

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Ch. Marsch)



**Digitale Bildanalyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in der  
Epidermis gesunder, entzündlich veränderter oder aktinisch geschädigter Haut**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Katrin Radant  
geboren am 10.09.1977 in Halle/Saale

Gutachter: PD Dr. med. Matthias Fischer  
Prof. Dr. med. Miklós Simon

Datum der Verteidigung: 15.12.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000015022**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015022>]

## **Referat und bibliographische Beschreibung**

Digitale Bildanalyseverfahren werden in jüngster Zeit zunehmend eingesetzt, um immunhistochemisch angefärbte Strukturen zu quantifizieren. Der Vorteil, der sich gegenüber manuellen Zählverfahren abzeichnet, ist eine aufgrund des relativ geringeren Arbeits- und Zeitaufwandes besonders ökonomische Datenerhebung. Da die Vorgehensweise bei der digitalen Bildanalyse der jeweiligen Fragestellung angepasst werden muss, werden in der aktuellen Literatur entsprechend unterschiedliche Vorgehensweisen beschrieben und diskutiert. Ungeachtet dieser Vielfalt sollten sowohl bereits bei der Digitalisierung als auch bei der Entwicklung und Anwendung solcher Verfahren bestimmte Grundregeln beachtet werden, da sonst leicht Methodenartefakte entstehen, die die Qualität der Messungen negativ beeinflussen können. Auf wesentliche Grundregeln wird in der Arbeit näher eingegangen.

Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Quantifizierung der Expression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder, entzündlich veränderter (Psoriasis vulgaris, Lichen ruber) und aktinisch geschädigter Haut (aktinische Keratosen) mit Hilfe eines digitalen Bildanalyseverfahrens. Dabei wurden Serienschnitte paraffineingebetteter Haut mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki-67 und mit Antikörpern gegen die Differenzierungsmarker Filaggrin, Cytokeratin 10 und Involucrin inkubiert und angefärbt. Zudem wurde in weiteren Serienschnitten die Expression eines kürzlich in der Epidermis nachgewiesenen ionotropen Glutamaterezeptors vom Typ des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor) untersucht. Die digitale Bildanalyse erfolgte unter Verwendung der Software Adobe Photoshop® und Image Processing Tool Kit®. Mit der verwendeten Methode konnten die in der Literatur beschriebenen typischen Verteilungsmuster der genannten Proliferations- und Differenzierungsmarker in den unterschiedlichen Diagnosen größtenteils repliziert werden. Deshalb ist anzunehmen, dass die Expression der verwendeten immunhistochemischen Marker mit dieser Methode zuverlässig quantifiziert werden kann. Ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des NMDA-Rezeptors und der Expression der einzelnen Marker ließ sich nicht herstellen, es zeigte sich jedoch eine deutliche verminderte Expression des NMDA-Rezeptors bei Auftreten einer Parakeratose.

Radant, Katrin: Digitale Bildanalyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in der Epidermis gesunder, entzündlich veränderter oder aktinisch geschädigter Haut. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 77 Seiten, 2008

## Inhaltsverzeichnis

Referat und bibliographische Beschreibung .....	II
Inhaltsverzeichnis .....	III
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole .....	V
1. Einleitung und Problemstellung .....	1
1.1. Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten .....	2
1.1.1. Proliferation von Keratinozyten .....	3
1.1.2. Differenzierung von Keratinozyten .....	4
1.1.3. Proliferations- und Differenzierungsmarker in gesunder Haut, sowie bei entzündlichen Dermatosen und Präkanzerosen .....	5
1.1.4. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) .....	8
1.2. Quantifizierung immunhistochemischer Strukturen .....	9
1.2.1. Von der Entnahme der Probe bis zur Fixierung .....	11
1.2.2. Immunhistochemie .....	11
1.2.3. Digitalisierung .....	12
1.2.4. Digitale Bildanalyse .....	12
1.2.5. Quantifizierungen im Rahmen dieser Arbeit .....	15
2. Fragen und Ziele der Arbeit .....	16
3. Material und Methoden .....	17
3.1. Untersuchtes Gewebe .....	17
3.2. Immunhistochemie .....	18
3.2.1. Immunhistochemischer Proliferationsmarker: Ki-67 .....	18
3.2.2. Immunhistochemischer Differenzierungsmarker: Filaggrin .....	19
3.2.3. Immunhistochemischer Differenzierungsmarker: CK 10 .....	19
3.2.4. Immunhistochemischer Differenzierungsmarker: Involucrin .....	19
3.2.5. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) .....	20
3.3. Digitalisierung .....	21
3.4. Auswertung mit digitaler Bildanalyse .....	22
3.4.1. Kalibrierung des Abbildungsmaßstabes .....	23
3.4.2. Einzeichnen der Basalmembran, der Ober- und Untergrenze des Stratum corneums .....	23
3.4.3. Maskierung und Messung der Fläche von Stratum corneum und von vitaler Epidermis .....	25

3.4.4. Messung der Dicke der vitalen Epidermis und des Stratum corneums .....	27
3.4.5. Auszählung positiver Zellkerne .....	28
3.4.6. Messung der Länge der Basalmembran .....	30
3.4.7. Messung der angefärbten Fläche und der Intensität der Färbung .....	31
3.5. Statistische Auswertung.....	33
4. Ergebnisse .....	34
4.1. Dicke und Fläche der vitalen Epidermis und des Stratum corneum.....	34
4.2. Expression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder Haut, entzündlichen Dermatosen und Präkanzerosen.....	40
4.3. Expression des NMDA-Rezeptors in gesunder Haut, entzündlichen Dermatosen und Präkanzerosen .....	49
4.4. Zusammenhang zwischen der Ausprägung keratinozytärer NMDA- Rezeptoren und der Expression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern.....	51
5. Diskussion.....	52
5.1. Digitale Bildanalyse immunhistochemischer Präparate .....	52
5.2. Dicken- und Flächenmessung.....	56
5.3. Präsenz von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder Haut, entzündlichen Dermatosen und Präkanzerosen.....	57
5.4. Expression des NMDA-Rezeptors und seine Korrelation mit Proliferations- und Differenzierungsmarkern.....	61
6. Zusammenfassung .....	63
7. Literatur.....	65
8. Anhang.....	69
8.1. Anhang A: Photoshop Aktionen erstellen, speichern und laden.....	69
8.2. Anhang B: Dokumentation der verwendeten Aktionen.....	70
9. Thesen .....	76
Lebenslauf.....	VI
Publikation.....	VII
Erklärung .....	VIII
Erklärung .....	IX
Danksagung .....	X

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AEC	3-amino-9-ethyl-carbazol
AK	Aktinische Keratose
CaR	Calcium Sensing Receptor
CK10	Cytokeratin 10
GH	gesunde Haut
HaCaT	Human adult low calcium high temperature
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSI-Farbraum	Farbraum in dem die Farbe eines Pixels durch Farbwert (hue), Sättigung (saturation) und Helligkeit (intensity) definiert wird
LR	Lichen ruber
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR1	R1-Komponente des NMDA-Rezeptors (konstant)
NMDAR2	R2-Komponente des NMDA-Rezeptors (variabel)
NMDAR3	R3-Komponente des NMDA-Rezeptors (variabel)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PV	Psoriasis vulgaris
RGB-Farbraum	Farbraum in dem die Farbe eines Pixels durch die Primärfarben rot, grün und blau definiert wird
Str.	Stratum
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)

## 1. Einleitung und Problemstellung

Immunhistochemische Techniken finden seit mehr als 30 Jahren in der Dermatohistologie Anwendung. Während sich ihr Einsatzbereich zunächst vorwiegend auf Forschungsfragen beschränkte, werden sie mittlerweile auch für diagnostische Zwecke und zur Kontrolle des Therapieerfolges in der klinischen Routine verwendet. Insbesondere bei der Diagnostik von Neoplasmen sind immunhistochemische Verfahren in der heutigen Zeit nicht mehr wegzudenken. Mit der Erweiterung des Einsatzbereichs der Immunhistochemie haben sich auch die damit verbundenen Fragestellungen grundlegend gewandelt. Zu Beginn stand zumeist eine qualitative Beurteilung der Anfärbungen im Mittelpunkt des Interesses, wobei die Anwender der Frage nachgingen, ob ein bestimmter Marker in einer Gewebeprobe nachweisbar ist oder nicht. Inzwischen geht das Interesse über diese rein qualitative Unterscheidung hinaus. Immer mehr Forscher beschäftigen sich mit der Quantifizierung immunhistochemisch angefärbter Strukturen und damit z.B. mit der Frage, wie viel eines bestimmten Markers in einer Gewebeprobe nachweisbar ist [Taylor et al. 2006] [Walker 2006].

Bei der Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Gewebestrukturen kommen zunehmend digitale Bildanalysemethoden zum Einsatz. Das Prinzip der digitalen Bildanalyse besteht darin, die zu messenden Strukturen aufgrund von Unterschieden in Größe, Gestalt, Dichte, Helligkeit, Textur und Farbe computergestützt vom Hintergrund zu separieren und zu quantifizieren [Hughes, McCulloch 1991]. In der Fachliteratur wurde bereits eine Vielzahl verschiedener digitaler Bildanalyseverfahren beschrieben, die mit unterschiedlicher Software auf unterschiedliche Art und Weise das Ziel der Quantifizierung erreichen sollen [Underwood et al. 2001] [Loukas et al. 2003] [Goedkoop et al. 2005]. Viele Beschreibungen sind schwer nachvollziehbar, enthalten diskussionswürdige Arbeitsschritte und Computereinstellungen oder sind ohne die von den Autoren verwendete Software nicht reproduzierbar. Dieser Mangel an Standardisierung ist dementsprechend einer der wesentlichen Kritikpunkte digitaler Bildanalyseverfahren [Walker 2006].

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines einfach anwendbaren, automatisierten und replizierbaren digitalen Bildanalyseverfahrens zur Quantifizierung verschiedener epidermaler Merkmale. Mit Hilfe dieses Verfahrens soll u.a. die Rolle eines kürzlich in der Epidermis nachgewiesenen Glutamaterezeptors (NMDA) in Bezug auf

die Proliferation und die Differenzierung von Keratinozyten in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut untersucht werden [Fischer 2004]. Im Folgenden werden deshalb zunächst die Begriffe Proliferation und Differenzierung erläutert. Anschließend werden einige wichtige Proliferations- und Differenzierungsmarker sowie deren Expression in gesunder, entzündlicher und aktinischer Haut beschrieben. Im darauf folgenden Abschnitt werden die in der Fachliteratur diskutierten Probleme bei der Quantifizierung immunhistochemischer Präparate im Allgemeinen und die spezifischen Probleme digitaler Bildanalyseverfahren im Besonderen dargestellt. Anhand dieser Vorüberlegungen werden danach die Fragen und Ziele der vorliegenden Arbeit abgeleitet und präzisiert. Anschließend wird eine Studie zur Untersuchung der Rolle des NMDA-Rezeptors bei der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten vorgestellt. Dazu werden zunächst das Untersuchungsmaterial und das entwickelte digitale Bildanalyseverfahren beschrieben und die Ergebnisse berichtet. Zum Abschluss werden die einzelnen Arbeitsschritte des Bildanalyseverfahrens diskutiert und Möglichkeiten der Optimierung vorgeschlagen. Darüber hinaus werden die Untersuchungsergebnisse vor dem Hintergrund der beschriebenen Probleme interpretiert.

### **1.1. Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten**

Die Epidermis ist ein klassisches Proliferationsgewebe, das heißt, sie unterliegt ständiger Erneuerung. Die hierbei aus den Basalzellen entstehenden Keratinozyten durchlaufen einen komplexen Differenzierungsprozess, der zur Entwicklung kernloser Hornzellen führt [Fritsch 2004]. In gesunder Haut umfasst dieser Prozess einen Zeitraum von etwa 28 Tagen und führt unter physiologischen Bedingungen zur Entwicklung einer funktionstragenden Hornschicht, dem Stratum corneum, das widerstandsfähig gegen mikrobielle Einflüsse, oxidativen Stress, inklusive UV-Licht, mechanische Einflüsse und chemische Noxen ist sowie zur Regulation des Wärme- und Flüssigkeitshaushaltes beiträgt [Elias 2007]. Im Gegensatz zur normalen Verhornung (Orthokeratose), kann es durch verschiedene mechanische, chemische oder entzündliche Reize zu einer qualitativen Störung der Ausdifferenzierung kommen. Folgen dieser Differenzierungsstörung ist oft eine schwere Beeinträchtigung der Barrierefunktion, die dann wiederum die Expression verschiedener Differenzierungsmarker induziert [Ekanayake-Mudiyanselage et al. 1998].

Viele entzündliche Hauterkrankungen sind durch eine Verdickung des Stratum corneum (Hyperkeratose) gekennzeichnet. Werden dabei aufgrund einer gesteigerten Mitoserate zu viele Corneozyten gebildet, wird von einer Proliferationshyperkeratose gesprochen (Bsp.: Psoriasis vulgaris). Ist die Abschilferung der Hornzellen (Desquamatio insensibilis) gestört, wird der Begriff der Retentionshyperkeratose verwendet (Bsp.: Ichthyosis vulgaris). Der Begriff der Parakeratose wird verwendet, wenn aufgrund einer pathologischen oder unvollständigen Differenzierung einzelne Keratinozyten im Stratum corneum noch Kernreste enthalten.

Bei Ekzemerkrankungen der Haut kommt es häufig zu einer Verdickung der Epidermis (insbesondere des Stratum spinosum) was als Akanthose bezeichnet wird. Im weiteren Verlauf der Differenzierung entwickeln die Keratinozyten basophile Hyalingranula, denen das Stratum granulosum seinen Namen verdankt. In dieser normalerweise 1-3 Zellschichten dicken Schicht finden wichtige Differenzierungsprozesse statt, in deren Verlauf die Keratinozyten ihre Zellkerne und -organellen abbauen, eine Lipidsubstanz in den Interzellularraum abgeben und sich schließlich zu platten kernlosen Corneozyten entwickeln [Kerl et al. 2003].

Die Begriffe Proliferation und Differenzierung können als theoretische Konstrukte betrachtet werden und sind somit direkter Beobachtung nicht zugänglich. Mit Hilfe immunhistochemischer Techniken lassen sich jedoch Syntheseprodukte, die im Verlaufe der beiden Prozesse exprimiert werden, nachweisen, so dass Rückschlüsse auf den Grad der Proliferation und der Differenzierung eines Gewebes getroffen werden können.

#### 1.1.1. Proliferation von Keratinozyten

In der Epidermis gesunder Haut herrscht ein Gleichgewicht zwischen dem Zellgewinn (Mitose) und dem Zellverlust (terminale Differenzierung und Apoptose) von Keratinozyten [Fritsch 2004]. Der Prozess des Zellgewinns wird dabei mit dem Begriff der Proliferation umschrieben. Die Proliferation umfasst die Zellneubildung durch mitotische Teilung und erfolgt normalerweise nur im Stratum basale (Kompartiment der Proliferation). Hier beträgt die Mitoserate etwas weniger als 1% der Basalzellen. Unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise in akanthotischer Epidermis, finden Zellteilungen dagegen auch suprabasal statt. Auch Traumen, Entzündungen, chemische oder physikalischen Reize haben Auswirkungen auf die Proliferation.

Doch wie lassen sich Aussagen zum Grad der zellulären Proliferation in einem Gewebe treffen? Die wohl bekannteste Möglichkeit den Replikationsgrad eines Gewebes abzuschätzen, ist das Zählen mitotischer Zellen. Da jedoch die Dauer der Zellteilung erheblich variieren kann, lassen sich mit dieser Methode nur unzureichende Angaben über die wahre Replikationsrate machen. Eine exaktere Methode die Anzahl mitotischer Zellen zu bestimmen, ist die Durchflußzytometrie, mit deren Hilfe alle Zellen in der S-Phase des Zellzyklus analysiert werden können. Einen entscheidenden Nachteil dieser Messmethode stellt allerdings der relativ hohe labortechnische Aufwand dar. Des Weiteren muss das zu untersuchende Gewebe spezielle Anforderungen erfüllen, so dass auch dieses Verfahren für Routineuntersuchungen ungeeignet erscheint [Mehregan, Mehregan 1996].

Die Entdeckung spezifischer Proliferationsmarker wie beispielsweise des Ki-67-Antigens und dessen Darstellung in Paraffin-eingebetteten Hautproben mittels immunhistochemischer Verfahren stellten ökonomischere Methoden bei der Beurteilung des Proliferationsgrades eines Gewebes in Aussicht [Scholzen, Gerdes 2000].

#### 1.1.2. Differenzierung von Keratinozyten

Unter dem Terminus Differenzierung wird die strukturelle und funktionelle Entfaltung der Keratinozyten verstanden, die mit einer Spezialisierung der Zellen einhergeht. Sie führt schließlich zur Umwandlung der lebenden Keratinozyten in die funktionstragende Hornschicht, ein Prozeß der innerhalb nur weniger Stunden abläuft. Während dieses Wandels werden Syntheseprodukte (Strukturproteine) freigesetzt, die von den Keratinozyten im Verlauf des etwa zwei Wochen andauernden Differenzierungsweges vom Stratum basale über das Stratum spinosum bis hin zum Stratum granulosum gebildet werden. Zu den bedeutendsten Syntheseprodukten zählen hierbei bestimmte Keratinfilamentproteine (Zytokeratine), Filaggrin, Loricrin und Involucrin [Watt 1983]. Darüberhinaus findet die Synthese der sogenannten Odland-Körperchen statt, die reichlich Lipide in Form von Ceramiden, Sterolestern und Phospholipiden enthalten und die gemeinsam mit Enzymen mittels Exozytose in den Interzellulärraum geschleust werden. Parallel zu diesen Synthesevorgängen werden die im Keratinozyten enthaltenen Zellorganellen abgebaut, so dass am Ende eine kompakte Hornschicht entsteht, deren regelmäßig angeordnete kernlose Zellen von

einer amorphen Matrix umgeben und mit hochmolekularem Keratin gefüllt sind, eingebettet in eine undurchlässige Lipidmasse.

### 1.1.3. Proliferations- und Differenzierungsmarker in gesunder Haut, sowie bei entzündlichen Dermatosen und Präkanzerosen

Die Untersuchung proliferierender Zellpopulationen ist ein wichtiger Bestandteil in der Diagnostik benigner und maligner Gewebe. Im Jahr 1983 wiesen Gerdes et al. erstmals ein Protein nach, das streng mit der Zellproliferation assoziiert ist. Das sogenannte Ki-67 Antigen kann während der Interphase des Zellzyklus im Zellkern gesunder Zellen jedoch auch im Zellkern von Tumorzellen detektiert werden. Die Tatsache, dass es während allen aktiven Phasen des Zellzyklus präsent ist, in der G0-Phase jedoch fehlt, macht es zu einem exzellenten Proliferationsmarker, obwohl seine funktionelle Signifikanz unklar bleibt [Scholzen, Gerdes 2000]. Zum Nachweis des Ki-67 Antigens dienen monoklonale Antikörper, wie beispielsweise der MIB-1 Antikörper. In gesunder Haut ist die Expression des Ki-67 Antigens auf das Kompartiment der Proliferation, d.h. auf das Stratum basale beschränkt. In entzündlichen Dermatosen finden Proliferationsvorgänge durch eine gesteigerte Proliferationsrate jedoch auch suprabasal statt [Caldwell et al. 1997] [Bovenschen et al. 2005].

Die Psoriasis vulgaris ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die histologisch durch eine Verdickung der vitalen Epidermis, eine Verlängerung der Reteleisten, eine gesteigerte Mitoseaktivität der Keratinozyten und ein verdicktes Stratum corneum mit Parakeratose gekennzeichnet ist. Die Transitzeit der Keratinozyten ist dabei stark verkürzt. Caldwell et al. untersuchten die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 u.a. auch in psoriatischer Haut und fanden dabei eine im Vergleich zu normaler Haut stark erhöhte Expression [Caldwell et al. 1997]. Die Auswertung der MIB-1-positiven Zellen erfolgte dabei durch manuelles Zählen bzw. durch Schätzen. Auch die Arbeitsgruppe um Bovenschen kam zu dem Ergebnis, dass psoriatische im Vergleich zu atopischer Haut und zu Lichen ruber eine stark erhöhte Expression Ki-67 positiver Zellen aufweist [Bovenschen et al. 2005]. Bei dieser Untersuchung wurde die Zahl positiver Zellen pro mm Basalmembran mittels digitaler Bildanalyse ermittelt. Auch bei in-situ-Tumoren und in invasiven Neoplasien findet eine gesteigerte Proliferation statt. Carpenter et al. untersuchten die Expression von Ki67 in Aktinischen Keratosen, sonnengeschädigter und in gesunder Haut und fanden dabei die

maximale Ki67 Expression in Aktinischen Keratosen. Die Auswertung erfolgte mittels Digitaler Bildanalyse [Carpenter et al. 2004].

Für den Vorgang der Differenzierung von Keratinozyten existieren ebenfalls spezifische Syntheseprodukte bzw. Differenzierungsmarker, die sich mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachweisen lassen. Filaggrin, ein basisches Strukturprotein der Keratinozyten, das aus dem hochmolekularen Profilaggrin durch Dephosphorylierung gebildet wird, gilt als ein klassischer Differenzierungsmarker [Ishida-Yamamoto et al. 1997]. In gesunder Haut wird das calciumabhängige, hochreaktive Protein insbesondere im Stratum granulosum exprimiert und führt zur Aggregation von Keratinfilamenten und zu deren Vernetzung, womit die Bildung des Keratins abgeschlossen ist. Watanabe et al. haben die Expression dieses Differenzierungsmarkers in psoriatischer Haut untersucht und fanden hierbei eine im Vergleich zu normaler Haut geringere oder keine Reaktion von Anti-Filaggrin-Antikörpern [Watanabe et al. 1991]. Diese Beobachtung konnte durch Gerritsen und Iizuka bestätigt werden [Gerritsen et al. 1997] [Iizuka et al. 2004].

Cytokeratin 10 ist ein Polypeptid, das in gesunder Haut während der Differenzierung von Keratinozyten, ebenfalls calciumabhängig, in suprabasalen Schichten exprimiert wird [Drozdoff et al. 1993]. Dieses hochstabile, unlösliche Zytokeratin ist Hauptbestandteil der Keratinfilamente und zählt somit nicht nur zu den Strukturproteinen, sondern dient als ein wichtiger Marker der frühen Differenzierung. Bernerd et al. fanden eine verminderte Expression dieses Differenzierungsmarkers in psoriatischer Haut, allerdings erfolgte hier eine Schätzung [Bernerd et al. 1992]. In einer Studie von Bovenschen [Bovenschen et al. 2005] wurde die Expression von Cytokeratin 10 ebenfalls untersucht. Hier fand sich eine im Vergleich zum Lichen ruber etwas geringere Expression dieses Differenzierungsmarkers, die somit in etwa dem Expressionsmuster bei normaler Keratinisation entspricht. In beiden Beiträgen wurde keine Aussage über den Grad der Parakeratose getroffen. Die Ausprägung von Cytokeratin 10 (und anderen Cytokeratinen) in aktinischen Keratosen untersuchten Ishida et al. mit dem Ergebnis, dass sich in aktinischen Keratosen im Vergleich zu gesunder Haut eine viel geringere Expression nachweisen ließ [Ishida et al. 2001].

Als Marker der späten Differenzierung gilt Involucrin, ein Vorläufer der Cornified envelope, das in gesunder Haut erstmals im oberen Stratum spinosum detektiert wird, bevor es seine maximale Ausprägung in Höhe des Stratum granulosum erhält [Watt 1983]. In psoriatischer Haut beginnt die terminale Differenzierung früher, weshalb

hier oftmals eine vermehrte Expression von Involucrin beobachtet werden kann [Caldwell et al. 1997] [Gerritsen et al. 1997] [Ichikawa et al. 1997]. Während es in der aktuellen Literatur detaillierte Aussagen über Unterschiede in der Expression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder Haut gibt, sind nur wenige entsprechende Studien für den Lichen ruber oder für aktinische Keratosen bekannt.

Tabelle 1: Untersuchungen zu Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder, entzündlicher und aktinischer Haut

<b>Zellreaktion</b>	<b>Antigen</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Besonderheiten</b>	<b>Literatur</b>
Proliferation	Ki-67	MIB-1	Stärkere Expression bei Psoriasis vulgaris und Neoplasmen	[Carpenter et al. 2004] [Caldwell et al. 1997] [Scholzen, Gerdes 2000] [Bovenschen et al. 2005]
Differenzierung	Filaggrin	Monoklonaler Maus-IgG1 Clone FLG01	Geringere Expression in Psoriasis	[Watanabe et al. 1991] [Gerritsen et al. 1997] [Iizuka et al. 2004]
„frühe“ Differenzierung	Cytokeratin 10 (CK10)	Monoklonaler Maus-IgG1 Clone DE-K10	Geringere/ gleich große Expression in Psoriasis Geringere in aktinischer Keratose	[Drozdoff et al. 1993] [Bernerd et al. 1992] [Ishida et al. 2001] [Bovenschen et al. 2005]
„späte“ Differenzierung	Involucrin	Monoklonaler Maus-IgG1 Clone SY5	Frühere/ stärkere Expression in Psoriasis	[Watanabe et al. 1991] [Caldwell et al. 1997] [Gerritsen et al. 1997] [Ichikawa et al. 1997]

#### 1.1.4. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor)

Zahlreiche, teilweise rezeptorvermittelte Prozesse beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten. Bikle, Lansdown, Elias und Chia-Ling konnten zeigen, dass hierbei insbesondere die intrazelluläre Calciumkonzentration eine entscheidende Rolle spielt [Bikle 2004] [Lansdown 2002] [Elias et al. 2002] [Chia-Ling et al. 2004]. Diese Forschungsgruppen beschäftigen sich auch mit der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration und konnten verschiedene Ionenkanäle und Rezeptoren identifizieren, welche den Calciuminflux vermitteln. Arbeitsgruppen um Bikle und Chia-Ling wiesen beispielsweise einen transmembranösen Calcium Sensing Receptor (CaR) nach, der durch einen extrazellulären Calciumanstieg aktiviert werden kann und den Calciuminflux in die Zelle steuert [Bikle 2004] [Chia-Ling et al. 2004]. Des Weiteren existieren verschiedene neurogene Rezeptoren, die als Ionenkanalproteine einen Calciuminflux aus dem Extrazellularraum in die Keratinozyten steuern. In die Gruppe dieser neurogenen Rezeptoren sind die ionotropen Glutamatrezeptoren einzuordnen, die einen transmembranösen Calciuminflux in die Zelle bewirken können. In der vorliegenden Arbeit wird ein Subtyp aus der Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren, der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) untersucht, dem eine wichtige Funktion in der Regulation der Calciumhomöostase zugesprochen wird [Fischer 2004] [Fuziwara et al.] [Nahm et al. 2004].

Der Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten: der konstanten NMDAR1-Einheit, der variablen NMDAR2-Einheit, für die 4 Varianten bekannt sind und einer NMDAR3-Einheit, für die zwei Varianten bekannt sind. Er ist an einen nicht-selektiven kationenspezifischen Ionenkanal gekoppelt und führt bei Aktivierung durch L-Glutamat (in-vivo) oder N-Methyl-D-Aspartat (in-vitro) zu einem Einstrom von Calcium und Natrium in die Zelle sowie zu einem Ausstrom von Kalium in den Extrazellularraum. Unter Ruhebedingungen ist der Rezeptor geschlossen und durch Magnesium-Ionen blockiert. Für eine optimale Stimulation des Rezeptors werden zusätzliche, sogenannte Koagonisten benötigt, hierzu zählen Glycin, D-Serin und Histamin. Des Weiteren gibt es eine Bindungsstelle für bestimmte NMDA-Rezeptorantagonisten wie Ketamin oder Dizolzipin (MK-801). Die NMDA-Rezeptoren sind vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem zu finden, darüber hinaus konnten sie auch im Pankreas, in Megakaryozyten, in Osteoblasten und auch in der Epidermis nachgewiesen werden. Mit Hilfe von RT-PCR und immunhistochemischen Untersuchungen ließen sich hier NMDA-Rezeptoren in allen vitalen Schichten gesunder Epidermis mit

einer besonderen Expression im Stratum granulosum nachweisen [Fischer, Glanz et al. 2004]. Dieser Nachweis führte zu der Vermutung, dass NMDA-Rezeptoren einen Einfluss auf die Verhornung haben könnten. Diese Vermutung wurde von der Beobachtung gestützt, dass eine Blockade von NMDA-Rezeptoren durch den selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK 801 bei HaCaT-Zellen zu einer verminderten Expression der Differenzierungsmarker Cytokeratin 10 und Filaggrin und zu einer Unterdrückung der Verhornung führt. Die Proliferation von HaCaT-Zellen blieb von der Stimulation bzw. von der Blockade unbeeinflusst. Des Weiteren wurde eine verminderte Expression von NMDA-Rezeptoren bei dem Auftreten einer Parakeratose beobachtet [Fischer 2004].

## **1.2. Quantifizierung immunhistochemischer Strukturen**

Immunhistochemisch angefärbte Strukturen lassen sich hinsichtlich verschiedenster Merkmale quantifizieren. So werden im Rahmen einiger Fragestellungen Merkmale wie die Anzahl, die Größe oder die Gestalt der gefärbten Gewebekomponenten untersucht. Für andere Fragestellungen hingegen ist das Ausmaß oder die Intensität der Anfärbungen von besonderem Interesse. Entsprechend der Vielfalt der Fragestellungen und der zu messenden Merkmale werden bei der Quantifizierung immunhistochemischer Marker sehr unterschiedliche Methoden eingesetzt [Walker 2006]. Hier lassen sich vornehmlich manuelle Zähl- und Schätzmethode von computerunterstützten Bildanalyseverfahren unterscheiden.

Bei der traditionellen Quantifizierung immunhistochemischer Präparate werden die angefärbten Strukturen während des Mikroskopierens gezählt oder hinsichtlich ihrer Verteilungsmuster oder Intensität beurteilt. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode ist der relativ hohe Zeit- und Arbeitsaufwand. In vielen Studien werden deshalb nur wenige Präparate untersucht und so bleiben die Stichproben nur eingeschränkt repräsentativ [Johansson et al. 2001]. Einige komplexere Verfahren, wie z.B. stereologische Analysen oder Serienrekonstruktionen zur quantitativen Beschreibung dreidimensionaler Merkmalsverteilungen auf der Grundlage vieler zweidimensionaler Serienschnitte, werden durch den Arbeitsaufwand bei manueller Quantifizierung nahezu unmöglich [Coggeshall, Lekan 1996]. Ein weiteres Problem manueller Zähl- und Schätzmethode ist die Subjektivität der gewonnenen Werte. So liegt es beispielsweise bei einer Auszählung von Zellen im Ermessen der Auszählenden, wel-

che der Zellen als positiv gefärbt gelten und welche nicht. Unterschiede in der Erfahrung der Auswertenden oder in der Sorgfalt, mit der sie vorgehen, führen hier zu unterschiedlichen Messwerten und somit zu einer erhöhten Intra- und Interratervariabilität [Jagoe et al. 1991] [Beliën et al. 1999]. Der Mangel an Objektivität bei manuellen Schätz- oder Zählmethoden wurde bereits in vielen Studien untersucht und ist in der wissenschaftlichen Literatur gut dokumentiert [Taylor et al. 2006]. Um die Objektivität zu erhöhen, ist der Einsatz mehrerer Beurteiler notwendig, was wiederum mit einer erheblichen Steigerung des Arbeitsaufwandes einhergeht.

Um die Quantifizierung immunhistochemischer Präparate objektiver, reliabler und ökonomischerer zu gestalten, kommen in den letzten Jahren zunehmend digitale Bildanalysemethoden zum Einsatz. Bei diesen Verfahren werden die gefärbten Präparate zunächst digitalisiert und die interessierenden Strukturen aufgrund von Unterschieden in Größe, Gestalt, Dichte, Helligkeit, Textur und Farbe computergestützt vom Hintergrund separiert [Hughes, McCulloch 1991]. Die anschließende Quantifizierung der Präparate hinsichtlich dieser Merkmale erfolgt meistens ebenfalls computerunterstützt. Die Reliabilität und die Validität digitaler Bildanalysemethoden wurde bereits in verschiedenen Studien erfolgreich überprüft, beispielsweise von Beliën und Lehr [Beliën et al. 1999] [Lehr et al. 2001]. In Vergleichsstudien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass digitale Bildanalysemethoden unter bestimmten Bedingungen den traditionellen Quantifizierungsmethoden bezüglich Objektivität und Reliabilität überlegen sind [Beliën et al. 1999]. Außerdem ist der Arbeits- und Zeitaufwand bei der digitalen Bildanalyse vergleichsweise gering [Johansson et al. 2001] und es werden auch zunehmend ökonomischere Lösungen vorgeschlagen, bis hin zum Einsatz preiswerter Diascanner, die sogar die Anschaffung kostenintensiver Mikroskope und Digitalkameras erübrigen können [Elie et al. 2003]. In der wissenschaftlichen Fachliteratur scheint sich deshalb ein Konsens darüber zu etablieren, dass gut entwickelte und weitestgehend automatisierte digitale Bildanalysemethoden manuellen Zähl- und Schätzmethoden vorzuziehen sind. Dennoch wird davon ausgegangen, dass auch beim heutigen Stand der Forschung auf den meisten Stufen des Prozesses der Quantifizierung noch ein großes Potenzial zur Verbesserung besteht [Taylor et al. 2006] [Walker 2006].

Im Folgenden wird der Prozess der Quantifizierung mittels digitaler Bildanalyse in seiner Gesamtheit kurz beschrieben und die Probleme auf jeder Ebene dieses Prozesses dargestellt. Die Beschreibung ist der Zielstellung dieser Arbeit angepasst und

bleibt deshalb weitestgehend auf die für diese Arbeit wesentlichen Probleme beschränkt.

#### 1.2.1. Von der Entnahme der Probe bis zur Fixierung

Entsprechend der Differenzierung von Taylor lassen sich die Arbeitsschritte Entnahme der Gewebeprobe, Paraffineinbettung, Zuschnitt und Deparaffinisierung als ein erster Abschnitt des Quantifizierungsprozesses auffassen [Taylor et al. 2006]. Sollen später Hautmerkmale wie z.B. die Dicke der Hornschicht oder krankheitsbedingte Unterschiede von Proliferations- oder Differenzierungsmarkern quantifiziert werden, sind möglicherweise schon die Lokalisation und die Bedingungen der Entnahme der Gewebeprobe für das Messergebnis entscheidend. Bei der Analyse von krankheitsbedingten Unterschieden empfiehlt sich z.B. die Entnahme einer Probe gesunder und einer Probe krankhaft veränderter Haut vergleichbarer Lokalisation ein und desselben Patienten. Proben gesunder und krankhaft veränderter Haut von unterschiedlichen Personen sind nur eingeschränkt vergleichbar, unterscheiden sich die Lokalisationen zudem stark (z.B. Leisten- und Felderhaut), ist ein akzeptabler Vergleich weitestgehend ausgeschlossen. Nach der Entnahme der Probe können die Lagerungsdauer und -bedingungen, die Fixationszeit und Typ des Fixativs, die Paraffineinbettung, die Schnittdicke und der Anschnitt der Zellen beim Anfertigen der Präparate oder auch die Entparaffinisierung nachfolgende Schritte und damit letztendlich auch die Messergebnisse beeinflussen. Das Ausmaß dieser Einflüsse ist jedoch kaum untersucht und dementsprechend schwer einzuschätzen. Insgesamt gilt dieser erste Abschnitt als der am wenigsten standardisierte [Taylor et al. 2006].

#### 1.2.2. Immunhistochemie

Der zweite Abschnitt setzt sich nach Taylor aus den Arbeitsschritten der immunhistochemischen Färbung zusammen [Taylor et al. 2006]. Hier haben Variablen wie die Dauer und der Typ der Antigendemaskierung, die Spezifität und Konzentration des Antikörpers, die Inkubationszeit oder Merkmale des Chromogens einen Einfluss auf die Intensität der Färbung und somit auf das Messergebnis. Die Vorgehensweisen in diesem Abschnitt des Quantifizierungsprozesses sind jedoch weitestgehend standardisiert und in der Fachliteratur ausführlich diskutiert worden.

Eine weitgehende Konstanz der Messbedingungen kann durch den Einsatz von Färbautomaten erreicht werden. Wie umfangreiche Recherchen von Diaz zeigen, bestehen dennoch Variabilitäten immunhistochemischer Färbungen zwischen verschiedenen Laboren [Diaz, Sneige 2005]. Gegenstand der Untersuchungen von Diaz waren immunhistochemische Färbungen von Östrogen-Rezeptoren.

### 1.2.3. Digitalisierung

Während die Überlegungen zu den ersten beiden Abschnitten des Quantifizierungsprozesses manuelle Quantifizierungsmethoden und digitale Bildanalysen gleichermaßen betreffen, beginnen mit der Digitalisierung der Präparate die für digitale Bildanalysen spezifischen Probleme. So fällt z.B. eine ungleichmäßige Ausleuchtung des mikroskopierten Präparates bei der manuellen Quantifizierung durch die Adaptionsfähigkeit des menschlichen Auges möglicherweise weniger ins Gewicht. Hingegen wirken sich auch geringe Helligkeitsabweichungen unter Umständen gravierend auf die digitalen Bilddaten aus. Zum größten Teil unkontrollierbar sind Variabilitäten aufgrund der Eigenheiten verschiedener Aufzeichnungssysteme. Digitalkameras unterscheiden sich zum Teil ganz erheblich bei der Aufzeichnung und Weiterverarbeitung der Daten. Die Bildsensoren können beispielsweise nach unterschiedlichen Prinzipien arbeiten oder unterschiedliche Auflösungen, Kontrastumfänge, Farbtiefen oder spektrale Empfindlichkeiten aufweisen. Die von den Sensoren detektierten Informationen werden von unterschiedlichen Systemen mit verschiedenen Algorithmen weiter verarbeitet, bevor sie dem Anwender letztendlich als fertiges Bild zugänglich werden. Der Einfluss dieser Variablen ist schwer zu untersuchen, da kaum ein Labor über mehrere unterschiedliche Aufnahmesysteme verfügt und vergleichende Untersuchungen durchführen könnte. Dementsprechend ist in der Literatur auch keine Studie auffindbar, die verschiedene Kamerasysteme miteinander vergleicht.

### 1.2.4. Digitale Bildanalyse

Um immunhistochemisch gefärbte Strukturen quantifizieren zu können, muss die mit dem zu messenden Merkmal assoziierte Färbung von der Grundfärbung des Präparates isoliert werden. Die einfachste Vorgehensweise besteht darin, einen für den interessierenden Marker repräsentativen Farbbereich zu identifizieren und von diesem ausgehend, ähnliche Farbbereiche auszuwählen (z.B. mit dem „Zauberstab-

Werkzeug“ in Adobe Photoshop). Leider führt diese Methode oft nicht zu einer validen Auswahl der relevanten Bildbereiche. Eine zweite einfache Möglichkeit besteht in der Zerlegung eines RGB-Bildes in die drei Farbkanäle Rot, Grün und Blau. Im RGB-Farbraum wird die Färbung jedes Pixels eines Bildes durch abgestufte Werte auf den drei Farbkanälen Rot, Grün und Blau beschrieben. Dementsprechend enthält der Rotkanal alle roten, der Grünkanal alle grünen, und der Blaue alle blauen Bildinformationen. Kommt die relevante Färbung einem reinen Rot, Grün oder Blau nahe, so lassen sich die entsprechend gefärbten Gewebekomponenten in einem der Kanäle deutlich von den anderen Bildbereichen abgrenzen [Underwood et al. 2001] [Russ 1996]. Bei einer Umwandlung dieses Kanals in ein Graustufenbild ist die interessierende Färbung dann durch die dunkelsten Bildbereiche repräsentiert. Ist die Färbung jedoch eine komplexe Mischung, empfiehlt sich eine Umwandlung in ein Graustufenbild, bei der die Farbkanäle prozentual so gewichtet werden, dass die Trennung zwischen interessierender Färbung und irrelevanter Hintergrundfärbung maximal wird (z.B. mit dem Werkzeug „Kanalmixer“ in Adobe Photoshop). Eine dritte Möglichkeit der Separation der interessierenden Färbung basiert auf einer Umwandlung des Bildes von RGB-Modus in den HSI-Modus. Im HSI-Farbraum wird die Farbe eines Pixels durch einen Farbwert (hue), die Sättigung (saturation) und die Helligkeit (intensity) beschrieben (Abb.1). Die Farbwerte sind in diesem Farbraum auf einem kreisförmigen Kontinuum angeordnet und werden dementsprechend in Adobe Photoshop in Grad angegeben. Die Kanäle Sättigung und Helligkeit werden hingegen in % angegeben. Für einige Färbungen gelingt eine Separation auf der Grundlage von Farbwert und Sättigung besser als dies im RGB-Modus möglich ist [Russ 1996].

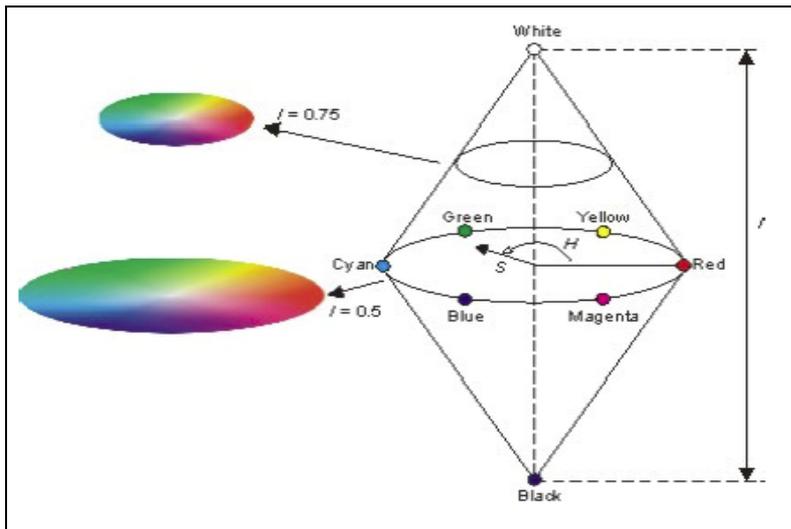


Abbildung 1: HSI Farbraum: Farbbeschreibung durch Hue (Farbton), Saturation (Sättigung) und Intensity (Intensität) [Quelle: Universität Münster, WS06/07, Seminar Bildverarbeitung, 7. Kapitel]

Bei allen drei Methoden muss die Beschreibung des relevanten Farbbereichs weit genug sein, um alle interessierenden Objekte einzuschließen und eng genug, um den irrelevanten Hintergrund auszuschließen. Dadurch entstehen oft Farbbeschreibungen, die spezifisch für nur ein Bild sind und die beim nächsten Bild schon nicht mehr die gewünschten Bereiche auswählen. Aus diesem Grund haben Underwood et al. eine subtraktive Methode vorgeschlagen, bei der die irrelevanten Hintergrundfarben sukzessive durch Weiß ersetzt werden, bis nur noch die relevanten angefärbten Strukturen im Bild enthalten sind [Underwood et al. 2001].

Welches dieser Verfahren am besten funktioniert, ist vom zu analysierenden Bildmaterial abhängig. Die Einstellungen sollten jeder spezifischen Färbung angepasst und vor der Anwendung an einer repräsentativen Bilderstichprobe getestet werden.

Nach der Separation vom Hintergrund ist es für viele Quantifizierungen notwendig, die Bilddaten so zu transformieren, dass die relevanten Färbungen in Form schwarzer Flächen vor weißem Hintergrund repräsentiert sind. Um zu einer solchen binären Darstellung zu gelangen, wird mit einem Schwellenwert festgelegt, ab welcher Intensität der Färbung oder ab welchem Grauwert eine Gewebekomponente als positiv für den zu bestimmenden Marker gelten soll und somit schwarz eingefärbt wird. Dieser Schwellenwert kann manuell für jedes Bild einzeln gewählt, für alle Bilder konstant gehalten oder automatisch bestimmt werden [Jagoe et al. 1991] [Johansson et al. 2001].

### 1.2.5. Quantifizierungen im Rahmen dieser Arbeit

Die Quantifizierung immunhistochemischer Präparate kann generell nach sehr unterschiedlichen Gesichtspunkten erfolgen. Die einfachste Form der Messung beinhaltet eine Aussage darüber, ob ein bestimmter Marker nachweisbar ist oder nicht. Nach diesem Prinzip erfolgt auch die Zählung angefärbter Gewebestrukturen wie z.B. die von Zellkernen. Eine Zählung beinhaltet für jeden Zellkern die Entscheidung, ob er für den relevanten Marker positiv ist oder nicht. Darüber hinaus kann es aber auch interessant sein, wie viel eines bestimmten Markers in einer Gewebeprobe nachweisbar ist. Als mögliche Maßzahlen können hier die Größe der angefärbten Fläche, die Intensität der Färbung oder eine Kombination aus beiden dienen [Walker 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit interessieren Quantifizierungen der Expression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern sowie die des NMDA-Rezeptors in der Epidermis. Bei dem Proliferationsmarker Ki67 liegt die immunhistochemische Reaktivität innerhalb der Zellkerne. Nach Inkubation mit dem Antikörper MIB-1 besteht die Quantifizierung dieser Zellen daher in einer Auszählung der MIB-1 positiven Kerne. In der Literatur erfolgen die Angaben über diese Anzahl mehrheitlich in der Einheit MIB-1-positive Kerne im Verhältnis zur Länge der Basalmembran. Aus diesem Grund stellt die Länge der Basalmembran ebenfalls ein zu quantifizierendes Merkmal dar [Bovenschen et al. 2005] [Lee et al. 2002]. Die Expression der Differenzierungsmarker sowie die des NMDA-Rezeptors sind nicht kernassoziiert und erfolgt mehr oder weniger gleichmäßig in der gesamten Epidermis. Als Messwerte können hier also die durchschnittliche Intensität der Färbung oder die Größe der positiven Fläche im Verhältnis zur vitalen Epidermis angegeben werden. Des Weiteren soll das Ausmaß der Verhornung bestimmt werden. Dies bedeutet neben einer rein qualitativen Beschreibung (Parakeratose / keine Parakeratose) auch eine Quantifizierung der Dicke bzw. der Fläche des Stratum corneum.

## 2. Fragen und Ziele der Arbeit

1) Das erste Ziel der Arbeit besteht darin, eine Verfahrensweise zu entwickeln, mit deren Hilfe sich immunhistochemisch nachgewiesene Strukturen zuverlässig quantifizieren lassen. Dieses Verfahren soll die Messung folgender Merkmale ermöglichen:

- Dicke und Fläche von Stratum corneum und vitaler Epidermis
- Länge der Basalmembran
- Expression des Proliferationsmarkers Ki67
- Expression der Differenzierungsmarker CK10, Involucrin und Filaggrin
- Expression des NMDA-Rezeptors

Darüber hinaus soll dieses Verfahren folgenden Ansprüchen genügen:

- Realisierung mit leicht zugänglicher und verbreiteter Software
- weitestgehende Unabhängigkeit vom Anwender durch automatisierte Messung
- hohe Reliabilität und Validität der Messung
- Nachvollziehbarkeit und Nutzbarkeit für andere Anwender

2) Weiterhin soll geprüft werden, ob mit Hilfe des entwickelten Verfahrens die aus der Literatur bekannten quantitativen Aussagen zur Präsenz von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut repliziert werden können

3) Das dritte Ziel der Arbeit besteht darin, die Rolle des NMDA-Rezeptors für die Verhornung zu untersuchen. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression keratinozytärer NMDA-Rezeptoren und morphologischen Besonderheiten der Verhornung?

Lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung keratinozytärer NMDA-Rezeptoren und der Expression bestimmter Differenzierungs- und Proliferationsmarker in Serienschnitten humaner paraffineingebetteter Haut nachweisen?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Untersuchtes Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben humaner Haut lichtmikroskopisch dargestellt und digital erfaßt. Für alle immunhistochemischen Färbungen wurden die Präparate nach ihrer Entnahme in 4% Formaldehyd fixiert und anschließend standardmäßig in Paraffin eingebettet. Dabei erfolgte die Untersuchung an gesunder Haut, sowie an entzündlichen und präkanzerösen Dermatosen. Die Proben gesunder Haut wurden im Rahmen von Varizenoperationen, Reduktionsplastiken, bei der Nachexzision maligner Melanome aus dem Randbereich der Operationspräparate oder aus dem Randbereich von Präkanzerosen gewonnen. Die Präparate der entzündlichen Dermatosen (Psoriasis vulgaris und Lichen ruber) sowie der Präkanzerosen entstammten der Routinehistologie von Patienten der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Bei den Präkanzerosen handelte es sich um aktinische Keratosen. Bei dieser Erkrankung lassen sich hinsichtlich der histologischen Ausprägung verschiedene Arten unterscheiden: hypertropher, atropher, bowenoider, akantholytischer und pigmentierter Typ, wobei in der vorliegenden Untersuchung aktinische Keratosen vom hypertrophen Typ untersucht wurden. Um insgesamt eine möglichst homogene Materialauswahl zu treffen, wurden nur Präparate ausgewählt, die vom Körperstamm oder von den proximalen Extremitäten entnommen worden waren. Bei allen Patienten war die Diagnose sowohl anhand des klinischen Bildes als auch anhand der Histologie im HE-Präparat gesichert worden. Ein positives Votum der Ethik-Kommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg liegt vor.

Tabelle 2: Immunhistochemisch untersuchte Paraffin-eingebettete Präparate

<b>Diagnose</b>	<b>Anzahl</b>
Normale Haut	n=20
Psoriasis vulgaris	n=22
Lichen ruber	n=23
Aktinische Keratosen	n=18

In der vorliegenden Untersuchung erfolgten vergleichende immunhistochemische Färbungen an Serienschnitten humaner, paraffineingebetteter Haut. Die Präparate wurden mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki-67 und mit Antikörpern gegen die Differenzierungsmarker Filaggrin, CK10 und Involucrin inkubiert und angefärbt. Im Anschluß daran wurden sie mit bereits vorliegenden Serienschnitten verglichen, die mit einem Antikörper gegen den NMDA-Rezeptor inkubiert und angefärbt worden waren. Die NMDA-Präparate waren dabei bereits für eine Studie zur Untersuchung von Glutamatrezeptoren hergestellt worden und wurden deshalb retrospektiv untersucht [Fischer 2004].

## **3.2. Immunhistochemie**

### **3.2.1. Immunhistochemischer Proliferationsmarker: Ki-67**

Das Ki-67 Antigen ist ein Protein, das in proliferierenden Zellen während aller aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird und somit als einer der wichtigsten Proliferationsmarker für die Wachstumsfraktion eines Gewebes gilt. Ein spezifischer Antikörper für dieses nukleäre Antigen ist MIB1. Es zeigt in proliferierenden Zellen eine starke Kernfärbung [Scholzen, Gerdes 2000].

Vor dem Einsatz des Antikörpers wurden die Präparate zunächst mit Xylol (2x10 Minuten) und im Weiteren mit absolutem Alkohol (2x5 Minuten) entparaffiniert. Im Anschluß daran erfolgte die Vorbehandlung mittels 10mM Citratpuffer in der Mikrowelle. Dabei wurden die Proben bei 600 Watt für 5min. erhitzt und nach 20 minütiger Abkühlung mit TBS gespült. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Maus-Antikörper (dianova GmbH, Hamburg) in der Konzentration 1:30 (Inkubationszeit: 1Stunde bei 37°C). Anschließend wurde 30min mit einem sekundären Mausantikörper inkubiert (Konzentration 1:100). Im Anschluß an diese Inkubation und Spülen mit PBS kamen kommerzielle Farbkomplexe zum Einsatz. Zunächst wurde dabei Elite-ABC zugesetzt (Vector Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA), gefolgt von einer AEC-Färbung (=3-Amino-9-Ethyl Carbazol) (DAKO AEC Substrat-Chromogen System; DAKO Corporation, Carpinteria, USA). Diese erfolgte unter Raumtemperaturen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat und AEC als Chromogen. Abschließend wurden die Präparate kurz (10 sec.) mit Hämalaun (1:4 in Aqua dest.) gegengefärbt, 10min mit Leitungswasser gebläut und mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

### 3.2.2. Immunhistochemischer Differenzierungsmarker: Filaggrin

Filaggrin gilt als ein wichtiger Differenzierungsmarker der Epidermis. Zur Vorbehandlung wurden die Präparate mit 0,1%iger Trypsinlösung inkubiert. Nachdem die Proben mit Leitungswasser und PBS gespült worden waren, kam der Primärantikörper (monoklonaler Maus-Antikörper Filaggrin (Ab-1), Clone FLG01, Oncogene Research Products, San Diego USA), in einer Verdünnung von 1:200 zum Einsatz. Als Sekundärantikörper diente ein Anti-Mouse IgG Antikörper in der Verdünnung 1:100 (Inkubationszeit: 30min bei Raumtemperatur) Im Anschluss daran erfolgte die Färbung wie unter 3.2.1. beschrieben.

### 3.2.3. Immunhistochemischer Differenzierungsmarker: CK 10

Zunächst erfolgte auch hier eine Vorbehandlung mit 10mM Citratpuffer, worin die Präparate für 20min erhitzt wurden. Nach dem Abkühlen folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (DE-K10, DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Konzentration von 1:50. Im Anschluß erfolgte die Färbung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat und AEC als Chromogen (DAKO AEC Substrat-Chromogen System; DAKO Corporation, Carpinteria, USA) wie bereits unter 3.2.1. beschrieben. Als Gegenfarbe diente Hämalaun in einer Verdünnung von 1:4 in Aqua dest., danach wurden die Präparate mit Glycerin-gelatine abgedeckt.

### 3.2.4. Immunhistochemischer Differenzierungsmarker: Involucrin

Wie bereits beschrieben sind mitotische Zellteilungen dem Bereich der Basalzellschicht vorbehalten. Zellen, die das Stratum basale verlassen, um sich der terminalen Differenzierung zu unterziehen, nehmen an Größe zu und bilden verschiedene Syntheseprodukte aus. Ein wichtiger Marker für die späteren Abschnitte der Differenzierung ist Involucrin, ein lösliches Vorläuferprotein der Cornified envelope. Nachdem die Keratinozyten das Stratum basale verlassen haben und zu wachsen beginnen, wird es calciumabhängig synthetisiert. In gesunder Haut ist das Protein zuerst in den oberen Abschnitten des Stratum spinosum zu finden, bevor es seine maximale Expression im Stratum granulosum zeigt.

Die Vorbehandlung der Präparate erfolgte mittels Trypsinandauung. Hierfür wurden die Proben in 0,1% Trypsinlösung für 15 min. bei 37°C inkubiert und anschließend mit Leitungswasser und TBS gespült. Im Anschluss daran wurde mit dem Involucrin-

Primärantikörper (Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Germany) für 1 Stunde inkubiert. Hierbei kam ein monoklonaler Mausantikörper vom IgG-Typ in einer Konzentration von 1:500 zur Anwendung. Als Sekundär-Antikörper diente ein biotinylierter Maus-Antikörper in der Verdünnung 1:100, mit dem die Präparate 30min behandelt wurden. Die Färbung erfolgte ebenfalls mit  $H_2O_2$  als Substrat und AEC als Chromogen (DAKO AEC Substrat-Chromogen System; DAKO Corporation, Carpinteria, USA) wie unter 3.2.1. beschrieben. Als Gegenfarbe diente Hämalaun (Verdünnung von 1:4 in Aqua dest.), im Anschluss daran wurden die Präparate ebenfalls mit Glyceringelatine abgedeckt.

### 3.2.5. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor)

Wie bereits unter 1.1.4. beschrieben, können beim NMDA-Rezeptor drei Untereinheiten unterschieden werden. Die NMDAR1-Einheit ist der konstante Bestandteil, die R2- und R3-Einheit sind variable Bestandteile des Rezeptors, weshalb zur immunhistochemischen Markierung des NMDA-Rezeptors ein gegen die R1-Einheit gerichteter monoklonaler Maus-Antikörper verwendet wurde (Clone 54.1, BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland). Dieser IgG2a-Anti-Nr1-Mausantikörper ist gegen ein Fusionsprotein (aa 660-811) von NMDAR1 gerichtet, welches die transmembranösen Regionen III und IV verbindet. Die Negativkontrollen wurden gleichartig mit einem Kontrollantikörper behandelt. Hierbei handelte es sich um einen Maus-IgG2a-Antikörper ohne Spezifität (Purified mouse IgG2a, Isotypkontrolle; BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland).

Zunächst erfolgte auch bei diesem Antikörper die Entparaffinisierung der Präparate mit Xylol und Alkohol. Anschließend wurden die Proben zur Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3%iger  $H_2O_2$ -Lösung (in 100% Methanol) für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Nach Zugabe eines 10mM Citratpuffers (pH 6,0) wurden die Präparate zur Antigendemaskierung bei 600 Watt 3 Mal für je 5 Minuten in einer Mikrowelle erhitzt und nachdem sie für 20 min abgekühlt worden waren mit einer Tris-gepufferten Salzlösung gespült. Im Anschluss daran wurden die Präparate für 15 Minuten bei 37 Grad Celsius mit einer 0,001%igen Trypsinlösung angedaut. Um die Hintergrundaktivität zu unterdrücken, wurden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Milchpulver versetzt (2g in 100ml PBS). Nach dieser Vorbehandlung kam der IgG2a-Anti-Nr1-Mausantikörper (in PBS)

zum Einsatz. Mit diesem wurden die Präparate für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS gespült. Als immunhistochemisches Detektionssystem wurde ein sekundärer biotinylierter Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 in PBS eingesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation und Spülen mit PBS wurde der ABC-Komplex zugesetzt, danach erfolgte die Färbung unter Raumtemperaturen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat und AEC als Chromogen. Auch hier wurden die Präparate abschließend mit Hämalaun in einer Verdünnung von 1:4 gegengefärbt, 10min in Leitungswasser gebläut und mit Glycingelatine eingedeckt.

### **3.3. Digitalisierung**

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch mit einer Vergrößerung von 12,5 untersucht. Um eine optimale Ausleuchtung jedes Präparates zu gewährleisten, wurde vor Beginn jeder neuen Aufnahmesitzung nach dem Köhlerschen Prinzip gearbeitet.

Die Digitalisierung wurde mit Hilfe eines Farb-Kamerasystems des Typs Spot Insight QE Color realisiert. Zur Aufnahme wurde mit der SPOT Steuer- und Auswertesoftware der Modus „Brightfield-transmitted-light“ gewählt, der vom Hersteller bei durchlichtmikroskopischer Betrachtung angefärbter Präparate auf gläsernen Objektträgern empfohlen wird.

Mit Hilfe der digitalen Bildanalyse sollten später die angefärbten Strukturen der Präparate quantifiziert werden, weshalb eine farbtreue Aufzeichnung von besonderer Wichtigkeit war. Um diese zu gewährleisten, wurde zu Beginn jeder neuen Aufnahmesitzung ein Weißabgleich mit einem Objektträger ohne Präparat durchgeführt. Da bei den Aufnahmen immer der gleiche Typ von Objektträgern und immer das gleiche Objektiv verwendet wurden, können dadurch bedingte Farbverfälschungen ausgeschlossen werden. Der Einfluss von Größen wie Spannungsschwankungen oder die Betriebsdauer der Lampe des Mikroskops auf die Farbtreue wurde minimiert, indem der Weißabgleich nach der Aufnahme von jeweils zehn Präparaten wiederholt wurde.

Die aufgenommenen Bilder haben eine Auflösung von 1600x1200 Pixel und wurden im JPG-Format mit geringer Komprimierung abgespeichert. Die Farbtiefe wurde auf 24 Bit pro Pixel, also auf acht Bit pro Kanal im RGB-Farbraum, eingestellt. Mit dem System sind auch Farbtiefen bis 48 Bit und eine kompressions- und somit verlust-

freie Speicherung im TIFF-Format möglich. Da aber noch nicht jedes Bildverarbeitungsprogramm solche hohen Farbtiefen unterstützt und die entsprechenden Dateien etwa den 16fachen Speicherplatzbedarf haben, mussten die entsprechenden Informationsverluste in Kauf genommen werden. Diese Informationsverluste wirken sich vor allem auf die Differenzierung feinsten Farbunterschiede aus. Da sich die weiteren Analysen der Bilder auf relativ weite Farbbereiche beziehen, ist der hieraus für die Messergebnisse zu erwartende Nachteil jedoch vernachlässigbar klein.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Serienschnitten einer Hautprobe zu gewährleisten, wurde bei der Digitalisierung darauf geachtet, möglichst äquivalente Ausschnitte der verschiedenen Präparate ein und derselben Hautprobe zu erfassen.

Die Messwerte der im Rahmen dieser Arbeit interessierenden Größen wurden anschließend durch eine digitale Analyse der aufgenommenen Präparate gewonnen. Da die Entwicklung der entsprechenden Bildanalysemethoden ein wichtiges Ziel dieser Arbeit ist, werden diese Methoden im Folgenden ausführlich dargestellt.

Mit Hilfe der entwickelten Bildanalyseverfahren wurden in allen Serienschnitten die Dicke und die Fläche des Stratum corneums und der vitalen Epidermis sowie die Länge der Basalmembran gemessen. Ebenso wurden die Expression der Differenzierungsmarker und des Proliferationsmarkers sowie der NMDA-Rezeptoren in der vitalen Epidermis ermittelt. Um Aussagen über eine mögliche Korrelation zwischen der Ausprägung von NMDA-Rezeptoren und der Ausprägung der Parakeratose zu untersuchen, wurden die Präparate qualitativ in solche mit Parakeratose und solche ohne Parakeratose unterteilt. Die Zuordnung in die erste Gruppe erfolgte bei einer parakeratotischen Verhornung von mehr als 50% der Epidermisoberfläche.

### **3.4. Auswertung mit digitaler Bildanalyse**

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der im Rahmen dieser Dissertation erarbeiteten Verfahrensweise zur digitalen Bildanalyse immunhistochemisch gefärbter Gewebestrukturen detailliert beschrieben. Als Software für die digitale Bildanalyse wurde Adobe Photoshop CS in Kombination mit Image Processing Toolkit Version 5 (Reindeer Graphics, Asheville, NC, USA) verwendet. Die Software Image Processing Toolkit ist ein Plugin für Adobe Photoshop, die entsprechenden Funktionen sind nach der Installation als Filter im Filtermenü von Adobe Photoshop verfügbar.

Die einzelnen Arbeitsschritte (Aktionen), die während der digitalen Bildanalyse nacheinander erfolgen, wurden aufgezeichnet und die Aktionssets als Datenfiles im Format \*.atn gespeichert. Diese Aktionssets ermöglichen zum einen einen automatisierten Arbeitsablauf, zum anderen lassen sie sich auch auf andere Rechner exportieren. Zur Veranschaulichung wird die Anleitung hierzu im Anhang A wiedergegeben. Darüber hinaus wurden die in einem erstellten Aktionsset angewandten Schritte zum besseren Verständnis in Textform dokumentiert. Diese Dokumentationen sind für alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten und verwendeten Aktionssets im Anhang B angegeben.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Aktionen werden alle Transformationen auf Kopien des zu analysierenden Bildes angewendet. Diese Kopien werden in Ebenen über dem Originalbild abgelegt. Das Originalbild liegt in der Hintergrundebene und wird zu keiner Zeit verändert. In der Palette „Ebenen“ von Adobe Photoshop (Abbildung 2f) können alle erstellten Ebenen ein- oder ausgeblendet, verschoben oder auch gelöscht werden. Wird die Palette „Ebenen“ nicht in Photoshop angezeigt, kann sie über Fenster > Ebenen aufgerufen werden. Am Ende der Bildanalyse können Originalbild und Ebenen gemeinsam in einer Datei gespeichert werden.

#### 3.4.1. Kalibrierung des Abbildungsmaßstabes

Um später die Längen- und Flächenmessungen in den gewünschten Einheiten vornehmen zu können, wurde die Aktion „Kalibrierung Abbildungsmaßstab“ erstellt. Bei der Ausführung dieser Aktion wird das entsprechende Bild automatisch auf einen Abbildungsmaßstab von 0,571 µm pro Pixel kalibriert.

#### 3.4.2. Einzeichnen der Basalmembran, der Ober- und Untergrenze des Stratum corneums

Zunächst werden die Begrenzungen der interessierenden Epidermisschichten (vitale Epidermis und Stratum corneum) eingezeichnet. Dazu wurden die drei Aktionen „Basalmembran“, „Obergrenze Stratum corneum“ und „Untergrenze Stratum corneum“ erstellt. Die Aktion „Basalmembran“ erstellt bei Ihrer Ausführung zunächst eine transparente Ebene mit dem Namen „Basalmembran“ über dem zu analysierenden Bild. Anschließend wird das Buntstiftwerkzeug von Photoshop ausgewählt und es erscheint die Meldung "Bitte zeichnen Sie die Basalmembran ein". Der An-

wender muss dann den Button "Anhalten" unter dieser Meldung betätigen und kann nun mit dem Cursor bei gedrückter linker Maustaste sorgfältig die Basalmembran mit einer schwarzen Linie von einem Pixel Breite nachzeichnen. Dabei ist unbedingt zu beachten, dass die eingezeichnete Linie nicht unterbrochen ist und am Bildrand beginnt und endet, da spätere Aktionen sonst nicht einwandfrei funktionieren. Die beiden Aktionen „Obergrenze Stratum corneum“ und „Untergrenze Stratum corneum“ funktionieren analog. Bis auf das Einzeichnen der Linien laufen alle beschriebenen Schritte automatisch ab. Werden alle drei Aktionen nacheinander ausgeführt und die entsprechenden Begrenzungen eingezeichnet, besteht die resultierende Bilddatei aus insgesamt vier Ebenen (Abbildung 2a-e). Die unterste Ebene ist die Hintergrundebene, in der das zu analysierende Bild liegt. Darüber folgen drei transparente Ebenen mit den Bezeichnungen „Basalmembran“, „Obergrenze Stratum corneum“ und „Untergrenze Stratum corneum“. In jeder dieser Ebenen liegt jeweils nur eine der die interessierenden Gewebestrukturen begrenzenden Linien. Die Ausführung dieser drei Aktionen kann in beliebiger Reihenfolge vorgenommen werden.

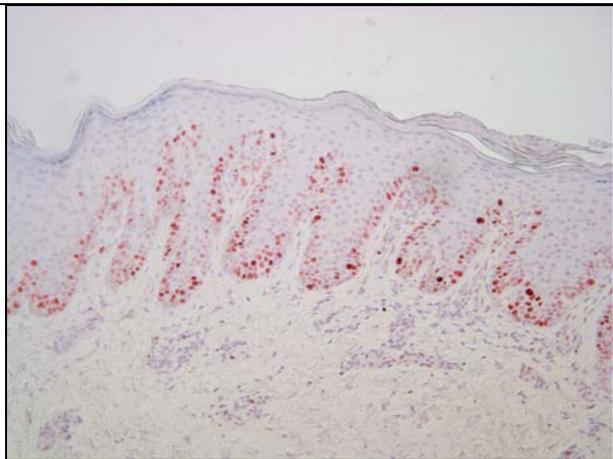


Abbildung 2a: Hintergrundebene mit dem zu analysierenden Bild (psoriatische Haut mit dem Proliferationsmarker MIB-1)

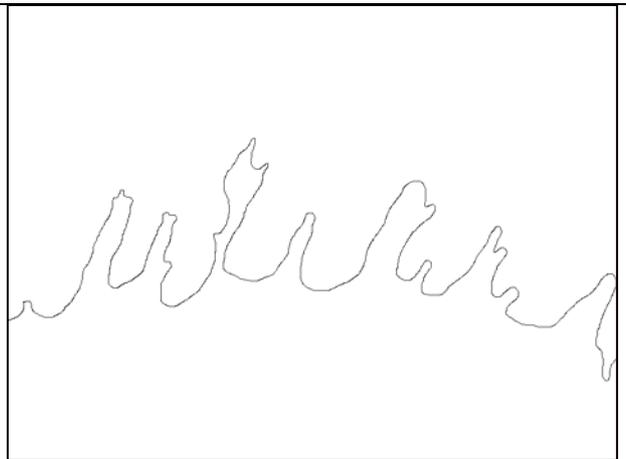
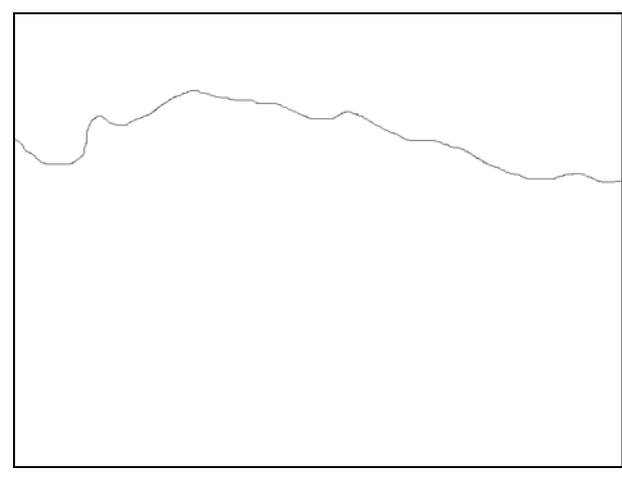
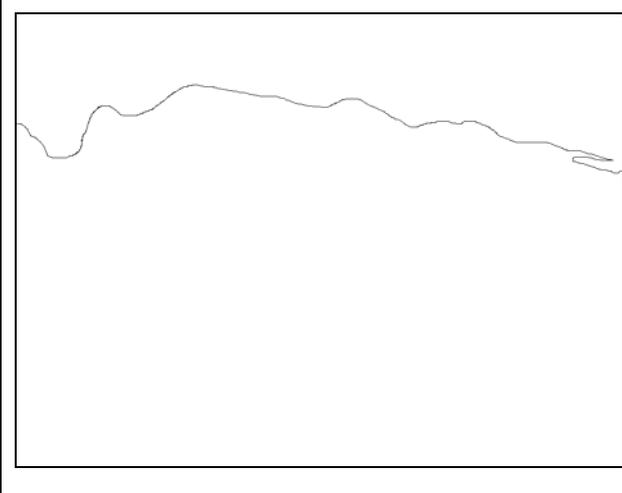
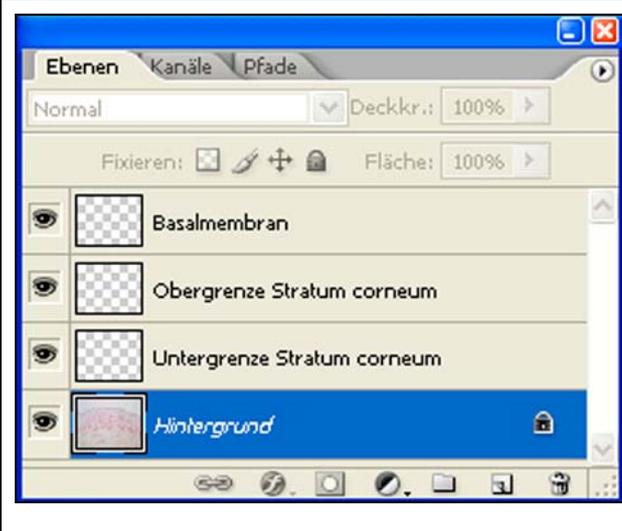


Abbildung 2b: Ebene „Basalmembran“

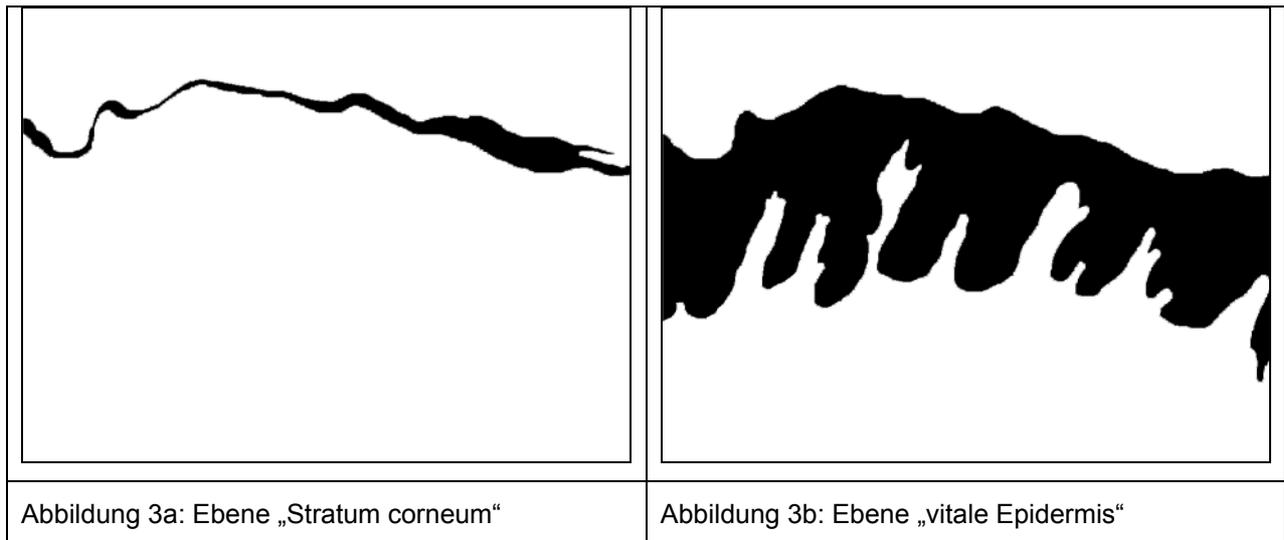
	
<p>Abbildung 2c: Ebene „Untergrenze Stratum corneum“</p>	<p>Abbildung 2d: Ebene „Obergrenze Stratum corneum“</p>
	
<p>Abbildung 2e: Ansicht des zu analysierenden Bildes mit allen eingeblendeten Ebenen</p>	<p>Abbildung 2f: Darstellung der Ebenen im Ebenenmenü von Adobe Photoshop</p>

### 3.4.3. Maskierung und Messung der Fläche von Stratum corneum und von vitaler Epidermis

Nachdem die begrenzenden Linien eingezeichnet sind, werden zwei weitere Ebenen erstellt, in denen die vitale Epidermis und das Stratum corneum als schwarze Flächen vor einem weißen Hintergrund dargestellt sind (Abbildung 3). Diese Ebenen werden zur Maskierung und zur Messung der Fläche dieser Hautschichten verwendet. Automatisiert wird die Erstellung der Ebenen mit Hilfe der Aktionen „Fläche vitale Epidermis“ und „Fläche Stratum corneum“. Wird die Aktion „Fläche vitale Epider-

mis“ ausgeführt, so wird zuerst eine Kopie der Ebene „Untergrenze Stratum corneum“ erstellt, die dann die Bezeichnung „vitale Epidermis“ erhält. Diese Ebene wird in den Vordergrund verschoben und anschließend mit einer Kopie der Ebene "Basalmembran" verschmolzen. Es resultiert also eine Ebene, in der die Begrenzungen der vitalen Epidermis, also die Basalmembran und die Untergrenze des Stratum corneum, eingezeichnet sind. Dann erfolgt die Meldung "Bitte das Zauberstab-Werkzeug auswählen und in die vitale Epidermis klicken". Hält der Anwender nun die Aktion an und kommt dieser Aufforderung nach, wird der Bereich innerhalb der Begrenzungen, also der Bereich der vitalen Epidermis, ausgewählt. Dabei ist besonders wichtig, dass die Option „benachbart“ des Zauberstab-Werkzeugs aktiviert ist, dass die Begrenzungslinien nicht unterbrochen sind und dass sie den Bildrand berühren. Wird beim Einsatz des Zauberstab-Werkzeugs mehr als nur der Bereich der vitalen Epidermis ausgewählt, ist eine dieser drei Bedingungen nicht erfüllt. Nach der Fortsetzung der Aktion durch erneutes Betätigen des Buttons „Ausführen“ wird die Fläche der vitalen Epidermis schwarz und der Hintergrund weiß gefärbt. Anschließend wird ein weißer Rand mit einer Breite von einem Pixel in die Ebene gelegt. Dies ist notwendig, da einige Messungen nur auf Objekte angewandt werden können, die den Bildrand nicht berühren. Mit den darauf folgenden Schritten wird eine Kopie der Ebene „vitale Epidermis“ erstellt, die den Namen „Fläche vitale Epidermis“ erhält. Auf diese Ebene wird der Filter „Label Features“ mit der Einstellung „Area“ angewendet. Dadurch wird die schwarz dargestellte Fläche der vitalen Epidermis gemessen und der entsprechende Messwert in der Einheit Quadratmikrometer einblendet. Sollte die zu messende Gewebekomponente in dem Bild z.B. durch die Wahl des Ausschnittes durch mehrere nicht miteinander verbundene Flächen repräsentiert sein, werden diese Flächen einzeln gemessen und dementsprechend mehrere Werte ausgegeben. In einem solchen Fall müssen die einzelnen Werte summiert werden.

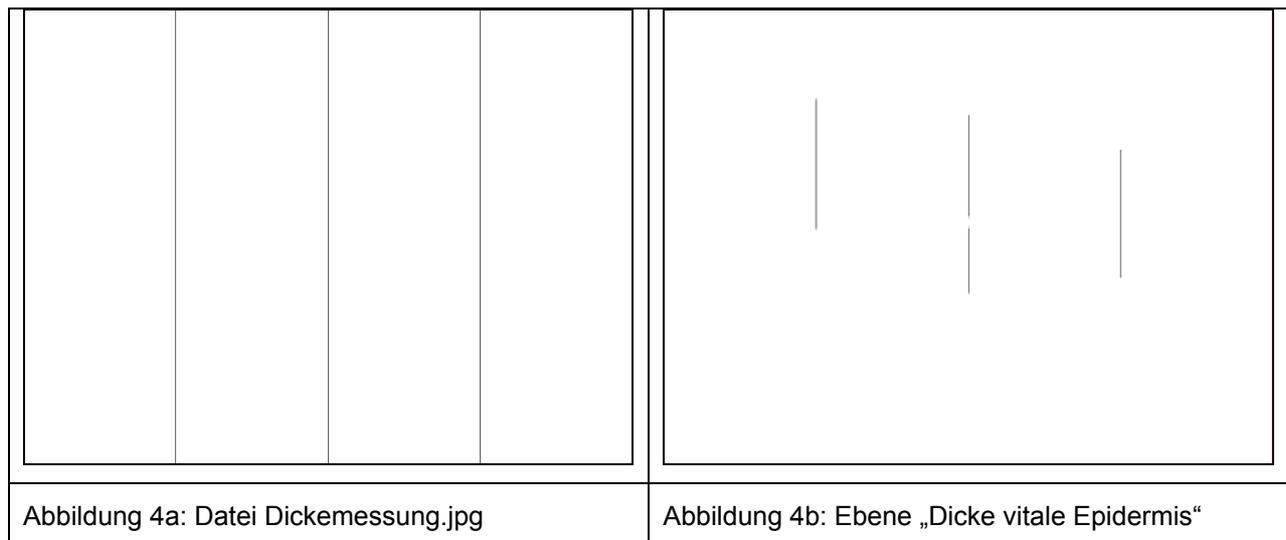
Die Aktion „Fläche Stratum corneum“ läuft analog ab, nur wird als Begrenzung statt der Basalmembran die Obergrenze des Stratum corneums verwendet. Alle beschriebenen Schritte werden automatisch ausgeführt, als einzige Ausnahme muss der Anwender in jeder der Aktionen einmal mit dem Zauberstab in die angezeigte Gewebestruktur klicken.



#### 3.4.4. Messung der Dicke der vitalen Epidermis und des Stratum corneums

Mit Hilfe der Aktionen „Dicke vitale Epidermis“ und „Dicke Stratum corneum“ werden zwei weitere Ebenen in das Bild eingefügt, die eine einfache und objektive Dickenmessung an drei verschiedenen Stellen ermöglichen. Zur Vorbereitung dieser beiden Aktionen wurde eine Bilddatei erstellt, in der drei senkrechte schwarze Linien einen weißen Untergrund mit der Größe der zu analysierenden Bilddateien in vier gleich große Abschnitte teilen (Abbildung 4a). Dieses Bild mit dem Namen Dickemessung.jpg muss vor der Ausführung der beiden Aktionen auf dem Computer auf dem Laufwerk C:\ gespeichert werden. Wenn die Aktion „Dicke vitale Epidermis“ ausgeführt wird, wird als erstes die Datei Dickemessung.jpg im Arbeitsspeicher abgelegt. Dann wird in der zu analysierenden Bilddatei eine neue Ebene mit dem Namen "Dicke vitale Epidermis" angelegt, in die das Bild Dickemessung.jpg eingefügt wird. Anschließend wird mit Hilfe der Ebene „vitale Epidermis“ der Teil der Linien gelöscht, der außerhalb der vitalen Epidermis liegt. Es resultiert eine weiße Ebene mit drei schwarzen Linien, die genau so lang sind, wie die vitale Epidermis an diesen Stellen dick ist (Abbildung 4b). Auf diese Ebene wird wiederum der Filter „Label Features“, in diesem Fall mit der Einstellung „Length“ angewendet. Dadurch wird die Länge der Linien gemessen und die entsprechenden Messwerte in der Einheit Mikrometer eingeblendet. Sollten eine oder mehrere der Linien unterbrochen sein, werden für die Teilstücke einzelne Werte ausgegeben, die wiederum zu addieren sind.

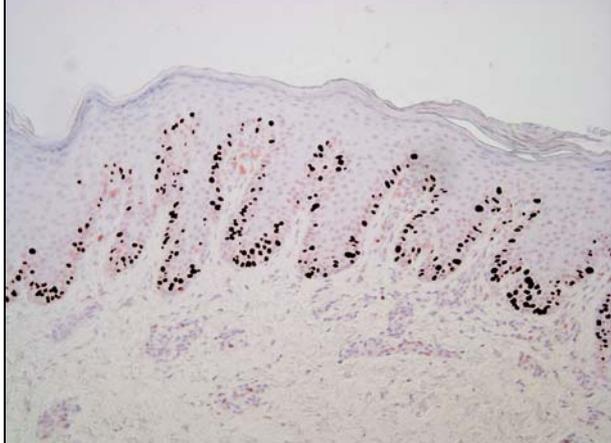
Die Aktion „Dicke Stratum corneum“ funktioniert nach dem gleichen Prinzip. Alle Schritte dieser Aktionen werden automatisch durchgeführt.

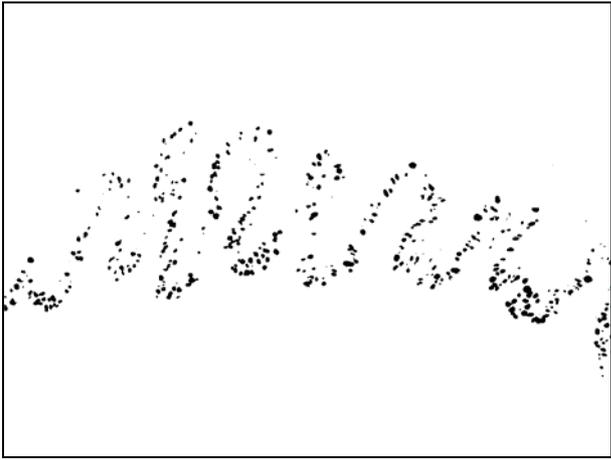
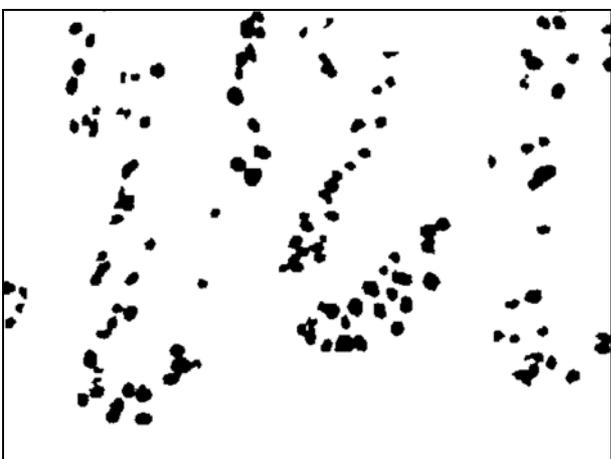


### 3.4.5. Auszählung positiver Zellkerne

Im Falle des Markers Ki-67 besteht die Quantifizierung in einer Auszählung MIB-positiver Zellkerne. Um mit der Software Image Processing Toolkit diese Auszählung vornehmen zu können, müssen diese positiven Zellkerne als separierte schwarze Punkte auf einem weißen Hintergrund dargestellt werden. Eine solche Darstellung wird mit Hilfe der Aktion „positive Zellkerne“ erreicht. Diese Aktion erstellt zunächst eine Ebene mit der Bezeichnung „positive Zellkerne“, in der eine Kopie des zu analysierenden Bildes abgelegt wird. Mit Hilfe der Ebene „vitale Epidermis“ werden dann alle Bildbereiche weiß gefärbt, die außerhalb der vitalen Epidermis liegen. Anschließend wird das Bild in dieser Ebene in ein Graustufenbild umgewandelt. Um die MIB-positiven Zellkerne möglichst differenziert abzubilden, gehen bei dieser Umwandlung die drei Farbkanäle mit unterschiedlicher Gewichtung in das Graustufenbild ein. Tests an einer repräsentativen Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Bilder haben gezeigt, dass eine sehr gute Differenzierung der rötlich gefärbten Zellkerne erreicht wird, wenn der Rotkanal mit -200% und Grün- sowie Blaukanal mit jeweils 170 % gewichtet werden. Anschließend erscheint eine Meldung mit der Aufforderung, einen Schwellwert so einzustellen, dass in dem zur visuellen Kontrolle eingeblendeten Farbbild alle MIB-positiven Zellen schwarz dargestellt werden. In der Ebene „positive Zellkerne“ werden durch diesen Arbeitsschritt alle Bildpunkte mit Grauwerten unterhalb dieses Schwellwertes schwarz, alle darüber werden weiß (Abbildung 5). Diese Umwandlung in ein binäres Bild führt zu einer Vielzahl kleiner schwarzer Punkte, die keine Zellkerne repräsentieren, bei der automatischen Aus-

zählung der Zellkerne aber mitgezählt werden würden. Darüber hinaus würden alle Zellkerne, die sich in dem binären Bild berühren, bei der Auszählung als nur ein Zellkern gezählt werden. Bei der Fortsetzung der Aktion „positive Zellkerne“ kommen deshalb die Filter „Watershed Segmentation“ und „Reject Features“ des Image Processing Toolkits zur Anwendung, wodurch überlappende Zellkerne voneinander separiert und schwarze Flecken mit einer Größe von weniger als 40 Bildpunkten gelöscht werden. Am Ende der Aktion erfolgt noch einmal eine visuelle Kontrolle. Dazu wird das zu analysierende Farbbild eingeblendet und die bei einer Zählung berücksichtigten Zellkerne werden schwarz umrandet angezeigt. Sollten zu viel oder zu wenig Zellkerne hervorgehoben sein, kann die Ebene „positive Zellkerne“ einfach gelöscht, die Aktion noch einmal ausgeführt, und der Schwellwert in die entsprechende Richtung korrigiert werden. Ebenso ist es in dieser Darstellung möglich, fälschliche Umrandungen von nicht-positiven Zellkernen mit dem Radiergummi-Werkzeug zu entfernen oder nicht umrandete positive Zellkerne nachträglich mit dem Buntstift-Werkzeug zu markieren. Bis auf die manuelle Einstellung des Schwellwertes und den möglichen abschließenden Korrekturen laufen alle beschriebenen Schritte automatisch ab. Um anschließend die Anzahl der positiven Zellkerne automatisch auszuzählen, ist der Filter „Count“ zu verwenden, der im Filtermenü unter „IP\*Measure Features“ zu finden ist.

	
<p>Abbildung 5a: Bild nach der der Umwandlung in Grauwerte</p>	<p>Abbildung 5b: Visuelle Kontrolle beim Einstellen des Schwellwertes</p>

	
<p>Abbildung 5c: Binäres Bild</p>	<p>Abbildung 5d: Letzte visuelle Kontrolle</p>
	
<p>Abbildung 5e: Detailaufnahme des binären Bildes</p>	<p>Abbildung 5f: Detail nach Anwendung der Filter Watershed Segmentation und Reject Features</p>

### 3.4.6. Messung der Länge der Basalmembran

Die Messung der Länge der Basalmembran wird mit Hilfe der Aktion „Länge Basalmembran“ realisiert. Bei der Ausführung dieser Aktion wird auf der Grundlage der Ebene „Basalmembran“ die Ebene „Länge Basalmembran“ erstellt. In dieser ist die Basalmembran vor einem weißen Hintergrund dargestellt und durch eine einen Pixel breite weiße Kontur vom Bildrand getrennt. Dies ermöglicht eine Längenmessung mit Hilfe des Filters „Label Features“. Da mit der Einstellung „Length“ nur gerade Linien korrekt gemessen werden, wird zur Messung der Basalmembran die Einstellung „Skeleton Length“ gewählt. Der Messwert für die Länge der Basalmembran wird

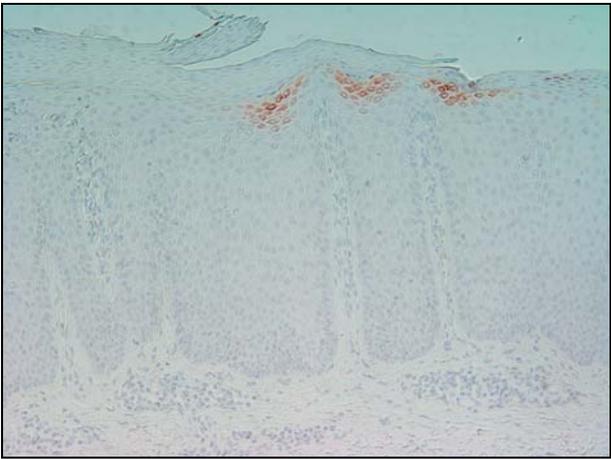
durch die Anwendung des Filters wiederum in der Einheit Mikrometer in die Ebene eingeblendet. Alle Schritte der Aktion laufen automatisch ab.

#### 3.4.7. Messung der angefärbten Fläche und der Intensität der Färbung

Durch die Aktionen „Fläche Färbung“ und „Intensität Färbung“ wird die Messung von Markern wie Cytokeratin 10, Involucrin und Filaggrin vorbereitet, deren immunhistochemische Reaktivität nicht im Zellkern, sondern im Zytoplasma am intensivsten ist. Bei der Aktion „Fläche Färbung“ wird ähnlich wie bei der Aktion „positive Zellkerne“ eine Kopie des zu analysierenden Bildes in einer neuen Ebene eingefügt und in ein Graustufenbild umgewandelt, wobei der Rotkanal wieder mit -200% gewichtet wird und Grün- sowie Blaukanal mit jeweils 170%. Diese Einstellungen sind das Ergebnis empirischer Untersuchungen über die optimale Darstellung der angefärbten Strukturen im Graustufenbild (wie bereits unter 3.4.5. beschrieben). Die Bildbereiche außerhalb der vitalen Epidermis werden auch bei dieser Aktion weiß gefärbt und das Graustufenbild wird in ein binäres schwarz-weiß-Bild umgewandelt. Der Schwellenwert wird hier vom Anwender nicht selbst eingestellt, sondern liegt immer bei einem Grauwert von 170. Anschließend wird wieder der Filter „Reject Features“ auf das Bild angewendet. Durch diese Arbeitsschritte entsteht eine Abbildung, in der die rötlichen Färbungen des zu analysierenden Bildes als schwarze Flächen dargestellt werden (Abbildung 6b). Diese schwarzen Flächen sind zumeist nicht miteinander verbunden. Da sie deshalb vom Image Processing Toolkit als einzelne Objekte erkannt werden, werden die Flächen auch einzeln gemessen und müssen anschließend summiert werden. Zur Messung empfiehlt sich deshalb der Filter „Measure All Features“, der im Filtermenü unter „IP\*Measure Features“ zu finden ist. Bei der Auswahl dieses Filters werden alle schwarz gefärbten Flächen hinsichtlich verschiedenster Merkmale gemessen. Die resultierenden Messergebnisse werden in einer Textdatei an einem frei wählbaren Ort auf dem Rechner gespeichert. Anschließend kann diese Textdatei z.B. in Microsoft Excel eingelesen werden und die gemessenen Flächen können automatisch in Excel addiert werden.

Die Aktion „Intensität Färbung“ funktioniert analog zur Aktion „Fläche Färbung“, allerdings wird die Aktion bereits mit der Umwandlung in ein Graustufenbild beendet und es erfolgt hier keine Umwandlung in ein binäres Bild mehr. Dementsprechend ist in der resultierenden Ebene „Intensität Färbung“ die rötliche Färbung in den Graustufen repräsentiert (Abbildung 6c). Am Ende der Aktion „Intensität Färbung“ wird

der Bereich der vitalen Epidermis ausgewählt und es erscheint die Meldung „Bitte wählen Sie zur Messung Filter > IP\*Measure Global > Brightness“. Nachdem der angegebene Arbeitsschritt durchgeführt wurde, erscheint ein Fenster, das unter anderem die Intensität (Int) der gewählten Fläche ausgibt. Dabei ist unbedingt zu beachten, dass sich die hier ausgegebene Intensität auf die Helligkeit und nicht auf die Färbung bezieht. In hellen Flächen werden demnach größere Intensitäten gemessen als in dunklen Flächen. Damit eine intensiver gefärbte Fläche einen größeren Wert erhält als eine weniger intensiv gefärbte Fläche, wird der gemessene Wert invertiert, indem er von 255 (dem maximalen Helligkeitswert) abgezogen wird. Durch die Fortsetzung der Aktion durch erneutes Betätigen des Buttons „Ausführen“ wird die Auswahl aufgehoben.

	
<p>Abbildung 6a: Zu analysierendes Bild mit Färbung des Differenzierungsmarkers Filaggrin</p>	<p>Abbildung 6b: Ebene „Fläche Marker“</p>
	
<p>Abbildung 6c: Ebene „Dichte Marker“</p>	

### **3.5. Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung der mit Hilfe der digitalen Bildanalyse ermittelten Messwerte wurden folgende Verfahren eingesetzt:

- t-Test für unabhängige Stichproben (Mittelwertsunterschiede zwischen gesunder Haut und den einzelnen Erkrankungen bezüglich Dicken-, Flächenmessung des Stratum corneum, der vitalen Epidermis, der Länge der Basalmembran, sowie der Expression der Proliferations- und Differenzierungsmarker und des NMDA-Rezeptors).

- Pearson-Korrelationen (Zusammenhang zwischen NMDA-Expression und Expression der Proliferations- und Differenzierungsmarker)

- Paralleltestreliabilitäten zwischen Dicken- und Flächenmessungen:

Da Korrelationen keine intervallskalierten Merkmale sind, wurden die Reliabilitäten vor der Durchschnittsbildung und der Auswertung des Mittelwertsunterschiedes Fischer-z transformiert, die Mittelwerte wurden anschließend Fischer-z rücktransformiert

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Dicke und Fläche der vitalen Epidermis und des Stratum corneum

Um das Ausmaß der Verhornung und der Hyperplasie der Epidermis zu ermitteln, wurden in jedem der fünf unterschiedlich gefärbten Serienschnitte einer Hautprobe die Dicke des Stratum corneum, die Fläche des Stratum corneum, die Dicke der vitalen Epidermis und die Fläche der vitalen Epidermis gemessen. Außerdem wurde in allen Serienschnitten die Länge der Basalmembran ermittelt.

Da sich die Messungen auf ein und dieselbe Hautprobe beziehen, stellen sie parallele Messungen desselben Merkmals dar und geben dementsprechend Auskunft über die Paralleltestreliabilität des jeweiligen Messverfahrens. Diese Paralleltestreliabilitäten sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Die durchschnittlichen Werte liegen zwischen 0,72 und 0,85. Alle in der Tabelle beschriebenen Messungen sind dementsprechend ausreichend reliabel. Die Reliabilitäten der Flächenmessungen erreichen fast durchgängig höhere Werte als die der Dickemessungen. Insgesamt ist dieser Reliabilitätsunterschied signifikant ( $p=0,015$ ). Damit sollte die Flächenmessung der Dickenmessung vorgezogen werden.

Tabelle 3: Paralleltestreliabilitäten der Dicke- und Flächenmessung von vitaler Epidermis und Stratum corneum sowie der Längenmessung der Basalmembran

	<b>Fläche vitale Epi- dermis</b>	<b>Dicke vitale Epi- dermis</b>	<b>Fläche Stratum corneum</b>	<b>Dicke Stratum corneum</b>	<b>Länge der Ba- salmembran</b>
$r_{\text{NMDA, Involucrin}}$	0,82	0,81	0,77	0,77	0,73
$r_{\text{NMDA, Filaggrin}}$	0,83	0,79	0,74	0,70	0,78
$r_{\text{NMDA, CK10}}$	0,78	0,72	0,88	0,86	0,63
$r_{\text{NMDA, MIB}}$	0,77	0,74	0,79	0,79	0,71
$r_{\text{Involucrin, Filaggrin}}$	0,88	0,86	0,84	0,84	0,74
$r_{\text{Involucrin, CK10}}$	0,92	0,85	0,80	0,79	0,72
$r_{\text{Involucrin, MIB}}$	0,83	0,80	0,79	0,78	0,65
$r_{\text{Filaggrin, CK10}}$	0,89	0,81	0,81	0,70	0,74
$r_{\text{Filaggrin, MIB}}$	0,82	0,76	0,87	0,78	0,71
$r_{\text{CK10, MIB}}$	0,88	0,83	0,81	0,76	0,73
<b>M</b>	<b>0,85</b>	<b>0,80</b>	<b>0,81</b>	<b>0,78</b>	<b>0,72</b>

## **Psoriasis**

Die typischen histologischen Merkmale der Psoriasis vulgaris mit einer im Vergleich zu gesunder Haut stärkeren Verhornung und einer Verbreiterung der vitalen Epidermis ließen sich in der vorliegenden Untersuchung auch quantitativ nachweisen. Eine stärkere Verhornung zeigte sich mit beiden Messmethoden, also sowohl mit Hilfe der Dickemessung des Stratum corneum (M=62,69µm für Psoriasis vulgaris vs. M=32,48µm für gesunde Haut, p=0,012) als auch mit Hilfe der Flächenmessung (58431,49µm<sup>2</sup> für PV vs. 29689,66µm<sup>2</sup> für GH, p=0,017). Des Weiteren fanden sich signifikante Unterschiede in der Dicke der vitalen Epidermis (M=246,05µm für PV vs. M=124,54µm für GH, p<0,001) und in der Flächenmessung der vitalen Epidermis (M=236135,65µm<sup>2</sup> für PV vs. 110421,97µm<sup>2</sup> für GH, p<0,001). Betrachtet man den relativen Anteil des Stratum corneum an der Gesamtepidermisdicke fanden sich keine Unterschiede zwischen Psoriasis vulgaris und gesunder Haut (M= 20,76% bei PV vs. 23,49% bei GH, p=0,461). Auch bezüglich des flächenmäßigen prozentualen Anteils waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Die Verlängerung der Reteleisten und die damit verbundene Verlängerung der Basalmembran (M=2458,81µm für PV vs. M=1446,53µm für GH, p<0,001) ließ sich ebenfalls nachweisen.

## **Lichen ruber**

Histologisch besteht bei dieser entzündlichen Hauterkrankung oft eine akanthotische Epidermis mit variabel verbreitertem Stratum corneum. Auch in der vorliegenden Untersuchung fand sich beim Lichen ruber eine im Vergleich zu normaler Haut signifikant größere Dicke (M=60,38µm bei Lichen ruber, M=32,48µm bei gesunder Haut, p=0,001) und eine größere Fläche des Stratum corneum (M=54969,84µm<sup>2</sup> bei LR, M=29689,66µm<sup>2</sup> bei GH, p=0,001). Auch die vitale Epidermis war beim Lichen ruber verbreitert. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu gesunder Haut fanden sich sowohl in Bezug auf die Dicke der vitalen Epidermis (M=200,08µm bei LR vs. M=124,54µm bei GH, p=0,008) als auch in Bezug auf die Fläche (M=181782,43µm<sup>2</sup> bei LR, M=110421,97µm<sup>2</sup> bei GH, p=0,004). Bezüglich des relativen Anteils des Stratum corneum an der Gesamtepidermisdicke bzw. -fläche ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Lichen ruber und gesunder Haut aufzeigen (M= 23,11% bei LR vs. 23,49% bei GH, p=0,894).

Ein Vergleich der Dicke bzw. der Fläche des Stratum corneums zwischen Lichen ruber und Psoriasis vulgaris brachten keine signifikanten Mittelwertsunterschiede. In der Flächenmessung der vitalen Epidermis zeigte die Psoriasis im Vergleich zum Lichen ruber tendenziell höhere Werte ( $M=236135,65\mu\text{m}^2$  bei PV,  $M=181782,42\mu\text{m}^2$  bei LR,  $p=0,054$ ), verfehlt jedoch knapp das Signifikanzniveau.

### **Aktinische Keratose**

In der vorliegenden Untersuchung wurden Aktinische Keratosen vom hypertrophen Typ untersucht, deren histologisches Merkmal eine Hyperkeratose mit parakeratotischen Anteilen ist. Die Epidermis ist zumeist deutlich verdickt. Diese histologischen Merkmale konnten durch die quantitative Analyse reproduziert werden. Die durchschnittliche Dicke des Stratum corneum bei aktinischen Keratosen betrug dabei  $M=125,04\mu\text{m}$  vs.  $M=32,48\mu\text{m}$  für gesunde Haut,  $p<0,001$  und war somit deutlich verbreitert. Auch die Mittelwerte der Flächen zeigten einen hochsignifikanten Unterschied ( $M=112484,70\mu\text{m}^2$  bei AK,  $M=29689,66\mu\text{m}^2$  bei GH,  $p<0,001$ ). Signifikante Unterschiede ließen zudem in der Dickenmessung der vitalen Epidermis ( $M=166,43\mu\text{m}$  bei AK vs.  $M=124,54\mu\text{m}$  für GH,  $p<0,001$ ) und in der Flächenmessung der vitalen Epidermis aufzeigen ( $M=152157\mu\text{m}^2$  für AK vs.  $110421,97\mu\text{m}^2$  für GH,  $p=0,035$ ). Der relative Anteil des Stratum corneum an der Gesamtepidermisdicke war bei aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut deutlich erhöht. Signifikante Unterschiede waren dabei sowohl in der Dickenmessung ( $M=39,72\%$  bei AK vs.  $23,49\%$  bei GH,  $p<0,001$ ) als auch in der Flächenmessung nachweisbar ( $M=39,27\%$  bei AK vs.  $23,56\%$  bei GH,  $p<0,001$ ). Die Länge der Basalmembran unterschied sich nicht signifikant zu der von gesunder Haut.

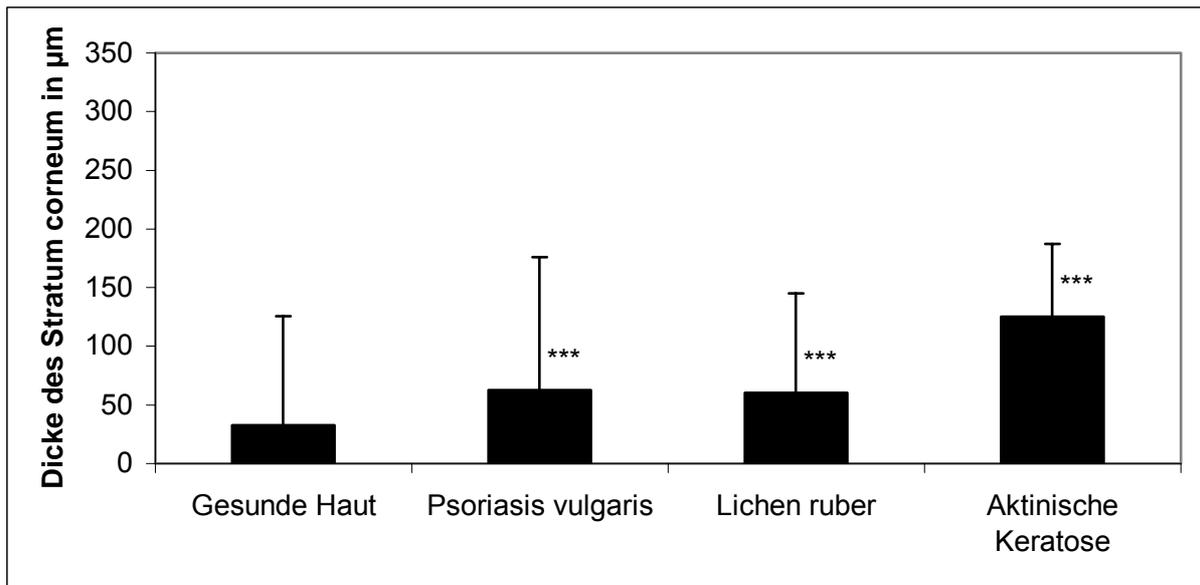


Abbildung 7: Dicke des Stratum corneum in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikante Verbreiterung des Stratum corneum bei Psoriasis vulgaris, Lichen ruber und aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut (\*\*\*) für  $p \leq 0,001$ )

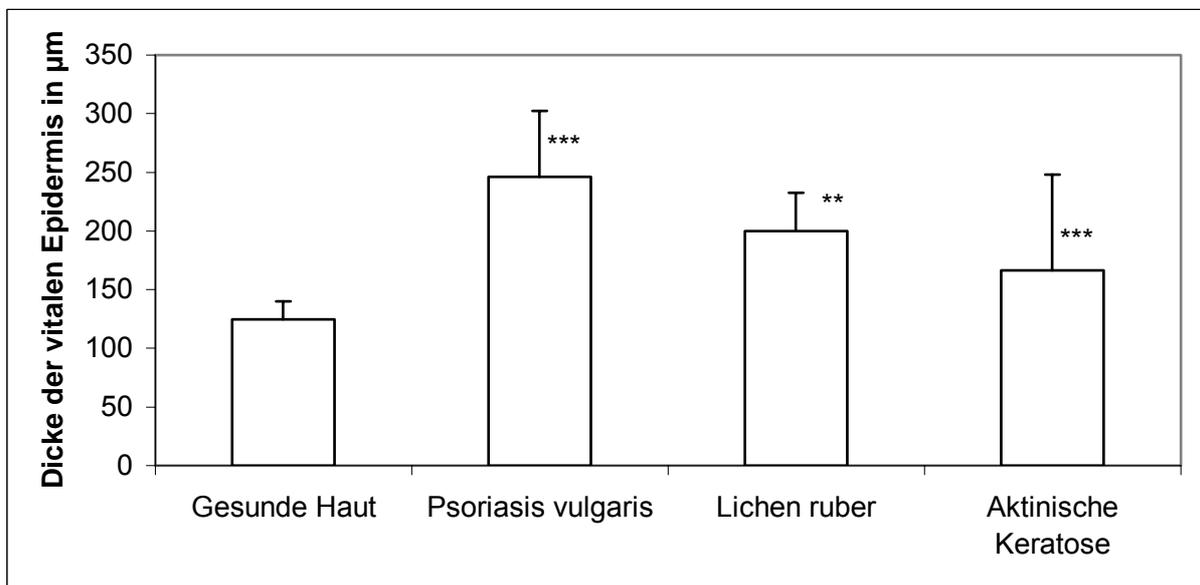


Abbildung 8: Dicke der vitalen Epidermis in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikante Verbreiterung der vitalen Epidermis bei Psoriasis vulgaris, Lichen ruber und aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut (\*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ )

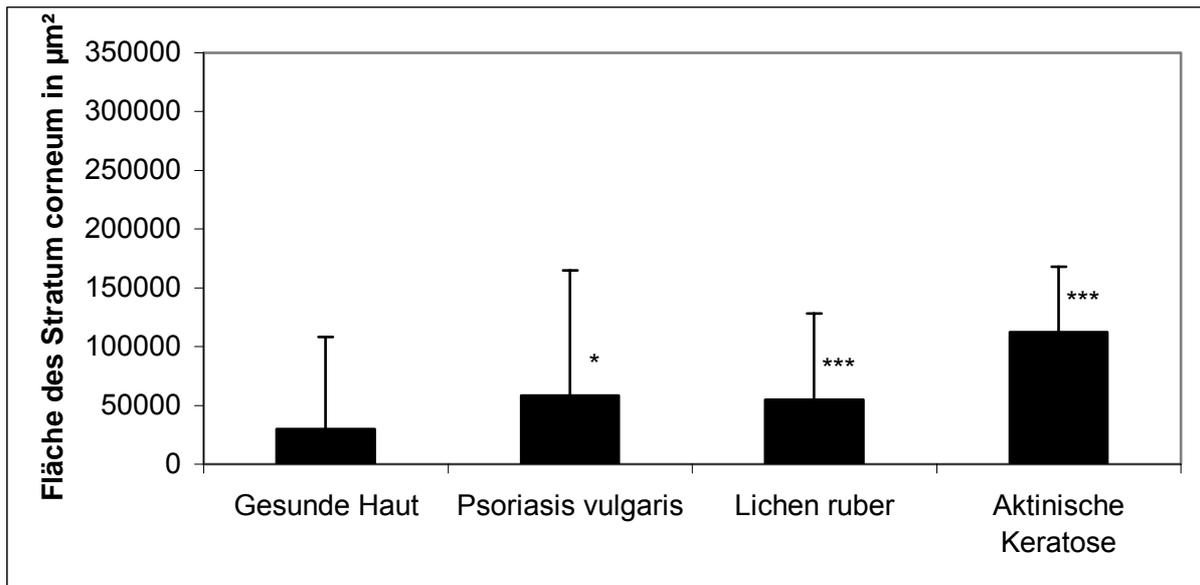


Abbildung 9: Fläche des Stratum corneum in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikante Verbreiterung des Stratum corneum bei Psoriasis vulgaris, Lichen ruber und aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut (\* für  $p \leq 0,05$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ )

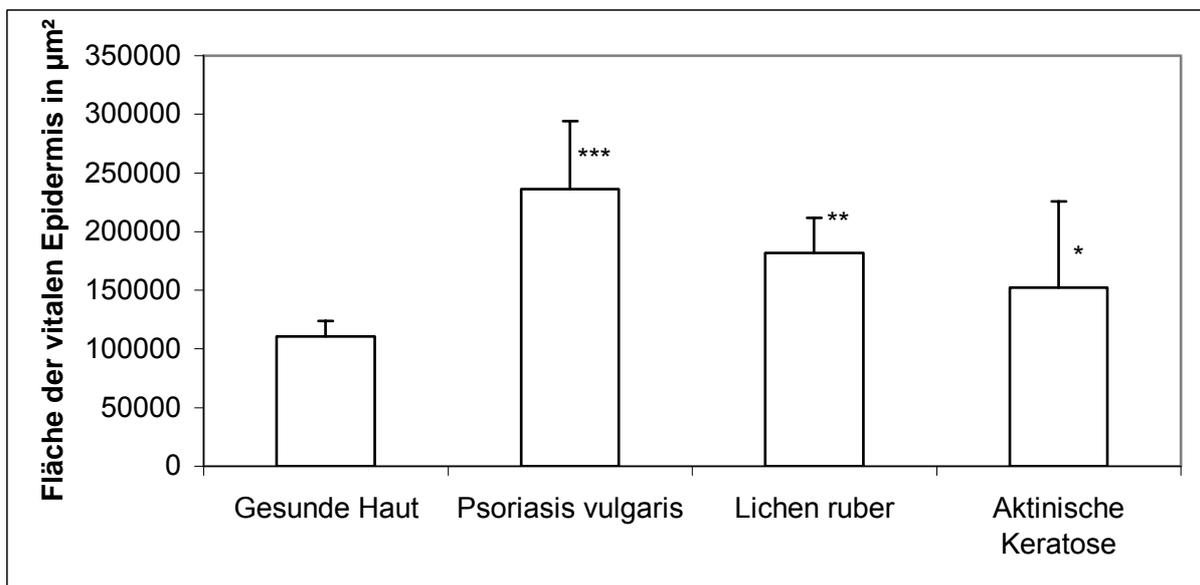


Abbildung 10: Fläche der vitalen Epidermis in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikante Verbreiterung der vitalen Epidermis bei Psoriasis vulgaris, Lichen ruber und aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut (\* für  $p \leq 0,05$ , \*\* für  $p \leq 0,01$  und \*\*\* für  $p \leq 0,001$ )

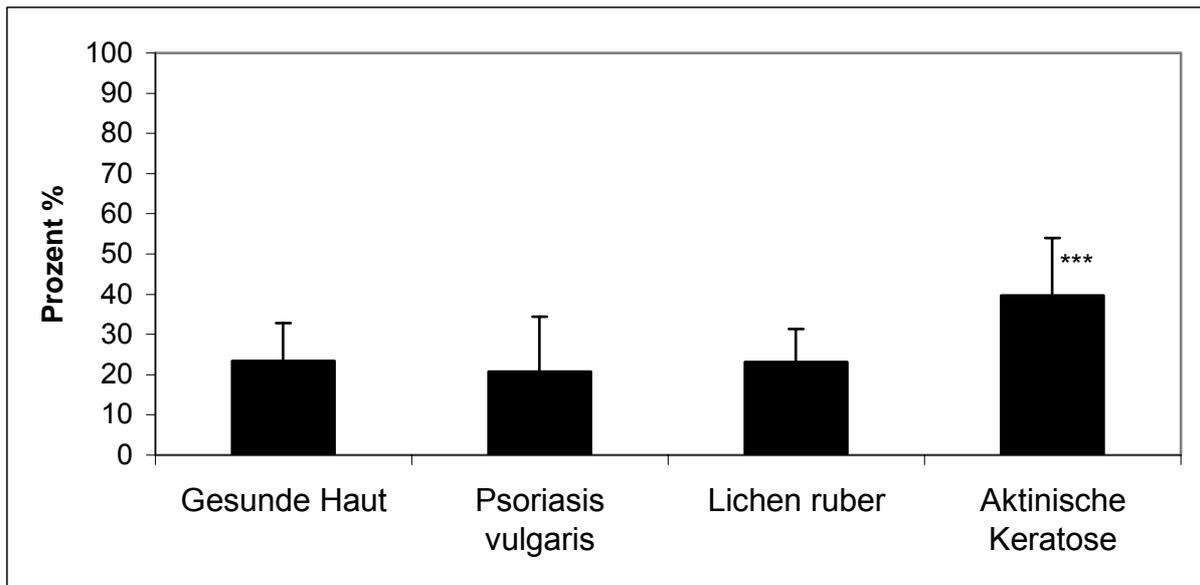


Abbildung 11: Prozentualer Anteil der Dicke des Stratum corneum an der Dicke der gesamten Epidermis in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikante Verbreiterung des Stratum corneum bei Aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut (\*\*\*) für  $p \leq 0,001$ )

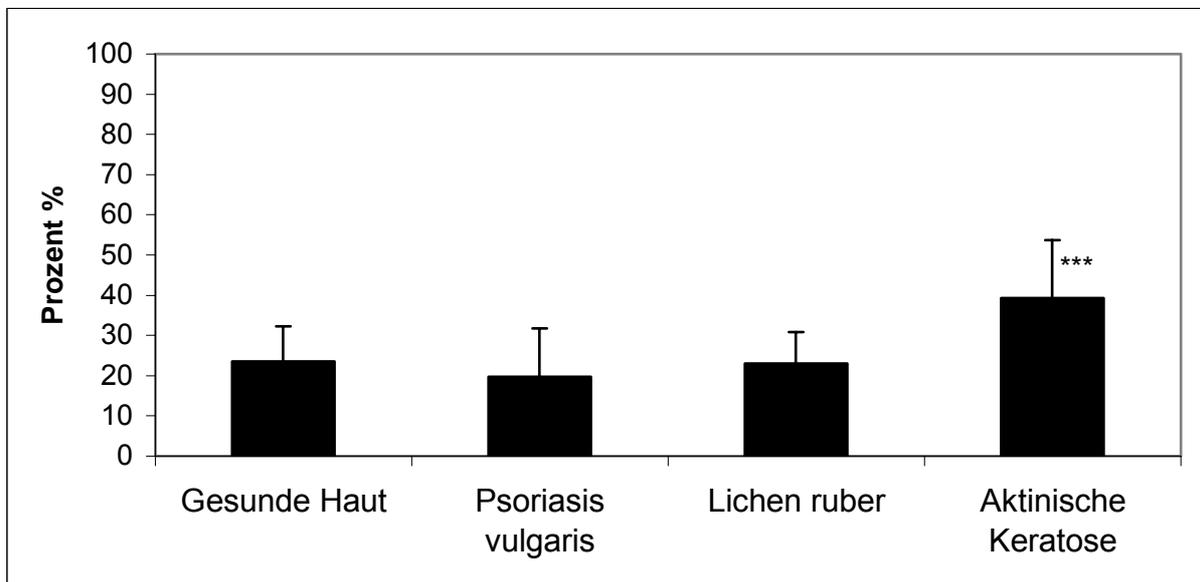


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der Fläche des Stratum corneum an der Fläche der gesamten Epidermis in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikante Vergrößerung des Stratum corneum bei Aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut (\*\*\*) für  $p \leq 0,001$ )

## **4.2. Expression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder Haut, entzündlichen Dermatosen und Präkanzerosen**

Da wir daran interessiert waren, wie sich gesunde Haut von krankhafter Haut bezüglich der Expression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern unterscheidet, werden im Folgenden nur die Mittelwertsunterschiede zwischen gesunder Haut einerseits und den verschiedenen Hautkrankheiten andererseits auf Signifikanz getestet. Da bezüglich der zu erwartenden Mittelwertsunterschiede gerichtete Hypothesen vorliegen, wurde einseitig getestet. Die Angaben der Expression der Differenzierungsmarker erfolgt sowohl hinsichtlich ihrer flächenmäßigen Ausprägung (Angaben in %), als auch hinsichtlich der Intensität ihrer Anfärbung. Nach Umwandlung in ein Graustufenbild reichten die Messwerte der Intensität von 0 (schwarz) bis 255 (weiß). Für eine verständlichere graphische Darstellung wurde der gemessene Wert jedoch invertiert, indem er von 255 (dem maximalen Helligkeitswert) abgezogen wurde. Damit erhält eine intensiver gefärbte Fläche einen größeren Wert als eine weniger intensiv gefärbte Fläche.

### **Gesunde Haut**

MIB-1 positive Zellen ließen sich in gesunder Haut im Stratum basale nachweisen. Die übrigen Anteile der Epidermis zeigten erwartungsgemäß keine positive Reaktion (Abbildung 13). Filaggrin ließ sich bandförmig in den oberen Epidermisschichten mit besonders intensiver Anreicherung im Stratum granulosum darstellen (Abbildung 14). Cytokeratin 10 konnte in allen Anteilen der Epidermis nachgewiesen werden, mit der optisch intensivsten Anfärbung und somit der stärksten Expression in den suprabasalen Anteilen (Stratum spinosum) (Abbildung 15). Involucrin fand sich in den oberen Epidermisanteilen, d.h. im oberen Stratum spinosum und im Bereich des Stratum granulosum (Abbildung 16).

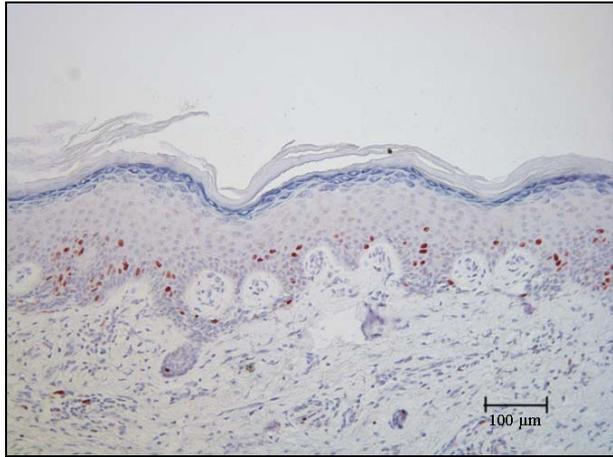


Abbildung 13: MIB-1 in gesunder Haut

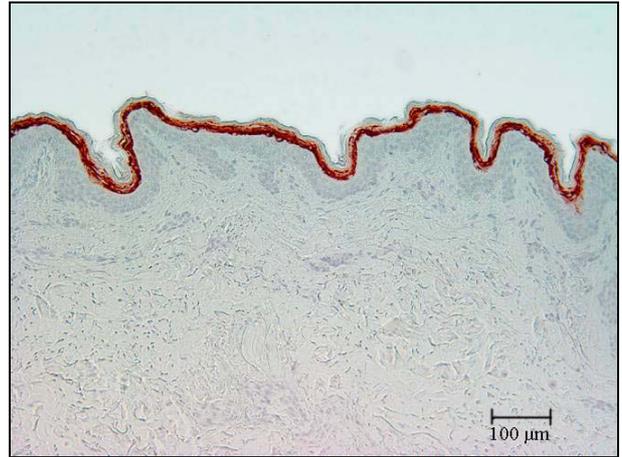


Abbildung 14: Filaggrin in gesunder Haut

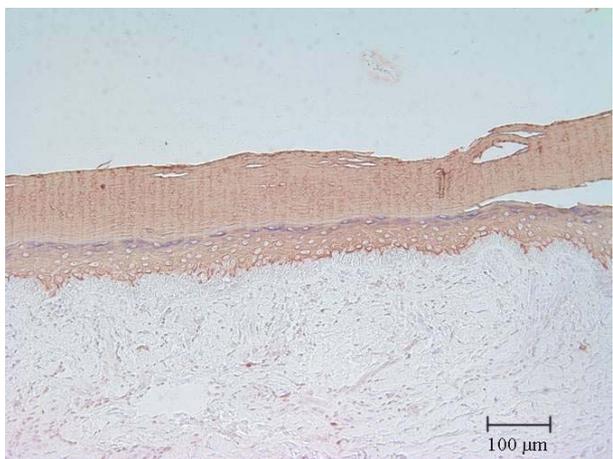


Abbildung 15: CK10 in gesunder Haut

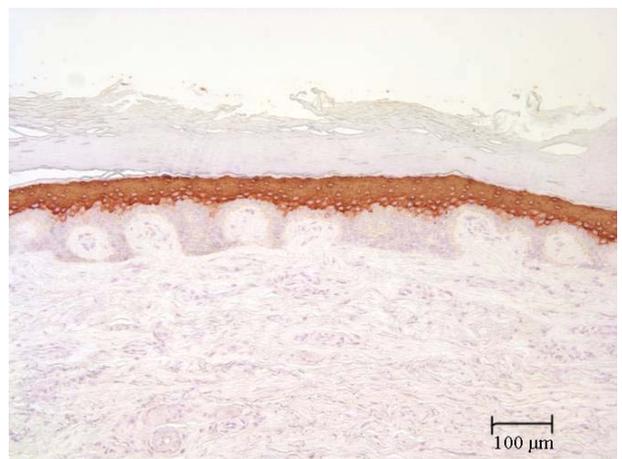


Abbildung 16: Involucrin in gesunder Haut

### Psoriasis vulgaris

In psoriatischer Haut ließen sich MIB1-positive Zellen auch in suprabasalen Schichten aufzeigen. Quantitativ ließ sich dabei eine im Vergleich zu normaler Haut signifikant erhöhte Zahl MIB1-positiver Zellen nachweisen ( $M=136,35$  bei Psoriasis vulgaris,  $M=52,47$  bei gesunder Haut,  $p<0,001$ ). Auch in der Anzahl MIB1 positiver Zellen pro mm Basalmembran fanden sich in der vorliegenden Studie signifikante Ergebnisse ( $M=62,4/\text{mm}$  bei PV vs.  $36,6/\text{mm}$  bei GH,  $p=0,009$ ) (Abbildung 17).

Das Verteilungsmuster der Differenzierungsmarker entsprach dem gesunder Haut, in der quantitativen Ausprägung fanden sich jedoch Unterschiede. Der Differenzierungsmarker Filaggrin wurde im Vergleich zu normaler Haut bei Psoriasis signifikant

weniger exprimiert. Dieser Unterschied war sowohl im Bezug auf die Intensität (M=9,11 bei PV vs. M=30,38 bei GH,  $p=0,002$ ) als auch in der flächenmäßigen Ausprägung nachweisbar. Hierzu erfolgen die Angaben in Prozent der Filaggrin-positiven Fläche pro Fläche vitaler Epidermis mit einem signifikanten Mittelwertsunterschied zwischen Psoriasis vulgaris und gesunder Haut (M=2,70% für PV, vs. M=13,10% für GH,  $p<0,001$ ) (Abbildung 18).

Die Expression von Cytokeratin 10 war im Vergleich zu normaler Haut in ihrer Intensität tendenziell erniedrigt (M=77,6 für PV, M=96,9 bei GH,  $p=0,076$ ), die CK10 positive Fläche pro Fläche vitaler Epidermis zeigte dagegen keine signifikanten Mittelwertsunterschiede (M=43,5% bei PV, M= 52,43% bei GH,  $p=0,448$ ) (Abbildung 19).

Der frühe Differenzierungsmarker Involucrin war bei Psoriasis vulgaris bereits in tieferen Epidermisanteilen nachweisbar (Abbildung 20), die quantitativen Analysen zeigten jedoch inhomogene Ergebnisse. Eine tendenziell vermehrte Expression fand sich bezüglich der Intensität der Färbung (M=99,87 für PV, vs. M=86,16 für GH,  $p=0,087$ ). Dagegen fand sich in der prozentualen flächenmäßigen Ausprägung eine signifikant geringere Expression (M=29,4 bei PV, 43,2 bei GH,  $p=0,013$ ).

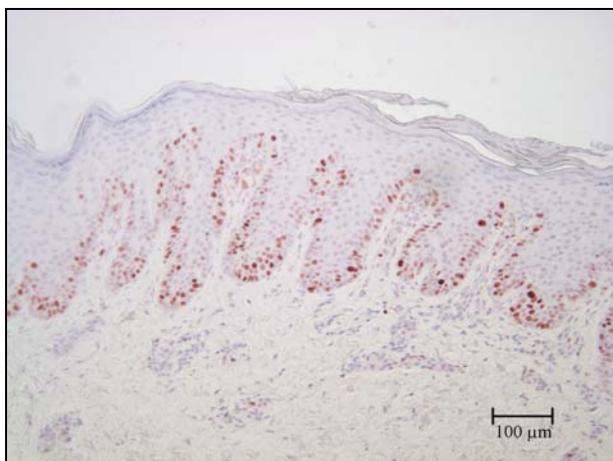


Abbildung 17: MIB-1 in psoriatischer Haut

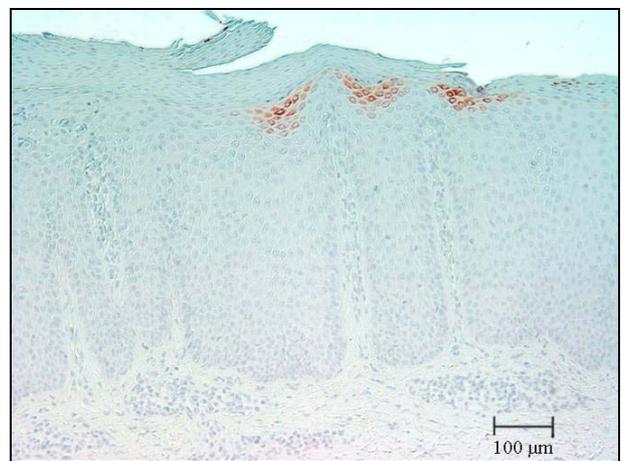


Abbildung 18: Filaggrin in psoriatischer Haut



Abbildung 19: CK10 in psoriatischer Haut

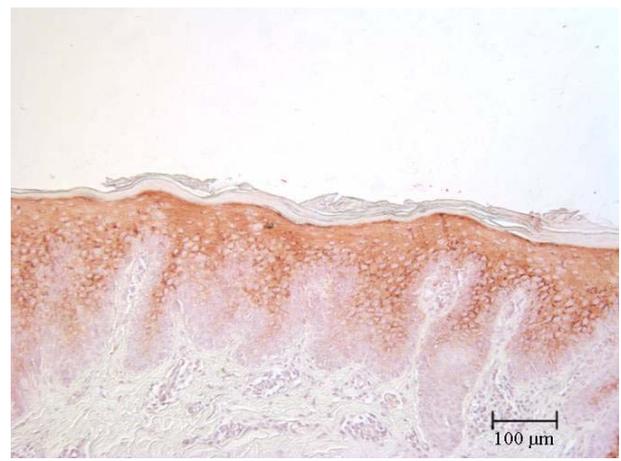


Abbildung 20: Involucrin in psoriatischer Haut

### Lichen ruber

Wie bei der Psoriasis vulgaris waren beim Lichen ruber MIB1-positive Zellen auch suprabasal sichtbar (Abbildung 21). Die quantitative Analyse zeigte eine im Vergleich zu normaler Haut signifikant erhöhte Anzahl MIB1-positiver Zellen ( $M=108,04$  bei Lichen ruber,  $M=52,47$  bei gesunder Haut,  $p=0,010$ ). Auch die Anzahl MIB1-positiver Zellen pro mm Basalmembran war im Vergleich zu normaler Haut signifikant erhöht ( $M=62,4$  bei LR vs.  $36,6$  bei GH,  $p=0,046$ ). Das Verteilungsbild der Differenzierungsmarker Filaggrin und CK 10 stimmte mit dem gesunder Haut und dem der Psoriasis vulgaris überein. Für den späten Differenzierungsmarker Filaggrin fand sich eine höhere Expression beim Lichen ruber im Vergleich zu gesunder Haut. Dies ließ sich signifikant für die Intensität ( $M=64,70$  bei LR,  $30,38$  bei GH,  $p<0,001$ ) nachweisen. Für die flächenmäßige Ausprägung waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar ( $M=16,64\%$  bei LR,  $13,09\%$  bei GH,  $p=0,317$ ). Cytokeratin10 wurde beim Lichen ruber geringer als in gesunder Haut exprimiert. Signifikante Ergebnisse fanden sich hierbei sowohl bezüglich der Intensität ( $M=67,48$  bei LR vs.  $96,90$  bei GH,  $p=0,031$ ) als auch im Bezug auf die Fläche ( $M=30,89\%$  bei LR vs.  $M=52,43\%$  bei GH,  $p=0,034$ ). Involucrin wurde beim Lichen ruber bereits in etwas tiefer gelegenen Anteilen der vitalen Epidermis exprimiert. Signifikante Unterschiede zu gesunder Haut fanden sich jedoch weder in der Intensität der Färbung noch in der Fläche der angefärbten Keratinozyten.

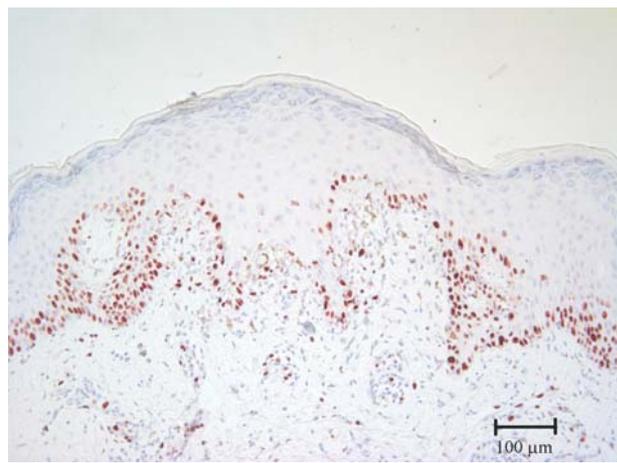


Abbildung 21: MIB-1 bei Lichen ruber

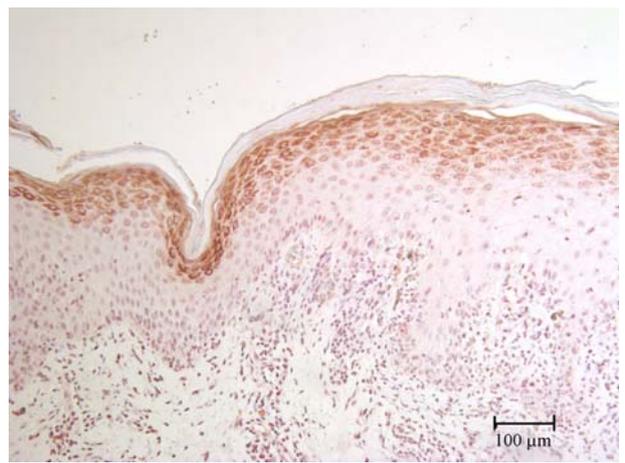


Abbildung 22: Filaggrin bei Lichen ruber

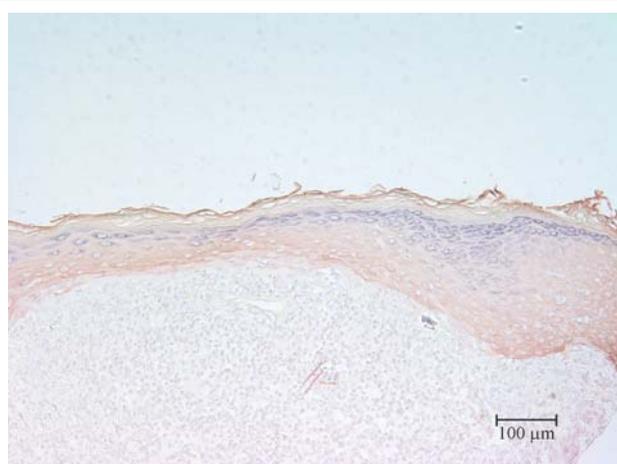


Abbildung 23: CK10 bei Lichen ruber

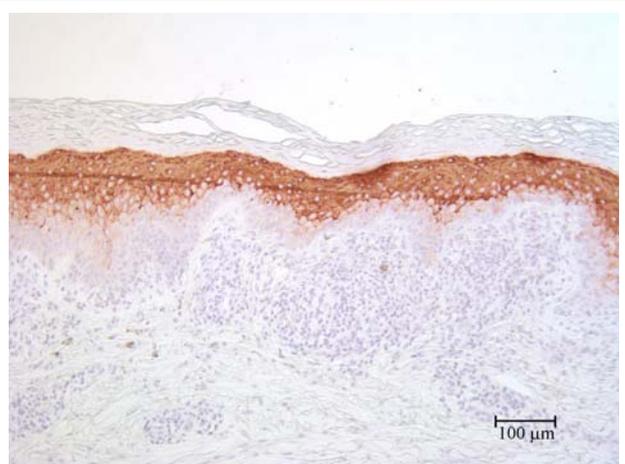


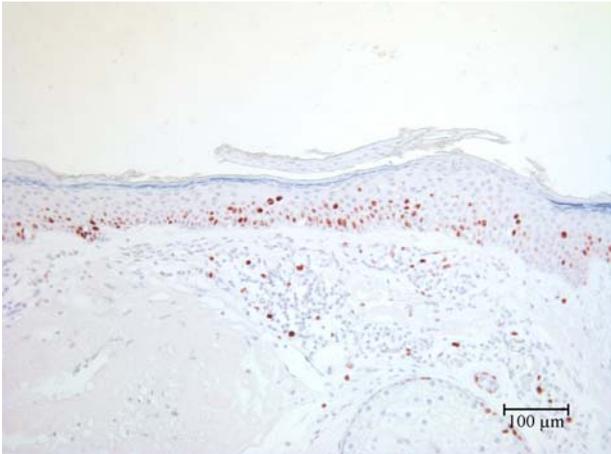
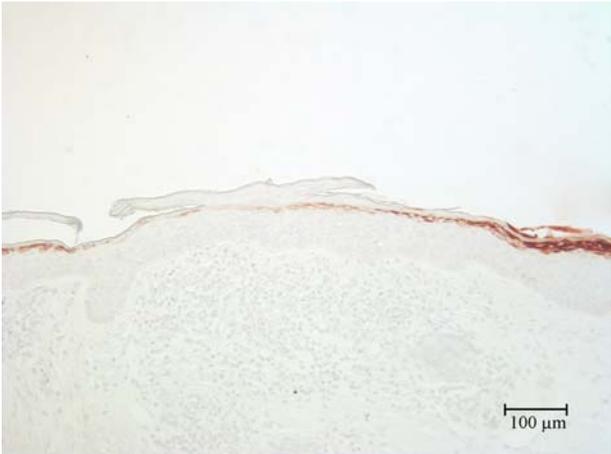
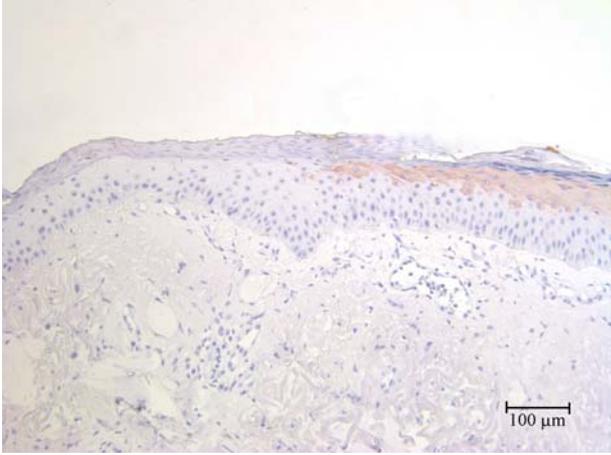
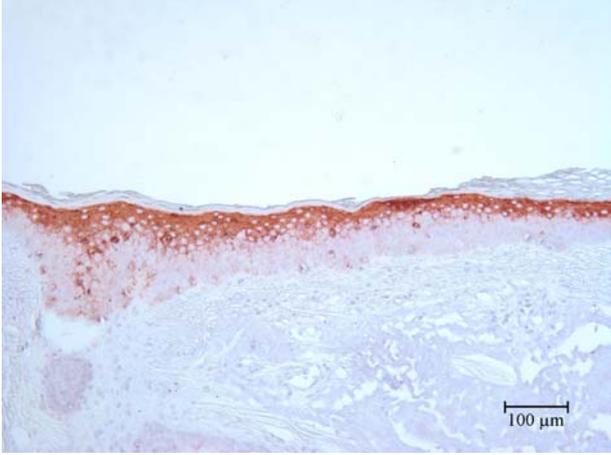
Abbildung 24: Involucrin bei Lichen ruber

### Aktinische Keratose

In einigen Präparaten mit aktinischer Keratose fanden sich MIB1-positive Zellen auch in suprabasalen Anteilen der vitalen Epidermis (Abbildung 25). Quantitativ ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zu normaler Haut aufzeigen.

Für den späten Differenzierungsmarker Filaggrin fand sich eine signifikant verminderte Expression im Vergleich zu gesunder Haut (Abbildung 26). Die traf sowohl für die Intensität ( $M=18,89$  bei AK,  $30,38$  bei GH,  $p=0,076$ ) als auch für die prozentuale flächenmäßige Ausprägung zu ( $M=5,47\%$  bei AK,  $13,09\%$  bei GH,  $p=0,009$ ). Cytokeratin10 wurde bei aktinischer Keratose ebenfalls geringer als in gesunder Haut exprimiert (Abbildung 27). Signifikante Ergebnisse fanden sich hierbei sowohl bezüg-

lich der Intensität (M=53,08 bei AK vs. 96,90 bei GH, p=0,002) als auch im Bezug auf die Fläche (M=25,52% bei AK vs. M=52,43% bei GH, p=0,015). Für die Expression von Involucrin zeigten sich in der Intensität der Färbung keine Unterschiede (Abbildung 28). In der flächenmäßigen Ausprägung war Involucrin dagegen signifikant vermindert nachweisbar (M=22,17% bei AK vs. M=43,18% bei GH, p=0,002).

	
<p>Abbildung 25: MIB-1 in aktinischer Keratose</p>	<p>Abbildung 26: Filaggrin in aktinischer Keratose</p>
	
<p>Abbildung 27: CK10 in aktinischer Keratose</p>	<p>Abbildung 28: Involucrin in aktinischer Keratose</p>

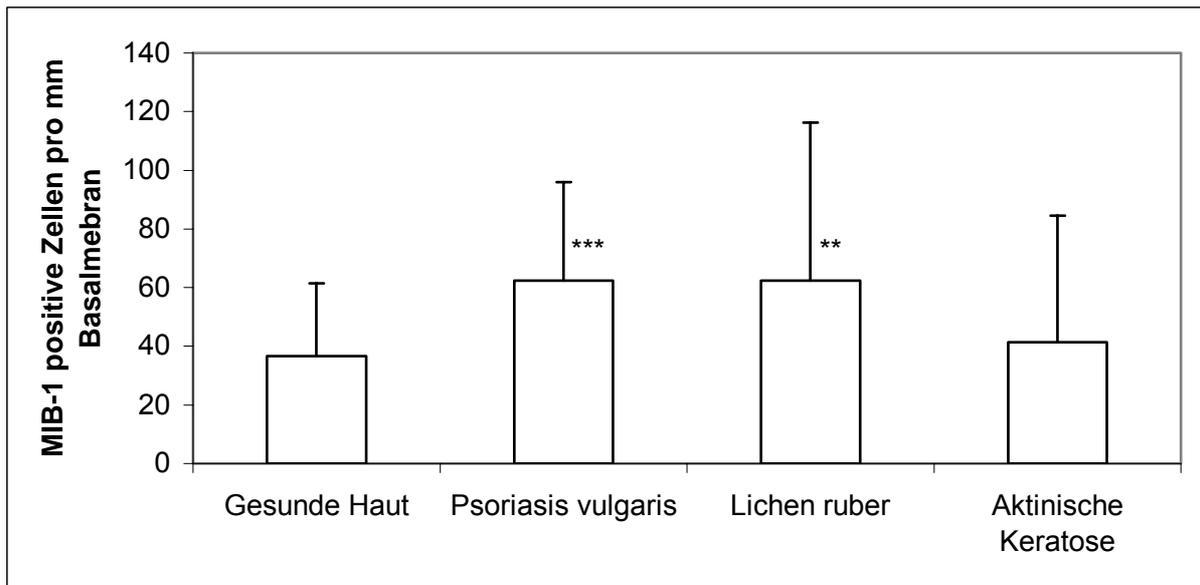


Abbildung 29: Expression des Proliferationsmarkers MIB-1 in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikant vermehrte Expression bei Psoriasis vulgaris und Lichen ruber (\*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ )

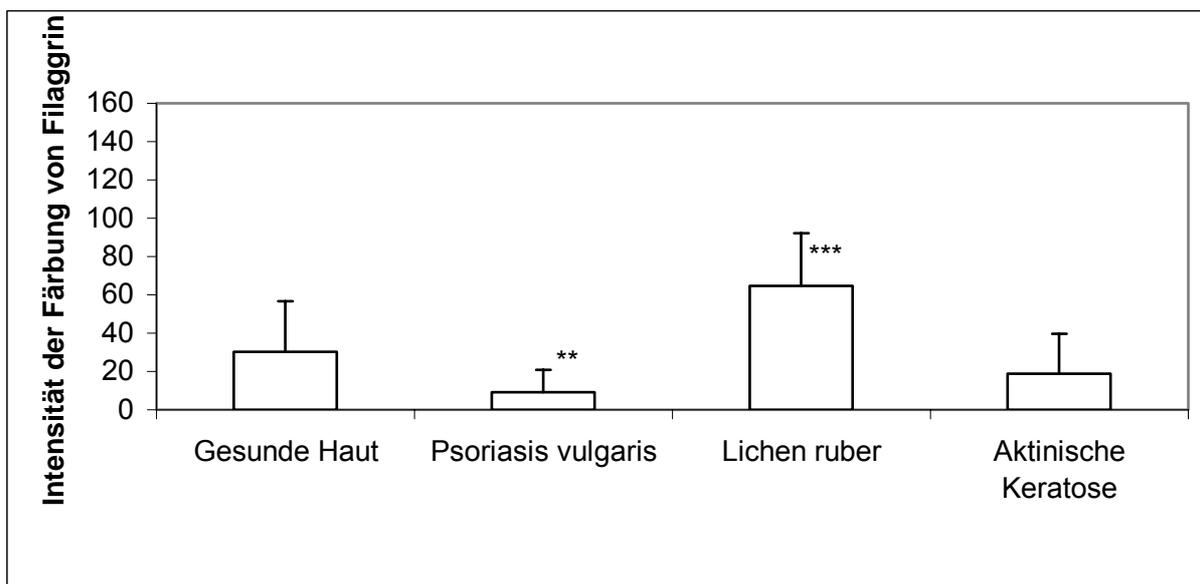


Abbildung 30: Expression des Differenzierungsmarkers Filaggrin bezüglich der Intensität seiner Färbung in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikant verminderte Expression bei Psoriasis vulgaris, signifikant vermehrte Expression bei Lichen ruber, keine signifikanten Unterschiede bei aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut (\*\*für  $p \leq 0,01$ , \*\*\*für  $p \leq 0,001$ )

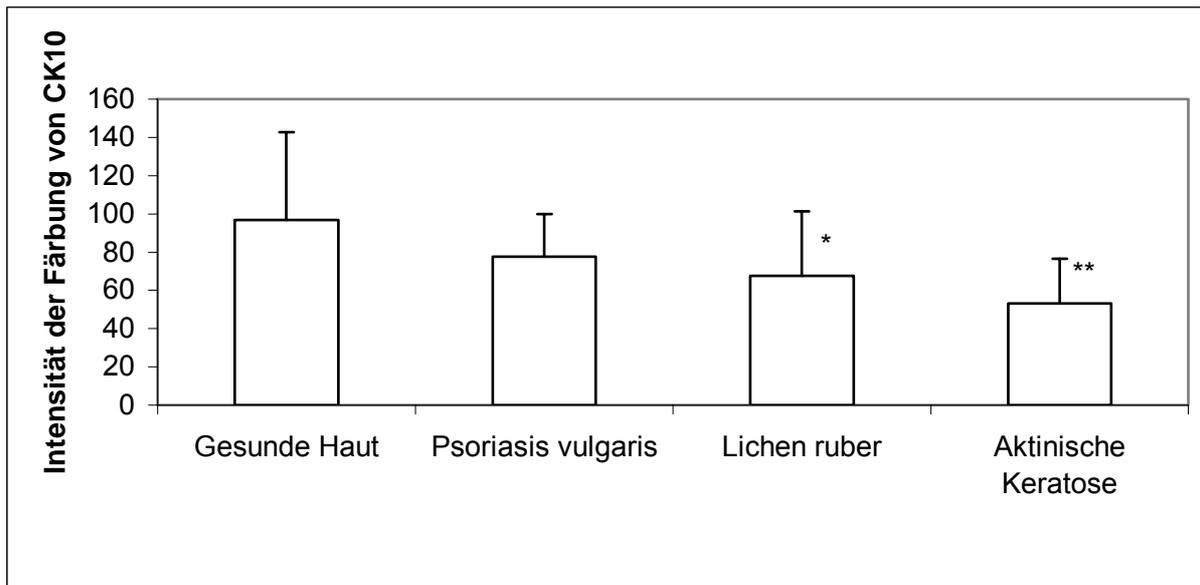


Abbildung 31: Expression des Differenzierungsmarkers Cytokeratin 10 bezüglich der Intensität seiner Färbung in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Keine Signifikanz bei Psoriasis vulgaris, signifikante Verringerung bei Lichen ruber und bei aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut (\*für  $p \leq 0,05$ , \*\*für  $p \leq 0,01$ )

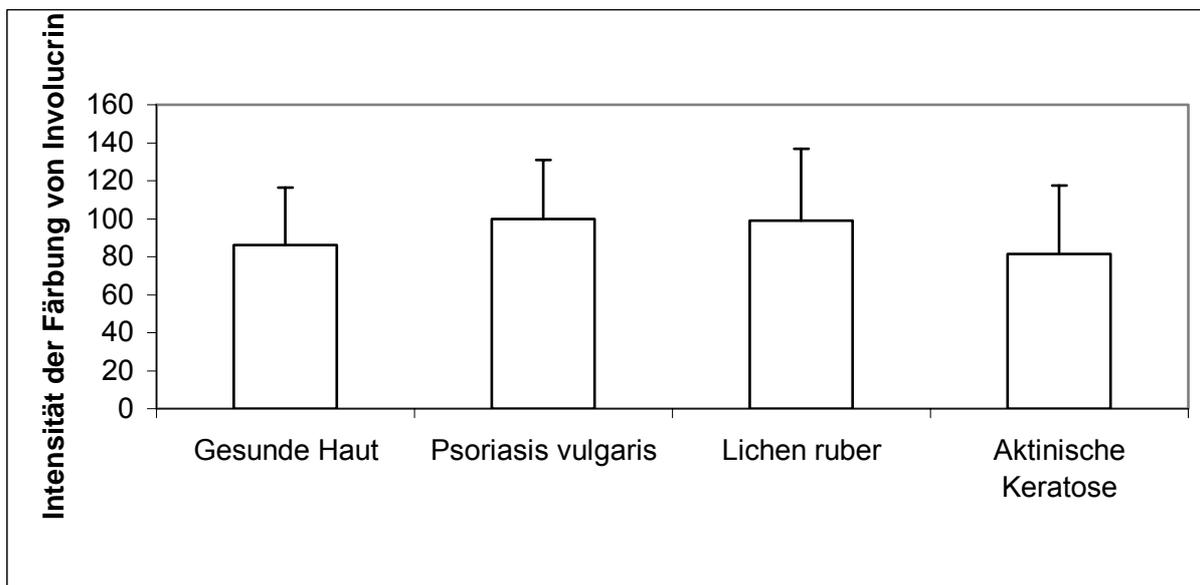


Abbildung 32: Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin bezüglich der Intensität seiner Färbung in gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Keine Signifikanzen bei Psoriasis vulgaris, Lichen ruber und bei aktinischer Keratose im Vergleich zu gesunder Haut

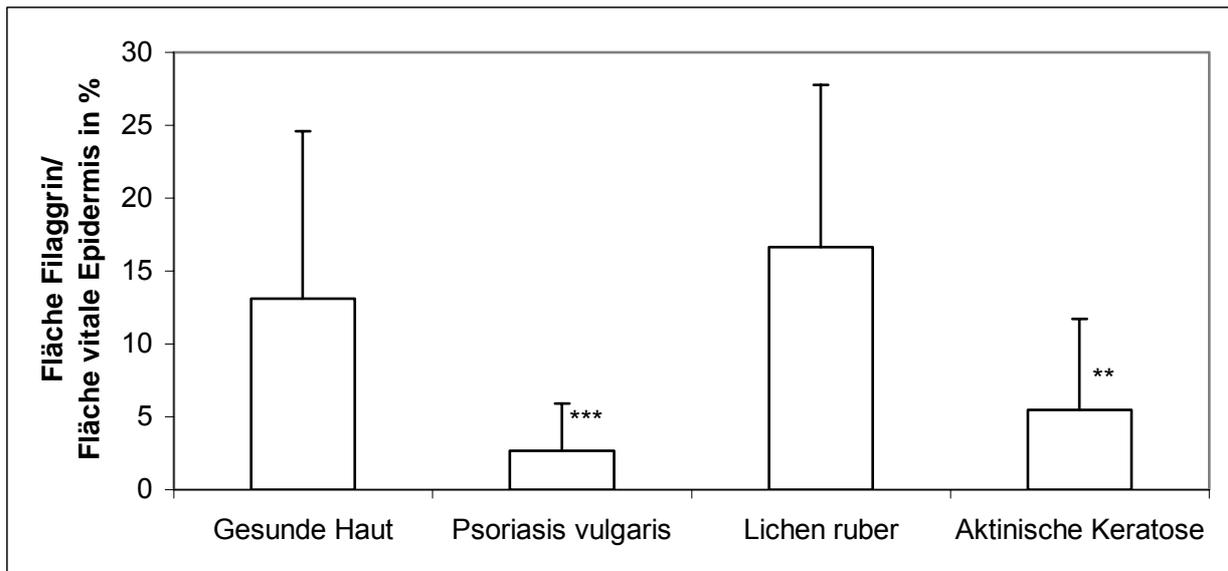


Abbildung 33: Expression des Differenzierungsmarkers Filaggrin bezüglich seines prozentualen Anteils in der Epidermis gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikant verringert bei Psoriasis vulgaris, keine Signifikanz bei Lichen ruber, signifikant verringert bei aktinischer Keratose (\*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ )

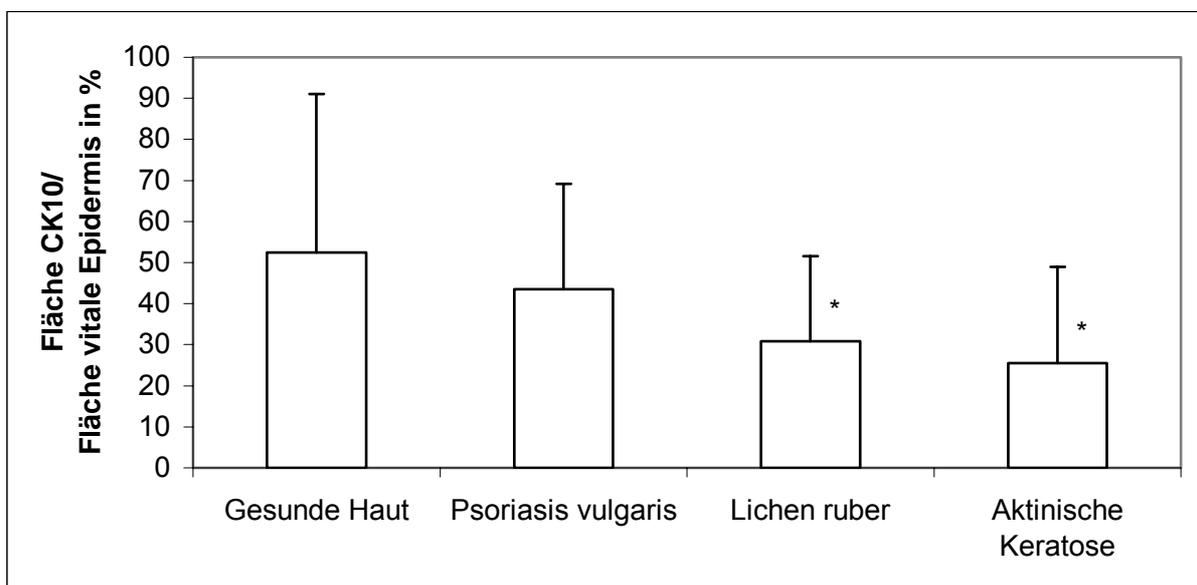


Abbildung 34: Expression des Differenzierungsmarkers Cytokeratin 10 bezüglich seines prozentualen Anteils in der Epidermis gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Keine Signifikanz bei Psoriasis vulgaris, signifikant verringert bei Lichen ruber und aktinischer Keratose (\* für  $p \leq 0,05$ )

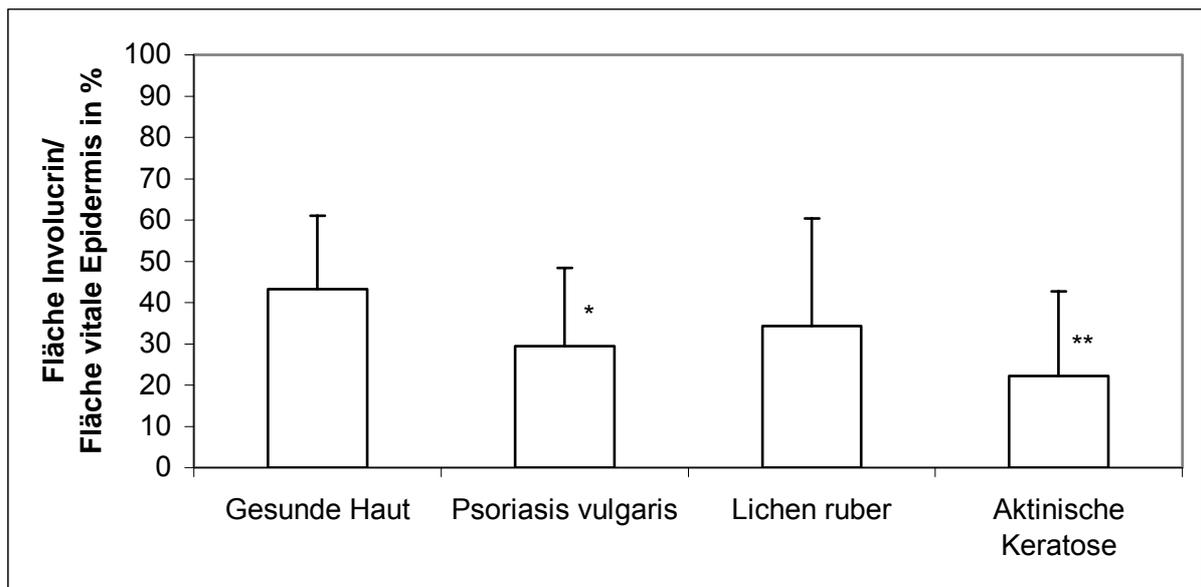


Abbildung 35: Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin bezüglich seines prozentualen Anteils in der Epidermis gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut: Signifikant vermindert bei Psoriasis vulgaris, keine Signifikanz bei Lichen ruber, signifikant vermindert bei aktinischer Keratose (\* für  $p \leq 0,05$ , \*\* für  $p \leq 0,01$ )

#### 4.3. Expression des NMDA-Rezeptors in gesunder Haut, entzündlichen Dermatosen und Präkanzerosen

In der vorliegenden Arbeit sollte auch der Zusammenhang zwischen der Expression keratinozytärer NMDA-Rezeptoren und morphologischen Besonderheiten der Verhornung untersucht werden, wobei insbesondere die Dicke des Stratum corneum und die Ausprägung der Parakeratose in Zusammenhang mit der NMDA-Expression analysiert werden sollte. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen Verhornungsstörungen (Parakeratose) entzündlicher und aktinischer Genese.

In den Präparaten mit gesunder Haut fand sich eine Anfärbung der NMDA-Rezeptoren in der gesamten Epidermis mit besonderer Intensität im Bereich des Stratum granulosum (Abbildung 36). Das Stratum corneum dagegen war NMDA-negativ. In psoriatischer Haut, beim Lichen ruber und bei den aktinischen Keratosen war dieses Verteilungsmuster ebenfalls sichtbar, hier fiel jedoch eine verminderte NMDA-Expression bei Auftreten einer Parakeratose auf (Abbildung 37).

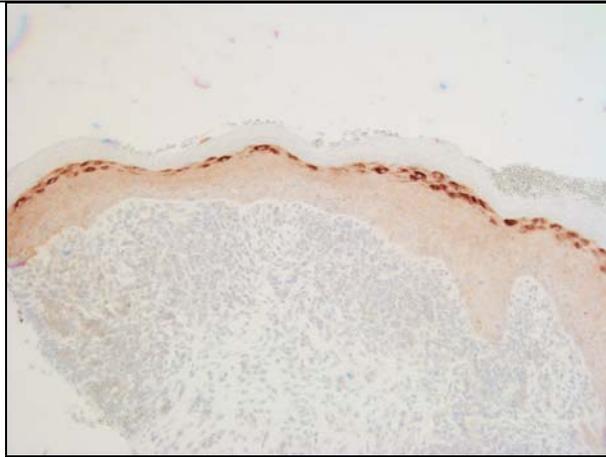


Abbildung 36: Bandförmige Expression des NMDA-Rezeptors bei Lichen ruber



Abbildung 37: Vergleichsweise geringere Expression des NMDA-Rezeptors bei Parakeratose (hier: Psoriasis vulgaris)

Diese Beobachtung ließ sich mittels digitaler Bildanalyse quantifizieren. Die NMDA-Rezeptor-Dichte betrug bei Parakeratose  $M=14,52$  vs.  $M=25,17$  bei normaler Verhornung ( $p=0,003$ ) und war somit signifikant verringert (Abbildung 38). Auch die flächenmäßige Ausprägung war bei Parakeratose signifikant verringert  $M=4,81\%$  vs.  $M=12,07\%$  bei normaler Verhornung ( $p=0,006$ ) (Abbildung 39).

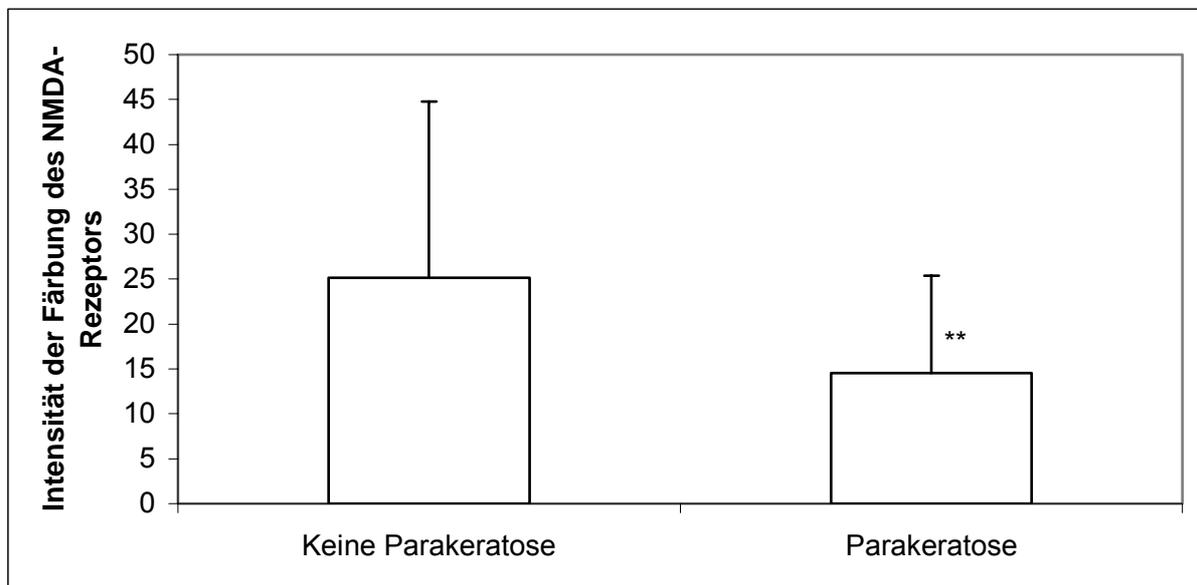


Abbildung 38: Expression des NMDA-Rezeptors bezüglich der Intensität seiner Färbung in Abhängigkeit von der Parakeratose: Signifikant verminderte Expression bei Parakeratose (\*\* für  $p \leq 0,01$ )

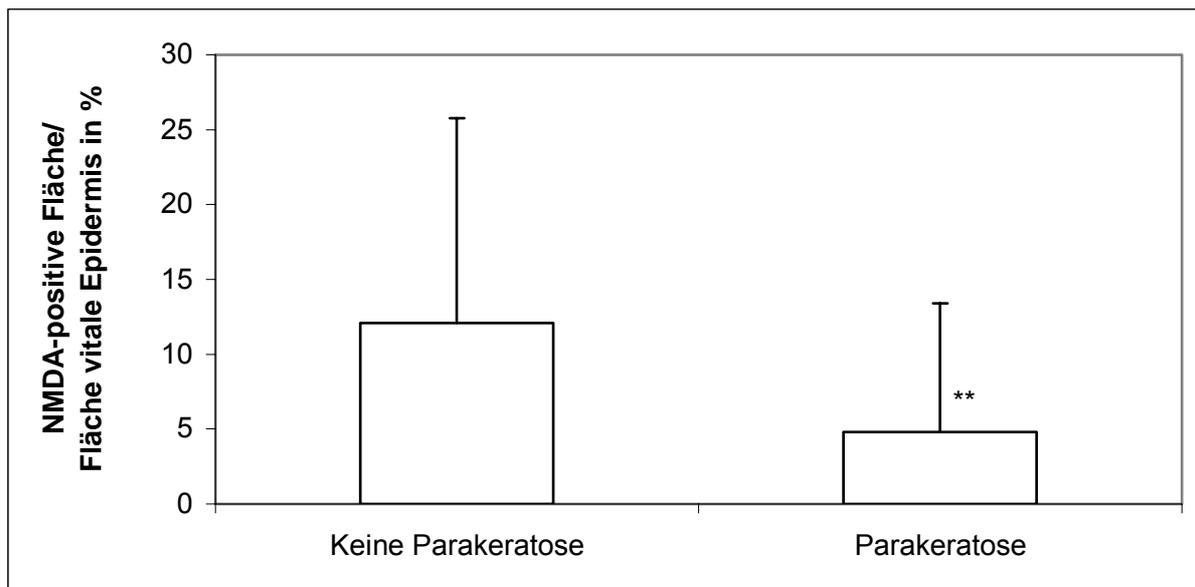


Abbildung 39: Expression des NMDA-Rezeptors bezüglich der flächenmäßigen Ausprägung in der vitalen Epidermis in Abhängigkeit von der Parakeratose: Signifikant verminderte Expression bei Parakeratose (\*\* für  $p \leq 0,01$ )

Es ließen sich keine signifikanten Mittelwertsunterschiede zwischen der NMDA-Expression in gesunder Haut im Vergleich zu der in den anderen Dermatosen sowohl im Bezug auf die Dichte als auch auf die Fläche nachweisen.

Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der NMDA-Rezeptoren und der Dicke des Stratum corneum.

#### **4.4. Zusammenhang zwischen der Ausprägung keratinozytärer NMDA-Rezeptoren und der Expression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern**

Bei der Analyse konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen der NMDA-Expression und der Expression des Proliferationsmarkers MIB1 nachgewiesen werden. Auch eine Korrelation zwischen NMDA und der Expression der Differenzierungsmarker Filaggrin, CK10 und Involucrin konnte weder bezüglich ihrer Intensität noch ihrer flächenmäßigen Ausprägung nachgewiesen werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Digitale Bildanalyse immunhistochemischer Präparate

Digitale Bildanalyseverfahren finden seit mehr als 10 Jahren in der Dermatohistologie Anwendung. Insbesondere in der Quantifizierung immunhistochemischer Marker scheinen sie aufgrund weitestgehender Objektivität und aufgrund des vergleichsweise geringeren Arbeits- und Zeitaufwandes manuellen Zähl- und Schätzmethode deutlich überlegen zu sein [Beliën et al. 1999] [Johansson et al. 2001].

Obwohl zahlreiche Vorteile gegenüber manuellen Verfahren bestehen, ist die Arbeit mit der digitalen Bildanalyse nicht immer einfach. Auch hiermit stellen sich bei der Interpretation von angefärbten Strukturen z.B. die Fragen, ab welcher Färbungsintensität eine Zelle oder ein Gewebe als positiv für den zu bestimmenden Marker gelten soll oder mit welcher der verschiedenen technischen Möglichkeiten das Ausmaß einer Färbung ermittelt werden soll. Solche Entscheidungen können die mit Hilfe der digitalen Bildanalyse gefundenen Ergebnisse stark beeinflussen. Darüberhinaus muss natürlich jede Quantifizierung immunhistochemischer Präparate als ein Gesamtprozess gesehen werden, an dessen Beginn die Entnahme einer Gewebeprobe steht und von dem die Interpretation digitaler Bilddaten nur den letzten Schritt darstellt. Um tatsächlich von einer sorgfältigen Messung oder Quantifizierung der interessierenden Merkmale sprechen zu können, müsste ein hohes Maß an Objektivität, Standardisierung und Reproduzierbarkeit auf jeder Stufe dieses Prozesses gewährleistet sein. Da im Allgemeinen aber davon ausgegangen wird, dass auch beim heutigen Stand der Forschung auf den meisten Stufen des Prozesses der Quantifizierung noch ein großes Potenzial zur Verbesserung besteht, werden anstelle von quantitativen Analysen meist semiquantitative Scores eingesetzt [Walker 2006] [Taylor et al. 2006].

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit auf der Basis gebräuchlicher Bildverarbeitungssoftware makrobasierte Algorithmen entwickelt, die nach interaktiver Selektion zu analysierender Regionen eine zuverlässige quantitative Bestimmung immunhistochemisch markierter Zellen in der Epidermis erlauben.

Dabei interessierten insbesondere die Quantifizierung von Proliferations- und Differenzierungsmarkern sowie die der Expression von NMDA-Rezeptoren in gesunder Haut im Vergleich zu entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut. Dar-

über hinaus war das Ausmaß an Verhornung ein relevantes Merkmal. Da bei allen Markern nur die Expression innerhalb der vitalen Epidermis interessierte, blieben die anderen im Präparat repräsentierten Gewebekomponenten (z.B. Corium) unberücksichtigt. Bei dem Proliferationsmarker Ki67 liegt die immunhistochemische Reaktivität innerhalb der Zellkerne, dementsprechend bestand die Quantifizierung in einer Auszählung der MIB-1-positiven Kerne. Darüber hinaus erschien eine Relativierung an der Länge der Basalmembran im untersuchten Gewebeausschnitt sinnvoll, da die Expression von Ki67 überwiegend im Stratum basale erfolgt [Bovenschen et al. 2005] [Lee et al. 2002]. Die Länge der Basalmembran war deshalb ebenfalls ein im Rahmen dieser Arbeit zu quantifizierendes Merkmal. Die Expression der Differenzierungsmarker sowie des NMDA-Rezeptors ist nicht kernassoziiert und erfolgt mehr oder weniger gleichmäßig in der gesamten Epidermis. Als Messwerte konnten hier also die durchschnittliche Intensität der Färbung oder die Größe der positiven Fläche angegeben werden. Aus den oben genannten Gründen war es sinnvoll, die positive Fläche an der relevanten Gewebekomponente, der vitalen Epidermis, zu relativieren [Bovenschen et al. 2005]. Deshalb war es bedeutsam, auch die Dicke und die Schnittfläche der vitalen Epidermis zu quantifizieren. Das Ausmaß der Verhornung war in den zu analysierenden Präparaten durch das Stratum corneum repräsentiert und ebenfalls als Dicke oder Fläche operationalisierbar.

Mit dem verwendeten Verfahren ließen sich die oben genannten histologischen und immunhistochemisch angefärbten Strukturen in Serienschnitten gesunder, entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut nachweisen und quantifizieren. Das Verfahren zeichnete sich zudem durch eine gute Reliabilität und Validität aus. Die einzelnen Vorgehensweisen bei der Bildbearbeitung wurden im Material- und Methodenteil detailliert dargestellt, wodurch es anderen Anwendern möglich sein soll, die einzelnen Arbeitsschritte nachzuvollziehen und die Beschreibung als Anleitung für eigene Fragestellungen zu nutzen. Als Grundlage für die Entwicklung des angewandten digitalen Bildanalyseverfahrens dienten Publikationen von Underwood [Underwood et al. 2001]. Mit der Verwendung des Programmes Adobe Photoshop CS und des Plugins Image Processing Toolkit kam eine relativ leicht zugängliche und weit verbreitete Software zum Einsatz, was die Praktikabilität des Verfahrens auch für andere Anwender erhöht. Zudem ist die Arbeit mit dem Programm kosten- und zeiteffektiv und relativ wenig personalintensiv.

Nur die ersten Arbeitsschritte bestanden aus dem manuellen Nachzeichnen der Grenzen des Stratum corneum und der Basalmembran in allen Präparaten. Die darauffolgenden Schritte liefen bis einschließlich der Ermittlung von Dicke und Fläche des Stratum corneum und der vitalen Epidermis automatisch ab. Zur Beantwortung der Frage, welche der beiden Meßmethoden als die reliablere zu werten sei, wurden beide Verfahren miteinander verglichen. Die Reliabilitäten der Flächenmessungen erreichten nahezu durchgängig höhere Werte als die der Dickemessungen. Da diese Unterschiede sogar signifikant waren, ist die Flächenmessung somit als die zuverlässigere Meßmethode anzusehen. Auch die Messungen der Basalmembranlänge zeigten zwischen den Serienschnitten eine gute Reliabilität.

In weiteren Schritten des digitalen Bildanalyseverfahrens wurde die Expression des Proliferationsmarkers, der drei Differenzierungsmarker sowie des NMDA-Rezeptors gemessen. Vor Beginn dieser Messungen wurde ein Schwellenwert für die Färbungsintensität festgelegt, ab welchem der Marker als positiv zu werten war. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Einstellungen empirisch ermittelt, an einer repräsentativen Stichprobe getestet und dann auf alle Differenzierungsmarker gleichermaßen angewandt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Präparaten zu ermöglichen. Bei den Präparaten mit dem Proliferationsmarker Ki-67 erfolgte die Wahl des Schwellenwertes individuell für jedes Bild. Diese individuelle Festlegung ist zwar anfällig für Interrater-Variabilitäten, erlaubt aber eine feine visuelle Kontrolle bei der Entscheidung, welche Strukturen gemessen werden sollen und welche nicht. Insbesondere bei Bildern mit suboptimalem Kontrast oder bei Belichtungsschwankungen können die Fähigkeiten des menschlichen Auges bei diesem Arbeitsschritt unersetzlich sein. Dementsprechend bevorzugen einige Autoren die manuelle Wahl des Schwellenwertes für jedes individuelle Bild [Jagoe et al. 1991] [Johansson et al. 2001].

In Zusammenschau unserer bisherigen Ergebnisse scheint es für künftige histomorphometrische Untersuchungen sinnvoll, zur vergleichenden Analyse entweder Randbezirke der Biopsie auszuwählen, in denen gesundes an krankhaft verändertes Gewebe grenzt oder 2 Biopsien zu entnehmen (gesunde und krankhaft veränderte Haut), um einen intraindividuellen Vergleich zu ermöglichen. Bei der Aufnahme der digitalen Bilder sollte darauf geachtet werden, dass Qualitätsstandards bei der Mikroskopie wie z.B. das Einstellen des Beleuchtungsstrahlengangs nach dem Köhler'schen Prinzip unbedingt einzuhalten sind, um Helligkeitsabweichungen, die sich un-

ter Umständen gravierend auf die digitalen Bilddaten auswirken können, zu korrigieren. Auch Helligkeits- und Farbunterschiede, die durch die Betriebsdauer oder durch Stromschwankungen der Lichtquelle entstehen, können die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse negativ beeinflussen. Aus diesem Grund ist ein regelmäßiger Weißabgleich ebenfalls unerlässlich. Bei der Bildaufnahme ist grundsätzlich darauf zu achten, dass weitestgehend mit manuellen Einstellungen gearbeitet wird. Durch den Einsatz von Belichtungsautomatiken oder automatischen Tonwert- und Kontrastkorrekturen entsteht nämlich nicht nur eine unerwünschte Variabilität zwischen Aufnahmen mit verschiedenen Kamerasystemen, sondern auch zwischen verschiedenen Aufnahmen mit ein und demselben System. Schon eine kleine Änderung des fotografierten Ausschnitts kann z.B. dazu führen, dass die Belichtungsautomatik einer Kamera eine andere Verschlusszeit oder eine andere Blende wählt, was wiederum erhebliche Auswirkungen auf die Messwerte hat. Bei der Speicherung der Bilddaten ist möglichst komprimierungsfrei mit voller Auflösung und Farbtiefe zu arbeiten, da sonst wichtige Bildinformationen verloren gehen können. Allerdings sind der verlustfreien Speicherung durch den erheblichen Speicherplatzbedarf Grenzen gesetzt. Bezüglich der Quantifizierung immunhistochemisch markierter Strukturen werden in der Literatur heterogene Maßzahlen verwendet, die Angaben erfolgen hier in Anzahlen, Flächen- oder Längenmaßen, so dass sich die Daten oft nicht zwischen verschiedenen Untersuchungen vergleichen lassen. Bei höherer mikroskopischer Vergrößerung beziehen sich die Angaben auf kleinere Ausschnitte des Präparates weshalb z.B. weniger positive Zellkerne zu erwarten sind. Selbst bei ein und derselben Vergrößerung können durch unterschiedliche Sensorgrößen der Aufnahmesysteme unterschiedlich große Ausschnitte untersucht werden. Die Anzahl der positiven Strukturen sollte deshalb nicht in absoluten Maßzahlen angegeben, sondern zur Größe der relevanten Gewebekomponente, der Anzahl der Pixel, der Größe des untersuchten Gewebeausschnittes oder der Anzahl der Zellen ins Verhältnis gesetzt werden. Die Wahl der richtigen Maßzahlen (z.B. Intensität oder Anzahl positiver Zellen im Verhältnis zu einer bestimmten Fläche) ist allerdings von der Art des zu untersuchenden Merkmals und von dessen Verteilung innerhalb des Präparates abhängig, so dass es hier keine generelle Richtlinie geben kann [Walker 2006].

## 5.2. Dicken- und Flächenmessung

Das verwendete digitale Bildanalyseverfahren stellt aufgrund seiner hohen Reliabilität eine besonders geeignete Methode zur Bestimmung der Dicke und/oder der Fläche eines definierten Areals dar. Dabei sind, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, die Messergebnisse der Flächenmessung reliabler als die der Dickenmessung. Wenn möglich, sollte deshalb die Flächenmessung bevorzugt eingesetzt werden. Im Folgenden werden die Messergebnisse der Dicken- und Flächenmessungen aus den Analysen der einzelnen Erkrankungen mit denen von gesunder Haut verglichen.

Die Psoriasis vulgaris ist histologisch durch eine Verbreiterung der vitalen Epidermis und durch tief ausgezogene gleichlange epidermale Reteleisten gekennzeichnet, die Verhornung ist para- und/oder hyperkeratotisch. Diese histologischen Merkmale ließen sich in der vorliegenden Untersuchung auch quantitativ aufzeigen. Hierbei fand sich sowohl bezüglich der Dicken- als auch bezüglich der Flächenmessung ein signifikant verbreitertes Stratum corneum und eine signifikant verbreiterte vitale Epidermis im Vergleich zu gesunder Haut. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Alper [Alper et al. 2004]. Der prozentuale Anteil des Stratum corneum an der Gesamtepidermis zeigt dagegen keinen Unterschied zwischen Psoriasis vulgaris und gesunder Haut. Es scheint demnach die Dicke des Stratum corneum bei psoriatischer Haut proportional zur Dicke der vitalen Epidermis zuzunehmen. Wenngleich dieses Resultat in der Publikation von Alper et al. nicht explizit genannt wird, so lassen die Ergebnisse aus dessen Untersuchung dennoch den gleichen Rückschluß zu. Auch hier lassen sich keine Unterschiede zwischen Psoriasis vulgaris und gesunder Haut hinsichtlich des prozentualen Anteils des Stratum corneum an der Gesamtdicke der Epidermis finden.

Der Lichen ruber ist histologisch durch ein bandförmiges subepidermales entzündliches lymphohistiozytäres Infiltrat gekennzeichnet sowie durch eine akanthotisch verbreiterte Epidermis. Typisch ist dabei eine Verbreiterung des Stratum granulosum, sowie ein variabel verbreitertes Stratum corneum, das vereinzelt von Parakeratose durchsetzt ist. Auch in der vorliegenden Studie fand sich im Vergleich zu gesunder Haut sowohl hinsichtlich der Dicken- als auch der Flächenmessung ein signifikant verbreitertes Stratum corneum und eine signifikant verbreiterte vitale Epider-

mis. Der prozentuale Anteil des Stratum corneum an der Gesamtepidermis zeigte wiederum keinen Unterschied zwischen Lichen ruber und gesunder Haut. Vergleichbare Untersuchungen sind in der aktuellen Literatur nicht beschrieben.

Die untersuchten Präparate mit Aktinischer Keratose vom hypertrophen Typ sind histologisch durch eine Hyperkeratose mit parakeratotischen Anteilen charakterisiert. Die Epidermis ist deutlich verdickt. Diese histologischen Merkmale konnten ebenfalls quantitativ nachgewiesen werden. Im Vergleich zu gesunder Haut fand sich sowohl im Bezug auf die Dicken- als auch auf die Flächenmessung ein signifikant verbreiteres Stratum corneum und eine signifikant verbreiterte vitale Epidermis. Sogar der prozentuale Anteil des Stratum corneum an der Gesamtepidermis war im Vergleich zu gesunder Haut signifikant erhöht. Im Unterschied dazu zeigte die prozentuale Auswertung bei der Psoriasis vulgaris ja, dass das Verhältnis zwischen den einzelnen Kompartimenten (Str. corneum, vitale Epidermis) bei dieser Erkrankung erhalten bleibt. Dies könnte ein bislang unbeachteter Unterschied zwischen benignen hyperproliferativen (z.B. Psoriasis vulgaris) und malignen Dermatosen (z.B. aktinische Keratosen) sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl die Dicke des Stratum corneum als auch die der vitalen Epidermis stark variieren und durch verschiedene Faktoren (z.B. Entzündung oder Malignisierung) beeinflusst werden kann. Mit der verwendeten Messmethode ist es möglich, die Dicke und Fläche dieser Größen auf eine ökonomische und nachvollziehbare Art und Weise zu messen. Ein routinemäßiger Einsatz der Messmethode bei Fragestellungen zur Evaluation verschiedener Hauterkrankungen, die mit einer Veränderung der Epidermisdicke einhergehen und bei denen die Varianz der Epidermisdicke möglicherweise eine diagnostische oder therapeutische Variable darstellt, bietet sich an.

### **5.3. Präsenz von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder Haut, entzündlichen Dermatosen und Präkanzerosen**

Mit Hilfe des entwickelten Verfahrens konnte die Expression der Proliferations- und Differenzierungsmarker in den einzelnen Serienschnitten quantifiziert werden. Um eine Aussage über die Validität des Verfahrens treffen zu können, wurden die erhaltenen Messergebnisse mit bereits publizierten Untersuchungen zur Präsenz von

Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder Haut, in entzündlichen Dermatosen und aktinischer Keratose verglichen.

Die Psoriasis vulgaris ist eine entzündliche hyperproliferative Erkrankung, bei der die DNA-Synthese- und die Mitoserate in den basalen Abschnitten der Epidermis um ein Vielfaches erhöht ist. Wie bereits von Caldwell, Bovenschen und Gerritsen beschrieben [Caldwell et al. 1997] [Bovenschen et al. 2005] [Gerritsen et al. 1997], konnte auch in der vorliegenden Untersuchung bei Psoriasis vulgaris eine im Vergleich zu normaler Haut signifikant erhöhte Zahl MIB1-positiver Zellen nachgewiesen werden. Wenngleich bei der Psoriasis vulgaris MIB1-positive Zellen auch suprabasal nachweisbar sind, erfolgt die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 doch überwiegend im Stratum basale und ist hier auf die Zellkerne beschränkt. Aus diesen Gründen ist es sinnvoll, als Referenz die Basalmembran zu verwenden und die quantitativen Angaben in der Einheit „MIB1-positive Zellen pro mm Basalmembran“ zu machen. Dies ermöglicht zudem eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien. Ein allgemeines Problem des Proliferationsmarkers Ki67 ist, dass er nur anzeigen kann, dass die Zelle das Potential hat, sich zu teilen, er sagt jedoch nichts über die aktuelle Zellteilung aus. Obwohl die Expression von Ki67 also nicht in jedem Fall im direkten Zusammenhang mit dem Terminus der Wachstumsfraktion eines Gewebes steht, findet sich jedoch eine starke Korrelation zwischen diesen beiden Parametern [Scholzen, Gerdes 2000].

Die Verteilungsmuster der Differenzierungsmarker unterschieden sich nicht wesentlich von denen gesunder Haut, in der mengenmäßigen Ausprägung fanden sich jedoch erhebliche Unterschiede. Die Expression von Filaggrin war bei der Psoriasis vulgaris im Vergleich zu gesunder Haut sowohl hinsichtlich der Intensität als auch hinsichtlich der Fläche signifikant verringert. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Watanabe und Gerritsen [Watanabe et al. 1991] [Gerritsen et al. 1997]. Die Intensität von Cytokeratin 10 war bei der Psoriasis vulgaris im Vergleich zu normaler Haut tendenziell erniedrigt und entspricht daher weitestgehend den Beobachtungen von Bernerd [Bernerd et al. 1992]. Allerdings wurde in dessen Studie die CK10 Expression geschätzt. Bezüglich der flächenmäßigen Ausprägung fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu gesunder Haut. In den Untersuchungen von Bovenschen [Bovenschen et al. 2005] betrug die CK10 positive Fläche ca. 41%, in der vorliegenden Untersuchung betrug sie 43,5%. Es besteht

demnach eine hohe Übereinstimmung zwischen beiden Untersuchungen. Boven-schen verglich die CK10-Expression in Psoriasis vulgaris jedoch nur mit der bei Li-chen ruber und bei atopischer Dermatitis und nicht mit der in gesunder Haut. Für den frühen Differenzierungsmarker Involucrin waren die Ergebnisse unserer Studie un-einheitlich. Qualitativ ließ sich Involucrin im Vergleich zu gesunder Haut bereits in tieferen Schichten der vitalen Epidermis nachweisen. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben von Watanabe, Caldwell, Ichikawa und Gerritsen et al. überein [Watanabe et al. 1991] [Caldwell et al. 1997] [Ichikawa et al. 1997] [Gerritsen et al. 1997]. Eine tendenziell vermehrte Expression fand sich in unserer Studie bezüglich der Färbungsintensität. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Cald-well und Gerritsen überein, allerdings erfolgte in deren Arbeiten keine digitale Bild-analyse, sondern ein manuelles Auszählen der positiven Zellen [Caldwell et al. 1997] [Gerritsen et al. 1997]. In der letztgenannten Untersuchung wurde dabei die Involu-crin-Expression aus dem Verhältnis der Involucrin positiven Zelllagen zu allen Zella-gen der vitalen Epidermis ermittelt. In den Studien von Ichikawa erfolgte die Auswer-tung mittels Gelelektrophorese und Immunoblot. Auch hier war eine vermehrte Ex-pression nachweisbar [Ichikawa et al. 1997]. Ein direkter Vergleich mit unserer Arbeit ist aus methodischen Gründen nicht möglich. In Bezug auf die prozentuale flächen-mäßige Ausprägung fanden wir eine signifikant verminderte Involucrin-Expression.

Der Lichen ruber ist eine subakut oder chronisch verlaufende, entzündliche papulöse Hauterkrankung, die zumeist mit starkem Juckreiz einhergeht. Histologisch besteht typischerweise subepidermal ein bandförmiges lymphohistiozytäres Infiltrat. Die akanthotische Epidermis hat ein deutlich verbreitertes Stratum granulosum und ein variabel verbreitertes Stratum corneum, welches gelegentlich von Parakeratose durchsetzt ist. Beim Lichen ruber waren MIB1-positive Zellen ebenfalls suprabasal sichtbar und die quantitative Analyse zeigte eine im Vergleich zu normaler Haut sig-nifikant erhöhte Anzahl MIB1-positiver Zellen pro mm Basalmembran. Vergleichbare Untersuchungen sind in der aktuellen Literatur nicht beschrieben.

Das Verteilungsmuster der Differenzierungsmarker stimmte mit dem gesunder Haut und dem der Psoriasis vulgaris überein. Für den späten Differenzierungsmarker Fi-laggrin fand sich in der Messung der Intensität eine höhere Expression beim Lichen ruber im Vergleich zu gesunder Haut. Da Filaggrin vorwiegend im Stratum granulo-sum exprimiert wird und dieses typischerweise beim Lichen ruber hyperproliert,

entsprach dieses Ergebnis unseren Erwartungen. Für die flächenmäßige Ausprägung ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Cytokeratin 10 wurde beim Lichen ruber signifikant geringer als in gesunder Haut exprimiert. Dies traf sowohl auf die Intensität als auf die Fläche zu. Vergleichbare Untersuchungen lassen sich in der Literatur nicht finden. Involucrin wurde beim Lichen ruber bereits in tieferen Epidermisanteilen exprimiert, was mit den Beobachtungen von Ichikawa übereinstimmt [Ichikawa et al. 1997]. Quantitativ ließen sich für diesen späten Differenzierungsmarker jedoch weder in der Intensität der Färbung noch in der Fläche der angefärbten Keratinozyten signifikante Unterschiede zu gesunder Haut aufzeigen. Die gleichen Ergebnisse wurden von McCullough und Radden gefunden [McCullough, Radden 1992]. Sie haben die Expression von Involucrin beim Lichen ruber der Mundschleimhaut mit lichenoiden Arzneireaktionen und gesunder Mundschleimhaut verglichen.

Aktinische Keratosen treten oft als multiple erythematosquamöse Läsionen in den lichtexponierten Arealen auf und können sich zu Plattenepithelkarzinomen entwickeln. Histopathologisch werden der hypertrophe, der atrophe, der bowenoide, der akantholytische und der hyperpigmentierte Typ unterschieden [Kirkham 1997].

In den Präparaten mit aktinischer Keratose waren MIB1-positive Zellen zum Teil auch in suprabasalen Anteilen der vitalen Epidermis sichtbar. Entgegen der Erwartungen waren jedoch quantitativ keine signifikanten Unterschiede zu normaler Haut nachweisbar. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Publikationen von Caldwell und Carpenter [Caldwell et al. 1997] [Carpenter et al. 2004] und konnten im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit nicht erklärt werden. Sie sollten Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Für den späten Differenzierungsmarker Filaggrin fand sich sowohl hinsichtlich der Intensität der Färbung als auch der flächenmäßigen Ausprägung eine signifikant verminderte Expression. Da ein Mangel an Filaggrin eine unvollständige terminale Differenzierung der Keratinozyten zur Folge hat und aktinische Keratosen histologisch oft mit einer Parakeratose einhergehen, stimmen die Ergebnisse der Flächenmessung von Filaggrin mit unseren Annahmen überein. Cytokeratin10 wurde bei aktinischer Keratose ebenfalls sowohl in der Intensitäts- als auch der Flächenmessung signifikant geringer als in gesunder Haut exprimiert. Zu diesem Ergebnis kam auch Ishida bei der vergleichenden Untersuchung von Aktinischen Keratosen, Mor-

bus Bowen, Plattenepithelkarzinomen und seborrhoischen Keratosen mit gesunder Haut [Ishida et al. 2001]. Über die Expression von Involucrin in aktinischen Keratosen gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Caldwell et al. berichten nach manueller Zählung der positiven Zellen über eine vergleichsweise höhere Expression [Caldwell et al. 1997], Ichikawa et al. fanden im Gegensatz dazu keine Unterschiede zu gesunder Haut [Ichikawa et al. 1997]. In der vorliegenden Arbeit waren die Ergebnisse ebenfalls uneinheitlich. In der Intensität der Anfärbung waren keine Unterschiede feststellbar, die flächenmäßige Ausprägung von Involucrin war dagegen im Vergleich zu gesunder Haut signifikant vermindert. Unsere Daten fügen sich somit besser in das Konzept des Pathomechanismus aktinischer Keratosen, das durch eine Abnahme der Differenzierungsfähigkeit maligner Zellen charakterisiert ist, ein.

Zusammenfassend lässt sich das Messverfahren in Hinblick auf die Quantifizierung der immunhistochemischen Marker wie folgt charakterisieren: Die Ergebnisse aus den Analysen weisen ein hohes Maß an Übereinstimmung mit denen vergleichbarer Untersuchungen auf. Deshalb ist die Messmethode als valide einzuschätzen. Ein entscheidender Vorteil besteht in ihrer Objektivität, da Bildaquisition und Messvorgang automatisch ablaufen und nur die Festlegung der Messregion und die Einstellung der Schwellenwerte subjektiv erfolgen. Aus diesem Grund ist das Verfahren weitgehend untersucherunabhängig. Im Vergleich zwischen Flächen- und densitometrischer Messung ist aus unserer Sicht die Flächenmessung als die zuverlässigere Messmethode anzusehen, weil Schwankungen in der Intensität der histologischen Färbung bei ihr weniger oder keinen Einfluss auf das Messergebnis haben.

#### **5.4. Expression des NMDA-Rezeptors und seine Korrelation mit Proliferations- und Differenzierungsmarkern**

In Untersuchungen an nativen Keratinozyten und HaCaT-Zellen konnte Fischer die Präsenz von ionotropen Glutamatrezeptoren vom Typ des NMDA-Rezeptors in humaner Epidermis nachweisen [Fischer 2004]. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers konnte mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie eine positive Reaktion in der gesamten Epidermis unter besonderer Betonung des Stratum granulosum dargestellt werden. Bei Verhornungsstörungen, die mit einer Parakera-

tose einhergehen, fand sich dabei eine verminderte NMDA-Expression. Darüberhinaus bewirkte die Blockade des Rezeptors eine verminderte Expression der Differenzierungsmarker Cytokeratin 10 und Filaggrin, während die Proliferation von einer Stimulation oder Blockade von NMDA-Rezeptoren unbeeinflusst blieb. Unsere Arbeitsgruppe beobachtete weiterhin bei Blockade des NMDA-Rezeptors eine geringere Verhornung, weshalb Grund zu der Annahme bestand, dass die Expression von NMDA-Rezeptoren mit der Dicke des Stratum corneum korrelieren könnte [Fischer 2004].

Die vorliegende Arbeit sollte unter Verwendung des digitalen Bildanalyseverfahrens untersuchen, ob sich in vivo Korrelationen zwischen der NMDA-Expression und der Expression von Proliferations- oder Differenzierungsmarkern nachweisen lassen. Darüberhinaus sollte die Beobachtung, dass eine verminderte NMDA-Expression mit einer Verhornungsstörung (Parakeratose) einhergeht, quantitativ verifiziert werden.

Das Verteilungsmuster der NMDA-Rezeptoren mit Expression in der gesamten Epidermis unter besonderer Betonung des Stratum granulosum ließ sich in der Arbeit wieder aufweisen. Die Vermutung, die NMDA-Expression könne mit der Dicke des Str. corneum korrelieren, ließ sich jedoch nicht bestätigen. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Dicke oder der Fläche der NMDA positiven Schicht und der Dicke bzw. Fläche des Stratum corneum. Auch eine Korrelation zwischen der Menge keratinozytärer NMDA-Rezeptoren und der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 oder der kalziumabhängigen Differenzierungsmarker Filaggrin, Cytokeratin 10 und Involucrin ließ sich nicht nachweisen. Denkbar wäre, dass ein fehlender durch NMDA-Rezeptoren vermittelter Calcium-Influx durch andere Calciumkanäle kompensiert wird. Als Beispiel hierfür sei auf den unter 1.1.4. erwähnten transmembranösen Calcium Sensing Receptor (CaR) verwiesen, der nach seiner Aktivierung den Calciuminflux in die Zelle steuert [Bikle 2004] [Chia-Ling et al. 2004].

Bezüglich der Frage nach einer quantitativ veränderten NMDA-Expression bei Parakeratose fanden sich in der vorliegenden Arbeit signifikante Ergebnisse mit einer bei Parakeratose deutlich verringerten NMDA-Expression sowohl hinsichtlich der Intensitäts- als auch der Flächenmessung. Dies könnte ein Hinweis für die pathophysiologische Bedeutung keratinozytärer NMDA-Rezeptoren sein, die durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die Differenzierung von Keratinozyten beeinflussen.

## 6. Zusammenfassung

Mit Hilfe eines digitalen Bildanalyseverfahrens wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und der Differenzierungsmarker Filaggrin, Cytokeratin10 und Involucrin sowie des NMDA-Rezeptors in gesunder Haut untersucht und mit entzündlich veränderter und aktinisch geschädigter Haut verglichen. Zusätzlich waren morphologische Besonderheiten der Verhornung, wie die Dicke des Stratum corneum und das Verhornungsmuster (z.B. Vorliegen einer Parakeratose) von besonderem Interesse. Die Studie wurde mit humaner paraffineingebetteter Haut (gesunde Haut n=20, Psoriasis vulgaris n=22, Lichen ruber n=23, aktinische Keratosen n=18) durchgeführt. Die Auswertung mittels digitaler Bildanalyse erfolgte unter Verwendung des Programmes Adobe Photoshop CS und des Plugins Image Processing Toolkit. Die Anwendung dieser leicht zugänglichen und verbreiteten Software, sowie die weitestgehend automatisierte Arbeitsweise erhöhen zum einen die Praktikabilität des Verfahrens und ermöglichen zum anderen die Nutzbarkeit durch andere Anwender. Zudem ist das Verfahren auch für andere Fragestellungen modifizierbar.

Um eine Quantifizierung der immunhistochemischen Marker innerhalb der vitalen Epidermis zu ermöglichen und um eine Aussage über die Stärke der Verhornung treffen zu können, erfolgten Dicken- und Flächenmessungen des Stratum corneum und der vitalen Epidermis. Dabei ließen sich in allen drei Diagnosegruppen (Psoriasis vulgaris, Lichen ruber und aktinische Keratose), die histologisch mit einer Hyperkeratose und Akanthose einhergehen, signifikante Unterschiede im Vergleich zu gesunder Haut aufzeigen. Im Vergleich zwischen Dicken- und Flächenmessungen erwies sich dabei die Letztgenannte als die zuverlässigere Messmethode.

Die Auswertung der Expression der Proliferations- und Differenzierungsmarker erbrachte für die Psoriasis vulgaris eine signifikant vermehrte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67, sowie eine signifikant verringerte Expression des Differenzierungsmarkers Filaggrin. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur. Die Intensität von Cytokeratin 10 war bei der Psoriasis vulgaris tendenziell erniedrigt, bezüglich der flächenmäßigen Ausprägung fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu gesunder Haut. Für den späten Differenzierungsmarker Involucrin waren unsere Ergebnisse uneinheitlich, eine tendenziell vermehrte Expression fand sich bezüglich der Färbungsintensität, eine signifikant verminderte Expression ließ sich in Bezug auf die prozentuale flächenmäßige Ausprägung nachweisen.

Beim Lichen ruber fand sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Anzahl MIB1-positiver Zellen. Filaggrin wurde bezüglich seiner Intensität vermehrt exprimiert, ein Phänomen was zu der Beobachtung passt, dass das Stratum granulosum beim Lichen ruber hyperproliferiert. Für die flächenmäßige Ausprägung ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Cytokeratin 10 wurde beim Lichen ruber sowohl hinsichtlich der Intensität als auch der flächenmäßigen Ausprägung signifikant geringer als in gesunder Haut exprimiert. Für den späten Differenzierungsmarker Involucrin konnten weder in der Intensität der Färbung noch in der Fläche der angefärbten Keratinozyten signifikante Unterschiede zu gesunder Haut nachgewiesen werden.

In den Präparaten mit aktinischer Keratose waren MIB1-positive Zellen teilweise auch in den suprabasalen Anteilen der vitalen Epidermis sichtbar, quantitativ ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zu normaler Haut aufzeigen. Unsere Annahme, eine gesteigerte MIB-1-Expression vorzufinden, fand demnach keine Bestätigung. Für den späten Differenzierungsmarker Filaggrin fand sich erwartungsgemäß sowohl hinsichtlich der Intensität der Färbung als auch der flächenmäßigen Ausprägung eine signifikant verminderte Expression. Auch für Cytokeratin10 war sowohl in der Intensitäts- als auch der Flächenmessung eine signifikant geringere Expression nachweisbar. Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit den Literaturangaben überein. Die Ergebnisse aus der Messung der Involucrin-Expression waren bei der aktinischen Keratose wiederum uneinheitlich. In der Intensität der Anfärbung waren keine Unterschiede nachweisbar, die flächenmäßige Ausprägung war dagegen im Vergleich zu gesunder Haut signifikant vermindert.

Die berichteten Ergebnisse aus der Quantifizierung der Marker stehen größtenteils in Übereinstimmung mit denen vergleichbarer Untersuchungen, weshalb die Messmethode als valide einzuschätzen ist, zudem ist sie weitestgehend untersucherunabhängig. Im Vergleich zwischen Flächen- und densitometrischer Messung ist aus unserer Sicht die Flächenmessung als die zuverlässigere Messmethode anzusehen, weil Schwankungen in der Intensität der Färbung hierbei einen geringeren Einfluss auf das Messergebnis haben.

Ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des NMDA-Rezeptors und der Expression der einzelnen Marker ließ sich in der vorliegenden Untersuchung nicht finden. Erwartungsgemäß zeigte sich jedoch eine deutliche verminderte Expression des NMDA-Rezeptors bei Auftreten einer Parakeratose.

## 7. Literatur

1. Alper M, Kavak A, Parlak AH, Demirci R, Belenli I, Yesildal N: Measurement of epidermal thickness in a patient with psoriasis by computer-supported image analysis. *Braz J Med Biol Res* 37 (2004) 111-7
2. Beliën JA, Somi S, de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP: Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 52 (1999) 184-92
3. Bernerd F, Magnaldo T, Darmon M: Delayed onset of epidermal differentiation in psoriasis. *J Invest Dermatol* 98 (1992) 902-10
4. Bikle DD: Vitamin D Regulated Keratinocyte Differentiation. *J Cell Biochem* 92 (2004) 436-44
5. Bovenschen HJ, Seyger MMB, Van De Kerkhof PCM: Plaque psoriasis vs. atopic dermatitis and lichen planus: a comparison for lesionat T-cell subsets, epidermal proliferation and differentiation. *Br J Dermatol* 153 (2005) 72-8
6. Caldwell CJ, Hobbs C, McKee PH: The relationship of Ki67 and involucrin expression in proliferative, pre-neoplastic and neoplastic skin. *Clin and Exp Dermatol* 22 (1997) 11-6
7. Carpenter PM, Linden KG, McLaren CE, Kuo-Tung Li, Arain S, Barr RJ, Hite P, Sun JD, and Meyskens FL, Jr.: Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 13 (2004) 1996-2002
8. Chia-Ling LT, Oda Y, Komuves L, Bikle DD: The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calc* 35 (2004) 265-73
9. Coggeshall RE, Lekan HA: Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 364 (1996) 6-15
10. Diaz LK, Sneige N: Estrogen receptor analysis for breast cancer, current issues and keys to increasing testing accuracy. *Adv Anat Pathol* 12 (2005) 10-19
11. Drozdoff V, Pledger WJ: Commitment to differentiation and expression of early differentiation markers in murine keratinocytes in vitro are regulated independently of extracellular calcium concentrations. *J Cell Biol* 123 (1993) 909-19

12. Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E: Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol* 111 (1998) 517-23
13. Elias P: The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* 29 (2007) 3-14
14. Elias PM, Ahn SK, Denda M, Brown BE, Crumrine D, Kimutai LK, Kömüves L, Lee SH, Feingold KR: Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol* 119 (2002) 1128-35
15. Elie N, Plancoulaine B, Signolle JP, Herlin P: A simple way of quantifying immunostained cell nuclei on the whole histologic section. *Cytometry Part A* 56 (2003) 37-45
16. Fischer M, Glanz D, William T, Klapperstück T, Wohlrab J, Marsch WCh: N-methyl-D-aspartate-receptors influence the intracellular calcium concentration of keratinocytes. *Exp Dermatol* 13 (2004a) 512-9
17. Fischer M, William T, Helmbold P, Wohlrab J, Marsch WCh: Expression of epidermal N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR1) depends on formation of the granular layer-analysis in diseases with parakeratotic cornification. *Arch Dermatol Res* 296 (2004b) 157-62
18. Fischer M: Glutamatrezeptoren vom Typ des N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors in der Haut des Menschen. Untersuchungen zur Verteilung, Dichte und Funktion. Halle, Univ., Med. Fak., Habil., 110 Seiten, 2004c
19. Fritsch P: Dermatologie und Venerologie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2004, S. 5-10
20. Fuziwara S, Inoue K, Denda M: NMDA-type glutamate receptor is associated with cutaneous barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 120 (2003) 1023-9
21. Gerritsen MJ, Elbers ME, de Jong EM, van de Kerkhof PC: Recruitment of cycling epidermal cells and expression of filaggrin, involucrin and tenascin in the margin of the active psoriatic plaque, in the uninvolved skin of psoriatic patients and in the normal healthy skin. *J Dermatol Sci* 14 (1997) 179-88
22. Goedkoop AY, de Rie MA, Teunissen MB, Picavet DI, van der Hall PO, Bos JD, Tak PP, Kraan MC: Digital image analysis for the evaluation of the inflammatory infiltrate in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 297 (2005) 51-9

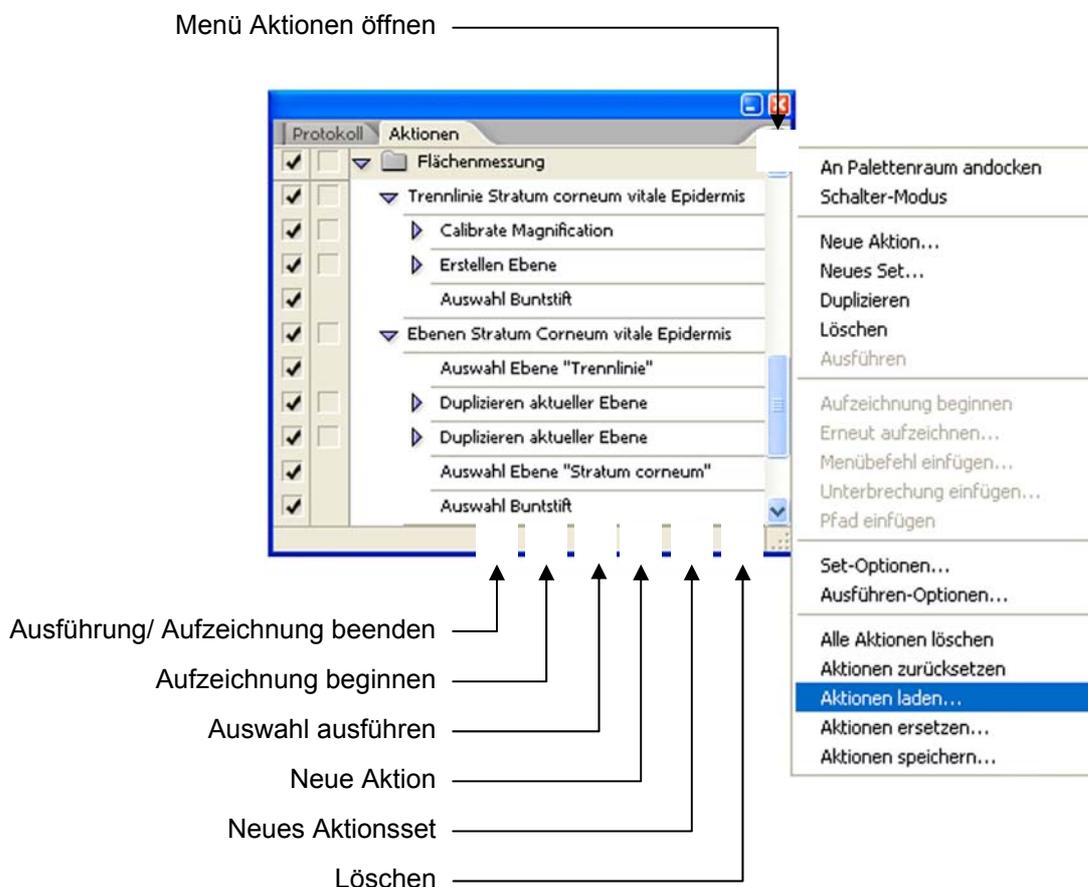
23. Hughes FJ, McCulloch CAG: Quantification of chemotactic response of quiescent and proliferating fibroblasts in boyden chambers by computer-assisted image analysis. *J Histochem and Cytochem* 39 (1991) 243-46
24. Ichikawa E, Watanabe S, Takahashi H: Keratin and involucrin expression in discoid lupus erythematosus and lichen planus. *Arch Dermatol Res* 289 (1997) 519-26
25. Iizuka H, Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A: Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *J Dermatol* 31 (2004) 271-76
26. Ishida H, Kumakiri M, Ueda K, Lao LM, Yanagihara M, Asamoto K, Imamura Y, Noriki S, Fukuda M: Comparative histochemical study of bowen's disease and actinic keratosis: preserved normal basal cells in bowen's disease. *Eur J Histochem* 45 (2001) 177-90
27. Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'Guin WMO, Dale BA, Iizuka H: Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation. *British J Dermatol* 137 (1997) 9-16
28. Jagoe R, Steel JH, Vucicevic V, Alexander N, van Noorden S, Wootton R and Polak JM: Observer variation in quantification of immunocytochemistry by image analysis. *Histochemical Journal* 23 (1991) 541-47
29. Johansson AC, Visse E, Widegren B, Sjögren HO, Siesjö P: Computerized image analysis as a tool to quantify infiltrating leukocytes: a comparison between high- and low-magnification images. *J Histochem Cytochem* 49 (2001) 1073-79
30. Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff HH: *Histopathologie der Haut*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2003, S. 74-75
31. Kirkham N: Tumors and cysts of the epidermis. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B (Eds): *Lever's Histopathology of the skin*. Eight Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia-New York, 1997, S. 701-4
32. Lansdown AB: Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen* 10 (2002) 271-85
33. Lee JH, An HT, Chung JH, Kim KH, Eun HC, Cho KH: Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18 (2002) 253-61

34. Lehr HA, Jacobs TW, Yaziji H, Schnitt SJ, Gown AM: Quantitative Evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. *Am J Clin Pathol* 115 (2001) 814-22
35. Loukas CG, Wilson GD, Vojnovic B, Linney A: An image analysis-based approach for automated counting of cancer cell nuclei in tissue sections. *Cytometry A* 55 (2003) 30-42
36. McCullough MJ, Radden BG: Involucrin expression in some oral lichenoid lesions. *J Oral Pathol Med* 21 (1992) 367-9
37. Mehregan Dar, Mehregan Dav: Immunohistochemistry: A prognostic as well as diagnostic tool. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 15 (1996) 317-25
38. Nahm WK, Philpot BD, Adams MM, Badiavas EV, Zhou LH, Butmarc J, Bear MF, Falanga V: Significance of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor-mediated signaling in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 200 (2004) 309-17
39. Russ JC: *The image processing and analysis cookbook*. Reindeer Graphics Inc., Asheville NC 1996-2002
40. Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67 Protein: From the known and the unknown. *J Cellular Physiol* 182 (2000) 311-22
41. Taylor CR, Levenson RM: Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 49 (2006) 411-24
42. Underwood RA, Gibran NS, Muffley LA, Usui ML, Olerud JE: Color subtractive-computer-assisted image analysis for quantification of cutaneous nerves in a diabetic mouse model. *J Histochem & Cytochem* 49 (2001) 1285-91
43. Walker RA: Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology*. 49 (2006) 406-10
44. Watanabe S, Wagatsuma K, Ichikawa E, Takahashi H: Abnormal distribution of epidermal protein antigens in psoriatic epidermis. *J Dermatol* 18 (1991) 143-51
45. Watt FM: Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 81 (1983) 100-3

## 8. Anhang

### 8.1. Anhang A: Photoshop Aktionen erstellen, speichern und laden

Mit Hilfe der Photoshop Aktionen kann eine Abfolge verschiedener Bearbeitungsschritte automatisiert werden. Wird die Palette „Aktionen“ nicht in Photoshop angezeigt, kann sie über Fenster > Aktionen aufgerufen werden. Um eine neue Aktion anzulegen, wird zunächst in der unteren Menüleiste der Button „Neue Aktion“ betätigt (siehe Abbildung). Wird anschließend der Button „Aufzeichnung beginnen“ aktiviert, werden alle nachfolgend auf das Bild angewandten Bearbeitungsschritte aufgezeichnet. Mit dem Button „Ausführung / Aufzeichnung beenden“ wird die Aufzeichnung beendet. Anschließend kann die aufgezeichnete Abfolge von Bearbeitungsschritten automatisch auf jedes Bild angewandt werden, indem die entsprechende Aktion zunächst ausgewählt und dann der Button „Auswahl ausführen“ betätigt wird. Die Aktionen werden in Aktionssets zusammengefasst. Um ein solches Aktionsset zu speichern, wird das Aktionsset markiert, dann das Menü für die Aktionen geöffnet und "Aktionen speichern" ausgewählt. Das entsprechende Aktionsset kann nun als Datei im Format \*.atn in einem beliebigen Ordner gespeichert werden. Ein anderer Nutzer kann auf seinem Rechner im gleichen Menü den Befehl "Aktionen laden" wählen und so das Aktionsset in die eigene Anwendung importieren. Wird bei der Speicherung eines Aktionssets die Taste Alt Gr gedrückt, wird keine Datei im \*.atn Format erstellt, sondern eine Textdatei, in der die Schritte des Aktionssets dokumentiert sind.



## 8.2. Anhang B: Dokumentation der verwendeten Aktionen

<b>Aktion: Kalibrierung</b> Calibrate Magnification Units Per Pixel: 0,571 Units: $\mu\text{m}$	<b>Aktion: Basalmembran</b> Erstellen Ebene Verwenden: Ebene Name: "Basalmembran" Auswahl Ebene "Basalmembran" Ohne Sichtbar machen Einblenden Ebene "Basalmembran" Bewegen aktueller Ebene Bis: vorne Ebene Setzen Vordergrundfarbe Als: RGB-Farben Rot: 0 Grün: 0 Blau: 0 Auswahl Buntstift Setzen aktueller Pinsel Als: Pinsel Hauptdurchmesser: 1 Pixel Stopp Meldung: "Bitte zeichnen Sie die Basalmembran ein."
--	--

<p><b>Aktion: Obergrenze Stratum corneum</b></p> <p>Erstellen Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Verwenden: Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Name: "Obergrenze Stratum corneum"</p> <p>Auswahl Ebene "Obergrenze Stratum corneum"</p> <p style="padding-left: 20px;">Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden Ebene "Obergrenze Stratum corneum"</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Bis: vorne Ebene</p> <p>Setzen Vordergrundfarbe</p> <p style="padding-left: 20px;">Als: RGB-Farben</p> <p style="padding-left: 20px;">Rot: 0</p> <p style="padding-left: 20px;">Grün: 0</p> <p style="padding-left: 20px;">Blau: 0</p> <p>Auswahl Buntstift</p> <p>Setzen aktueller Pinsel</p> <p style="padding-left: 20px;">Als: Pinsel</p> <p style="padding-left: 20px;">Hauptdurchmesser: 1 Pixel</p> <p>Stopp</p> <p style="padding-left: 20px;">Meldung: "Bitte zeichnen Sie die Obergrenze des Stratum corneums ein."</p>	<p><b>Aktion: Untergrenze Stratum corneum</b></p> <p>Erstellen Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Verwenden: Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Name: "Untergrenze Stratum corneum"</p> <p>Auswahl Ebene "Untergrenze Stratum corneum"</p> <p style="padding-left: 20px;">Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden Ebene "Untergrenze Stratum corneum"</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Bis: vorne Ebene</p> <p>Setzen Vordergrundfarbe</p> <p style="padding-left: 20px;">Als: RGB-Farben</p> <p style="padding-left: 20px;">Rot: 0</p> <p style="padding-left: 20px;">Grün: 0</p> <p style="padding-left: 20px;">Blau: 0</p> <p>Auswahl Buntstift</p> <p>Setzen aktueller Pinsel</p> <p style="padding-left: 20px;">Als: Pinsel</p> <p style="padding-left: 20px;">Hauptdurchmesser: 1 Pixel</p> <p>Stopp</p> <p style="padding-left: 20px;">Meldung: "Bitte zeichnen sie die Untergrenze des Stratum corneums ein."</p>
--	---

<p><b>Aktion: Fläche vitale Epidermis</b></p> <p>Auswahl Ebene "Untergrenze Stratum corneum"</p> <p style="padding-left: 20px;">Ohne Sichtbar machen</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Name: "vitale Epidermis"</p> <p style="padding-left: 20px;">2</p> <p>Auswahl Ebene "vitale Epidermis"</p> <p style="padding-left: 20px;">Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden aktueller Ebene</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Bis: vorne Ebene</p> <p>Einblenden Ebene "Basalmembran"</p> <p>Auswahl Ebene "Basalmembran"</p> <p style="padding-left: 20px;">Ohne Sichtbar machen</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Name: "Basalmembran Kopie"</p> <p style="padding-left: 20px;">2</p>	<p><b>Aktion: Fläche Stratum corneum</b></p> <p>Auswahl Ebene "Untergrenze Stratum corneum"</p> <p style="padding-left: 20px;">Ohne Sichtbar machen</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Name: "Stratum corneum"</p> <p style="padding-left: 20px;">2</p> <p>Auswahl Ebene "Stratum corneum"</p> <p>Einblenden Ebene "Stratum corneum"</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Bis: vorne Ebene</p> <p>Auswahl Ebene "Obergrenze Stratum corneum"</p> <p style="padding-left: 20px;">Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden Ebene "Obergrenze Stratum corneum"</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p style="padding-left: 20px;">Name: "Begrenzung Stratum corneum Kopie"</p>
--	--

<p>Auswahl Ebene "Basalmembran Kopie"</p> <p>Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden Ebene "Basalmembran Kopie"</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>Bis: vorne Ebene</p> <p>Auf eine Ebene reduzieren</p> <p>Stopp</p> <p>Meldung: "Bitte das Zauberstab-Werkzeug auswählen und in die vitale Epidermis klicken."</p> <p>Fläche füllen</p> <p>Verwenden: Schwarz</p> <p>Deckkraft: 100%</p> <p>Modus: normal</p> <p>Auswahl umkehren</p> <p>Fläche füllen</p> <p>Verwenden: Weiß</p> <p>Deckkraft: 100%</p> <p>Modus: normal</p> <p>Setzen Auswahl</p> <p>Als: ohne</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>Bis: vorne Ebene</p> <p>Setzen Ebenenstile von aktueller Ebene</p> <p>Als: Ebenenstile</p> <p>Skalieren: 100%</p> <p>Kontur füllen: Kontur</p> <p>Mit Aktiviert</p> <p>Position: innen</p> <p>Füllmethode: Farbe</p> <p>Modus: normal</p> <p>Deckkraft: 100%</p> <p>Größe: 1 Pixel</p> <p>Farbe: RGB-Farben</p> <p>Rot: 255</p> <p>Grün: 255</p> <p>Blau: 255</p> <p>Auf eine Ebene reduzieren</p> <p>Ausblenden Ebene "vitale Epidermis"</p>	<p>2</p> <p>Auswahl Ebene "Begrenzung Stratum corneum Kopie"</p> <p>Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden Ebene "Begrenzung Stratum corneum Kopie"</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>Bis: vorne Ebene</p> <p>Auf eine Ebene reduzieren</p> <p>Stopp</p> <p>Meldung: "Bitte das Zauberstab-Werkzeug auswählen und in das Stratum corneum klicken."</p> <p>Fläche füllen</p> <p>Verwenden: Schwarz</p> <p>Deckkraft: 100%</p> <p>Modus: normal</p> <p>Auswahl umkehren</p> <p>Fläche füllen</p> <p>Verwenden: Weiß</p> <p>Deckkraft: 100%</p> <p>Modus: normal</p> <p>Setzen Auswahl</p> <p>Als: ohne</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>Bis: vorne Ebene</p> <p>Setzen Ebenenstile von aktueller Ebene</p> <p>Als: Ebenenstile</p> <p>Skalieren: 100%</p> <p>Kontur füllen: Kontur</p> <p>Mit Aktiviert</p> <p>Position: innen</p> <p>Füllmethode: Farbe</p> <p>Modus: normal</p> <p>Deckkraft: 100%</p> <p>Größe: 1 Pixel</p> <p>Farbe: RGB-Farben</p> <p>Rot: 255</p> <p>Grün: 255</p>
---	--

	Blau: 255 Auf eine Ebene reduzieren Ausblenden aktueller Ebene
--	--

<p><b>Aktion: Dicke Stratum corneum</b></p> <p>Öffnen            C:\Dickemessung.jpg</p> <p>Setzen Auswahl            Als: alle</p> <p>Kopieren</p> <p>Schließen</p> <p>Erstellen Ebene            Verwenden: Ebene            Name: "Dicke Stratum corneum"</p> <p>Einblenden Ebene "Dicke Stratum corneum"</p> <p>Auswahl Ebene "Dicke Stratum corneum"            Ohne Sichtbar machen</p> <p>Bewegen aktueller Ebene            Bis: vorne Ebene</p> <p>Einfügen            Glätten: ohne</p> <p>Auswahl Ebene "Stratum corneum"</p> <p>Bewegen aktueller Ebene            Bis: vorne Ebene</p> <p>Farbbereich            Farben: Lichter</p> <p>Auswahl Ebene "Dicke Stratum corneum"            Ohne Sichtbar machen</p> <p>Bewegen aktueller Ebene            Bis: vorne Ebene</p> <p>Fläche füllen            Verwenden: Weiß            Deckkraft: 100%            Modus: normal</p> <p>Setzen Auswahl            Als: ohne</p> <p>Auswahl Ebene "Stratum corneum"            Ohne Sichtbar machen</p> <p>Ausblenden aktueller Ebene</p> <p>Auswahl Ebene "Dicke Stratum corneum"</p>	<p><b>Aktion: Dicke vitale Epidermis</b></p> <p>Öffnen            C:\Dickemessung.jpg</p> <p>Setzen Auswahl            Als: alle</p> <p>Kopieren</p> <p>Schließen</p> <p>Erstellen Ebene            Verwenden: Ebene            Name: "Dicke vitale Epidermis"</p> <p>Einblenden Ebene "Dicke vitale Epidermis"</p> <p>Auswahl Ebene "Dicke vitale Epidermis"            Ohne Sichtbar machen</p> <p>Bewegen aktueller Ebene            Bis: vorne Ebene</p> <p>Einfügen            Glätten: ohne</p> <p>Auswahl Ebene "vitale Epidermis"            Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden aktueller Ebene</p> <p>Bewegen aktueller Ebene            Bis: vorne Ebene</p> <p>Farbbereich            Farben: Lichter</p> <p>Auswahl Ebene "Dicke vitale Epidermis"            Ohne Sichtbar machen</p> <p>Bewegen aktueller Ebene            Bis: vorne Ebene</p> <p>Fläche füllen            Verwenden: Weiß            Deckkraft: 100%            Modus: normal</p> <p>Setzen Auswahl            Als: ohne</p> <p>Auswahl Ebene "vitale Epidermis"            Ohne Sichtbar machen</p>
--	--

<p>Ohne Sichtbar machen</p> <p>Ausblenden aktueller Ebene</p>	<p>Ausblenden aktueller Ebene</p> <p>Auswahl Ebene "Dicke vitale Epidermis"</p> <p>Ohne Sichtbar machen</p> <p>Ausblenden aktueller Ebene</p>
---	---

<p><b>Aktion: positive Zellkerne</b></p> <p>Auswahl Ebene "vitale Epidermis"</p> <p>Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden aktueller Ebene</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>Bis: Ebene 8</p> <p>Ohne Auswahl anpassen</p> <p>Farbbereich</p> <p>Farben: Lichter</p> <p>Auswahl Ebene "Hintergrund"</p> <p>Ohne Sichtbar machen</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p>Name: "positive Zellkerne"</p> <p>2</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>Bis: Ebene 9</p> <p>Ohne Auswahl anpassen</p> <p>Fläche füllen</p> <p>Verwenden: Weiß</p> <p>Deckkraft: 100%</p> <p>Modus: normal</p> <p>Setzen Auswahl</p> <p>Als: ohne</p> <p>Kanalmixer</p> <p>Mit Monochromatisch</p> <p>Schwarz-Ausgabe: ist eine Mischung aus</p> <p>Rot: -200%</p> <p>Grün: 170%</p> <p>Blau: 170%</p> <p>Ausblenden Ebene "Dicke vitale Epidermis"</p> <p>Ausblenden Ebene "Dicke Stratum corneum"</p>	<p>Ausblenden Ebene "Stratum corneum"</p> <p>Ausblenden Ebene "Basalmembran"</p> <p>Ausblenden Ebene "Obergrenze Stratum corneum"</p> <p>Ausblenden Ebene "Untergrenze Stratum corneum"</p> <p>Ausblenden Ebene "vitale Epidermis"</p> <p>Setzen aktueller Ebene</p> <p>Als: Ebene</p> <p>Modus: multiplizieren</p> <p>Stopp</p> <p>Meldung: "Bitte wählen Sie Bild &gt; Anpassen &gt; Schwellenwert und setzen Sie den Schwellenwert so, das alle MIB-positiven Zellen schwarz dargestellt werden."</p> <p>Watershed Segmentation</p> <p>Reject Features</p> <p>Edge Cutoff Mode: &lt;unbekannt&gt;</p> <p>Cutoff Size (Pixels): 40</p> <p>Outline</p> <p>Setzen aktueller Ebene</p> <p>Als: Ebene</p> <p>Modus: abdunkeln</p>
--	---

<p><b>Aktion: Fläche Färbung</b></p> <p>Auswahl Ebene "Hintergrund"</p> <p>    Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden Hintergrund</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p>    Name: "Fläche Färbung"</p> <p>    2</p> <p>Kanalmixer</p> <p>    Mit Monochromatisch</p> <p>    Schwarz-Ausgabe: ist eine Mischung aus</p> <p>    Rot: -200%</p> <p>    Grün: 170%</p> <p>    Blau: 170%</p> <p>Auswahl Ebene "vitale Epidermis"</p> <p>    Ohne Sichtbar machen</p> <p>Einblenden aktueller Ebene</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>    Bis: vorne Ebene</p> <p>Farbbereich</p> <p>    Farben: Lichter</p> <p>Ausblenden aktueller Ebene</p> <p>Auswahl Ebene "Fläche Färbung"</p> <p>    Ohne Sichtbar machen</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>    Bis: vorne Ebene</p> <p>Fläche füllen</p> <p>    Verwenden: Weiß</p> <p>    Deckkraft: 100%</p> <p>    Modus: normal</p> <p>Setzen Auswahl</p> <p>    Als: ohne</p> <p>Schwellenwert</p> <p>    Tonwertkorrektur: 170</p> <p>Reject Features</p> <p>    Edge Cutoff Mode: Remove any edge</p> <p>    Cutoff Size (Pixels): 40</p> <p>Ausblenden Ebene "Fläche Färbung"</p>	<p><b>Aktion: Dichte Färbung</b></p> <p>Auswahl Ebene "Hintergrund"</p> <p>    Ohne Sichtbar machen</p> <p>Duplizieren aktueller Ebene</p> <p>    Name: "Dichte Färbung"</p> <p>    2</p> <p>Kanalmixer</p> <p>    Mit Monochromatisch</p> <p>    Schwarz-Ausgabe: ist eine Mischung aus</p> <p>    Rot: -200%</p> <p>    Grün: 170%</p> <p>    Blau: 170%</p> <p>Einblenden Ebene "vitale Epidermis"</p> <p>Auswahl Ebene "vitale Epidermis"</p> <p>    Ohne Sichtbar machen</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>    Bis: vorne Ebene</p> <p>Farbbereich</p> <p>    Farben: Lichter</p> <p>Auswahl Ebene "Dichte Färbung"</p> <p>    Ohne Sichtbar machen</p> <p>Ausblenden aktueller Ebene</p> <p>Einblenden Ebene "Dichte Färbung"</p> <p>Bewegen aktueller Ebene</p> <p>    Bis: vorne Ebene</p> <p>Fläche füllen</p> <p>    Verwenden: Weiß</p> <p>    Deckkraft: 100%</p> <p>    Modus: normal</p> <p>Setzen Auswahl</p> <p>    Als: ohne</p> <p>Ausblenden aktueller Ebene</p> <p>Ausblenden Ebene "vitale Epidermis"</p>
--	--

## 9. Thesen

1. Immunhistochemisch nachweisbare Proliferations- und Differenzierungsmarker sind für die Diagnostik und Erforschung verschiedener Dermatosen von herausragender Bedeutung.
2. Mit dem vorgestellten digitalen Bildanalyseverfahren lassen sich immunhistochemisch nachgewiesene Proliferations- und Differenzierungsmarker in der Epidermis zuverlässig quantifizieren. Durch die Anwendung einer leicht zugänglichen und verbreiteten Software (Adobe Photoshop und Image Processing Tool Kit) sowie durch die weitestgehend automatisierte Arbeitsweise ist das Verfahren praktikabel und ermöglicht die Nutzbarkeit durch andere Anwender.
3. Das Ausmaß der Verhornung sowie die Größe der vitalen Epidermis lassen sich mit Hilfe der digitalen Bildanalyse quantifizieren, wobei die Flächenmessung als die zuverlässigere Messmethode anzusehen ist.
4. Bei der Psoriasis vulgaris, beim Lichen ruber und bei aktinischen Keratosen besteht zumeist eine Hyperkeratose. Der prozentuale Anteil des Stratum corneum an der Gesamtepidermisdicke ist im Vergleich zu gesunder Haut jedoch nur bei aktinischen Keratosen erhöht.
5. Bei der Psoriasis vulgaris finden Proliferationsvorgänge auch suprabasal statt. Quantitativ ist im Vergleich zu gesunder Haut eine vermehrte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 nachweisbar.
6. Bei der Psoriasis vulgaris ist die Expression des Differenzierungsmarkers Filaggrin stark verringert. Die Intensität von Cytokeratin 10 ist erniedrigt, bezüglich der flächenmäßigen Ausprägung finden sich keine Unterschiede im Vergleich zu gesunder Haut. Für den späten Differenzierungsmarker Involucrin sind die Ergebnisse uneinheitlich.
7. Beim Lichen ruber besteht eine im Vergleich zu gesunder Haut erhöhte Anzahl MIB1-positiver Zellen.

8. Beim Lichen ruber mit der krankheitstypischen Hyperproliferation des Stratum granulosum wird der Differenzierungsmarker Filaggrin bezüglich seiner Intensität vermehrt exprimiert. Für die flächenmäßige Ausprägung lassen sich keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Cytokeratin 10 wird geringer als in gesunder Haut exprimiert. Für den späten Differenzierungsmarker Involucrin können keine Unterschiede zu gesunder Haut nachgewiesen werden.

9. Bei aktinischen Keratosen sind MIB1-positive Zellen teilweise auch in den suprabasalen Anteilen der vitalen Epidermis sichtbar. Quantitativ lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zu normaler Haut aufzeigen, weshalb unsere Annahme, eine gesteigerte Ki-67-Expression vorzufinden, nicht bestätigt werden kann.

10. Für die beiden Differenzierungsmarker Filaggrin und Cytokeratin 10 finden sich bei den aktinischen Keratosen erwartungsgemäß eine im Vergleich zu gesunder Haut verminderte Expression. Die Ergebnisse aus der Messung der Involucrin-Expression sind bei aktinischen Keratosen uneinheitlich.

11. Ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor) und der Expression der Proliferations- und Differenzierungsmarker lässt sich in der vorliegenden Untersuchung nicht finden.

12. Die Expression des NMDA-Rezeptors ist bei Verhornungsstörungen mit Parakeratose vermindert.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name: Katrin Radant, geb. Benndorf  
Geburtsdatum: 10.09.1977  
Geburtsort: Halle/Saale

### Schulbildung

1984-1991 Polytechnische Oberschule, Halle  
1991-1996 Landesgymnasium Latina August Hermann Francke, Halle  
1996 Abitur

### Studium

1996-2002 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
  
12/2002 Drittes Staatsexamen

### Weiterbildung

02/2003-07/2004 Ärztin im Praktikum in der Dermatologischen Klinik des Klinikums Dorothea Christiane Erleben, Quedlinburg  
  
08/2004 Approbation  
  
08/2004-12/2007 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
  
12/2007 Fachärztin für Haut- und Geschlechtskrankheiten  
  
seit 01/2008 Fachärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## **Publikation**

Radant K, Radant M, Fischer M: Digitale Bildanalyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunder Haut und bei Psoriasis vulgaris. JDDG 2 (2007) 143

## **Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Digitale Bildanalyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in der Epidermis gesunder, entzündlich veränderter oder aktinisch geschädigter Haut**

selbstständig verfasst zu haben.

Halle/Saale, im Mai 2008

## **Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Digitale Bildanalyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in der Epidermis gesunder, entzündlich veränderter oder aktinisch geschädigter Haut**

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

Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Halle/Saale, im Mai 2008

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Betreuung von Herrn Privatdozent Dr. med. Matthias Fischer. Ihm danke ich an erster Stelle für seine Unterstützung und Beratung bei der Bearbeitung des Themas. Er hat mir sowohl fachliche als auch moralische Unterstützung gegeben, ich schätze die Zusammenarbeit mit ihm sehr.

Herrn Professor Dr. med. Marsch danke ich für die fundierte Ausbildung im Fach Dermatologie und für die Motivation, kontinuierlich an der Dissertation zu arbeiten.

Für die praktische Anwendung des entwickelten digitalen Bildanalyseverfahrens und die sich daraus ergebenden konstruktiven Gespräche danke ich Herrn Privatdozent Dr. med. Johannes Wohlrab.

Dem Direktor des Institutes für Informatik der Martin-Luther-Universität Prof. Dr.-Ing. Stefan Posch danke ich für wertvolle Hinweise bei der Arbeit mit digitaler Bildanalyse.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern für ihren Zuspruch und ihre Unterstützung. Sie waren mir vor allem bei der Fertigstellung der Arbeit eine sehr große Hilfe.

Mein größter Dank gilt Matthias. Er hat mich bei der Entwicklung des Analyseverfahrens unermüdlich unterstützt, beraten und mit Geduld und viel Verständnis zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.