

Wissenschaftliches Hauptprogramm, Teil 2:
Vortragsreihe „Dermatotherapie“

Methoden zur Lumineszenzbildgebung des pH-Wertes - Anwendung im Rahmen der Wundheilung

*Dr. med. Stephan Schreml,
Klinik und Poliklinik für Dermatologie,
Universität Regensburg, Regensburg*

Die Wundheilung ist ein zentrales Thema in der Dermatologie und verläuft physiologischerweise in drei zeitlich und räumlich überlappenden Phasen: Inflammation, Proliferation und Tissue Remodeling (Geweberestrukturierung) (1, 2). Etwa 30 % der Kosten in der Dermatologie werden durch chronische Wunden verursacht (3). Die Kenntnis biologischer Basisparameter wie pO₂ und pH ist entscheidend zum Verständnis der dabei ablaufenden komplexen Prozesse (4, 5). Insbesondere der pH-Wert im Wundexsudat nimmt entscheidenden Einfluss auf viele Heilungsprozesse. Zu nennen sind hier zum Beispiel der Einfluss von pH auf die Enzymaktivität (zum Beispiel MMPs) sowie auf die Proliferation und Migration von Zellen (zum Beispiel Fibroblasten und Keratinozyten). Auch therapeutisch eingesetzte Wundheilungsenzyme (zum Beispiel Streptokinase) zeigen eine pH-Abhängigkeit, die eine Kenntnis dieses Parameters in vivo am Menschen nötig macht. Insbesondere die Messung von pH im Wundexsudat ist entscheidend, da dieses in besonderer Weise die Heilung beeinflusst (6-8).

Bislang stand als Methode vor allem die pH-Glaselektrode zur Verfügung, die jedoch nur punktuelle Einzelwerte liefern kann und damit der Heterogenität zweidimensionaler Wundstrukturen keine Rechnung tragen kann. Wir haben nun zwei Verfahren entwickelt, die sich der Lumineszenz bestimmter Indikatorfarbstoffe in Abhängigkeit vom vorliegenden pH bedienen (9, 10). Die erste Methode nutzt das so genannte time-domain dual lifetime referencing (tdDLR) von einem pH-abhängigen Farbstoff (Fluoresceinisothiocyanat) und einem pH-unabhängigen Referenzfarbstoff (Ruthenium(II)tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)) (10). Die Farbstoffe sind dabei an und in inerten Mikropartikeln gebunden und dann innerhalb einer Polyurethan-Hydrogelmatrix auf transparenten Folien immobilisiert. Nach Anregung mittels LED emittieren die Farbstoffe Licht, das wiederum in Exzitations- und Emissionsphase mittels einer CCD-Kamera aufgenommen und dann ein Verhältnis der gewonnenen Lumineszenzintensitäten gebildet wird. Anhand von sigmoidalen Kalibrationskurven kann dann mittels eines fünf-parametrischen sigmoidalen Fits durch das Verhältnis der Lumineszenzintensitäten der pH für jeden einzelnen Pixel berechnet werden. Dabei entstehen pro Messung über 300.000 pH-Werte und der pH-Wert wird erstmals am Menschen sichtbar. Damit steht ein biokompatibler zweidimensionaler Sensor zur pH-Visualisierung am Menschen, aber auch im Labor zur Verfügung. Die zweite Methode nutzt die Emission von zwei Farbstoffen innerhalb der RGB-Kanäle einer handelsüblichen Kamera (grüner Kanal: pH-Indikator Fluoresceinisothiocyanat, blauer Kanal: Referenzfarbstoff Diphenylantracen), um ein 2D-pH-Abbild zu generieren (9). Das Signal im blauen Kanal bleibt dabei vom pH unbeeinflusst und dient für jeden Pixel als Referenz zum pH-abhängigen Signal



im grünen Kanal. Eine Auftrennung des RGB-Bildes eines Sensors auf Gewebe in die drei Kanäle ermöglicht es, für jeden Punkt der Wunde den exakten pH aus einer Kalibrationskurve zu generieren. Zudem kann im roten Kanal gleichzeitig mittels eines Sauerstoff-abhängigen Indikators ein 2D-pO₂-Abbild innerhalb von Wunden gewonnen und mit den pH-Werten korreliert werden. Auch hier konnte also ein biokompatibler 2D-Sensor für die Anwendung am Menschen etabliert werden. Entscheidend ist, dass bei beiden Methoden das pH-Signal nicht von pO₂, Temperatur und Beleuchtungsunterschieden beeinflusst wird, wodurch erstmals auch Methoden für den klinischen Einsatz zur Verfügung stehen.

Mit beiden Methoden sind auch Reihenmessungen im Zeitverlauf möglich. Wir konnten am Modell der Spalthautentnahmestellen am Menschen zeigen, dass der pH als Surrogatparameter der akuten (physiologischen) Wundheilung fungiert und von Werten über 8 am ersten postoperativen Tag auf Werte um 6,5 am 14. postoperativen Tag abfällt. Auch ist es uns erstmals gelungen, die 2D-Verteilung von pH in chronischen Wunden am Menschen zu visualisieren. Aktuell werden die dabei gewonnenen einzigartigen Daten mittels komplexer IT-gestützter Makros ausgewertet.

Literatur

1. Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, Longaker M T. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314-321.
2. Singer A J, Clark R A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.
3. Bickers D R, Lim H W, Margolis D, et al. The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 490-500.
4. Schreml S, Szeimies R M, Karrer S, Heinlin J, Landthaler M, Babilas P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24: 373-378.
5. Schreml S, Szeimies R M, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2010; 163: 257-268.
6. Winter G D, Scales J T. Effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature* 1963; 197: 91-92.
7. Winter G D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* 1962; 193: 293-294.
8. Hinman C D, Maibach H. Effect of Air Exposure and Occlusion on Experimental Human Skin Wounds. *Nature* 1963; 200: 377-378.
9. Meier R J*, Schreml S*, Wang X D, Landthaler M, Babilas P, Wolfbeis O S. Simultaneous photographing of oxygen and pH in vivo using sensor films. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 50: 10893-10896. *gleichberechtigte Erstautoren
10. Schreml S*, Meier R J*, Wolfbeis O S, Landthaler M, Szeimies R M, Babilas P. 2D luminescence imaging of pH in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 2432-2437. *gleichberechtigte Erstautoren

