

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

DISSERTATION

In-vivo Untersuchungen zur molekularen Wirkungsweise von
thermomechanischer Ablation an der Haut

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tamara Kathrin Dörr

aus Pforzheim

Datum der Promotion: 04. Juni 2021

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
TABELLENVERZEICHNIS	2
ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
IN-VIVO UNTERSUCHUNGEN ZUR MOLEKULAREN WIRKUNGSWEISE VON THERMOMECHANISCHER ABLATION AN DER HAUT	10
EINLEITUNG	10
Wundheilung und Hautstruktur	11
Minimalinvasive Verfahren	15
Laser	15
Mikroneedling	16
Wirkmechanismus	17
Radiofrequenztherapie	17
Wirkmechanismus	17
Thermomechanische Ablation (TMA)	18
Möglichkeiten der transdermalen Wirkstoffapplikation	19
Kutane Mikrodialyse als Untersuchungsmethode für die Freisetzung von Entzündungsmediatoren	20
Zielsetzung der Arbeit	21
MATERIAL UND METHODEN	23
Thermomechanische Ablation	23
Studiendesign	24
Behandlungssetting	25
Mikrodialyse	26
Laboranalyse	27
Datenanalyse	30
ERGEBNISSE	32
Zytokinmodulationen direkt nach TMA	32

Zytokinmodulationen 24h nach TMA	36
Modulationen von Zytokinen mit Wirkung auf das adaptive Immunsystem	40
Zytokinprofile der T-Zell-Subtypen	42
Modulation wundheilungs-assoziiertes Chemokine	45
Modulation wundheilungs-assoziiertes Wachstumsfaktoren	49
Inflammatorische Reaktion von Proband A	53
Zytokinprofile	54
DISKUSSION	56
Inflammatorische Reaktion	56
Unterschiedliche Zytokinexpression bei minimalinvasiven Verfahren	58
Wachstumsfaktoren.....	60
Inflammatorische Reaktion von Proband A	61
Ausgangssituation der Zytokinprofile	62
Limitationen und mögliche Fehlerquellen.....	62
Ausblick.....	64
REFERENZEN.....	65
ANHANG	72
Übersicht aller Messwerte 1h und 24h post-TMA für behandeltes Areal und Kontrollareal.....	72
P-Werte für alle Zytokine 1h post-TMA in Relation zur Kontrolle	83
P-Werte für alle Zytokine 24h post-TMA in Relation zur Kontrolle	84
P-Werte für alle Zytokine 1h post-TMA in Relation zu 24h post-TMA.....	85
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	86
LEBENS LAUF	87
PUBLIKATIONS LISTE.....	88
DANKSAGUNG	89

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Verdampfung der Haut durch thermomechanische Ablation.....	19
Abbildung 2: Tixel®, Novoxel Ltd., Netanya, Israel.....	23
Abbildung 3: Handstück des Tixel® und sein metallischer Tip	24
Abbildung 4: Protrusion des Tips nach Aktivierung.....	24
Abbildung 5: Versuchsaufbau Mikrodialyse.....	27
Abbildung 6: Luminex® xMAP®- Technologie.....	29
Abbildung 7: Inflammatorische Zytokine im Gewebedialysat 1h post-TMA in Relation zur Kontrolle	34
Abbildung 8: Inflammatorische Zytokine im Gewebedialysat 24h post-TMA in Relation zur Kontrolle	37
Abbildung 9: Zeitliche Dynamik der inflammatorischen Zytokine 1h und 24h nach TMA	39
Abbildung 10: Zeitliche Dynamik der auf das adaptive Immunsystem wirkenden Zytokine 1h und 24h nach TMA	41
Abbildung 11: Konzentration und zeitliche Dynamik der Zytokinprodukte von TH ₁ -Zellen 1h und 24h nach TMA	42
Abbildung 12: Konzentration und zeitliche Dynamik der Zytokinprodukte von TH ₂ -Zellen 1h und 24h nach TMA	43
Abbildung 13: Konzentration und zeitliche Dynamik der Zytokinprodukte von TH ₁₇ -Zellen 1h und 24h nach TMA	44
Abbildung 14: Chemokine im Gewebedialysat 1h und 24h post-TMA in Relation zur Kontrolle	46
Abbildung 15: Zeitliche Dynamik der wundheilungs-assoziierten Chemokine 1h und 24h nach TMA.....	48
Abbildung 16: Wundheilungs-assoziierte Wachstumsfaktoren 1h und 24h post-TMA in Relation zur Kontrolle	50
Abbildung 17: Zeitliche Dynamik der wundheilungs-assoziierten Wachstumsfaktoren 1h und 24h nach TMA.....	52
Abbildung 18: Normverteilung der TH ₁ /TH ₂ /TH ₁₇ -Zytokine nach 24h Stimulation mit ConA/SEB im in-vitro Zellstimulationsassay	54

Abbildung 19: TH₁/TH₂/TH₁₇-Zytokinprofile der einzelnen Probanden in der unbehandelten Haut.....55

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zytokine mit mehr als Konzentrationsverdopplung im Kontrollareal nach 24h im Vergleich zum Kontrollareal nach 1h bei Proband A mit Vergleichswerten der Probanden B-F53

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Minimalinvasive Techniken, die durch Induktion der Kollagenneubildung eine Verbesserung der Hautstruktur bewirken, finden zunehmend Anwendung. Durch Reduktion der Wundheilungsdauer und Nebenwirkungsraten haben neue fraktionierte Verfahren wie fraktioniert-ablative Laser oder die kürzlich eingeführte thermomechanische Ablation (TMA) die klassischen ablativen Laser als Goldstandard abgelöst. Die molekularen Effekte dieser Techniken sind kaum untersucht, für die individualisierte Auswahl der Verfahren sowie für deren prospektive Nutzung in der transdermalen Wirkstoffapplikation ist deren Kenntnis jedoch essentiell. In der vorliegenden Arbeit werden die grundlegenden Wirkmechanismen der TMA untersucht.

Methoden

TMA (Tixel®) wurde an 6 gesunden Probanden durchgeführt. 1h und 24h postinterventionem wurde mittels kutaner Mikrodialyse Gewebeflüssigkeit aus den TMA-Arealen sowie aus Kontrollarealen gewonnen. Mittels Luminex®xMAP® Technologie wurden die Proben auf Zytokine und Wachstumsfaktoren untersucht. Die Ergebnisauswertung erfolgte als deskriptive Statistik, der Vergleich anhand der Mediane der Gruppen. Unterschiede wurden mittels Wilcoxon-Test statistisch getestet, p-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

Ergebnisse

1h nach TMA wurde eine signifikante Hochregulation der inflammatorischen Zytokine IL-1 β (46,3%;p<0.05), IL-6 (14,8%;p<0.05), IL-8 (77,7%;p<0.01) und TNF α (83,9%;p<0.05) beobachtet. Nach 24h war noch IL-1 β (366,0%;p<0.05) signifikant erhöht, IL-8 (16,5%;p=0.74) war gesunken, TNF α lag auf dem Niveau der Kontrolle und IL-6 (-14%;p=0.14) war herabreguliert.

24h nach TMA war in der Gruppe der Chemokine MCP-1 signifikant herabreguliert (-37,3%;p>0.01), während PDGF (+313,3%;p=0.34) erhöht war. Die im adaptiven Immunsystem wirkenden Zytokine IL-2, IL-15 und IL-9 waren nach 24h nicht signifikant hochreguliert.

Die Wachstumsfaktoren VEGF-A, HGF, PDGF, BDNF und EGF zeigten eine Hochregulation nach 24h. VEGF-A (78,9%;p<0.01 und 52,2%;p=0.6) und HGF

(47,4%; $p<0.01$ und 47,2%; $p=0.07$) waren initial stärker hochreguliert, während PDGF, BDNF und EGF initial herabreguliert waren. FGF-2 war zu beiden Messzeitpunkten signifikant herunterreguliert (-27,2%; $p<0.01$; -22,1%; $p<0.05$).

Diskussion

Der signifikante Anstieg proinflammatorischer Zytokine unmittelbar nach sowie der verzögerte Anstieg der Wachstumsfaktoren 24h nach der TMA bilden die Phasen der Wundheilung gut ab. Der Abfall von IL-8 innerhalb von 24 Stunden weist auf eine kurze Re-Epithelialisierungszeit und schnelle Wiederherstellung der Hautintegrität nach TMA hin. Dies unterstützt die klinischen Daten, dass die TMA im Vergleich zu den ablativen Laserbehandlungen ein geringeres Ausmaß an epithelialer Verletzung induziert und eine Reduktion der Ausfallzeit sowie ein vermindertes Risiko für Nebenwirkungen bedingt. Die Untersuchung zeigt auf molekularer Basis, dass die TMA für regenerative Behandlungen, bei denen eine nur kurzzeitige Barrierefunktionsstörung angestrebt wird, eine Alternative zu den bislang untersuchten ablativen Laserverfahren darstellt.

Schlußfolgerung

Die Wundheilung nach TMA wurde auf molekularer Ebene untersucht. Es zeigten sich Zytokinmodulationen und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, die die bekannten Phasen einer Wundheilungsreaktion widerspiegeln.

ABSTRACT

Background

Microinvasive skin resurfacing techniques, inducing collagen formation and deposition, are used increasingly in dermatology. Replacing ablative treatments, the current gold standard are modern techniques such as fractionated ablative lasers, radiofrequency, microneedling or the recently induced thermomechanical ablation (TMA).

Few studies have investigated the molecular effects of such treatments. Although the general mechanism seems to be the induction of inflammation resulting in dermal collagen deposition there are differences to be noted that may lead to tailored skin rejuvenation approaches in the future. Being a new approach on microinvasive techniques, knowledge of molecular effects of TMA is essential but has not yet been studied.

Methods

Using Tixel®, TMA was performed on 6 healthy study subjects. Tissue fluid of treated and control areas was extracted using cutaneous microdialysis 1h and 24h postinterventionem. In a multiplex assay analysis, cytokines and growth factors were quantified using Luminex®xMAP® technology. Descriptive statistics, using median comparison, were performed. Wilcoxon-test was chosen for statistical testing, significance was determined as $p < 0.05$.

Results

1h post-TMA significant upregulation of inflammatory cytokines IL-1 β (46,3%; $p < 0.05$), IL-6 (14,8%; $p < 0.05$), IL-8 (77,7%; $p < 0.01$) and TNF α (83,9%; $p < 0.05$) was measured. 24h post-TMA IL-1 β (366,0%; $p < 0.05$) was still significantly upregulated, IL-8 (16,5%; $p = 0.74$) had decreased, TNF α had returned to control levels and IL-6 (-14%; $p = 0.14$) showed downregulation. 24h post-TMA chemoattractant MCP-1 was significantly downregulated (-37,3%; $p > 0.01$), PDGF was upregulated (+313,3%; $p = 0.34$). Upregulation of cytokines IL-2, IL-15 and IL-9 modulating adaptive immunity after 24h was not significant.

Growth factors VEGF-A, HGF, PDGF, BDNF and EGF were upregulated after 24h. VEGF-A (78,9%; $p < 0.01$ and 52,2%; $p = 0.6$) and HGF (47,4%; $p < 0.01$ and 47,2%; $p = 0.07$) showed higher upregulation after 1h while PDGF, BDNF and EGF were downregulated.

FGF-2 showed significant downregulation (-27,2%; $p<0.01$; -22,1%; $p<0.05$) at both timepoints.

Discussion

The significant rise of inflammatory cytokines and delayed upregulation of growth factors after TMA reflect the phases of wound healing. The decay of IL-8 concentrations within 24h indicates a rapid re-epithelialisation and fast restoration of the skin's integrity after TMA. In comparison to ablative lasers TMA leads to a lesser extent and shorter duration of epithelial injury and thus reduces down time and lowers the risk for side effects. The investigation shows that TMA is a valid alternative to previously studied laser treatments when aiming at fast restoration of the skin barrier.

Conclusion

The wound healing after TMA was analyzed on a molecular basis. The found cytokine modulations and release of growth factors were in accordance to the known phases of wound healing.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EZM	Extrazelluläre Matrix
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor; Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor
bNGF	β -Nerve growth factor; β -Nerven-Wachstumsfaktor
CCD	Charge-coupled device; Ladungsgekoppeltes Gerät
CCL	C-C-motif chemokine ligand; C-C-Motiv Chemokin-Ligand
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand; C-X-C Motiv Chemokin-Ligand
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor; Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay; Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren
Er:YAG-Laser	Erbium Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
FGF	Fibroblast growth factor; Fibroblasten Wachstumsfaktor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor; Granulozytärer-makrophagozytärer Kolonien-stimulierender Faktor
GROα	Growth-regulated oncogene α ; Wachstumsreguliertes Onkogen α
HGF	Hepatocyte growth factor; Hepatozyten-Wachstumsfaktor
IFN	Interferon
IL	Interleukin

IP	Interferon- γ induced protein; Interferon- γ induziertes Protein
K1	Kontrollareal nach 1h (Messzeitpunkt 1)
K24	Kontrollareal nach 24h (Messzeitpunkt 2)
KGF	Keratinocyte growth factor; Keratinozytenwachstumsfaktor
LIF	Leukemia inhibitory factor; Leukämiehemmender Faktor
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1; Monozytäres chemokinetisches Protein 1
MIP	Macrophage inflammatory protein; Makrophagozytäres inflammatorisches Protein
MMP	Matrixmetalloprotease
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor (two B subunits); Von Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor (zwei B-Untereinheiten)
PF	Platelet factor; Plättchenfaktor
PLGF-1	Placental growth factor 1; plazentarer Wachstumsfaktor 1
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; Nach Aktivierung reguliert, normal T-Zell-exprimiert und –sekretiert
SCF	Stem cell factor; Stammzelleffektor
SDF	Stromal derived growth factor; Aus dem Stroma stammender Wachstumsfaktor
T1	1h nach thermomechanischer Ablation (Messzeitpunkt 1)
T24	24h nach thermomechanischer Ablation (Messzeitpunkt 2)

TH	CD-4-T-Helferzell-Subtyp
TMA	Thermomechanische Ablation
TNF	Tumor necrosis factor; Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor; Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

IN-VIVO UNTERSUCHUNGEN ZUR MOLEKULAREN WIRKUNGSWEISE VON THERMOMECHANISCHER ABLATION AN DER HAUT

EINLEITUNG

Die Bedeutung von minimalinvasiven Behandlungen zur Verbesserung der Hautstruktur nimmt gerade vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung einer immer älter werdenden Gesellschaft stetig zu.

Eine Verbesserung des Hauterscheinungsbildes ist nicht nur bei der aktinischen Elastose der alternden Haut sondern auch bei pathologischen Hautveränderungen wie Narben, Dyschromien und Striae wünschenswert, da diese Zustände das Erscheinungsbild prägen und sich negativ auf die Psyche, die soziale Interaktion und somit auf die gesellschaftliche Einbindung eines Individuums auswirken können (1).

Mittlerweile existieren hierfür eine ganze Reihe von Behandlungsansätzen, deren Anwendungsgebiete immer weiter diversifizieren. Während die Applikation von topischen Wirkstoffen zur Verbesserung des Hauterscheinungsbildes bereits seit der Antike Tradition hat (1), ist die Nutzung minimalinvasiver physikalischer Verfahren ein relativ junger Behandlungsansatz, der erst seit der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts Einzug in den klinischen Alltag gefunden hat (2-5). Das Prinzip beruht auf der Induktion einer umschriebenen epidermalen und dermalen Verletzung mit dem Ziel, durch konsekutive Wundheilungsprozesse die Kollagenneubildung anzuregen und so eine Restrukturierung der Hautoberfläche zu erreichen. Nach den physikalischen Modalitäten, mithilfe derer diese Verletzung induziert wird, lassen sie sich in thermische, mechanische sowie kombinierte, thermomechanische Systeme unterteilen. Gegenwärtig wird eine Reihe von sehr unterschiedlichen Geräten in der klinischen Praxis eingesetzt, nur wenige davon sind bislang in großen multizentrischen Studien evaluiert worden. Einige Studien zur Untersuchung der unterschiedlichen Wirksamkeit (6-9), ihrem Anwendungsspektrum (10, 11) sowie den zu erwartenden Nebenwirkungen (5, 11) liegen jedoch vor. Da sich durch viele dieser Methoden eine nur temporäre Barrierestörung der Haut erzeugen lässt, stellen sie außerdem potentielle Systeme für die transdermale Wirkstoffapplikation dar und werden diesbezüglich intensiv beforscht.

Doch insbesondere hinsichtlich der Erforschung der molekularen Mechanismen, auf denen diese Verfahren und damit auch deren Unterschiede basieren gibt es bislang nur wenige Untersuchungen. Um Anwendern sowie Patienten eine differenzierte und individualisierte wissenschaftsbasierte Auswahl der unterschiedlichen Verfahren für die minimalinvasive Behandlung zu ermöglichen und Forscher zu befähigen, die Wirkung einer transdermal eingebrachten Substanz von den Effekten der vorangegangenen Behandlung zu trennen, ist die Kenntnis dieser molekularen Wirkmechanismen jedoch essentiell.

Wundheilung und Hautstruktur

Die Verbesserung der Hautstruktur durch Wundheilungsprozesse ist ein komplexer Vorgang, an dem eine Vielzahl von Zelltypen und die von ihnen sezernierten Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen. Die wichtigsten Akteure dieser Prozesse sind Keratinozyten, in die Haut einwandernde Immunzellen sowie die Bestandteile der Extrazellulären Matrix (EZM). Zu letzterer gehören Kollagenfasern sowie Proteoglykane und Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure, die Straffheit und Belastbarkeit der Haut im Wesentlichen mitbestimmen. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die einzelnen Entitäten gegeben und ihre grundlegende Funktion in der Wundheilung erläutert werden.

Die nach einer Verletzung ablaufende Wundheilung kann in mehrere Phasen unterteilt werden.

Hämostase

Unmittelbar nach einer Verletzung erfolgt zunächst die hämostatische Blutstillung, an der die beschädigten Endothelzellen mit einer Vasokonstriktion und die plasmatische Gerinnung mit der Entstehung eines Fibrinnetzes beteiligt sind. Außerdem kommt es zur Thrombozytenaktivierung und –aggregation. Der dabei entstehende Thrombus enthält auch Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin aus der EZM und fungiert neben der Blutstillung als provisorische Matrix für einwandernde Zellen und Reservoir für Wachstumsfaktoren (12, 13).

Aktivierte Thrombozyten schütten die Wachstumsfaktoren TGF α , TGF β , PDGF, VEGF, EGF, FGF und proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 aus, letzteres wird

außerdem von Endothelzellen sezerniert (13, 14). Dies markiert bereits den Übergang in die zweite Phase, die Inflammation.

Inflammatorische Phase: Chemotaxis, Zellmigration, Zellaktivierung

TGF α und $-\beta$, IL-1, TNF α , PDGF wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, Fibroblasten und zirkulierenden Monozyten. Die neutrophilen Granulozyten binden an Integrin-Rezeptoren der Extrazellulären Matrix. Außerdem bahnen sie sich ihren Weg zum Ort der Inflammation, indem sie einen Teil der EZM durch Proteasen und die Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMP) abbauen. Der Wachstumsfaktor PDGF wirkt zusätzlich chemotaktisch auf Fibroblasten, die durch PDGF außerdem einen proliferativen Reiz erfahren. So wird bereits in der Frühphase die Synthese der Extrazellulären Matrix angeregt. Aktivierte Keratinozyten an den Wundrändern sekretieren chemokinetische Zytokine wie MCP-1, welches primär auf Monozyten und Makrophagen wirkt (12-14).

Rekrutierte Fibroblasten sezernieren IFN γ , welches die Umwandlung der Monozyten in Makrophagen induziert. Die eingewanderten Makrophagen sezernieren selbst die chemokinetisch wirksamen Proteine IL-1, PDGF und TNF α sowie IL-6, G-CSF und GM-CSF, durch die weitere Makrophagen und Fibroblasten rekrutiert und aktiviert werden. Fibroblasten schütten ebenfalls IL-6, G-CSF und GM-CSF aus. Außerdem sezernieren sie FGF und VEGF, welche angiogenetische Effekte haben (13).

Makrophagen phagozytieren eingedrungene Bakterien sowie apoptotische Zellen und Zelldebris. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF α regen die Produktion von Stickstoffoxid (NO) an, welches an der Immunregulation sowie durch Radikalbildung an der Zerstörung von eindringenden Erregern beteiligt ist.

IL-1 und TNF α stimulieren außerdem Keratinozyten, Fibroblasten und Makrophagen zur Sezernierung von MMPs, welche die beschädigte EZM spalten und die Zellmigration erleichtern (12, 13, 15).

Diese Phase beginnt bereits wenige Minuten nach der Verletzung und geht nach ca. 72h fließend in die nächste Phase über (13).

Proliferative Phase: Effekte der sezernierten Wachstumsfaktoren und Zytokine – Epithelialisierung, Angiogenese und EZM-Synthese

In der Phase der Proliferation, die wenige Tage nach der Verletzung beginnt und bis etwa zwei Wochen nach der Verletzung andauert, wird das verletzte, und durch die Inflammation von eingedrungenen Erregern gereinigte Gewebe durch neu gebildete Strukturen ersetzt. Hierzu gehören die Reepithelialisierung, die Revaskularisierung und die Neusynthese von EZM. Dieser letzte Effekt ist es, der für den hautverbessernden Effekt minimalinvasiver Verfahren primär verantwortlich ist.

Reepithelialisierung

IL-1 und TNF α induzieren die Genexpression von KGF und IL-6 in Fibroblasten, beide stimulieren benachbarten Keratinozyten zur Migration in das Wundareal sowie zur Proliferation und epidermalen Differenzierung. Die stimulierten Keratinozyten beginnen selbst mit der Produktion von IL-6 und NO und verstärken so diesen Prozess (13, 14).

Revaskularisierung

Sowohl die beteiligten inflammatorischen Zellen (Makrophagen, Thrombozyten) als auch die Gewebezellen (Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen) sezernieren den Wachstumsfaktor VEGF, der intakte Endothelzellen zur Proliferation und Bildung neuer Gefäße anregt (13, 15).

Synthese Extrazellulärer Matrix

PDGF, EGF und FGF, die unter anderem aus Plättchen und Makrophagen stammen, sind die wichtigsten Wachstumsfaktoren für Fibroblasten zur Synthese von extrazellulärer Matrix. Auf diese Stimuli hin migrieren Fibroblasten in das Wundareal, proliferieren und synthetisieren eine provisorische Matrix, die vor allem aus Kollagen Typ III, Glykosaminoglykanen und Fibronectin besteht. Verankert werden diese neuen Matrixbestandteile an Integrinen, deren Synthese durch TNF α induziert wird.

Eine wichtige Rolle spielt außerdem der Wachstumsfaktor TGF β , der ebenfalls mitogen auf Fibroblasten wirkt und auch die Differenzierung in Myofibroblasten zur Wundkontraktion unterstützt. Er stimuliert Fibroblasten außerdem zur Synthese von Kollagen Typ I, sorgt für die Herabregulation der MMP-Produktion sowie die Hochregulation von MMP-Inhibitoren. Das Konzentrationsmaximum von TGF β wird nach 7-14 Tagen erreicht. Der letzte Schritt in dieser Phase ist die Beendigung der

Fibroblastenstimulation durch IP10, welches die Rekrutierung neuer Fibroblasten durch Herabregulation von EGF verhindert und PF4, welches antiproliferativ auf die Fibroblasten wirkt (13, 14, 16).

Wundreifung und Reorganisation

Diese letzte und längste Phase, die mehrere Monate bis Jahre andauert, ist durch die Reorganisation der EZM gekennzeichnet und dient der Stabilität des entstehenden neuen Gewebes. Die initiale Matrix besteht, wie oben bereits erwähnt, vor allem aus Fibronectin, Fibrin, Vitronectin und Thrombospondin und wird in der Proliferativen Phase durch Kollagen-III-reiches Granulationsgewebe ersetzt. Die Kollagensynthese dauert noch mindestens 4-5 Wochen nach der Verletzung an. Gegen Ende dieser Phase besteht es zu 90% aus Kollagen Typ I und entspricht damit der Kollagenzusammensetzung von gesunder Haut. Allerdings sind die Kollagenfasern deutlich dünner als die unverletzter Haut und, im Gegensatz zu den netzartig verwebten Fasern in gesundem Gewebe, parallel angeordnet. Im Laufe der Zeit werden die initialen Kollagenfasern reabsorbiert und durch dickere Fasern ersetzt, die allein strukturell bereits stärker sind. Diese werden aber auch der Hautbelastung entsprechend ausgerichtet, was zusätzlich funktionell zur größeren Robustheit beiträgt. Nach 3 Monaten hat es die endgültige Festigkeit erreicht, welche etwa 80% der unversehrten Haut entspricht (13, 14).

T-Zell-Funktion in der Wundheilung

Die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems stellen keine notwendige Voraussetzung für die vorangehend beschriebenen Prozesse dar. Dennoch übernehmen verschiedene Subtypen der CD-4⁺-T-Zellen eine Rolle in der Wundheilung, indem sie die Wundheilungsreaktionen modulieren.

Während TH₁-Zellen über die Zytokine IFN γ und TNF in erster Linie die Inflammation verstärken und unterhalten, wirken die TH₂-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 stimulierend auf Fibroblasten und fördern so die Produktion der EZM (17, 18). Außerdem werden durch sie Makrophagen stimuliert, eine Unterbrechung des hierfür relevanten IL-4-Signalwegs führte im Tiermodell zu einem verzögerten Wundschluss, beeinträchtiger Bildung von Granulationsgewebe und ungeordneter Kollagenablagerung (19). TH₂-Zytokine tragen also zur Festigkeit und Strukturoptimierung der Neo-Cutis bei. TH₁₇-Zellen hingegen fördern durch die von ihnen produzierten Zytokine IL-17 und IL-22 in erster Linie die

Reepithelialisierung und Wiederherstellung der Hautbarriere (18). Außerdem werden TH₁₇-Zellen in ihrer Aktivität durch TH₁-Zytokine gehemmt (17).

Minimalinvasive Verfahren

Die ersten Systeme, die erfolgreich zur Verbesserung des Hautbildes eingesetzt wurden, waren ablative Laser, die in den 1990er Jahre erstmals beschrieben wurden (2, 3). Zeitgleich wurden auch Vorläufer der perkutanen Kollageninduktion für die kosmetische Behandlung von Narben entwickelt (4). Die nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen und relevanten Ausfallzeiten dieser Verfahren hat die Entwicklung von neuen Techniken motiviert, welche bleibender Gegenstand der Forschung ist. Hier konnten in den letzten Jahren neben der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Laserverfahren Fortschritte durch die Entwicklung neuer Systeme erzielt werden, die eine geringere Ausfallszeit der Patienten und reduzierte Nebenwirkungsraten mit sich bringen. Die Radiofrequenzablation bedient sich elektromagnetischer Wellen zur Induktion einer thermischen Verletzung. Die thermomechanische Ablation, welche Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen ist, kombiniert die thermische Komponente mit der mechanischen. Letztere wird isoliert beim Mikroneedling genutzt (20). Als Weiterentwicklung des Lasers sind die nicht-ablativen Laser zu nennen, bei denen eine Verletzung geringeren Ausmaßes induziert wird und die Epidermis weitestgehend intakt bleibt (21).

Eine weitere technische Weiterentwicklung ist die Verwendung von fraktionierten Systemen. Hierbei wirkt die genutzte physikalische Kraft nicht flächig auf das Gewebe, sondern auf mikroskopisch kleine Areale verteilt, zwischen denen die Haut unversehrt bleibt (22). Diese Unterteilung in fraktionierte und nicht-fraktionierte Behandlung ist bei allen Verfahren sinnvoll, die auch flächig angewendet werden können, wie dem Laser oder der Radiofrequenz.

Laser

Laserbasierte Behandlungen werden in der Medizin in zahlreichen Fachgebieten genutzt. Je nach medizinischer Fragestellung kommen unterschiedliche Lasersysteme zur Anwendung, die nach dem für die Erzeugung der Laserstrahlen genutzten Medium unterschieden werden. Die Medien erzeugen unterschiedliche Wellenlängen, welche den Effekt der Behandlung bestimmen. Laserstrahlen müssen von Gewebemolekülen

absorbiert werden, damit ein klinischer Effekt beobachtet werden kann, abhängig vom Absorptionsspektrum der verschiedenen Gewebemoleküle geschieht dies bei unterschiedlichen Wellenlängen. Durch die Absorption wird thermische Energie frei und das Gewebe wird zur Verdampfung gebracht.

Für Behandlungen zur Verbesserung der Hautstruktur ist insbesondere das Absorptionsspektrum von Wassermolekülen interessant, zur Behandlung von Pigmentstörungen ist das Spektrum von Melanin relevant, in der Behandlung von vaskulären Veränderungen das von Hämoglobin. Zudem wird die Tiefenpenetration der Laserstrahlen primär von der Wellenlänge bestimmt (23).

Der Er:YAG erzeugt Wellenlängen um 2940 nm, der CO₂-Laser 10600 nm und der Nd:YAG 1064 nm (7, 24). Der CO₂-Laser und Er:YAG-Laser werden zur ablativen Behandlung der Haut oder Hautveränderungen eingesetzt. Die Wellenlängen anderer Laser, wie z.B. des Nd:YAG-Lasers werden vor allem zur Zerstörung von Gefäßen, z.B. in der Behandlung von Hämangiomen oder auch Teleangiektasien eingesetzt (24).

Die komplette Zerstörung des Gewebes bei den ablativen Laserverfahren führt zu einem breiteren Indikationsspektrum und einer stärkeren Potenz bezüglich der Induktion von Regenerationsprozessen. Da dies die Effektivität der Hautverjüngung bedingt, ist der CO₂-Laser nach wie vor das verbreitetste Verfahren zur Verbesserung der Hautstruktur (25). In den letzten Jahren wird er dabei vornehmlich im fraktionierten Modus eingesetzt. Gleichzeitig sind diese Verfahren im Vergleich zu anderen Techniken aber auch mit einer längeren Ausfallzeit und einem erhöhten Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen wie der Entstehung von laserinduzierten Pigmentstörungen und Narbenbildungen assoziiert (26, 27).

Mikroneedling

Das Mikroneedling ist eine rein mechanische Form der perkutanen Kollageninduktion. Das zu behandelnde Hautareal wird dabei mit feinen Nadeln penetriert (pro cm² circa 200 Penetrationen). Die Nadeln setzen Mikroläsionen bis in die papilläre Dermis, die eine Wundheilungsreaktion mit konsekutiver Kollagenneubildung induzieren (28, 29). Während die Dicke der Nadeln zwischen 1-3 µm liegen sollte (4, 29), variiert die Länge der Nadeln je nach Hersteller und Indikation zwischen 0,2 und 2,5 mm. Hochwertige

Nadeln zeichnen sich durch ein Längen-Durchmesser-Verhältnis von 13:1 aus (30). Kurze Nadeln mit geringer Eindringtiefe sind mittlerweile auch für den Heimgebrauch erhältlich und können zur Verbesserung des Hautbildes sowie zur Einschleusung von Wirkstoffen genutzt werden, Nadellängen von 0,5-1,0 mm sind zur Behandlung von Falten geeignet, die effektive Behandlung von hypo- und hypertrophen Narben erfordert Eindringtiefen von 1,5-2,0 mm (31).

Größere Eindringtiefen ab ca. 1,5 mm oder Behandlungen in sensiblen Körperregionen wie dem Gesicht können mit starken Schmerzen assoziiert sein, weshalb hierfür die Vorbehandlung mit einem Lokalanästhetikum empfohlen wird (30, 31).

Wirkmechanismus

Die Verletzung der papillären Dermis führt zu superfiziellen Blutungen, welche einen potenten Stimulus für die Initiation von Wundheilungsprozessen darstellen (32). Da jedoch auch kurze Nadeln, die zu keinen sichtbaren Blutungen führen, klinische Effekte zeigen, konstatieren Liebl et al. (29), dass die Penetration mit den Mikronadeln zu Veränderungen im Membranpotential der Hautzellen führt und die gesamte Prozedur mit mehreren hundert Penetrationen intrazellulär in einem polarisierten elektromagnetischen Feld resultiert, das die Genexpression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf DNA-Ebene stimuliert.

Radiofrequenztherapie

Die Radiofrequenz wird seit den 1920er Jahren in der Medizin genutzt, für minimalinvasive Anwendungen in der Dermatologie ist dieses Verfahren in den USA seit 2002 zugelassen (33).

Wirkmechanismus

Monopolare und bipolare Radiofrequenz

Die elektromagnetischen Wellen mit Frequenzen zwischen 3 – 300 kHz erzeugen einen elektrischen Strom, der bei Applikation im Gewebe auf den gewebsspezifischen Widerstand trifft. Durch diese Impedanz wird der elektrische Strom in thermische Energie umgewandelt und führt zu einer thermischen Verletzung des Gewebes. Monopolare und bipolare Verfahren unterscheiden sich lediglich in der Anzahl der aktiven Elektroden.

Während bei der monopolen Radiofrequenzablation der Strom zwischen einer eingebrachten Elektrode und einer Erdungselektrode fließt, geschieht der Stromfluss bei der bipolaren Radiofrequenz zwischen zwei aktiven Elektroden (34, 35).

Unipolare Radiofrequenz

Die thermale Energie wird bei der unipolaren Radiofrequenz nicht durch die gewebsspezifische Impedanz sondern durch die Anregung von H₂O-Molekülen im Gewebe durch elektromagnetische Strahlung im Bereich von 40 MHz erzeugt (35).

Thermomechanische Ablation (TMA)

Die thermomechanische Ablation ist ein neues Verfahren, das physikalische Kräfte durch den Einsatz von thermischer und mechanischer Energie kombiniert. Dabei wird ein auf ca. 400°C aufgeheiztes Kopfstück („Tip“), das mit einem gleichmäßigen Feld von 9x9 pyramidal geformten Spitzen (je 1,25 mm Länge, Fläche der Pyramidenspitzen je 3x10⁻⁴ cm²) besetzt ist, kurzzeitig in direkten Kontakt mit der Haut gebracht. Jede Spitze erzeugt dabei eine Mikropore in der Haut.

Die technischen Grundlagen dieser Technologie wurden von Lask et al. (36) beschrieben und physikalische Berechnungen haben gezeigt, dass die Dauer der abgegebenen Energie mit der Dauer der Kontaktzeit korreliert. Ein 14 ms-Puls resultiert in einer recht hohen Energieabgabe von ~25 mJ/Pore, bei 10 ms-Pulsen werden ~15 mJ/Pore abgegeben und bei 6 ms-Pulsen erreichen ~10 mJ/Pore das Gewebe (37).

Ein weiterer einstellbarer Parameter ist die Protrusion des Tips (100 - 1000 µm), welcher den Abstand zwischen Spitze der Pyramiden zum Rand des Handstücks bezeichnet. Diese Einstellung dient vor allem dazu, die Behandlung dem Zielgewebe und den lokal unterschiedlichen Dicken des Stratum corneums anzupassen (38).

In der ersten Variante des Tips wurden Spitzen aus Edelstahl verwendet, aufgrund der besseren Haltbarkeit wurde im Verlauf auf Titan-Spitzen umgestellt. Je nach Dauer des eingestellten Kontakts werden ablativ Effekte erreicht, die klinisch denen des CO₂-Lasers sehr ähnlich sind (14 ms Einzelkontakt oder 9 ms Doppelkontakt). Durch die Einstellung einer geringeren Gesamtenergie durch Reduktion der Kontaktzeit gelingt es auch einen nicht-ablativen Effekt (9 ms Einzelkontakt) zu erzielen.

Die Energie wird über Konduktion auf die Haut übertragen und es kommt zu einer Verdampfung der oberen Hautschichten, bei der kraterförmige Läsionen von 50 - 200 µm

Tiefe entstehen (Abbildung 1). Durch die Penetration der Haut mit den Spitzen sind die entstehenden Krater frei von nekrotischem Gewebe (37, 38). Die Behandlung ist weitgehend schmerzarm, sodass nicht mit einer lokalanästhesierenden Creme vorbehandelt werden muss. Durch die konduktive Wärmeübertragung nimmt die Temperatur mit der Entfernung zum Tip schnell ab und die in den tieferen Hautschichten gelegenen Nozizeptoren werden in deutlich geringerem Maße stimuliert als beispielsweise bei ablativen Lasern oder der Radiofrequenzbehandlung (39). Auch die Wundheilung und die damit verbundene Ausfallzeit sind im Vergleich zu den fraktionierten CO₂-Lasersystemen kürzer (37). Während der Behandlung muss keine Rauchabführung vorhanden sein oder eine Schutzbrille getragen werden (40). Aufgrund dieser ersten Daten, war es unser Ziel in einer ersten Pilotstudie mehr über die pathophysiologischen Prozesse der Wundheilung nach einer TMA Behandlung zu erfahren. Da eine Induktion von Wundheilungsprozessen zu erwarten ist, sollte bereits unmittelbar nach der Behandlung ein Anstieg der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 TNF α sowie des Wachstumsfaktors PDGF zu beobachten sein.



Abbildung 1: Verdampfung der Haut durch thermomechanische Ablation (Quelle: Novoxel.com/product/tma-technology/)

Möglichkeiten der transdermalen Wirkstoffapplikation

Eine weitere spannende klinische Entwicklung ist die Einbringungen von Substanzen über die Haut. Alle fraktionierten Systeme sind potentielle Vorbehandlungen für die Einschleusung aktiver Substanzen über die Haut und sind Gegenstand diesbezüglicher Studien (40-42). Sie können durch die Schaffung von Mikroporen die lipophile Hautbarriere überwinden und so den Weg für die Penetration hydrophiler Substanzen bahnen.

Vorteil der thermomechanischen Ablation gegenüber dem Microneedling ist die Schaffung von länger bestehenden Kanälen durch die thermische Schädigung, welche jedoch im Vergleich zum Laser geringer ist (37, 40).

Kutane Mikrodialyse als Untersuchungsmethode für die Freisetzung von Entzündungsmediatoren

Die kutane Mikrodialyse ist ein etabliertes minimal-invasives Verfahren, mit welchem Moleküle im Extrazellularraum der Haut extrahiert werden können. Insbesondere in der Erforschung inflammatorischer Hauterkrankungen wie Atopischer Dermatitis, Psoriasis und chronischer induzierbarer Urtikaria sowie Hypersensitivitätsreaktionen wie Typ-I-Allergien (vgl. (43, 44)) kommt sie in den letzten Jahren zunehmend zum Einsatz. Die Besonderheit dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit, interzelluläre Mediatoren sowie Stoffwechselprodukte der Hautzellen *in-vivo* sowie deren Dynamik im zeitlichen Verlauf untersuchen zu können, während bei der alternativen Methode der Hautbiopsie die Konzentrationen *ex vivo* bestimmt werden und nur Momentaufnahmen darstellen. Weitere Vorteile sind die geringere Invasivität mit fehlender Narbenbildung sowie die direkte Auswertbarkeit der Dialyseflüssigkeit ohne Notwendigkeit der vorherigen Isolation durch Aufbereitung des Gewebeverbands aus der Biopsie (43, 45).

Bei dieser Technik werden dünne Katheter, deren Spitze aus einer Dialysemembran besteht, in die Dermis oder Subkutis eingebracht und kontinuierlich mit einer physiologischen Dialyseflüssigkeit perfundiert. Entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten diffundieren lösliche Moleküle aus dem Extrazellularraum in die Dialyseflüssigkeit, welche an der Katheterspitze aufgefangen wird. Dieses Dialysat kann nun im Labor auf die Konzentration der Moleküle untersucht werden, die für die jeweilige Forschungsfrage von Interesse sind.

Für das Einbringen der Katheter ist die vorherige Tunnelung der Haut mittels Kanülen erforderlich. Die damit verbundene Verletzung der Haut resultiert in einer Modulation von inflammatorischen Markern in der Haut (45), was bei der Interpretation der Ergebnisse von Mikrodialyse-Studien beachtet werden sollte. Zudem ist für das Einbringen der Katheter eine lokalanästhetische Vorbehandlung der Haut zu empfehlen, die einen zusätzlichen Eingriff in das System bedeuten und wiederum Verfälschung von Ergebnissen führen könnte (43). Daher sollten gleichartig vorbehandelte Kontrollen verwendet werden (45), anhand derer sich die Effekte der angewendeten Untersuchungsmethode von denen der untersuchten Behandlung unterschieden lassen.

Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation werden die molekularen Wirkmechanismen der thermomechanischen Ablation nach Anwendung an der Haut untersucht. Dieses minimalinvasive Verfahren nutzt die Kombination aus mechanischer und thermischer Energie. Die Kenntnisse über die Wundheilungsprozesse, die nach der Behandlung ablaufen, sind relevant für die weitere Anwendung des Verfahrens, gerade im Vergleich mit anderen bekannten ablativen und fraktionierten Verfahren. In dieser Arbeit werden die Konzentrationen der einzelnen Mediatoren im TMA-Areal in Relation zu den dazugehörigen Kontrollen untersucht, und der zeitliche Verlauf unmittelbar nach der TMA sowie 24h nach TMA verglichen.

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit untersucht werden: Führt die Anwendung der thermomechanischen Ablation an der Haut zu einer, wie in der Literatur beschriebenen Wundheilungsreaktion? In welchem Ausmaß kann diese beobachtet werden und wie ist deren zeitlicher Verlauf?

Hierzu wurden im Einzelnen die Veränderungen folgender Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in der Wundheilung eine Rolle spielen, betrachtet:

Zytokine

Inflammatorische Zytokine

Der primäre Fokus lag auf der Analyse verschiedener Zytokine. Ein Anstieg der inflammatorischen Zytokine ist bereits unmittelbar nach der Behandlung zu erwarten. Gemäß dem beschriebenen Ablauf der Wundheilung werden in dieser Gruppe die stärksten Veränderungen nach Anwendung der TMA erwartet. Insbesondere die Dynamik von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α sind hierbei von Interesse und wurden von uns untersucht.

Zytokine im adaptiven Immunsystem

Weitere von uns untersuchte Zytokine wirken vor allem auf das adaptive Immunsystem, indem sie die Differenzierung der T-Zellen beeinflussen. Hier sind IL-2, IL-15 und IL-9 wichtige Zytokine. T-Zellen sind für den geordneten Ablauf der Wundheilung nicht unbedingt erforderlich, spielen gleichwohl aber eine modulierende Rolle.

Chemokine

Auch die chemokinetisch wirksamen Zytokine spielen eine tragende Rolle in der inflammatorischen Phase. Daher werden die Veränderungen dieser Substanzen 24h nach TMA untersucht. In dieser Gruppe sind vor allem MCP-1 und PDGF von Interesse. Letzteres übernimmt in der Wundheilung pleiotrope Funktionen und wirkt nicht nur als Chemokin, sondern ist auch ein Wachstumsfaktor.

Wachstumsfaktoren

Diese spielen insbesondere im weiteren Verlauf der Wundheilung eine große Rolle. In dieser Arbeit haben wir uns auf die frühe Freisetzung der Wachstumsfaktoren fokussiert. Während die primäre Aufgabe der Wachstumsfaktoren erst in späteren Phasen der Wundheilung zum Tragen kommt, wirken die Zytokine und Chemokine der inflammatorischen Phase bereits früh auf die Expression von Wachstumsfaktoren. In der Literatur ist beschrieben, dass neben PDGF eine verstärkte Expression insbesondere von VEGF-A und FGF-2 bereits sehr früh in der Wundheilungsreaktion beobachtet werden kann.

MATERIAL UND METHODEN

Thermomechanische Ablation

Die thermomechanische Ablation (Tixel®; Novoxel Ltd., Netanya, Israel) ist ein neues fraktioniertes System zur mikroinvasiven Therapie der Haut, welches thermische und mechanische Energie nutzt. Das Gerät (Abbildung 2) besteht aus einem Handstück mit Aktivierungstaste, das mit einem Monitor verbunden ist. Auf dem Monitor können die Einstellungen des gewünschten Behandlungsmodus vorgenommen werden. Möglich sind Einzelpulse oder Doppelpulse mit einer Kontaktdauer zwischen 5 und 18 ms, die Pulsfrequenz beträgt 1 Hz. Das Handstück ist mit einem erhitzbaren Kopfstück ausgestattet, welches im Ruhemodus in das Handstück eingefahren ist (Home-Position). Die aktive Funktionsoberfläche des Kopfstücks enthält 81 pyramidal-geformte Spitzen, die auf einer Fläche von 1x1 cm gleichmäßig in 9 Reihen verteilt sind. Jede Pyramide ist 1,25 mm hoch und besitzt einen Spitzen-Radius von 100 µm, sodass die gesamte Hautkontaktfläche jeder Pyramide $3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ beträgt. Das Kopfstück besteht aus Titanium und befindet sich in direktem Kontakt mit einer keramischen Wärmeeinheit, die eine Erhitzung des Kopfstücks auf 400°C und die Konstanthaltung dieser Temperatur während der Behandlung gewährleistet (Abbildung 3). Die Sterilisation des Kopfstücks wird durch eine dreiminütige Erhitzung der Spitze auf 350-400°C vor Einsatzbereitschaft des Gerätes erreicht, die Reinigung des Gerätes findet nach der Behandlung bei 540°C für 5 min statt.



Abbildung 2: Tixel®, Novoxel Ltd., Netanya, Israel (Quelle: Novoxel.com)

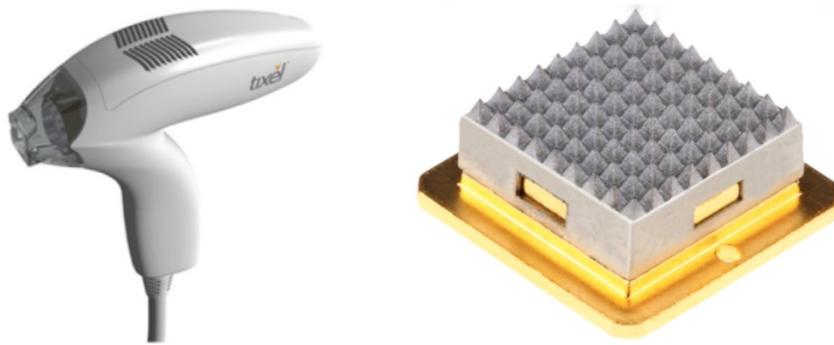


Abbildung 3: Handstück des Tixel® und sein metallischer Tip (Quelle: Novoxel.com)

Zur Behandlung wird das Handstück flach auf das zu behandelnde Areal aufgesetzt. Durch Auslösung der Aktivierungstaste fährt das erhitzte Kopfstück durch einen linearen Beschleunigungsmotor rasch nach vorne und kommt für die voreingestellte Zeit in direkten Kontakt mit der Haut (Abbildung 4). Die thermische Energie, die dabei an die Haut abgegeben wird, führt zur Evaporation des im Gewebe enthaltenen Wassers und resultiert in der Entstehung von Kratern im Mikrometer-Bereich. Während der Behandlung werden Geschwindigkeit, Protrusion und Temperatur des Kopfstücks konstant und mit hoher Präzision überwacht.

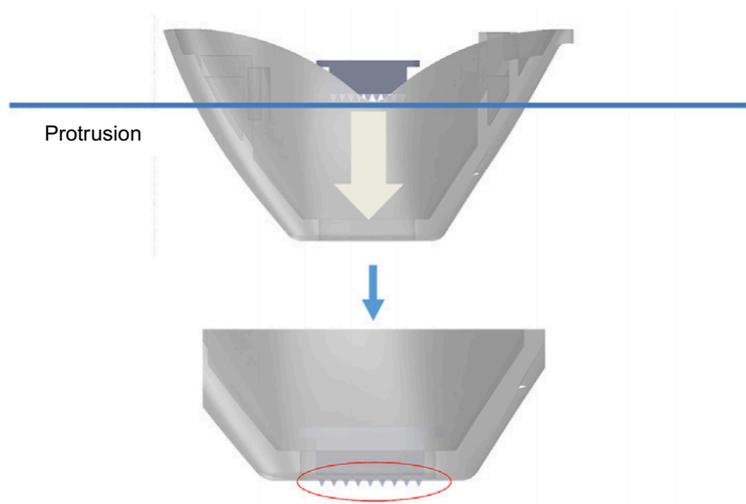


Abbildung 4: Protrusion des Tips nach Aktivierung (Quelle: Novoxel.com)

Studiendesign

Die Pilotstudie wurde initiiert, um die Wundheilung *in vivo* nach thermomechanischer Ablation zu untersuchen.

Folgende Ein –und Ausschlusskriterien waren in der Studie vorgesehen:

Entscheidungsfähige Probanden jeglichen Hauttyps und jeglichen Geschlechts mit einem Mindestalter von 18 Jahren waren zur Teilnahme an der Studie zugelassen. Ausschlusskriterien waren ein schlechter Allgemeinzustand, bekannte Hauterkrankungen, Schwangerschaft und Stillen.

Die Studie wurde am 01.06.2017 von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (Antragsnummer EA1/081/17).

Insgesamt wurden im Zeitraum von August bis November 2018 sechs gesunde Probanden (drei Männer, drei Frauen, Alter 21-53, Mittelwert 38 Jahre) in die Studie eingeschlossen. Die Festlegung der Fallzahl erfolgte unter Einbezug medizinethischer Überlegungen in Absprache mit der Ethikkommission. Nach der Mikrodialyse ist keine Narbenbildung zu erwarten, gleichwohl kann die, durch die Einlage der Mikrodialysekatheter entstandene Verletzung, für einige Wochen sichtbar bleiben und so eine kosmetische Beeinträchtigung bedingen. Zudem kann trotz der lokalanästhetischen Vorbehandlung keine vollständige Schmerzlosigkeit garantiert werden (39). Daher wurde die geringstmögliche Probandenzahl gewählt, bei der, unter Berücksichtigung der methodenbedingten Ausfallwahrscheinlichkeiten, statistisch aussagekräftige Ergebnisse erwartet werden können.

Vor Beginn der Experimente wurde nach einer gründlichen mündlichen und schriftlichen Aufklärung über die geplante Behandlung und die Gewinnung der Proben eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

Behandlungssetting

Vor der Behandlung wurden sowohl das Behandlungsareal am proximalen volaren Unterarm als auch das distal davon gelegene Kontrollareal durch den Studienleiter markiert und als Vorbereitung für die Mikrodialyse für 40-60 min mit einer lidocainhaltigen Creme (Emla®) lokal anästhesiert. An allen Studienteilnehmern wurde die thermomechanische Ablation auf beiden volaren Unterarmen auf einer Fläche von 40 x 40 mm und mit einem 16 ms Doppelpuls bei 800 µm Protrusion durchgeführt.

Mikrodialyse

Die Gewinnung der Gewebeflüssigkeit erfolgte durch kutane Mikrodialyse an zwei Zeitpunkten: 1h sowie 24h post-TMA. Die Mikrodialyse 1h post-TMA wurde am linken Arm durchgeführt. Für den zweiten Untersuchungszeitpunkt 24h post-TMA wurden das behandelte Areal sowie das Kontrollareal am rechten Arm für die Mikrodialyse herangezogen. Somit wurde zu beiden Zeitpunkten unversehrte Haut für die Mikrodialyse genutzt. Mikrodialysekatheter mit einer Porengröße von 3000 kDA wurden von EP Medical ApS (Kopenhagen, Dänemark) erworben, die Konnektoren zum Verbinden der Spritzenampullen mit den Mikrodialysekathetern stammten von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland).

Pro Areal wurden drei 21 G-Kanülen über die Länge von 2 cm intrakutan von medial nach lateral eingebracht. Zwischen den Kanülen sowie zum Rand des markierten Areals wurde ein Abstand von je 1 cm eingehalten.

Durch die Kanülenöffnung wurden das Membranstück des Dialysekatheters mithilfe des eingelegten Führungsdrahts von lateral nach medial eingeführt. Anschließend wurde die Kanüle entfernt, sodass die Dialysemembran des Katheters intrakutan zu liegen kam.

Mit einer speziellen Hochpräzisions-Mikrodialysepumpe wurde die Dialyseflüssigkeit mit einer Laufrate von 0,8 µl/min durch die Katheter gepumpt, nach einer Priming-Phase von 1h wurde das Dialysat über 2h in Parafilm®-überzogenen PCR-Behältern aufgefangen (Abbildung 5).

Nach Herstellerangaben und Vorerfahrungen sind bis zu 20% der Katheter nicht funktionsfähig, hierbei können Defekte der Durchlässigkeit des Katheters oder der Dialysemembran ursächlich sein. Zur Erkennung einer Malfunktion wurden die PCR-Behälter vor und nach der Mikrodialyse gewogen, außerdem wurden die Analyseergebnisse betrachtet.

Die Proben wurden unmittelbar nach der Dialyse bei -80°C aufbewahrt und die Katheter wurden wieder entfernt.

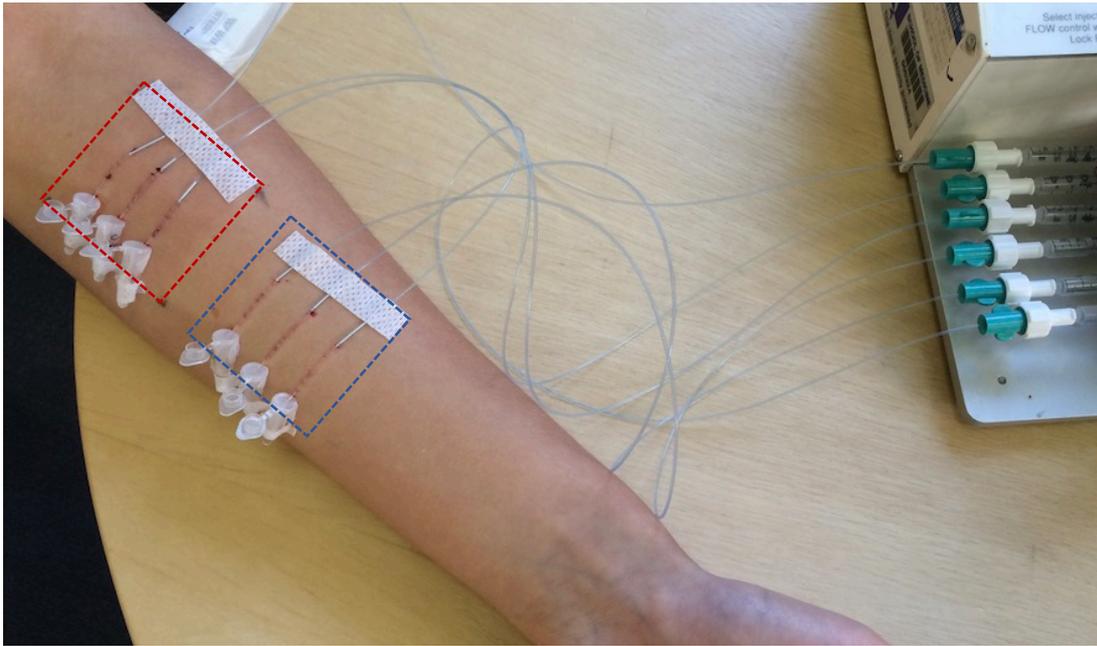


Abbildung 5: Versuchsaufbau Mikrodialyse

- *behandeltes Areal*
- *Kontrollareal*

Laboranalyse

Die Analyse der, via kutaner Mikrodialyse extrahierten Gewebeflüssigkeit wurde mithilfe der Luminex®xMAP® Technologie durchgeführt. Hierzu wurde das 45-plex ProcartaPlex™ Multiplex-Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) genutzt, mit dem folgende Zytokine und Wachstumsfaktoren detektiert wurden: BDNF, Eotaxin (auch CCL11), EGF, FGF-2, GM-CSF, GRO α (auch CXCL1), HGF, bNGF, LIF, IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-1 α , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8/CXCL8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17a, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IP-10 (auch CXCL10), MCP-1 (auch CCL2), MIP-1 α (auch CCL3), MIP-1 β (auch CCL4), RANTES (auch CCL5), SDF-1 α (auch CXCL12), TNF α , TNF β , PDGF-BB, PLGF-1, SCF, VEGF-A und VEGF-D.

Bei dieser Methode werden die Proben zusammen mit farbkodierten magnetischen Beads inkubiert, die mit antigen-spezifischen Antikörper besetzt sind (Abb. 6A). In mehreren Waschschrinen wird der Überstand entfernt bevor ein Mix von Detektionsantikörpern zugegeben wird, die ebenfalls den jeweiligen Analyten binden, ähnlich einem Sandwich-ELISA. Im nächsten Schritt werden diese Detektionsantikörper

mit einem Farbstoff (in unserem Fall Streptavidin, R-Phycoerythrin, SAPE) markiert, der als Reportermolekül fungiert (Abb. 6B).

Um das vorhandene Volumen optimal ausnutzen zu können wurde nach einem 384-well-Platten-Protokoll gearbeitet, bei dem nur $\frac{1}{4}$ des regulär genutzten Volumens benötigt wird, sodass eine Doppelbestimmung der einzelnen Proben möglich ist. Dieses Protokoll unterschied sich vom Herstellerprotokoll durch zusätzliche Inkubations- und Vermischungsschritte, die aufgrund des kleinen Volumens eingeführt wurden.

Die vorbereiteten Proben wurden mithilfe des Luminex MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA) ausgelesen. Dieser nutzt sowohl die Farbstoffzytometrie, bei der ein Laser die Farbkodierung der magnetischen Beads und ein zweiter die farbstoffmarkierten Antikörper detektiert (Abb. 6C), als auch Charge-coupled-device (CCD) Bildgebung, die die Beads in einem Monolayer mithilfe von zwei LEDs quantifiziert (Abb. 6D). So wird die Menge der in den Proben enthaltenen Analyte ermittelt.

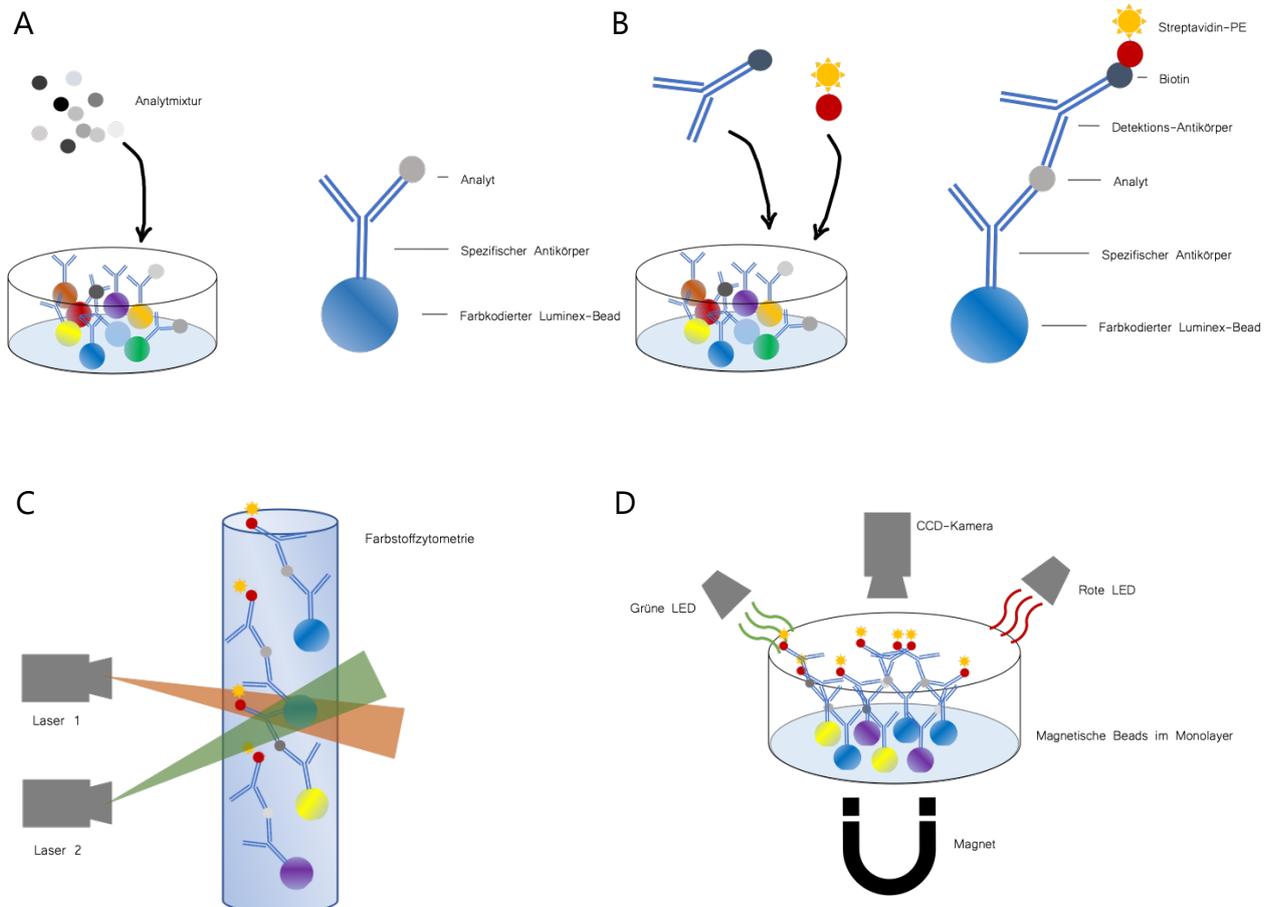


Abbildung 6: Luminex®xMAP® - Technologie

6A: Zugabe der Probe zu magnetischen, farbkodierten Luminex®-Beads, die mit antigenspezifischen Antikörpern beschichtet sind (exemplarisch nur je ein Antikörper dargestellt). Jede Antikörperbeschichtung ist mit einer anderen Farbe kodiert, sodass jeder bestimmte Analyt eine eigene Farbe besetzt.

6B: Zugabe von Detektionsantikörper, der mit seinem Fab-Abschnitt ebenfalls den Analyten bindet, am Fc-Abschnitt wird das ebenfalls zugegebene Reporter-molekül (hier: Streptavidin, R-Phycoerythrin, SAPE) gebunden.

6C: Farbstoffzytometrische Quantifizierung der Analyte mittels zweier Laser. Laser 1 klassifiziert die Beads anhand ihrer Farbe, Laser 2 misst die Stärke des generierten Farbstoffsignals, welches proportional zur Anzahl der gebundenen Analyte pro Bead ist.

6D: Beleuchtung der Beads mittels zweier Leuchtdioden (LED) im magnetisch erzeugten Monolayer. Eine LED dient zur Identifizierung des gebundenen Analyts, die zweite LED lässt die Messung der Stärke des generierten Farbstoffsignals zu. Die Messung erfolgt mittels Charged-coupled-device (CCD)-Kamera.

Datenanalyse

Alle Daten wurden mithilfe von Microsoft Excel 16.18 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) und IBM SPSS® 25.0 (IBM Corp. Armonk, New York, USA) ausgewertet. Verglichen wurden die zu einem Zeitpunkt gehörigen Werte der behandelten Areale gegen die Kontrollareale desselben Zeitpunkts. Aufgrund der geringen Datenmenge wurde der Median für den Vergleich herangezogen, welcher durch Ausreißer nicht verzerrt wird und somit eine bessere Repräsentation der Daten darstellt als der Mittelwert.

Von der Datenanalyse exkludiert wurden die Daten der Proben, bei denen intraexperimentell eine Malfunktion der Mikrodialysekatheter auffiel. Dies war bei insgesamt 9 Kathetern der Fall. Entsprechend gilt $n=32$ für das behandelte Areal 1h nach TMA, $n=30$ für das Kontrollareal nach 1h, $n=34$ für das behandelte Areal 24h nach TMA und $n=30$ für das Kontrollareal nach 24h.

Da bei Proband A nach 24h eine starke Hochregulation von proinflammatorischen Parametern sowohl im behandelten Areal als auch im Kontrollareal zeigte und im Vergleich zu Probanden B-F deutliche Abweichungen zu beobachten waren, wurden diese Daten gesondert betrachtet. Dies betrifft die Analyte IL-1 β , IL-6, LIF, IL-8, IL-10, IL-31, TNF α , MIP-1 β , MIP-1 α , GRO α , PDGF-BB und IL-17a.

Für diese Analyte gilt $n=26$ für das behandelte Areal 1h nach TMA, $n=26$ für das Kontrollareal nach 1h, $n=28$ für das behandelte Areal 24h nach TMA und $n=24$ für das Kontrollareal nach 24h.

Zur Deskription der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde die prozentuale Veränderung des Medians des behandelten Areals in Relation zum Median des unbehandelten Kontrollareals herangezogen.

Die Unterschiede wurden statistisch getestet, hierfür wurde der Wilcoxon-Test herangezogen, welcher die Verteilung der Daten in den einzelnen Gruppen vergleicht.

Entsprechend der Hypothese, eine Wundheilungsreaktion zu induzieren, wurden IL-1, IL-6, TNF α und PDGF mit einer einseitigen Signifikanz beschrieben. Alle anderen Werte wurden als explorative Untersuchungen durchgeführt und die zweiseitige Signifikanz betrachtet.

Entsprechend der üblichen Konventionen wurden p -Werte < 0.05 als statistisch signifikant gewertet. Aufgrund des explorativen Charakters der Untersuchung sollten die

p-Werte nicht confirmatorisch sondern rein explorativ als Maß für die Effektstärke interpretiert werden.

Da der Wilcoxon-Test nur Datenpaare testen kann, werden hierbei für die fehlenden Daten aufgrund der malfunktionalen Katheter auch die dazugehörigen Datenpaare entfernt. Dies muss bei der Interpretation der Effektstärke berücksichtigt werden.

ERGEBNISSE

Zum Zeitpunkt der TMA waren beide Unterarme der Probanden frei von makroskopischen Wunden, Rötungen oder Narben.

7 der gesamthaft 36 Katheter wiesen eine Malfunktion auf, in sechs Fällen war der Katheters nicht durchlässig und es konnte keine Dialysatflüssigkeit gesammelt werden, in einem Fall wies die Dialysemembran einen Defekt auf und es konnte kein einziger Analyt nachgewiesen werden. 2 der Katheter konnten aufgrund eines Verlusts des Führungsdrahts nicht eingelegt werden.

Die Durchführung der Laboranalyse sowie die Auswertung der Laborergebnisse gingen ohne Schwierigkeiten vonstatten.

Zytokinmodulationen direkt nach TMA

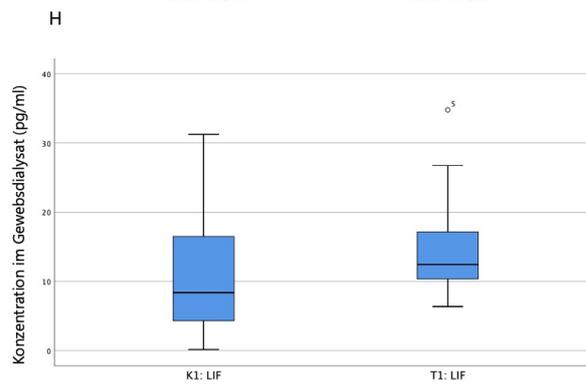
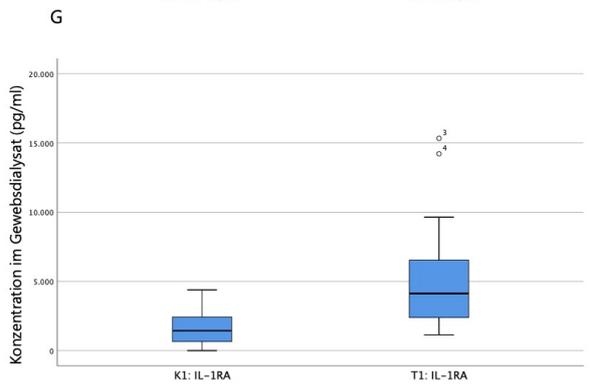
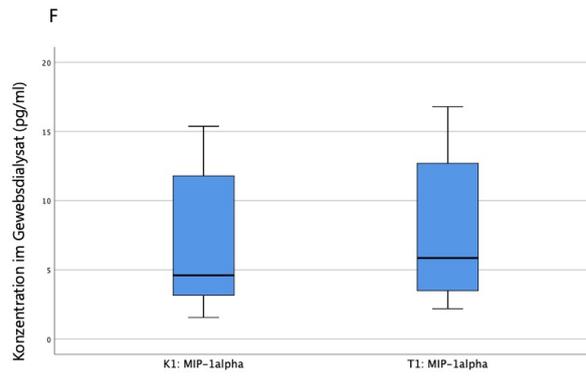
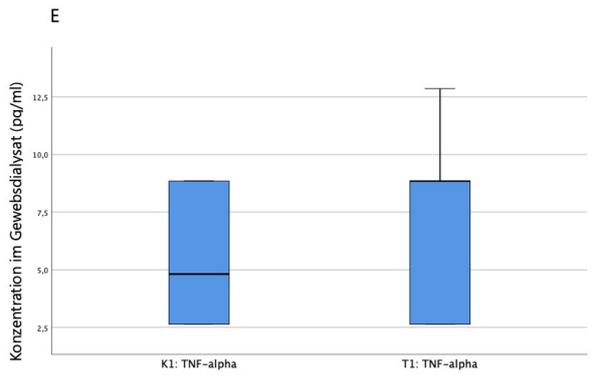
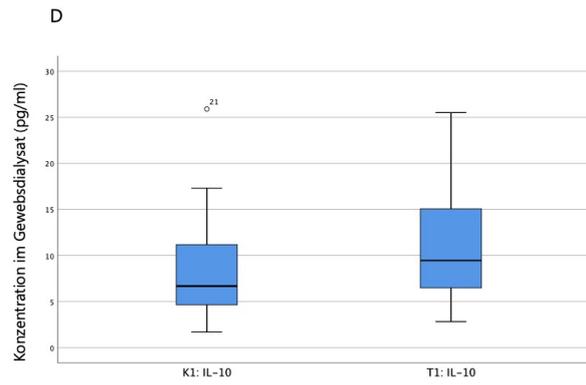
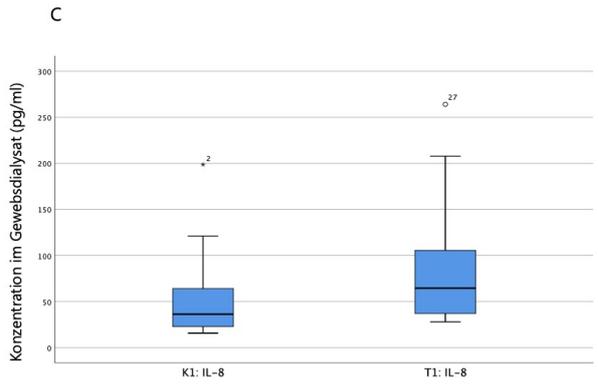
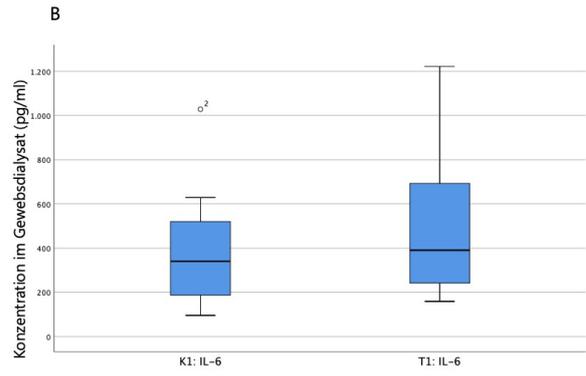
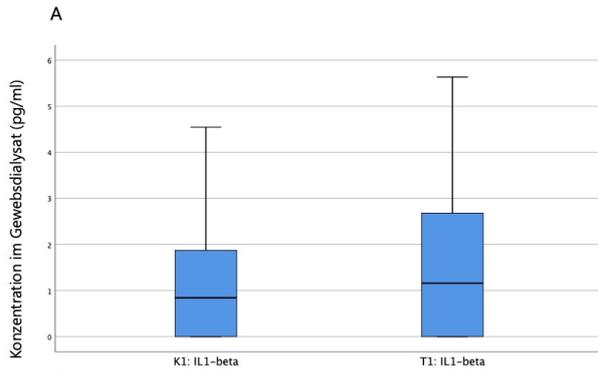
1h nach der TMA konnte bei der Mehrzahl der analysierten inflammatorischen Zytokine eine Hochregulation beobachtet werden.

Die klassischen inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α und MIP-1 α stiegen im behandelten Areal bereits unmittelbar nach der Behandlung deutlich an (Abbildung 7).

IL-1 β (Abbildung 7A) lag um 37,7% signifikant höher als die Kontrolle (K1: 0,84 pg/ml; T1: 1,16 pg/ml; $p < 0.05$), IL-6 (Abbildung 7B) war ebenfalls signifikant um 14,8% erhöht (K1: 340,29 pg/ml; T1: 390,71 pg/ml; $p < 0.05$), IL-8 signifikant um 77,7% (K1: 36,28 pg/ml; T1: 64,48 pg/ml; $p < 0.01$) (Abbildung 7C). IL-10 war um 41,6% erhöht, zeigte aber keine Signifikanz (K1: 6,68 pg/ml; T1: 9,46 pg/ml; $p = 0.45$) (Abbildung 7D). TNF α war wiederum signifikant um 83,9% (K1: 4,81 pg/ml; T1: 8,85 pg/ml; $p < 0.05$) (Abbildung 7E) und MIP-1 α um 27,0% (K1: 4,60 pg/ml; T1: 5,85 pg/ml; $p = 0.15$) (Abbildung 7F) erhöht. Das zu IL-1 α und IL-1 β antagonistisch wirkenden Molekül IL-1RA, das ebenfalls in der frühen Phase der Inflammation freigesetzt wird, zeigte einen starken und signifikanten Anstieg (187,7%; K1: 1431,73 pg/ml; T1: 4119,61 pg/ml; $p < 0.01$) im Vergleich zur Kontrollmessung (Abbildung 7G). LIF (Leukemia inhibitory factor; Leukämiehemmender Faktor), ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin der IL-6-Familie stieg signifikant um 48,6% an (K1: 8,36 pg/ml; T1: 12,42 pg/ml; $p < 0.05$) (Abbildung 7H).

Herunterreguliert waren hingegen das mit IL-1 β synergistisch wirkende IL-1 α , welches signifikant um 20,5% herunterreguliert war (K1: 1,16 pg/ml; T1: 0,92 pg/ml; p < 0.05) (Abbildung 7J).

Auch IL-17a und IL-18, welche ebenfalls proinflammatorisch wirken, waren beide unmittelbar nach der Behandlung im behandelten Areal vermindert (IL-17a: -56,7%; K1: 4,09 pg/ml; T1: 1,77 pg/ml; p = 0.49, IL-18: -23,3%; K1: 16,86 pg/ml; T1: 12,93 pg/ml; p = 0.36) (Abbildung 7 K, L).



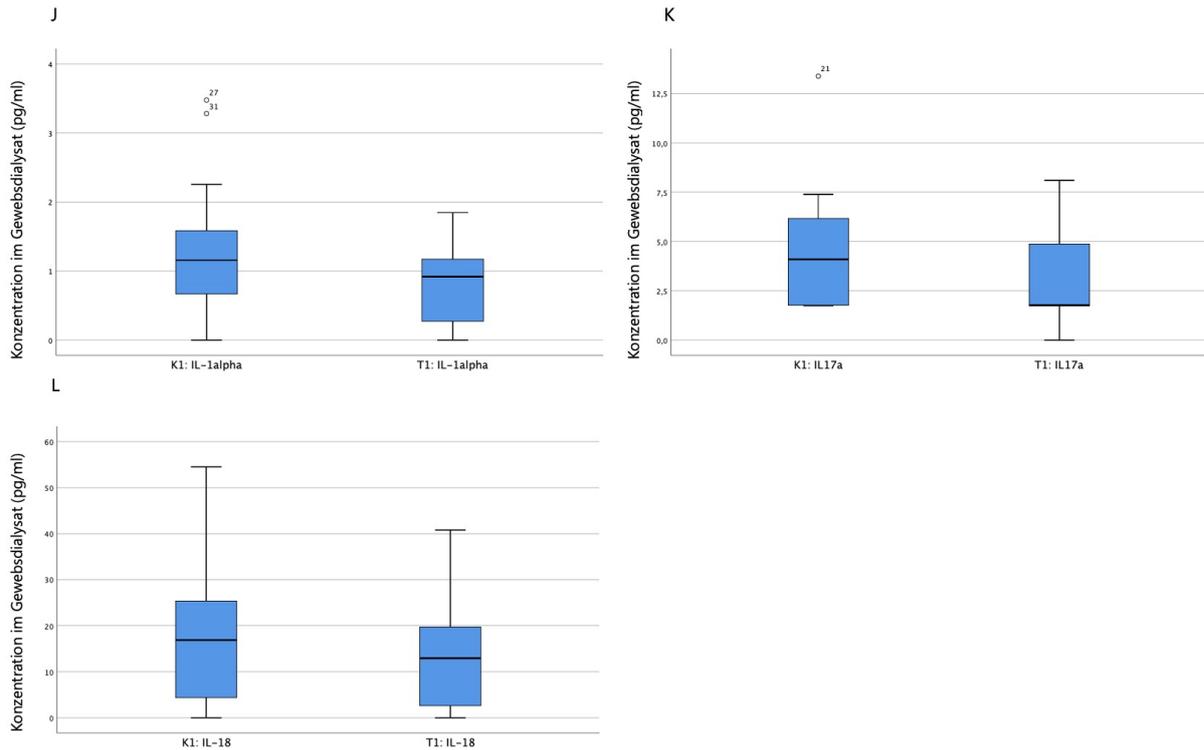


Abbildung 7: Inflammatorische Zytokine im Gewebedialysat 1h post-TMA in Relation zur Kontrolle

Doppelbestimmte Werte präsentiert als Boxplot-Whisker-Diagramm:

□ 25-75% (Q1-Q3)

— Median

T 1,5x Interquartilsabstand

° Ausreißer >1,5x Interquartilsabstand

* Ausreißer >3x Interquartilsabstand

K1: Kontrollareal 1h post-TMA (n=26 für A, B, C, D, E, F, H, K; n=30 für G, J, L)

T1: TMA-Areal nach 1h (n=26 für A, B, C, D, E, F, H, K; n=32 für G, J, L)

7A: IL-1beta= Interleukin-1β (pg/ml); 7B: IL-6=Interleukin-6 (pg/ml); 7C: IL-8 = Interleukin-8 (pg/ml); 7D: IL-10 = Interleukin-10 (pg/ml); 7E: TNFα = Tumornekrosefaktor α (pg/ml); 7F: MIP-1 α = Macrophage inflammatory protein-1 α ; Makrophagozytäres inflammatorisches Protein-1 α (pg/ml); 7G: IL-1RA = = Interleukin-1 Rezeptorantagonist (pg/ml); 7H: LIF = Leukemia inhibitory factor; Leukämiehemmender Faktor (pg/ml); 7J: IL-1alpha = Interleukin-1α (pg/ml); 7K: IL-17a = Interleukin-17a (pg/ml); 7L: IL-18 = Interleukin-18 (pg/ml)

Zytokinmodulationen 24h nach TMA

Nach 24h (T24) zeigte sich eine unterschiedliche Entwicklung im Reaktionsmuster der einzelnen Zytokinprofile.

Die Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF α zeigten nach 24h bereits einen deutlichen Rückgang. Während IL-8 (16,5%; $p = 0.74$) nur noch gering und nicht mehr signifikant erhöht war und TNF α (0,0%, $p = 0.23$) wieder auf dem Niveau des Kontrollwerts lag (Abbildung 8A, B), zeigte IL-6 sogar erniedrigte Werte (-14,0%; $p = 0.14$) im Vergleich zum Kontrollwert (Abbildung 8C).

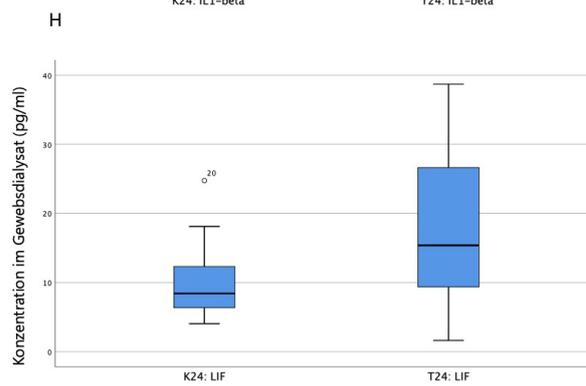
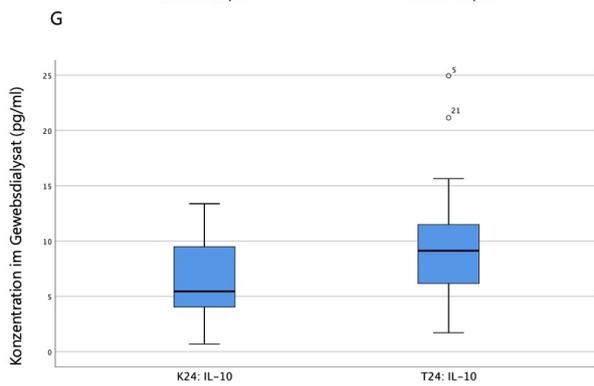
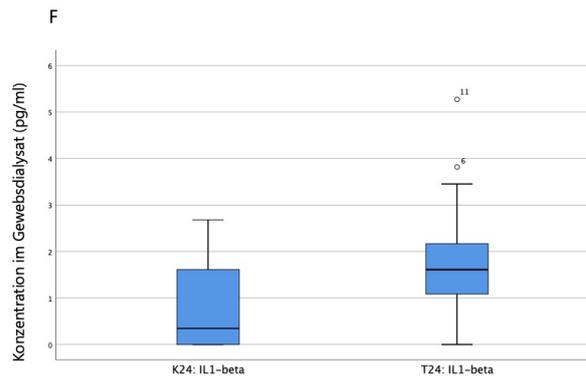
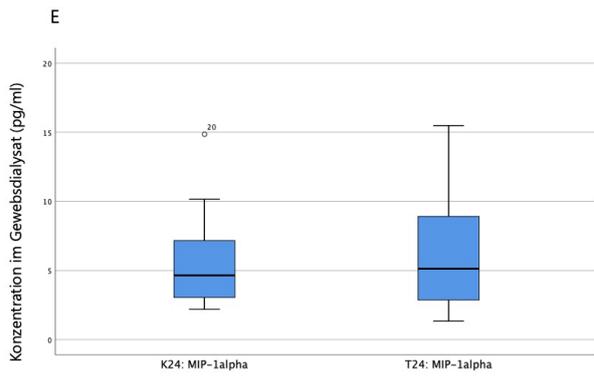
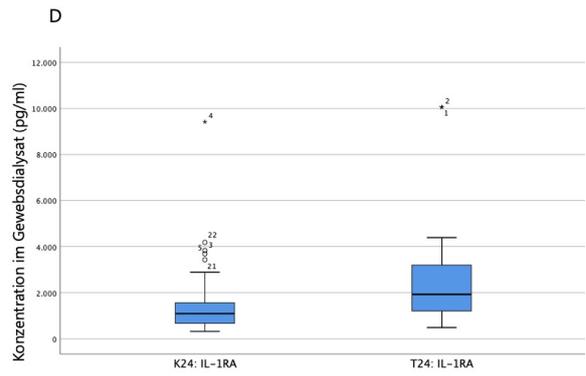
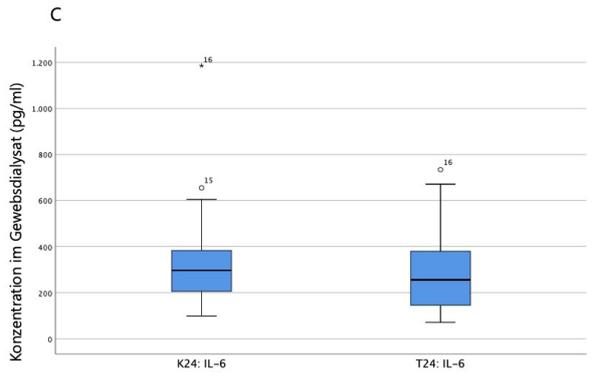
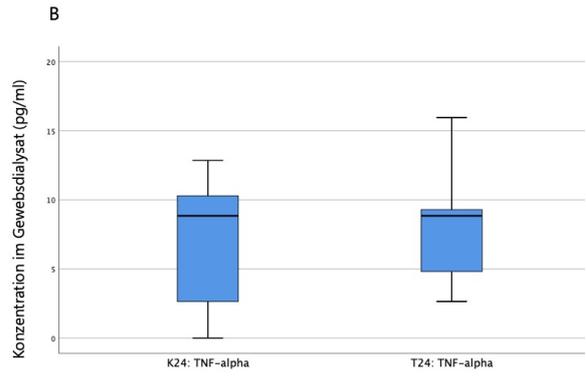
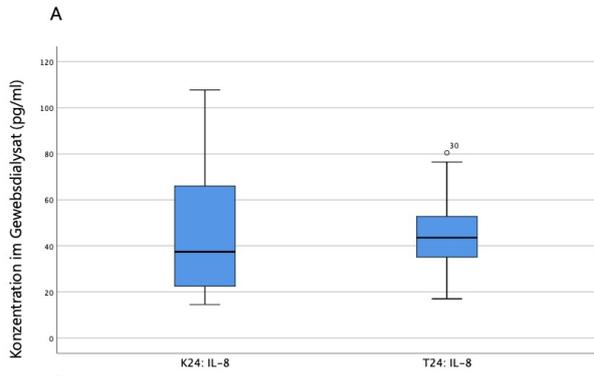
IL-1RA war nach 24h ebenfalls gesunken, in Relation zur Kontrolle aber immer noch signifikant um 76,9% erhöht (K24: 1089,95 pg/ml; T24: 1928,08 pg/ml; $p < 0.05$) (Abbildung 8D). Ebenso war MIP-1 α (10,4%; K24: 4,64 pg/ml; T24: 5,12 pg/ml; $p = 0.21$) (Abbildung 8E) nach 24h noch in erhöhten Konzentrationen nachweisbar, im Vergleich zur Konzentration unmittelbar post-TMA jedoch leicht verringert.

Die Konzentrationen von IL-1 β , IL-10 und LIF hingegen stiegen im Verlauf weiter an und waren gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. IL-1 β war nach 24h um 366,0% (K24: 0,35 pg/ml; T24: 1,61 pg/ml; $p < 0.05$) (Abbildung 8F), IL-10 um 67,5% (K24: 5,45 pg/ml; T24: 9,12 pg/ml; $p < 0.01$) (Abbildung 8G) und LIF um 82,8% (K24: 8,4 pg/ml; T24: 15,36 pg/ml; $p < 0.01$) (Abbildung 8H) im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert.

Das im Vergleich zur Kontrolle initial stark verminderte IL-1 α war nach 24h noch stärker, herabreguliert als direkt nach TMA. Gegenüber dem Kontrollareal zeigte es eine Verminderung um 27,0% (K24: 1,39 pg/ml; T24: 1,01 pg/ml; $p = 0.09$) (Abbildung 8J).

Die zuvor herunterregulierten proinflammatorischen Zytokine IL-17a und IL-18 zeigten nach 24h einen Anstieg um 131,1% bzw. 68,1% und ihre Konzentrationen lagen nun 15,9% (IL-17a: K24: 3,53 pg/ml; T24: 4,09 pg/ml; $p = 0.06$) bzw. 57,3% (IL-18: K24: 13,81 pg/ml; T24: 21,73 pg/ml; $p = 0.22$) über denen des Kontrollareals (Abbildung 8K, L).

Abbildung 9 zeigt die Veränderungen der proinflammatorischen Zytokine als Reaktion auf die TMA zu beiden Zeitpunkten in Prozent in Bezug auf das jeweilig zugehörige Kontrollareal am distalen Unterarm.



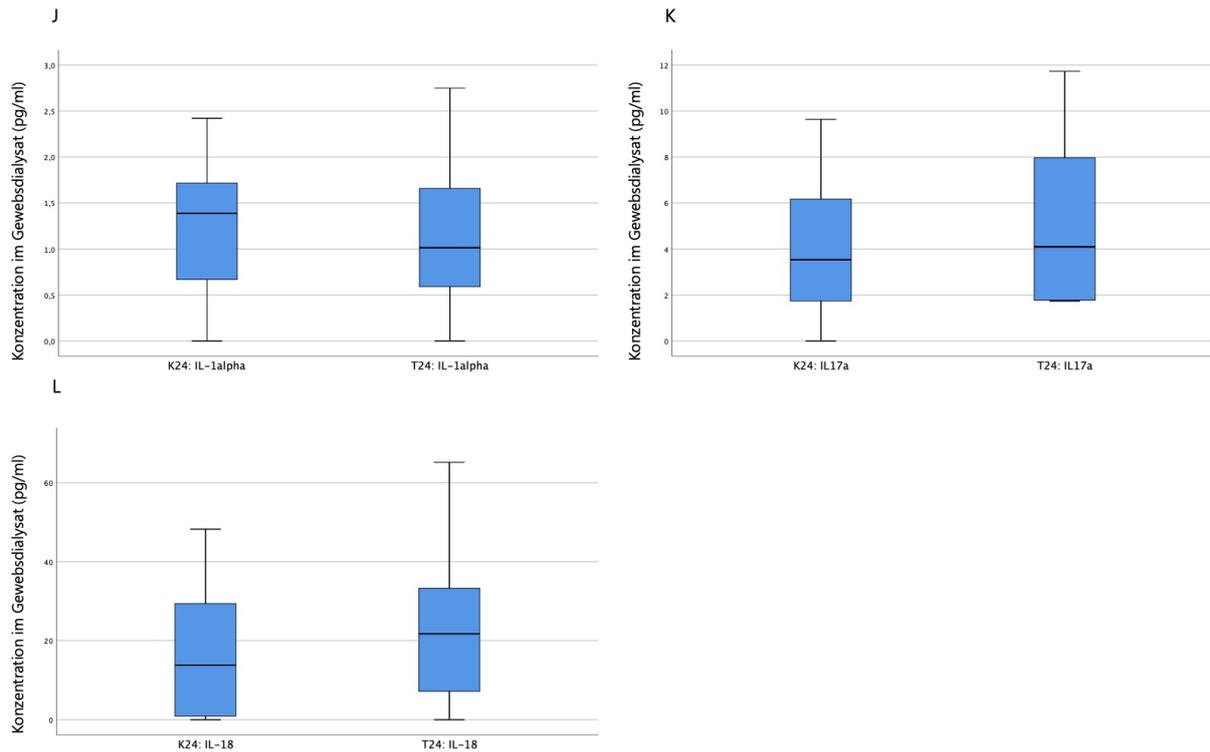


Abbildung 8: Inflammatorische Zytokine im Gewebedialysat 24h post-TMA in Relation zur Kontrolle

Doppelbestimmte Werte präsentiert als Boxplot-Whisker-Diagramm:

□ 25-75% (Q1-Q3)

— Median

T 1,5x Interquartilsabstand

° Ausreißer >1,5x Interquartilsabstand;

* Ausreißer >3x Interquartilsabstand

K24: Kontrollareal 24h post-TMA (n=24 für A, B, C, E, F, G, H, K; n=30 für D, J, L)

T24: TMA-Areal nach 24h (n=28 für A, B, C, E, F, G, H, K; n=34 für D, J, L)

8A: IL-8 = Interleukin-8 (pg/ml); 8B: TNF α = Tumornekrosefaktor α (pg/ml); 8C: IL-6 = Interleukin 6 (pg/ml); 8D: IL-1RA = Interleukin-1 Rezeptorantagonist (pg/ml); 8E: MIP-1 α = Macrophage inflammatory protein-1 α ; Makrophagozytäres inflammatorisches Protein-1 α (pg/ml); 8F: IL-1beta = Interleukin-1 β (pg/ml); 8G: IL-10 = Interleukin-10 (pg/ml); 8H: LIF = Leukämieinhibierender Faktor (pg/ml); 8J: IL-1alpha = Interleukin-1 α (pg/ml); 8K: IL-17a = Interleukin-17a (pg/ml); 8L: IL-18 = Interleukin-18 (pg/ml)

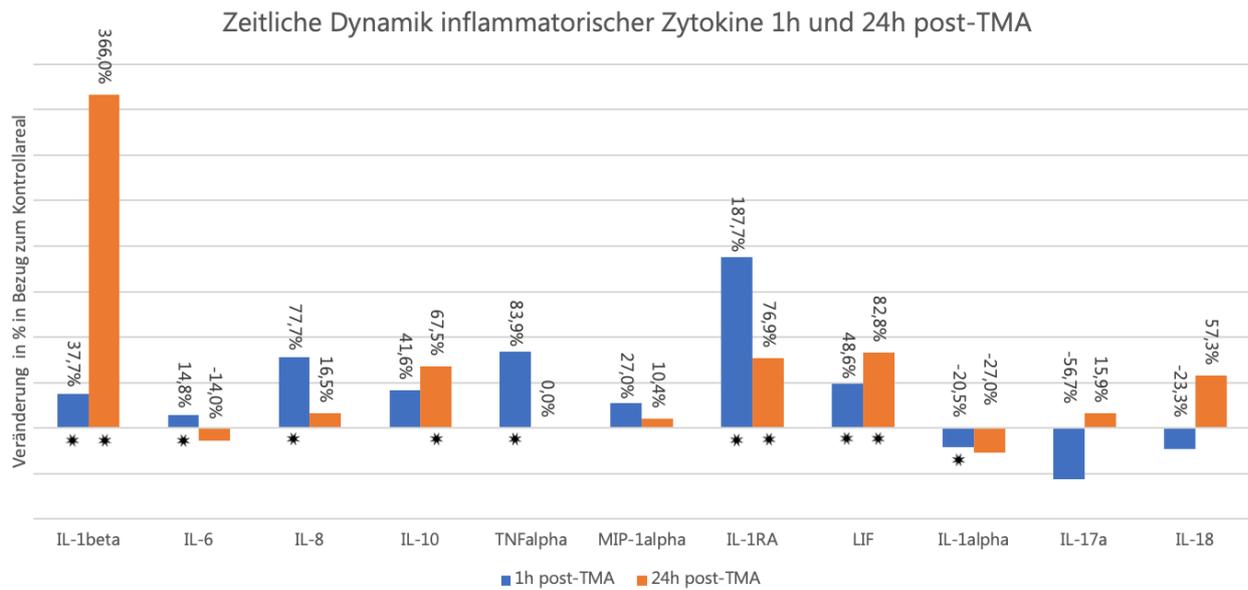


Abbildung 9: Zeitliche Dynamik der inflammatorischen Zytokine 1h und 24h nach TMA

Verhältnis in Prozent jeweils in Bezug zur Kontrolle; * p < 0.05

IL-1beta = Interleukin-1 β ; IL-6 = Interleukin 6; IL-8 = Interleukin-8; IL-10 = Interleukin-10; TNFalpha = Tumornekrosefaktor α ; IL-1RA = Interleukin-1 Rezeptorantagonist; LIF = Leukämieinhibierender Faktor; IL-1alpha = Interleukin-1 α ; IL-17a = Interleukin-17a; IL-18 = Interleukin-18

Modulationen von Zytokinen mit Wirkung auf das adaptive Immunsystem

Die Zytokine, die vor allem modulierend auf das adaptive Immunsystem wirken, zeigten unterschiedliche Dynamiken. IL-2, IL-15, IL-23 und IL-9 waren 24h nach TMA in erhöhten Konzentrationen messbar, IL-2 (1h post-TMA: -8%, $p = 0.09$; 24h post-TMA: 13,3%, $p = 0.21$), IL-15 (1h post-TMA: -37,1%, $p = 0.45$; 24h post-TMA: 51,9%, $p = 0.17$) und IL-23 (1h post-TMA: -6,8%, $p = 0.33$; 24h post-TMA: 40,0%, $p = 0.08$) waren initial herabreguliert, IL-9 (1h post-TMA: 8,5%, $p = 0.97$; 24h post-TMA: 26,5%, $p = 0.17$) war zu beiden Zeitpunkten in erhöhten Konzentrationen messbar.

IL-12p70, IL-21 und IL-27 hingegen waren unmittelbar nach TMA nach 24h in verminderten Konzentrationen im TMA-Areal messbar. IL-12p70 war initial um 339,5% gegenüber der Kontrolle erhöht messbar ($p = 0.99$), nach 24h jedoch um -68,9% herabreguliert ($p = 0.17$). IL-21 lag unmittelbar nach TMA auf dem Niveau der Kontrolle (1h post-TMA: 0%, $p = 0.8$; 24h post-TMA: -31,1%, $p = 0.81$) und IL-27 (1h post-TMA -100,0%, $p = 0.7$; 24h post-TMA: -96,0%, $p = 0.66$) war zu beiden Zeitpunkten herabreguliert (Abbildung 10). Die Konzentration von IL-5 im behandelten Areal lag zu beiden Zeitpunkten auf exakt dem Niveau des Kontrollareals. IFN α , IL-13 und IL-7 waren in vielen Proben unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze, sodass eine sinnvolle Verwertung der Daten nicht möglich ist.

Zeitliche Dynamik der auf das adaptive Immunsystem wirkenden Zytokine 1h und 24h post-TMA

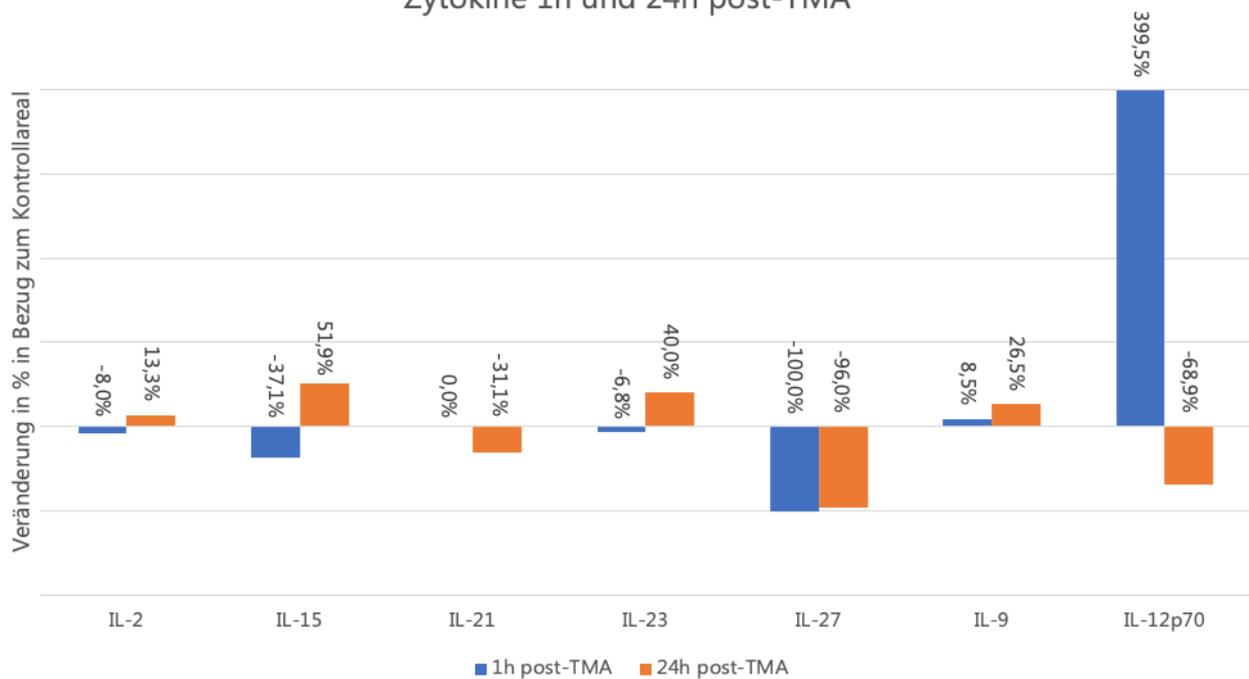


Abbildung 10: Zeitliche Dynamik der auf das adaptive Immunsystem wirkenden Zytokine 1h und 24h nach TMA

IL-2 = Interleukin 2; IL-9 = Interleukin-9; IL12p70 = Interleukin 12; IL-15 = Interleukin-15; IL-21 = Interleukin-21; IL-23 = Interleukin 23; IL-27 = Interleukin-27

Zytokinprofile der T-Zell-Subtypen

Betrachtet man die Zytokine unter dem Gesichtspunkt der sekretierenden T-Zell-Subtypen, zeigen sich unterschiedliche Dynamiken. Unmittelbar nach der TMA waren die Zytokinprodukte aller T_H -Subtypen herabreguliert (Abbildung 11-13). Nach 24h wurde insbesondere eine Zunahme der Produkte der TH_1 -Zellen (Abbildung 11) und TH_2 -Zellen (Abbildung 12) beobachtet, die Zytokine der TH_{17} -Zellen waren 24h post-TMA nur teilweise und vergleichsweise geringer gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 13).

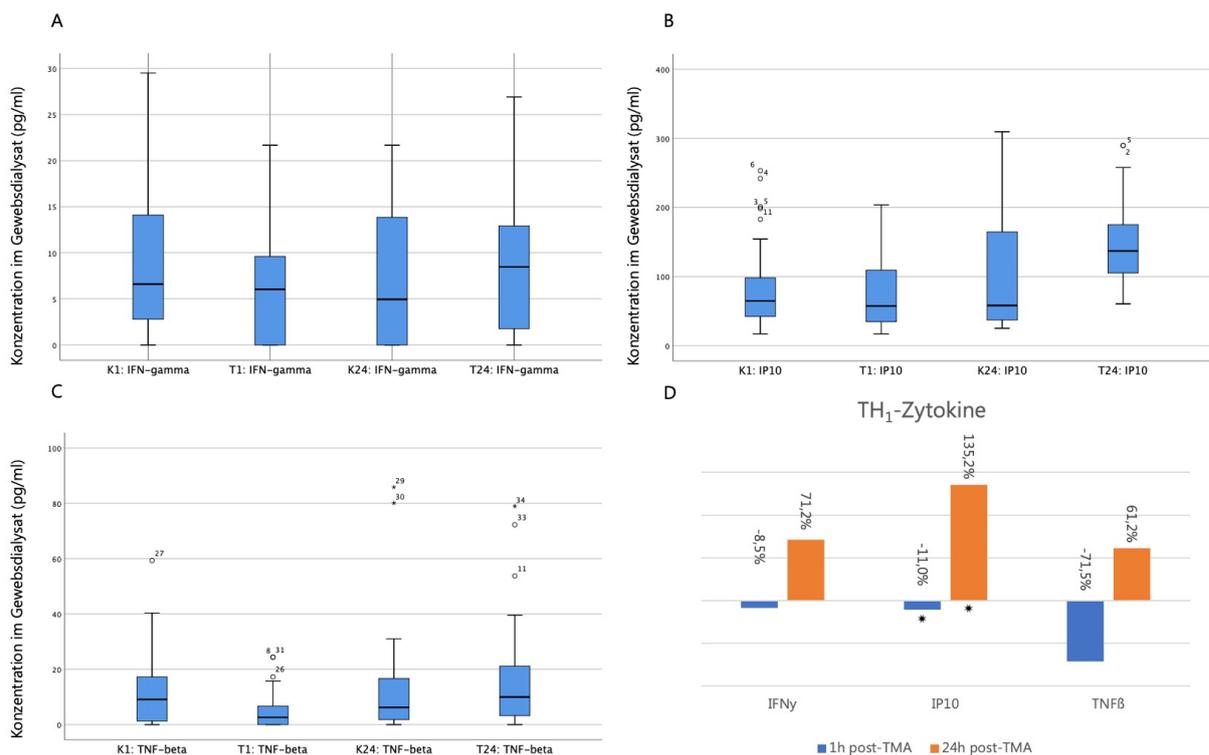


Abbildung 11: Konzentration (A-C) und zeitliche Dynamik (D) der Zytokinprodukte von TH_1 -Zellen 1h und 24h nach TMA

A-C: Doppelbestimmte Werte präsentiert als Boxplot-Whisker-Diagramm:

□ 25-75% (Q1-Q3)

— Median

T 1,5x Interquartilsabstand

° Ausreißer >1,5x Interquartilsabstand;

* Ausreißer >3x Interquartilsabstand

K1: Kontrollareal 1h post-TMA (n=30)

T1: TMA-Areal nach 1h (n=32)

K24: Kontrollareal 24h post-TMA (n=30)

T24: TMA-Areal nach 24h (n=34)

11A: IFNgamma = Interferon γ (pg/ml); 11B: IP10 = Interferon- γ induziertes Protein 10 (pg/ml);
11C: TNF-beta = Tumornekrosefaktor β (pg/ml)

D: Verhältnis in Prozent jeweils in Bezug zur Kontrolle; * p < 0.05

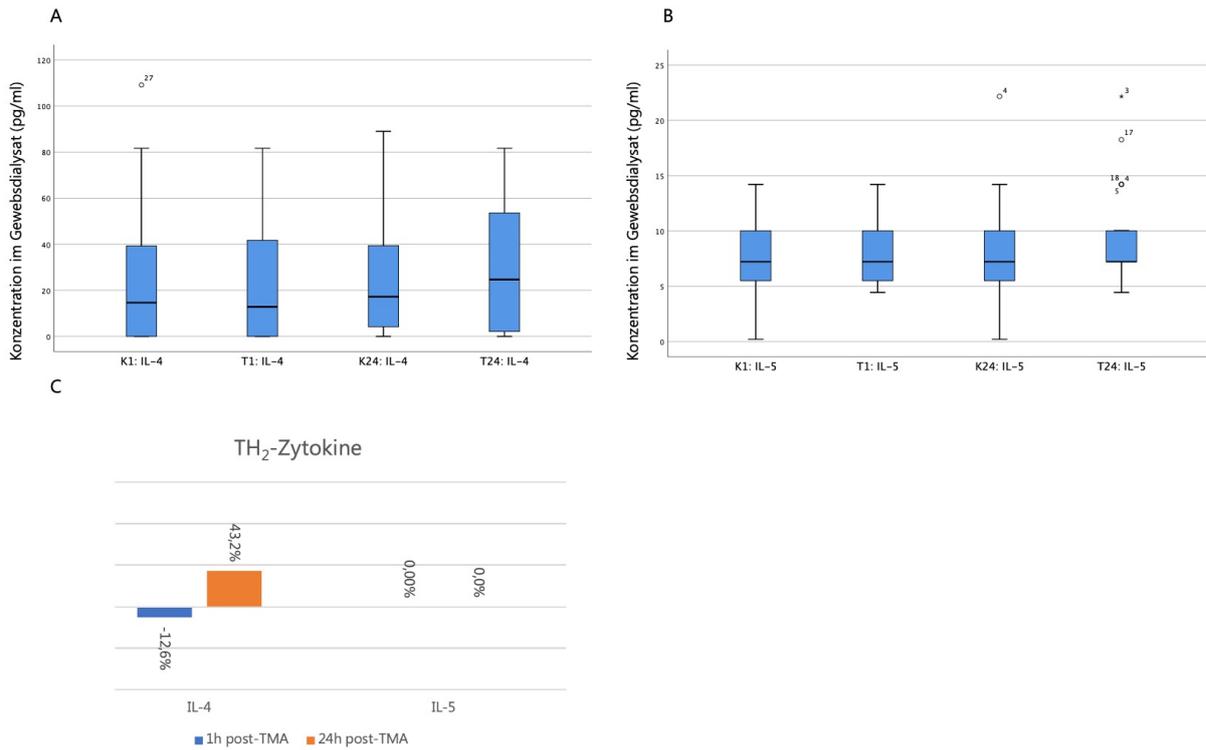


Abbildung 12: Konzentration (A-B) und zeitliche Dynamik (C) der Zytokinprodukte von TH₂-Zellen 1h und 24h nach TMA

A-B: Doppelbestimmte Werte präsentiert als Boxplot-Whisker-Diagramm:

□ 25-75% (Q1-Q3)

— Median

T 1,5x Interquartilsabstand

° Ausreißer >1,5x Interquartilsabstand;

* Ausreißer >3x Interquartilsabstand

K1: Kontrollareal 1h post-TMA (n=30)

T1: TMA-Areal nach 1h (n=32)

K24: Kontrollareal 24h post-TMA (n=30)

T24: TMA-Areal nach 24h (n=34)

12A: IL-4 = Interleukin-4 (pg/ml); 12B: IL-5 = Interleukin-5 (pg/ml)

C: Verhältnis in Prozent jeweils in Bezug zur Kontrolle

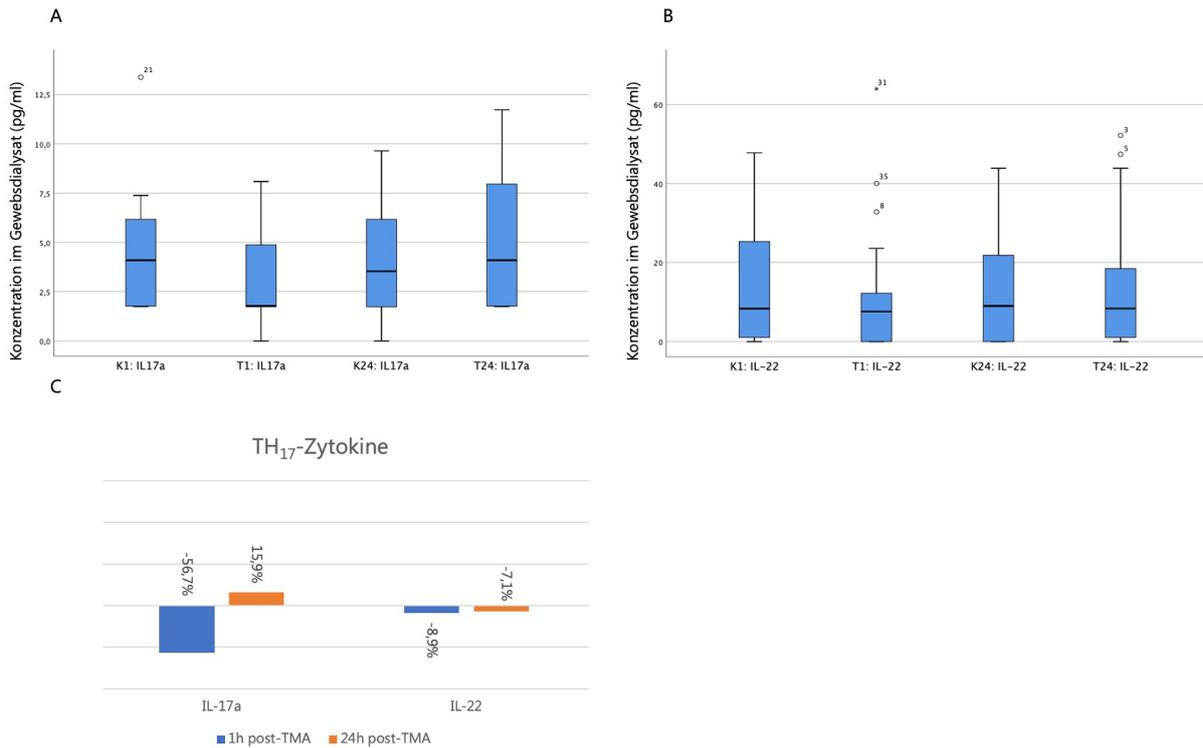


Abbildung 13: Konzentration (A-B) und zeitliche Dynamik (C) der Zytokinprodukte von TH₁₇-Zellen 1h und 24h nach TMA

A-B: Doppelbestimmte Werte präsentiert als Boxplot-Whisker-Diagramm:

□ 25-75% (Q1-Q3)

— Median

T 1,5x Interquartilsabstand

° Ausreißer >1,5x Interquartilsabstand;

* Ausreißer >3x Interquartilsabstand

K1: Kontrollareal 1h post-TMA (n=26 für A; n=30 für B)

T1: TMA-Areal nach 1h (n=26 für A; n=32 für B)

K24: Kontrollareal 24h post-TMA (n=30)

T24: TMA-Areal nach 24h (n=28 für A; n=34 für B)

13A: IL-17a = Interleukin 17a (pg/ml); 13B: IL-22 = Interleukin-22 (pg/ml)

C: Verhältnis in Prozent jeweils in Bezug zur Kontrolle

Modulation wundheilungs-assoziiertes Chemokine

Die von Makrophagen sezernierten Chemokine zeigten nach der thermomechanischen Ablation einen Konzentrationsanstieg. Die chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen wirkenden MIP-1 α , RANTES und PDGF zeigten dabei unterschiedliche Dynamiken, waren nach 24h aber gegenüber dem Kontrollareal alle deutlich erhöht.

MIP-1 α stieg zunächst um das 1,3fache (K1: 4,60 pg/ml; T1: 5,85 pg/ml; $p = 0.15$) um dann nach 24h noch um das 1,1fache (K24: 4,64 pg/ml; T24: 5,12 pg/ml; $p = 0.21$) erhöht zu sein (vgl. Abbildungen 7F, 8E), RANTES, PDGF und Eotaxin waren initial herabreguliert, nach 24h aber gegenüber der Kontrolle erhöht. RANTES war nach 1h mit 48,19 pg/ml im TMA-Areal um -23,8% gegenüber der Kontrolle (K1: 63,27 pg/ml; $p = 0.94$) vermindert, nach 24h war die Konzentration auf 69,22 pg/ml (K24: 52,35 pg/ml; $p = 0.24$) angestiegen und lag 32,2% über der Kontrolle (Abbildung 14A). PDGF, welches viele andere Funktionen in der Wundheilung erfüllt und auch chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt, war initial ebenfalls herabreguliert (-55,3%; K1: 194,96 pg/ml; T1: 87,21 pg/ml; $p = 0.36$), nach 24h aber ebenfalls deutlich um 313,8% (K24: 49,06 pg/ml; T24: 203,01 pg/ml; $p = 0.34$) gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 14B). Das chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten wirkende Eotaxin war initial ebenfalls herabreguliert (-12,6%; K1: 7,84 pg/ml; T1: 6,85 pg/ml; $p = 0.95$), nach 24h aber signifikant erhöht messbar (28,9%; K24: 6,85 pg/ml; T24: 8,83 pg/ml; $p < 0.05$) (Abbildung 14C).

Das von Keratinozyten sekretierte, chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen wirkende MCP-1, zeigte hingegen eine initiale Erhöhung um 11,7% (K1: 822,32 pg/ml; T1: 918,25 pg/ml; $p = 0.69$), 24h post-TMA eine signifikante Herabregulation um -37,3% (K24: 979,76 pg/ml; T24: 609,98 pg/ml; $p < 0.01$) (Abbildung 14D). Das vor allem von T-Zellen sekretierte MIP-1 β war 1h post-TMA signifikant um 20,3% erhöht (K1: 26,45 pg/ml; T1: 31,82 pg/ml; $p < 0.05$), lag nach 24h aber um 24,2% (K24: 27,11 pg/ml; T24: 20,54 pg/ml; $p < 0.05$) signifikant unter der Konzentration im Kontrollareal (Abbildung 14E). Die Chemokine GRO α und SDF-1 α zeigten nur geringfügige Veränderungen (Abbildung 14F, G). Eine Übersicht der zeitlichen Dynamiken zeigt Abbildung 15.

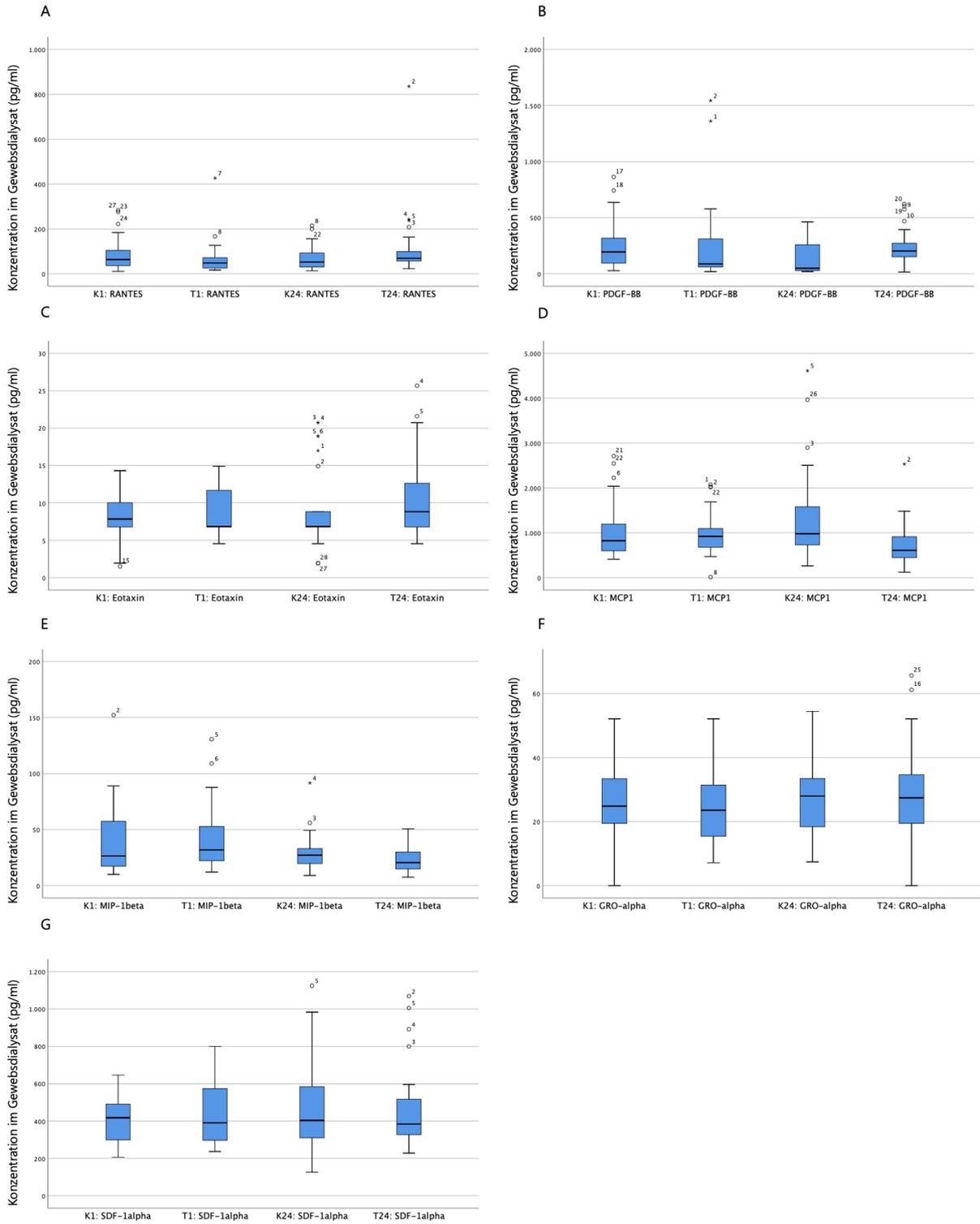


Abbildung 14: Chemokine im Gewebedialysat 1h und 24h post-TMA in Relation zur Kontrolle

Doppelbestimmte Werte präsentiert als Boxplot-Whisker-Diagramm:

□ 25-75% (Q1-Q3)

— Median

T 1,5x Interquartilsabstand

° Ausreißer >1,5x Interquartilsabstand;

* Ausreißer >3x Interquartilsabstand

K1: Kontrollareal 1h post-TMA (n=26 für B, C; n=30 für A, D, E, F, G)

T1: TMA-Areal nach 1h (n=26 für B, C; n=32 für A, D, E, F, G)

K24: Kontrollareal 24h post-TMA (n=24 für B, C; n=30 für A, D, E, F, G)

T24: TMA-Areal nach 24h (n=28 für B, C; n=34 für A, D, E, F, G)

14A: RANTES = regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; nach Aktivierung reguliert, normal T-Zell-exprimiert und –sekretiert (pg/ml); 14B: GRO- α = Growth-regulated oncogene α ; Wachstumsreguliertes Onkogen α (pg/ml); 14C: PDGF-BB = Platelet-derived growth factor (two B subunits); von Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor (zwei B-Untereinheiten) (pg/ml); 14D: Eotaxin = Eotaxin (pg/ml); 14E: MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein 1; Monozytäres chemokinetisches Protein 1 (pg/ml); 14F: MIP-1beta = Macrophage inflammatory protein-1 β ; Makrophagozytäres inflammatorisches Protein-1 β (pg/ml); 14G: SDF-1 α = Stromal derived growth factor 1 α ; aus dem Stroma stammender Wachstumsfaktor 1 α (pg/ml)

Zeitliche Dynamik wundheilungsassoziierter Chemokine 1h und 24h post-TMA

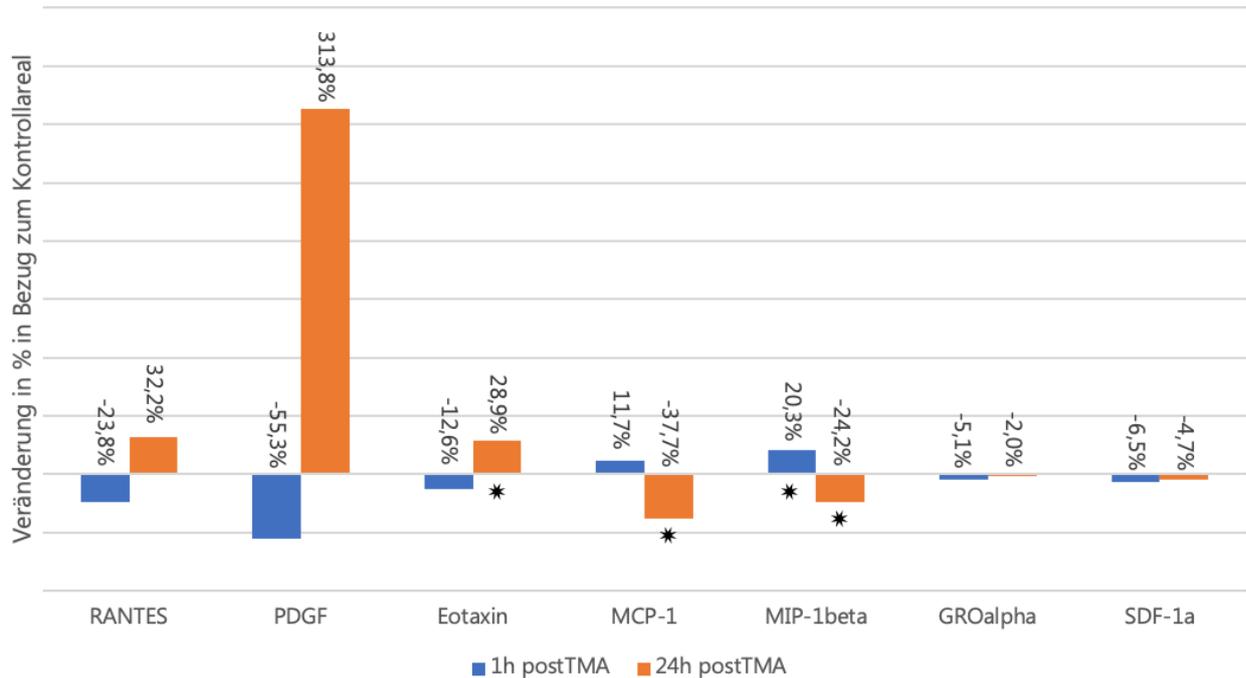


Abbildung 15: Zeitliche Dynamik der wundheilungs-assozierten Chemokine 1h und 24h nach TMA

Verhältnis in Prozent jeweils in Bezug zur Kontrolle; * $p < 0.05$

RANTES = Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; Nach Aktivierung reguliert, normal T-Zell-exprimiert und -sekretiert; GRO α = Growth-regulated oncogene α ; Wachstumsreguliertes Onkogen α ; PDGF-BB = Platelet-derived growth factor (two B subunits); Von Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor (zwei B-Untereinheiten); Eotaxin/CCL11 = Eotaxin, auch CCL11 = C-C-Motiv Chemokin-Ligand 11; MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein 1; Monozytäres chemokinetisches Protein 1; MIP-1beta = Macrophage inflammatory protein-1 β ; Makrophagozytäres inflammatorisches Protein-1 β ; SDF-1a = Stromal derived growth factor 1 α ; Aus dem Stroma stammender Wachstumsfaktor 1

Modulation wundheilungs-assoziiierter Wachstumsfaktoren

Bis auf FGF-2 (T24: -22,1%), PLGF-1 (T24: -5,5%) und VEGF-D (-0,3%) waren alle gemessenen wundheilungs-assoziierten Wachstumsfaktoren nach 24h gegenüber den zugehörigen Kontrollen erhöht. Unmittelbar nach der TMA waren VEGF-A und HGF bereits signifikant erhöht (VEGF-A: K1: 120,35 pg/ml; T1: 216,93 pg/ml; $p < 0.01$, HGF: K1: 141,97 pg/ml; T1: 209,26 pg/ml; $p < 0.01$) und nahmen im Verlauf in ihren Konzentrationen in nur geringem Maße ab und lagen auch nach 24h über denen des Kontrollareals (VEGF-A: K24: 110,99 pg/ml; T24: 188,83 pg/ml $p = 0.6$, HGF: K24: 129,98 pg/ml; T24: 191,35 pg/ml; $p = 0.07$) (Abbildung 16A, B).

Der Stammzellenwachstumsfaktor SCF war initial um 6,3% ($p = 0.94$) hochreguliert und 24h post-TMA leicht auf 6,6% ($p = 0.73$) über das Niveau der Kontrolle angestiegen (Abbildung 16C).

PDGF (Abbildung 14B), BDNF (Abbildung 16D) sowie EGF (Abbildung 16E) hingegen waren initial herabreguliert (PDGF: -55,3%; $p = 0.36$, BDNF: -4,8%; $p = 0.38$, EGF: -35,8%; $p = 0.45$), lagen 24h post-TMA jedoch deutlich über den Kontrollwerten (PDGF: 313,8%; $p = 0.34$, BDNF: 57,3%; $p < 0.05$, EGF: 30,3%; $p = 0.06$). Die Hochregulation von BDNF war dabei statistisch signifikant.

FGF-2 hingegen zeigte eine deutliche und statistisch signifikante Herabregulation. Es war unmittelbar nach der TMA auf -27,2% (K1: 253,97 pg/ml; T1: 184,92 pg/ml; $p < 0.01$) gegenüber dem Kontrollareal vermindert, nach 24h zeigte es weiterhin eine signifikante Herabregulation von -22,1% (K24: 223,44 pg/ml; T24: 174,02 pg/ml; $p < 0.05$) (Abbildung 16F). Ähnlich verhielt sich die Konzentration von PLGF-1, welches allerdings in geringerem Ausmaß und nicht signifikant herabreguliert war (1h post-TMA: -9,9%; $p = 0.84$, 24h post-TMA: -5,5; $p = 0.88$) (Abbildung 16G). VEGF-D war initial um 15,7% hochreguliert, 24h nach TMA gering gegenüber dem Kontrollareal vermindert (1h post-TMA: 15,7%; $p = 0.99$, 24h post-TMA: -0,3% $p = 0.62$) (Abbildung 16H).

GM-CSF und bNGF waren in vielen Proben unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze, sodass eine sinnvolle Verwertung der Daten nicht möglich ist. Eine Übersicht der zeitlichen Dynamiken der gemessenen Wachstumsfaktoren zeigt Abbildung 17.

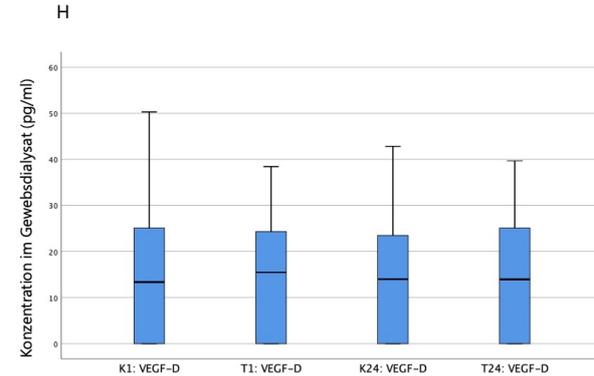
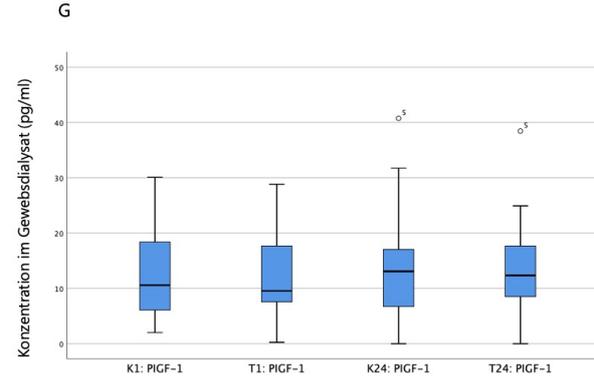
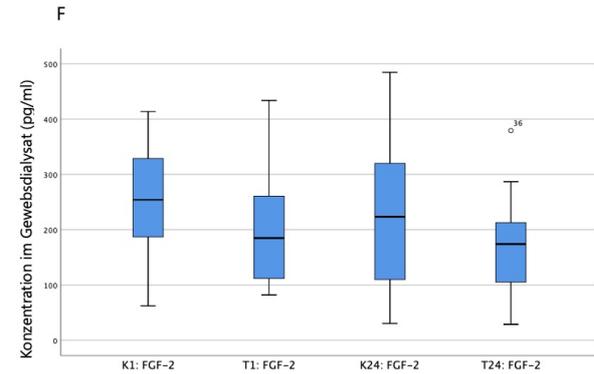
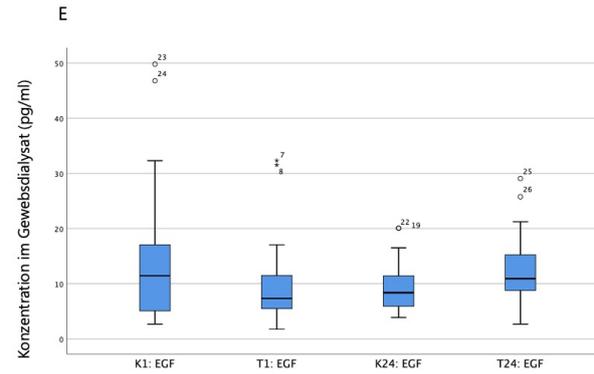
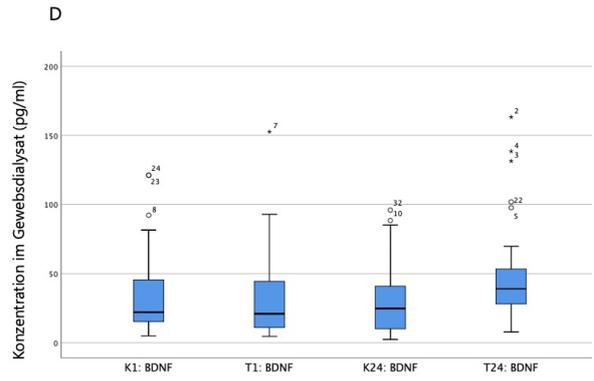
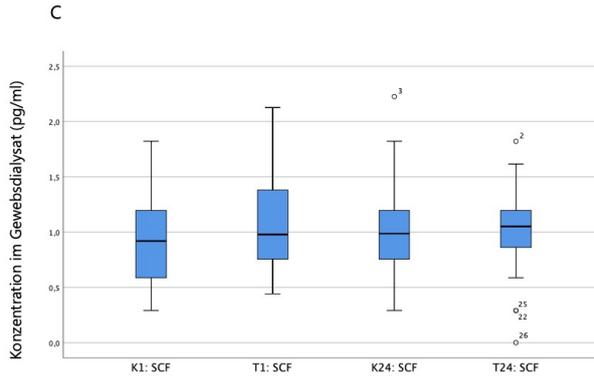
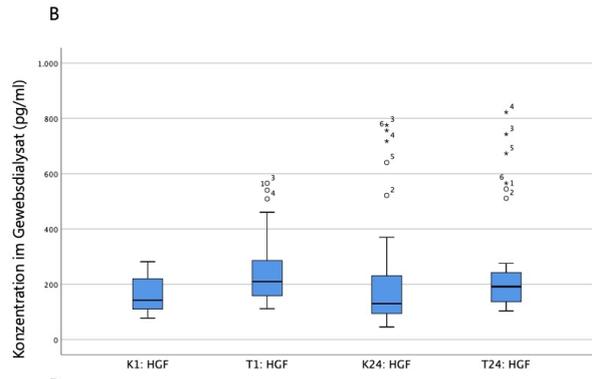
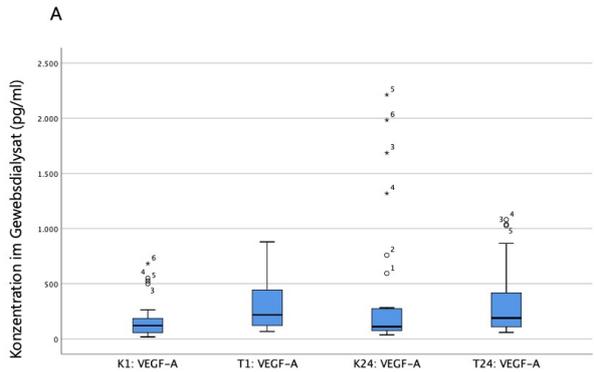


Abbildung 16: Wundheilungs-assoziierte Wachstumsfaktoren 1h und 24h post-TMA in Relation zur Kontrolle

Doppelbestimmte Werte präsentiert als Boxplot-Whisker-Diagramm:

□ 25-75% (Q1-Q3)

— Median

T 1,5x Interquartilsabstand

° Ausreißer >1,5x Interquartilsabstand;

* Ausreißer >3x Interquartilsabstand

K1: Kontrollareal 1h post-TMA (n=30)

T1: TMA-Areal nach 1h (n=32)

K24: Kontrollareal 24h post-TMA (n=30)

T24: TMA-Areal nach 24h (n=34)

16A: VEGF-A = Vascular endothelial growth factor A; vakulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (pg/ml); 16B: HGF = Hepatocyte growth factor; Hepatozyten-Wachstumsfaktor (pg/ml); 16C: SCF = Stem cell factor; Stammzellfaktor (pg/ml); 16D: BDNF = Brain-derived neurotrophic factor; vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (pg/ml); 16E: EGF = Epidermal growth factor; Epidermaler Wachstumsfaktor (pg/ml); 16F: FGF-2 = Fibroblast growth factor 2; Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (pg/ml); 16G: PLGF-1 = Placentar growth factor 1; plazentarer Wachstumsfaktor 1 (pg/ml); 16H: VEGF-D = Vascular endothelial growth factor D; vakulärer endothelialer Wachstumsfaktor D (pg/ml)

Zeitliche Dynamik wundheilungs-assoziiertes Wachstumsfaktoren 1h und 24h post-TMA

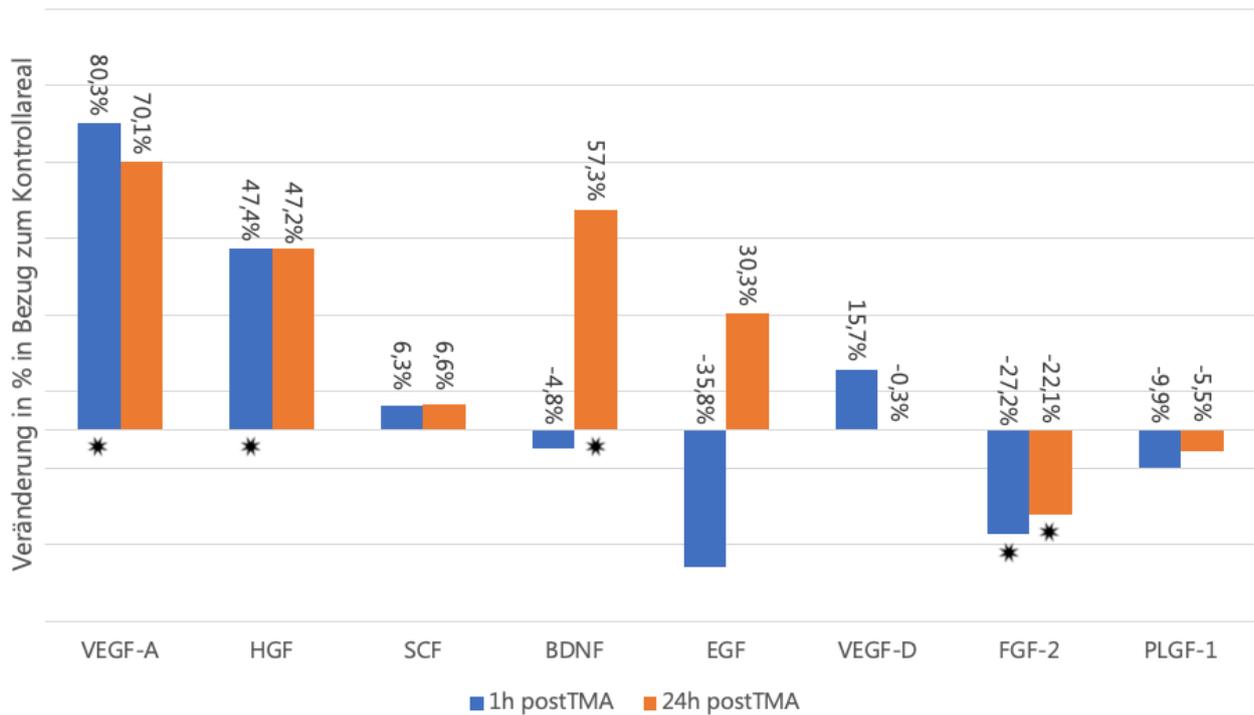


Abbildung 17: Zeitliche Dynamik der wundheilungs-assoziierten Wachstumsfaktoren 1h und 24h nach TMA

Verhältnis in Prozent jeweils in Bezug zur Kontrolle; * $p < 0.05$

VEGF-A = Vascular endothelial growth factor A; vakulärer endothelialer Wachstumsfaktor A; HGF = Hepatocyte growth factor; Hepatozyten-Wachstumsfaktor; SCF = Stem cell factor; Stammzellfaktor; BDNF = Brain-derived neurotrophic factor; vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (pg/ml); EGF = Epidermal growth factor; Epidermaler Wachstumsfaktor; VEGF-D = Vascular endothelial growth factor D; vakulärer endothelialer Wachstumsfaktor D; FGF-2 = Fibroblast growth factor 2; Fibroblasten Wachstumsfaktor 2; PLGF-1 = Placentar growth factor 1; plazentarer Wachstumsfaktor 1 (pg/ml)

Inflammatorische Reaktion von Proband A

Proband A zeigte am zweiten Untersuchungszeitpunkt, 24h nach der Behandlung, einen generalisierten Anstieg von Entzündungsparametern. Dies zeigte sich sowohl im behandelten Areal als auch im Kontrollareal. So war beispielsweise IL-6 bei Proband A nach 24h im Kontrollareal um 195,7% gegenüber der Kontrolle nach 1h erhöht. Im behandelten Areal lag die Konzentration 24h post-TMA um 350,4% höher als 1h post-TMA, während alle anderen Probanden einen Unterschied von -34,6% im behandelten Areal zwischen den beiden Zeitpunkten zeigten. Ähnliches konnte für IL-1 β , LIF, IL-8, IL-10, IL-31, TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β , GRO α , PDGF-BB und IL-17a gezeigt werden, bei denen die Konzentration sowohl im behandelten Areal als auch im Kontrollareal bei Proband A nach 24h mindestens doppelt so hoch als nach 1h lag, alle anderen Probanden jedoch deutlich geringere Konzentrationsveränderungen zeigten. Eine Übersicht gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Zytokine mit mehr als Konzentrationsverdopplung im Kontrollareal nach 24h im Vergleich zum Kontrollareal nach 1h bei Proband A mit Vergleichswerten der Probanden B-F

	Probanden B-F Veränderung zwischen T1 und T24 in %	Proband A Veränderung zwischen K1 und K24 in %	Proband A Veränderung zwischen T1 und T24 in %
MIP-1 α	-12,4	3198,1	2221,8
LIF	23,6	150,4	354,4
IL-1 β	39,0	116,1	221,5
IL-6	-34,6	195,7	350,4
IL-8	-32,4	1630,0	511,0
IL-10	-3,5	148,4	110,2
IL-17a	131,1	175,0	495,5
IL-31	80,7	100,8	170,8
TNF α	0,0	105,5	252,1
MIP-1 β	-35,4	1140,0	753,4
GRO α	16,4	231,8	162,7
PDGF	132,8	117,9	710,4

Zytokinprofile

Zur Charakterisierung der Probanden wurde eine Analyse des TH₁/TH₂/TH₁₇-Profils erstellt. Hierzu wurden die Kontrollen von beiden Zeitpunkten gemittelt. Abbildung 18 zeigt die normale prozentuale Verteilung entsprechend der Normwerte nach 24h Stimulation mit ConA/SEB entsprechend dem Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam.

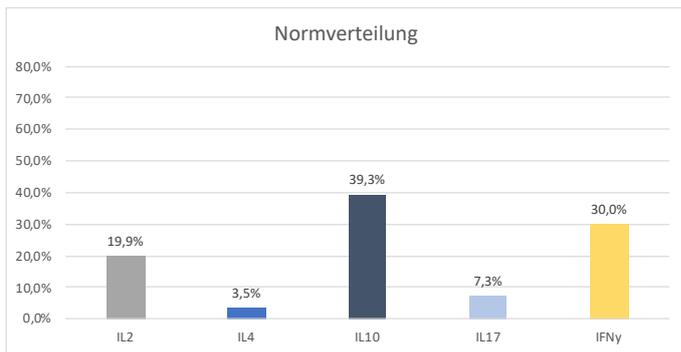


Abbildung 18: Normverteilung der TH₁/TH₂/TH₁₇-Zytokine nach 24h Stimulation mit ConA/SEB im in-vitro Zellstimulationsassay (Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam)

IL-2 = Interleukin-2; IL-4 = Interleukin-4; IL-10 = Interleukin-10; IL-17 = Interleukin-17; IFN γ = Interferon γ

IL-4 ist bei allen Probanden im Vergleich zu der Normverteilung erhöht, während die anderen Zytokine von den Verhältnissen her der Norm ähneln (siehe Abbildung 19).

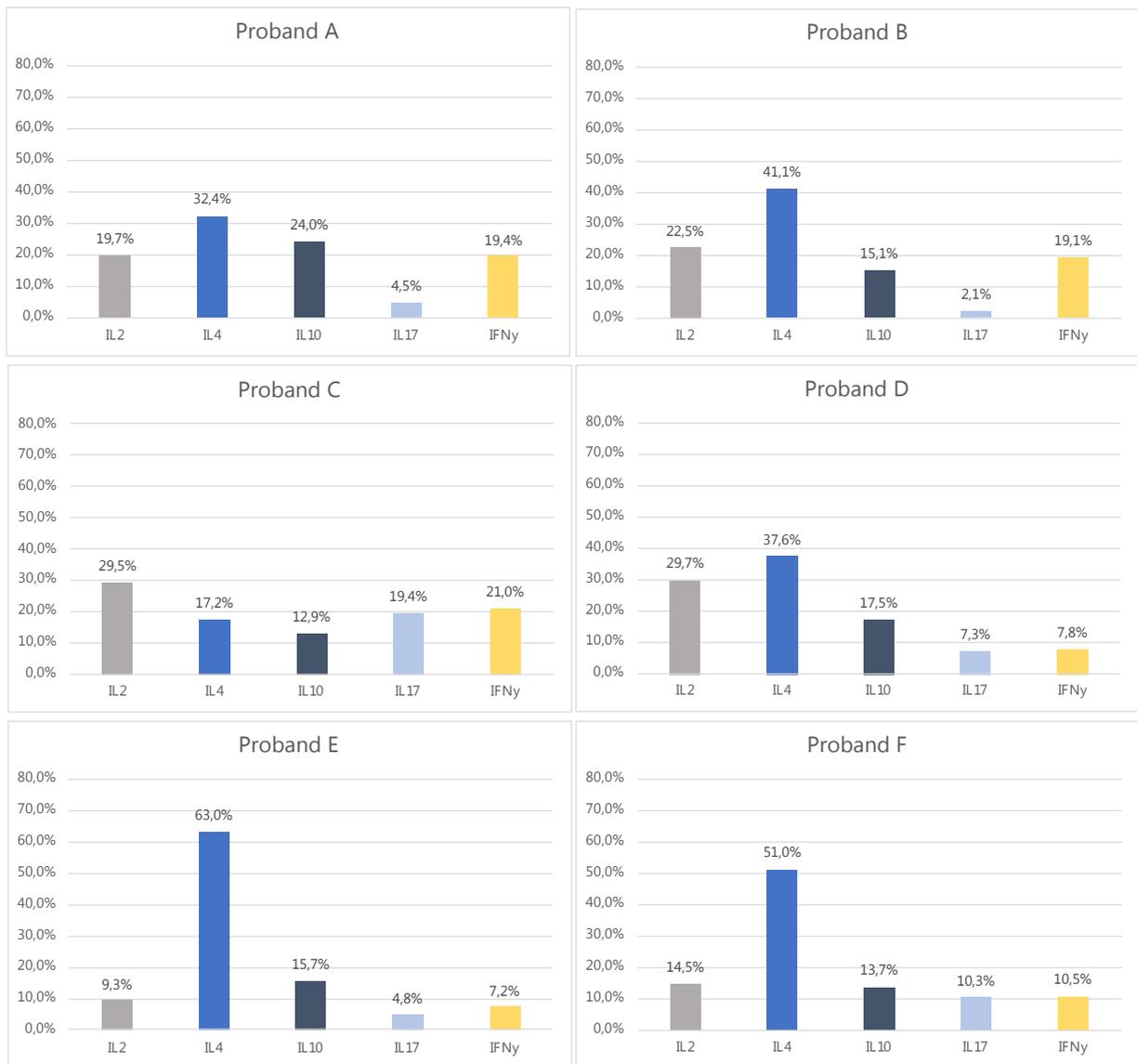


Abbildung 19: TH₁/TH₂/TH₁₇-Zytokinprofile der einzelnen Probanden in der unbehandelten Haut

Angabe jeweils in Prozent der Summe der angegebenen Zytokine

IL-2 = Interleukin-2; IL-4 = Interleukin-4; IL-10 = Interleukin-10; IL-17 = Interleukin-17; IFN γ = Interferon γ

DISKUSSION

Die molekularen Wirkungsweisen der unterschiedlichen minimalinvasiven Systeme, die an der Haut angewendet werden, sind bislang nicht umfassend untersucht. Die TMA stellt ein innovatives System zur fraktionierten Behandlung der Haut und eine der neuesten minimalinvasiven Techniken dar.

In unserer Arbeit untersuchten wir die molekularen Wirkungsweisen der TMA und legten wir den Fokus auf die Veränderungen von wundheilungs-assoziierten Zytokine und Chemokinen, die in unserer Untersuchung 1h und 24h nach TMA bestimmt wurden. Diese Zeitpunkte wurden deshalb gewählt, da es nach der TMA klinisch zunächst zu einer entzündlichen Reaktion mit anschließender Krustenbildung kommt und nach klinischem Aspekt sowie den vorbeschriebenen Wundheilungsprozessen die stärksten Zytokin- und Chemokinmodulationen in den ersten 24h zu erwarten sind. Die Bestimmung der Fallzahl erwies sich als richtig, da wir deutliche Unterschiede zwischen dem behandelten Areal und der Kontrolle feststellen konnten.

Inflammatorische Reaktion

Die inflammatorische Phase der Wundheilung ist in unserer Studie sehr gut nachweisbar. IL-1, IL-6, TNF α , IL-8 und MIP-1 α stiegen schnell an. Ebenso beobachteten wir eine Zunahme der Wachstumsfaktoren PDGF, EGF und VEGF-A. Dies korreliert mit den Ergebnissen zahlreicher Studien (vgl.(15)) und deutet auf die Induktion einer Wundheilungsreaktion hin, die durch die Behandlung gewünscht ist und deren klinischen Effekt bedingt.

Die Zytokine IL-1, IL-6, TNF α , IL-8 und MIP-1 α sind im Konzept der Akuten-Phase-Reaktion, das die charakteristische Reaktion des Organismus auf lokale oder systemische Störungen der körpereigenen Homöostase beschreibt, als Initiatoren dieser systemischen Reaktion bekannt (46-50). Obwohl bei unserer Untersuchung keiner der Probanden über eine systemische Reaktion berichtete und aufgrund des geringen Ausmaßes der Verletzung eine solche auch nicht zu erwarten ist, kann davon ausgegangen werden, dass dieselben Mechanismen, die bei großen Gewebeerletzungen die Akute-Phase-Reaktion induzieren (51) auch bei kleinen lokalen Verletzungen gelten. Van Miert (52) beschrieb in diesem Zusammenhang die Einteilung

der auf die Störung der Homöostase reagierenden Zytokine in drei Gruppen. Neben den bereits erwähnten proinflammatorischen Zytokinen gehören hierzu die antiinflammatorischen Zytokine sowie jene, die primär modulierend auf Zellen des erworbenen Immunsystems wirken.

Die in unserer Untersuchung bestimmten Vertreter der antiinflammatorischen Zytokine, IL-10 und IL-1RA waren zu beiden Zeitpunkten der Untersuchung ebenfalls in deutlich erhöhten Konzentrationen messbar. Dies deutet darauf hin, dass die Mechanismen auf molekularer Ebene auch für kleine und lokalisierte Gewebeverletzungen zuzutreffen.

Betrachtet man die Zytokine unter dem Gesichtspunkt der sekretierenden Zelltypen, lassen sich deutliche Unterschiede feststellen.

In der frühen inflammatorischen Phase sind Monozyten und Makrophagen, Zellen des angeborenen Immunsystems, wesentliche Akteure, die Wundheilungsprozesse anstoßen (13). Dies zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung eindrücklich. Einerseits zeigen viele Zytokine, die chemotaktisch auf Makrophagen wirken, nach der thermomechanischen Ablation einen Anstieg (MIP-1 α , IL-1, IFN γ , GRO α , PDGF (13, 15) und RANTES (53)), andererseits sind auch viele Produkte dieses Zelltyps insbesondere nach 24h in erhöhten Konzentrationen messbar. Nicht alle Analyte, die als Produkte monozytärer Zellen bekannt sind, verhielten sich in gleicher Weise. Während einige initial verringerte Konzentrationen zeigten und erst im Verlauf anstiegen (MIP-1 α , PDGF, IL-1, IL-23 und andere, vgl. (13), (54)), waren andere bereits früh erhöht. Dies gilt insbesondere für IL-6, IL-8 und TNF α , die allerdings von einer ganzen Reihe, von an der Initialphase der Wundheilung beteiligten, Zellen ausgeschüttet werden und auch durch die mechanische Stimulation der Behandlung aktiviert werden können. Letzteres ist vor allem durch Mastzellen (55) und die durch die Behandlung verletzten Keratinozyten (56) bedingt, welche ebenfalls die genannten Zytokine produzieren können (13).

Überraschend ist die signifikante Herabregulation von MCP-1 nach 24h, welches in einigen Untersuchungen eine starke Korrelation zum zeitlichen Auftreten sowie der Verteilung von Makrophagen zeigte (15, 57-59).

In Bezug auf die Zellen des erworbenen Immunsystems beobachteten wir herabregulierte Zytokinprofile der T-Zell-Subtypen TH₁, TH₂ und TH₁₇-T-Zellen. Bei ausgedehnten,

sowohl mechanischen als auch thermischen Verletzungen wird über eine generelle Suppression der zellulären Immunantwort berichtet (60-62). Obwohl T-Zellen für den Wundschluss keine Notwendigkeit darstellen, spielen sie doch eine Rolle in der Modulation der Wundheilungsreaktion und der Festigkeit und Struktur der resultierenden neu gebildeten Haut (18). In unserer Untersuchung konnte eine Herabregulation der T-Zell-Produkte unmittelbar nach der TMA sowie eine Hochregulation der TH₁- und TH₂-Zytokine beobachtet werden.

Die TH₁-Zytokine INF γ sowie TNF verstärken in erster Linie die Inflammation. Das in der vorliegenden Untersuchung signifikant erhöhte IP10 ist ein zuverlässiger Surrogatmarker zum Nachweis einer zellulären Immunaktivierung, da es nach Kontakt mit INF γ von unterschiedlichen Zellen freigesetzt wird und eine höhere *in vivo* und *ex vivo* Stabilität aufweist (63). Da TNF α durch zahlreiche andere Zelltypen produziert wird, wird lediglich TNF β als Produkt der TH₁-Zellen in die Ergebnisse einbezogen.

TH₂-Zytokine wirken modulierend auf Fibroblasten und stimulieren die Produktion der Extrazellulären Matrix inklusive Kollagen (18). Entsprechend ist die beobachtete subsequent verstärkte Expression nach initialer Herabregulation schlüssig mit der Annahme einer Induktion von Wundheilungsreaktion und EZM-Synthese.

In der Wundheilung spielen regulatorische T-Zellen wie die TH₁₇-Zellen vor allem bei der Förderung der Reepithelialisierung sowie Wiederherstellung der Hautbarriere eine Rolle (18). Wie auch bei IL-8 lagen die Konzentrationen der TH₁₇-Zellprodukte IL17a und IL-22 auf dem Niveau der Kontrolle und weisen auf eine bereits abgeschlossene Reepithelialisierung und wiederhergestellte Integrität der Hautbarriere hin.

Diese T-Zell-spezifischen Reaktionen zeigten sich auch in unserer Untersuchung als Antwort auf die thermomechanische Ablation. Die beschriebenen Mechanismen scheinen also ebenso wie die Akute-Phase-Reaktion nicht nur für die systemische Reaktion auf Traumata, sondern auch auf molekularer Ebene für kleine und lokalisierte Gewebeerletzungen zuzutreffen. Die Bedeutung dieser Veränderungen ist jedoch nach wie vor nicht abschließend geklärt und sollte weitergehend untersucht werden.

Unterschiedliche Zytokinexpression bei minimalinvasiven Verfahren

Bislang gibt es noch nicht viele Untersuchungen zu den molekularen Wirkmechanismen der unterschiedlichen Verfahren, dennoch weist ein Vergleich der existenten Studien auf das Vorhandensein von Unterschieden hin.

Orringer et al. (64, 65) untersuchten die molekularen Effekte sowohl des minimalinvasiven ablativen Er:YAG-Laser als auch der fraktionierten nicht-ablativen 1550 nm-Erbium-Laserbehandlung mittels RNA-Extraktion und Immunhistochemie an Hautbiopsien. Bei beiden Verfahren zeigte sich ebenfalls eine Zunahme von inflammatorischen Parametern, die einzelnen Zytokine und Wachstumsfaktoren zeigten jedoch eine andere Gewichtung als in der vorliegenden Studie zur thermomechanischen Ablation. Während der ablativ Laser nach 24h signifikante Anstiege von IL-1 β (16fach) und IL-8 (200fach) und nicht signifikante Anstiege von TNF α nach 24h zeigte, konnte beim fraktionierten nicht-ablativen Ansatz signifikante Anstiege von TNF α (115-45fach) und IL-1 β (1,6-13fach bei 7/10 Probanden) beobachtet werden (64, 65). Bei der thermomechanischen Ablation in unserer Untersuchung stieg IL-1 β um das 1,4-14,9fache in 3/6 Probanden nach 24h, TNF α hingegen war nach 24h gegenüber der Kontrolle nicht erhöht.

An einem aus Vorhaut-Keratinocyten kultivierten 3D-Hautmodell zeigten Schmitt et al. (66) einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Ablation und der Zunahme von IL-8, welches bei der thermomechanischen Ablation nach 24h nicht erhöht messbar war. Auch Engelhardt et al. (58) beschrieben IL-8 als Marker für das Ausmaß der epithelialen Verletzung, welcher nach vollständiger Re-Epithelialisierung bis unter die Nachweisbarkeitsgrenze gesunken war. In einer direkten Gegenüberstellung des vollablativen CO₂-Lasers und des fraktionierten CO₂-Lasers wurde eine stärkere Induktion von IL-1 β und IL-8 durch die vollablativen Verfahren deutlich (67). Dies könnte man damit erklären, dass es bei einer vollablativen Behandlung zu einer deutlich stärkeren Verletzung der Haut kommt. Ebenso wird durch den CO₂-Laser eine stärkere Verletzung der Epidermis und Dermis hervorgerufen als bei der TMA (37).

Dieser Zusammenhang zeigt sich ebenso bei der Radiofrequenztherapie, bei der elektrischer Strom zwischen den in die Haut eingebrachten Nadeln fließt, und die Epidermis so eine rein mechanische, die Dermis jedoch zusätzlich eine thermische Verletzung erfährt. Der Anstieg von IL-8 war hier im Vergleich zu den ablativen Verfahren deutlich geringer (66, 68).

Da bei der TMA IL-8 bereits nach 24h deutlich gesunken war und nur noch geringfügig und nicht signifikant über der Konzentration des Kontrollareals lag, weisen die Ergebnisse unserer Untersuchungen auf eine sehr kurze Re-Epithelialisierungszeit und eine wiederhergestellte Integrität der Epidermis bereits 24h nach thermomechanischer

Ablation hin. Neben der Reduktion der Ausfallszeit wird dadurch im Vergleich zum ablativen CO₂-Laser auch das Risiko für Hautinfektionen gesenkt.

Das Microneedling hingegen unterscheidet sich von den anderen Verfahren nicht nur durch das Fehlen einer thermischen dermalen Verletzung, sondern auch durch die molekularen Effekte. Während bei den Verfahren mit einer thermischen Komponente ein Anstieg proinflammatorischer Zytokine zu beobachten ist, konnten Schmitt et al. (69) in einem organotypischen 3D-Modell *ex vivo* eine Herunterregulation von proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β nachweisen. Aus diesem Grund scheint das Microneedling im Vergleich zu den Systemen, die mit zusätzlicher thermischer Wirkung arbeiten, weniger effektiv zu sein. Klinische Studien, die diese Systeme bezüglich ihrer klinischen Effektivität vergleichen, fehlen bislang jedoch.

Wachstumsfaktoren

Während Zytokine in der Frühphase zur Induktion der Wundheilung eine bedeutsame Rolle spielen, sind die Aufgaben der Wachstumsfaktoren insbesondere auch für die späteren Phasen der Reepithelialisierung, Angiogenese und Reorganisation der EZM von Relevanz.

Der starke Anstieg von VEGF-A, sowohl unmittelbar nach der thermomechanischen Ablation als auch nach 24h, bestätigt die Ergebnisse zahlreicher Studien, die eine frühe Induktion dieses angiogenetischen Wachstumsfaktors und seine Produktion durch eine Vielzahl an Zellen, die in der inflammatorischen Frühphase nach einer Hautverletzung aktiv sind, zeigen. Gerade in der Frühphase werden als Quelle von VEGF-A vor allem Thrombozyten diskutiert (vgl. (13, 15, 70)).

Der pleiotrope Wachstumsfaktor PDGF wird unter anderem von aktivierten Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert und wirkt einerseits chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und Fibroblasten, induziert andererseits aber auch die Produktion von EZM durch Fibroblasten. Letzteres ist der Effekt, durch den die Verbesserung der Hautstruktur nach mikroinvasiven Behandlungen bedingt ist. Obwohl die Synthese der EZM zu den von uns untersuchten Zeitpunkten noch nicht das primäre Ziel der Wundheilung darstellt, kann der deutliche Anstieg von PDGF nach 24h als Hinweis auf die Effektivität der Behandlung gewertet werden.

Ähnliches gilt für den Wachstumsfaktor EGF, der vor allem stimulierend auf Fibroblasten, Epithel und Endothel wirkt (71, 72) und damit eine wichtige Rolle in der posttraumatischen Reepithelialisierung und dem dermalen Remodeling spielt (72, 73).

Der verzögerte Anstieg von BDNF, der nach Gewebeverletzungen der Erhaltung und dem Schutz peripherer Nerven dient (74) ist ebenfalls in der Literatur beschrieben (75).

Die Expression von FGF-2 ist unmittelbar nach sowie 24h nach thermomechanischer Ablation statistisch signifikant herabreguliert. Da die Vertreter der FGF-Familie in vielen Studien bereits im Wundsekret, also der Frühphase der Inflammation in erhöhten Konzentrationen gefunden wurde (15), ist dieses Ergebnis überraschend. Auffallend ist, dass die verminderte Konzentration in vier der sechs Probanden (A, C, D, F) gemessen wurde, zwei zeigten zwar eine initiale Verminderung, nach 24h jedoch einen Anstieg im post-TMA-Areal (B und E). FGF-2 erfüllt vielfältige Aufgaben in der Wundheilung und stellt einen Proliferationsreiz für Endothel und Epithel, Fibroblasten und Keratinozyten dar und induziert die Synthese von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykanen sowie die Re-Epithelialisierung (16, 76, 77). Während der Proliferationsreiz ebenfalls von FGF-1, einem strukturell sehr ähnlichen Protein derselben Familie ausgeht, ist die Induktion der Synthese von EZM-Proteinen primär Aufgabe von FGF-2 (16, 77). Die große Bedeutung dieses Wachstumsfaktors in der Wundheilung wird auch durch vielversprechende Forschung an topisch appliziertem FGF-2 zur Verbesserung der Wundheilung deutlich (vgl. (78)).

Wie auch für PDGF und EGF gilt jedoch, dass die Synthese von Kollagen gerade im weiteren Verlauf der Wundheilung relevant wird und in der von uns untersuchten Frühphase nicht das primäre Ziel darstellt. Zudem wurden andere Vertreter der FGF-Familie wie FGF-1 nicht bestimmt, welche die Aufgaben von FGF-2 in dieser frühen Phase übernommen haben könnten. Ein Anstieg von FGF-2 wäre im Verlauf dennoch bei allen Probanden zu erwarten und weiterführende Untersuchungen müssen dies sowie die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse näher beleuchten.

Inflammatorische Reaktion von Proband A

Die generalisierte inflammatorische Reaktion von Proband A am zweiten Untersuchungstag ist deutlich und in allen relevanten inflammatorischen Parametern ist ein mehr als 3facher Anstieg zwischen den beiden Kontrollarealen mit ebenfalls starker Zunahme in den behandelten Arealen zu beobachten. Da zum Zeitpunkt der

Untersuchung keine Hautveränderung zu beobachten war, wurde der Proband nach Auswertung der Ergebnisse nach etwaigen erinnerlichen Ursachen befragt. Nach Evaluation der genannten Umstände ist eine Reaktion auf ein zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten erstmals genutztes Duschgel oder auf die zur Anästhesie verwendete Lidocain – Creme (Emla®) am wahrscheinlichsten.

Ausgangssituation der Zytokinprofile

Die Erstellung der individuellen Zytokinprofile erfolgte zur grundsätzlichen Einschätzung der immunologischen Ausgangssituation der teilnehmenden Probanden und um die Gruppencharakteristik genauer zu analysieren. Die Darstellung der einzelnen Analyte in Relation zu den anderen ermöglicht hierbei den Vergleich, da die absoluten Werte interindividuell stärkere Abweichungen zeigten. Die starke Betonung von IL-4 bei allen Probanden gegenüber der beschriebenen Normalverteilung ist auffällig. Hierbei muss bedacht werden, dass diese Normwerte sich auf die Verteilung der Zytokine nach 24h in-vitro Stimulation mit ConA/SEB (79) beziehen. Aber auch die Probengewinnung mittels Mikrodialyse könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse haben, da die zu analysierenden Proteine in unterschiedlicher Form im Gewebe vorliegen und unterschiedlich gut in die Dialyseflüssigkeit übertreten. Die Methode der Mikrodialyse ist bislang nicht hinreichend für alle der in dieser Studie bestimmten Parameter validiert. Bei der Analytgewinnung mittels Mikrodialyse spielen neben Länge und Durchmesser der Membran insbesondere die Molekülgröße, -ladung und Proteinbindung der Analyte eine Rolle (80-82), außerdem nimmt die Halbwertszeit und damit die mögliche Degradationsraten der einzelnen Analyte Einfluss (45). Hierzu gibt es insgesamt jedoch zu wenige Daten um eine zuverlässige Aussage treffen zu können. Die Bedeutung der hier gemessenen Werte bleibt also unklar und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Da diese genannten möglichen Einflussfaktoren sich jedoch auf alle Messung in unserer Studie niederschlagen, bleiben die Werte in Relation zu Zeitpunkten, zwischen den behandelten Arealen und Kontrollarealen sowie zwischen den einzelnen Probanden dennoch vergleichbar.

Limitationen und mögliche Fehlerquellen

In der vorliegenden Untersuchung wurden die molekularen Effekte der thermomechanischen Ablation an der Haut untersucht. Obwohl die Ergebnisse die zu den

gewählten Messzeitpunkten erwartete inflammatorische Reaktion gut widerspiegeln, soll abschließend auf die Limitationen hingewiesen werden.

Die kutane Mikrodialyse ist eine minimalinvasive Methode, deren Einsatzspektrum in der Forschung nicht nur in der Klinik für Dermatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin an Breite gewinnt und die valide Ergebnisse erzielt (vgl. (43, 82-84)). Da die Einlegetiefe der Mikrodialysemembran, die Solute nur aus der unmittelbaren Umgebung der Membran aufnimmt, nicht exakt reproduzierbar ist (beispielsweise beeinflusst die Elastizität der untersuchten Haut die Insertion der Kanülen), kann ein Einfluss auf die Messergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Der Effekt von mikroinvasiven Behandlungen liegt in der dermalen Deposition von Kollagen Typ I einige Wochen nach der Behandlung. Studien zeigen diesen Effekt nach dem Auftreten der hier bestimmten Zytokine und Wachstumsfaktoren, eine direkte Messung des Effektes fand aber in unserer Untersuchung nicht statt, da diese als minimalinvasiver Ansatz konzipiert ist und die Untersuchung von Strukturkollagenen eine Hautbiopsie erforderlich machen würde. Zudem können die gewählten Messzeitpunkte lediglich die erste Phase der Wundheilung widerspiegeln. Die Untersuchung des Langzeiteffektes der thermomechanischen Ablation ist bleibender Forschungsgegenstand der Arbeitsgruppe. In der vorliegenden Untersuchung legten wir den Fokus zunächst auf die Induktion der Wundheilung, da wir hier die interessantesten Aspekte erwarteten. Die geringe Anzahl der Probanden stellt eine weitere Limitation dar und durch eine größere Untersuchungspopulation würde eine stärkere Aussagekraft bei der Interpretation der Daten erreicht. In der vorliegenden Studie ist diese durch zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Probanden teilweise eingeschränkt.

Die Interpretation der statistischen Signifikanz für die Zytokine, die nicht in der primären Zielsetzung inkludiert sind, sollte mit Vorsicht erfolgen. Die Bestimmung aller Signifikanzniveaus bei der großen Anzahl der vorliegenden Analyte führt zur Entstehung des multiplen Testproblems, bei dem mit zunehmender Anzahl der Tests die Wahrscheinlichkeit für ein zufällig signifikantes Ergebnis steigt. Das statistische Testen der Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte explorativ, daher sollten signifikante p-Werte ebenfalls explorativ als Maß für die beobachtete Effektstärke und nicht konfirmatorisch interpretiert werden.

Die Studie bildet eine singuläre Behandlung der TMA an der Haut des volaren Unterarmes ab, die thermomechanische Ablation zur Verbesserung ästhetisch beeinträchtigender Hautsituationen wird äquivalent zu den meisten anderen

minimalinvasiven Verfahren jedoch in seriellen Behandlungen und zumeist im Gesicht angewandt. Obwohl wir glauben, dass die prinzipiellen Mechanismen der dermalen und epidermalen Wundheilung sowohl in der Unterarmhaut als auch der Gesichtshaut vergleichbar sind und die serielle Anwendung der TMA die Reaktion der Haut auf den Stimulus nicht verändert, sollte dies als möglicher Einflussfaktor erwähnt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass durch multiple Anwendungen eine Verstärkung des gewünschten Effektes erreicht wird.

Ausblick

Die thermomechanische Ablation ist eine vielversprechende neue Behandlungsmethode, die gering invasiv und mit einer vergleichbar geringen Ausfallzeit der Patienten, klinisch beobachtbare Effekte zur Hautstrukturverbesserung erzielt. Die Auswahl des jeweiligen Verfahrens beruht bislang auf den Präferenzen und Kenntnissen der behandelnden Ärzte und wird nicht aufgrund distinktiver Patientenmerkmale getroffen. Die Untersuchung der molekularen Wirkmechanismen der unterschiedlichen Verfahren soll dazu beitragen, Unterschiede zwischen den Verfahren zu definieren, um so klare Empfehlungen bezüglich der Behandlungsmodalität für verschiedene Fragestellungen erarbeiten zu können. Wir konnten zeigen, dass die TMA zu einer Induktion von Zytokinen, aber auch von Wachstumsfaktoren führt.

Da die thermomechanische Ablation zudem in der transdermalen Applikation von lipophilen Wirkstoffen erfreuliche Ergebnisse erzielt (40) kann durch Kenntnis der molekularen Wirkmechanismen eine differenziertere Ergebnisinterpretation zwischen Behandlung und Wirkstoff erfolgen. Dies wird von der Arbeitsgruppe weiterhin beforscht.

REFERENZEN

1. Kerscher M. Dermatokosmetik. [Dresden]: Steinkopff Verlag; 2004, 2009.
2. Roberts TLI, Lettieri JT, Ellis LB. CO2 Laer Resurfacing: Recognizing and Minimizing Complications. *Aesthetic Surgery Journal*. 1996;16(2):142-8.
3. Roberts TL, 3rd. The emerging role of laser resurfacing in combination with traditional aesthetic facial plastic surgery. *Aesthetic Plast Surg*. 1998;22(2):75-80.
4. Nair PA, Badri T. Microneedling. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2018.
5. Li D, Lin SB, Cheng B. Complications and posttreatment care following invasive laser skin resurfacing: A review. *J Cosmet Laser Ther*. 2018;20(3):168-78.
6. Britt CJ, Marcus B. Energy-Based Facial Rejuvenation: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA Facial Plast Surg*. 2017;19(1):64-71.
7. Aslam A, Alster TS. Evolution of laser skin resurfacing: from scanning to fractional technology. *Dermatol Surg*. 2014;40(11):1163-72.
8. Prens SP, de Vries K, Neumann HA, Prens EP. Non-ablative fractional resurfacing in combination with topical tretinoin cream as a field treatment modality for multiple actinic keratosis: a pilot study and a review of other field treatment modalities. *J Dermatolog Treat*. 2013;24(3):227-31.
9. Shin MK, Choi JH, Ahn SB, Lee MH. Histologic comparison of microscopic treatment zones induced by fractional lasers and radiofrequency. *J Cosmet Laser Ther*. 2014;16(6):317-23.
10. Alster TS, Lupton JR. Lasers in dermatology. An overview of types and indications. *Am J Clin Dermatol*. 2001;2(5):291-303.
11. Loesch MM, Somani AK, Kingsley MM, Travers JB, Spandau DF. Skin resurfacing procedures: new and emerging options. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014;7:231-41.
12. Kapp H, Smola H. Regulation der Wundheilung durch Wachstumsfaktoren und Zytokine. *HARTMANN WundForum*. 2006;1:8-14.
13. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):12S-34S.
14. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.
15. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835-70.

16. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, Abdullah KM. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)*. 2003;39(10):787-800.
17. Raulf-Heimsoth M, Stock P. T-Helferzellen und ihre Zytokine. *Allergo J*. 2008;17:152-5.
18. Boothby IC, Cohen JN, Rosenblum MD. Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair. *Sci Immunol*. 2020;5(47).
19. Knipper JA, Willenborg S, Brinckmann J, Bloch W, Maass T, Wagener R, Krieg T, Sutherland T, Munitz A, Rothenberg ME, Niehoff A, Richardson R, Hammerschmidt M, Allen JE, Eming SA. Interleukin-4 Receptor alpha Signaling in Myeloid Cells Controls Collagen Fibril Assembly in Skin Repair. *Immunity*. 2015;43(4):803-16.
20. Beasley KL, Weiss RA. Radiofrequency in cosmetic dermatology. *Dermatol Clin*. 2014;32(1):79-90.
21. Moravvej H, Barikbin B, Ghavam SA, Karimi S. Nonablative Fractional Laser Resurfacing. *J Laser Med Sci*. 2011;2(1):30-5.
22. Manstein D, Herron GS, Sink RK, Tanner H, Anderson RR. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med*. 2004;34(5):426-38.
23. Husain Z, Alster T. The role of lasers and intense pulsed light technology in dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2015;9:29-40.
24. Greve B, Raulin C. [The neodymium YAG laser: its application in dermatology]. *Hautarzt*. 2000;51(3):152-8.
25. Chwalek J, Goldberg DJ. Ablative skin resurfacing. *Curr Probl Dermatol*. 2011;42:40-7.
26. Preissig J, Hamilton K, Markus R. Current Laser Resurfacing Technologies: A Review that Delves Beneath the Surface. *Semin Plast Surg*. 2012;26(3):109-16.
27. Hartmann D, Ruzicka T, Gauglitz GG. Nebenwirkungen ästhetischer Eingriffe an der Haut. *JDDG*. 2015;13(8):778-87.
28. Aust MC, Reimers K, Repenning C, Stahl F, Jahn S, Guggenheim M, Schwaiger N, Gohritz A, Vogt PM. Percutaneous collagen induction: minimally invasive skin rejuvenation without risk of hyperpigmentation-fact or fiction? *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(5):1553-63.

29. Liebl H, Kloth LC. Skin cell proliferation stimulated by microneedles. *J Am Coll Clin Wound Spec.* 2012;4(1):2-6.
30. Nair PA, Arora TH. Microneedling Using Dermaroller A Means Of Collagen Induction Therapy. *Gujarat Medical Journal.* 2014;69(1):24-7.
31. Singh A, Yadav S. Microneedling: Advances and widening horizons. *Indian Dermatol Online J.* 2016;7(4):244-54.
32. Aust MC, Fernandes D, Kolokythas P, Kaplan HM, Vogt PM. Percutaneous collagen induction therapy: an alternative treatment for scars, wrinkles, and skin laxity. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(4):1421-9.
33. Alexiades-Armenakas M, Dover JS, Arndt KA. Unipolar versus bipolar radiofrequency treatment of rhytides and laxity using a mobile painless delivery method. *Lasers Surg Med.* 2008;40(7):446-53.
34. Paasch U, Bodendorf MO, Grunewald S, Simon JC. Skin rejuvenation by radiofrequency therapy: methods, effects and risks. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2009;7(3):196-203.
35. Lolis MS, Goldberg DJ. Radiofrequency in cosmetic dermatology: a review. *Dermatol Surg.* 2012;38(11):1765-76.
36. Lask G, Elman M, Fournier N, Slatkine M. Fractional vaporization of tissue with an oscillatory array of high temperature rods: part I: ex vivo study. *J Cosmet Laser Ther.* 2012;14(5):218-23.
37. Elman M, Fournier N, Barneon G, Bernstein EF, Lask G. Fractional treatment of aging skin with Tixel, a clinical and histological evaluation. *J Cosmet Laser Ther.* 2016;18(1):31-7.
38. Friedman O, Koren A, Niv R, Mehrabi JN, Artzi O. The toxic edge-A novel treatment for refractory erythema and flushing of rosacea. *Lasers Surg Med.* 2019;51(4):325-31.
39. Ltd. N. TMA Technology 2019 [Available from: <http://www.novoxel.com/product/tma-technology>].
40. Sintov AC, Hofmann MA. A novel thermo-mechanical system enhanced transdermal delivery of hydrophilic active agents by fractional ablation. *Int J Pharm.* 2016;511(2):821-30.
41. Scheiblhofer S, Thalhamer J, Weiss R. Laser microporation of the skin: prospects for painless application of protective and therapeutic vaccines. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(6):761-73.

42. Zhu DD, Wang QL, Liu XB, Guo XD. Rapidly separating microneedles for transdermal drug delivery. *Acta Biomater.* 2016;41:312-9.
43. Baumann KY, Church MK, Clough GF, Quist SR, Schmelz M, Skov PS, Anderson CD, Tannert LK, Gimenez-Arnau AM, Frischbutter S, Scheffel J, Maurer M. Skin microdialysis: methods, applications and future opportunities-an EAACI position paper. *Clin Transl Allergy.* 2019;9:24.
44. Hersini KJ, Melgaard L, Gazerani P, Petersen LJ. Microdialysis of inflammatory mediators in the skin: a review. *Acta Derm Venereol.* 2014;94(5):501-11.
45. Stenken JA, Church MK, Gill CA, Clough GF. How minimally invasive is microdialysis sampling? A cautionary note for cytokine collection in human skin and other clinical studies. *AAPS J.* 2010;12(1):73-8.
46. Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005;6(11):1045-56.
47. Gadola SD. Einführung in das Immunsystem. *Klinische Immunologie: Elsevier;* 2012. p. 3-76.
48. Blackburn WD, Jr. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. *J Rheumatol Suppl.* 1994;42:9-13.
49. Kushner I, Gewurz H, Benson MD. C-reactive protein and the acute-phase response. *J Lab Clin Med.* 1981;97(6):739-49.
50. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990;265(3):621-36.
51. Gordon AH, Koy A. The Acute Phase Response to Injury and Infection. The Roles of Interleukin 1 and Other Mediators. Amsterdam: Elsevier; 1985.
52. van Miert ASJPAM. Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological and therapeutic aspects. *Vet Quart.* 1995;175:41-50.
53. CCL5 C-C motif chemokine ligand 5 (Homo sapiens (human)) 2019 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6352>].
54. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:221-42.
55. Zhang D, Spielmann A, Wang L, Ding G, Huang F, Gu Q, Schwarz W. Mast-cell degranulation induced by physical stimuli involves the activation of transient-receptor-potential channel TRPV2. *Physiol Res.* 2012;61(1):113-24.

56. Feliciani C, Gupta AK, Sauder DN. Keratinocytes and cytokine/growth factors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(4):300-18.
57. DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, Kovacs EJ. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol.* 1995;146(4):868-75.
58. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1849-60.
59. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):313-26.
60. Meert KL, Ofenstein JP, Sarnaik AP. Altered T cell cytokine production following mechanical trauma. *Ann Clin Lab Sci.* 1998;28(5):283-8.
61. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock.* 1999;11(3):153-9.
62. Wood GW, Volenec FJ, Mani MM, Humphrey LJ. Dynamics of T-lymphocyte subpopulations and T-lymphocyte function following thermal injury. *Clin Exp Immunol.* 1978;31(2):291-7.
63. Berlin IfMDL. IP-10 Ein neuer Marker zum Nachweis einer zellulären Immunaktivierung. *Diagnostik-Info 247.* Berlin: Labor Berlin; 2020.
64. Orringer JS, Rittie L, Hamilton T, Karimipour DJ, Voorhees JJ, Fisher GJ. Intraepidermal erbium:YAG laser resurfacing: impact on the dermal matrix. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64(1):119-28.
65. Orringer JS, Rittie L, Baker D, Voorhees JJ, Fisher G. Molecular mechanisms of nonablative fractionated laser resurfacing. *Br J Dermatol.* 2010;163(4):757-68.
66. Schmitt L, Amann PM, Marquardt Y, Heise R, Czaja K, Gerber PA, Steiner T, Holzle F, Baron JM. Molecular effects of fractional ablative erbium:YAG laser treatment with multiple stacked pulses on standardized human three-dimensional organotypic skin models. *Lasers Med Sci.* 2017;32(4):805-14.
67. Orringer JS, Sachs DL, Shao Y, Hammerberg C, Cui Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Direct quantitative comparison of molecular responses in photodamaged human skin to fractionated and fully ablative carbon dioxide laser resurfacing. *Dermatol Surg.* 2012;38(10):1668-77.
68. Min S, Park SY, Yoon JY, Suh DH. Comparison of fractional microneedling radiofrequency and bipolar radiofrequency on acne and acne scar and investigation of

mechanism: comparative randomized controlled clinical trial. *Arch Dermatol Res.* 2015;307(10):897-904.

69. Schmitt L, Marquardt Y, Amann P, Heise R, Huth L, Wagner-Schiffler S, Huth S, Baron JM. Comprehensive molecular characterization of microneedling therapy in a human three-dimensional skin model. *PLoS One.* 2018;13(9):e0204318.
70. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
71. Bennet N, Schultz G. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 1993;165:728-37.
72. Berlanga-Acosta J, Gavilondo-Cowley J, Lopez-Saura P, Gonzalez-Lopez T, Castro-Santana MD, Lopez-Mola E, Guillen-Nieto G, Herrera-Martinez L. Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int Wound J.* 2009;6(5):331-46.
73. Tokumaru S, Higashiyama S, Endo T, Nakagawa T, Miyagawa JI, Yamamori K, Hanakawa Y, Ohmoto H, Yoshino K, Shirakata Y, Matsuzawa Y, Hashimoto K, Taniguchi N. Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol.* 2000;151(2):209-20.
74. Santos D, Giudetti G, Micera S, Navarro X, Del Valle J. Focal release of neurotrophic factors by biodegradable microspheres enhance motor and sensory axonal regeneration in vitro and in vivo. *Brain Res.* 2016;1636:93-106.
75. Onger ME, Delibas B, Turkmen AP, Erener E, Altunkaynak BZ, Kaplan S. The role of growth factors in nerve regeneration. *Drug Discov Ther.* 2017;10(6):285-91.
76. Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol.* 1994;12(1):157-69.
77. Borena BM, Martens A, Broeckx SY, Meyer E, Chiers K, Duchateau L, Spaas JH. Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(1):1-23.
78. Nunes QM, Li Y, Sun C, Kinnunen TK, Fernig DG. Fibroblast growth factors as tissue repair and regeneration therapeutics. *PeerJ.* 2016;4:e1535.
79. Berlin-Potsdam IfMD. T-Helferzellstatus - TH1/TH2/TH17/Treg-Profil. Diagnostikinformatio Nr 238. Berlin-Potsdam: IMD Labor Berlin; 2019.

80. Maurer MH, Berger C, Wolf M, Futterer CD, Feldmann RE, Jr., Schwab S, Kuschinsky W. The proteome of human brain microdialysate. *Proteome Sci.* 2003;1(1):7.
81. Rosenbloom AJ, Sipe DM, Weedn VW. Microdialysis of proteins: performance of the CMA/20 probe. *J Neurosci Methods.* 2005;148(2):147-53.
82. Carmona-Aparicio L, Rivera-Espinosa L, Juarez-Olguin H. The Use of Microdialysis in the Study of Encephalopathies. *Miscellanea on Encephalopathies - A Second Look*2012. p. 199-224.
83. Sjogren F, Anderson CD. Are cutaneous microdialysis cytokine findings supported by end point biopsy immunohistochemistry findings? *AAPS J.* 2010;12(4):741-9.
84. Clough GF, Jackson CL, Lee JJ, Jamal SC, Church MK. What can microdialysis tell us about the temporal and spatial generation of cytokines in allergen-induced responses in human skin in vivo? *J Invest Dermatol.* 2007;127(12):2799-806.

ANHANG

Übersicht aller Messwerte 1h und 24h post-TMA für behandeltes Areal und Kontrollareal

	BDNF				bNGF				EGF			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	42,11		40,18	30,56	0,00		0,00	0,00	6,22		11,41	9,41
	44,03		163,27	26,07	0,00		0,00	0,00	7,31		9,92	8,38
	20,29	20,29	131,43	27,03	0,00	0,00	0,00	15,43	5,08	5,08	16,14	8,38
	17,73	19,01	138,51	27,99	0,00	0,00	0,00	26,46	3,87	6,22	16,14	9,41
	21,58	17,73	101,86	63,94	0,00	0,00	0,00	21,28	4,48	5,08	13,34	9,92
	10,68	22,22	35,69	40,83	0,00	0,00	0,00	26,46	3,87	5,08	6,22	6,22
Proband B	152,66	36,33	34,09	24,14	26,46	0,00	0,00	0,00	32,32	12,39	12,39	11,41
	87,72	92,21	48,53	85,15	15,43	0,00	0,00	0,00	31,51	14,29	13,34	14,29
		47,89	59,12	25,43		0,00	0,00	0,00		13,34	13,34	10,42
		63,94	40,83	88,36		0,00	0,00	0,00		17,05	15,22	14,29
	92,86	41,79	53,34		18,46	15,43	0,00		17,05	17,05	10,42	
	63,30	39,54	52,38		0,00	0,00	35,66		16,14	17,05	10,42	
Proband C	13,24	12,60	24,78	6,84	0,00	0,00	0,00	0,00	6,22	5,65	6,77	7,31
	4,60	20,29	15,49	10,04	0,00	18,46	0,00	0,00	5,08	11,41	6,22	3,87
	16,45	9,40	27,99		0,00	0,00	0,00		6,22	6,22	15,22	
	9,72	4,92	37,29		0,00	0,00	0,00		5,08	5,08	17,95	
	11,32	8,12	27,35	4,60	0,00	0,00	0,00	0,00	6,22	5,08	10,42	6,22
	19,33	5,56	34,09	9,40	0,00	0,00	0,00	0,00	6,22	6,22	9,41	8,38
Proband D	18,08	18,79	20,91	38,91	0,00	0,00	0,00	0,00	5,90	11,46	7,37	20,06
	39,29	28,85	34,03	43,10	13,21	0,00	0,00	0,00	11,46	8,78	5,90	16,49
	10,45	71,38	62,00	34,77	0,00	0,00	0,00	0,00	8,78	14,02	10,14	15,27
	43,10	81,39	97,66	69,32	0,00	0,00	18,66	0,00	11,46	18,89	11,46	20,06
		121,20		11,14		30,57		0,00		49,81		5,90
		121,20		11,14		0,00		0,00		46,80		5,90
Proband E	21,98		41,19	2,97	0,00		23,65	0,00	15,27		29,07	5,90
	17,73		37,78	12,86	0,00		0,00	6,88	15,27		25,76	12,76
	5,01	45,41	69,73	2,27	0,00	0,00	0,00	0,00	7,37	32,31	21,23	4,35
	9,09	21,98	43,49	2,97	0,00	0,00	0,00	0,00	10,14	18,30	16,49	5,90
	9,09	20,20	7,73	9,09	0,00	0,00	0,00	18,66	10,14	26,87	8,78	8,78
	10,11	10,45	14,24	13,20	0,00	0,00	6,88	0,00	11,46	20,06	8,78	9,46
Proband F	75,94	31,80	33,66	45,80	21,20	23,65	18,66	0,00	11,46	4,35	10,14	7,37
	37,02	21,98	10,11	95,92	0,00	0,00	0,00	0,00	5,90	5,90	2,66	8,08
	87,75		43,10	23,05	0,00		18,66	18,66	2,66		11,46	5,90
	25,94		41,57	17,38	0,00		32,77	2,91	1,73		11,46	4,35
	57,98	15,28	24,49		6,88	18,66	0,00		12,76	4,35	8,78	
	44,64	6,03	34,40		0,00	0,00	13,21		7,37	2,66	7,37	

	Eotaxin				FGF-2				GM-CSF			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	14,91		12,62	16,99	429,39		159,67	225,63	0,00		0,00	0,00
	14,91		18,92	14,91	433,97		280,01	237,09	0,00		0,00	0,00
	12,62	10,02	20,73	20,73	326,60	278,67	258,59	471,22	0,00	0,00	15,11	1,20
	10,02	13,80	25,67	20,73	333,89	391,32	251,88	442,48	0,00	0,00	13,71	4,61
	10,02	12,62	21,60	18,92	296,69	341,18	188,37	319,96	0,00	0,00	8,88	4,61
	6,85	12,62	17,97	18,92	194,49	413,66	206,02	268,64	0,00	0,00	0,00	0,00

Proband B	12,62	10,02	6,85	6,85	122,42	253,23	193,81	90,25	0,00	0,00	0,00	0,00
	13,80	12,62	10,02	6,85	90,25	373,54	191,09	120,33	0,00	8,88	8,88	0,00
		10,02	10,02	6,85		231,03	212,80	109,88		0,00	0,00	0,00
		11,37	12,62	6,85		269,98	204,67	182,92		1,20	8,88	0,00
	12,62	10,02	12,62		197,88	404,47	285,35		4,61	0,00	0,00	
12,62	10,02	10,02		208,73	379,47	217,53		4,61	8,88	0,00		
Proband C	6,85	6,85	6,85	6,85	101,49	141,79	77,52	136,27	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,85	10,02	6,85	8,54	81,78	187,01	80,36	136,27	0,00	4,61	0,00	0,00
	6,85	1,52	6,85		150,06	93,07	93,07		0,00	0,00	0,00	
	12,62	6,85	12,62		114,07	107,79	70,41		4,61	0,00	0,00	
	6,85	6,85	10,02	6,85	109,88	87,43	121,03	158,99	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,85	6,85	10,02	6,85	136,27	82,48	60,40	185,64	0,00	0,00	0,00	0,00
Proband D	6,79	4,56	6,79	4,56	214,90	235,55	191,21	241,93	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,79	4,56	4,56	4,56	274,74	233,96	272,33	288,41	4,64	0,00	0,00	0,00
	4,56	6,79	4,56	6,79	138,12	273,93	135,03	332,86	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,79	6,79	4,56	8,83	188,85	256,30	208,57	358,07	0,00	0,00	0,00	6,54
		8,83		4,56		265,91		221,24		0,00		0,00
	6,79		4,56		206,99		446,60		0,00		0,00	
Proband E	8,83		8,83	4,56	152,86		83,14	56,33	2,27		2,27	0,00
	10,74		7,83	6,79	162,99		28,80	95,22	4,64		0,00	6,54
	6,79	14,31	12,56	1,94	106,63	216,49	159,09	30,22	2,27	17,34	6,54	0,00
	4,56	6,79	8,83	1,94	103,58	242,72	108,92	37,38	2,27	0,00	2,27	0,00
	6,79	12,56	4,56	6,79	100,54	87,66	85,40	74,14	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,79	8,83	6,79	6,79	99,78	62,24	105,10	71,16	0,00	0,00	0,00	0,00
Proband F	6,79	6,79	6,79	6,79	290,02	366,22	128,86	262,71	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,79	4,56	4,56	6,79	246,71	311,00	108,15	309,38	0,00	0,00	0,00	0,00
	5,70		8,83	6,79	341,79		197,51	397,28	0,00		8,21	2,27
	4,56		10,74	8,83	180,99		141,99	484,62	0,00		2,27	0,00
	6,79	4,56	4,56		214,90	328,81	286,80		0,00	0,00	0,00	
4,56	1,94	6,79		230,78	254,70	379,28		0,00	0,00	0,00		

	GRO α				HGF				IFN α			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A					540,29		544,48	369,97	0,00		0,00	0,00
					460,05		510,85	521,38	0,00		0,00	0,00
					565,42	219,79	743,01	775,64	0,00	0,00	0,00	0,00
					508,74	265,77	822,33	717,44	0,00	0,00	0,00	0,00
					247,91	281,31	673,28	640,25	0,00	0,00	0,00	0,00
				291,27	242,31	565,42	756,28	0,00	0,00	0,00	0,00	
Proband B	43,37	27,41	21,43	27,41	125,08	233,32	178,74	105,99	0,00	0,00	0,00	0,00
	39,38	19,43	0,00	7,43	121,52	242,31	198,21	93,91	0,00	0,00	0,00	0,00
		23,42	23,42	23,42		125,08	275,77	111,98		0,00	0,00	0,00
		23,42	0,00	11,44		169,52	231,07	108,39		0,00	0,00	0,00
Proband C	45,37	43,37	19,43		322,06	237,82	215,26		0,00	0,00	0,00	
	27,41	33,40	31,40		280,21	233,32	184,49		0,00	0,00	0,00	
	15,44	27,41	15,44	11,44	276,88	160,25	164,89	155,60	0,00	0,00	0,00	0,00
	19,43	27,41	19,43	11,44	237,82	194,79	226,56	127,45	0,00	0,00	0,00	0,00
	15,44	3,40	27,41		183,34	129,81	103,58		0,00	0,00	0,00	
	31,40	0,00	27,41		123,89	161,41	127,45		0,00	0,00	0,00	
Proband D	27,41	11,44	31,40	15,44	181,04	129,81	136,89	249,03	0,00	0,00	0,00	0,00
	21,43	23,42	23,42	31,40	174,14	148,61	174,14	203,91	0,00	0,00	0,00	0,00
	7,14	18,39	28,56	33,43	188,90	102,71	201,71	91,89	0,00	0,00	0,00	0,00
	28,56	23,56	23,56	18,39	200,55	103,91	264,09	82,23	0,00	0,00	0,00	0,00
12,97	18,39	52,12	23,56	208,68	79,80	237,61	139,61	0,00	0,00	0,00	0,00	
7,14	33,43	61,16	38,21	223,75	89,48	199,38	125,39	0,00	0,00	0,00	0,00	
	52,12		33,43		132,51		115,86		0,00		0,00	
	52,12		28,56		139,61		84,65		0,00		0,00	

Proband E	23,56		45,23	18,39	141,97		103,91	118,25	0,00		0,00	0,00
	23,56		33,43	28,56	149,05		113,48	132,51	0,00		0,00	0,00
	31,01	47,54	45,23	31,01	235,30	144,33	242,23	45,43	0,00	1,39	0,00	0,00
	18,39	21,00	18,39	23,56	212,16	134,87	237,61	68,85	0,00	0,00	0,00	0,00
	38,21	28,56	12,97	54,40	111,09	109,89	149,05	85,86	0,00	0,00	0,00	0,16
	23,56	26,08	18,39	33,43	113,48	106,31	133,69	76,16	0,00	0,00	0,00	0,24
Proband F	47,54	33,43	65,62	23,56	208,68	146,69	137,24	181,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	7,14	23,56	23,56	33,43	156,12	115,86	125,39	216,80	0,00	0,00	0,00	0,00
	18,39		35,83	33,43	403,94		115,86	212,16	0,00		0,00	0,00
	18,39		47,54	31,01	300,73		114,67	230,68	0,00		0,00	0,00
	52,12	28,56	33,43		209,84	108,70	149,05		0,00	0,00	0,00	
	12,97	0,00	31,01		160,82	77,37	141,97		0,00	0,00	0,00	

	IFN γ				IL-1 α				IL-1 β			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	8,64		0,85	19,07	0,08		0,54	1,23				
	11,25		4,74	0,00	1,12		1,01	0,59				
	6,04	8,64	26,91	21,68	1,01	0,80	1,33	1,66				
	6,04	15,16	22,99	16,46	0,49	1,66	0,91	1,98				
	3,44	11,25	17,77	13,85	0,49	1,12	2,42	2,42				
	0,00	13,85	9,94	16,46	0,00	0,80	0,59	1,66				
Proband B	19,07	11,25	8,64	6,04	0,91	0,38	1,33	0,28	4,55	1,61	2,35	1,61
	19,07	19,07	8,64	3,44	1,71	1,71	1,39	0,33	3,09	0,84	1,61	0,00
		19,07	16,46	3,44		1,33	1,66	1,87		2,35	1,98	0,84
		19,07	11,25	8,64		1,44	0,59	1,44		0,84	2,35	0,00
	19,07	13,85	19,07		1,44	2,26	2,75		5,64	4,55	3,45	
	19,07	19,07	26,91		0,70	1,44	1,01		3,82	3,82	3,82	
Proband C	6,04	15,16	0,85	11,25	1,66	1,07	1,98	1,44	1,23	0,84	0,84	1,61
	3,44	29,52	0,85	16,46	1,01	1,33	0,91	1,23	1,61	3,09	1,61	1,61
	3,44	3,44	8,64		1,12	0,00	0,91		1,23	0,00	1,61	
	21,68	0,00	16,46		1,23	0,00	0,91		4,55	0,00	1,23	
	8,64	6,04	11,25	0,85	1,07	1,33	2,20	1,12	1,61	0,84	5,27	0,00
	16,46	6,04	13,85	8,64	1,12	0,64	1,33	1,33	3,09	0,84	3,09	1,61
Proband D	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,27	0,27	1,06	0,00	0,00	0,35	0,35
	6,03	0,00	0,00	0,00	1,06	0,80	0,27	0,93	0,71	0,00	0,35	0,00
	0,00	6,03	0,00	0,00	0,00	1,19	1,06	0,80	0,00	1,08	1,08	0,00
	6,03	7,15	1,76	3,85	0,01	0,67	0,80	2,11	0,00	0,35	1,47	1,87
		3,85		0,00		0,93		0,27		2,68		0,35
		6,03		0,00		0,93		0,27		1,08		0,71
Proband E	3,85		7,15	0,00	1,32		0,80	0,00	1,08		1,87	0,00
	6,03		8,28	15,29	1,32		0,54	1,72	2,68		1,87	1,87
	0,00	14,10	11,75	3,85	0,27	3,48	1,98	0,67	0,00	3,51	1,08	0,71
	0,00	1,76	6,03	0,00	0,86	0,67	0,27	1,72	0,00	0,35	1,08	0,00
	0,00	10,58	0,00	9,43	0,00	2,04	0,54	1,85	1,08	1,08	0,00	1,87
	8,28	1,76	1,76	8,28	0,27	0,34	1,32	1,98	0,01	0,00	0,35	2,68
Proband F	1,76	2,79	8,28	0,00	1,59	3,28	0,67	0,60	1,87	0,35	2,68	0,00
	0,00	0,00	0,00	1,76	0,27	2,11	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00	0,35
	0,00		10,58	15,29	0,93		2,11	1,52	0,00		1,87	0,00
	0,00		12,92	10,58	0,00		1,98	1,85	0,00		1,87	0,00
	10,58	6,03	1,76		1,85	1,59	1,32		2,68	1,87	1,08	
	0,00	0,00	8,28		0,80	1,32	2,50		0,00	0,00	1,08	

	IL-1RA				IL-2				IL-4			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	7530,66		10058,67	1129,48	15,19		15,19	11,20	0,00		2,11	89,02
	9630,32		10058,67	1539,65	11,20		15,19	15,19	27,42		19,29	10,94
	15334,07	3688,68	3269,89	3828,52	11,20	11,20	21,09	18,35	0,00	19,29	58,74	35,39
	14217,73	3339,61	3548,96	9416,30	4,04	13,34	23,54	15,19	0,00	10,94	35,39	35,39
	7069,61	3269,89	4388,93	3688,68	4,04	15,19	15,19	21,09	0,00	0,00	66,38	39,33
	7850,20	3898,48	2435,94	2887,01	11,20	15,19	13,34	15,19	0,00	10,94	19,29	43,25
Proband B	3200,20	1608,26	1952,22	320,89	11,20	15,19	15,19	11,20	66,38	10,94	19,29	0,00
	3235,04	2574,55	2021,18	722,60	11,20	23,54	23,54	11,20	51,03	54,89	0,00	2,11
		554,40	3618,81	453,99		15,19	18,35	11,20		58,74	19,29	2,11
		823,94	3060,92	1061,41		15,19	21,09	11,20		43,25	0,00	27,42
	8490,13	1780,06	3200,20		18,35	18,35	15,19		31,42	66,38	51,03	
5443,76	1061,41	2713,33		15,19	21,09	15,19		19,29	19,29	51,03		
Proband C	1986,69	655,20	993,43	857,78	4,04	11,20	4,04	15,19	2,11	19,29	2,11	19,29
	1471,10	1436,85	925,55	790,13	4,04	18,35	11,20	11,20	2,11	51,03	0,00	10,94
	2366,70	254,76	1539,65		4,04	11,20	4,04		19,29	0,00	2,11	
	1129,48	387,32	1471,10		11,20	4,04	11,20		58,74	0,00	43,25	
	2401,32	320,89	1676,93	655,20	11,20	15,19	13,34	11,20	10,94	0,00	43,25	0,00
	3933,47	320,89	1231,76	587,96	11,20	11,20	15,19	11,20	51,03	0,00	19,29	15,15
Proband D	5050,91	0,00	2799,42	1118,48	12,15	9,40	9,40	9,40	0,00	0,00	0,00	14,63
	5751,78	201,56	2587,68	850,68	14,66	9,40	12,15	6,27	24,66	0,00	0,00	14,63
	5834,10	1118,48	3514,13	3430,41	9,40	6,27	9,40	9,40	0,00	24,66	0,00	0,00
	7806,28	1426,60	3514,13	4181,17	14,66	9,40	6,27	14,66	14,63	4,15	34,45	39,28
		2417,69		345,33		10,81		9,40		39,28		4,15
	2075,89		760,44		9,40		6,27		34,45		0,00	
Proband E	3514,13		578,09	669,60	12,15		9,40	6,27	53,60		58,32	0,00
	3010,40		485,76	2118,76	14,66		6,27	9,40	81,64		53,60	63,02
	1557,52	4388,75	2417,69	1206,93	9,40	14,66	14,66	6,27	0,00	109,15	81,64	53,60
	1206,93	2672,47	1903,94	1029,65	9,40	6,27	12,15	6,27	0,00	0,00	24,66	9,48
	1470,31	1118,48	805,63	1118,48	9,40	9,40	9,40	6,27	44,08	81,64	0,00	63,02
	1557,52	669,60	1295,04	1470,31	9,40	9,40	9,40	9,40	24,66	14,63	48,86	63,02
Proband F	5998,68	1990,01	1470,31	578,09	6,27	6,27	2,20	6,27	39,28	14,63	53,60	24,66
	5422,23	2075,89	985,08	439,24	6,27	2,20	2,20	6,27	0,00	0,00	0,00	4,15
	4305,76		940,40	1338,97	6,27		6,27	6,27	0,00		77,01	34,45
	3514,13		1029,65	1557,52	6,27		6,27	6,27	0,00		81,64	53,60
	3681,33	1644,47	1206,93		2,20	6,27	6,27		48,86	24,66	24,66	
	4430,23	1382,82	1731,18		6,27	2,20	6,27		0,00	0,00	72,36	

	IL-5				IL-6				IL-7			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	14,21		5,51	10,00					0,82		0,00	0,47
	10,00		10,00	10,00					0,64		0,99	0,28
	5,51	10,00	22,17	14,21					0,00	0,28	0,99	0,90
	5,51	14,21	14,21	22,17					0,00	0,64	1,64	0,82
	5,51	14,21	14,21	10,00					0,00	0,00	1,07	1,15
	10,00	14,21	14,21	14,21					0,00	0,28	0,47	0,47
Proband B	5,51	5,51	10,00	5,51	424,75	520,21	298,02	291,15	1,15	0,08	0,28	0,28
	10,00	10,00	10,00	0,20	390,71	1028,34	509,96	605,40	0,00	0,82	0,82	0,82
		5,51	5,51	5,51		307,12	412,05	288,85		0,08	0,28	0,00
		10,00	5,51	5,51		386,42	347,29	540,62		0,64	0,37	0,55
	10,00	10,00	5,51		550,79	407,80	345,09		1,07	0,08	0,64	
5,51	5,51	10,00		390,71	338,46	286,54		0,08	0,18	0,28		
Proband C	5,51	0,20	5,51	10,00	186,32	236,83	70,75	148,07	0,00	0,47	0,28	0,37
	5,51	5,51	5,51	5,51	159,33	347,29	78,25	175,70	0,08	0,55	0,00	0,99
	5,51	5,51	7,80		279,60	175,70	105,72		0,00	0,00	0,08	
	5,51	0,20	10,00		241,68	181,04	130,57		0,00	0,00	0,28	
	10,00	5,51	18,26	5,51	246,51	196,75	130,57	121,49	0,28	0,28	0,28	0,55
	10,00	5,51	14,21	10,00	345,09	173,01	102,46	173,01	0,08	0,08	1,07	0,00

Proband D	7,22	7,22	7,22	5,82	660,39	297,66	670,97	303,24	0,00	0,66	0,00	0,40
	7,22	4,45	7,22	7,22	1221,68	342,11	660,39	314,38	0,30	0,00	0,11	0,99
	7,22	7,22	7,22	7,22	473,27	553,97	561,99	655,10	0,00	0,99	0,00	0,00
	5,82	7,22	7,22	10,04	1092,97	607,33	734,24	1185,67	0,48	0,83	0,11	0,30
		7,22		10,04		628,59		235,77		0,30		0,00
	7,22		7,22		586,03		280,88		0,00		0,30	
Proband E	10,04		10,04	10,04	319,94		241,44	325,49	0,30		0,00	0,00
	10,04		7,22	10,04	306,03		235,77	484,08	0,83		0,66	0,83
	7,22	10,04	7,22	7,22	169,83	187,18	413,51	98,98	0,11	1,08	0,11	0,83
	7,22	7,22	7,22	4,45	184,29	95,97	275,27	131,78	0,00	0,30	0,00	0,00
	4,45	4,45	7,22	4,45	195,81	119,93	161,10	303,24	0,00	0,48	0,00	0,00
	4,45	4,45	7,22	7,22	190,06	95,97	308,81	235,77	0,00	0,00	0,00	0,00
Proband F	7,22	7,22	4,45	7,22	948,21	548,62	224,41	264,03	0,00	0,00	0,11	0,00
	5,82	7,22	7,22	7,22	828,55	424,42	98,98	325,49	0,00	0,00	0,00	0,00
	7,22		7,22	4,45	1041,36		190,06	369,68	0,00		0,11	0,30
	7,22		10,04	7,22	692,10		166,92	397,11	0,00		0,30	0,30
	7,22	7,22	7,22		744,75	446,18	172,73		0,11	0,00	0,00	
	7,22	7,22	7,22		575,35	269,65	269,65		0,00	0,00	0,21	

	IL-8				IL-9				IL-10			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A					3,80		3,80	2,54				
					2,54		7,15	1,37				
					1,95	5,10	10,72	6,46				
					0,33	3,80	6,46	6,46				
					1,37	1,37	9,99	5,10				
					0,00	2,54	6,46	10,72				
Proband B	64,07	91,95	48,60	22,86	10,72	3,80	4,44	5,10	3,85	7,05	11,18	5,67
	60,58	198,64	57,12	40,28	9,99	6,46	0,00	9,27	9,96	12,11	10,87	3,85
		64,07	51,98	46,92		5,10	2,54	3,16		6,22	15,64	13,37
		79,19	38,64	87,36		3,80	0,00	5,10		11,18	10,57	9,66
	207,92	121,09	51,13		7,85	12,20	7,85		13,06	12,42	24,95	
174,22	104,03	60,58		9,27	5,10	12,95		7,62	11,18	14,34		
Proband C	91,95	50,29	51,13	22,10	2,54	2,54	5,10	1,37	8,19	5,41	11,80	3,85
	72,91	67,59	53,69	37,01	1,37	7,85	6,46	0,33	4,62	5,41	4,88	3,85
	48,60	24,38	38,64		3,80	3,80	9,27		6,49	6,77	4,36	
	104,97	16,91	44,41		7,85	0,00	3,80		5,41	3,36	5,41	
	43,58	22,10	55,40	37,83	3,80	3,80	5,10	0,00	7,90	8,78	5,41	4,88
	73,80	20,60	39,46	62,32	4,44	3,80	7,85	7,85	5,41	4,62	3,85	5,94
Proband D	30,88	19,60	25,05	20,92	0,93	1,80	2,78	0,23	7,92	1,70	9,29	4,03
	48,67	23,65	25,05	20,92	9,43	1,80	2,28	4,99	13,57	9,29	9,29	5,61
	27,92	30,88	33,94	25,05	0,93	4,41	8,10	4,99	4,03	9,64	7,92	4,03
	64,89	35,49	41,93	35,49	6,19	2,78	12,94	6,19	12,85	4,34	10,70	9,29
		48,67		14,57		10,11		8,76		4,65		6,92
	40,29		18,30		11,51		0,93		6,59		5,29	
Proband E	35,49		27,92	69,64	6,19		7,45	2,78	18,83		8,95	0,68
	33,94		17,02	92,71	11,51		11,51	10,11	24,30		6,92	12,48
	45,26	52,15	76,45	25,05	6,19	13,67	8,76	10,11	18,44	25,90	21,15	2,26
	37,07	22,96	45,26	19,60	0,23	3,31	4,99	3,85	25,50	12,85	14,31	11,76
	30,88	23,65	18,30	41,10	6,19	12,22	0,00	14,41	8,95	17,30	9,29	11,41
	35,49	19,60	37,07	35,49	8,76	6,82	3,85	12,22	10,70	8,26	12,85	11,41
Proband F	126,73	37,07	70,60	48,67	10,80	8,76	12,22	2,78	7,25	4,65	5,29	5,29
	112,08	30,88	33,94	86,50	6,19	2,78	2,78	2,78	2,83	4,65	1,70	6,59
	264,10		36,28	75,46	0,93		15,92	7,45	21,15		7,92	4,65
	88,56		42,75	107,68	1,80		15,92	6,82	15,05		7,25	4,65
	121,03	39,48	50,40		12,94	11,51	5,58		15,80	5,29	7,25	
	105,50	15,78	80,43		0,23	2,28	6,19		9,99	6,59	7,25	

	IL-12p70				IL-13				IL-15			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	0,00		0,00	0,00	0,00		0,00	7,31	5,43		0,00	0,00
	0,00		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		12,52	1,54
	0,00	0,00	1,03	0,02	0,00	0,00	5,90	12,40	5,43	8,15	17,90	10,45
	0,00	0,00	0,48	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	1,54	14,43	13,49	0,00
	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	8,52	0,00	8,15	5,43	5,43
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,90	0,00	8,52	0,00	0,00	1,54	16,21
Proband B	0,00	0,00	0,00	0,00	15,56	0,00	0,00	0,00	16,21	14,43	14,43	5,43
	0,48	0,00	0,02	0,00	10,60	0,00	0,00	0,00	25,37	23,98	16,21	25,37
		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		8,15	14,43	0,00
		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		26,73	17,90	17,90
	0,00	0,02	0,00		12,40	5,90	8,52		17,06	12,52	14,43	
	0,00	0,00	0,23		5,90	10,60	11,53		14,43	17,06	12,52	
Proband C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,54	0,00	0,00
	0,00	0,48	0,00	0,00	0,00	11,53	0,00	0,00	0,00	1,54	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	
	0,23	0,00	0,00		8,52	0,00	0,00		0,00	0,00	10,45	
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,90	0,00	0,00	0,00	8,15	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proband D	2,26	2,37	2,48	2,71	0,00	0,00	0,00	0,00	2,64	5,08	1,23	6,21
	2,95	2,48	2,26	2,71	6,60	0,00	0,00	0,35	9,88	5,08	10,38	7,83
	2,26	2,71	2,48	2,48	0,00	1,54	0,35	0,00	1,23	7,30	5,08	7,30
	2,71	2,95	3,07	2,71	4,26	1,54	6,60	5,07	12,81	5,08	10,38	9,38
		2,95		2,71		6,60		0,00		6,21		5,08
		3,43		2,71		5,07		0,00		8,35		5,08
Proband E	2,95		3,19	2,48	4,26		5,07	0,00	9,38		9,38	2,64
	2,95		2,95	3,19	5,07		5,07	6,60	11,36		7,30	9,38
	2,48	4,19	2,95	3,07	0,00	6,60	1,54	6,60	6,21	16,06	13,28	7,83
	2,48	2,48	2,71	2,37	0,00	0,00	1,54	0,00	7,30	2,64	6,76	8,87
	2,71	3,19	2,26	2,95	3,42	8,05	0,00	8,05	3,90	8,87	3,29	6,21
	3,19	2,48	2,71	2,95	1,54	0,00	0,00	3,42	3,90	6,21	5,65	5,08
Proband F	2,95	2,71	3,19	2,48	6,60	0,00	5,85	0,00	5,08	1,97	2,64	3,90
	2,48	2,60	2,26	2,71	0,00	0,00	0,00	0,00	2,64	0,00	3,29	2,64
	2,48		3,68	2,71	0,00		3,42	3,42	2,64		8,87	4,50
	2,04		3,80	2,71	0,00		7,34	3,42	2,64		11,36	3,29
	2,95	2,71	2,95		8,05	6,60	0,00		7,30	7,30	6,21	
	2,48	2,04	2,71		0,00	0,00	3,42		3,90	2,64	3,90	

	IL-17a				IL-18				IL-21			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A					16,86		0,87	29,38	3,34		0,00	29,10
					25,37		33,27	0,87	29,10		0,00	15,11
					16,86	25,37	61,83	38,94	0,00	10,44	32,09	15,11
					21,21	25,37	65,19	31,34	0,00	0,00	29,10	17,15
					12,25	16,86	46,23	40,78	0,00	0,00	29,10	25,96
					0,00	25,37	12,25	37,07	0,00	0,00	0,00	15,11
Proband B	1,77	1,77	4,87	1,77	40,78	16,86	21,21	0,00	30,61	0,00	12,90	0,00
	4,87	1,77	9,64	1,77	40,78	25,37	25,37	9,79	25,96	3,34	0,00	0,00
		1,77	1,77	0,00		16,86	29,38	12,25		0,00	25,96	15,11
		4,87	9,64	0,00		33,27	25,37	21,21		15,11	0,00	0,00
	4,87	1,77	7,38		33,27	40,78	40,78		10,44	24,33	27,55	
	1,77	1,77	1,77		33,27	33,27	37,07		3,34	10,44	32,09	
Proband C	0,00	7,38	1,77	7,38	7,18	21,21	0,87	16,86	0,00	0,00	0,00	3,34
	1,77	7,38	4,87	4,87	16,86	51,54	12,25	12,25	0,00	32,09	15,11	0,00
	4,87	7,38	4,87		0,87	9,79	12,25		0,00	0,00	0,00	
	1,77	4,87	8,54		12,25	0,00	31,34		15,11	0,00	3,34	
	4,87	4,87	11,73	9,64	0,87	7,18	12,25	0,00	0,00	0,00	22,65	0,00
	4,87	7,38	11,73	7,38	29,38	0,87	7,18	16,86	0,00	0,00	3,34	12,90

Proband D	4,09	6,17	6,17	1,73	0,00	0,11	4,38	8,19	0,00	0,00	0,00	3,95
	8,09	1,73	4,09	1,73	15,38	0,00	0,11	0,00	10,85	0,00	0,00	7,38
	1,73	1,73	1,73	1,73	0,00	4,38	4,38	0,00	0,00	0,00	0,61	0,61
	8,09	4,09	1,73	8,09	13,62	15,38	22,26	20,56	0,61	0,00	3,95	12,02
		1,73		6,17		17,12		0,11		7,38		5,09
	4,09		0,00		8,19		0,00		7,38		0,00	
Proband E	4,09		4,09	4,09	18,85		18,85	15,38	9,69		9,69	0,61
	6,17		4,09	6,17	15,38		15,38	46,69	5,09		5,09	7,38
	1,73	13,39	4,09	1,73	0,11	54,54	48,27	4,38	0,00	21,43	12,02	0,00
	1,73	4,09	6,17	1,73	4,38	15,38	38,71	0,00	0,00	0,00	5,09	0,00
	1,73	6,17	1,73	1,73	11,83	38,71	0,00	25,62	0,61	15,53	2,82	14,36
	1,73	1,73	1,73	4,09	8,19	22,26	2,36	15,38	3,95	0,61	5,09	5,09
Proband F	6,17	2,97	4,09	6,17	15,38	4,38	25,62	11,83	19,07	9,69	19,07	7,38
	1,73	1,73	1,73	6,17	0,11	0,11	0,00	6,31	0,00	5,09	0,00	16,71
	1,73		11,68	4,09	8,19		43,51	48,27	0,00		28,57	10,85
	1,73		9,02	2,97	0,00		32,23	38,71	0,00		23,81	52,67
	4,09	4,09	4,09		20,56	15,38	18,85		10,85	16,71	16,71	
	1,73	1,73	1,73		8,19	0,00	23,94		0,00	0,00	14,36	

	IL-22				IL-23				IL-27			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	0,00		0,00	20,29	21,01		26,57	37,46	0,00		0,00	11,79
	17,71		9,75	0,00	15,33		15,33	15,33	0,00		0,00	0,00
	12,45	0,00	52,22	12,45	21,01	32,05	29,32	32,05	0,00	23,61	5,99	17,67
	0,00	1,01	27,87	0,00	15,33	32,05	32,05	29,32	0,00	11,79	0,00	11,79
	0,00	0,00	47,43	17,71	15,33	32,05	29,32	29,32	0,00	0,37	17,67	17,67
	0,00	1,01	6,99	22,84	9,45	15,33	34,76	42,81	0,00	11,79	0,00	17,67
Proband B	17,71	1,01	6,99	0,00	34,76	32,05	37,46	37,46	41,64	11,79	23,61	0,37
	32,84	17,71	0,00	1,01	63,88	26,57	9,45	9,45	47,70	29,59	0,00	0,00
		25,36	1,01	1,01		23,80	42,81	23,80		11,79	41,64	0,00
		22,84	0,00	0,00		37,46	26,57	3,17		23,61	0,00	0,37
	4,11	27,87	40,18		53,41	37,46	42,81		47,70	47,70	47,70	
0,00	12,45	9,75		42,81	37,46	53,41		0,00	35,60	38,61		
Proband C	1,01	4,11	1,01	0,00	15,33	32,05	37,46	18,19	0,00	23,61	0,00	0,00
	0,00	27,87	0,00	0,00	26,57	34,76	37,46	15,33	0,00	29,59	0,00	17,67
	0,00	0,00	0,00		26,57	21,01	37,46		11,79	0,00	0,00	
	12,45	0,00	6,99		48,13	15,33	42,81		41,64	0,00	0,00	
	1,01	0,00	9,75	0,00	32,05	29,32	40,14	21,01	0,00	0,00	35,60	0,00
	0,00	0,00	1,01	0,00	42,81	37,46	48,13	53,41	29,59	0,00	0,37	5,99
Proband D	0,00	1,25	3,55	25,31	28,32	23,57	28,32	14,45	0,00	0,00	0,00	18,55
	12,02	0,00	0,00	9,01	25,93	18,94	18,94	23,57	18,55	0,00	0,00	59,23
	6,17	12,02	4,83	6,17	33,17	18,94	38,11	23,57	0,00	0,00	0,00	0,00
	12,02	15,18	18,45	21,83	12,26	10,12	28,32	28,32	34,61	10,70	34,61	14,60
		25,31		4,83		28,32		33,17		34,61		18,55
	15,18		1,25		30,73		23,57		42,76		3,07	
Proband E	23,56		12,02	0,00	28,32		33,17	6,02	6,84		34,61	0,00
	12,02		18,45	21,83	18,94		21,24	28,32	55,09		34,61	42,76
	6,17	47,79	12,02	9,01	16,68	43,13	23,57	10,12	0,00	10,70	0,00	18,55
	3,55	10,50	6,17	12,02	14,45	18,94	16,68	18,94	0,00	0,00	10,70	3,07
	12,02	25,31	3,55	21,83	33,17	21,24	16,68	45,67	3,07	50,97	0,00	67,53
	9,01	1,25	15,18	9,01	18,94	18,94	43,13	38,11	10,70	0,00	26,54	10,70
Proband F	64,00	32,51	28,87	21,83	50,79	23,57	40,61	10,12	59,23	34,61	42,76	0,00
	12,02	6,17	1,25	25,31	10,12	12,26	28,32	30,73	0,00	0,00	0,00	3,07
	12,02		43,87	27,08	10,12		33,17	23,57	0,00		34,61	3,07
	6,17		43,87	43,87	8,04		38,11	45,67	0,00		34,61	0,00
	40,02	25,31	15,18		38,11	23,57	33,17		42,76	26,54	0,00	
	12,02	3,55	36,23		8,04	0,61	18,94		0,00	0,00	18,55	

	IL-31				IP10				LIF			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A					203,59		137,02	151,57				
					203,59		289,63	148,93				
					139,67	198,44	229,16	211,29				
					142,32	241,86	249,45	190,70				
					201,01	201,01	289,63	213,85				
Proband B	27,75	3,06	9,93	33,29	84,22	78,67	137,02	164,70	20,29	20,29	27,66	11,54
	36,01	22,06	0,00	6,62	57,54	119,65	146,29	309,54	13,54	31,24	38,27	5,19
		3,06	16,15	16,15		60,39	146,29	167,31		16,48	29,46	14,53
		16,15	3,06	3,06		75,88	169,92	263,32		22,16	28,56	16,48
	27,75	33,29	27,75		122,33	182,93	162,08		34,78	22,16	20,29	
Proband C	19,14	16,15	33,29		111,56	154,20	139,67		26,75	27,66	16,48	
	0,00	22,06	0,00	16,15	38,67	54,67	63,23	58,96	9,49	6,30	1,60	8,44
	9,93	22,06	16,15	0,00	32,73	67,47	73,09	56,11	7,38	14,53	7,38	6,30
	0,00	9,93	3,06		35,71	35,71	133,02		9,49	0,15	6,30	
	3,06	0,00	0,00		78,67	35,71	151,57		12,54	4,04	10,52	
Proband D	9,93	16,15	22,06	0,00	35,71	44,55	175,14	37,19	10,52	6,30	10,52	4,04
	27,75	3,06	27,75	16,15	47,46	41,62	122,33	35,71	14,53	4,04	7,38	4,04
	0,00	0,00	0,00	0,00	48,30	49,82	86,53	57,54	14,25	14,25	22,86	8,36
	0,00	5,74	0,00	10,38	57,54	57,54	132,85	51,35	12,30	6,36	38,72	10,34
	10,38	1,06	12,68	1,06	33,50	63,82	113,62	27,82	10,34	4,32	25,69	6,36
Proband E	1,06	10,38	10,38	5,74	57,54	70,20	191,07	62,24	18,10	6,36	36,87	12,30
		19,58		8,06		42,28		39,32		8,36		7,36
		5,74		0,00		45,28		39,32		10,34		7,36
	10,38		14,99	0,00	86,53		76,67	42,28	21,91		8,36	16,18
	12,68		19,58	10,38	106,75		60,67	94,88	20,01		12,30	24,74
Proband F	0,00	33,30	10,38	10,38	42,28	96,56	257,96	30,64	15,21	18,10	27,56	6,36
	0,00	1,06	1,06	5,74	33,50	65,41	187,34	39,32	16,18	12,30	20,01	8,36
	5,74	19,58	0,00	24,17	59,10	98,25	79,94	63,82	10,34	15,21	18,10	18,10
	5,74	0,00	14,99	28,74	67,00	93,20	115,35	60,67	6,36	4,32	14,25	12,30
	10,38	8,06	1,06	0,00	25,05	25,05	141,73	27,82	12,30	4,32	6,36	10,34
Proband G	0,00	0,00	1,06	1,06	19,64	20,97	79,94	25,05	6,36	2,22	10,34	10,34
	0,00		14,99	0,00	39,32		131,08	33,50	17,14		10,34	6,36
	0,00		19,58	19,58	17,01		120,56	29,23	12,30		8,36	8,36
	21,87	10,38	1,06		30,64	25,05	76,67		12,30	2,22	14,25	
	0,00	0,00	14,99		33,50	17,01	105,04		12,30	8,36	18,10	

	MCP-1				MIP-1 α				MIP-1 β			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	2076,38		748,10	1760,89								
	2027,20		2533,03	1580,56								
	905,97	1371,92	1332,25	2899,22								
	1111,67	1912,06	1328,49	2493,77								
	1479,54	1437,00	1336,43	4610,63								
Proband B	671,76	2224,59	968,49	2504,25								
	795,91	1088,33	510,13	351,63	6,80	10,41	7,06	5,72	87,69	76,49	32,84	22,36
	13,14	2036,67	612,35	928,19	7,94	12,59	7,44	6,00	78,46	152,26	43,97	49,37
		760,79	593,18	415,37		7,82	8,55	6,80		65,30	50,71	56,04
		955,95	565,07	712,93		10,86	7,06	6,27		73,20	38,48	91,66
Proband C	1076,86	955,09	592,22		16,79	11,95	8,43		130,72	89,02	46,68	
	1028,66	792,32	434,50		12,69	13,11	9,27		109,00	79,78	34,98	
	576,75	725,31	221,63	265,29	4,56	3,94	5,44	2,93	59,36	34,27	22,36	29,95
	472,00	1192,71	318,31	437,66	5,15	3,61	5,44	2,18	52,72	57,37	25,47	23,93
	589,32	619,03	422,31		3,45	2,18	2,93		39,86	13,71	19,09	
Proband D	892,85	443,97	376,22		7,06	2,18	3,61		65,30	26,23	25,47	
	511,63	597,03	137,58	278,87	2,18	4,56	2,18	3,61	29,95	19,09	26,99	26,99
	642,71	517,15	122,22	362,32	2,93	2,57	2,18	3,94	34,27	17,38	15,59	29,95

Proband D	1172,10	852,32	446,23	757,16	3,50	3,15	2,78	5,11	21,09	17,30	7,54	26,09
	1689,21	876,77	776,78	996,87	6,14	4,65	3,33	4,17	32,98	21,64	10,03	27,23
	1007,36	2709,25	388,66	731,89	3,15	4,96	2,78	4,17	12,06	29,51	10,03	18,92
	2020,71	2545,96	607,60	1033,22	5,41	4,65	3,15	5,11	26,09	31,82	19,46	35,33
		647,32		748,04		3,15		3,84		27,23		21,64
	586,25		784,49		3,50		2,78		26,66		18,38	
Proband E	1031,82		607,60	2224,82	14,64		12,47	10,16	16,24		20,54	17,30
	1080,12		515,99	3965,23	14,86		10,28	14,86	16,24		14,13	35,33
	820,17	518,87	1250,45	1380,01	15,79	15,38	15,48	7,51	27,23	31,82	40,10	9,02
	674,17	599,07	933,32	1136,94	15,79	13,68	12,91	9,79	22,19	17,30	26,09	9,02
	682,63	634,57	748,74	897,02	12,69	13,79	10,51	9,43	13,09	16,24	9,02	20,54
	965,44	473,97	1482,27	962,65	11,33	11,79	11,10	9,30	17,30	10,03	16,24	16,77
Proband F	1004,56	977,31	747,34	743,13	8,68	1,56	4,80	3,15	41,31	14,13	17,30	27,23
	817,38	873,98	485,60	1031,82	4,49	2,00	2,40	2,40	31,82	22,74	10,03	35,33
	1619,60		703,06	1327,15	4,17		4,17	2,78	52,45		20,54	28,36
	818,08		674,17	1209,46	3,50		3,33	2,40	29,51		20,54	30,66
	897,02	724,87	657,93		5,56	3,15	2,00		31,82	18,38	14,13	
	930,53	410,91	912,38		3,50	1,56	1,33		24,97	13,61	24,97	

	PDGF				PLGF-1				RANTES			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A					18,15		15,73	17,17	57,08		60,76	96,92
					28,82		21,82	14,31	57,81		835,53	72,80
					21,99	11,56	24,92	21,15	30,19	39,73	208,04	65,97
					12,16	25,45	23,36	21,48	30,19	51,26	242,84	56,35
					14,15	18,81	38,45	40,75	39,37	36,10	237,12	82,18
					8,08	15,57	17,66	31,72	22,33	52,35	71,27	58,18
Proband B	1360,59	210,86	214,36	385,68	18,81	9,36	10,22	8,36	426,57	43,33	42,61	49,82
	1543,82	179,06	249,11	337,43	20,98	8,08	12,61	6,72	166,67	128,41	78,62	214,56
		242,20	266,30	462,69		10,96	13,69	10,96		73,57	62,24	54,89
		269,72	252,55	410,41		15,89	12,16	15,73		76,28	60,76	155,76
	575,18	317,27	196,78		23,54	21,82	20,14		84,57	76,67	90,26	
578,36	266,30	186,17		17,17	14,62	13,22		72,80	68,23	79,01		
Proband C	64,00	50,06	102,40	64,00	7,53	5,27	9,50	4,39	23,97	28,67	28,67	21,49
	64,00	39,88	117,34	50,06	7,81	8,64	6,72	8,64	25,57	41,89	27,52	32,43
	94,85	48,05	575,18		8,64	5,66	8,50		42,97	24,37	95,24	
	31,55	60,05	469,19		9,21	1,98	11,11		61,50	21,49	141,71	
	79,57	31,55	393,94	39,88	7,26	9,50	10,81	6,72	27,90	20,63	69,74	17,95
	79,57	27,31	238,73	48,05	4,39	4,15	6,99	5,53	40,45	19,76	57,08	26,35
Proband D	23,65	95,03	15,02	256,59	7,07	5,55	0,00	15,17	53,40	58,31	24,07	128,06
	32,39	113,22	15,02	219,27	14,38	17,31	7,59	22,43	98,87	75,27	24,07	154,56
	19,32	223,93	163,68	242,57	2,09	22,16	10,69	12,79	22,99	183,35	61,04	92,82
	32,39	219,27	200,69	256,59	9,39	18,38	18,11	17,04	62,13	161,20	98,32	199,98
		863,66		23,65		30,09		3,55		275,70		30,56
	742,63		23,65		24,61		13,32		222,18		33,81	
Proband E	108,66		603,00	19,32	8,36		13,85	0,00	54,49		162,86	25,15
	131,50		622,20	19,32	9,65		8,62	7,07	41,42		143,51	39,24
	72,44	540,71	205,33	19,32	3,31	20,27	20,27	0,00	24,07	283,59	126,95	17,06
	54,52	636,62	193,73	23,65	8,62	6,06	10,69	2,57	16,53	104,37	63,23	13,31
	61,22	478,64	79,20	32,39	0,24	7,59	5,05	9,65	19,75	119,24	26,77	35,98
	72,44	402,60	81,45	41,20	3,06	4,05	4,55	6,56	26,23	81,85	68,70	29,48
Proband F	310,51	147,56	149,86	265,94	19,73	13,32	3,55	14,38	126,95	73,63	63,23	59,95
	345,84	117,78	154,46	261,26	7,59	5,30	0,00	22,70	85,14	44,68	22,99	112,07
	233,24		172,91	38,99	28,44		13,06	13,58	70,34		58,86	34,90
	219,27		205,33	41,20	14,38		19,46	14,38	20,83		74,72	46,86
	289,37	131,50	277,65		17,04	7,33	14,38		97,22	31,10	46,86	
	331,70	99,57	294,07		12,27	10,17	12,53		66,51	10,09	99,42	

	SCF				SDF-1 α				TNF α			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	2,02		0,98	1,41	595,79		566,14	707,05				
	2,02		1,82	1,62	695,26		1068,93	683,54				
	1,62	1,41	1,19	2,23	671,89	458,77	799,57	983,18				
	2,13	1,82	1,41	1,82	558,79	610,79	891,74	857,80				
	1,51	1,62	1,41	1,19	400,58	431,15	1005,47	1124,60				
	1,82	1,62	1,62	1,41	458,77	465,74	595,79	783,20				
Proband B	0,98	1,19	1,19	0,76	799,57	377,17	318,41	274,14	2,64	2,64	9,73	2,64
	1,19	1,19	1,62	0,53	588,34	569,82	344,27	508,12	9,73	2,64	9,73	0,00
		0,76	0,98	0,98		417,50	417,50	390,51		2,64	2,64	2,64
		1,19	1,41	0,98		393,86	228,08	511,70		2,64	9,73	2,64
	1,19	1,62	0,76		577,21	544,18	458,77		2,64	2,64	2,64	
	0,98	1,19	0,98		438,02	417,50	383,83		2,64	2,64	2,64	
Proband C	0,76	1,19	0,76	1,30	305,64	261,72	318,41	370,54	2,64	2,64	2,64	9,73
	0,76	1,19	1,19	0,98	237,18	370,54	299,29	318,41	2,64	2,64	2,64	2,64
	0,76	0,76	1,19		324,84	216,04	377,17		2,64	2,64	2,64	
	0,76	0,53	1,41		625,90	228,08	390,51		2,64	2,64	9,73	
	0,76	1,19	1,41	0,98	255,55	267,92	337,77	324,84	9,73	2,64	15,95	2,64
	0,76	0,98	1,19	1,19	267,92	225,06	328,06	264,82	2,64	2,64	9,73	2,64
Proband D	1,63	1,13	0,86	1,13	338,96	295,88	281,98	456,33	12,86	8,85	8,85	8,85
	1,13	0,86	1,13	0,86	468,86	423,63	288,90	415,62	8,85	8,85	8,85	8,85
	1,13	0,86	0,86	0,86	288,90	503,02	292,38	353,80	8,85	4,81	8,85	12,86
	0,59	0,86	0,29	0,99	468,86	490,08	365,09	560,88	8,85	8,85	8,85	8,85
		0,86		0,86		645,98		331,63		8,85		12,86
		0,59		0,59		538,27		346,35		6,84		8,85
Proband E	1,13		0,29	0,59	365,09		473,07	196,99	12,86		8,85	12,86
	1,38		0,00	1,13	353,80		384,21	310,00	8,85		8,85	10,86
	1,38	0,86	0,86	0,29	285,43	597,97	507,36	125,97	8,85	8,85	8,85	4,81
	0,59	1,13	0,86	0,29	278,54	350,07	331,63	181,65	8,85	8,85	8,85	4,81
	0,86	0,59	0,73	0,73	254,86	485,80	268,31	251,53	8,85	4,81	8,85	6,84
	0,86	0,59	0,86	0,59	261,56	346,35	376,51	292,38	8,85	4,81	8,85	8,85
Proband F	0,59	0,59	0,59	1,13	588,59	464,66	485,80	443,94	12,86	4,81	8,85	12,86
	0,44	0,29	0,86	1,13	368,88	384,21	338,96	583,92	4,81	8,85	4,81	12,86
	1,13		1,13	1,38	570,04		560,88	481,54	8,85		8,85	8,85
	0,86		1,13	1,13	331,63		516,11	695,87	8,85		4,81	8,85
	0,59	0,59	1,13		481,54	299,39	448,05		8,85	8,85	12,86	
	0,59	0,59	0,86		380,35	206,35	533,81		8,85	4,81	8,85	

	TNF β				VEGF-A				VEGF-D			
	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24	T1	K1	T24	K24
Proband A	0,62		14,45	5,67	797,63		495,49	593,74	35,20		34,41	42,82
	6,87		29,61	1,74	772,20		746,80	758,29	33,61		0,00	26,07
	14,99	4,19	9,95	5,67	878,89	500,27	1026,18	1685,57	15,46	30,69	39,68	23,46
	0,00	13,93	0,00	3,51	784,31	549,34	1081,11	1318,79	17,09	15,46	25,57	31,97
	4,19	0,45	39,58	30,98	404,91	525,39	1037,77	2212,78	31,12	26,56	38,59	7,83
	0,45	1,74	4,19	16,63	326,71	682,20	864,93	1983,77	15,46	34,81	11,26	28,46
Proband B	8,58	8,58	4,55	6,46	139,66	166,25	151,20	74,44	7,83	0,00	0,00	15,46
	24,37	16,08	2,88	8,14	120,09	263,11	143,12	105,19	0,00	22,91	22,34	0,00
		19,49	6,06	20,08		107,48	244,35	97,19		0,00	24,54	12,49
		22,50	2,88	11,88		133,32	232,64	137,35		29,81	0,00	0,00
	14,99	29,61	53,75		588,94	185,40	197,62		0,00	0,00	0,00	
	6,46	10,90	25,01		457,29	225,62	199,37		0,00	11,26	0,00	
Proband C	3,19	4,91	20,08	18,33	210,44	76,71	91,49	38,48	24,54	50,31	0,00	0,00
	2,88	16,08	0,00	30,98	161,62	110,92	91,49	51,89	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,51	2,88	18,33		115,50	17,01	58,63		15,46	25,57	0,00	
	2,28	0,00	18,33		82,38	27,41	68,22		7,83	0,00	0,00	
	6,06	1,25	5,67	0,45	122,96	44,06	68,22	110,92	21,76	0,00	35,20	12,49
	1,25	0,00	9,95	1,74	139,08	36,82	59,76	123,54	0,00	0,00	29,37	0,00

Proband D	0,00	0,00	0,00	0,00	268,96	129,78	387,04	87,93	0,00	0,00	0,00	26,11
	0,00	9,52	0,00	0,00	452,08	154,10	488,47	119,73	0,00	0,00	25,61	21,29
	0,00	1,50	15,74	8,88	214,50	184,15	416,59	96,48	0,00	0,00	13,93	15,47
	0,00	0,00	8,88	6,46	433,22	224,22	508,92	128,44	20,71	18,24	30,85	26,11
		40,34		12,18		169,08		56,83		0,00		15,47
	21,90		0,00		144,61		91,87		27,10		9,15	
Proband E	4,79		15,01	0,00	74,22		108,40	99,78	20,71		7,87	33,06
	17,23		8,26	5,33	98,46		115,05	166,35	24,05		4,25	22,97
	0,00	59,33	21,10	11,50	139,88	72,92	273,88	36,04	38,43	18,24	15,47	0,00
	0,00	0,00	3,26	5,89	106,40	57,47	224,22	67,75	25,10	25,10	20,71	12,22
	3,26	26,86	17,23	85,85	67,10	41,65	109,06	72,92	28,07	24,58	22,97	0,00
	0,21	0,00	32,08	80,12	88,58	41,65	164,31	75,52	17,58	25,10	25,10	0,00
Proband F	24,35	17,23	22,71	0,00	247,93	95,16	277,40	111,06	19,50	0,00	25,10	11,28
	0,00	9,52	0,00	0,00	219,36	44,79	148,67	154,78	0,00	0,00	0,00	10,27
	0,00		72,26	4,26	623,05		118,39	272,48	0,00		0,00	19,50
	0,00		78,98	26,01	404,32		91,21	283,04	0,00		19,50	18,24
	15,74	10,17	2,33		236,75	100,44	139,88		27,59	16,20	13,93	
	0,00	1,50	7,65		212,43	62,60	180,03		4,25	0,00	0,00	

T1 TMA-Areal nach 1h

K1 Kontrollareal 1h post-TMA

T24 TMA-Areal nach 24h

K24 Kontrollareal 24h post-TMA

Exkludierte Daten aufgrund Kathetermalfunktion

Im Wilcoxon-Test nicht berücksichtigte Datenpaare

P-Werte für alle Zytokine 1h post-TMA in Relation zur Kontrolle

<i>T1 zu K1</i>	p-Wert	<i>T1 zu K1</i>	p-Wert	<i>T1 zu K1</i>	p-Wert
BDNF	0,381	IL-5	0,831	IL-31	0,76
bNGF	0,578	IL-6	0,01*	IP10	0,003
EGF	0,452	IL-7	0,082	LIF	0,024
Eotaxin	0,952	IL-8	0,003	MCP-1	0,689
FGF-2	0,001	IL-9	0,968	MIP-1α	0,147
GM-CSF	0,82	IL-10	0,448	MIP-1β	0,013
GRO-α	0,524	IL-12p70	0,99	PDGF	0,363*
HGF	0,001	IL-13	0,397	PIGF-1	0,842
IFN-α	1	IL-15	0,447	RANTES	0,94
IFN-γ	0,404	IL-17a	0,491	SCF	0,939
IL-1α	0,029*	IL-18	0,363	SDF-1α	0,499
IL-1β	0,043*	IL-21	0,804	TNF-α	0,014*
IL-1RA	0	IL-22	0,806	TNF-β	0,244
IL-2	0,087	IL-23	0,329	VEGF-A	0,001
IL-4	0,978	IL-27	0,701	VEGF-D	0,991

zweiseitige Signifikanz bestimmt mithilfe des Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben;

*einseitige Signifikanz bestimmt mithilfe des Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben

P-Werte für alle Zytokine 24h post-TMA in Relation zur Kontrolle

<i>T24 zu K24</i>	p-Wert	<i>T24 zu K24</i>	p-Wert	<i>T24 zu K24</i>	p-Wert
BDNF	0,013	IL-5	0,348	IL-31	0,91
bNGF	0,85	IL-6	0,138*	IP10	0,002
EGF	0,057	IL-7	0,319	LIF	0,007
Eotaxin	0,032	IL-8	0,744	MCP-1	0
FGF-2	0,019	IL-9	0,171	MIP-1α	0,206
GM-CSF	0,052	IL-10	0,011	MIP-1β	0,024
GRO-α	0,388	IL-12p70	0,17	PDGF	0,339*
HGF	0,07	IL-13	0,292	PIGF-1	0,884
IFN-α	0,5	IL-15	0,156	RANTES	0,236
IFN-γ	0,62	IL-17a	0,127	SCF	0,725
IL-1α	0,087*	IL-18	0,441	SDF-1α	0,438
IL-1β	0,013*	IL-21	0,811	TNF-α	0,232*
IL-1RA	0	IL-22	0,638	TNF-β	0,491
IL-2	0,206	IL-23	0,076	VEGF-A	0,598
IL-4	0,456	IL-27	0,659	VEGF-D	0,615

zweiseitige Signifikanz bestimmt mithilfe des Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben;

*einseitige Signifikanz bestimmt mithilfe des Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben

P-Werte für alle Zytokine 1h post-TMA in Relation zu 24h post-TMA

<i>T1 zu T24</i>	p-Wert	<i>T1 zu T24</i>	p-Wert	<i>T1 zu T24</i>	p-Wert
BDNF	0,111	IL-5	0,031	IL-31	0,253
bNGF	0,365	IL-6	0,001*	IP10	0
EGF	0,081	IL-7	0,162	LIF	0,39
Eotaxin	0,074	IL-8	0	MCP-1	0,014
FGF-2	0,08	IL-9	0,101	MIP-1α	0
GM-CSF	0,291	IL-10	0,255	MIP-1β	0
GRO-α	0,314	IL-12p70	0,151	PDGF	0,283*
HGF	0,854	IL-13	0,694	PIGF-1	0,719
IFN-α	1	IL-15	0,201	RANTES	0,034
IFN-γ	0,227	IL-17a	0,017	SCF	0,675
IL-1α	0,018*	IL-18	0,054	SDF-1α	0,295
IL-1β	0,39*	IL-21	0,04	TNF-α	0,179*
IL-1RA	0	IL-22	0,371	TNF-β	0,001
IL-2	0,187	IL-23	0,008	VEGF-A	0,934
IL-4	0,142	IL-27	0,877	VEGF-D	0,856

zweiseitige Signifikanz bestimmt mithilfe des Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben;

*einseitige Signifikanz bestimmt mithilfe des Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Tamara Kathrin Dörr, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In-vivo Untersuchungen zur molekularen Wirkungsweise von thermomechanischer Ablation an der Haut“ 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.“

16.12.2020

Datum

Unterschrift

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

1. Zuberbier T, Dörr T: Allergologie. Akt Dermatol 2017;43(01/02):17-20.
2. Zheleznov S, Urzhumtseva G, Petrova N, Sarsaniia Z, Didkovskii N, Dörr T, Zuberbier T: Gastritis Can Cause and Trigger Chronic Spontaneous Urticaria Independent of the Presence of Helicobacter pylori. Int Arch Allergy Immunol 2018;175(4):246-251.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte den Personen meinen Dank ausdrücken, die mit Ihrer Unterstützung zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben.

Großer Dank gilt Frau Prof. Maja Hofmann für die Möglichkeit der Durchführung und Begleitung meiner Promotionsarbeit an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Danke für die gute Betreuung und das stets offene Ohr für meine Fragen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Torsten Zuberbier für die Vermittlung des Themas sowie das studienbegleitende Mentoring bedanken, von dem ich auch während meiner Promotion sehr profitiert habe.

Ich danke Herrn Prof. Per Skov und Frau Katrine Baumann für die Einführung und Unterstützung bei der Durchführung der Mikrodialyse.

Frau Prof. Annika Vogt, Frau Sabrina Hadam und Herrn Stefan Frischbutter danke ich für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Laboranalysen sowie der steten Bereitschaft, meine Fragen zu beantworten und mir labortechnische Fähigkeiten zu vermitteln.

Dank gilt meiner Schwester Rebecca Wittum, die mir in Fragen der statistischen Auswertung der Daten zur Seite gestanden hat.

Außerdem gilt mein Dank den sechs Probanden, die sich zur Teilnahme an dieser experimentellen Studie bereit erklärt haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und ganz besonders bei meinem Partner Christian bedanken. Ihr habt mir mit Ausdauer und Geduld zur Seite gestanden und mich stets zum Weitermachen motiviert.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben.

