

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

DISSERTATION

Vertikale nicht-invasive Darstellung der Haut mittels
Zwei-Photonen-Mikroskopie und optischer Kohärenztomografie –
Einflüsse von Alter, Geschlecht und Hautareal

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Czekalla

aus Erfurt

Datum der Promotion: 05.03.2021

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	4
1 ABSTRACT	4
1.1 ABSTRACT (DEUTSCH)	4
1.2 ABSTRACT (ENGLISCH)	5
2 EINFÜHRUNG	6
3 MATERIAL UND METHODIK	10
3.1 PROBANDEN	10
3.2 STUDIENDURCHFÜHRUNG	10
3.3 STATISTIK	11
3.4 ZWEI-PHOTONEN-MIKROSKOPIE (2PM)	12
3.5 OPTISCHE KOHÄRENZTOMOGRAPHIE (OCT)	12
3.6 BESTIMMUNG DER STRATUM CORNEUM- UND EPIDERMISDICKE	13
3.7 ERMITTLUNG DES SAAID	14
4 ERGEBNISSE	14
4.1 VORUNTERSUCHUNGEN	14
4.1.1 Einfluss von Kontaktflüssigkeit	14
4.1.2 Einfluss der Haarentfernung	15
4.1.3 Einfluss der Tape Stripping-Methode	15
4.2 STRATUM CORNEUM- UND EPIDERMISDICKE	15
4.2.1 Bestimmung der Stratum corneum-Dicke und deren Einflussfaktoren	15
4.2.2 Bestimmung der Epidermisdicke und deren Einflussfaktoren	15
4.3 BESTIMMUNG DES SAAID UND DESSEN EINFLUSSFAKTOREN	16
5 DISKUSSION	17
5.1 METHODENOPTIMIERUNG	17
5.2 EINFLUSSFAKTOREN AUF EPIDERMIALE UND DERMALE STRUKTUREN	17
5.2.1 Evaluierung der Stratum corneum-Dicke	17
5.2.2 Auswertung der Epidermisdicke	18
5.2.3 Bewertung des SAAID	19
5.3 VOR- UND NACHTEILE DER VERWENDETEN 2PM- UND OCT-GERÄTE ZUR BESTIMMUNG KUTANER STRUKTUREN	20
6 FAZIT	21
7 LITERATURVERZEICHNIS	22

<i>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</i>	27
<i>ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN</i>	28
<i>DRUCKEXEMPLARE AUSGEWÄHLTER PUBLIKATIONEN</i>	29
<i>LEBENS LAUF</i>	53
<i>PUBLIKATIONS LISTE</i>	55
<i>DANKSAGUNG</i>	56

ZUSAMMENFASSUNG

1 ABSTRACT

1.1 ABSTRACT (DEUTSCH)

Einführung: Eine hohe Bildauflösung zur Darstellung der Epidermis und Dermis ist essentiell, um deren Funktionen und die Auswirkungen diverser Einflüsse zu verstehen. Verschiedene Ex- und In-vivo-Methoden können die Epidermisdicke (ED) sowie die strukturelle Zusammensetzung der Dermis abbilden. Eine optische Biopsie vermeidet im Gegensatz zur invasiven Probenentnahme die präparative Veränderung der Gewebestruktur, ist schneller und schmerzfrei. In der vorliegenden Pilotstudie wird die optische Biopsie durch Aufnahmen mittels eines Weitfeld-Zwei-Photonen-Mikroskops (2PM) realisiert. Diese Scans basieren auf einer Zwei-Photonen angeregten Fluoreszenz (TPEF) im Nahinfrarotbereich, welche ein Autofluoreszenz- (AF-) Signal im sichtbaren Spektralbereich emittiert. Dieselbe Primärstrahlung erzeugt gleichzeitig eine Frequenzverdoppelte Sekundärstrahlung (SHG) bei vorliegenden geordneten Molekülstrukturen. Die Dicke und Struktur der Epidermis und Dermis verändern sich bekanntermaßen im Alter. Das Stratum corneum (SC) dagegen konnte bisher nur artifiziell dargestellt werden. Es existieren nur wenige Studien über die Variation der Hautschichtung in verschiedenen Körperregionen und unter differenter Umweltbelastung.

Methodik: Dreißig hautgesunde Probanden von 18 bis 66 Jahre wurden mittels eines modifizierten 2PM untersucht. Von fünf verschiedenen Körperregionen wurde je ein Falschfarbenvorgang (200 µm x 7 mm) erzeugt. Die ED wurde in den 2PM-Aufnahmen gemessen und die Werte mit Ergebnissen der optischen Kohärenztomografie verglichen. Anhand der 2PM-Bilder wurde das Kollagen-Elastin-Verhältnis über den SHG-zu-AF-Altersindex der Dermis (SAAID) berechnet und in Abhängigkeit des Alters, des Geschlechts und der Körperregion analysiert.

Ergebnisse: AF- und SHG-Signale erlauben nach Spektraltrennung synchron und deckungsgleich je ein Zellular- und Kollagenbild aufzuzeichnen. Zudem wird Elastin durch das AF-Signal sichtbar. Das durch Tape Stripping reduzierte SC verbessert die Signalintensität. Um das AF-Signal zu verstärken ist die Haarentfernung und Verwendung von destilliertem Wasser als Kontaktmedium essentiell. An sonnenexponierter Haut ist die gesamte Epidermis sowie das SC signifikant dicker im Vergleich zu sonnengeschützten Hautarealen ($p < 0,05$). Die ED nimmt mit steigendem Alter signifikant ab ($p < 0,05$), ebenso der SAAID ($p < 0,05$). Männer zeigen im Vergleich zu Frauen eine dickere Epidermis, jedoch einen signifikant kleineren SAAID ($p < 0,05$).

Der SAAID am volaren Unterarm ist signifikant höher als am Abdomen ($p < 0,05$). Am niedrigsten ist der SAAID an der Glutealregion ($p < 0,05$).

Fazit: Die Weitfeld-2PM stellt eine neue Methode zur nicht-invasiven vertikalen Darstellung der Epidermis und Dermis dar. Insbesondere sind die SC-Abbildung sowie eine Unterscheidung von Kollagen und Elastin möglich. Neben genderspezifischen Unterschieden weisen die Messergebnisse der ED und des SAAID auf einen stärkeren Einfluss unterschiedlicher Körperregionen im Vergleich zum Alter hin.

1.2 ABSTRACT (ENGLISCH)

Introduction: High-resolution images of the epidermis and dermis are essential to understand their function and changes caused by influences. Several ex-vivo and in-vivo methods are available to determine the epidermis thickness (ET) and dermis. Optical biopsies avoid preparative influence of tissue structures, are quick and painless in contrast to punch biopsies. In the present study, these optical biopsies could be realized in scans using wide-field two-photon microscopy (2PM). These scans are based on two-photon excited fluorescence (TPEF) with excitation in the near-infrared range, which generates an autofluorescence (AF) signal in the visible spectral range. The same primary radiation simultaneously generates a frequency-doubled secondary generation (SHG) in the presence of ordered molecular structures. The thickness and structure of the epidermis and dermis are known to change with age. The stratum corneum (SC), on the other hand, could only be represented artificially. There are only few studies on the variation of the skin layers in different body regions and under different conditions.

Methods: Thirty skin-healthy volunteers aged 18 to 66 were scanned by using the modified 2PM. A false-colour image (200 μm x 7 mm) of five different body sides was generated. The ET was measured by 2PM and compared to images of optical coherence tomography (OCT). From the 2PM images, the collagen-elastin-ratio was calculated using the SHG-to-AF-aging-index of dermis (SAAID) and analysed as a function of age, gender and body region.

Results: AF and SHG signals allow synchronous and congruent recording of cellular and collagen images after spectral separation. Elastin is made visible by the AF signal. The signal intensity is enhanced by reduction of the SC using tape stripping. To enhance the AF signal, hair removal and use of distilled water as a contact medium is essential. ET decreases significantly with increasing age ($p < 0.05$), as does SAAID ($p < 0.05$). Men show a thicker epidermis compared to women, but

a smaller SAAID ($p < 0.05$). The SAAID on the volar forearm is significantly higher than on the abdomen ($p < 0.05$). SAAID is lowest in the gluteal region ($p < 0.05$).

Conclusion: The wide-field 2PM is a new method for non-invasive imaging of the epidermis and dermis, in particular the SC and elastin. In addition to gender-specific differences, the measurement results of ET and SAAID indicate a stronger influence of different body regions compared to age.

2 EINFÜHRUNG

Zur Darstellung der Hautschichten und deren Komponenten sowie zur Diagnostik benigner und maligner Hauterkrankungen wird nach wie vor in der Dermatologie die invasive Probenentnahme zur histologischen Betrachtung via Mikroskopie als Goldstandard verwendet. Hierbei wird die Cutis in einer Vertikalansicht analysiert. Die Zeit bis zur Diagnose beträgt ca. 24 bis 48 Stunden (1; 2).

Die Cutis besteht aus drei Schichten: der Epidermis, Dermis und Subcutis. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den obersten zwei Schichten, der Epidermis und der direkt darunterliegenden oberen Dermis. Die Epidermis gliedert sich wiederum in vier Schichten, das Stratum corneum (SC), Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale (3). Die durchschnittliche Dicke des SCs beträgt 10 bis 30 μm (4; 5; 6). Als äußerste Hautschicht hat das SC direkten Kontakt zur Umgebung. Dadurch wird diesem die besondere Rolle des Barrierschutzes gegen extrinsische Einflüsse zugeschrieben, wie zum Beispiel ultraviolette (UV) Strahlung, Dehydratation oder Penetration von Stoffen. Am SC lassen sich zudem hyperkeratotische Prozesse sowie Wundheilungsgeschehen beobachten (5; 7). Insgesamt ist jedoch die gesamte Epidermis wichtig zur Beurteilung von Einflussfaktoren auf die Schutzfunktion der Haut (8; 9). Verschiedene Messungen der Epidermisdicke (ED) sind bereits etabliert, weisen jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse auf und sind auf Grund unterschiedlicher Messmethoden schwer zu vergleichen. In der Literatur werden für die ED im Mittel Werte zwischen 75 und 100 μm angegeben (3; 8; 10; 11). Die Basalmembran, das Stratum basale, trennt die Epidermis von der Dermis. Über Reteleisten ist die Epidermis mit der Dermis verbunden. Diese Transitzone wird dermoepidermale Junctionzone genannt. Die Dermis unterteilt sich in das Stratum papillare und Stratum reticulare und besteht hauptsächlich aus der Extrazellulärmatrix (EZM) (3). Zudem sind in jener u.a. Hautanhangsdrüsen, Haarfollikel, Blut- und Lymphgefäße lokalisiert. Die Hauptbestandteile der

EZM sind Kollagen zu 70 bis 80 % und Elastin zu 2 bis 4 %. Sie verleihen der Haut ihre Elastizität (12).

Neben der invasiven Probenentnahme existieren vielversprechende technische Methoden zur Visualisierung der Hautschichten im Rahmen einer nicht-invasiven optischen Biopsie. Der große Vorteil gegenüber dem Goldstandard ist die Möglichkeit einer In-vivo-Diagnostik, bei der durch das Wegfallen des invasiven Eingriffes unerwünschte Nebenwirkungen, wie Schmerzen, Entzündung, Blutung und Narbenbildung entfallen. Intrinsische Effekte wie Genetik, Alter oder Geschlecht und extrinsische Einflüsse, wie Therapieeffekte, ultraviolette (UV-) Strahlung, Toxine oder Schadstoffe auf einzelne Hautschichten und deren Bestandteile können evaluiert werden. Die optische Kohärenztomografie (OCT), Laserscanning Mikroskopie (LSM), Confocal Raman Mikroskopie (CRM) und Zwei-Photonen-Mikroskopie (2PM) zählen aktuell zu den verwendeten optischen Technologien (5; 6; 9; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 10). Die LSM erzeugt horizontale Scanbilder in einer hohen Auflösung, die nach Zusammensetzung (engl.: stitching) der Einzelbilder zu Mosaiken über mehrere Millimeter. Die Gewebetiefe kann bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm bis zu einer Maximaltiefe von 200 bis 300 μm registriert werden (19; 14). Hierbei kann die Darstellung im Fluoreszenz- als auch im Reflexionsmodus (RCM) erfolgen, welcher zur Darstellung von der Morphologie angewendet wird. Multiple Stacks können übereinandergelegt werden, so dass nachträglich ein vertikales Bild entsteht, allerdings mit Informationsverlust (14; 20). Mit dem In-vivo-LSM VivaScope ist eine zelluläre Auflösung, jedoch keine Unterscheidung zwischen Elastin und Kollagen möglich (21; 19).

Indessen ist die OCT bisher die einzige Technik, welche direkt einen Vertikalscan erlaubt. Die Haut kann über eine Länge von mehreren Millimetern und bis zu einer Tiefe von 1 bis 2 mm gescannt werden (22). Der Vergleich mit dem histologischen Bild ist durch die vertikale Ausrichtung des OCT-Bildes möglich (23). Die Evaluierung der Epidermis und deren morphologischen Strukturen kann wie gewohnt vorgenommen werden, ist aber mit den für In-vivo-Messungen zur Verfügung stehenden Geräten durch deren geringere Bildauflösung nur eingeschränkt möglich. Die OCT wird dennoch zu diagnostischen Zwecken mit herangezogen, beispielsweise in der Hauttumordiagnostik zur Bestimmung der Morphologie von Basalzellkarzinomen (22).

Ein neues innovatives vertikal abbildendes Verfahren ist die 2PM. Das System basiert auf einem nichtlinearen Effekt im Nahinfrarotbereich. Die von zwei Photonen erzeugte Fluoreszenz (engl.:

two-photon excited fluorescence; TPEF) wird in einem Bild dargestellt. Fluorophore sind Bestandteile in Mitochondrien und diversen membrangebundenen Enzymen der Zelle, wie Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NAD(P)H) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) sowie Melanin und Elastin. Zellmembran und Zellkern heben sich nicht fluoreszierend ab (16; 24; 25; 26). Wird dieses Verfahren ohne Zugabe von kontrastgebenden exogenen Substanzen nur durch die fluoreszenzoptischen Eigenschaften der körpereigenen Moleküle in deren jeweiligen Konzentration im Gewebe angewandt, so stellt die erzeugte Sekundärstrahlung autofluoreszierende Strahlung dar. Demnach entsteht hier ein Autofluoreszenz- (AF-) Bild (16). Dagegen kann der physikalische Effekt der Frequenzverdopplung (engl.: second harmonic generation; SHG) nur in geordneten Molekularstrukturen erreicht werden, wie zum Beispiel am Kollagen. Die Visualisierung des dermalen Kollagens ist durch die Bestandteile von kristallinen und nicht Zentromer beinhaltender Strukturen möglich (5). Somit ist sowohl eine zelluläre Auflösung als auch die Darstellung von EZM-Strukturen möglich.

Das 2PM kann daher als vergleichende Referenz zu bestehenden Studien und deren Ergebnissen herangezogen werden (7). Die bisherige 2PM-Bildgebung erfolgt wie bei der LSM zunächst horizontal und ermöglicht eine vertikale Betrachtung durch die Aufnahme von Z-Stapeln und Berechnung von vertikalen Bildern. Grundsätzlich sind die Bildgrößen auf unter 500 μm begrenzt und weisen zusätzlich durch das Sticking eine schlechtere Qualität auf. Die vertikale Bildgebung schafft einen schnellen und umfassenden Überblick über die Haut. Die OCT kann wegen der gleichen Schnittbildebene als Vergleichstechnik eingesetzt werden (22). Dabei sollte berücksichtigt werden, dass das verwendete OCT „VivoSight 3.2“, im Gegensatz zu OCTs mit höheren Auflösungen, eine Auflösung von ca. 10 μm aufweist. Das SC mit einer mittleren Dicke von 12 μm wird dadurch artifiziell dargestellt. Damit ist diese OCT nicht für die Bestimmung der SC-Dicke geeignet. Aufnahmen des SCs zur genauen Bestimmung der SC-Dicke waren bisher weder invasiv noch nicht-invasiv möglich (14; 27). Eine Ausnahme bildet die Visualisierung und Messung des SCs durch die OCT mit Dicken über 50 μm , wie es an den Handflächen und Fußsohlen sowie bei hyperkeratotischer Haut vorkommt (9; 7).

Des Weiteren lässt sich durch die oben genannten Verfahren die Hautalterung ermitteln. Diese wird durch intrinsische und extrinsische Aspekte beeinflusst (28). Der entscheidendste extrinsische Umweltfaktor und die Ursache der Hautalterung ist hierbei die Sonnenstrahlung (29; 30; 31). Die Exposition von Sonneneinstrahlung induziert freie Radikale, die mit den Bestandteilen der EZM interagieren bis ein kritisches Level erreicht ist (32). Dieser Effekt, die

verfrühte Hautalterung (engl.: photoaging), geht mit einer dermalen Elastose einher (23; 33; 28). Der Grad der Hautalterung kann durch das Verhältnis zwischen Kollagen und Elastin bestimmen werden (2; 33; 34). Die Kollagenfaserbündel atrophieren mit zunehmendem Alter, woraus eine Abflachung der Reteleisten resultiert. Zudem dünnt sich das Elastinnetz durch die Faseransammlung aus (35; 36). Vor allem die Akkumulation der Elastinfasern kennzeichnet den Grad der extrinsischen Hautalterung (23; 33; 37). Vorherige Studien haben bereits den Kollagen-Elastin-Index sowohl in-vivo als auch ex-vivo getestet. Dieser kann durch den in der Dermis gemessenen SHG-AF-Index im Alter (engl.: SHG-to-AF-age-index of dermis; SAAID) quantifiziert werden und ist folgend definiert:

$$SAAID = \frac{(SHG-AF)}{(SHG+AF)} \quad (1)$$

Er eignet sich als nicht-invasive Objektivierung der Determinierung intrinsischer und extrinsischer Hautalterung. Der SAAID ist eine aussagekräftige Methode zur Analyse der Dermis durch die Auswertung der im selben Scan registrierten AF- und SHG-Signalintensität (38). Durch Photoaging wird eine Kollagenatrophie und damit einhergehende Verminderung der Kollagenmenge induziert, welches in der Reduktion des SHG-Signals objektiviert wird. Zudem wird durch eine verstärkte AF-Signalintensität des Elastins die solar gesteigerte Elastose wiedergespiegelt (16; 39; 40; 23).

Das erste Ziel der Arbeit war es das In-vivo-Messverfahren mit dem 2PM-Prototypen zu optimieren. Als Basis dienten bisher gewonnene Daten aus Ex-vivo-Studien an Schweineohren (41). Im Fokus stand die Fragestellung, welchen Einfluss eine Haarentfernung, Reduktion des SCs sowie Verwendung unterschiedlicher Kontaktagentia auf die Bildqualität und -auflösung haben. Danach erfolgte die Darstellung der gesamten Epidermis inklusive des SCs. In den Aufnahmen wurde deren Dicke ausgemessen. Die detaillierte Ansicht der Epidermis und Dermis sowie Messergebnisse zur ED-Bestimmung wurden mit den Daten eines kommerziellen OCT-Gerätes verglichen. Die Veränderung der Elastin- und Kollagenstrukturen der Dermis im Alter wurde mit Hilfe des SAAID erfasst. Der Bezug der Studien zueinander und deren Inhalte sind in Abbildung 1 dargestellt. Im Fokus der Auswertung lag die Fragestellung in wie fern intrinsische Faktoren, wie Alter, Geschlecht und Körperregion, sowie extrinsische Parameter, wie UV-Strahlung, Einfluss auf das SC, die gesamte Epidermis und die dermalen EZM-Komponenten nehmen.

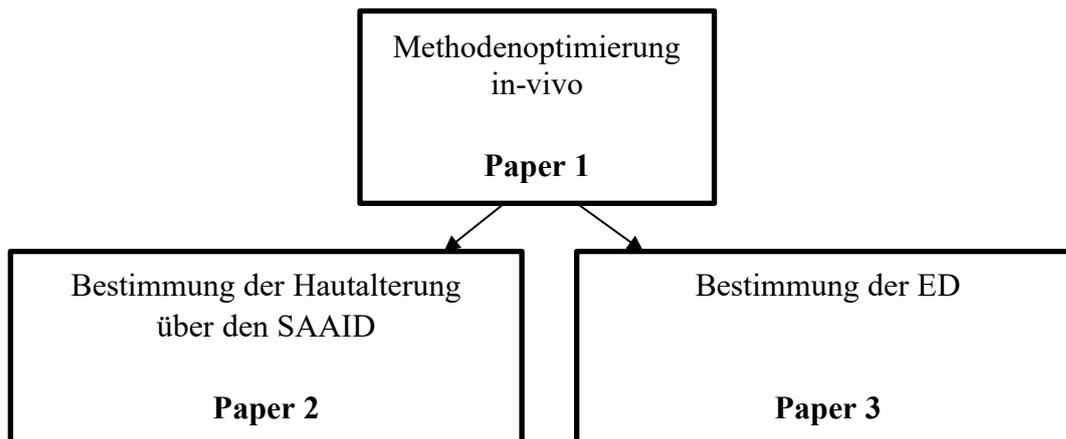


Abbildung 1: Zusammenhänge der Publikationen

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 PROBANDEN

Die Studie nach dem Medizin-Produktgesetz erhielt ein positives Votum durch die Ethikkommission des Landes Berlin (DIMDI-Number: 00008670 (A), Eudamed-Number: CIV-13-08-0115553). Alle Probanden gaben ihre schriftliche Einwilligung. Eingeschlossen wurden volljährige Probanden, welche frei von Barrierschäden der Haut sowie benignen und malignen Hauterkrankungen waren und die deutsche Staatsbürgerschaft innehatten. Die Kriterien stimmen mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki überein. Schwangere, stillende Frauen und in richterlichen und behördlichen Einrichtungen untergebrachte Menschen gemäß § 29 Medizin-Produkte-Gesetz sowie Drogen- und Alkoholabhängige wurden ausgeschlossen. In der gesamten Studie nahmen insgesamt dreißig freiwillige Probanden teil, welche in drei Altersgruppen (AG) gegliedert wurden: AG 1 (18 bis 30 Jahre), AG 2 (31 bis 50 Jahre), AG 3 (50 bis 66 Jahre). Die Probanden wurden zudem nach Hauttypen entsprechend der Klassifikation nach Fitzpatrick eingeteilt (42). Zur Methodenoptimierung zu Beginn der Studie wurden insgesamt zehn Probanden (Probandennummer 01 bis 10; Frauen: n = 6, Männer: n = 4) mit dem Hauttyp I bis III (AG 1: n = 4, AG 2: n = 3, AG 3: n = 3) ausgewählt. Zur Analyse der ED und des SCs sowie des SAAID wurde die Studie um zwanzig Probanden (Probandennummer 11 bis 30; Frauen: n = 10, Männer: n = 10) des Hauttyp II (AG 1: n = 7, AG 2: n = 7, AG 3: n = 6) erweitert.

3.2 STUDIENDURCHFÜHRUNG

Fünf verschiedene Hautareale wurden gescannt. Diese wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Sonnenexposition, mechanischen Belastung und ihrer Erreichbarkeit mit dem 2PM ausgewählt. Als Beispiel sonnengeschützter Haut fungierte die Innenseite des Unterarms (volar / ventral,

Flexorengruppe) in gestreckter Position, der Unterbauch (Abdomen, pelvis, Os coxae), die Glutealregion (Crista iliaca, Übergang vom Rücken zum Gesäß) und die Wade (Musculus gastrocnemius, Zentrum). Die Außenseite des Unterarms (dorsal, Extensorengruppe) wurde zur Vermessung sonnenexponierter Haut verwendet (35; 34). Die Glutealregion ist ein Vertreter für ein Areal mit mechanischer Belastung. Zur Messung mittels 2PM lag die Testperson auf einer Kosmetikliege (Queen I Classic 1-motoring; soleni Calssic), welche die genaue Positionierung des zu untersuchenden Körperteils und der Hautregion gewährleistete.

In dem ersten Teil der Pilotstudie wurden am volaren und dorsalen Unterarm sowohl nicht rasierte und rasierte Haut als auch SC-reduzierte Haut untersucht. Das zu messende Hautareal wurde zu Beginn drei Mal desinfiziert (Softasept®N Braun, Art.-Nr.: 3887138, Hamburg, Deutschland). Zur Elimination der Vellus- und Terminalhaare wurde bei der Gruppe, die rasiert wurde, fünf Mal eine superficiale Rasur vorgenommen (Wilkinson Sword, non-steril, Art.-Nr.: 182H, Wilkinson Sword GmbH, Solingen, Deutschland). Zur Reduktion des SCs wurde die Tape Stripping-Methode angewandt. Hierfür wurde ein Klebefilm von ca. (5 x 1,9) cm² (tesa®Film, Art. Nr.: 5529, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) auf die rasierte Haut gepresst und anschließend mit einem Roller zehn Mal darüber gerollt bevor der Klebestreifen abgezogen wurde. Dieser Prozess wurde fünf Mal wiederholt. Weiterhin wurden Glycerin (propane-1,2,3-triol; C₃H₈O₃) und destilliertes Wasser auf ihre Eignung zur Anpassung des Brechungsindex untersucht. Hierzu wurden die Produkte vor dem Aufsetzen des Messkopfes auf die Haut getropft.

In der Erweiterung der Pilotstudie wurde jedes der fünf verschiedenen Hautareale nach optimierter Subjektpräparierung mit dem 2PM gescannt. Dazu wurde das zu scannende Hautareal rasiert, danach drei Mal desinfiziert und abschließend destilliertes Wasser als Kontaktmedium appliziert. Basierend auf einem Überblickscan in der XZ-Achse 2000 x 400 µm² mit einer Bildauflösung von 10 µm und Geschwindigkeit von 10 mms⁻¹ wurde ein Detailscan mit einer Auflösung von 1 µm entsprechend 1 Pixel (px) aufgenommen. Zur Darstellung des Bildes wurden die Kanäle 1 und 2 des Verarbeitungsprogrammes DataViewer Version 1.3 genutzt. Das gleiche Vorgehen wurde an jedem Hautareal mit der additiven Anwendung des fünfmaligen Tape Strippings wiederholt.

3.3 STATISTIK

Zur statistischen Analyse wurden die Datenprogramme Microsoft Excel 2010 und SPSS 22 (IBM ® SPSS® Statistics) für Windows 10 verwendet. Die Messwerte des SCs, der ED und des SAAID wurden einer (Ko-) Varianzanalyse unterzogen. Der statistischen Auswertung war je der

Friedmann-Test für abhängige Stichproben vorangestellt. Die Signifikanz des Einflusses differenter Körperareale auf das SC, die ED und den SAAID wurde mittels des gepaarten Wilcoxon-Tests getestet. Zur Analyse der Auswirkung des Geschlechts und Alters auf das SC, die ED und den SAAID wurde der ungepaarte Mann-Whitney-Test angewandt. Der Effekt unterschiedlicher Altersgruppen auf das SC, die ED und den SAAID wurde durch den nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test analysiert. Als statistisch signifikant wurden alle p-Werte mit $p < 0,05$ definiert. Eine Korrelationsanalyse bezogen auf alle durch das 2PM und die OCT gemessenen ED-Werte wurde vorgenommen.

3.4 ZWEI-PHOTONEN-MIKROSKOPIE (2PM)

Für die gesamte Studie wurde das 2PM (2PM VertiSCAN V.21; W.O.M. WORLD OF MEDICINE GmbH, Berlin) verwendet. Der Aufbau und die Funktionsweise sind im Paper 1 Abbildung 1 abgebildet. Ein Gewebebild wird durch einen Scan der Haut mittels einer Flying Optic erzeugt. Der Fokus eines Ultrakurzpuls lasers (780nm, TEM₀₀, Pulsdauer 100fs, Rep. Rate 100 MHz) bewegt sich lateral durch das adjustierte Hautareal mit einem Hochgeschwindigkeitsscan bis 40 mms^{-1} . Dieser ist gekoppelt an eine mit 14 g Masse ultraleichten hochaperturigen Scanlinse (NA = 1,25). Das AF-Bild wird durch Sekundärstrahlung erzeugt, dass die fluoreszierenden Moleküle, angeregt durch zwei Photonen, aussenden, wenn sie auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen. AF- und SHG-Bilder werden simultan nach der Erregung mit einer Wellenlänge von 780 nm in einer Größe von 7 mm lateral in der X-Richtung und 500 μm vertikal in der Z-Ebene generiert. Die unterschiedlichen Wellenlängen der Sekundärstrahlung werden durch Spektralfilter, sogenannte Dichroite, in Kanäle separiert und durch je einen Sekundärelektronenvervielfacher, einen Photomultiplier, pro Kanal registriert. Das SHG-Signal der Sekundärstrahlung liegt bei exakt der halben Primärwellenlänge, also bei 390 nm, und wird im Kanal 1 von 380 bis 410 nm registriert. Von 415 nm bis 720 nm wird das AF-Signal im Kanal 2 identifiziert (41). Aus den aufgenommenen Daten entstehen zwei Grauwertbilder, die in einem Falschfarbenbild mit wählbarer Pixelauflösung von 0,5 bis 50 μm zusammengeführt werden können.

3.5 OPTISCHE KOHÄRENZTOMOGRAPHIE (OCT)

Die OCT funktioniert nach dem Prinzip der Weißlicht-Interferometrie in einer Michelson-Anordnung (15). Je nach Rückstreuungseigenschaft des jeweiligen Gewebebestandteils, wie Zellmembran, Zellkern, Zytoplasma, EZM und Melaningranula, ergibt sich ein Kontrastbild,

welches ein Muster erzeugt (14). Ein optisches Interferometer erfasst die rückgestreute Lichtintensität als Funktion der Gewebetiefe und rechnet dies in ein zweidimensionales Schnittbild in einem A- und B-Scan um (7; 35; 11). In dieser Studie wurde der VivoSight-Scanner „VivoSight 3.2.“ (Michelson, Kent, Großbritannien) verwendet. Dieses Multistrahl-System nutzt eine Frequenz von 20 kHz, welches mit einem Hochgeschwindigkeits-Laserscanner (santec®, Japan) verbunden ist. Die Hautschichten werden in einem lateralen Scanbereich von 6 x 6 mm, in einer Tiefe von 1 bis 2 mm, je nach Gewebebeschaffenheit unterhalb der Hautoberfläche in einer Auflösung von < 7,5 µm lateral und < 5 µm axial mit einer maximalen Fokustiefe von 1 mm abgebildet. Zur Gewährleistung einer möglichst hohen Eindringtiefe werden Wellenlängen im Infrarotbereich von 900 bis 1350 nm genutzt (43; 44; 45). Der VivoSight-Scanner verwendet eine Laser-Zentralwellenlänge von 1305 nm. Dies ermöglicht nicht-invasiv und in Echtzeit das Erkennen von mikroskopischen Strukturen des Gewebes (35; 7; 11).

3.6 BESTIMMUNG DER STRATUM CORNEUM- UND EPIDERMISDICKE

Die Dicke des SCs wurde als Distanz zwischen der ersten superficialen Struktur und dem Beginn des Stratum granulare bestimmt (4; 6). Das Programm Image J wurde verwendet, um das SC alle 125 px in einem Falschfarbenbild auszumessen. Zur Kalkulation der ED im 2PM-Scan wurde das Programm DataViewer genutzt. Hierfür wurde die Bilddatei des jeweiligen Einzelkanals ausgewählt. Alle 150 µm wurde die Schichtdicke mit einem Cursor in dem bestimmten Kanal in counts pro px notiert. Dabei war die ED als Distanz zwischen der Hautoberfläche und der dermoepidermalen Junctionzone definiert. Dies ist mit dem Beginn des AF-Signals bis zum Beginn des SHG-Signals dargestellt. Das Minimum und Maximum der ED beschreiben die epidermalen Reteleisten und dermalen Papillen, welche als Täler und Berge erscheinen (46). Demzufolge werden die SHG-Werte von den AF-Werten subtrahiert:

$$ED = AF\text{-Signal} - SHG\text{-Signal} \quad (2)$$

Die durch das 2PM untersuchten Hautareale wurden anschließend je zwei Mal durch die OCT visualisiert. Genutzt wurde der A-Scan, welcher 60 Bilder pro Phasenbild (engl.: frame) erzeugt. Zum Bemessen der Epidermis wurde ein Bild ausgewählt, welches frei von Haarfollikeln und Störartefakten war. Die Epidermis stellt sich in der OCT, wie im Paper 3 Abbildung 1 zu sehen ist, als Zone der äußersten hellen Reflektion und der nächsten Lichtrückstreuungsschicht, der Dermis, als weniger reflektierende Frequenz, dar (15).

3.7 ERMITTLUNG DES SAAID

Die AF- und SHG-Signalintensität zur Berechnung des SAAID wurden von je drei Quadratflächen mit einem Umfang von $4400 \mu\text{m}^2$ pro Aufnahme analysiert. Die markierten Areale waren in der oberen Dermis lokalisiert. Ausgeschlossen wurden Bereiche mit Blutgefäßen oder vermindertem Signal. Im Durchschnitt wurde das Zentrum des gekennzeichneten Rechtecks bei $100 \mu\text{m}$ unterhalb der Oberfläche positioniert. Es wurde je im AF- und SHG-Bild an der gleichen Stelle verortet. Zur Analyse der Graustufenwerte wurde ImageJ 1.41 (Java 1.6.0_45) verwendet.

4 ERGEBNISSE

Der 2PM VertiScan hat die Möglichkeit eine Aufnahme der Epidermis bis in die obere Dermis zu generieren. Das AF-Signal stellt sich im Farbbild grün dar. Das AF-Signal der epidermalen Zellen wird durch die endogenen Fluorophore des Zytoplasmas erzeugt, dadurch erscheint der Zellkern dunkel. Das SC ist die intensive autofluoreszierende oberste Schicht und als hellgrüne Linie sichtbar. Die darunterliegenden lebenden epidermalen Zellen weisen ein weniger intensives AF-Signal auf. Das Kollagen, welches in den Papillen vertikal ausgerichtet ist, wird durch das SHG-Signal im Falschfarbenbild rot dargestellt. Eine Abgrenzung der Epidermis zum Stratum papillare der Dermis wird somit eindeutig visualisiert. Die Hügel und Täler der epidermalen Junktionzone sind deutlich sichtbar, wodurch die Basallamina erkennbar wird. Die auf der Basallamina liegenden pigmentierten Zellen sind wiederum AF-Signal reicher als die darüber liegenden epidermalen Zellschichten. Ausgenommen davon sind die Korneozyten. Die Elastinfasern der Dermis werden erst durch deren Aggregation sichtbar. Das AF-Signal der Elastinfasern wird von dem weitaus höheren SHG-Signal des Kollagens überlagert. So wirken die Elastinfasern im Stratum reticulare gelb. Zudem erscheinen die Blutgefäße des Plexus superficialis, welche unterhalb der Papillen lokalisiert sind, schwarz, ohne AF- oder SHG-Signal. Jene sind schlaufenförmig angeordnet. Im Paper 1 Abbildung 3, 4 und 7 sind die einzelnen Strukturen beschriftet.

4.1 VORUNTERSUCHUNGEN

4.1.1 Einfluss von Kontaktflüssigkeit

Zum optimalen Kontakt und zur Minimierung der Reflektion an den optischen Grenzflächen wird zwischen Messkopf und Haut ein Kontaktmittel aufgetragen. Nach der Applikation von Glycerin ist das SC als ein helles Signal zu sehen, ebenso auf durch Tape Stripping SC-reduzierter Haut. Das SC grenzt sich stark von den kaum sichtbaren anderen epidermalen Zellen sowie Elastinfasern

der Dermis ab. Kollagenfasern wiederum sind sichtbar. Eine höhere Bildauflösung und Intensität epidermaler und dermaler Bestandteile resultiert durch das Auftragen des Kontaktmediums Wasser im Gegensatz zu Glycerin, welches Paper 1 Abbildung 5 deutlich illustriert.

4.1.2 Einfluss der Haarentfernung

Das Haar gliedert sich in Haarschaft und Follikel. Der Haarschaft besteht aus verhorntem Keratin, welches ein sehr helles AF-Signal aufweist. Daraus resultiert eine Abnahme der Signalintensität unterhalb des Haares. Durch den starken Signalverlust im umliegenden Gewebe sind dort keine epidermalen Zellen mehr sichtbar. Dies ist im Paper 1 Abbildung 4 und 6 veranschaulicht. Das SHG-Signal ist ebenso stark reduziert.

4.1.3 Einfluss der Tape Stripping-Methode

Das Tape Stripping entfernt die oberste Schicht des SCs. Die infolgedessen reduzierte Zahl der Korneozyten vermindert den von ihnen ausgehende Streuungs- und Absorptionseffekt. Dies wiederum steigert die AF-Signalintensität in der Epidermis. In den Scans des Papers 1 Abbildung 7 ist der Effekt im Vergleich abgebildet.

4.2 STRATUM CORNEUM- UND EPIDERMISDICKE

4.2.1 Bestimmung der Stratum corneum-Dicke und deren Einflussfaktoren

Die Dicke des SCs nimmt von der Wade über den dorsalen Unterarm, volaren Unterarm, der Glutealregion zum Abdomen zu. Das SC am dorsalen Unterarm ist signifikant dicker als am volaren Unterarm ($p < 0,001$), der Glutealregion ($p = 0,017$) und des Abdomens ($p = 0,012$). Visualisiert sind die Ergebnisse in einem Boxplot im Paper 3 Abbildung 3. Das SC der Wade ist signifikant am dicksten gegenüber dem volaren Unterarm ($p = 0,001$), dem Abdomen ($p = 0,001$) und der Glutealregion ($p = 0,004$) mit Ausnahme des dorsalen Unterarms. Die SC-Dicke verschmälert sich signifikant im Alter am Abdomen ($p = 0,009$), hingegen verdickt sie sich an der Glutealregion signifikant ($p = 0,015$). Ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die SC-Dicke kann in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

4.2.2 Bestimmung der Epidermisdicke und deren Einflussfaktoren

Die Epidermis insgesamt lässt sich sowohl durch das 2PM als auch durch die OCT kontrastieren. In der Gegenüberstellung beider Methoden wird stets mit dem 2PM eine dickere Epidermis im Vergleich zur OCT gemessen, mit Ausnahme der Epidermis am Abdomen. Beide Methoden korrelieren positiv signifikant ($r = 0,494$; $p < 0,0001$; $N = 97$). Im Box-Plot des Papers 3 Abbildung

4 sind die Werte beider Messmethoden gegenübergestellt. Unter der Nutzung des 2PM zeigen alle untersuchten Körperregionen eine unterschiedliche ED. Im Vergleich zum volaren Unterarm ($p = 0,004$) und Abdomen ($p = 0,001$) ist die Epidermis am dorsalen Unterarm signifikant dicker. Die ED am volaren Unterarm ist signifikant dicker als am Abdomen ($p = 0,003$). Am Abdomen ist die Epidermis signifikant am dünnsten ($p < 0,01$). Auch mit der OCT wird die ED an der Glutealregion am dicksten gemessen. Sie ist im Vergleich zum dorsalen Unterarm ($p = 0,003$), volaren Unterarm ($p = 0,002$), Abdomen ($p = 0,015$) sowie zur Wade ($p < 0,001$) je signifikant dicker.

Beide vertikale Techniken der optischen Biopsie zeigen die Korrelation zwischen dem Alter und jeder der fünf Körperregionen, im Paper 3 Abbildung 5 illustriert. In der bildlichen Darstellung mit dem 2PM geht die Dickenabnahme mit der Abflachung der epidermalen Reteleisten und dermalen Papillen einher. Die Abnahme der ED im Alter ist am dorsalen Unterarm ($p = 0,002$) und volaren Unterarm ($p = 0,009$) signifikant. In der OCT ist eine Abnahme der ED im Alter einerseits am dorsalen Unterarm ($p = 0,028$) und volaren Unterarm ($p = 0,01$), andererseits am Abdomen ($p = 0,038$) signifikant festzustellen.

Betrachtet man den Einfluss des Geschlechts auf die ED, so wird allzeit eine dickere Epidermis an allen untersuchten Hautarealen der Männer im Vergleich zu Frauen gemessen. Signifikant ist dieses Phänomen am Abdomen ($p = 0,028$) und an der Wade ($p = 0,041$). In der OCT ist dieser Effekt an der Glutealregion ($p < 0,001$) signifikant.

4.3 BESTIMMUNG DES SAAID UND DESSEN EINFLUSSFAKTOREN

Der SAAID ist abhängig von den Anteilen der Elastin- und Kollagenstrukturen. Die Werte des SAAID der verschiedenen Körperregionen sind dem Box-Plot des Papers 2 Abbildung 2 zu entnehmen. An der Glutealregion ist der SAAID im Vergleich zu allen anderen Körperregionen signifikant am niedrigsten ($p < 0,05$). Der SAAID am volaren Unterarm zeigt in seiner Tendenz einen höheren Wert als am dorsalen Unterarm und ist gegenüber dem Ergebnis des Abdomens signifikant höher ($p = 0,023$).

Bereits visuell ist der Unterschied zwischen junger und gealterter Haut erfassbar, wie Paper 1 Abbildung 8 und Paper 2 Abbildung 3 zeigen. Die Kollagenfasern wirken in ihrer Signalintensität des SHG im Verhältnis zu den Elastinfasern, die eine höhere Signalintensität des AF aufweisen, vermindert. Die Elastinfasern scheinen in der Dermis älterer Haut mehr durch, als in der Dermis jüngerer Haut, wodurch die obere Dermis orange wirkt. Durch die Berechnung des SAAID kann

diese altersbedingte dermale Gewebeveränderung objektiviert werden. In dieser Studie ist die negative Korrelation zwischen dem SAAID und Alter am dorsalen Unterarm ($p = 0,017$) und an der Glutealregion ($p = 0,02$) signifikant, siehe Paper 2 Abbildung 4.

Analysiert man den Einfluss des Geschlechts auf den SAAID, so liegt der Index bei Frauen in allen Körperregionen höher als bei Männern, wie Paper 2 Abbildung 5 zeigt. An der Wade ist diese Beobachtung signifikant ($p = 0,004$).

5 DISKUSSION

5.1 METHODENOPTIMIERUNG

Eine höhere Bildauflösung und Intensität epidermaler und dermaler Bestandteile resultiert aus der Verwendung von destilliertem Wasser als Kontaktmedium und einer Haarrasur sowie dem Anwenden der Tape Stripping-Methode zur Beurteilung spezifisch dermaler Strukturen. Der Vorteil des Kontaktmediums Wasser im Gegensatz zu Glycerin lässt sich durch den Brechungsindex des Glycerins $n = 1,47$ erklären. Dieser ist vergleichbar mit jenem des Kollagens $n = 1,47$, unterscheidet sich jedoch deutlich von dem der Epidermis $n = 1,43$. Wasser mit einem Brechungsindex von $n = 1,33$ liegt hingegen deutlich näher an dem der Epidermis und ihrer Bestandteile. Der Brechungsindex des Zytoplasmas ist $n = 1,35$ und der des Zellkerns $n = 1,36$ (47). Zudem penetriert Wasser besser in die superficiale Schicht des SCs und beeinträchtigt somit nicht das Kollagen-Signal. Zudem liegt eine Diskrepanz zwischen dem Brechungsindex der Haut und der starken Strahlung des Haares bei nicht rasierter Haut vor. Die dunklen Areale um die Haarfollikel ergeben sich aus der Absorption der Anregungsstrahlung durch den pigmentierten Haarschaft. Die durch Tape Stripping erhöhte Signalintensität dermaler Strukturen mit resultierendem Informationsgewinn konnte bereits durch ähnliche Ergebnisse in Ex-vivo-Studien an Schweinehaut nachgewiesen werden (41).

5.2 EINFLUSSFAKTOREN AUF EPIDERMAL UND DERMALE STRUKTUREN

5.2.1 Evaluierung der Stratum corneum-Dicke

Das SC ist an der Wade am dicksten. Dies kann durch eine weniger natürliche Hautabschilferung gegenüber anderer Hautschichten erklärt werden (27). Ein dickeres SC am dorsalen Unterarm als eine UV-exponierte Hautstelle gegenüber sonnengeschützter Haut, wie die des Abdomens, des volaren Unterarms und der Glutealregion, wird auch durch die Studie von Huzaria, et. al verzeichnet. Er verwendete die CRS als Messmethode und detektierte ein dünneres und raueres

SC an sonnengeschützter Haut im Vergleich zu sonnenexponierter Haut (20). Bereits 1997 wies Lock-Andersen, et al. darauf hin, dass das SC an Körperstellen mit gering ausgesetzter UV-Einstrahlung weniger Photoprotektion aufzeigt (48). Ebenso konnte eine Veränderung der SC-Dicke im Alter belegt werden. Auch wenn diese nicht für alle gemessenen Hautareale generalisiert werden kann. Verschiedene Studien zeigen ähnlich kontroverse Ergebnisse. OCT-Messungen, welche u.a. aus falscher Annahme das SC bemessen haben, ergaben sowohl eine Verdickung des SCs im Alter am Abdomen als auch ein Ausdünnen des SCs am dorsalen Unterarm und der Glutealregion (49). Andere Studien konnten keine signifikante Korrelation zwischen der Veränderung der SC-Dicke und dem Alter unter der Nutzung ex-vivo von Lichtmikroskopie oder in-vivo mit CRS feststellen (14; 13; 48; 49). Abgesehen von Fruhstorfer, et al., welcher ein dünneres SC am volaren Zeigefinger bei Frauen im Vergleich zu Männern maß, gab es keine weiteren Studien, die den Einfluss des Geschlechtes auf die SC-Dicke identifizieren (50).

5.2.2 Auswertung der Epidermisdicke

Die Epidermis ist einerseits an der Glutealregion unabhängig vom Alter und des Geschlechts im Vergleich zu allen anderen Körperregionen am dicksten ($p < 0,05$). Dieses Areal ist beispielhaft für eine der mechanischen Belastung stark ausgesetzten Körperregion. Durch die größere Dehnung der Haut verringert sich der elastische Charakter des Gewebes (27; 45). Andererseits weisen die Ergebnisse den Einfluss extrinsischer Faktoren, wie UV-Strahlung auf (51; 52). Die Epidermis sonnenexponierter Haut ist dicker als die der UV geschützten (53; 14). Da die Epidermis der Glutealregion dicker ist als die am dorsalen Unterarm, liegt es nahe, dass die unterschiedlichen extrinsischen Faktoren die Wachstums- und Differenzierungsprozesse in differentem Maße beeinflussen und irritieren. Im Gegensatz dazu konnte der intrinsische Einfluss der Körperregion auf die ED in der OCT-Studie von Mogensen, et al. nicht gezeigt werden. Hier existierte kein signifikanter Unterschied zwischen der ED des dorsalen Unterarmes und des volaren Unterarmes sowie gegenüber der Wade (15).

Eine Verschmälerung der ED mit zunehmendem Alter wurde bereits in der Vergangenheit mit vielen verschiedenen Bildgebungsprozessen, wie der OCT, LSM, CRS und auch histologisch via Lichtmikroskopie nachgewiesen (14; 15; 48; 52; 53). Mit der neuen Methode des 2PMs als auch dem VivoSight-Scanner wird das bestätigt. Die statistisch negative Korrelation zwischen Alter und ED wird auch in einer OCT-Studie von Mogensen, et al. nachgewiesen, welche verschiedene Körperregionen, wie Gesicht, Brustkorb, Nacken und Wade untersuchte (15). Die Ergebnisse von Sandby-Møller, et al., die keine signifikante Abhängigkeit der ED im Alter an verschiedenen

Hautstellen, wie Schulter, dorsaler Unterarm und Gesäß zeigen, stehen dem Ganzen kontrovers entgegen (13). In der Evaluation und Diskussion der Messergebnisse muss neben der intrinsischen, chronischen Hautalterung auch der Prozess der extrinsischen Hautalterung wie das Photoaging berücksichtigt werden. Beide Effekte überlappen sich. Die Sonnenexposition induziert Hautalterungsprozesse, die sich in der Zunahme der ED, u.a. aus inflammatorischen Hyperpigmentierung resultierend, als auch in der Reduktion des Kollagens in der Dermis niederschlagen (53; 18; 14). Die Interaktion beider Prozesse wurde durch Neerken, et al. mit der OCT und einem CRS dargestellt. U.a. wurde gezeigt, dass die Reduzierung der ED von der spezifischen Körperstelle abhängig ist. Der Effekt ist an sonnengeschützter Haut deutlicher als an nicht UV-geschützter Haut. Die Dicke der gesamten Epidermis, gemessen am Unterarm, nahm schrittweise signifikant bis zu einer ED von 15 μm mit zunehmendem Alter ab (14).

Zudem haben Frauen eine dickere Epidermis als Männer. Im Gegensatz dazu zeigte die OCT-Studie von Mogensen, et al. keinerlei geschlechtsspezifische Unterschiede der ED an zwölf verschiedenen Körperregionen (15). Die Studie von Gambichler, et al. zeigte ebenso keinen signifikanten Einfluss des Geschlechts auf die ED im Bereich der Skapula, Wade, des ventralen Unterarms, Gesäß und Pectoralis. Ausgenommen sind die Ergebnisse an der Stirn. Hier war die ED signifikant dünner ($p < 0,05$) bei älteren Frauen im Vergleich zu älteren Männern (46).

5.2.3 Bewertung des SAAID

Die Anteile der Elastin- und Kollagenstrukturen differieren in ihrer Verhältnismäßigkeit in unterschiedlichen Körperregionen. Ein niedriger SAAID am dorsalen Unterarm weist eine physiologisch niedrigere Elastizität auf als am volaren Unterarm, welches die Ergebnisse vorangegangener Studien unterstreicht. Sanchez, et al. zeigte höhere SAAID-Werte von UV-protektierter Haut gegenüber Sonnenstrahlung ausgesetzter Haut (34). Ein ähnlicher Effekt wurde in einer Studie von Darwin, et al. aufgezeigt, in der die Einwirkung von UV-Strahlung auf die ungeschützte Haut gegenüber mit Sonnencreme-geschützter Haut, über einen Zeitraum von vier Wochen, untersucht wurde (32). Interessanterweise ist in der hiesigen Studie der SAAID am sonnengeschützten Gesäß am niedrigsten. Der Einfluss von mechanischen Noxen und Bewegung scheint hier einen weiteren Effekt zu haben, welcher die Haut über dem Gluteus stark ausdehnt und so zu einer höheren elastischen Belastung führt. Auch da ist der Unterschied der SAAID-Werte zwischen zwei sonnengeschützten Bereichen, dem volaren Unterarm und der Glutealregion, deutlicher als zwischen dem sonnengeschützten volaren Unterarm und dem sonnenexponierten dorsalen Unterarm. Resultierend ist der Einfluss auf den SAAID nur multifaktoriell zu verstehen.

Ein Vergleich mit weiteren Studien ist auf Grund der unterschiedlich angewandten Methoden und untersuchten Körperregionen, wie das Gesicht, der nicht näher bezeichneten Unterarm, der Nacken und nicht weiterer definierte Körperstellen, erschwert (32; 1; 43; 35; 38; 37).

Die Auflockerung der Kollagenbündel im Alter, wodurch das Fasernetzwerk an seiner geordneten Struktur verliert, zeigt sich in der Verminderung des SHG-Signals. Die Kollagenfasern verlieren an ihrer Haltekraft (54). Die Elastinfasern dagegen akkumulieren, welches sich in einer erhöhten Intensität des AF-Signals widerspiegelt (50). Die Verminderung des SAAID mit zunehmendem Alter kann in dieser Studie belegt werden. Koehler, et al. nutzte den sogenannten Dermis-Morphologie-Score, welcher zugleich zur Quantifizierung der morphologischen Veränderungen im Alter dient. Es zeigte sich das gleiche Ergebnis, eine signifikante Abnahme des Index im Alter (35). In der Studie von Lin, et al. war ebenso eine Zunahme von AF-Arealen im Vergleich zur Abnahme von SHG-Arealen im Alter zu sehen, welche die histologischen Strukturveränderungen der Dermis widerspiegeln (39). Karagas, et al. verwies nicht nur auf eine starke und höher frequentierte Solarelastose in sonnenexponierter Haut, sondern zeigte auch eine signifikante Zunahme mit dem Alter ($p \leq 0,001$) auf (33). Die intraindividuellen Eigenschaften der Dermis und individuelle Kumulation der Solarexpression erklären die unterschiedlichen Werte in den einzelnen Altersgruppen. Darüber hinaus sollten weitere intrinsische und umweltbedingte Einflussfaktoren, wie das Nutzen von Sonnencreme oder Rauchen, berücksichtigt werden. Die vorliegende Studie war nicht darauf abgezielt den kurzfristigen Effekt von UV-Strahlung auf die Haut zu untersuchen, weswegen der Zeitraum der Datengewinnung auf die sonnenärmeren Monate zwischen September und Dezember (Berlin, Deutschland) gelegt wurde.

Darüber hinaus lassen sich in der vorliegenden Studie geschlechtsspezifische Unterschiede finden. Der SAAID ist bei Frauen höher als bei Männern. In der Literatur hingegen werden unterschiedliche Ergebnisse berichtet. Koehler, et al. demonstrierte eine geschlechtsspezifische dynamische Veränderung des SAAID im Alter. Frauen wiesen eine steilere und schnellere Reduzierung des SAAID auf als die jeweilige Vergleichsgruppe der Männer (40). In nachfolgenden Studien konnte diese Korrelation nicht reproduziert werden (43; 35).

5.3 VOR- UND NACHTEILE DER VERWENDETEN 2PM- UND OCT-GERÄTE ZUR BESTIMMUNG KUTANER STRUKTUREN

Mit dieser Pilotstudie kann gezeigt werden, dass das 2PM, neben der bereits bekannten Messmethode der OCT, eine alternative Technik der nicht-invasiven Darstellung der Epidermis

ist. Während das SC durch das 2PM als eine klar abzugrenzende autofluoreszierende Schicht erscheint, wie Paper 1 Abbildung 3 und Paper 3 Abbildung 2 demonstrieren, kann das SC mit der hier verwendeten OCT nicht eindeutig definiert werden. Die epidermale Junktionzone bildet sich im 2PM als Welle ab. In der OCT stellt sich die Transitzone zwischen Epidermis und Dermis aufgrund der Auflösungsgrenzen der OCT eher als eine gerade Linie dar. Die Diskrepanz der ausgemessenen ED-Werte kann damit erklärt werden, dass das 2PM eine deutlich höhere Auflösung als die hier verwendete OCT bietet. Zwar sind die Epidermis und Dermis in der OCT gut voneinander abgrenzbar, jedoch nicht bis auf zelluläre Ebene. Im Bild ist die wellenförmige Struktur nicht sichtbar, so dass angenommen wird, dass ungenauere Messdaten resultieren. Kritisch muss die 2PM-Technik der ED-Bestimmung insofern gesehen werden, als dass diese, die aus der Histologie bekannte, sehr wellenartige dermoepidermale Übergangzone exakt wiedergibt, jedoch eine geeignete Mittelwertbildung benötigt, um einen für das gesamte Hautareal validen ED-Wert angeben zu können. Bei Fehlern in dieser Statistik können auch inkorrekte Werte durch hohe Schwankung bei der Ausmessung entstehen (17; 46).

6 FAZIT

Das Weitfeld-2PM bietet eine vertikale Schnittbildgebung über mehrere Millimeter lateraler Ausdehnung in einer zellulären Auflösung in-vivo. Das weite Sichtfeld ermöglicht einen sehr guten Überblick über epidermale und obere dermale Strukturen sowie deren Veränderungen. Die Reduktion starker Absorption und Streuung der Strahlung durch Haarentfernung oder Abtragen von Korneozyten durch Tape Stripping gewährleistet die Lichtausbreitung in tiefere Schichten. Verglichen mit der OCT bietet das innovative 2PM mit seiner höheren Auflösung eine Methode zur genaueren Untersuchung und detaillierten Darstellung der Epidermis, wodurch zum Beispiel die Reteleiste aussagekräftig abgebildet werden kann. Darüber hinaus ist die Abbildung des SCs ohne Artefakte möglich. Daraus folgend ist das Messen der SC-Dicke über mehrere Zentimeter an verschiedenen Hautstellen zum ersten Mal durchführbar. In nachfolgenden Studien können nun auch detaillierte Einflussfaktoren und minimale Auswirkungen auf die Veränderung der obersten Schicht der Epidermis detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Methoden, 2PM und OCT, zur Identifizierung der ED geeignet sind. Dadurch ist die Evaluierung der Einflüsse intraindividuellen, intrinsischer und extrinsischer Faktoren auf jene möglich. Die ersten In-vivo-Aufnahmen zeigen, dass die Visualisierung von elastischen Fasern in AF-Bildern möglich ist. Die unterschiedlichen Signalintensitäten können somit auch zur Bestimmung des Hautalters genutzt werden. Die Quantifizierung der Hautalterung ist mit dem SAAID möglich. Dieser ist abhängig von Elastin- und Kollagenstrukturen, welche sich in ihrer Zusammensetzung an verschiedenen

Körperstellen deutlich unterscheiden. Damit bestätigt diese Pilotstudie den Einfluss des Alters auf die EZM. Darüber hinaus wurden erste Hinweis auf die Beeinflussung des SAAID durch das Geschlecht gezeigt. Zudem war es durch die Anwendung derselben Methode in einer Studie möglich signifikante Unterschiede des SAAID bezüglich sonnengeschützter und UV-ausgesetzter Hautareale zu messen. Wegen der geringen Anzahl an Probanden sind weitere Studien nötig, um die Daten zu verifizieren. Durch das Anwenden des beschriebenen nicht-invasiven Prozesses ist dies ethisch vertretbar. In zukünftigen Studien muss berücksichtigt werden, dass die Körperregion einen erheblichen Einfluss auf den SAAID hat, um gemessene Werte nicht zu verzerren.

Zu schlussfolgern ist, dass das 2PM eingesetzt werden kann, um kosmetische, medizinische und umweltbedingte Effekte auf das SC, die gesamte Epidermis und die obere Dermis zu evaluieren. Die invasive Diagnostik in der Dermatologie mittels Histologie kann durch die optische Biopsie via 2PM additiv unterstützt und der Einsatz jener minimiert werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Cicchi, R**, Sestini, S, De Georgi, V, Massi, D, Lotti, T, Pavone, FS. Nonlinear laser imaging of skin lesions. *J Biophotonics*. 2008, 1(1):62-73.
2. **Knott, A**, Reuschlein, K, Lucius, R, Stäb, F, Wenck, H, Gallinat, S. Deregulation of versican and elastin binding protein in solar elastosis. *Biogerontology*. 2009, 10(2):181-90.
3. **Welsch, U**. *Lehrbuch Histologie*. München : Sobotta, 2006. S. 267.
4. **Crowther, JM**, Sieg, A, Blenkiron, P, Marcott, C, Matts, PJ, Kaczvinsky, JR, Rawlings, AV. Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. *Br J Dermatol*. 2008, 159(3):567-77.
5. **Richter, T**, Peuckert, C, Sattler, M, Koenig, K, Riemann, I, Hintze, U, Wittern, KP, Wiesendanger, R, Wepf, R. Dead but highly dynamic--the stratum corneum is divided into three hydration zones. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004, 7(5):246-57.
6. **Lademann, J**, Richter, H, Astner, S, Patzelt, A, Knorr, F, Sterry, W, Antoniou, Ch. Determination of the thickness and Determination of the thickness and structure of the skin barrier by in vivo laser scanning microscopy. *Laser Physics Letters*. 2008, 5(4):311-15.
7. **Lademann, J**, Otberg, N, Richter, H, Meyer, L, Audring, H, Teichmann, A, Thomas, S, Knüttel, A, Sterry, W. Application of optical non-invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with histological analysis. *Skin Res Technol*. 2007, 13(2):119-32.

8. **Gambichler, T**, Boms, S, Stücker, M, Kreuter, A, Sand, M, Moussa, G, Altmeyer, P, Hoffmann, K. Comparison of histometric data obtained by optical coherence tomography and routine histology. *J Biomed Opt.* 2005, 10(4):44008.
9. **Gambichler, T**, Boms, S, Stücker, M, Kreuter, A, Moussa, G, Sand, M, Altmeyer, P, Hoffmann, K. Epidermal thickness assessed by optical coherence tomography and routine histology: preliminary results of method comparison. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006, 20(7):791-5.
10. **Weissman, J**, Hancewicz, T und Kaplan, P. Optical coherence tomography of skin for measurement of epidermal thickness by shapelet-based image analysis. *Opt Express.* 2004, 12(23):5760-9.
11. **Toki, F**, Honkura, N, Shirakata, Y, Imamura, T, Higashiyama, S, Nanba, D. Second harmonic generation reveals collagen fibril remodeling in fibroblast-populated collagen gels. *Cell Structure and Funktion.* 2013, 38(2):227-36.
12. **Lovell, CR**, Smolenski, KA, Duance, VC, Light, ND, Young, S, Dyson, M. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *Br J Dermatol.* 1987, 117(4):419-28.
13. **Sandby-Møller, J**, Poulsen, T und Wulf, HC. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol.* 2003, 83(6):410-3.
14. **Neerken, S**, Lucassen, GW, Bisschop, MA, Lenderink, E, Nuijs, TA. Characterization of age-related effects in human skin: A comparative study that applies confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2004, 9(2): p., 2004, 9(2):274-81.
15. **Mogensen, M**, Morsy, HA; Thrane, L; Jemec, GB. Morphology and epidermal thickness of normal skin imaged by optical coherence tomography. *Dermatology.* 2008, 217(1):14-20.
16. **König, K**. Clinical multiphoton tomography. *J Biophotonics.* 2008, 1(1):13-23.
17. **Josse, G**, George, J und Black, D. Automatic measurement of epidermal thickness from optical coherence tomography images using a new algorithm. *Skin Res Technol.* 2011, 17(3):314-9.
18. **Sauermann, K**, Clemann, S, Jaspers, S, Gambichler, T, Altmeyer, P, Hoffmann, K, Ennen, J. Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol.* 2002, 8(1):52-6.
19. **Darvin, ME**, Richter, H, Zhu, YJ, Meinke, MC, Knorr, F, Gonchukov, SA, König, K, Lademann, J. Comparison of in vivo and ex vivo laser scanning microscopy and multiphoton tomography application for human and porcine skin imaging. *Quantum Electronics.* 2014, 44(7):646-51.

20. **Huzaira, M**, Rius, F, Rajadhyaksha, M, Gonzalez, S. Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol*. 2001, 116(6):846-52.
21. **Sugata, K**, Osanai, O, Sano, T, Akiyama, M, Fujimoto, N, Tajima, S, Takema, Y. Evaluation of unique elastic aggregates (elastic globes) in normal facial skin by multiphoton laser scanning tomography. *European Journal of Dermatology*. 2015, 52(2):138-44.
22. **Ulrich, M**, Klemp, M, Darvin, ME, König, K, Lademann, J, Meinke, MC. In vivo detection of basal cell carcinoma: comparison of a reflectance confocal microscope and a multiphoton tomograph. *J Biomed Opt*. 2013, 18(6):61229.
23. **Baillie, L**, Askew, D, Douglas, N, Soyer, HP. Strategies for assessing the degree of photodamage to skin: a systematic review of the literature. *Br J Dermatol*. 2011, 165(4):735-42.
24. **Schenke-Layland, K**, Riemann, I, Damour, O, Stock, UA, König, K. Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs--powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006, 58(7):878-96.
25. **Zipfel, WR**, Williams, RM, Christie, R, Nikitin, AY, Hyman, BT, Webb, WW. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100(12):7075-80.
26. **Zoumi, A**, Yeh, A und Tromberg, BJ. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99(7):11014-9.
27. **Houcine, A**, Delalleau, A, Heraud, S, Guiraud, B, Payre, B, Duplan, H, Delisle, MB, Damour, O, Bessou-Touya, S. How biophysical in vivo testing techniques can be used to characterize full thickness skin equivalents. *Skin Res Technol*. 2016, 22(3):284-94.
28. **Manickavasagam, A**, Hirvonen, LM, Melita, LN, Chong, EZ, Cook, RJ, Bozec, L, Festy, F. Multimodal optical characterisation of collagen photodegradation by femtosecond infrared laser ablation. *Analyst*. 2014, 139(23):6135-43.
29. **Biniek, K**, Levi, K und Dauskardt, RH. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc Natl Acad Sci*. 2012, 109(42):17111-6.
30. **Kurtmann, J**. How the sun ages our skin. The dermis as the driving force. *Hautarzt*. 2011, 62(8):588-90.
31. **Robert, C**, Bonnet, M, Marques, S, Numa, M, Doucet, O. Low to moderate doses of infrared A irradiation impair extracellular matrix homeostasis of the skin and contribute to skin photodamage. *Skin Pharmacol Physiol*. 2015, 28(4):196-204.

32. **Darvin, ME**, Richter, H, Ahlberg, S, Haag, SF, Meinke, MC, Le Quintrec, D, Doucet, O, Lademann, J. Influence of sun exposure on the cutaneous collagen/elastin fibers and carotenoids: negative effects can be reduced by application of sunscreen. *J Biophotonics*. 2014, 7(9):735-43.
33. **Karagas, MR**, Zens, MS, Nelson, HH, Mabuchi, K, Perry, AE, Stukel, TA, Mott, LA, Andrew, AS, Appelbaum, KM, Linet, M. Measures of cumulative exposure from a standardized sun exposure history questionnaire: a comparison with histologic assessment of solar skin damage. *Am J Epidemiol*. 2007,165(6):719-26.
34. **Sanchez, WY**, Obispo, C, Ryan, E, Grice, JE, Roberts, MS. Changes in the redox state and endogenous fluorescence of in vivo human skin due to intrinsic and photo-aging, measured by multiphoton tomography with fluorescence lifetime imaging. *J Biomed Opt*. 2013, 18(6):061217.
35. **Koehler, MJ**, Hahn, S, Preller, A, Elsner, P, Ziemer, M, Bauer, A, König, K, Bückle, R; Fluhr, JW, Kaatz, M. Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive in vivo scoring of the dermal fibre network. *Exp Dermatol*. 2008, 17(6):519-23.
36. **Waller, JM** und Maibach, HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res Technol*. 2006, 12(3):145-54.
37. **Sugata, K**, Osanai, O, Sano, T, Takema, Y. Evaluation of photoaging in facial skin by multiphoton laser scanning microscopy. *Skin Res Technol*. 2011, 17(1):1-3.
38. **Cicchi, R**, Kapsokalyvas, D, De Giorgi, V, Maio, V, Van Wiechen, A, Massi, D, Lotti, T, Pavone, FS. Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophotonics*. 2010, 3(1-2):34-43.
39. **Lin, SJ**, Wu, RJ, Tan, HY, Lo, W, Lin, WC, Young, TH, Hsu, CJ, Chen, JS, Jee, SH, Dong, CY. Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Opt Lett*. 2005, 30(17):2275-77.
40. **Koehler, MJ**, König, K, Elsner, P, Bückle, R, Kaatz, M. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Opt Lett*. 2006, 31(19):2879-81.
41. **Döge, N**, Thiel, E, Seewald, G, Albrecht, S, Vogt, A, Liebscher, J, Schönborn, KH. Wide-field Two Photon Microscopy: Transcending technology limitations. *Optik & amp*. 2015, 10(5): 39-42.
42. **Fitzpatrick, TB**. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988, 124(6):869-71.
43. **Koehler, MJ**, Preller, A, Kindler, N, Elsner, P, König, K, Bückle, R, Kaatz, M. Intrinsic, solar and sunbed-induced skin aging measured in vivo by multiphoton laser tomography and biophysical methods. *Skin Res Technol*. 2009, 15(3):357-63.

44. **Welzel, J.** Optical coherence tomography in dermatology: a review. *Skin Res Technol.* 2001, 7(1):1-9.
45. **Huang, AS,** Gonzalez, JM Jr, Le, PV, Heur, M, Tan, JC. Sources of structural autofluorescence in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013, 54(7):4813-20.
46. **Gambichler, T,** Matip, R, Moussa, G, Altmeyer, P, Hoffmann, K. In vivo data of epidermal thickness evaluated by optical coherence tomography: effects of age, gender, skin type, and anatomic site. *J Dermatol Sci.* 2006, 44(3):145-52.
47. **Tuchin, VV.** Optical clearing of tissues and blood using the immersion method. *Journal of Physics D.* 2004, 38(15):2497.
48. **Lock-Anderson, J,** Therkildsen, P, de Fine Olivarius, F, Gniadecka, M, Dahlstrom, K, Poulsen, T, Wulf, HC. Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1997, 13(4):153–8.
49. **Tsugita, T,** Nishijima, T, Kitahara, T, Takema, Y. Positional differences and aging changes in Japanese woman epidermal thickness and corneous thickness determined by OCT (optical coherence tomography). *Skin Res Technol.* 2013, 19(3):242-50.
50. **Fruhstorfer, H,** Abel, U, Garthe, CD, Knüttel, A. Thickness of the stratum corneum of the volar fingertips. *Clin Anat.* 2000, 13(6):429-33.
51. **Kambayashi, H,** Yamashita, M, Odake Y, Takada, K, Funasaka, Y, Ichihashi, M. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci.* 2001, 27(1):19-25.
52. **Gambichler, T,** Boms, S, Stücker, M, Moussa, G, Kreuter, A, Sand, M, Sand, D, Altmeyer, P, Hoffmann, K. Acute skin alterations following ultraviolet radiation investigated by optical coherence tomography and histology. *Arch Dermatol Res.* 2005, 297(5):218-25.
53. **Wu, S,** Li, H, Zhang, X, Li, Z. Optical features for chronological aging and photoaging skin by optical coherence tomography. *Lasers Med Sci.* 2013, 28(2):445-50.
54. **Lavker, RM,** Zheng, PS und Dong, G. Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J Invest Dermatol.* 1987, 88(3):44-51.
55. **Akhalaya, MY,** Maksimov, GV, Rubin, AB, Lademann, J, Darvin, ME. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin. *Ageing Res Rev.* 2014, 16:1-11.
56. **Bernstein, EF,** Chen, YQ, Tamai, K, Shepley, KJ, Resnik, KS, Zhang, H, Tuan, R, Mauviel, A, Uitto, J. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol.* 1994, 103(2):182-6.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Carolin Czekalla, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Vertikale nicht-invasive Darstellung der Haut mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie und optischer Kohärenztomografie – Einflüsse von Alter, Geschlecht und Hautareal*. 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 (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Unterschrift, Datum

ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

Carolin Czekalla hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Czekalla C**, Schönborn KH, Markworth S, Ulrich M, Göppner D, Gollnick H, Röwert-Huber J, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC. Technical parameters of vertical in-vivo multiphoton microscopy: A critical evaluation of the flyscanning method. *Laser Physics Letters*. 2015, 12(8):085602 DOI: 10.1088/1612-2011/12/8/085602.

Anteile an Publikation: Ethikvotum 10 %, Studiendesign 50 %, Durchführung der Studie, Erfassung der Daten und Auswertung zu 100 %, Schreiben der Publikation 70 %.

Publikation 2: **Czekalla C**, Schönborn KH, Döge N, Jung S, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC. Impact of body site, age and gender on the collagen/elastin index by non-invasive in-vivo vertical two photon microscopy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2017, 30(5):260-67. DOI: 10.1159/000477854.

Anteile an Publikation: Ethikvotum 10 %, Studiendesign 80 %, Durchführung der Studie, Erfassung der Daten und Auswertung mit Statistik zu 100 %, Verfassen der Publikation 80 %.

Publikation 3: **Czekalla C**, Schönborn KH, Lademann J, Meinke MC, Noninvasive Determination of Epidermal and Stratum Corneum Thickness in-vivo Using Two-Photon Microscopy and Optical Coherence Tomography: Impact of Body Area, Age, and Gender. *Skin Pharmacol Physiol*. 2019, 32(3):142–50; DOI: 10.1159/000497475.

Anteile an Publikation: Ethikvotum 10 %, Studiendesign 80%, Durchführung der Studie, Erfassung der Daten und Auswertung mit Statistik zu 100 %, Verfassen der Publikation 90 %.

Unterschrift, Datum

Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

DRUCKEXEMPLARE AUSGEWÄHLTER PUBLIKATIONEN

Czekalla C, Schönborn KH, Markworth S, Ulrich M, Göppner D, Gollnick H, Röwert-Huber J, Darwin ME, Lademann J, Meinke MC. Technical parameters of vertical in-vivo multiphoton microscopy: A critical evaluation of the flyscanning method. *Laser Physics Letters*. 2015, 12(8):085602. <https://doi.org/10.1088/1612-2011/12/8/085602>

Czekalla C, Schönborn KH, Döge N, Jung S, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC. Impact of body site, age and gender on the collagen/elastin index by non-invasive in-vivo vertical two photon microscopy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2017, 30(5):260-67. <https://doi.org/10.1159/000477854>

Czekalla C, Schönborn KH, Lademann J, Meinke MC. Noninvasive Determination of Epidermal and Stratum Corneum Thickness in-vivo Using Two-Photon Microscopy and Optical Coherence Tomography: Impact of Body Area, Age, and Gender. *Skin Pharmacol Physiol.* 2019, 32(3):142–50. <https://doi.org/10.1159/000497475>

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

Czekalla C, Schönborn KH, Markworth S, Ulrich M, Göppner D, Gollnick H, Röwert-Huber J, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC. Technical parameters of vertical in-vivo multiphoton microscopy: A critical evaluation of the flyscanning method. *Laser Physics Letters*. 2015, 12(8):085602. DOI: 10.1088/1612-2011/12/8/085602.

Czekalla C, Schönborn KH, Döge N, Jung S, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC. Body regions have an impact on the collagen/elastin index of the skin measured by non-invasive in-vivo vertical two photon microscopy. *Exp. Dermatol*. 2017, 26(9):822-24. DOI: 10.1111/exd.13283.

Czekalla C, Schönborn KH, Döge N, Jung S, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC. Impact of body site, age and gender on the collagen/elastin index by non-invasive in-vivo vertical two photon microscopy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2017, 30(5):260-67. DOI: 10.1159/000477854.

Czekalla C, Schönborn KH, Lademann J, Meinke MC. Noninvasive Determination of Epidermal and Stratum Corneum Thickness in-vivo Using Two-Photon Microscopy and Optical Coherence Tomography: Impact of Body Area, Age, and Gender. *Skin Pharmacol Physiol*. 2019, 32(3):142–50. DOI: 10.1159/000497475.

DANKSAGUNG

Vor allem ein Dank an Prof. Dr. Martina Meinke für die großartige Betreuung sowie Prof. Dr. Jürgen Lademann und der gesamten AG Lademann (Dr. Sebastian Ahlberg, Sabine Schanzer, Heike Richter, Christiane Domke) für ihre Unterstützung und Beantwortung von Fragen.

Dank der Kooperation mit der W.O.M. WORLD OF MEDICINE GmbH, Berlin (Dr. Karl-Heinz Schönborn, Dr. Sören Markworth, Marek Brylowski) wurde diese klinische Studie ermöglicht. Durch die fachliche Kompetenz des AG-Leiters Dr. Karl-Heinz Schönborn wurden stets technische Fragen beantwortet oder auftretende Probleme diskutiert und wenn möglich behoben.

Mein Dank geht auch an Erik Thiel, der durch seine langjährige Arbeit am 2PM VertiCAN stets ein exzellenter Ansprechpartner war und fortwährend Erklärung bot, ebenso Dr. Nadine Döge, die ihre Expertise an mich weitervermittelte, welche sie durch die Masterarbeit über ex-vivo Experimente am 2PM VertiSCAN erlangte.

Dr. Martina Ulrich ist ein Dank auszusprechen für den Beitrag aus klinischer Sicht, besonders durch ihre Erfahrung an der OCT.

Ein besonderes Dankeschön an meine Familie und Freunde für das lange emotionale Beistehen, Unterstützen, Aufbauen und deren Geduld.