

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Wundheilung mittels Multiphotonentomographie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Steffen Springer

aus Jena

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Abstract.....	1
2 Einleitung	4
2.1 Zielstellung.....	6
3 Material und Methoden	7
3.1 Allgemein – Messgerät, Software.....	7
3.2 Ethik.....	7
3.3 Optimierung des Messverfahrens der Multiphotonentomographie für menschliche Haut (<i>in vivo</i>) ⁽¹⁴⁾	7
3.4 Untersuchung der Wundheilung mittels der Multiphotonentomographie an menschlicher Haut (<i>in vivo</i>) ⁽¹⁵⁾	8
3.5 Multiphotonentomographie an chronischen Wunden und die Bewertung einer sterilen, optisch transparenten, bakteriellen Nanozellulose-Abdeckung als eine neue Ankopplungsmethode an die menschliche Haut ⁽¹⁶⁾	8
4 Ergebnisse	10
4.1 Allgemein	10
4.2 Optimierung des Messverfahrens der Multiphotonen- tomographie für menschliche Haut (<i>in vivo</i>) ⁽¹⁴⁾	10
4.3 Untersuchung der Wundheilung mittels der Multiphotonen- tomographie an menschlicher Haut (<i>in vivo</i>) ⁽¹⁵⁾	12
4.4 Multiphotonentomographie an chronischen Wunden und die Bewertung einer sterilen, optisch transparenten, bakteriellen Nanozellulose-Abdeckung als ein diagnostisches Fenster in die menschliche Haut ⁽¹⁶⁾	14

5	Diskussion und Ausblick	18
5.1	Optimierung des Messverfahrens der Multiphotonen- tomographie für menschliche Haut (<i>in vivo</i>) ⁽¹⁴⁾	18
5.2	Untersuchung der Wundheilung mittels der Multiphotonen-tomographie an menschlicher Haut (<i>in vivo</i>) ⁽¹⁵⁾	18
5.3	Multiphotonentomographie an chronischen Wunden und die Bewertung einer sterilen, optisch transparenten, bakteriellen Nanozellulose-Abdeckung als ein diagnostisches Fenster in die menschliche Haut ⁽¹⁶⁾	20
6	Literaturverzeichnis	23
7	Eidesstattliche Versicherung	27
7.1	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	28
8	Druckexemplare	30
9	Lebenslauf	55
10	Publikationsliste	58
11	Danksagung	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: BNC Folie - MPT Messung.....	9
Abbildung 2: Verlauf des SAAID exemplarisch für einen Probanden ⁽¹⁴⁾	11
Abbildung 3: Unterschiede in der Bildqualität in Abhängigkeit von der Aufnahmezeit je Bild. Exemplarisch hier für das Stratum granulosum (Fokustiefe ca. 20 µm). Scanzeit von links nach rechts 1 s, 3 s, 7 s, 13 s. ⁽¹⁴⁾	11
Abbildung 4: SAAID Verlauf von Visite 1 bis Visite 7 ⁽¹⁵⁾	13
Abbildung 5: Akute Wunde nach Curettage (A), erste messbare Struktur Kollagen I (B-D)	13
Abbildung 6: Bereich der akuten Wunde mit Kruste und Entzündungszeichen Visite 2 (A); reduzierte Kollagenmatrix während Visite 2 (B) und Visite 3 (C-D)	13
Abbildung 7: Visite 4 - Bereich der akuten Wunde mit Kruste und reduziertem Durchmesser (A); nur wenige Kollagenfasern detektiert (B + C); Visite 5 - erste Zellen detektiert (D)	14
Abbildung 8: Visite 6 - Bereich der akuten Wunde ohne Kruste und Entzündungszeichen (A); Zellen des Stratum granulosum (B) und Stratum spinosum (C); reifes Kollagen mit ausgeprägten Netzwerken (D)	14
Abbildung 9: Visite 7 - Bereich der akuten Wunde nach 24 Monaten - akute Wunde ohne Kruste und Entzündungszeichen (A); Zellen des Stratum granulosum (B) und Stratum spinosum (C); dichtes Netzwerk von reifem Kollagen (D).....	14
Abbildung 10: SAAID Verlauf gesunder Haut (repräsentatives Beispiel) ⁽¹⁶⁾	15
Abbildung 11: SAAID Verlauf im Zentrum einer chronischen Wunde (repräsentatives Beispiel) ⁽¹⁶⁾	15
Abbildung 12: SAAID Verlauf am Rand einer chronischen Wunde (repräsentatives Beispiel) ⁽¹⁶⁾	15
Abbildung 13: SAAID Verlauf bei Benutzung der BNC (schwarze Linie) sowie des Deckglases (graue Linie) (repräsentatives Beispiel) ⁽¹⁶⁾	16
Abbildung 14: MPT Messungen ohne BNC Folie - A: AF – Stratum corneum; B: AF – Stratum granulosum; C: AF – Stratum basale; D: SHG – Stratum papillare ⁽¹⁶⁾ ..	16
Abbildung 15: MPT Messungen mit BNC Folie - A: AF – Stratum corneum; B: AF – Stratum granulosum; C: AF – Stratum basale; D: SHG – Stratum papillare ⁽¹⁶⁾	16
Abbildung 16: CLSM mit BNC Folie - BNC Folie (A); Stratum corneum (B); Stratum granulosum (C); Stratum basale (D); Stratum papillare (E).....	17

Abbildung 17: OCT Messungen mit BNC Folie – BNC Folie (A); Epidermis (B);
Dermis (C)17

Abkürzungsverzeichnis

BNC	Bakterien-Nano-Cellulose
MPT	Multiphotonentomographie
OCT	Optische Kohärenztomographie
NIR	Nahes Infrarot
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert)
nm	Nanometer
TIFF	Tagged Image File Format
SAAID	Second Harmonic Generation (SHG)-to-Autofluorescence Aging Index of Dermis (SAAID)
AF	Autofluorescence
SHG	Second Harmonic Generation (Frequenzverdopplung)
CLSM	Konfokale Laserscanningmikroskopie

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick der Wundkategorien ⁽¹⁾	4
Tabelle 2: Zweiseitige asymptotische Signifikanzen der SAAID - Werte abhängig von der Aufnahmezeit (Wilcoxon Test) ⁽¹⁴⁾	11

1 Abstract

For differentiation and diagnosis of different healing phases of acute and chronic wounds, purely clinical observation has been used so far. In recent years, various non-invasive optical diagnostic methods have established themselves in clinical practice. These include optical coherence tomography (OCT) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Multiphoton tomography (MPT) is not yet established in clinical practice. It enables investigations of epidermal and dermal structures in subcellular resolution through two- or multiphoton excitation. An important index in MPT is the second harmonic generation-to-autofluorescence ageing index of the dermis (SAAID). It describes the ratio of collagen fibers and endogenous fluorophores in epidermis and dermis.

The aim of the presented work is the investigation of different healing phases of acute as well as chronic wounds and their allocation to known phases of wound healing by MPT. Therefore, three studies were carried out.

The first study served to optimize measurement time during MPT. Multiphoton measurements were performed on 10 patients with four measurement times per image (1 s, 3 s, 7 s, 13 s). It could be shown that the data of 1 s and 3 s already provide qualitatively good information for quantitative evaluation and morphological assessment.

In a second study, wound healing phases of acute wounds were investigated. For this purpose, 10 patients were subjected to curettage and multiphoton measurements were performed over a period of 21 days and a control measurement 24 months after curettage. The changing course of SAAID could be assigned to individual wound healing phases exudation, granulation and epithelisation.

The third study examined chronic wounds in the area of wound centre (n=8) and wound margin (n=6). In addition, application of bacterial nanocellulose (BNC) was investigated as coupling adapters to human skin in OCT, CLSM and MPT. All methods were measured with BNC as well as standardized coupling adapter. The course of SAAID in chronic wounds could be assigned to specific wound healing phases. For BNC a suitability as coupling adapter could be proven.

In the presented dissertation, it could be shown that MPT is a suitable instrument for the examination of acute and chronic wounds. In addition, it has been demonstrated that BNC does not interfere with MPT during data acquisition or evaluation.

Für Differenzierung und Diagnose unterschiedlicher Heilungsphasen akuter und chronischer Wunden wurden bisher die rein klinische Beobachtung genutzt. In den vergangenen Jahren haben sich verschiedene, nicht-invasive, optische Diagnostikverfahren im klinischen Alltag etabliert. Hierzu zählen die Optische Kohärenztomographie (OCT) und die Konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM). Ein weiteres, noch nicht im klinischen Alltag etabliertes System, stellt die Multiphotonentomographie (MPT) dar. Sie ermöglicht durch die Zwei- bzw. Mehrphotonenanregung die Untersuchung epidermaler und dermaler Strukturen in subzellulärer Auflösung. Ein wichtiger Messwert der MPT ist der Second Harmonic Generation-zu-Autofluoreszenz Alterungsindex der Dermis (SAAID). Dieser beschreibt im Wesentlichen das Verhältnis von Kollagenfasern und endogenen Fluorophoren in der Epidermis und Dermis.

Ziel der vorgelegten Arbeit ist die Untersuchung der unterschiedlichen Heilungsphasen akuter Wunden sowie chronischer Wunden und deren Zuordnung zu den bekannten Phasen der Wundheilung mittels MPT. Hierzu wurden drei Studien durchgeführt.

Die erste Studie diente der Optimierung der Messzeit während der Multiphotonentomographie. Hierfür wurden bei 10 Patienten Multiphotonenmessungen mit vier Messzeiten je Aufnahme (1 s, 3 s, 7 s, 13 s) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Daten der Messzeiten von 1 s bzw. 3 s bereits qualitativ gute Informationen zur quantitativen Auswertung und der morphologischen Beurteilbarkeit liefern.

In einer zweiten Studie wurden die Wundheilungsphasen akuter Wunden untersucht. Hierfür wurden 10 Patienten einer Curettage unterzogen und Multiphotonenmessungen über einen Zeitraum von 21 Tagen sowie eine Kontrollmessung 24 Monate nach der Curettage durchgeführt. Der sich ändernde Verlauf des SAAID konnte dabei den einzelnen Wundheilungsphasen Exsudation, Granulation und Epithelisierung zugeordnet werden.

Die dritte Studie untersuchte chronische Wunden (Ulcus cruris) im Bereich des Wundzentrums (n=8) sowie des Wundrandes (n=6). Zusätzlich wurde die Anwendung bakterieller Nanozellulose (BNC) für die Verfahren OCT, CLSM sowie MPT als Ankopplungsadapter an die menschliche Haut untersucht. Bei allen Verfahren wurde eine Messung mit der BNC sowie eine Messung mit den standardisierten Ankopplungsadaptoren durchgeführt. Die Verläufe des SAAID

chronischer Wunden konnten bestimmten Wundheilungsphasen zugeordnet werden. Für BNC konnte eine Eignung als Ankopplungsadapter nachgewiesen werden.

In der vorgelegten Dissertation konnte gezeigt werden, dass die MPT ein geeignetes Instrument zur Untersuchung akuter und chronischer Wunden darstellt. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die BNC die MPT bei Datenerfassung bzw. -auswertung nicht beeinträchtigt.

2 Einleitung

Wunden sind im Leben eines jeden Menschen immer wiederkehrende Begleiter. Unabhängig vom Alter – egal ob Kind, Erwachsener oder Greis – treten Situationen auf, in denen die Struktur unseres größten Organes – der Haut – geschädigt wird. Im Speziellen können dies zum Beispiel Abschürfungen, die Curettage einer seborrhoischen Keratose oder aber die Shave-Exzision von melanozytären Nävi sein. In all diesen Situationen entstehen Wunden, die im Regelfall von unserer Haut eigenständig, innerhalb eines mehr oder minder kurzen Zeitraumes, verschlossen und wiederhergestellt werden. Allerdings kann es auch unter verschiedenen Umständen zu einem verzögerten Wundverschluss kommen, z. B. bei immer wiederkehrende Entzündungen einer Wunde. So können chronische Wunden entstehen.

Abhängig von der Art ihrer Entstehung lassen sich Wunden in drei Kategorien einteilen – traumatisch, iatrogen und chronisch. In Tabelle 1 ist ein exemplarischer Überblick der Wundkategorien zu sehen.

Tabelle 1: Überblick der Wundkategorien ⁽¹⁾

Traumatische Wunden	Iatrogene Wunden	Chronische Wunden
Mechanische Verletzungen (Schürf-, Schnitt-, Stich- und Schusswunden)	Inzisionen	Dekubitus
Thermische Verletzungen (Erfrierungen, Verbrennungen)	Punktionen	Vaskulitiden
Chemische Verletzungen (Verätzungen durch Säuren und Laugen)	Laserbehandlungen	Arterieller Ulkus
	Amputationen	Venöses Ulkus
	Strahlenschäden	Ulzerierte Tumore
		Strahlenulkus

Die Wundheilung verläuft dabei unabhängig von der Größe der Wunde in drei verschiedenen Phasen, welche sich zeitlich überlappen und somit untrennbar miteinander verbunden sind. ⁽²⁾ Die erste Phase ist die inflammatorische Phase. An diese schließt sich die proliferative Phase, auch Granulationsphase genannt, an. ⁽²⁾ Als dritte und letzte Phase findet die Regenerationsphase, auch Epithelisierungsphase genannt, statt. ⁽²⁾ Die Wundheilung besteht also immer aus den drei Abschnitten Abbau, Umbau und Aufbau. Die bekannteste klinische Methode zur Evaluierung von Wundheilungsphasen ist die reine Beobachtung klinischer

Faktoren. Einen neuen Ansatzpunkt kann hier die Multiphotonenlasertomographie (MPT) bieten. Sie erlaubt das optische Eindringen in die verschiedenen Hautschichten, ohne dabei Gewebeschäden zu verursachen. Bereits in den letzten Jahren konnte die MPT, vor allem in der Dermatologie, ihren großen Nutzen unter Beweis stellen. ⁽³⁾ Sie wurde zum Beispiel bereits für die nichtinvasive Charakterisierung morphologischer und biophysikalischer Eigenschaften der Haut etabliert und erlaubt die Unterscheidung dermalen und epidermalen Strukturen. ⁽³⁾ Des Weiteren wurde die MPT genutzt um pathologische Veränderungen der Haut zu beurteilen, wie etwa beim Vorkommen des malignen Melanoms sowie beim Plattenepithel- und Basalzellkarzinom. ^(4-6, 12, 13) Die MPT beruht dabei auf dem Zwei-Photonen-Effekt und arbeitet im nahen Infrarot-Bereich. Dieser besitzt den Vorteil, dass Strahlung, welche mit dieser Wellenlänge abgegeben wird, keine Schäden am Gewebe verursacht. Des Weiteren sind die unerwünschten Nebeneffekte, wie Streuung und Absorption, auf ein Minimum reduziert. Ein essentieller und nicht mehr wegzudenkender Parameter ist der sogenannte Second Harmonic Generation-to-Autofluorescence Aging Index of Dermis (SAAID). Er beschreibt das Intensitätsverhältnis zwischen der Autofluoreszenz (AF) und der Frequenzverdopplung (SHG) und wird durch folgende Gleichung definiert:
$$\text{SAAID} = \frac{\text{SHG} - \text{AF}}{\text{SHG} + \text{AF}}$$
 ⁽⁷⁻⁹⁾ Bezogen auf epidermale und dermale Strukturen spiegelt der SAAID das Verhältnis zwischen den SHG-Anteilen, wie den Kollagenfasern der Dermis und den AF-Anteilen, wie dem Keratin der Hornschicht, dem NADH/NADPH lebender Zellen der Epidermis sowie den Elastinfasern der Dermis, wider. ^(8,9) Ein hoher bzw. positiver SAAID resultiert aus einem hohen SHG Signal und deutet auf eine große Menge von Kollagen hin. Ein niedriger bzw. negativer SAAID hingegen resultiert aus einem hohen AF Signal und deutet daher eher auf das Vorhandensein zellulärer Strukturen sowie von Elastinfasern hin. ⁽⁷⁻⁹⁾ Ein hoher SAAID ist eher in der Haut junger Menschen ermittelbar, da hier die Anzahl der Elastinfasern geringer ist als bei älteren Menschen. ⁽⁷⁾ Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass ein niedrigerer SAAID eher für einen hohen Anteil an Elastinfasern steht und somit eher bei älteren Menschen vorzufinden ist, da mit fortschreitendem Alter Kollagenfasern durch Elastinfasern ersetzt werden. Ferner konnte die MPT in den vergangenen Jahren auch erfolgreich in Kombination mit anderen nichtinvasiven, bildgebenden Verfahren zu diagnostischen Zwecken, wie etwa der Konfokalen Laserscanningmikroskopie (CLSM) oder der Optischen Kohärenztomographie (OCT), eingesetzt werden. ⁽⁹⁻¹²⁾ Die Vorteile der MPT

gegenüber der OCT und CLSM sind die Möglichkeit der subzellulären Auflösung und der Nachweis von dynamischen Vorgängen auf biochemischer und pathophysiologischer Grundlage. ⁽³⁵⁾

2.1 Zielstellung

Während die MPT in der dermatologischen Forschung zur Beurteilung intakter Haut bereits fest etabliert ist, gibt es bislang nur wenige Untersuchungen zum Einsatz der MPT bei Wunden.

Die Zielstellung der vorgelegten Dissertation umfasste daher die Evaluierung der MPT zur Untersuchung von Wunden bzw. der Wundheilung.

Für die vollständige/umfassende Bearbeitung der Aufgabenstellung waren daher Untersuchungen sowohl an akuten als auch chronischen Wunden notwendig.

Für die Bearbeitung der Zielstellung wurde diese in folgende Teilaufgaben unterteilt:

- Einarbeitung in die MPT und Optimierung des Messverfahrens für die Untersuchung von Wunden
- In vivo Untersuchung und Charakterisierung des Heilungsprozesses von akuten Wunden mittels MPT
- In vivo Untersuchung von chronischen Wunden mittels MPT
- Verwendung einer bakteriellen Nanozellulose (BNC) als neue Ankopplungsmethode für die MPT an gesunder Haut

3 Material und Methoden

3.1 Allgemein – Messgerät, Software

Für die Durchführung der Messreihen wurde ein MPT (DermaInspect®) der Firma JenLab GmbH, Jena, Deutschland genutzt. Dieser verfügt über einen einstellbaren Laser, welcher im NIR-Bereich arbeitet und dessen Impulsdauer sich im Femtosekundenbereich bewegt. Die Wellenlänge λ kann dabei zwischen 710 nm und 920 nm variiert werden. Die Ankopplung an die menschliche Haut erfolgte über ein 100 μm Deckglas in einem Kopplungsadapter. Dies stellt das Standard-Setup dar. Die Aufnahmen wurden mit der Software JenLabScan Ver. 5.9.11.0 (JenLab GmbH, Jena, Deutschland) aufgezeichnet und als Mehrkanal TIFF gespeichert. Die Datenauswertung erfolgte mit den Programmen Excel 2013 (Microsoft Corporation, 2013, Redmond USA) sowie zum Teil mit SPSS 21 (IBM Corporation, 2012, Armonk, USA).

3.2 Ethik

Im Rahmen dieser Dissertation wurden keine Versuchsreihen an Tieren durchgeführt. Alle Untersuchungen am Menschen wurden streng nach der Deklaration von Helsinki und mit positiver Zustimmung der lokalen Ethik-Kommission der Landesärztekammer Thüringen durchgeführt.

3.3 Optimierung des Messverfahrens der Multiphotonentomographie für menschliche Haut (*in vivo*)⁽¹⁴⁾

Ziel dieser Studie war es die Messzeit pro aufgenommen Bild zu reduzieren und dabei aber trotzdem alle quantitativen und qualitativen Daten zu erfassen ohne jedoch Einbußen hinsichtlich der morphologischen sowie mathematischen Auswertbarkeit hinnehmen zu müssen. Des Weiteren sollte die Belastung für das zu vermessende Gewebe auf ein Minimum reduziert werden. Hierfür wurden je Messfeld drei Bildstapel entlang der Z-Achse, mit je vier verschiedenen Messzeiten je Bild (1 s, 3 s, 7 s, 13 s) aufgenommen. Die Anregungswelle λ wurde auf 790 nm eingestellt. Die maximale Fokustiefe lag bei 220 μm . Die Ausgangsleistung wurde durch die Software, beginnend bei 10 mW, automatisch mit fortschreitender Tiefe bis zum Maximum (50 mW) angepasst.

3.4 Untersuchung der Wundheilung mittels der Multiphotonentomographie an menschlicher Haut (*in vivo*)⁽¹⁵⁾

Im Rahmen dieser Studie war es das Ziel, die Wundheilung mittels der MPT über einen Zeitraum von 21 Tagen und nach 24 Monaten zu dokumentieren. Hierbei waren die Wundheilungsverläufe mittels MPT zu dokumentieren und auszuwerten. Die akute Wunde wurde durch eine Curettage induziert und hatte initial einen maximalen Durchmesser von etwa 8 mm. Es waren epidermale als auch dermale Schichten durch die Curettage betroffen. Es kam zu minimalem Blutaustritt. Die Messungen wurden dabei, 1 d, 4 d, 7 d, 14 d, 21 d sowie 24 Monate nach erfolgter Curettage durchgeführt. Parallel erfolgten Kontrollmessungen an gesunder Haut. Es wurden Bildstapel entlang der Z-Achse bis zu einer maximalen Fokustiefe von 225 μm aufgenommen. Die Anregungswelle λ wurde auf 790 nm eingestellt. Die Ausgangsleistung wurde durch die Software, beginnend bei 10 mW, automatisch mit fortschreitender Tiefe bis zum Maximum (50 mW) angepasst.

3.5 Multiphotonentomographie an chronischen Wunden und die Bewertung einer sterilen, optisch transparenten, bakteriellen Nanozellulose-Abdeckung als eine neue Ankopplungsmethode an die menschliche Haut⁽¹⁶⁾

Die Messungen der chronischen Wunde (*Ulcus cruris*) wurden an verschiedenen Stellen mittels MPT durchgeführt – dem Zentrum der Wunde (n=8) sowie am Wundrand (n=6). Parallel erfolgten Kontrollmessungen an gesunder Haut. Die chronischen Wunden wurden bei einer Vorstellung der Patienten im Rahmen der Wundsprechstunde in der Hautklinik des SRH Waldklinikum Gera gemessen. Es wurden Bildstapel entlang der Z-Achse bis zu einer maximalen Fokustiefe von 225 μm aufgenommen. Die Anregungswelle λ wurde auf 790 nm eingestellt. Die Ausgangsleistung wurde durch die Software, beginnend bei 10 mW, automatisch mit fortschreitender Tiefe bis zum Maximum (50 mW) angepasst. Die Scanzeit je Bild betrug 1 s.

Ferner wurde in dieser Studie eine BNC Folie, statt des bisherigen Standard-Setups, als neue Ankopplungsmethode an die menschliche Haut untersucht. Grundgedanken dafür waren die Verhinderung von Kreuzkontaminationen von Patient A zu Patient B über das Gerät sowie die bessere Anpassung der BNC, aufgrund ihrer besseren mechanischen Flexibilität, an die Wundoberfläche im

Gegensatz zum Standard-Setup. Hierfür wurden neben der MPT zwei zusätzliche optische Verfahren, die Optische Kohärenztomographie (OCT) sowie die Konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM), in Kombination mit einer BNC Folie in die Untersuchungen einbezogen. Diese Messungen wurden im Rahmen eines „Proof of Concept“ ausschließlich an gesunder Haut durchgeführt. Des Weiteren wurden für die MPT zwei Bildstapel mit der BNC Folie sowie zwei mit dem Standard-Setup entlang der Z-Achse mit je 50 Bildern erzeugt. Die automatische Fokusverstellung betrug dabei 5 μm und die Messdauer je Bild 3 Sekunden. Abbildung 1 zeigt die BNC Folie vor der Messung mittels MPT. Der unter der BNC erkennbare Abdruck auf der Haut (Abbildung 1) rührt von der vorherigen Messung mit dem Standard-Setup her. Alle weiteren detaillierten Informationen zu den Messparametern können der Publikation ⁽¹⁶⁾ entnommen werden.



Abbildung 1: BNC Folie - MPT Messung

CLSM

Für die CLSM Messungen wurde das VivaScope 1500 der Firma Michelson verwendet. Es wurden drei Bildstapel mit je 68 Bildern für die Konfiguration mit BNC Folie als auch für die Kontrollmessung aufgenommen. Die maximale Fokustiefe lag bei 310 μm . Die Ausgangsleistung wurde durch das Gerät automatisch an die Tiefe angepasst.

OCT

Für die OCT Messungen wurde das VivoSight der Firma DermoScan verwendet. Es wurden 10 Messreihen für die Konfiguration mit BNC Folie als auch für die Kontrollmessung aufgenommen. Die maximale Fokustiefe lag bei 996 μm . Die Ausgangsleistung wurde durch das Gerät automatisch an die Tiefe angepasst.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemein

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den folgenden Publikationen detailliert dargestellt:

1. Optimierung des Messverfahrens der Multiphotonentomographie für menschliche Haut (in vivo) ⁽¹⁴⁾

Springer S, Zieger M, Koenig K, Kaatz M, Lademann J and Darvin ME, Optimization of the measurement procedure during multiphoton tomography of human skin in vivo Skin Research and Technology 2015; Volume 22, Issue 3 August 2016, Pages 356-362

2. Untersuchung der Wundheilung mittels der Multiphotonentomographie an menschlicher Haut (in vivo) ⁽¹⁵⁾

Springer S, Zieger M, Böttcher A, Lademann J, Kaatz M, Examination of wound healing after curettage by multiphoton tomography of human skin in vivo, Volume 23, Issue 4, November 2017, Pages 452-458

3. Multiphotonentomographie an chronischen Wunden und die Bewertung einer sterilen, optisch transparenten, bakteriellen Nanozellulose-Abdeckung als ein diagnostisches Fenster in die menschliche Haut ⁽¹⁶⁾

Springer S, Zieger M, Hipler UC, Lademann J, Albrech V, Bueckle R, Meß C, Kaatz M, Huck V, Multiphotonic staging of chronic wounds and evaluation of sterile, optical transparent bacterial nanocellulose covering: A diagnostic window into human skin, Volume 25, Issue 1 January 2019, Pages 68-78

4.2 Optimierung des Messverfahrens der Multiphotonentomographie für menschliche Haut (*in vivo*) ⁽¹⁴⁾

Wie in Abbildung 2 und Tabelle 2 zu sehen ist, ergab sich für die unterschiedlichen Scan-Zeiten je Bild kein nennenswerter Unterschied im Verlauf des SAAID. Lediglich die Aufnahmen mit 7 s und 13 s Aufnahmezeit zeigen einen minimal anderen Verlauf bis zu einer Tiefe von 80 µm. Die Aufnahmen mit 7 s bzw. 13 s, zu sehen in Abbildung 3, zeigen eine sehr gute Qualität hinsichtlich der morphologischen Auswertbarkeit. Alle Strukturen, zellulär als auch subzellulär, lassen sich ohne Einschränkungen eindeutig identifizieren. Mit abnehmender Aufnahmezeit sinkt die Qualität der Bilder.

So zeigen die Scans mit 1 s bzw. 3 s einen erkennbaren Unterschied im Gegensatz zu den 7 s und 13 s Scans. Aber auch hier lassen sich alle morphologischen Strukturen noch zweifelsfrei identifizieren und differenzieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung der Aufnahmezeit auf 3 s je Bild keine großen Verluste hinsichtlich der morphologischen Beurteilbarkeit mit sich bringt. Ferner konnte festgehalten werden, dass die Veränderung der Scanzeit keinen signifikanten Einfluss auf die Auswertbarkeit des SAAID hat. Dieser zeigte über die verschiedenen Scanzeiten hinweg einen gleichmäßig konstanten Verlauf.

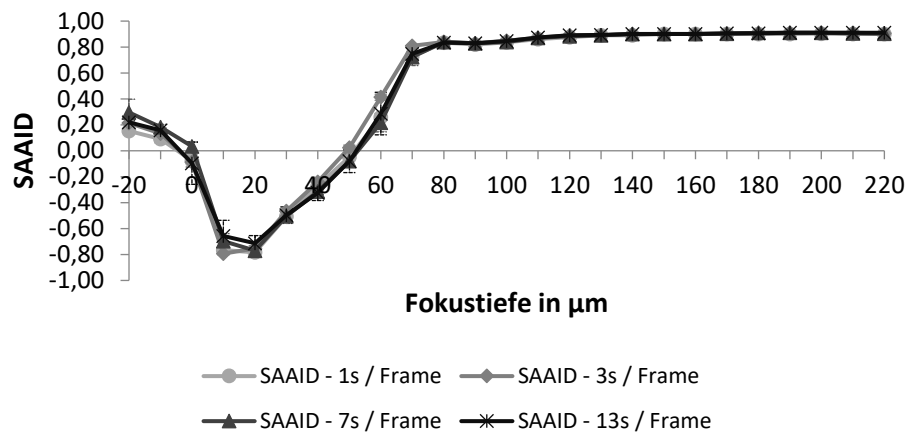


Abbildung 2: Verlauf des SAAID exemplarisch für einen Probanden ⁽¹⁴⁾

Tabelle 2: Zweiseitige asymptotische Signifikanzen der SAAID - Werte abhängig von der Aufnahmezeit (Wilcoxon Test) ⁽¹⁴⁾

Aufnahmezeiten	1s vs. 3s	1s vs. 7s	1s vs. 13s	3s vs. 7s	3s vs. 13s	7s vs. 13s
Test Sequenz Tiefe 60 µm	0.373	0.929	0.475	0.561	0.534	0.153
Test Sequenz Maximum SHG Signal	0.233	0.733	0.196	0.892	0.792	0.458
Test Sequenz Tiefe 150 µm	0.593	0.915	0.518	0.705	0.236	0.257

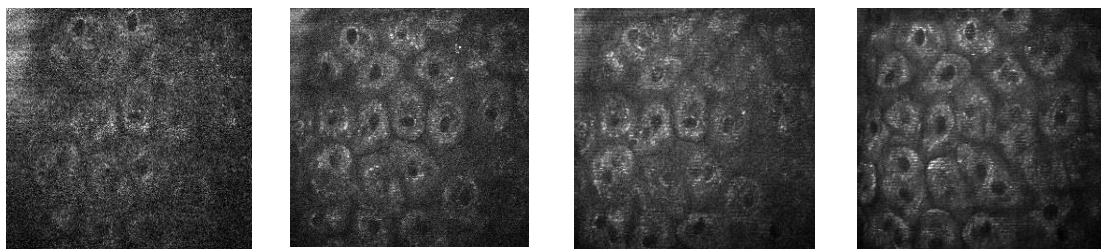


Abbildung 3: Unterschiede in der Bildqualität in Abhängigkeit von der Aufnahmezeit je Bild. Exemplarisch hier für das Stratum granulosum (Fokustiefe ca. 20 µm). Scanzeit von links nach rechts 1 s, 3 s, 7 s, 13 s. ⁽¹⁴⁾

4.3 Untersuchung der Wundheilung mittels der Multiphotonen-tomographie an menschlicher Haut (in vivo) ⁽¹⁵⁾

Im Verlauf der Untersuchungen ist eine deutliche Veränderung des SAAID im Bereich der Wunde im Gegensatz zum Verlauf bei gesunder Haut (Abbildung 4) zu erkennen. Positive SAAID Werte zeigen das Vorhandensein von Kollagen an (ausgeprägter SHG Signalanteil am SAAID). Negative Werte deuten auf dessen Reduzierung hin und zeigen eine Verschiebung des SAAID zugunsten von endogenen Fluorophoren oder Elastin an (ausgeprägter AF Signalanteil am SAAID). Direkt nach der erfolgten Curettage (Abbildung 5A) ist der SAAID vergleichbar mit dem Kontrollareal (Abbildung 4-Visite 1). Epidermale Strukturen konnten mittels MPT nicht nachgewiesen werden. Die erste detektierte Struktur bestand aus einem dichten Kollagenfasernetzwerk (Abbildung 5B-D) im Bereich der Dermis. In der folgenden Visite 2, 24 Stunden nach erfolgter Curettage, ist während der exsudativen Phase ein beginnendes Absinken des SAAID zu erkennen (Abbildung 4). Des Weiteren war in Visite 2 die Ausbildung einer Kruste sowie Entzündungszeichen zu beobachten (Abbildung 6A). Ferner kam es 96 Stunden nach erfolgter Curettage (Visite 3), in der Granulationsphase, bereits zu einem Abklingen der Entzündungszeichen sowie einem leichten Abflachen der Kruste. Epidermale Strukturen konnten nicht detektiert werden. Es konnte eine Reduzierung der Kollagenfasern in den Visiten 2 und 3 nachgewiesen werden (Abbildung 6 B-D). Der SAAID sank hierbei weiter ab. In den anschließenden Visiten 4 und 5, sieben bzw. 14 Tage nach der Curettage war abermals ein weiteres Absinken des SAAID zu verzeichnen. Dieser lag jetzt vollständig im negativen Bereich. Während dieser proliferativen Phase (Visite 4 und 5) konnte eine Verringerung des Wunddurchmessers verzeichnet werden (Abbildung 7A). Des Weiteren konnten in Visite 4 nur wenige Kollagenfasern während der Messungen erfasst werden (Abbildung 7B-C). Sieben Tage später, in Visite 5, konnten erste Zellen mit der MPT nachgewiesen werden (Abbildung 7D). Weitere sieben Tage später in Visite 6, während der Epithelisierungsphase, konnten bereits erste Zellverbände in verschiedenen Schichten gezeigt werden. Speziell die Zellen des Stratum granulosum sowie des Stratum spinosum (Abbildung 8B-C) konnten anhand ihres Differenzierungsgrades identifiziert werden. Ferner konnten dichte Netzwerke aus Kollagenfasern erfasst werden. Das Vorhandensein der epidermalen sowie dermalen Hauptbestandteile spiegelt sich auch im SAAID wider. Der Wert nähert sich jenem intakter Haut an. Eine Kruste sowie Entzündungszeichen konnten zu

diesem Zeitpunkt nicht mehr beobachtet werden. In Visite 7 (Abbildung 9A-D), welche 24 Monate nach der Curettage erfolgte, wurden in allen epidermalen Schichten Zellen unterschiedlicher Differenzierung in dichten Verbänden registriert. Diese entsprachen in ihrer Morphologie denen gesunder Haut. In den dermalen Schichten konnten ebenfalls, vergleichbar zu gesunder Haut, dichte Fasernetzwerke aus Kollagen I festgehalten werden. Der SAAID zeigte einen identischen Wert vergleichbar mit gesunder Haut.

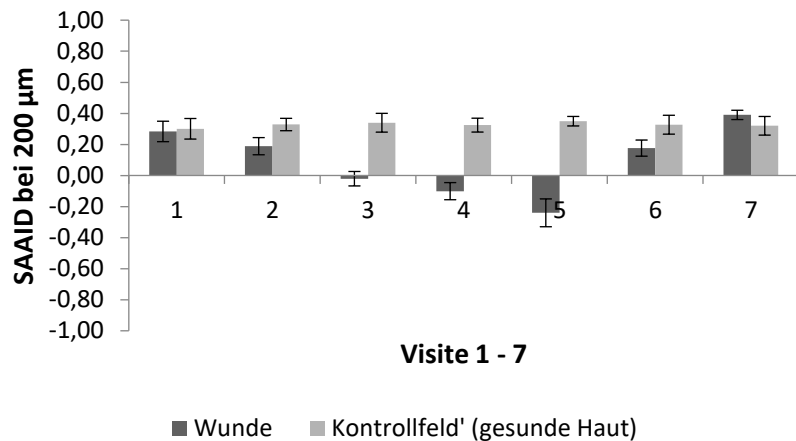


Abbildung 4: SAAID Verlauf von Visite 1 bis Visite 7 ⁽¹⁵⁾

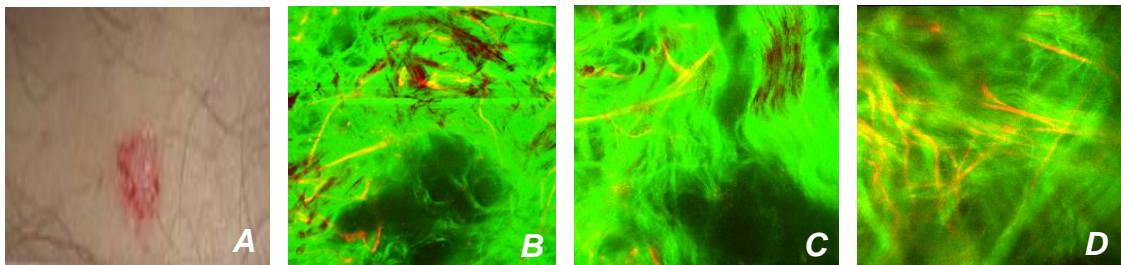


Abbildung 5: Akute Wunde nach Curettage (A), erste messbare Struktur Kollagen I (B-D)

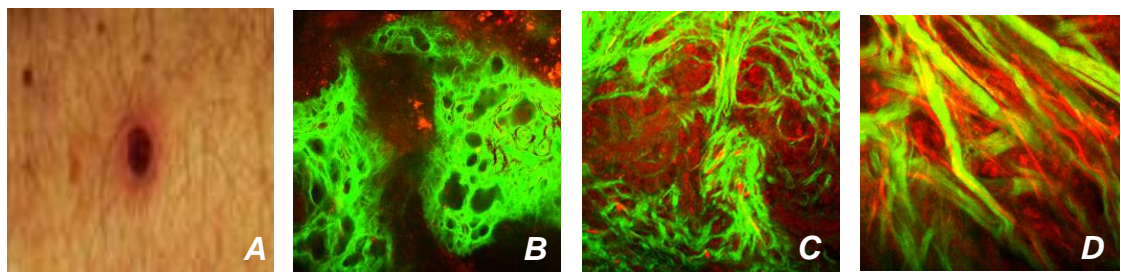


Abbildung 6: Bereich der akuten Wunde mit Kruste und Entzündungszeichen Visite 2 (A); reduzierte Kollagenmatrix während Visite 2 (B) und Visite 3 (C-D)

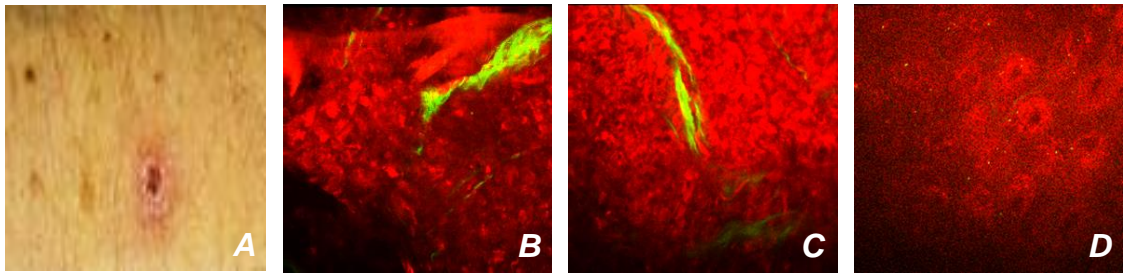


Abbildung 7: Visite 4 - Bereich der akuten Wunde mit Kruste und reduziertem Durchmesser (A); nur wenige Kollagenfasern detektiert (B + C); Visite 5 - erste Zellen detektiert (D)

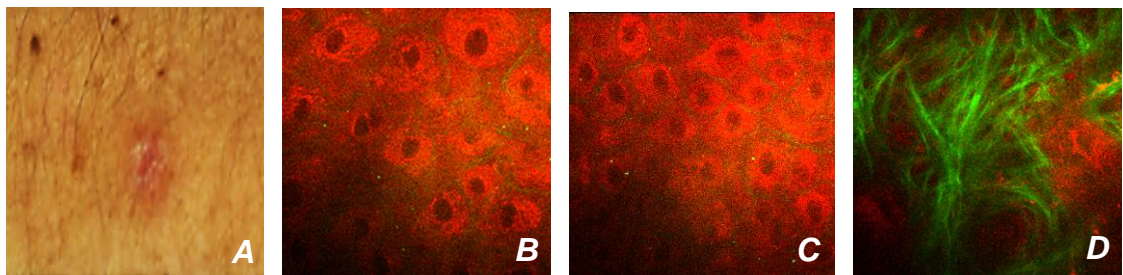


Abbildung 8: Visite 6 - Bereich der akuten Wunde ohne Kruste und Entzündungszeichen (A); Zellen des Stratum granulosum (B) und Stratum spinosum (C); reifes Kollagen mit ausgeprägten Netzwerken (D)

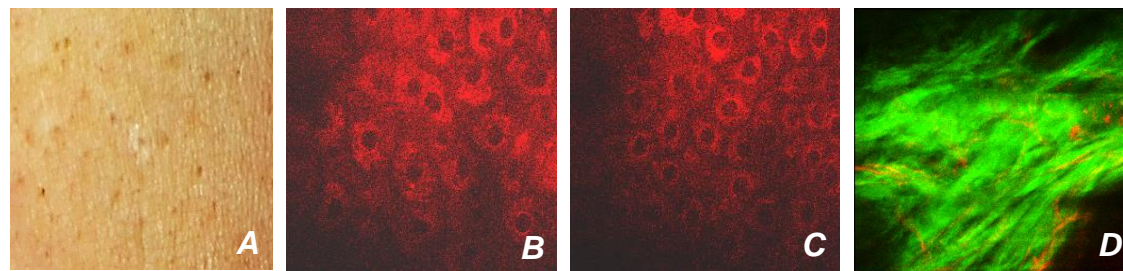


Abbildung 9: Visite 7 - Bereich der akuten Wunde nach 24 Monaten - akute Wunde ohne Kruste und Entzündungszeichen (A); Zellen des Stratum granulosum (B) und Stratum spinosum (C); dichtes Netzwerk von reifem Kollagen (D)

4.4 Multiphotonentomographie an chronischen Wunden und die Bewertung einer sterilen, optisch transparenten, bakteriellen Nanozellulose-Abdeckung als ein diagnostisches Fenster in die menschliche Haut ⁽¹⁶⁾

Der SAAID des Kontrollgebietes zeigt den Verlauf für gesunde Haut (Abbildung 10), wie er bereits auch durch Kaatz et al. ⁽⁴⁾ gezeigt werden konnte. Auch morphologisch konnten die Merkmale für gesunde Haut, wie etwa dichte Zellverbände in den einzelnen epidermalen Schichten sowie dichte Fasernetzwerke aus Kollagen I, festgehalten werden. Hingegen konnte für den Verlauf des SAAID im Zentrum der chronischen Wunde festgestellt werden, dass dieser vollständig im negativen

Bereich verläuft (Abbildung 11). Des Weiteren konnten keine epidermalen Schichten nachgewiesen werden. Auch konnten im Bereich der Dermis keine dichten Fasernetzwerke aus Kollagen I dargestellt werden. Für den Verlauf des SAAID am Wundrand konnte gezeigt werden, dass dieser sich ähnlich verhält wie bei einer akuten Wunde während der Epithelisierungsphase (Abbildung 12). Des Weiteren konnten lose Anhäufungen von Zellen in den epidermalen Schichten sowie mit fortschreitender Fokustiefe auch der beginnende Aufbau von dichten Kollagennetzwerken detektiert werden.

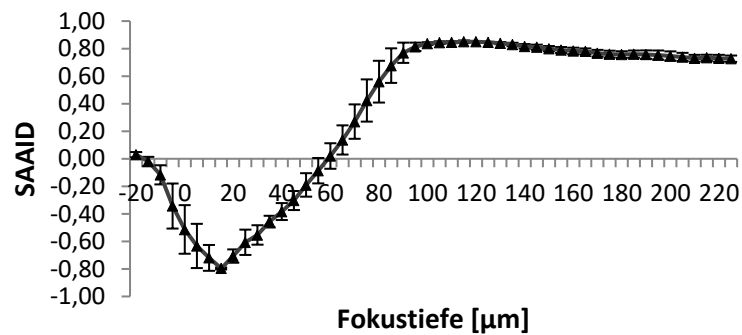


Abbildung 10: SAAID Verlauf gesunder Haut (repräsentatives Beispiel) ⁽¹⁶⁾

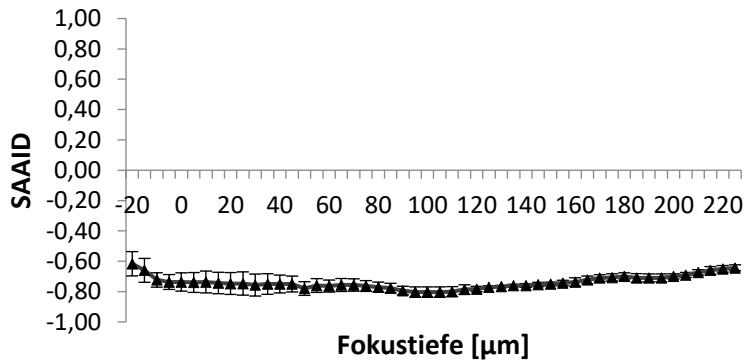


Abbildung 11: SAAID Verlauf im Zentrum einer chronischen Wunde (repräsentatives Beispiel) ⁽¹⁶⁾

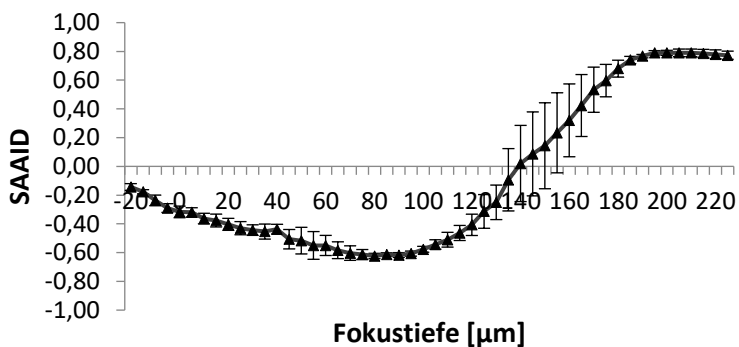


Abbildung 12: SAAID Verlauf am Rand einer chronischen Wunde (repräsentatives Beispiel) ⁽¹⁶⁾

Die Vermessung der BNC im Vergleich zur Standard-Setup (Deckglas mit Koppelring) zeigte für den Verlauf des SAAID in weiten Teilen viele Übereinstimmungen. Lediglich die Minima und Maxima zeigen unterschiedliche Werte (Abbildung 13). Auch ist die Fokustiefe für das Erreichen der Minima und Maxima unterschiedlich. Die Verschiebung der Fokustiefe basiert auf der Dicke der BNC Folie. Hinsichtlich der Morphologie konnte gezeigt werden, dass sich sowohl bei der BNC Folie als auch beim Standard-Setup alle epidermalen (Stratum corneum – Stratum basale) als auch dermalen Strukturen (Stratum papillare) eindeutig identifizieren und klar von der Umgebung abgrenzen lassen (Abbildung 14 und Abbildung 15).

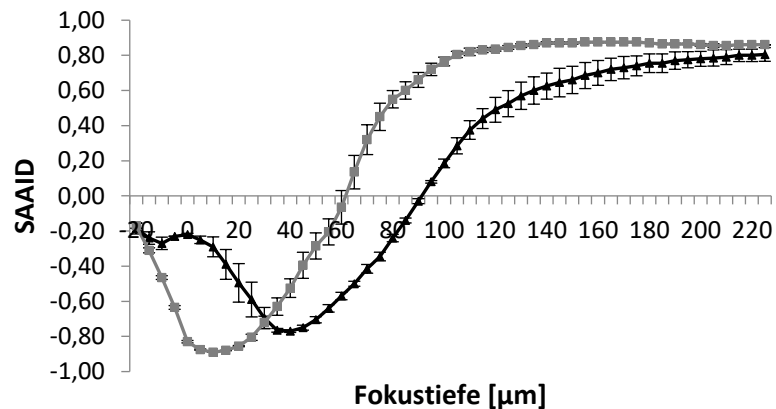


Abbildung 13: SAAID Verlauf bei Benutzung der BNC (schwarze Linie) sowie des Deckglases (graue Linie) (repräsentatives Beispiel) ⁽¹⁶⁾

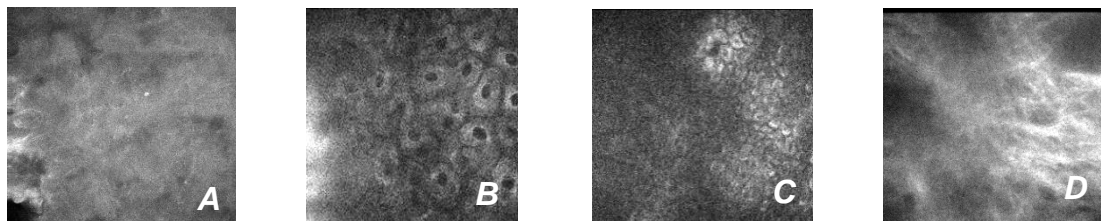


Abbildung 14: MPT Messungen ohne BNC Folie - A: AF – Stratum corneum; B: AF – Stratum granulosum; C: AF – Stratum basale; D: SHG – Stratum papillare ⁽¹⁶⁾

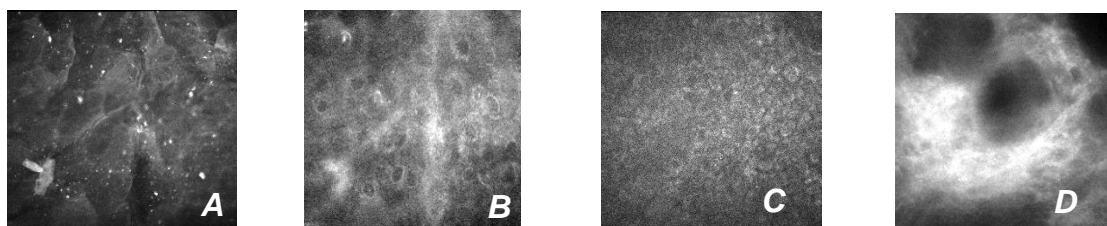


Abbildung 15: MPT Messungen mit BNC Folie - A: AF – Stratum corneum; B: AF – Stratum granulosum; C: AF – Stratum basale; D: SHG – Stratum papillare ⁽¹⁶⁾

Für die OCT und CLSM Messungen konnte festgestellt werden, dass diese ebenfalls sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der quantitativen und qualitativen Auswertung erreichten, wenn eine BNC genutzt wird. So konnten für die einzelnen Messkonfigurationen, mit und ohne BNC Folie, die morphologischen Abgrenzungen der einzelnen Strukturen einwandfrei nachvollzogen werden. Die Epidermis und Dermis konnten einwandfrei voneinander abgegrenzt werden. Ebenfalls konnte die BNC Folie innerhalb der Messverläufe ⁽¹⁶⁾ sowie der morphologischen Aufnahmen von den dermalen Strukturen zweifelsfrei unterschieden werden (Abbildung 16 – 17).

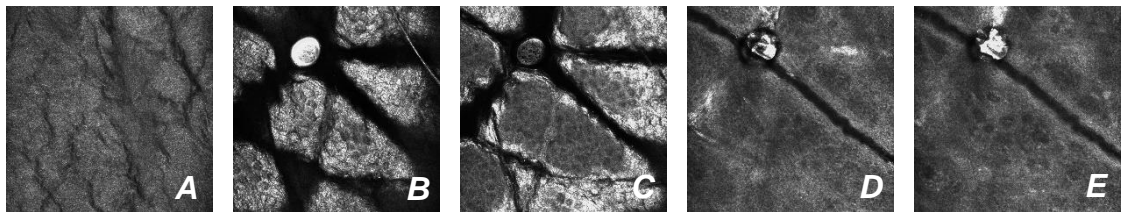


Abbildung 16: CLSM mit BNC Folie - BNC Folie (A); Stratum corneum (B); Stratum granulosum (C); Stratum basale (D); Stratum papillare (E)

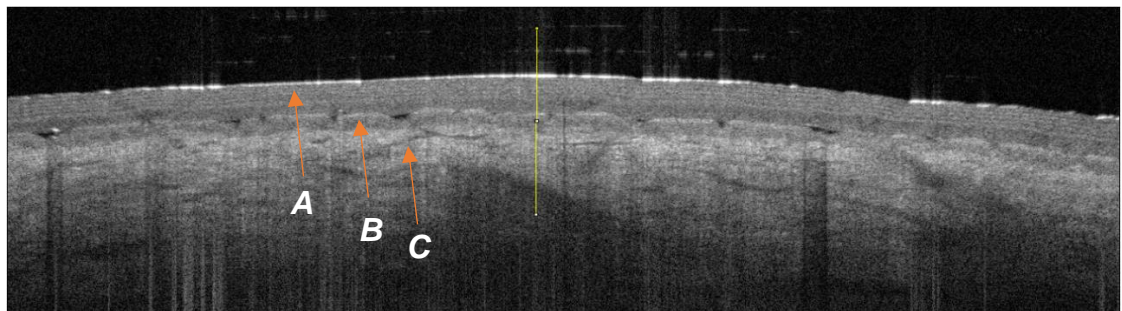


Abbildung 17: OCT Messungen mit BNC Folie – BNC Folie (A); Epidermis (B); Dermis (C)

Die Intensitätsverläufe können den Abbildungen 11, 13, 14 und 15 der Publikation „Multiphotontomographie an chronischen Wunden und die Bewertung einer sterilen, optisch transparenten, bakteriellen Nanozellulose-Abdeckung als ein diagnostisches Fenster in die menschliche Haut“ ⁽¹⁶⁾ entnommen werden.

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Optimierung des Messverfahrens der Multiphotonen-tomographie für menschliche Haut (*in vivo*)⁽¹⁴⁾

Der unter Punkt 4.2 Abbildung 1 dargestellte Kurvenverlauf des SAAID beruht auf den unterschiedlichen starken AF und SHG Signalen. Der Rückgang des SAAID beruht auf einer gesteigerten Intensität des AF Signals^(9, 20, 21, 23-26), welche durch eine große Anzahl zellulärer Bestandteile in der Epidermis hervorgerufen wird. Der Anstieg und der positive Verlauf hingegen beruhen auf einer Reduzierung des AF und einer Steigerung des SHG Anteils im Signal. Die Zunahme der SHG Intensität beruht auf einer steigenden Anzahl von Kollagenfasern in der Dermis.^(9, 20, 21, 23-26) Die unter Punkt 4.2 beschriebenen Abweichungen im Verlauf des SAAID für die Aufnahmen mit 7 s und 13 s je Bild beruhen auf Bewegungsartefakten. Die Abnahmen der Bildqualität mit abnehmender Scanzeit beruhen auf einem niedrigen Signal-Rausch-Abstand⁽²⁷⁾, welcher eine niedrige Intensität sowie einen schlechteren Kontrast zur Folge hat. In den Aufnahmen wird dies durch eine schlechtere Abgrenzung der Zellen und Fasern von dem sie umgebenden Hintergrund deutlich. Es konnte gezeigt werden, dass eine Messzeit von 3 s je Bild ausreichend ist, um qualitativ gute Informationen zur quantitativen Auswertung und der morphologischen Beurteilbarkeit zu erlangen. Diese wird in zukünftigen Untersuchungen zur Anwendung kommen.

5.2 Untersuchung der Wundheilung mittels der Multiphotonen-tomographie an menschlicher Haut (*in vivo*)⁽¹⁵⁾

Direkt nach erfolgter Curettage, in Visite 1, war nur noch der SAAID der dermalen Schichten darstellbar. Grund hierfür war das vollständige Fehlen der epidermalen Schichten und der darin enthaltenen zellulären Bestandteile, wie NAD(P)H, Keratin sowie anderer Fluorophore.^(9, 17, 39-41) Der minimale Anteil an Zellen im Gegensatz zum Kollagengehalt in der Dermis führte zu einer deutlichen Reduzierung des AF Signals und zu einem vergleichsweise hohen SHG Signal, dessen Grundlage die Kollagen I Fasern sind.^(9, 11, 17-19, 21-24, 39-41)

In den Visiten 2 und 3 war ein Absinken des SAAID messbar. Dieses hatte den Rückgang des Kollagen I als Ursache, welcher durch Metalloproteasen während der Entzündungsphase angetrieben wurde.⁽¹⁷⁾

In der Proliferationsphase, während den Visiten vier und fünf, konnte ein weiteres Absinken des SAAID verzeichnet werden. Dies ist begründet in der weiteren Reduzierung des Kollagen I im Wundgebiet bis zu einem Minimum. In weiterer Konsequenz führt dies zu einem geringeren SHG Anteil ^(9, 18, 19, 21-24, 39-41) im detektierten Signal und damit zu einer Veränderung des SAAID gegenüber den vorangegangenen Visiten. Während der Epithelisierung, in Visite 6, konnten im SAAID dermale und epidermale Anteile messbar erfasst werden. Dies ließ sich anhand morphologischer Aufnahmen bestätigen. Dabei zeigte sich, dass der AF Anteil des SAAID stärker ausgeprägt war als der SHG Anteil. Ursache hierfür ist die Dauer der Wiederherstellung dichter Kollagennetzwerke in der Dermis. Hierfür wird wesentlich mehr Zeit beansprucht, als für die Proliferation der Zellen in den epidermalen Schichten. ^(26, 27) Dieser Prozess kann mehrere Monate andauern. ⁽²⁸⁾ In der Abschlussvisite (Visite 7), nach 24 Monaten, konnte für das Wundareal ein identischer SAAID nachgewiesen werden wie für gesunde Haut. Sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis konnten alle Bestandteile gesunder Haut in Anzahl und Beschaffenheit nachgewiesen werden. Speziell in der Dermis konnten nun dichte Fasernetzwerke aus Kollagen und Elastin nachgewiesen werden. Hieraus ergab sich ein erheblicher Anstieg des SHG Signal im Vergleich zum AF Signal. ^(17, 27)

Die MPT erwies sich in dieser Studie als eine passende Methode, um die Änderungen in den Phasen der Wundheilung bei akuten Wunden zu dokumentieren. Der SAAID wurde dabei in jeder Phase der Wundheilung grundlegend beeinflusst, sodass dieser einer Phase der Wundheilung zugeordnet werden konnte. Auch konnten die Überlappungen der Wundheilungsphasen sehr gut dokumentiert werden. Dies macht die MPT zu einem nützlichen Werkzeug, um die einzelnen Phasen der Wundheilung und mögliche Störungen in diesen, wie zum Beispiel bei chronischen Wunden, zu detektieren.

Die MPT als mehrdimensionales Bildgebungsverfahren mit ihrer Auflösung im subzellulären Bereich bietet gegenüber den etablierten klinischen Methoden (OCT) ⁽¹⁰⁾ den Nachweis endogener Fluorophore sowie extrazellulärer Komponenten wie Kollagen (SHG) auf nichtinvasiver Basis. ⁽²⁰⁾ Eine Färbung wie in der Histologie ist nicht notwendig. ⁽²⁰⁾ Des Weiteren bietet die MPT im Gegensatz zu den anderen optischen Verfahren (OCT, CLSM) den Vorteil weniger anfällig für Bildverschlechterungen zu sein, aufgrund wesentlich geringerer Streuung des eingestrahltten Lichtes außerhalb der Fokusebene. ⁽⁴²⁾ Ferner bietet die MPT die

Nachweismöglichkeit von fluoreszierenden Enzymen, wie NAD(P)H, die Aufschluss über Änderungen im Zellstoffwechsel geben können. ⁽²⁰⁾ Sie bietet die Möglichkeit epidermale Strukturen (Keratinocyten, Basalzellen, Melanozyten) sowie extrazelluläre Komponenten der Dermis (Kollagen- und Elastinfasern) detailliert und nichtinvasiv darzustellen. ⁽²⁰⁾

5.3 Multiphotonentomographie an chronischen Wunden und die Bewertung einer sterilen, optisch transparenten, bakteriellen Nanozellulose-Abdeckung als ein diagnostisches Fenster in die menschliche Haut ⁽¹⁶⁾

MPT

Der SAAID aus dem Zentrum einer chronischen Wunde gleicht dem von akuten Wunden während der Proliferations- sowie Entzündungsphase. ⁽¹⁶⁾ Dies zeigt sich deutlich an den Änderungen der Signalbestandteile des SAAID, der AF sowie dem SHG. Grund hierfür ist das Fehlen dermalen Strukturen, welche eine Verringerung des SHG Signals zur Folge haben und somit das Verhältnis von SHG und AF zu Gunsten des AF Anteils verschieben. Durch Deka et al. ⁽¹⁷⁾ wurde beschrieben, dass der Abbau von Kollagen I während der Entzündungsphase stattfindet. Im Gegensatz zum Zentrum der chronischen Wunde zeigt der SAAID im Randbereich der Wunde einen anderen Fortgang. Dieser entspricht einer akuten Wunde während der Epithelisierung. ⁽¹⁵⁾ Ursache hierfür sind vereinzelte Zellen und Kollagenfasern, welche im Randbereich detektiert wurden. Aufgrund der überlegenen Anzahl von Zellen hatte auch hier das AF Signal einen größeren Anteil am SAAID als das SHG Signal. ^(7, 18, 19, 21-24) Ferner wurden bakterielle Infektionen in den Bereichen der chronischen Wunden im Rahmen der Studie festgestellt, sodass sich die Frage nach einer sterilen Abdeckung stellte. Zweck dieser Abdeckungen soll die Verhinderung von Kreuzkontaminationen sein. Als nützlich erschien hier die BNC, welche bereits ihre Zellkompatibilität unter Beweis gestellt hat. ⁽²⁹⁾ Aus technischer Sicht weist die BNC Folie ebenfalls Vorteile gegenüber dem bisherigen Setup aus Glas und Koppelring auf. Zum einen ist die Folie nicht steif, sondern kann an die Topographie des Wundareals angepasst werden, zum anderen ist sie wesentlich größer und kann somit eine erheblich größere Fläche bedecken. Während der Messungen mit der BNC Folie konnten keine signifikant negativen Einflüsse auf die Qualität der morphologischen Aufnahmen festgestellt werden, jedoch kam es zu Dämpfungen hinsichtlich der Intensitäten von MPT und CLSM. Diese hatten jedoch keinen

Einfluss auf die Auswertbarkeit der aufgenommenen Kurvenverläufe. So konnte für das Standard-Setup sowie für das Setup mit der BNC Folie gezeigt werden, dass trotz der Dämpfung der SAAID nahezu konstant ist. Grund hierfür ist, dass beide Signalanteile (AF und SHG) in gleichem Maße der Dämpfung durch die Folie unterliegen. Des Weiteren führt diese zu einem etwas breiteren AF Signal, welches den Beginn des SAAID in diesen Messungen um zirka 30 μm verschoben hat. Trotz dieser Eigenschaften können Aufnahmen, welche mit der BNC Folie durchgeführt wurden, ohne größere Einschränkungen für eine Auswertung hinsichtlich des SAAID genutzt werden.

OCT

Die einzelnen Peaks der OCT Messung ohne BNC Folie entsprechen den epidermalen und dermalen Strukturen. ^(16-Abbildung 11) Speziell im Bereich der Epidermis sorgt das Stratum corneum für eine hohe Intensität und trägt damit maßgeblich zu dessen Peak bei, welcher jedoch niedriger als der der Dermis ist. ⁽³⁰⁻³⁴⁾ Der zweite Peak ist dem Grenzbereich von Dermis und Epidermis zuzuordnen, welcher ein stärkeres Signal zur Folge hat, jedoch auch Bereiche aufweist, welche zu geringeren Reflektionen führen. ^(30-34, 38) Für den Messverlauf mit der BNC Folie ^(16-Abbildung 13) kann die Zuordnung der Intensitätspeaks analog dem Setup ohne BNC Folie beschrieben werden. Lediglich der Eingangspeak ^(16-Abbildung 13) ist hier nicht mehr einer dermalen Struktur zuzuordnen, sondern wird durch die Folie hervorgerufen, welche ebenfalls über stark reflektierende Bestandteile verfügt.

CLSM

Die Messverläufe für die CLSM ^(16-Abbildung 14 -15) stellen sich unterschiedlich dar. Der niedrige Beginn der Intensitätskurve im Standardsetup ^(16-Abbildung 14) ist auf das Fehlen reflektierender Strukturen zurückzuführen. Der wenig später erscheinende, mit steilem Anstieg versehene, Peak ist auf den Eintritt in die Epidermis zurückzuführen, im Speziellen hier auf das Stratum corneum und auf die stark reflektierenden Komponenten auf zellulärer Ebene, wie etwa Korneozyten. ⁽³⁵⁻³⁸⁾ Im weiteren Verlauf wird das Intensitätssignal geringer, speziell sei hier der Bereich der dermoepidermalen Junktionszone genannt. Hier sind hauptsächlich dunkle Papillen mit umgebenden Keratinozyten vorzufinden. ⁽³⁵⁻³⁸⁾ Das große Plateau im Verlauf ist der Dermis zuzuordnen. Aufgrund des Fehlens von Melanin und Keratin ist das Intensitätssignal hier wesentlich schwächer ausgeprägt als in der Epidermis. ^(35, 36) Der Messaufbau mit der BNC Folie ^(16-Abbildung 15) zeigte einen ähnlichen Verlauf.

Jedoch kam es zu Veränderung im Beginn der Intensitätskurve sowie in deren Amplitude. So beginnt diese auf einem wesentlich höheren Niveau. Dies basiert darauf, dass die Folie über reflektierende Strukturen verfügt und diese für eine hohe Intensität sorgen. Im weiteren Verlauf fällt auf, dass der Intensitätspeak der Epidermis wesentlich gedämpfter erscheint. Die Folie muss einen absorbierenden Charakter auf bestimmte Wellenlängen von Strahlung ausüben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die MPT ein nützliches Werkzeug darstellt um akute und chronische Wunden auf epidermaler und dermaler Ebene zu untersuchen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass aufgrund von potentiell vorhandenen Infektionen in chronischen Wunden, optisch transparente Abdeckungen notwendig sind, welche zu den etablierten optischen Verfahren kompatibel sind. Hier erwies sich die BNC als ein sehr gut geeignetes Produkt. Es zeigte sich sowohl für die MPT, die CLSM als auch die OCT, dass die BNC Folie genutzt werden kann und trotzdem qualitativ als auch quantitativ klinische Messungen möglich sind, welche zwar mit kleinen Einbußen behaftet sind, jedoch in ihrem analytischen Charakter nicht negativ beeinflusst werden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Probst, Vasel-Biergans; Wundmanagement. 2. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 70191 Stuttgart; 2010; ISBN 978-3-8047-2413-6
- [2] Heinlin J, Schreml S, Babilas P, Landthaler M, Karrer S: Wundheilung Therapeutische Interventionen. *Hautarzt* 2010; 61: 611-628
- [3] Kaatz M, Sturm A, Elsner P, König K, Bückle R and Koehler MJ, Depth-resolved measurement of the dermal matrix composition by multiphoton laser tomography. Volume 16, Issue 2, *Skin Research and Technology* 2010, Pages 131 - 136
- [4] Dimitrow E, Riemann I, Ehlers A, Koehler MJ, Norgauer J, Elsner P, Koenig K, Kaatz M. Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis. *Exp Dermatol* 2009; 18: 509–515
- [5] Dimitrow E, Ziemer M, Koehler MJ, Norgauer J, Koenig K, Elsner P, Kaatz M. Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1752–1758
- [6] Seidenari S, Arginelli F, Dunsby C, French P, Koenig K, Magnoni C, Manfredini M, Talbot C, Ponti G. Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of basal cell carcinoma: morphologic features for non-invasive diagnostics. *Exp Dermatol* 2012; 21: 831–836
- [7] Koehler MJ, König K, Elsner P, Bückle R and Kaatz M, In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. Volume 31, Issue 19; *Skin Research and Technology* 2006, Pages 2879 - 2881
- [8] Riccardo Cicchi, Dimitrios Kapsokalyvas, Vincenzo De Giorgi, Vincenza Maio, Annelies Van Wiechen, Daniela Massi, Torello Lotti, and Francesco S. Pavone. Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophotonics*. 2010;1–2:34–43
- [9] Darvin ME, Richter H, Ahlberg S, Haag SF, Meinke MC, Le Quintrec D, Doucet O and Lademann J, Influence of sun exposure on the cutaneous collagen/ elastin fibers and carotenoids: negative effects can be reduced by application of sunscreen. *Journal of Biophotonics* 2014, No. 9, 735 – 743,
- [10] Koenig K, Speicher M, Bueckle R, Reckfort J, McKenzie G, Welzel J, Koehler MJ, Elsner P, Kaatz M. Clinical optical coherence tomography combined with multiphoton tomography of patients with skin diseases. *J Biophotonics* 2009; 2: 389–397
- [11] Koenig K, Speicher M, Koehler MJ, Scharenberg R, Kaatz M. Clinical application of multiphoton tomography in combination with high-frequency ultrasound for evaluation of skin diseases. *J Biophotonics* 2010; 3: 759–773

- [12] Koehler MJ, Speicher M, Lange-Asschenfeldt S, Stockfleth E, Metz S, Elsner P, Kaatz M, Koenig K. Clinical application of multiphoton tomography in combination with confocal laser scanning microscopy for in vivo evaluation of skin diseases. *Exp Dermatol* 2011; 20: 589–594.
- [13] Ulrich M, Klemp M, Darvin ME, König K, Lademann J and Meinke MC, In vivo detection of basal cell carcinoma: comparison of a reflectance confocal microscope and a multiphoton tomograph. *Journal of Biomedical Optics* 2013, Volume 18(6), 061229-1 - 061229-6
- [14] Springer S, Zieger M, Koenig K, Kaatz M, Lademann J and Darvin ME, Optimization of the measurement procedure during multiphoton tomography of human skin in vivo. *Skin Research and Technology* 2015; Volume22, Issue3 August 2016, Pages 356-362
- [15] Springer S, Zieger M, Böttcher A, Lademann J, Kaatz M, Examination of wound healing after curettage by multiphoton tomography of human skin in vivo. Volume23, Issue4, November 2017, Pages 452-458
- [16] Springer S, Zieger M, Hipler UC, Lademann J, Albrech V, Bueckle R, Meß C, Kaatz M, Huck V, Multiphotonic staging of chronic wounds and evaluation of sterile, optical transparent bacterial nanocellulose covering: A diagnostic window into human skin. Volume 25, Issue 1 January 2019, Pages 68-78
- [17] Deka G, Wu WW, Kao FJ, In vivo wound healing diagnosis with second harmonic and fluorescence lifetime imaging. *J Biomed Optics*.2013;18:061222-1–061222-9
- [18] Cicchi R, Sestini S, De Giorgi V, Massi D, Lotti T, Pavone FS, Nonlinear laser imaging of skin lesions. *J Biophoton* 2008; 1: 62–73
- [19] Perry SW, Burke RM, Brown EB, Two-photon and second harmonic microscopy in clinical and translational cancer research. *Ann Biomed Eng* 2012; 40: 277–291
- [20] Koenig K, Clinical multiphoton tomography. *J Biophoton* 2008; 1: 13–23
- [21] Adur J, Carvalho HF, Cesar CL, Casco VH, Nonlinear optical microscopy signal processing strategies in cancer. *Cancer Inform* 2014; 13: 67–76
- [22] Roberts MS, Dancik Y, Prow TW, Thorling CA, Lin LL, Grice JE, Robertson TA, Koenig K, Becker W, Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 77: 469–488
- [23] Del Barco O, Bueno JM, Second harmonic generation signal in collagen fibers: role of polarization, numerical aperture, and wavelength. *J Biomed Opt* 2012; 17: 045005

- [24] Czekalla C, Schönborn K-H, Döge N, Jung S, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC, Impact of Body Site, Age, and Gender on the Collagen/Elastin Index by Noninvasive in vivo Vertical Two-Photon Microscopy. *Skin Pharmacol Physiol* 2017;30:260–267
- [25] Weinigel M, Breunig HG, Uchugonova A, König K, Multipurpose nonlinear optical imaging system for in vivo and ex vivo multimodal histology. *Journal of Medical Imaging*, Jan–Mar 2015, 016003-1 - 016003-10
- [26] Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR, Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg.* 1998;176:26S–38S
- [27] Cicchi R, Kapsokalyvas D, De Giorgi V, Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophotonics.* 2010;1–2:34–43
- [28] Dealey C, *The Care of Wounds: A Guide for Nurses.* West Sussex: Wiley-Blackwell; 1999
- [29] Wiegand C, Moritz S, Hessler N, Antimicrobial functionalization of bacterial nanocellulose by loading with polihexanide and povidone-iodine. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26:245
- [30] Welzel J, Optical coherence tomography in dermatology: a review. *Skin Res Technol.* 2001;7:1-9
- [31] Welzel J, Lankenau E, Birngruber R, Engelhardt R, Optical coherence tomography of the human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology* Volume 37, Number 6, 1997, 959- 963
- [32] Gambichler T, Moussa G, Sand M, Sand D, Altmeyer P, Hoffmann K, Applications of optical coherence tomography in dermatology. *Journal of Dermatological Science* (2005) 40, 85—94
- [33] Ring HC, Mogensen M, Hussain AA, Steadman N, Banzhaf C, Themstrup L, Jemec GB, Imaging of collagen deposition disorders using optical coherence tomography. *JEADV* 2015, 29, 890–898
- [34] Babalola O, Mamalis A, Lev-Tov H, Jagdeo J, Optical coherence tomography (OCT) of collagen in normal skin and skin fibrosis. *Arch Dermatological Research* (2014) 306:1–9
- [35] Welzel J, Schuh S, Noninvasive diagnosis in dermatology. *J German Soc Dermatol.* 2017;15:999-1016
- [36] Gonzalez S, Gilaberte-Calzada Y, In vivo reflectance-mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology. *International Journal of Cosmetic Science,* 2008, 30, 1–17

- [37] Meyer LE, Otberg N, Sterry W, Lademann J, In vivo confocal scanning laser microscopy: comparison of the reflectance and fluorescence mode by imaging human skin. *Journal of Biomedical Optics* 11(4), July/August 2006, 044012-1 - 044012-6
- [38] Lademann J, Otberg N, Richter H, Meyer L, Audring H, Teichmann A, Thomas S, Knüttel A, Sterry W, Application of optical non-invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with histological analysis. *Skin Research and Technology* 2007; 13: 119–132
- [39] Waller JM, Maibach HI, Age and skin structure and function, a quantitative approach. II, Protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Research and Technology* 2006,12: 145–154
- [40] Zipfel WR, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT, Webb WW Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7075–7080
- [41] Toki F, Honkura N, Shirakata Y, Imamura T, Higashiyama S, Nanba D, Second harmonic generation reveals collagen fibril remodeling in fibroblast-populated collagen gels. *Cell Struct Funct* 2013; 38: 227–236
- [42] Schenke-Layland K, Riemann I, Damour O, Stock UA, Koenig K, Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs – powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery, Rev* 2006; 58: 878–896
- [43] Victoria E, Centonze, John G, White Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. *Biophysical Journal*, Volume 75, October 1998, 2015–2024

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Steffen Springer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “ *Untersuchung der Wundheilung mittels Multiphotonentomographie* “ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7.1 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Steffen Springer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Springer S, Zieger M, Koenig K, Kaatz M, Lademann J, Darvin ME, Optimization of the measurement procedure during multiphoton tomography of human skin in vivo, Skin Research and Technology, 2016, Aug;22(3):356-362. : 10.1111/srt.12273. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26456590

Beitrag im Einzelnen:

Aus den durch mich durchgeführten Messungen und der sich anschließenden Datenauswertung sind die Grafiken in den Abbildungen 1 und 3 entstanden. Des Weiteren resultieren daraus alle Aufnahmen in den Abbildungen 2 sowie 3 (A – D). Aus meiner statistischen Auswertung ist die Tabelle 2 hervorgegangen. Tabelle 1 ist eine, von mir selbst erstellte Übersicht über die angewendeten Scanparameter während der Untersuchungen bzw. Messungen. Grundlegend ist durch mich die komplette Literaturrecherche sowie die Verfassung der gesamten Publikation erfolgt.

Publikation 2: Springer S, Zieger M, Böttcher A, Lademann J, Kaatz M, Examination of wound healing after curettage by multiphoton tomography of human skin in vivo, Skin Research and Technology, 2017, Nov;23(4):452-458. : 10.1111/srt.12355. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28271554

Beitrag im Einzelnen:

Aus meinen Messungen und der sich anschließenden Auswertung der Daten, sind die Grafiken in den Abbildungen 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 11 entstanden. Des Weiteren sind aus den von mir durchgeführten Untersuchungen die Aufnahmen in den Abbildungen 3, 5, 7 und 9 hervorgegangen. Die Tabellen 1 und 2 sind ebenfalls durch mich erstellt worden. Sie zeigen die angewendeten Scanparameter für die Untersuchungen sowie den zeitlichen Ablauf derer. Grundlegend ist durch mich die komplette Literaturrecherche sowie die Verfassung der gesamten Publikation erfolgt.

Publikation 3: Springer S, Zieger M, Hipler UC, Lademann J, Albrecht V, Bueckle R, Meß C, Kaatz M, Huck V, Multiphotonic staging of chronic wounds and evaluation of sterile, optical transparent bacterial nanocellulose covering: A diagnostic window into human skin, Skin Research and Technology, 2019, Jan;25(1):68-78. : 10.1111/srt.12597. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29923636

Beitrag im Einzelnen:

Aus meinen Messungen und der anschließenden Datenauswertung sind die Aufnahmen in den Abbildungen 4, 6, 8, 10 und 12 entstanden. Im Weiteren sind durch meine Messungen und die anschließende Auswertung der Daten die Grafiken aus den Abbildungen 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13 sowie 14 und 15 hervorgegangen. Die Übersicht der angewendeten Scanparameter, in Tabelle 1, wurde ebenfalls von mir erstellt. Grundlegend ist durch mich die komplette Literaturrecherche sowie die Verfassung der gesamten Publikation erfolgt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Druckexemplare

<https://doi.org/10.1111/srt.12273>

Titel: *“Optimization of the measurement procedure during multiphoton tomography of human skin in vivo”*

<https://doi.org/10.1111/srt.12273>

<https://doi.org/10.1111/srt.12273>

<https://doi.org/10.1111/srt.12273>

<https://doi.org/10.1111/srt.12273>

<https://doi.org/10.1111/srt.12273>

<https://doi.org/10.1111/srt.12273>

<https://doi.org/10.1111/srt.12355>

Titel: *“Examination of wound healing after curettage by multiphoton tomography of human skin in vivo”*

<https://doi.org/10.1111/srt.12355>

<https://doi.org/10.1111/srt.12355>

<https://doi.org/10.1111/srt.12355>

<https://doi.org/10.1111/srt.12355>

<https://doi.org/10.1111/srt.12355>

<https://doi.org/10.1111/srt.12355>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

Titel: *“Multiphotonic staging of chronic wounds and evaluation of sterile, optical transparent bacterial nanocellulose covering: A diagnostic window into human skin”*

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

<https://doi.org/10.1111/srt.12597>

9 **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 **Publikationsliste**

2018

1: Springer S, Zieger M, Hipler UC, Lademann J, Albrecht V, Bueckle R, Meß C, Kaatz M, Huck V. Multiphotonic staging of chronic wounds and evaluation of sterile, optical transparent bacterial nanocellulose covering: A diagnostic window into human skin. *Skin Res Technol.* 2019 Jan;25(1):68-78. doi: 10.1111/srt.12597. Epub 2018 Jun 20. PubMed PMID: 29923636.

Impact factor: 1.657

2: Springer S, Zieger M, Hipler UC, König K, Lademann J, Kaatz M, Koehler MJ. Non-invasive evaluation of human mucosal structures by multiphoton laser scanning tomography in vitro. *Skin Res Technol.* 2018 Aug;24(3):445-449. doi: 10.1111/srt.12451. Epub 2018 Feb 6. PubMed PMID: 29405439.

Impact factor: 1.657

2017

3: Springer S, Zieger M, Böttcher A, Lademann J, Kaatz M. Examination of wound healing after curettage by multiphoton tomography of human skin in vivo. *Skin Res Technol.* 2017 Nov;23(4):452-458. doi: 10.1111/srt.12355. Epub 2017 Mar 7. PubMed PMID: 28271554.

Impact factor: 1.489

2016

4: Springer S, Zieger M, Koenig K, Kaatz M, Lademann J, Darvin ME. Optimization of the measurement procedure during multiphoton tomography of human skin in vivo. *Skin Res Technol.* 2016 Aug;22(3):356-62. doi: 10.1111/srt.12273. Epub 2015 Oct 12. PubMed PMID: 26456590.

Impact factor: 1.662

2015

5: Zieger M, Springer S, Koehler MJ, Kaatz M. Multiphoton tomography. *Hautarzt*. 2015 Jul; 66(7):511-21. doi: 10.1007/S00105-015-3626-9. Review German. PubMed PMID: 25943693.

Impact factor: 0.511

2014

6: Köhler MJ, Springer S, Kaatz M. On the seasonality of dermatoses: a retrospective analysis of search engine query data depending on the season. *Hautarzt*. 2014 Sep;65(9):814-22. doi: 10.1007/S00105-014-2848-6. German. PubMed PMID: 25234631.

Impact factor: 0.564

2013

7: Wiegand C, Springer S, Abel M, Wesarg F, Ruth P, Hipler UC. Application of a drainage film reduces fibroblast ingrowth into large-pored polyurethane foam during negative-pressure wound therapy in an in vitro model. *Wound repair regen*. 2013 Sep-Oct;21(5):697-703. doi: 10.1111/WRR.12073. Epub 2013 Aug 12. PubMed PMID: 23937617.

Impact factor: 2.768

2011

8: Koehler MJ, Zimmermann S, Springer S, Elsner P, König K, Kaatz M. Keratinocyte morphology of human skin evaluated by in vivo multiphoton laser tomography. *Skin Res Technol*. 2011 Nov;17(4):479-86. doi: 10.1111/J.1600-0846.2011.00522.X. Epub 2011 Mar 31. Pubmed PMID: 21453411.

Impact factor: 1.599

11 **Danksagung**

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie sein stetiges Interesse und Unterstützung, die hilfreichen Gespräche und vor allem für seine große fachliche Expertise, von der ich stets profitieren konnte bedanken.

Frau PD Dr. med. Alexa Patzelt danke ich herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit an der Charité Berlin. Dabei möchte ich im Speziellen die Übernahme der Betreuung, die schnelle Kommunikation, die hilfreichen Ratschläge sowie die fachliche Unterstützung und ihr außerordentliches Engagement hervorheben.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. rer. nat. et med. habil. Uta-Christina Hipler sowie Herrn PD Dr. med. habil. Martin Kaatz für die Betreuung meiner Doktorarbeit seitens des Universitätsklinikums Jena sowie des SRH Wald-Klinikums Gera. Auch hier möchte ich ihr stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, die hervorragende Kommunikation und fachliche Unterstützung erwähnen.

Herrn PhD Dr. rer. medic. Maxim E. Darwin danke ich herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit an der Charité Berlin. Dabei möchte ich im Speziellen die Erreichbarkeit, schnelle Kommunikation, die hilfreichen Ratschläge sowie die fachliche und technische Unterstützung hervorheben.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern, besonders bei Herrn Dr. rer. nat. Michael Zieger, der genannten Einrichtungen bedanken, die mir mit hilfreichen Ideen und Ratschlägen zur Seite gestanden haben.