

Konfokálna mikroskopia – nový pohľad do našej kože

Confocal microscopy – a new insight into our skin

Hegy, J.

Súhrn

Liečba bola po stáročia spojená s bolestivými zákrokmi. O to intenzívnejšia je snaha modernej medicíny liečiť a vyšetřovať neinvazívne a nebolestivo. Tento trend je viditeľný vo všetkých odboroch medicíny a dermatológiu je jedným z priekopníkov. V snahe získať hodnoverné výsledky a nemusieť pri tom invazívne vyšetřovať pacienta sa začalo v dermatovenerológii používať stále viac a viac poznatkov optiky a analýzy obrazu. Tieto metódy sa ukázali byť ideálne pre odbor, v ktorom je zrak hlavný diagnostický nástroj. Pre pôvodný nedostatok úzko špecializovaných zariadení a počítačových programov sa priekopníci obrátili na astronómiu, kde sa metódy digitálneho zberu a analýzy obrazu už dlhšiu dobu využívali a okrem toho bola pozorovaná určitá korelácia medzi snímanými obrazmi oboch odborov. V súčasnej dobe už existujú viaceré zariadenia a metódy, ktoré sú špecializované na využitie v dermatovenerológii na zobrazovanie kože, slizníc, vlasov a nechtov. Je to aj vďaka dostupnosti týchto nových technológií, dostupnosti výkonných počítačových systémov, ako aj ostatných špecificky orientovaných nástrojov, bez ktorých by sa takéto technológie dali len ťažko uplatniť v praxi.

Využívanie zobrazovacích postupov na zlepšenie manažmentu kožných chorôb môže byť pre dermatovenerológov novotou, pretože väčšinou sa diagnostika a liečba zameriavala na vizuálne vyšetřenie pacienta, niekedy doplnené diagnostickou biopsiou z chorobného ložiska.

KLúčové slová: *konfokálna mikroskopia, koža, neinvazívne vyšetřenie*

Abstract

For centuries, medical treatment was associated with painful procedures. That is why in modern medicine there is an intensive effort to treat and investigate in a non-invasive and painless way. This trend is visible in all fields of medicine, and dermatology is one of the pioneers. The effort to obtain reliable results without using invasive methods started in fact in dermatovenerology. This field has used more and more knowledge of optics and image analysis, which have proved to be ideal for the field in which the principal diagnostic tool is sight. In order to handle the initial lack of highly specialized equipment and computer programs the pioneers turned astronomy where the methods of collection and analysis of digital images have been used for a long time and, moreover, a certain correlation has been observed between the scanned images of both disciplines.

At present there are already a number of devices and methods that are specialized for use in dermatovenerology for the purpose of viewing skin, mucous membranes, hair and nails. It is also thanks to the availability of these new technologies and the availability of powerful computer systems, as well as other specifically based instruments, without which such technologies could hardly be applied in practice.

Key words: *confocal microscopy, skin, non-invasive investigation*

Princíp konfokálnej mikroskopie je známy už vyše päťdesiat rokov a jeho prvý prototyp bol zostrojený Marvinom Minskym v roku 1957. Projekt skončil neúspechom, pretože Minsky nenašiel pre svoj prístroj adekvátny svetelný zdroj. Tento fakt pozastavil vývoj konfokálnej mikroskopie až do polovice šesťdesiatych rokov, kedy na lekárskej fakulte UK v Plzni zostrojili a patentovali Hadravský a Petrň konfokálny mikroskop na princípe Nipkowovho kotúča. I keď mikroskop v tejto konfigurácii nedosiahol široké využitie, boli pomocou neho získané prvé ostré úzke optické rezy hrubou vzorkou [1, 2].

Konfokálnymikroskopnarozdielodklasickejmikroskopie využíva bodové osvetlenie a bodovú clonu rôznej veľkosti v opticky konjugovanej roviny pred snímačom. Pomocou tejto metódy je konfokálny mikroskop schopný eliminovať signál dopadajúci z neostrej roviny nad a pod zaostrenou vrstvou (Schéma 1). Označenie „konfokálny“ vychádza práve z tejto konfigurácie. Snímač konfokálneho mikroskopu dokáže pri správnom zaostrení snímať odraz alebo fluorescenciu len z veľmi úzkeho okolia fokálnej roviny. V praxi to znamená, že sme schopní pomocou tohto usporiadania optickej osi ostro a selektívne pozorovať aj štruktúry zanorené vo vzorke. Pri klasickej konfokálnej mikroskopii je v jednom momente snímaná len jedna rovina.

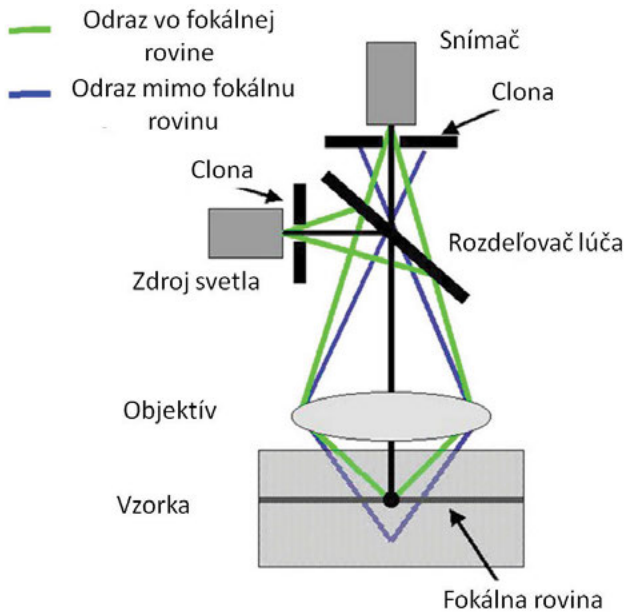


Schéma 1 • Znáozornenie častí konfokálneho mikroskopu

Obmedzenia konfokálnej mikroskopie

Konfokálna mikroskopia má však aj svoje nevýhody a hranice. Využitie konfigurácie s variabilnou bodovou clonou výrazne znižuje intenzitu signálu dopadajúceho na detektor, čo vyžaduje dlhé expozičné časy. Druhým obmedzením konfokálnej mikroskopie je hĺbka penetrácie použitého svetelného zdroja. Súčasná technická úroveň nám síce dáva k dispozícii aj silnejšie svetelné zdroje so schopnosťou penetrovat' hlbšie do skúmaného preparátu, ale výkon takéhoto zdroja už môže poškodiť biologické systémy, a tým sa stáva prakticky nepoužiteľným.

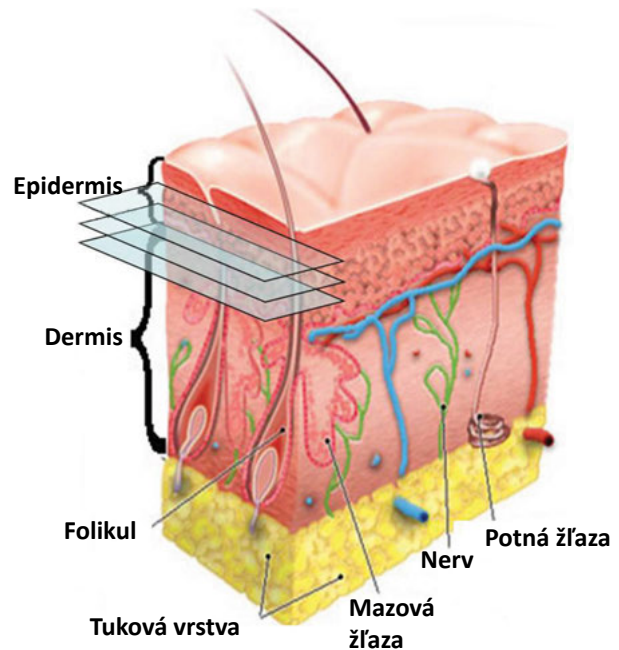
Konfokálny obraz

Každá diagnostická metóda má svoje špecifiká a nie je tomu inak ani pri konfokálnej mikroskopii. Už desaťročia sa považuje za štandard mikroskopického zobrazovania tkaniva laterálny histopatologický rez. Obdobne je tomu aj pri iných zobrazovacích metódach, ako napríklad vysokofrekvenčná ultrasonografia alebo optická koherentná tomografia. Tieto metódy pracujú tiež so zobrazením v laterálnej rovine, a preto boli pohotovejšie prijaté odbornou verejnosťou. V prípade vysokofrekvenčnej ultrasonografie sa stali neodlúčiteľnou súčasťou diagnostiky (predoperačné meranie hrúbky kožného nádoru – Breslow). Pri konfokálnej mikroskopii sa však stretávame s takzvaným *en face* zobrazením (Obr. 1).

Zobrazenie *en face* znamená, že obraz vidíme v horizontálnych rovinách a vďaka konštrukcii mikroskopu prenikáme postupne do hĺbky odhaľovaním jednotlivých horizontálnych vrstiev.

Hrúbka jednotlivých vrstiev sa postupne znižila natoľko, že momentálne dokážeme zobraziť vrstvu tenšiu ako 5 µm. Táto vertikálna rozlišovacia schopnosť spojená s laterálnou rozlišovacou schopnosťou menšou ako 1,5 µm už umožňuje snímanie tkaniva na subcelulárnej úrovni, avšak v rovine

posunutej o 90° oproti štandardnému histologickému rezu. Z toho dôvodu je potrebné poznať tvar jednotlivých štruktúr v *en face* zobrazení.



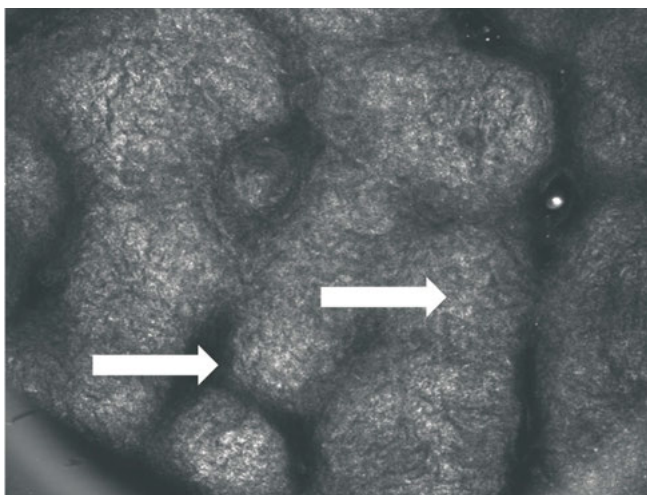
Obr. 1 • Zobrazenie *en face* snímania kože konfokálnym mikroskopom (schéma: autor)

Konfokálna mikroskopia má ešte jedno špecifikum. Všetky štruktúry sú zobrazené čiernobielo, respektíve na čiernobielej osi, na základe intenzity a vlnovej dĺžky odrazu použitého elektromagnetického žiarenia. Tejto vlastnosti sa hovorí refraktérnosť. Väčšina komerčne dostupných reflektčných konfokálnych mikroskopov používaných v medicíne na neinvazívnu diagnostiku využíva laserový lúč o nízkom výkone (trieda 1M) do 36 mW a vlnovú dĺžku v rozpätí od 430 do 850 nm. Najbežnejšie používané prístroje pracujú s vlnovou dĺžkou 830 nm. Pri týchto charakteristikách vykazujú tri látky v koži vysoký index odrazu (vysokú refraktérnosť) a zobrazujú sa ako biele alebo svetlo šedé. Jedná sa o keratín, melanín a kolagén. Iné látky v koži budú mať naopak nízky index odrazu (nízku refraktérnosť) a skôr čiernu alebo tmavošedú farbu. Práve vznikajúci kontrast dokážeme zobraziť a spolu s ním aj jednotlivé štruktúry v koži.

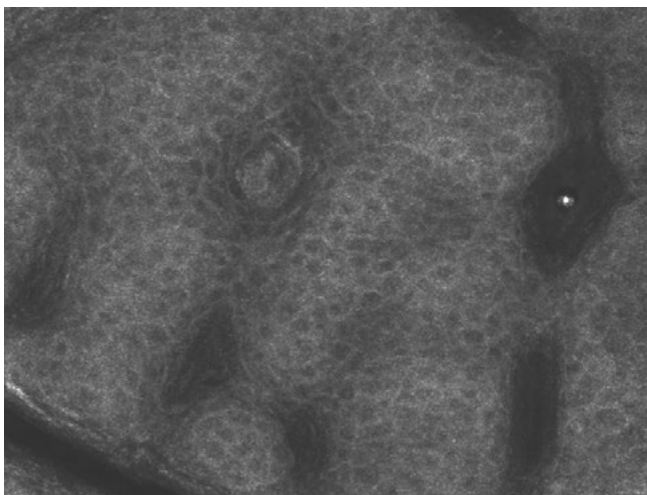
Konfokálne znaky fyziologickej kože

Keď snímame fyziologickú ľudskú kožu, narazíme na opakujúce sa znaky, ktoré zodpovedajú jednotlivým anatomickým vrstvám a štruktúram. Prvá vrstva, ktorá sa pri snímaní zobrazí, je stratum corneum. Pomocou konfokálnej mikroskopie je do určitej miery možné odlíšiť aj jednotlivé korneocyty v stratum disjunctum, ktoré sa zobrazia ako voľne plávajúce polygonálne štruktúry v médiu s bielym reflektujúcim lemom. Stratum conjunctum vykazuje kvôli väčšej hrúbke intenzívny biely odraz (Obr. 2). Štruktúra stratum corneum pripomína pohľad na

hornatý terén, v ktorom dominujú vyvýšené oblasti striedajúce sa s depresiami (takzvaný znak „Hills and valleys“). Približne po 20 μm ustúpi stratum corneum a zobrazí sa stratum granulosum. Práve pri stratum granulosum je markantný rozdiel medzi konfokálnym a histologickým obrazom. V laterálnom, histologickom, zobrazení sa bunky stratum granulosum javia byť úzke, husto usporiadané štruktúry. V konfokálnom, horizontálnom *en face* zobrazení majú polygonálny tvar od 15 μm do 20 μm v priemere, s tmavým nerefraktérnym jadrom a tenkou refraktérnou cytoplazmou (Obr. 3). Štruktúrou pripomína stratum granulosum včelí plást (tzv. „honeycombed pattern“).



Obr. 2 • Konfokálny obraz stratum corneum s viditeľným znakom „Hills and valleys“ (označené šipkou) a vývodom ekrinnej žľazy (foto: autor) (500 x 500 μm)

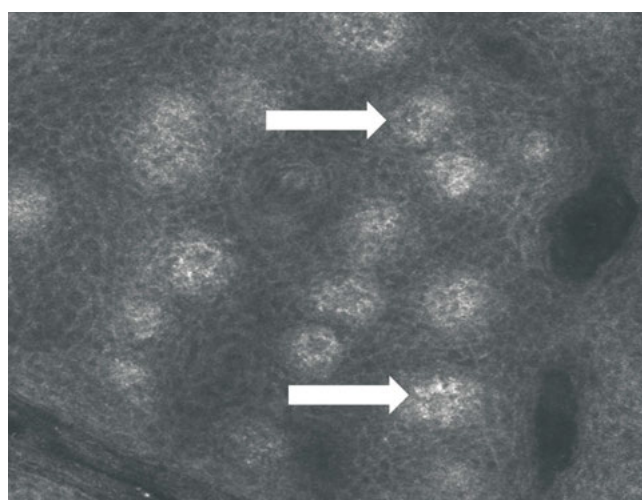


Obr. 3 • Konfokálny obraz stratum granulosum s viditeľnou charakteristickou štruktúrou včelieho plástu (foto: autor) (500 x 500 μm)

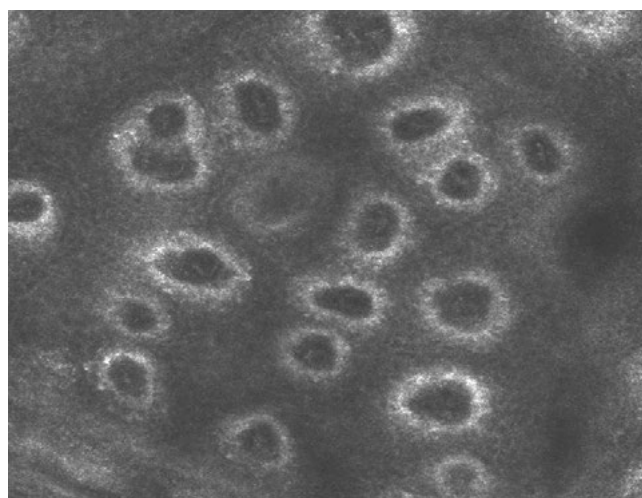
Pri posune snímanej roviny do hĺbky o približne 15 μm sa začne postupne prelínavo zobrazovať stratum spinosum. Aj táto vrstva je tvorená polygonálnymi bunkami s tmavým nerefraktérnym jadrom a tenkou refraktérnou cytoplazmou, avšak rozmer jednotlivých keratinocytov je menší ako pri

stratum granulosum. Práve kvôli podobnosti spomínaných dvoch vrstiev v konfokálnom zobrazení sa dajú ľahko zameniť. Okrem rozmeru buniek je ďalším rozdielom hrúbka stratum spinosum, ktorá býva na základe lokalizácie snímania niekoľkonásobne väčšia ako pri stratum granulosum.

Postupným zanorovaním sa do hlbších vrstiev sa nám v stratum spinosum začnú objavovať rôzne veľké ostrovčeky vysokorefraktérnych buniek. Jedná sa o vrcholy dermálnych papíl (Obr. 4). Vysokorefraktérne bunky predstavujú melanocyty nachádzajúce sa na bazálnej membráne. Pri ďalšom posune do hĺbky sa jednotlivé ostrovčeky zmenia na vysokorefraktérne prstence predstavujúce bazálnu membránu a centrálné uložené nízko refraktérne kapilárny lumen a papilárnu dermis. Keďže obraz je snímaný kontinuálne v tzv. „realtime“ režime, budú sa v kapilárnom lumene zobrazovať jednotlivé bunky krvného obehu (erytrocyty a leukocyty) (Obr. 5).



Obr. 4 • Konfokálny obraz stratum spinosum s viditeľnými vrchmi dermálnych papíl (označené šipkou) a vysokorefraktérnymi bunkami (foto: autor) (500 x 500 μm)



Obr. 5 • Konfokálny obraz stratum spinosum s vysokorefraktérnymi prstencami bazálnej membrány a centrálnymi uloženými kapilármi (foto: autor) (500 x 500 μm)

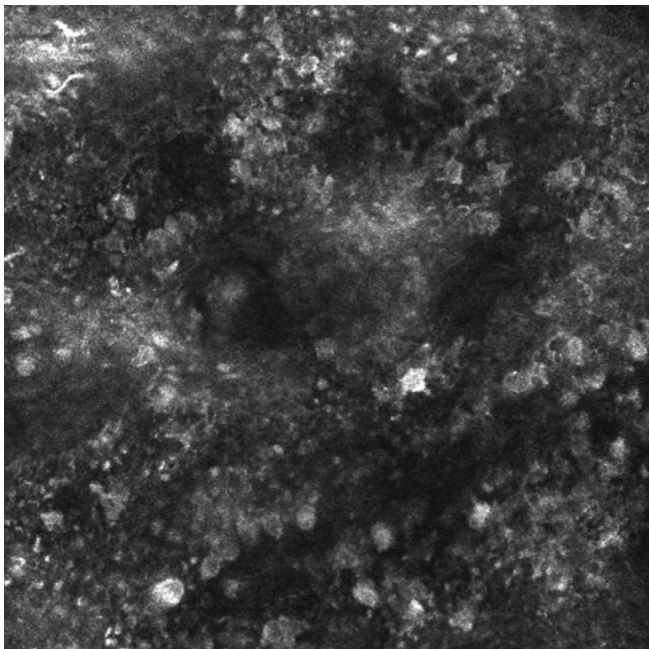
Po prekročení bazálnej membrány sa reflektovaný signál začne postupne strácať kvôli hĺbke a nízkemu výkonu lasera. Z toho dôvodu je laserový refraktérny konfokálny mikroskop pri penetrácii do dermis schopný zobrazit' len vysoko refraktérny kolagén.

Okrem jednotlivých vrstiev kože sme schopní konfokálnou mikroskopiou zobrazit' aj niektoré adnexá. Dobrým príkladom sú vývody ekrinných žliaz s charakteristickou skrutkovitou štruktúrou a relatívne vysokým refraktérnym indexom. Dobre pozorovateľné sú aj vlasy, ochlpenie a ústie pilosebaceózneho komplexu s charakteristickým cirkulárnym usporiadaním buniek ostia. Určitým obmedzením pri snímaní kože je anatomická štruktúra epidermy na dlaniach a stupajach. Vzhľadom na hrúbku stratum corneum a prítomnosť stratum lucidum nedokážeme zobrazit' v týchto lokalizáciách celú epidermis bez použitia silnejšieho laserového zdroja, ktorý by však mohol poškodiť snímané tkanivo. Niektoré moderné konfokálne mikroskopy dovoľujú popri snímaní v základnom zväčšovacom režime aj digitálne zväčšenie (tzv. „digital zoom enhancement“), pomocou ktorého sme schopní na bazálnej membráne rozoznať jednotlivé dendrity melanocytov, transportujúce melanosómy do cieľových keratinocytov.

Súčasný stav výskumu

Melanocytárne lézie

Jedna z prvých oblastí v dermatológii, kde sa začala konfokálna mikroskopia využívať, bola onkológia. I keď štandardom v neinvazívnej diagnostike pigmentovaných kožných lézií sa stala dermatoskopia, nie vždy je táto metóda schopná správne diagnostikovať suspektné ložisko.

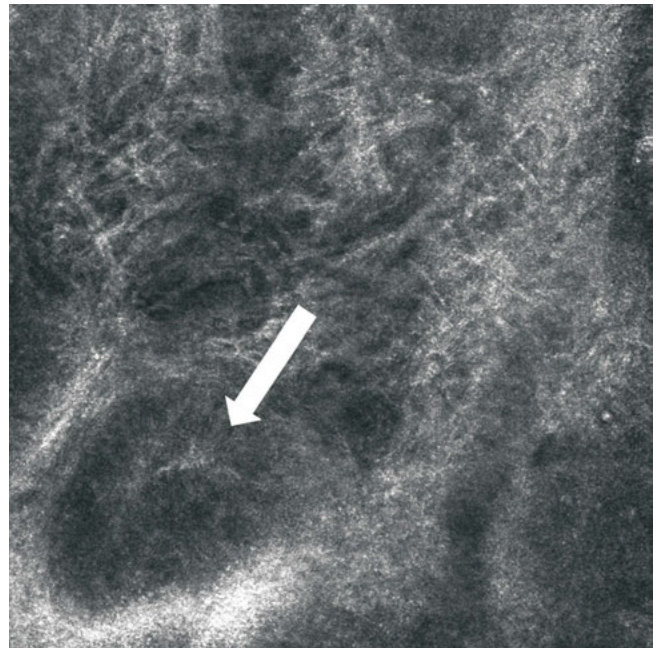


Obr. 6 • Konfokálny obraz pagetoidného rozptylu buniek v melanóme (foto: autor) (500 x 500 μm)

Konfokálna mikroskopia vďaka svojej neinvazivite a dostatočnej hĺbke snímania sa javila byť ideálnym doplnovacím vyšetrením. V súčasnej dobe sú definované dva hlavné znaky a štyri vedľajšie znaky charakterizujúce maligne zvrhnutie. Najmarkantnejšie sú viditeľná dysplázia buniek epidermy a papilárnej dermis („Pagetoid spread“) a alterácia viditeľného melaninového prstenca papily (Obr. 6) [2, 3].

Nemelanómové kožné nádory

Druhým širokým poľom, v ktorom našla konfokálna mikroskopia využitie, je diagnostika nemelanómových nádorov kože. Výskum a prax sa intenzívnejšie prikláňa k problematike bazocelulárneho karcinómu, a to pre jeho jednoznačný klinický a konfokálny obraz (polarizácia buniek epidermis, viditeľné bazaloidné granuly, horizontálna neovaskularizácia) (Obr. 7).



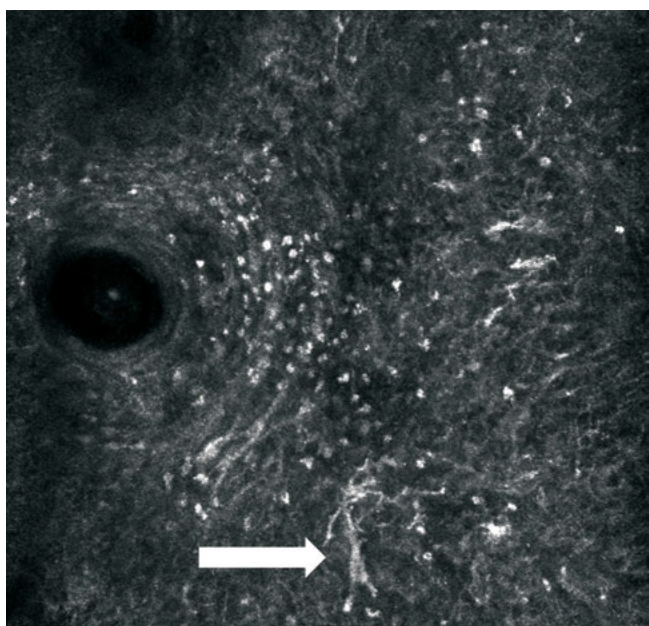
Obr. 7 • Konfokálny obraz bazaloidných granúl (označené šípkou) a kolagénových vlákien v bazocelulárnom karcinóme (foto: autor) (500 x 500 μm)

Aktinické keratózy a spinocelulárny karcinóm sú síce diagnostikovateľné konfokálnym mikroskopom (dysplastické bunky v epidermis, horizontálna neovaskularizácia, parakeratóza, hyperkeratóza), ale diferenciácia medzi nimi je často možná len na základe klinického obrazu. Pri tejto širokej skupine nádorov sa práve kvôli relatívne ľahkej klinickej diagnostike využíva konfokálna mikroskopia v prvom rade na demarkáciu tumoru, respektíve určenie úspešnosti rôznych foriem neinvazívnej terapie [4,5].

Ochorenia kože spojené so zápalom

Jedná sa o relatívne širokú skupinu diagnóz, pri ktorých sme schopní diagnostikovať zápal, respektíve zobraziť zápalové bunky v epiderme (Langerhansenove bunky, neutrofilly).

Rosacea, acne vulgaris, pemphigus foliaceus, lupus erythematosus sú príklady diagnóz, pri ktorých bola konfokálna mikroskopia použitá za účelom diagnostiky alebo kontroly dynamiky ochorenia počas terapie (Obr. 8). Veľmi špecifické miesto v tejto skupine má diferenciálna diagnostika alergickej a iritačnej kontaktnej dermatitídy. Pomocou konfokálnej mikroskopie je taktiež možné s vysokou mierou presnosti určiť pozitivitu epikutánných testov už po 48 hodinách [6, 7].



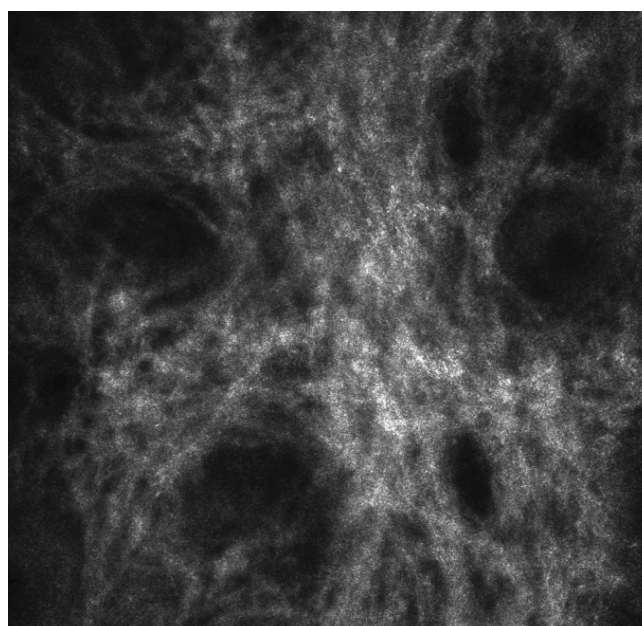
Obr. 8 • Konfokálny obraz zápalu s viditeľnou dendritickou bunkou (označené šipkou) a zápalovým infiltrátom v okolí folikulu (foto: autor) (500 x 500 μm)

Popáleniny, poleptaniny a transplantáty

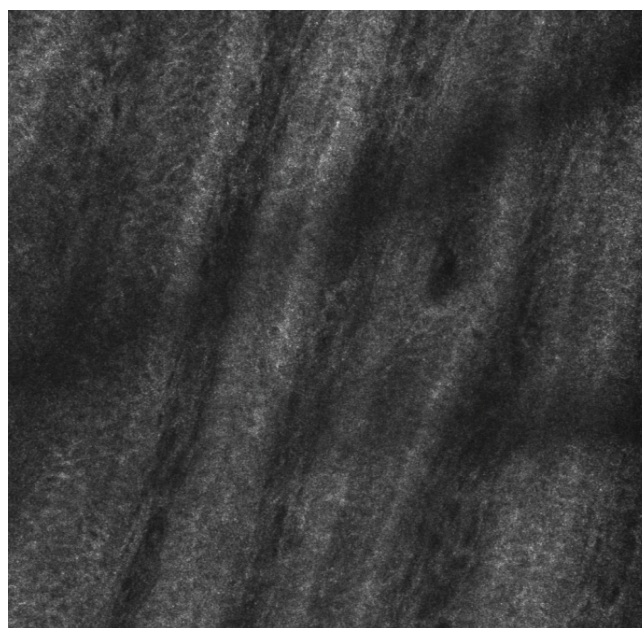
V prípade popálenín je úloha konfokálnej mikroskopie orientovaná hlavne na detekciu mikrocirkulácie v papilách postihnutej kože. Na túto tému bolo publikovaných množstvo štúdií, poukazujúcich na výraznú koreláciu medzi mierou cirkulácie a prognózou hojenia. Určité základné kroky boli tiež vykonané v oblasti monitorovania miery odhojenia transplantátov pri rôznych formách adjuvantnej podpornej liečby. V každom prípade bola hodnotená hlavne prítomnosť alebo neprítomnosť cirkulácie v papilárnych kapilárach. Celkovo je problematika konfokálneho zobrazovania popálenín a transplantátov relatívne neprebádaná vzhľadom na obmedzené možnosti využitia [8].

Jazvy

Konfokálna metóda zohráva síce v súčasnosti len experimentálnu, ale kľúčovú úlohu pri diagnostike hojacich sa jaziev a ich novej transformácie z normotrofickej formy do formy hypertrofickej, prípadne do keloidu. Diagnostika je síce možná aj na základe klinického obrazu, avšak pomocou konfokálnej mikroskopie vieme určiť prakticky hneď po reepitelizácii, ktorým smerom bude hojace sa tkanivo progredovať. Pre hypertrofickú jazvu a aj pre keloid sú špecifické rovnobežne usporiadané snopce kolagénu a keratinocytov, na rozdiel od eutrofického, náhodného usporiadania kolagénu bez známkov buniek (Obr. 9, 10) [9].



Obr. 9 • Eutrofická jazva (foto: autor) (500 x 500 μm)



Obr. 10 • Hypertrofická jazva (foto: autor) (500 x 500 μm)

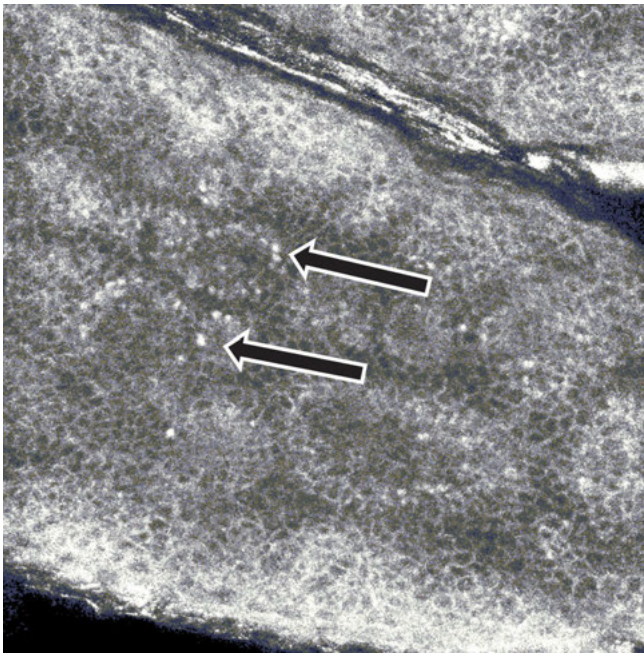
Korektívna dermatológia

Photoaging

Prvá neinvazívna metóda, schopná rozoznať solárne poškodenú kožu, bola vysokofrekvenčná mikroskopia („subepidermal low echogenic band“ - SLEB) [10]. Konfokálna mikroskopia dokáže určiť niekoľko faktorov poškodenia (zvýšenie hrúbky epidermy, hypertrofia buniek stratum granulosum, stenčenie stratum basale a zníženie množstva dermálnych papíl). V posledných piatich rokoch bolo publikovaných niekoľko štúdií, ktoré sledovali konfokálne parametre starnutia kože pred a po nich rejuvenačnými zákrokmi [11, 12].

Poruchy pigmentácie

Zmeny pigmentácie sú vzhľadom na lokalizáciu melanocytov primárne v epidermis ľahko diagnostikovateľné (nepítomnosť melaninového prstenca papily, semicirkulárne prstence, prítomnosť len jednotlivých aktivovaných melanocytov).



Obr. 11 • Konfokálny obraz vitiliga so známkami repigmentácie (vysoko refraktérne body na papilárnych prstencoch označené šipkou) (foto: autor) (500 x 500 μm)

Konfokálna mikroskopia má svoje využitie pri sledovaní úspešnosti fototerapie v liečbe vitiliga, keďže novo aktivované melanocyty sa dajú pozorovať o niekoľko týždňov skôr pomocou konfokálneho mikroskopu ako klinicky (Obr. 11). Táto možnosť skorej evaluácie je dôležitá vzhľadom na možnú efektívnu voľbu terapie pacienta, bez nutnosti predĺženej expozície UV žiareniu [13].

Trichológia

Využitie konfokálnej mikroskopie v tejto oblasti dermatológie nie je rozsiahle, ale zaznamenalo niekoľko dôležitých úspechov. Prvým bolo konfokálne zobrazenie niektorých kozmetických extern a ich interakcie s vlasom. Štruktúru vlasu a folikulu nie je možné presne zaznamenať pomocou konfokálnej reflektancie, ale využitie fluorescenčných markerov a fluorescenčného snímača to umožňuje. V súčasnosti sa využíva konfokálna mikroskopia ako doplnujúca metóda pri diferenciálnej diagnostike alopecii a pri kontrole terapie [14].

Kvantitatívne merania kože

Meranie zmien epidermy je pomocou konfokálnej mikroskopie veľmi presné a jednoznačné. Dokážeme odmerať aj jednotlivé vrstvy. To zohráva kľúčovú úlohu pri hodnotení možných atrofických zmien pri dlhodobom používaní topických kortikosteroidov alebo pri diagnózach ovplyvňujúcich hrúbku epidermy. Veľmi dôležitým prínosom je možnosť sledovať a in vivo merať štruktúry vo fyziologickej aj patologicky zmenenej koži bez skreslenia klasickej histológie. Vysoko hodnoteným vedeckým prínosom bolo aj in vivo snímanie a popísanie zmien v epidermis a retikulárnej dermis navodených UVA žiarením [12].

Konfokálna mikroskopia sa však neobmedzuje len na vyššie uvedené okruhy. Možnosti, ktoré táto metóda svojou neinvazivitou ponúka, sú rozsiahle a použiteľné aj v iných odboroch medicíny. Treba určite spomenúť otorinolaryngológiu (rýchla diagnostika slizničných ložísk a tumorov), gastroenterológiu (neinvazívne vyšetrenie ložísk tráviaceho traktu) a základný výskum (testovanie nových povrchovo aktívnych látok na laboratórnych zvieratách bez nutnosti invazívnej kontroly).

Literatúra

1. Pawley, J. B.: Handbook of Confocal Microscopy, Plenum Press, New York, 1990.
2. Plášek, J.: Nové metódy optické mikroskopie. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, 1995.
3. Andersen, F.A., Landry, R.J.: Optical radiation measurements and instrumentation. J.invest.Dermatol 1981; 77(1): 8 – 12.
4. Pellacani, G., Longo, C., Malvehy, J., Puig, S., Carrera, C., Segura, S., Bassoli, S., Seidenari, S.: In vivo confocal microscopic and histopathologic correlations of dermoscopic features in 202 melanocytic lesions. Arch Dermatol 2008; 144(12): 1597 – 1608.
5. Charles, C.A., Marghoob, A.A., Busam, K.J., Clark-Loeser, L., Halpern, A.C.: Melanoma or pigmented basal cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation with dermoscopy, in vivo confocal scanning laser microscopy, and routine histology. Skin Res Technol 2002; 8(4): 282 – 287.

6. Ulrich, M., Stockfleth, E., Roewert-Huber, J., Astner, S.: Noninvasive diagnostic tools for nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007 Dec; 157 Suppl 2: 56 – 58.
7. Ulrich, M., Roewert-Huber, J., González, S., Rius-Diaz, F., Stockfleth, E., Kanitakis, J.: Peritumoral clefting in basal cell carcinoma: correlation of in vivo reflectance confocal microscopy and routine histology. *J Cutan Pathol* 2011; 38(2): 190 – 195.
8. Angelova-Fischer, I., Pfeuti, T., Zillikens, D., Rose, C.: In vivo confocal laser scanning microscopy for non-invasive diagnosis of pemphigus foliaceus. *Skin Res Technol* 2009; 15(1): 40 – 44.
9. Sakanashi, E.N., Matsumura, M., Kikuchi, K., Ikeda, M., Miura, H.: A comparative study of allergic contact dermatitis by patch test versus reflectance confocal laser microscopy, with nickel and cobalt. *Eur J Dermatol* 2010; 20(6): 705 – 711.
10. Altintas, A.A., Guggenheim, M., Altintas, M.A., Amini, P., Stasch, T., Spilker, G.: To heal or not to heal: predictive value of in vivo reflectance-mode confocal microscopy in assessing healing course of human burn wounds. *J Burn Care Res* 2009; 30(6): 1007 – 1012.
11. Oliveira, G.V., Hawkins, H.K., Chinkes, D., Burke, A., Tavares, A.L., Ramos-e-Silva, M., Albrecht, T.B., Kitten, G.T., Herndon, D.N.: Hypertrophic versus non hypertrophic scars compared by immunohistochemistry and laser confocal microscopy: type I and III collagens. *Int Wound J* 2009; 6(6): 445 – 452.
12. El-Zawahry, M.B., Abdel El-Hameed El-Cheweikh, H.M., Abd-El-Rahman Ramadan, S., Ahmed Bassiouny, D., Mohamed Fawzy, M.: Ultrasound biomicroscopy in the diagnosis of skin diseases. *Eur J Dermatol* 2007; 17(6): 469 – 475.
13. Gambichler, T., Sauermann, K., Altintas, M.A., Altmeyer, P., Hoffmann, K.: Acute effect of solar-simulated radiation on epidermal thickness assessed by confocal laser scanning microscopy in vivo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18(5): 638 – 639.
14. Gambichler, T., Sauermann, K., Altintas, M.A., Paech, V., Kreuter, A., Altmeyer, P., Hoffmann, K.: Effects of repeated sunbed exposures on the human skin. In vivo measurements with confocal microscopy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; 20(1): 27 – 32.