

**Untersuchung zur epidermalen Dicke und zur  
alters- und tiefenabhängigen Zusammensetzung  
der extrazellulären dermalen Matrix mittels  
Multiphotonenlasertomographie**

**Dissertation**

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

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich- Schiller-Universität Jena

von Tanja Vogel  
geboren am 29.12.1986 in Suhl

## Gutachter

1. Prof. Dr. J. Norgauer, Jena
2. PD Dr. A. Bauer, Dresden
3. Prof. Dr. K. König, Saarbrücken

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.12.2012

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Autofluoreszenz
bzgl.	bezüglich
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy (konfokale Laserscanningmikroskopie)
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
CV	Coefficient of Variation (Variationskoeffizient)
DNA	DNS (Desoxyribonukleinsäure)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAM	Flavin-Adenin-Mononukleotid
HE	Hämatotoxylin - Eosin Färbung
HIV	Human Immundeficiency Virus (Humanes Immundefizienzvirus)
HR	Handrücken
LE	Lupus erythematoses
MLT	Multiphotonen Laser Tomograph
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MRT 1-5	Maximale relative Tiefe im Abschnitt 1 bis 5 (siehe Auswertung der mittels PRIMOS gewonnenen Daten)
MW	Mittelwert
NA	Numerische Apertur
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)

NIR	Near Infrared (Nahe Infrarotstrahlung im Wellenlängenbereich von 700-1400 nm)
OCT	Optical Coherence Tomography (optische Kohärenztomografie)
PMT	Photo Multiplier Tube (Photomultiplier bzw. Lichtdetektor)
PRIMOS	Phaseshift Rapid in Vivo Measurement of Skin
SAAID	SHG to AF Aging Index of Dermis (SHG zu AF Alterungs- Index der Dermis)
SHG	Second Harmonic Generation
SPC	Single Photon Counting (Einzelphotonenzählung)
Str.	Stratum (Schicht)
Tab.	Tabelle
Tbc	Tuberkulose
TF 1	Testfeld 1
TF 2	Testfeld 2
TTS	Transdermales, therapeutisches System
UA	Unterarm
UV	Ultraviolett (ultraviolette Strahlung im Wellenlängenbereich von 100-400 nm)
v.a.	vor allem

### **Abkürzungen für physikalische Größen und Einheiten:**

$\mu\text{m}$	Mikrometer
cm	Zentimeter
$\text{cm}^2$	Quadratzenimeter
$\text{GW}/\text{cm}^2$	Gigawatt pro Quadratzenimeter
MHz	Megahertz
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
mW	Milliwatt
$\text{MW}/\text{cm}^2$	Megawatt pro Quadratzenimeter
nm	Nanometer
s	Sekunde

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>11</b>
2.1 Aufbau und Funktion des Hautorgans .....	11
2.1.1 Makroskopie der Haut.....	11
2.1.2.1 Epidermis .....	12
2.1.2.2 Dermoepidermale Junctionszone .....	14
2.1.2.3 Dermis .....	14
2.1.2.4 Subkutis.....	15
2.1.3 Funktionen des Hautorgans.....	16
2.2 Die Geschichte der Multiphotonenlasertomographie .....	17
2.3 Das Prinzip der Multiphotonenlasertomographie.....	18
2.3.1 Zweiphotonenfluoreszenzanregung .....	18
2.3.2 Die endogenen Fluorophore der Haut.....	20
2.3.4 Second harmonic generation (SHG) .....	22
2.4 Der SAAID Hautalterungsindex.....	23
2.5 Die epidermale Dicke der Haut - ein Vergleich unterschiedlicher Messverfahren .....	26
<b>3 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>29</b>
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>31</b>
4.1 Patientenkollektiv .....	31
4.2 Probandenaufklärung.....	31
4.3 Ein- und Ausschlusskriterien.....	32
4.3.1    Einschlusskriterien .....	32

4.3.2 Ausschlusskriterien .....	33
4.4 Aufbau und Funktionsweise des Multiphotonenlasertomographen DermaInspect .....	36
4.5 Ablauf der Untersuchung am Multiphotonenlasertomographen .....	38
4.6 Statistische Auswertung .....	42
4.7 Das optische 3D Hautmessgerät PRIMOS .....	43
4.7.1 Funktionsweise des PRIMOS .....	43
4.7.2 Ablauf der Untersuchungen mit dem optischen 3D Hautmessgerät PRIMOS .....	43
4.7.3 Auswertung der mittels Primos gewonnenen Daten .....	44
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
5.1 Die Schichten gesunder Haut unter dem Lichtmikroskop .....	46
5.1.1 Eigenschaften junger, gesunder Haut .....	46
5.1.2 Eigenschaften der Altershaut .....	47
5.2 Die Schichten gesunder Haut unter dem Multiphotonenlasertomographen .....	48
5.3 Vergleich zwischen konventioneller Histologie und Multiphotonenlasertomografie bzgl. der Morphologie einzelner Hautschichten .....	51
5.4 Bestimmung der epidermalen Dicke mithilfe des MLT .....	52
5.5 Die epidermale Dicke in Abhängigkeit vom Probandenalter und der Körperlokalisierung .....	54
5.6 Der Hautalterungsindex SAAID .....	56
5.6.1 Der SAAID in Abhängigkeit vom Lebensalter .....	57
5.6.2 Der SAAID in Abhängigkeit von der Messtiefe .....	58
5.6.3 Der SAAID in Relation zur Oberfläche bzw. zum SHG Peak .....	60
5.7 Ergebnisse der Messungen mittels PRIMOS .....	63
5.7.1 Vergleich der 3 Testfelder .....	63
5.7.2 Vergleich der Altersgruppen .....	64
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>68</b>

6.1 Interpretation der Emissionscharakteristika im AF und SHG Kurvenverlauf in Abhängigkeit von der Hauttiefe und dem Lebensalter .....	68
6.2 Interpretation und Vergleich des SAAID Kurvenverlaufs bei jungen und alten Probanden .....	72
6.2.1 Ursachen und Biologie der Kollagenablagerung im Str. papillare der Dermis in alter Haut.....	73
6.3 Der SAAID in Abhängigkeit von der Messtiefe .....	75
6.4 Beurteilung der Hautfaltenmessung mittels PRIMOS.....	75
6.5 Vorteile der Multiphotonenlasertomographie .....	78
6.6 Nachteile der Multiphotonenlasertomographie .....	79
6.7 Vorschläge zur Optimierung der Messung mittels MLT.....	80
6.8 Die Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie in Forschung und Praxis.....	81
<b>7 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>84</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>9 Anhang .....</b>	<b>93</b>

# 1 Zusammenfassung

Als nach außen gerichtetes, größtes Organ des menschlichen Körpers ist unsere Haut einer Vielzahl von externen und intrinsischen Einflüssen ausgesetzt, die sich im Laufe des Lebens summieren und das äußere Erscheinungsbild sichtbar verändern. Im Zuge eines komplexen biologischen Prozesses entstehen neben Falten auch pigmentierte Veränderungen (Lentiginos solaris et senilis). Diese makroskopisch sichtbaren Veränderungen stellen für viele Menschen in erster Linie ein kosmetisches Problem dar und stellen die Kosmetikindustrie vor neue Herausforderungen. Mithilfe der Lichtmikroskopie lassen sich u.a. Veränderungen innerhalb der Dermis nachweisen – der Kollagengehalt sinkt, gleichzeitig erfolgt eine Ablagerung minderwertigen elastischen Materials, welche durch UV-Strahlung zusätzlich begünstigt wird.

Lange Zeit basierte auch die Bestimmung der epidermalen Dicke auf der mikroskopischen Auswertung von Hautbiopsien. Diese Methode stellt jedoch nicht nur einen invasiven Eingriff mit dementsprechenden Risiken dar, sondern führt aufgrund von Fixationsartefakten mitunter zu verfälschten Ergebnissen.

In den letzten Jahren rückte neben anderen innovativen Imagingverfahren die Multiphotonenlasertomographie als vielversprechendes, risikoarmes, diagnostisches Verfahren in der Dermatologie zunehmend in den Vordergrund. Die horizontale, hochauflösende Darstellung einzelner Hautschichten bis in eine Tiefe von 200  $\mu\text{m}$  ermöglicht die exakte Visualisierung der Zellarchitektur, pathologischer Zellveränderungen oder die Demonstration des transkutanen Stofftransportes verschiedener Pharmaka bzw. Kosmetika. Das Prinzip beruht darauf, endogene Biomoleküle der Haut mittels langwelliger NIR-Strahlung zur Fluoreszenz anzuregen und die emittierten Photonen mithilfe von Detektoren zu erfassen. Neben der Autofluoreszenz (AF) endogener Fluorophore lässt sich ein weiteres optisches Phänomen des dermalen fibrillären Kollagens, der second harmonic generation Effekt (SHG), erzeugen: AF und SHG Signal werden separat erfasst. Aus dem Verhältnis der AF des Elastins und dem SHG des Kollagens lässt sich der sogenannte SAAID Hautalterungsindex berechnen und sich auf diese Weise das Alter der Haut quantifizieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war u.a. die Frage, inwieweit das Alter des Probanden und die Messtiefe die Höhe des SAAID beeinflussen. Desweiteren standen neben der morphologischen, horizontalen Darstellung der einzelnen epidermalen Zellschichten auch exakte Berech-

nungen zur epidermalen Dicke in Abhängigkeit von Körperlokalisierung und Probandenalter im Vordergrund der klinisch prospektiven Studie. 30 hautgesunde, freiwillige Probanden zwischen 21 und 82 Jahren, die zuvor in 3 Altersgruppen aufgeteilt wurden, unterzogen sich dazu einer einmaligen, mehrstündigen Untersuchung am MLT. Unter Verwendung der JenLab Software wurden an 2 Testfeldern (Unterarm dorsal und Handrücken) zunächst in jeder epidermalen Hautschicht exemplarische, morphologische Bilder generiert. Anschließend erfolgte in jedem Testareal die Aufnahme von 3 sogenannten SPC Stapeln mit je 50 Bildern. Desweiteren erfolgten bei jedem Probanden Messungen zur Faltentiefe der Haut am optischen 3 D Messgerät PRIMOS.

Nach Auswertung der SPC Stapel und grafischer Auftragung der totalen Photonenzahl pro Bild über die Fokustiefe ergaben sich charakteristische Kurvenverläufe für AF und SHG mit entsprechenden Peaks, die anhand typischer Fluorophore in einzelnen Zellschichten den entsprechenden epidermalen Schichten zugeordnet werden konnten. Aus den Abständen zwischen den Peaks innerhalb eines Stapels konnte die Dicke der jeweiligen Epidermisschicht berechnet werden. In allen Altersgruppen wurden signifikant höhere Werte am Handrücken im Vergleich zum Unterarm nachgewiesen. Eine Zu- oder Abnahme der Dicke der untersuchten epidermalen Schichten mit steigendem Probandenalter zeigte sich nicht.

Desweiteren resultierte eine mit zunehmendem Alter signifikante, kontinuierliche Abnahme des SAAID. Nach grafischer Darstellung des SAAID über die Hauttiefe zeigten sich starke Unterschiede zwischen jungen und alten Probanden: Bei jungen Studienteilnehmern steigt der SAAID bis auf ein Maximum innerhalb der Dermis an und verläuft bis zum Erreichen der maximalen Fokustiefe plateauförmig, während beim alten Probanden nach Erreichen eines SAAID Peaks der Hautalterungsindex auf einen Wert abfällt, der auch bei zunehmender Tiefe konstant bleibt. Der SAAID Peak bei alter Haut korrespondiert mit einem Streifen intakten Kollagens innerhalb der papillären Dermis, der als Grenzzone bezeichnet wird und einen Ansatz zur Reparatur lichtbedingter Hautschäden darstellt.

Die Auswertung der mittels PRIMOS gemessenen Hautfaltentiefe erbrachte bei Vergleich der Altersgruppen in keinem der 3 Testfelder signifikante Unterschiede. Beim Testen der 3 Lokalisationen gegeneinander resultierte eine signifikant geringere maximale Faltentiefe an der Unterarminnenseite gegenüber dem Handrücken, was sich durch die stärkere Exposition des Handrückens gegenüber Umweltreizen erklären lässt.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Aufbau und Funktion des Hautorgans**

#### **2.1.1 Makroskopie der Haut**

Mit 1,5 – 2 m<sup>2</sup> überzieht unsere Haut als sogenanntes „Flächenorgan“ die Außenseite des Organismus und stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Das makroskopische Erscheinungsbild der Hautoberfläche zeigt ein typisches Relief aus Furchen, Falten, Feldern bzw. Leisten. Bewegungsfurchen und -falten bilden sich im Bereich der Gelenke. Mit zunehmendem Lebensalter entstehen aufgrund eines Elastizitätsverlustes verstärkt Altersfalten.

Die unbehaarte Leistenhaut findet man im Bereich der Handinnenfläche und an der Fußsohle. Sie weist aufgrund der besonderen mechanischen Belastung in diesen Körperregionen eine besondere Dicke auf. Die Anordnung der Hautleisten ist determiniert durch ein genetisch festgelegtes Papillarleistenmuster, das für jeden Menschen einzigartig ist. Diese Individualität macht man sich in der Kriminologie und Anthropologie zunutze. Die übrige Haut wird durch eine zarte Furchung in polygonale Felder unterteilt, an deren Schnittpunkten sich die Haarfollikel befinden. Dieses Muster führte zur Bezeichnung Felderhaut. Von klinischem Interesse ist die linienförmige Gliederung der Haut. Die Schnittführung bei Operationen sollte beispielsweise entlang der Hautspaltlinien, die durch die Struktur und Anordnung von Kollagen- und elastischen Fasern der darunterliegenden Dermis verursacht werden, erfolgen. Klaffende Wunden können so vermieden werden, außerdem resultieren später diskretere Narben.

Viele Genodermatosen aber auch bestimmte Arten von Nävi folgen hingegen den sogenannten Blaschko-Linien, welche weder mit Gefäß- noch Nervenverläufen assoziiert sind, sondern vielmehr dem Ausbreitungsweg von Zellen während der Embryogenese entsprechen.

Bedeutsam für die Ausbreitung des Herpes zoster ist die segmentale Gliederung der Haut in Form von Dermatomen, die die radikuläre Innervation der Haut widerspiegeln (Moll 2005, Rassner 2009).

## 2.1.2 Mikroskopie der Haut

Unsere Haut ist schichtförmig aufgebaut und gliedert sich von außen nach innen wie folgt:

- Epidermis (Oberhaut)
- Dermis (Lederhaut)
- Subkutis (Unterhaut)

### 2.1.2.1 Epidermis

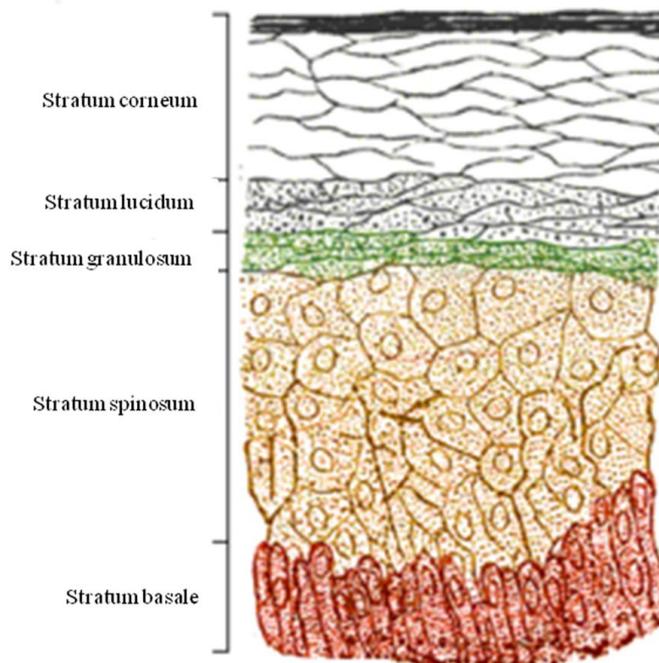
Die gefäßlose Epidermis bildet ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel und besteht zu etwa 90% aus Keratinozyten, die im Zuge der terminalen epidermalen Differenzierung in kernlose Korneozyten (Hornzellen) umgewandelt werden. Die Zellen durchlaufen innerhalb von 28 Tagen einen Reifungsprozess und steigen innerhalb der Epidermisschichten auf: Das einschichtige Stratum basale besteht aus kubischen Zellen, die in der Lage sind, sich zu teilen. Als unterste Zellschicht der Epidermis erfüllt es die wichtige Aufgabe der Regeneration. Womöglich teilen sich nur wenige Stammzellen, wobei eine Tochterzelle basal erhalten bleibt, die andere gen Hautoberfläche wandert. Unter Veränderung ihrer Struktur durchläuft sie das Stratum spinosum, das Stratum granulosum, letztendlich das Stratum corneum und wird an der Hautoberfläche abgestoßen. Abb. 1 veranschaulicht schematisch den schichtförmigen Aufbau der Epidermis.

Während das Stratum basale noch als einschichtige Zellschicht zylindrischer Zellen imponiert, flachen die Zellen im Stratum spinosum zunehmend ab und bilden mehrere übereinander liegende Zelllagen. Die einzelnen Stachelzellen sind durch Interzellularbrücken, die sogenannten Desmosomen, untereinander verbunden. Im darüber liegenden ein- bis dreilagigem Stratum granulosum enthalten die Körnerzellen basophile Keratohyalin granula und erscheinen bereits deutlich abgeflacht. Zunehmend gehen Zellen nun in die Apoptose über, verbunden mit einem Abbau der Zellorganellen.

Die äußerste Epidermisschicht bezeichnet man als Stratum corneum. Sie besteht aus 10-20 Lagen kernloser, abgestorbener Hornzellen (Korneozyten), die als keratinreiche, flache Zellen nach außen abgestoßen werden. Palmoplantar findet sich zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum das Stratum lucidum – eine dünne homogen erscheinende Schicht mit dicht gepackten Zellen (Rassner 2009, Moll 2005).

Neben den Keratinozyten beherbergt die Epidermis auch andere Zellen, jedoch in wesentlich geringerer Anzahl. Dazu zählen Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen und Lymphozyten) sowie Merkel-Zellen, denen eine Perzeptionsfunktion zukommt.

Melanozyten sind als dendritische Zellen in der Basalzzone der Epidermis lokalisiert. Elektronenmikroskopisch sind sie anhand ihrer Melanosomen identifizierbar, in denen sie aus der Aminosäure Tyrosin das Hautpigment Melanin synthetisieren und an benachbarte Keratinozyten abgeben (Moll 2005). Sie bilden somit das Pigmentsystem der Haut und schützen vor UV-Strahlung (Rassner 2009). Die Langerhans-Zellen sind überwiegend suprabasal und im Bereich der äußeren Wurzelscheide lokalisiert und entstammen der myeloischen Zellreihe des Knochenmarks. Erst nach Einwanderung in die Epidermis erfolgt die Differenzierung zu Langerhans-Zellen. Sie gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen und sind an der Aktivierung von T-Helferzellen beteiligt. Gleichzeitig erfüllen sie eine wichtige Funktion bei der Entstehung allergischer Typ IV Reaktionen. Hierzu zählt z.B. das allergische Kontaktekzem (Moll 2005).



**Abb. 1: Aufbau der Epidermis. (modifiziert nach <http://www.triconmed.de/professional-healthcare/bilder/hautaufbau.g>).**

### **2.1.2.2 Dermoepidermale Junktionszone**

Diese auch als Basalmembranzzone bezeichnete Grenzfläche verbindet die Epidermis mit der darunterliegenden Dermis und verzahnt beide Hautschichten miteinander. Epidermale Reteleisten ragen in die Dermis hinein, zwischen denen bindegewebige, dermale Papillen lokalisiert sind. Somit lässt sich ein wellenförmiger Verlauf beschreiben. Die Basalmembran besteht aus zwei Hauptschichten, der Lamina lucida, die mittels Verankerungsfibrillen an der Plasmamembran der Basalzellen befestigt ist, und der Lamina densa, die Verbindung zur Dermis hat. Zusammen mit feinen Kollagenfasern und Matrixsubstanz wird eine Zone zwischen Epidermis und Dermis geschaffen, die den Austausch von Zellen und Molekülen kontrolliert (Terhost 2005). Aufgrund des komplexen Aufbaus sind jedoch auch zahlreiche Störungen im Bereich der epidermo-dermalen Junktionszone möglich, die z.B. zu einer Blasenbildung - wie beim bullösen Pemphigoid - führen können (Moll 2005, Terhost 2005).

### **2.1.2.3 Dermis**

Die Dermis besteht aus fibroelastischem Bindegewebe und erstreckt sich bis zum subkutanen Fettgewebe. Neben Fibroblasten, setzt sie sich überwiegend aus kollagenen und elastischen Fasern zusammen, die in eine gelartige Grundsubstanz eingebettet sind. Fasern und Grundsubstanz bezeichnet man zusammen als extrazelluläre Matrix (Fritsch 2009). Histologisch lässt sich die Dermis in zwei Schichten unterteilen: Das oberflächlich gelegene Stratum papillare, welches sich zwischen den epidermalen Reteleisten befindet, und das breite Stratum reticulare. Während die zellreiche papilläre Dermis mit zahlreichen Blutgefäßen und Nerven vorwiegend für die Versorgung der Epidermis verantwortlich ist, besteht das Stratum reticulare größtenteils aus kollagenen und elastischen Fasern, die der Haut mechanische Stabilität und Reißfestigkeit bzw. Elastizität verleihen (Moll 2005).

#### Dermale Zellen

Fibroblasten sind die dominierenden Zellen der Dermis, welche die Synthese von kollagenen Fasern und der Grundsubstanz übernehmen. Auch Histozyten, die als aktive Makrophagen abgestorbene Zellen und Abbaumaterial aufnehmen, lassen sich in der Dermis zahlreich nachweisen. Für allergische und entzündliche Reaktionen sind die basophilen Mastzellen mit ihren histaminhaltigen Granula verantwortlich (Moll 2005).

## Dermale Fasern

Kollagenfasern, bestehend aus Typ 1 Kollagen, bilden den Hauptanteil der dermalen extrazellulären Matrix. Sie sind zu Kollagenfaserbündeln arrangiert, die parallel zur Hautoberfläche verlaufen und der Haut mechanische Stabilität verleihen. Kollagenfasern vom Typ 3 (Retikulinfasern) und Typ 7 befinden sich im Bereich der Basalmembran und spielen eine Rolle bei der Verankerung der Dermis in der Epidermis (Moll 2005). Im Zuge der Hautalterung sinkt der Kollagengehalt durch die abnehmende Syntheseleistung der Fibroblasten (Varani et al. 2002).

Auch elastische Fasern sind am Aufbau des dermalen Fasernetzwerkes beteiligt. Sie bestehen aus einem amorphen Kern, dem Elastin und umgebenden Mikrofibrillen. Dieser strukturelle Aufbau garantiert nach Verformung der Haut die Rückkehr zur Ausgangslage (Fritsch 2009).

## Grundsubstanz

Die Grundsubstanz der Dermis fungiert hauptsächlich als mechanische Stütze und Stoßdämpfer, da sie in der Lage ist, Wasser zu speichern. Dies wird ermöglicht durch die anionischen Glykosaminoglykane und Proteoglykane, die im wesentlichen durch Fibroblasten synthetisiert und durch Hyaluronidase und lysosomale Enzyme wieder abgebaut werden (Fritsch 2009).

### **2.1.2.4 Subkutis**

Das Unterhautfettgewebe isoliert den Körper vor Kälteeinwirkung und bietet Schutz vor äußeren, mechanischen Einwirkungen. Lipozyten bilden läppchenartige Formationen und sind durch bindegewebige Septen voneinander getrennt. In den Septen verlaufen Blutgefäße und Nerven, die bis in die Dermis ziehen (Fritsch 2009).

### **2.1.3 Funktionen des Hautorgans**

Als äußere Hülle unseres Organismus erfüllt die Haut in erster Linie eine Schutzfunktion gegenüber externen Einflüssen. Das Eindringen von Infektionserregern wird bei intakter Hautoberfläche durch den speziellen Aufbau der oberen Epidermis mit Hornschuppen und dichten Zell-Zell-Verbindungen verhindert. Die besondere Beschaffenheit der Epidermis bietet überdies eine exzellente Barriere gegenüber der Austrocknung unseres Körpers. Weiterhin besitzt der Säureschutzmantel der Haut mit einem pH-Wert von 5,5 eine hohe Pufferkapazität und bildet somit nicht nur Schutz vor mikrobiellen Erregern, sondern auch gegenüber chemischen Noxen. Um einfallende UV-Strahlung abzuschirmen, reflektiert und absorbiert die Haut Licht. Die Reflexion erfolgt v.a. durch den Oberflächenfilm und das Stratum corneum, nicht reflektierte Strahlen werden durch das Melaninpigment in den Melanozyten des Stratum basale absorbiert. Die Stärke dieses Schutzes ist jedoch von der individuellen Pigmentierung jedes Einzelnen abhängig und erfordert in Abhängigkeit vom Hauttyp jedes Einzelnen einen zusätzlichen Schutz durch UV-Karenz, Kleidung oder Sonnencreme.

Der komplexe Aufbau der Dermis aus kollagenen und elastischen Fasern sowie der wasserspeichernden Grundsubstanz schützt vor scherenden, gewebstrennenden Einflüssen.

Mechanische Einwirkungen werden durch das subkutane Fettgewebe abgepuffert. Dieses erfüllt insbesondere eine wichtige Funktion hinsichtlich der Thermoregulation unseres Körpers. Die Subkutis schützt einerseits vor Kälteeinwirkung, zum anderen kann durch eine Steigerung der Hautdurchblutung und Schweißsekretion Wärme nach außen abgegeben werden.

Neben den bisher genannten Eigenschaften spielt die Haut zudem eine wichtige Rolle in der Aufnahme äußerer Reize. Als Sinnesorgan vermittelt sie Berührungs-, Druck-, Temperatur- und Schmerzempfindungen über spezifische Rezeptoren und freie Nervenendigungen, die in der Dermis und Subkutis lokalisiert sind.

Zusammenfassend lässt sich die Haut als ein komplexes Organ mit vielfältigen Aufgaben beschreiben. Nicht zuletzt besitzt sie eine bedeutsame Rolle in der psychosozialen Kommunikation und lässt Rückschlüsse auf den Gemütszustand oder das Alter des betrachteten Menschen zu. (Rassner 2009, Moll 2005).

## 2.2 Die Geschichte der Multiphotonenlasertomographie

Das Prinzip der Anregung eines Moleküls durch zwei Photonen wurde erstmals 1931 durch Maria Goeppert-Mayer beschrieben (Goeppert-Mayer 1931). 30 Jahre später untersuchten Kaiser und Garrett dieses Prinzip experimentell an Calcium-Fluorid-Europium-Kristallen mittels eines Rubinlasers (Kaiser und CGB 1961). Doch erst 1990 führten Denk et al. die ersten mikroskopischen Untersuchungen mithilfe der Zweiphotonenfluoreszenzanregung durch. Hierbei gelang es ihnen, Chromosomen in sich teilenden Nierenzellen darzustellen (Denk et al. 1990).

Der SHG Effekt -bekannt seit Anfang der 60iger Jahre- wurde durch Christensen und Hellwarth erstmals für eine experimentelle Studie eingesetzt: Die beiden Wissenschaftler untersuchten die Struktur von Zinkselenid-Kristallen unter einem konventionellen Lichtmikroskop. Der SHG Effekt wurde unter Verwendung eines Nd:YAG Lasers erzeugt, mittels Prisma und Linse gelang es, den Strahl zu polarisieren und auf die Probe zu fokussieren, sodass SHG per Lichtmikroskopie beobachtet werden konnte (Hellwarth und Christensen 1974).

1978 gelang es Gannaway und Sheppard erstmalig mithilfe eines Scanning-Mikroskops Bilder verschiedener Kristalle durch den SHG-Effekt zu erzeugen. Aufgrund der hohen Kontraste konnten Strukturdetails, die zuvor durch konventionelle Lichtmikroskopie nicht sichtbar waren, dargestellt werden. Sie erkannten damals bereits den Nutzen der Methode in der Untersuchung biologischer Gewebe. Doch erst mit der Einführung gepulster Laser gelang es, die auf die Probe auftreffende Energie soweit zu drosseln, dass nur eine geringe Schädigung biologischer Gewebe verursacht wurde (Gannaway und Sheppard 1978). 1981 untersuchten Shmuel Roth und Issac Freund Kollagen in Sehnen von Rattenschwänzen – der vermutlich erste Nachweis von SHG an einem biologischen Präparat (Roth und Freund 1981). Die Erstellung von Bildern gelang jedoch erst fünf Jahre später (Freund et al. 1986).

Nachdem Denk et al. im Jahr 1990 Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie demonstriert hatten, wurden bis heute zahlreiche Studien sowohl an Gewebeproben ex vivo als auch an menschlicher Haut in vivo durchgeführt. Aufgrund der hohen Eindringtiefe der Laserstrahlung können einzelne Zellen und sogar Fasern in lebender Haut studiert werden, die lichtmikroskopisch nur an fixierten, geschnittenen und gefärbten Proben ex vivo untersucht werden können. In Tierexperimenten wurde u.a. Nieren- und Hirngewebe mithilfe der Zweiphotonenfluoreszenzanregung untersucht (Dunn et al. 2002, Helmchen und Denk 2005). Neben dem Einsatz des

MLT in der Dermatologie ergeben sich somit auch in anderen Bereichen der Medizin neue, vielversprechende Forschungsmöglichkeiten.

## **2.3 Das Prinzip der Multiphotonenlasertomographie**

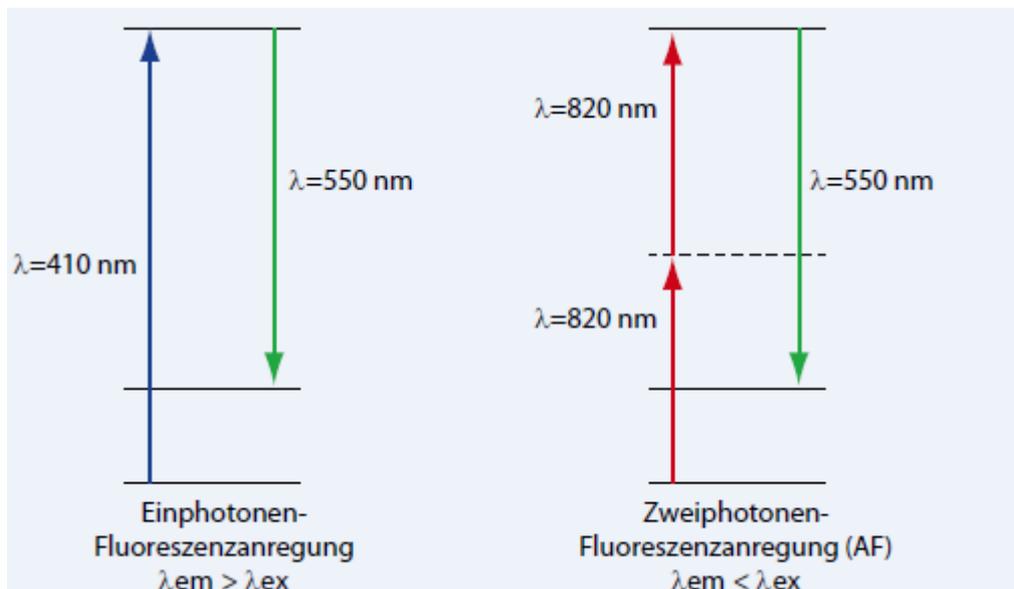
Die Multiphotonenlasertomographie ist ein modernes, nicht invasives optisches Verfahren, das mithilfe eines Lasers die Untersuchung und Abbildung einzelner horizontaler Hautschichten mit subzellulärer Auflösung ( $<1\mu\text{m}$ ) ermöglicht.

Damit bestehen die Voraussetzungen zur digitalen Abbildung und Bewertung zellulärer und molekularer Strukturen. Während die ersten Multiphotonen-Laserscanning-Mikroskope lediglich zweidimensionale Messungen *in vitro* ermöglichten, erlaubte die weitere Entwicklung bald auch eine dreidimensionale Rekonstruktion des mikroskopisch untersuchten Objekts anhand horizontaler Schnittbilder (Kaatz und König 2010, Denk et al. 1990). Die Weiterentwicklung des Prinzips zur Multiphotonenlasertomografie ermöglicht nicht nur die Darstellung horizontaler Hautschichten an Gewebeproben *ex vivo*, sondern auch Messungen am Patienten *in vivo* mit hohem Kontrast und subzellulärer Auflösung (Kaatz und König 2010). Dies wird mithilfe eines 80/90-MHz-Titan-Sapphire-Lasers realisiert (Kaatz und König 2010). Demzufolge stellt dieses Verfahren ein neuartiges diagnostisches Mittel zur Untersuchung der menschlichen Haut dar. Die Multiphotonenlasertomographie wurde zur Früherkennung von Hautkrebs oder zur Effektivitätskontrolle kosmetischer oder pharmazeutischer Wirkstoffe *in vivo* angewendet (König 2008). Auch Gewebeproben von Patienten mit verschiedenen dermatologischen Erkrankungen können mithilfe des Geräts analysiert werden. Es findet Anwendung bei Pilzinfektionen der Haut oder entzündlichen Hauterkrankungen wie Kontaktekzemen oder Psoriasis (König und Riemann 2003).

### **2.3.1 Zweiphotonenfluoreszenzanregung**

Fluoreszenz bezeichnet die Emission von Licht in Form von Photonen nach vorheriger Anregung von Atomen oder Molekülen durch eine externe Energiequelle (Ghiran 2011). Durch die Anregung von fluoreszenzfähigen Atomen bzw. Molekülen werden deren Elektronen in einen

energetisch höheren Zustand versetzt. Bei Rückkehr in den energetischen Grundzustand wird Fluoreszenzstrahlung emittiert, die in Form von Photonen registriert werden kann und i.d.R. aufgrund einer höheren Wellenlänge energieärmer ist als die Anregungsstrahlung (Einphotonenfluoreszenzanregung) (Ghiran 2011, Kaatz und König 2010). Um ein Fluoreszenzmolekül optisch in einen angeregten Zustand zu versetzen, bedarf es der Absorption in Form von Photonen. Während bei der klassischen Einphotonenanregung mithilfe einer kurzwelligen, energiereichen Strahlung ein einzelnes Photon absorbiert und infolgedessen ein Molekül zur Fluoreszenz angeregt wird, kann bei der Zweiphotonenautofluoreszenzanregung der gleiche Effekt durch die Absorption zweier Photonen im langwelligen Nahe-Infrarot-Bereich (NIR) zwischen 700 und 1100 nm erreicht werden (Abb. 2) (König 2008, König 2000). Die Elektronen des angeregten Moleküls werden dabei auf ein höheres Energieniveau angehoben. Da dieser Zustand instabil ist, sind sie bestrebt, in den Grundzustand zurückzukehren und emittieren dabei die gewünschte kurzwellige, energiereiche Fluoreszenzstrahlung, die in Form von detektierten Photonen gemessen wird (König 2008). Im Unterschied zur Einphotonenfluoreszenzanregung ist die emittierte Strahlung kurzwelliger und damit energiereicher als die ursprüngliche Anregungsstrahlung (Kaatz und König 2010). Biomoleküle, die ohne vorherige Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen in der Lage sind, nach Anregung mithilfe von Photonen kurzwellige Strahlung zu emittieren, bezeichnet man als endogene Fluorophore – sie erzeugen die sogenannte Autofluoreszenz.



**Abb. 2: Unterschiede zwischen Einphotonen- und Zweiphotonenfluoreszenzanregung. Die grünen Pfeile stellen die emittierte Fluoreszenzstrahlung dar (Kaatz und König 2010).**

Unabdingbare Voraussetzung für die Anregung eines Moleküls durch zwei Photonen ist eine hohe Photonenflussdichte. Durch femtosekundengepulste Laser mit einer Leistung von ca. 100 mW und die Fokussierung des Laserstrahls unter Verwendung von Objektiven hoher numerischer Apertur (NA) werden die dafür erforderlichen hohen Lichtintensitäten im Bereich von MW/cm<sup>2</sup> bzw. GW/cm<sup>2</sup> erzeugt (König 2008, König 2000). Da nur wenige endogene Absorber im optischen Fenster zwischen 700 und 1100 nm existieren, erscheint das Gewebe nahezu transparent und eine hohe Eindringtiefe der NIR-Strahlung wird ermöglicht (König 2000). Folglich können endogene Fluorophore und eine Vielzahl exogener fluoreszierender Stoffe, z.B. Kosmetika oder Pharmaka *in vivo* oder *ex vivo* in Gewebeproben in Tiefen von mehr als 100 µm detektiert werden (König 2000).

### **2.3.2 Die endogenen Fluorophore der Haut**

Die Autofluoreszenz der Haut hat ihren Ursprung in einer Vielzahl endogener Fluorophore mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften (Masters et al. 1997). Die Aufzeichnung der Emissionswellenlängen und der Fluoreszenzlebensdauer erlauben Rückschlüsse auf den Ursprung der Fluoreszenz (Masters et al. 1997). Die bedeutendsten Fluorophore der Haut sind das in den Korneozyten enthaltene Keratin im Stratum corneum, NAD(P)H in allen lebenden Zellen sowie das im Stratum basale lokalisierte Pigment Melanin und Elastin im Bereich der Dermis. Die stärksten Fluoreszenzsignale liefern Keratin und Melanin (König 2008).

Fluoreszenzsignale in den oberen Schichten der Epidermis entstammen der Hornsubstanz Keratin. Zu dieser Erkenntnis gelangten Pena et al. in einer 2005 durchgeführten Studie. Wie bereits beschrieben, wandern epidermale Zellen vom Stratum basale gen Hautoberfläche, um dann als Hornschuppen abgestoßen zu werden. Im Zuge dieses Prozesses nimmt der Keratingehalt stetig zu und erreicht sein Maximum im Stratum corneum. Hier kann demzufolge ein starkes Fluoreszenzsignal registriert werden (Pena et al. 2005).

Den Nicotinsäurederivaten NADH und NADPH kommen wichtige Funktionen im Zellstoffwechsel zu: Als Kofaktor von Redoxreaktionen sind sie in der Lage, sowohl Elektronen abzugeben als auch aufzunehmen und sind somit entscheidend in den Zellstoffwechsel involviert.

NAD(P)H findet sich im Zytoplasma und in den Mitochondrien und ist für den Hauptanteil der zellulären Fluoreszenz verantwortlich. Es zeigt bei einer Anregungswellenlänge von 730 nm sein Emissionsmaximum im blau-grünen Bereich und kann aufgrund der hohen Eindringtiefe von NIR-Laserstrahlung auch noch in Tiefen bis zu 150  $\mu\text{m}$  beobachtet werden (Masters et al. 1997, König 2008).

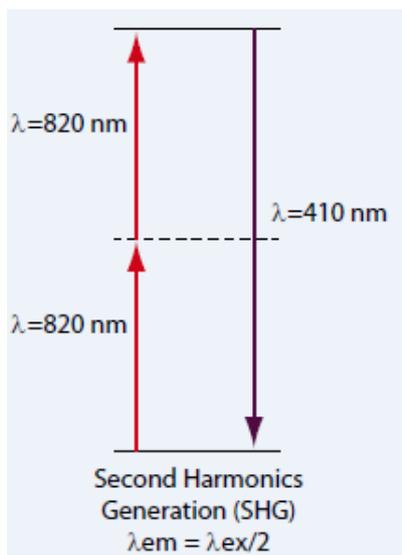
Flavine und Flavin-Adenin-Mono- und Dinukleotide (FAM und FAD) fungieren ebenfalls als Redoxpartner für verschiedene Enzyme des mitochondrialen Zellstoffwechsels, emittieren Fluoreszenzstrahlung jedoch anders als NAD(P)H nur im oxidierten Zustand und sind in wesentlich geringeren Konzentrationen als NAD(P)H in diesen Zellorganellen vorhanden. Um FAD selektiv anzuregen, benötigt man Wellenlängen von 900 bis 1000 nm, in denen NAD(P)H nur noch geringfügig leuchtet (Huang et al. 2002). Die Redoxfluorometrie basierend auf der Fluoreszenz von NAD(P)H und FAD kann somit als minimal invasive Methode zur Beschreibung des zellulären Energiestoffwechsels als Funktion von Substratverfügbarkeit, Sauerstoffangebot und mitochondrialer Funktionsfähigkeit herangezogen werden (Huang et al. 2002).

Während die zuvor beschriebenen epidermalen Fluorophore bei einer Wellenlänge von 760 nm angeregt werden können, erscheinen bei 800 nm stark fluoreszierende Zellen im Stratum basale (Dimitrow et al. 2009b). Dieses Signal wird durch fluoreszierendes Melanin hervorgerufen, was innerhalb der Melanosomen synthetisiert wird und für die Hautpigmentierung sowie die Färbung von Augen und Haaren verantwortlich ist. Im Gegensatz zu anderen endogenen Fluorophoren weist Melanin ein außergewöhnlich breites Absorptionsspektrum vom nahen Ultraviolett bis zum nahen Infrarot auf (Kaatz und König 2010). Neben dem Melanin zeigt ein weiteres Pigment der Haut fluoreszierende Eigenschaften: Lipofuszin. Als Nebenprodukt des Fettsäurestoffwechsels akkumuliert es im Laufe des Lebens und ist somit ein Indikator der Gewebeeralterung (Kaatz und König 2010).

Unterhalb der Epidermis werden dermale Fasern sichtbar. Sowohl Elastin als auch Kollagen verfügen als extrazelluläre Matrixproteine über die Fähigkeit zur Fluoreszenz (Kaatz und König 2010). Die Signale aus diesen Schichten stellen eine Kombination aus der Autofluoreszenz des Elastins und dem sogenannten SHG Effekt des Kollagens dar (Dimitrow et al. 2009b).

### 2.3.4 Second harmonic generation (SHG)

Dieser optische Effekt ist ein Phänomen nicht zentrosymmetrischer Moleküle wie Kollagen in der Haut oder Myosin bzw. Tubulin in den Muskelzellen (Lin et al. 2005). Regt man dermales Kollagen mit zwei NIR-Photonen einer Wellenlänge von idealerweise 800 nm an, so wird ein Photon emittiert, welches exakt die Hälfte der ursprünglichen Anregungswellenlänge und die doppelte Energie bei doppelter Frequenz aufweist (Campagnola und Loew 2003, Zoumi et al. 2002). Dieses Phänomen wird in Abb. 3 veranschaulicht.



**Abb. 3: Das Prinzip der Generierung von second harmonic generation (SHG) (Kaatz und König 2010).**

Das SHG-Signal wird in der Dermis durch fibrilläres Kollagen hervorgerufen und ist dann am stärksten, wenn der Laserstrahl parallel zu den Fibrillen auftrifft (Zipfel et al. 2003). Die SHG Intensität ist von der Anregungswellenlänge abhängig und erscheint maximal bei 800 nm, bei Wellenlängen unter 800 nm setzt sich das Signal sowohl aus der Autofluoreszenz des Elastins als auch dem SHG des Kollagens zusammen und zeigt eine abgeschwächte Intensität, ebenso bei Wellenlängen über 800 nm (Zoumi et al. 2002). Die folgende Graphik veranschaulicht die Abhängigkeit der SHG Intensität von der Anregungswellenlänge (Abb. 4).

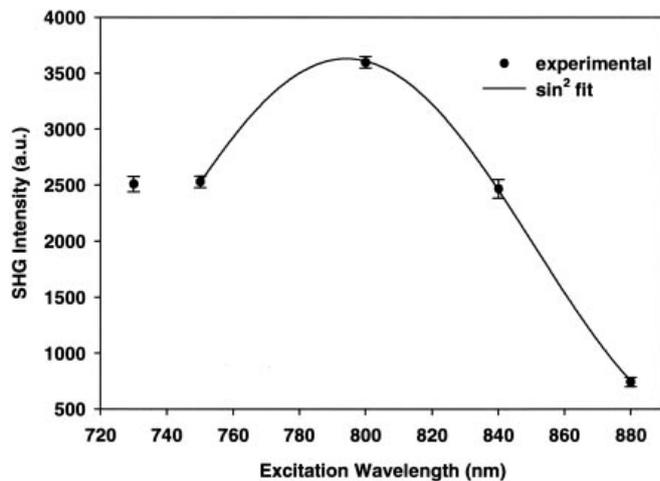


Abb. 4: Spektrale Abhängigkeit der SHG Intensität (Zoumi et al. 2002).

## 2.4 Der SAAID Hautalterungsindex

Unsere Haut zeigt mit zunehmendem Lebensalter typische Veränderungen, die sowohl auf extrinsische als auch intrinsische Faktoren zurückzuführen sind. Die intrinsische Hautalterung beschreibt den irreversiblen, physiologischen Prozess, der mit einem gesteigerten Verlust von Zellen, einer veränderten Morphologie und der natürlichen Reduktion der Hautfunktionen einhergeht (Krutmann et al. 2008, Koehler et al. 2008). Er beginnt bereits nach Vollendung der physiologischen Reife (Koehler et al. 2008). Eine seiner Ursachen liegt neben einer genetischen Prädisposition, der sogenannten „biologischen Uhr“ im wesentlichen in einer altersbedingten, verminderten Sekretion hypophysärer, adrenaler und gonadaler Hormone (Zouboulis 2003). Klinisch manifestiert sich dieser Prozess in Form einer verringerten Gewebespannung mit Faltenbildung, Trockenheit der Haut sowie Verdünnung von Epidermis und Dermis (Zouboulis 2003, Krutmann et al. 2008). Diese Veränderungen haben nicht nur Auswirkungen auf das äußere Erscheinungsbild, sondern beeinträchtigen auch wichtige Hautfunktionen. Die Talg- und Schweißsynthese vermindert sich, was wiederum Auswirkungen auf die intakte Funktion der Hautbarriere und die Thermoregulation des Hautorgans hat, desweiteren verzögert sich die Wundheilung und die epidermale Zellerneuerung (Zouboulis 2003). Die Haut wird insgesamt anfälliger gegenüber dermatologischen Erkrankungen und Infektionen (Zouboulis 2003). Die extrinsische Hautalterung ist im wesentlichen das Ergebnis der langjährigen Einwirkung von UV-Strahlung und lässt sich in Form von sichtbaren Pigmentveränderungen, wie z.B. Lentigines solaris et senilis oder in Form präkanzeröser Veränderungen,

wie z.B. der Aktinischen Keratose, nachweisen. Nikotinabusus und andere Umwelttoxene beschleunigen zusätzlich den Prozess der Hautalterung auf extrinsischem Weg (Koehler et al. 2008).

Ein wichtiger Parameter für den sichtbaren Hautalterungsprozess ist der dermale Kollagengehalt. Den Hauptbestandteil der dermalen extrazellulären Matrix bildet Kollagen Typ 1. Durch eine abnehmende Kollagensynthese, der UV- und Nikotin- induzierten verstärkten Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie einer Ablagerung minderwertigen, elastischen Materials schreitet die Hautalterung fort (Varani et al. 2002, Fisher et al. 1999, Knuutinen et al. 2002). Die UV-bedingte Ablagerung von Elastinfasern bezeichnet man als solare Elastose (Bernstein et al. 1994).

Der „SHG- to -AF Alterungsindex der Dermis“ (SAAID) ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen dermalen Kollagen- und Elastinfasern und ist folgendermaßen definiert:  $SAAID = \frac{SHG-AF}{SHG+AF}$  (Koehler et al. 2006). Für den SHG-Effekt ist intradermal ausschließlich das Kollagen verantwortlich, der Hauptanteil der Autofluoreszenz wird hingegen durch elastische Fasern hervorgerufen. Sowohl das SHG als auch das AF Signal werden vom selben Objektiv erfasst. Bevor sie die Photodetektoren erreichen, können die Signale durch die Verwendung spezieller Filtersysteme getrennt detektiert werden. Das SHG Signal wird durch den dichroitischen Spiegel reflektiert und durchläuft anschließend einen Bandpassfilter. Das langwelligere Autofluoreszenz-Signal passiert den Spiegel und einen Langpassfilter, bevor es detektiert wird (Lin et al. 2005). Mithilfe der Multiphotonenlasertomographie wurde in vorangegangenen Studien von Köhler et al. eine signifikante kontinuierliche Abnahme des Hautalterungsindex SAAID mit zunehmendem Alter beobachtet (Abb. 5) (Koehler et al. 2006). Lin et al. kamen zu der Schlussfolgerung, dass der Hautalterungsindex SAAID mit zunehmendem Alter abnimmt und damit als Indikator für das Ausmaß der lichtbedingten Hautalterung herangezogen werden kann (Abb. 6) (Lin et al. 2005).

Die vorliegende Arbeit widmet sich u.a. der Frage, in welchem Ausmaß die Messtiefe unter Berücksichtigung des Alters des Probanden die Höhe des SAAID beeinflusst.

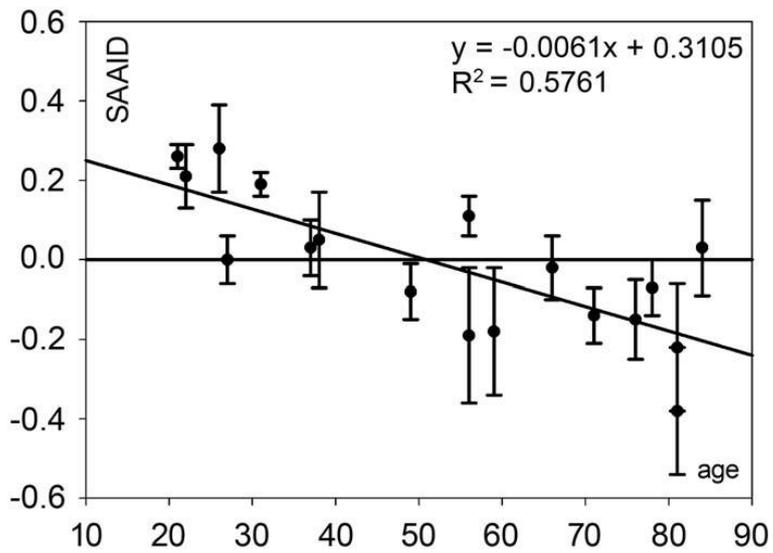


Abb. 5: Abhängigkeit des SAAID vom Lebensalter (Koehler et al. 2006).

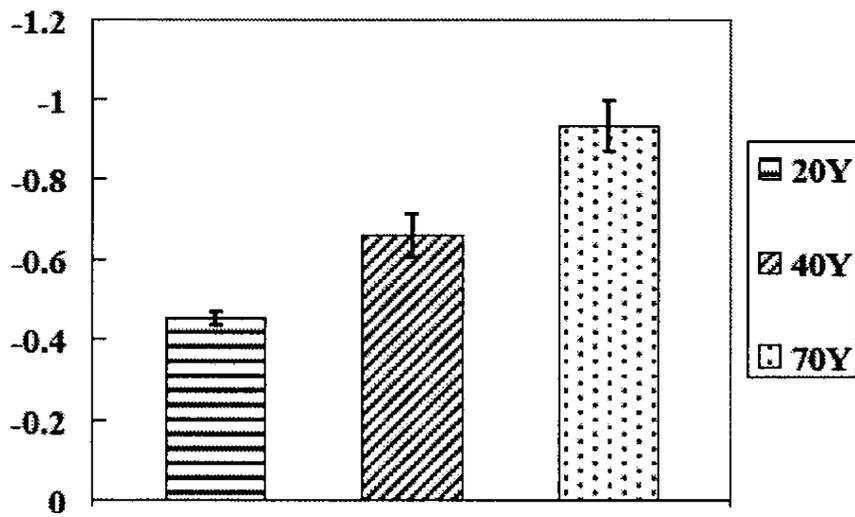


Abb. 6: Abnahme des SAAID in Abhängigkeit vom Lebensalter (Lin et al. 2005).

## 2.5 Die epidermale Dicke der Haut - ein Vergleich unterschiedlicher Messverfahren

Die Dicke der Epidermis beträgt an den meisten Messpunkten der Haut im Mittel 40-50  $\mu\text{m}$ . Höhere Werte finden sich an Handgelenken und Handrücken mit ca. 80  $\mu\text{m}$ , während an den Fingerspitzen Spitzenwerte von etwa 400  $\mu\text{m}$  erreicht werden (Whitton und Everall 1973). Somit variiert die Dicke der Epidermis erheblich an unterschiedlichen Körperstellen, ist jedoch nicht bzw. nur geringfügig vom Alter des Probanden abhängig (Whitton und Everall 1973, Sandby-Møller et al. 2003).

In einer Studie von Whitton und Everall wurden bei 188 Freiwilligen im Alter zwischen 15 und 89 Jahren 214 Hautbiopsien an unterschiedlichen Körperstellen entnommen, die epidermale Dicke in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und bioptierter Körperstelle gemessen und die Werte miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die deutlichsten Unterschiede der Epidermisdicke in Abhängigkeit von der bioptierten Körperstelle zu verzeichnen sind. So wurden Werte von 17  $\mu\text{m}$  im Gesicht und bis zu 485  $\mu\text{m}$  an der Fingerbeere registriert. Signifikante Unterschiede konnten auch zwischen Handrücken und dorsalem Unterarm erfasst werden. Dagegen zeigte sich eine bemerkenswerte lokalisationsbezogene Übereinstimmung der Epidermisdicke in verschiedenen Altersgruppen. Gleichzeitig ließen sich nur geringfügige Differenzen zwischen männlichen und weiblichen Personen feststellen (Whitton und Everall 1973).

Auch einige Hauterkrankungen führen zu Veränderungen der Epidermisdicke. Während bei einem Ekzem oder einer Psoriasis vulgaris eine Zunahme (Akanthose) der Epidermisdicke gemessen wird, bedingen Narben oder der Lichen sclerosus eine Atrophie. Auch ein chronischer aktinischer Schaden kann in einer epidermalen Hyperplasie mit Akanthose und Hyperkeratose münden (Unna 1894). Diese Befunde sind in mehreren Studien überprüft wurden (Bech-Thomsen und Wulf 1996, Kambayashi et al. 2001, Lavker et al. 1995, Pearse et al. 1987).

Über einen langen Zeitraum basierte die Bestimmung der Epidermisdicke auf der mikroskopischen Auswertung bioptierter Hautproben. Diese Methode stellt nicht nur einen invasiven Eingriff mit dementsprechenden Risiken dar, sondern führt infolge der Fixation der Proben auch zu Schrumpfungartefakten und Veränderungen der natürlichen Hautmorphologie, die die Werte erheblich verfälschen können (Whitton und Everall 1973, Gambichler 2005). So

wurden in einer Untersuchung von Therkildsen et al. unterschiedliche Epidermisdicken durch differente Färbe- und Fixationstechniken bestimmt (Therkildsen 1998).

Die konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM) erlaubte erstmals morphometrische Messungen in vivo. Der Vorteil dieser nicht invasiven Methode beruht vor allem auf der Erhaltung der natürlichen Hautstruktur und zeichnet sich durch eine hohe Präzision aus (Corcuff et al. 1993). Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die Limitation auf maximale Eindringtiefen von etwa 180 µm, sodass an einigen Körperstellen nicht die gesamte Epidermisdicke erfasst werden kann. Messungen der Epidermisdicke mithilfe der Konfokalen Laserscanningmikroskopie beschränken sich demzufolge auf Areale mit relativ dünner Haut (Nouveau-Richard et al. 2004).

Die Sonographie wird in der Dermatologie routinemäßig zur Darstellung von Hauttumoren und deren Eindringtiefe in das Gewebe genutzt. Der Grad der Auflösung epidermaler Veränderungen ist jedoch frequenzabhängig: Zur Evaluation epidermaler Veränderungen sind Frequenzen von 50 bis 100 MHz erforderlich, während die 20 MHz Sonographie zur Verlaufskontrolle von Dermatosen mit Hautdicken- und Hautdichtemessungen Verwendung findet (Gottlöber et al. 2000). Nur wenige Studien zur Messung der Epidermisdicke mittels Ultraschall sind bisher veröffentlicht. Als weiteres, nicht invasives Verfahren vermag es ebenso wie die konfokale Laserscanningmikroskopie die Problematik von Schrumpfungartefakten bei histologischen Methoden zu umgehen (Overgaard Olsen et al. 1995). S. Nouveau-Richard führte 2004 an 11 Probanden Untersuchungen zur Epidermisdicke an 3 Testarealen sowohl mit Ultraschall - unter Verwendung einer Frequenz von 22 MHz - als auch mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie durch, wobei beide Verfahren in etwa gleiche Ergebnisse lieferten und die Genauigkeit der Sonographie bekräftigt werden konnte (Nouveau-Richard et al. 2004). Andere Studien erbrachten z.T. enttäuschende Ergebnisse: In einer klinischen Studie zur Effizienz von topischem Sirolimus in der Psoriasisbehandlung zeigten Ultraschalluntersuchungen keine signifikante Dickenreduktion durch die Therapie, obwohl sich klinisch eine deutliche Besserung des Scores nachweisen ließ (Ormerod et al. 2005).

In einer weiteren Studie eignete sich weder der hochauflösende Ultraschall noch die optische Kohärenztomographie (OCT) zur Beurteilung der Wirksamkeit von Verum und Placebo bei Steroid induzierter epidermaler Atrophie (Cossmann und Welzel 2006).

Die Korrelation zwischen den Verfahren Ultraschall und Histologie bei Messungen von Basalzellkarzinomen war nicht überzeugend (Desai et al. 2007).

Die OCT stellt ein weiteres neuartiges, bildgebendes Verfahren mit hoher Auflösung dar. Allerdings erlaubt ein Algorithmus basierend auf tiefenabhängigen Signalintensitäten keine validen Ergebnisse bzgl. der epidermalen Dicke (Gambichler et al. 2006). In einer aktuellen Studie wurden Unterschiede zwischen verschiedenen Lokalisationen und Kindern bzw. Erwachsenen festgestellt (Mogensen et al. 2008).

In den letzten Jahren rückte die Multiphotonenlasertomographie als vielversprechendes, nicht invasives diagnostisches Verfahren in der Dermatologie zunehmend in den Vordergrund. Mit einer gegenüber der konfokalen Laserscanningmikroskopie noch höheren Auflösung und der Möglichkeit einer differenzierten spektralen Analyse der emittierten Autofluoreszenz (AF) und der second harmonic generation (SHG) können z.B. dermale Veränderungen im Zuge der Hautalterung in vivo erfasst und bewertet werden (Koehler et al. 2006, Koehler et al. 2008). Die horizontale Darstellung epidermaler Zellschichten ermöglicht hochaufgelöste morphologische Bilder und damit die exakte Beurteilung epidermaler Veränderungen. Somit ergeben sich neue, nicht invasive Möglichkeiten auch im Bereich der Dermatoonkologie (Dimitrow et al. 2009a).

Aufgrund der oben genannten Vorzüge der Multiphotonenlasertomographie erschien diese Methode geeignet, um Messungen zum Hautalterungsindex vorzunehmen und exakte Berechnungen zur Dicke einzelner epidermaler Hautschichten durchzuführen.

### 3 Ziele der Arbeit

Zu Beginn der Studie sollten exemplarisch Bilder der einzelnen epidermalen Schichten gesunder Haut morphologisch vor dem Hintergrund der Bewertung des MLT hinsichtlich des Auflösungsvermögens und damit des Einsatzes in der Diagnostik von pathologischen Hautveränderungen dargestellt werden.

Für zahlreiche Untersuchungen an der Haut, etwa zur Hautalterung oder zur Wirksamkeit von systemischen bzw. topisch auf die Haut wirkenden Substanzen ist eine exakte Dickenbestimmung der Epidermis Grundvoraussetzung. Zu diesem Zweck war die morphologische Darstellung des Stratum corneum und der „ersten lebenden Zelle“ innerhalb des Stratum granulosum erforderlich. Als „erste lebende Zelle“ wurde die oberste Zelle innerhalb des Stratum granulosum definiert, in der man einen dunklen Zellkern von einem granulierten Zytoplasma abgrenzen kann. Die Stapelmessungen, die im Anschluss daran sowohl am dorsalen Unterarm (TF 1) als auch am Handrücken (TF 2) vom Stratum corneum ausgehend durchgeführt wurden, sollten u.a. der exakten Berechnung der Dicke unterschiedlicher epidermaler Schichten dienen. Die eigentliche Fragestellung bestand darin, ob das Probandenalter und die Lokalisation des Testareals die epidermale Dicke beeinflussen.

Gleichzeitig sollte untersucht werden, inwieweit das Alter des Probanden und unterschiedliche Messtiefen Einfluss auf die Höhe des SAAID nehmen. Von besonderem Interesse war dabei die kollagenreiche Grenzzone, die bei alter Haut als Reaktion auf jahrelange UV-Einstrahlung in der oberen papillären Dermis nachzuweisen ist. Exemplarische, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte, histologische Schnittbilder von junger Haut und Altershaut sollten herangezogen werden, um die Unterschiede insbesondere im Bereich der papillären Dermis in Abhängigkeit vom Alter zu visualisieren. Mittels MLT sollte in vivo zu untersucht werden, ob die dicht gepackten kollagenen Fasern in diesem Bereich ein starkes SHG Signal hervorrufen und damit den berechneten Wert des SAAID gegenüber tieferen dermalen Schichten anheben.

Teil der Untersuchungen war auch die Messung der Hautfaltentiefe an 3 unterschiedlichen Testfeldern, was mithilfe des optischen 3 D Messgerätes PRIMOS realisiert wurde. Es sollte geklärt werden, ob mithilfe des Gerätes Unterschiede hinsichtlich der mittleren und maximalen Hautfaltentiefe an verschiedenen Körperstellen und in Abhängigkeit des Probandenalters nachweisbar sind und die Ergebnisse mit der klinischen Einschätzung übereinstimmen.

Schließlich sollten Vor- und Nachteile des MLT, die sich im Laufe der Studie offenbarten, evaluiert und der Messvorgang bzgl. Zeitaufwand und Praktikabilität optimiert werden.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Patientenkollektiv**

In die Studie wurden insgesamt 30 hautgesunde, freiwillige Probanden eingeschlossen, darunter jeweils 15 Männer und 15 Frauen. Diese wurden in 3 Altersgruppen eingeteilt, wobei in jeder Altersgruppe jeweils 5 Männer und 5 Frauen am Multiphotonenlasertomograph untersucht wurden. Gruppe 1 bestand aus 10 jungen Männern und Frauen zwischen 21 und 27 Jahren, wobei das Durchschnittsalter  $23,3 \pm 1,9$  Jahre betrug. In der zweiten Gruppe wurden 10 Probanden mittleren Alters zwischen 42 und 59 Jahren gemessen, das Durchschnittsalter betrug hier  $47,3 \pm 3,1$  Jahre. Das letzte Probandenkollektiv setzte sich aus Männern und Frauen im Alter von 64 bis 82 Jahren zusammen, wobei das Durchschnittsalter  $72 \pm 6,4$  Jahre betrug.

### **4.2 Probandenaufklärung**

Jeder Untersuchungsteilnehmer wurde vor Beginn der Studie über den Zweck der Untersuchung, die Dauer und den Ablauf der Messungen am Multiphotonenlasertomographen und dem PRIMOS Gerät zur Messung der Oberflächentopographie sowie den damit verbundenen möglichen Risiken umfangreich aufgeklärt. Alle in die Studie eingeschlossenen Probanden erklärten daraufhin ihr Einverständnis in schriftlicher Form. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität genehmigt, sie entsprach den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen, die in der Deklaration von Helsinki festgelegt sind. Die Entscheidung zur Studienteilnahme durch die Probanden erfolgte auf freiwilliger Basis. Alle Teilnehmer wurden darüber in Kenntnis gesetzt, dass sich bei einer Teilnahmeablehnung oder dem Ausscheiden aus der Studie keine Nachteile für weitere medizinische Behandlungen ergeben. Des Weiteren wurden Studienteilnehmer darüber informiert, dass ihre Daten nur im Rahmen der Studienauswertung verwendet werden und nicht an Dritte weitergegeben werden.

## 4.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Auswahl der Patienten erfolgte mithilfe der tabellarisch aufgelisteten Ein- und Ausschlusskriterien. Diese wurden sowohl während der Rekrutierung als auch unmittelbar vor Messbeginn in Form eines Aufklärungsgespräches überprüft.

### 4.3.1 Einschlusskriterien

Die Probanden mussten jeweils alle der genannten Kriterien erfüllen:

1. Alter ab 18 Jahre
2. Schriftliche Einwilligungserklärung zur Studie und zum Studienablauf
3. Hauttyp II oder III nach Fitzpatrick

**Tab. 1: Hauttypen nach Fitzpatrick (Fitzpatrick 1988)**

<b>Typ</b>	<b>Dermatitis solaris („Sonnenbrand“)</b>	<b>Bräunung</b>
I	immer, stark ausgeprägt	Nie
II	Immer	evtl. leicht
III	Möglich	Ja
IV	sehr selten	Stark
V	Nie	natürliche braune Pigmentierung
VI	Nie	schwarze Hautfarbe

4. Nichtraucher (seit mindestens 2 Jahren und insgesamt <10 PY)

### 4.3.2 Ausschlusskriterien

Probanden, die eines oder mehrere der aufgeführten Kriterien erfüllen, durften nicht in die Studie eingeschlossen werden:

1. dermatologische Erkrankung (Neurodermitis, Psoriasis, Lupus erythematodes)
2. schwere internistische bzw. Erkrankungen des Immunsystems (z. B. Tbc, LE, HIV, Hepatitis B/C, Thyreoiditis, aktive Tumorerkrankungen)
3. Allergien gegen Bestandteile von Tesafilm oder von Klebstoffen (Pflasterallergie)
4. Schwangerschaft und Stillzeit
5. Pflegecremes, die Anti-Aging-Wirkstoffe wie z.B. Q10, Vitamine, Flavonoide enthalten
6. Wechsel der Pflegecreme
7. Solariumbesuche und Sonnenbäder während der Testzeit sowie mehr als 6 Solariumbesuche im letzten Jahr
8. Tropenaufenthalt in den letzten 6 Monaten bzw. geplanter Urlaub im Messzeitraum
9. Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln und Vitaminpräparaten
10. Hormonersatztherapie
11. Medikamentengabe über ein TTS (Medikamentenpflaster)

#### In den letzten 4 Wochen vor Beginn der Studie

12. Dermatologische Lokalthherapie auf den Unterarmen oder Handrücken
13. Anwendung von cortisonhaltigen Präparaten und/ oder Immunsuppressiva
14. Anwendung von Selbstbräunern bzw. Betacarotinpräparaten
15. Fango- oder Moorpackungen
16. Manipulationen am Unterarm und an der Hand, wie das Auftragen von Kosmetika, Rasuren, Epilation, Haarentfernungscreme oder Tattoos

## 1 Woche vor Beginn der Studie

17. Bäder in chloriertem Wasser

### Am Tag der Messung

18. Auftragen von Creme im Bereich der Testfelder

Oben genannte Ein- und Ausschlusskriterien wurden aus unterschiedlichen Gründen gewählt: Neben einem Mindestalter von 18 Jahren sowie der schriftlichen Einwilligungserklärung zur Studie - Kriterien, die aus rechtlichen Gründen erfüllt sein mussten – sollten die Probanden seit mindestens 2 Jahren Nichtraucher sein und insgesamt nicht mehr als 10 PY geraucht haben. In mehreren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Rauchen und vorzeitiger Hautalterung nachgewiesen.

Rauchen verringert die Synthese von Kollagen I und III. Die Expression von Matrixmetalloproteinasen innerhalb der Dermis ist bei Rauchern deutlich höher als bei Nichtrauchern. Daraus ergeben sich Veränderungen für die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die eine vorzeitige Hautalterung bedingen (Knuutinen et al. 2002, Yin et al. 2000). Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass Tabakrauch zu einer verstärkten Faltenbildung im Gesicht führt (Ernster et al. 1995, Daniell 1971). Ein Einschluss von Rauchern in die Studie würde somit verfälschte Messergebnisse liefern.

Schwere internistische Erkrankungen, wie z.B. Tbc oder Tumorerkrankungen sind Systemerkrankungen, die sich auch auf die Haut auswirken und das gesunde Hautbild verändern. Als Beispiel sei an dieser Stelle die Tuberkulose genannt: Eine kutane Manifestation ist entweder direkt durch eine Primärinfektion der Haut mit *Mycobacterium tuberculosis* möglich, kann jedoch auch in Form von Tuberkuliden bei Organtuberkulosen auftreten (Moll 2005). Histologisch lassen sich je nach Tuberkuloseform tuberkuloide Granulome, eine chronische granulomatöse Entzündung der Dermis oder irreguläre Epidermisverdickungen nachweisen (Moll 2005). Zum anderen induzieren z.B. in der Onkologie eingesetzte, zielgerichtete Therapeutika kutane Nebenwirkungen und verändern damit die natürliche Hautarchitektur: Der Einsatz sogenannter Multikinase-Inhibitoren, wie z.B. Imatinib, führt nicht selten zu makulopapulösen Exanthenen und Pruritus. Auch eine Neigung zu periorbitalen Ödemen wird beschrieben. Die zur Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms sowie metastasierter Pankreaskarzinome eingesetzten EGFR Antagonisten führen besonders häufig zu Hautnebenwir-

kungen, v.a. in Form eines akneiformen Exanthems. Ca. 1/3 aller Patienten klagt zudem über Hauttrockenheit (Kähler und Hauschild 2009).

Um eine gute Vergleichbarkeit hinsichtlich der Fluoreszenzintensität im Stratum basale zwischen den Probanden zu erreichen, durften nur Probanden des Hauttyps 1 und 2 nach Fitzpatrick eingeschlossen werden. Die sogenannte melanogene Aktivität der Melanin produzierenden Zellen innerhalb des Stratum basale unterscheidet sich bei den unterschiedlichen Hauttypen. Die Einwirkung von UV Strahlung wird als wichtigster Stimulus der Melanogenese betrachtet (Moll 2005). Auch ein Tropenaufenthalt in den vergangenen 6 Monaten bzw. ausgedehnte Sonnenbäder oder Solariumbesuche des Probanden waren vor Einschluss in die Studie auszuschließen, da die exzessive UV Belastung zum einen eine verstärkte Melanogenese zur Folge hat, zum anderen die Hautalterung beschleunigt wird (Koehler et al. 2009, Koehler et al. 2006).

Ein weiteres wichtiges Ausschlusskriterium war die Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen. Durch den fallenden Östrogenspiegel postmenopausal verliert die Haut an Elastizität sowie Feuchtigkeit und der dermale Kollagengehalt sinkt (Hall und Phillips 2005, Castelo-Branco et al. 1992) Eine Hormonersatztherapie wirkt diesen natürlichen Hautveränderungen entgegen. In einer Studie von Maheux et al. konnte eine signifikante Zunahme der Hautdicke bei Frauen nachgewiesen werden, die mit Östrogen behandelt wurden (Maheux et al. 1994). Desweiteren zeigte sich in einer von Castelo Branco et al. durchgeführten Studie ein deutlicher Anstieg des dermalen Kollagengehalts bei Frauen, die mit einer Hormonersatztherapie behandelt wurden (Castelo-Branco et al. 1992).

Auch eine Anwendung cortisonhaltiger Präparate führt zu für diese Studie unerwünschten Effekten: Houck et al. gelang der Nachweis proteolytischer und kollagenolytischer enzymatischer Aktivität in Fibroblastenkulturen nach Behandlung mit Cortisol (Houck et al. 1968). Eine Verringerung der Hautdicke durch eine Behandlung mit Prednisolon konnte durch Grahame bei Rheumapatienten nachgewiesen werden (Grahame 1969). Eine Atrophie von Kollagenfasern verbunden mit einem Verlust des natürlichen Arrangements der Fasern wurde nach längerer Lokalbehandlung gesunder Haut mit einer Hydrokortisonsalbe in einer Studie von Mancini et al. beobachtet. Darüber hinaus konnten auch Veränderungen elastischer Fasern sowie Veränderungen in der Morphologie der Fibroblasten nachgewiesen werden (MANCINI et al. 1960).

## 4.4 Aufbau und Funktionsweise des Multiphotonenlasertomographen DermaInspect

Der Multiphotonenlasertomograph DermaInspect (JenLab GmbH, Jena, Deutschland) ist ein Lasersystem, welches zur nicht invasiven Untersuchung von Haut und Hautanhangsgebilden in vivo entwickelt wurde. Darüber hinaus ermöglicht er Messungen an Gewebeproben ex vivo. Er wird gemäß der europäischen Sicherheitsrichtlinien in die Laserschutzklasse 1M eingestuft. Durch intensive Laserpulse hoher Folgefrequenz im NIR-Spektralbereich werden geeignete Zielmoleküle, die bereits beschriebenen endogenen Fluorophore bzw. verschiedene Pharmaka oder Kosmetika, zur Autofluoreszenz angeregt. Die von ihnen emittierten Photonen werden mithilfe eines Photomultipliers (PMT) erfasst und digital verarbeitet. Im Spektralbereich zwischen 600 und 1200 nm, dem sogenannten optischen Fenster, kann NIR Strahlung bis zu einige mm tief in die Hautschichten eindringen ohne diese zu schädigen. Aufgrund eines Mangels endogener Absorber erscheinen biologische Gewebe hier nahezu transparent. Die Hauteindringtiefe des Lasers ist durch die verwendete Fokussieroptik jedoch auf ca. 200 µm begrenzt. Folglich können sowohl epidermale als auch oberflächliche dermale Gewebestrukturen dargestellt, krankhafte Hautveränderungen diagnostiziert oder die Eindringtiefe verschiedener Pharmaka bzw. Kosmetika untersucht werden. Fluoreszenzbildgebung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung wird auf diesem Wege ermöglicht.

### Das Gerät besteht aus drei Moduleinheiten:

- Einem durchstimmbaren, gepulsten Titanium Sapphir Laser (MaiTai, Spectra Physics or Chameleon, Coherent) mit einem einstellbaren Wellenlängenbereich zwischen 750 und 850 nm, einer maximalen Leistung von 900 mW und einer Pulsfolgefrequenz von 80 MHz
- Einer Scanning Detektor Einheit bestehend aus einem Diodendetektor als Triggermodul, einem schrittmotorgesteuerten Polarisator zur Leistungsregelung, einem NIR Umlenkspiegel, zwei x,y Galvanometerscannern mit silberbeschichteten Spiegeln, einer Scanoptik mit Aufweitungsfunktion sowie einem Fluoreszenzteiler, einer Fokussieroptik mit 40-facher Vergrößerung und einer NA von 1,3 (Öl) und einer Piezo-z-Höhenverstellung. Mithilfe eines Photomultipliers werden emittierte Fluoreszenzsignale

erfasst. Durch Filter vor den Detektoren wird die Erfassung unerwünschter Streustrahlung verhindert.

- Einem Steuermodul (Hardware) zur Regelung der Scanning Detektor Einheit. Das Steuermodul steuert mittels PC und der Software DermaInspect die Bildaufnahme.

Abb. 7 zeigt vereinfacht den Aufbau des Gerätes. Im Februar 2009 wurde an die Fokussieroptik eine bewegliche, schwenkbare Scaneinheit angebracht, die Messungen auch an bisher schwer zugänglichen Arealen, wie beispielsweise am Kopf, ermöglicht (Abb. 8).

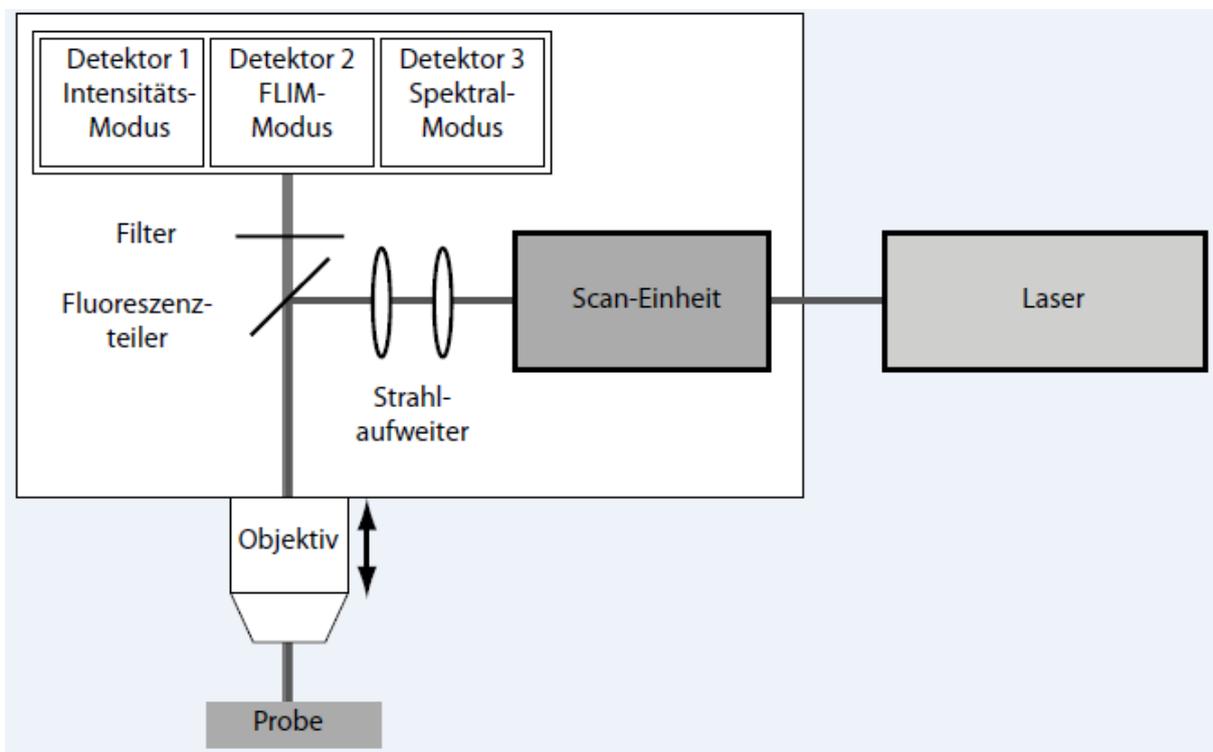
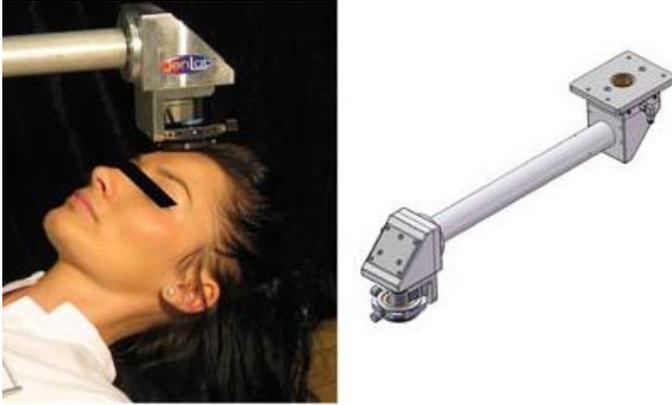


Abb. 7: Schematischer Aufbau des Lasersystems DermaInspect der JenLab GmbH, Jena, Deutschland (Kaatz und König 2010).



**Abb. 8: Schwenkbare Scaneinheit zur Untersuchung schwer zugänglicher Hautareale (König et al. 2008).**

Der Laserstrahl wird entsprechend der eingestellten Anregungsleistung mittels Polarisator abgeschwächt und passiert die Scaneinheit mit den darin enthaltenen Galvanometerscannern, bevor er auf den Strahlaufweiter und den Fluoreszenzteiler trifft. Nach Durchtritt des Objektivs erreicht er die Haut des Patienten oder eine Gewebeprobe und regt geeignete Zielmoleküle zur Fluoreszenz an. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung durchläuft nun retrograd das Objektiv, den Fluoreszenzteiler und ein Filtersystem, bevor die Photonen von den Detektoren registriert werden. Durch die Filter werden SHG Signale des Kollagens und die Autofluoreszenz des Elastins jeweils separat erfasst.

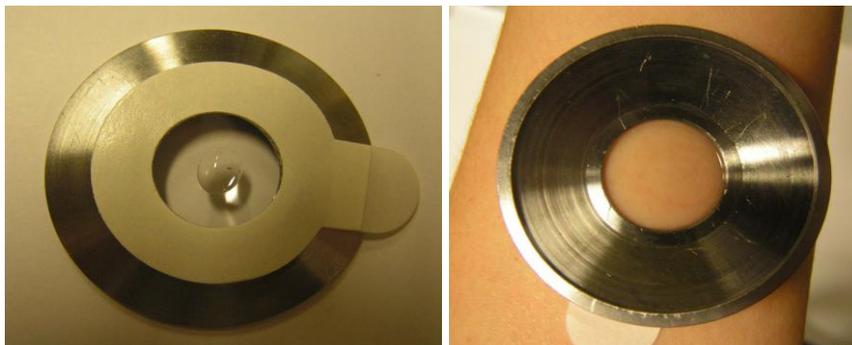
## **4.5 Ablauf der Untersuchung am Multiphotonenlasertomographen**

Für die Messung am Multiphotonenlaser DermaInspect wurden zwei Testfelder mit einer Fläche von  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  definiert, zum einen die dorsale Seite des rechten Unterarms ca. 10 cm proximal des Handgelenks (Testfeld 1), zum anderen der Handrücken desselben Armes (Testfeld 2). Um Artefakte durch Haare zu vermeiden, wurden die Probanden vor Beginn der Untersuchung im Bereich der Testareale rasiert. Anschließend erfolgte die Positionierung des Studienteilnehmers auf einer elektrisch höhenverstellbaren Untersuchungsliege (Abb. 9).



**Abb. 9: Messung am DermaInspect (König 2008).**

Auf dem Testfeld 1 wurde ein rundes, magnetisches Koppelstück aus Metall befestigt, in dessen Mitte sich ein rundes Deckgläschen mit einer Dicke von 0,18 mm befand. Zwischen Haut und Glasplättchen wurde zuvor ein Wassertropfen und zwischen Glasplättchen und Objektiv ein Tropfen Immersionsöl aufgetragen und das Koppelstück mithilfe eines doppelseitigen Kleberinges auf das rasierte Testfeld aufgeklebt (Abb. 10). Im Folgenden wurde der Proband mit der Liege an das Gerät gefahren und das Koppelstück an das Objektiv magnetisch angekoppelt.



**Abb. 10: Magnetisches Koppelstück, das auf das rasierte Testfeld des Probanden aufgeklebt wurde.**

Der Raum wurde abgedunkelt und der Laser mithilfe der MaiTai-Software hochgefahren. Danach erfolgten die Einstellungen an der Software JenLab Scan. Die standardisierten Parameter sind in Tab. 2 zur besseren Übersicht zusammenfassend dargestellt.

Die Anregungswellenlänge für die Stapelmessungen wurde aufgrund der daraus resultierenden stärkeren Fluoreszenzsignale innerhalb der Dermis mit 800 nm festgelegt. Für die morphologischen Messungen epidermaler Schichten wurde eine Wellenlänge von 760 nm ausgewählt, da bei dieser Wellenlänge die Fluoreszenz der epidermalen Fluorophore optimal ist. Die mit 49 mW festgelegte maximale Laserpower des MLT während der Messung basiert auf Untersuchungen von Fischer et al., in denen bei Verwendung einer Laserenergie unter 50 mW ein nur sehr geringes Schädigungspotential für die Haut nachgewiesen werden konnte, das weit unter dem von natürlicher UV-Strahlung liegt (Fischer et al. 2008). Die gewählten Werte für Zoom, Kontrast und Bildaufnahmezeit garantieren eine hohe Qualität der erstellten Bilder.

**Tab. 2: Standardisierte Einstellungsparameter am Multiphotonenlaser DermaInspect**

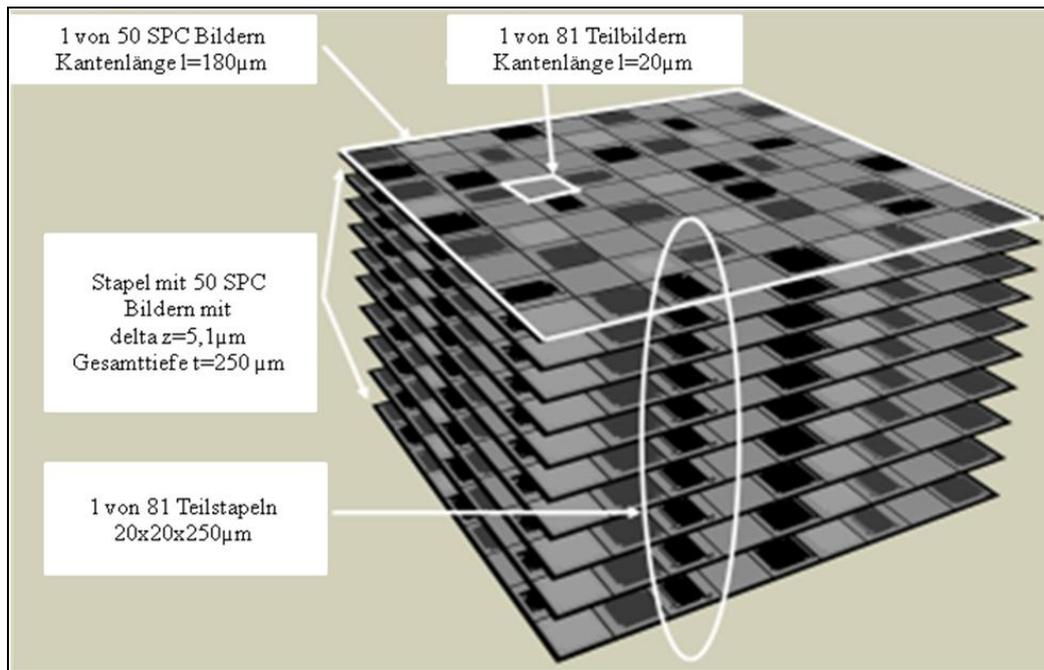
Messparameter	Stapelmessungen	Morphologische Messungen
Anregungswellenlänge	800 nm	760nm
Maximale Laserpower	49 mW	
Zoom:	727	
Bildaufnahmezeit:	7,4 s	13,4 s
Kontrast:	920	

Unter Verwendung der JenLab Software wurden nun in jeder epidermalen Hautschicht exemplarisch morphologische Bilder generiert. Weiterhin erfolgte im Testareal die Aufnahme von 3 Zweikanal SPC (Single-Photon-Count) Stapeln mit einer Kantenlänge von 180  $\mu\text{m}$  mithilfe der SPCImage Software (Becker & Hickl, Berlin, Germany). Dazu wurde zunächst die sogenannte „erste lebende Zelle“, also die Zelle, in der man einen dunklen Zellkern von einem granulierten Zytoplasma abgrenzen kann, unterhalb des Stratum corneum im gerade beginnenden Str. granulosum aufgesucht. Durch diese Vorgehensweise wurde bei allen Patienten ein definierter Bezugspunkt der Messungen geschaffen. Begonnen wurde ca. 10  $\mu\text{m}$  oberhalb des ersten Oberflächensignals des Stratum corneum. Im Abstand von je 5,1  $\mu\text{m}$  zwischen jedem ausgelösten Bild wurden so 50 SPC Bilder pro Stapel bis in eine Hauttiefe von 200 bis 250  $\mu\text{m}$  erstellt. Die beschriebene Prozedur wurde auf dem Handrücken (Testfeld 2)

wiederholt. Insgesamt wurden im Verlauf der Studie auf diesem Weg etwa 9000 Zweikanal SPC Stapel analysiert. Abb. 11 stellt einen solchen SPC Stapel schematisch dar.

Unter Zuhilfenahme der Becker & Hickl Software konnten die Stapeldateien exportiert und somit separat aufgetrennt werden in 127x127 Pixel Matrizen der gezählten Photonen und sogenannte bitmap Dateien. Die Photonenmatrizen wurden anschließend für weitere Berechnungen in das Softwareprogramm MatLab 7.6 importiert (The MathWorks, Natick, MA, USA). Zeigten die Stapel offensichtliche vertikale Bewegungsartefakte, so wurde eine Korrektur vorgenommen. Bei ausgeprägten Veränderungen wurden sie von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Nach dem Import der Photonenmatrizen eines Stapels in die MatLab 7.6 Software wurden die Daten in einer 3D Matrix bestehend aus 50 Ebenen und 9x9 Datenpunkten pro Kanal zusammengefasst. Somit wurde jeder Stapel in 81 sogenannte Splitstapel mit einer Kantenlänge von jeweils 20  $\mu\text{m}$  zerlegt. Durch Bildung von Durchschnittswerten zwischen der Photonenintensität der aktuellen Bildebene unter Einbezug der vorhergehenden und nachfolgenden Ebene wurden die Intensitätskurven für weitere Berechnungen „vertikal geglättet“.

Um Bereiche mit Haarfollikeln, glandulären Ausführungsgängen oder Falten innerhalb des Testfeldes nicht mit in die Auswertung einzubeziehen, wurden Splitstapel, die keinen klaren Oberflächen-Peak im AF-Kanal aufwiesen bzw. bedeutsam vom Median der einzelnen Peaklevel abgewichen sind, eliminiert, sodass am Ende von den ursprünglichen 81 Splitstapeln pro Patient und Testfeld 60 bis 80 für weitere Analysen verwendet werden konnten. Die folgende Abbildung veranschaulicht graphisch das Prinzip der 3D Matrix.



**Abb. 11:** Schematische Darstellung eines SPC Stapels bestehend aus 50 SPC Bildern (Photonenmatrizen) mit einer Kantenlänge von  $l=180\mu\text{m}$  und einem vertikalen Abstand zwischen den Bildern von  $z=5,1\mu\text{m}$ . Die Splitstapel entstanden durch Teilung des gesamten Stapels in 81 Spalten mit jeweils 50 Bildern (Kantenlänge  $l=20\mu\text{m}$ ) (Koehler et al. 2010).

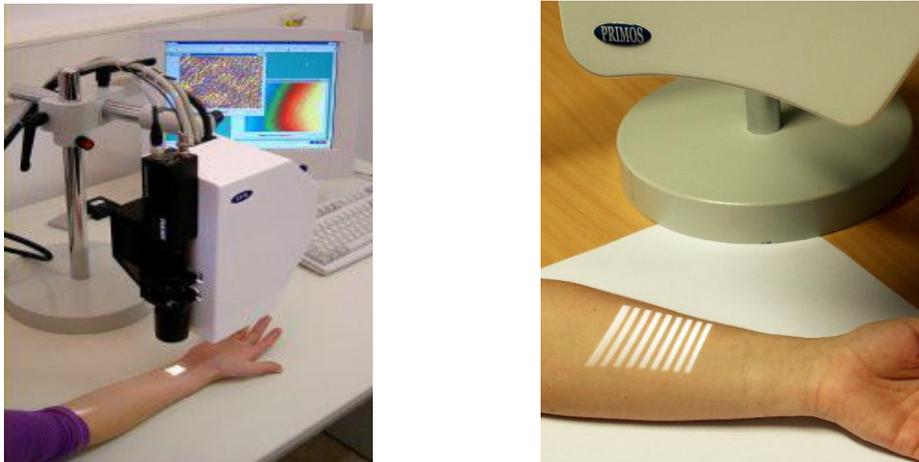
## 4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS 13.0 (Lead Technologies, Had-donfield, NJ, USA). Der Vergleich zwischen den einzelnen Altersgruppen erfolgte durch die Verwendung des Mann-Whitney Tests für unabhängige Stichproben sowohl in den Untersu-chungen zur epidermalen Dicke als auch bei den Messungen zur dermalen Matrixzusammen-setzung. Signifikante Unterschiede in der epidermalen Dicke verschiedener Lokalisationen (Unterarm dorsal und Handrücken) wurden anhand des Wilcoxon Tests für abhängige Stich-proben geprüft. Das Signifikanzlevel wurde mit  $\alpha=0,05$  festgelegt.

## 4.7 Das optische 3D Hautmessgerät PRIMOS

### 4.7.1 Funktionsweise des PRIMOS

Für die dreidimensionale Erfassung und Bewertung der Hautoberfläche wurde das optische 3D Messgerät PRIMOS (Phaseshift Rapid In Vivo Measurement Of Skin) verwendet. Dabei wird ein paralleles Streifenmuster auf die Hautoberfläche projiziert (Abb. 12) und mittels Aufnahmeoptik auf einer Kamera abgebildet, digitalisiert und zur qualitativen Bewertung einem Mess- und Auswertungsrechner zugeführt. Der 3D- Messeffekt wird dadurch erreicht, dass feinste Höhenunterschiede auf der Hautoberfläche die parallelen Projektionsstreifen auslenken und diese Auslenkungen ein qualitatives und quantitatives Maß für das Hautprofil darstellen. Das Gerät arbeitet berührungslos und mit einer hohen Messgeschwindigkeit (68ms/3D-Bild) (GFMesstechnik und GmbH).



**Abb. 12: Projektion eines Streifenmusters auf das zu untersuchende Hautareal. (Quelle: GFM Messtechnik, zur Verfügung gestellt von Dipl. Ing. Herrn Gerhard Müller, Service &Support, eigene Fotografien).**

### 4.7.2 Ablauf der Untersuchungen mit dem optischen 3D Hautmessgerät PRIMOS

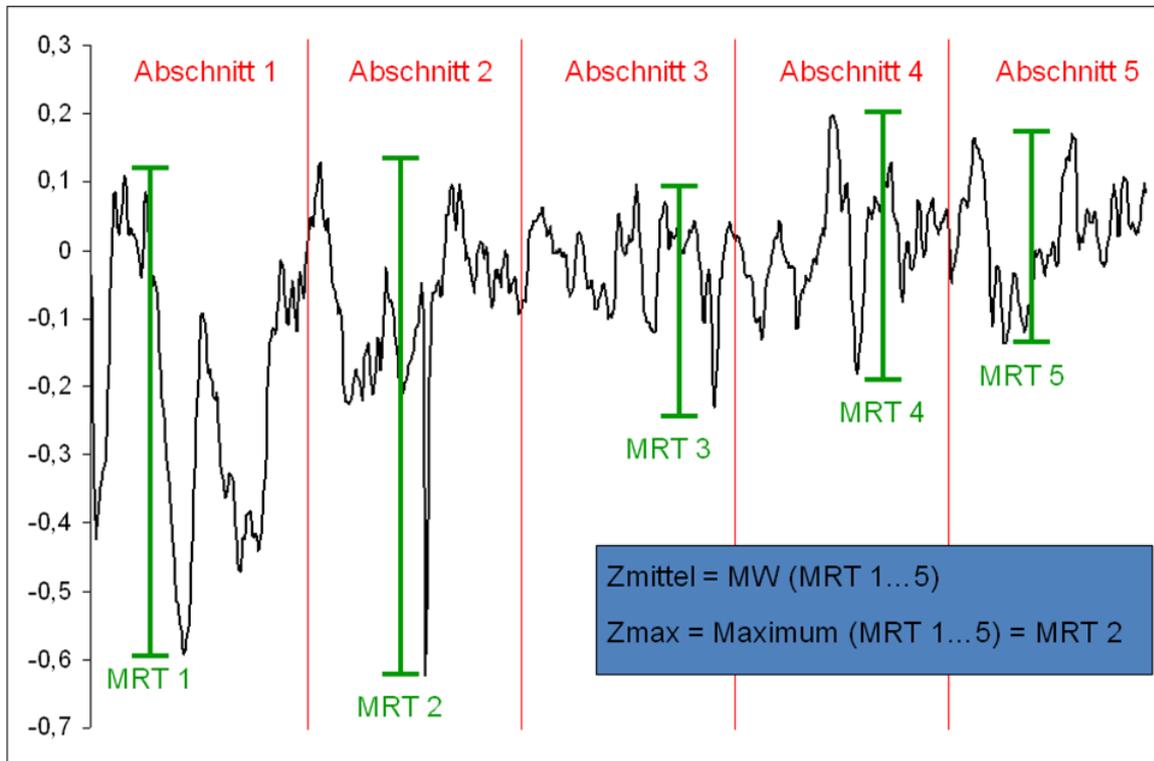
Die Messungen erfolgten an 3 Testfeldern. Hierbei wurden die bereits am DermaInspect verwendeten Testareale Unterarm dorsal und Handrücken verwendet sowie ein weiteres Testfeld auf der Unterarminnenseite ausgewählt und von störenden Haaren befreit. Der Arm des Probanden wurde auf einer Schaumstoffunterlage positioniert. Nach dem Starten der Computer-

software PRIMOS wurde das Messprogramm geöffnet und auf dem Monitor das Kamerabild angezeigt. Anschließend musste das Testfeld fokussiert werden, wobei darauf zu achten war, dass nicht nur die Mitte des zu messenden Areals, sondern auch der Randbereich des Hautfeldes in der Fokusebene liegen. Zur besseren Fokussierung des Testfeldes war die Einblendung des Musters „Fadenkreuz“ hilfreich, das sowohl auf der Haut des Probanden als auch auf dem Monitor angezeigt wurde. Die optimale Schärfe des Sensors wurde erreicht, wenn beide Fadenkreuze in Übereinstimmung gebracht werden konnten. Dies gelingt meist jedoch nur auf ebenen Körperstellen, da in diesem Fall die Messoberfläche parallel zum Aufnahme-feld positioniert ist. Bei optimalen Lichtverhältnissen wurde durch das Auslösen des Messvorgangs ein farbkodiertes Höhenprofil des entsprechenden Hautareals erstellt, welches sowohl die Makrostruktur des Testfeldes (Form, Welligkeit) als auch dessen Mikroprofil (Hautstruktur, Falten) beinhaltet (GFMesstechnik und GmbH). Das Messergebnis konnte nachfolgend probanden-verschlüsselt gespeichert werden. Pro Testareal wurden 3 Bilder ausgelöst, um in der Auswertung der Ergebnisse eine höhere statistische Sicherheit zu erlangen.

#### **4.7.3 Auswertung der mittels Primos gewonnenen Daten**

Zur Auswertung der Ergebnisse war ein mehrschrittiger Prozess erforderlich. Zunächst wurden die \*.omc Dateien in die Primos-Software importiert und fehlerhafte Dateien von weiteren Analysen ausgeschlossen. Da das topographische Höhenbild sowohl Informationen zur Makro- als auch Mikrostruktur enthält, ist es erforderlich, beide Strukturen zu trennen. Dafür und zum Ausgleich etwaiger Unebenheiten, besonders im Bereich der Hand, wurde der robuste Hochpassfilter verwendet. Im Anschluss daran erfolgte die automatische Elimination feiner Härchen. Die genormten \*.bmp Dateien wurden exportiert, für weitere Berechnungen in \*.txt Dateien umgeschrieben und nach Import in das Softwareprogramm MatLab 7.6 ausgewertet. Dazu wurden zunächst übereinstimmende Areale in korrespondierenden Bildern manuell definiert. Auf jedes ausgewählte Feld wurden nun 10 Linien aufgeblendet, wobei jede ein bestimmtes Tiefenprofil umfasste. Dieses spezifische Tiefenprofil wurde durch das Programm in 5 Abschnitte unterteilt. In jedem Abschnitt erfolgte die Bestimmung der relativen maximalen Tiefe und innerhalb des gesamten Tiefenprofils pro Linie wurde sowohl die maximale als auch die mittlere Tiefe berechnet (Abb. 13). Insgesamt wurden 10 Mittelwerte aus insgesamt 10 Linien pro ausgewähltem Hautfeld bestimmt, die automatisch jeweils zu einem Mittelwert für die maximale Tiefe und die mittlere Tiefe für das gesamte Hautfeld zusammengefasst wurden. Pro Testareal (Unterarm innen, Unterarm dorsal sowie Handrücken) wurden also

Mithilfe der Software 3 Mittelwerte berechnet, aus denen jeweils der Median der gemittelten und der maximalen Faltentiefe für weitere Berechnungen mit Excel 11.6 SP 2 und für statistische Tests verwendet wurde. Mithilfe des Wilcoxon Tests wurden die einzelnen Testfelder untereinander auf Signifikanzen geprüft, der Mann-Whitney Test fand für das Testen zwischen den Altersgruppen Verwendung.



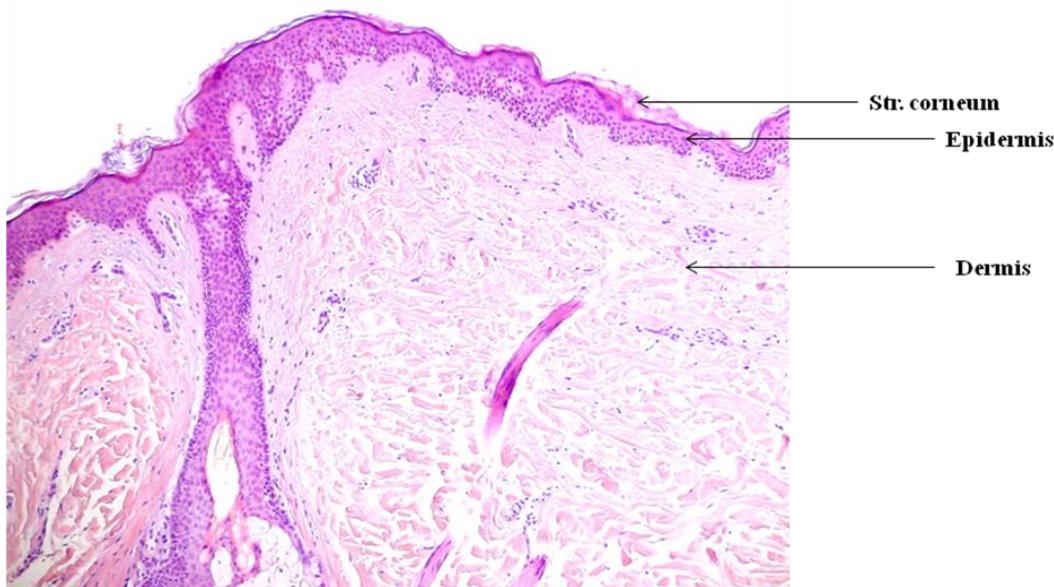
**Abb. 13:** Exemplarische Darstellung von einer der 10 Linien, die auf das ausgewählte Hautfeld projiziert wurden. Nach Unterteilung des Höhenprofils in fünf Abschnitte wurde in jedem Abschnitt die maximale relative Tiefe (MRT 1-5) bestimmt. Die mittlere relative Tiefe ergab sich aus dem Mittelwert von MRT 1-5.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Die Schichten gesunder Haut unter dem Lichtmikroskop

#### 5.1.1 Eigenschaften junger, gesunder Haut

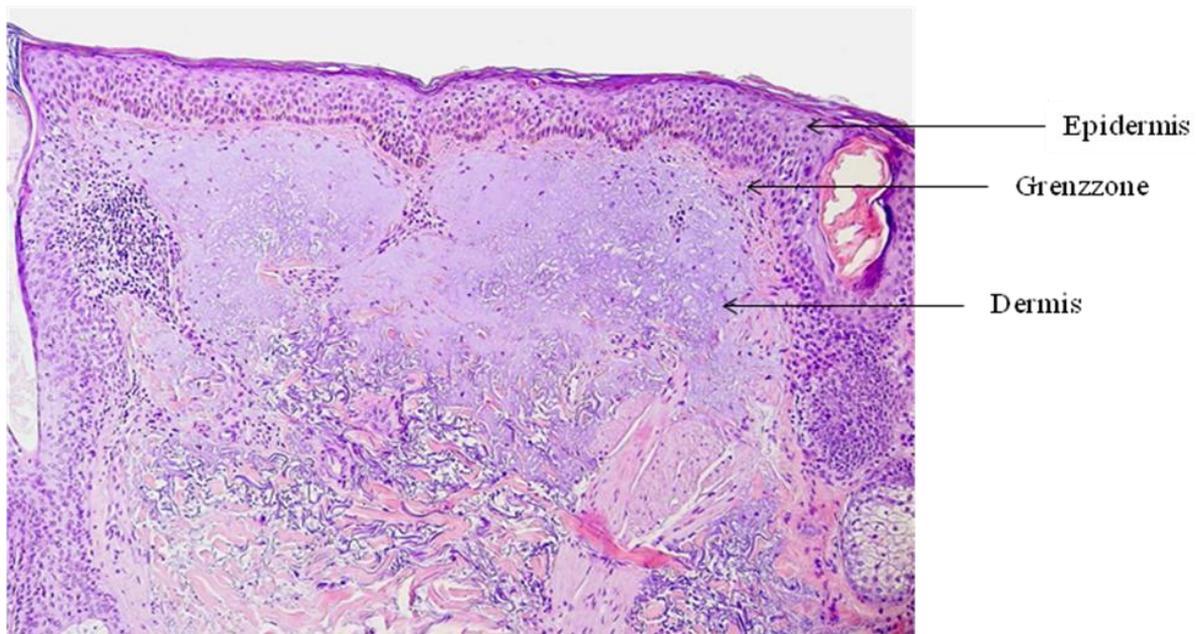
Das im Folgenden abgebildete, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte, histologische Präparat (Abb. 14) zeigt in 100 facher Vergrößerung die typische Schichtung gesunder, junger Haut. Zuerst erkennt man das sich vom Str. granulosum ablösende Str. corneum, darunter werden die vitalen Schichten der Epidermis sichtbar, die sich jedoch in dieser lichtmikroskopischen Aufnahme im Unterschied zu Darstellungen im MLT nicht genau differenzieren lassen. Zwischen Epidermis und Dermis zeigt sich eine für das Alter der Haut normale Junctionszone. Dichtes, parallel zur Oberfläche ausgerichtetes, kollagenes Material in Form der für die Altershaut typischen Grenzzone fehlt. Blassrosa imponiert die Dermis. Sie wird von breiten Kollagenfasern durchzogen, die den Hauptanteil der Lederhaut ausmachen und für mechanische Stabilität sorgen (vgl. Einleitung 2.1.2.3 Dermis). Es fällt auf, dass der Kollagengehalt in der Dermis mit zunehmender Tiefe nahezu konstant bleibt. Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Stapelmessungen mittels MLT wider, die in Kapitel 5.6.2 dargestellt werden. Feine elastische Fasern sind im Vergleich zu kollagenen Fasern in der HE-Färbung nicht sichtbar, sondern werden nur durch Spezialfärbungen (Resorcin-Fuchsin) erkennbar.



**Abb. 14: Biopsie gesunder, junger Haut. (HE, 100 fache Vergrößerung, zur Verfügung gestellt von Dr. Susanne Metz, Assistenzärztin der Hautklinik Jena).**

### 5.1.2 Eigenschaften der Altershaut

Abb. 15 zeigt das typische Bild gesunder, lichtexponierter Altershaut. Am Übergang von Epidermis zu Dermis, im oberen Teil des Str. papillare, imponiert ein schmales, rosa gefärbtes Band aus parallel ausgerichteten Kollagenfasern. Diesen schmalen Streifen bezeichnet man als Grenzzone (Lavker 1979). Unterhalb der Grenzzone sinkt der relative Kollagengehalt, zum einen aufgrund des Abbaus durch Matrixmetalloproteinasen, zum anderen durch eine verminderte de novo Synthese. Die Aktivität der MMPs wird durch UV Strahlung zusätzlich induziert und kann auch durch den Genuss von Nikotin verstärkt werden (Koehler et al. 2008). Das folgende HE gefärbte, histologische Schnittbild veranschaulicht das Phänomen der solaren Elastose innerhalb der Dermis: Kollagenfasern gehen infolge langjähriger UV-Exposition zugrunde und imponieren als bläulich-glasige, homogene Masse. Darüber hinaus erfolgt eine Ablagerung minderwertigen, elastotischen Materials, welches in dieser Färbung nicht erkennbar ist (Krutmann 2003). Erst im unteren Drittel der Dermis werden vereinzelte, breite Kollagenstreifen erkennbar. Diese typischen Veränderungen der Altershaut lassen sich nicht nur lichtmikroskopisch darstellen, sondern spiegeln sich auch im Hautalterungsindex SAAID wider, der nach Durchführung der Stapelmessungen berechnet wurde (vgl. Kapitel 5.6).

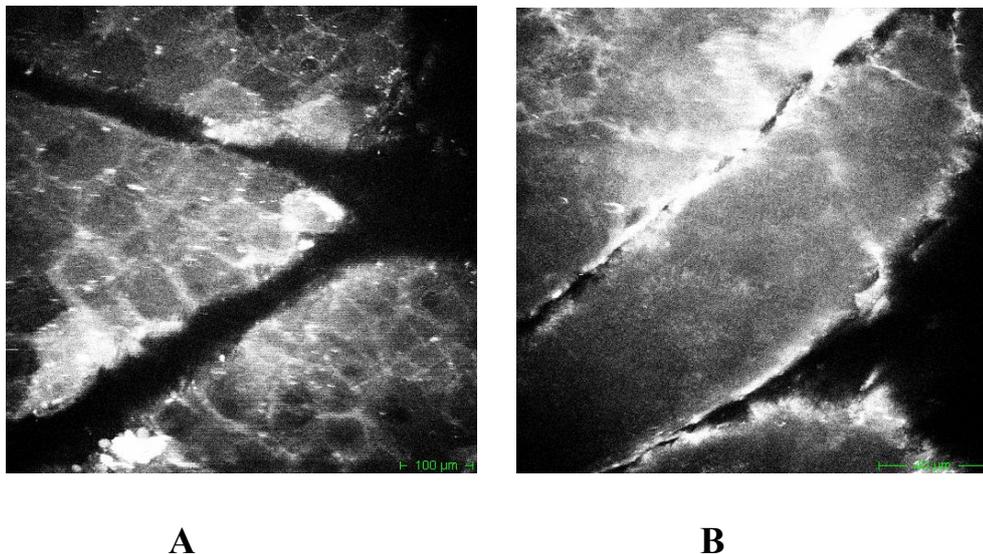


**Abb. 15: Histologisches Präparat gesunder Altershaut, Biopsie lichtexponierter Kopfhaut. (HE, 100 fache Vergrößerung, zur Verfügung gestellt von Dr. Susanne Metz, Assistenzärztin der Hautklinik Jena).**

## 5.2 Die Schichten gesunder Haut unter dem Multiphotonenlasertomographen

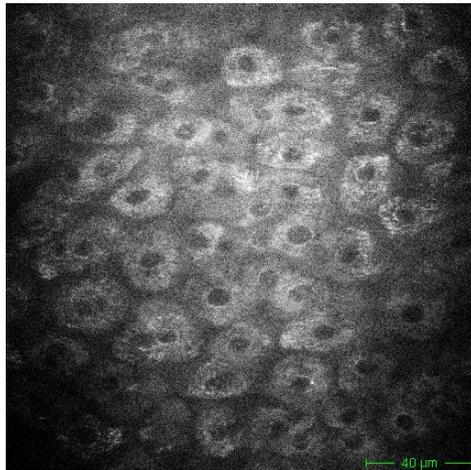
Im Gegensatz zur konventionellen Histologie ermöglicht die nicht-invasive Multiphotonenlasertomographie die hochaufgelöste, horizontale Darstellung epidermaler und dermaler Hautschichten *in vivo*. Auch die Anfertigung optischer Schnittbilder an Gewebeproben *ex vivo* kann mittels MLT realisiert werden. Aufwändige Fixations- und Färbemethoden, die bei Betrachtung von Gewebeproben unter dem Lichtmikroskop erforderlich sind, entfallen (Kaatz und König 2010). Die folgenden Abbildungen zeigen - anhand ausgewählter MLT Bilder von innerhalb der Studie gemessenen Probanden - typische morphologische Merkmale gesunder Haut des jungen Probanden in unterschiedlicher Tiefe.

Die ersten beiden Aufnahmen veranschaulichen das variierende Erscheinungsbild des Stratum corneum (Abb. 16): Im linken Bild (A) ist die hexagonale Struktur der Korneozyten erkennbar. Typisch ist das Fehlen eines Zellkerns und die auffallende Fluoreszenz der Zellgrenzen. Bei anderen Probanden wies das Stratum corneum eine homogene Struktur auf (B) und stellte sich als nahezu amorphes Gebilde mit stärker und schwächer fluoreszierenden Bereichen dar, die als hypo- und hyperintense Bereiche imponieren. Hauptträger der Fluoreszenz in dieser Schicht ist das Keratin.

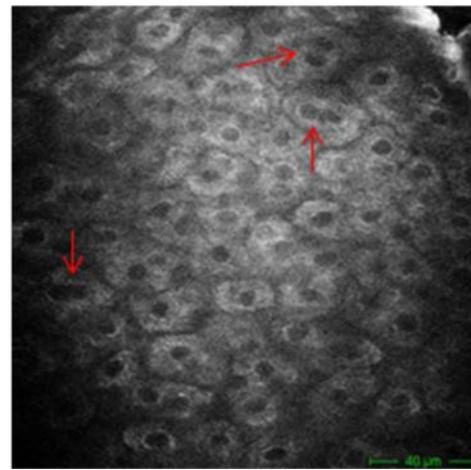


**Abb. 16: Stratum corneum.** Im Bild A ist die hexagonale Struktur der Korneozyten erkennbar, Bild B zeigt das das Stratum corneum als homogene Struktur. (Anregungswellenlänge 760 nm, Bildaufnahmezeit 13,4 s).

Typisch für das Stratum granulosum sind große, in einem lockeren Zellverband angeordnete Zellen mit einem dunklen, meist zentralständigen Zellkern und dem grobkörnig imponierenden Zytoplasma, in dem die Zellorganellen lokalisiert sind (Abb. 17 C). Die Interzellularräume erscheinen im Vergleich zum darunter liegenden Stratum spinosum (Abb. 17 D) weiter. In der Stachelzellschicht sind die einzelnen Zellen dichter gepackt und kleiner im Vergleich zur Körnerzellschicht. In beiden Zellschichten trägt im Wesentlichen das v.a. intramitochondrial lokalisierte NAD(P)H zur zellulären Fluoreszenz bei. Die hyperintensiven, punktförmigen Areale innerhalb des Zytoplasmas sind somit auf NAD(P)H haltige Zellorganellen und sogenannte Keratohyalingranula, die reichlich Keratin enthalten, zurückzuführen. Im Unterschied zum Stratum corneum erscheinen die Zellgrenzen der Keratinozyten, ebenso wie die Zellkerne, aufgrund fehlender endogener Fluorophore hypointens. Beim aufmerksamen Betrachten fallen im Stratum spinosum 3 Zellen auf, die scheinbar 2 Zellkerne enthalten (rote Pfeile). Dieses „Doppelkernphänomen“ ist auf einen doppelten Anschnitt der Zellkerne innerhalb dieser Schichtebene zurückzuführen.



**C**

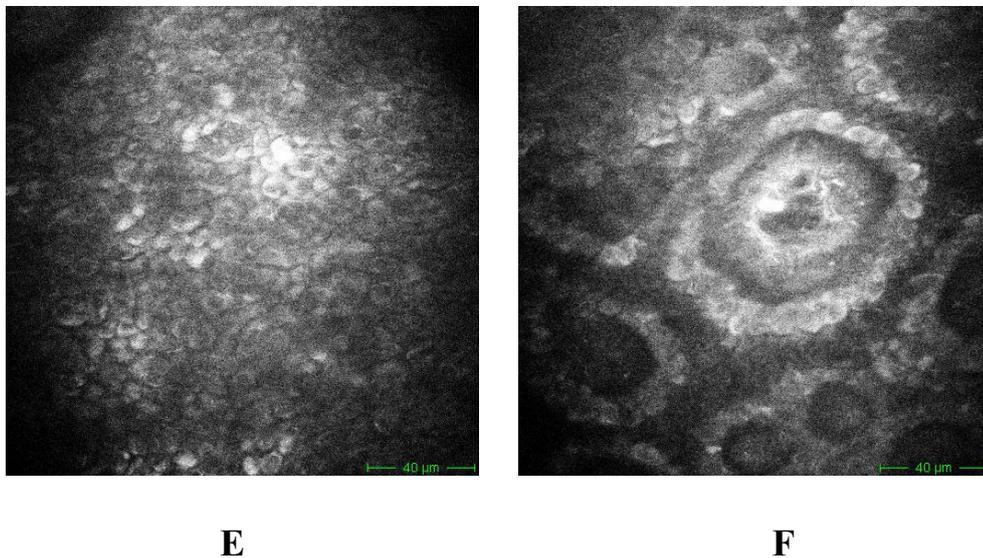


**D**

**Abb. 17: Stratum granulosum (C) und spinosum (D) im Vergleich. Die roten Pfeile in D verweisen auf das sogenannte „Doppelkernphänomen“. (Anregungswellenlänge 760 nm, Bildaufnahmezeit 13,4 s).**

Im Mittel 51  $\mu\text{m}$  (am Unterarm) bzw. 89  $\mu\text{m}$  (am Handrücken) unterhalb der ersten lebenden Zelle, also der obersten Zelle innerhalb des Stratum granulosums, in der man einen dunklen Zellkern von einem granulierten Zytoplasma abgrenzen kann, befindet sich das Stratum basale (Abb. 18 E). Dieses imponiert durch kleine, polygonale bis runde Zellen. Interzellularräume sind kaum noch erkennbar. Die starken Fluoreszenzsignale liefert das Hautpigment Melanin, dessen Menge in Abhängigkeit vom Hauttyp interindividuell variiert. Bei besonders stark fluoreszierenden Zellen lässt sich der Zellkern nicht mehr klar vom umgebenden Zytoplasma abgrenzen.

Mit zunehmender Gewebetiefe erscheinen runde, hypointense, dermale Papillen (Abb. 18 F), gesäumt von melaninhaltigen Zellen des Stratum basale. Das bereits innerhalb der Dermis lokalisierte Stratum papillare besteht zum großen Teil aus extrazellulären kollagenen Fasern, die sich jedoch bei der verwendeten, für das SHG Signal des Kollagens zu geringen, Anregungswellenlänge von  $\lambda = 760 \text{ nm}$  nicht als hyperintense Bereiche darstellen ließen. Die klare Abgrenzung der Papillen, wie in Abb. 18 F dargestellt, gelang nicht bei jedem der untersuchten Probanden.



**Abb. 18: Stratum basale (E) und papillare (F). E zeigt stark fluoreszierende Zellen des Stratum basale. In F sind die Papillen des Stratum papillare zu erkennen. (Anregungswellenlänge 760 nm, Bildaufnahmezeit 13,4 s).**

### 5.3 Vergleich zwischen konventioneller Histologie und Multiphotonenlasertomografie bzgl. der Morphologie einzelner Hautschichten

**Tab. 3: Vergleich zwischen konventioneller Histologie und Multiphotonenlasertomografie bzgl. der Morphologie einzelner Hautschichten**

Hautschicht	Konventionelle Histologie	Multiphotonenlasertomografie
Str. corneum	<ul style="list-style-type: none"> <li>• schmales Band, welches sich vom vitalen Stratum granulosum ablöst</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• polygonale, kernlose Korneozyten bzw. homogenes, amorphes Gebilde</li> <li>• hypo- und hyperintense Bereiche</li> </ul>
Str. granulosum	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mehrere Zelllagen übereinander</li> <li>• große Zellen</li> <li>• lockerer Zellverband</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• große Zellen mit grobkörnigem Zytoplasma und großem Zellkern</li> <li>• weite Interzellularräume</li> </ul>
Str. spinosum	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mehrere Zelllagen übereinander</li> <li>• dicht gepackte Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kleine Zellen</li> <li>• enge Interzellularräume, daher dichter Zellverband</li> </ul>
Stratum basale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• einschichtiger Zellverband</li> <li>• längliche, zylinderförmige Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sehr kleine polygonale bis runde Zellen</li> <li>• Interzellularräume kaum noch erkennbar</li> <li>• starkes Fluoreszenzsignal durch Melanin</li> </ul>
Stratum papillare	<ul style="list-style-type: none"> <li>• durch Kollagenfasern hellrosa imponierende, zapfenähnliche Gebilde</li> <li>• mit den epidermalen Reteleisten verzahnt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• runde, hypointense Strukturen, von melaninhaltigen Zellen des Stratum basale umgeben</li> </ul>

In Tab. 3 wird das morphologische Erscheinungsbild der einzelnen Hautschichten in der konventionellen Histologie mit der Morphologie unter dem Multiphotonenlasertomographen verglichen. Durch die horizontale Darstellung der einzelnen Hautschichten gelingt mithilfe der Multiphotonenlasertomographie im Gegensatz zur konventionellen Histologie eine exakte Beurteilung einzelner Zellen innerhalb des Zellverbandes. Somit können Veränderungen frühzeitig erkannt und gegebenenfalls therapiert werden.

## 5.4 Bestimmung der epidermalen Dicke mithilfe des MLT

Bestimmt man die epidermale Dicke während der MLT-Messung anhand einer Skala in der JenLab Software, ist diese Methode als Einmalmessung sehr fehleranfällig, da der wellenförmige Verlauf der Schichtgrenzen, z.B. an der Oberfläche oder im Bereich der dermo-epidermalen Zone nicht berücksichtigt werden kann.

Um das Messverfahren zu objektivieren, wurden Stapelmessungen durchgeführt, wobei jeweils 3 Stapel innerhalb des jeweiligen Testfeldes (Unterarm dorsal und Handrücken) an unterschiedlichen Stellen aufgenommen wurden, um die statistische Sicherheit zu erhöhen. Dazu wurde unterhalb des Stratum corneum im gerade beginnenden Stratum granulosum die sogenannte „erste lebende Zelle“ gesucht, also die oberste Zelle, in der man einen dunklen Zellkern von einem granulierten Zytoplasma abgrenzen kann. Ausgehend von diesem festgelegten Startpunkt wurde die Eindringtiefe des Lasers soweit verringert, dass gerade die ersten Oberflächensignale des Stratum corneums in der Jenlab Software darstellbar waren. An dieser Stelle wurde anschließend die Stapelmessung gestartet und 50 Bilder im Abstand von 5,1  $\mu\text{m}$  generiert.

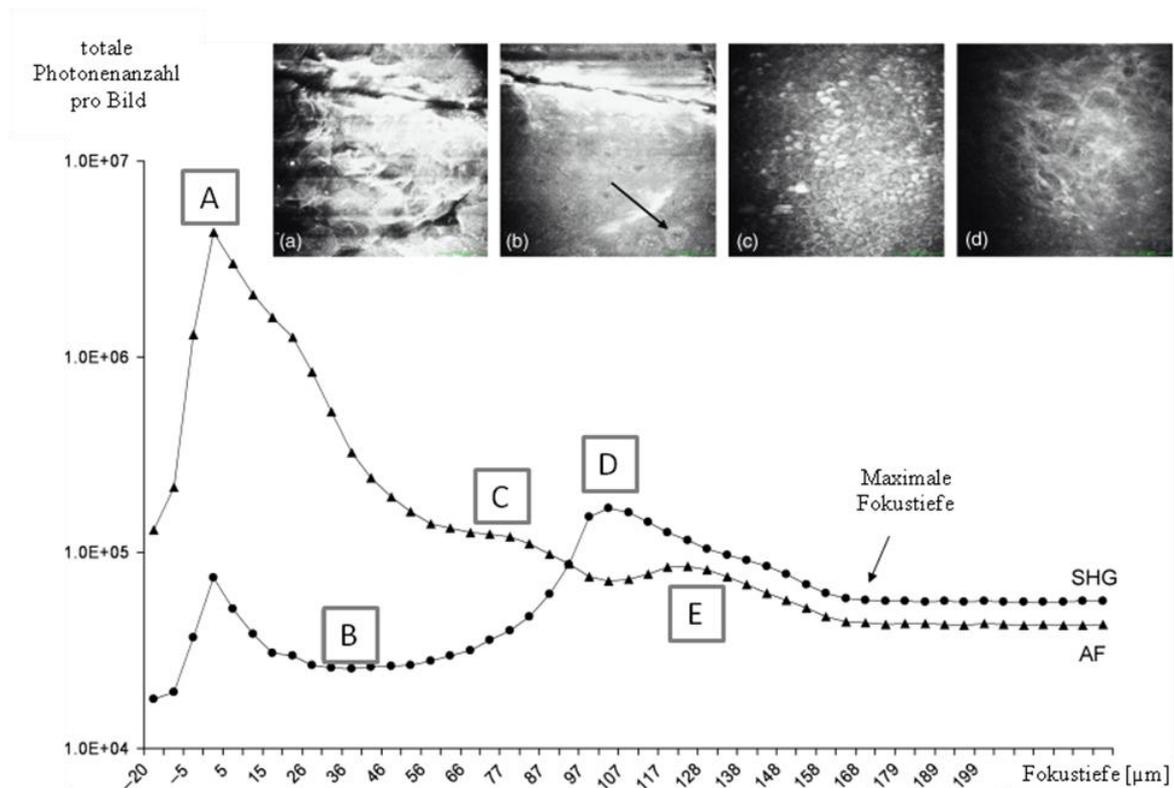
In jedem einzelnen Bild des Stapels wird eine bestimmte Anzahl von Photonen registriert, die Auskunft über die Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals gibt. Je höher die emittierte Photonenanzahl dabei ist, desto größer ist die Lichtintensität. Analysiert man die SPC Stapel graphisch, so erhält man charakteristische Kurven der AF und der SHG. Dazu wird die emittierte Photonenanzahl pro Bild über die Hauteindringtiefe aufgetragen. Vergleicht man die Intensitätsspitzen und -minima mit den bitmaps, die das Gerät gleichzeitig erstellt, kann man im Kurvenverlauf entsprechende Peaks und Minima (A-E) einzelnen Zellschichten (a-d) zuordnen (vgl. Abb. 19).

Der erste Peak - sowohl im SHG als auch AF-Kanal - wird durch die oberste Schicht, das Stratum corneum, hervorgerufen (A,a). Im weiteren Verlauf zeigt die Autofluoreszenzkurve einen starken Abfall, bevor eine kleine Aufwölbung beobachtet werden kann, die durch die Autofluoreszenz des Melanins im Stratum basale verursacht wird (C,c).

Nach diesem Melaninpeak in der AF-Kurve zeigt sich eine prominente Spitze in der SHG-Kurve (D). SHG wird in der Haut durch Kollagen generiert, woraus man schlussfolgern kann,

dass dieser SHG Peak aus der oberen papillären Dermis (d) stammen muss, in der reichlich Kollagen vorhanden ist.

Das Minimum zwischen den beiden SHG Peaks entspricht dem Stratum granulosum (B,b). In einer bestimmten Tiefe, bei den meisten Probanden zwischen 130 und 180  $\mu\text{m}$ , verlaufen die SHG und die AF Kurve parallel. In diesem Bereich ist die maximale Eindringtiefe des Lasers erreicht.



**Abb. 19:** Typische Emissionskurven eines alten Probanden mit Verknüpfung der Peaks zu bestimmten Hautschichten, A=Hautoberflächenpeak, sowohl im SHG als auch AF Kanal, B= Stratum granulosum, C= Melaninpeak im Stratum basale, D= SHG Peak der papillären Dermis im Bereich der Grenzzone, E= AF Peak durch solare Elastose. Im Bereich zwischen 130 und 180  $\mu\text{m}$  war die maximale Fokustiefe des Lasers erreicht, was in der Grafik durch den parallelen Verlauf der SHG und AF Kurve zum Ausdruck kommt (Koehler et al. 2010).

Die oben präsentierte Graphik (Abb. 19) veranschaulicht die Bestimmung der Dicke einzelner Epidermisschichten anhand der SHG und AF Kurve bei einem Probanden aus der Altersgruppe 3. Die totale Photonenzahl pro Bild wurde dazu über die Fokustiefe aufgetragen. Die Abstände zwischen den genannten Peaks innerhalb eines Stapels resultieren in der Dicke der

jeweiligen Epidermisschicht. Das Stratum corneum wird definiert als Abstand zwischen A und B, also der Distanz zwischen dem Eingangspeak an der Hautoberfläche und der sogenannten „ersten lebenden Zelle“. Die lebende Epidermis umfasst die Differenz zwischen B und C und beinhaltet das Stratum granulosum, spinosum und basale. Die gesamte Epidermisdicke erschließt sich aus dem Intervall zwischen A und C und die Tiefe der papillären Dermis aus der Distanz zwischen A und D.

Allerdings wurden nicht in allen Stapeln die genannten Peaks und Minima gefunden. Flache oder multiple Spitzen im Kurvenverlauf erschwerten die genaue Zuordnung zu entsprechenden Zellschichten. Wie bereits erwähnt, liegt die Hauptursache für unterschiedliche Kurvenverläufe in der Wellenform der Haut. Dieses Problem kann umgangen werden, wenn man einen Stapel in Teilstapel zerlegt, sodass man pro Splitstapel ein Messfeld betrachtet, welches so klein ist, dass es nur wenige Zellen enthält. Aus einem Stapel mit einer Kantenlänge von  $180 \times 180 \mu\text{m}$  wurden 81 Teilstapel, die eine Fläche von jeweils  $20 \times 20 \mu\text{m}$  abdecken (vgl. 4.5 Abb. 11). In den meisten dieser Splitstapel waren die genannten Peaks und Minima klar abgrenzbar.

## **5.5 Die epidermale Dicke in Abhängigkeit vom Probandenalter und der Körperlokalisierung**

Bei insgesamt 30 Probanden, unterteilt in 3 Altersgruppen, wurden sowohl am dorsalen Unterarm als auch am Handrücken jeweils 3 Stapel erstellt und nach den oben beschriebenen Prinzipien ausgewertet. Beim Vergleichen der einzelnen Altersgruppen untereinander ließen sich nur geringfügige Unterschiede bzgl. der epidermalen Dicke feststellen. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch beim Vergleich zwischen Hand und Unterarm. In allen Altersgruppen zeigten sich in jeder epidermalen Schicht signifikant höhere Werte am Handrücken im Vergleich zum Unterarm (Abb. 20).

Der wellenförmige Verlauf der dermoepidermalen Junktionszone im Bereich eines Stapels wird durch den Variationskoeffizienten ausgedrückt, der in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 4) in den letzten beiden Spalten prozentual angegeben wurde. Er ist definiert als Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert einer Variablen X. X ist in diesem Fall die epi-

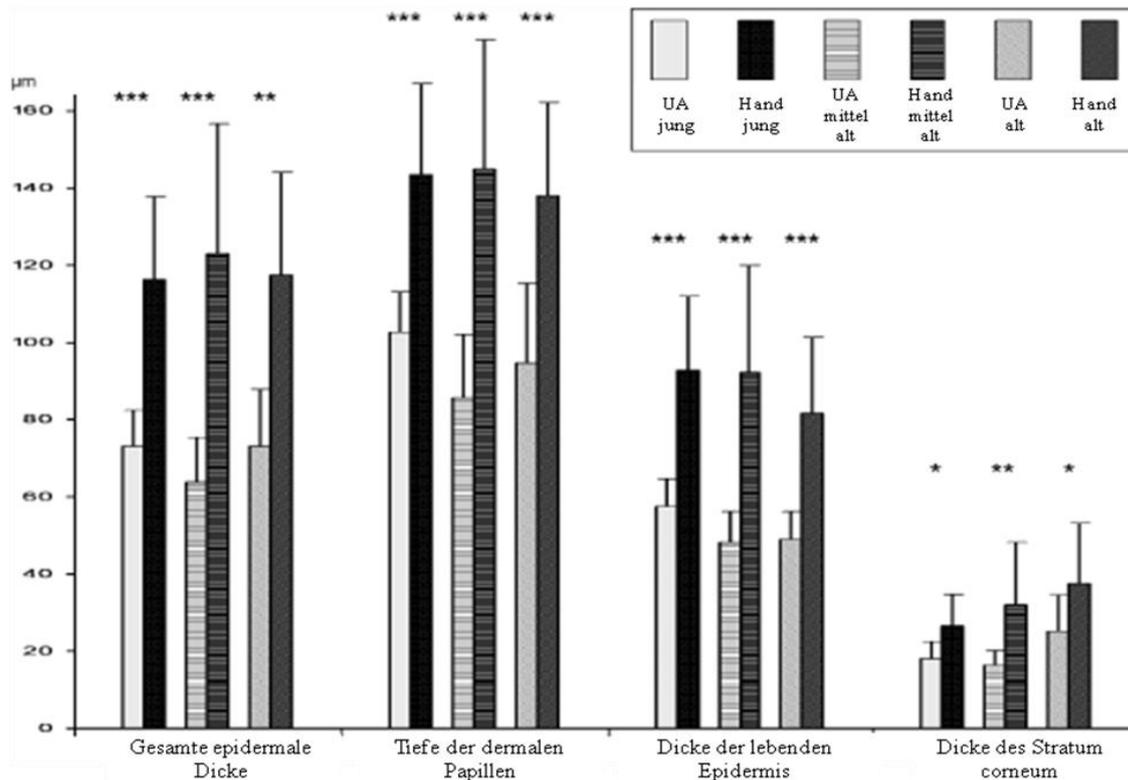
dermale Dicke bzw. die Tiefe der papillären Dermis. Der Variationskoeffizient erreicht umso höhere Werte, je stärker der wellenförmige Verlauf der Basalmembranzzone ausgeprägt ist.

Der Grad der Welligkeit der dermoepidermalen Zone zeigte in allen 3 Altersgruppen ähnliche Werte, eine Abnahme mit zunehmendem Alter aufgrund einer Abflachung der Papillen infolge einer Atrophie konnte somit nicht nachgewiesen werden.

**Tab. 4: Die Dicke epidermaler Schichten in Abhängigkeit von Lokalisation und Altersgruppe**

		Epidermale Dicke ge- samt	Tiefe der papillären Dermis	Dicke der lebenden Epidermis	Dicke des Stratum corneum	CV in % epider- male Dicke	CV in % papil- läre Tiefe
<b>Gruppe 1</b>	Unterarm	73	103	57	18	25	18
<b>Durchschnittsalter</b> <b>23,3 ± 1,9 Jahre</b>	Hand	117	144	93	27	26	20
<b>Gruppe 2</b>	Unterarm	64	86	48	16	16	13
<b>Durchschnittsalter</b> <b>47,3 ± 3,1 Jahre</b>	Hand	123	145	92	32	21	18
<b>Gruppe 3</b>	Unterarm	73	95	49	25	23	18
<b>Durchschnittsalter</b> <b>72,1 ± 6,4 Jahre</b>	Hand	117	138	82	38	20	17

Nach Mittelung der jeweils drei Messwerte pro Proband erfolgte die Berechnung eines Mittelwerts pro Gruppe für den Unterarm dorsal (TF1) und den Handrücken (TF2). Der Variationskoeffizient CV repräsentiert den wellenförmigen Verlauf der Basalmembranzzone (Koehler et al. 2010).



**Abb. 20: Graphische Darstellung der Dicke epidermaler Schichten auf unterschiedlichen Testfeldern und in Abhängigkeit vom Lebensalter. Verglichen wurde jeweils die Dicke unterschiedlicher Epidermisschichten zwischen Unterarm (UA) und Handrücken innerhalb der bekannten 3 Altersgruppen. Helle Balken: Unterarm dorsal, dunkle Balken: Handrücken \*p<0,05, \*\*p=0,0039, \*\*\*p=0,0020 (Koehler et al. 2010).**

Die Unterschiede zwischen den beiden Testfeldern sind innerhalb aller 3 Altersgruppen signifikant. Die Signifikanz ist umso höher, je kleiner der Signifikanzwert p ist, d.h. je mehr Sterne über dem jeweiligen Balken in der oben präsentierten Graphik angegeben sind. Vergleicht man die Dicke der angegebenen epidermalen Schichten zwischen den Altersklassen, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

## 5.6 Der Hautalterungsindex SAAID

Der „SHG- to -AF Alterungsindex der Dermis“ (SAAID) ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen dermalen Kollagen- und Elastinfasern und ist folgendermaßen definiert:  $SAAID = \frac{SHG-AF}{SHG+AF}$  (Koehler et al. 2006). Für den SHG-Effekt ist intradermal ausschließlich das Kollagen verantwortlich, der Hauptanteil der Autofluoreszenz wird hingegen durch elastische Fasern hervorgerufen. Aufgrund des im Alter schwindenden Gehalts an

reifem Kollagen und der Ablagerung minderwertigen elastotischen Materials ergibt sich eine kontinuierliche Abnahme des SAAID mit zunehmendem Lebensalter.

### 5.6.1 Der SAAID in Abhängigkeit vom Lebensalter

Betrachtet man die Messergebnisse aller Probanden, so zeigt sich der SHG Peak der papillären Dermis im Mittel in einer Hauttiefe von  $91 \pm 16\mu\text{m}$  unterhalb des Oberflächenpeaks. Da die epidermale Dicke zwischen den einzelnen Altersgruppen nicht signifikant variiert, konnte auch keine Korrelation zwischen der Tiefe, in der der Peak erreicht wurde, und dem Patientenalter festgestellt werden. Vielmehr wurden teils beachtliche interindividuelle Unterschiede zwischen den Probanden einer Altersgruppe beobachtet, was in Abb. 21 graphisch zum Ausdruck gebracht wird.

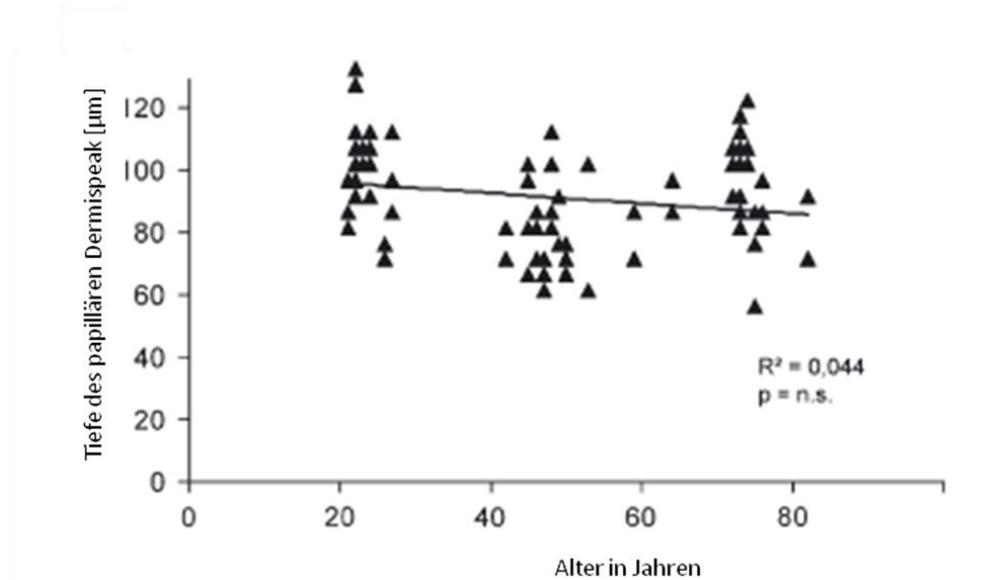
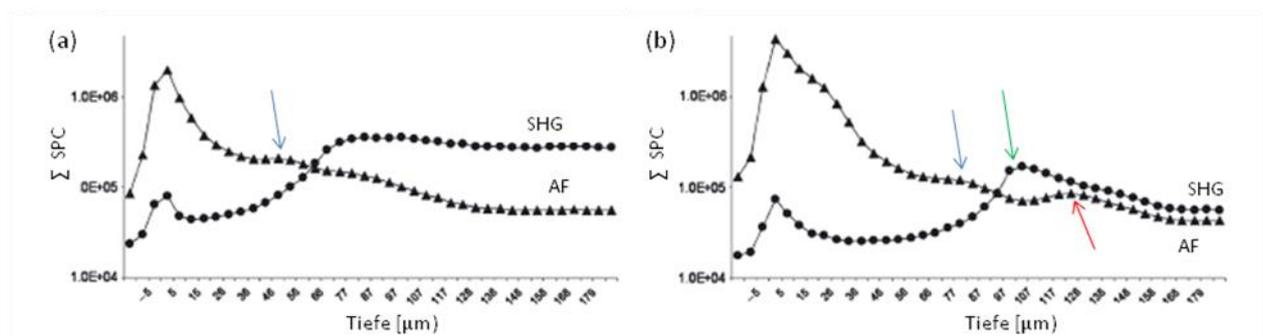


Abb. 21: Die Tiefe des papillären Dermispeak als Indikator der epidermalen Dicke in Abhängigkeit des Alters des Probanden (Kaatz et al. 2010).

## 5.6.2 Der SAAID in Abhängigkeit von der Messtiefe

Wie die bereits zitierte Studie von Köhler et al. gezeigt hat, nimmt der Hautalterungsindex SAAID mit zunehmendem Alter signifikant und kontinuierlich ab (Koepler et al. 2006). Im Folgenden (Abb. 22) soll die Abhängigkeit des SAAID von der Hauteindringtiefe bei jungen und alten Patienten veranschaulicht werden. In der folgenden Abbildung sind jeweils ein Stapel eines Probanden aus Gruppe 1 (jung) und ein Stapel von einem Probanden der Gruppe 3 (alt) graphisch dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der gezählten Photonen in beiden Kanälen (AF und SHG) über die Hauteindringtiefe des Lasers aufgetragen.



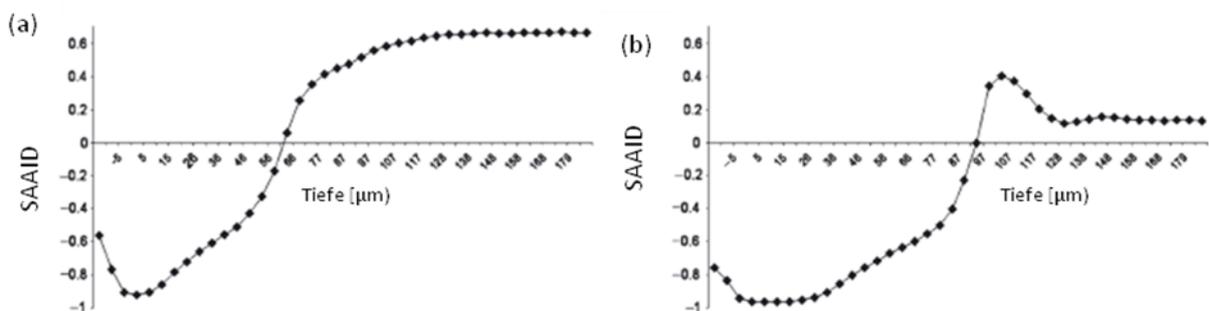
**Abb. 22: SHG und AF Signal in unterschiedlichen Tiefen bei (a) einem jungen Probanden (Gruppe 1) und (b) einem alten Probanden (Gruppe 3). Die farbigen Pfeile markieren die Peaks innerhalb des Kurvenverlaufs der AF und der SHG. Blaue Pfeile: AF-Peak innerhalb des melaninhaltigen Str. basale, grüner Pfeil: SHG Peak innerhalb der Grenzzone, roter Pfeil: AF Peak innerhalb der Dermis durch die vermehrte Ablagerung elastotischen Materials (Kaatz et al. 2010).**

Bei Betrachtung der Graphiken werden Unterschiede im Kurvenverlauf sowohl bezüglich des SHG Signals als auch der Autofluoreszenz AF deutlich. Im AF Kanal wurde in der Altersgruppe 3 ein nicht nur höherer, sondern auch insgesamt breiterer Peak im Bereich des Stratum corneum registriert. Beide Kurven zeigen im weiteren Verlauf einen Abfall, bevor eine leichte Wölbung erkennbar wird (blaue Pfeile), die der Autofluoreszenz des Melanins im Stratum basale zuzuordnen ist. Nach dieser leichten Erhebung fällt die AF Kurve bei den jungen Probanden kontinuierlich ab und sistiert nach Erreichen der maximalen Fokustiefe des Lasers auf konstantem Niveau.

In der Graphik des Probanden höheren Lebensalters hingegen zeigt die AF Kurve im Bereich zwischen 112 und 138  $\mu\text{m}$  (roter Pfeil) eine weitere Wölbung, die durch die altersbedingte Ablagerung elastischen Materials unterhalb der papillären Dermis erklärt werden kann.

Die SHG Kurve zeigt nach dem Eingangspeak bei beiden Probanden zunächst einen kurzen Abfall, steigt bei dem jungen Probanden jedoch schneller und steiler wieder an, bis eine maximale Höhe erreicht wird. Nach dem Erreichen dieses Maximums an Signalintensität unterscheiden sich beide Kurven deutlich hinsichtlich des weiteren Verlaufs: Das SHG Signal bleibt bei dem jungen Studienteilnehmer auch mit zunehmender Tiefe konstant, wohingegen bei der älteren Testperson nach Erreichen des Maximums an SHG Intensität (grüner Pfeil) ein Abfall des SHG Signals mit zunehmender Tiefe registriert wird. Auch die Anzahl der gezählten Photonen im SHG Kanal ist bei dem jungen Probanden größer verglichen mit dem Probanden aus der höheren Altersgruppe in Graphik (b).

Die genannten Unterschiede zwischen junger und alter Haut spiegeln sich auch im Kurvenverlauf des daraufhin berechneten und graphisch über die Hauteindringtiefe aufgetragenen SAAID wider (Abb. 23):



**Abb. 23: SAAID in Abhängigkeit der Hauttiefe bei einem jungen Probanden (a) und einem alten Probanden (b) (Kaatz et al. 2010).**

Betrachtet man den Verlauf der SAAID Kurven, lässt sich beobachten, dass in (a) die SAAID Kurve mit zunehmender Tiefe bis auf ein Maximum ansteigt und dieses Plateau beibehält. Bei dem älteren Studienteilnehmer in (b) steigt der SAAID mit der Hauteindringtiefe bis zum Erreichen eines Maximums an, um anschließend auf einen Wert abzufallen, der im weiteren Verlauf der Kurve bei zunehmender Tiefe konstant bleibt. Dieses SAAID Maximum korres-

pondiert höchstwahrscheinlich mit dem schmalen Band aus intaktem Kollagen zwischen der moepidermalen Junctionszone und dem Bereich solarer Elastose. Diesen intakten Kollagenstreifen bezeichnet man als Grenzzone. Im HE-Schnitt der gesunden Altershaut imponiert diese Zone als schmaler, blassrosa Streifen zwischen Epidermis und Dermis (vgl. Kap. 5.1.2, Abb. 15).

Differenzen ergeben sich bei genauerer Betrachtung auch im Schnittpunkt der SAAID Kurven mit der x-Achse. Die Kurve des jungen Probanden schneidet die x-Achse bei einer geringeren Tiefe als der Graph des alten Probanden. Der Anstieg des SAAID ist demzufolge bei dem jungen Probanden steiler, da auch das Maximum des SHG Signals in geringerer Tiefe bei (a) im Vergleich zu (b) erreicht wird.

### **5.6.3 Der SAAID in Relation zur Oberfläche bzw. zum SHG Peak**

Aufgrund der interindividuellen Variabilität des papillären Dermispeak (siehe Abb. 21), wurde untersucht, ob der SAAID genauer beurteilt werden kann, wenn man in einer bestimmten Tiefe relativ zum SHG Peak misst oder eine Tiefe relativ zur Oberfläche wählt. In beiden Fällen wird jeweils der in verschiedenen Altersgruppen bestimmte SAAID über das Alter aufgetragen (Abb. 24) und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  berechnet. Das Bestimmtheitsmaß ergibt sich aus dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten  $r$ , der als Maß für den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen  $X$  und  $Y$ , in unserem Fall  $X$ =Alter und  $Y$ =SAAID angesehen werden kann. Zwischen Alter und SAAID besteht ein linearer Zusammenhang, denn mit zunehmendem Alter verringert sich der SAAID Wert proportional (Koehler et al. 2006).

Der Korrelationskoeffizient  $r$  ist somit negativ. Durch Quadrieren von  $r$  ergibt sich ein positives  $R^2$ . Je näher  $R^2$  an 1 liegt, desto höher die Wahrscheinlichkeit des linearen Zusammenhangs. In beiden Fällen fand sich eine proportionale Zunahme des SAAID mit zunehmender Messtiefe, was bereits in den vorhergehenden Graphiken zum Ausdruck kommt. Bei der Bestimmung des SAAID relativ zur Oberfläche erreichte  $R^2$  Werte von etwa  $R^2= 0,7$ , bei Messungen des SAAID relativ zum SHG Peak wurden Werte von  $R^2= 0,6$  erreicht. Höhere Werte konnten rechnerisch erzielt werden, wenn die 3 Stapel pro Patient gemittelt wurden.  $R^2$  nahm dann bei der Messung relativ zur Oberfläche Werte von  $R^2= 0,8$  an, wohin-

gegen bei Messungen unterhalb des SHG Peaks nur Werte von  $R^2 = 0,7$  errechnet werden konnten (Abb. 25).

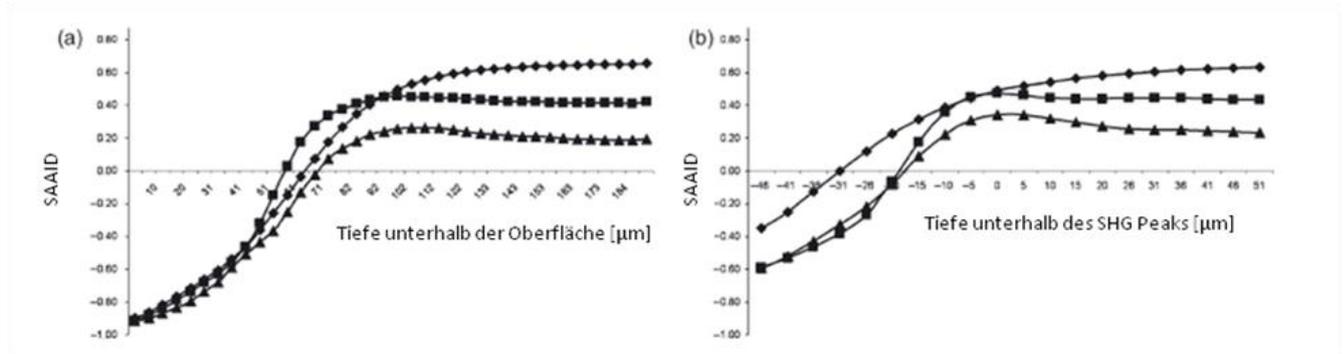


Abb. 24: SAAID Kurven der 3 Altersgruppen (  $\blacklozenge$  = junge Probanden,  $\blacksquare$  = mittelalte Probanden,  $\blacktriangle$  = alte Probanden) relativ zur Oberfläche (a) bzw. zum SHG Peak (b). Die SAAID Werte ergeben sich aus den Mittelwerten der 3 Stapel von insgesamt 10 Probanden pro Gruppe (Kaatz et al. 2010).

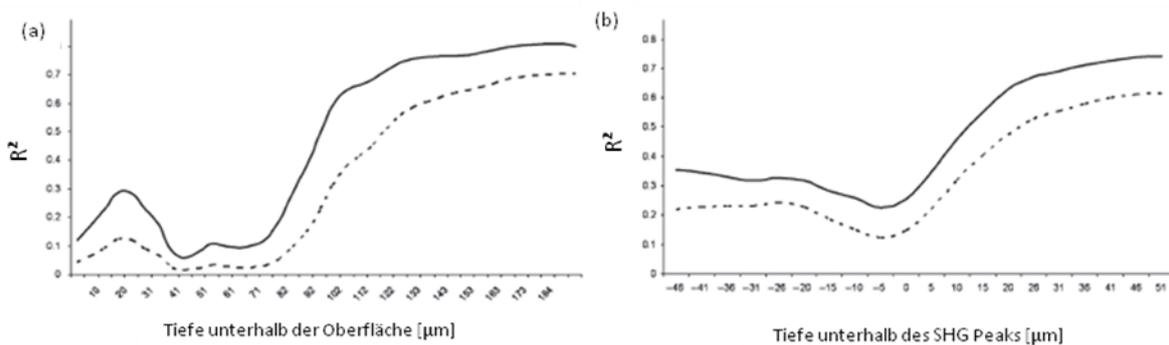
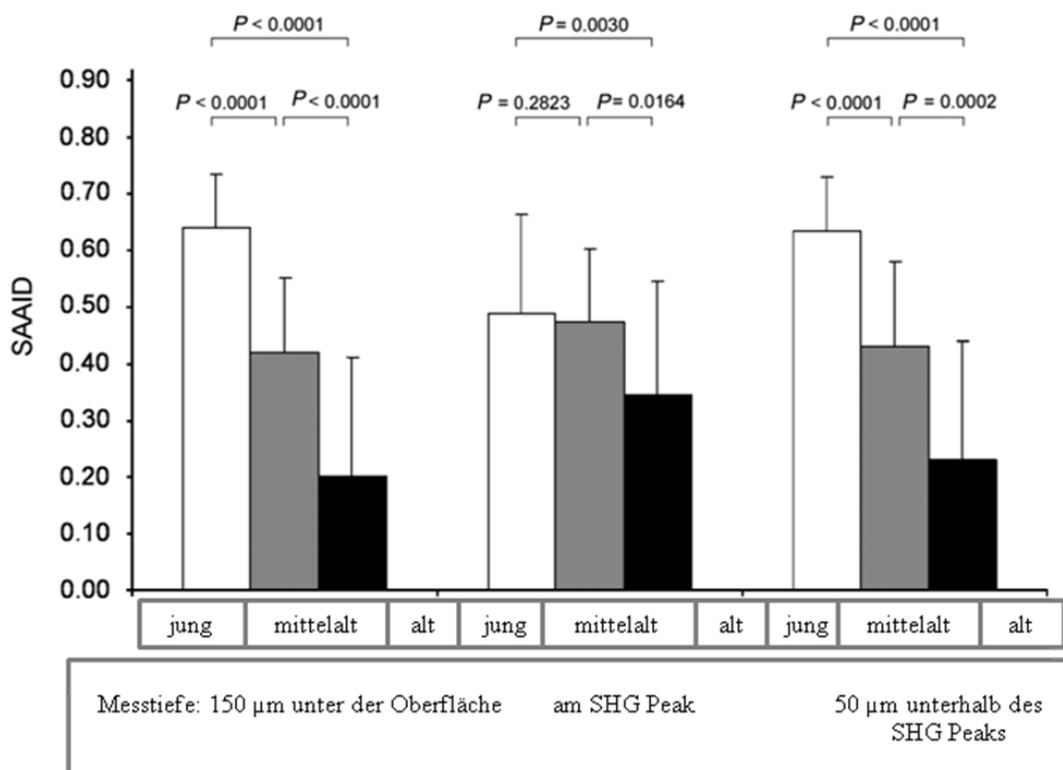


Abb. 25: Korrelation des SAAID mit dem Alter der Probanden in Abhängigkeit der Fokustiefe relativ zur Oberfläche (a) oder zum SHG-Peak (b). Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  (gestrichelte Linie) steigt kontinuierlich unterhalb des SHG Peaks, erreicht jedoch höhere Werte bei Messungen relativ zur Oberfläche. Indem man den Mittelwert aus 3 Stapeln pro Patient bildet, erhöht sich der Wert von  $R^2$  in beiden Graphiken um 0,1 (durchgezogene Linie) (Kaatz et al. 2010).

Der SAAID wurde anschließend auf signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen getestet. Dazu folgten Berechnungen des Hautalterungsindex in 3 unterschiedlichen Tiefen jeder Altersgruppe, um die Abhängigkeit des SAAID von der Messtiefe deutlich zu machen. Signifikante Unterschiede in den SAAID Werten der einzelnen Altersgruppen sind im folgenden Diagramm in einer Messtiefe von 150  $\mu\text{m}$  unterhalb der Hautoberfläche sichtbar, während die Bestimmung des SAAID am SHG Peak kaum Unterschiede zwischen den Alters-

gruppen erkennen lässt. Obwohl der SAAID-Unterschied im Hautalterungsindex zwischen der mittleren und der Gruppe hohen Alters mit einem p-Wert von  $p=0,0164$  signifikant ist, zeigt sich beim Vergleich der jungen mit den mittelalten Probanden bei einem p-Wert von  $p=0,2823$  keine Signifikanz mehr. Misst man jedoch 50  $\mu\text{m}$  unterhalb der papillären Dermis werden die Unterschiede im SAAID der einzelnen Altersgruppen erneut hochsignifikant, wobei der p-Wert zwischen mittelalten und alten Probanden bei der Bestimmung des SAAID 150  $\mu\text{m}$  unterhalb der Oberfläche mit  $p<0,0001$  kleiner ist als bei der Messung 50  $\mu\text{m}$  unterhalb des SHG Peaks ( $p=0,0002$ ).

Die Signifikanz ist umso höher, je kleiner der p-Wert ist. Demzufolge werden die signifikantesten Ergebnisse bzgl. der SAAID Abnahme im Alter erreicht, wenn man bei allen Probanden den Hautalterungsindex in einer konstanten Tiefe unterhalb der Oberfläche bestimmt (Abb. 26).



**Abb. 26: Der Hautalterungsindex SAAID in allen 3 Altersgruppen in Abhängigkeit der Messtiefe. Die signifikantesten Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden in einer Tiefe von 150  $\mu\text{m}$  unterhalb der Oberfläche sichtbar. Diese Tiefe wurde aufgrund des ausreichenden Abstandes zum SHG Peak und zur maximalen Fokustiefe des Lasers gewählt (Kaatz et al. 2010).**

## **5.7 Ergebnisse der Messungen mittels PRIMOS**

Mithilfe des optischen 3 D Messgerätes wurde bei allen 30 Probanden sowohl die mittlere als auch die maximale Faltentiefe der Haut an 3 Testfeldern (UA innen, UA außen und Handrücken) ermittelt. Pro Testfeld ergaben sich jeweils drei Werte für maximale als auch mittlere Faltentiefe. Diese Ergebnisse wurden in Excel 11.6 SP 2 importiert und pro Testfeld jeweils der Median der drei Werte ermittelt. Diese Daten konnten anschließend für Signifikanztests, die mittels SPSS 13.0 durchgeführt wurden, genutzt werden.

Getestet wurden zum einen die Testfelder gegeneinander, d.h. UA innen gegen UA außen, UA außen gegen Handrücken und UA innen gegen Handrücken. Verwendung fand diesbezüglich der Wilcoxon Test für abhängige Stichproben. Dieses Verfahren wurde sowohl für die mittlere als auch maximale Faltentiefe genutzt.

Im Anschluss erfolgte die Testung der einzelnen Altersgruppen gegeneinander auf signifikante Unterschiede in mittlerer und maximaler Faltentiefe. Dazu wurde Altersgruppe 1 (jung) gegen Gruppe 2 (mittelalt), Gruppe 1 (jung) gegen 3 (alt) und schließlich 2 (mittelalt) gegen 3 (alt) mithilfe des Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben auf signifikante Unterschiede bzgl. mittlerer und maximaler Faltentiefe getestet.

Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests mit  $\alpha < 0,05$  festgelegt.

### **5.7.1 Vergleich der 3 Testfelder**

Beim Vergleich der 3 Testfelder gegeneinander zeigt sich lediglich eine Signifikanz bezüglich der maximalen Faltentiefe beim Vergleich zwischen Unterarm innen und Handrücken (Tab. 5). Die maximale Faltentiefe ist an der Unterarminnenseite signifikant geringer als auf dem Handrücken. Dieses Ergebnis ist unabhängig vom Alter des Probanden.

**Tab. 5: Ergebnisse des Testens der 3 unterschiedlichen Testfelder gegeneinander**

Lokalisationen gegeneinander	MW Faltentiefe			Max Faltentiefe		
		UA i vs UA a	UA a vs HR	UA i vs HR	UA i vs UA a	UA a vs HR
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,7611	0,6408	0,3572	0,4016	0,2599	0,0244

**Legende:** **gelb** = signifikanter Unterschied bzgl. der maximalen Faltentiefe (Max Faltentiefe) zwischen Unterarm innen (UA i) und Handrücken (HR), da  $\alpha < 0,05$ , MW Faltentiefe = mittlere Faltentiefe, UA a = Unterarm außen, vs = versus

### 5.7.2 Vergleich der Altersgruppen

Beim Vergleich der Altersgruppen untereinander finden sich auf keinem der drei Testfelder weder bzgl. der mittleren noch der maximalen Faltentiefe signifikante Unterschiede. Ein Trend zeichnet sich beim Vergleich der Altersgruppen 1 und 2 (Tab. 6) bzgl. der mittleren Faltentiefe am Unterarm außen ab: Anzunehmen ist eine geringere mittlere Faltentiefe bei jungen Probanden gegenüber den Testpersonen mittleren Alters. Beim Vergleich der maximalen Faltentiefe am Handrücken zwischen Gruppe 1 und 3 (Tab. 7) ist ebenfalls eine Tendenz dahingehend erkennbar, dass bei junger Haut die maximale Faltentiefe am Handrücken geringere Werte annimmt als bei alter Haut. Diese beiden Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant. Beim Testen von mittelalter gegen alte Haut (Tab. 8) zeigen sich weder in mittlerer noch in maximaler Faltentiefe Tendenzen oder eine Signifikanz in einem der drei Testfelder, da  $\alpha$  erheblich über dem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 liegt.

**Tab. 6: Ergebnisse des Testens zwischen jungen (Altersgruppe 1) und mittelalten Probanden (Altersgruppe 2)**

Altersgruppe 1 vs 2	MW Faltentiefe			Max Faltentiefe		
	UA außen	UA innen	Handrücken	UA außen	UA innen	Handrücken
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,0630	0,3930	0,2475	0,2176	0,2888	0,1051

**Legende:** Tendenz dahingehend, dass am Unterarm außen (UA außen) die mittlere Faltentiefe in Altersgruppe 1 (MW Faltentiefe) geringer ist als in Altersgruppe 2, jedoch kein signifikanter Unterschied nachweisbar, da  $\alpha > 0,05$ , Max Faltentiefe = maximale Faltentiefe, vs = versus

**Tab. 7: Ergebnisse des Testens zwischen jungen (Altersgruppe 1) und alten Probanden (Altersgruppe 3)**

Altersgruppe 1 vs 3	MW Faltentiefe			Max Faltentiefe		
	UA außen	UA innen	Handrücken	UA außen	UA innen	Handrücken
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,9118	0,3150	0,6305	0,5787	0,2799	0,0524

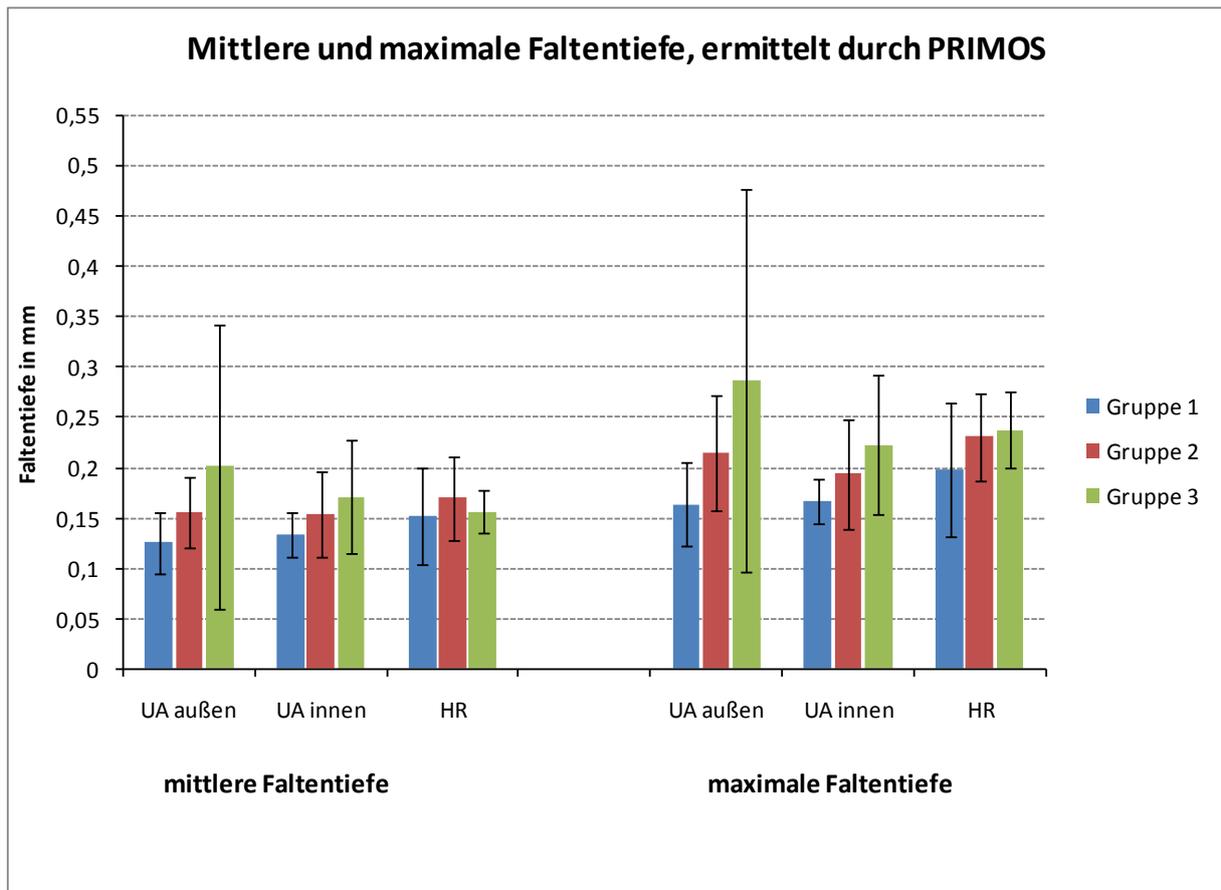
**Legende:** Tendenz dahingehend, dass am Handrücken die maximale Faltentiefe (Max Faltentiefe) in Altersgruppe 1 geringer ist als in Altersgruppe 3, jedoch kein signifikanter Unterschied nachweisbar, da  $\alpha > 0,05$ , MW Faltentiefe = mittlere Faltentiefe, UA = Unterarm, vs = versus

**Tab. 8: Ergebnisse des Testens zwischen mittelalten (Altersgruppe 2) und alten Probanden (Altersgruppe 3)**

Altersgruppe 2 vs 3	MW Faltentiefe			Max Faltentiefe		
	UA außen	UA innen	Handrücken	UA außen	UA innen	Handrücken
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,1051	0,6450	0,4040	0,8109	0,4937	0,9275

Legende: MW Faltentiefe = mittlere Faltentiefe, Max Faltentiefe = maximale Faltentiefe, UA = Unterarm, vs = versus

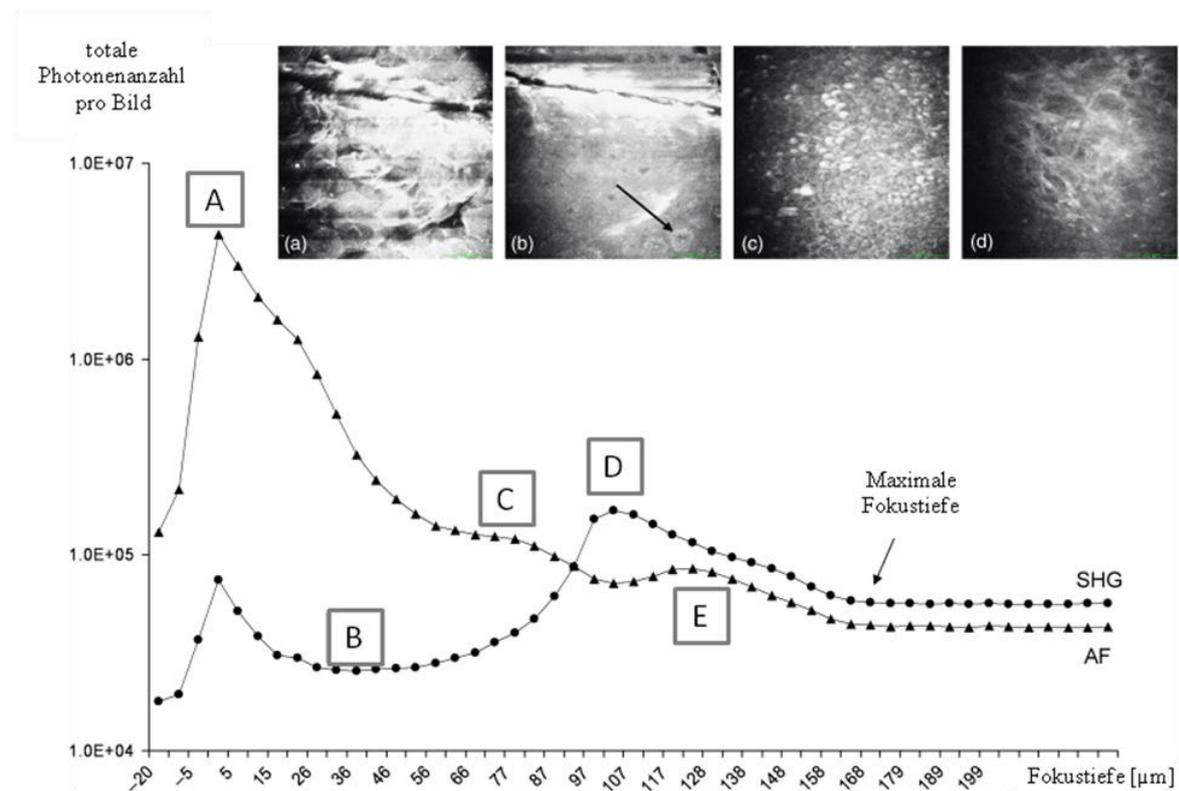
Die folgende Abbildung (Abb. 27) stellt die Ergebnisse der Messungen mittels PRIMOS grafisch dar. Zum Teil ergaben sich relativ große Messunterschiede sowohl interindividuell unter den Probanden einer Gruppe, als auch zwischen den drei Altersgruppen. In der statistischen Auswertung resultierten insbesondere im Testfeld UA außen hohe Standardabweichungen, sodass signifikante Differenzen bzgl. der Hautfältelung zwischen einzelnen Testfeldern und verschiedenen Altersgruppen durch die Messung mittels PRIMOS nicht nachweisbar waren.



**Abb. 27:** Grafische Darstellung der mittels PRIMOS gemessenen mittleren und maximalen Faltentiefe auf den bekannten Testfeldern. Die farblich verschieden dargestellten Gruppen repräsentieren die 3 unterschiedlichen Altersklassen: Gruppe 1 = junge Haut, Gruppe 2 = mittelalte Haut, Gruppe 3 = alte Haut.

## 6 Diskussion

### 6.1 Interpretation der Emissionscharakteristika im AF und SHG Kurvenverlauf in Abhängigkeit von der Hauttiefe und dem Lebensalter



**Abb. 28:** Typische Emissionskurve eines Probanden der Altersgruppe 3 mit Verknüpfung der Peaks zu bestimmten Hautschichten (Koehler et al. 2010).

Wie bereits im Kapitel Ergebnisse beschrieben, lassen sich die Peaks und Minima der beiden Kurven anhand spezifischer Fluorophore bestimmten Hautschichten zuordnen (Abb.28). Ein prominenter Peak kann sowohl im AF als auch im SHG Kanal in einer Fokustiefe zwischen 5 und 15 µm relativ zur ersten lebenden Zelle registriert werden und entspricht morphologisch der Hautoberfläche, bestehend aus kernlosen Keratinozyten. Das starke AF Signal (A) erklärt sich durch das ausgeprägte Fluoreszenzvermögen des endogenen Fluorophors Keratin, was im Stratum corneum reichlich vorhanden ist. Der Eingangspeak in der SHG Kurve lässt sich bisher keinem eindeutigen Ursprung zuordnen, da SHG innerhalb der Haut im Wesentlichen

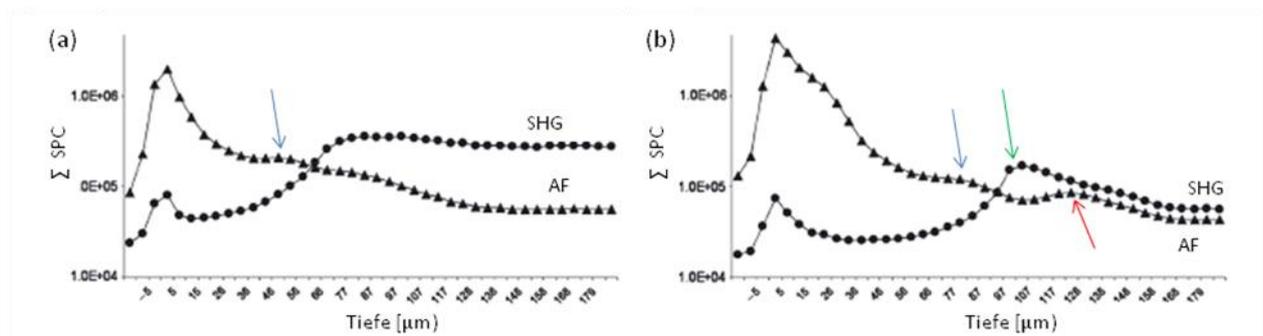
durch Kollagen hervorgerufen wird, das sich in der Epidermis jedoch nicht nachweisen lässt. Erklärbar wäre dieser Peak einerseits z.B. durch minimale Oberflächenreflexionen oder andererseits Harnstoff, der innerhalb der Epidermis im Harnstoffzyklus aus stickstoffhaltigen Abbauprodukten synthetisiert wird (Tabachnick und LaBadie 1970). Als nicht-zentrosymmetrisches Molekül vermag Harnstoff ein SHG-Signal zu generieren. Aufgrund der Synthese dieser Substanz innerhalb der Epidermis wird auch in den tieferen Schichten der Oberhaut ein schwaches, konstantes SHG Signal registriert (B).

Nach dem Eingangspeak im AF-Kanal zeigt sich ein steiler Abfall der Kurve, der in eine weitere Erhebung innerhalb der Kurve mündet (C). Diese leichte Wölbung wird offenbar durch fluoreszierendes Melanin im Stratum basale verursacht, da die verwendete Anregungswellenlänge von 800 nm das Hautpigment optimal zur Fluoreszenz anzuregen vermag (Dimitrow et al. 2009b). NAD(P)H, welches vornehmlich die fluoreszierenden Eigenschaften des Stratum granulosum und spinosum bedingt, liefert die stärksten Signale bei einer Anregungswellenlänge von 760 nm, die in dieser Studie nur zur Aufnahme morphologischer Bilder am Laser eingestellt wurde. Die Wellenlänge  $\lambda=800$  nm wurde für die Stapelmessungen gewählt, da bei dieser Wellenlänge eine maximale SHG Intensität des dermalen Kollagens erreicht werden kann und auch elastische Fasern optimal erfassbar sind. Somit ergibt sich innerhalb eines Stapels, der bei  $\lambda=800$  nm generiert wurde, kein verstärktes Fluoreszenzsignal im Sinne einer Kurvenwölbung oder eines Peaks für NAD(P)H (B).

Nach diesem Melaninpeak in der AF-Kurve zeigt sich ein steiler Anstieg in der SHG-Kurve, der auf einen Höhepunkt in einer Tiefe von etwa 100  $\mu\text{m}$  hinausläuft (D). Nach Erreichen dieses Maximums fällt die Kurve bis zur maximalen Fokustiefe des MLT kontinuierlich ab (Abb. 28 und 29 b). Dieser Kurvenverlauf ist charakteristisch für die Haut eines Probanden in hohem Lebensalter und spiegelt den reduzierten Gehalt an dermalem Kollagen wider, was hauptsächlich durch eine UV bedingte Induktion von Matrixmetalloproteinasen erklärt werden kann (Koehler et al. 2006). Der SHG Peak in gealterter Haut lässt sich durch einen noch relativ hohen Gehalt an Kollagenfasern im Bereich der papillären Dermis begründen. Diesen schmalen Kollagenstreifen bezeichnet man als Grenzzone, dessen Dicke z.B. als Parameter für die Effizienz von Antiaging Wirkstoffen genutzt werden kann. Der Begriff Grenzzone wurde durch Lavker bereits 1979 geprägt. Lavker untersuchte die Zusammensetzung der Epidermis, dermoepidermalen Junctionszone sowie der papillären Dermis mittels Elektronenmikroskopie bei jungen und alten Probanden sowohl an der Oberarminnenseite (nicht lichtexpo-

niert) als auch am dorsalen Unterarm (lichtexponiert) anhand von Biopsien. Während beim alten Probanden in der nicht lichtexponierten papillären Dermis eine deutliche Ablagerung elastotischen Materials nachgewiesen werden konnte, fand sich am lichtexponierten Unterarm des alten Probanden innerhalb der papillären Dermis ein Arrangement aus dicht gepackten kollinear angeordneten kollagenen Fasern (Lavker 1979). Auch mittels konventioneller Lichtmikroskopie kann nach HE-Färbung in lichtgeschädigter, alter Haut die Grenzzone dargestellt werden: Sie lässt sich als schmaler, eosinophiler Streifen zwischen Epidermis und der durch solare Elastose bläulich imponierenden übrigen Dermis abgrenzen (vgl. 5.1.2 Gesunde Altershaut, Abb. 15).

Unterhalb der Grenzzone nimmt der Kollagengehalt bei einem alten Menschen rapide und kontinuierlich ab, während die junge Haut nach Erreichen der maximalen Signalintensität dieses Niveau auch mit zunehmender Tiefe konstant hält (Abb. 29 a). Dieser Sachverhalt erklärt sich in einem insgesamt höheren Gehalt an vornehmlich Kollagen 1 und einer gleichmäßigen Verteilung kollagener Fasern innerhalb der gesamten Dermis in junger Haut.



**Abb. 29: SHG und AF Signal in unterschiedlichen Tiefen bei (a) einem jungen Probanden und (b) einem alten Probanden. Charakteristische Unterschiede hinsichtlich des Kurvenverlaufs und der Emissionspeaks werden deutlich (Kaatz et al. 2010).**

Auch die Struktur des Kollagens weist deutliche Unterschiede beim Vergleich von junger und alter Haut auf: Das amorphe Erscheinungsbild der Kollagenfasern in junger Haut, womöglich begründet durch die kompakte und dichte Anordnung der Faserbündel, wird in gealterter Haut durch ein filiformes Arrangement von Kollagenfasern abgelöst, was als Zeichen einer verdünnten Matrix infolge eines Kollagenschwunds angesehen werden kann (Koehler et al. 2008).

Ein weiterer Peak zeigt sich bei Studienteilnehmern der Altersgruppe 3 in der AF-Kurve innerhalb der Dermis (E). Dieses auffällige Fluoreszenzsignal, welches sich bei jungen Probanden nicht nachweisen lässt, ist am ehesten durch eine Akkumulation minderwertigen, elastischen Materials in sonnenexponierter, alter Haut zu erklären (El-Domyati et al. 2002). Das als solare Elastose bezeichnete Phänomen kann als morphologisches Korrelat der chronisch lichtbedingten Hautschädigung und damit der extrinsischen Hautalterung aufgefasst werden (Bernstein et al. 1994, Koehler et al. 2009). Montagna et al. beschrieben bereits 1989 eine Anhäufung elastischen Materials sowie morphologische Veränderungen elastischer Fasern innerhalb der Dermis anhand von Biopsien aus sonnenexponierter Haut der Wange (Montagna et al. 1989). Die genannten Veränderungen werden höchstwahrscheinlich durch den direkten Einfluss von UV-Strahlen auf die Synthese von elastischen Fasern hervorgerufen, können aber auch Folge einer erhöhten MMP-Aktivität und damit einer Zerstörung des elastischen Fasernetzwerkes sein (Koehler et al. 2006, Krutmann 2003). Eine erhöhte Expression von MMP wird zum einen direkt durch die Einwirkung von UV Strahlung getriggert. Die Expression der MMP 1 und 3 scheint aber vor allem durch die Einwirkung von Sauerstoffradikalen in Verbindung mit UVB Strahlung vermittelt zu sein. Desweiteren sind reaktive Sauerstoffspezies in der Lage, direkt die Expression von Tropo-Elastin-mRNS anzuregen und damit einen wesentlichen Beitrag zur solaren Elastogenese zu leisten (Krutmann 2003).

Aus einer Literaturstudie von Sellheyer et al. geht hervor, dass für die Pathogenese der solaren Elastose v.a. die de novo Synthese elastotischen Materials - bestehend aus Elastin, Glykosaminoglykanen und Fibrillin - verantwortlich ist, ein gesteigerter Abbau elastischer Fasern aber ebenfalls eine wichtige Rolle spielt (Sellheyer 2003).

Da Elastin als endogenes Fluorophor bei 800 nm optimal angeregt wird und bei alten Probanden eine deutliche Vermehrung von Elastinfasern vorliegt, ergibt sich in Altersgruppe 3 im Vergleich zu jungen Probanden intradermal ein durch die Hautalterung bedingtes stärkeres Fluoreszenzsignal in Form des beschriebenen Peaks (E).

## 6.2 Interpretation und Vergleich des SAAID Kurvenverlaufs bei jungen und alten Probanden

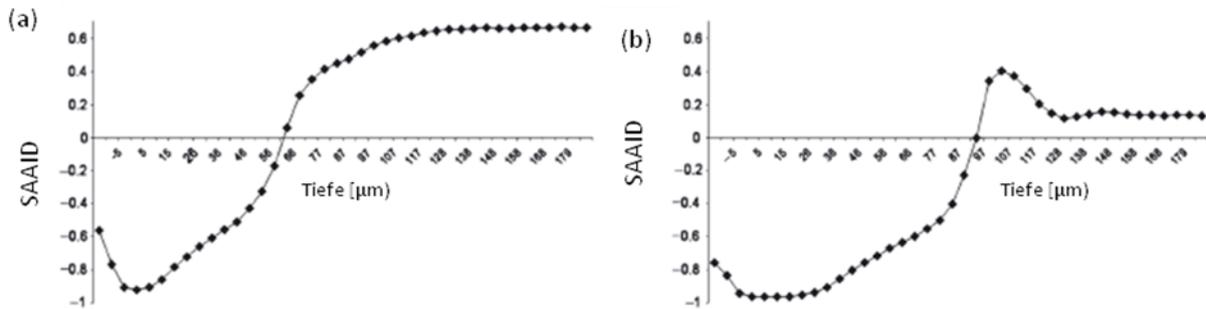


Abb. 30: Vergleich des SAAID Kurvenverlaufs in Abhängigkeit der Hauttiefe zwischen einem jungen Probanden (a) und einem alten Probanden (b) (Kaatz et al. 2010).

Koehler et al. konnten einen signifikanten Abfall des SAAID mit zunehmendem Lebensalter nachweisen. In dieser Arbeit wurden 18 Patienten von 21 bis 84 Jahre einer Messung am Multiphotonenlasertomographen unterzogen. Fünf Messpunkte im Bereich der Innenseite des Unterarms wurden ausgewählt. Anschließend erfolgte in einer definierten Tiefe von  $z=110\ \mu\text{m}$  unterhalb der Basalmembran die Anregung dermalen Fasern mit einer Wellenlänge von  $\lambda=820\ \text{nm}$ . Unter Verwendung unterschiedlicher Filter wurden sowohl ein SHG als auch ein AF Signal registriert. Nach Export der Daten erfolgte die Berechnung des Hautalterungsindex SAAID, wobei sich deutlich niedrigere Werte bei älteren Studienteilnehmern im Vergleich zu jüngeren Probanden ergaben (Koehler et al. 2006). Im Gegensatz zu den Messungen dieser Studiengruppe, die den Hautalterungsindex in einer definierten Tiefe bestimmten, wurde in dieser Studie der SAAID in unterschiedlichen Hauttiefen berechnet und graphisch ausgewertet, wobei sich charakteristische Kurvenverläufe für junge und alte Probanden ergaben (Abb. 30). Während in Altersgruppe 1 der SAAID mit zunehmender Hauteindringtiefe bis auf ein Maximum ansteigt und ein konstantes Niveau beibehält, steigt der SAAID bei alten Probanden zwar zunächst ebenfalls bis zum Erreichen eines Maximalwerts, fällt im weiteren Kurvenverlauf jedoch stark ab und sichtet auf diesem Level, bis die maximale Fokustiefe erreicht ist.

Die starke Abnahme des SAAID kann mithilfe der massiven Vermehrung elastischen Materials bei gleichzeitiger Abnahme des Kollagengehalts unterhalb der papillären Dermis begründet werden. Dieser Sachverhalt spiegelt sich in höheren AF Werten aufgrund der solaren Elastose und niedrigeren SHG Werten infolge der Reduktion des Kollagens wider und resultiert entsprechend der SAAID-Berechnung in einem geringeren Hautalterungsindex bei alten Studienteilnehmern.

Die Hauttiefe, in der bei alten Probanden der SAAID Peak registriert werden kann, korrespondiert mit der papillären Dermis. Diesen Bereich bezeichnet man als sogenannte Grenzzone: Zwischen elastischen Mikrofibrillen befinden sich hier dicht gepackte, ko-lineare und parallel zur Hautoberfläche angeordnete Kollagenfasern, die in einer Studie von Lavker et al. 1979 elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden (Lavker 1979). Durch immunhistochemische Methoden unter Verwendung spezifischer Antikörper konnten die Hauptbestandteile der Grenzzone, Kollagen 1 und 3, identifiziert werden (El-Domyati et al. 2002). Auch mittels konventioneller Lichtmikroskopie lässt sich nach HE-Färbung ein schmaler, eosinophiler Streifen zwischen Epidermis und der durch solare Elastose bläulich imponierenden übrigen Dermis abgrenzen (vgl. 5.1.2 Gesunde Altershaut, Abb. 15).

Mithilfe der Multiphotonenlasertomografie konnte im Bereich der Grenzzone (papilläre Dermis) ein hoher Kollagengehalt durch ein starkes SHG Signal nachgewiesen werden. Zusammen mit einem niedrigen AF Wert mangels elastischer Fasern in diesem Areal führt die Berechnung des Hautalterungsindex zu höheren Werten im Vergleich zur retikulären Dermis und im Diagramm zu dem charakteristischen SAAID Peak bei alten Probanden.

### **6.2.1 Ursachen und Biologie der Kollagenablagerung im Str. papillare der Dermis in alter Haut**

Eine verstärkte Kollagenablagerung in der Grenzzone wurde in mehreren Studien belegt und ließ sich vor allem in sonnenexponierter und UV-geschädigter Haut des älteren Menschen beobachten: Lavker et al. untersuchten u.a. die Struktur der papillären Dermis sowohl am UA innen (lichtgeschütztes Hautareal) und am UA außen (lichtexponiertes Hautareal). Während sich am Unterarm innen bei alter Haut im Vergleich zu junger Haut lediglich eine starke Vermehrung elastischer Mikrofibrillen zeigt, konnte in der sonnenexponierten, alten Haut ein

etwa 1 µm dickes Band aus kolinear angeordneten Kollagenfibrillen nachgewiesen werden, die an dieser Stelle die elastischen Mikrofibrillen ersetzen. Auffällig erschien auch das parallele Arrangement der Kollagenfasern, das in ähnlicher Art auch im Narbengewebe beobachtet werden kann (Lavker 1979). Die Grenzzone entspricht somit einer Mikronarbe innerhalb der papillären Dermis und tritt in lichtgeschädigter, alter Haut auf.

Weiterhin konnte eine signifikant höhere Anzahl an Typ 1 Prokollagen exprimierenden Fibroblasten an lichtexponierten Stellen bei alten Menschen nachgewiesen werden. Neben der Vermehrung der Fibroblasten zeigte sich eine erhöhte Produktion von Prokollagen 1 im Vergleich zu sonnengeschützten Hautstellen innerhalb der gleichen Altersgruppe (Chung et al. 2001). Chronische UV Belastung führt zur Stimulation der Kollagensynthese in lichtgeschädigter Haut und zu den geschilderten strukturellen Veränderungen im Bereich der papillären Dermis. Verglichen mit intrinsisch gealterter Haut ist der Kollagenabbau innerhalb der gesamten Dermis u.a. durch eine Hemmung der Pro-Kollagen-1 Synthese in Fibroblasten und eine vermehrte Aktivität von Matrixmetalloproteinasen jedoch gesteigert (Krutmann 2003).

Die Grenzzonendicke kann klinisch als Maß für die Effektivität einer hautverjüngenden bzw. -reparierenden Therapie bei chronischen Lichtschäden herangezogen werden. Eine signifikante Kollagenvermehrung innerhalb der Grenzzone nach Dermabrasio im Gesichtsbereich konnte histologisch und immunhistologisch in einer Studie von Nelson et al. nachgewiesen werden (Nelson et al. 1994). Zudem belegten Seite et al. in einer 2005 durchgeführten Studie die Wirksamkeit einer Retinol-Vitamin C Kombination u.a. histologisch anhand einer verbreiterten Grenzzone (Seité et al. 2005).

Die gesteigerte Kollagensynthese im Bereich der papillären Dermis lichtgeschädigter, reifer Haut stellt somit einen Ansatz zur Reparatur UV-bedingter Schäden dar. Durch eine Verbreiterung der Grenzzone wird vermutlich eine stärkere Absorption der schädlichen Strahlen erreicht und damit das Ausmaß des Kollagenabbaus in tieferen dermalen Schichten begrenzt. Die genauen Ursachen und der Sinn der Kollagenvermehrung im Bereich der Grenzzone bleiben Gegenstand der Forschung.

### **6.3 Der SAAID in Abhängigkeit von der Messtiefe**

In der vorliegenden Studie konnte die Abhängigkeit des SAAID von der Messtiefe gezeigt werden. Die beste Abgrenzung der Unterschiede zwischen den Altersgruppen gelingt, wenn man so tief wie möglich innerhalb der Dermis zwischen dem SHG Peak und der maximalen Fokustiefe misst. Noch deutlicher werden die Unterschiede zwischen junger und alter Haut bei mehreren Messungen innerhalb des Testfeldes in gleicher Tiefe und anschließender Mittelung der Ergebnisse. Bei Bestimmung des SAAID am SHG Peak in der papillären Dermis zeigte sich zwischen junger und mittelalter Haut kein signifikanter Unterschied, zwischen mittelalten und alten Probanden konnte eine Signifikanz hinsichtlich des Hautalterungsindex festgestellt werden, allerdings war der p-Wert im Vergleich zu den Messungen in tieferen dermalen Schichten deutlich höher. Die beschriebenen Signifikanzunterschiede können mit der Existenz der kollagenreichen Grenzzone auf dem Niveau des SHG Peaks in lichtexponierter, gealterter Haut begründet werden. Aufgrund höherer SHG Werte infolge der Kollagenablagerung und niedrigerer AF Werte mangels Elastin in diesem Bereich ergibt sich nach Einsetzen der beiden Parameter in die SAAID Formel auch ein höherer Wert im Hautalterungsindex im Vergleich zu tieferen dermalen Schichten. Um zuverlässige und aussagekräftige SAAID Werte zu erhalten, sollte demzufolge möglichst tief unterhalb des SHG Peaks gemessen werden.

### **6.4 Beurteilung der Hautfaltenmessung mittels PRIMOS**

In diesem Teil der Studie bestand die Fragestellung darin, ob Unterschiede bezüglich der mittleren und maximalen Faltentiefe sowohl zwischen den verschiedenen Testfeldern als auch zwischen den einzelnen Altersgruppen mittels Streifenprojektion nachweisbar sind. Das Ausmaß der Hautfältelung nimmt mit steigendem Lebensalter zu und kann mit einer Versteifung des Stratum corneums und einer abnehmenden mechanischen Stabilität und Dehnbarkeit aufgrund des dermalen Kollagenschwunds begründet werden (Batisse et al. 2002).

In einer Studie von Lavker et al. wurde das Oberflächenprofil der Haut bei jungen und alten Probanden an verschiedenen lichtexponierten Lokalisationen, u.a. am Handrücken, am dorsalen Unterarm, im Gesicht sowie an nicht exponierten Arealen (Gesäß, Abdomen, Oberarm

innen) untersucht. Während sich an den lichtgeschützten Hautstellen zwischen junger und alter Haut nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Oberflächenstruktur nachweisen ließen, zeigte die bei junger Haut vorhandene geordnete geometrische Oberflächenstruktur im Bereich der lichtexponierten Hautlokalisationen (Unterarm dorsal, Gesicht und Handrücken) z.T. erhebliche Veränderungen. Am Handrücken wurde eine Auslöschung des in junger Haut vorhandenen geordneten „Honigwabenmusters“ mit flacheren, aber tieferen Falten beobachtet. Auch im Gesicht ließ sich ein ungeordnetes Oberflächenprofil mit irregulär und diskontinuierlich angeordneten Falten nachweisen. Lavker begründet die Unterschiede in der Oberflächenstruktur zwischen junger und alter Haut mit den dermalen Veränderungen, die im Zuge der Hautalterung auftreten und infolge chronischer UV Belastung verstärkt werden. Das unterschiedliche Ausmaß der Veränderungen beim Vergleich lichtexponierter Areale scheint dabei Ausdruck einer unterschiedlich starken UV Belastung zu sein (Lavker et al. 1980).

Kligman et al. konnten keine histologischen Unterschiede zwischen der eigentlichen Falte und dem umgebenden Gewebe nachweisen. Sie schlussfolgerten, dass die Faltenbildung infolge mechanischer Beanspruchung in elastizitätsgeminderter, alter Haut generell eintritt, in lichtgeschädigten Arealen, wie z.B. am Handrücken verstärkt stattfindet und die tiefsten Falten im Gesicht auftreten. Da die Haut des Gesichts im Vergleich zu anderen Körperregionen beständig der UV Strahlung ausgesetzt ist, wird der Umbau des elastischen Fasernetzwerkes beschleunigt. Aufgrund der hohen mechanischen Belastung der Gesichtshaut im Sinne von Kontraktionen der mimischen Muskulatur z.B. beim Öffnen und Schließen des Mundes resultiert in besonderem Maße eine persistierende Faltenbildung bei vorhandenem dermalen Elastizitätsverlust in der Haut des alten Menschen (Kligmann et al. 1985).

Mithilfe des PRIMOS ließ sich die Hypothese, dass die Faltenbildung mit steigendem Lebensalter zunimmt, jedoch nicht erhärten. Sowohl bei Vergleich der Altersgruppen 1 und 2, 1 und 3 als auch 2 und 3 waren in keinem der drei Testfelder signifikante Unterschiede hinsichtlich maximaler bzw. mittlerer Faltentiefe nachweisbar. Allerdings war ein klarer Trend dahingehend erkennbar, dass bei jungen Probanden die maximale Faltentiefe am Handrücken geringer ist als bei alten Studienteilnehmern. Bei Vergleich der Gruppe 1 (junge Probanden) mit Gruppe 2 (Probanden mittleren Alters) wurde eine Signifikanz nur knapp verfehlt, was möglicherweise auf eine zu geringe Anzahl an Probanden zurückzuführen ist. Auch klinisch lässt sich bei alten verglichen mit jungen Menschen ein auffällig stärkeres Faltenrelief am Handrücken beobachten. Diese Beobachtung lässt sich zum einen mithilfe des Prozesses der

intrinsischen Hautalterung als auch durch eine zeitlebens starke Exposition gegenüber Licht und chemischen Umwelttoxinen sowie eine verstärkte mechanische Beanspruchung (extrinsische Hautalterung) erklären. Diese Theorie lässt sich auch auf den dorsalen Unterarm übertragen: Hier ergab sich bei Auswertung der PRIMOS Messung ein Trend bezüglich einer geringeren Faltentiefe in Altersgruppe 1 gegenüber Gruppe 2. Signifikante Unterschiede waren hier nicht messbar.

Ursächliche Faktoren für fehlende signifikante Unterschiede bzgl. der Faltentiefe zwischen den Testfeldern und den Altersgruppen können auch im Messvorgang begründet sein. Die PRIMOS-Messung erfordert zur optimalen Vergleichbarkeit der Ergebnisse jeweils ähnliche Lichtverhältnisse. Zwar zeigt ein grün erscheinendes Signal auf dem Bildschirm die Bereitschaft des Gerätes zur Messung an, eine hundertprozentige Übereinstimmung hinsichtlich der Helligkeit zu vorhergehenden oder nachfolgenden Messungen kann jedoch nicht erreicht werden.

Schwierigkeiten treten auch bei Messungen auf unebenen Körperstellen, wie z.B. dem Handrücken, auf: Zur Fokussierung des Testfeldes wird ein Fadenkreuz auf das jeweilige Hautareal projiziert. Ein eingblendetes Fadenkreuz ist auf dem Monitor erkennbar. Ziel ist es, beide Fadenkreuze in Übereinstimmung zu bringen. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Messoberfläche parallel zum Aufnahmefeld positioniert ist, was auf ebenen Körperstellen, wie z.B. am Unterarm innen leicht erreicht werden kann (GF Messtechnik und GmbH). Weist die Hautoberfläche des Testfeldes Unebenheiten auf, z.B. durch hervorstehende Knochen oder Sehnen am Handrücken, oder ist schräg zur Kamera ausgerichtet (verkippt), können die beiden Fadenkreuze nicht exakt in Einklang gebracht werden. Besonders im Randbereich des ausgewählten Testfelds werden einige Stellen unscharf abgebildet, was die exakte Auswertung erschwert. Eine weitere Ursache für Messfehler könnte im individuellen Behaarungsmuster der Probanden begründet sein. Dies sollte v.a. bei Messungen am Unterarm außen berücksichtigt werden. Zwar wurde vor der Messung das ausgewählte Testfeld sorgfältig rasiert - kleine, auf dem Testfeld verbliebene „Haarstoppel“ könnten aber insbesondere bei sehr behaarten, männlichen Probanden zu stärkeren Unebenheiten der Hautoberfläche im Vergleich zu weniger behaarten Testpersonen geführt haben. Unter Berücksichtigung dieses Aspektes lassen sich möglicherweise die hohen Standardabweichungen im Testfeld UA außen erklären.

## 6.5 Vorteile der Multiphotonenlasertomographie

Die Multiphotonenlasertomographie bietet als nichtinvasives, schmerzfreies, bildgebendes Verfahren vielversprechende Möglichkeiten im Bereich der Dermatologie. Die Morphologie einzelner Hautschichten, Zellen sowie subzellulärer Strukturen kann anhand der Detektion fluoreszierender, endogener Biomoleküle *in vivo* betrachtet und analysiert werden (König et al. 2008). Die Eindringtiefe des Lasers bis in eine Tiefe von ca. 200  $\mu\text{m}$  erlaubt darüber hinaus die Darstellung von Kollagen- und Elastinfasern sowie deren semiquantitative Bestimmung in der Dermis. Die selektive Abbildung der genannten Fasersysteme gelingt durch die Verwendung unterschiedlicher Filtersysteme, sodass das Autofluoreszenzsignal des Elastins und das SHG -Signal des Kollagens jeweils separat von den Detektoren erfasst werden können. Das Prinzip der MLT beruht auf der Stimulation endogener Fluorophore – eine exogene Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen ist nicht notwendig.

Das Verfahren ist bei Verwendung der üblichen Leistungsparameter ausgesprochen nebenwirkungsarm. So wurden in einer Studie von Fischer et al. die Risiken der Laserstrahlung in Hinblick auf Zellschädigungen untersucht. Biopsien wurden nach Bestrahlung mit UV- bzw. Laserstrahlung mit fluoreszenzmarkierten CPD (cyclobutane-pyrimidine-dimers) Antikörpern behandelt, die Zellschäden auf DNA Ebene sichtbar machen. Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei hohen Laserleistungen, die unter normalen Bedingungen nicht zur Anwendung kommen, die Folgen der NIR Strahlen für die Haut in etwa den schädigenden Effekten durch die tägliche UV-Belastung entsprechen (Fischer et al. 2008). Für die verwendete Laserleistung von 50 mW lagen die Veränderungen deutlich darunter.

Desweiteren finden sich im Wellenlängenbereich der NIR-Strahlung nur wenige endogene Absorber innerhalb der Haut, wodurch zum einen die relativ hohe Eindringtiefe des Lasers erklärt werden kann (König 2000), zum anderen hautschädigende Effekte weitgehend vermieden werden (Xu et al. 1996).

Durch die Anregung von Strukturen im Femtolitervolumen-Bereich wird die Laserstrahlung im Unterschied zur konfokalen Laserscanningmikroskopie (CLSM) extrem fokussiert, sodass eine Strahlenbelastung außerhalb des Fokus vermieden wird (Helmchen und Denk 2005). Das Risiko von Nebenwirkungen durch die Laserstrahlung ist somit als gering einzustufen.

Ein weiterer Vorteil der minimalen Anregungsvolumina ergibt sich aus der Reduktion von Streueffekten in biologischem Gewebe. Aufgrund der Verringerung dieses unerwünschten Phänomens wird eine hochauflösende Bildgebung (horizontal  $< 1\ \mu\text{m}$ , vertikal  $< 2\ \mu\text{m}$ ) in Hauttiefen bis etwa  $200\ \mu\text{m}$  ermöglicht (Helmchen und Denk 2005, Dimitrow et al. 2009a).

Durch die zusätzliche Verwendung eines flexiblen Schwenkarms können zudem auch topographisch anspruchsvolle Regionen, wie z.B. Stirn oder Schläfe untersucht werden. Darüber hinaus ermöglicht dieser technische Fortschritt eine bequemere Lagerung für den Probanden, da das Messfeld nicht mehr horizontal zum Objektiv ausgerichtet sein muss.

Innerhalb der Studie gelang eine exakte Bestimmung der Epidermisdicke, die für das Monitoring zahlreicher Dermatosen und ihrer Therapien genutzt werden kann. Gleichzeitig bildet Sie die Voraussetzung für eine Einschätzung der Wirksamkeit und des Schädigungspotentials extern auf die Haut einwirkender Substanzen und physikalischer Einflüsse.

## **6.6 Nachteile der Multiphotonenlasertomographie**

Während der Untersuchungen offenbarten sich einige Nachteile des Multiphotonenlasers DermaInspect. Physikalisch bedingt erfordern die Messungen bisher noch einen hohen Zeitaufwand. Korrekte Lagerung des Patienten, Rasur behaarter Messfelder, exakte Positionierung des Koppelstückes und Einstellung der „ersten lebenden Zelle“ auf dem Monitor sowie die morphologische Darstellung der einzelnen Hautschichten und die abschließenden drei Stapelmessungen erforderten insgesamt einen nicht unerheblichen Zeitrahmen von etwa 2,5 h. In einigen Fällen gestaltete sich die Lagerung des Probanden schwierig.

Verwertbare Stapelmessungen und einwandfreie morphologische Aufnahmen erforderten eine nicht flexible, starre Unterlage für den zu messenden Unterarm bzw. die Hand. Andererseits wurde das lange Ausharren auf der Untersuchungsfläche in einer teilweise unbequemen Haltung auf harter Unterlage vom Patienten als unangenehm wahrgenommen. Durch die hohe Auflösung haben bereits kleinere Bewegungen Auswirkungen auf die Bildqualität. Besonders bei älteren Patienten machte sich das lange Ausharren auf der Untersuchungsfläche in Bewegungsartefakten bemerkbar, z. B. durch unwillkürliche Muskelbewegungen oder tiefe Atemexkursionen. Ein Kissen mit Sandfüllung, das sich der Position und den anatomischen Gege-

benheiten des Probanden anpasst, sollte den langen Messvorgang für den Probanden angenehmer gestalten, führte allerdings bei einigen Teilnehmern zu minimalen Verlagerungen des Testfeldes, was sich in Verschiebungsartefakten besonders während der Stapelmessungen äußerte.

Die Messungen am Unterarm stellten sich in ihrer Durchführbarkeit als wesentlich einfacher und unkomplizierter im Vergleich zum Handrücken heraus. Während die Haut des Unterarms eine relativ ebene Auflagefläche für das Koppelstück bietet, erwies sich die Positionierung auf der Hand mitunter schwierig, da Knochen und Sehnen das Oberflächenprofil der Hand gestalten. In einigen Fällen musste aufgrund von Artefakten durch oberflächliche pulsierende Gefäße die Lokalisation des Koppelstücks geändert werden. Aufgrund der genannten Einschränkungen im Bereich der Hand konnten am Unterarm bessere morphologische Bilder erzielt werden.

Die bereits erwähnte Eindringtiefe des Lasers von 200  $\mu\text{m}$  ermöglicht die Darstellung von Strukturen bis in die Dermis hinein und stellt gegenüber der Einphotonen-Fluoreszenz-Mikroskopie einen Fortschritt dar. Allerdings lassen sich insbesondere Hauterkrankungen, die mit Verhornung einhergehen, aufgrund der begrenzten Eindringtiefe des Lasers nur eingeschränkt beurteilen. Bei verstärkter Verhornung aktinischer Läsionen gelingt die Darstellung und klinische Beurteilung dermalen Strukturen nicht.

## **6.7 Vorschläge zur Optimierung der Messung mittels MLT**

Aufgrund der genannten Einschränkungen des Verfahrens wurde nach geräte- und messtechnischen Verbesserungsmöglichkeiten gesucht. Die z.T. unbequeme Lagerung des Probanden auf der Untersuchungsfläche begründete sich meist darin, dass der Unterarm bzw. die Hand auf einer unverschieblichen, starren Unterlage fixiert werden musste. Um dieses Problem zu beheben, wurde versuchsweise ein Kissen mit Sandfüllung verwendet, welches sich jedoch aufgrund minimaler Verlagerungen des Testfeldes nicht als optimal herausstellte. Als Alternative sollte bei Folgemessungen über eine Fixation mit einer anpassungsfähigen Lagerung, wie sie etwa bei der Extremitätenruhigstellung Verletzter verwendet wird, nachgedacht werden. Geeignet wäre somit eine Substanz, in die die zu untersuchende Extremität eingebettet wird, die sich aber im Zuge des Messvorgangs nicht verschieben kann.

Desweiteren erwies sich bei einigen Probanden die Untersuchungsfläche als relativ schmal, sodass eine bequeme Lagerung erschwert wurde. Der Arm musste teilweise enganliegend am Rumpf positioniert werden, was zu einer verkrampften Haltung im Bereich des Schultergelenks führte. Unwillkürlichen Bewegungen oder Muskelzuckungen während der Untersuchung können sich als Folge negativ auf die Messergebnisse auswirken. Die Verwendung einer breiteren Auflagefläche mit einer optimalen Positionierung des Probanden kann den Untersuchungsgang wesentlich erleichtern.

Ein weiterer denkbarer, technischer Fortschritt wäre die Minimierung der Auflagefläche des Koppelstücks, um noch kleinere, schwierig zu erreichende Hautareale, beispielsweise am Finger, untersuchen zu können. Das während der Messungen verwendete Koppelstück benötigte eine größere, ebene Auflagefläche. Die Fixierung bereitete bei manchen Probanden bereits am Handrücken Probleme.

Letztendlich sollte der erforderliche Zeitrahmen für eine Messung deutlich reduziert werden, was allerdings nur über eine weitere technische Entwicklung, insbesondere des verwendeten Lasers, zu realisieren ist. Desweiteren beschränkt die auf ca. 200  $\mu\text{m}$  begrenzte Eindringtiefe des Lasers den Einsatz des Systems. Allerdings deutet sich mit der Entwicklung von Minien-doskopen bereits eine Lösung für viele Indikationen an.

## **6.8 Die Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie in Forschung und Praxis**

Die Multiphotonenlasertomographie als nicht invasives, schmerzfreies und hochauflösendes bildgebendes Verfahren wird in Zukunft nicht nur im Forschungsbereich, sondern auch im klinischen Bereich, insbesondere in der Dermatologie und Augenheilkunde, zunehmend an Bedeutung gewinnen.

In aktuellen Studien wurde der Multiphotonenlaser DermaInspect als neues diagnostisches Instrument bei Patienten mit malignem Melanom evaluiert und typische morphologische Veränderungen im Vergleich zu normaler Haut beschrieben (Dimitrow et al. 2009a, Dimitrow et al. 2009b). Andere Untersuchungen von Koehler et al. dienten der Erforschung des intrinsischen und extrinsischen epidermalen und dermalen Hautalterungsprozesses (Koehler et al.

2006, Koehler et al. 2008, Koehler et al. 2009). Blasenbildende Erkrankungen, wie z.B. der Pemphigus vulgaris, lassen sich mithilfe des MLT sehr gut darstellen (Kaatz und König 2010). Die Anwendung des MLT eignet sich auch zur Untersuchung von Patienten mit Psoriasis und anderen entzündlichen Hauterkrankungen (König und Riemann 2003). Neue Perspektiven ergeben sich desweiteren in der Analyse und Beurteilung berufsbedingter, dermatologischer Fragestellungen. Ein Beispiel hierfür stellt das Kontaktekzem der Hände dar. Charakteristische zelluläre Veränderungen, wie Schrumpfungsartefakte und ein Flüssigkeitsinflux in den Interzellularraum konnten im Rahmen einer Studie unter standardisierter Anwendung hautreizender Substanzen beobachtet werden (Kaatz und König 2010). Thermische Veränderungen, wie sie z.B. im Rahmen einer Lasertherapie oder infolge von Verbrennungen der Haut auftreten, lassen sich mittels Multiphotonenlasertomographie feststellen. Aufgrund einer Denaturierung der fibrillären Struktur des Kollagens bei Temperaturen zwischen 57 und 60° C ist hitzegeschädigtes Kollagen nicht mehr in der Lage, SHG zu generieren (Kaatz und König 2010). Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet könnte in Zukunft das Monitoring zahlreicher Therapieeffekte im Rahmen der Behandlung dermatologischer Erkrankungen sein (Kaatz und König 2010).

Auch pharmakokinetische Prozesse, die zelluläre Antwort auf kosmetische und pharmazeutische Produkte sowie das Diffusionsverhalten von Arzneistoffen können durch Zweiphotonenabsorption nachvollzogen werden: Mithilfe des MLT untersuchten König et al. 2006 die Diffusion topisch applizierter Kosmetika durch das Stratum corneum und deren intradermale Akkumulation und beschrieben anschließend die Freisetzung funktionalisierter Nanopartikel in Haarfollikeln und Reteleisten (König et al. 2006, Wang et al. 2010). Auch im Rahmen der Wundheilung wurde u.a. die Aktivität von Fibroblasten und die Kollagenproduktion beobachtet (Wang et al. 2010, Torkian et al. 2004).

Neue Möglichkeiten ergeben sich auch in der Augenheilkunde: Mithilfe der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie lassen sich neben den einzelnen Schichten der Kornea auch kollagene Fasern des Hornhautstromas darstellen. Darüber hinaus können Keratozyten in ihrem physiologischen Milieu in vivo betrachtet und subzelluläre Strukturen, wie z.B. Mitochondrien aufgrund ihres hohen NADPH Gehalts detektiert werden. Klinische Anwendung findet die Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie in der Hornhauttransplantationschirurgie. Implantierte Endothelzellen der Kornea können postoperativ mithilfe von Zweiphotonenprozessen hinsichtlich ihrer Funktionalität kontrolliert werden. Die höhere Auflösung retinaler Zellen und die

Darstellung von Nervenfasern führt zu einer Überlegenheit der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Früherkennung von Netzhauterkrankungen im Vergleich zur Diagnostik mittels OCT (Wang et al. 2010). Therapeutisch wird die Zweiphotonenabsorption nach Katarakt Operationen genutzt: Die Freisetzung zytostatischer Wirkstoffe in der Linse zur Verhinderung einer späteren Trübung kann mithilfe dieser Methode getriggert werden (Kim et al. 2006).

Im Tierexperiment wurden sowohl physiologische Funktionsparameter der Niere als auch die Arzneimittelanflutung in 4 D Darstellung untersucht und somit intrakorporale Bildgebung praktiziert. Zur Untersuchung pathophysiologischer Prozesse an der Niere eignet sich die Multiphotonenlasertomographie hervorragend, da sie die Visualisierung und Quantifizierung dynamischer Prozesse mit hoher Auflösung möglich macht (Kang et al. 2006).

Auch im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen zur Entstehung und Therapie von Tumoren findet die Multiphotonenfluoreszenzbildgebung Anwendung: Die Wirksamkeit antiangiogenetisch wirksamer Medikamente in Tumorgewebe wurde durch Tozer et al. untersucht (Tozer et al. 2005). Die potenzielle klinische Anwendung dieser modernen Bildgebung bei Gliomoperationen propagierte Leppert nach Durchführung einer experimentellen Studie zur Unterscheidung zwischen Tumor- und normalem Nervenzellgewebe mittels Multiphotonenmikroskopie (Leppert et al. 2006).

Die genannten Beispiele repräsentieren nur eine kleine Auswahl zahlreicher Forschungsmöglichkeiten, die sich in der Medizin durch die Multiphotonenmikroskopie und –lasertomographie ergeben. Aufgrund zahlreicher Vorzüge gegenüber klassischen mikroskopischen Verfahren, wie z.B. einer höheren subzellulären Auflösung, der Darstellung von Strukturen in ihrer physiologischen Umgebung und der relativ großen Eindringtiefe ins Gewebe wird sich diese Technologie auch in Zukunft in verschiedensten Forschungsbereichen, aber auch zunehmend in der klinischen Praxis etablieren.

## 7 Schlussfolgerungen

1. Der Multiphotonenlaser DermaInspect ermöglicht als nicht invasives, risikoarmes Verfahren die horizontale, morphologische Darstellung epidermaler Schichten und einzelner Zellen in höchster Auflösung in vivo und ex vivo. Die hohe Fokustiefe von ca. 200  $\mu\text{m}$  gestattet die Visualisierung und Bewertung des epidermalen und dermalen Gefüges. Damit kann die MLT auch zur klinischen Diagnostik verschiedener pathologischer Hautveränderungen eingesetzt werden.
2. Die Möglichkeit einer differenzierten spektralen Analyse der emittierten Autofluoreszenz (AF) und der second harmonic generation (SHG) erlaubt die Erfassung und Evaluierung altersbedingter, dermalen Veränderungen.
3. Aus dem Verhältnis der AF des Elastins und dem SHG des Kollagens innerhalb der Dermis berechnet sich der sogenannte SAAID Hautalterungsindex, der mit zunehmendem Alter aufgrund des reduzierten Kollagengehalts und der Ablagerung elastischen Materials eine signifikante, kontinuierliche Abnahme zeigt.
4. Die Höhe des SAAID ist abhängig von der Messtiefe. Der Hautalterungsindex bleibt beim jungen Probanden innerhalb der Dermis mit zunehmender Hauteindringtiefe konstant, während er bei alter Haut nach einem Maximums innerhalb der papillären Dermis auf einen Wert abfällt, der bis zum Erreichen der maximalen Fokustiefe des Lasers konstant bleibt.
5. Der relativ hohe SAAID Wert innerhalb der papillären Dermis des alten Menschen lässt sich auf einen schmalen Streifen intakten Kollagens zurückführen, der als Grenzzone bezeichnet wird und einen Reparaturansatz UV-bedingter Schäden darstellt.
6. Die Dicke einzelner epidermaler Schichten und der gesamten Oberhaut ist unabhängig vom Alter der Haut. Sie zeigt jedoch deutliche Unterschiede an verschiedenen Körperstellen. Am Handrücken lassen sich signifikant höhere Werte als am Unterarm messen.
7. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Hautfaltentiefe in Abhängigkeit vom Alter lassen sich mithilfe des optischen 3D-Messgerätes PRIMOS nicht nachweisen. Bei klarem Trend muss allerdings die geringe Zahl an Probanden als Ursache betrachtet werden.

8. Der Einsatz eines schwenkbaren Laserarms am Objektiv des MLT, erleichtert nicht nur die Durchführbarkeit von Messungen an unebenen Körperstellen, wie z.B. am Handrücken, sondern ermöglicht auch den Zugang zu vorher schwer bzw. nicht erreichbaren Hautarealen.

## 8 Literaturverzeichnis

- Batisse D, Bazin R, Baldeweck T, Querleux B, Lévêque J. 2002. Influence of age on the wrinkling capacities of skin. *Skin Res Technol*, 8 (3):148-154.
- Bech-Thomsen N, Wulf H. 1996. Photoprotection due to pigmentation and epidermal thickness after repeated exposure to ultraviolet light and psoralen plus ultraviolet A therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 11 (5-6):213-218.
- Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, Uitto J. 1994. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol*, 103 (2):182-186.
- Campagnola P, Loew L. 2003. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotechnol*, 21 (11):1356-1360.
- Castelo-Branco C, Duran M, González-Merlo J. 1992. Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas*, 15 (2):113-119.
- Chung J, Seo J, Choi H, Lee M, Youn C, Rhie G, Cho K, Kim K, Park K, Eun H. 2001. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol*, 117 (5):1218-1224.
- Corcuff P, Bertrand C, Leveque J. 1993. Morphometry of human epidermis in vivo by real-time confocal microscopy. *Arch Dermatol Res*, 285 (8):475-481.
- Cossmann M, Welzel J. 2006. Evaluation of the atrophogenic potential of different glucocorticoids using optical coherence tomography, 20-MHz ultrasound and profilometry; a double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Dermatol*, 155 (4):700-706.
- Daniell HW. 1971. Smoker's wrinkles. A study in the epidemiology of "crow's feet". *Ann Intern Med*, 75 (6):873-880.
- Denk W, Strickler J, Webb W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248 (4951):73-76.
- Desai T, Desai A, Horowitz D, Kartono F, Wahl T. 2007. The use of high-frequency ultrasound in the evaluation of superficial and nodular basal cell carcinomas. *Dermatol Surg*, 33 (10):1220-1227; discussion 1226-1227.

Dimitrow E, Ziemer M, Koehler M, Norgauer J, König K, Elsner P, Kaatz M. 2009a. Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma. *J Invest Dermatol*, 129 (7):1752-1758.

Dimitrow E, Riemann I, Ehlers A, Koehler M, Norgauer J, Elsner P, König K, Kaatz M. 2009b. Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis. *Exp Dermatol*, 18 (6):509-515.

Dunn K, Sandoval R, Kelly K, Dagher P, Tanner G, Atkinson S, Bacallao R, Molitoris B. 2002. Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283 (3):C905-916.

El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk D, Gasparro F, Ahmad H, Uitto J. 2002. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol*, 11 (5):398-405.

Ernster VL, Grady D, Miike R, Black D, Selby J, Kerlikowske K. 1995. Facial wrinkling in men and women, by smoking status. *Am J Public Health*, 85 (1):78-82.

Fischer F, Volkmer B, Puschmann S, Greinert R, Breitbart E, Kiefer J, Wepf R. 2008. Assessing the risk of skin damage due to femtosecond laser irradiation. *J Biophotonics*, 1 (6):470-477.

Fisher G, Talwar H, Lin J, Voorhees J. 1999. Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol*, 69 (2):154-157.

Fitzpatrick TB. 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*, 124 (6):869-871.

Freund I, Deutsch M, Sprecher A. 1986. Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon *Biophys. J.*

Fritsch. 2009. *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Aufl. Heidelberg: Springer Verlag.

Gambichler T. 2005. Epidermal thickness assessed by optical coherence tomography and routine histology: preliminary results of method comparison *JEADV* 2006.

Gambichler T, Matip R, Moussa G, Altmeyer P, Hoffmann K. 2006. In vivo data of epidermal thickness evaluated by optical coherence tomography: effects of age, gender, skin type, and anatomic site. *J Dermatol Sci*, 44 (3):145-152.

Gannaway JN, Sheppard CJR. 1978. Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope. *Optical and Quantum Electronics*.

GMesstechnik, GmbH. Handbuch Optisches 3D-Hautmessgerät PRIMOS, Software PRIMOS 5.4

Ghiran IC. 2011. Introduction to fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol*, 689:93-136.

Goeppert-Mayer M. 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen *Ann Phys*.

Gottlöber P, Ulrich J, Hoffmann K. *Sonographie in der Dermatologie*

Grahame R. 1969. Elasticity of human skin in vivo. A study of the physical properties of the skin in rheumatoid arthritis and the effect of corticosteroids. *Ann Phys Med*, 10 (3):130-136.

Hall G, Phillips TJ. 2005. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol*, 53 (4):555-568; quiz 569-572.

Hellwarth R, Christensen P. 1974. Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe *Optics Communications*.

Helmchen F, Denk W. 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2 (12):932-940.

Houck JC, Sharma VK, Patel YM, Gladner JA. 1968. Induction of collagenolytic and proteolytic activities by anti-inflammatory drugs in the skin and fibroblast. *Biochem Pharmacol*, 17 (10):2081-2090.

Huang S, Heikal A, Webb W. 2002. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J*, 82 (5):2811-2825.

Kaatz M, König K. 2010. [Multiphoton microscopy and in vivo tomography in dermatologic imaging]. *Hautarzt*, 61 (5):397-409.

Kaatz M, Sturm A, Elsner P, König K, Bückle R, Koehler MJ. 2010. Depth-resolved measurement of the dermal matrix composition by multiphoton laser tomography. *Skin Res Technol*, 16 (2):131-136.

Kähler KC, Hauschild A. 2009. [Skin changes as a result of targeted therapies in oncology patients: cutaneous side effects of targeted therapies in oncology patients]. *Hautarzt*, 60 (5):433-440.

Kaiser W, CGB G. 1961. Two photon excitation in  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$  *Phys Rev Lett*.

Kambayashi H, Yamashita M, Odake Y, Takada K, Funasaka Y, Ichihashi M. 2001. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci*, 27 Suppl 1:S19-25.

- Kang J, Toma I, Sipos A, McCulloch F, Peti-Peterdi J. 2006. Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291 (2):F495-502.
- Kim H, Härtner S, Behe M, Behr T, Hampp N. 2006. Two-photon absorption-controlled multidose drug release: a novel approach for secondary cataract treatment. *J Biomed Opt*, 11 (3):34024.
- Kligmann AM, Zheng P, Lavker RM. 1985. The anatomy and pathogenesis of wrinkles *British Journal of Dermatology*.
- Knuutinen A, Kokkonen N, Risteli J, Vähäkangas K, Kallioinen M, Salo T, Sorsa T, Oikarinen A. 2002. Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin. *Br J Dermatol*, 146 (4):588-594.
- Koehler M, König K, Elsner P, Bückle R, Kaatz M. 2006. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Opt Lett*, 31 (19):2879-2881.
- Koehler M, Preller A, Kindler N, Elsner P, König K, Bückle R, Kaatz M. 2009. Intrinsic, solar and sunbed-induced skin aging measured in vivo by multiphoton laser tomography and biophysical methods. *Skin Res Technol*, 15 (3):357-363.
- Koehler M, Hahn S, Preller A, Elsner P, Ziemer M, Bauer A, König K, Bückle R, Fluhr J, Kaatz M. 2008. Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive in vivo scoring of the dermal fibre network. *Exp Dermatol*, 17 (6):519-523.
- Koehler MJ, Vogel T, Elsner P, König K, Bückle R, Kaatz M. 2010. In vivo measurement of the human epidermal thickness in different localizations by multiphoton laser tomography. *Skin Res Technol*, 16 (3):259-264.
- König K. 2000. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc*, 200 (Pt 2):83-104.
- König K. 2008. Clinical multiphoton tomography. *J Biophotonics*, 1 (1):13-23.
- König K, Riemann I. 2003. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt*, 8 (3):432-439.
- König K, Ehlers A, Stracke F, Riemann I. 2006. In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton tomography. *Skin Pharmacol Physiol*, 19 (2):78-88.
- König K, Weinigel M, Hoppert D, Bückle R, Schubert H, Köhler M, Kaatz M, Elsner P. 2008. Multiphoton tissue imaging using high-NA microendoscopes and flexible scan heads for clinical studies and small animal research. *J Biophotonics*, 1 (6):506-513.

- Krutmann J. 2003. [Skin aging]. *Hautarzt*, 54 (9):803.
- Krutmann J, Diepgen T, Billmann-Krutmann C. 2008. *Hautalterung: Grundlagen- Prävention- Therapie*. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Lavker R. 1979. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol*, 73 (1):59-66.
- Lavker R, Gerberick G, Veres D, Irwin C, Kaidbey K. 1995. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J Am Acad Dermatol*, 32 (1):53-62.
- Lavker RM, Kwong F, Kligman AM. 1980. Changes in skin surface patterns with age. *J Gerontol*, 35 (3):348-354.
- Leppert J, Krajewski J, Kantelhardt S, Schlaffer S, Petkus N, Reusche E, Hüttmann G, Giese A. 2006. Multiphoton excitation of autofluorescence for microscopy of glioma tissue. *Neurosurgery*, 58 (4):759-767; discussion 759-767.
- Lin S, Wu RJ, Tan H, Lo W, Lin W, Young T, Hsu C, Chen J, Jee S, Dong C. 2005. Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Opt Lett*, 30 (17):2275-2277.
- Maheux R, Naud F, Rioux M, Grenier R, Lemay A, Guy J, Langevin M. 1994. A randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effect of conjugated estrogens on skin thickness. *Am J Obstet Gynecol*, 170 (2):642-649.
- MANCINI RE, STRINGA SG, CANEPA L. 1960. The action of ACTH, cortisone and prednisone on the connective tissue of normal and sclerodermic human skin. *J Invest Dermatol*, 34:393-417.
- Masters B, So P, Gratton E. 1997. Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophys J*, 72 (6):2405-2412.
- Mogensen M, Morsy H, Thrane L, Jemec G. 2008. Morphology and epidermal thickness of normal skin imaged by optical coherence tomography. *Dermatology*, 217 (1):14-20.
- Moll I. 2005. *Dermatologie*. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, Duale Reihe.
- Montagna W, Kirchner S, Carlisle K. 1989. Histology of sun-damaged human skin. *J Am Acad Dermatol*, 21 (5 Pt 1):907-918.

- Nelson B, Majmudar G, Griffiths C, Gillard M, Dixon A, Tavakkol A, Hamilton T, Woodbury R, Voorhees J, Johnson T. 1994. Clinical improvement following dermabrasion of photoaged skin correlates with synthesis of collagen I. *Arch Dermatol*, 130 (9):1136-1142.
- Nouveau-Richard S, Monot M, Bastien P, de Lacharrière O. 2004. In vivo epidermal thickness measurement: ultrasound vs. confocal imaging. *Skin Res Technol*, 10 (2):136-140.
- Ormerod A, Shah S, Copeland P, Omar G, Winfield A. 2005. Treatment of psoriasis with topical sirolimus: preclinical development and a randomized, double-blind trial. *Br J Dermatol*, 152 (4):758-764.
- Overgaard Olsen L, Takiwaki H, Serup J. 1995. High-frequency ultrasound characterization of normal skin. Skin thickness and echographic density of 22 anatomical sites Copenhagen, Denmark: Skin Research and Technology.
- Pearse A, Gaskell S, Marks R. 1987. Epidermal changes in human skin following irradiation with either UVB or UVA. *J Invest Dermatol*, 88 (1):83-87.
- Pena A, Strupler M, Boulesteix T, Schanne-Klein M. 2005. Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy. *Opt Express*, 13 (16):6268-6274.
- Rassner G. 2009. *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas*. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Roth S, Freund I. 1981. Optical Second-Harmonic Scattering in Rat-Tail Tendon Biopolymers.
- Sandby-Møller J, Poulsen T, Wulf H. 2003. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol*, 83 (6):410-413.
- Seité S, Bredoux C, Compan D, Zucchi H, Lombard D, Medaisko C, Fourtanier A. 2005. Histological evaluation of a topically applied retinol-vitamin C combination. *Skin Pharmacol Physiol*, 18 (2):81-87.
- Sellheyer K. 2003. Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation? *J Cutan Pathol*, 30 (2):123-127.
- Tabachnick J, LaBadie J. 1970. Studies on the biochemistry of epidermis. IV. The free amino acids, ammonia, urea, and pyrrolidone carboxylic acid content of conventional and germ-free albino guinea pig epidermia. *J Invest Dermatol*, 54 (1):24-31.
- Terhost D. 2005. *Dermatologie*. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer.

- Therkildsen P. 1998. Epidermal thickness measured by light microscopy: a methodological study Munksgaard: Skin Research and Technology 1998.
- Torkian B, Yeh A, Engel R, Sun C, Tromberg B, Wong B. 2004. Modeling aberrant wound healing using tissue-engineered skin constructs and multiphoton microscopy. *Arch Facial Plast Surg*, 6 (3):180-187.
- Tozer G, Ameer-Beg S, Baker J, Barber P, Hill S, Hodgkiss R, Locke R, Prise V, Wilson I, Vojnovic B. 2005. Intravital imaging of tumour vascular networks using multi-photon fluorescence microscopy. *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (1):135-152.
- Unna P. 1894. *Histopathologie der Hautkrankheiten*. Aufl. Berlin: August Hirschwald.
- Varani J, Perone P, Fligiel S, Fisher G, Voorhees J. 2002. Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J Invest Dermatol*, 119 (1):122-129.
- Wang B, König K, Halbhuber K. 2010. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research. *J Microsc*, 238 (1):1-20.
- Whitton J, Everall J. 1973. The thickness of the epidermis. *Br J Dermatol*, 89 (5):467-476.
- Xu C, Zipfel W, Shear J, Williams R, Webb W. 1996. Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (20):10763-10768.
- Yin L, Morita A, Tsuji T. 2000. Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch Dermatol Res*, 292 (4):188-194.
- Zipfel W, Williams R, Christie R, Nikitin A, Hyman B, Webb W. 2003. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (12):7075-7080.
- Zouboulis C. 2003. [Intrinsic skin aging. A critical appraisal of the role of hormones]. *Hautarzt*, 54 (9):825-832.
- Zoumi A, Yeh A, Tromberg B. 2002. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (17):11014-11019.

## 9 Anhang

### Danksagung

Hiermit möchte ich OA Dr. Kaatz für die Überlassung des Themas und die kontinuierliche Betreuung der Arbeit danken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Johannes Köhler für die intensive Betreuung bzgl. der Multiphotonenlaserauswertungen, die zahlreichen Tipps während der Messungen und die Unterstützung bei der Einarbeitung ins Thema. Sowohl bei fachlichen als auch organisatorischen Fragen standen mir OA Kaatz und Dr. Köhler jederzeit hilfreich zur Verfügung.

Bedanken möchte ich mich besonders auch bei Frau Nancy Schmidt, nicht nur für die geduldige Einführung in die Arbeit mit dem MLT DermaInspect, sondern auch für die organisatorische Hilfe während der Studie.

Bei meiner Freundin und Kommilitonin Anne Cathrin Sturm, die mir während der Messungen am Multiphotonenlaser regelmäßig zur Seite stand, möchte ich mich auf diesem Wege noch einmal herzlich bedanken.

Mein Dank gilt ebenso der Firma JenLab, insbesondere Rainer Bückle, der mich bei technischen Problemen stets unterstützt und die kontinuierliche Verbesserung des Gerätes umgesetzt hat.

Ich danke Dr. Susanne Metz für die Bereitstellung der histologischen Schnittbilder sowie Nadja Kindler für die Hilfe bei der Rekrutierung der Probanden.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen teilnehmenden Probanden bedanken, ohne die das Gelingen der Studie gar nicht erst möglich gewesen wäre.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, die mich während der Zeit bis zur Fertigstellung der Dissertation ermutigte und mir emotional und finanziell hilfreich zur Seite stand.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: OA Dr. Martin Kaatz, Dr. Johannes Köhler, Anne Cathrin Sturm, Nancy Schmidt, Dr. Susanne Metz, Nadja Kindler, Rainer Bückle,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Grundlage der Dissertation bildete die Bearbeitung eines Komplexes von mehreren Themen gemeinsam mit meiner Kommilitonin Anne Cathrin Sturm. Die Messungen am Multiphotonenlaser zur epidermalen Dicke, zur Morphologie der Epidermis sowie die Stapelmessungen als Basis für die Berechnungen zum Hautalterungsindex SAAID sowie die Messungen am PRIMOS erfolgten in gemeinschaftlicher Arbeit. Darüber hinaus wurden gemeinsam Messungen zur Untersuchung der Effektivität von Imiquimod bei Patienten mit Aktinischer Keratose durchgeführt. In den beiden Dissertationen werden jeweils verschiedene Elemente dieser Themenkomplexe behandelt. Teile der Ergebnisse wurden bereits im Verlauf der Erstellung der Dissertation publiziert (vergleiche dazu (Koebler et al. 2010, Kaatz et al. 2010)).

**Ort, Datum**

**Unterschrift des Verfassers**

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Vogel, Tanja

Anschrift: Görsgrund 1  
98553 Altendambach/ Thüringen

Telefon: 0151/40311146 03681/ 301701

E- Mail: medijena@web.de

Geburtsdatum: 29.12.1986

Geburtsort: Suhl

Familienstand: ledig

## Bildungsweg

09/ 93 – 07/ 97 Staatliche Grundschule Erlau

08/ 97 – 06/ 05 Staatliches Hennebergisches Gymnasium „ Georg Ernst “ Schleusingen  
Abschluss: Abitur

seit 10/05 Medizinstudium in Jena

09/07 1.Staatsexamen - Physikum

geplant 10/11 2. Staatsexamen

## **Wissenschaftlicher Werdegang**

05/08	Wahl des Promotionsthemas
06/08 – 04/09	Literaturrecherche, Ethikantrag, Protokollerstellung, Probandenrekrutierung
04/09 – 11/09	Probandenmessungen
01/10	Publikation „In vivo measurement of the human epidermal thickness in different localizations by multiphoton laser tomography“ (Zweitautor)
02/10-04/11	Verfassen der Dissertationsschrift

## **Famulaturen**

03/08	Anästhesie/Intensivmedizin Krankenhaus Neuhaus a. Rwg.
09/08	Pädiatrie Hochgebirgsklinik Davos/Wolfgang – Schweiz
03/09	Poliklinik der Dermatologie am Universitätsklinikum Jena
09/09	Gynäkologie/Geburtshilfe Henneberg Klinik Hildburghausen

Altendambach, 17.04.2011