkten gescannt werden, wodurch die Möglichkeit besteht, dynamische Prozesse entzündlicher Hauterkrankungen, z.B. im Rahmen des Ansprechens oder Nichtansprechens einer Therapie, nachzuvollziehen (Longo et al. 2012 b, Moscarella et al. 2014). Weiter kann die KLSM auch zur Verlaufsbeobachtung akuter oder chronischer Erkrankungen, zum Beispiel für das bessere Verständnis immunhistopathologischer Prozesse und für daraus gegebenenfalls resultierende

neue Therapieoptionen, eine gute Hilfestellung bieten (Koller et al. 2009, Moscarella et al. 2014). Nicht zuletzt liefert das KLSM schon während des Untersuchungsvorgangs direkt einsehbares Bildmaterial, was dem geschulten Untersucher eine schnelle *bedside*-Diagnostestellung ermöglichen kann.

Durch die technisch bedingte hohe Auflösung des KLSM, können, mit Hilfe des integrierten Softwaresystems und eines ebenfalls hochauflösenden Bildschirms, Detaildarstellungen, die bis in die subzelluläre Ebene reichen (laterale Auflösung 0.1–1 μm), mit exzellenter Bildqualität digital präsentiert und gespeichert werden (Gareau et al. 2008, Rajadhyaksha et al. 1995, www.vivascope.de). Die Vergleichbarkeit mit histologischen Schnittbildern ist gegeben. Dies wurde in zahlreichen Arbeiten, in denen direkte Vergleiche der Histologie eines erkrankten Hautareals mit den vorher an gleicher Stelle erfolgten KLSM-Aufnahmen angestellt wurden, belegt (Ardigò et al. 2007, Ardigò et al. 2009 a, Ardigò et al. 2009 b, Ardigò et al. 2014, González et al. 1999, Koller et al. 2014, Kurzeja et al. 2014, Swindells et al. 2004, Wolberink et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden die KLSM-Aufnahmen nicht direkt mit der Histologie des gleichen Hautareals verglichen, da dies aufgrund der retrospektiven Herangehensweise nicht möglich war. Die Diagnose der jeweiligen Erkrankung stand zum Zeitpunkt der Auswertung des Bildmaterials jedoch fest, sodass ein Vergleich mit bereits vorliegenden histologischen Bildern, den bekannten histologischen Kriterien der jeweiligen Erkrankung und anderen durchgeführten Untersuchungsergebnissen (direkte und indirekte Immunfluoreszenz, PCR, Abstrichergebnissen etc.) erfolgen konnte. Weiterhin waren uns zu allen drei der von uns untersuchten Krankheitsentitäten mindestens jeweils zwei frühere Arbeiten zugänglich, welche die zelluläre Morphologie dieser Erkrankungen mittels der konfokalen Laserscanmikroskopie untersuchten (Abraham et al. 2012, Ardigò et al. 2007, Ardigò et al. 2014, Astner et al. 2005 a, Astner et al. 2005 b, Debarbieux et al. 2013, González et al. 1999, Levi et al. 2012, Sakanashi et al. 2010, Swindells et al. 2004). Diese Arbeiten dienten uns ebenfalls als Orientierung bei der Auswertung des KLSM-Bildmaterials (siehe auch Kapitel 2.4.1).

Die drei in dieser Arbeit von uns untersuchten Krankheitsentitäten gehören in den Formenkreis der vesikulobullösen Hauterkrankungen, da sie sich alle klinisch durch das Vorhandensein von Vesikeln oder Bullae präsentieren. Morphologische KLSM-Kriterien der o.g. drei Krankheitsentitäten wurden, wie oben erwähnt, in einzelnen vorangehenden Arbeiten bereits beschrieben. Ein direkter Vergleich dieser drei Krankheitsentitäten und die Beantwortung der Frage nach ihrer Unterscheidbarkeit nach einzelnen oder in Kombination auftretenden KLSM-Morphologiekriterien erfolgte bislang jedoch noch nicht.

Wir konnten mit unserer Arbeit zeigen, dass eine Unterscheidung der Krankheitsentitäten allergisches Kontaktekzem, Varizella-Zoster-Infektion und bullöses Pemphigoid anhand der mit dem konfokalen Laserscanmikroskop dargestellter morphologischer Kriterien möglich ist.

4.1.1 Das allergische Kontaktekzem in der konfokalen Laserscanmikroskopie

Das allergische Kontaktekzem ließ sich in der Darstellung mit dem konfokalen Mikroskop in der vorliegenden Arbeit durch das Vorhandensein von Mikrovesikeln hauptsächlich in den oberen Epidermisschichten, durch eine gering bis mäßig ausgeprägte Spongiose sowie ein ebenso gering ausgeprägtes inflammatorisches Infiltrat, jeweils mit maximaler Ausprägung im Stratum spinosum, charakterisieren. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Arbeiten von Ardigò et al. 2012, Astner et al. 2005 a und Swindells et al. 2004 weitgehend überein.

Im Gegensatz zu der in den Arbeiten von Swindells et al. 2004 beschriebenen Korrelation der Ausprägung der Spongiose sowie des inflammatorischen Infiltrates im Stratum spinosum zum klinischen Schweregrad der Reaktion, konnten wir hier bezüglich dieser Parameter keinen Zusammenhang feststellen. Die quantitative Ausprägung sowie die Verteilungsdichte der Mikrovesikel korrelierten jedoch gut mit der klinischen Ausprägung der allergischen Reaktion, was auch Astner et al. 2005 b und Swindells et al. 2004 beobachtet haben.

Die aus unseren Daten nicht herzuleitende Korrelation zwischen der Ausprägung der Spongiose sowie des inflammatorischen Infiltrates einerseits und der klinisch sichtbaren Reaktion

andererseits wird in nachfolgenden Arbeiten und in einem größeren Kollektiv weiter untersucht werden müssen.

Astner et al. (2005 b) berichteten bezüglich der Untersuchung des AKE mit dem KLSM, dass vor allem in späteren, subakuten Phasen eines AKE eine Parakeratose im Stratum corneum zu beobachten war. In ihrer ebenfalls im Jahr 2005 im Journal of the American Academy of Dermatology veröffentlichten Arbeit, konnten sie bei den Untersuchungen des AKE mit dem KLSM keinerlei pathologische Veränderungen im Stratum corneum feststellen. Hier erfolgten konfokalen Aufnahmen ausnahmslos 72 h (Tag 3) nach Entfernen der Testsubstanzen. In unseren Untersuchungen mit dem KLSM zeigte sich eine Parakeratose in 8 der 22 Fälle, unabhängig von den Ablesetagen und vom klinischen Schweregrad der Reaktion. Lediglich in 5 Fällen erfolgte in unserem Patientenkollektiv eine Spätablesung, wovon ein Testfeld am Tag 6, zwei am Tag 7, eines am Tag 8 und eines 5 Wochen nach durchgeführter Epikutantestung konfokal aufgenommen wurde. Bei der letztgenannten Spätreaktion war mit dem KLSM eine Parakeratose zu detektieren, in den davor genannten nicht. Um hier eine Aussage, bezüglich der Umstände die zum Auftreten einer Parakeratose beim AKE führen können, zu treffen, ist das vorliegende Patientenkollektiv zu klein. Tendenziell sind unsere Ergebnisse nicht widersprüchlich zu den Ergebnissen der Arbeit von Astner et al. (2005 b), wo eine Parakeratose beim AKE beschrieben, jedoch ihr Auftreten gehäuft erst ab dem 9. Tag der Ablesung vorlag. In mehreren, unter anderem auch vergleichenden Arbeiten zum allergischen und zum irritativen Kontaktekzem (Astner et al. 2005 b, Astner et al. 2006, Swindells et al. 2004) wurde die Parakeratose vor allem als Merkmal der irritativen Reaktion beschrieben. Bis auf eine Reaktion auf die Testsubstanz Natriumlaurylsulfat, welche auch irritativer Genese gewesen sein konnte, wurden die von uns konfokal aufgenommenen epikutanen Reaktionen auf die jeweiligen Testsubstanzen als kontaktallergisch gewertet.

In diesem Zusammenhang ist auch die morphologische Erscheinung der Parakeratose in der KLSM erwähnenswert. Branzan et al. (2007) beschrieben die Zellkerne im Stratum corneum als dunkle Strukturen. Swindells et al. (2004) haben in ihrer vergleichenden Arbeit zu morphologischen Unterschieden beim allergischen und irritativen Kontaktekzem sowohl helle als auch dunkle Strukturen als Zellkerne im Sinne einer Parakeratose gesehen. Sie erklärten die helle Erscheinung der Nuklei mit der Eigenschaft der Testsubstanz Natriumlaurylsulfat, welche vermutlich den

Brechungsindex der Zellkerne ändert. In unseren KLSM Aufnahmen zeigte sich die Parakeratose, welche wir in einigen Fällen bei der akuten Kontaktdermatitis beobachten konnten, mit dunklen Arealen innerhalb der Korneozyten des Stratum corneum, welche zentral einen sehr hellen Punkt aufwiesen. Wir deuteten die dunklen Areale als die Nuklei und das helle punktförmige Zentrum als den Nukleolus, welcher sich auch im Stratum granulosum als hoch refraktil zeigt. Im Falle des Stratum granulosum wurde dies auch von Branzan et al. (2006), Lieb et al. (2008), Huzaira et al. (2001) und Rajadhyaksha et al. (1999) beschrieben (siehe auch Kap. 1.4.4). Auch wir hatten, wie oben bereits erwähnt, eine Reaktion auf die Testsubstanz Natriumlaurylsulfat in unserem Patientenkollektiv. Hier zeigte sich in den konfokalen Aufnahmen 96 h nach Entfernung der Testsubstanz keine deutlich sichtbare Parakeratose, welches auf den Umstand zurückgeführt werden könnte, dass auch die klinische Reaktion sich nur schwach, also mit einem Erythem ohne sichtbare Papeln, Bläschen oder Infiltrat, darstellte.

Die in der Histologie des AKE, aber auch in vorangehenden Publikationen zu diesem Thema (Astner et al. 2005 a, González et al. 1999, Slodownik et al. 2015) oftmals beschriebene, deutlich sichtbar gesteigerte Vaskularisation im Sinne von erweiterten Kapillaren in den Papillenspitzen konnten wir in unseren Untersuchungen mit einer insgesamt eher gering ausgeprägten Vaskularisation (in 90 % der Fälle geringe bis mäßige Ausprägung) nicht feststellen. Dies kann dadurch zu begründen sein, dass 16 der 22 untersuchten Testfelder (72 %) ebenfalls eine nur schwache bis einfach positive epikutane Reaktion aufwiesen.

Alle von uns mittels des KLSM detektierten morphologischen Parameter zeigten insgesamt eine hervorragende Korrelation zu vorbeschriebenen histologischen Kennzeichen des Krankheitsbildes eines allergischen Kontaktekzems (siehe auch Kapitel 1.1.2 der Einleitung).

4.1.2 Die Varizella-Zoster-Infektion in der konfokalen Laserscanmikroskopie

In der erkrankten Haut aller neun Patienten unseres Patientenkollektivs mit der gesicherten Diagnose einer Varizella-Zoster-Infektion konnten wir mit dem KLSM, innerhalb streng intraepidermal gelegener Strukturdefekte, vergrößerte akantholytische Zellen, nekrotisches

Zellmaterial sowie das Vorhandensein von pleomorphen Keratinozyten bzw. multinukleären Riesenzellen detektieren.

Unseres Wissens nach wurden morphologische KLSM-Kriterien der Varizella-Zoster-Infektion der Haut bisher nur in den Arbeiten von Abraham et al. 2012, Debarbieux et al. 2013 sowie Goldgeier et al. 2002 beschrieben. Diese Arbeiten stellen Berichte einzelner Fälle dar, größere Patientenkollektive wurden diesbezüglich noch nicht untersucht. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen der oben genannten Autoren und auch mit den aus der Histologie bekannten morphologischen Merkmalen der Erkrankung überein.

Wir konnten außerdem zeigen, dass auch klinische Frühformen einer Varizella-Zoster-Infektion, welche sich noch nicht mittels sichtbarer Vesikel, sondern lediglich mit einem Erythem darstellen, die gleichen morphologischen KLSM-Merkmale aufwiesen wie die fortgeschrittenen klinischen Stadien. Somit konnten die mit bloßem Auge noch nicht erkennbaren Vesikel mittels des KLSM dargestellt werden. Durch dieses Ergebnis wäre - die Reproduzierbarkeit vorausgesetzt - die konfokale Laserscanmikroskopie hervorragend dafür geeignet, die mögliche Differentialdiagnose einer Varizella-Zoster-Infektion innerhalb weniger Minuten zu bestätigen oder auszuschließen. In solchen frühen Phasen der Infektion ist die klinische Blickdiagnose, vor allem bei ungewöhnlicher Lokalisation der Hauteffloreszenz z.B. bei multisegmentalen Befall oder Manifestation des Erythems an einer Extremität, schwierig und mehrere Differentialdiagnosen (Erysipel, allergisches oder irritativ-toxisches Kontaktekzem etc.) sind möglich. Besonders bei immunsupprimierten Patienten sind oft wenige Stunden bis zum Beginn einer zielgerichteten Therapie für die weitere Prognose entscheidend. Die PCR-Diagnostik hat nach Leung et al. (2010) zwar insbesondere auch in den Frühstadien der Erkrankung sowohl eine sehr gute Spezifität als auch Sensitivität (jeweils nahezu 100 %), birgt jedoch den Nachteil, dass sie Ergebnisse frühestens ein bis drei Tage nach der Materialgewinnung liefern kann. Andere zur Verfügung stehende Verfahren zur Diagnosesicherung sind weniger genau und ebenso zeitintensiv (Braun-Falco und Ruzicka 2012, Leung et al. 2010).

4.1.3 Das bullöse Pemphigoid in der konfokalen Laserscanmikroskopie

In unseren KLSM-Aufnahmen war das bullöse Pemphigoid gekennzeichnet durch intakte obere Epidermisschichten ohne Pathologika bis hin zum unteren Stratum spinosum. Ab hier ließ sich eine spongiotische Auflockerung der Zellgrenzen erkennen, welche sich schließlich im Bereich der dermoepidermalen Junctionszone zu großen Bullae ausformte.

Nach unserem derzeitigen Wissensstand wurden bisher drei Fälle eines bullösen Pemphigoids von Levi et al. (2012) sowie neun Läsionen von insgesamt sieben Patienten mit bullösem Pemphigoid von Ardigò et al. (2014) mit dem konfokalen Mikroskop untersucht und beschrieben.

Insbesondere in der Arbeit von Ardigò et al. (2014) wurden sowohl die auch von uns beobachtete beginnende Spongiose und Exozytose im Stratum spinosum als auch die großen subepidermalen Vesikel bzw. Bullae geschildert. Letztere beschrieben Ardigò et al. (2014), genauso wie wir, als dunkle Areale, welche runde, kleine, hell erscheinende zelluläre Strukturen ohne sichtbaren Zellkern beinhalten. Diese kleinen zellulären Strukturen wurden als inflammatorische Zellen identifiziert. Weiterhin sahen sie im Randbereich der Bullae homogene Strukturen, die sie als Fibrinablagerungen deuteten. Auch wir konnten die oben beschriebenen inflammatorischen Zellen innerhalb der Bullae indentifizieren. Weiterhin sahen wir auch unscharfe, teils zu einer homogenen Masse verschmelzende Strukturen innerhalb der Blasen, deuteten diese aber eher als Zelldetritus sowie Zellfragmente bzw. als nekrotisches Zellmaterial. Hier ist die Frage zu stellen, ob die Auflösung des KLSM die Unterscheidung kumulierender Zellfragmente von Fibrin zulässt. Genauere, auf diese Fragestellung zielende, Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv könnten hier sicherlich interessant sein.

4.1.4 Die Differenzierbarkeit der drei untersuchten vesikulobullösen Krankheitsentitäten mittels der In-vivo-konfokalen Laserscanmikroskopie

Während das allergische Kontaktekzem (AKE) vorwiegend durch intraepidermale Bläschenbildung, Spongiose und Exozytose entzündlicher Zellen in die oberen Epidermisschichten gekennzeichnet ist, stehen beim bullösen Pemphigoid (BP) große, subepidermale Bullae und die

Unversehrtheit des Stratum corneum und granulosum im Vordergrund. Im Rahmen der uns vorliegenden Daten konnte durch die paarweise Rang-Korrelation nach Spearman und der multivariaten statistischen Analyse gezeigt werden, dass sobald in den konfokalen Aufnahmen Spongiose, inflammatorisches Infiltrat und Vesikel (SIV-Komplex) im Bereich des Stratum basale bzw. der dermoepidermalen Junktionszone in Kombination zu detektieren waren, dies hinweisend auf die Diagnose eines BP war ($p= 0.0044$). Befanden sich diese Parameter in den höheren Epidermisschichten war dies ein Indikator für ein AKE.

Die Varizella-Zoster-Infektion war dagegen hauptsächlich durch das Vorhandensein von mehrkernigen Riesenzellen vorwiegend in den mittleren bis unteren Epidermisschichten, aber auch durch Akantholyse und Nekrose (NAP-Komplex, $p < 0.001$) charakterisiert. Diese Klassifikatoren waren in dieser Kombination bei den anderen beiden Krankheitsentitäten nicht festzustellen.

Bei den beiden morphologischen Parametern Parakeratose ($p= 0,798$) und Vaskularisation ($p= 0,08$) ließ sich keine Signifikanz zu den einzelnen Krankheitsentitäten und, wie oben bereits beschrieben, auch nicht zu dem Schweregrad der Ausprägung der Erkrankungen beobachten. Bei den übrigen oben genannten morphologischen Klassifikatoren zeigte sich jedoch bezüglich ihrer Ausprägung, Verteilung und ihres Vorkommens in den einzelnen Epidermisschichten, eine spezifische und statistisch signifikante Unterscheidung hinsichtlich der jeweiligen einzelnen Krankheitsentität und teilweise auch hinsichtlich des Schweregrades der Ausprägung der Erkrankungen (siehe Tabelle 5).

Abgeleitet aus den oben genannten Ergebnissen ließen sich für fast alle ausgewählten o.g. Klassifikatoren eine Spezifität, eine Sensitivität sowie ein positiv-prädiktiver Wert von jeweils 100% errechnen. Diesbezüglich eine generalisierende Aussage zu treffen, wäre jedoch bei der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht gerechtfertigt. Dagegen spricht auch die retrospektive Herangehensweise an die Fragestellung in dieser Beobachtungsstudie, durch welche eine verblindete Auswertung der Ergebnisse nicht möglich war.

Die vorliegenden Ergebnisse sowie die statistische Analyse zeigen trotz des kleinen Patientenkollektivs, dass sich die drei ätiopathogenetisch heterogenen vesikubullösen Krankheitsentitäten mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskopes anhand der oben genannten morphologischen Parameter gut voneinander unterscheiden lassen

4.2 Mögliche Limitationen der vorliegenden Arbeit

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Studie handelte es sich um eine monozentrische, nicht-kontrollierte, retrospektive Beobachtungsstudie. Aufgrund dieser Studienform sind generelle Aussagen zur Eignung der KLSM für die Diagnose vesikulobullöser Hauterkrankungen nicht gerechtfertigt. Vielmehr diene diese Studie als Pilotprojekt der Beschreibung diagnostischer Parameter für die untersuchten Hauterkrankungen. Für genauere Aussagen zur diagnostischen Eignung sind zukünftige prospektive Studien erforderlich.

Des Weiteren ist die Interpretation des Bildmaterials einerseits von der jeweiligen Erfahrung des Untersuchers, andererseits auch von der Vorkenntnis der Diagnose bzw. des klinischen Bildes der Erkrankung abhängig. Eine zukünftige prospektive Studie sollte diese Faktoren berücksichtigen und eine verblindete Auswertung des KLSM-Bildmaterials durch mehrere Begutachter vorsehen (Rao et al. 2013).

Im Hinblick auf das Krankheitsbild des AKE wäre weiterhin für zukünftige Studien die systematische Auswertung der Ablesezeiten hinsichtlich der Ausprägung der morphologischen Veränderungen sinnvoll, da insbesondere bei kontaktallergischen Hauterkrankungen verzögerte Reaktionen auf das auslösende Agens möglich sind und so morphologische Merkmale zu unterschiedlichen Zeiten auch zu unterschiedlichen Ausprägungen führen könnten.

Auch die strikte Korrelation der KLSM-Aufnahmen mit histologischen Schnittbildern derselben Hautareale wäre zur Evaluation und Definition morphologischer KLSM-Kriterien - vor allem bei bisher konfokal noch nicht oder wenig untersuchten Dermatosen - und in Kombination mit größeren Patientenkollektiven ein wichtiges Kriterium für zukünftige Projekte (Moscarella et al. 2014).

4.3 Grenzen der konfokalen Laserscanmikroskopie

Die konfokale Laserscanmikroskopie wird nicht zu Unrecht als schnell durchzuführende Untersuchungsmethode bezeichnet, die dem geübten Untersucher prompte Einblicke in die verschiedenen Hautschichten ermöglicht, welche vergleichbar mit histologischen Schnittbildern sind. Dennoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Untersuchung eines einzelnen z.B. 4x4 mm großen Hautfeldes, inklusive des Bootvorganges des Gerätes, des korrekten und bequemen Platzierens des Patienten, und aller weiterer Vor- und Nachbereitungen, mindestens 30 min beansprucht. Voraussetzung ist eine gute und routinierte Kenntnis der Funktionsweise des Gerätes, die eine umfassende Einschulung in die Benutzung erforderlich macht (Calzavara-Pinton et al. 2008, Volgger 2008). Die Interpretation der Bilder wiederum erfordert eine ausgiebige Erfahrung des Untersuchers, welche nur durch regelmäßige Auseinandersetzung mit dem Themengebiet sowie durch zugrundeliegende histologische Kenntnisse bedingt werden kann. Die Erfahrung des Untersuchers ist dabei nicht nur eine wichtige Voraussetzung für die tägliche Praxis, wo Fehldiagnosen fatale Fehlentscheidungen nach sich ziehen können, sondern auch für die Durchführung von Studien, da bereits einzelne Fehlinterpretationen statistische Analysen verfälschen können (Hoogedoorn et al. 2014).

Weiterhin muss bedacht werden, dass nicht jeder Patient für die Untersuchung mit dem KLSM uneingeschränkt geeignet ist. Es muss gewährleistet sein, dass die zu untersuchende Person ca. 15 - 20 Minuten ruhig und in einer Position (liegend oder sitzend) verharren kann. Bei sehr alten und bei sehr jungen Personen kann dies ein limitierender Faktor sein.

Trotz der guten Auflösung der mittels des KLSM generierten Bilder, gibt es auch diesbezüglich einige Grenzen dieser Methode zu benennen. Zum einen reicht die Auflösung nicht aus, gewisse Zellsubpopulationen voneinander zu unterscheiden (Longo et al. 2012 a). Deutlich wird dieser Umstand vor allem bei den verschiedenen Leukozyten-Subtypen. Mittels der KLSM ist es somit nicht möglich, eosinophile Granulozyten von basophilen und neutrophilen Granulozyten zu unterscheiden. Dies wiederum erschwert die Differenzierung unterschiedlicher entzündlicher Dermatosen. Zum Beispiel könnte beim AKE die Möglichkeit der detaillierten Analyse des entzündlichen Infiltrates, eine Quantifizierung kontaktallergischer Reaktionen zur

Standardisierung der Auswertung von Epikutantestungen (Barsch 2007) mittels der KLSM, wie es bereits unter anderem in den Arbeiten von Sakanashi et al. 2010 und Slodownik et al. 2015, diskutiert wurde, erleichtern.

Zum anderen ist die geringe vertikale Eindringtiefe des KLSM von maximal 150-350 μm , die maximal bis in das Stratum reticulare der Dermis reicht, als nachteilig anzusehen (Gareau et al. 2008, Huzaira et al. 2001). Somit ist die Beurteilung dermalen Prozesse und Erkrankungen, wie sie z.B. bei der kutanen Mastozytose, verschiedenen Vaskulitiden, der Sklerodermie und andere Bindegewebserkrankungen zu finden sind, stark eingeschränkt bzw. nicht möglich. Die Anwendung von Lasersystemen mit einer Wellenlänge größer als 1064 nm könnte dieses Problem zwar beheben, hätte aber zur Folge, dass die laterale Auflösung dadurch geringer wird (Branzan et al. 2007, Calzavara-Pinton et al. 2008, Gonzáles et al. 2009, Rajadhyaksha et al. 1995).

Zur sicheren Diagnose und Differenzierung bestimmter Autoantikörper oder anderer Bestandteile des Immunsystems, insbesondere bei Dermatosen autoimmuner Genese aber auch anderer blasenbildender Erkrankungen (wie z.B. der hereditären Epidermolysen), werden in der näheren Zukunft Untersuchungen wie die direkte und indirekte Immunfluoreszenz durch die KLSM zunächst nicht ersetzt werden können. Ob die KLSM die Hautbiopsie-Entnahme zur histologischen Untersuchung in klinisch unklaren Fällen ersetzen kann, wird sich mit der Zeit durch größer angelegte Studie erweisen müssen (Hoogedoorn et al. 2014).

4.4 Ausblick

Die Dynamik morphologischer KLSM-Parameter bei der kontaktallergischen Reaktion wurde bereits u.a. in den Arbeiten von Astner et al. (2005 b) und Sakanashi et al. (2010) untersucht, ebenso der Vergleich zum irriativen Kontaktekzem und zu fraglich negativen, vermeintlich allergischen Reaktionen im Epikutantest (Slodownik et al. 2015). In der Arbeit von Silvia Koller et al. (2009) wurden verschiedene erythemosquamöse bzw. entzündliche Dermatosen (Psoriasis, Kontaktdermatitis, Mykosis fungoides, chronisch discoider Lupus erythematodes, subakut kutaner Lupus erythematodes) hinsichtlich unterschiedlicher KLSM-Kriterien verglichen. Levi et al. (2012) stellten mit Hilfe einzelner Fallbeispiele Vergleiche morphologischer Kriterien des

Pemphigus foliaceus, des *Pemphigus vulgaris* und des bullösen Pemphigoids dar. Kurzeja et al. (2012) zeigten in einem etwas größeren Patientenkollektiv ebenfalls morphologische Unterschiede in der KLSM für den *Pemphigus vulgaris* und den *Pemphigus foliaceus* auf.

Weitere vergleichende Arbeiten mit großen Fallzahlen, zum Beispiel auch mit der Fragestellung, ob eventuell klinische Frühformen wie das prämonitorische BP mittels der KLSM der Grunderkrankung zugeordnet werden können, wären - nicht zuletzt für die klinische Praxis - sicherlich lohnenswert und interessant.

Neben der in dieser Arbeit beschriebenen und verwendeten reflektierenden konfokalen Laserscanmikroskopie, soll die fluoreszierende konfokale Laserscanmikroskopie nicht unerwähnt bleiben. Die Firma MAVIG (GmbH, München, Deutschland) vertreibt das VivaScope® 1500 Multilaser, welches die reflektierende und fluoreszierende In-vivo-konfokale Laserscanmikroskopie miteinander kombiniert (www.vivascope.de).

Während bei dem reflektierenden KLSM unterschiedliche Reflexionsindizes inter- und intrazellulärer Strukturen die Kontrastierung des Bildes bedingen (Rajadhyaksha et al. 1995), wird der Kontrast bei dem fluoreszierenden KLSM mittels exogenen fluoreszierenden Molekülen, den Fluorophoren (z.B. Indocyaningrün, Methylenblau, Toluidinblau), welche entweder in die Haut injiziert werden oder topisch auf die Haut aufgebracht werden, erzeugt. Durch spezielle, auf die Anregungsfähigkeit des jeweiligen Fluorophors abgestimmte Wellenlängen des Lasersystems, wird ein schwarz-weiß-Kontrast im Bild erzeugt, welcher zelluläre und subzelluläre Strukturen besser in Erscheinung treten lässt, als das rein reflektierende KLSM. Insbesondere dermale Strukturen können so, vornehmlich im Falle der intradermalen Injektion von Indocyaningrün, deutlich besser sichtbar gemacht werden (Astner et al. 2008, Meyer et al. 2006, Skvara et al. 2012, Swindle et al. 2003). Bei dem topischen Einsatz der Fluorophore (als Creme oder Lotion) ist jedoch die geringe Eindringtiefe sowie die nicht immer gewährleistete optimale Verteilung des Kontrastmittels innerhalb der Epidermis ein wesentlich limitierender Faktor in der Untersuchung zellulärer und subzellulärer Strukturen (Sattler et al. 2012, Skvara et al. 2012). Weiterhin muss die Möglichkeit unerwünschter Nebenwirkungen bedacht werden. Neben kontaktallergischen Reaktionen können vor allem bei der intradermalen Injektion auch systemische Nebenwirkungen

auftreten. Um die Vor- und Nachteile sowie die Praktikabilität und Verwertbarkeit der fluoreszierenden KLSM im klinischen Alltag optimal bewerten zu können, ist noch die Durchführung weiterer klinischer Studien erforderlich. Nichtsdestotrotz kann der Einsatz von Fluorophoren in der KLSM vor allem in der klinischen Forschung neue Wege eröffnen. Zum Beispiel könnten durch die Entwicklung zielgerichteter Fluorophore, die subzelluläre Moleküle sichtbar und unterscheidbar machen, dynamische pathophysiologische und immunologische Prozesse visualisiert werden (Skvara et al. 2012). Auch könnten Fluoreszin-beladene Antikörper, die an bestimmte epidermale oder subepidermale Strukturen binden, diese für die KLSM markieren und so die Differentialdiagnose von autoimmunbedingten Dermatosen aber auch von malignen Hauterkrankungen ermöglichen, wie es in einem Mausmodell bereits gezeigt wurde (Anikijenko et al. 2001) und so ggf. die Biopsie-Entnahme für die direkte Immunfluoreszenz ersetzen.

Ein zusätzlicher technischer Ausblick wäre die Entwicklung weiterer Softwaresysteme, die eine virtuelle dreidimensionale Rekonstruktion der konfokalen Aufnahmen ermöglichen. Damit wäre nicht nur die Präsentation aussagekräftigen Bildmaterials eindrucksvoll möglich, auch die bessere visuelle Vergleichbarkeit mit histologischen Schnittbildern wäre dadurch gegeben (Calzavara-Pinton et al. 2008).

An erster Stelle bei der Arbeit mit dem konfokalen Laserscanmikroskop sollte jedoch - vor allem auf dem mit dieser Methode noch nicht so weitreichend erforschten Feld der inflammatorischen Dermatosen - die Durchführung methodologisch sorgfältig arrangierter Studien stehen, um morphologische Kriterien für einzelne Erkrankungen in der KLSM besser definieren zu können (Hoogedoorn et al. 2014) und die konfokale Mikroskopie weiter in der klinischen Praxis zu etablieren.

Da Universitätskliniken und große klinische Zentren für die Forschung bzw. die Durchführung sorgfältig angelegter und umfangreicher klinischer Studien in der Regel die besten Voraussetzungen bieten, sollte hier eine Schlüsselposition für die Anwendung und Arbeit mit dem konfokalen Mikroskop liegen. Aber auch die Ausstattung kleinerer Kliniken und Schwerpunktpraxen mit modernen konfokalen Mikroskopen sowie die umfangreiche Schulung

interessierter Dermatologen und Pflegekräfte muss weiter gefördert werden, um eine Grundlage für die Routineanwendung in der täglichen Praxis zu schaffen.

Mit Hilfe der oben genannten Möglichkeiten und Voraussetzungen könnte sich in Zukunft eine neue Ära der nicht invasiven *bedside*-Diagnostik von Hauterkrankungen sowie der klinischen Forschung inklusive eines neuen Verständnisses für pathophysiologische Prozesse eröffnen, welche eine Bereicherung für das Fachgebiet der Dermatologie und Allergologie verspricht und von der gewiss auch weitere Fachgebiete werden profitieren können.

V. Zusammenfassung

Die In-vivo-konfokale Laserscanmikroskopie ist eine moderne Methode zur nicht-invasiven Untersuchung epidermaler und dermaler Läsionen in hoher zellulärer Auflösung.

Mit der Zielsetzung, anhand dieser Technik typische bildmorphologische Kriterien für drei ausgewählte vesikulobullöse Krankheitsentitäten zu definieren und zu vergleichen, wurden insgesamt 40 einzelne vesikulobullöse Effloreszenzen bei 24 Patienten mit den Dermatosen bullöses Pemphigoid, Varizella-Zoster-Infektion und allergische Kontaktdermatitis im klinischen Alltag mittels des Vivascope® 1500 und 3000 untersucht. Davon waren 22 Effloreszenzen dem Krankheitsbild des allergischen Kontaktekzems und jeweils 9 den Krankheitsbildern bullöses Pemphigoid und Varizella-Zoster-Infektion zuzuordnen. Retrospektiv wurden diagnostische Kriterien der konfokalen Laserscanmikroskopie zu den drei oben genannten Krankheitsentitäten erarbeitet sowie mit bekannten histologischen Merkmalen und mit bereits bekannten Ergebnissen aus der Literatur verglichen. Außerdem erfolgte die statistische Auswertung der erhobenen Daten bzw. der morphologischen Kriterien im Hinblick auf ihre Verwertbarkeit für eine sichere Diagnosestellung der jeweiligen einzelnen Krankheitsentität sowie der sicheren Unterscheidung der oben genannten Hauterkrankungen untereinander.

Die durch uns identifizierten morphologischen Klassifikatoren (pleomorphe Keratinozyten bzw. multinukleäre Riesenzellen, inflammatorisches Infiltrat, Spongiose, Akantholyse, Nekrose und Vesikel bzw. Bullae) wurden in ihrer Ausprägung, Verteilung und ihrem Vorkommen in den einzelnen Epidermisschichten untersucht. Dabei konnten statistisch signifikante Ergebnisse aus den Daten hinsichtlich der jeweiligen einzelnen Krankheitsentität und teilweise auch hinsichtlich des Schweregrades der Ausprägung der Erkrankungen erhoben werden.

Anhand einer multivariaten Analyse der Ergebnisse konnten zudem Gruppen von Klassifikatoren gebildet werden, die eine gute Korrelation zueinander und zu einer jeweiligen Krankheitsentität boten. Die allergische Kontaktdermatitis war gekennzeichnet durch intraepidermale Mikrovesikel, inflammatorische Zellen und Spongiose, überwiegend im Stratum spinosum und Stratum granulosum. Die Varizella-Zoster-Infektion zeigte pleomorphe ballonierete Keratinozyten

und multinukleäre Riesenzellen im Stratum spinosum sowie akantolytische Zellen und epidermale Nekrose. Das bullöse Pemphigoid war charakterisiert durch Blasen im Bereich der dermoepidermalen Junctionszone, zahlreiche inflammatorische Zellen und Spongiose im Stratum spinosum und Stratum basale sowie intravesikuläre inflammatorische Zellen.

Neben einer guten Korrelation zwischen den Ergebnissen der konfokalen Laserscanmikroskopie und der konventionellen Histologie konnten mit dieser Arbeit somit signifikante konfokale Unterscheidungskriterien für die oben genannten Krankheitsentitäten aufgezeigt werden, welche für eine unmittelbare, nicht-invasive Diagnosestellung, insbesondere bei fehlender klinischer Eindeutigkeit, in der täglichen Praxis von Bedeutung sein könnten.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Abraham LS, Costa MC, Agozzino M, Amorosi B, Cota C, Ardigò M (2012): In vivo reflectance confocal microscopy for varicella prompt diagnosis and treatment in a severely immunosuppressed patient. *Skin Res Technol* 18(3), 386–388
- 2 Altintas MA, Altintas AA, Guggenheim M, Steiert AE, Aust MC, Niederbichler AD, Herold C, Vogt PM (2010): Insight in Human Skin Microcirculation Using In Vivo Reflectance-Mode Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Digit Imaging* 23(4), 475-481
- 3 Anikijenko P, Vo LT, Murr ER, Carrasco J, McLaren WJ, Chen Q, Thomas SG, Delaney PM, King RG (2001): In vivo detection of small subsurface melanomas in athymic mice using noninvasive fiber optic confocal imaging. *J Invest Dermatol* 117(6), 1442-8
- 4 Ardigò M, Maliszewski I, Cota C, Scope A, Sacerdoti G, González S, Berardesca E (2007): Preliminary evaluation of in vivo reflectance confocal microscopy features of Discoid lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 156(6),1196-1203
- 5 Ardigò M, Cota C, Berardesca E, González S (2009 a): Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and histology in the evaluation of plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23(6), 660-667
- 6 Ardigò M, Buffon RB, Scope A, Cota C, Buccini P, Berardesca E, Pellacani G, Marghoob AA, Gill M (2009 b): Comparing in vivo reflectance confocal microscopy, dermoscopy, and histology of clear-cell acanthoma. *Dermatol Surg* 35(6), 952–959
- 7 Ardigò M, Longo C, Cristaudo A, Berardesca E, Pellacani G (2012): Evaluation of allergic vesicular reaction to patch test using in vivo confocal microscopy. *Skin Res Technol* 18(1), 1-3

- 8 Ardigò M, Agozzino M, Longo C, Conti A, Di Lernia V, Berardesca E, Pellacani G (2013): Psoriasis plaque test with confocal microscopy: evaluation of different microscopic response pathways in NSAID and steroid treated lesions. *Skin Res Technol* 19(4), 417-423
- 9 Ardigò M, Agozzino M, Amorosi B, Moscarella E, Cota C, de Abreu L, Berardesca E (2014): Real-time, non-invasive microscopic confirmation of clinical diagnosis of bullous pemphigoid using in vivo reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol* 20(2), 194–199
- 10 Astner S: In-vivo Reflektanz konfokale Mikroskopie zur non-invasiven Diagnostik des akuten Kontaktekzems. Med. Diss. Berlin 2008
- 11 Astner S, Ulrich M (2010): Konfokale Laserscan-Mikroskopie. *Hautarzt* 61(5), 421-428
- 12 Astner S, González E, Cheung A, Rius-Díaz F, González S (2005 a): Pilot study on the sensitivity and specificity of in vivo reflectance confocal microscopy in the diagnosis of allergic contact dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 53(6), 986-992
- 13 Astner S, González E, Cheung AC, Rius-Díaz F, Doukas AG, William F, González S (2005 b): Non-invasive evaluation of the kinetics of allergic and irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 124(2), 351-359
- 14 Astner S, Burnett N, Rius-Díaz F, Doukas AG, González S, González E (2006): Irritant contact dermatitis induced by a common household irritant: a noninvasive evaluation of ethnic variability in skin response. *J Am Acad Dermatol* 54(3):458-465
- 15 Astner S, Dietterle S, Otberg N, Rówert-Huber HJ, Stockfleth E, Lademann J (2008): Clinical applicability of in vivo fluorescence confocal microscopy for noninvasive diagnosis and therapeutic monitoring of nonmelanoma skin cancer. *J Biomed Opt* 13(1), 014003

- 16 Barsch J: Quantitative Aspekte der Kontaktallergie. In: Fuchs T, Aberer W (Hrsg.): Kontaktekzem. 2. Auflage; Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen 2007, 67-77
- 17 Başaran YK, Gürel MS, Erdemir AT, Turan E, Yurt N, Bağci IS (2015): Evaluation of the response to treatment of psoriasis vulgaris with reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol* 21(1), 18-24
- 18 Branzan AL, Landthaler M, Szeimies RM (2007): In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology. *Lasers Med Sci* 22(2), 73-82
- 19 Braun-Falco M, Ruzicka T (2012): The role of molecular genetics in dermatologic diagnosis. *Hautarzt* 63 Suppl 1, 45-52
- 20 Buch AC, Kumar H, Panicker N, Misal S, Sharma Y Charusheela R, Gore CR (2014): A Cross-sectional Study of Direct Immunofluorescence in the Diagnosis of Immunobullous Dermatoses. *Indian J Dermatol* 59(4), 364–368
- 21 Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M, Sala R, Pellacani G (2008): Reflectance Confocal Microscopy for In Vivo Skin Imaging. *Photochem Photobiol* 84(6), 1421-1430
- 22 Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS, Rajadhyaksha M, Menaker GM, Charles C, Jiang SB (2004): Use of ex vivo confocal scanning microscopy during Mohs surgery vor nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 30(12 Pt 1), 1470-1478
- 23 Debarbieux S, Depaepe L, Poulalhon N, Dalle S, Balme B, Thomas L (2013): Reflectance confocal microscopy characteristics of eight cases of pustular eruptions and histopathological correlations. *Skin Res Technol* 19(1), e444–e452

- 24 Drago F, Rampini E, Rebora A (2002): Atypical exanthems: morphology and laboratory investigations may lead to an aetiological diagnosis in about 70% of cases. *Br J Dermatol* 147(2), 255-260
- 25 Dreiseitl S, Ohno-Machado L, Binder M (2000): Comparing three-class diagnostic tests by three-way ROC analysis. *Med Decis Making* 20(3), 323-331
- 26 Enk AH, Knop J: Immunologische Grundlagen des allergischen und des irritativen Kontaktekzems. In: Fuchs T, Aberer W (Hrsg.): *Kontaktekzem*. 2. Auflage; Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen 2007, 13-23
- 27 Fawcett T (2006): An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit Lett* 27, 861-874
- 28 Fuchs T: Epikutantest. In: Fuchs T, Aberer W (Hrsg.): *Kontaktekzem*. 2. Auflage; Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen 2007, 267-326
- 29 Fuertes de Vega I, Iranzo-Fernández P, Mascaró-Galy JM (2014): Bullous pemphigoid: clinical practice guidelines. *Actas Dermosifiliogr* 105(4), 328-46
- 30 Fyhrquist N, Lehto E, Lauerma A (2014): New findings in allergic contact dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 14(5), 430-5
- 31 Gareau DS, Patel YG, Rajadhyaksha M: Basic principles of reflectance confocal microscopy. In: González S, Gill M, Halpern AC (Hrsg.): *Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumors - An Atlas with Clinical, Dermoscopic and Histological Correlations*; Informa Healthcare, London 2008, 1-6
- 32 Goldgeier M, Alessi C, Muhlbauer JE (2002): Immediate noninvasive diagnosis of herpesvirus by confocal scanning laser microscopy. *J Am Acad Dermatol* 46(5), 783-785

- 33 González S (2009): Confocal Reflectance Microscopy in Dermatology: Promise and Reality of Non-Invasive Diagnosis and Monitoring. *Actas Dermosifiliogr* 100: Supl. 2, 59-69
- 34 González S, González E, White WM, Rajadhyaksha M, Anderson RR (1999): Allergic contact dermatitis: correlation of in vivo confocal imaging to routine histology. *J Am Acad Dermatol* 40(5 Pt 1),708-713
- 35 Hertl M, Wolff H: Primäreffloreszenzen. In: Einführung. In: Plewig G, Landthaler M, u.a. (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Band I. 6. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2012, 7-10
- 36 Hillebrand K, Bricout H, Schulze-Rath R, Schink T, Garbe E (2015): Incidence of herpes zoster and its complications in Germany, 2005-2009. *J Infect* 70(2),178-86
- 37 Hödl S: Histologie des allergischen Kontaktekzems. In: Fuchs T, Aberer W (Hrsg.): *Kontaktekzem*. 2. Auflage; Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen 2007, 25-33
- 38 Hoogedoorn L, Peppelman M, van de Kerkhof PC, van Erp PE, Gerritsen MJ (2014): The value of in vivo reflectance confocal microscopy in the diagnosis and monitoring of inflammatory and infectious skin diseases: a systematic review. *Br J Dermatol*. Epub ahead of print
- 39 Horn M, Gerger A, Koller S, Weger W, Langsenlehner U, Krippel P, Kerl H, Samonigg H, Smolle J (2007): The use of confocal laser scanning microscopy in microsurgery for invasive squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 156(1), 81-84
- 40 Huzaira M, Rius F, Rajadhyaksha M, Anderson RR, González S (2001): Topographic Variations in Normal Skin, as Viewed by In Vivo Reflectance Confocal Microscopy. *J Investigative Dermatol* 116(6), 846-852

- 41 Käß S: Konfokale Lasermikroskopie – Evaluation an nativen Gewebeschnitten für mikrographische Chirurgie. Med. Diss. Regensburg 2012
- 42 Kempf W, Hantschke M, Kutzner H, Burgdorf WHC: Dermatopathologie. 2. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2011
- 43 Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D (2014): Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev* 13(4-5), 477-81
- 44 Kirtschig G, Wojnarowska F (1994): Autoimmune blistering diseases: an up-date of diagnostic methods and investigations. *Clin Exp Dermatol* 19, 97-112
- 45 Koller S, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V, Weger W, Smolle J, Hofmann-Wellenhof R (2009): In vivo reflectance confocal microscopy of erythematosquamous skin diseases. *Exp Dermatol* 18(6), 536-540
- 46 Koller S, Inzinger M, Rothmund M, Ahlgrimm-Siess V, Massone C, Arzberger E, Wolf P, Hofmann-Wellenhof R (2014): UV-induced alterations of the skin evaluated over time by reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28(8), 1061–1068
- 47 Kurzeja M, Rakowska A, Rudnicka L, Olszewska M (2012): Criteria for diagnosing pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus by reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol* 18(3), 339-46
- 48 Kurzeja M, Czuwara J, Rakowska A, Sicinska J, Maj M, Nasierowska-Guttmejer A, Rudnicka L, Olszewska M (2014): Reflectance confocal microscopy as a non-invasive diagnostic tool for Hailey-Hailey disease. *Skin Res Technol* 20(4), 503-509

- 49 Lautenschlager S: Humane Herpesviren. In: Plewig G, Landthaler M, u.a. (Hrsg.): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Band I. 6. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2012, 100-123
- 50 Leung J, Harpaz R, Baughman AL, Heath K, Loparev V, Vázquez M, Watson BM, Schmid DS (2010): Evaluation of laboratory methods for diagnosis of varicella. *Clin Infect Dis* 51(1), 23-32
- 51 Levi A, Ophir I, Lemster N, Maly A, Ruzicka T, Ingber A, Enk CD (2012): Noninvasive visualization of intraepidermal and subepidermal blisters in vesiculobullous skin disorders by in vivo reflectance confocal microscopy. *Lasers Med Sci* 27(1), 261–266
- 52 Lieb JA, Gill M, Patel YG, Rajadhyaksha M González S: Normal Skin. In: González S, Gill M, Halpern AC (Hrsg.): *Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumors - An Atlas with Clinical, Dermoscopic and Histological Correlations*; Informa Healthcare, London 2008, 7-29
- 53 Longo C, Zalaudek I, Argenziano G, Pellacani G (2012 a): New directions in dermatopathology: in vivo confocal microscopy in clinical practice *Dermatol Clin* 30(4), 799-814
- 54 Longo C, Casari A, Pepe P, Moscarella E, Zalaudek I, Argenziano G, Pellacani G (2012 b): Confocal microscopy insights into the treatment and cellular immune response of Basal cell carcinoma to photodynamic therapy. *Dermatology* 225(3), 264-70
- 55 Mahler V, Geier J, Schnuch A (2014): Current trends in patch testing - new data from the German Contact Dermatitis Research Group (DKG) and the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK). *J Dtsch Dermatol Ges* 12(7), 583-92

- 56 Meyer LE, Otberg N, Sterry W, Lademann J (2006): In vivo confocal scanning laser microscopy: comparison of the reflectance and fluorescence mode by imaging human skin. *J Biomed Opt* 11(4), 044012
- 57 Mihályi L, Kiss M, Dobozy A, Kemény L, Husz S (2012): Clinical relevance of autoantibodies in patients with autoimmune bullous dermatosis. *Clin Dev Immunol*. Published online 2012 Dec 24, Article ID 369546, 9 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/369546>
- 58 Minsky M (1988): Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* 10, 128-138
- 59 Moscarella E, Argenziano G, Lallas A, Pellacani G, Longo C (2014): Confocal microscopy: a new era in understanding the pathophysiologic background of inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 23(5), 320-321
- 60 Mossman D (1999): Three-way ROCs. *Med Decis Making* 19(1), 78-89
- 61 Nagel MA, Gilden D (2013): Complications of varicella zoster virus reactivation. *Curr Treat Options Neurol* 5(4), 439-53
- 62 Paddock SW (2000): Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. *Mol Biotechnol* 16, 127-149
- 63 Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR (1995): In Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy of Human Skin: Melanin Provides Strong Contrast. *J Invest Dermatol* 104, 946-952
- 64 Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH (1999): In Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy of Human Skin II: Advances in Instrumentation and Comparison With Histology. *J Invest Dermatol* 113, 293-303

- 65 Rao BK, Mateus R, Wassef C, Pellacani G (2013): In vivo confocal microscopy in clinical practice: comparison of bedside diagnostic accuracy of a trained physician and distant diagnosis of an expert reader. *J Am Acad Dermatol* 69(6), e295-300
- 66 Ruëff und Przybilla: Akute allergische Kontaktdermatitis in Toxische und allergische Kontaktdermatitis. In: Plewig G, Landthaler M, u.a. (Hrsg.): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Band I. 6. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2012, 490-493
- 67 Sakanashi EN, Matsumura M, Kikuchi K, Ikeda M, Miura H (2010): A comparative study of allergic contact dermatitis by patch test versus reflectance confocal laser microscopy, with nickel and cobalt. *Eur J Dermatol* 20(6), 705-711
- 68 Sattler E, Kästle R, Arens-Corell M, Welzel J (2012): How long does protection last?-in vivo fluorescence confocal laser scanning imaging for the evaluation of the kinetics of a topically applied lotion in an everyday setting. *Skin Res Technol* 18(3), 370-377
- 69 Schmidt E, Zillikens D (2013): Pemphigoid diseases. *Lancet* 381(9863), 320-32
- 70 Siedler A, Hecht J, Rieck T, Tolksdorf K, Hengel H (2013): Varicella vaccination in Germany. A provisional appraisal in the context of MMR vaccination. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56(9), 1313-20
- 71 Skvara H, Plut U, Schmid JA, Jonak C (2012): Combining in vivo reflectance with fluorescence confocal microscopy provides additive information on skin morphology. *Dermatol Pract Concept* 2(1), 3-12
- 72 Slodownik D, Levi A, Lapidoth M, Ingber A, Horev L, Enk CD (2015): Noninvasive in vivo confocal laser scanning microscopy is effective in differentiating allergic from nonallergic equivocal patch test reactions. *Lasers Med Sci* 30(3), 1081-1087

- 73 Swindells K, Burnett N, Rius-Diaz F, González E, Mihm MC, González S (2004): Reflectance confocal microscopy may differentiate acute allergic and irritant contact dermatitis in vivo. *J Am Acad Dermatol* 50(2), 220-8
- 74 Swindle LD, Thomas SG, Freeman M, Delaney PM (2003): View of normal human skin in vivo as observed using fluorescent fiber-optic confocal microscopic imaging. *J Invest Dermatol* 121(4), 706-712
- 75 Szliska C: Kontaktallergien an den verschiedenen Körperregionen. In: Fuchs T, Aberer W (Hrsg.): *Kontaktekzem*. 2.Auflage; Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen 2007, 175-188
- 76 VivaScope® 1500 – Bedienungsanleitung. Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop mit optionaler VivaCam® Makrokamera. O.Verf. Lucid Inc. Rochester, New York (USA) 2011
- 77 Volgger M: *Lichtmikroskopie - Theorie und Anwendung*; hrsg. Lichtscheidl IK; Onlineausgabe 29. Februar 2008: <http://www.univie.ac.at/mikroskopie/>
- 78 Wassef C, Mateus R, Rao BK (2012): In vivo reflectance confocal microscopy features of discoid lupus erythematosus. *J Drugs Dermatol* 11(9), 1111-1113
- 79 Weinmann S, Chun C, Mullooly JP, Riedlinger K, Houston H, Loparev VN, Schmid DS, Seward JF (2008): Laboratory diagnosis and characteristics of breakthrough varicella in children. *J Infect Dis* 197 Suppl 2; 132-8
- 80 Welzel J, Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S, Hohenleutner U (2011): Konfokale Lasermikroskopie in der Dermatologie, AWMF-Leitlinien-Register Nr. 013/076, S1-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Dermatologie, AWMF online. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/013-076.html>

- 81 World Health Organization (2014): Varicella and herpes zoster vaccines: WHO position paper, June 2014. *Wkly Epidemiol Rec* 89(25); 265-87
- 82 Wolberink EA, van Erp PE, Teussink MM, van de Kerkhof PC, Gerritsen MJ (2011): Cellular Features of Psoriatic Skin: Imaging and Quantification Using In Vivo Reflectance Confocal Microscopy. *Cytometry B Clin Cytom* 80(3),141–149
- 83 Wolberink EA, Peppelman M, van de Kerkhof PC, van Erp PE, Gerritsen MJ (2014): Establishing the dynamics of neutrophil accumulation in vivo by reflectance confocal microscopy. *Exp Dermatol* 23(3),184-188
- 84 Wutzler P, Neiss A, Banz K, Goertz A, Bisanz H (2002): Can varicella be eliminated by vaccination? Potential clinical and economic effects of universal childhood varicella immunisation in Germany. *Med Microbiol Immunol* 191, 89-96
- 85 www.vivascope.de
- 86 Zillikens D: Bullöses Pemphigoid. In: Bullöse Autoimmundermatosen. In: Plewig G, Landthaler M, u.a. (Hrsg.): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Band I. 6. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2012, 790-795

Danksagung

Besonderen Dank möchte ich richten an:

Priv.-Doz. Dr. med. Holger Hänßle für die Bereitstellung des Themas, Hilfestellung und wissenschaftliche Betreuung während aller Arbeitsprozesse, die sehr kollegiale und freundschaftliche Motivation und die rasche Korrektur der Arbeit. Nicht zuletzt bin ich ihm für die Miterstellung der Publikation dieser Promotionsarbeit zu großem Dank verpflichtet.

Prof. Dr. med. M. P. Schön für die freundliche Unterstützung, durch die eine zeitnahe Fertigstellung dieser Arbeit erst möglich wurde.

Meinen ärztlichen Kollegen an der UMG, die mir bei der Besorgung von Patientendaten und organisatorischen Fragen stets hilfreich zur Seite standen.

... und den Patienten, ohne die es diese Arbeit nie gegeben hätte.

Lebenslauf

Am 23.06.1981 wurde ich als erstes Kind des Ehepaares Edith Samhaber, geb. Stier, und Josef Samhaber in Sathmar, Rumänien geboren. Im Anschluss an unseren Umzug nach Deutschland, begann ich 1987 meine schulische Ausbildung an der Kugelsburgschule in Volkmarsen. 1991 wechselte ich an das Christian-Rauch-Gymnasium in Bad Arolsen, wo ich im Jahr 2000 die Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Mein Medizinstudium absolvierte ich von 2000 bis 2007 an der Georg-August-Universität in Göttingen. Nach meinem Praktischen Jahr, welches ich in Budapest, Bremerhaven und Alfeld durchführte, schloss ich mein Studium im Mai 2007 erfolgreich mit dem dritten Staatsexamen ab.

Von September 2007 bis Juli 2008 arbeitete ich als Assistenzärztin in der Nordseeklinik Norderney, einer Rehabilitationseinrichtung für Haut- und Atemwegserkrankungen. Im Anschluss erweiterte ich meine Kenntnisse in der Inneren Medizin, inklusive der Angiologie und der Phlebologie, als Assistenzärztin im Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Northeim. Zwei Jahre war ich nachfolgend als Weiterbildungsassistentin in der Überörtlichen Dermatologischen Gemeinschaftspraxis in Kassel bei Dr. med. Thomas Meyer, Stefanie Baum und Kollegen tätig.

Seit April 2012 arbeite ich als Ärztin in der Abteilung Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Göttingen, wo ich im März 2013 die vorliegende Promotionsarbeit unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. Holger Hänßle begann. Im Februar 2016 absolvierte ich erfolgreich die Facharztprüfung für Dermatologie und Venerologie.