

Analyse von Wundheilungsprozessen mit Hilfe von In-vivo-Laser-Scan-Mikroskopie

Characterization of wound healing by in vivo laser scanning microscopy

Abstract

Recent developments of new optical technologies in the past years lead to modern analytical systems suitable for new applications in the field of dermatology. In our study we describe the value of in vivo laser scanning microscopy (LSM) for the characterization of wound healing. In contrast to the gold standard – the measurements of the transepidermal water lost (TEWL) – this optical method has the advantage not to be disturbed by any interstitial fluid or topically applied substances. Standardized superficial wounds were produced by the suction blister technique and the healing process of the wounds was investigated using LSM. The LSM method has been proven to be a suitable technique for an objective evaluation of the wound healing process. Quantitative analysis of the healing process was facilitated by introducing scales characterizing the exact healing phase of the investigated wounds. This study revealed that the onset of tissue repair is not restricted to the edges of the cutaneous wound but is found at the same time around the area of the hair follicles. Small islands of corneocytes were forming around the hair follicles leading to fully covered wound surface consisting of a first layer of corneocytes.

Keywords: in vivo laser scanning microscopy, suction blister technique, wound healing, quantitative analysis

Zusammenfassung

Die erfolgreiche Entwicklung der optischen Technologien in den letzten Jahren führte zu Analysesystemen, die speziell im Bereich der Dermatologie neue Möglichkeiten der Anwendung erschließen. Im vorliegenden Beitrag wird über den Einsatz eines In-vivo-Laser-Scan-Mikroskops zur Charakterisierung von Wundheilungsprozessen berichtet. Im Gegensatz zum Goldstandard – den Messungen des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) – hat diese optische Methode den Vorteil, dass sie nicht durch Störfaktoren wie Wundflüssigkeit und topisch applizierte Substanzen beeinflusst wird. In der vorliegenden Studie wurden definierte oberflächliche Wunden mit Hilfe der Saugblasentechnik erzeugt und deren Abheilungsprozess mit Hilfe der In-vivo-Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) untersucht. Es zeigte sich, dass die LSM-Technik eine objektive Bewertung des Wundheilungsprozesses ermöglicht. Durch die Einführung von charakteristischen Stadien der Wundheilung ist es sogar möglich, eine quantitative Bewertung des Wundheilungsprozesses vorzunehmen. Im Rahmen der Untersuchungen konnte u.a. nachgewiesen werden, dass der Wundheilungsprozess nicht nur von den Wundrändern her erfolgt. Auch um die Haarfollikel bilden sich Inseln von Korneozyten, die allmählich miteinander verschmelzen und zu einer ersten Bedeckung der Wundoberfläche mit einer geschlossenen Zellschicht von Korneozyten führen.

Schlüsselwörter: In-vivo-Laser-Scan-Mikroskopie, Saugblasentechnik, Wundheilung, quantitative Analyse

Jürgen Lademann¹

Axel Kramer²

Lars Meyer¹

Alena Alborova¹

Wolfram Sterry¹

Bernhard Lange-
Asschenfeldt¹

1 Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie,
Charité – Universitätsmedizin
Berlin, Deutschland

2 Institut für Hygiene und
Umweltmedizin der Ernst-
Moritz-Arndt-Universität,
Greifswald, Deutschland

Einleitung

Mit der Zunahme der Lebenserwartung der Bevölkerung in den meisten Industrieländern kommt der Problematik der Wundheilung, speziell bei älteren Patienten, eine zunehmende Bedeutung zu.

Gegenwärtig sind verschiedene Wundcremes und Wundaufgaben kommerziell verfügbar [1], [2], [3]. Viele neue Produkte befinden sich in der Entwicklung. Die objektive Bewertung der Effektivität dieser Produkte bzw. entsprechender Therapieverfahren stellt bis heute ein Problem dar [4], [5]. Der gegenwärtige Goldstandard, der zur Bewertung der Barriereigenschaften der Haut eingesetzt wird – die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) – ist nur bedingt zur Charakterisierung der Wundheilung geeignet [6], [7], [8]. Zum einen sind Wunden häufig mit einem Film aus Wundflüssigkeit bedeckt. Zum anderen enthalten die meisten der Wundsalben wässrige Bestandteile, die auf der Haut abdampfen [9]. Beide Prozesse führen dazu, dass die TEWL-Messungen gestört werden.

Im vorliegenden Beitrag wird der Einsatz der In-vivo-Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) [10], [11], [12] zur Charakterisierung der Wundheilung auf zellulärer Ebene vorgestellt. Die Untersuchungen wurden dadurch möglich, dass es heute miniaturisierte Laser- und Detektionssysteme gibt, die es in Verbindung mit Lichtleitfasern erlauben, mikroskopische Untersuchungen an jeder beliebigen Körperstelle von Patienten und Probanden durchzuführen [13]. Mit Hilfe dieser Mikroskopiesysteme ist es möglich, die Reepithelialisierung der Wunden ungestört von der Behandlungsmethode zu analysieren. Der vorliegende Beitrag bezieht sich auf die Darstellung des Einsatzes der LSM zur Charakterisierung von Wundsalben. Darüber hinaus bietet die LSM wesentlich mehr Möglichkeiten im klinischen Alltag zur Diagnose und Therapiekontrolle [10], [11], [14], [15].

Materialien und Methoden

Probanden

Standardisierte Wunden wurden mit Hilfe der Saugblasentechnik am Unterarm von gesunden männlichen und weiblichen Probanden erzeugt [16]. Das Alter der Probanden lag zwischen 23 und 47 Jahren.

Saugblasentechnik

Eine Vakuumkammer mit einem Durchmesser von 6 mm wurde auf die Hautoberfläche aufgesetzt und über einen Zeitraum von 120 min ein Unterdruck von 200 mm/Hg erzeugt. Innerhalb von 30 bis 60 min entsteht hierbei auf der Hautoberfläche eine Saugblase [16]. Das Blasendach wurde anschließend entfernt. Damit entstand eine oberflächliche Wunde (Abbildung 1), die innerhalb von wenigen Tagen narbenfrei abheilt.



Abbildung 1: Oberflächliche mit Hilfe der Saugblasentechnik erzeugte Wunde

In-vivo-Laser-Scan-Mikroskopie

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Studie wurden mit Hilfe des In-vivo-Laser-Scan-Mikroskops „Stratum“ der Firma Otilass Ltd. (Melbourne, Australien) durchgeführt [17], [18]. Das Gerät besteht aus einer Basisstation, die den Argonlaser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und das Detektionssystem enthält [12], [13], [19]. Die Laserstrahlung wird über Lichtleitfasern einem frei beweglichen Handstück zugeführt (Abbildung 2), das das optische Abbildungssystem und die Fokussteuerung enthält. Das Laser-Scan-Mikroskop wurde bei den hier beschriebenen Untersuchungen im Fluoreszenzmodus betrieben. Hierzu wurde eine 0,1%ige Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein auf die Wundoberfläche gegeben, um die Oberflächenstruktur des Gewebes sichtbar zu machen. Das Fluoreszenzsignal wurde wiederum durch ein Bündel von Lichtleitfasern dem Detektionssystem in der Basisstation zugeführt. Die Messfläche betrug $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$. Mit Hilfe des Laser-Scan-Mikroskops konnten Untersuchungen bis zu einer Tiefe von $150 \mu\text{m}$ im Gewebe durchgeführt werden.

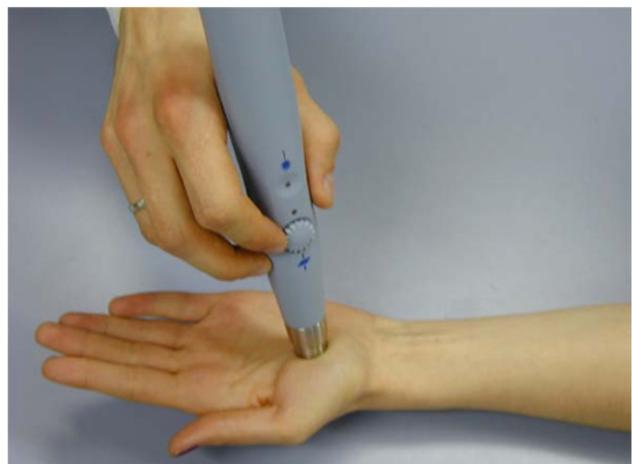


Abbildung 2: Handstück des Laser-Scan-Mikroskops, das das optische Abbildungssystem und die Fokussteuerung enthält

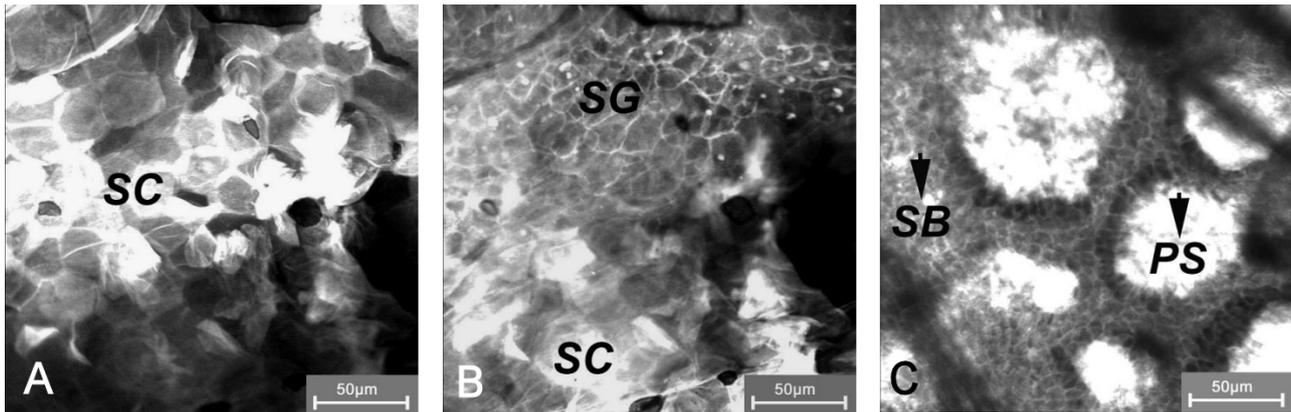


Abbildung 3: Laser-Scan-mikroskopische Darstellung verschiedener Hautschichten. A) Stratum corneum (SC); B) Grenzschicht zwischen dem Stratum corneum (SC) und dem Stratum granulosum (SG); C) Papillarstruktur (PS) mit Blutgefäßen.

Ergebnis und Diskussion

Wird der Laserfokus von der Oberfläche einer gesunden Haut in das Gewebe verfahren, werden verschiedene Hautschichten sichtbar. In Abbildung 3A ist die oberste Hautschicht des Stratum corneum (SC) dargestellt. Die regelmäßige Anordnung der Korneozyten ist klar zu erkennen. Der Farbstoff hat sich besonders in den Lipidschichten zwischen den Korneozyten angelagert, so dass scharfe Strukturen erkennbar sind. Fährt man den Laserfokus tiefer in das Gewebe, wird die Grenze zwischen dem Stratum corneum (SC) und dem Stratum granulosum (SG) sichtbar. In Abbildung 3B ist links unten noch das Stratum corneum zu erkennen, während oben rechts bereits das Stratum granulosum erscheint. Die Korneozyten mit einem Durchmesser von ca. 5 µm lassen sich gut von den wesentlich kleineren Zellen im Stratum granulosum unterscheiden. Die Strecke, die der Laserfokus von der Hautoberfläche bis zur Grenze des Stratum corneum zur lebenden Epidermis verfahren wurde, entspricht der Schichtdicke des Stratum corneum und ist zur Charakterisierung der Hautbarriere sehr gut geeignet. Verlagert man die Fokusebene weiter in tiefere Gewebeschichten, wird die Papillarstruktur (PS) der Haut sichtbar. Innerhalb der Papillarstruktur sind einzelne Blutgefäße zu erkennen (Abbildung 3C).

Führt man derartige Untersuchungen an Wundoberflächen durch, die vorher mit Hilfe der Saugblasentechnik erzeugt wurden, sieht man anstelle der Hautbarriere einen Flüssigkeitsfilm, der sich durch interstitielle Flüssigkeit gebildet hat. Unterhalb dieses Films sind klar die intakten Strukturen des lebenden Gewebes zu erkennen. Der Flüssigkeitsfilm trocknet relativ schnell ein und bildet eine krustenförmige Struktur auf der Wundfläche. Nach ungefähr 5 d bildet sich die erste Schicht der Korneozyten heraus (Abbildung 4). Die Neubildung des Stratum corneum beginnt erwartungsgemäß an den Wundrändern. Aber auch um die Haarfollikel bilden sich kleine Inseln aus Korneozyten heraus. Innerhalb von 1–2 d verschmelzen diese Inseln miteinander, so dass sich eine komplette Bedeckung der Wundoberfläche mit ein bis zwei Zelllagen von Korneozyten ergibt. Beobachtet man den natürlichen Heilungsprozess, so hat sich nach ca. 8–10 d die Haut-

barriere wieder vollständig herausgebildet. Jedoch weist diese Barriere noch keine glatte, homogene Oberflächenstruktur auf, wie das in Abbildung 3A gezeigt ist. Die Korneozyten zeigen eine unregelmäßige Anordnung. Erst nach 10–14 d wird eine Oberflächenstruktur erreicht, wie sie der Haut vor dem Setzen der Wunde entspricht.

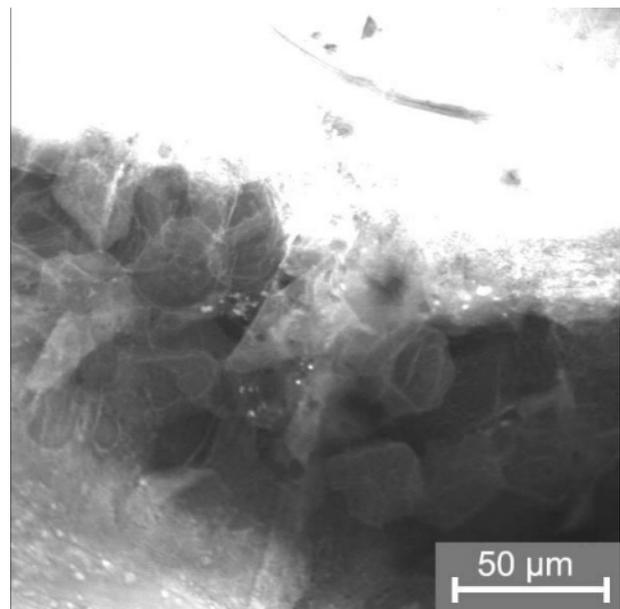


Abbildung 4: Nach ca. 5 d bildet sich die erste Zelllage von Korneozyten unter der verkrusteten Wundoberfläche heraus.

Die Laser-Scan-mikroskopischen Untersuchungen können sehr gut dafür eingesetzt werden, die Effektivität von Wundsalben bzw. Wundaufgaben zu charakterisieren. Der Nachteil der In-vivo-Laser-Scan-Mikroskopie im Vergleich zu den TEWL-Messungen besteht darin, dass die Laser-Scan-Mikroskopie keine Zahlenwerte liefert, die einen quantitativen Vergleich und eine Bewertung des Wundheilungsprozesses ermöglichen. Daher wurde im Rahmen der verschiedenen Wundheilungsstudien vorgeschlagen, den einzelnen Stadien der Wundheilung, welche durch die LSM gut erfasst werden können, Zahlenwerte zuzuordnen. So ist z.B. das Stadium 1 dadurch gekennzeichnet, dass die Wunde mit Wundsekret bedeckt ist, das eine geschlossene Kruste bildet. Im Stadium 2 hat sich die erste Lage des Stratum corneum neu herausgebildet. Die

vollständige Neubildung des Stratum corneum ist durch das Stadium 3 charakterisiert. Diese Klassifikation ist sehr gut geeignet, die Wirkung von Wundsalben bzw. Wundauflagen mit Hilfe der Laser-Scan-Mikroskopie quantitativ zu bewerten. Damit steht eine nicht invasive online-Analysemethode zur Verfügung, die es ermöglicht, Wundheilungsprozesse unabhängig von äußeren Störfaktoren objektiv zu bewerten. Im Gegensatz zu den TEWL-Messungen erhält man bei der LSM-Analyse eine konkrete Vorstellung über den Zustand der Wunde, der durch einen entsprechenden Zahlenwert charakterisiert ist. Durch die ortsaufgelöste Messung mit Hilfe der In-vivo-Laser-Scan-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass der Wundheilungsprozess nicht nur von den Wundrändern her beginnt, sondern auch um die Haarfollikel herum.

Danksagung

Wir danken der Stiftung für Hautphysiologie beim Stifterverband der Deutschen Wissenschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- Ryan TJ. Infection following soft tissue injury: its role in wound healing. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(2):124-8. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32801a3e7c
- White RJ, Cooper R, Kingsley A. Wound colonization and infection: the role of topical antimicrobials. *Br J Nurs.* 2001;10(9):563-78.
- Auger FA, Lacroix D, Germain L. Skin substitutes and wound healing. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009;22(2):94-102. DOI: 10.1159/000178868
- Charruyer A, Ghadially R. Stem cells and tissue-engineered skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009;22(2):55-62. DOI: 10.1159/000178864
- Nasca MR, Shih AT, West DP, Martinez WM, Micali G, Landsman AS. Intermittent pressure decreases human keratinocyte proliferation in vitro. *Skin Pharmacol Physiol.* 2007;20(6):305-12. DOI: 10.1159/000108146
- Buraczewska I, Brostrom U, Loden M. Artificial reduction in transepidermal water loss improves skin barrier function. *Br J Dermatol.* 2007;157(1):82-6. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.07965.x
- Buraczewska I, Berne B, Lindberg M, Loden M, Torma H. Long-term treatment with moisturizers affects the mRNA levels of genes involved in keratinocyte differentiation and desquamation. *Arch Dermatol Res.* 2009;301(2):175-81. DOI: 10.1007/s00403-008-0906-6
- Chang MJ, Huang HC, Chang HC, Chang TM. Cosmetic formulations containing Lithospermum erythrorhizon root extract show moisturizing effects on human skin. *Arch Dermatol Res.* 2008;300(6):317-23. DOI: 10.1007/s00403-008-0867-9
- Savic S, Savic M, Tamburic S, Vuleta G, Vesic S, Muller-Goymann CC. An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: the influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation. *Eur J Pharm Sci.* 2007;30(5):441-50. DOI: 10.1016/j.ejps.2007.01.006
- Astner S, Dietterle S, Otberg N, Rowert-Huber HJ, Stockfleth E, Lademann J. Clinical applicability of in vivo fluorescence confocal microscopy for noninvasive diagnosis and therapeutic monitoring of nonmelanoma skin cancer. *J Biomed Opt.* 2008;13(1):014003. DOI: 10.1117/1.2837411
- Dietterle S, Lademann J, Rowert-Huber HJ, Stockfleth E, Antoniou C, Sterry W, Astner S. In-vivo diagnosis and non-invasive monitoring of imiquimod 5% cream for non-melanoma skin cancer using confocal laser scanning microscopy. *Laser Physics Letters.* 2008;5(10):752-9. DOI: 10.1002/lapl.200810055
- Lademann J, Patzelt A, Darvin M, Richter H, Antoniou C, Sterry W, Koch S. Application of optical non-invasive methods in skin physiology. *Laser Physics Letters.* 2008;5(5):335-46. DOI: 10.1002/lapl.200710138
- 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. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2007.00208.x
- Changez M, Varshney M, Chander J, Dinda AK. Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: in vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006;50(1):18-25. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.018
- Gotter B, Faubel W, Neubert RH. Optical methods for measurements of skin penetration. *Skin Pharmacol Physiol.* 2008;21(3):156-65. DOI: 10.1159/000131081
- Lademann J, Jacobi U, Richter H, Otberg N, Weigmann HJ, Meffert H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W. In vivo determination of UV-photons entering into human skin. *Laser Physics.* 2004;14(2):234-7.
- Jacobi U, Engel K, Patzelt A, Worm M, Sterry W, Lademann J. Penetration of pollen proteins into the skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 2007;20(6):297-304. DOI: 10.1159/000108101
- Lademann J, Richter H, Golz K, Zastrow L, Sterry W, Patzelt A. Influence of microparticles on the homogeneity of distribution of topically applied substances. *Skin Pharmacol Physiol.* 2008;21(5):274-82. DOI: 10.1159/000148043
- Ossadnik M, Richter H, Teichmann A, Koch S, Schafer U, Wepf R, Sterry W, Lademann J. Investigation of differences in follicular penetration of particle- and nonparticle-containing emulsions by laser scanning microscopy. *Laser Physics.* 2006;16(5):747-50. DOI: 10.1134/S1054660X06050033

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,
Charité – Universitätsmedizin Berlin, Bereich
Hautphysiologie, Charitéplatz 1, 10117 Berlin,
Deutschland, Tel.: 030/450518100, Fax:
030/450518918
juergen.lademann@charite.de

Bitte zitieren als

Lademann J, Kramer A, Meyer L, Alborova A, Sterry W, Lange-Asschenfeldt B. Analyse von Wundheilungsprozessen mit Hilfe von In-vivo-Laser-Scan-Mikroskopie. *GMS Krankenhaushyg Interdisziplin.* 2009;4(2):Doc06.

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2009-4/dgkh000131.shtml>

Veröffentlicht: 16.12.2009

Copyright

©2009 Lademann et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.