

**Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
der Universität Würzburg**

Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Jürgen Groll

Quantitative Analyse histologischer Aufnahmen der Haut

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Daniel Kruse

aus Oldenburg

Würzburg, August 2023

Referentin: Prof. Dr. Heike Walles
Korreferentin: Prof. Dr. Nurcan Üçeyler
Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Kortüm

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. März 2024

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

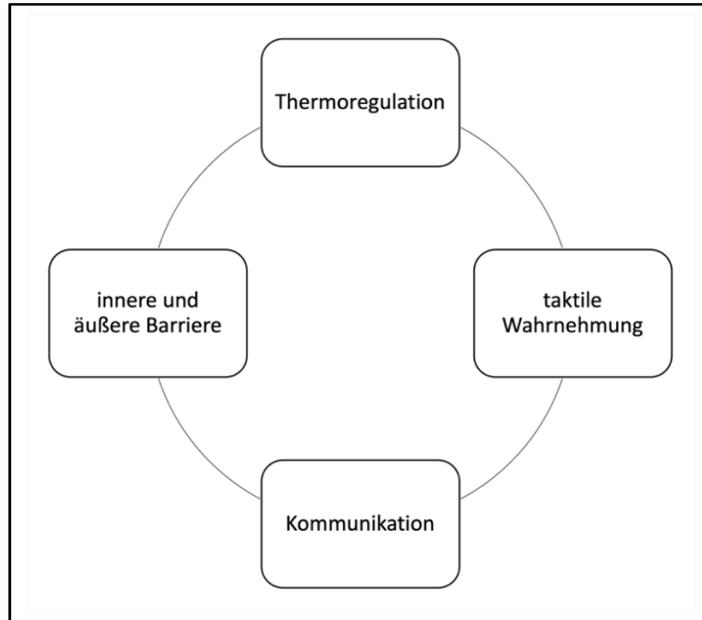
1	Einleitung	1
1.1	Funktionen und feingeweblicher Aufbau der Haut.....	1
1.2	Phasen der Wundheilung.....	5
1.3	Therapeutische Ansätze der Wundbehandlung.....	8
1.4	Modellorganismen und In-vitro-Testsysteme zur Untersuchung der Wundheilung	10
1.5	Methoden zur Untersuchung der Wundheilung in In-vitro Wundmodellen	11
1.6	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	15
2.1	Ethik- und Tierversuchsvotum.....	15
2.2	Bildgestützte Bewertung der epidermalen Histomorphologie	15
2.3	Bildgestützte Quantifizierung der Revaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung.....	18
3	Ergebnisse	25
3.1	Bildgestützte Bewertung der epidermalen Histomorphologie	25
3.2	Bildgestützte Quantifizierung der Revaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung.....	32
4	Diskussion	40
5	Zusammenfassung	46
6	Summary	47
7	Literaturverzeichnis	48

Appendix	
I. Anleitung und Hintergrundwissen zum BSGC-Score	
II. Bildbeilage zum BSGC-Score	
III. Formblatt des BSGC-Scores	
IV. Abkürzungsverzeichnis	
V. Abbildungsverzeichnis	
VI. Tabellenverzeichnis	
VII. Danksagung	
VIII. Lebenslauf	
IX. Eigene Veröffentlichungen	
X. Versicherung an Eides statt	

1 Einleitung

1.1 Funktionen und feingeweblicher Aufbau der Haut

Die Haut stellt das größte Organsystem des menschlichen Körpers mit unmittelbarem Kontakt zur Außenwelt dar. Hieraus generiert sich ein vielfältiges Aufgabenspektrum. Eine dieser Funktionen stellt die innere und äußere Hautbarriere dar. Sie schützt den Organismus vor potenziell schädigenden Einflüssen. Diese sind zum Beispiel mechanische Traumata, physikalische Schädigungen, wie Ultraviolettstrahlung oder chemische Noxen und biologische Pathogene wie Bakterien, Pilze oder Parasiten. Durch den zugrundeliegenden Aufbau werden Verluste von Flüssigkeit, Eiweißen und Elektrolyten nach außen verhindert (1). Keratin stellt dabei einen wichtigen Faktor des Hautschutzes dar (2). Durch das Zusammenspiel von Schweißsekretion und der Kontrolle des Gefäßtonus der oberflächlich liegenden Blutgefäße, und der damit verbundenen Perfusion, wird Einfluss unter anderem auf die Thermoregulation des Organismus genommen (1). Des Weiteren besitzt die Haut eine Sinnesfunktion. Diese taktile Wahrnehmung erfolgt durch das Vorhandensein verschiedener Rezeptoren, unter anderem Presso- und Thermorezeptoren sowie Nozizeptoren. Außerdem kann der Haut eine gewisse Kommunikationsfunktion zugeschrieben werden (1). Beispielhaft kann das Erröten oder aber die distanzschaffende bzw. distanzvermindernde Wirkung der in der Dermis angesiedelten Duftdrüsen genannt werden.



*Abb. 1: Funktionen der Haut:
Innere und äußere Barriere, Thermoregulation, taktile Wahrnehmung und Kommunikation stellen die Funktionen des Organsystems Haut dar.*

Man unterscheidet Leisten- und Felderhaut. Die Palmar- und Plantarflächen der Hände und Füße sind durch die sogenannte Leistenhaut bedeckt, das restliche Integument ist durch glatt imponierende Felderhaut bedeckt. Haare finden sich ausschließlich auf der Felderhaut. (3). Grundlegend kann ein dreischichtiger Aufbau beobachtet werden. Von apikal nach basal heißen diese drei Schichten Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut) (siehe Abb. 2).

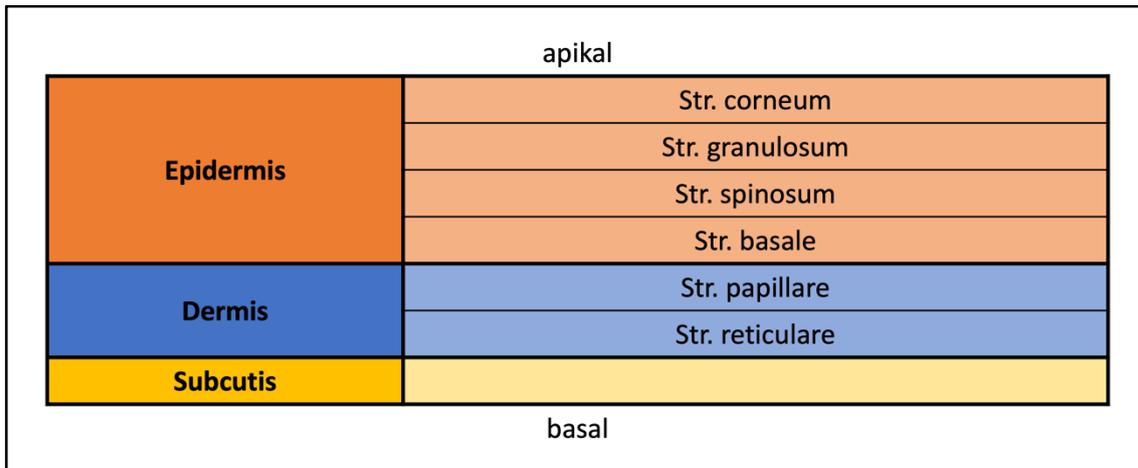


Abb. 2: Schichtweiser Aufbau der Felderhaut:

Die menschliche Haut weist einen dreischichtigen Aufbau auf. Basal befindet sich die Subcutis (Unterhaut, gelb dargestellt), unmittelbar darüber befindet sich die Dermis (Lederhaut, blau dargestellt). Die Dermis wiederum besteht aus einem basal liegenden Stratum reticulare und einem apikal befindlichen Stratum papillare. Den apikalen Abschluss mit Kontakt zur Außenwelt stellt die Epidermis (Oberhaut, orange dargestellt) mit seinen vier von basal nach apikal verlaufenden Strata Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum dar.

Bei der Epidermis handelt es sich um ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel mit Kontakt zur Außenwelt (4). Der zahlenmäßig führende Zelltypus der Epidermis ist der Keratinozyt. Vitale Keratinozyten finden sich in der physiologischen Epidermis lediglich in den Strata basale, spinosum und granulosum (5). Avitale Keratinozyten können im Stratum corneum nachgewiesen werden. Die Epidermis besitzt einen vierschichtigen Aufbau, in dem sich die Proliferations- bzw. Differenzierungsrichtung der Keratinozyten von basal nach apikal widerspiegelt. Basal liegt das Stratum basale, welches durch eine basophile einzelne Zellschicht säulenförmiger bis kubischer Keratinozyten mit prominenten Zellkernen charakterisiert ist. Das Stratum basale ist der mitotisch aktivste Bereich innerhalb der Epidermis. Von hier aus erfolgt die kontinuierliche Erneuerung der Epidermis (4). Unmittelbar hierüber liegt das Stratum spinosum. Es ist gekennzeichnet durch eine schwächere Basophilie als das Stratum basale. Die hier auftretenden Keratinozyten sind mehrschichtig und besitzen durch ihre interzellulären Verbindungen, v.a. Desmosomen, eine vielgestaltige bis stachelige Morphe. Zellkerne und Kernkörperchen sind erkennbar. Nach apikal auslaufend werden die Zellen flacher (5). Die Strata basale und spinosum werden zusammen, aufgrund ihrer mitotischen Aktivität, auch mit dem Begriff Stratum germinativum bezeichnet (3). Es schließt sich das Stratum granulosum an. Flache und polygonale Zellen, die Keratohyalin granula beherbergen, zeichnen dieses Stratum aus. Es handelt sich um die letzte Schicht mit vitalen

Keratinocyten. Nuclei sind noch vorhanden (1). Ausschließlich in der Leistenhaut befindet sich zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum das Stratum lucidum, welches lichtmikroskopisch glänzend imponiert. Das Stratum lucidum kann auch als Übergangszone vitaler zu avitaler Keratinocyten bezeichnet werden (3). Apikal abschließend, und somit in direktem Kontakt zur Außenwelt tretend, befindet sich das Stratum corneum. Charakteristisch für dieses Stratum ist eine flache amorphe Matrix aus avitalen Keratinocyten, welche Hornlamellen bilden, die im Verlauf von der Hautoberfläche abgeschilfert werden (1) (siehe Abb. 3). Abschließend kann festgestellt werden, dass das Stratum corneum mit seinen histomorphologischen Merkmalen den Endpunkt der Differenzierung der Keratinocyten darstellt (5).

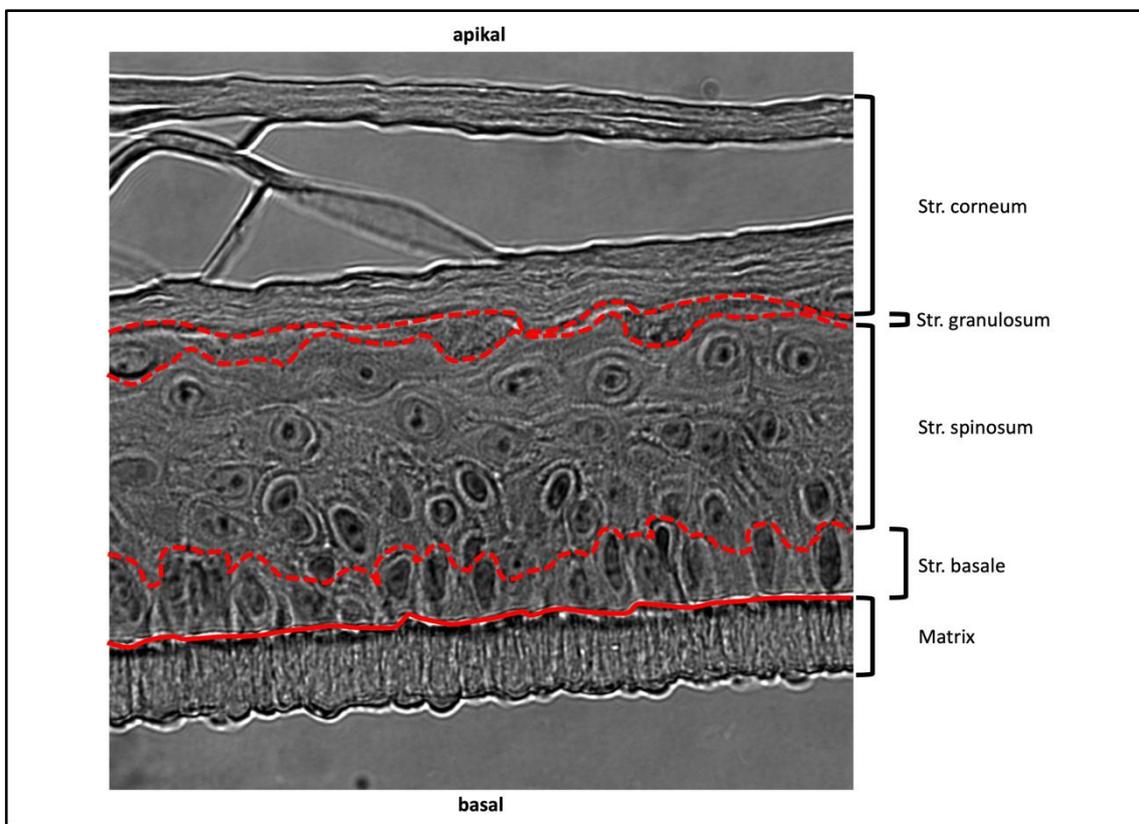


Abb. 3: Aufbau der Epidermis dargestellt anhand einer lichtmikroskopischen Aufnahme eines humanen In-vitro-Epidermismodells:

Die Epidermis zeigt einen schichtweisen Aufbau. Von basal nach apikal werden die durch eine rot-gestrichelte Linie voneinander getrennten unterschiedlichen Strata als Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum bezeichnet. An der Basis der Abbildung befindet sich eine azellularisierte Matrix, welche als Verankerungsstelle des hier dargestellten Epidermismodells dient.

Unterhalb der Epidermis liegt die Dermis mit seinen beiden von basal nach apikal befindlichen Strata reticulare und papillare (1). Den embryologischen Ursprung der Dermis stellt das Mesenchym dar. Dabei entspringt sie drei unterschiedlichen Gruppen. Diese sind die Neuralleiste, das Seitenplattenmesoderm und das paraxiale Mesoderm

(6, 7, 8). Innerhalb der Dermis sind Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen, Blutgefäße, sensorische Rezeptoren (v.a. für Druck und Dehnung) und Nerven zu finden (1). Die Subcutis kann als innerster Pol der Haut angesehen werden. Sie beherbergt Adipozyten, wodurch sie makroskopisch gelblich imponiert. Die Subcutis ist durch eine hohe Dichte von Kapillaren stark vaskularisiert. Als Funktionen dieser Schicht können die thermische Isolation, Speicherung von Energie und das Abfedern mechanischer Traumata angesehen werden (1). Unterhalb der Subcutis schließen sich tiefer liegende Strukturen wie zum Beispiel die Muskulatur an. Als äußere Begrenzung sieht sich die Haut daher einer Vielzahl potenziell schädlicher Einflüsse entgegen, welche die Integrität des Körpers gefährden. Als grundlegend wichtig stellt sich daher die Reparatur dieser dar.

1.2 Phasen der Wundheilung

Eine Wunde stellt eine Unterbrechung der physiologischen und anatomischen Struktur und Funktion dar (9). Diese Unterbrechung kann durch verschiedene interne oder externe Einflüsse erfolgen (10). Ist eine Wunde nach sechs Wochen nicht vollständig verheilt oder gestaltet sich diese als unempfindlich gegenüber einer lege artis durchgeführten Wundbehandlung, so wird diese als chronisch bezeichnet (11). Diese chronischen Wunden stellen mit ihren häufigen mikrobiologischen Komplikationen eine enorme gesundheitsökonomische Belastung in den Industrienationen dar (12). Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika betragen die Ausgaben des öffentlichen Gesundheitswesens für chronische Wunden im Jahr 2014 etwa 32 Milliarden US-Dollar (13).

Bei der regelhaft verlaufenden Wundheilung handelt es sich um einen komplexen physiologischen Prozess, an dem mehrere Zellreihen und deren Mediatoren beteiligt sind (10). Überblickend wird sie in vier aufeinander folgende und sich überschneidende Phasen unterteilt. Diese Phasen sind nicht immer klar voneinander abgrenzbar und werden als Hämostase, Inflammation, Proliferation und Remodeling bezeichnet (14). Die Wundheilung kann dabei als *Sanatio per primam intentionem* (sogenannte Primärheilung) oder *Sanatio per secundam intentionem* (sogenannte Sekundärheilung) erfolgen. Die Primärheilung zeichnet sich durch eine ohne auftretende Komplikationen oder Störungen ablaufende Wundheilung aus. Nötig hierfür sind ausreichend durchblutete und chirurgisch debridierte und adaptierte Wundränder. Bei einer Sekundärheilung sind die Voraussetzungen der Primärheilung weitestgehend nicht erfüllt. Die Wunde verheilt vergleichsweise langsam unter ausgeprägter Entstehung

narbigen Gewebes. Die zugrundeliegende Wundfläche ist in der Regel ausgeprägter. Eine Primärheilung wird der Sekundärheilung vorgezogen (15).

Unmittelbar nach der Verwundung beginnt die Hämostase. Ziel der Hämostase ist die Blutungsstillung. Als grundlegende Elemente der Hämostase können die Gefäßwand, die Thrombozyten und die Gerinnungskaskade angesehen werden (16). Nach einer reflektorischen Gefäßverengung kommt es zur Bildung und Organisation eines Fibringerinnsels. Proinflammatorische Mediatoren wie zum Beispiel Transforming growth factor beta, Platelet derived growth factor, Fibroblast growth factor und Epidermal growth factor werden freigesetzt (14). Das Fibrinnetzwerk führt nicht nur zu einem primären Wundverschluss und stellt somit eine erste Barriere gegen das Eindringen möglicher Pathogene dar, sondern ist auch Voraussetzung für die in der inflammatorischen Phase ablaufende Zellmigration (17). Die zweite Phase, die Inflammationsphase, dauert etwa zwei Tage an (10) und ist gekennzeichnet durch die Migration von Entzündungszellen in das Wundgebiet (14). Dabei handelt es sich vor allem um neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten (18, 19, 20). Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten wird durch das Vorhandensein von bakteriellen Detritus, der Aktivierung des Komplementsystems und der Degranulierung der Blutplättchen gesteigert (21). Durch die neutrophilen Granulozyten wiederum werden proinflammatorische Mediatoren und reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt, welche einen antibakteriellen Effekt aufweisen (10). Zusammenfassend handelt es sich bei der Inflammation um eine lokalisierte Gewebereaktion, die durch eine Verletzung ausgelöst wird und bei der es zu einer Freisetzung lysosomaler Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies durch verschiedene Immunzellen kommt. Hierdurch wird die Abräumung avitaler Zelltrümmer und bakterieller Pathogene ermöglicht (22). Die dritte Phase, welche auch Proliferationsphase genannt wird, dauert bis zu 14 Tage an (23). In ihr finden die Bildung der Extrazellulärmatrix, die Angiogenese, die Reepithelialisierung und die Kollagensynthese statt (14). Endprodukt dieser Phase ist der eigentliche Wundverschluss und die Ausbildung einer epithelialen Barriere (10). Die Bildung der Extrazellulärmatrix erfolgt durch das Granulationsgewebe. Hierzu wird die Proliferation von Fibroblasten, Kollagen und elastischen Fasern gesteigert (24). Innerhalb der Extrazellulärmatrix des Wundgrundes erfolgt die Angiogenese (25). Sie ist gekennzeichnet durch die Proliferation von Endothelzellen, der Anpassung der Basalmembran, der Ausbildung röhrenförmiger Strukturen und der Organisation perivaskulär auftretender Zellen (10). Innerhalb des Endothels kann unter anderem glatte Muskulatur nachgewiesen werden. Die Revaskularisierung ermöglicht den

Stoffaustausch und die Migration von Immunzellen in das umliegende Stroma (26) und ist Voraussetzung zur Bildung neuen Granulationsgewebes (27). Mit Reepithelialisierung wird die vollständige Deckung einer kutanen Wunde durch eine neue Epidermis bezeichnet. Keratinozyten aus den Wundrändern wandern in die Wunde ein und proliferieren dort (23). Da die Keratinozytenmigration in Richtung der noch intakten Haut erfolgt, nähern sich die Wundränder einander an (10). Die Proliferationsphase unterliegt verschiedenen Steuerungsmechanismen. Sie richtet sich unter anderem nach dem Ausmaß der Inflammation und den freigesetzten Zytokinen und Wachstumsfaktoren (28). Die letzte Phase der Wundheilung kann bis über ein Jahr dauern und wird als Remodeling bezeichnet. Endprodukt dieser Phase ist ein Gewebe mit ausgeprägter mechanischer Belastbarkeit und bestmöglicher morphologischer Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe. Dies erfolgt durch Reorganisation, Degradierung und Resynthese der Extrazellulärmatrix. Die Inflammation klingt vollends ab. Durch die Transformation des Granulationsgewebes entsteht Narbengewebe (10). Narbengewebe weist im Vergleich zu physiologischer Haut funktionelle und morphologische Unterschiede auf. Die vorliegenden Kollagenfasern sind verdichtet und wenig strukturiert. Hautanhangsgebilde wie beispielsweise Haare fehlen gänzlich (29). Nachdem die Wunde durch Keratinozyten vollständig bedeckt ist, differenziert sich eine Epidermis mit allen physiologisch vorhandenen Strata (30) Die Zusammensetzung des Narbengewebes insbesondere des Kollagenanteils der Extrazellulärmatrix verändert sich nach der initialen Abdeckung der Wunde noch über Monate (10). Es erfolgt die Transformation der Fibroblasten in Myofibroblasten. Myofibroblasten exprimieren das Aktin der glatten Muskulatur (22, 24) und können durch diesen Marker nachgewiesen werden. Durch die Kontraktion der Myofibroblasten erfolgt die Adaption der Wundränder (24).

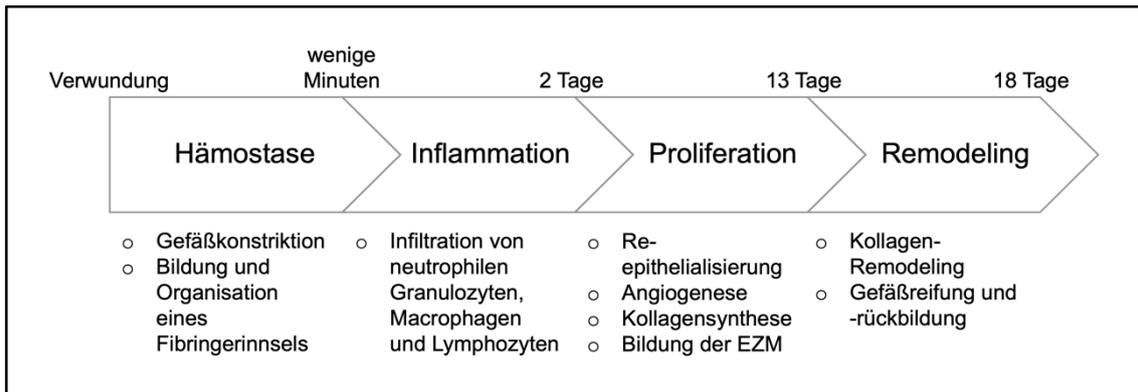


Abb. 4: Phasen der Wundheilung (modifiziert nach Gonzalez et al (2016) und Guo et al (2010) (10, 14)): Die Wundheilung wird in vier aufeinanderfolgende und sich überschneidende Phasen unterteilt. Die Hämostase beginnt unmittelbar nach Verwundung und dauert wenige Minuten an. Sie ist gekennzeichnet durch eine Gefäßkonstriktion sowie die Bildung und Organisation eines Fibringerinnsels. Die Inflammation schließt sich der Hämostase an und dauert etwa zwei Tage. Hier infiltrieren neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Bis etwa zum 13. Tag nach der Verwundung erfolgt die Proliferation. Dabei finden eine Reepithelialisierung, Angiogenese, Kollagensynthese und die Bildung der Extrazellulärmatrix statt. Abschließend findet bis zum etwa 18. Tag nach der Verwundung das Remodeling statt. Hier erfolgen Kollagen-Remodeling sowie Gefäßreifung und -rückbildung.

Verschiedene innere und äußere Faktoren beeinflussen die Wundheilung. Beispiele für wundheilungsstörende bzw. -verzögernde Einflüsse sind Infektion (31), Mangelernährung (32), Nikotinabusus (33), Diabetes mellitus (34) sowie iatrogene Einflüsse wie beispielsweise die Radio- (35, 36) oder Steroidtherapie (31). Zur Unterstützung des Prozesses der Wundheilung konnten bisher verschiedene therapeutische Ansätze etabliert werden.

1.3 Therapeutische Ansätze der Wundbehandlung

Als grundlegende chirurgische Intervention zur Förderung der Wundheilung kann das sogenannte Débridement angesehen werden. Der Begriff Débridement bezeichnet dabei die radikale chirurgische Entfernung nekrotischen Gewebes sowie potenziell vorhandener Fremdkörper und Bakterien aus akuten oder chronischen Wunden. Die vorliegende Wunde wird hierbei weiter ausgeschnitten. Ohne Débridement wäre eine lokal begrenzte überschießende Wundheilung durch die vermehrte Produktion von Metalloproteasen aufgrund des Vorhandenseins von nekrotischem Gewebe, Fremdkörpern und Bakterien die Folge. Durch das Debridieren einer chronischen Wunde werden die Wundränder angefrischt und diese kann unter Umständen in den Status einer akuten Wunde überführt werden. Hierdurch kann das Erreichen einer physiologischen Wundheilung ermöglicht werden (37). Die Durchführung des Débridements sollte dabei großzügig und schnellstmöglich erfolgen (38).

Moderne Wundauflagen müssen verschiedenen Anforderungen genügen. Sie sollten zum Beispiel ein optimales Feuchtigkeitsmilieu am Übergang zwischen Wunde und Verband aufrechterhalten, die Ableitung überschüssigen Wundexsudats ermöglichen, die Wunde vor Auskühlung schützen, den Wundgrund abdecken und vor der Kontamination mit Bakterien, Fremdkörpern oder anderweitigen Verunreinigungen bewahren. Auch sollte der Verbandwechsel nahezu atraumatisch möglich sein (37). Es besteht eine Vielzahl unterschiedlicher Verbandstoffe. Die Wahl der geeigneten Wundaufgabe richtet sich nach der zugrundeliegenden Charakteristik der Wunde. Dazu bedient man sich einem überblickenden Assessment der Wundverhältnisse. Trockene Wunden werden grundsätzlich feucht gehalten, bei nässenden Wunden wird überschüssiges Wundexsudat abgeleitet und bei nekrotischen Arealen erfolgt die Entfernung ebendieser. Infizierte Wunden sollten antimikrobiell behandelt werden. Verändert sich die Wunde in ihren Charakteristiken, ändert sich auch das Therapieregime (37). Es ist von großer Relevanz ein optimales Feuchtigkeitsmilieu zur Förderung der Wundheilung zu erreichen (39). Ein feuchtes Milieu begünstigt dabei grundsätzlich eine schnellere Wundheilung als ein trockenes (40). Durch den Einsatz verschiedenster Wundaufgaben kann dieses optimale Feuchtigkeitsmilieu erreicht und anfallendes Wundexsudat in geeignetem Maße absorbiert bzw. zurückgehalten werden (39). Unterstützend werden lokal antiseptische Maßnahmen angewandt. Ziel dieser Maßnahmen ist die Inaktivierung oder Reduzierung biologischer Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilzen. Ebenfalls sollen bestehende Biofilme entfernt werden (12). Bei größtmöglicher Verminderung unerwünschter Nebenwirkungen, die auf den Organismus einwirken, soll lokal ein besonders antiseptisches Milieu entstehen (41). Beispiele besonders wirksamer und verträglicher Antiseptika sind Polyhexanid und Octenidindihydrochlorid (12).

Ein weiteres gängiges chirurgisches Therapiekonzept, das bei chronischen Wunden Anwendung findet, ist die Vacuum assisted closure-Therapie (VAC-Therapie). In die Wunde wird hierbei nach erfolgtem Débridement ein in Größe der Wunde angepasster Schaumstoffschwamm eingelegt. Die Wunde wird mittels einer Folie luftdicht verschlossen. Durch ein Loch wird ein Schlauchsystem eingeführt, welches mit einer Vakuumpumpe verbunden ist. Ein auf das Wundgebiet begrenzter Unterdruck wird erzeugt und Wundexsudat in einen Auffangbehälter abgeleitet (42). Anwendungsbeispiele der VAC-Therapie sind diabetische Ulcera (43), die Therapie eines Abdomen apertum (44) und große infizierte Hautdefekte (45).

Für die plastische Deckung nicht verschlossener Wunden bestehen viele Möglichkeiten. Beispielhaft hierfür sind Lappenplastiken und verschiedene Hauttransplantate, wie zum Beispiel Spalthaut (46). Zukünftig könnte ebenfalls der Einsatz mesenchymaler Stammzellprodukte Einzug in die Therapie chronischer Wunden finden (47).

1.4 Modellorganismen und In-vitro-Testsysteme zur Untersuchung der Wundheilung

Derzeit werden vor allem Tiermodelle zur Verlaufsbeurteilung von Verwundung und Wundheilung der Haut eingesetzt. Eine große Gruppe der Modellorganismen sind die Nagetiere. Besonders Ratten und Mäuse werden häufig eingesetzt. Vorteile dieser sind niedrige Kosten, eine gut mögliche Pflege sowie die Verfügbarkeit molekularer Sonden zur Gewebeanalyse (48). Jedoch bestehen entscheidende histologische Unterschiede zum Menschen, woraus Limitationen resultieren. Die Haut der Nager enthält eine muskuläre Panniculus-carnosus-Schicht, welche auf Höhe der Subkutis eine eher losere Verbindung mit tieferliegenden Gewebsstrukturen darstellt (49) und eine ausgeprägte Wundkontraktion ermöglicht (50). Die Epidermis und Dermis der Nager ist dünner als die der menschlichen Haut. Es liegen weniger epidermale Strata sowie eine insgesamt dichtere Verteilung von Haarfollikeln vor (51). Auch sind in der murinen Haut keine apokrinen Schweißdrüsen zu beobachten (52). Großflächige oder auch multiple Defekte sind aufgrund der kleinen Größe des Modellorganismus nicht oder nur eingeschränkt darstellbar (53). Das Hausschwein stellt einen weiteren häufig genutzter Modellorganismus dar, da dessen Haut eine hohe anatomische und physiologische Übereinstimmung zur menschlichen Haut besitzt (54). Eine hohe Ähnlichkeit stellt jedoch keine komplette Übereinstimmung dar, weshalb sich die Übertragbarkeit auf den Menschen von mithilfe von Tiermodellen gewonnenen Ergebnissen als problematisch darstellen kann. Beispielhaft sollen einige Differenzen im histologischen Aufbau der Haut des Hausschweins näher betrachtet werden: Die Hautdrüsen des Hausschweins zeigen eine geringere Vaskularisierung. Auch fehlen ekkrine Drüsen im gesamten Integument. Unterhalb der Subkutis befinden sich ausgeprägte Fetteinlagerungen (55). Derzeit kann jedoch kein etabliertes Tiermodell den klinischen Wundheilungsprozess des Menschen exakt nachbilden (56).

In Anbetracht der ethischen Herausforderungen bei der Durchführung von Tierversuchen publizierten Russel und Burch 1960 die drei R-Prinzipien Reduction, Refinement und Replacement. Reduction steht für die Verringerung der Anzahl der

Versuchstiere auf das notwendige Minimum, Refinement für die artgerechte Haltung und Untersuchungsbedingungen für das Versuchstier und Replacement für den Einsatz geeigneter Alternativmethoden zum Tierversuch (57). In-vitro-Testsysteme setzen an den Prinzipien des Replacement und der Reduction an. Ein Vorteil dieser ist eine hohe Verfügbarkeit standardisierter Modelle und damit untereinander vergleichbarer Modelle (58). Als nachteilig erweist sich die Beeinträchtigung der Barrierefunktion der Haut (58). Auch ist kritisch zu betrachten, dass ein isoliertes Organsystem und nicht das komplexe Zusammenspiel innerhalb eines Gesamtorganismus dargestellt werden kann (59). Als geeignetes Beispiel für den Einsatz von In-vitro-Testsystemen kann die Studie von Kieseewetter et al. von 2019 zur Beobachtung der epidermalen Wundheilung angesehen werden (60).

1.5 Methoden zur Untersuchung der Wundheilung in In-vitro Wundmodellen

In der täglichen chirurgischen Visite erfolgen regelmäßige Wund- und Befundkontrollen sowie postoperative Verbandwechsel. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Wundgröße, Adaptation der Wundränder, randständige Hämatome, Sekretion, Beschaffenheit der Wund- oder Drainageflüssigkeit und dem Geruch. Auf die klassischen Entzündungszeichen Rötung (Rubor), Schwellung (Tumor), Überwärmung (Calor), Schmerzen (Dolor) und die Funktionseinschränkung bzw. -verlust (Functio laesa) der betroffenen Körperregion werden ebenfalls beurteilt. Diese Kriterien können jedoch nicht auf In-vitro-Testsysteme übertragen werden.

Ein gebräuchliches Mittel zur Beurteilung der Wundheilung in Wundheilungsmodellen ist das Messen der Konzentrationen verschiedener Zellmetaboliten, wie zum Beispiel Glucose und Lactat, und die Aktivität von Proliferationsmarkern, wie zum Beispiel Ki67. Sowohl der Anstieg und Abfall einzelner Parameter als auch die Gesamtdynamik kann mit einer Zellregeneration oder einem Zelluntergang assoziiert sein. Beispielhaft hierfür können die Konzentrationen von Glucose und Lactat sowie die Aktivität von Ki67 angesehen werden. Hierdurch können unter anderem aerobe Stoffwechselbedingungen und zellulärer Stress quantifiziert werden (59). Eine Möglichkeit der Messung dieser Zellmetabolite besteht in der Photometrie. Nachteilig hierfür stellt sich jedoch die Notwendigkeit des Vorhaltens besonderer Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien dar. Auch können nur indirekt Aussagen zum Zustand des Modells getroffen werden. Mithilfe einer Impedanzmessung können Aussagen zur Barrierefunktion einer Epidermis getroffen werden. Eine intakte Barriere geht mit einem hohen elektrischen Widerstand

einher (61). Der transepitheliale elektrische Widerstand gilt dabei als ein geeigneter Messwert für die nicht-invasive elektrische Charakterisierung von Zellen und Zellschichten (62). Eine genaue Unterscheidung der vier epidermalen Strata basale, spinosum, granulosum und corneum voneinander ist hiermit jedoch nicht möglich. Aus angefertigten Schnitten aufgenommene histologische Abbildungen stellen grundsätzlich eine gute Möglichkeit zur Auswertung und (Verlaufs-) Beurteilung kutaner Wundheilungsmodelle dar. Häufig wird eine überblickende Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefertigt, um in kurzer Zeit eine orientierende Beurteilung eines histologischen Modells durchzuführen. Nachteilig ist jedoch, dass die Befundung derzeit aufgrund fehlender standardisierter histologischer Beurteilungskriterien stark von subjektiven Einflüssen geprägt ist und keinem festen Schema folgt. Es kommt mitunter zu deutlich auseinanderweichenden Beurteilungen desselben Modells durch verschiedene Befundende. Auch wird die Vergleichbarkeit durch eine fehlende Quantifizierung der Ergebnisse erschwert. Es mangelt dadurch nach erfolgter Befundung an unmittelbar vergleichbaren Daten. Insgesamt ermöglicht die histologische Analyse eine Darstellung der histomorphologischen Architektur in hoher Ortsauflösung. Jedoch können keine genauen Rückschlüsse auf die Funktionalität des vorliegenden Gewebes getroffen werden (61). Die überblickende HE-Färbung kann durch eine Immunhistochemie ergänzt werden. Mithilfe der Immunhistochemie ist es möglich, verschiedene Komponenten in unterschiedlichen Geweben oder Zelltypen sichtbar zu machen (63). Schwächen dieser Technik liegen vor allem in der limitierten Darstellung komplexer zellulärer Zustände sowie die schwierige zeitgleiche Quantifizierung mehrerer unterschiedlicher Zelltypen. Auch stellt sich die Ortsauflösung als gering dar. Neuere Ansätze einer Fluoreszenz-Multiplex-Darstellung erfordern wiederum spezielle Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien (64).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Derzeit existiert keine Methode zur standardisierten Quantifizierung der epidermalen Histomorphologie und der Qualität epidermaler In-vitro-Testsysteme. Auch wurde die Vaskularisierung als möglicher stellvertretender Parameter der kutanen Wundheilung noch nicht softwaregestützt ausgezählt und so zur möglichen Beurteilung angewandt. Ziel dieser Arbeit ist es daher zum einen diese Mängel aufzugreifen und ein Scoring-System mit dem Namen Basale-spinosum-granulosum-corneum-Score (BSGC-Score) als Instrument für eine Quantifizierung der epidermalen Histomorphologie kutaner In-vitro-Testsysteme zu etablieren. Auch soll dieses neue Tool in den potenziellen

Einsatzbereichen Qualitätsmanagement und in der Verlaufsbeurteilung von Verbrennungsmodellen angewandt und evaluiert werden (siehe Abb. 5).

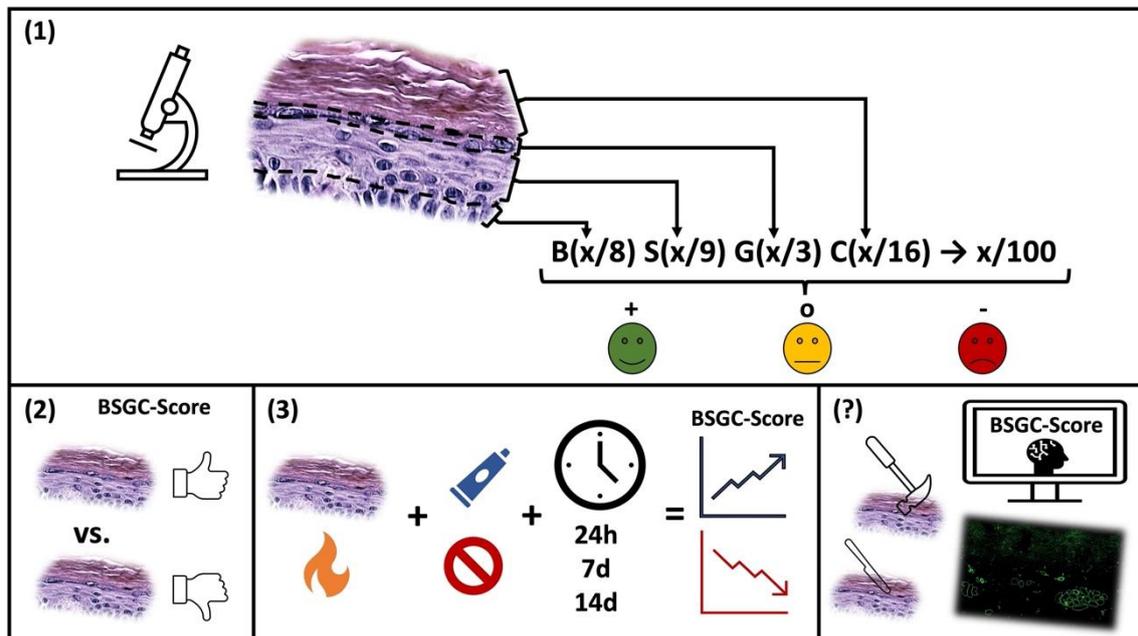


Abb. 5: Grafische Zusammenfassung: Bildgestützte Bewertung der epidermalen Histomorphologie:
 (1) Aufstellen des BSGC-Scores: Anhand histomorphologischer Merkmale war es möglich Epidermismodelle mithilfe des BSGC-Scores zu befunden und in Gütekriterien einzuordnen.
 (2) Qualitätskontrolle: Es erfolgte der Vergleich unterschiedlicher Epidermismodelle mithilfe der ermittelten BSGC-Scores.
 (3) Beurteilung der Wundheilung eines Verbrennungsmodells: Epidermis-Verbrennungsmodelle werden jeweils topisch behandelt beziehungsweise nicht behandelt und die BSGC-Scores dieser nach 24 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass die topisch behandelten Epidermismodelle einen höheren BSGC-Score und somit einen besseren histomorphologischen Zustand aufwiesen als die nicht behandelten.
 (?) Mögliche weitere Anwendungsbeispiele: Weitere zukünftig mögliche Einsatzgebiete des BSGC-Scores können der Einsatz zur Evaluation unterschiedlicher Verletzungsmodi, das Anlernen einer künstlichen Intelligenz zur automatisierten Befunderhebung und die Ausweitung auf Vollhautmodelle sein.

Zum anderen sollen die Vaskularisierung und Revaskularisierung in einem Verwundungsmodell automatisiert quantifiziert und als Beurteilungsparameter der kutanen Wundheilung herangezogen werden (siehe Abb. 6).

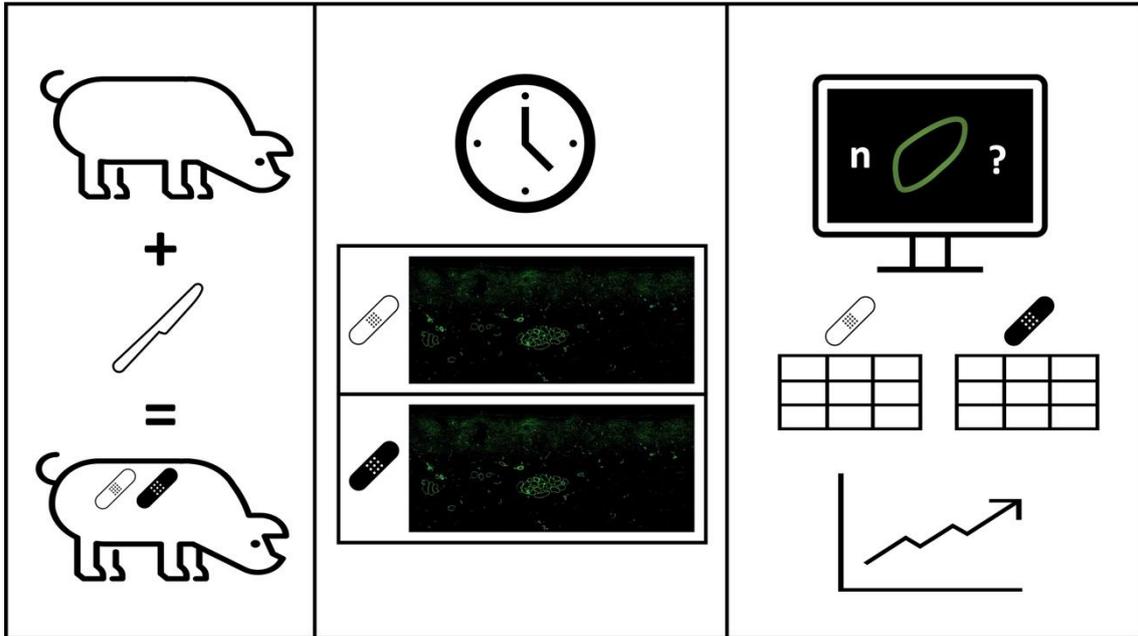


Abb. 6: Grafische Zusammenfassung: Bildgestützte Quantifizierung der Revaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung:
 Porcine Modelle wurden durch scharfe Gewalt verwundet und mit okklusiven und nicht okklusiven Wundauflagen behandelt. Es erfolgte die Anfertigung histologischer Immunfluoreszenzaufnahmen aus Stanzbiopsien nach fünf beziehungsweise sieben Tagen. Mithilfe einer Bildbearbeitungssoftware war es möglich Blutgefäßanschnitte auszuzählen und die unterschiedlichen Wundauflagen miteinander zu vergleichen. Es zeigte sich ein Anstieg der Revaskularisierung aller behandelten Wundbereiche.

2 Material und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Für den ersten Abschnitt dieser Arbeit „Bildgestützte Bewertung der epidermalen Histomorphologie“ lagen positive Ethikvota der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Aktenzeichen 182/10 und 280/18sc) vor. Für den zweiten Abschnitt der Arbeit „Bildgestützte Quantifizierung der Vaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung“ lag ein positiver Tierversuchsantrag des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft und Forschung der Republik Österreich (Geschäftszahl 2020-0.701.444) vor.

2.2 Bildgestützte Bewertung der epidermalen Histomorphologie

2145 hochauflösende lichtmikroskopische Fotografien von HE-gefärbten Epidermis- und Vollhautmodellen jeglichen Zustands wurden gesichtet und beurteilt. Die Modelle wurden bereits im Voraus am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg durch wissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Projektgruppe für standardisierte In-vitro-Testsysteme im Rahmen anderer Versuchsreihen angefertigt, fixiert, eingebettet, zugeschnitten und mit HE gefärbt. Angefertigt sind die lichtmikroskopischen Fotografien mithilfe des Keyence BZ-9000. Sie zeigen die Modelle in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung. Während der Durchsicht der Abbildungen wurden sämtliche beobachtete Defekte und Zustände der einzelnen epidermalen Strata fortlaufend aufgelistet und mehrfache Beobachtungen zu jeweils einem Punkt zusammengefasst. Physiologische histologische Charakteristika der einzelnen epidermalen Strata von Nativhaut wurden festgelegt und die beobachteten Defekte aus den Fotografien, mit abnehmendem Übereinstimmungsgrad zur Nativhaut, in absteigender Reihenfolge aufgezählt. Die verschiedenen Strata wurden mit Wichtungsfaktoren belegt. Elemente zur Befunddokumentation und Benutzerfreundlichkeit wurden eruiert.

Zur Qualitätssicherung wurden insgesamt 59 in Paraffin gebettete Vollhaut- und Epidermismodelle unterschiedlicher Donoren histologisch aufgearbeitet. Diese Modelle wurden am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg als Chargentests aufgebaut. Zu Beginn wurden diese Präparate mit einem Mikrotom (Leica SM 2010 R, Feather Microtome Blade Type A35)

in Dünnschnitte von jeweils 6 Mikrometer (μm) Stärke geschnitten und in einem Wasserbad auf Objektträger (Thermo Scientific Superfrost) aufgezogen. Nachdem die Schnitte über Nacht bei 32 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) im Wärmeschrank (Medite TDO66) getrocknet wurden, wurden sie am nächsten Tag für 60 Minuten bei 60 $^{\circ}\text{C}$ im Wärmeschrank (Medite TDO66) erwärmt, um das Paraffin zu schmelzen. Nach dem Schmelzen des Paraffins wurde eine HE-Färbung unter dem Abzug durchgeführt. Zu Beginn wird hierzu der histologische Schnitt für jeweils zehn Minuten in eine erste und anschließend in eine zweite unverdünnte Xylol-Lösung getaucht. Das Präparat wird in eine absteigende Alkoholreihe jeweils drei Mal auf- und abgetaucht. Die absteigende Alkoholreihe besteht aus zwei 96-prozentigen (%-igen), einer 70%-igen sowie einer 50%-igen Ethanol-Lösung. Der Schnitt wird nun in demineralisiertem Wasser geschwenkt, bis keine Turbulenzen mehr zu beobachten sind. Nacheinander wird dieser nun für sechs Minuten in unverdünntes Hämatoxylin (Morphisto, Deutschland), fünf Minuten in Leitungswasser und sechs Minuten in unverdünntes Eosin (Morphisto, Deutschland) gegeben. Das Präparat wird mehrmals in demineralisiertem Wasser auf- und abgetaucht bis keine Farbe mehr ausgewaschen wird. Abschließend wird der Schnitt drei Mal kurz in 70%-ige Ethanol-Lösung eingetaucht. Anschließend für zwei Minuten in 96%-iges Ethanol und jeweils für fünf Minuten in jeweils zwei unverdünnte Isopropanol- und Xylol-Lösungen gegeben (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Protokoll der HE-Färbung

Zeitansatz	Lösung
10 Minuten (min)	Xylol I
10 min	Xylol II
je 3x auf- und abtauchen und kurz ablaufen lassen	Ethanol 96 %
	Ethanol 96 %
	Ethanol 70 %
	Ethanol 50 %
schwenken, bis keine Turbulenzen mehr beobachtbar sind	demineralisiertes Wasser
6 min	Hämatoxylin
5 min	Leitungswasser
6 min	Eosin
mehrmals auf- und abtauchen bis keine Farbe mehr auswäscht	demineralisiertes Wasser
3x kurz eintauchen	Ethanol 70 %
2 min	Ethanol 96 %
5 min	Isopropanol I (unverdünnt)
5 min	Isopropanol II (unverdünnt)
5 min	Xylol I (unverdünnt)
5 min	Xylol II (unverdünnt)

Der HE-Färbung schloss sich das blasenfreie Eindecken des histologischen Schnittes mit organischem Eindeckmedium (Entellan™, Sigma-Aldrich, Deutschland) und Deckgläschen (Menzel-Gläser 24x60 mm #1) an. Das Präparat trocknete anschließend über Nacht unter dem Abzug. Am nächsten Tag wurden die Schnitte lichtmikroskopisch mit dem Keyence BZ-9000 überblickend visitiert. Nach der ersten überblickenden Sichtung wurden die Präparate mithilfe des aufgestellten BSGC-Scores befundet.

Zuerst wurden die Rahmendaten in die freigegebenen Felder der Dokumentationselemente eingetragen. Bei 5-facher Vergrößerung erfolgte die erste Betrachtung. Die Anleitung sowie die Bildbeilage (siehe Appendix I. - II.) wurden unterstützend verwendet. Jeweils drei unterschiedliche Bereiche wurden pro Präparat ausgewählt. Bei diesen wurden systematisch nacheinander die Strata basale, spinosum, granulosum und corneum bei 10- bis 20-facher Vergrößerung befundet. Für jeden der drei Ausschnitte wurde ein Punktwert pro Stratum vergeben und in den Befundbogen eingetragen. Optional konnten die Fotoausschnitte zudem fotodokumentiert werden. Der Mittelwert aus den Punktwerten jedes einzelnen Stratum wurde gebildet. Es erfolgte die Verrechnung mit den jeweiligen Wichtungsfaktoren und die Dokumentation der Beurteilungsformel sowie die Betrachtung des farblich hinterlegten Punktwertes.

Abschließend wurde das Gesamtpräparat mithilfe des errechneten Scores und dem Bewertungsschlüssel in seiner gänzlichen Güte bewertet.

Durch Schneider et al. (2021) wurde ein dreidimensionales In-vitro-Epidermismodell für Verbrennungsmodelle etabliert und der BSGC-Score zur Verlaufsbeurteilung dieser Verbrennungsmodelle eingesetzt. Die Verbrennungsmodelle wurden aus Zellen dreier Donoren aufgebaut. Pro Donor wurde je ein unverwundetes Kontrollmodell (Kontrolle), ein verbranntes und unbehandeltes (Verbrennung) sowie ein verbranntes und anschließend mit einer 5%-igen Dexpanthenol-Lösung behandeltes Epidermismodell (Behandlung) im Verlauf des Versuches gesichtet und befundet. Es erfolgte die Beurteilung mittels BSGC-Scores für Kontrolle und Behandlung an den Zeitpunkten 24 Stunden, sieben Tage und 14 Tage nach Verbrennung. Behandlung wurde an den Zeitpunkten sieben Tage und 14 Tage nach Verbrennung beurteilt. Die Anwendung des BSGC-Scores erfolgte wie in 2.2 beschrieben. Abschließend wurden die Ergebnisse durch Schneider et al. (2021) einem Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Test für Mehrfachvergleiche unterzogen und grafisch dargestellt.

2.3 Bildgestützte Quantifizierung der Revaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung

Bearbeitet wurden Bildaufnahmen Immunfluoreszenz gefärbter (IF) porciner Verwundungsmodelle, welche jeweils eine Kutis abbildeten. Von derselben Aufnahme waren jeweils eine IF-Darstellung von 4'-6-Diamidino-2-phenylindol/DAPI (blau) und alpha Smooth muscle actin (aSMA) (hellgrün) vorhanden. Zu Beginn wurde eine aSMA-gefärbte Aufnahme ausgewählt und ein Ausschnitt hieraus zur händischen Auszählung extrahiert (gelber Rahmen). Angeschnittene Anteile von Drüsen und Drüsenausführungsgängen wurden zuvor entfernt (siehe Abb. 7).

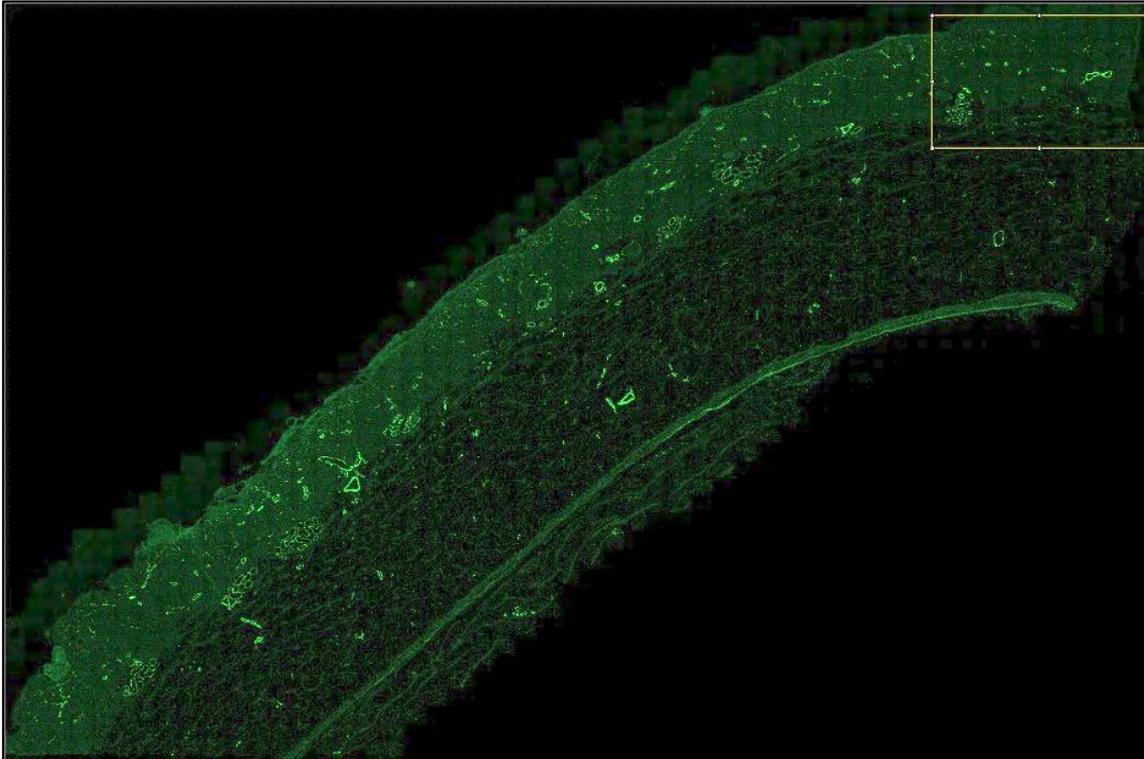


Abb. 7: Kutis mit durch Immunfluoreszenz-Färbung angefärbtes aSMA: Bereiche mit den Oberflächenmerkmale aSMA imponieren grünlich. Im rechten oberen Bildbereich wurde ein Bildausschnitt zur Analyse mit einem gelben Rechteck markiert.

Der gewählte Bildausschnitt wurde mithilfe der Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungssoftware ImageJ nach folgendem Schema bearbeitet:

- Image > Color > Split channels > Auswählen des green channels

In diesem Ausschnitt imponierten die Gefäßanschnitte gräulich (siehe Abb. 8 (A)) und es erfolgte die Einteilung des gesamten Bildes in vier Bereiche, einem links-oberen, einem links-unteren, einem mittleren und einem rechten Bereich. Im links-oberen Bildabschnitt konnten 39, im links-unteren Bereich 34, im mittleren 38 sowie im rechten 22 Gefäßanschnitte gezählt werden. Unterhalb der Abschnitte wurden die Gefäßanschnitte aller vier Abschnitte, welche gräulich imponieren, unter total addiert und aufgelistet. Insgesamt waren 133 Gefäßanschnitte zu erkennen (siehe Abb. 8 (B)).

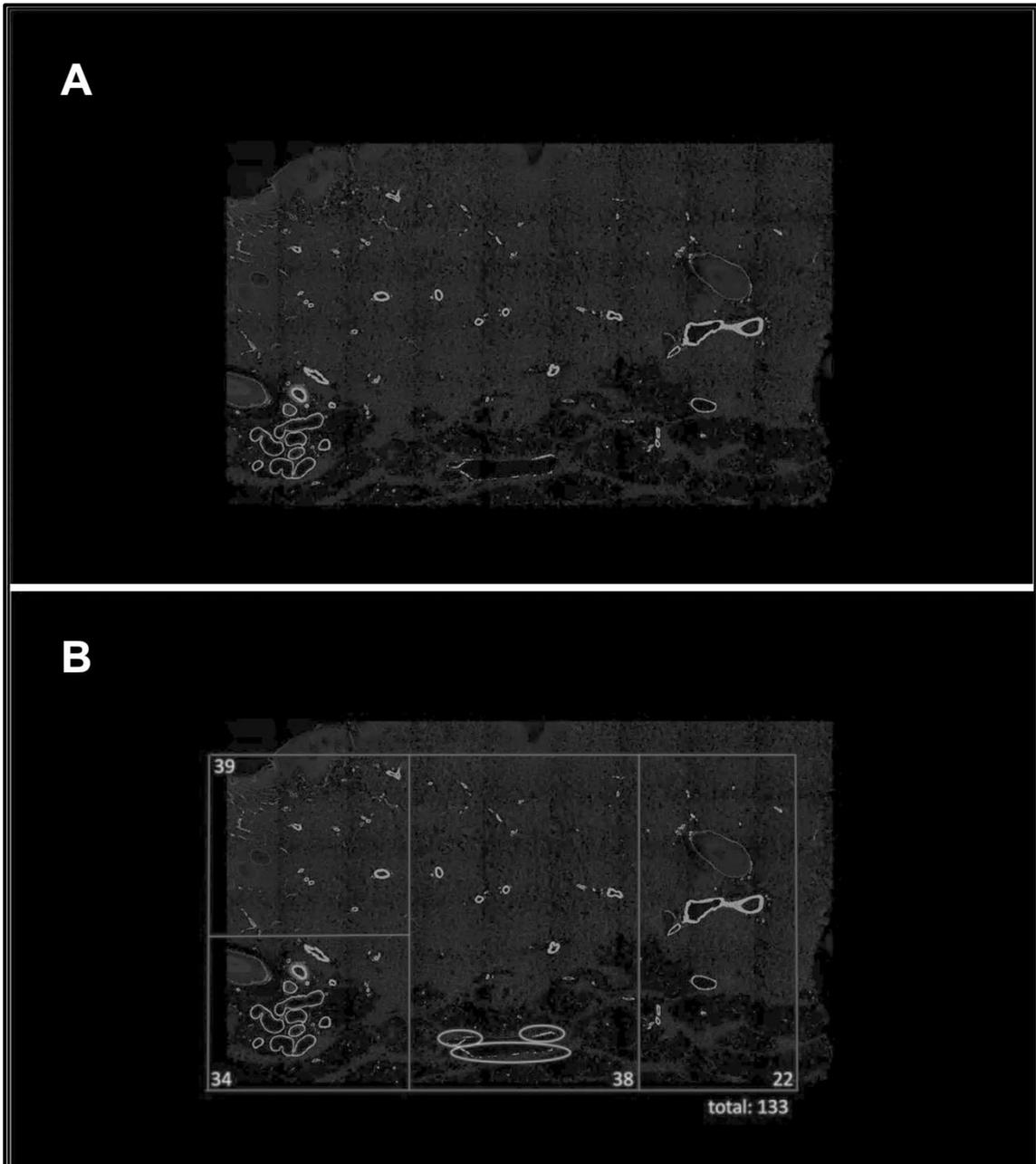


Abb. 8: Abbildungsausschnitt nach Split channels (green) und händischer Auszählung der Gefäßanschnitte in unterteilten Bildabschnitten:

(A) Die Gefäßanschnitte zeigen sich nach Split channels (green) gräulich.

(B) Der gesamte Bildbereich wurde in vier markierte Abschnitte eingeteilt, einen links-oberen, einem links-unteren, einem mittleren sowie einem rechten Bildabschnitt. Links-oben zeigen sich 39, links-unten 34, in der Mitte 38 sowie rechts 22 Gefäßanschnitte. Insgesamt sind 133 Gefäßanschnitte erkannt worden.

Im zweiten Ansatz erfolgte die automatisierte Auszählung der angeschnittenen Gefäße mithilfe von ImageJ. Dazu wurde der zuvor auf 8-bit gesetzte Bildausschnitt folgendermaßen weiterbearbeitet:

- Image > Adjust > Threshold (Genzen: 14-255; Default; B&W; Dark background off; Stack histogram off; Don't reset range off) > Apply (siehe Abb. 9 (A))
- Analyze > Analyze Particles (Size: 0-Infinity; Circularity: 0.00-1.00; Display results on; Clear results on; Summarize on; Add to manager on; Exclude on edges off; Include holes on; Record stats off; In situ show off) > OK (siehe Abb. 9 (B))
- Results-Fenster > Results > Distribution (siehe Abb. 9 (C))

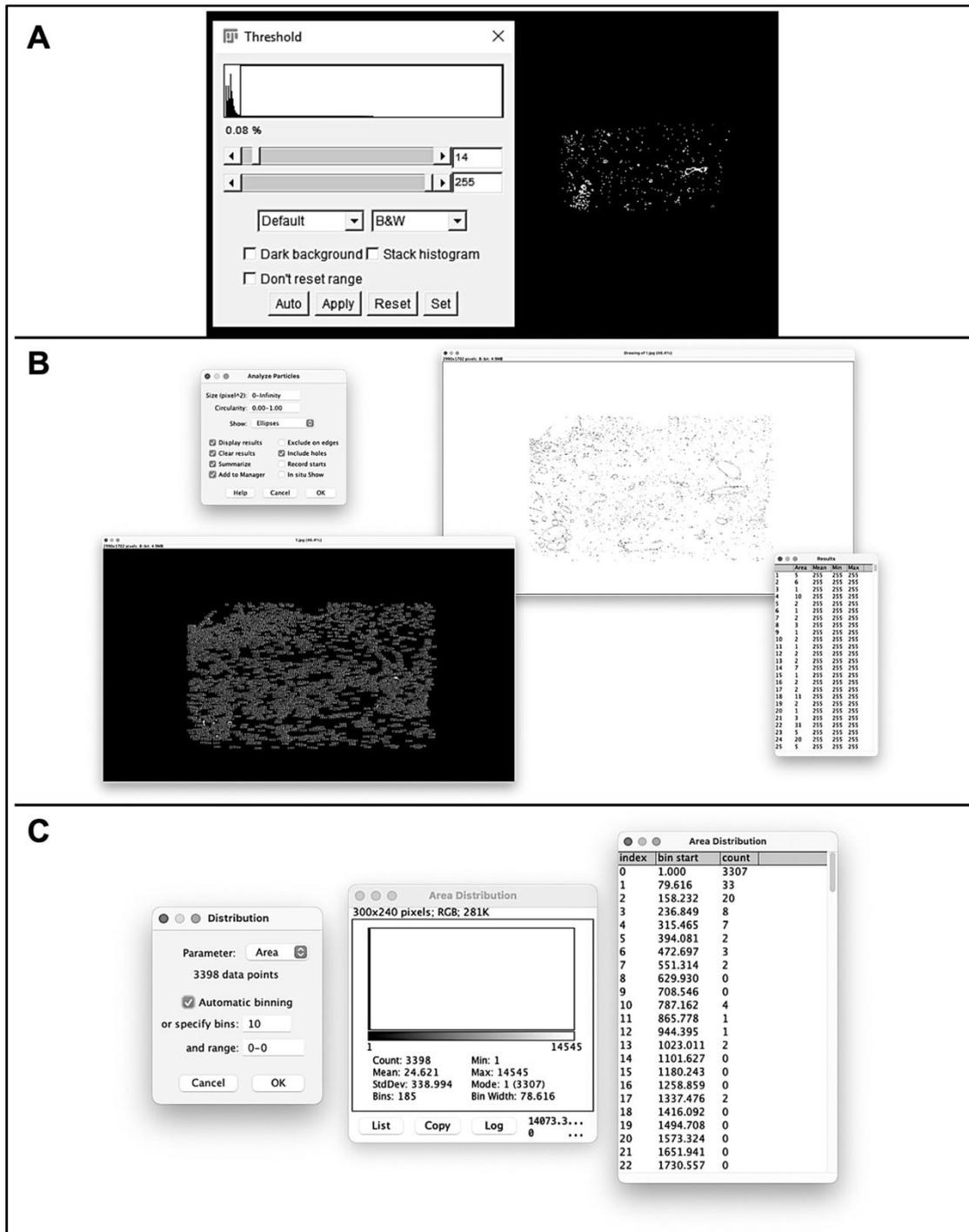


Abb. 9: Threshold, Analyze Particles und Area Distribution:

(A) Im linken Bildabschnitt sind die gewählten Auswertungsparameter der Threshold zu sehen. Der rechte Bildabschnitt zeigt das grafische Ergebnis der Auswertung. Die Gefäßanschnitte sind weiß auf schwarzem Grund hervorgehoben.

(B) Der linke obere Abbildungsbereich zeigt die ausgewählten Auswertungsparameter von Analyze Particles. Rechts oben erkennt man das grafische Ergebnis der Auswertung. Gefäßanschnitte sind schwarz auf weißem Grund hervorgehoben. Links unten sind die Gefäßanschnitte fortlaufend nummeriert. Diese sind im rechten unteren Abschnitt tabellarisch unter Results aufgelistet.

(C) Die Abbildung besteht aus einem linken, einem mittleren und einem rechten Bereich. Links zeigen sich die gewählten Analyseparameter der Distribution. In der Mitte die Gesamtübersicht der Area Distribution. Rechts wiederum ist die tabellarische Auswertung der Area Distribution zu erkennen.

Die Werte der Area Distribution wurden daraufhin in eine Excel-Tabelle eingepflegt. Die Werte unterhalb der Pixelgröße 30 (index: 0; bin start: 1.000; count: 3307) wurden nicht weiter berücksichtigt.

Eine HE-gefärbte Aufnahme des porcinen Kutanmodells wurde gesichtet. Die Behandlung der Wunden erfolgte mittels zweier übereinanderliegender Wundauflagen. Direkt der Wunde aufliegend wurde an allen Verwundungsbereichen eine Hydroactive bacterial nanocellulose-basierte hydroaktive Wundauflage (epicite^{hydro}®, QRSkin GmbH, Würzburg) verwendet. Über dieser Auflage wurden unterschiedliche sekundäre Wundauflagen der Kategorien okklusiv und nicht-okklusiv verwendet. Die Wunden wurden in drei verschiedene Verwundungsbereiche aufgeteilt. Lateral liegende vitale und unverwundete Bereiche trugen die Bezeichnung Wundrand. Der eigentliche Verwundungsbereich wurde in zwei Bereiche eingeteilt. Zum einen der apikal liegende und in der Wundheilung aktive Bereich Wundheilung sowie der basal liegende Bereich unter dem eigentlichen Verwundungsbereich Wundgrund (siehe Abb. 10).

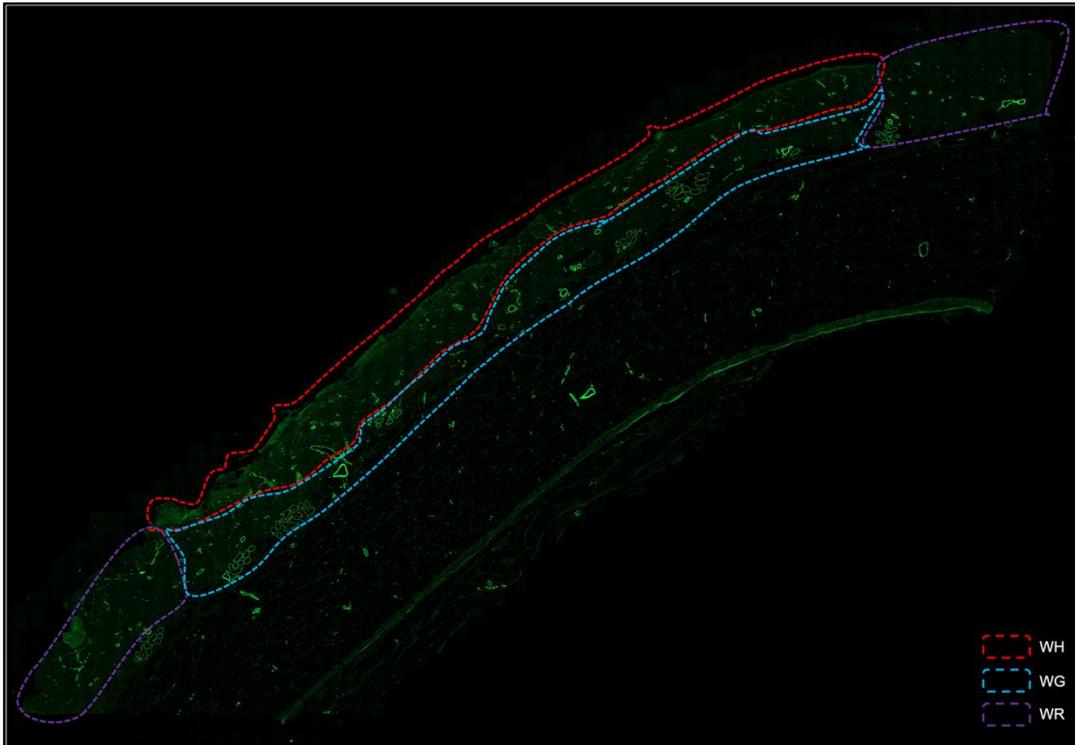


Abb. 10: Einteilung des Verwundungsmodells in verschiedene Wundbereiche:
 Die Abbildung wurde in drei Wundbereiche eingeteilt. Die lilafarbene gestrichelte Linie begrenzt den Bereich Wundrand (WR), die rote gestrichelte Linie den Bereich Wundheilung (WH), die blaue gestrichelte Linie den Bereich Wundgrund (WG).

Diese Einteilung wurde auf die aSMA-gefärbten Aufnahmen übertragen. Aus den aSMA-gefärbten Abbildungen wurden die Bereiche Wundheilung extrahiert. Die Fläche der jeweils mit der Freehand selections ausgewählten und markierte Bereiche wurde mittels Analyze > Measure gemessen. Es erfolgte für diese Bereiche die Auszählung der Vaskularisierung wie in 2.3 beschrieben. Anschließend wurden die Quotienten aus Anzahl der Gefäßanschnitte und der jeweiligen ermittelten Teilfläche berechnet. Abschließend wurden diese Quotienten der Teilbereiche Wundheilung und Wundgrund gegenübergestellt.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Der erste Abschnitt befasst sich mit der bildgestützten Bewertung der epidermalen Histomorphologie mithilfe eines erstmals aufgestellten Scoring-Systems. Im zweiten Abschnitt wird die mittels Immunfluoreszenz erfasste Vaskularisierung und Revaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung ebenfalls bildgestützt am Beispiel eines porcinen Verwundungsmodells quantifiziert.

3.1 Bildgestützte Bewertung der epidermalen Histomorphologie

In diesem ersten Versuchsabschnitt wird ein Scoring-System zur Bewertung histologischer Aufnahmen epidermaler In-vitro-Testsysteme aufgestellt. Die Bewertungskriterien richten sich nach histomorphologischen Charakteristika der Epidermis. Anschließend wird der BSGC-Score in den Bereichen Qualitätssicherung und Verlaufsbeurteilung von Verbrennungsmodellen angewandt.

Insgesamt werden innerhalb des BSGC-Score 40 morphologische Kriterien erfasst. Im Rahmen der Sichtung und Beurteilung von 2145 hochauflösenden Fotografien HE-gefärbter Epidermis- und Vollhautmodellen jeglichen Zustands wurden diese Kriterien anhand der ermittelten Defekte des Gesamtmodells als auch der einzelnen Strata aufgestellt und nach absteigenden Punktwerten angeordnet. Ein hoher Punktwert korreliert hierbei mit einem hohen Übereinstimmungsgrad zu einer physiologischen und nativen Epidermis mit deren charakteristischen histomorphologischen Kennzeichen, welche vergleichend gesichtet wurde. Begleitend wurden histologische Merkmale der Epidermis aus Literaturquellen verwendet. Insgesamt fallen neun Kriterien auf das Stratum basale, zehn auf das Stratum spinosum, vier auf das Stratum granulosum und 17 auf das Stratum corneum. Auch sind die morphologischen Kriterien in den Farbtönen grün, gelb und rot hinterlegt. Die Farbtöne stehen dabei für die Gütekriterien sehr gut bis gut (+/grün), befriedigend bis ausreichend (o/gelb) und mangelhaft bis ungenügend (-/rot). Die folgenden Tabellen (siehe Tab. 2 – 5) zeigen die aufgestellten morphologischen Kriterien mit den zugeordneten Punktwerten und den hinterlegten Farbtönen:

Tab. 2: Morphologische Kriterien für das Stratum basale

Beschreibung	zugeordneter Punktwert
gut diskriminierbares kubisch bis hochprismatisches Epithel mit Mitosefiguren	8
gut diskriminierbares kubisch bis hochprismatisches Epithel mit hyperchromatischen Zellkernen	7
gut diskriminierbares kubisch bis hochprismatisches Epithel mit hypochromatischen Zellkernen	6
einzelne Zellgrenzen schlecht diskriminierbar, jedoch keinerlei Defekte	5
flaches Epithel	4
vereinzelte Konglomerate	3
multiple Konglomerate	2
schlecht vom Stratum spinosum diskriminierbar	1
Stratum basale nicht vorhanden, diskontinuierlich oder fehlende Differenzierung	0

Tab. 3: Morphologische Kriterien für das Stratum spinosum

Beschreibung	zugeordneter Punktwert
einzelne Zellen gut diskriminierbar, keinerlei Defekte	9
vereinzelte Konglomerate	8
vereinzelte geringgradige Spalträume oder Vakuolisierung	7
multiple Konglomerate	6
weniger als drei Zelllagen vorhanden	5
multiple Spalträume	4
vereinzelte großflächige Defekte oder Vakuolisierung	3
stark ausgeprägte großflächige Defekte oder Vakuolisierung	2
diskontinuierlich	1
fehlende Differenzierung	0

Tab. 4: Morphologische Kriterien für das Stratum granulosum:

Beschreibung	zugeordneter Punktwert
stark ausgeprägt	3
mäßig ausgeprägt	2
schwach ausgeprägt	1
nicht ausgeprägt oder fehlende Differenzierung	0

Tab. 5: Morphologische Kriterien für das Stratum corneum

Beschreibung	zugeordneter Punktwert
keinerlei Defekte	16
leichte Abschilferungen	15
vereinzelt punktuell auftretende Spalträume oder Vakuolisierung	14
starke oberflächliche Abschilferungen	13
multiple punktuell auftretende Spalträume oder Vakuolisierung	12
multiple nicht-kontinuierliche längsförmige Defekte	11
multiple kontinuierliche längsförmige Defekte	10
großflächiger oberflächlicher längsförmiger Defekt	9
großflächiger oberflächlicher netzförmiger Defekt oder Vakuolisierung	8
großflächiger oberflächlicher längsförmiger Defekt mit zusätzlichen Spalträumen oder Vakuolisierung	7
großflächiger oberflächlicher netzförmiger Defekt mit zusätzlichen Spalträumen oder Vakuolisierung	6
Kontinuität durch oberflächliche Verletzung zerstört	5
Kontinuität durch tiefe Verletzung zerstört	4
komplette en-bloc-Ablösung vom restlichen Präparat	3
komplette längsförmige Auffederung	2
Keratose	1
weniger als drei Zelllagen vorhanden oder fehlende Differenzierung	0

Die verschiedenen Strata wurden mit Wichtungsfaktoren belegt. Das Stratum basale erhält den Wichtungsfaktor vier, die Strata spinosum und granulosum jeweils drei und das Stratum corneum zwei. Teil des Formblattes sind darüber hinaus Dokumentationselemente zu Datum der Befundung, zur Bezeichnung des Präparates und zum Namen/Kürzel des/der Beurteilenden. Ebenfalls steht ein Feld zum Erstellen von Kommentaren zur Verfügung (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Bereich zur Dokumentation von Rahmendaten des Präparates

Datum:	X
	X
Bezeichnung des Präparates:	X
	X
	X
Name/Kürzel des/der Beurteilenden:	X
Kommentare:	
	X

Die Auswertung wird als numerischer Score berechnet und dem Nutzer in tabellarischer Form angezeigt (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Tabellarische Auswertung des BSGC-Scores

Gesamt	x	100
B	x	8
S	x	9
G	x	3
C	x	16

Der tabellarischen Auswertung angeschlossen ist die Grundformel des BSGC-Scores in Form von $B(x/8) S(x/9) G(x/3) C(x/16) \rightarrow x/100$, wobei der Buchstabe x als Platzhalter dient (siehe Abb. 11).

$$B(x/8) S(x/9) G(x/3) C(x/16) \rightarrow x/100$$

Abb. 11: Grundformel des BSGC-Scores:
Die Grundformel des BSGC-Scores als abschließendes Dokumentationselement lautet $B(x/8) S(x/9) G(x/3) C(x/16) \rightarrow x/100$. (B: Stratum basale; S: Stratum spinosum; G: Stratum granulosum; C: St. corneum; x: Platzhalter)

Das Feld Bewertungsschlüssel: Gesamtpräparat, welches ebenfalls farblich unterlegt ist, bildet den Abschluss des Dokumentes. Die verschiedenen Farbtöne sind den Bewertungskriterien und ihren zugehörigen Punktwertbereichen zugeordnet. Grün steht für sehr gut bis gut (100 – 70 Punkte), gelb für befriedigend bis ausreichend (69 – 28 Punkte) und rot für mangelhaft bis ungenügend (27 – 0 Punkte) (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Bewertungsschlüssel des Gesamtpräparats

Bewertungsschlüssel: Gesamtpräparat	
sehr gut bis gut	100 - 70 Punkte
befriedigend bis ausreichend	69 - 28 Punkte
mangelhaft bis ungenügend	27 - 0 Punkte

Abschließend wurden eine Bildbeilage und eine Anleitung mit Hintergrundinformationen zum BSGC-Score erstellt und angehängt. Diese sowie das Formblatt für den BSGC-Score sind in Gänze in dem Appendix (siehe Appendix I. - III.) hinterlegt.

Insgesamt wurden 59 Chargentests von Epidermis- und Dermismodellen gesichtet und in Ihrer Qualität der Epidermis im Vergleich zur Echthaut beurteilt. Mit Charge wird in diesem Zusammenhang ein einheitlicher Produktionsprozess von Epidermis- oder Dermismodellen bezeichnet. Im Rahmen von Chargentests wird die Qualität einer gesamten Produktionsreihe beurteilt. Stellvertretend für die gesamte Produktionsreihe wird dafür ein einzelnes repräsentatives Modell getestet. Beispielhaft hierfür soll nun jeweils ein Modell aus den oben genannten Bewertungskategorien des Bewertungsschlüssels vorgestellt werden.

Zur Verdeutlichung eines Chargentests der Bewertungskategorie sehr gut bis gut dient hier ein Modell, welches dem BSGC-Score B(7/8) S(7/9) G(3/3) C(11/16) → 80/100 zugerechnet wird. Das Stratum basale zeigt ein gut diskriminierbares kubisch bis hochprismatisches Epithel mit hyperchromen Zellkernen, das Stratum spinosum vereinzelte geringgradige Spalträume oder Vakuolisierung, das Stratum granulosum ist stark ausgeprägt und das Stratum corneum ist von multiplen nicht-kontinuierlichen längsförmigen defekten geprägt (siehe Abb. 12 (I)).

Als Beispiel eines Chargentests der Bewertungskategorie befriedigend bis ausreichend dient hier ein Modell, welches dem BSGC-Score B(3/8) S(7/9) G(2/3) C(0/16) → 39/100 zugerechnet wird. Das Stratum basale zeigt vereinzelte Konglomerate, das Stratum spinosum vereinzelte geringgradige Spalträume oder Vakuolisierung, das Stratum

granulosum ist mäßig ausgeprägt und das Stratum corneum besitzt weniger als drei Zellschichten oder weist eine fehlende Differenzierung auf. Die Strata basale und granulosum sowie das Gesamtpräparat erfüllen das Bewertungskriterium befriedigend bis ausreichend, das Stratum spinosum sehr gut bis gut sowie das Stratum corneum mangelhaft bis ungenügend (siehe Abb. 12 (II)).

Als Beispiel eines Chargentests der Bewertungskategorie mangelhaft bis ungenügend dient hier ein Modell, welches dem BSGC-Score B(1/8) S(0/9) G(1/3) C(2/16) → 11/100 zugerechnet wird. Das Stratum basale ist schlecht vom Stratum spinosum abgrenzbar, das Stratum spinosum ist fehlend differenziert, das Stratum granulosum ist schwach ausgeprägt und das Stratum corneum zeigt eine komplette längsförmige Auffederung. Die Strata basale, spinosum und corneum sowie das Gesamtpräparat erfüllen das Bewertungskriterium mangelhaft bis ungenügend, das Stratum granulosum befriedigend bis ausreichend (siehe Abb. 12 (III)).

I

C	multiple nicht-kontinuierliche längsförmige Defekte (→)	11 (+)
G	stark ausgeprägt (X)	3 (+)
S	vereinzelt geringgradige Spalträume oder Vakuolisierung (*)	7 (+)
B	gut diskriminierbares kubisch bis hochprismatisches Epithel mit hyperchromatischen Zellkernen (V)	7 (+)
Gesamt		80 (+)

B(7/8) S(7/9) G(3/3) C(11/16) → 80/100

II

C	weniger als drei Zellagen vorhanden oder fehlende Differenzierung (→)	0 (-)
G	mäßig ausgeprägt (X)	2 (o)
S	vereinzelt geringgradige Spalträume oder Vakuolisierung (*)	7 (+)
B	vereinzelt Konglomerate (V)	3 (o)
Gesamt		39 (o)

B(3/8) S(7/9) G(2/3) C(0/16) → 39/100

III

C	komplette längsförmige Auffederung (→)	2 (-)
G	schwach ausgeprägt (X)	1 (o)
S	fehlende Differenzierung (*)	0 (-)
B	schlecht vom Str. spinosum abgrenzbar (V)	1 (-)
Gesamt		11 (-)

B(1/8) S(0/9) G(1/3) C(2/16) → 11/100

Abb. 12: Beispielhafte Auswertung eines Chargentests der Bewertungskategorie sehr gut bis gut, befriedigend bis ausreichend und mangelhaft bis ungenügend: Der rechte Abbildungsbereich zeigt einen histologischen Schnitt in einer HE-Färbung. Die linke Spalte bezeichnet den beurteilten Bereich (B: Stratum basale; S: Stratum spinosum; G: Stratum granulosum; C: St. corneum). In der zweiten Spalte sind die jeweiligen Bewertungskriterien des Beispiels genannt. Teil der Bewertungskriterien sind die Symbole →, X, * und V, welche die jeweiligen Kriterien im rechten Abbildungsbereich innerhalb des histologischen Schnittes aufzeigen. In der dritten Spalte ist der jeweiligen Punktwert für den Auswertungsbereich gelistet. Die vierte Spalte zeigt die Bewertungskriterien des jeweiligen Bewertungsbereiches in symbolischer Form als (+), (o) und (-). (+) und der grüne Farbton stehen dabei für das Bewertungskriterium sehr gut bis gut, (o) sowie der gelbe Farbton stehen für das Bewertungskriterium befriedigend bis ausreichend und (-) sowie der rote Farbton für mangelhaft bis ungenügend. Unterhalb der Tabelle ist die vollständige Bewertungsformel des jeweiligen Beispiels zu erkennen.

- (I) Beispielauswertung eines Chargentests der Bewertungskategorie sehr gut bis gut.
 (II) Beispielauswertung eines Chargentests der Bewertungskategorie ausreichend bis befriedigend.
 (III) Beispielauswertung eines Chargentests der Bewertungskategorie mangelhaft bis ungenügend.

Im Versuch von Schneider et al. (2021) wurden 3D-in-vitro-Epidermismodelle für sieben Sekunden durch einen heißen Metallstab verbrannt. Anschließend wurde eine Hälfte der Testsysteme topisch mittels 5%-iger Dexpanthenol-Lösung behandelt, die andere Hälfte der Testsysteme wurde nicht behandelt und als Kontrolle bezeichnet. Es erfolgte die Evaluation der Testsysteme 24-Stunden, sieben Tage und 14 Tage nach Verbrennung als Verlaufsbeurteilung der Wundheilung der Modelle. Als einer der Evaluationsparameter diente u.a. der BSGC-Score. Die ermittelten BSGC-Formeln der Kontroll- und Behandlungsgruppe wurden einem Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Test für Mehrfachvergleiche unterzogen. Es zeigte sich eine statistische Signifikanz der Gruppe Verbrennung (Burn) am siebten Tag nach Verbrennung bei einem p-Wert von $< 0,05$ (*) (siehe Abb. 13).

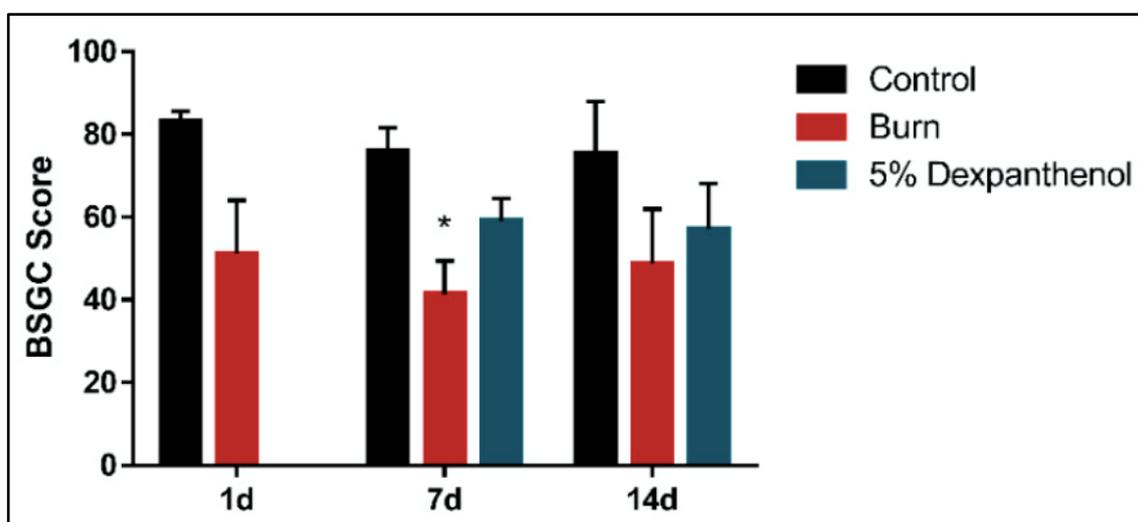


Abb. 13: Grafische Darstellung des Ergebnisses eines Kruskal-Wallis-Tests mit Dunn's Test für Mehrfachvergleiche verändert aus Schneider et al. (2021) (59) zur Verlaufsbeurteilung eines Verbrennungsmodells: Beurteilung der Modellgruppen Kontrolle (Control, schwarz), Verbrennung (Burn, rot) und Behandlung (5% Dexpanthenol, blau) jeweils nach einem, sieben und 14 Tagen. Es zeigte sich eine statistische Signifikanz der Gruppe Verbrennung am siebten Tag nach Verbrennung bei einem p-Wert von $< 0,05$ (*).

3.2 Bildgestützte Quantifizierung der Revaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung

In diesem Abschnitt der Arbeit wird die Revaskularisierung als ein möglicher Parameter zur Ermittlung der kutanen Wundheilung genutzt. Als Grundlage hierfür dienen mittels Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigte histologische Aufnahmen porciner Verwundungsmodelle. Die Aufnahmen der porcinen Verwundungsmodelle erfolgte im Versuch von Tuca et al. (2022). Dabei wurden im Bereich der Flanken zweier Versuchstiere insgesamt pro Tier 12 3 cm x 3 cm fassende und 1,2 mm tiefe Wunden

mit einem Dermatom gesetzt, davon jeweils sechs pro Seite. Es erfolgte die Behandlung mithilfe okklusiver und nicht-okklusiver Wundauflagen. Das erste Versuchstier wurde nach fünf Tagen, das zweite Versuchstier nach sieben Tagen geopfert. Anschließend erfolgte die Entnahme von 8 mm im Durchmesser fassenden Stanzbiopsien aus den behandelten Bereichen. Hieraus wurden u.a. die Immunfluoreszenz-gefärbten histologischen Aufnahmen angefertigt und mithilfe einer Bildbearbeitungssoftware weiter untersucht.

Mithilfe dieser Bildverarbeitungssoftware soll zuerst die Vaskularisierung grundsätzlich und anschließend die Revaskularisierung an den oben genannten mit okklusiven und nicht-okklusiven Wundauflagen behandelten Verwundungsmodellen erfasst werden. Durch die Quantifizierung der Revaskularisierungsgrade sollen Aussagen über den Heilungsverlauf getroffen und die unterschiedlichen Wundauflagen miteinander verglichen werden.

Nach der Einteilung des gesamten Bildes in vier Bereiche, einem links-oberen, einem links-unteren, einem mittleren und einem rechten Bereich, wurden die imponierenden Gefäßanschnitte händisch ausgezählt. Im links-oberen Bildabschnitt sind 39, im links-unteren Bereich 34, im mittleren 38 sowie im rechten 22 Gefäßanschnitte zu erkennen. Insgesamt sind auf der gesamten Aufnahme 133 Gefäßanschnitte zu erkennen (siehe Abb. 14).

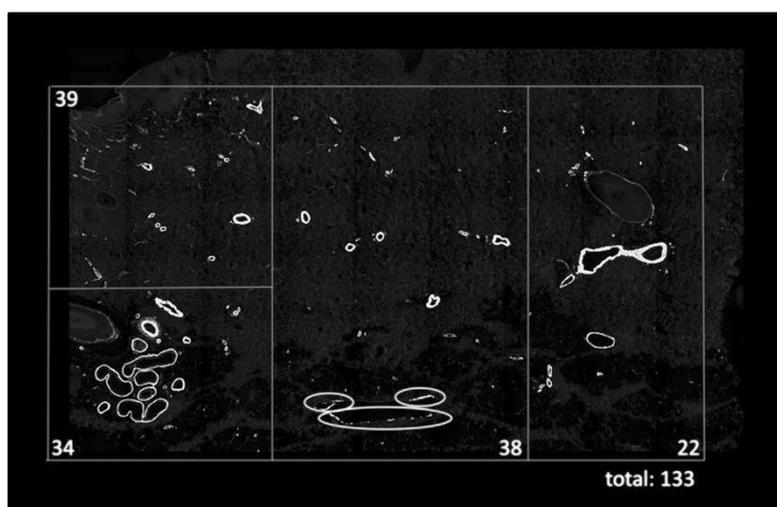
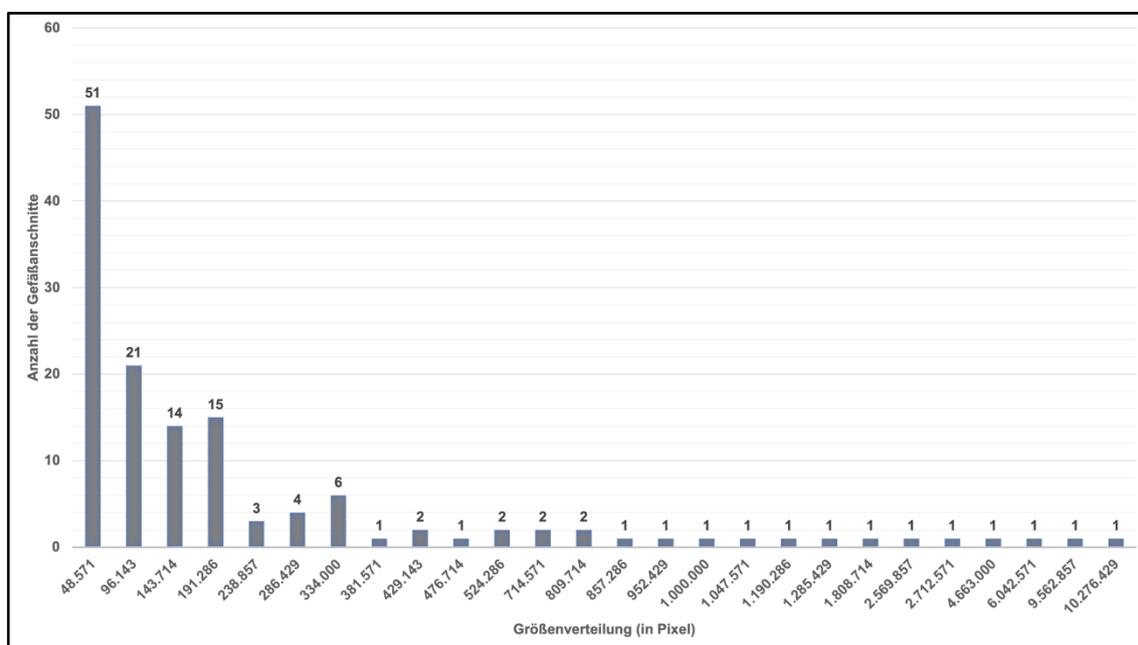


Abb. 14: Ergebnis der händischen Auszählung der angeschnittenen Gefäße:
Der gesamte Bildbereich wurde in vier markierte Abschnitte eingeteilt. Die Gefäßanschnitte imponieren dabei gräulich. Im links-oberen Bildabschnitt konnten 39, im links-unteren Bereich 34, im mittleren 38 sowie im rechten 22 Gefäßanschnitte gezählt werden. Unterhalb der Abschnitte wurden die Gefäßanschnitte aller vier Abschnitte addiert. Insgesamt waren 133 Gefäßanschnitte zu erkennen.

Mithilfe der in 2.3 beschriebenen Parameter wurden in derselben Abbildung 137 elliptische Bildpunkte mit einer Größe ab 30 Pixel von der Bildbearbeitungssoftware ImageJ automatisiert erkannt und in Größenbereiche bis zu einer bestimmten Größe eingeteilt. Abb. 15 zeigt die Verteilung der automatisch ermittelten Bildpunkte.



Tab. 9: Ermittlung der Teilflächen, der Anzahl der Gefäßanschnitte und des Quotienten Gefäßanschnitte/Teilfläche in nicht-okklusiven (rot unterlegt) sowie okklusiven Wundauflagen (blau hinterlegt)

	Präparat	Teilflächen	Gefäß-anschnitte	Gefäß-anschnitte/Teilfläche
nicht-okklusive Wundauflagen	22L1 Wundgrund	0,638	1280	2006
	22L1 Wundheilung	0,195	1735	8897
	22L4 Wundgrund	0,506	1535	3034
	22L4 Wundheilung	0,129	2040	15814
	22R1 Wundgrund	0,485	2556	5270
	22R1 Wundheilung	0,403	5641	13998
	22R4 Wundgrund	0,435	1655	3805
	22R4 Wundheilung	0,171	2646	15474
okklusive Wundauflagen	22L2 Wundgrund	0,45	966	2147
	22L2 Wundheilung	0,108	1395	12917
	22L5 Wundgrund	0,788	1952	2477
	22L5 Wundheilung	0,359	1299	3618
	22R3 Wundgrund	0,383	942	2460
	22R3 Wundheilung	0,116	891	7681

Anschließend wurden die Gefäßanschnitte/Teilfläche jeweils in den Bereichen Wundgrund und Wundheilung addiert und die Mittelwerte hieraus gebildet. Für Wundgrund zeigte sich ein durchschnittlicher Wert von 3028 Gefäßanschnitte/Teilfläche, für Wundheilung 11200 Gefäßanschnitte/Teilfläche. Ein ungepaarter t-Test wurde mit GraphPad Prism Version 9.0.0 durchgeführt. Es zeigte sich eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,0006 (***) (siehe Abb. 16).

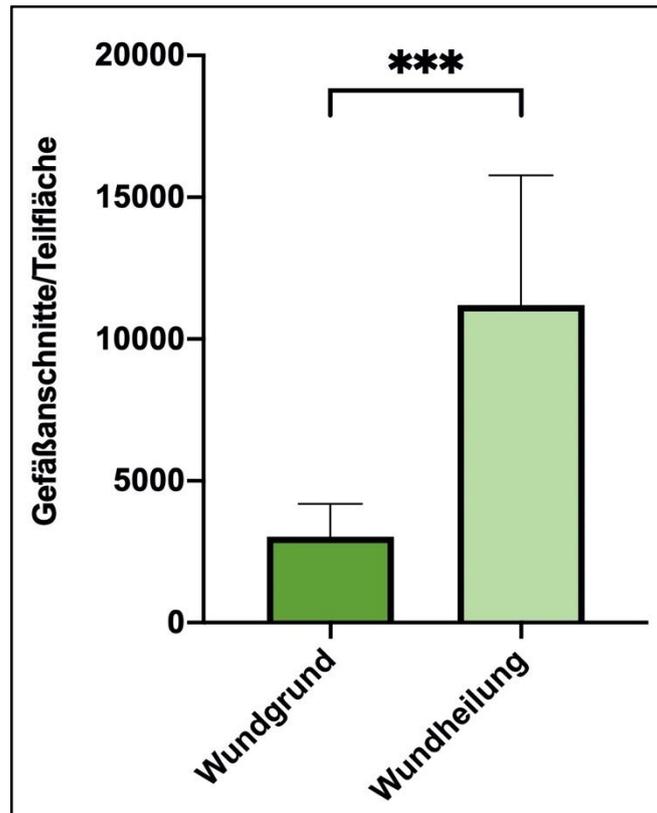


Abb. 16: Gefäßanschnitte/Teilfläche in den Bereichen Wundgrund und Wundheilung: Das Säulendiagramm zeigt an der x-Achse die beiden Bildbereiche Wundgrund (dunkelgrün) und Wundheilung (hellgrün). An der y-Achse sind die Gefäßanschnitte/Teilfläche dargestellt. Für Wundgrund zeigte sich ein durchschnittlicher Wert von 3028 Gefäßanschnitte/Teilfläche, für Wundgrund 11200 Gefäßanschnitte/Teilfläche. Ein ungepaarter t-Test wurde mit GraphPad Prism Version 9.0.0 durchgeführt. Es zeigte sich eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,0006 (**).

Nach dem Vergleich der Bereiche Wundgrund und Wundheilung wurden diese jeweils nach ihrer zugrundeliegenden Wundauflage in die Kategorien Wundgrund nicht-okklusive Wundauflagen, Wundheilung nicht-okklusive Wundauflagen, Wundgrund okklusive Wundauflagen und Wundheilung okklusive Wundauflagen untergliedert. Es wurden ebenfalls die durchschnittlichen Gefäßanschnitte/Teilfläche dieser Unterkategorien ermittelt. Für den Bereich Wundgrund nicht-okklusive Wundauflagen zeigten sich durchschnittlich 3529 Gefäßanschnitte/Teilfläche, für Wundheilung nicht-okklusive Wundauflagen 13546 Gefäßanschnitte/Teilfläche. Bei einem mit GraphPad Prism Version 9.0.0 durchgeführten ungepaarten t-Test zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,0012 (**). Für den Bereich Wundgrund okklusive Wundauflagen ergaben sich 2361 Gefäßanschnitte/Teilfläche, für Wundheilung okklusive Wundauflagen 8072 Gefäßanschnitte/Teilfläche. Bei einem mit GraphPad Prism Version 9.0.0

durchgeführten ungepaarten t-Test zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen keine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,1013 (siehe Abb. 17).

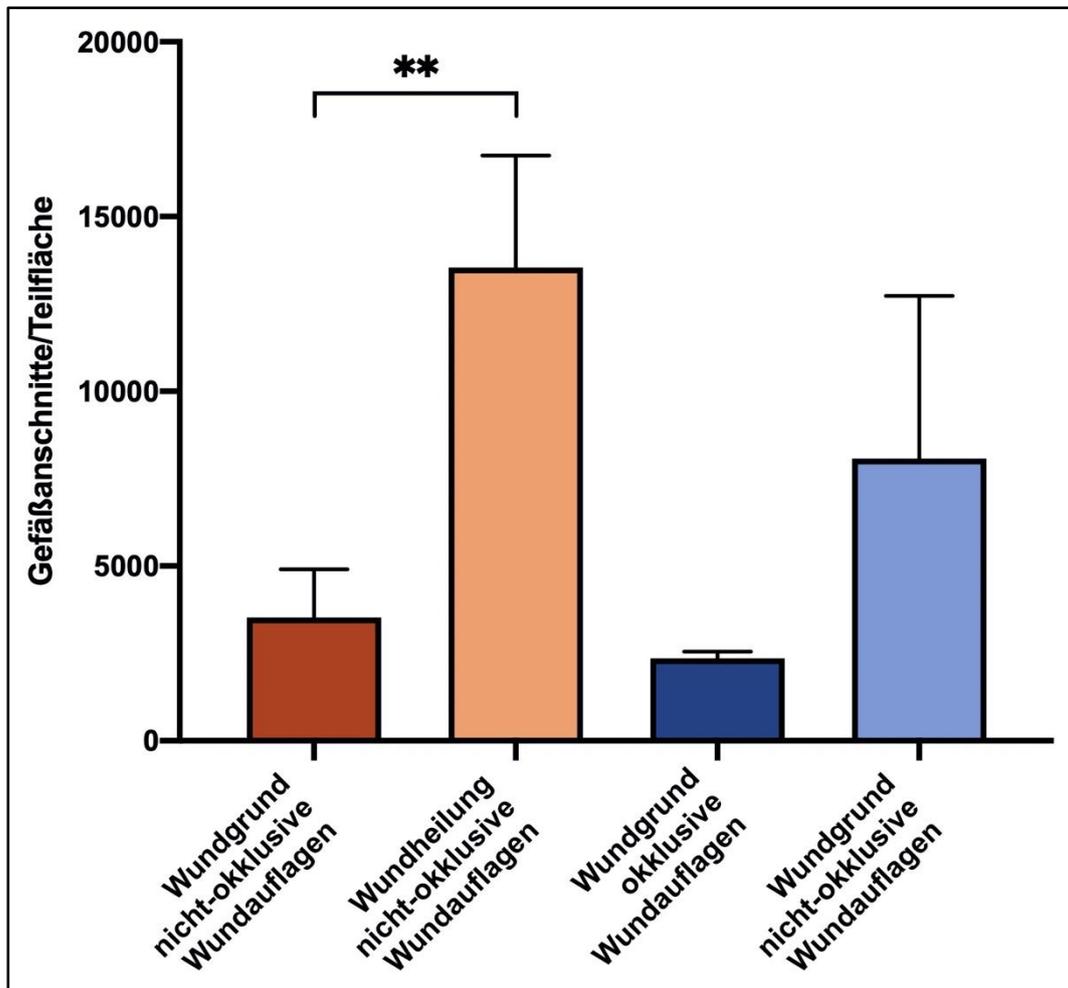


Abb. 17: Darstellung des Quotienten Gefäßanschnitte/Teilfläche in nicht-okklusiven (in roten Farbtönen unterlegt) sowie okklusiven Wundauflagen (in blauen Farbtönen unterlegt): An der x-Achse des Säulendiagramms sind die Bezeichnungen der Präparate aufgelistet (vital reminiscent jeweils dunkler unterlegt; Wundheilung jeweils heller unterlegt), die y-Achse zeigt die Gefäßanschnitte/Teilfläche. Für Wundgrund nicht-okklusive Wundauflagen zeigten sich durchschnittlich 3529 Gefäßanschnitte/Teilfläche, für Wundheilung nicht-okklusive Wundauflagen 13546 Gefäßanschnitte/Teilfläche. Bei einem mit GraphPad Prism Version 9.0.0 durchgeführten ungepaarten t-Test zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,0012 (**). Für Wundgrund okklusive Wundauflagen ergaben sich 2361 Gefäßanschnitte/Teilfläche, für Wundheilung okklusive Wundauflagen 8072 Gefäßanschnitte/Teilfläche. Bei einem mit GraphPad Prism Version 9.0.0 durchgeführten ungepaarten t-Test zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen keine statistische Signifikanz.

Es wurden die Quotienten der Gefäßanschnitte/Teilfläche aus den Bereichen Wundheilung und Wundgrund der nicht-okklusiven Wundauflagen und okklusiven Wundauflagen gebildet. Dabei zeigten sich für die nicht-okklusiven Wundauflagen 4,4, 5,2, 2,7 und 4,1 Gefäßanschnitte/Teilfläche (Wundheilung/Wundgrund). Für die

okklusiven Wundauflagen konnten 6,0, 1,5 und 3,1 Gefäßanschnitte/Teilfläche (Wundheilung/Wundgrund) gemessen werden (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Ermittlung des Quotienten Gefäßanschnitte/Teilfläche zwischen den Bereichen Wundheilung sowie Wundgrund in nicht-okklusiven (rot unterlegt) und okklusiven Wundauflagen (blau unterlegt)

	Präparat	Gefäßanschnitte/Teilfläche (Wundheilung/Wundgrund)
nicht-okklusive Wundauflagen	22L1	4,4
	22L4	5,2
	22R1	2,7
	22R4	4,1
okklusive Wundauflagen	22L2	6,0
	22L5	1,5
	22R3	3,1

Diese Quotienten wurden gegenübergestellt. Für die nicht-okklusiven Wundauflagen zeigte sich ein Wert von 4100 Gefäßanschnitte/Teilfläche (Wundheilung/Wundgrund), für die okklusiven Wundauflagen 4500 Gefäßanschnitte/Teilfläche (Wundheilung/Wundgrund). Ein ungepaarter t-Test, der mit GraphPad Prism Version 9.0.0 durchgeführt wurde, zeigte keine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,7863 (siehe Abb. 18).

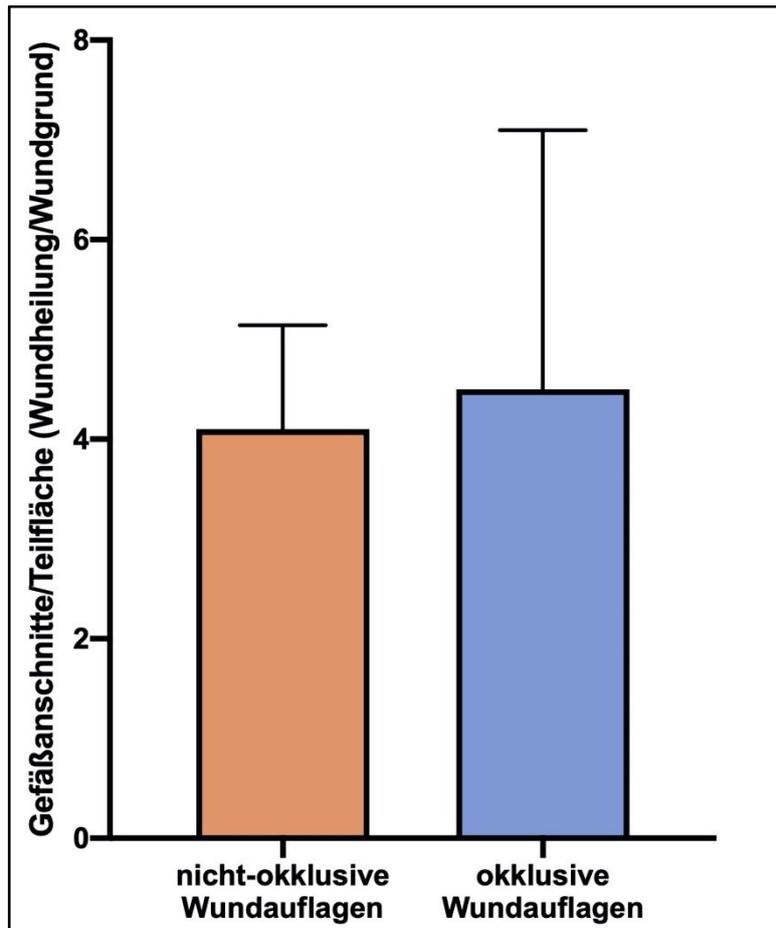


Abb. 18: Darstellung des Quotienten Gefäßanschnitte/Teilfläche zwischen den Bereichen Wundheilung sowie Wundgrund in nicht-okklusiven (rot unterlegt) und okklusiven Wundauflagen (blau unterlegt): An der x-Achse des Säulendiagramms sind die Bezeichnungen der Präparate aufgelistet, die y-Achse zeigt die Gefäßanschnitte/Teilfläche der Bereiche Wundheilung/Wundgrund. Für die nicht-okklusiven Wundauflagen zeigte sich ein Wert von 4100 Gefäßanschnitte/Teilfläche (Wundheilung/Wundgrund), für die okklusiven Wundauflagen 4500 Gefäßanschnitte/Teilfläche (Wundheilung/Wundgrund). Ein ungepaarter t-Test, der mit GraphPad Prism Version 9.0.0 durchgeführt wurde, zeigte keine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,7863.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Score zur Quantifizierung der Güte von Epidermismodellen in toto sowie der einzelnen Strata im Vergleich zur Nativhaut aufgestellt. Dieser Score zeigt dabei im Stil einer Facettenklassifikation insgesamt 40 Kriterien (neun für das Stratum basale, zehn für das Stratum spinosum, vier für das Stratum granulosum und 17 für das Stratum corneum) und ist mit einem Bewertungsschlüssel und einer farblichen Codierung hinterlegt (rot/- entspricht der Kategorie mangelhaft bis ungenügend, gelb/o entspricht der Kategorie befriedigend bis ausreichend und grün/+ entspricht der Kategorie sehr gut bis gut). Zusätzliche Dokumentationselemente sind eingefügt und eine Bildbeilage sowie eine Anleitung sind angehängt (siehe Appendix I. - III.). Das Formblatt ist im DIN A4-Format angelegt. Der BSGC-Score wurde im Rahmen der Qualitätskontrolle sowie zur Verlaufsbeurteilung im Rahmen eines Verbrennungsversuches von Schneider et al. (2021) erfolgreich angewandt.

Als Vorbild des BSGC-Scores diente die TNM-Klassifikation, welche in den 1940er Jahren von Pierre Denoix aufgestellt und durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) veröffentlicht wurde (65). Die TNM-Klassifikation stellt eine Facettenklassifikation für maligne Tumorerkrankungen dar, in der unter anderem die Tumorgröße (T), der Lymphknotenstatus (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) in Form einer Tumorformel dargestellt werden. Dies erlaubt die Einteilung bzw. Umwandlung in ein genaues Tumorstadium, woraus sich anschließend das Therapieziel und das Therapieregime ergeben sowie Aussagen zur Prognose getroffen werden können. International und interdisziplinär ist es somit möglich anhand der Tumorformel eine Vielzahl an Informationen zügig zu übermitteln. Seit der ursprünglichen Einführung durch die UICC 1950 entstanden bisher mehrfache Auflagen der TNM-Klassifikation, welche tumorspezifisch fortlaufend aktualisiert bzw. angepasst werden. Auch wurden die ursprünglichen drei Deskriptoren der Tumorformel um weitere Variablen wie zum Beispiel die Differenzierung der Tumorzellen (G) oder der Resektionsstatus (R) ergänzt. Die TNM-Klassifikation ist heutzutage fester Bestandteil einer jeden interdisziplinären onkologischen Therapie.

Bisher wurde noch keine genaue Quantifizierung der morphologischen Güte von Epidermismodellen beschrieben. Somit beruht die Beurteilung von Epidermismodellen derzeit ausschließlich auf subjektiven und damit nicht vergleichbaren Kriterien. Eine

qualitativ hochwertige Verlaufsbeurteilung verschiedener Epidermismodelle anhand morphologischer Marker erscheint ebenfalls hierdurch nicht möglich. In der aktuellen Test Guideline Number 439 von 2021 der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) heißt es zum histomorphologischen Aufbau epidermaler Modelle lediglich: „Histological examination of the RhE (reconstructed human epidermis) model should be provided demonstrating human epidermis-like structure (including multi-layered stratum corneum)” (66). Auf eine genauere mikroskopische Analyse der Morphe der Epidermismodelle wird hierbei nicht weiter eingegangen. Die Anwendbarkeit des BSGC-Scores wurde im Rahmen des Qualitätsmanagements geprüft. Die Anwendung erfolgte auf 59 Chargentests angefertigter Epidermismodelle. Es konnten Aussagen zur histomorphologischen Güte aller vorliegenden epidermaler In-vitro-Testsysteme getroffen werden. Eine direkte morphologische Verlaufsbeschreibung der Testsysteme im zeitlichen Verlauf auf lichtmikroskopischer Ebene entfällt in vielen Versuchsreihen zumeist. Der Fokus liegt v.a. auf immunhistochemischen Gesichtspunkten, welche indirekt den Zustand eines histologischen Präparates oder das Ausmaß einer Entzündungsreaktion beschreiben. Je nach spezifischer Fragestellung werden zur Verlaufsbeurteilung zum Beispiel in Verbrennungsmodellen verschiedene Interleukine, Vascular endothelial growth factor, Lactatdehydrogenase und Ki67-Protein erhoben und im zeitlichen Verlauf verglichen. Beispielhaft hierfür dient die Arbeit von Schneider et al. (2021). Die Beurteilung mittels immunhistochemischer Marker erfordert mitunter ausgeprägte zeitliche, personelle und finanzielle Ressourcen. Es ist zudem nicht ersichtlich, welche Gütekriterien ein Epidermismodell an bestimmten Zeitpunkten aufweist und wie sich diese unter Umständen wandeln. Mithilfe des BSGC-Scores konnte die Verlaufsbeurteilung eines In-vitro-Verbrennungsmodells aus humaner Epidermis durch Schneider et al. (2021) nach festgelegten Zeiten nach Verbrennung erfolgreich durchgeführt werden. Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass ein Epidermismodell nach sieben Tagen nach Verbrennung einen signifikant niedrigeren Punktwert im Vergleich zum unverwundeten Kontrollmodell aufwies, sich der Punktwert jedoch im Rahmen der eintretenden Wundheilung auch wieder erhöht (59). Der BSGC-Score kann demnach als geeignetes ergänzendes Evaluationstool der Güte eines In-vitro-Epidermismodells zu immunhistochemischen Parametern angesehen werden. Besonders hervorzuheben ist die gute Beurteilbarkeit nicht nur des Gesamtmodells, sondern auch der einzelnen epidermalen Strata, die durch die hohe Ortsauflösung histologischer Aufnahmen

ermöglicht wird. Hierdurch wird der jeweilige Zustand der Modelle objektivierbar, was einen Vergleich und vor allem eine quantifizierbare Verlaufsbeurteilung ermöglicht.

Auch stellt die korrekte Dokumentation der Befundungsergebnisse Anwenderinnen und Anwender oftmals vor Herausforderungen. Klare Dokumentationselemente und das für gängige Laborbücher gewählte DIN A4-Format erlauben eine einfache und standardisierte Dokumentation der histomorphologischen Befunde.

Der BSGC-Score zeigt jedoch ebenfalls Limitationen auf. Der Score ist kein diagnostisches Mittel, welches die qualifizierte Befundung durch histologisch geschultes Personal ersetzen oder detaillierte Aussagen über die Gänge des Modells treffen kann und soll. Der gezielte Anwendungsbereich dieses Tools liegt einzig und allein in der Evaluation epidermaler In-vitro-Modelle. Eine Ausweitung des BSGC-Scores auf diagnostische Parameter ist zukünftig nicht vorgesehen. Es ergibt sich kein Anspruch auf Vollständigkeit der Befundung histologischer Modelle. Der BSGC-Score soll seinen Stellenwert als ein ergänzendes Mittel der Befundung haben und immunhistochemische Parameter zur Beurteilung ergänzen. Je nach Fragestellung, die der Versuchsreihe zugrunde liegt, muss diese ggf. erweitert werden. Auch können teilweise subjektive Einflüsse des/der Befundenden nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Obwohl die Zielgruppe auf histologisch nicht spezialisiertes Personal liegt, ist es jedoch nötig, dass vor der Erstanwendung eine qualifizierte Einweisung erfolgt. Nach vorgenommener Einweisung konnte der Score auch durch histologisch nicht speziell geschultes Personal wie zum Beispiel Hilfswissenschaftlerinnen und Hilfswissenschaftler sicher angewandt werden. Aufgrund der Vielzahl beurteilter Modelle könnte der hierbei entstandene Datensatz als sogenannte Ground Truth für die automatisierte Auswertung epidermaler In-vitro-Testsysteme durch eine künstliche Intelligenz verwendet werden. Eine Ground Truth ist vergleichbar mit einem Grund- oder Lehrsatz zum Anlernen einer künstlichen Intelligenz.

Als histologische Zielstruktur des zweiten Teils der Arbeit diente die mittlere Gefäßschicht der Kapillaren, die Tunica muscularis. Diese besteht aus glatten Muskelzellen, in denen unter anderem α SMA vorliegt (67). ASMA wurde in diesem Versuch gezielt ausgewählt um Gefäßanschnitte mittels Immunfluoreszenz darzustellen. Zu Beginn wurden erkennbare Talgdrüsenanschnitte händisch entfernt. Diese Strukturen lassen sich durch bestimmte histomorphologische Merkmale von Blutgefäßen unterscheiden. Sie treten traubenförmig-gruppiert innerhalb der Dermis auf und besitzen

eine vakuolöse Form. Das zentrale Lumen wirkt aufgrund des muzinösen Charakters des Sekretes ausgewaschen (3). Ohne die vorherige Entfernung dieser drüsigen Formationen wären diese mit hoher Wahrscheinlichkeit wegen ihrer elliptischen Morphe fälschlicherweise durch die Software als Gefäßanschnitte erkannt und gezählt worden. Es erfolgte die anfänglich manuelle Auszählung der kapillaren Gefäßstrukturen an einer aSMA gefärbten IF-Aufnahmen eines porcinen Hautmodells. Dies diente als Referenzwert zur Ermittlung der nötigen Einstellungen der Software zur automatisierten Zählung. Um eine Softwaregestützte Auswertung zu etablieren, wurden elliptische Formationen mit einer Größe ≥ 30 Pixeln innerhalb der porcinen Dermis gezählt. 30 Pixel entsprechen im Maßstab der vorliegenden Bildaufnahmen etwa $8 \mu\text{m}$. Diese Größe wurde gewählt, da $8 \mu\text{m}$ der durchschnittlichen Größe von Kapillaren entsprechen (68) und diese dadurch als Kapillaren angesehen werden konnten. Die vaskulären Formationen konnten mittels der Bildbearbeitungssoftware ImageJ erfasst und quantifiziert werden. Es zeigten sich mit 133 ermittelten Bildpunkten in der manuellen Auszählung und 137 ermittelten Bildpunkten in der automatisierten Auszählung annähernd übereinstimmende Werte. Hierdurch konnten die für die Auszählung und weiteren Versuche notwendigen Einstellungen ermittelt werden.

Im zweiten Abschnitt des Versuches wurden diese Kenntnisse angewandt um die Neovaskularisierung in verwundeten und mit sekundären okklusiven bzw. nicht-okklusiven Wundaufgaben behandelten Bereichen zu quantifizieren und zu vergleichen. Die Neovaskularisierung stellt einen wichtigen Teil der kutanen Wundheilung dar (69). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine bessere Wundheilung mit einer verstärkten Vaskularisierung bzw. Kapillarisation einhergeht, sich demnach ein zahlenmäßig größeres Verhältnis aus Anzahl von Gefäßanschnitten innerhalb einer bestimmten Fläche zeigt und softwaregestützt quantifiziert werden kann.

Durch die Unterteilung des Modells in die drei Abschnitte Wundrand, Wundgrund und Wundheilung ist es möglich, den Bereich der eigentlichen Wundheilung zu ermitteln und gezielt zu untersuchen. Demnach findet die Transformation verwundeten in heilenden Gewebes in demjenigen Bereich statt, in dem zuvor auch eine Verwundung erfolgte. Diese Charakteristik trifft auf den Bereich Wundheilung zu, weshalb dieser auch fokussiert weiter betrachtet wurde. Wichtig war es, die Anzahl der Kapillaren auf die entsprechend gemessene Fläche von Wundheilung zu beziehen, damit die Dichte der Vaskularisierung ermittelt werden und sozusagen das Verhältnis der Vaskularisierung pro Fläche quantifiziert werden kann. Hierdurch werden die Ergebnisse untereinander

erst vergleichbar. Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass in dem Bereich Wundheilung, in dem Wundheilung stattfindet signifikant mehr Gefäßanschnitte als in Wundgrund in Relation zur Teilfläche gemessen werden konnten. Die ursprüngliche Hypothese konnte daher bestätigt werden, dass in den Bereichen, in denen vermehrt Vaskularisation gemessen werden kann, auch eine ausgeprägtere Wundheilung stattfindet, also die Neovaskularisation als ein aussagekräftiger Marker für das generelle Stattfinden von Wundheilung verwendet werden kann. Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen von King et al. (2014), welche eine ausgeprägtere Wundheilung mit einer verstärkten Revaskularisierung assoziierten (70). Im Vergleich zwischen nicht-okklusiven und okklusiven Wundauflagen konnte diese Beobachtung ebenfalls bestätigt werden. So zeigte sich innerhalb der Gruppe der nicht-okklusiven Wundauflagen eine signifikant stärker ausgeprägte Vaskularisation innerhalb Wundheilung im Vergleich zu Wundgrund. Bei den okklusiven Wundauflagen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Zweites Ziel war es, einen unterschiedlichen Vaskularisierungsgrad zwischen sekundären okklusiven und nicht-okklusiven Wundauflagen an einem porcinen Verwundungsmodell miteinander zu vergleichen und somit also einen potenziellen Unterschied dieser Therapeutika in der Revaskularisierung herauszustellen. Um hierbei eine Vergleichbarkeit untereinander zu ermöglichen, wurden die Quotienten der nicht-okklusiven und okklusiven Wundauflagen der Gefäßanschnitte/Teilfläche von jeweils Wundheilung/Wundgrund gebildet. Hierunter zeigte sich, dass es hinsichtlich der Revaskularisierung keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen sekundären Wundauflagen zueinander gibt. Es zeigte sich jedoch bei Tuca et al. (2022), dass nicht-okklusive Verbände eine signifikant deutlich ausgeprägtere Reepithelialisierung gegenüber okklusiven Verbänden zeigen. Bei okklusiven Verbänden liegt eine signifikant deutlich größere Gewebedicke der neu gebildeten Dermis als beim Einsatz nicht-okklusiver Verbände vor (71). Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die hier angewandten Wundauflagen keinen Vor- bzw. Nachteil, zumindest in Anbetracht der Neovaskularisierung, zueinander bieten.

Der BSGC-Score als Facettenklassifikation kann mit seinen 40 Beurteilungskriterien als Tool für die bildgestützte Quantifizierung der epidermalen Histomorphologie kutaner In-vitro-Testsysteme angesehen werden. Eine Anwendbarkeit im Rahmen des Qualitätsmanagements konnte durch die erfolgreiche Anwendung auf die Beurteilung von Chargentests nachgewiesen werden. Auch war es möglich, den

histomorphologischen Zustand eines Verbrennungsmodells inklusive dessen Heilungsverlaufs fortlaufend zu beurteilen sowie die histomorphologischen Korrelate zu erfassen, zu quantifizieren und miteinander zu vergleichen. Eine Ausweitung des Anwendungsbereichs auf weitere Versuchsmodalitäten, wie die Verlaufsbeurteilung anderweitiger epidermaler Verwundungs- oder Heilungsmodelle ist denkbar. Zukünftig könnte der BSGC-Score um Beurteilungskriterien dermalen Strukturen ergänzt und somit auf Kutismodelle ausgeweitet werden. Die fortlaufende Evaluation der Nutzerfreundlichkeit und Aktualität erscheint sinnvoll, die Befundung durch eine künstliche Intelligenz (KI) möglich.

Im zweiten Teil der Arbeit war es möglich, die Vaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung mithilfe einer Bildbearbeitungssoftware zu quantifizieren. Es zeigten sich Unterschiede in der Vaskularisierungsdichte topisch behandelte porciner Verwundungsmodelle. Die Quantifizierung mittels ImageJ war einfach und schnell durchführbar. Es zeigte sich, dass die Vaskularisierungsdichte okklusiver in Vergleich zu nicht-okklusiver Wundverbände nicht signifikant größer ist. Tuca et al. (2022) konnte jedoch zeigen, dass in diesem Fall eine signifikant größere Gewebedicke beim Einsatz okklusiver Wundverbände in Vergleich zu nicht-okklusivem Verbandmaterial entsteht. Die Wundheilung stellt jedoch ein äußerst komplexes physiologisches Gesamtkonstrukt dar, welches aus verschiedenen parallel ablaufenden Prozessen besteht. Die isolierte Betrachtung der Revaskularisierung als einzelner Prozess der Wundheilung, so wahr sie auch einen essenziellen Prozess darstellt, kann daher nicht als generelles Kriterium für die Gesamtbeurteilung ebendieser dienen. Hier findet die gewählte Methodik seine Limitation. Die hier angewandte automatisierte Auszählung der Revaskularisierung besitzt jedoch sicherlich einen Stellenwert zur zügigen und überblickenden Beurteilung.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit hatte zum Ziel quantitative Analysen histologischer Aufnahmen der Haut nach unterschiedlichen Gesichtspunkten zu etablieren. Im ersten Abschnitt wurde die bildgestützte Quantifizierung der epidermalen Histomorphologie untersucht. Nach Sichtung und Beurteilung von 2145 hochauflösenden Fotografien HE-gefärbter Epidermis- und Vollhautmodellen jeglichen Zustands, wurde der BSGC-Score als Facettenklassifikation mit seinen insgesamt 40 Beurteilungskriterien aufgestellt. Die unterschiedlichen epidermalen Strata wurden mit Wichtungsfaktoren belegt. Die Bewertungskategorien sind mit einem Ampelsystem unterlegt. Eine Befundungsformel wurde aufgestellt. Weitere Bestandteile des BSGC-Scores sind eine Anleitung mit Bildbeilage sowie Dokumentationselemente. Die Anwendung erfolgte erfolgreich im Rahmen der Qualitätssicherung an Chargentests und zur Verlaufsbeurteilung eines In-vitro-Verbrennungsmodells aus humaner Epidermis durch Schneider et al. (2021) Der BSGC-Score dient als zügig durchführbares Evaluationstool zur Befundung von In-vitro-Epidermismodellen und nicht als diagnostisches Mittel. Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Vaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung. Es wurden aSMA-IF-gefärbte Abbildungen porciner Verwundungsmodelle betrachtet und nach der Entfernung drüsiger Strukturen Gefäßanschnitte zu Beginn manuell ausgezählt. Hieraus wurden die nötigen Einstellungen für die Bildbearbeitungssoftware ImageJ ermittelt und die Abbildungen dieser anschließend zugeführt. Es erfolgte die automatisierte Quantifizierung elliptischer Formationen mit einer Größe ≥ 30 Pixel. Im nächsten Schritt wurden die Abbildungen in die Bereiche Wundrand, Wundgrund und Wundheilung unterteilt. In dem Bereich Wundheilung zeigte sich eine signifikant größere Revaskularisierung als in Wundgrund. Abschließend erfolgte der Vergleich sekundärer Wundauflagen. Der Vergleich der Quotienten Wundheilung/Wundgrund nicht-okklusiver und okklusiver Wundauflagen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Neovaskularisierung. Die isolierte Betrachtung der Revaskularisierung als einzelner Prozess der Wundheilung kann nicht als generelles Kriterium für die Gesamtbeurteilung dienen. Hier findet die gewählte Methodik ihre Limitation. Zukünftige Anwendungsbereiche des BSGC-Scores sind die Ausweitung auf Vollhautmodelle und andere Verwundungsmodalitäten. Eine automatisierte und durch eine KI-gestützte Befundung ist ebenfalls aufgrund des zugrundeliegenden umfangreichen Datensatzes denkbar. Auch kann eine automatisierte softwaregestützte Quantifizierung der Vaskularisierung als überblickende und zügige Beurteilung der Wundheilung sinnvoll erscheinen.

6 Summary

This work aimed to establish quantitative analyses of histological images of the skin according to different aspects. In the first section, image-based quantification of epidermal histomorphology was investigated. After reviewing and assessing 2145 high-resolution photographs of HE-stained epidermis and full-thickness skin models of any condition, the BSGC score was established as a facet classification with its total of 40 assessment criteria. Weighting factors were assigned to the different epidermal strata. The assessment categories are underlaid with a color system. A scoring formula was established. Further components of the BSGC score are a manual with picture supplement as well as documentation elements. It was successfully applied in the context of quality assurance on batch tests and for progression assessment of an in vitro human epidermis burn model by Schneider et al. (2021). The BSGC score serves as a rapidly feasible evaluation tool for the reporting of in vitro epidermis models and not as a diagnostic tool. The second section focuses on vascularization as a parameter of cutaneous wound healing. ASMA-IF-stained images of porcine wounding models were considered, and after removal of glandular structures, vascular formations were manually counted at baseline. From this, the necessary settings for the image processing software ImageJ were determined and the images were subsequently fed to it. Automated quantification of elliptical formations with a size ≥ 30 pixels was performed. In the next step, the images were divided into the areas of wound margin, wound bed and wound healing. The wound healing area showed significantly greater revascularization than wound bed. Finally, secondary wound dressings were compared. The comparison of the wound healing/wound bed quotients of non-occlusive and occlusive wound dressings showed no significant difference in neovascularization. The isolated consideration of revascularization as a single process of wound healing cannot serve as a general criterion for the overall assessment. This is where the chosen methodology finds its limitation. Future areas of application of the BSGC score include extension to full-thickness skin models and other wound modalities. Automated and AI-assisted scoring is also conceivable due to the extensive underlying data set. Automated software-assisted quantification of vascularization may also appear useful as an overview and expeditious assessment of wound healing.

7 Literaturverzeichnis

1. Arda O, Goksugur N, Tuzun Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014;32(1):3-13.
2. Allen TD, Potten CS. Desmosomal form, fate, and function in mammalian epidermis. *J Ultrastruct Res.* 1975;51(1):94-105.
3. Welsch U, Kummer W, Deller T, editors. *Lehrbuch Histologie.* 4th ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2014.
4. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:339-73.
5. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012;30(3):257-62.
6. Moore K, Persaud T. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology.* 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.
7. Sadler T. *Langman's Medical Embryology.* 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
8. Carlson B. *Human Embryology and Developmental Biology.* 4th ed. Philadelphia: Mosby; 2009.
9. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol.* 1994;130(4):489-93.
10. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5):614-20.
11. Sharma RK, John JR. Role of stem cells in the management of chronic wounds. *Indian J Plast Surg.* 2012;45(2):237-43.
12. Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *Int Wound J.* 2013;10 Suppl 1:9-14.
13. Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, et al. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value Health.* 2018;21(1):27-32.
14. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
15. Scheithauer M, Riechelmann H. [Review part II: disorders in cutaneous woundhealing]. *Laryngorhinootologie.* 2003;82(1):36-9.
16. Riddel JP, Jr., Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2007;24(3):123-31.
17. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 18):3209-13.
18. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004;28(3):321-6.
19. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):12s-34s.
20. Campos AC, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(3):281-8.
21. Grose R, Werner S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol Biotechnol.* 2004;28(2):147-66.
22. Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2003;32(3):239-44.
23. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):9-18.

24. Calin MA, Coman T, Calin MR. The Effect of Low Level Laser Therapy on Surgical Wound Healing. *Romanian Reports in Physics*. 2010;62(3):617-27.
25. Mendonca RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol*. 2009;84(3):257-62.
26. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-60.
27. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther*. 1991;52(3):407-22.
28. Mason DE, Mitchell KE, Li Y, Finley MR, Freeman LC. Molecular basis of voltage-dependent potassium currents in porcine granulosa cells. *Mol Pharmacol*. 2002;61(1):201-13.
29. Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*. 2019;8(6).
30. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.
31. Janis JE, Harrison B. Wound Healing: Part I. Basic Science. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016;138(3S):9S-17S.
32. Stechmiller JK. Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutr Clin Pract*. 2010;25(1):61-8.
33. Silverstein P. Smoking and wound healing. *Am J Med*. 1992;93(1a):22s-4s.
34. Burgess JL, Wyant WA, Abdo Abujamra B, Kirsner RS, Jozic I. Diabetic Wound-Healing Science. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(10).
35. Girod DA, McCulloch TM, Tsue TT, Weymuller EA, Jr. Risk factors for complications in clean-contaminated head and neck surgical procedures. *Head Neck*. 1995;17(1):7-13.
36. Melan'in VD, Rybak RF, Senkevich VM. [Prophylaxis of the postop complications in combined treatment of patients with laryngeal cancer]. *Vestn Otorinolaringol*. 1998(5):46-8.
37. Attinger CE, Janis JE, Steinberg J, Schwartz J, Al-Attar A, Couch K. Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):72S-109S.
38. Barret JP, Herndon DN. Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111(2):744-50; discussion 51-2.
39. Bishop SM, Walker M, Rogers AA, Chen WY. Importance of moisture balance at the wound-dressing interface. *J Wound Care*. 2003;12(4):125-8.
40. Kannon GA, Garrett AB. Moist wound healing with occlusive dressings. A clinical review. *Dermatol Surg*. 1995;21(7):583-90.
41. Hirsch T, Jacobsen F, Rittig A, Goertz O, Niederbichler A, Steinau HU, et al. [A comparative in vitro study of cell toxicity of clinically used antiseptics]. *Hautarzt*. 2009;60(12):984-91.
42. Ford-Dunn S. Use of vacuum assisted closure therapy in the palliation of a malignant wound. *Palliat Med*. 2006;20(4):477-8.
43. Eginton MT, Brown KR, Seabrook GR, Towne JB, Cambria RA. A prospective randomized evaluation of negative-pressure wound dressings for diabetic foot wounds. *Ann Vasc Surg*. 2003;17(6):645-9.
44. Stonerock CE, Bynoe RP, Yost MJ, Nottingham JM. Use of a vacuum-assisted device to facilitate abdominal closure. *Am Surg*. 2003;69(12):1030-4; discussion 4-5.
45. de Geus HR, van der Klooster JM. Vacuum-assisted closure in the treatment of large skin defects due to necrotizing fasciitis. *Intensive Care Med*. 2005;31(4):601.
46. Khan AA, Khan IM, Nguyen PP, Lo E, Chahadeh H, Cerniglia M, et al. Skin Graft Techniques. *Clin Podiatr Med Surg*. 2020;37(4):821-35.

47. Guillamat-Prats R. The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. *Cells*. 2021;10(7).
48. Gould LJ, Leong M, Sonstein J, Wilson S. Optimization and validation of an ischemic wound model. *Wound Repair Regen*. 2005;13(6):576-82.
49. Fang RC, Mustoe TA. Animal models of wound healing: utility in transgenic mice. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2008;19(8):989-1005.
50. Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res*. 1998;290 Suppl:S1-11.
51. Dahiya P. Burns as a model of SIRS. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(13):4962-7.
52. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:969618.
53. Burmeister DM, Supp DM, Clark RA, Tredget EE, Powell HM, Enkhbaatar P, et al. Advantages and Disadvantages of Using Small and Large Animals in Burn Research: Proceedings of the 2021 Research Special Interest Group. *J Burn Care Res*. 2022;43(5):1032-41.
54. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*. 2001;9(2):66-76.
55. Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol*. 1978;7:39-52.
56. Ud-Din S, Bayat A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair Regen*. 2017;25(2):164-76.
57. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia*. 1960;1(13):500-.
58. Mathes SH, Ruffner H, Graf-Hausner U. The use of skin models in drug development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69-70:81-102.
59. Schneider V, Kruse D, de Mattos IB, Zöphel S, Tiltmann KK, Reigl A, et al. A 3D In Vitro Model for Burn Wounds: Monitoring of Regeneration on the Epidermal Level. *Biomedicines*. 2021;9(9).
60. Kiesewetter L, Littau L, Walles H, Boccaccini AR, Groeber-Becker F. Reepithelialization in focus: Non-invasive monitoring of epidermal wound healing in vitro. *Biosens Bioelectron*. 2019;142:111555.
61. Groeber F, Engelhardt L, Egger S, Werthmann H, Monaghan M, Walles H, et al. Impedance spectroscopy for the non-destructive evaluation of in vitro epidermal models. *Pharm Res*. 2015;32(5):1845-54.
62. Birgersson U, Birgersson E, Aberg P, Nicander I, Ollmar S. Non-invasive bioimpedance of intact skin: mathematical modeling and experiments. *Physiol Meas*. 2011;32(1):1-18.
63. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:299-311.
64. Lin JR, Izar B, Wang S, Yapp C, Mei S, Shah PM, et al. Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *Elife*. 2018;7.
65. (UICC) TUFICC. TNM History, Evolution and Milestones [11.06.2022]. Available from: <https://www.uicc.org/sites/main/files/atoms/files/TNM-History-2021.pdf>.
66. OECD. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method2021.
67. Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*. 1990;63(2):144-61.

68. Müller B, Lang S, Dominietto M, Rudin M, Schulz G, Deyhle H, et al. High-resolution tomographic imaging of microvessels. *Proc SPIE*. 2008;7078:70780B.
69. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(10):647-61.
70. King A, Balaji S, Keswani SG, Crombleholme TM. The Role of Stem Cells in Wound Angiogenesis. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(10):614-25.
71. Tuca A-C, Bernardelli de Mattos I, Funk M, Winter R, Palackic A, Groeber-Becker F, et al. Orchestrating the Dermal/Epidermal Tissue Ratio during Wound Healing by Controlling the Moisture Content. *Biomedicines*. 2022;10(6):1286.

Appendix

I. Anleitung und Hintergrundwissen zum BSGC-Score

Anleitung und Hintergrundwissen zum BSGC-Score

Einleitung

Epidermismodelle aus Felderhaut finden im Tissue Engineering als standardisierte In-vitro Testsysteme, aber auch im klinischen Gebrauch als Transplantate ihren Nutzen. Dafür werden aus einer Hautbiopsie die Keratinozyten und Fibroblasten isoliert, in einem Nährmedium kultiviert und an einen Carrier gebunden um anschließend transplantiert zu werden.

Problematisch ist jedoch, dass es bisher kein standardisiertes Tool zur Evaluation der Güte solcher Epidermismodelle im Vergleich zu Echthaut gibt. Dieser Score soll das Problem auf eine möglichst praktische und einfache Art lösen und verschiedene Epidermispräparate untereinander vergleichbar machen. Auch soll dem Nutzer bereits mit einem Blick möglich sein, anhand des vorliegenden Scores eine Bewertung des Gesamtpräparates als auch der einzelnen Strata zu treffen.

Die Bewertung erfolgt dabei anhand typischer histologischer epidermaler Charakteristika. Der Aufbau des Scores orientiert sich an verschiedenen Facettenklassifikationen, die in der Medizin einen großen klinischen Nutzen vorweisen (zum Beispiel das TNM-Staging solider Malignome das bereits seit den 1950er Jahren klinische Verwendung genießt).

Bei der Erstellung des Scores wurden insgesamt 2145 Proben untersucht und 40 Kriterien diskriminiert. Auch findet eine Wichtung der Relevanz der unterschiedlichen Strata statt.

Physiologischer Aufbau einer Epidermis

Um die Güte eines Epidermismodells zu verstehen ist es wichtig, grundlegende histologische Merkmale dieses Gewebes zu kennen. Im Folgenden soll daher kurz auf den Schichtenaufbau einer Felderhaut-Epidermis eingegangen werden:

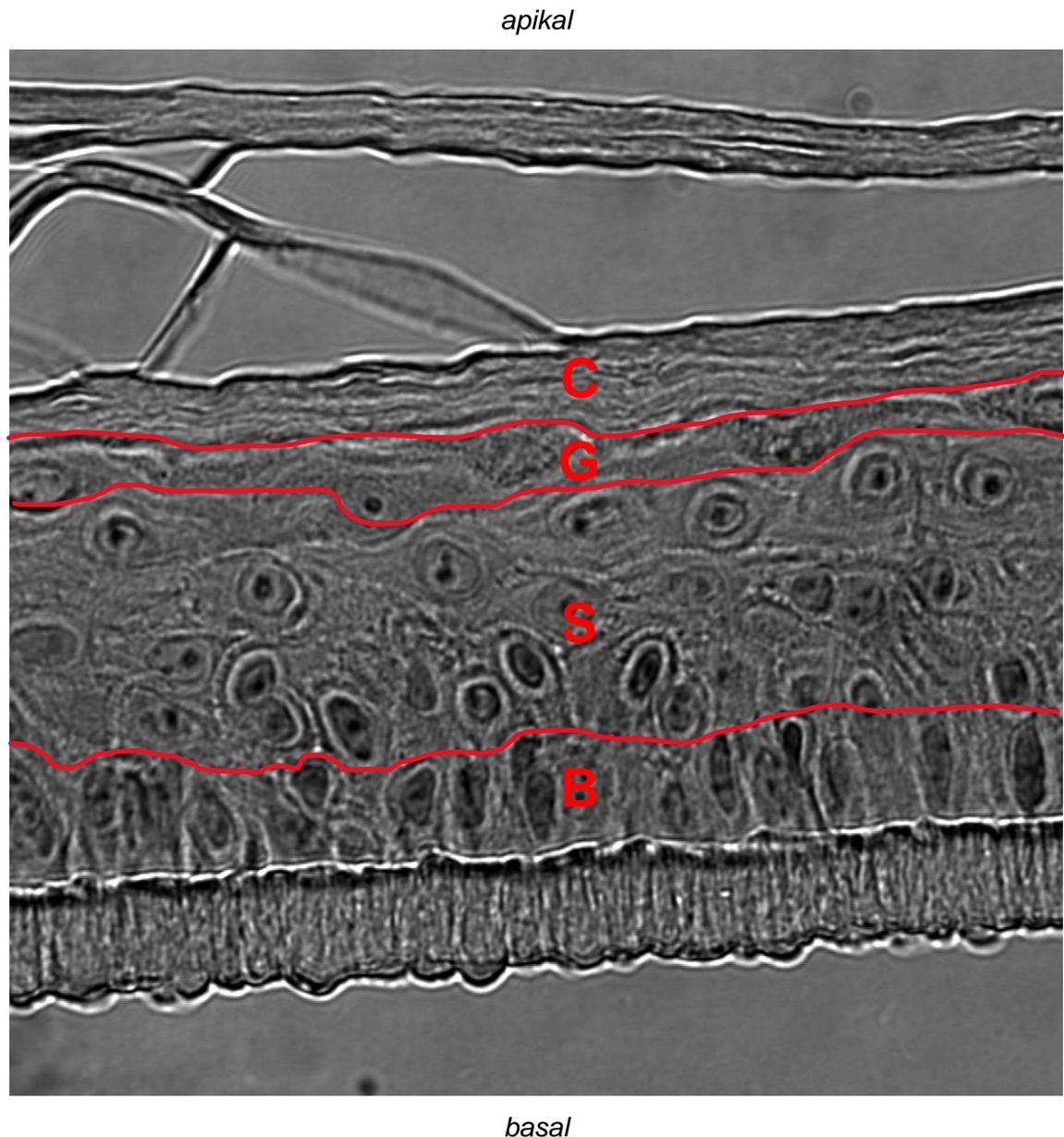


Abbildung 1: Physiologischer Aufbau einer Epidermis

(C: Stratum corneum; G: Stratum granulosum; spin: S spinosum; B: Stratum basale)

Kurz gesagt bedeckt die Epidermis die Außenfläche des Körpers. Man unterscheidet Leisten- von Felderhaut. Leistenhaut befindet sich dabei an den haarlosen Fußsohlen und Handinnenflächen, Felderhaut an den übrigen Bereichen des Körpers. Bei der Epidermis handelt es sich um ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel mit einem charakteristischen Schichtenaufbau. Die Zellen werden hierbei als Keratinozyten bezeichnet.

Von basal nach apikal finden sich in der Felderhaut die Strata basale, spinosum, granulosum und corneum. In der Leistenhaut ist noch zusätzlich zwischen den Strata corneum und granulosum das Stratum lucidum diskriminierbar. Im weiteren soll sich jedoch ausschließlich mit dem Aufbau der Felderhaut beschäftigt werden.

Das Stratum basale liegt der Basalmembran auf, die die Epidermis von der bindegewebigen Dermis trennt. Das kubisch bis hochprismatisch einreihige Epithel dieser Zellschicht ist der Ausgangspunkt der Zellregeneration und -proliferation. Wird sie verletzt, kommt die Zellregeneration zum Erliegen. Gemeinsam mit dem Stratum spinosum (das Zellen unterschiedlicher Morphologie aufweist) wird das Stratum basale als Stratum germinativum bezeichnet.

Das Stratum granulosum imponiert mit Granula aus Loricrin, Profilaggrin und Zytokeratinfilamenten. Alle basal dieser Zellschicht liegenden Strata (inklusive des Stratum granulosum) besitzen vitale Zellorganellen und Zellkerne.

Als superficiale Zellschicht fällt das Stratum corneum auf. Es beherbergt keinerlei vitale Zellorganellen oder Zellkerne und ist durch eine gleichmäßige homogene Färbung gut zu erkennen. Die Zellen dieser Zellschicht werden als Korneozyten bezeichnet. Je nachdem wie groß die mechanische Belastung der Epidermis ist, gestaltet sich die Ausprägung der Dicke dieser Schicht. Sie ist darüber hinaus Endpunkt der epidermalen Zelldifferenzierung und besitzt vor allem eine Schutzaufgabe für das darunterliegende Gewebe.

Artefaktkunde

Bei der Anfertigung histologischer Schnitte können Artefakte entstehen. Diese lassen sich nicht immer vermeiden. Das Erkennen von Artefakten ist jedoch wichtig damit die Gesamtbeurteilung des Präparates nicht verfälscht wird. Um den Einfluss von Artefakten möglichst gering zu halten, werden pro Probe jeweils vier Schnitte begutachtet.

Im Folgenden werden die häufigsten Artefakte vorgestellt:

Färbeartefakte:

Im Färbeprozess kann ein zu intensiv gefärbtes Präparat entstehen. Typisch hierfür sind fleckförmige Verdunkelungen.

Faltenbildung/Überlagerung:

Beim Auftragen des frischen Schnittes auf den Objektträger kann es zur Faltenbildung oder Überlagerung kommen.

Luftblasen im Eindeckmittel:

Durch schlechtes Eindecken im Anschluss an die Färbung verbleiben Luftblasen im Präparat.

Stumpfe Mikrotomklinge:

Auffällig für die Nutzung einer stumpfen Mikrotomklinge ist das Auftreten regelmäßiger wellenförmiger Verletzungen, Eindellungen oder Abschilferungen des Präparates. Vor allem das Stratum corneum ist hiervon betroffen. Mögliches Anzeichen sind ebenfalls artifizielle punktuelle Spalträume vor allem im Stratum spinosum.



Abbildung 2: Mögliche Artefakte 1
Abschilferungen des Stratum corneum (*), Überlagerungen
(Kreis und Rechteck)



Abbildung 3: Mögliche Artefakte 2:
artifizielle Spalträume (*), Eindellungen durch stumpfe Mikrotomklinge
(Pfeile), Färbeartefakt (Kreis)

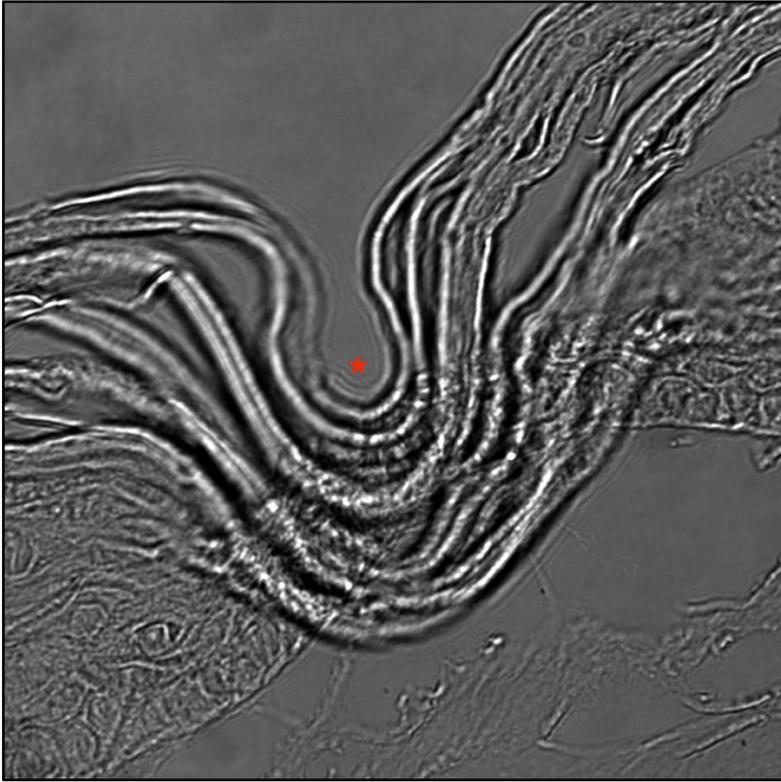


Abbildung 4: Mögliche Artefakte 3

60x-Vergrößerung, Eindellung durch stumpfe Mikrotomklinge (*)

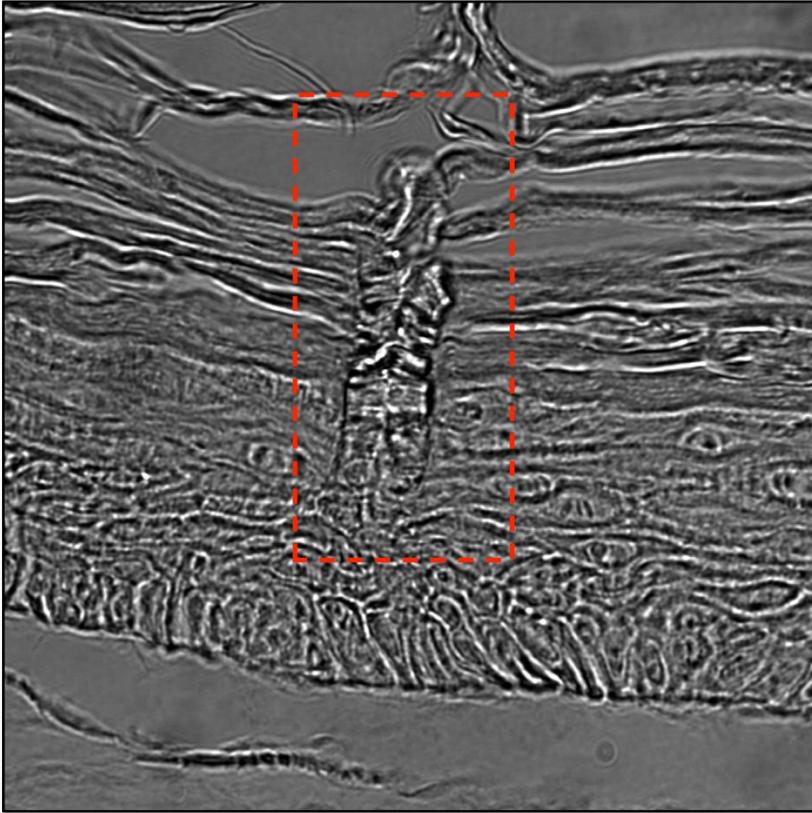


Abbildung 5: Mögliche Artefakte 4
60x-Vergrößerung, Überlagerung (Rechteck)

Bewerten eines Epidermismodells mithilfe des BSGC-Scores

Bevor Sie mit der eigentlichen Bewertung beginnen können, müssen einige Vorbereitungen getroffen werden. Achten Sie darauf, dass Sie von einem Präparat mindestens drei geeignete Schnitte besitzen, die Sie in die Bewertung mit einschließen können. Auch ist es wichtig, dass Sie zuvor den Score mit Datum und den Namen des Präparates und des Bewertenden in das Protokoll eintragen.

Suchen Sie sich nun einen Ausschnitt aus einem Präparat und beurteilen Sie diesen mithilfe der Score-Kriterien für jedes einzelnes Stratum in der 20x- oder 40x-Vergrößerung. Tragen Sie Ihren Score in die Tabelle ein. Verfahren Sie mit zwei weiteren Schnitten genauso, sodass Sie insgesamt drei Ausschnitte bewerten. Es empfiehlt sich Fotografien Ihrer Ausschnitte anzufertigen und mittels geeigneten Dateinamens zu sichern. So können Sie auch bei späteren Fragen Ihre Bewertung nachvollziehen. Die Tabelle berechnet Ihnen Ihren Score, und berücksichtigt dabei auch die Gewichtungsfaktoren, sobald Sie Ihre Bewertungen eingetragen haben.

Sollte es Unklarheiten bei der Zuordnung eines Stratums zu einem bestimmten Kriterium geben, nutzen Sie die Bildbeilage mit den Beispielbildern sowie das Glossar.

Nach fertiger Bewertung können Sie die Tabelle ausdrucken und in Ihr Laborbuch einkleben.

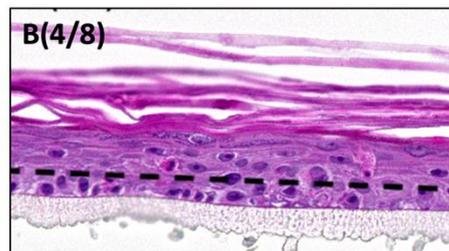
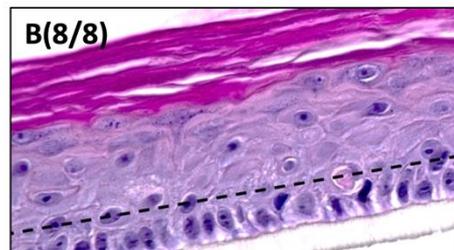
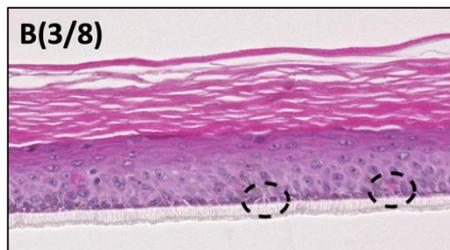
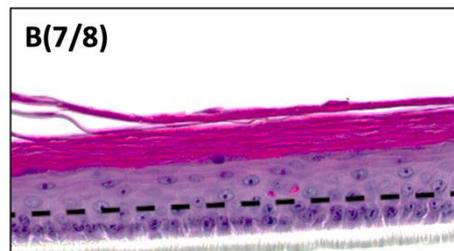
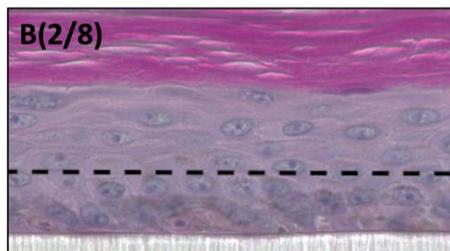
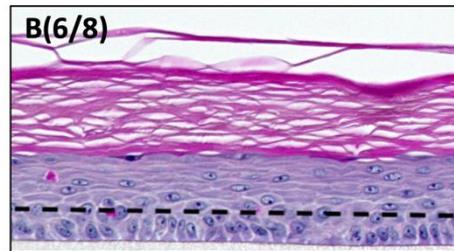
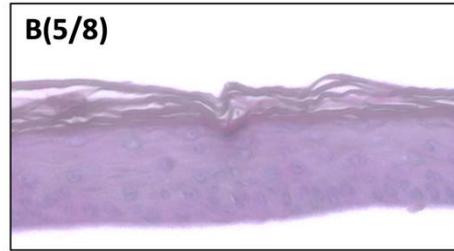
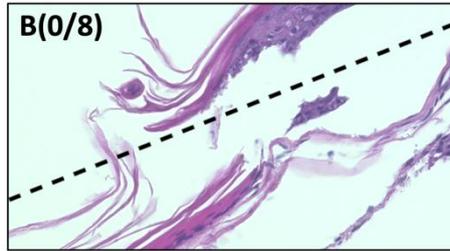
Glossar

apikal	an der Spitze gelegen
basal	an der Basalmembran liegend
Differenzierung	Unterscheidung, Spezifität für eine bestimmte Zellart
diskriminierbar	abgrenzbar
en-bloc	komplett, im Stück
epidermal	zur Epidermis gehörend
hochprismatisch	zylindrisch
hyperchromatisch	stark chromatisch gefärbte Zellkerne
hypochromatisch	blass chromatisch gefärbte Zellkerne
Keratose	atypisches Vorhandensein von Zellkernen und/oder Zellorganellen im Stratum corneum
Konglomerat	Zelleinschluss
kubisch	würfelförmig
Mitosefiguren	Zellkerne zeigen verschiedene erkennbare Mitosestadien
Morphologie	Erscheinungsbild
Stratum/Strata	Stratum/Strata
superficial	oberflächlich

II. Bildbeilage zum BSGC-Score

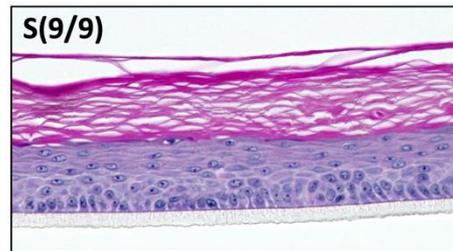
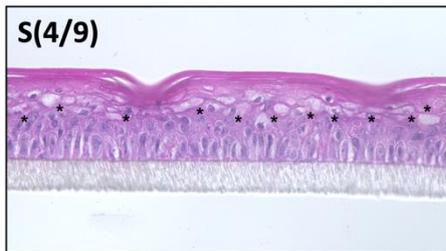
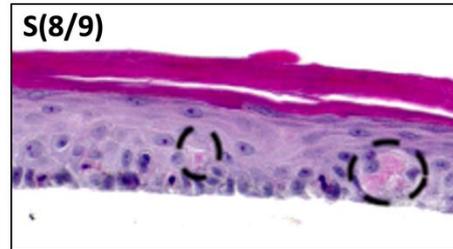
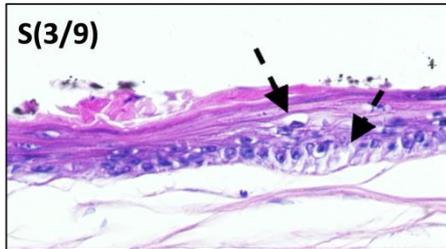
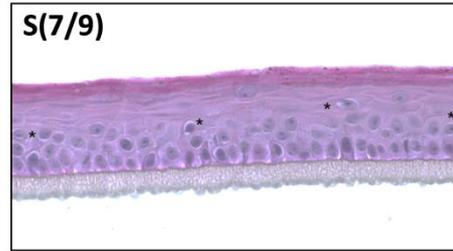
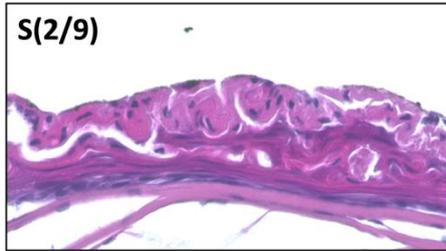
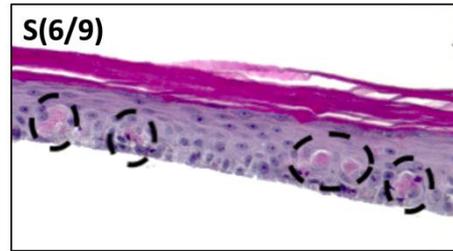
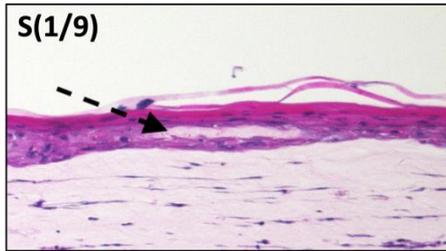
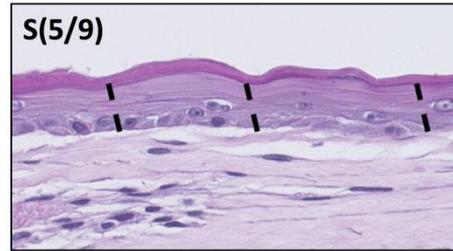
Str. basale

Bildbeilage zum BSGC-Score



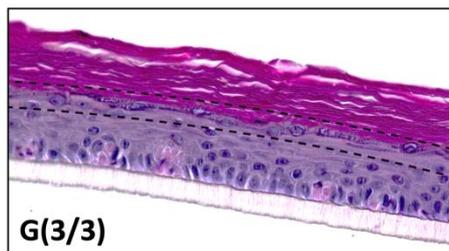
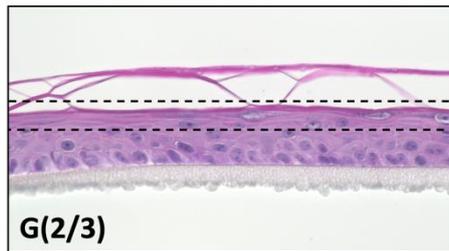
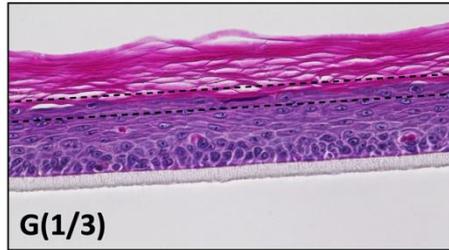
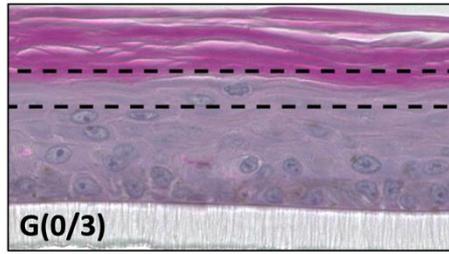
Str. spinosum

Bildbelege zum BSGC-Score



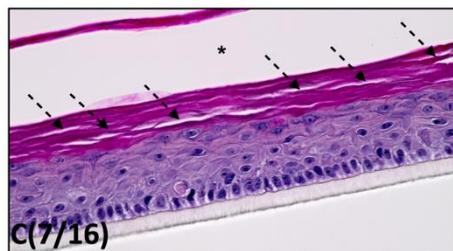
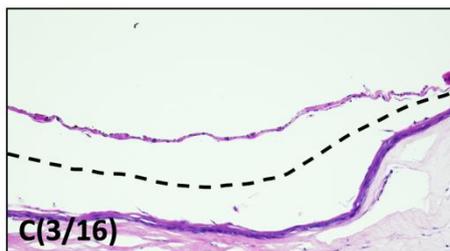
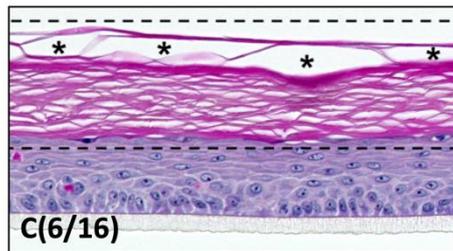
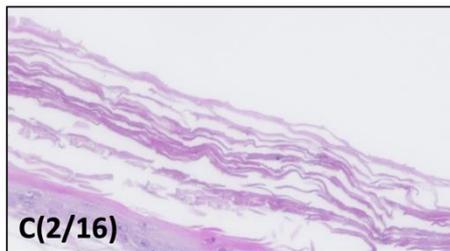
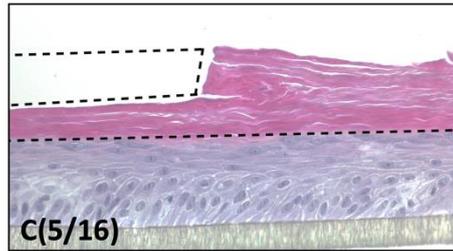
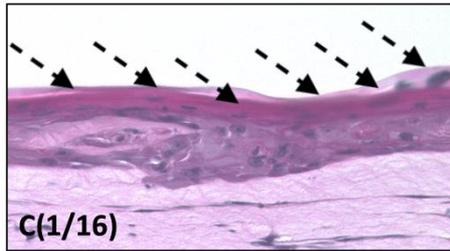
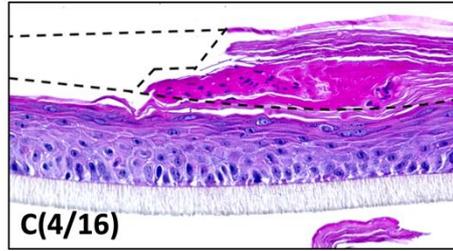
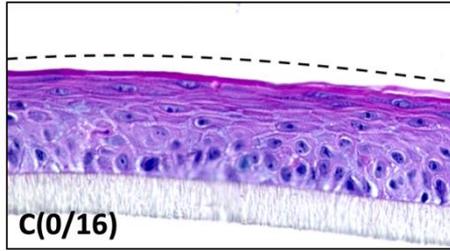
Str. granulosum

Bildbeilage zum BSGC-Score



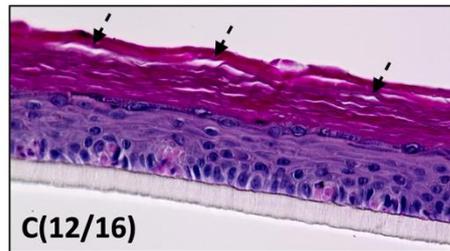
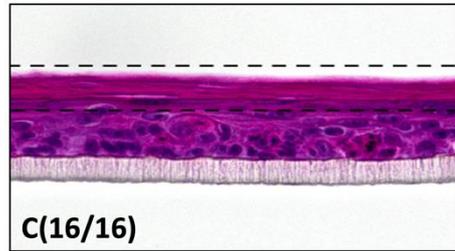
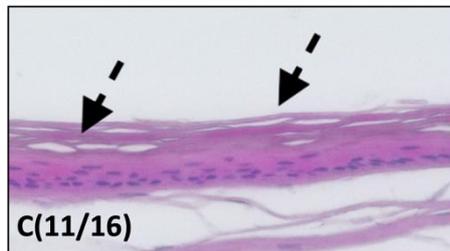
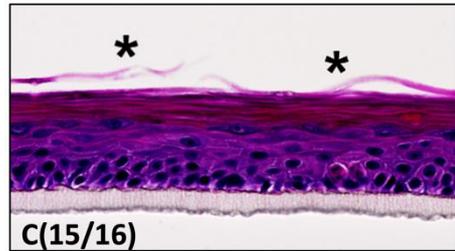
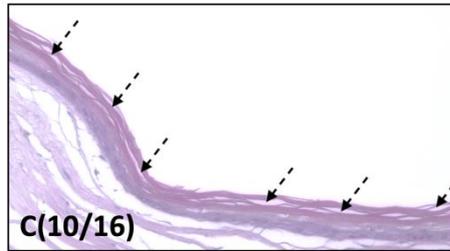
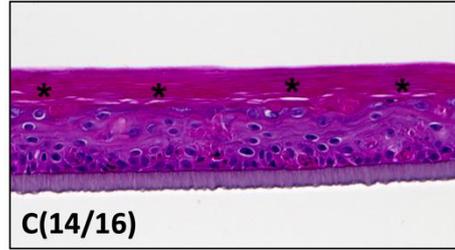
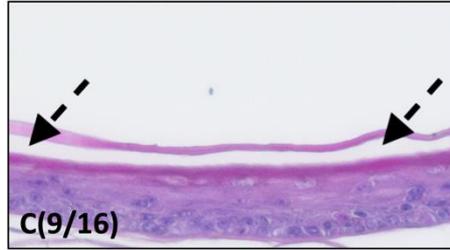
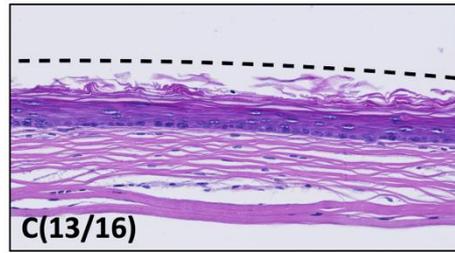
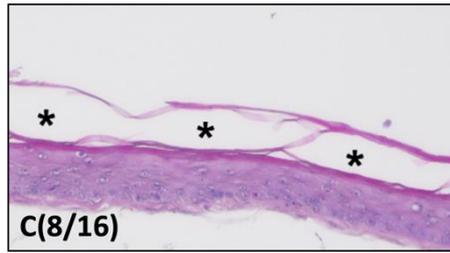
Str. corneum 1/2

Bildbeilage zum BSGC-Score



Str. corneum 2/2

Bildbeilage zum BSGC-Score



III. Formblatt des BSGC-Scores

Score zur überblickenden Beurteilung der Güte von Epidermismodellen im Vergleich zu Echthaut (BSGC-Score)									
Stratum	Beschreibung	zugeordneter Punktwert	erreichter Punktwert Schritt 1	erreichter Punktwert Schritt 2	erreichter Punktwert Schritt 3	erreichter Punktwert Str.	Wichtungsfaktor	Gesamtpunktzahl Str.	
Str. corneum	keinerlei Defekte	16							
	leichte Abschürfungen	15							
	vereinzelt punktuell auftretende Spalt Räume oder Vakuolisierung	14							
	starke oberflächliche Abschürfungen	13							
	multiple punktuell auftretende Spalt Räume oder Vakuolisierung	12							
	multiple nicht-kontinuierliche längsförmige Defekte	11							
	multiple kontinuierliche längsförmige Defekte	10							
	großflächiger oberflächlicher längsförmiger Defekt	9							
	großflächiger oberflächlicher längsförmiger Defekt oder Vakuolisierung	8							
	großflächiger oberflächlicher längsförmiger Defekt mit zusätzlichen Spalt Räumen oder Vakuolisierung	7							
Str. granulosum	kontinuierlich durch oberflächliche Verletzung zerstört	6							
	Kontinuität durch oberflächliche Verletzung zerstört	5							
	komplette en-bis-ablösung vom restlichen Präparat	4							
	komplette längsförmige Aufreißung	3							
	Keratose	2							
	weniger als drei Zelllagen vorhanden oder fehlende Differenzierung	1							
	0	0							
	stark ausgeprägt	3							
	mäßig ausgeprägt	2							
	schwach ausgeprägt	1							
nicht ausgeprägt oder fehlende Differenzierung	0								
Str. spinosum	einzelne Zellen gut diskriminierbar, keinerlei Defekte	9							
	vereinzelt Konglomerate	8							
	vereinzelt geringgradige Spalt Räume oder Vakuolisierung	7							
	multiple Konglomerate	6							
	weniger als drei Zelllagen vorhanden	5							
	multiple Spalt Räume	4							
	vereinzelt großflächige Defekte oder Vakuolisierung	3							
	stark ausgeprägte großflächige Defekte oder Vakuolisierung	2							
	diskontinuierlich	1							
	fehlende Differenzierung	0							
Str. basale	gut diskriminierbares kubisch bis hochprismatisches Epithel mit Mitosefiguren	8							
	gut diskriminierbares kubisch bis hochprismatisches Epithel mit hyperchromatischen Zellkernen	7							
	gut diskriminierbares kubisch bis hochprismatisches Epithel mit hyperchromatischen Zellkernen	6							
	einzelne Zellkernen schlecht diskriminierbar, jedoch keinerlei Defekte	5							
	flaches Epithel	4							
	vereinzelt Konglomerate	3							
	multiple Konglomerate	2							
	schlecht vom Str. spinosum diskriminierbar	1							
	Str. basale nicht vorhanden, diskontinuierlich oder fehlende Differenzierung	0							

Datum:	X
Bezeichnung des Präparates:	X X X X
Name/Kürzel des/der Beurteilenden:	X
Kommentare:	X

Gesamt	100
B	8
S	9
G	3
C	16

B (2/6) S (9/9) G (3/3) C (1/10) → 2/100

Bewertungsschlüssel: Gesamtpunkt	100 - 70 Punkte
sehr gut bis gut	69 - 28 Punkte
befriedigend bis ausreichend	27 - 0 Punkte
mangelhaft bis ungenügend	

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
aSMA	alpha Smooth muscle actin
BSGC-Score	Basale-spinosum-granulosum-corneum-Score
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
HE	Hämatoxylin-Eosin
IF	Immunfluoreszenz
min	Minute/n
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
RhE	reconstructed human epidermis
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VAC-Therapie	Vacuum assisted closure-Therapie
µm	Mikrometer

V. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktionen der Haut	2
Abb. 2: Schichtweiser Aufbau der Felderhaut.....	3
Abb. 3: Aufbau der Epidermis dargestellt anhand einer lichtmikroskopischen Aufnahme eines humanen In-vitro-Epidermismodells.	4
Abb. 4: Phasen der Wundheilung (modifiziert nach Gonzalez et al (2016) und Guo et al (2010) (10, 14)).....	8
Abb. 5: Grafische Zusammenfassung: Bildgestützte Bewertung der epidermalen Histomorphologie.....	13
Abb. 6: Grafische Zusammenfassung: Bildgestützte Quantifizierung der Revaskularisierung als Parameter der kutanen Wundheilung.	14
Abb. 7: Kutis mit durch Immunfluoreszenz-Färbung angefärbtes α SMA.....	19
Abb. 8: Abbildungsausschnitt nach Split channels (green) und händischer Auszählung der Gefäßanschnitte in unterteilten Bildabschnitten	20
Abb. 9: Threshold, Analyze Particles und Area Distribution.....	22
Abb. 10: Einteilung des Verwundungsmodells in verschiedene Wundbereiche	24
Abb. 11: Grundformel des BSGC-Scores	28
Abb. 12: Beispielhafte Auswertung eines Chargentests der Bewertungskategorie sehr gut bis gut, befriedigend bis ausreichend und mangelhaft bis ungenügend.....	31
Abb. 13: Grafische Darstellung des Ergebnisses eines Kruskal-Wallis-Tests mit Dunn's Test für Mehrfachvergleiche verändert aus Schneider et al. (2021) (59) zur Verlaufsbeurteilung eines Verbrennungsmodells	32
Abb. 14: Ergebnis der händischen Auszählung der angeschnittenen Gefäße	33
Abb. 15: Erfassung und Verteilung der automatisch ermittelten Bildpunkte eines Testausschnittes ≥ 30 Pixel	34
Abb. 16: Gefäßanschnitte/Teilfläche in den Bereichen Wundgrund und Wundheilung	36
Abb. 17: Darstellung des Quotienten Gefäßanschnitte/Teilfläche in nicht-okklusiven (in roten Farbtönen unterlegt) sowie okklusiven Wundauflagen (in blauen Farbtönen unterlegt)	37
Abb. 18: Darstellung des Quotienten Gefäßanschnitte/Teilfläche zwischen den Bereichen Wundheilung sowie Wundgrund in nicht-okklusiven (rot unterlegt) und okklusiven Wundauflagen (blau unterlegt)	39

VI. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Protokoll der HE-Färbung.....	17
Tab. 2: Morphologische Kriterien für das Stratum basale	26
Tab. 3: Morphologische Kriterien für das Stratum spinosum.....	26
Tab. 4: Morphologische Kriterien für das Stratum granulosum	27
Tab. 5: Morphologische Kriterien für das Stratum corneum	27
Tab. 6: Bereich zur Dokumentation von Rahmendaten des Präparates.....	28
Tab. 7: Tabellarische Auswertung des BSGC-Scores.....	28
Tab. 8: Bewertungsschlüssel des Gesamtpräparats	29
Tab. 9: Ermittlung der Teilflächen, der Anzahl der Gefäßanschnitte und des Quotienten Gefäßanschnitte/Teilfläche in nicht-okklusiven (rot unterlegt) sowie okklusiven Wundauflagen (blau hinterlegt)	35
Tab. 10: Ermittlung des Quotienten Gefäßanschnitte/Teilfläche zwischen den Bereichen Wundheilung sowie Wundgrund in nicht-okklusiven (rot unterlegt) und okklusiven Wundauflagen (blau unterlegt)	38

VII. Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Heike Walles bedanken, die es mir ermöglichte, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Auch danke ich Frau Prof. Dr. Üçeyler und Herrn Prof. Dr. Schilling für die konstruktiven Gespräche und Anregungen für meine Forschungsarbeit.

Für das allzeit offene Ohr, die ausgezeichnete Unterstützung und vor allem für die große Geduld danke ich Herrn Dr. Florian Groeber-Becker. Lieber Florian, hab herzlichen Dank dafür, dass Du mich fachlich und menschlich von Anfang an auf diesem Weg begleitet, mir das spannende Gebiet des Tissue Engineering näher und mich mit vielen innovativen Ideen vorangebracht hast.

Für die konstruktive und äußerst lehrreiche Zusammenarbeit im Rahmen der beiden Publikationen möchte ich Verena Weigel und Ives Bernardelli de Mattos danken.

Auch möchte ich besonders Sylvia Bartod und allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Danke sagen. Sie haben mich von Anfang an im Labor mit an die Hand genommen und in all die für mich neuen praktischen Tätigkeiten eingearbeitet.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meiner Partnerin Désirée. Danke dafür, dass Ihr mich während des Studiums, während der seelisch aufreibenden Staatsexamina und den ersten unsicheren Schritten als Arzt allzeit aufgefangen habt. Ohne Euch wäre ich sicherlich nicht so unbeschadet durch die permanenten Aufs und Abs der letzten Jahre gekommen.

IX. Eigene Veröffentlichungen

Schneider, V.; **Kruse, D.**; de Mattos, I.B.; Zöphel, S.; Tiltmann, K.-K.; Reigl, A.; Khan, S.; Funk, M.; Bodenschatz, K.; Groeber-Becker, F. A 3D In Vitro Model for Burn Wounds: Monitoring of Regeneration on the Epidermal Level. *Biomedicines* 2021, 9, 1153. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091153>

Tuca, A.-C.; Bernardelli de Mattos, I.; Funk, M.; Winter, R.; Palackic, A.; Groeber-Becker, F.; **Kruse, D.**; Kukla, F.; Lemarchand, T.; Kamolz, L.-P. Orchestrating the Dermal/Epidermal Tissue Ratio during Wound Healing by Controlling the Moisture Content. *Biomedicines* 2022, 10, 1286. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061286>

X. Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt.

Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademische Grade erworben, noch versucht solche zu erwerben.

Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen mich diesbezüglich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.