

**Weiterentwicklung und Evaluation eines
drei-dimensionalen Hautmodelles
zur pharmakologischen Testung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Nadja Nicole Zöller
aus Frankfurt

Frankfurt 2008
(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. V. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn,

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Bernd

Datum der Disputation:

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Betreuung von
Herrn Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn, AK Kinematische Zellforschung

extern im Biochemischen Labor des Zentrums

der Dermatologie und Venerologie

am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität

unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Bernd,

in Kooperation mit der Firma Phenion GmbH & Co. KG, Düsseldorf,

3 D Skin models, unter der Leitung von Frau Dr. A. Sättler

und im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit Herrn Prof. Dr. H. Menke,

Klinikum Offenbach, Chirurgische Klinik III, durchgeführt.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
<u>Inhaltsverzeichnis</u>	I
<u>Abbildungsverzeichnis</u>	VII
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	X
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1 Der Aufbau der Haut	1
1.2 Ultraviolette Strahlung (UV)	9
1.3 Cytokine	11
1.3.1 Interleukin 6	13
1.3.2 Interleukin 8	15
1.4 Hautmodelle - Alternativmethoden zu Tierversuchen	15
1.5 Der Einsatz von Hautäquivalenten	20
1.5.1 Verbrennungen	20
1.6 Glukocorticoide	26
1.6.1 Anti-inflammatorische Wirkung	26
1.6.2 Atrophie	28
1.7 Arbeitshypothese	29
<u>2. Material und Methoden</u>	32
2.1 Entwicklung eines drei-dimensionalen Vollhautmodells	
(full thickness skin models, FTSMs)	32
2.1.1 Herstellung der Matrix	32
2.1.2 Isolation von primären Zellen zur Vollhautmodell Herstellung	32
2.1.3 Kultivierung der primären Zellen	34

2.2 Hautäquivalent Herstellung	35
2.2.1 Kultivierungsprotokoll des FTSMs	35
2.2.2 Melanozyten Hautmodell	35
2.3 Einsatz des drei-dimensionalen FTSMs zur Analyse inflammatorischer und anti-inflammatorischer Reaktionen	36
2.3.1 Induktion inflammatorischer Cytokine	36
2.3.2 Systemische Glukocorticoidzugabe	37
2.3.3 Topische Steroidbehandlung	37
2.3.4 Bestimmung der Interleukin (IL) Konzentration	38
2.4 Einsatz drei-dimensionaler Hautmodelle zur Evaluation atrophischer Veränderungen der Haut infolge langfristiger GC-Behandlung	39
2.4.1 Systemische Langzeitbehandlung mit GC	39
2.4.2 Topische Langzeitbehandlung mit GC	40
2.4.3 Kollagensynthese	40
2.4.3.1 Stimulation der Kollagensynthese	40
2.4.3.2 P1NP Bestimmung	41
2.5 Die Einflussnahme von UVB und α-MSH auf die Induktion von Zellschäden	43
2.5.1 Screening von Zellschäden bei Melanozytenmodellen nach UVB Stimulation	43
2.5.2 Cytotoxizitätstest	43
2.6 Histologische Beurteilung	44
2.6.1 Fixierung der Hautmodelle	44
2.6.2 Schneiden der Hautmodelle	44
2.6.2.1 Paraffinschnitte	44
2.6.2.2 Kryoschnitte	45

2.7 Einsatz eines autologen drei-dimensionalen Hautäquivalentes zur	
Behandlung schwerer Verbrennungen	45
2.7.1 Isolation von primären Zellen zur Herstellung eines autologen Hautäquivalentes	45
2.7.2 Matrixbeschreibung	46
2.7.3 Kultivierungsprotokoll	46
2.7.4 Aufbereitung der Proben für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	47
2.7.5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	47
2.8 Morphologische Beurteilung der Hautmodelle	49
2.8.1 Aufarbeitung der in Paraffin eingebetteten Schnitte zur immunhistochemischen Analyse	49
2.8.2 Aufarbeitung der Gefrierschnitte zur immunhistochemischen Analyse	49
2.8.3 Hämatoxilin/Eosinfärbung	49
2.9 Immunhistochemie	50
2.9.1 Lokalisation von Interleukin-6 am FTSM	50
2.9.2 Immunhistochemischer Nachweis proliferierender Zellen	50
2.9.3 Immunhistochemischer Nachweis von Melanozyten (S100)	51
2.9.4 Immunhistochemischer Nachweis apoptotischer Zellen (Tunnelassay)	52
2.9.5 Aufnahmen der histologischen Befunde	53
2.9.6 Epidermale Differenzierungsmarker	53
2.9.6.1 Keratin	53
2.9.6.2 Laminin	53
2.9.7 Dermale Differenzierungsmarker	54

2.9.7.1 Elastin	54
2.9.7.2 Fibronectin	55
2.9.7.3 Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)	55
<u>3. Ergebnisse</u>	57
3.1 Aufbau des drei-dimensionalen Vollhautmodells	57
3.2 Morphologische Charakterisierung des FTSMs	58
3.2.1 Histologische Untersuchungen der FTSMs	58
3.2.2 Differenzierungsmarker	60
3.3 UV-Bestrahlung steigert die Cytokinsekretion des FTSMs	63
3.4 Glukocorticoide (GC) reduzierten die UV-induzierte Sekretion pro-inflammtorischer Cytokine	66
3.4.1 Systemische Zugabe von Betamethason-17-valerat (BMV) reduzierte die UVB vermittelte Cytokinsekretion	66
3.4.2 Topisch appliziertes Betnesol [®] reduzierte die Cytokinsekretion nach Stimulation mit UVB	69
3.4.3 Anti-inflammatorisches Potential dermatologisch relevanter Cremes	74
3.5 Analysen des atrophischen Potentials unterschiedlicher GC am FTSM und Kollagensynthese	78
3.5.1 Langzeitbehandlung mit systemisch zugegebenen GC reduzierte die Anzahl der epidermalen Zellschichten	78
3.5.2 Wiederholte topische Behandlung mit Betnesol [®] über einen Zeitraum von 14 Tagen reduzierte die epidermalen Zellschichten signifikant	81

3.5.3 Topische Behandlung mit handelsüblichen GC Salben und Calcipotriol enthaltenden Salben reduzierte die Anzahl der epidermalen Zellschichten	83
3.5.4 Topische Applikation von GC Salben induzierte keine Apoptose, jedoch wurde die Proliferation der epidermalen Keratinozyten gehemmt	87
3.5.5 Kollagensynthese	90
3.5.5.1 Ascorbinsäure stimulierte die Kollagensynthese	90
3.5.5.2 Während der submersen Fibroblastenphase der FTSMs nahm die Kollagensynthese stetig zu	91
3.5.6 Topische Applikation GC-haltiger Salben reduzierte die Kollagensynthese	92
3.6 Melanozytenmodelle	95
3.6.1 Integration von Melanozyten in das FTSM	95
3.6.2 Einfluß der Pigmentzellen auf die UVB induzierte Cytokinsekretion	97
3.6.3 UVB vermittelte Stimulation von Melanozyten-FTSMs erhöhte die LDH-Freisetzung	99
3.7 Herstellung eines autologen Hautäquivalentes auf der Grundlage der Wundauflage Matriderm®	102
3.7.1 Entwicklung der Hautäquivalente	103
3.7.2 Differenzierungsmarker	108
<u>4. Diskussion</u>	111
4.1 Morphologische Kriterien des FTSMs	111
4.2 Anti-inflammatorisches Potential der GC	115
4.3 Atrophisches Potential der GC	119
4.4 Einsatzmöglichkeiten und Eigenschaften eines Vollhautäquivalentes	121

4.5 Ausblick	124
<u>5. Zusammenfassung</u>	126
<u>6. Literatur</u>	128
<u>7. Danksagung</u>	139
<u>8. Ehrenwörtliche Erklärung</u>	142

Abbildungsverzeichnis		Seite
Abb. 1.1	Schematischer Aufbau der Haut	1
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Epidermis. 13	5
Abb. 1.3	Der Diskurs von Keratinozyten und anderen Zellarten mittels Cytokinen und Wachstumsfaktoren	13
Abb. 1.4	Klassifizierung der Verbrennungstiefe	21
Abb. 1.5	Aufnahme einer 17 jährigen Patientin nach Verbrühung des Fußes	22
Abb. 1.6	Aufnahmen von durch feuchte Hitze verursachten Verbrennungen	24
Abb. 1.7	Keloide Narbenbildung eines 12 jährigen Jungen	25
Abb. 1.8	Glukocorticoid Interaktion mit dem Glukocorticoidrezeptor und dem Glukocorticoidrezeptor response element	27
Abb. 1.9	Striae Bildung nach topischer GC Behandlung	29
Abb. 2.1	Bestimmungsprinzip der P1NP-Analyse	42
Abb. 3.1	Aufsicht auf die zur Kultivierung verwendete Matrix in 24-well Platten	57
Abb. 3.2	Aufsicht auf die während der ALI auf Filterpapier überführten FTSMs	58
Abb. 3.3	Vergleich des FTSMs mit nativer Haut	59
Abb. 3.4	Zwei Differenzierungsstadien des FTSMs	60
Abb. 3.5	Dermale Differenzierungsmarker des FTSMs	61
Abb. 3.6	Epidermale Differenzierungsmarker des FTSMs	63
Abb. 3.7	UVB induzierte dosisabhängige (A) IL-6 und (B) IL-8 Sekretion	64
Abb. 3.8	UVB induzierte IL-6 im epidermalen und dermalen Bereich	65

Abb. 3.9	UVB reduzierte die epidermalen Zellschichten	66
Abb. 3.10	Betamethason-17-valerat inhibierte die UVB induzierte Cytokinsekretion	68
Abb. 3.11	Betamethason-17-valerat minderte die UVB induzierten morphologischen Veränderungen der Epidermis	69
Abb. 3.12	Betnesol [®] reduzierte die UVB induzierte IL-6 und IL-8 Sekretion	72
Abb. 3.13	Betnesol [®] reduzierte die UVB induzierte IL-6 und IL-8 Sekretion	73
Abb. 3.14	Topische Applikation dermatologisch relevanter Cremes reduzierte die UVB vermittelte IL-6 und IL-8 Sekretion	75
Abb. 3.15	Topische Applikation dermatologisch relevanter Cremes reduzierte die UVB vermittelte IL-6 und IL-8 Sekretion	77
Abb. 3.16	GC abhängige Reduktion der epidermalen Zellschichten	80
Abb. 3.17	Betnesol [®] reduzierte die Anzahl der epidermalen Zellschichten	82
Abb. 3.18	Topische Applikation von Betnesol [®] über 14 Tage reduzierte die Schichtdicke und die Anzahl der epidermalen Zellschichten	83
Abb. 3.19	GC und Calcipotriol haltige Salben reduzierten die epidermale Dicke	85
Abb. 3.20	Eine topische Applikation handelsüblicher GC und Calcipotriol enthaltender Salben induzierte eine epidermale Atrophie	87
Abb. 3.21	GC hemmten die Proliferation der epidermalen Keratinozyten	89
Abb. 3.22	Einfluss von Ascorbinsäure auf die Kollagensynthese	91
Abb. 3.23	Zunahme der Kollagensynthese in der submersen Fibroblastenphase	92

Abb. 3.24	Einfluss topischer Applikation GC haltiger Salben auf die Kollagensynthese	94
Abb. 3.25	Vergleich des „klassischen“ FTSMs mit dem Melanozytenmodell	95
Abb. 3.26	Morphologischer Vergleich des FTSMs mit dem Melanozytenmodell	96
Abb. 3.27	Immunhistochemischer Nachweis der Melanozyten im FTSM	97
Abb. 3.28	Melanozyten-FTSM eines kaukasischen Spenders: UVB abhängige IL-6 und IL-8 Sekretion	98
Abb. 3.29	Melanozyten-FTSM eines dunkelhäutigen Spenders: UVB abhängige IL-6 und IL-8 Sekretion	99
Abb. 3.30	UVB abhängige LDH Sekretion bei kaukasischen Melanozyten-FTSMs	101
Abb. 3.31	Histologische Dokumentation der Spalthaut-Aufarbeitung	103
Abb. 3.32	REM Aufnahmen der Biomatrix Matriderm [®]	104
Abb. 3.33	Besiedelung der Biomatrix Matriderm [®] mit Fibroblasten	105
Abb. 3.34	REM Aufnahmen des Hautäquivalentes	106
Abb. 3.35	Entwicklung einer mehrschichtigen Epidermis nach Überführung des Hautäquivalentes an die ALI	107
Abb. 3.36	HaCaT bildeten Reteleiste ähnliche Strukturen	107
Abb. 3.37	Primäre Keratinozyten bildeten Reteleiste ähnliche Strukturen	108
Abb. 3.38	Nachweis proliferativer Zellen im Hautäquivalent	109
Abb. 3.39	Expression von Laminin und Elastin im Hautäquivalent	110

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	Activating protein-1
ALI	Air Liquid Interface
AEC	3-amino-9-ethyl-carbazole
BMV	Betamethason-17-valerat
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer
DEJ	Dermale Epidermale Junktionszone
DM	Desoximethason
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FTSM	Full thickness skin model
GC	Glukocorticoid
GR	Glukocorticoidrezeptor
H/E	Hämatoxilin/Eosin
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
IL	Interleukin
I κ B	NF- κ B Inhibitor
MMP	Matrix Metalloproteinase
NF- κ B	nuclear factor- κ B
P1NP	Pro-collagen type 1 N-terminal pro-peptide
PC	Prednicarbat
P/S	Penicillin/Streptomycin
st. b.	Stratum basale
st. cor.	Stratum corneum
st. gr.	Stratum granulosum

st. sp.	Stratum spinosum
T/E	Trypsin/EDTA
TMB	Tetra-Methyl-Blau
TNF- α	tumor necrosis factor- α
UV	Ultraviolette Strahlung

1. Einleitung

1.1 Der Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers mit einer durchschnittlichen Fläche von 2 m² bei einem Erwachsenen. Zu ihren Aufgaben zählen neben dem Schutz vor exogenen mechanischen, physikalischen und mikrobiellen Einflüssen immunologische und kommunikative Aufgaben. Histologisch wird die Haut von distal nach proximal in Epidermis, Dermis und Subcutis untergliedert (Abb. 1.1).

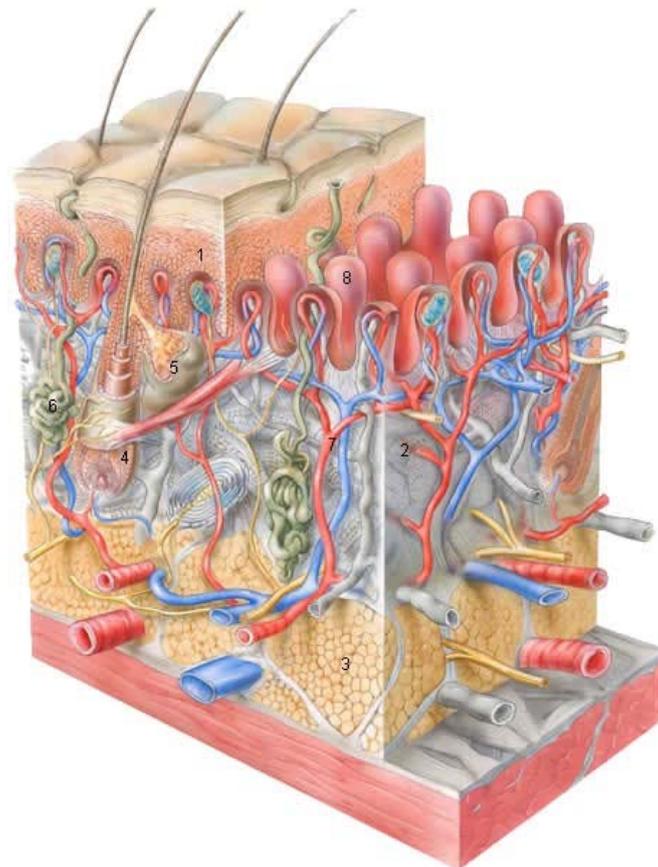


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der Haut.

1 Epidermis, 2 Dermis, 3 Subcutis, 4 Haarfollikel, 5 Talgdrüse, 6 Schweißdrüse, 7 Blutgefäß, 8 Papille

von: www.scf-online.com/english/27_e/frontpage27_e.htm

Als Energiespeicher und Kälteschutz dient die, aus einem lockeren Bindegewebe mit eingelagerten Fettzellen bestehende, Subcutis. Mechanische Stabilität und Reißfestigkeit erhält die Haut durch die als bindegewebiges Gerüst dienende Dermis (Corium), die sich in zwei Schichten gliedert; das Stratum papillare und das Stratum reticulare. Namensgebend für das Stratum papillare sind die Papillen, welche die Dermis fest mit der Epidermis verzahnen. Durch das diese durchziehende Kapillarnetz wird die Epidermis mit Nährstoffen versorgt. Ferner sind in diesem Bereich Rezeptoren angesiedelt, welche die Umweltbedingungen detektieren. So werden Temperaturveränderungen durch Wärme- und Kälterezeptoren wahrgenommen. Mechanische Reize werden über die ebenfalls im Stratum papillare angesiedelten Tastkörperchen erfasst und über freie Nervenendigungen weitergeleitet. Das Stratum reticulare zeichnet sich durch das scherengitterartig angeordnete fibrilläre Proteingerüst, welches u.a. aus Kollagen- und Elastinfasern besteht, aus. Die extrazelluläre Matrix (ECM) verleiht der Haut u.a. Dehnbarkeit und ist für ihre mechanische Stabilität verantwortlich. Zu den Komponenten der ECM gehören u.a. die von dermalen Fibroblasten in den extrazellulären Raum sekretierten Proteine Fibronectin, Kollagen, Elastin und Proteoglycane.

Kollagene stellen 25% der Proteinmasse des gesamten Körpers, sie sind somit die am häufigsten vorkommende Proteinfamilie. Die unterschiedlichen Kollagentypen sind spezifisch für die entsprechenden Körperregionen. Kollagenmonomere bestehen aus drei Polypeptidketten (α -Ketten), welche eine triple helikale Struktur aufbauen. Zu den fibrillären Kollagenen zählen Kollagen Typ I, Typ II und Typ III, sie bilden dickere Fasern durch Zusammenlagerung der beschriebenen Kollagenmonomere zu Bündeln. Kollagen IV ist ein nicht fibrilläres Kollagen, welches eine Komponente der Basallamina ist. Es dient einerseits der mechanischen Stabilisierung und andererseits als Matrix der Anlagerung anderer Proteine. Kollagen IV enthält nicht helikale Bereiche, welche dem Molekül Flexibilität verleihen. Im Gegensatz zu Kollagen IV bildet das fast ausschließlich in der Basalmembran zu findende

Kollagen VII Fibrillen aus, welche von carboxy- und aminoterminalen nichtkollagenen Domänen flankiert werden. Kollagen VII ist entscheidend, um die Integrität der Basalmembran zu gewährleisten. Ist diese z.B. durch Autoimmunantikörper gegen Kollagen VII gestört, so löst sich die Epidermis im Bereich der Basalmembran ab, wie z.B. bei Epidermolysis bullosa (Chen et al., 2007). Während Kollagenfasern der Haut Widerstandsfähigkeit gegenüber Dehnungsreizen vermitteln, sind die Elastinfasern hauptsächlich für die Elastizität und Dehnungsfähigkeit der Haut verantwortlich.

Elastin assoziiert mit Fibrillin und bildet somit die verschiedenen elastischen Fasern. In den bereits erwähnten dermalen Schichten unterscheiden sich die elastischen Fasern u.a. aufgrund ihrer Orientierung zur dermalen-epidermalen Junctionszone (DEJ). Im Bereich des Stratum papillare findet man dünne senkrecht zur DEJ angeordnete Elastinfasern (Kielty et al., 2002), wohingegen die elastischen Fasern im Bereich des Stratum reticulare parallel zur DEJ orientiert sind. Die Stabilisierung der elastischen Fasern erfolgt u.a. durch Protein-Proteininteraktionen. Zu diesen Proteinen zählt auch **Elafin**. UVA Bestrahlung stimuliert in Fibroblasten sowohl die Expression als auch die Synthese von Elafin. Dieses besteht aus der N-terminalen Transglutaminase-Domäne und der C-terminalen Proteaseinhibitor-Domäne. Indem Elafin an Elastin assoziiert, verhindert es die elastolytische Degradation der elastischen Fasern (Muto et al., 2007).

Aufgrund der Interaktion von **Fibronectin** mit anderen Makromolekülen wie z. B. Kollagen, Glucosaminoglycanen, Proteoglycanen etc. bildet sich ein Netzwerk, an welchem Zellen adhären und an ihm entlang migrieren können. Durch alternatives RNA-Splicing des primären Transkriptes des Fibronektins entsteht eine große Variation an verschiedenen Fibronektinketten. Die Bildung der Fibronektinfasern erfolgt über Homodimerisierung der 250kDa großen subunits, welche über Disulfidbrücken verbunden sind. Zellinteraktion mit den Fibronektinfasern erfolgt über die RGD (Arg-Gly-Asp) Sequenz des Fibronektins.

Die Dynamik der Dermis wird durch möglichen und permanent stattfindenden Ab- und Wiederaufbau der ECM vermittelt. Hierbei erfolgt der enzymatische Abbau der ECM Bestandteile u.a. durch die Proteinfamilie der **Matrix Metalloproteinasen** (MMP). MMPs werden im dermalen Bereich durch Fibroblasten entweder in den extrazellulären Raum sekretiert oder sind an die basale Oberfläche der Basalmembran gebunden.

Die **Basallamina**, welche basal zum epithelialen Gewebe liegt, vermittelt die Verankerung des Epithelialengewebes (Epidermis) mit dem angrenzenden Bindegewebe (Dermis). Man unterscheidet vier Schichten der Basallamina, die **Lamina lucida**, **Lamina densa**, **Lamina rara interna** und die **Lamina fibroreticularis**. Die Lamina lucida stellt die Verbindung vom Epithel zur Lamina densa her. Namensgebend für die Lamina densa sind die geflechtartigen Strukturen des Kollagen IV. Dieses verleiht das namensgebende elektronendichte Erscheinungsbild. Die Lamina rara interna ist die Verbindungsschicht zur Lamina fibroreticularis, welche das Bindegewebe mit der Basallamina verbindet. Den der Basallamina adhären Zellen dient diese extrazelluläre Matrix einerseits als Substrat der Zellmigration und andererseits wird die für Zelladhäsion nötige mechanische Stabilität vermittelt. Hauptbestandteile der Basallamina sind Kollagen Typ IV, Laminin, Proteoglycane und Glycoproteine.

Laminin gehört zu der Proteinfamilie der extrazellulären Glycoproteine die aus drei über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten bestehen. Aufgrund der Anordnung der Polypeptidketten zu drei kurzen Armen und einem langen ähnelt die Molekülstruktur einem Kreuz. Die Proteinfamilie der Laminine interagiert miteinander, mit Proteoglycanen und anderen Komponenten der Basalmembran, wie z.B. Nidogen. Der Nidogen/Laminin I Komplex vermittelt Zelladhäsion an das Kollagen Typ IV Netzwerk der Basallamina. In der Haut wird Laminin hauptsächlich von den Keratinozyten im Stratum basale exprimiert und in den extrazellulären Raum sekretiert.

Bei der Epidermis handelt es sich um ein 0,03-0,25mm dickes, mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel ektodermalen Ursprungs. Es bietet Schutz gegen Wasserverlust, physikalische Schäden wie z.B. ultraviolette Strahlung und mikrobielle Infektionen. In der Epidermis werden Keratinozyten, Merkelzellen, Melanozyten und Langerhans-Zellen gefunden. Mit einem Anteil von 90% der epidermalen Zellen stellen die Keratinozyten die häufigste Zellpopulation der Epidermis dar.

Morphologisch werden vier epidermale Schichten unterschieden, das **Stratum corneum**, **Stratum granulosum**, **Stratum spinosum** und das **Stratum basale** (Abb. 1.2). In einigen Hautregionen findet man eine fünfte Schicht, das **Stratum lucida**.

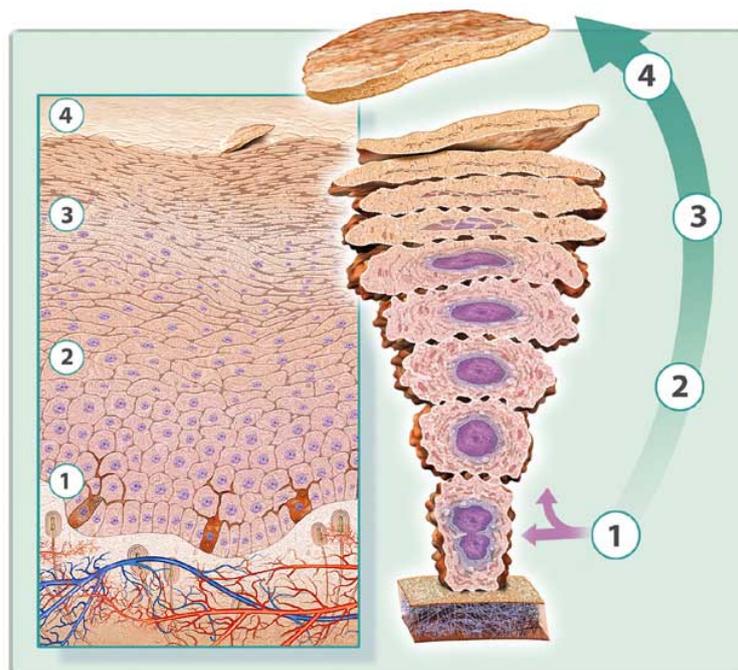


Abb.1.2 Schematische Darstellung der Epidermis. Bei der Differenzierung wandeln sich die Basalzellen in kernlose, flache Hornzellen um.

1. Stratum basale
2. Stratum spinosum
3. Stratum granulosum
4. Stratum corneum

von http://www.scf-online.com/english/35_e/frontpage35_e.htm

Die in der basalen Schicht der Epidermis (Stratum basale) stattfindende Proliferation der Keratinozyten muss unter physiologischen Bedingungen mit dem Verlust an Korneozyten des Stratum corneum übereinstimmen, um Homöostase des Gewebes sicherzustellen. Der Differenzierungsgrad der Keratinozyten, und somit die verschiedenen epidermalen Strata, kann aufgrund der Expression spezifischer Proteine, welche zur Homöostase beitragen, abgeleitet werden. So wird Involukrin spezifisch im oberen Teil des Stratum spinosum und Stratum granulosum exprimiert. Durch mechanische Schädigung der oberen verhornten Zellschichten wird erhöhte Keratinozyten Proliferation, Induktion von Wachstumsfaktoren (z.B. EGF), Cytokinen (z.B. IL-1, TNF α) und Cyclooxygenasen induziert (Tsai, J. C. et al., 1994).

Die Proliferation der Keratinozyten beginnt immer in dem, der Lamina lucida aufsitzenden, einschichtigen **Stratum basale**. Durch Teilung der Stammzellen, welche nicht der terminalen Differenzierung der übrigen Keratinozyten unterliegen, entstehen neue Stammzellen und sogenannte Amplifikationszellen. Diese sind in der Lage 3-5 Mitosen zu durchlaufen, bevor sie zu terminal differenzierten Keratinozyten werden. Cytokeratin 5 und Cytokeratin 14 werden als basale Cytokeratine bezeichnet. Sie bilden ein die Keratinozyten durchspannendes, feines Netz von Intermediärfilamenten. Der Abbau und Ersatz der basalen Cytokeratine durch suprabasale Cytokeratine (z.B. CK10, CK1) ist direkt mit der fortschreitenden Zelldifferenzierung assoziiert. Cytokeratine sind somit hervorragende Marker des Differenzierungsgrades von epidermalen Zellen. **Cytokeratin 10** gehört zu den suprabasalen Cytokeratinen.

Im sich anschließenden 2-5 zelllagigen **Stratum spinosum** findet die Zunahme des Zellvolumens und eine horizontale Umorientierung der Zellachse der Keratinozyten statt. Die Synthese von Involukrin und Profilaggrin findet ebenfalls im Stratum spinosum statt. Im Bereich des oberen Stratum spinosum wird Profilaggrin exprimiert, welches durch Zusammenlagerung mit Keratinfilamenten Keratohyalin granula bildet. Diese sind

charakteristisch für das anschließende, 1-3 Zellschichten umfassende, **Stratum granulosum**. Durch das im Stratum granulosum, im Rahmen der Dephosphorylierung und des proteolytischen Zerfalls des Profilaggrins, freigesetzte **Filaggrin** wird die Keratinbildung durch Zusammenlagerung der Keratinfilamente und deren Vernetzung über Disulfidbrücken abgeschlossen. Bei der Gruppe der Filaggrine handelt es sich um stark basische (histidinreiche) Proteine (35 kDa). Filaggrin und Loricrin zählen zu den terminalen Differenzierungsmarkern von Keratinozyten.

In den Zellen des Stratum granulosum findet man Odland-Körperchen, dies sind Enzyme und Lipide enthaltende, lamellierte Zellorganellen. Im Zuge der fortschreitenden Differenzierung der Keratinozyten im oberen Bereich des Stratum granulosum werden der Zellkern und die meisten Zellorganellen abgebaut. Das Abplatten und die Dehydratation der Zellen bewirkt eine streng geometrische Anordnung der aneinander fixierten immobilisierten Keratinozyten. Die Exocytose der Odland-Körperchen bedingt die Ausbildung einer zementartigen Lipidsubstanz im Interzellularraum, bestehend aus Lipiden und Proteinen. Die entstehenden cornified envelopes vermitteln hohe chemische Resistenz gegenüber chemischen Detergenzien, organischen Lösungsmitteln und reduzierenden Substanzen. Außerdem weisen die Keratinozyten hohe Rigidität auf. Aufgrund der im Stratum granulosum synchron ablaufenden terminalen Differenzierung der Keratinozyten wandern diese im Zellverband in das Stratum corneum ein.

Die 10-20 Zellschichten umfassende Schicht des **Stratum corneum** bildet den Abschluss der Epidermis zur Umwelt. Charakteristisch für diese Schicht sind die plättchenartig angeordneten, kernlosen, hexagonalen Korneozyten. Die sich ablösenden Zellen werden als **Stratum disjunctum** bezeichnet. Sie lösen sich als Einzelzellen oder als Zellaggregate von der äußersten Zellschicht, nachdem die Dichtsubstanz zwischen den Zellen und den oberen Schichten des Stratum corneum zerfallen ist (Fritsch, 1998).

Untersucht man, in welchem Stadium sich aus epidermalem Gewebe isolierte Keratinozyten befinden, so können hierzu verschiedene Proteine, die charakteristisch für verschiedene Differenzierungsstadien sind, verwendet werden. Zu den während der terminalen Differenzierungsphase von Keratinozyten exprimierten Proteinen gehören u.a. Cytokeratine, Involukrin, Loricrin und Filaggrin (Watt, 1983). Die Cytokeratine 5 und 14 werden ausschließlich von basalen Keratinozyten exprimiert. Zu den ersten mit der Differenzierung verbundenen Proteinen gehören Cytokeratin 1 und Cytokeratin 10. Sie werden in den suprabasalen Epidermisschichten exprimiert. Cytokeratin 6 wird in normalen Keratinozyten nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert. Erhöhte Cytokeratin 6 und Cytokeratin 16 Konzentrationen treten bei hyperproliferativen Keratinozyten, wie z.B. bei Psoriasis oder der Wundheilung, auf (Tomic-Canic et al., 1998).

Involukrin lagert sich, am Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum, an die Innenseite der Zellmembran der Keratinozyten. Dort wird es mit anderen Proteinen, wie Loricrin, Keratolin etc. durch eine calciumabhängige Transglutaminase quervernetzt und bildet somit den cornified envelope. Loricrin und Filaggrin werden in den oberen Schichten des Stratum granulosum und im Stratum corneum exprimiert, sie werden in vielen Studien als Indikatoren für das Erreichen bzw. Vollenden der terminalen Differenzierung der Keratinozyten genannt. Diese Proteine können Aufschluß über photoadaptive Veränderungen der Proliferation und Differenzierung nach UVB Bestrahlung geben (Lee et al., 2002). Bei Aktivierung oder Schädigung der Keratinozyten wird das Proliferationsverhalten verändert. Zu parakrin und autokrin kompetenten Wachstumsstimulatoren gehören u.a. Interleukine (IL) wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-20 und die Wachstumsfaktoren EGF, TGF, KGF. TNF- α (Köck et al., 1990) kann, als pleiotropher Mediator mit z.T. gegensätzlichen Wirkungen abhängig von dessen Konzentration, proliferationshemmend wirken (Kondo et al., 1997). Die Wirkung von IL-20, besonders im Zusammenhang mit der Psoriasis-Therapie, ist Gegenstand

diverser Studien. Dieses Cytokin beeinflusst die Proliferation, Angiogenese und Inflammation (Stenderup et al., 2007).

Melanozyten sind die Zellspezies, welche für die Pigmentierung u.a. der Haare und der Haut verantwortlich sind. Die melanozytären Zellkörper sind ausschließlich im Stratum basale zu finden. Sie bilden Dendriten aus, welche bis in den Bereich des Stratum granulosum reichen. Über diese werden die Pigment enthaltenden Melanosomen zu den diese aufnehmenden Keratinozyten transportiert. Melanozyten verschiedener ethnischer Bevölkerungsgruppen können aufgrund des Verhältnisses von Phäomelanin und Eumelanin und der Melanosomen differenziert werden. Kaukasische Melanozyten haben einen höheren Anteil an Phäomelanin, wohingegen Eumelanin in Melanozyten dunkelhäutiger Personen überwiegt. Die beiden Pigmente unterscheiden sich aufgrund ihrer Farbe. Phäomelanin ist ein gelb-rotes Pigment, Eumelanin ist ein braun-schwarzes Pigment. Eumelanin wird seinerseits in zwei Untergruppen differenziert, DHICA-Melanin ist für die Braunfärbung verantwortlich, DHI-Eumelanin vermittelt Schwarzfärbung. Die Melanosomen in kaukasischen Keratinozyten lagern sich zu Komplexen zusammen, welche entweder von einer Membran umschlossen sind oder aufgrund der in den Zwischenräumen der einzelnen Melanosomen identifizierbaren granulären Strukturen als Einheit anzusehen sind. In negroiden Keratinozyten bilden die Melanosomen keine Komplexe, sie liegen als Einzelorganellen vor (Westerhof, 2006). Unabhängig vom ethnischen Hintergrund der Personen liegt das Verhältnis zwischen Keratinozyten und Melanozyten im Stratum basale bei 35:1.

1.2 Ultraviolette Strahlung (UV)

Das die Erdoberfläche erreichende Frequenzspektrum der Sonne reicht von 280nm bis in den Infrarotbereich. UVC, dessen Wellenlänge unter 280nm liegt, kann, aufgrund der filtrierenden Ozonschicht in der Stratosphäre, nicht die Erdoberfläche erreichen. Mittel- bis langwelliges

UV-Licht gilt als biologisch aktiv. Als Sonnenbrandspektrum wird UVB, dessen Wellenlänge zwischen 280 und 315nm liegt, bezeichnet. Das langwelligere UVA 320-400nm wird in zwei Untergruppen eingeteilt, UVA₁ von 340-400nm und UVA₂ von 320-340nm. Die Wellenlänge ist entscheidend für die energetische Wirkung und die Absorptionsstärke. Je kurzwelliger die Strahlung ist, umso energiereicher ist sie, jedoch wird sie auch umso stärker absorbiert. So kann UVB nicht durch Fensterglas dringen (Fritsch, 1998).

Einen schützenden Filter der Haut gegenüber dieser Strahlung stellt das Stratum corneum dar. Lediglich 90% der UVA Energie, aber 50% der UVB Energie gelangen in die tieferen Hautschichten. In den oberen Hautschichten absorbieren und streuen Melanin, Nukleinsäuren, Proteine und Lipide die eindringende UV Strahlung; so wird die Penetrationstiefe der Strahlung beeinflusst. Ca. 20% der eingestrahnten UVB Energie erreichen im kaukasischen Hauttyp das Stratum spinosum. Das obere Corium erreichen 10% der UVB- und 30%-50% der UVA Strahlung und des sichtbaren Lichts. Somit wird deutlich, dass UVB weniger tief in die Haut penetriert als UVA.

Ultraviolette Strahlung verursacht mehrere Aspekte, die zu malignen Hautveränderungen führen. Es wird diskutiert, ob mutagene DNA- Schäden für die Initiationsphase von Tumoren verantwortlich sind und ob UV induzierte Immunsuppression verhindert, dass das Tumorwachstum eingeschränkt wird (Kripke et al., 1992). UVA Strahlung verursacht hauptsächlich oxidative Schäden, vor allem an Guanin. An Dipyrimidin Stellen finden Cytosin-Thymidin Transition oder Cytosin/Cytosin-Thymidin/Thymidin Tandemmutationen durch UVB Strahlung statt (Clingen et al., 1995). Diese DNA-Mutation wird im p53 Tumorsuppressor Gen in 50% der nicht melanomen epidermalen Hauttumore gefunden (Ziegler A et al., 1994). Die Induktion von IL-6 korreliert mit der Bildung von Cyclobutan Pyrimidin Dimeren (CPDs) (Petit-Frère et al., 1998). UV Strahlung ist für die Induktion inflammatorischer Reaktionen bekannt (Brink et al., 2000; Skiba et al., 2005). Hierzu zählt die Expressions- und Sekretionsregulation pro-inflammatorischer Cytokine, wie der tumor

necrosis factor- α (TNF- α) (Storey et al., 2005; Pupe et al., 2002). Die Cytokine werden hauptsächlich über spezifische Transkriptionsfaktoren, wie z.B. den nuclear factor- κ B (NF- κ B), welche die Transkription von Genen die in Inflammationsreaktionen oder der Apoptose eine zentrale Rolle einnehmen, reguliert. Zu den durch NF- κ B regulierten Genen in der humanen Haut zählen IL-1, IL-6 and IL-8 (Lewis und Spandau, 2007; Matsusaka et al., 1993). Die zentrale Rolle, die NF- κ B in diesem Szenario einnimmt, wurde experimentell bewiesen. Es zeigte sich, dass die Inhibition von NF- κ B durch Oligonukleotide, welche als unspezifische Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors fungierten, zu verstärktem DNA-laddering und einer höheren Anzahl an sunburn cells nach UVB Bestrahlung führte (Yokoyama et al., 2005; Miyachi et al., 1983). Als DNA-laddering bezeichnet man den Abbau der genomischen DNA durch Endonucleasen. In diesem Prozess entstehen 180-185 Basenpaar lange Fragmente, welche als Indikator der Apoptose genutzt werden können. Sunburn cells entstehen u.a. bei Sonnenbränden oder bei der Kombinationstherapie von Psoralen und UVA Bestrahlung. Charakteristisch für diese Zellen ist der pyknotische Zellkern. Das Chromatin im Zellkern ist irreversibel kondensiert, aus diesem Grunde werden sunburn cells auch als Zellen, welche in den programmierten Zelltod gehen (Apoptose) definiert (Young, 1987). Die Generation von sunburn cells ist ein präziser Parameter zur Beurteilung der Effizienz von Sonnenschutzcremes (Bernerd und Asselineau, 2001; Hofmann-Wellenhof et al., 2004). Inflammation – nicht alleinig ausgelöst durch UVB – ist ein häufig auftretender Parameter bei den meisten Hautkrankheiten, welche effektiv durch Glukocorticoide supprimiert werden.

1.3 Cytokine

Unter dem Oberbegriff der Cytokine werden lösliche Proteine zusammengefasst, die für die Regulation und Vermittlung immunologischer Reaktionen durch Sekretion in die extrazelluläre Flüssigkeit verantwortlich sind. Ihre Expression wird durch externe Reize wie

z.B. Toxine, Viren, Bakterien, ultraviolette Strahlung, osmotischen Stress oder durch andere Cytokine beeinflusst (Abb. 1.3). Obwohl Cytokine keine homogene Proteingruppe darstellen, gibt es einige charakteristische Gemeinsamkeiten. Cytokine sind kleine Proteine, deren Molekulargewicht zwischen 8kDa und 50kDa liegt. Sie bilden Monomere, Homo- und Hetero-Dimere oder selten Trimere. Es gibt nur wenige Cytokine, die nur von einem einzigen Zelltyp synthetisiert werden. Der überwiegende Anteil an Cytokinen wird von verschiedenen Zellen produziert; zu diesen zählen u.a. auch die in meiner Doktorarbeit untersuchten Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten. Die meisten Zelltypen sind in der Lage in entsprechenden Aktivitätszuständen ein breites Spektrum an Cytokinen zu exprimieren. Aufgrund der Redundanz einiger Cytokine, schützt sich der Organismus vor gravierenden Schäden bei Ausfall eines speziellen Cytokins. Ferner kann ein Cytokin auf verschiedene Zellen wirken (pleiotrophe Wirkung) und jeweils zellspezifische Reaktionen induzieren. So hemmt IL-4 die Interferon- γ Synthese in T-Lymphozyten und stimuliert die Immunglobulinsynthese in B-Lymphozyten. Die Sekretion von IL-12 wird hauptsächlich mit immunkompetenten Zellen assoziiert. Neben diesen Zellen exprimieren und sekretieren auch Keratinozyten dieses Cytokin. UV Strahlung stimuliert die Expression von IL-12. Auch IL-12 zählt zu den pleiotroph wirkenden Cytokinen. In T-Helfer 1 Zellen induziert IL-12 die Expression von TNF- α , wohingegen es dessen Expression in epidermalen Zellen hemmt. Es zeigte sich, dass die TNF- α Sekretion nach der Induktion eines inflammatorischen Reizes, wie z.B. UVB von nicht inflammatorischen Zellen, wie den epidermalen Zellen, zu immunkompetenten Zellen (T-Helfer Zellen) geleitet wird (Werth et al., 2003).

Einige Cytokine (Interferon- α , Interferon- β) vermitteln anti-proliferative und anti-virale Reaktionen, die Synthese virusreplikations- und zellproliferationshemmender Enzyme wird gefördert. Zu den pro-inflammatorischen Cytokinen gehören u.a. TNF- α , IL-1, IL-8 und IL-6 (Fritsch, 1998; Ansel et al., 1990).

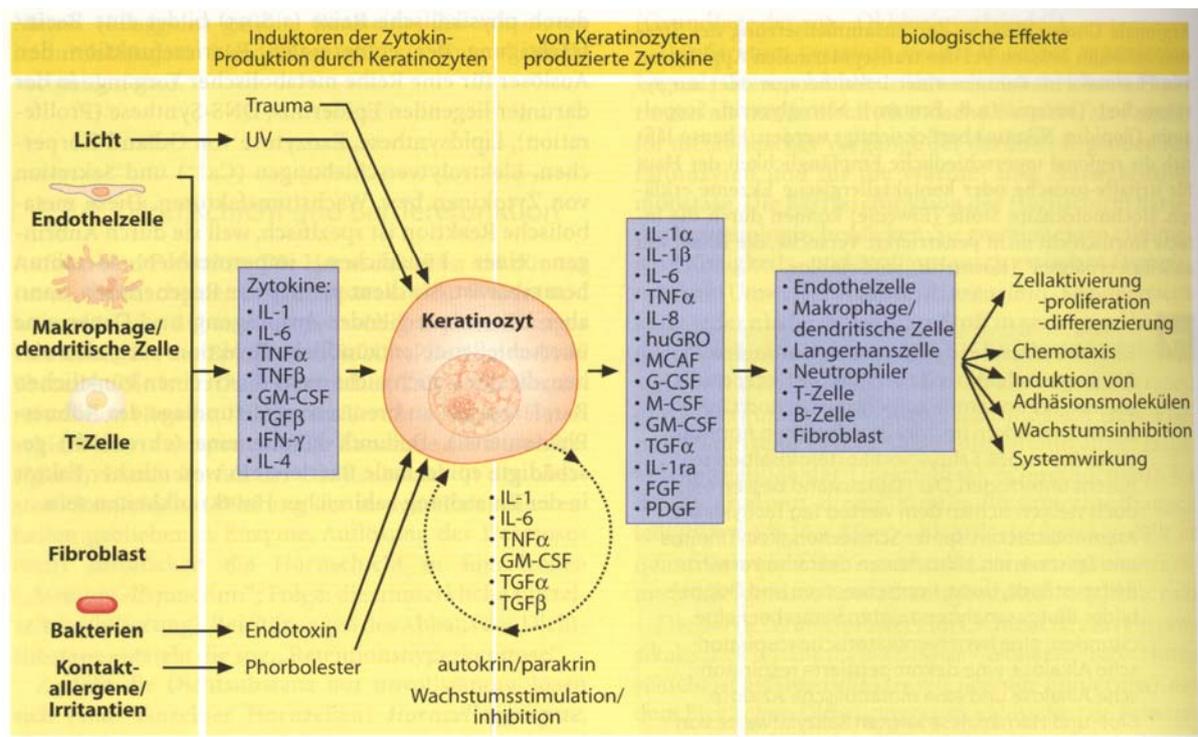


Abb.1.3 Der Diskurs von Keratinozyten und anderen Zellarten mittels Cytokinen und Wachstumsfaktoren.

Aus Fritsch : Dermatologie und Venerologie, Springer Verlag (1998), S. 16

1.3.1 Interleukin 6

Das einzelsträngige Protein IL-6, dessen molekulare Masse aufgrund unterschiedlicher Phosphorylierung, O- und N-Glycosylierungen, zwischen 21 und 28kDa liegt (Van Snick, 1990), wird in vielen Zelllinien wie z. B. Endothelzellen, Fibroblasten (Krueger et al., 1991), Keratinozyten, Mastzellen, T-Zellen und B-Zellen exprimiert. Erst die Stimulation durch externe oder zellinterne Signale steigert die IL-6 Expression. Cytokine wie Interferon- γ , IL-1 α , TNF- α (Van Snick, 1990), sowie bakterielle Endotoxine, Lipopolysaccharide (LPS) und virale Infektionen gehören zu den IL-6 konzentrationssteigernden Stimuli.

IL-6 ist ein multifunktionelles Cytokin, unter anderem steigert IL-6 die Proliferation von Keratinozyten (Sawamura et al., 1998; Sato et al., 1999). T-Zellen werden zum Verlassen der G0 Phase und Eintritt in die G1 Phase angeregt. Welche Funktion IL-6 in der Haut

(Paquet und Piérard, 1996) hat ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird davon ausgegangen, dass es einen entscheidenden Anteil bei lokalen und systemischen Infektionen hat. Es konnte beobachtet werden, dass IL-6 natürliche Killerzellen aktiviert (Kirnbauer et al., 1992). Die Überproduktion dieses Proteins könnte aufgrund seiner B-Zellen stimulierenden Wirkung für die Pathologie einiger Autoimmunkrankheiten verantwortlich sein. Ferner ist IL-6 aufgrund seiner proliferationssteigernden Wirkung auf Keratinozyten in der Wundheilung nach Verletzungen und Operationen wichtig (Grellner et al., 2000; Kawakami et al., 1997; Kawakami et al., 1998, Wang et al., 2004). Keratinozyten, welche aus psoriatischem Gewebe isoliert wurden, wiesen stark erhöhte IL-6 Konzentrationen auf (Grossmann et al., 1989; Castells-Rodellas et al., 1992).

Auch bei Sklerodermie ist IL-6 mitverantwortlich für den Krankheitsverlauf. Sklerodermie zeichnet sich durch exzessive Ablagerung von extrazellulären Matrix Komponenten u. a. von Kollagen in der Haut oder in den inneren Organen (Herz, Lunge, Niere, Verdauungstrakt) aus. Aufgrund der, durch IL-6, in Fibroblasten ausgelösten gesteigerten Kollagen- und Glucosaminoglycan Synthese wird diesem Cytokin eine parakrine oder autokrine Regulationsfunktion dieser Krankheit zugeschrieben. Die allgemeine Proteinsynthese und im Besonderen die Fibronektinsynthese wird durch IL-6 nicht beeinflusst. Gesteigerte IL-6 Konzentration im Blut wird als Indiz einer bevorstehenden Abstossung eines transplantierten Organs angesehen. Bei Patienten, die an renalen Karzinomen, Lennert's Lymphomen oder anderen Tumoren leiden, ist IL-6 deutlich überexprimiert. In der Stresssituation, welche durch Entzündungen, arthritische Beschwerden (entzündliche oder traumatische), postoperative Beschwerden/Komplikationen und schwere Verbrennungen ausgelöst wird, wird IL-6 als ein wichtiger Botenstoff betrachtet.

1.3.2 Interleukin 8

IL-8 gehört zu den Chemokinen, welche ihrerseits zu den Cytokinen gezählt werden. Hauptsächlich wird es in aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, endothelialen und epithelialen Zellen exprimiert. Mit einem molekularen Gewicht von 8kDa gehört das Dimere bildende IL-8 Molekül zu den kleinsten Cytokinen. Wie der Name Chemokin bereits andeutet, wirkt IL-8 als Chemotaxin auf Neutrophile (Norris et al., 1999) und T-Zellen. LPS (Sasaki et al., 2003), TNF- α , IL-1 und Interferon- γ (Fukuoka et al., 1998) werden oft als Stimulatoren der IL-8 Synthese eingesetzt. Aber auch die für IL-6 beschriebenen Stimulatoren beeinflussen die IL-8 Synthese.

1.4 Hautmodelle - Alternativmethoden zu Tierversuchen

Die Haut ist den Umwelteinflüssen direkt ausgesetzt. So stellt sie die erste und eine essentielle Barriere gegenüber exogenen Keimen und Bakterien dar. Die Reaktion auf die von außen auf den Körper einwirkenden Stressoren erfolgt über die Aktivierung zellspezifischer Antworten. So induziert Infektion durch Pathogene oder der Kontakt mit als Allergen wirkenden Substanzen u.a. die Synthese und Freisetzung pro-inflammatorischer Botenstoffe, die ihrerseits intrazelluläre Signalkaskaden initiieren. Aufgrund des morphologischen Aufbaus der Haut, sind die ersten Zellen, die Kontakt zu diesen Substanzen, Organismen oder Umwelteinflüssen haben, Keratinozyten. Diese rekrutieren über die von ihnen sekretierten Botenstoffe z.B. immunkompetente Zellen zum Ort einer Infektion.

Um die klinischen Konsequenzen dieser biologischen, chemischen und physikalischen Einflüsse zu mindern, besteht die stetige Bestrebung bereits etablierte pharmakologische Wirkstoffe zu verbessern und neue zu entwickeln. Hierzu werden adäquate Testsysteme benötigt, welche dem in vivo Zustand so nahe wie möglich kommen sollten. Primäre Analysen neuer Wirkstoffe werden an Monolayerkulturen durchgeführt. Toxizitätsanalysen,

Irritationsstudien und Wirkungsstudien der zu analysierenden Substanzen ermöglichen die Charakterisierung eines Wirkstoffes oder einer neuen Wirkstoffkombination. Zu den Vorteilen der Monolayerstudien zählen u.a., dass innerhalb eines kurzen Zeitraums verschiedene Parameter mit einem geringen Zellvolumen analysiert werden können, „high throughput“. Ferner werden zellspezifische Reaktionen auf die zu untersuchende Substanz abgebildet. Hierbei werden die Reinsubstanzen dem Medium zugefügt. Dies ermöglicht die direkte Korrelation der generierten Ergebnisse mit der Reinsubstanz. Zu beachten ist jedoch, dass besonders in der Dermatologie viele Wirkstoffe nicht systemisch dargereicht werden, sondern in Form von Emulsionen, Cremes bzw. Salben appliziert werden.

Aufgrund des beschriebenen Aufbaus der Haut und der Penetrationsbarriere, welche durch das Stratum corneum vermittelt wird, gelangt nur ein geringer Teil des Wirkstoffes nach topischer Applikation in die zu erreichenden Zellschichten bzw. zu den target cells. Die in Monolayerstudien ermittelte optimale Wirkstoffkonzentration kann somit nicht direkt mit der einzuarbeitenden Wirkstoffkonzentration zur topischen Behandlung korreliert werden. Ferner ist zu beachten, dass die Auswahl der Cremegrundlage ebenfalls Einfluss auf die Wirkung der Substanz haben kann. So ist darauf zu achten, dass die einzuarbeitende Substanz nicht bereits durch Komponenten der Basisformulierung abgebaut oder umgebaut wird. Außerdem ist die Barrierefunktion des Stratum corneum nicht für alle Substanzen und Formulierungen gleich. Die Aufnahme von Wirkstoffen über die Haut wird in zwei Wege unterteilt, einerseits den für lipophile Stoffe geltenden intrazellularen Weg und für hydrophile Wirkstoffe oder Formulierungen den transzellularen Weg. Somit kann aufgrund der Auswahl der Basisformulierung trotz der gleichen einformulierten Substanzkonzentration die Substanzmenge, welche die target cells erreicht, deutlich variieren. Aus diesem Grund sind Penetrationsstudien eine wichtige Komponente des Entwicklungsprozesses neuer Formulierungen. Hierzu wird u.a. Schweinehaut, welche eine der humanen Haut ähnliche

Morphologie aufweist, eingesetzt. Im Bereich von inflammatorischen Untersuchungen werden Tierversuche meist an Nagetieren durchgeführt. Die epidermale Morphologie dieser Tiere unterscheidet sich jedoch von der menschlichen Haut. Die Nagetieryepidermis weist lediglich 2-3 vitale epidermale Zellschichten auf, wohingegen die humane Haut über 10-12 vitale epidermale Zellschichten verfügt. Die Barrierefunktion des Stratum corneum der Nagetiere ist ebenfalls deutlich geringer, als die der menschlichen Haut. Das Penetrationsverhalten ist nicht ausschließlich von der Tierart, sondern auch von der Hautlokalität, abhängig. (Riedel, 2003).

Der Einsatz von Tierversuchen sollte und wird, aufgrund des erstarkenden Tierschutzes und der wachsenden Kritik an Tierversuchen, eingeschränkt werden. Dies zeigt sich u.a. an den OECD Richtlinien in Bezug auf den Einsatz von Tierversuchen in der kosmetischen Industrie. Aufgrund der am 27. Februar 2003 beschlossenen **7. Änderung der Kosmetikrichtlinie** und der daraus entstandenen Änderungsrichtlinie **2003/15/EC** (www.effci.com/FILES/BE/EFfCI%20Position%20Paper/legal.pdf; www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1976/L/01976L0768-20070508-en.pdf) ergab sich, dass ab 2009 ein generelles Verbot der Durchführung von Tierversuchen für Kosmetikprodukte und Inhaltsstoffe für die meisten Testbereiche besteht. Daraus ergibt sich, dass alternative Methoden entwickelt und evaluiert werden müssen (Curren et al., 2006, Costello, 2000). Zu den im Rahmen dieser Entwicklungen entstandenen Methoden gehören **Epidermismodelle** und **Vollhautmodelle (FTSMs)**. Bevor Epidermismodelle und FTSMs als Tierersatzmodelle anerkannt werden können, müssen diese zunächst in vergleichenden Studien zeigen, dass die in Tierversuchen generierten Ergebnisse, durch die neu entwickelten Ersatzmethoden repliziert werden können. Hierzu werden die Alternativmethoden und Testsysteme untersucht und validiert (Roguet et al., 2000).

Untersuchungen anhand von Epidermismodellen konzentrieren sich ausschließlich auf den Einfluss und die Wirkung von Substanzen auf die Keratinozyten. Auf einer artifiziellen Matrix bildet sich eine aus mehreren Keratinozyten-Zelllagen bestehende Epidermis. Abhängig vom Hersteller variieren der Differenzierungsgrad der einzelnen Modelle und die Anzahl der epidermalen Zelllagen. Die Integration weiterer epidermaler Zellen wie z.B. Melanozyten (MatTek) bewirkt, dass Hautmodelle sukzessiv dem *in vivo* Zustand angeglichen werden. Der Einsatz von Epidermismodellen ist vielseitig, so werden diese u.a. zur Evaluation der Filtereigenschaften von Sonnencremes (Bernerd und Asselineau, 2001; Gélis et al., 2003) und zur Diskriminierung zwischen sensibilisierenden und irritierenden Substanzen (Coquette et al., 2003) eingesetzt. Zu Studien bezüglich des Pigmenthaushaltes und der Wirkung von Haut bleichenden Substanzen und Wirkstoffen eignen sich Hautmodelle, welche Melanozyten enthalten. Diese Modelle bieten Chancen in der Untersuchung und Klassifizierung von Medikamenten, die in der Therapie von Vitiligo-Patienten eingesetzt werden (Bessou-Touya et al., 1998).

FTSMs unterscheiden sich von Epidermismodellen dadurch, dass sie sowohl aus einem dermalen wie auch aus einem epidermalen Bereich bestehen. Dermale Fibroblasten werden in ein der extrazellulären Matrix entsprechendes Äquivalent eingesät. Die auf der apikalen Seite der Matrix proliferierenden Fibroblasten bieten den im anschließenden Kultivierungsschritt eingesäten Keratinozyten ausreichenden Halt, so dass sich ein dem Epidermismodell entsprechender epidermaler Bereich des FTSMs bildet (Harrison et al., 2006). Die mehrschichtige, differenzierte Epidermis weist *in vivo* morphologische Homologien bezüglich der Strata auf. Kultivierungsprotokolle, welche sich an diesen Kriterien orientieren, begünstigen die Entwicklung einer Basalmembran (El Ghalbzouri et al., 2005). Durch Überführung der epidermalen Zellen an die Air Liquid Interface (ALI) entsteht eine stratifizierte Epidermis. Diese wird durch die Expression von Differenzierungsmarkern, deren

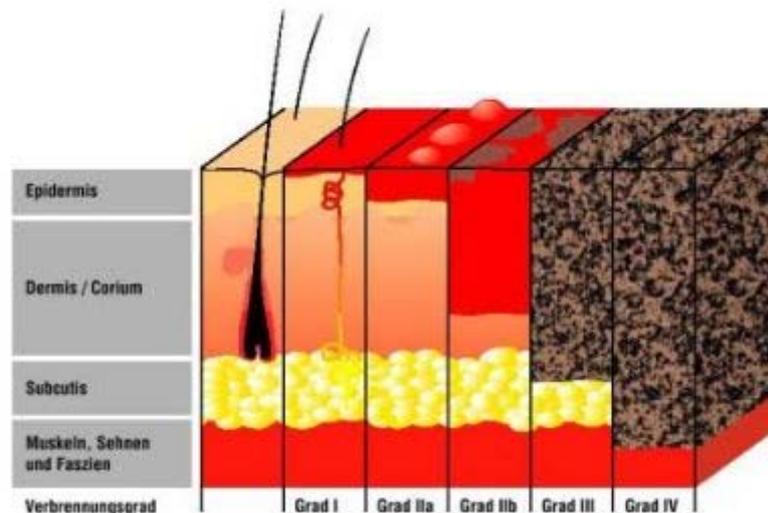
Lokalisation der in vivo Situation entspricht, charakterisiert (Schlotmann et al., 2001, El Ghalbzouri et al., 2004). Experimentell bieten FTSMs gegenüber Epidermismodellen den Vorteil, dass Zell-Zellinteraktionen in den Versuchsaufbau integriert werden können. FTSMs sind morphologisch und physiologisch dem in vivo Zustand ähnlicher als Epidermismodelle. Ferner bieten diese die Möglichkeit zu untersuchen, wie Wirkstoffe nachdem sie von einer Zellspezies aufgenommen und möglicherweise verstoffwechselt/abgebaut wurden, auf die sich anschließenden Zellen und Strata wirken. Die Einbeziehung des dermalen Bereiches der Haut in die Validierung und Studien neuentwickelter Wirkstoffe ist z.B. bei der Analyse von Steroiden von großer Bedeutung. Steroide beeinflussen die Proliferation dermalen und epidermalen Zellen. Die mit Hautatrophie assoziierte Ausbildung von Striae ist ausschließlich auf morphologische Veränderungen der Dermis zurückzuführen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Einbeziehung der Dermis und ihrer Komponenten in die ausgeführten Evaluationsstudien. Das gesellschaftlich verankerte Schönheitsideal ist u.a. dafür verantwortlich, dass die kosmetische Industrie die Verlangsamung, Minderung oder gar im Bestfall die vollständige Verhinderung von altersbedingten Hautveränderungen, wie Faltenbildung, Minderung der Elastizität der Haut etc., als stetiges Ziel verfolgt. Eine wichtige Komponente des Alterungsprozesses ist mit dem Rückgang der elastischen Fasern in der Dermis korreliert. Die Analyse neuer Wirkstoffe, welche die Kollagen- und Elastinsynthese stimulieren sollen, müsste um ihre Wirkung nicht allein auf Monolayerstudien zu stützen, an einem der menschlichen Dermis entsprechenden Testsystem untersucht werden. Hierzu eignen sich FTSMs in besonderer Weise, da sie dem Aufbau insbesondere der Gesichtshaut entsprechen. Die Aufnahme der aktiven Komponenten der neu zu entwickelnden Cremes entspräche somit dem in vivo Zustand. Der Alterungsgrad der Modelle könnte durch Variation des Spendermaterials beeinflusst und gesteuert werden.

1.5 Der Einsatz von Hautäquivalenten

Hautäquivalente werden zur Therapie schwer heilender oder großflächiger Wunden eingesetzt. Hierbei werden entweder Fremdzellen (allograph) oder Zellen des Patienten (autograph) eingesetzt. In den meisten Fällen werden epidermale Zellen auf eine Trägermatrix ausgesät und für einen definierten Zeitraum submers kultiviert, bevor sie transplantiert werden. Erfahrungen mit dieser Technik umfassen sowohl die Therapie von schwer heilenden Wunden, Ulcera Patienten als auch die Behandlung von Verbrennungsoffern.

1.5.1 Verbrennungen

Verbrennungen sind definiert als thermische Verletzung der Haut. Man unterteilt die Ursache der thermischen Einwirkung in **trockene Hitze**, wie z.B. Flammen, **feuchte Hitze**, wie z.B. heiße Flüssigkeiten, **elektrischen Strom** oder **Strahlung**. Die Wundversorgung von Verbrennungsoffern stellt hohe Anforderungen an die behandelnden Ärzte und das pflegende Personal, sowohl aufgrund der eigentlichen Verletzung als auch aufgrund der die thermische Einwirkung begleitenden psychologischen Folgen. Schockzustände des Patienten, Traumata und Beeinträchtigung der Atemwege bei Verbrennungen durch trockene Hitze sind häufige Begleiterscheinungen. Zu den die Versorgung dieser Patienten erschwerenden Faktoren zählt u.a. der Verlust bzw. die deutliche Einschränkung der Barrierefunktion der Haut. Die Klassifizierung von Verbrennungen erfolgt aufgrund der betroffenen Körperfläche (Neuner Regel nach Wallace. Hierbei wird der Körper in Areale von jeweils 9% aufgeteilt. Somit ist eine schnelle Abschätzung der betroffenen Körperoberfläche möglich. Als zweites Kriterium wird die Verbrennungstiefe der Verletzung definiert. Man unterscheidet 4 Verbrennungsgrade, welche sich aufgrund der verletzten epidermalen und dermalen Zonen unterscheiden (Abb. 1.4).



A

Schädigung	Symptomatik	Lokalisation	Therapie
Grad I:	Rötung, Schwellung, Schmerz (z.B. Sonnenbrand)	auf die Oberhaut begrenzt, Heilung spontan ohne Narben	durch Gels/Salben wie z.B. Flammazine, Fenistil-Gel
Grad II a:	Rötung, Blasenbildung, Schmerz (feuchter Blasengrund)	Oberhaut, teilweise Lederhaut, Heilung ohne Narbenbildung	selten OP nötig
Grad II b (tiefe II.-gradige):	Blässe, Blasen, Schmerz (trockener Blasengrund)	Oberhaut, teilweise Lederhaut, tief dermal, Heilung mit Narbenbildung	Abtragung
Grad III:	Nekrosen, grauweiß-schwarz	Epidermis völlig zerstört, Defektheilung	tiefere Abtragung
Grad IV:	Verkohlung	Zerstörung bis in tiefere Muskelschichten	u.U. Amputation

B

Abb. 1.4 Klassifizierung der Verbrennungstiefe

www.burnfree.de/info_fach.html (A),

www.freenet.de/freenet/fit_und_gesund/gesundheit/kinderheilkunde/verbrennungen/04.html (B)

Zu Verbrennungen ersten Grades zählen Sonnenbrände und oberflächliche Verbrennungen, welche konventionell, d.h. mit Gels und Salben behandelt werden können. Bei diesen

Verletzungen ist die Epidermis betroffen, meist jedoch nicht das Stratum basale. Verbrennungen zweiten Grades beinhalten Verletzungen bei denen die Dermis ebenfalls betroffen ist. So zählen Verbrühungen, bei denen sich nach der Verletzung Blasen bilden (Ablösung der Epidermis, Abb. 1.5) zu Verbrennungen des Grades IIa. Sie werden wie die Verbrennungen ersten Grades meist ohne chirurgischen Eingriff therapiert. Bei Verbrennungen des Grades IIb sind chirurgische Eingriffe erforderlich, da das betroffene Gewebe neben dem Stratum papillare auch das Stratum reticulare umfassen kann (Abb. 1.6 A). Von Verbrennungen dritten Grades (Abb. 1.6 B) spricht man, wenn die Epidermis und die Dermis vollständig zerstört sind und sich die Verletzung bis in die Subcutis erstreckt. Wie bereits bei Verbrennungen des Grades IIb ist die Abtragung des nekrotischen Gewebes (Debridierung) vor der weiteren Wundversorgung zwingend notwendig. Ist die gesamte Subcutis ebenfalls zerstört und sind somit auch das Muskelgewebe und die Knochen von der Verbrennung betroffen, so ist dies eine Verbrennung des Grades IV. Hier ist aufgrund der schwerwiegenden Schädigungen des Gewebes und der Knochen in vielen Fällen eine Amputation unvermeidbar.



Abb. 1.5 Aufnahme einer 17 jährigen Patientin nach Verbrühung des Fußes.

<http://dermatlas.med.jhmi.edu/derm/>

Je nach Verbrennungsgrad und der Fläche des betroffenen Areals sind der Wasserverlust, welcher mit dem Verlust des Stratum corneum und somit des Verdunstungsschutzes einhergeht und das erhöhte Infektionsrisiko die am vordergründigsten zu therapierenden Symptome. Unmittelbar nach der Entfernung des nekrotischen Gewebes muss bei Verbrennungen, welche sich bis in den dermalen Bereich erstrecken, ein Dermisersatz

transplantiert werden. Hierbei können zellfreie Dermisäquivalente oder allographe Dermissubstitute verwendet werden. Obwohl autologe Transplantate zu bevorzugen sind, bieten allographe Dermissubstitute, wie z.B. DermagraftTM, den Vorteil der zeitnahen Applizierbarkeit. Sie werden neben der Ulcera- und Verbrennungstherapie auch zur Behandlung von Epidermolysis bullosa Patienten eingesetzt (Sibbald et al., 2005). Aufgrund der bei dieser Krankheit auftretenden Mutationen, z.B. von Adhäsionsfaktoren wie der Ankerfibrille Kollagen VII, lösen sich Dermis und Epidermis im Bereich der Lamina densa bereits bei geringer mechanischer Beanspruchung. Untersuchungen des Heilungsprozesses zeigten, dass die Wundheilung durch die, von den Fibroblasten sekretierten, Wachstumsfaktoren und Cytokine gefördert wird (Kuroyanagi et al., 2004). Aus diesem Grund werden in der Behandlung schwer heilender Wunden bevorzugt Wundauflagen verwendet, welche vitale Zellen enthalten. Hierbei unterscheidet man autologe und allographe Gewebetransplantate. In der Verbrennungstherapie werden bevorzugt Spalthauttransplantate eingesetzt. Hierbei wird mit einem Dermatom eine 0,2-0,5mm dicke Hautschicht unbetreffenen Gewebes abgetragen. Dieses kann alternativ nach dem Meshen direkt auf die Wunde aufgelegt werden. Bei tieferen Wunden wird das Spalthautgewebe auf einen allographen Dermisersatz aufgebracht. Eine weitere Alternative der Wundtherapie bieten Vollhautäquivalente. Hierbei wird das exzidierte Gewebe ex vivo expandiert und auf eine Biomatrix (Trägermaterial) aufgebracht. Im Zuge der ex vivo Kultivierung bilden sich eine differenzierte Epidermis und Dermis aus. Die besiedelte Biomatrix kann dem Patienten transplantiert werden.



A



B

Abb. 1.6 Aufnahmen von durch feuchte Hitze verursachten Verbrennungen

Eine Verbrennung des Grades II (A) und eine Verbrennung des Grades III (B).

<http://www.emedicine.com/plastic/topic510.htm#target3>

Wie bereits erwähnt werden in der Verbrennungstherapie hauptsächlich Spalthauttransplantate eingesetzt. Je geringer die Fläche des als Transplantat exzidierten Gewebes ist, desto höher ist der Vergrößerungsfaktor, welcher durch Meshen erreicht werden muss, um das betroffene Areal zu bedecken. Erfahrungsgemäß kann durch Meshen ein Vergrößerungsfaktor von 1:4-1:10 erreicht werden. Auf Gewebe von nahen Verwandten wird zusätzlich zurückgegriffen (Coruh et al., 2005), wenn das unbetroffene Gewebe des Patienten nicht ausreicht, um das Wundareal zu bedecken. In diesen Fällen wird direkt auf die Wundfläche ein mit maximalem Faktor gemeshes Gewebe des Patienten aufgetragen. Zur Stabilisierung wird im Folgenden Spalthautgewebe des Fremdspenders, welches mit einem geringeren Faktor gemesht wurde, aufgelegt.

Die Herstellung von autologen Hautäquivalenten bietet neben der Verwendung des Patientenmaterials und somit der Limitierung der Immunreaktion nach Transplantation auch den Vorteil, dass die Fläche des zu exzidierenden Gewebes minimiert werden kann. Durch ex vivo Expansion der isolierten Zellen kann ein Vergrößerungsfaktor von 1:20-1:100 erreicht werden. Ein weiterer Vorteil dieses Behandlungsregimes ist die vollständige Abdeckung des betroffenen Gewebes. Im Gegensatz zur Behandlung mit gemeshtem Spalthautgewebe ist das

Wundareal bei Behandlung mit ungemeshtem Trägermaterial, mit aufgelagerten Zellen, vollständig bedeckt. Werden dermale Zellen neben epidermalen Zellen in das Trägermaterial integriert, so könnte das Heilungsverhalten verbessert werden. Dies ist besonders bei Verbrennungen höheren Grades von Bedeutung, da in diesen Fällen der dermale Bereich betroffen ist. Die überschüssige Narbenbildung (Abb. 1.7) macht die kontinuierliche Nachversorgung und Kontrolle der Wunde/Verletzung notwendig. Neben dem Einsatz in der Primärversorgung könnten diese auch in der Therapie zur Verbesserung des kosmetischen Resultates eingesetzt werden. Die psychologischen Folgen einer Brandverletzung, welche zu einem großen Teil mit dem veränderten Aussehen assoziiert sind, nehmen großen Einfluss auf die Genese und die Lebensqualität der Patienten. Eine optimale Wiederherstellung des bisher „gewohnten“ Aussehens, Minimierung des Narbengewebes und möglicher Pigmentierungsstörungen wie z.B. Hyperpigmentierung, machen in vielen Fällen zahlreiche kosmetische Eingriffe nach der medizinischen Gesundung des Patienten notwendig. Keloide Narbenbildung kann u.a., wenn die Verletzungen im Bereich des Halses auftraten, dazu führen, dass der Kinnbereich direkt auf dem Brustkorb anwächst. Die Beweglichkeit des Kopfbereiches wird durch stark kontrahierendes bzw. kontrahiertes Gewebe eingeschränkt oder gar vollständig verhindert.



Abb. 1.7 Keloide Narbenbildung eines 12 jährigen Jungen

1 Jahr nach Verbrühung mit kochendem Wasser

<http://dermatlas.med.jhmi.edu/derm>

1.6 Glukocorticoide

Die Glukocorticoide (GC) gehören zu den am besten untersuchten Wirkstoffen, sie werden seit mehr als 50 Jahren eingesetzt und die klinischen Erfahrungen festgehalten (Schäfer-Korting et al., 2005). Aufgrund ihrer Eigenschaften werden GC in 4 Klassen eingeteilt. Als Kriterien der Unterscheidung der einzelnen Klassen gilt einerseits das Wirkstoff vermittelte anti-inflammatorische Potential und andererseits das Potential, atrophische Veränderungen auszulösen. GC wie z.B. Hydrocortison zählen zu der Klasse I. Sie werden besonders bei geringen Inflammationen eingesetzt. Aufgrund ihres sehr geringen atrophischen Potentials sind sie zum Einsatz in der Langzeittherapie geeignet. Ein höheres anti-inflammatorisches Potential wird durch Vertreter der Klasse II wie z.B. Prednicarbat oder durch Klasse III Corticoide wie Betamethason-17-valerat und Momethasonfuroat vermittelt. Jedoch ist mit dem effizienteren anti-inflammatorischen Potential ein erhöhtes Risiko von atrophischen Veränderungen assoziiert. Clobetasol-17-propionat zählt zu den Klasse IV Corticoiden, diese haben das höchste anti-inflammatorische Potential. Der Einsatz dieser GC muss bei längerfristigem therapeutischem Einsatz noch intensiver überwacht werden, da ein sehr hohes Risiko der Atrophie besteht. Der längerfristige Einsatz aller GC wird durch die behandelnden Ärzte intensiv betreut, um bei ersten Indizien auf atrophische Veränderungen oder andere GC bedingte Nebenwirkungen intervenierend einwirken zu können.

1.6.1 Anti-inflammatorische Wirkung

Die GC reduzieren u.a. die Expression und Aktivität pro-inflammatorischer Cytokine. Unter physiologischen Bedingungen wird so eine Balance zwischen der zellspezifischen Abwehr und dem anti-inflammatorischen System des Körpers hergestellt. GC binden an den zytosolischen Glukocorticoidrezeptor (GR), welcher im inaktiven Zustand an einen heat-shock Proteinkomplex gebunden ist (Abb. 1.8). Nach Assoziation des GC an den Rezeptor dissoziiert der somit aktivierte GR vom „heat-shock“ Proteinkomplex und dimerisiert im

Cytoplasma. Durch Bindung aktivierter GR-Komplexe an „promotor responsive elements“ von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie activating protein-1 (AP-1) oder NF- κ B werden diese inaktiviert (de Bosscher et al., 2000; de Bosscher et al., 2003; Vanden Berghe et al., 1999). Glukocorticoide können aber auch durch Bindung an glucocorticoid response elements die Expression Cytokin inhibitorischer Proteine, wie dem NF- κ B Inhibitor (I κ B), steigern (Brattsand und Linden, 1996; Vanden Berghe et al., 1999; Lukiw et al., 1998). Die Cytokinsynthese wird somit sekundär, auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren, beeinflusst (Lukiw, W. et al., 1998).

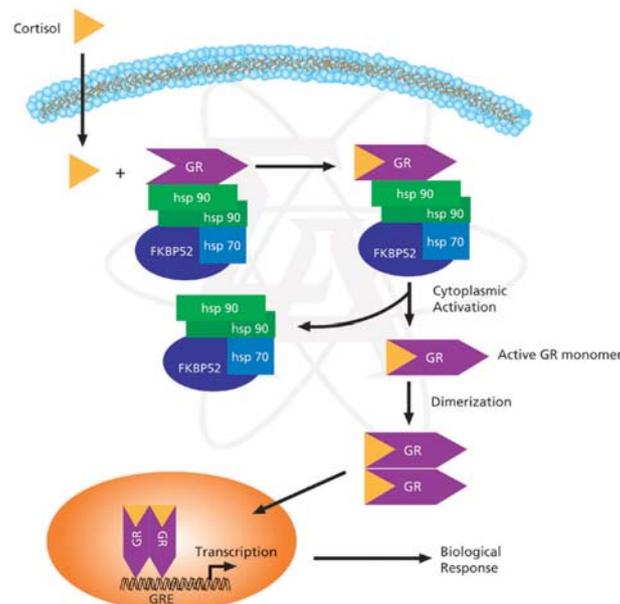


Abb. 1.8 Glukocorticoid Interaktion mit dem Glukocorticoidrezeptor und dem Glukocorticoidrezeptor response element

www.sigmaaldrich.com/.../Scientific_Resources/Pathway_Slides___Charts/Glucocorticoid_Receptor_Signaling.html

Eine weitere Möglichkeit die Cytokinkonzentration zu steuern, besteht in der Veränderung der Halbwertszeit der Cytokin-mRNA, welche destabilisiert werden kann (de Bosscher et al., 2003). Eine andere Regulationsvariante ist die Reduktion der Anzahl an Cytokinrezeptoren. Die GC Hydrocortison und Dexamethason wirken beispielhaft inhibitorisch auf die IL Synthese (Hettmannsperger et al., 1992). Einen etwas geringeren inhibitorischen Effekt hat

das Vitamin D₃ Analogon Calcitriol, welches in der Psoriasis­therapie Einsatz findet (Hettmannsperger et al., 1992). Die Vergleichsstudien zwischen primären Keratinozyten und HaCaT Zellen in Bezug auf Cytokininduktion nach UVB Bestrahlung und Inhibition der Cytokinsynthese durch verschiedene Glukocorticoide haben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zellspezies ergeben (Stein et al., 1997). Die Expression der untersuchten Cytokine wurde durch Glukocorticoidbehandlung herabgesetzt. Zu den in der Literatur häufig beschriebenen topischen Glukocorticoiden zählen u.a. Desoximethason (DM), Betamethason-17-valerat (BMV) und Prednicarbat (PC). Nach TNF α - Stimulation setzen die beschriebenen Glukocorticoide die IL-1 α Konzentration um 40% und die IL-6 Konzentration um 76% herab (Lange et al., 2000).

1.6.2 Atrophie

Neben der gewünschten anti-inflammatorischen Wirkung sind einige nachteilige Wirkungen mit GC assoziiert. Zu diesen zählt, dass nach langfristiger topischer Behandlung Hautverdünnung auftreten kann (Korting et al., 2002; Kolbe et al., 2001). Optimierung des „benefit-to-risk ratio“ ist somit eine wichtige Aufgabe innerhalb der Entwicklung neuer GC und der Modifikation bereits bestehender GC (Lange et al., 2000; Korting et al., 2002). Atrophische Veränderungen der Epidermis durch die Behandlung mit GC sind voraussichtlich auf Inhibierung der Proliferation und Veränderungen des Differenzierungsverhaltens von Keratinozyten zurückzuführen. Dermale Atrophie zeichnet sich durch GC vermittelte Inhibierung der Kollagenexpression aus (Görmar et al., 1990; Nuutinen et al., 2003). In vivo wurde gezeigt, dass Dexamethason, ein Klasse II GC, in Ratten sowohl die mRNA Konzentration als auch die Kollagen Typ I und Kollagen Typ III Konzentration deutlich reduzierte (Oishi et al., 2002). Aufgrund der Tatsache, dass diese Kollagentypen für die Vermittlung der dermalen Elastizität und Spannkraft verantwortlich sind, ist deren Rückgang eine mögliche Erklärung für die Striae Bildung (Abb. 1.9) bei Atrophie (Schackert et al.,

2000). Ein weiterer Aspekt dermalen Atrophie ist die deutliche Fragilität des Gewebes. Dexamethason reduzierte die Kollagen VII Promotoraktivität, dies könnte zur cutanen Fragilität beitragen (Gras et al., 2001).



A

B

Abb. 1.9 Striae Bildung nach topischer GC Behandlung

Zwei repräsentative Aufnahmen von Striae distensae im Bereich der Oberschenkel (A) und des linken Oberarms (B).

<http://www.dermis.net>

1.7 Arbeitshypothese

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden drei-dimensionale FTSMs auf Applikationsmöglichkeiten, sowohl in der pharmazeutischen Industrie als auch in der Wundversorgung, untersucht. Die morphologischen und die physiologischen Eigenschaften sollten dem in vivo Zustand so ähnlich wie möglich sein. Hierzu wurden die Expression und die Lokalisation von Differenzierungsmarkern und pro-inflammatorischen Enzymen und Cytokinen untersucht.

Zur Beurteilung der Homologie der humanen Haut und eines artifiziellen FTSMs wurden Histologien der Gewebe untersucht. Die FTSMs sollten, um als homolog der nativen Haut gelten zu können, ausgewählte Differenzierungsmarker an den der in vivo Situation

entsprechenden Stellen exprimieren. Ferner sollte nachgewiesen werden, dass diese auf inflammatorische Stimuli (UVB) mit deutlich erhöhter Cytokinsekretion reagieren.

Aufgrund der bereits beschriebenen Notwendigkeit, alternative Testverfahren zu Tierversuchen zu entwickeln, ergab sich die Fragestellung, ob das beschriebene FTSM geeignet ist GC spezifische Eigenschaften abzubilden. Sowohl die anti-inflammatorischen Eigenschaften als auch die Vermittlung atrophischer Veränderungen, der epidermalen und dermalen Strukturen der Haut, sollten untersucht werden.

Zur Analyse der GC, in Bezug auf anti-inflammatorische Wirkung, wurden die an inflammatorischen Reaktionen beteiligten Cytokine IL-6 und IL-8 auf Proteinebene im Elisa und immunhistochemisch an FTSM-Schnitten untersucht. Im Rahmen verschiedener Cytokin stimulierender Behandlungen mit UVB sollte herausgefunden werden, ob GC spezifische Unterschiede in Bezug auf die IL Konzentration, welche anhand von Monolayerstudien bereits beschrieben wurden (Stein et al., 1997; Lange et al., 2000), auch anhand des FTSMs nachweisbar sind.

Die Evaluation pharmakologischer Wirkstoffe, insbesondere von GC, beinhaltet neben den Untersuchungen der „beneficial factors“ auch die Beurteilung etwaiger Risiken und Nebenwirkungen. Bei GC ist insbesondere das nach längerfristiger topischer Anwendung erhöhte Risiko Hautverdünnung zu entwickeln, zu beachten. Zu den Kriterien atrophischer Veränderungen der Haut gehören die Abnahme der epidermalen Schichten und die Veränderung der Kollagensynthese. Beide Parameter dienen als Kriterien der Beurteilung von systemisch zugefügten und topisch applizierten GC.

Als Teilaspekt der Doktorarbeit wurde die sukzessive Angleichung des FTSMs an den in vivo Zustand bearbeitet. In diesem Zusammenhang wurden Melanozyten in das FTSM integriert

und ihre morphologische Stellung innerhalb des Modells untersucht. Hierbei wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Ferner wurde untersucht, welchen cytotoxischen Einfluss wiederholte inflammatorische Reize (UVB) auf das Melanozyten enthaltende FTSM haben. Hierzu wurde die Freisetzung des glykolytischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase, mittels eines im B-Labor etablierten Testverfahrens, bestimmt.

Aufgrund der bereits vorliegenden Erfahrungen autologer Epidermisäquivalente zur Therapie von Ulcera- und Verbrennungspatienten, ergab sich die Entwicklung eines autologen Vollhautäquivalentes. Hierzu wurde ein optimiertes Isolations- und Kultivierungsregime entwickelt. Als Qualitätskriterium wurde die Morphologie der Vollhautäquivalente bewertet. Diese Studie diente der prä-klinischen Phase der Wundversorgung von schweren Verbrennungen in Kooperation mit der Verbrennungsabteilung des Klinikums Offenbach unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Menke.

2. Material und Methoden

2.1 Entwicklung eines drei-dimensionalen Vollhautmodells (full thickness skin models, FTSMs)

2.1.1 Herstellung der Matrix

Als Trägermaterial der FTSMs diente bovines Kollagen Typ I (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland). Eine saure 1-prozentige Kollagen Typ I Lösung wurde in 24-well Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) nach einem, zur Patentierung durch Phenion (Düsseldorf, Deutschland) angemeldeten, Protokoll gefriergetrocknet (DE 10 2004 039 537 A1 and WO 2006 018147). Die Matrix wurde chemisch vernetzt und anschließend von zelltoxisch wirkenden Resten des Vernetzungsmittels gereinigt. Die in dieser Weise behandelten Matrices wurden zur Hautmodellkultivierung eingesetzt.

2.1.2 Isolation von primären Zellen zur Vollhautmodell Herstellung

Primäre Zellen wurden aus präputationalem Gewebe isoliert, welches von Spendern stammte, die das fünfte Lebensjahr noch nicht abgeschlossen hatten. Bereits im Operationssaal wurde das exzidierte Gewebe durch den Operateur in eine antibiotikahaltige Lösung überführt. Diese bestand aus D-MEM Hepes gepuffertem Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), welches mit 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco), 1% Gentamycin-Lösung (Gibco) und 1% Amphotericin-Lösung (Biochrome, Berlin, Deutschland) supplementiert wurde. Das Gewebe wurde bis zu seiner Aufarbeitung darin aufbewahrt. Über einen Zeitraum von 6h wurde es bei 6-8 maligem Waschlösungsaustausch (antibiotikahaltige Lösung, siehe oben) gereinigt. Die Epidermis wurde mit sterilen Skalpelln eingeschnitten und alternativ in eine Petrischale, die eine 0,25/0,125 prozentige Trypsin/EDTA (T/E) Lösung (Gibco) bzw. eine 70U/ml Thermolysin Lösung (Serva, Heidelberg, Deutschland) enthielt, überführt. Die

epidermale-dermale Junktion wurde durch diesen 15 stündigen Inkubationsschritt bei 4°C gelöst. Epidermis und Dermis wurden mechanisch mit sterilen Pinzetten separiert. Die epidermalen Zellen wurden 20 Minuten in einer 0,5% Trypsin/1mM EDTA Lösung (Gibco) bei 37°C inkubiert und die Zellverbände vereinzelt. Die enzymatische Reaktion wurde mit dem gleichen Volumen der eingesetzten T/E Lösung durch FKS gestoppt. Die bei 1.500xg für 10 Minuten in einer Standzentrifuge (Eppendorf 5804 R, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) abzentrifugierte Zellsuspension wurde in KBM-2 Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) - für Keratinozytenkulturen - oder in M-2 Medium (PromoCell) - für Melanozytenkulturen - aufgenommen. Zellen deren Zellmembran beschädigt war, wurden durch Trypanblau (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) angefärbt. Somit wurde die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt. Es wurden $4 \cdot 10^5$ epidermale Zellen/cm² in Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) angesät.

Primäre Fibroblasten wurden aus dem dermalen Anteil des Präputiums isoliert. Hierzu wurden dermale Stücke alternativ für 4h-24h bei 37°C in einer 70U/ml Kollagenase-Lösung (Serva) inkubiert. Alternativ wurden ca. 25mm² große Dermisstücke auf mit FKS (PAA, Heidelberg, Deutschland) vorbeschichtete 25cm² Zellkulturflaschen (Nunc) aufgebracht. Die Zellkulturflaschen wurden für 16h senkrecht in begasbaren 37°C, 5% CO₂ Inkubatoren (Heraeus, Hanau, Deutschland), mit einem Medienvolumen von 1ml Fibroblasten Medium, gelagert. Das Fibroblasten Medium bestand aus GlutaMAX Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (D-MEM, Gibco) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum, 1 mM Ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen behutsam, um Ablösen der Dermisstücke zu verhindern, horizontal gelegt. Nach weiteren 3h wurden 5ml Fibroblastenmedium hinzugefügt. Aus den aufgeklebten Dermisstücken wanderten Fibroblasten in einem ca. 3 Wochen dauernden Kultivierungszeitraum aus.

2.1.3 Kultivierung der primären Zellen

Die aus präputonalem Gewebe bzw. Spalthautgewebe gewonnenen, primären Zellen adhärten nach 2-4 Tagen. Zelltrümmer und nicht adhärente Zellen wurden aus dem Kultivierungssystem durch einen einmaligen Waschschrift mit PBS⁺⁺ entfernt. Medienaustausch erfolgte alle 2 Tage. Beim Passagieren der Zellen wurde das alte Kulturmedium verworfen. Durch Waschen mit 5-10ml PBS w/o Ca²⁺ und Mg²⁺ wurden Mediumreste entfernt. Die Zugabe einer, sowohl den Calcium- und Magnesiumchelator EDTA als auch Trypsin enthaltenden Lösung, diente sowohl dem Lösen der extrazellulären calcium- und magnesiumabhängigen Cadherin und Integrin vermittelten Zelladhäsionen als auch dem Lösen der Peptidverbindungen zwischen Kulturschalen-Boden und den Zellen. Die primären Fibroblasten wurden 2-3 Minuten mit einer 0,5% Trypsin/1mM EDTA Lösung (Gibco) bei 37°C im unbegasbaren Brutschrank inkubiert. Primäre Keratinozyten wurden 4-8 Minuten mit der genannten T/E Lösung im Brutschrank inkubiert. Die mikroskopische Kontrolle bestimmte den Zeitpunkt an dem sich die Zellen von dem Zellkulturflaschen-Boden gelöst hatten. Zur Inaktivierung der T/E Lösung wurde das gleiche Volumen des zellkulturspezifischen Mediums zugegeben. Die Zellen wurden suspendiert und bei 1.200xg für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die vitale Zellzahl mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammern bestimmt. Im Rahmen des Passagierens wurden 3*10³ Zellen/cm² angesät.

2.2 Hautäquivalent Herstellung

2.2.1 Kultivierungsprotokoll des FTSMs

Chemisch quervernetzte Kollagenmatrices wurden 10mal über einen Zeitraum von 4 Tagen mit PBS⁺⁺ gewaschen, um Reste des Vernetzungsmittels zu entfernen bevor die Matrices 18h mit Fibroblasten-Medium equilibriert wurden. Primäre Fibroblasten der Passage 3 bis 5 wurden in einer Zelldichte von $3 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$ Zellen/cm³ in 1ml Medium ausgesät. Medienwechsel erfolgte 48h nach Zellaussaat zum ersten Mal. Im Folgenden wurde das Medium für die 14tägige Fibroblasten-Phase 6mal pro Woche ersetzt. Anschließend wurden primäre Keratinozyten in einer Zelldichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/cm³ in 1ml Medium auf die Fibroblasten enthaltende Matrix ausgesät. Während der 7tägigen submersen Kultivierung wurde das Keratinozyten-Medium, das zur Kultivierung des Hautmodelles verwendet wurde, täglich ausgetauscht. In der abschließenden 14tägigen Kultivierungsphase wurden die FTSMs auf Filterpapiere überführt und an der Air-Liquid-Interface (ALI) mit ALI-Medium kultiviert. Zur Herstellung des ALI-Mediums wurde GlutaMax D-MEM und Ham's F12 (PAA) (3:1) mit 1.6mg/ml bovinem Serumalbumin, 0.4µg/ml Hydrocortison, 0.12IU/ml Insulin, 1mM Ascorbinsäure-2-phosphat (Sigma-Aldrich), und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco) supplementiert. Medienwechsel erfolgte in dieser Phase alle 2 Tage. Die gesamte Kultivierung erfolgte in 5% CO₂ Inkubationsschränken bei 37°C.

2.2.2 Melanozyten Hautmodell

Um das Hautmodell dem in vivo Zustand anzunähern, wurden primäre Melanozyten integriert. Hierzu wurden $3 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$ primäre Fibroblasten/cm³ der Passage 3 bis 5 in 1ml Medium in die quervernetzte Matrix eingesät. Nach der 14tägigen submersen Fibroblasten-Kultivierungsphase wurden primäre Keratinozyten und Melanozyten in einer Zelldichte von

jeweils $4 \cdot 10^5$ Zellen/cm³ in 1ml M-2 Medium aufgebracht. Während der 7tägigen submersen Kultivierung wurde das Keratinozyten/Melanozyten-Medium (1:1), das zur Kultivierung des Hautmodelles verwendet wurde, täglich ausgetauscht. In der abschließenden 14tägigen Kultivierungsphase wurden die FTSMs auf Filterpapiere überführt, wie unter „Kultivierungsprotokoll des FTSMs“ beschrieben, kultiviert.

2.3 Einsatz des drei-dimensionalen FTSMs zur Analyse inflammatorischer und anti-inflammatorischer Reaktionen

2.3.1 Induktion inflammatorischer Cytokine

Zur Untersuchung anti-inflammatorischer Wirkung verschiedener Substanzen wurde primär ein inflammatorischer Reiz gesetzt. Hierzu wurden stratifizierte FTSMs mittels einer Waldmann UV 3003K Bestrahlungskabine (Waldmann, Villingen-Schwenningen, Deutschland) mit unterschiedlichen UVB Intensitäten bestrahlt. Die Emissionswellenlänge lag zwischen 285nm und 350nm mit einem Maximum bei 310-315nm. Vor der Behandlung wurde das Kulturmedium durch PBS⁺⁺ ausgetauscht, um die Bildung phototoxischer Produkte innerhalb des Mediums zu verhindern. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde PBS⁺⁺ durch neues, unverbrauchtes Kulturmedium ersetzt. 24h nach der inflammatorischen Induktion wurde das Kulturmedium auf Eis in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und nach der Entfernung etwaiger Zelltrümmer, durch 10minütige Zentrifugation bei 1.200xg und 4°C, aliquotiert und bei -80°C bis zu deren Analyse gelagert. Die Hautmodelle wurden zwecks histologischer Analysen alternativ in 4,5% Formalin fixiert oder in TissueTek[®] (Jung, Deutschland) bei -80°C konserviert.

2.3.2 Systemische Glukocorticoidzugabe

Stratifizierte und differenzierte FTSMs wurden, wie unter „Induktion inflammatorischer Cytokine“ beschrieben, mit 100-250mJ/cm² UVB bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde das zur Verfügung stehende PBS⁺⁺ durch 20µM Betamethason-17-valerat enthaltendes Kulturmedium ersetzt. Die Endkonzentration wurde durch Verdünnung des in DMSO gelösten Betamethason-17-valerates in Kulturmedium erreicht. Dementsprechend wurde DMSO als Lösungsmittelkontrolle, in der Endkonzentration der Betamethason-17-valerat Probe, eingesetzt. 24h nach der Bestrahlung wurde das Kulturmedium auf Eis in Zentrifugenröhrchen überführt, die zellfreien Medien aliquotiert und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Die Hautmodelle wurden wie unter „Fixierung der Hautmodelle“ beschrieben fixiert und histologisch und immunhistologisch analysiert.

2.3.3 Topische Steroidbehandlung

Glukocorticoide (GC) werden unter dermatologischen Gesichtspunkten hauptsächlich topisch appliziert. Nach inflammatorischer Induktion durch UVB Bestrahlung wurden 15µl GC-haltige Creme mit einem Transferpettor[®] (Brand, Wertheim, Deutschland) auf die FTSMs aufgetragen. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass die applizierte Creme homogen auf der gesamten Oberfläche des Hautmodelles verteilt wurde, ohne dessen Oberfläche zu verletzen oder während der Applikation Druck auszuüben. Die mechanische Irritation durch Substanzapplikation wurde somit minimiert. Analysiert wurden Betnesol[®] (0,1% Betamethason-17-valerat, klinikseigene Apotheke), Alfason[®] (0,1% Hydrocortison-17-butytrat, Astellas, München, Deutschland), Dermatop[®] (0,25% Prednicarbat, Aventis, Frankfurt, Deutschland), Advantan[®] (0,1% Methylprednisolonaceponat, Intendis, Berlin, Deutschland), Ecural[®] (0,1% Mometasonfuroat, Essex Pharma, München, Deutschland), Diprosis[®] (0,064% Betamethasondipropionat, Essex Pharma). Ferner wurden die beiden Vitamin D Analoga Psorcutan[®] (0,005% Calcipotriol, Intendis) und Psorcutan[®] Beta

(0,005% Calcipotriol, 0,05% Betamethason, Intendis) untersucht. Wirkstofffreie Cremes (DAC[®], klinikseigene Apotheke; Dermatop Basissalbe[®], Aventis) dienten als interne Kontrolle der topischen Applikation. Entsprechend dem unter „Induktion inflammatorischer Cytokine“ beschriebenen Verfahren der Probengewinnung wurden 24h post Stimulation die Kulturmedien auf Eis entnommen und zellfrei bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Die FTSMs wurden zur histologischen Analyse, wie unter „Fixierung der Hautmodelle“ beschrieben, in Formalin fixiert.

2.3.4 Bestimmung der Interleukin (IL) Konzentration

Die Konzentration der IL wurde mit Interleukin enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) der Firmen Bender MedSystems (Wien, Österreich) und R&D (Wiesbaden, Deutschland), den Herstelleranweisungen folgend, im Kulturmedium bestimmt. 96-well Immunosorp (Nunc) Mikrotiterplatten wurden mindestens 16h bei Raumtemperatur oder 4°C (je nach Hersteller) mit mouse anti-human IL beschichtet. Unspezifische Bindungen wurden durch 2h Inkubation mit einem Blocking Puffer bei Raumtemperatur gestoppt. Nicht gebundene Primärantikörper wurden durch viermaliges Waschen mit den von den Herstellern empfohlenen Waschpuffern entfernt. Im Folgenden wurden Standards und die zu analysierenden zellfreien Kulturmedien aufgetragen und für 2h bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplattenschüttler MS1 Minishaker (IKA, Staufen, Deutschland) inkubiert. Nach Entfernen nicht gebundenen Proteins durch den Waschpuffer wurde der biotinierte goat anti-mouse Sekundärantikörper zugegeben. Nun erfolgte eine weitere zweistündige Inkubation mit einer Streptavidin-Horse-Radish-Peroxidase (HRP) Lösung. Die am ELISA-Reader (MR 5000, Dynatech, Ashford, UK) gemessene Farbreaktion wurde durch Zugabe von Tetra-Methyl-Blau (TMB) gestartet und nach ausreichender Farbentwicklung mit Schwefelsäure, der vom Hersteller empfohlenen Normalität, gestoppt. Am ELISA-Reader

wurde die optische Dichte bei der spezifischen Wellenlänge 450nm gegen die Referenzwellenlänge 650nm gemessen.

2.4 Einsatz drei-dimensionaler Hautmodelle zur Evaluation atrophischer Veränderungen der Haut infolge langfristiger GC-Behandlung

2.4.1 Systemische Langzeitbehandlung mit GC

Die Charakterisierung von GC beinhaltet neben der Evaluation des anti-inflammatorischen Potentials auch Untersuchungen in Bezug auf Risikofaktoren. Hierzu sind Langzeitstudien, insbesondere die Ausprägung des vermittelten Atrophierisikos betreffend, durchzuführen. Der Aspekt der epidermalen Verdünnung kann anhand von Hautmodellen, unter anderem durch histologische Beobachtung während der Behandlung, beurteilt werden. Differenzierte FTSMs wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen mit GChaltigen Medien kultiviert. Alle 2 Tage erfolgte der Austausch der Kulturmedien, welche alternativ 20µM Betamethason-17-valerat, 20µM Prednicarbat, 20µM Hydrocortison, 0,3% Ethanol oder keinen Wirkstoff enthielten. Stocklösungen der verwendeten GC wurden in 96% Ethanol hergestellt und mit ALI Medium auf die Endkonzentration verdünnt. Als interne Kontrolle wurde Ethanol, in der den GC entsprechenden Endkonzentration, verwendet. Zur Beurteilung des Einflusses der systemisch zugesetzten GC wurden vor Beginn und am letzten Tag der Versuchsphase Hautmodelle fixiert, eingebettet und geschnitten. Die Anzahl der epidermalen Zellschichten (Stratum basale bis Stratum granulosum) wurde anhand von Hämatoxylin/Eosin (H/E) gefärbten Schnitten ermittelt. Pro Versuchskondition und Behandlungstag wurden die epidermalen Zellschichten an 8 nicht aufeinanderfolgenden Schnitten an 15 Stellen ausgezählt. Die relative Veränderung der Anzahl epidermaler Zellschichten ergab sich aus der Korrelation der ermittelten Zahlen der einzelnen Versuchskonditionen vor Versuchsbeginn und nach Ende des Versuches.

2.4.2 Topische Langzeitbehandlung mit GC

Die GC bedingten epidermalen Veränderungen der Morphologie, insbesondere der epidermalen Dicke, konnten anhand eines Hautmodelles in vitro nachgestellt werden. Über einen Zeitraum von 6-14 Tagen wurden alle 2 Tage 15µl Creme mit einem Transferpettor[®] apikal auf ausdifferenzierte FTSMs aufgetragen. Die Anzahl der epidermalen Zellschichten wurde vor Beginn des Versuches und zu diversen Zeitpunkten während der Behandlung bestimmt. Zur direkten Korrelation der epidermalen Zellschichten einer Versuchsbedingung wurden zu jedem Fixierungszeitpunkt Proben aus demselben Hautmodell entnommen. Die im Folgenden aufgetragene Crememenge wurde der noch zur Verfügung stehenden Hautmodellgröße angepasst. Es wurden folgende GC-Cremes untersucht Betnesol[®] (0,1% Betamethason-17-valerat), Alfason[®] (0,1% Hydrocortison-17-butytrat), Dermatop[®] (0,25% Prednicarbat), Advantan[®] (0,1% Methylprednisolonaceponat), Ecural[®] (0,1% Mometasonfuroat), Diprosis[®] (0,064% Betamethasondipropionat). Desweiteren wurden die beiden Vitamin D Analoga Psorcutan[®] (0,005% Calcipotriol) und Psorcutan[®]Beta (0,005% Calcipotriol, 0,05% Betamethason) und die wirkstofffreien Cremes DAC[®] und Dermatop Basissalbe[®], welche als interne Kontrolle der topischen Applikation dienen, verwendet.

2.4.3 Kollagensynthese

2.4.3.1 Stimulation der Kollagensynthese

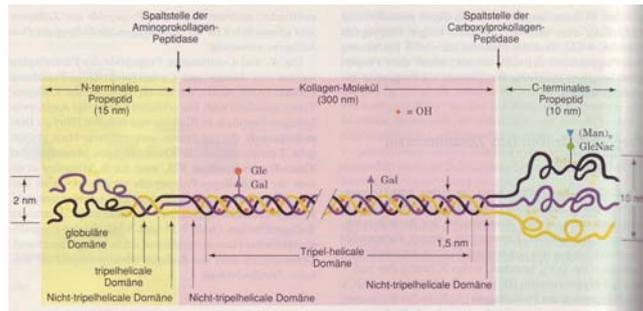
Die Kollagensynthese kann durch diverse Faktoren beeinflusst werden. Hierzu zählen unter anderem Vitamin C und GC. Die Kollagensynthese wurde an primären Fibroblasten und FTSMs untersucht. In den Monolayerstudien wurden $1 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in 1ml Kulturmedium in 24-well Platten (Nunc) eingesät. Nach 24h erfolgte Medienwechsel mit Medien die entweder Vitamin C oder GC enthielten. Medienüberstände wurden 24h, 48h, 72h und 96h

nach Stimulatorenzugabe entnommen. Zur Kollagensynthese-Bestimmung des FTSMs während der submersen Kultivierungsphase und im Zuge der Untersuchungen der Wirkung von GC im Langzeiteinsatz (siehe „Langzeitbehandlung mit Glukocorticoiden topisch“) wurde parallel zu den Medienwechseln jeweils ein Aliquot des Kulturmediums entnommen. Die zellfreien Überstände der entnommenen Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

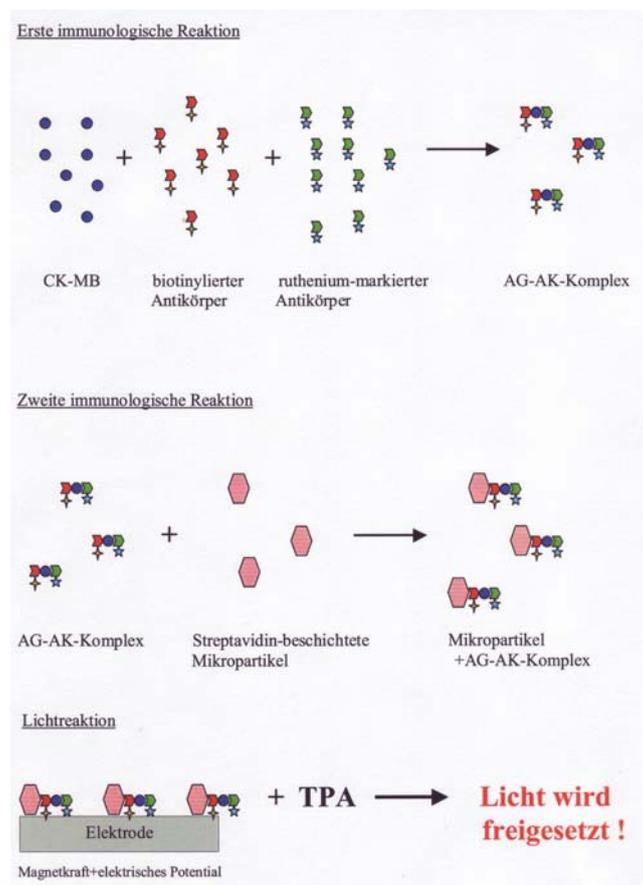
2.4.3.2 P1NP Bestimmung

Die zur Analyse der Kollagensynthese entnommenen Zellkulturmedien wurden mit dem P1NP Assay (Roche Pharmaceuticals, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) am Elecsys 1010 (vollautomatisches Random-Access Analysesystem; Roche Pharmaceuticals) untersucht. Die P1NP (Abb.2.1 A) Konzentration kann im Bereich von 0,15-500ng/ml bestimmt werden, da der Elecsys das Messprinzip der Elektrochemolumineszenz (ECL) nutzt. Die Probenanalyse erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Der ECL Reaktion ging ein Sandwich Test voraus. Hierzu wurden die zu analysierenden Zellkulturmedien in spezielle Elecsysprobengefäße überführt. Den Proben wurden biotiniliertes anti-P1NP und Ruthenium gekoppelte anti-P1NP Antikörper zugesetzt. Beide Antikörper banden an das in der Probe enthaltene P1NP. Im folgenden Reaktionsschritt wurden mit Streptavidin vorbeschichtete Mikropartikel hinzugefügt. An diese band der P1NP-Komplex. Das Reaktionsgemisch mit dem Immunkomplex wurde in die Messzelle gesaugt, wo der Immunkomplex sich durch die Wirkung eines Magneten an die Elektrode anlagerte. Ungebundene Immunkomplexe und Reagenzlösungen wurden durch mehrmalige Waschschriffe aus der Messzelle entfernt. Dem Messsystem wurde Tripopylamin (TPA) zugefügt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurde das ebenfalls an die Elektrode gebundene TPA angeregt und es entstanden TPA-Radikale. Der Ruthenium-Komplex wurde oxidiert. Die Reduktion des Ruthenium-Kations durch das TPA-Radikal überführte das Ruthenium-Kation in einen energiereichen

unstabilen Zustand. Durch Abgabe eines Licht-Photons der Wellenlänge 620nm gelangte dieses wieder in den Grundzustand. Diese Chemolumineszenz wurde mit einem Photomultiplier gemessen (Abb. 2.1 B). Die P1NP Konzentration der Proben wurde anhand der mitgeführten P1NP Konzentrationsreihe definiert.



A



B

Abb. 2.1 Bestimmungsprinzip der P1NP-Analyse

Schematische Darstellung des Kollagen-Propeptides (A) und der Messmethode des Elecsys (B).

Modifiziert nach Langenbrink, 2002.

2.5 Die Einflussnahme von UVB und α -MSH auf die Induktion von Zellschäden

2.5.1 Screening von Zellschäden bei Melanozytenmodellen nach

UVB Stimulation

Ausdifferenzierte Melanozytenmodelle wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen 5mal pro Woche entweder mit 50-400mJ/cm² UVB bestrahlt oder es wurde α -MSH, in einer Endkonzentration von 50 μ M bzw. 100 μ M, dem Medium zugesetzt. Vor Austausch des Kulturmediums wurde jeweils 1ml des Mediums abgenommen. Die Proben wurden um Zellreste zu entfernen 10 Minuten bei 1.200xg und 4°C zentrifugiert. Die zellfreien Medien wurden aliquotiert und bis zur Analyse der Cytotoxizität der Behandlung bei 4°C gelagert.

2.5.2 Cytotoxizitätstest

Als Kriterium der Cytotoxizität und der Zellschädigung wurde das intrazelluläre Enzym Lactat-Dehydrogenase ausgewählt. Die bei 4°C gelagerten zellfreien Medien wurden auf Raumtemperatur gebracht und den Anweisungen des Cytotoxizitätstests (Roche Pharmaceuticals, Mannheim, Deutschland) entsprechend analysiert. Im Folgenden wurden jeweils 100 μ l des zellfreien Überstandes in transparente 96-well Mikrotiterplatten überführt. Die in den Proben enthaltene Lactat-Dehydrogenase wandelte das zugesetzte Lactat, unter NAD⁺ Reduktion zu NADH + H⁺ und Pyruvat, um. Das entstandene NADH + H⁺ wurde, in der durch das hinzugefügte Diaphorase-Enzym katalysierten Reduktion des Tetrazolium Salzes (INT), zu Formazan und NAD⁺ oxidiert. Die LDH Konzentration wurde über die Absorptionsmessung des Formazans bei 500nm an einem ELISA Reader (Dynatech, Ashford, UK) bestimmt.

2.6 Histologische Beurteilung

2.6.1 Fixierung der Hautmodelle

Die Beurteilung der Morphologie der FTSMs erfolgte sowohl an Paraffin- als auch an Kryoschnitten. Die für Paraffinschnitte zu verwendenden Hautmodelle wurden in Einbettkassetten überführt und mindestens 24h in 4,5% Roti[®] Histofix (Carl Roth) fixiert. Im Folgenden wurden sie mittels des Shandon Hypercenter XP (Cheshire, UK) dehydriert und am Tissue Tek Embedding Center (Vogel, Gießen, Deutschland) in Paraffin eingebettet. Im Einzelnen wurden die Hautmodelle in einer ansteigenden Alkoholreihe dehydriert und abschließend in flüssigem Paraffin bis zum Einbetten aufbewahrt. Die eingebetteten Hautmodell-Paraffinblöckchen wurden bei Raumtemperatur gelagert. Die als Kryopräparate aufgearbeiteten FTSMs wurden mit einem Skalpell zerteilt und unmittelbar nach Probenentnahme in Kunststoff Einbettgefäße (Tissue-Tek Cryomold Standard, Sakura, Torrance, USA) überführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Hautmodelle senkrecht in den Einbettgefäßen angeordnet waren und somit die Schnittfläche zum Boden des Gefäßes zeigte. Die Hautmodelle wurden mit Tissue Freezing Medium (Jung, Nussloch, Deutschland) bedeckt, bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.6.2 Schneiden der Hautmodelle

2.6.2.1 Paraffinschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Hautmodelle wurden auf -6°C abgekühlt, damit das Hautmodell umschließende Paraffin erhöhte Festigkeit erhielt und somit die Schneideeigenschaften optimiert wurden. Die Präparate wurden an einem Mikrotom RM2125 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) geschnitten. Die 5µm dicken Schnitte wurden in das mit 50°C warmem Wasser gefüllte Paraffinstreckbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)

überführt. Die Schnittstreckerlösung Stick-on (Labonord, Templemars, Frankreich) diente dazu, die Schnitte zu glätten. Die Schnitte wurden mit feinen Pinseln auf den SuperFrost Objektträgern (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland), welche im Wasserbad unter die Schnitte geführt wurden, ausgerichtet. Nach Antrocknen der Schnitte wurden diese entweder, wie unter „Hämatoxilin/Eosinfärbung“ beschrieben, weiterbehandelt oder in Objektträgermappen bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.2.2 Kryoschnitte

Kryoschnitte wurden an einem Kryostaten CM 1900 (Leica, Nussloch, Deutschland) hergestellt. Die in Einbettgefäßen eingefrorenen Hautmodelle wurden etwas erwärmt, um sie auf Probenteller zu überführen. Die Proben wurden auf dem Probenteller mit Tissue Freezing Medium fixiert. Die Besonderheit dieses speziellen Einbettmediums ist, dass es bei Raumtemperatur flüssig ist und bei -26°C erstarrt. Die $8\mu\text{m}$ dicken Gefrierschnitte wurden auf SuperFrost Objektträger überführt und bei Raumtemperatur getrocknet. Bei direktem Einsatz wurden die Gefrierschnitte unmittelbar nach dem Schneiden in immunhistochemischen Färbungen eingesetzt. Die längerfristige Aufbewahrung von Gefrierschnitten erfolgte bei -20°C oder -80°C in kälte- und feuchtigkeitsbeständigen Mappen.

2.7 Einsatz eines autologen drei-dimensionalen Hautäquivalentes zur

Behandlung schwerer Verbrennungen

2.7.1 Isolation von primären Zellen zur Herstellung eines autologen

Hautäquivalentes

Zur Herstellung autologer Hautäquivalente wurden epidermale und dermale Zellen aus 1cm^2 großen Spalthautstücken isoliert. Mittels eines Dermatoms (Nouvag, Goldach, Schweiz) wurden $0,5\text{mm}$ dicke und 1cm^2 große Hautstücke von Patienten aus verschiedenen

Körperregionen (Abdomen, Oberschenkel, Thorax) entnommen. Nach intensivem Reinigen der Spalthautstücke in antibiotikahaltiger Waschlösung wurden diese in Thermolysin (Serva) enthaltende Petrischalen überführt. Hierbei war darauf zu achten, dass die dermale Seite der Hautstücke in der Lösung lag und die epidermale Seite nicht von der Lösung überspült wurde. Nach 14-15stündiger Inkubation bei 4°C wurden Epidermis und Dermis mechanisch separiert. Die Epidermis wurde in kleine Stücke geschnitten und für 20 Minuten in einer 0,25 prozentigen T/E Lösung bei 37°C inkubiert. Trypsinierung wurde durch Zugabe des äquivalenten Volumens FKS gestoppt. Primäre Fibroblasten wurden nach 2-4stündiger Inkubation in 70U/ml Kollagenase bei 1.500xg abzentrifugiert und nach Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in einer Zelldichte von $8 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in Zellkulturflaschen angesät.

2.7.2 Matrixbeschreibung

Die aus Rinderkollagen bestehende gefriergetrocknete Matrix war in verschiedenen Modifikationen von der Firma Skin&Health Care Dr. Suwelack (Billerbeck, Deutschland) erhältlich. Nach Rücksprache mit den Kooperationspartnern wurde Matriderm[®] mit Elastin (10cm x 10cm und 1mm dick) ausgewählt. Durch die ausgewählte Größe wird die Abdeckung einer größeren Fläche mit einem einzigen Hautäquivalent erleichtert. Bei der Auswahl des Matrixdurchmessers wurde darauf geachtet, dass Formstabilität des Produktes zu jedem Zeitpunkt gewährleistet war, und dass die Epidermis zu jedem Zeitpunkt der submersen Kultivierung auf dem Boden der Zellkulturgefäße befestigt war.

2.7.3 Kultivierungsprotokoll

Die unter sterilen Bedingungen gelieferte Matrix Matriderm[®] wurde für 5 Minuten in Fibroblastenmedium equilibriert. Dieser Inkubationsschritt diente dazu, die Matrix vollständig mit Medium zu bedecken und zu durchdringen. Zur Evaluation der optimalen Zelldichte wurde die Matrix zugeschnitten und in 6-well Schalen (Nunc) überführt. Primäre Fibroblasten

der Passage 1 bis 3 wurden in einer Zelldichte von $9 \cdot 10^5$ - $15 \cdot 10^5$ Zellen/cm³ in 3ml/cm³ Kulturmedium ausgesät. Medienwechsel erfolgte 48h nach Zellaussaat zum ersten Mal. Im Folgenden wurde das Medium während der submersen Fibroblasten-Kultivierungsphase 5mal pro Woche erneuert. Anschließend wurden primäre Keratinozyten in einer Zelldichte von $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/cm³ in 3ml/cm³ Kulturmedium auf die mit Fibroblasten besiedelte Matrix ausgesät. Während der 7tägigen submersen Kultivierungsphase der Keratinozyten wurde das Keratinozyten-Medium, das zur Kultivierung des Hautäquivalentes verwendet wurde, täglich ausgetauscht. In der abschließenden bis zu 14 Tage dauernden Kultivierungsphase wurden die Hautäquivalente auf Filterpapiere überführt und an der Air-Liquid-Interface mit ALI Medium kultiviert. In dieser Phase wurde das Medium alle 2 Tage ersetzt. Die gesamte Kultivierung erfolgte bei 37°C in Inkubationsschränken, deren CO₂ Gehalt auf 5% eingestellt war.

2.7.4 Aufbereitung der Proben für rasterelektronenmikroskopische

Aufnahmen

Zur rasterelektronenmikroskopischen Analyse der Hautäquivalente wurden diese 1h bei Raumtemperatur in 2,5% Glutaraldehyd (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Im Folgenden wurden die Proben 3mal 30 Minuten in 0,1M Phosphat-Puffer pH 7,2 gewaschen. Die Entwässerung der Proben wurde mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, absolut), jeweils für 10 Minuten, erreicht. Abschließend wurden die Proben mit Hexamethyldisilazan (VWR, Darmstadt, Deutschland) beschichtet und in einem Exikator getrocknet.

2.7.5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Analysen der Oberflächenstruktur der Hautäquivalente erfolgten am Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-4500 (Hitachi, Oberhausen, Deutschland). Hierzu wurden die Proben, wie unter „Aufarbeitung der Proben für rasterelektronenmikroskopische

Aufnahmen“ dargestellt, fixiert. Dem Prinzip, dass nur leitende Oberflächen im Rasterelektronenmikroskop dargestellt werden können, wurde Rechnung getragen, indem die mit einem Kohlekleber auf Aluminium-Probentellern fixierten Proben im Sputter Coater (Agar-Scientific, Stansted, UK) mit Gold besputtert wurden. Unter Hochvakuum wurden die aus einer Wolfram-Glühkathode im Wehnelt-Zylinder stammenden Elektronen zu einer gesättigten Wolke konzentriert. Das Anlegen einer Hochspannung zwischen Kathode und Anode bewirkte die Bildung eines distinkten Elektronenstrahls, welcher mit Hilfe von Magnetspulen abgelenkt und gebündelt wurde. Der gebündelte Elektronenstrahl wurde in XY-Richtung über die Probenfläche geführt. Die auf die mit Gold bedampften Oberflächenstrukturen der Probe treffenden Elektronen wurden abgelenkt bzw. bewirkten das Ablösen von Sekundärelektronen von der Probe. Diese wurden vom Sekundärelektronendetektor registriert und verstärkt. Bei einem Rasterelektronenmikroskop sind das signalerzeugende, d.h. der Elektronenstrahl, der die Probe scannt, und das signalverarbeitende System voneinander getrennt. Auf diese Weise entsteht ein indirektes Bild. Dies stellt sich folgendermaßen dar: synchron zu dem Elektronenstrahl der über die Probe geführt wird, wird der Elektronenmikroskop Tubus permanent gescannt. Die vom Detektor aufgefangenen und vom Verstärker intensivierten Elektronen, regulieren die Intensität des auf dem angeschlossenen Monitor entstehenden Bildpunktes. Je mehr Elektronen von der Probenfläche reflektiert und als Sekundärelektronen herausgelöst werden, umso heller erscheint der Datenpunkt auf dem Monitor. Auf diese Weise entsteht eine topographische Darstellung der Oberfläche der analysierten Proben, welche mit dem Digital Image Processing System (Point Electronics, Halle, Deutschland) aufgenommen wurde.

2.8 Morphologische Beurteilung der Hautmodelle

2.8.1 Aufarbeitung der in Paraffin eingebetteten Schnitte zur immunhistochemischen Analyse

Die Hautmodellschnitte wurden 15 Minuten bei 65°C in einem Heißluftinkubator getrocknet. Im Folgenden wurden sie in vier jeweils 10minütigen Xylol-Inkubationsschritten entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe, 2mal 5 Minuten Isopropylalkohol, 2mal 5 Minuten 96% Ethanol und 1mal 5 Minuten 70% Ethanol, rehydriert. Abschließend wurden die Hautmodellschnitte 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Die Weiterbehandlung der Schnitte erfolgte gemäß den Angaben der Antikörperhersteller.

2.8.2 Aufarbeitung der Gefrierschnitte zur immunhistochemischen Analyse

Gefrierschnitte trockneten 10 Minuten bei Raumtemperatur, um einen Verlust der Schnitte während der 10minütigen Inkubation in 4°C Aceton zu verhindern. Dieses wurde in drei jeweils 5minütigen Waschschritten in PBS⁺⁺ entfernt und die Primärantikörper aufgetragen.

2.8.3 Hämatoxilin/Eosinfärbung

Zur histologischen Beurteilung wurden Paraffin-eingebettete FTSM-Schnitte 30 Minuten bei 65°C in einem Inkubator getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Probenschlitten des Varistain 24-4 (Shandon, Cheshire, UK) überführt. Die Schnitte wurden entparaffiniert, indem die Schnitte 2mal 10 Minuten und 1mal 5 Minuten in Xylol inkubiert wurden. Diesen Xylolschritten folgten 2 jeweils 2minütige Inkubationen in Isopropylalkohol und eine abschließende 2minütige Inkubation in 96% Ethanol. Bevor die Schnitte 7 Minuten in Hämatoxilin gefärbt wurden, wurden diese 2 Minuten in Wasser gewaschen, um die Alkoholreste zu entfernen. Im Folgenden wurden die Schnitte 2 Minuten in Wasser, kurz in HCl-Alkohol und weitere 4 Minuten in Wasser gewaschen. Dem 30 Sekunden dauernden

96% Ethanol-Schritt, schloss sich ein 30 Sekunden dauernder Färbeschritt in Eosin (alkoholisch) an. Die Schnitte wurden nun entwässert indem sie 3 Minuten in 96% Ethanol, 2mal 2 Minuten in Isopropylalkohol und 2mal 10 Minuten in Xylol inkubiert wurden. Eindecken der Schnitte erfolgte automatisch an der Eindeckstation Consul (Shandon).

2.9 Immunhistochemie

2.9.1 Lokalisation von Interleukin-6 am FTSM

Zur Lokalisation von IL-6 im Hautmodell wurde rabbit anti-human IL-6 (Upstate, Billerica, USA) eingesetzt. Paraffinschnitte wurden, wie unter „Aufarbeitung der in Paraffin eingebetteten Schnitte zur immunhistochemischen Analyse“ beschrieben, aufgearbeitet. Die Hautmodellschnitte wurden in Feuchtenkammern überführt und 1h bei 37°C mit rabbit anti-human IL-6 (1:100) inkubiert. Nach 3 jeweils 10 Minuten dauernden Waschschritten wurde HRP-konjugierte goat anti-rabbit-IgG (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) für 1h bei Raumtemperatur zugegeben. Die Farbreaktion erfolgte, nach drei jeweils 10minütigen Waschschritten in PBS⁺⁺ durch Zugabe des AEC+Substrat-Chromogens (DakoCytomation). Die Schnitte wurden mit Mayer's Hämatoxylin Lösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt und mit Aquatek eingedeckt. Kontrollschnitte wurden in Abwesenheit des Primären- oder Sekundärenantikörpers durchgeführt.

2.9.2 Immunhistochemischer Nachweis proliferierender Zellen

Die immunhistochemische Detektion proliferierender Zellen erfolgte durch Ki-67. Dieses wird in allen Phasen des Zellzyklus mit Ausnahme der G₀-Phase und der frühen G₁-Phase exprimiert. Die höchste Expression wird in der G₂-Phase und der M-Phase erreicht (Gerdes et al., 1984) Paraffinschnitte wurden mit anti-human Ki-67 (clone MIB-1, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) und dem UltraTech HRP (AEC) Streptavidin-Biotin Detektion

System (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) wie bereits beschrieben (Hofmann et al., 2006) gefärbt. Zur Demaskierung des zu detektierenden Proteins wurden die entparaffinierten Schnitte 9mal 3 Minuten in 10mM Citratpuffer (pH 6,0) in einer Mikrowelle gekocht. Anschließend kühlten diese bei Raumtemperatur 20 Minuten im selben Puffer ab. Es schlossen sich jeweils ein 5minütiger Waschschrift in Aqua dest und in PBS⁺⁺ an. Zur Minderung unspezifischer Antikörperbindung wurden die Schnitte initial 10 Minuten mit dem mitgelieferten Protein Blocking Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blocking Puffer wurde vorsichtig von den Schnitten entfernt und anti-Ki-67 (1:50) wurde aufgetragen. Ungebundener Primärantikörper wurde nach der 1stündigen Inkubation bei Raumtemperatur durch 3 mindestens 2 Minuten dauernde Waschschriffe in PBS⁺⁺ entfernt. Es schloss sich eine 30minütige Inkubation mit dem polyvalenten biotin-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur an. Analog zur Entfernung ungebundenen Primärantikörpers wurden die Schnitte 3mal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Im abschließenden 45 Minuten dauernden Inkubationsschritt bei Raumtemperatur band der zugegebene Streptavin-alkalische Phosphatase Komplex an den Ki-67–Biotin Komplex. Vor Zugabe des AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole)–Enzym Substrates (H₂O₂) wurden die Schnitte erneut 3mal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die alkalische Phosphatase reduzierte H₂O₂ zu Wasser. AEC diente als Elektronendonator, infolgedessen wurde AEC unlöslich und präzipitierte an der Stelle der Enzymaktivität. Abschließend wurden die Schnitte in Mayer's Hämatoxylin Lösung (AppliChem) gegengefärbt. Das rote Präzipitat wurde, wie unter „Aufnahmen der histologischen Befunde“ beschrieben, dokumentiert.

2.9.3 Immunhistochemischer Nachweis von Melanozyten (S100)

Die in Hämatoxylin/Eosinfärbungen nicht eindeutig voneinander unterscheidbaren epidermalen Zellarten (Keratinocyten und Melanozyten), konnten durch das melanozyten-spezifische Protein S100 diskriminiert werden. Zur Lokalisation der Melanozyten im

Hautmodellschnitt wurde rabbit anti-human S100 (Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland) verwendet. Paraffinschnitte wurden, wie unter „Aufarbeitung der in Paraffin eingebetteten Schnitte zur immunhistochemischen Analyse“ beschrieben, aufgearbeitet. In einer Feuchtenkammer wurden die Hautmodellschnitte für 1h bei Raumtemperatur mit rabbit anti-human S100 (gebrauchsfertig) inkubiert. Nach drei 10minütigen Waschschritten mit PBS⁺⁺ wurden die Schnitte 1h bei Raumtemperatur mit HRP-konjugierten goat anti-rabbit-IgG (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Im Folgenden wurde nach drei jeweils 10minütigen Waschschritten das AEC+Substrat-Chromogen (DakoCytomation) zugegeben. Die Farbreaktion wurde unter einem Lichtmikroskop verfolgt und durch 5minütiges Waschen in PBS⁺⁺ gestoppt. Abschließend wurden die Schnitte in Mayer's Hämatoxylin Lösung (AppliChem) gegengefärbt. Die Schnitte wurden mit Aquatek eingedeckt. Kontrollschnitte wurden in Abwesenheit des Primären- oder Sekundärenantikörpers durchgeführt.

2.9.4 Immunhistochemischer Nachweis apoptotischer Zellen (Tunnelassay)

Die Identifikation von Zellen bei denen DNA-Strangbrüche, infolge der durchgeführten Behandlung, auftraten, wurde direkt an FTSM-Schnitten durch den Tunnelassay Kit ApopTag[®] (Chemicon, Hampshire, UK) detektiert. Hierzu wurden die deparaffinierten Schnitte für 20 Minuten mit Proteinase K (20µg/ml) vorbehandelt. Auf diese Weise wurde die Zellmembran aufgeschlossen. Digoxigenin gekoppelte dNTPs wurden durch die Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT), während der 1stündigen Inkubation bei 37°C, auf die freien 3' DNA-Enden übertragen. Nach drei Waschschritten in PBS⁺⁺ wurden die FTSM-Schnitte mit Rhodamin-markiertem anti-Digoxigenin 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Sekundärantikörper wurden durch 4 Waschschrritte in PBS⁺⁺ entfernt. Die Zellkerne wurden mit DAPI, welches im Eindeckmedium anti-fade/DAPI (0.5-0.1µg/ml, Chemicon, UK) enthalten war, gefärbt. Tunnel-positive Zellen fluoreszierten rot, wohingegen die Zellkerne blau fluoreszierten. Photographien wurden mit einer an das

Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Kamera aufgenommen, siehe „Aufnahmen der histologischen Befunde“.

2.9.5 Aufnahmen der histologischen Befunde

Die histologischen und immunhistochemischen Photographien wurden mit einer Sony Cyber Shot 3.3 (Sony, Köln, Deutschland), die an einem Zeiss Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angeschlossen war, aufgenommen. Alternativ wurden die Histologien über die am Zeiss Axioskop angeschlossene moticam 1000 (Motic, Wetzlar, Deutschland) mit der Software Motic Image Plus (Motic) aufgenommen.

2.9.6 Epidermale Differenzierungsmarker

2.9.6.1 Keratin

Der Nachweis von Keratinfilamenten und deren struktureller Aufbau wurde an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten FTSM-Schnitten mit delipidiertem Gesamtserum guinea pig anti-human pan-Keratin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) untersucht. Die FTSM Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend 1h bei Raumtemperatur in einer Feuchtenkammer mit anti-Keratin (1:20) inkubiert. Ungebundene Primärantikörper wurden durch drei 5minütige Waschschrte in PBS⁺⁺ entfernt. Als Sekundärantikörper wurden FITC-konjugierte anti-guinea pig IgG (1:100, Sigma-Aldrich) für 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln zugegeben. Abschließend wurden die Schnitte erneut 3mal 5 Minuten in PBS⁺⁺ gewaschen und mit DAPI enthaltendem Eindeckmedium anti-fade/DAPI (Chemicon) eingedeckt. Die Keratinfilamente fluoreszierten rot und die Zellkerne blau.

2.9.6.2 Laminin

Als Komponente der Basallamina wurde Laminin, welches von Keratinozyten exprimiert wird, ausgewählt. Zur Evaluation, in welchen Schichten des FTSMs Komponenten der

Basallamina exprimiert werden, wurden Formalin-fixierte in Paraffin-eingebettete FTSM-Schnitte mit mouse anti-human Laminin (clone MAM-89, Sigma-Aldrich und clone 4C7, Acris Antibodies) und FITC markiertem rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) gefärbt. Zur Antigen-Demaskierung wurden die FTSM-Schnitte nach Deparaffinierung 10 Minuten mit Proteinase K (gebrauchsfertig, DakoCytomation) bei 37°C inkubiert. Nachdem die Schnitte in Aqua dest. und PBS⁺⁺ gewaschen worden waren, wurde anti-Laminin (1:1000 für clone MAM-89, 1:5 für clone 4C7) aufgetragen und 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3mal für 5 Minuten in PBS⁺⁺ gewaschen, bevor der FITC-gekoppelte Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur aufgetragen wurde. Ungebundene Sekundärantikörper wurden analog zur Entfernung der ungebundenen Primärantikörper in drei PBS⁺⁺ Waschschritten entfernt. Die Gegenfärbung erfolgte mit dem DAPI enthaltenden anti-fade/DAPI (Chromogen) Einbettmedium. Die Analyse der Schnitte in Bezug auf die Lokalisation von Laminin erfolgte entsprechend den Ausführungen unter „Aufnahmen der histologischen Befunde“.

2.9.7 Dermale Differenzierungsmarker

2.9.7.1 Elastin

Als Komponente der extrazellulären Matrix wurde Elastin, welches von Fibroblasten in den extrazellulären Raum sekretiert wird und somit unter anderem dem dermalen Gewebe Elastizität vermittelt, als ein Qualitätskriterium und zu analysierender Differenzierungsmarker ausgewählt. Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete FTSM-Schnitte wurden mit mouse anti-human Elastin (clone BA-4, Acris Antibodies) und FITC markiertem rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) gefärbt. Antigen-Demaskierung wurde analog zu der bereits für Laminin beschriebenen Behandlung mit Proteinase K für 10 Minuten bei 37°C durchgeführt. Der monoclonale anti-Elastin IgG (1:1000) wurde in einer Feuchtenkammer auf die Schnitte

aufgetragen und 1h bei 37°C inkubiert. Der FITC-gekoppelte Sekundärantikörper inkubierte, nachdem ungebundene Primärantikörper entfernt wurden, 1h bei Raumtemperatur. Analog zur Entfernung des ungebundenen Primärantikörpers wurden ungebundene Sekundärantikörper ebenfalls in PBS⁺⁺ Waschschritten entfernt. Die Gegenfärbung erfolgte mit dem DAPI enthaltenden anti-fade/DAPI (Chromogen) Einbettmedium. Die Analyse der Schnitte in Bezug auf die Lokalisation von Laminin erfolgte entsprechend den Ausführungen unter „Aufnahmen der histologischen Befunde“.

2.9.7.2 Fibronektin

Zur weitergehenden Charakterisierung des dermalen Anteils des FTSMs wurde Fibronektin durch den polyclonalen rabbit anti-human Fibronektin Antikörper (Acris Antibodies) gefärbt. Hierzu wurden Paraffinschnitte wie unter „Aufarbeitung der in Paraffin eingebetteten Schnitte zur immunhistochemischen Analyse“ beschrieben vorbehandelt. Die Schnitte wurden 1h bei Raumtemperatur mit anti-Fibronektin (1:50) inkubiert. Wie bereits für andere Differenzierungsmarker beschrieben wurden die Schnitte mehrmalig mit PBS⁺⁺ gewaschen, bevor der FITC-gekoppelte anti-rabbit IgG für 1h bei Raumtemperatur aufgetragen wurde. Die Gegenfärbung erfolgte nach erneuten Waschschritten mit dem DAPI gekoppelten Eindeckmedium anti-fade/DAPI.

2.9.7.3 Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)

Die Proteinfamilie der Matrix Metalloproteinasen ist für den Abbau und die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix unter diversen Bedingungen verantwortlich. Lokalisation und Expression dieser Proteinfamilie wurde am FTSM durch MMP-2 Färbung untersucht. Rabbit anti-human MMP-2 (1:500, Sigma-Aldrich) wurde unmittelbar nach Rehydrierung der Schnitte für 1h bei 37°C aufgetragen. Die Zugabe des FITC gekoppelten anti-rabbit IgG, nach ausreichendem Auswaschen der ungebundenen Primärantikörper, für 1h bei Raumtemperatur, war dafür verantwortlich, dass die Identifikation des unter dem Fluoreszenzmikroskop rot

leuchtenden MMP-2 möglich wurde. Zur langfristigen Konservierung der Fluoreszenz wurde das DAPI enthaltende Eindeckmedium anti-fade/DAPI (Chemicon) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Aufbau des drei-dimensionalen Vollhautmodells

Die Kulturbedingungen der im Folgenden dargestellten Versuchse waren immer gleich. Als Matrix des drei-dimensionalen full-thickness skin model (FTSM) diente, wie unter „Material und Methoden“ beschrieben, eine aus Rinderkollagen bestehende Matrix, die in 24-well Platten lyophilisiert wurde (Abb. 3.1 A). Hierbei bildeten sich aufgrund des speziell entwickelten Lyophilisationsprotokolls kleine Poren aus, welche den eingesäten Zellen optimale Wachstumsbedingungen vermittelten. Zur Erhöhung der mechanischen Stabilität der Matrix wurde diese chemisch vernetzt und anschließend mit Zellen inokuliert. Die Kultivierungsphase erfolgte zunächst submers, wie in Abb. 3.1 B zu sehen. Es wurde darauf geachtet, dass die FTSMs während der Medienwechsel möglichst geringen mechanischen Reizen, welche durch Absaugen des Mediums entstehen können, ausgesetzt wurden.



Abb. 3.1 Aufsicht auf die zur Kultivierung verwendete Matrix in 24-well Platten

(A) in lyophilisiertem Zustand und (B) während der submersen Kultivierungsphase.

Wie bereits beschrieben wurden die FTSMs nach Ende der submersen Kultivierung an die Air-Liquid-Interface (ALI) überführt. Hierzu wurden die FTSMs wie in Abb. 3.2 A dargestellt auf Filterpapiere in 6-well Schalen (Abb. 3.2 B) überführt. Dies ermöglichte die Versorgung der FTSMs über Diffusion mit frischem Medium. Somit wurde die Kultivierung sukzessiv dem in vivo Zustand angeglichen. In vivo erfolgt die Versorgung mit Nährstoffen über die Kapillaren der papillären Dermis. Die Versorgung des FTSMs mit Nährstoffen erfolgte

ebenfalls über das dermale Äquivalent. Der epidermale Bereich stand in keinem direkten Kontakt zum Medium und war somit, wie humane Haut, unmittelbar der Umwelt, in diesem Fall der Luft, ausgesetzt.

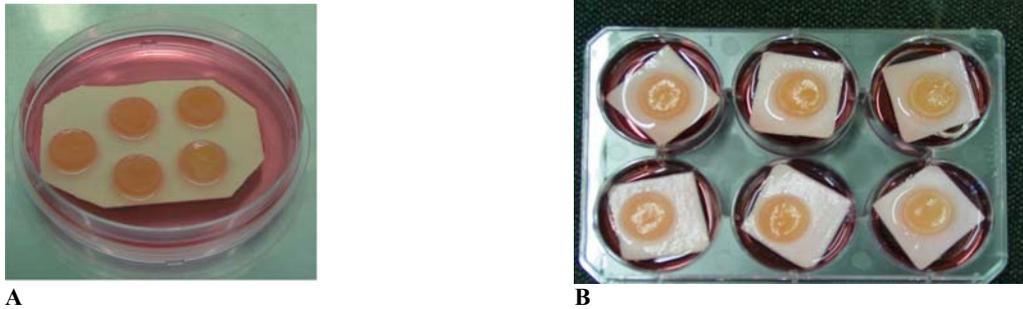


Abb. 3.2 Aufsicht auf die während der ALI auf Filterpapier überführten FTSMs.

(A) Zur Differenzierung wurden diese in Petrischalen überführt. (B) Vor Behandlungs- und Stimulationsbeginn wurden die FTSMs zur Vereinzelung in 6-well Schalen überführt.

3.2 Morphologische Charakterisierung des FTSMs

Gesunde humane Haut besteht aus einem dermalen und einem epidermalen Bereich, verbunden durch die Basalmembran unterhalb des Stratum basale. Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern das FTSM mit dem in vivo Zustand zu vergleichen ist. Die Charakterisierung morphologischer Strukturen und die Expression einiger Differenzierungsmarker dienen der Bewertung der Qualität des FTSMs.

3.2.1 Histologische Untersuchungen der FTSMs

Hämatoxylin/Eosin (H/E) gefärbte Schnitte zeigten, dass der dermale Bereich sowohl nativer Haut (Abb. 3.3 A) als auch des FTSMs (Abb. 3.3 B) durch Fibroblasten und die von ihnen sekretierten Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) aufgebaut wurde. Die Keratinozyten in der Junctionszone der Dermis und Epidermis waren palisadenförmig angeordnet. Diese einlagige Zellschicht entspricht dem Stratum basale, in welchem sich die proliferativen Keratinozyten befinden. Im sich anschließenden 3-4 Zelllagen umfassenden

Stratum spinosum fand die Umorientierung der Zellachse der Keratinozyten von der Vertikalen in die Horizontale statt. Der Verlust des Zellkerns und die Bildung der Odland-Körperchen fanden in dem, nach der Bildung granulärer Strukturen benannten, Stratum granulosum statt. Diese Zellschicht umfasste 2-3 Zelllagen. Den Abschluss der Epidermis bildete das mehrschichtige, aus kernlosen plättchenartig angeordneten Keratinozyten aufgebaute, Stratum corneum.

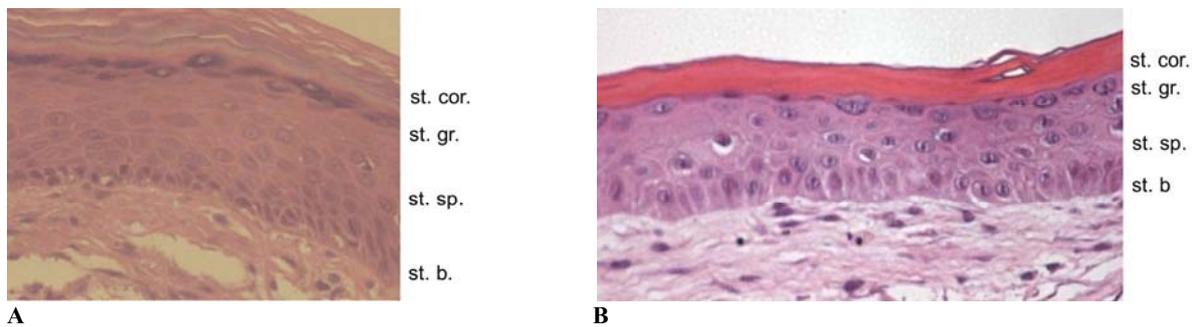


Abb. 3.3 Vergleich des FTSMs mit nativer Haut.

H/E Färbungen (A) nativer Haut und (B) des FTSMs (Tag 35 der Kultivierung) zeigten, dass die Epidermis vollständig differenziert war. Charakteristische epidermale Strata wurden anhand morphologischer Besonderheiten identifiziert und entsprachen in ihrer Lokalisation dem in vivo Zustand. (Stratum basale, st. b.; Stratum spinosum, st. sp.; Stratum granulosum, st. gr.; Stratum corneum, st. cor.) (40x)

Nachdem die Homologie des FTSMs mit nativer Haut nachgewiesen war, sollte die Differenzierung des FTSMs zeitabhängig untersucht werden. Hierzu wurden diese zu diversen Zeitpunkten der Kultivierung fixiert. Zum Zeitpunkt des Umsetzens des FTSMs von der submersen Kultivierung (am Gesamtkultivierungstag 21) an die ALI, bestand die Epidermis aus einer Zelllage. Aus dieser entwickelte sich im Laufe der 14 Tage dauernden ALI-Phase eine vollständig differenzierte Epidermis. Am Gesamtkultivierungstag 31, dies entspricht Tag 10 der ALI-Phase, (Abb. 3.4 A) waren das 1schichtige Stratum basale, ein 2-3schichtiges Stratum spinosum und ein 2 Zelllagen umfassendes Stratum granulosum ausgebildet. Infolge der Weiterkultivierung des FTSMs bis zum Gesamtkultivierungstag 35, dies entspricht Tag 14 der ALI-Phase, (Abb. 3.4 B) entwickelte sich ein mehrschichtiges Stratum corneum und die

epidermalen Zellschichten des Stratum spinosum umfassten nun 3-4 Zellschichten und das Stratum granulosum umfasste 2-3 Zellschichten.

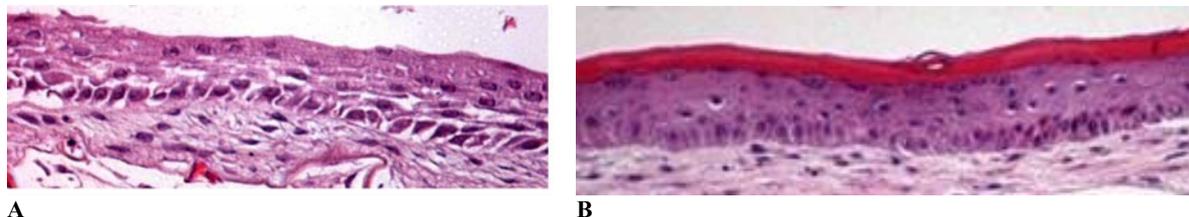


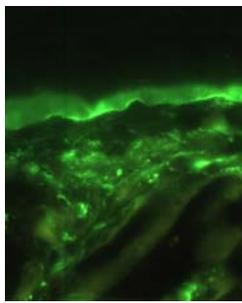
Abb. 3.4 Zwei Differenzierungsstadien des FTSMs

Die Differenzierung der FTSMs erfolgte nach dem Umsetzen an die ALI. H/E gefärbte Schnitte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung des FTSMs. Dargestellt sind (A) Tag 31 der Kultivierung und (B) Tag 35 der Kultivierung. (40x)

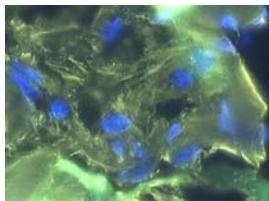
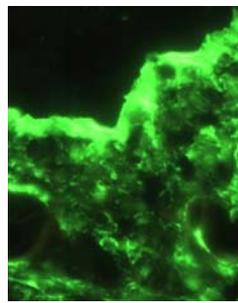
3.2.2 Differenzierungsmarker

Die Charakterisierung des FTSMs beinhaltete neben dem histologischen Vergleich mit nativer Haut anhand von H/E Färbungen auch Analysen der Expression und Lokalisation spezifischer Differenzierungsmarker. Hierbei wurde in gleichem Maße Wert auf dermale wie auf epidermale Differenzierungsmarker gelegt. FTSMs wurden, wie unter „Material und Methoden“ beschrieben, fixiert und mit Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine, wie z.B. Elastin, Fibronectin und Laminin, gefärbt. Als interne Kontrolle möglicher unspezifischer Färbungen wurden jeweils FTSM Schnitte ohne Primärantikörper behandelt. Es zeigten sich keine unspezifischen Interaktionen der Sekundärantikörper mit den FTSMs. Untersuchungen der dermalen Differenzierungsmarker Elastin, Fibronectin und MMP-2 zeigten, dass diese spezifisch im dermalen Bereich der FTSMs identifiziert werden konnten. Die Fibronectinfasern (Abb. 3.5 B) bildeten ein dichtes Netzwerk, welches die Fibroblasten, deren Zellkerne mit DAPI angefärbt wurden, umschloss. Bisher sind 20 verschiedene Fibronectin Ketten bekannt. Die der Haut Elastizität verleihenden Elastinfasern bildeten, wie in der „Einleitung“ bereits erwähnt, im oberen dermalen Bereich senkrecht zur dermalen-epidermalen Junctionszone (DEJ) orientierte Fasern (Abb. 3.5 A). Im unteren Bereich der

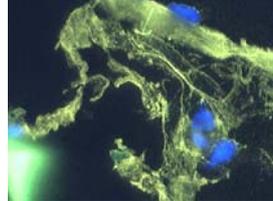
Dermis wurden hauptsächlich Fasern, die horizontal zur DEJ orientiert waren, gefunden. Als weiteres Charakteristikum der nativen Dermis kann die Expression von Metalloproteinasen (MMPs) angesehen werden. Diese üben eine entscheidende Rolle in der Reorganisation der ECM und der Zellmigration aus. Sie werden *in vivo* unter der Beteiligung von Cytokinen induziert. In immunhistochemischen Färbungen von MMP-2 Abb. 3.5 C) am FTSM zeigte sich, dass dieses von den dermalen Fibroblasten exprimiert wurde. Doppelfärbung mit DAPI zeigte, dass das Cytoplasma der Fibroblasten positiv für MMP-2 gefärbt war.



A Elastin



B Fibronectin



C MMP-2

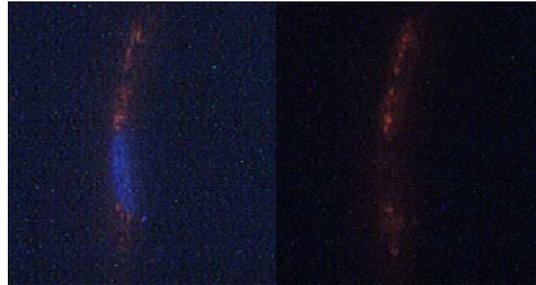


Abb. 3.5 Dermale Differenzierungsmarker des FTSMs.

Der dermale Bereich des FTSMs weist Proteine, welche im *in vivo* Zustand an den homologen Stellen exprimiert werden, auf. FTSM Schnitte wurden mit den entsprechenden Primärantikörpern behandelt; anschließend wurden an Alexa 488 bzw. Alexa 576 gebundene Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Es zeigte sich, dass Elastin (A) und Fibronectin (B) ein dichtes Fasernetzwerk ausbildeten. Der cytoplasmatische Bereich der dermalen Fibroblasten war eindeutig positiv in Bezug auf MMP-2 (C). (100x)

Nachdem der dermale Bereich des FTSMs charakterisiert war und zumindest die untersuchten Parameter weitgehend den in vivo Verhältnissen entsprachen, wurden respektive Untersuchungen für den epidermalen Bereich durchgeführt. Das in vivo ausschließlich in der Basalmembran zu findende Protein Laminin, welches im Komplex mit Nidogen für die Zelladhäsion an das Kollagen IV Netzwerk der Basallamina verantwortlich ist, wurde im FTSM ebenfalls in der Junctionszone zwischen Dermis und Epidermis lokalisiert (Abb. 3.6 A). Somit konnte eine wichtige Komponente einer funktionellen Basalmembran nachgewiesen werden. Ein Charakteristikum der Epidermis ist, dass proliferative Zellen nur im Bereich des Stratum basale zu finden sind. So waren dem in vivo Zustand entsprechend, ca. 25% der Keratinozyten des Stratum basale der FTSMs Ki-67 positiv (Abb. 3.6 B). In den oberen Strata der Epidermis konnten keine proliferativen Zellen identifiziert werden. Im Gegensatz zu Laminin, welches nur unterhalb des Stratum basale der Epidermis nachweisbar war, wurde Keratin in allen epidermalen Strata gefunden. Besonders deutlich erkennbar war das dichte Keratin Netzwerk zwischen Stratum spinosum und Stratum granulosum (Abb. 3.6 C).

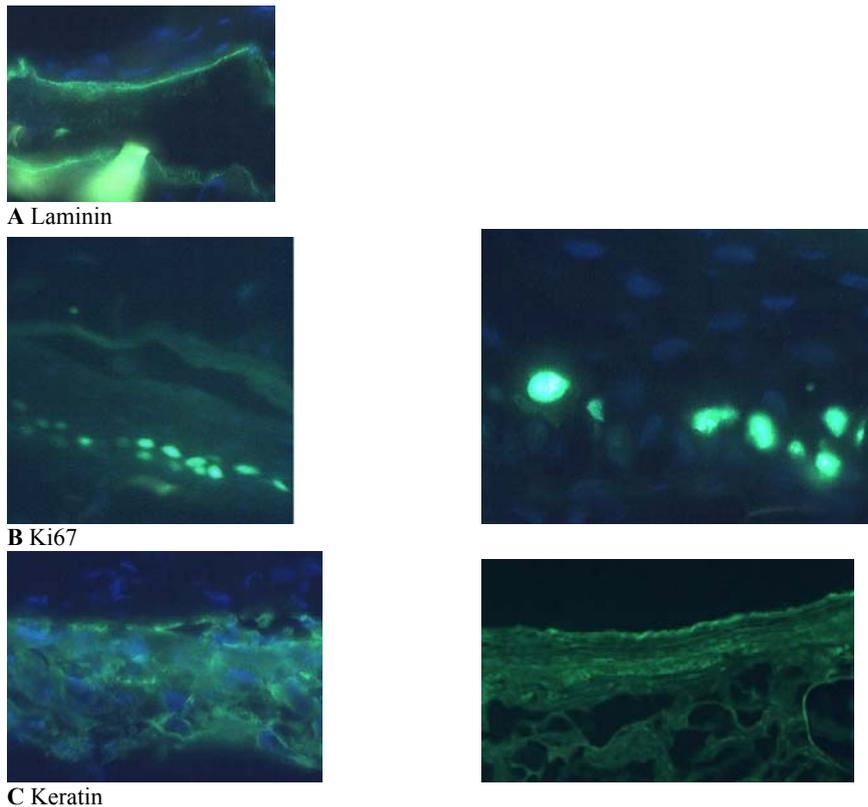


Abb. 3.6 Epidermale Differenzierungsmarker des FTSMs

Der epidermale Bereich der FTSMs wies Homologie zum in vivo Zustand auf. In mit den jeweiligen Primärantikörpern gefärbten FTSM Schnitten zeigte sich, dass Laminin (A) im Bereich der Basallamina detektierbar war. Im Stratum basale wurden proliferative Zellen durch Ki-67 (B) angefärbt. Ki-67 positive Zellen konnten nur in diesem Stratum detektiert werden. Im gesamten Bereich der Epidermis bildete sich ein dichtes Keratin Netzwerk (C), welches besonders deutlich im Bereich des Stratum spinosum und Stratum granulosum erkennbar war. Der Sekundärantikörper war mit Alexa 488 gekoppelt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. (100x)

3.3 UV-Bestrahlung steigert die Cytokinsekretion des FTSMs

UVB Strahlung wirkt als Induktor pro-inflammatorischer Reaktionen u.a. charakterisiert durch eine gesteigerte Cytokinsekretion (Sonesson et al., 2003; Stein et al., 1997). Die Wirkung auf das FTSM wurde untersucht, indem die FTSMs mit $50\text{-}300\text{mJ/cm}^2$ UVB bestrahlt wurden. 24h nach der Behandlung wurden die Medienüberstände gewonnen und die freigesetzte Cytokinkonzentration mit einem ELISA untersucht. Nach der Bestrahlung mit 50mJ/cm^2 wurde eine moderate Steigerung der IL-6 Konzentration um 20% und der IL-8 Konzentration um 45% im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (Abb. 3.7) gemessen. Die

Steigerung der UVB Intensität auf $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ bewirkte eine signifikante Steigerung der Cytokinkonzentrationen um 69% für IL-6 und um 114% für IL-8. UVB Intensitäten von $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ und $300\text{mJ}/\text{cm}^2$ übten keinen zusätzlichen stimulierenden Effekt auf die Cytokinsekretion aus. Die UVB Intensität, welche maximale Cytokinsekretion bewirkte, wurde somit nach der Bestrahlung mit $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB erreicht.

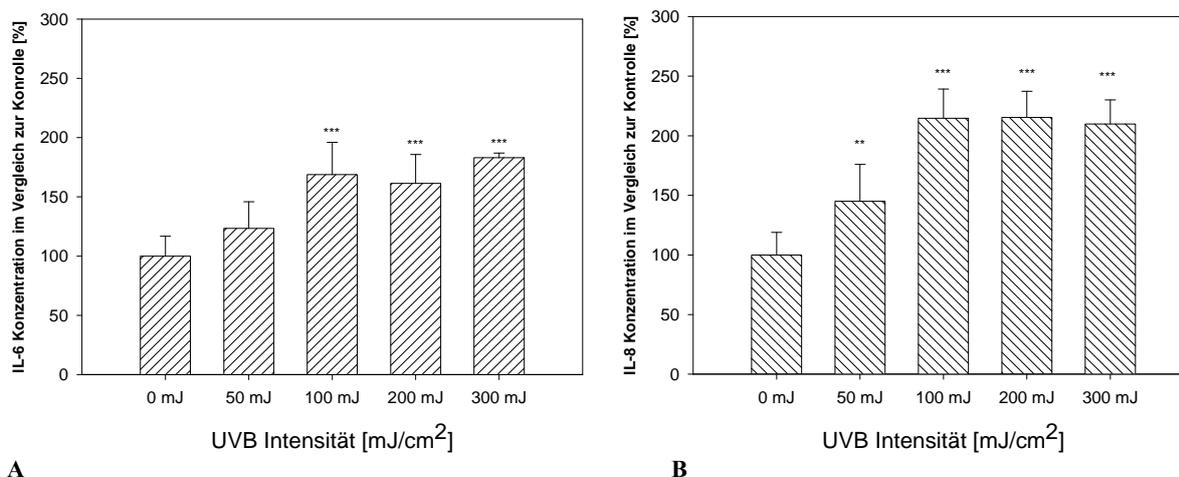


Abb. 3.7 UVB induzierte dosisabhängige (A) IL-6 und (B) IL-8 Sekretion.

24h nach der Bestrahlung der FTSMs wurden die Kulturmedien entnommen und die enthaltenen Cytokinkonzentrationen gemessen. Diese wurden zu den unbestrahlten Kontrollen korreliert, welche auf 100% gesetzt wurden. Die dargestellten Balken repräsentieren 3 unabhängige Experimente, deren Standardabweichung indiziert wurde.

(** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle)

Die Analyse des ins Kulturmedium sekretierten Cytokins gab noch keinen Aufschluss darüber, ob lediglich die epidermalen Keratinozyten für die detektierte Sekretion verantwortlich waren oder ob dermale Fibroblasten ebenfalls in die UVB vermittelte Reaktion involviert waren. Monolayerstudien und Studien, welche das Prinzip der Kultivierung epidermaler und dermaler Zellen, in durch semipermeable Membranen getrennten Kompartments nutzten, zeigten, dass cross-talk zwischen beiden Zellspezies stattfindet (Kondo et al., 1997). Anhand des FTSMs wurde diese Fragestellung durch den immunhistochemischen Nachweis von IL-6 untersucht. Nach der Bestrahlung wurde sowohl

im epidermalen als auch im dermalen Bereich des FTSMs IL-6 nachgewiesen (Abb. 3.8). Es zeigte sich somit, dass Fibroblasten und Keratinozyten durch UVB Strahlung gleichermaßen zur Sekretion von IL-6 angeregt wurden.

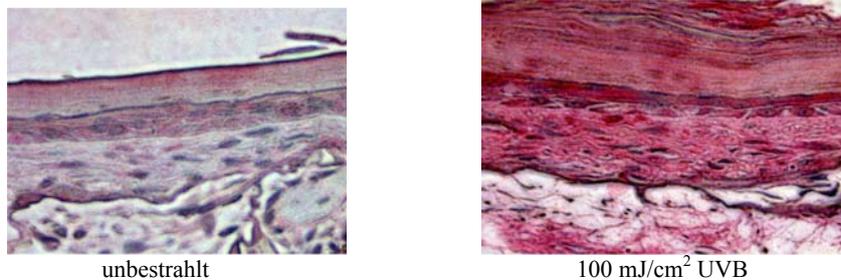


Abb. 3.8 UVB induzierte IL-6 im epidermalen und dermalen Bereich.

24h nach Bestrahlung der FTSMs mit 100mJ/cm^2 UVB wurden die Modelle fixiert und mit anti-IL-6 gefärbt. Der epidermale und dermale Bereich der bestrahlten Modelle waren deutlich gefärbt. (100x)

Die verwendete UVB Intensität beeinflusste nicht nur die interzelluläre Kommunikation, sondern zeigte auch morphologische Veränderungen. H/E Färbungen mit unterschiedlichen UVB Intensitäten bestrahlter FTSMs zeigten eine intensitätsabhängige Verdünnung der Epidermis (Abb. 3.9). Im Vergleich der unbestrahlten Kontrollen mit den 50mJ/cm^2 UVB bestrahlten Proben konnten keine nennenswerten Unterschiede dokumentiert werden, wohingegen die Steigerung der UVB Intensität auf 100mJ/cm^2 zu einer deutlichen Verdünnung der Epidermis führte. Eine weitere Steigerung der UVB Intensität führte zur starken Manifestation von sunburn cells (Daten nicht gezeigt).

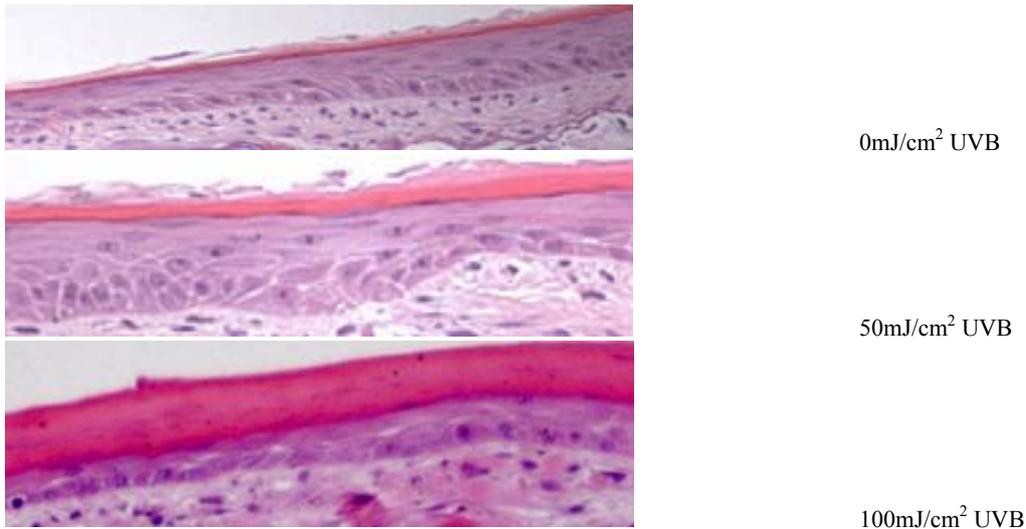


Abb. 3.9 UVB reduzierte die epidermalen Zellschichten.

Die morphologischen Veränderungen der Epidermis wurden durch UVB Bestrahlung induziert. FTSMs wurden 24h nach der Behandlung in Formalin fixiert. H/E Färbungen zeigten, dass die Epidermis nach der Bestrahlung mit 100mJ/cm² UVB weniger epidermale Zellschichten aufwies, als die unbestrahlte Kontrolle und die mit 50mJ/cm² UVB bestrahlte Probe.(40x)

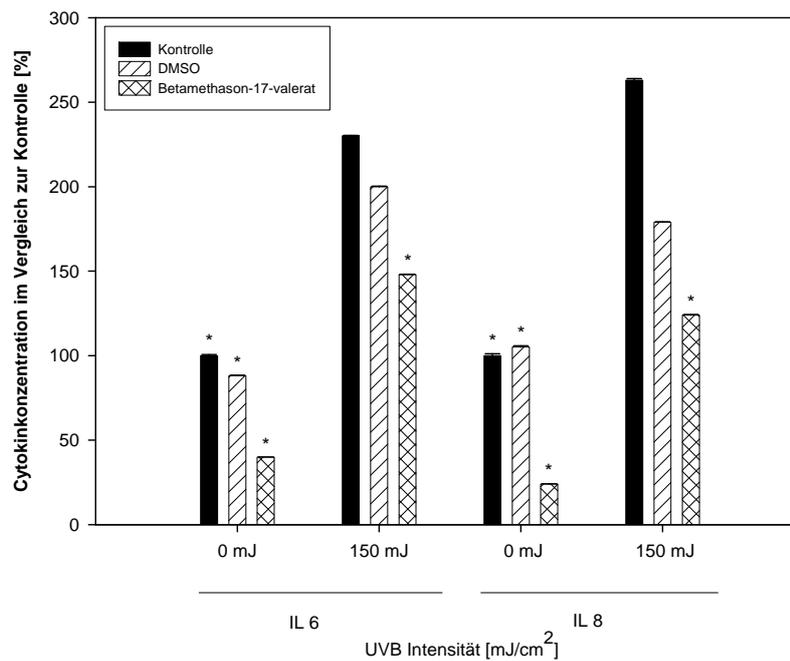
3.4 Glukocorticoide (GC) reduzierten die UV-induzierte Sekretion

pro-inflammatorischer Cytokine

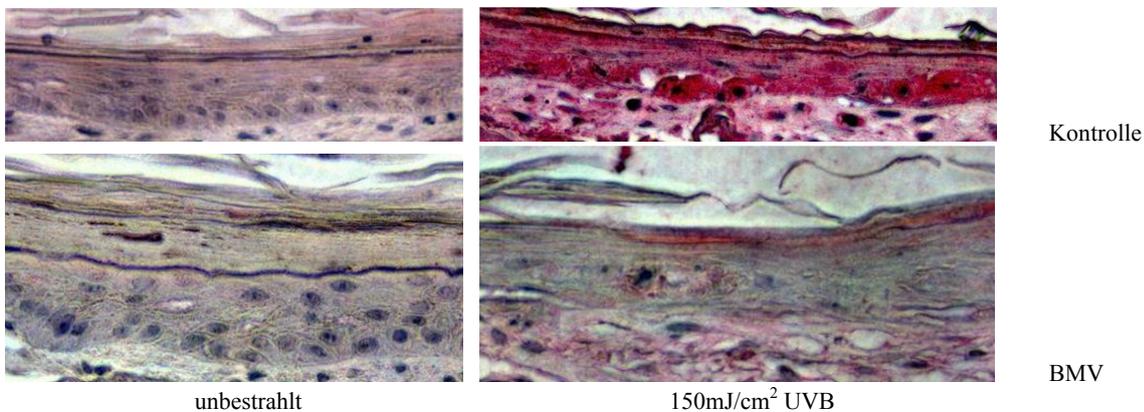
3.4.1 Systemische Zugabe von Betamethason-17-valerat (BMV) reduzierte die UVB vermittelte Cytokinsekretion

Die im vorausgehenden Abschnitt beschriebene UVB vermittelte Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine wurde im Folgenden dazu genutzt, um zu evaluieren, inwiefern das FTSM GC spezifische anti-inflammatorische Wirkung darstellen kann. Wie in 3.3 beschrieben, lag die optimale UVB Bestrahlungsintensität zwischen 100mJ/cm² und 200mJ/cm². In Abhängigkeit zur Dicke des Stratum corneum wurde die Strahlungsintensität variiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass maximale Cytokinfreisetzung und minimale Induktion von sunburn cells erfolgte (Daten nicht dargestellt). Nach der Bestrahlung mit 150mJ/cm² UVB wurden dem Medium 20µM Betamethason-17-valerat zugefügt. 24h nach Stimulation und Substanzzugabe wurde die sekretierte Cytokinkonzentration gemessen und

die FTSMs immunhistochemisch untersucht. Die basale IL-6 und IL-8 Konzentration der unbestrahlten Proben wurden durch Betamethason-17-valerat auf 40% für IL-6 bzw. auf 24% für IL-8, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, reduziert. Bestrahlung mit 150mJ/cm² in Abwesenheit von Betamethason-17-valerat steigerte die IL-6 Konzentration um 130% und die IL-8 Konzentration um 163% (Abb. 3.10 A). Die Zugabe des als Lösungsmittel verwendeten DMSOs, reduzierte die UVB induzierte IL-6 Sekretion um 14% und die IL-8 Sekretion um 20%. Die IL-6 und IL-8 Konzentrationen, der mit Betamethason-17-valerat behandelten Proben, waren nach der Bestrahlung signifikant geringer als nach der Bestrahlung ohne das GC. Die IL-6 Konzentration lag 37% und die IL-8 Konzentration 52% unter der jeweiligen Cytokinkonzentration der bestrahlten Kontrollen. Die in Abb. 3.10 B dargestellte immunhistochemische Färbung zeigte, dass der dermale und epidermale Bereich nach der Bestrahlung deutlich IL-6 positiv waren. In den mit Betamethason-17-valerat behandelten und bestrahlten FTSMs war die IL-6 Färbung in beiden Bereichen im Vergleich zu den bestrahlten Kontrollen deutlich schwächer. In den unbestrahlten FTSMs bestanden keine Unterschiede zwischen den GC behandelten FTSMs und den unbehandelten Kontrollen.



A



B

Abb. 3.10 Betamethason-17-valerat inhibierte die UVB induzierte Cytokinsekretion.

FTSMs wurden mit 150mJ/cm² UVB bestrahlt und anschließend 24h mit Medium, das 20μM Betamethason-17-valerat enthielt, inkubiert. (A) Die entnommenen Kulturmedien wurden in Bezug auf IL-6 und IL-8 untersucht. Die dargestellten Balken repräsentieren 3 unabhängige Experimente, deren Standardabweichung dargestellt ist (* : p ≤ 0,05 im Vergleich zur mit 150mJ/cm² UVB bestrahlten Kontrolle). (B) Histologische Schnitte der FTSMs wurden mit anti-IL-6 gefärbt. Bestrahlung mit 150mJ/cm² UVB induzierte signifikante IL-6 Sekretion, welche in den Betamethason-17- behandelten Proben deutlich gehemmt war. (40x)

Die positive Wirkung von Betamethason-17-valerat zeigte sich ebenfalls an histologischen Schnitten der behandelten FTSMs. Wie bereits gezeigt, nahm die Anzahl epidermaler Zellschichten nach Bestrahlung mit UVB ab. Vergleiche der epidermalen Struktur bestrahlter Modelle zeigten, dass bei den Betamethason-17-valerat behandelten FTSMs die UVB vermittelte Veränderung der epidermalen Struktur deutlich weniger ausgeprägt war, als bei den Kontroll FTSMs. In beiden gezeigten bestrahlten FTSMs waren Zellkerne im Stratum corneum zu erkennen, jedoch war keine eindeutige Reduktion der epidermalen Schichten der Betamethason-17-valerat behandelten FTSMs feststellbar (Abb. 3.11).

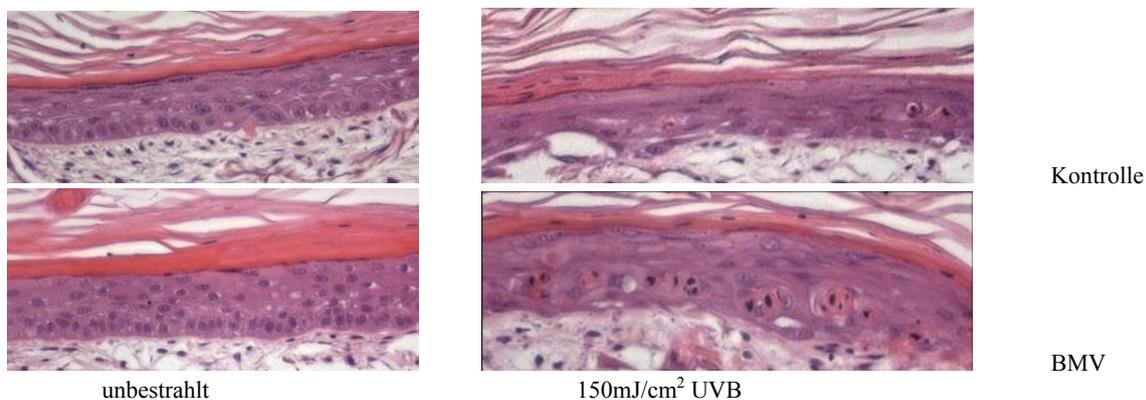


Abb. 3.11 Betamethason-17-valerat minderte die UVB induzierten morphologischen Veränderungen der Epidermis.

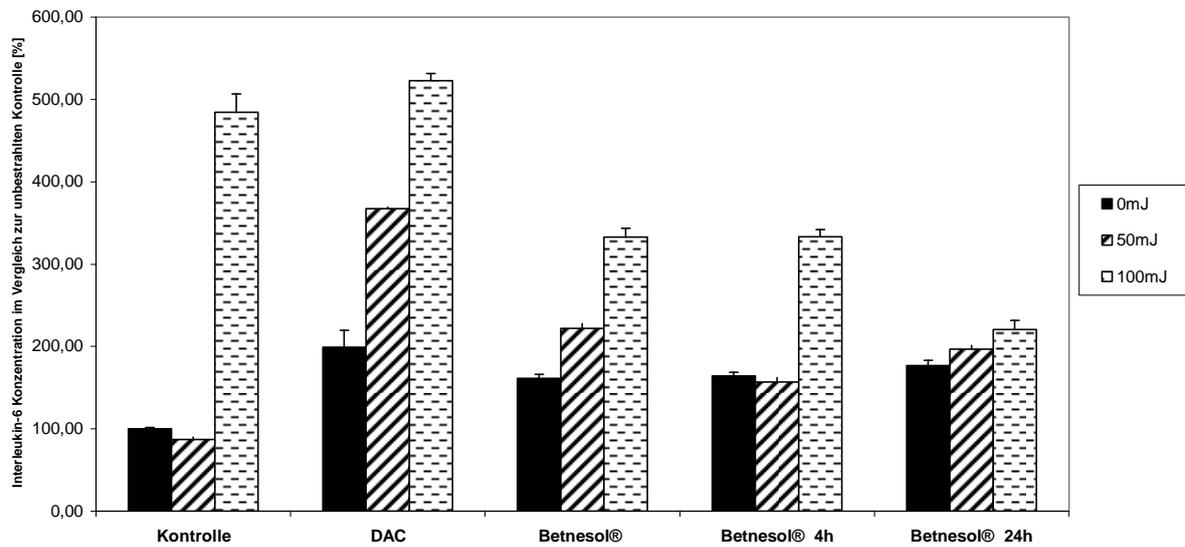
Nach Bestrahlung der FTSMs mit $150\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB wurden diese 24h mit $20\mu\text{M}$ Betamethason-17-valerat enthaltendem Medium kultiviert. Die epidermalen Zellschichten der bestrahlten und BMV behandelten FTSMs waren nicht reduziert. (40x)

3.4.2 Topisch appliziertes Betnesol[®] reduzierte die Cytokinsekretion nach Stimulation mit UVB

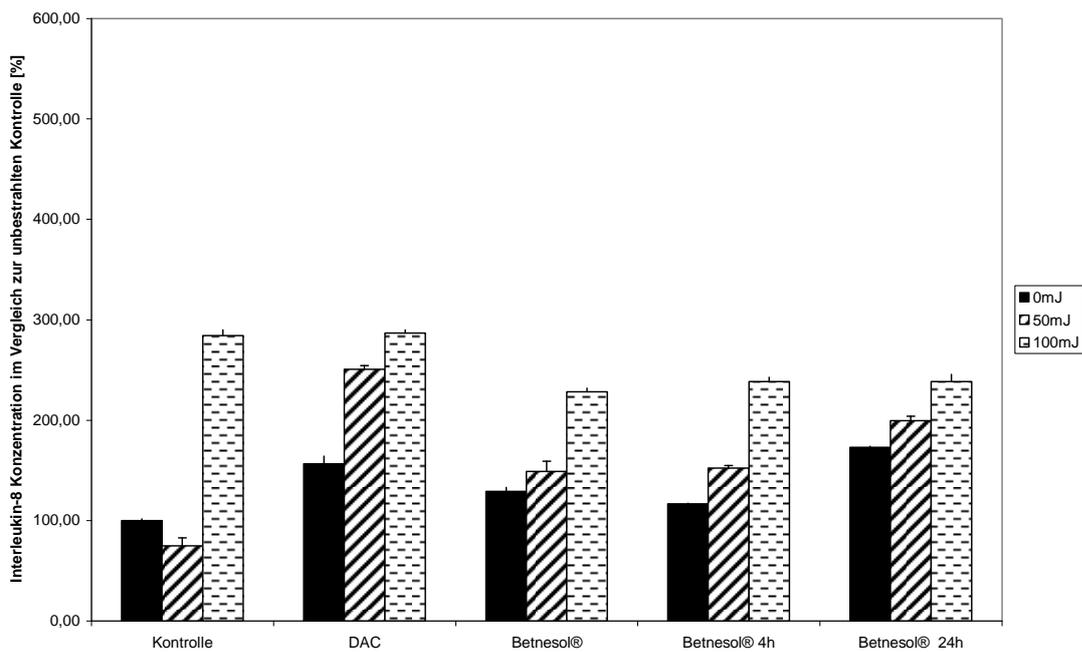
Zur Behandlung dermatologischer, inflammatorischer Erkrankungen werden hauptsächlich topische GC-Präparate eingesetzt. Die mechanische Stabilität und die dem in vivo Zustand entsprechende Hautstruktur des FTSMs erlaubten die topische Applikation einer GC-Salbe, um ihre anti-inflammatorische Wirkung zu testen. Zunächst wurde untersucht, ob die zu untersuchende Substanz bereits vor der UV-Bestrahlung aufgetragen werden musste, um protektive Effekte zu vermitteln. Hierzu wurden $15\mu\text{l}$ Betnesol[®] (0,1% Betamethason-17-

valerat) alternativ 24h, 4h oder 0h vor Stimulation mit $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ und $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB auf die FTSMs aufgetragen. Die Salbe wurde unmittelbar vor der Bestrahlung entfernt und nach der Bestrahlung erneut auf das FTSM aufgetragen. 24h nach der Stimulation und Substanzapplikation wurden die Medienüberstände entnommen und die Cytokinkonzentration bestimmt. Die (Abb. 3.12) IL-6 und IL-8 Sekretion der unbestrahlten, aber mit Salben (wirkstofffreie Salbe bzw. Betnesol[®]) behandelten, FTSMs waren erhöht. Die IL-6 Konzentration (Abb. 3.12 A) war 99% höher als die Cytokinkonzentration der unbehandelten Kontrolle. Die respektive IL-8 Konzentration (Abb. 3.12 B) war 56% höher als die der unbehandelten Kontrolle. Die topische Applikation stimulierte somit die Cytokinsekretion. Außerdem nahm die Cytokinkonzentration UVB intensitätsabhängig zu. Die IL-6 Konzentration der Applikationskontrolle (wirkstofffreie Salbe) war nach der Bestrahlung mit $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB 168% höher und nach der Bestrahlung mit $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB 423% höher als die IL-6 Konzentration der unbehandelten Kontrolle. Die IL-8 Sekretion war weniger ausgeprägt, als die IL-6 Sekretion. Nach der Bestrahlung mit $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB lag die IL-8 Konzentration 150% höher als die der unbestrahlten Kontrolle. Eine Erhöhung der UVB Intensität auf $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ erhöhte die sekretierte IL-8 Konzentration auf 187% der unbestrahlten und unbehandelten Proben. Die Bestrahlung der unbehandelten Kontrollen bewirkte erst bei einer Bestrahlungsintensität von $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB eine Erhöhung der sekretierten Cytokinkonzentration im Kulturmedium. Respektiv lag die IL-6 Konzentration 356% und die IL-8 Konzentration 184% höher als die der unbestrahlten Kontrolle. Deutliche Reduktion des UVB vermittelten inflammatorischen Reizes wurde infolge der Betnesol[®] Applikation festgestellt. Bei einer UVB Intensität von $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ war sowohl die IL-6 Konzentration als auch die IL-8 Konzentration 40% geringer als die Konzentrationen der Applikationskontrollen bei der gleichen UV Intensität. Betnesol[®] behandelte FTSMs sekretierten 20% weniger IL-8 und 31% weniger IL-6 als die mit $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB bestrahlten Kontroll-FTSMs. Vorinkubation mit Betnesol[®] übte keinen nennenswerten Effekt auf die

Hemmung der Cytokinsekretion aus. Als Ausnahme ist zu nennen, dass die IL-6 Konzentration der 24h mit Betnesol[®] vorinkubierten Probe, welche mit 100mJ/cm² UVB bestrahlt wurde, eine um 54% geminderte Cytokinkonzentration im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle aufwies (Abb. 3.12 A). Ein vergleichbarer Effekt war für IL-8 nicht dokumentierbar (Abb. 3.12 B).



A



B

Abb. 3.12 Betnesol® reduzierte die UVB induzierte IL-6 und IL-8 Sekretion.

Es bestanden keine Unterschiede, ob Betnesol® nach der Bestrahlung oder bereits 4h bzw. 24h vor der Stimulation mit UVB aufgetragen wurde. Bevor die FTSMs mit 0-100mJ/cm² UVB bestrahlt wurden, wurde die Creme entfernt. Nach der Bestrahlung wurde Betnesol® erneut aufgetragen. Die Kulturmedien wurden 24h nach der Behandlung entnommen. Als Kontrollen dienten FTSMs, die alternativ unbehandelt verblieben oder mit der Basissalbe behandelt wurden. Die (A) IL-6 und (B) IL-8 Konzentration der Kulturmedien aller bestrahlten Betnesol® behandelten FTSMs war deutlich geringer als die der bestrahlten Kontrollen. Dargestellt sind 3 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung.

In den folgenden Versuchen wurde auf eine Vorinkubation mit den GC Salben verzichtet, da kein nennenswerter additiver Effekt in Bezug auf die Hemmung der Cytokinsekretion gemessen wurde. In Abb. 3.13 wurde gezeigt, dass Betnesol[®] eine signifikante Reduktion der UVB abhängigen IL-6 (35%) und IL-8 (20%) Sekretion vermittelte. Die topische Applikation der wirkstofffreien Salbe erhöhte die Sekretion beider genannter Cytokine. Inwiefern es sich um einen direkt mit der mechanischen Irritation des Hautmodells assoziierten Effekt handelte oder ob ein Bestandteil der Salbe irritierend auf das FTSM wirkte, konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Nach der Bestrahlung bestanden keine signifikanten Unterschiede der IL-8 Konzentration zwischen der Applikationskontrolle und der bestrahlten Kontrolle.

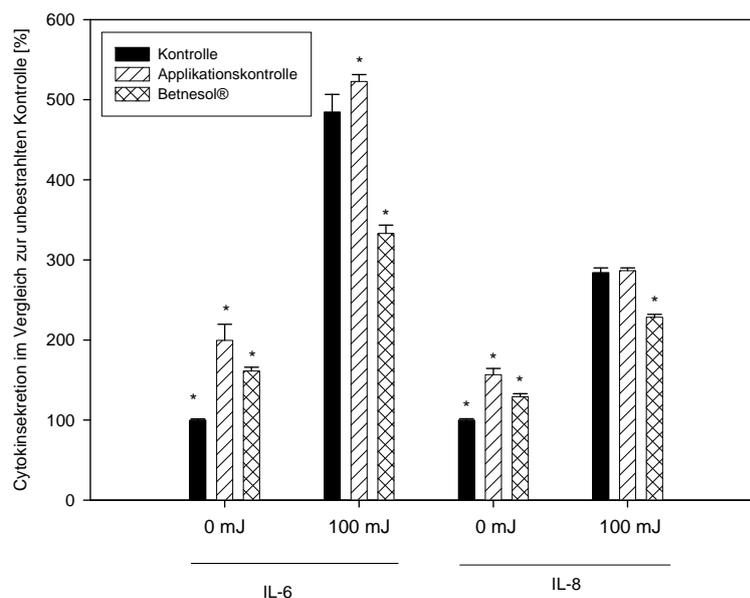


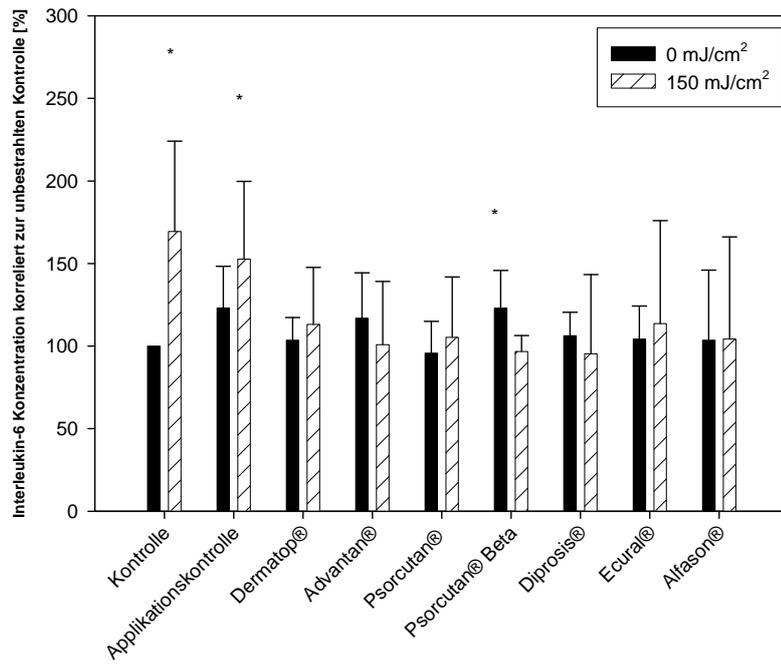
Abb. 3.13 Betnesol[®] reduzierte die UVB induzierte IL-6 und IL-8 Sekretion.

FTSMs wurden mit 100mJ/cm² UVB bestrahlt und anschließend wurde Betnesol[®] topisch aufgetragen. Nach 24h wurden die Kulturmedien entnommen und die Cytokinkonzentration gemessen. Dargestellt sind 3 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung.

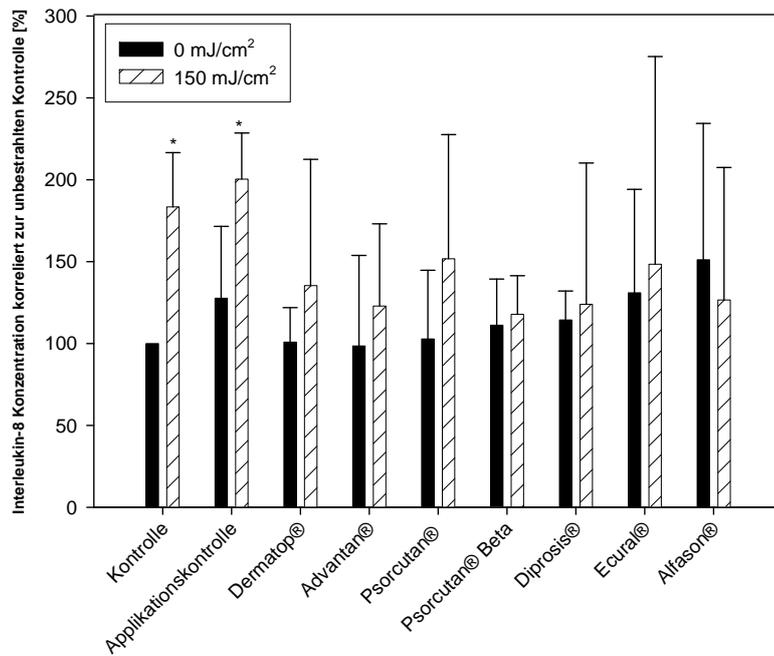
(* : p ≤ 0,05 im Vergleich zur 100mJ/cm² UVB bestrahlten Kontrolle)

3.4.3 Anti-inflammatorisches Potential dermatologisch relevanter Cremes

Der Untersuchung der anti-inflammatorischen Wirkung der Betamethason-17-valerat enthaltenden Heilsalbe Betnesol[®] schloss sich die Fragestellung an, ob wirkstoffspezifische Unterschiede ebenfalls mit dem FTSM abgebildet werden können. Hierzu wurden 5 GC haltige und zwei Calcipotriol haltige Salben ausgewählt, welche auf ihr anti-inflammatorisches Potential untersucht wurden. Nach UV-Stimulation der FTSMs wurden 15µl der entsprechenden Salben apikal appliziert. Eine Bestrahlung mit 150mJ/cm² UVB induzierte eine, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, um 84% erhöhte IL-8 Konzentration (Abb. 3.14 B) und eine um 64% erhöhte IL-6 Konzentration (Abb. 3.14 A). Die ausgewählten Salben reduzierten die freigesetzte UVB induzierte IL-6 Konzentration um 31% (Dermatop[®]) bis 39% (Psorcutan[®] Beta). Aufgrund der Standardabweichungen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen GC Salben. Die IL-8 Konzentration der bestrahlten und mit den Heilsalben behandelten FTSMs variierte stärker, als für IL-6 dokumentiert. Dermatop[®] (0.25% Prednicarbat) hemmte die IL-8 Sekretion um 26%. Eine ähnliche anti-inflammatorische Wirkung vermittelten Ecural[®] (0.1% Mometasonfuroat; 19%) und Psorcutan[®] (0,005% Calcipotriol; 17%). Die IL-8 Konzentration wurde durch Psorcutan[®] Beta (0,005% Calcipotriol + 0,05% Betamethason; 35%), Alfason[®] (0.1% Hydrocortison-17-butytrat, 30%), Diprosis[®] (0.064% Betamethasondipropionat, 32%) und Advantan[®] (0.1% Methylprednisolonaceponat; 33%), im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle, deutlich gesenkt.



A



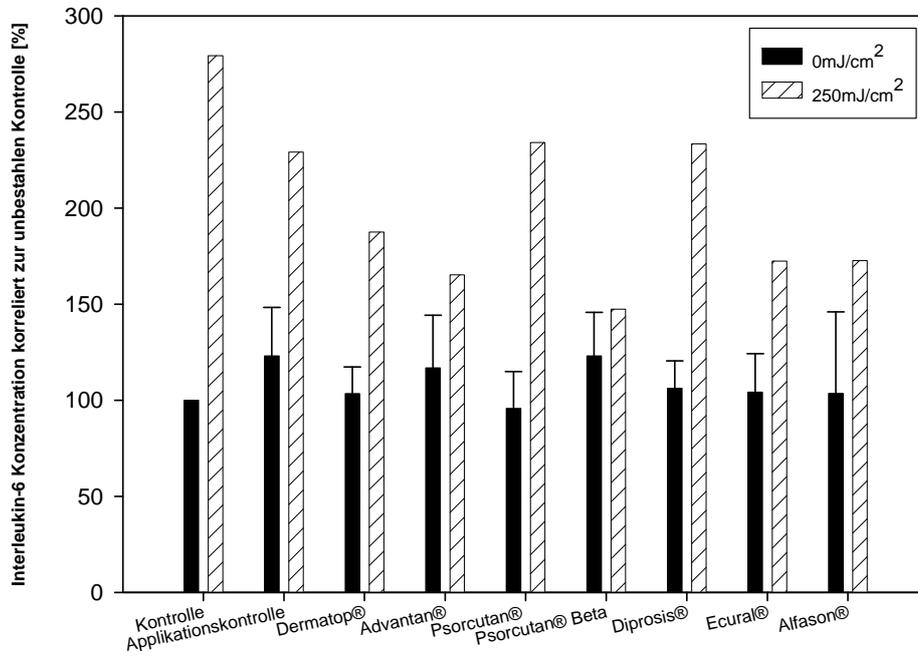
B

Abb. 3.14 Topische Applikation dermatologisch relevanter Cremes reduzierte die UVB vermittelte IL-6 und IL-8 Sekretion.

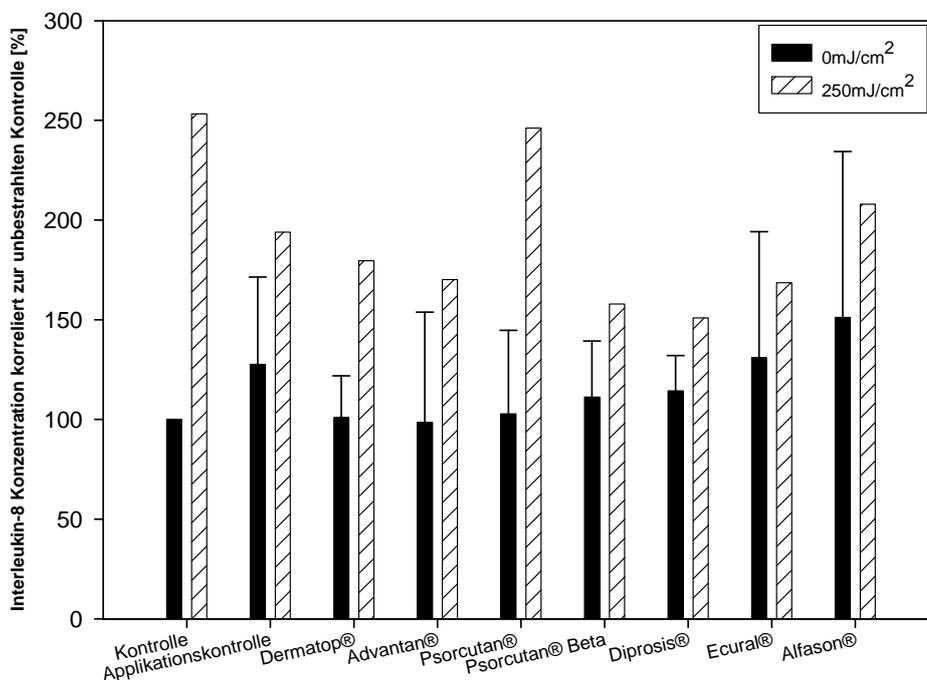
Nach Bestrahlung der FTSMs wurden die genannten Cremes topisch aufgetragen. Die (A) IL-6 und (B) IL-8 Konzentration wurde in den nach 24h entnommenen Kulturmedien bestimmt. Dargestellt sind 4 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung. (* : $p \leq 0,05$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle)

Die UVB Bestrahlung wurde auf $250\text{mJ}/\text{cm}^2$ erhöht, da bei $150\text{mJ}/\text{cm}^2$ keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Salben zu beobachten waren. Ich erwartete, dass durch eine Erhöhung der UVB Intensität und somit des inflammatorischen Reizes die wirkstoffspezifischen Unterschiede deutlicher zu erkennen seien. Die IL-6 Konzentration (Abb. 3.15 A) war um 182% und die IL-8 Konzentration (Abb. 3.15 B) war um 153%, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, erhöht. Die Korrelation der nach topischer Applikation und Bestrahlung ermittelten IL Konzentration zur IL Konzentration der bestrahlten Kontrolle zeigte, dass unabhängig vom enthaltenen Wirkstoff die IL Sekretion reduziert war. Die wirkstofffreie Applikationskontrolle hemmte die IL-6 Sekretion um 14% und die IL-8 Sekretion um 23%. Vergleichbare Reduktion der IL-6 Konzentration um 15% wurde nach Behandlung mit Psorcutan[®] (0,005% Calcipotriol) festgestellt. Die respektive IL-8 Konzentration wurde nicht wesentlich durch die Salbe verändert. Dermatop[®] (0.25% Prednicarbat) behandelte FTSMs sekretierten 37% weniger IL-6 und 29% weniger IL-8, als die bestrahlten Kontrollen. Die IL-6 und IL-8 Konzentrationen nach Ecural[®] (0.1% Mometasonfuroat) Behandlung waren 33% geringer. Psorcutan[®] Beta (0,005% Calcipotriol + 0,05% Betamethason) vermittelte die Senkung der sekretierten IL-8 Konzentration um 37% und die der IL-6 Konzentration um 43%. Die IL Konzentrationen nach Alfason[®] (0.1% Hydrocortison-17-butytrat) Behandlung waren um 38% für IL-6 (Abb. 3.15 A) und um 18% für IL-8 (Abb. 3.15 B) geringer, als die der bestrahlten Kontrolle. Advantan[®] (0.1% Methylprednisolonaceponat) reduzierte die UVB vermittelte IL-6 Sekretion um 38% und die IL-8 Sekretion um 32%. Eine ähnliche Wirkung wurde durch Diprosis[®] (0.064%

Betamethasondipropionat) vermittelt, sowohl die IL-6 als auch die IL-8 Konzentration waren um 40% reduziert.



A



B

Abb. 3.15 Topische Applikation dermatologisch relevanter Cremes reduzierte die UVB vermittelte IL-6 und IL-8 Sekretion.

Nach Bestrahlung der FTSMs wurden die genannten Cremes topisch aufgetragen und 24h inkubiert. Die (A) IL-6 und (B) IL-8 Konzentration der entnommenen Kulturmedien wurde bestimmt. Dargestellt sind 3 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung.

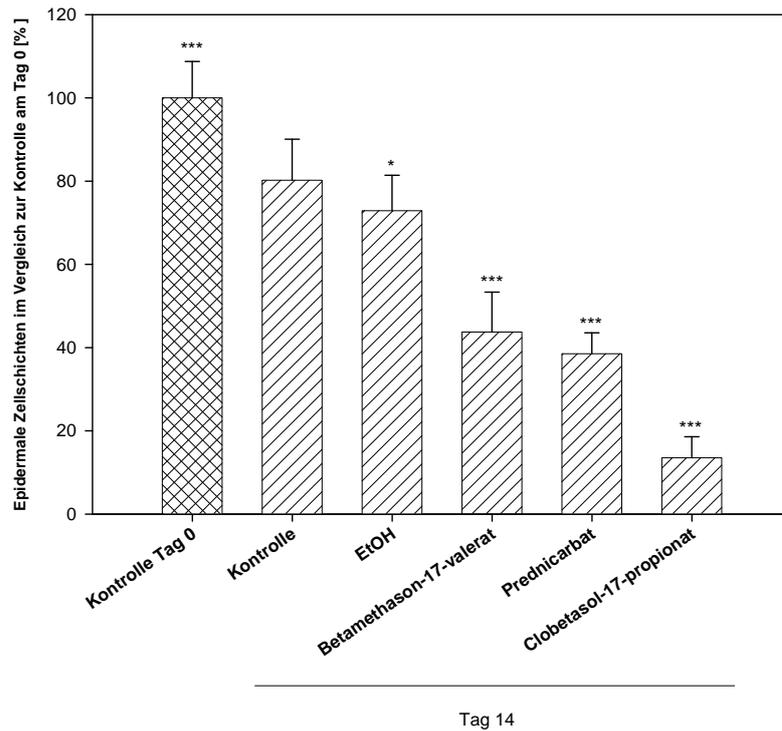
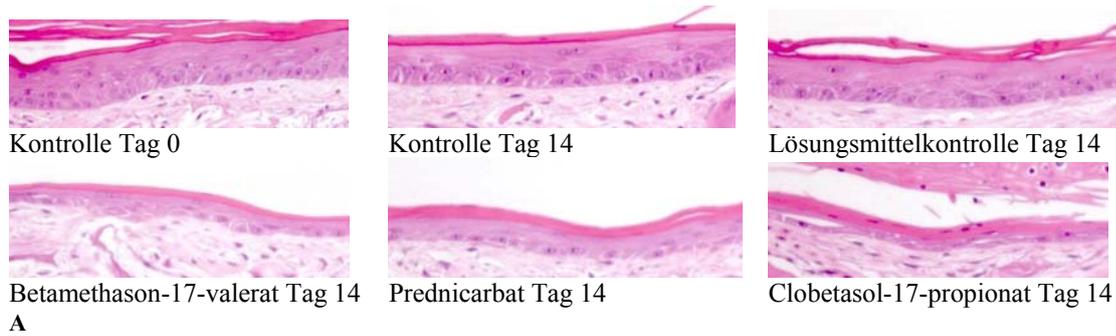
3.5 Analysen des atrophischen Potentials unterschiedlicher GC am

FTSM und Kollagensynthese

3.5.1 Langzeitbehandlung mit systemisch zugegebenen GC reduzierte die Anzahl der epidermalen Zellschichten

Beim Einsatz von GC zu therapeutischen Zwecken sind neben den, die Entzündungsparameter hemmenden, anti-inflammatorischen Potentialen auch die Risikofaktoren und somit die möglichen Nebenwirkungen zu beachten. Zu den mit systemischer GC-Behandlung assoziierten Nebenwirkungen zählen u. a. Veränderungen des Fettstoffwechsels, des Knochenaufbaus und das Auftreten von Hautpurpura (Haapasaari et al., 1997; Haapasaari et al., 1998; Capewell et al., 1990; Stead und Cooke, 1989; Autio et al., 1994). Während längerfristiger topischer Behandlungen mit GC haltigen Salben ist besonders auf die Manifestation atrophischer Veränderungen zu achten. Daher zählt die GC vermittelte Ausbildung von Hautatrophien (Schoepe et al., 2006; Korting et al., 2002) zu den am Besten charakterisierten Risikofaktoren der topischen Behandlung. Hierbei sind morphologische Veränderungen der Dermis und der Epidermis zu beobachten. Um die Sicherheit neu entwickelter Wirkstoffe zu evaluieren, werden diese häufig anhand von Monolayerkulturen untersucht. Hierbei wird der Einfluss von Reinsubstanzen u.a. auf das Proliferationsverhalten durch deren Zugabe zum Kulturmedium untersucht. Dieser Versuchsaufbau, welcher der systemischen Zugabe entspricht, wurde zunächst für die Behandlung des FTSMs mit verschiedenen GC übernommen. FTSMs wurden über 14 Tage jeden zweiten Tag mit 20µM

Betamethason-17-valerat, 20 μ M Prednicarbat oder 20 μ M Clobetasol-17-propionat enthaltendem Medium versorgt. Histologische Vergleiche H/E gefärbter FTSM Schnitte am Tag 0 der Behandlung mit FTSM Schnitten am Tag 14 der Behandlung zeigten, dass eine GC abhängige Reduktion der epidermalen Zellschichten (Abb. 3.16 A) stattfand. Eine geringfügige Abnahme der epidermalen Zellschichten während der Behandlung zeigte sich für die unbehandelten FTSMs. Zwischen den Lösungsmittelkontrollen (DMSO) und den unbehandelten Kontrollen konnte anhand der histologischen Schnitte erst aufgrund des Auszählens der epidermalen Zellschichten ein geringfügiger, aber signifikanter, Unterschied dokumentiert werden. Eine hochsignifikante Reduktion der epidermalen Zellschichten fand aufgrund der systemischen Zugabe der drei GC statt. Betamethason-17-valerat reduzierte die Anzahl der epidermalen Zellschichten um 50% (Abb. 3.16 B). Einen vergleichbaren Einfluss übte Prednicarbat auf die Epidermis aus, die Anzahl der Zellschichten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war um 52% reduziert. Nach der Behandlung mit Clobetasol-17-propionat war die Anzahl der epidermalen Zellschichten um 85%, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, vermindert.

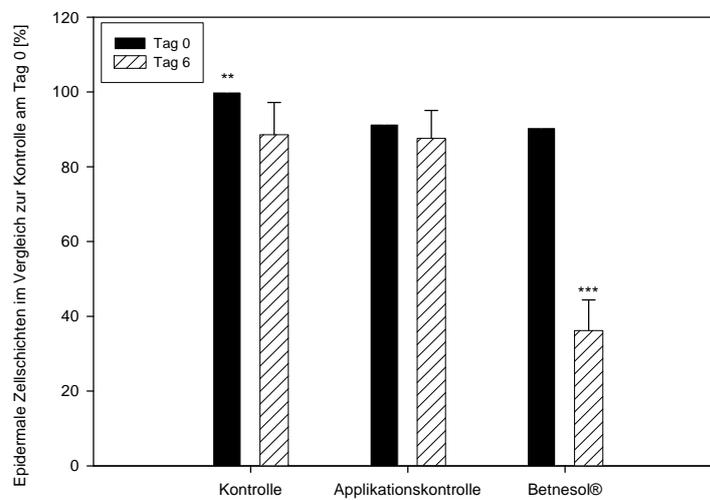
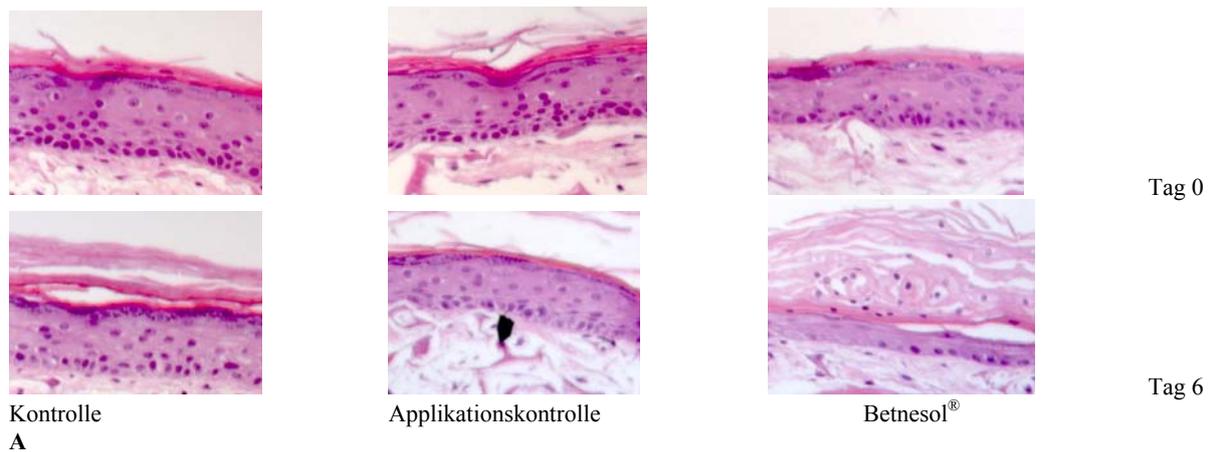
**B****Abb. 3.16 GC abhängige Reduktion der epidermalen Zellschichten**

FTSMs wurden 14 Tage mit 20 μ M Betamethason-17-valerat, 20 μ M Prednicarbat und 20 μ M Clobetasol-17-propionat enthaltendem Medium kultiviert. Am Tag 0 und Tag 14 der Behandlung wurden die FTSMs fixiert. (A) Die H/E Färbung zeigte eine deutliche Reduktion der Anzahl epidermaler Zellschichten der GC behandelten Modelle (40x). (B) Die Anzahl der epidermalen Zellschichten wurde bestimmt. Es sind 3 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung dargestellt.

(* : $p \leq 0,05$; *** : $p \leq 0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am Tag 14)

3.5.2 Wiederholte topische Behandlung mit Betnesol[®] über einen Zeitraum von 14 Tagen reduzierte die epidermalen Zellschichten signifikant

Dermatologen achten in der Auswahl, der zur Behandlung eingesetzten GC besonders auf das benefit-risk Verhältnis. Als Fortführung und sukzessive Annäherung an den in vivo Zustand wurde nach den am FTSM dokumentierten Veränderungen der epidermalen Struktur, infolge systemischer GC Behandlung, der Einfluss topischer GC auf die Epidermis untersucht. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden alle zwei Tage 15µl Betnesol[®] apikal auf die FTSMs aufgetragen. In Abb. 3.17 wurden die relative Veränderung der Anzahl der epidermalen Zellschichten am Tag 6 der Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am Tag 0 und die korrespondierenden Histologien dargestellt. Bei den Kontrollen wurde während der Behandlungsdauer eine geringfügige Reduktion der epidermalen Zellschichten festgestellt. Die relative Anzahl epidermaler Zellschichten der Kontrolle war am Tag 6 im Vergleich zur Kontrolle am Tag 0 der Behandlung um 10% reduziert (Abb. 3.17 B). Während des gesamten Versuchsverlaufes bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Applikationskontrolle. Bereits am Tag 6 der Behandlung zeigte sich an den H/E gefärbten FTSM Schnitten eine deutliche Veränderung der epidermalen Morphologie (Abb. 3.17 A), im Bereich des Stratum corneum waren deutlich Zellkerne zu erkennen, dies deutete auf eine gestörte Differenzierung im Sinne einer Parakeratose hin. Der Bereich des Stratum spinosum umfasste 1 Zelllage, wohingegen dieser Bereich der Kontroll-FTSMs 3-4 Zelllagen umfasste. Die epidermalen Zellschichten waren im Vergleich zur Kontrolle am Tag 6 um 37% reduziert (Abb. 3.17 B). Die deutliche Betnesol[®] vermittelte atrophische Veränderung der Epidermis zeigte sich auch am Tag 14 der Behandlung (Abb. 3.18). Zu diesem Zeitpunkt war die Anzahl der epidermalen Zellschichten auf insgesamt 2-3 Zelllagen reduziert, wobei keine eindeutige Differenzierung zwischen Stratum spinosum und Stratum granulosum möglich war. Der Bereich des Stratum spinosum war in den Kontroll-FTSMs 3-4 Zelllagen dick, in den Applikationskontrollen umfasste er 2-3 Zelllagen.



B

Abb. 3.17 Betnesol® reduzierte die Anzahl der epidermalen Zellschichten

Betnesol® wurde, wie unter Material und Methoden beschrieben, appliziert. Am Tag 0 und Tag 6 der Behandlung wurden die FTSMs fixiert. (A) Die H/E Färbung zeigte eine deutliche Reduktion der Anzahl epidermaler Zellschichten der Betnesol® behandelten Modelle (40x). (B) Die Bestimmung der Anzahl der epidermalen Zellschichten zeigte signifikante Veränderungen. Jeder Balken repräsentiert 3 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung.

(** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am Tag 6)

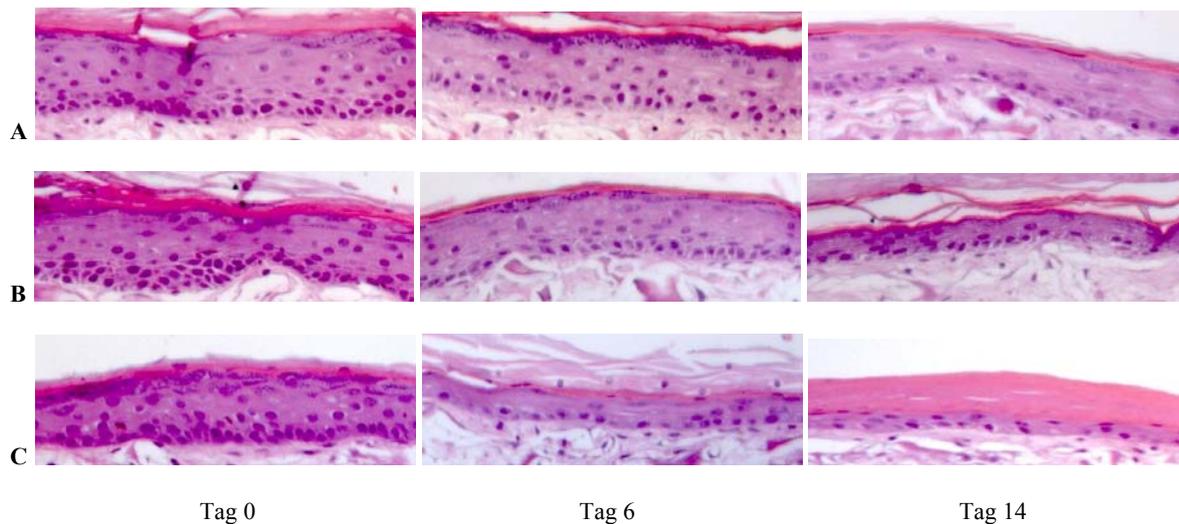


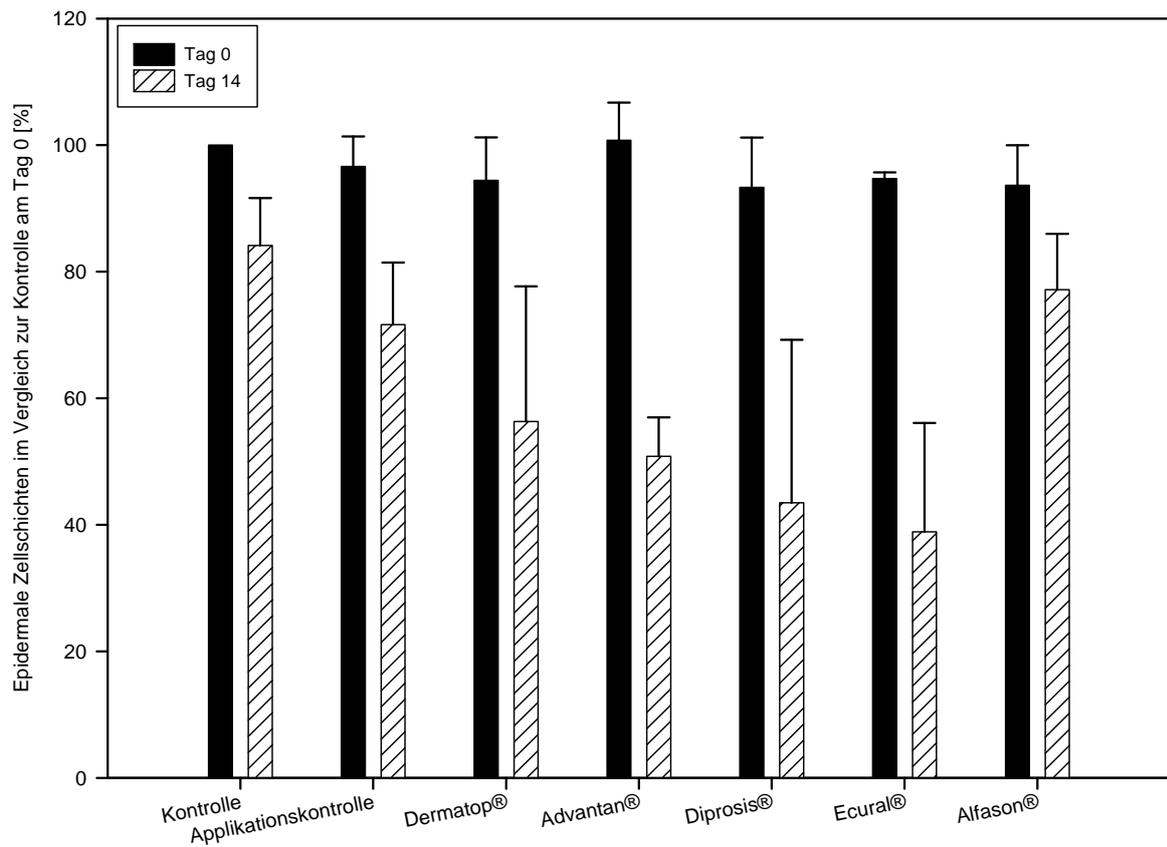
Abb. 3.18 Topische Applikation von Betnesol[®] über 14 Tage reduzierte die Schichtdicke und die Anzahl der epidermalen Zelllagen.

Die FTSMs wurden am Tag 0, Tag 6 und Tag 14 der Behandlung fixiert. Die H/E Färbungen zeigten, dass keine wesentliche Veränderung der epidermalen Morphologie der (A) unbehandelten Kontrolle während der 14 Tage detektierbar war. Eine geringfügige Abnahme der epidermalen Zellschichten am Tag 14 wurde für die (B) Applikationskontrolle dokumentiert. Eine signifikante Reduktion der Anzahl der epidermalen Zelllagen zeigte sich am Tag 6 der Behandlung mit (C) Betnesol[®], dieser Effekt war am Tag 14 ausgeprägter. (40x)

3.5.3 Topische Behandlung mit handelsüblichen GC Salben und Calcipotriol enthaltenden Salben reduzierte die Anzahl der epidermalen Zellschichten

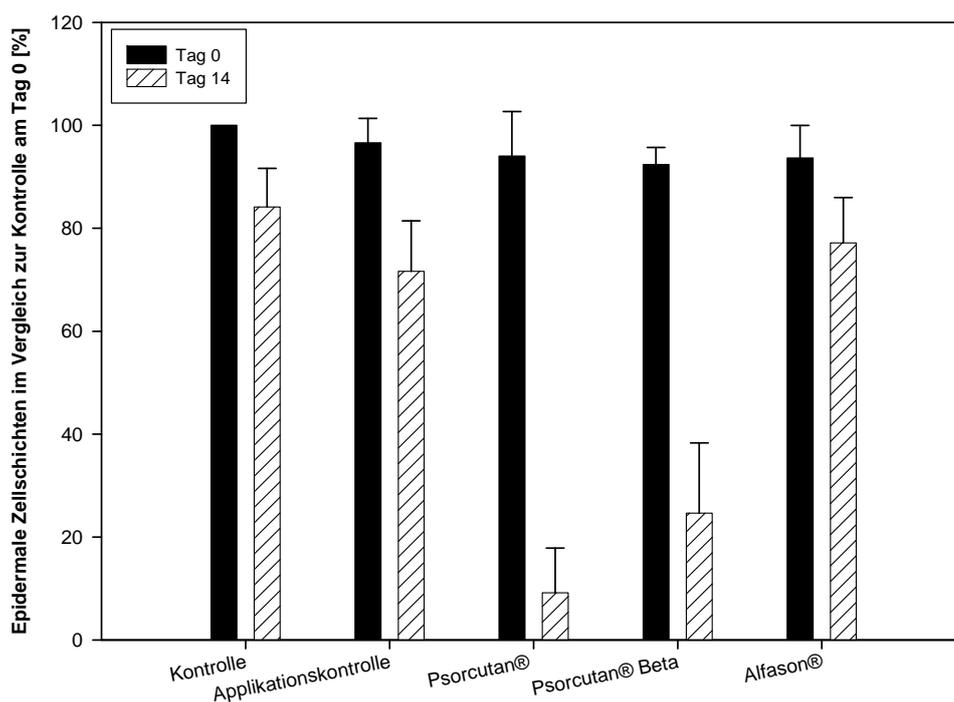
Aufgrund der im vorausgehenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse war ich daran interessiert, ob wirkstoffspezifische Unterschiede in Bezug auf die Induktion atrophischer Veränderungen durch das FTSM darstellbar sind und somit das in vivo bestehende Atrophierisiko wiederspiegelt wird. Nach 14 Tagen war die epidermale Dicke des unbehandelten FTSMs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am Tag 0 um 16% reduziert (Abb. 3.19 A). Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen den Alfason[®] (0.1% Hydrocortison-17-butytrat) behandelten FTSMs und der unbehandelten Kontrolle bzw. der Applikationskontrolle am Tag 14. Dermatop[®] (0.25% Prednicarbat) reduzierte die epidermale Dicke um 34%. In ähnlicher Weise wirkte sich die Behandlung mit Advantan[®]

(0.1% Methylprednisolonaceponat) und Ecural[®] (0.1% Mometasonfuroat) aus, die die Anzahl der epidermalen Zellschichten um 40% bzw. 54% reduzierten. Diprosis[®] (0.064% Betamethasondipropionat) bewirkte eine Abnahme der epidermalen Dicke im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 49%. Mit Ausnahme von Alfason[®] bewirkten alle GC Salben eine signifikante Reduktion der Anzahl der epidermalen Zellschichten. Die dargestellten Ergebnisse ermöglichten die distinkte Differenzierung zwischen unbehandelten FTSMs, den Applikationskontrollen, FTSMs die mit Alfason[®] oder Salben der GC Klasse II bzw. Klasse III behandelt worden waren. Die Anzahl der epidermalen Zellschichten bei den Dermatop[®] und Ecural[®] behandelten FTSMs unterschieden sich signifikant (Abb. 3.19 A). Wurde Salbe mit dem Vitamin D Analogon Calcipotriol 14 Tage topisch auf das FTSM aufgetragen, so war die Anzahl der epidermalen Zellschichten hoch signifikant reduziert. Die Behandlung mit Psorcutan[®] (0,005% Calcipotriol) (Abb. 3.19 B) reduzierte die epidermale Dicke um 89%. Eine Reduktion der epidermalen Zellschichten um 71% wurde nach der Behandlung mit Psorcutan[®]Beta (0,005% Calcipotriol + 0,05% Betamethason) festgestellt. Exemplarisch werden in Abb. 3.20 H/E gefärbte Histologien von FTSMs gezeigt, die mit GC Salben bzw. Calcipotriol Salben behandelt waren. Wie bereits für Betnesol[®] behandelte FTSMs gezeigt, wurden auch in den Advantan[®], Psorcutan[®] und Psorcutan[®]Beta behandelten FTSMs am Tag 14 der Behandlung Zellkerne im Bereich des Stratum corneum identifiziert. Die Reduktion der epidermalen Dicke war hauptsächlich auf die Abnahme der Anzahl der Zelllagen des Stratum spinosum zurückzuführen. Diese epidermale Schicht, die unter Kontrollbedingungen 3-4 Zelllagen umfasste, bestand in den GC behandelten FTSMs lediglich aus 1-2 Zelllagen (Abb. 3.20).



Tag 14	Kontrolle	Basissalbe	Dermatop®	Advantan®	Diprosis®	Ecural®	Alfason®
Kontrolle	/	*	**	**	*	**	ns
Basissalbe		/	*	*	*	**	ns
Dermatop®			/	ns	ns	*	*
Advantan®				/	ns	ns	*
Diprosis®					/	ns	*
Ecural®						/	*
Alfason®							/

A



Tag 14	Kontrolle	Basissalbe	Psorcutan®	Psorcutan® Beta	Alfason®
Kontrolle	/	*	**	**	ns
Basissalbe		/	**	**	ns
Psorcutan®			/	*	*
Psorcutan® Beta				/	*
Alfason®					/

B

Abb. 3.19 GC und Calcipotriol haltige Salben reduzierten die epidermale Dicke.

Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden 15µl der genannten Salben aufgetragen. Die Zahl der epidermalen Zellschichten wurde am Tag 0 und Tag 14 der Behandlung bestimmt. Alle verwendeten (A) GC Salben reduzierten die Anzahl der epidermalen Zellschichten. Eine signifikante Reduktion der Epidermis konnte ebenfalls für die (B) Calcipotriol behandelten FTSMs bestimmt werden. Dargestellt sind 4 unabhängige Experimente und deren Standardabweichungen.

(* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$)

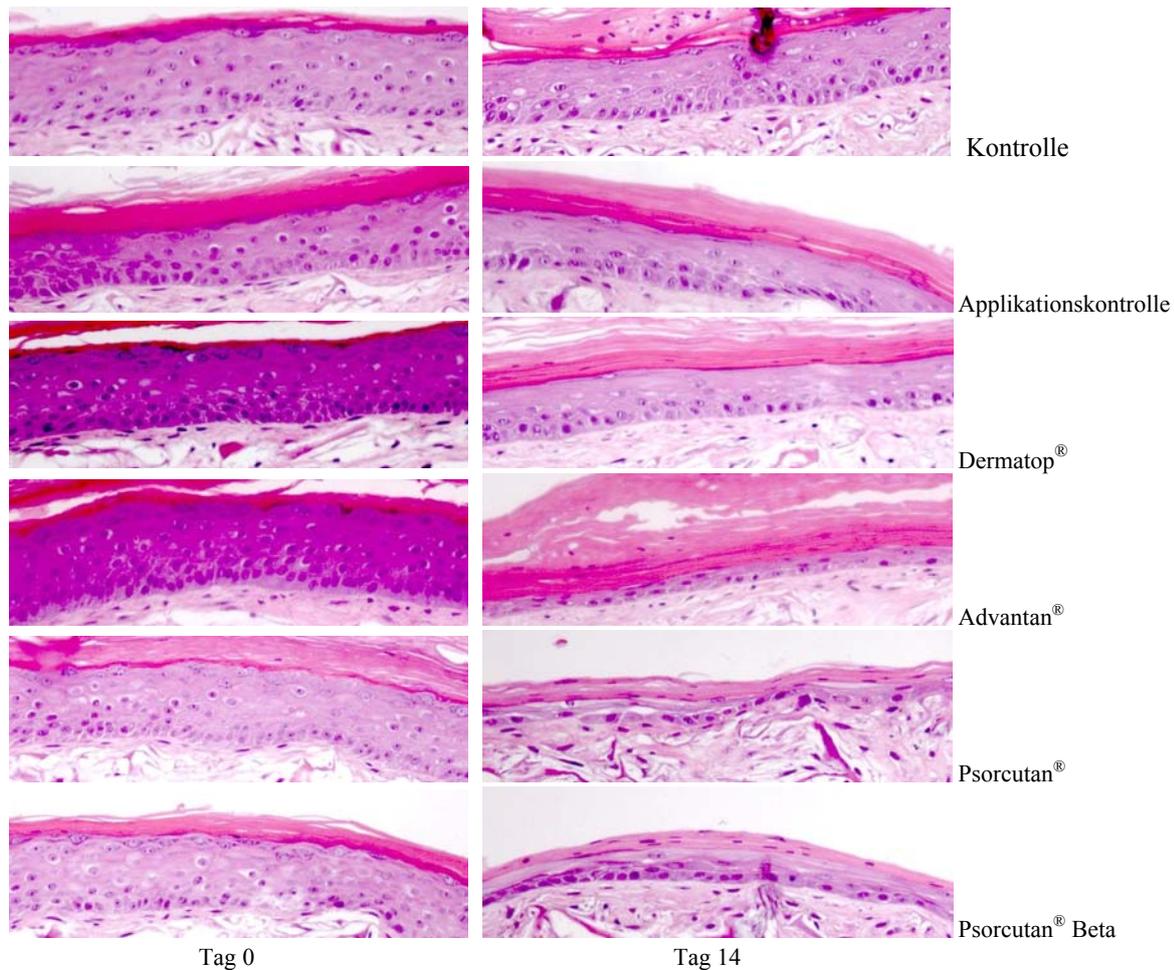


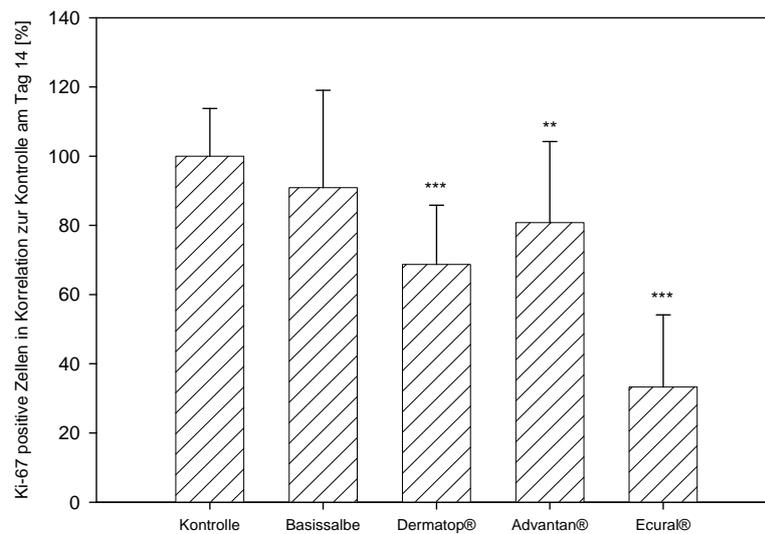
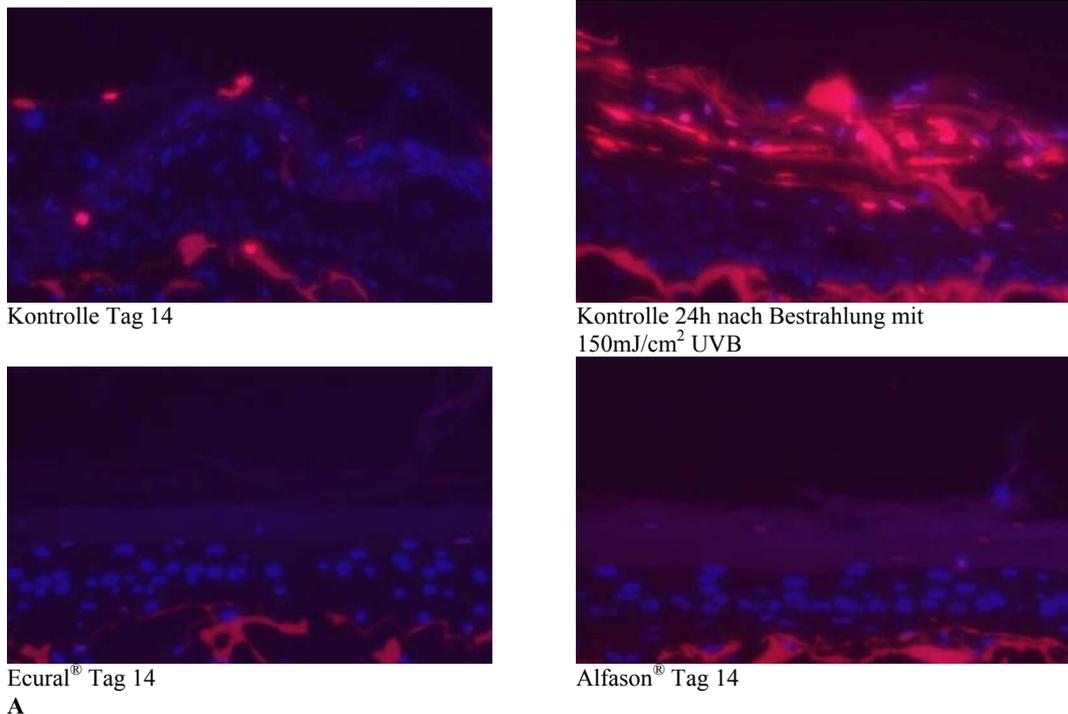
Abb. 3.20 Eine topische Applikation handelsüblicher GC und Calcipotriol enthaltender Salben induzierte eine epidermale Atrophie.

FTSMs wurden am Tag 0 und Tag 14 der Behandlung fixiert. H/E Färbungen zeigten, dass die Anzahl der epidermalen Zellschichten nach Behandlung mit Wirkstoff enthaltenden Salben deutlich reduziert war. (40x)

3.5.4 Topische Applikation von GC Salben induzierte keine Apoptose, jedoch wurde die Proliferation der epidermalen Keratinozyten gehemmt

Die Ursachen der, in den vorausgehenden Abschnitten beschriebenen GC vermittelten, epidermalen Atrophie wurden durch immunhistochemische Analysen näher untersucht. Anhand des Tunnelassays wurde geprüft, ob die GC vermittelte Reduktion der epidermalen Zellschichten auf Apoptose zurückzuführen sei. Als Positivkontrolle dienten UVB bestrahlte FTSMs (Sugimoto et al., 2006; Hurwitz und Spandau, 2000; Afaq et al., 2007). In deren

oberen epidermalen Zellschichten konnten Tunnel-positive Zellen identifiziert werden (Abb. 3.21 A). Zwischen den unbehandelten und den GC behandelten FTSMs am Tag 14 der Behandlung konnten keine Unterschiede in Bezug auf die Tunnelfärbung festgestellt werden. Exemplarisch wurden die GC Salben Ecural[®] und Alfason[®] ausgewählt. In der Analyse der epidermalen Zellschichten konnten hoch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle und Ecural[®] und ebenfalls zwischen Ecural[®] und Alfason[®] dokumentiert werden. Als zweiter Mechanismus, welcher ebenfalls für die Reduktion der epidermalen Zellschichten verantwortlich sein könnte, wurde die bereits in der Literatur beschriebene Eigenschaft, die Proliferation (Lange et al., 1997; Lange et al., 2000) zu hemmen, untersucht. Ki-67 diene als Marker der Proliferation (Onuma et al., 2001; Lee et al., 2002; van der Vleuten et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Ki-67 positiven Zellen im Stratum basale nach der 14 Tage dauernden GC Behandlung deutlich reduziert war (Abb. 3.21 B). In den unbehandelten Kontrollen war ungefähr jede vierte Zelle des Stratum basale Ki-67 positiv. Kein signifikanter Unterschied bestand Zwischen den Applikationskontrollen und den unbehandelten Kontrollen bestand kein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zur Kontrolle am Behandlungstag 14 war eine höchst signifikante Reduktion proliferativer Keratinozyten in den Dermatop[®], Advantan[®] und Ecural[®] behandelten FTSMs feststellbar. Die Anzahl Ki-67 positiver Zellen im Stratum basale der Dermatop[®] behandelten FTSMs war um 32% reduziert. Advantan[®] vermittelte eine Reduktion der proliferativen basalen Keratinozyten um 20%. Den stärksten Einfluss auf die Proliferation der gezeigten GC Salben übte Ecural[®] mit einer um 67% reduzierten Anzahl Ki-67 positiver Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aus.



B

Abb. 3.21 GC hemmen die Proliferation der epidermalen Keratinozyten

Epidermale Verdünnung infolge langfristiger Behandlung mit GC-Salben wurde mit Abnahme der Anzahl proliferativer Zellen, jedoch nicht mit gesteigerter Apoptose korreliert. Die genannten Salben wurden 14 Tage topisch auf FTSMs appliziert. (A) DNA-Strangbrüche wurden mit ApopTag[®] an FTSM Schnitten nachgewiesen. Während der Behandlungsdauer wurde keine wesentliche Induktion apoptotischer Zellen beobachtet. Als Positivkontrollen dienten FTSMs, die 24h nach Bestrahlung mit $150\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB fixiert wurden. In diesen Hautmodellen befanden sich tunnel-positive Zellen im oberen Bereich der Epidermis (100x). (B) Ki-67 Färbung der FTSMs zeigte GC abhängige Abnahme der Ki-67 positiven Zellen im Stratum basale. Dargestellt sind 3 unabhängige Experimente. (** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am Tag 14).

3.5.5 Kollagensynthese

Kollagen zählt zu den Proteinen der ECM, diese bilden ein komplexes Proteingerüst, welches der Haut mechanische Stabilität und Reißfestigkeit verleiht. Die Kollagensynthese kann durch verschiedene Parameter beeinflusst werden, so werden Fibroblasten z.B. in Wundsituationen zur Kollagensynthese angeregt. Bereits seit mehr als 50 Jahren ist bekannt, dass Ascorbinsäure die Kollagensynthese (Chan et al., 1990; Hata und Senoo, 1989) beeinflusst. Ascorbinsäure stimuliert die Pro-Kollagensynthese und dient auch als Coenzym der Prolyl-4-hydroxylase. Die Prolyl-4-hydroxylase katalysiert die Hydroxylierung der Prolin- und Lysinreste der einzelnen Kollagenmonomere, bevor diese zur Triplehelix verbunden werden. Des Weiteren ist bekannt, dass die Kollagensynthese durch GC beeinflusst wird. Im Rahmen von Vorversuchen, welche der Evaluation der Quantifizierungsmethode der Kollagensynthese dienten, wurde zunächst Ascorbinsäure eingesetzt. Ferner wurde untersucht, ob der verwendete Assay auch genutzt werden kann, um die Kollagensynthese in der Kultivierungsphase des FTSMs zu überwachen.

3.5.5.1 Ascorbinsäure stimulierte die Kollagensynthese

Im Folgenden wurde untersucht, in welcher Weise die P1NP Konzentration durch Ascorbinsäure beeinflusst wird. Primäre Fibroblasten wurden in 24-well Platten ausgesät und nach Adhäsion der Zellen am Kulturgefäßboden mit unterschiedlichen Ascorbinsäure-2-phosphat (ASP) Konzentrationen behandelt. Die Kulturmedien wurden 24h nach Stimulation abgenommen und in Bezug auf die enthaltene P1NP Konzentration untersucht. Die einzelnen Proben wurden zu unbehandelten Fibroblasten, welche als Kontrolle dienten, in Bezug gesetzt. ASP Zugabe erhöhte die sekretierte P1NP Konzentration signifikant, so war diese nach Zugabe von 50µg/ml ASP 425% (Abb. 3.22) höher als die respektive P1NP Konzentration der unbehandelten Kontrolle. Wurde die ASP Konzentration auf 250µg/ml erhöht, so wurde eine um 683% erhöhte P1NP Konzentration gemessen. Die als interne

Kontrolle der Messmethode analysierten HaCaT Zellen wiesen keine nachweisbare P1NP Konzentration auf.

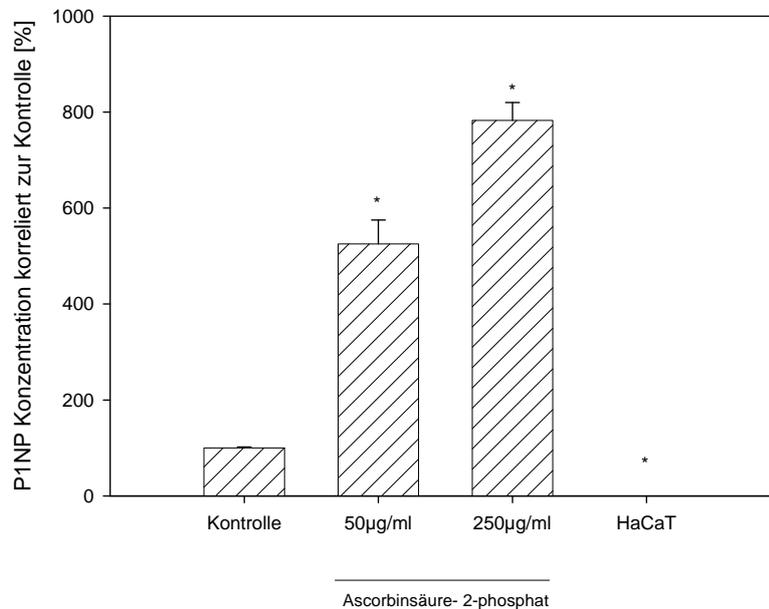


Abb. 3.22 Einfluss von Ascorbinsäure auf die Kollagensynthese.

Fibroblasten und HaCaT Zellen wurden in 24-well Platten ausgesät. 24h nach Zugabe von Ascorbinsäure wurde die P1NP Konzentration im Kulturmedium bestimmt. Es wurde signifikante konzentrationsabhängige Zunahme der P1NP Konzentration festgestellt. Die dargestellten Balken repräsentieren 3 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung. (* : $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle)

3.5.5.2 Während der submersen Fibroblastenphase der FTSMs nahm die

Kollagensynthese stetig zu

Nachdem am Monolayer gezeigt wurde, dass P1NP als Indikator der Kollagensynthese genutzt werden kann, untersuchten wir, ob diese auch zur Analyse der FTSMs einsetzbar ist.

Die Kulturmedien der FTSMs wurden bei jedem Medienwechsel während der submersen Kultivierungsphase der Fibroblasten entnommen und die P1NP Konzentration bestimmt. Aufgrund des Kultivierungsprotokolls wurde die erste P1NP Konzentrationsbestimmung 3 Tage nach Inokulation der Matrix mit primären Fibroblasten durchgeführt. Die Inkubationsdauer der Kulturmedien mit den FTSMs betrug von Tag 4 bis Tag 7 und am

Tag 11 der Inokulation jeweils 24h. Die Gegenüberstellung der P1NP Konzentrationen der Proben zeigte eine kontinuierliche Zunahme der P1NP Konzentration und somit der Kollagensynthese. Die P1NP Konzentration am Tag 4 lag bei 361ng/ml (Abb. 3.23), stieg auf 398ng/ml am Tag 5 und auf 422ng/ml am Tag 6. Am Tag 7 betrug diese 464ng/ml und erreichte in dieser Messreihe ihr Maximum am Tag 11 mit einer P1NP Konzentration von 536ng/ml. Diesen Ergebnissen entsprechend, fand bei den 24h mit den Kulturmedien inkubierten Proben eine deutliche zeitabhängige Zunahme der P1NP Konzentration statt.

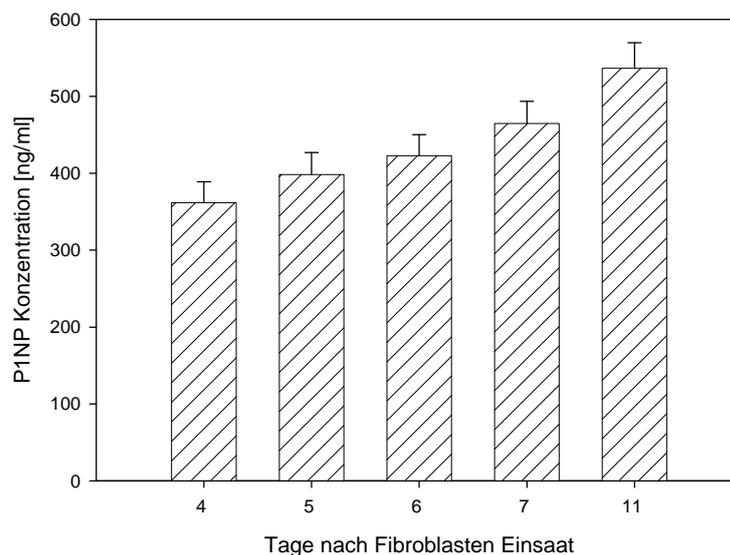


Abb. 3.23 Zunahme der Kollagensynthese in der submersen Fibroblastenphase

Die Kollagensynthese wurde, anhand der P1NP Konzentrationsbestimmung, während der submersen Kultivierungsphase der FTSMs beobachtet. Eine stetige Zunahme der P1NP Konzentration wurde dokumentiert. Die dargestellten Balken repräsentieren 3 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung.

3.5.6 Topische Applikation GC-haltiger Salben reduzierte die

Kollagensynthese

Neben den bereits eingehend beschriebenen Effekten der langfristigen GC Therapie auf die epidermale Verdünnung, verursachen diese auch schwerwiegende dermale Veränderungen. Zu den die dermale Atrophie bestimmenden Faktoren zählen u.a. die Hemmung der

Kollagensynthese (Gras et al., 2001; Schäfer-Korting et al., 2005) und ein beschleunigter Kollagenabbau (Schoepe et al., 2006). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der GC-enthaltenden Salben auf die Kollagensynthese als Parameter dermalen Atrophie ausgewählt. Pro-collagen type 1 N-terminal pro-peptide (P1NP) wird während der Kollagensynthese ins Kulturmedium sekretiert, somit diente es als Analyse-Parameter der Neusynthese von Kollagen Typ I. FTSMs wurden 11 Tage, jeden zweiten Tag, topisch mit 15µl GC-enthaltenden Salben behandelt. Die Kulturmedien wurden parallel zur topischen Applikation entnommen und in Bezug auf die enthaltene P1NP Konzentration analysiert. Die am Tag 0 ermittelte P1NP Konzentration der einzelnen FTSMs wurde auf 100% gesetzt. Die P1NP Konzentrationen der folgenden Behandlungstage wurden zur Konzentration am Tag 0 korreliert. Am Tag 11 war die P1NP Konzentration der unbehandelten Kontrolle 11% niedriger als zu Beginn des Experimentes (Abb. 3.24). Am Tag 11 der Behandlung mit topischen GC war eine signifikante Hemmung der Kollagensynthese für alle untersuchten Salben feststellbar. FTSMs, denen Dermatop[®] apikal aufgetragen wurde, zeigten eine um 45% reduzierte P1NP Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am Tag 11. Eine vergleichbare Hemmung wurde durch Advantan[®] vermittelt. Dieses reduzierte P1NP um 48%. Die P1NP Konzentrationen nach Ecural[®]- und Diprosis[®] Behandlung waren 75% bzw. 74% geringer, als die der unbehandelten Kontrolle am Tag 11. Das zu den GC der Klasse I zählende Alfason[®] hemmte die Kollagensynthese um 38%. GC Klassen spezifische Unterschiede wurden durch Korrelation der P1NP Konzentrationen der einzelnen GC Salben zu Alfason[®] am Tag 11 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die GC der Klasse II enthaltenden Salben Advantan[®] und Dermatop[®] die P1NP Konzentration im Vergleich zu den Alfason[®] behandelten FTSMs um 12% reduziert hatten. Im Gegensatz zu den Advantan[®] behandelten FTSMs war die P1NP Konzentrationsabnahme der Dermatop[®] behandelten FTSMs nicht signifikant. Topische Applikation von Klasse III enthaltenden GC Salben reduzierte die P1NP Konzentration noch deutlicher. Diprosis[®] wies eine um 58% geringere

P1NP Konzentration als die Alfason® behandelten FTSMs auf. Ecural® seinerseits reduzierte die P1NP Konzentration um 60%. Mit Hilfe des FTSMs konnten inhibierende Einflüsse der GC auf die Kollagensynthese in Bezug auf die verschiedenen GC Klassen differenziert werden.

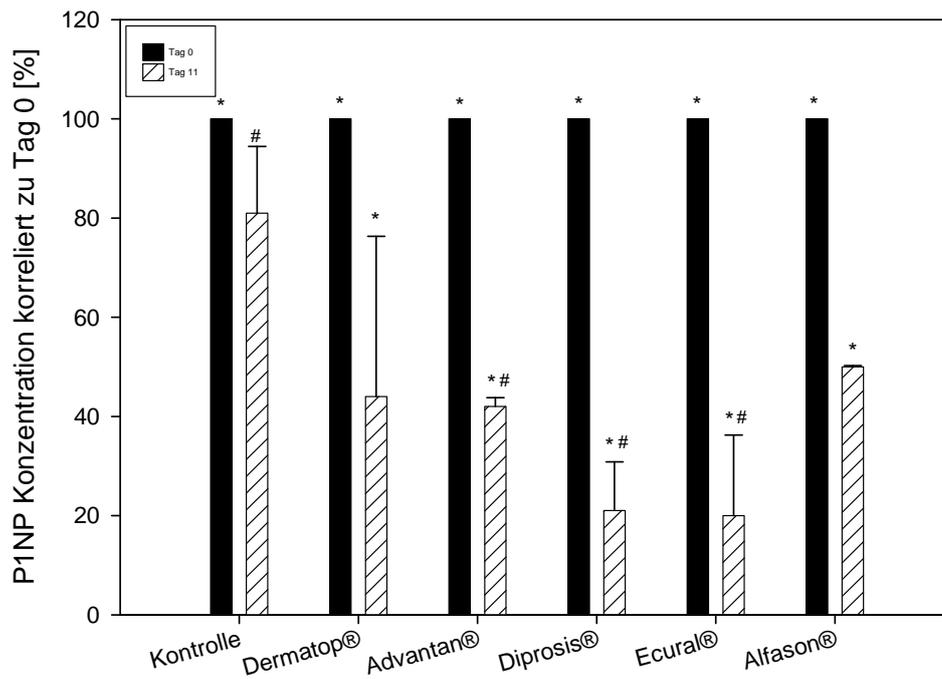


Abb. 3.24 Einfluss topischer Applikation GC-haltiger Salben auf die Kollagensynthese

FTSMs wurden 11 Tage topisch mit den genannten Salben behandelt. Die P1NP Konzentration wurde im Kulturmedium bestimmt. Es wurde eine signifikante GC-Klassen abhängige Reduktion der P1NP Konzentration beobachtet. Die dargestellten Balken repräsentieren 3 unabhängige Experimente und deren Standardabweichung. (* : $p \leq 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am Tag 11; # : $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Alfason® behandelten Probe am Tag 11)

3.6 Melanozytenmodelle

3.6.1 Integration von Melanozyten in das FTSM

Um das FTSM sukzessiv dem in vivo Zustand anzugleichen, wurden bei dessen Weiterentwicklung Melanozyten aus der Haut eines Farbigen integriert. Unterschiede bezüglich der Pigmentation des FTSMs waren bereits in der Aufsicht auf die Modelle erkennbar. In der Gegenüberstellung eines FTSMs (Abb. 3.25 A) und eines Melanozyten-FTSMs (Abb. 3.25 B) konnte eine deutliche Braunfärbung des Melanozyten-FTSMs erkannt werden. Bei höherer Vergrößerung (Abb. 3.25 C) wurde deutlich, dass Melanin, über die gesamte Oberfläche verteilt, vorlag. Die Pigmentierung war nicht homogen. Es konnten Bereiche höherer Melaninkonzentration erkannt werden.



Abb. 3.25 Vergleich des „klassischen“ FTSMs mit dem Melanozytenmodell

Morphologische Unterschiede des FTSMs (A: 1,5x) zum Melanozyten-FTSM (B: 2,5x; C: 4,5x) werden bereits in der Aufsicht deutlich.

Im Folgenden wurde untersucht, in welchen Bereichen des FTSMs sich die eingesäten Melanozyten angesiedelt hatten. H/E Färbungen zeigten, dass im Bereich des Stratum basale des Melanozyten-FTSMs epidermale Zellen mit dendritischen Fortsätzen (Abb. 3.26 B) angesiedelt waren. Zellen dieser Morphologie konnten in FTSM Schnitten (Abb. 3.26 A) nicht lokalisiert werden. Ferner unterschieden sich die beschriebenen Zellen eindeutig aufgrund ihrer dunkleren Färbung von den übrigen epidermalen Zellen.

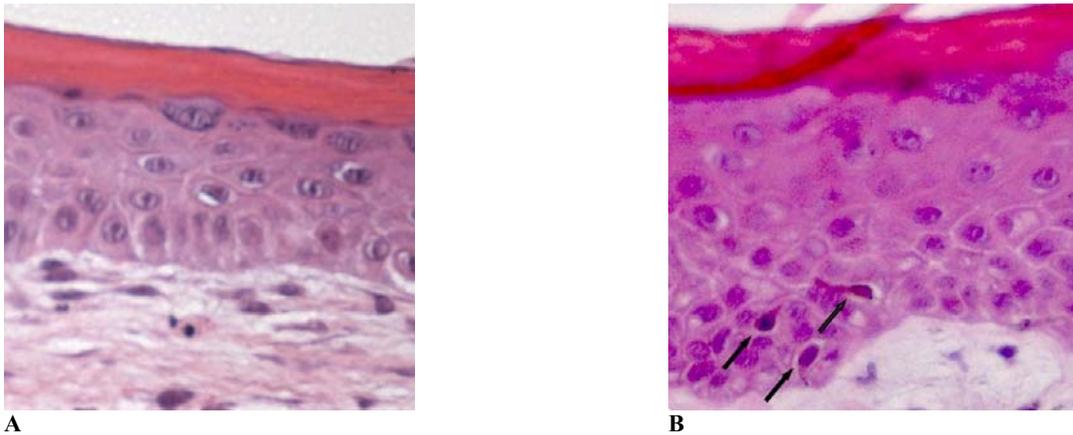


Abb. 3.26 Morphologischer Vergleich des FTSMs mit dem Melanozytenmodell

Melanozyten ordneten sich im Stratum basale des Melanozyten-FTSMs an. H/E Färbung zeigte, dass gegenüber dem „klassischen“ FTSM (A) im Melanozyten-FTSM (B) Melanozyten (Pfeile) in den unteren Strata der Epidermis zu finden waren (40x).

Zur eindeutigen Identifikation der Melanozyten wurde in Paraffinschnitten das melanozyten-spezifische Protein S-100 gefärbt. Wie bereits in den H/E Schnitten erkannt werden konnte, befanden sich die Zellkörper der Melanozyten im Bereich des Stratum basale (Abb. 3.27 A). Lediglich in dieser Schicht waren S-100 positiv gefärbte Zellkörper zu erkennen. Die Pigmentierung erfolgt *in vivo*, indem melaninhaltige Vesikel (Melanosomen) über Dendriten zu den Keratinozyten transportiert und von diesen phagozytiert werden. Im gesamten epidermalen Bereich des Melanozyten-FTSMs waren angeschnittene melanozytäre Dendriten angefärbt. Bereits bei 10facher Vergrößerung konnten S-100 positive Dendriten identifiziert werden. Bei höherer Vergrößerung (Abb. 3.27 B-D) wurde die dendritische Morphologie der angefärbten Melanozyten noch deutlicher. Über die ausgebildeten Dendriten bestand direkter Kontakt zwischen den Melanozyten und den Keratinozyten. Das Verhältnis von Melanozyten zu Keratinozyten betrug 1:30, welches dem *in vivo* Verhältnis entsprach.

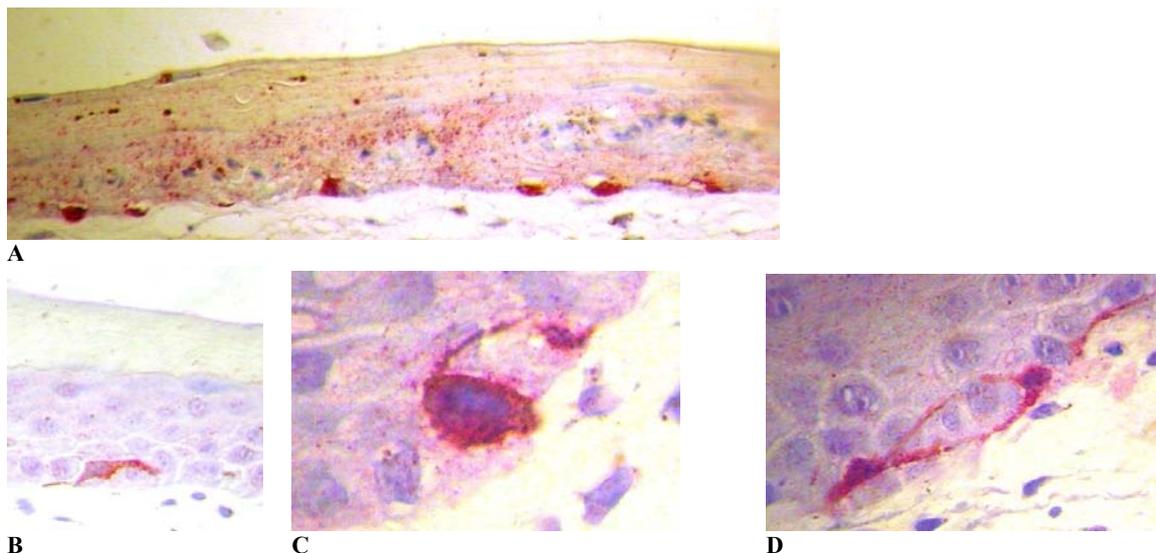


Abb. 3.27 Immunhistochemischer Nachweis der Melanozyten im FTSM

Melanozyten ordneten sich im Bereich des Stratum basale an und bildeten Dendriten aus, welche den gesamten epidermalen Bereich umspannten. S-100 Färbung von Melanozyten-FTSMs (A: 10x, B: 40x, C und D: 100x)

3.6.2 Einfluß der Pigmentzellen auf die UVB induzierte Cytokinsekretion

Analog zu den unter „Inflammatorische Stimulation des FTSMs steigert die Cytokinsekretion“ beschriebenen Ergebnissen wurden Melanozyten-FTSMs mit unterschiedlichen UVB Intensitäten bestrahlt. 24h nach der Stimulation wurden die Kulturmedien entnommen und die Konzentration der sekretierten Cytokine bestimmt. Wie bereits für das „klassische“ FTSM beschrieben, konnte eine UVB-intensitätsabhängige Stimulation der Cytokinsekretion nachgewiesen werden. Die IL-6 Sekretion von kaukasischen Melanozyten-FTSMs im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle war nach Bestrahlung mit 50mJ/cm^2 UVB um 75% erhöht (Abb. 3.28). Die respektive IL-8 Konzentration war um 37% erhöht. Eine Steigerung der UVB Intensität auf 100mJ/cm^2 bewirkte, dass 121% mehr IL-6 sekretiert wurde als von der unbestrahlten Kontrolle. Durch Erhöhung der eingesetzten UVB Intensität auf 200mJ/cm^2 , 300mJ/cm^2 oder 400mJ/cm^2 konnte keine weitere Steigerung der Cytokinfreisetzung erreicht werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden in den IL-8 Konzentrationsbestimmungen der bestrahlten Melanozyten-FTSMs gemessen. Die IL-8 Konzentration der bestrahlten Melanozyten-FTSMs erreichte nach Bestrahlung mit

100mJ/cm² UVB ihr Maximum. Es konnten durch eine weitere Erhöhung der UVB Intensität keine additiven Effekte nachgewiesen werden.

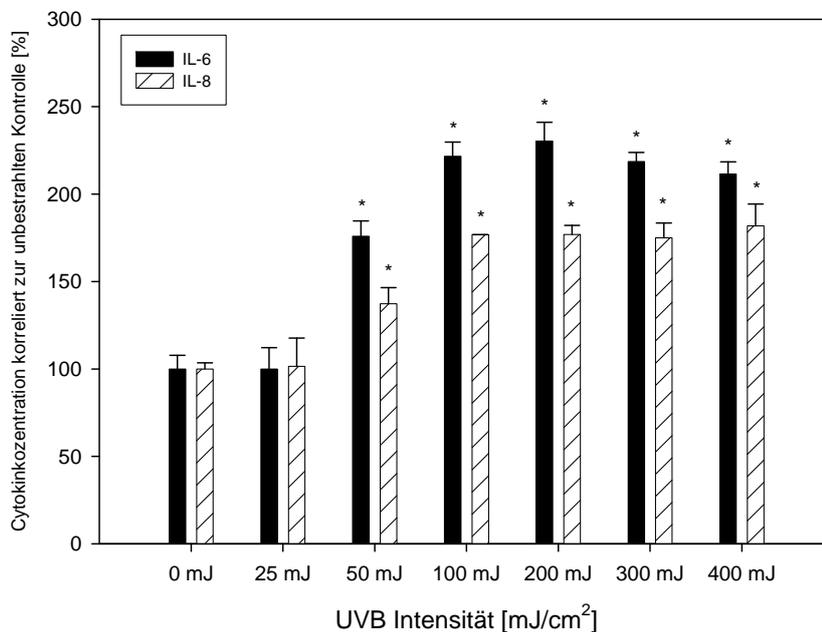


Abb. 3.28 Melanozyten-FTSM eines kaukasischen Spenders: UVB abhängige IL-6 und IL-8 Sekretion

24h nach der Bestrahlung der Hautmodelle wurden die Kulturmedien entnommen und die Cytokinkonzentrationen gemessen. Diese wurden zu den unbestrahlten Kontrollen korreliert, welche auf 100% gesetzt wurden. Die dargestellten Balken repräsentieren 3 unabhängige Experimente, deren Standardabweichung indiziert wurde. (* : $p \leq 0,05$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle)

Es ist allgemein bekannt, dass individuelle Unterschiede bei den einzelnen Hauttypen bezüglich der UV-Toleranz und des Sonnenbrandrisikos bestehen. Wie in den vorausgehenden Experimenten für kaukasische Melanozyten-FTSMs beschrieben, wurden Melanozyten-FTSMs deren epidermale Zellen von einem dunkelhäutigen Spender stammten mit unterschiedlichen UVB-Intensitäten bestrahlt (Abb.3.29). Es wurde ebenfalls eine signifikante UVB-intensitätsabhängige Konzentrationszunahme der inflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-8 beobachtet. Nach Bestrahlung mit 100mJ/cm² UVB lag die IL-6 Konzentration um 77% höher als die Konzentration der unbestrahlten Kontrolle. Eine Erhöhung der UVB Intensität auf 200mJ/cm² steigerte diese um 270% im Vergleich zur

unbestrahlten Kontrolle. Die IL-8 Sekretion wurde durch UVB weniger intensiv stimuliert, so war eine um 46% gesteigerte Konzentration nach Bestrahlung mit $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB messbar. Die Erhöhung der UVB Intensität auf $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ bewirkte, dass die respektive IL-8 Konzentration 131% höher als die der unbestrahlten Kontrolle war. Eine Plateauphase der Cytokininduktion, wie für das kaukasische Melanozyten-FTSM (Abb. 3.28) ab einer UVB-Intensität von $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ beobachtet wurde, konnte für das Melanozyten-FTSM des dunkelhäutigen Spenders (Abb. 3.29) nicht dokumentiert werden.

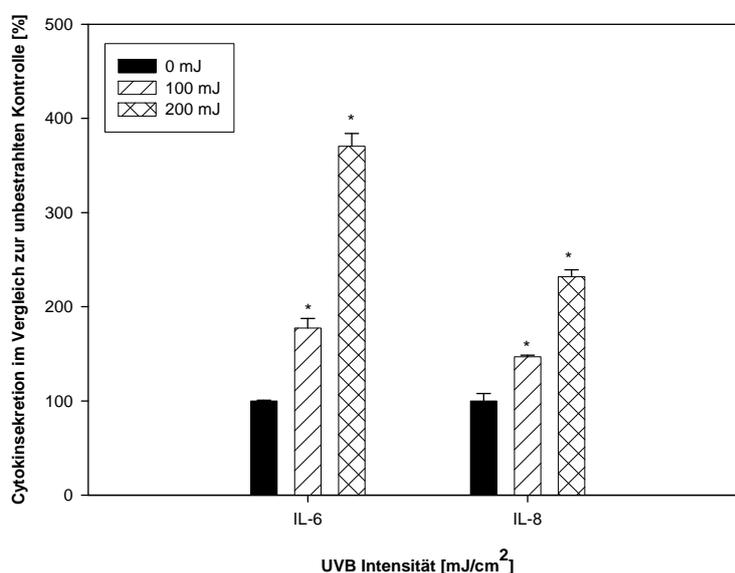


Abb. 3.29 Melanozyten-FTSM eines dunkelhäutigen Spenders: UVB abhängige IL-6 und IL-8 Sekretion

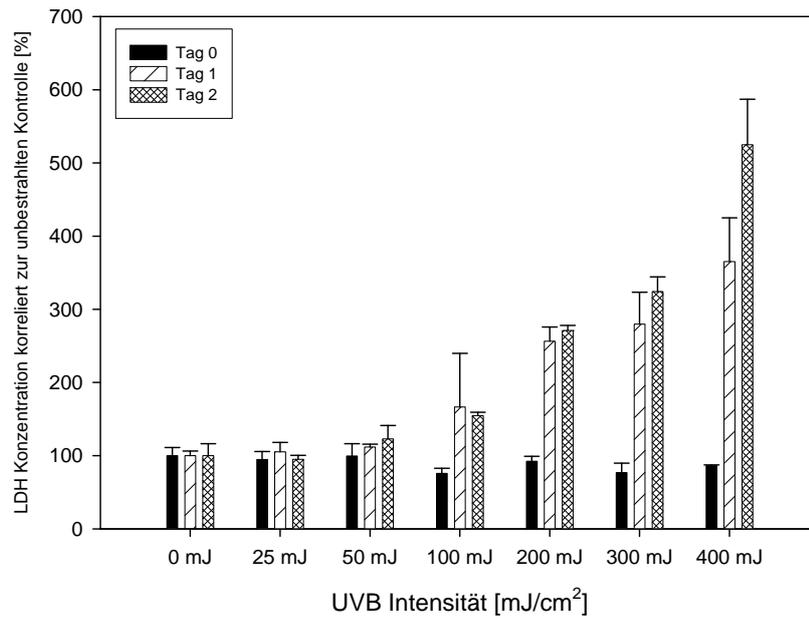
Die Cytokinsekretion wurde 24h nach Bestrahlung der Melanozyten-FTSMs gemessen. Die Cytokinkonzentrationen wurden zu den unbestrahlten Kontrollen korreliert, welche auf 100% gesetzt wurden. Die dargestellten Balken repräsentieren 3 unabhängige Experimente, deren Standardabweichung indiziert wurde. (* : $p \leq 0,05$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle)

3.6.3 UVB vermittelte Stimulation von Melanozyten-FTSMs erhöhte die

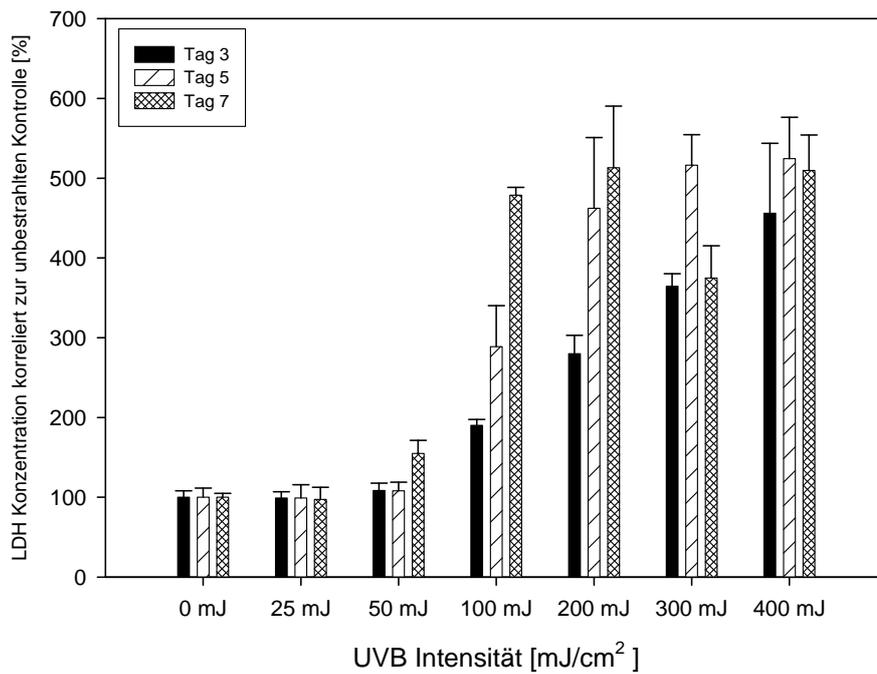
LDH-Freisetzung

Das cytoplasmatische Enzym LDH kann als Indikator für cytotoxische Zellreaktionen verwendet werden. In den im Folgenden dargestellten Experimenten wurden kaukasische Melanozyten-FTSMs täglich mit unterschiedlichen UVB Intensitäten bestrahlt. Die

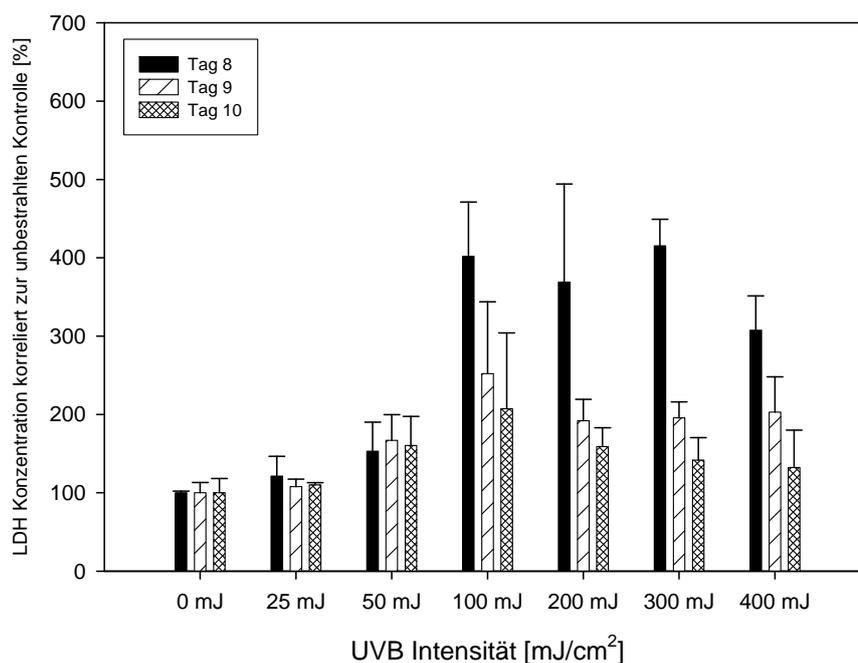
Kulturmedien wurden jeweils 24h nach der UVB Stimulation entnommen und die enthaltene LDH Konzentration gemessen. Vor Beginn des Bestrahlungsexperimentes gab es keine wesentlichen Unterschiede in den LDH Konzentrationen zwischen den untersuchten Melanozyten-FTSMs (Abb. 3.30 A). Am Tag 1 war eine Steigerung der LDH Konzentration bei den mit $200\text{-}400\text{mJ/cm}^2$ UVB bestrahlten Melanozyten-FTSMs zu beobachten. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich, dass die LDH Konzentration in Abhängigkeit von der UVB Intensität (200mJ/cm^2 : 156%; 300mJ/cm^2 : 180%; 400mJ/cm^2 : 265%) erhöht war. Die Bestimmung der LDH Konzentrationen an den Tagen 2 (Abb. 3.30 A), 3, 5 und 7 (Abb. 3.30 B) zeigten vergleichbare Messergebnisse. Die LDH Konzentrationen nahmen nach dem Behandlungstag 8 deutlich ab. Dies zeigte sich u.a. an den mit 200mJ/cm^2 UVB bestrahlten Melanozyten-FTSMs. Die LDH Konzentration war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am Tag 8 (268%) deutlich stärker erhöht als am Tag 9 (90%) (Abb. 3.30 C) und am Tag 10 (58%). Die LDH Konzentration, der mit 50mJ/cm^2 UVB bestrahlten Melanozyten-FTSMs, war ab Tag 7 (Abb. 3.30 B) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht (55%). Es konnte keine deutliche LDH Konzentrationsveränderung für die mit 25mJ/cm^2 UVB bestrahlten Melanozyten-FTSMs ermittelt werden (Abb. 3.30 A-C).



A



B



C

Abb. 3.30 UVB abhängige LDH Sekretion bei kaukasischen Melanozyten-FTSMs

Die Kulturmedien wurden (A) an den Tagen 0, 1, 2; (B) 3, 5, 7; (C) 8, 9 und 10 entnommen und in Bezug auf die enthaltene LDH Konzentration untersucht. Die LDH Konzentration der unbestrahlten Kontrollen wurde auf 100% gesetzt und alle übrigen Proben wurden zu ihnen korreliert. Die dargestellten Balken repräsentieren 3 unabhängige Experimente, deren Standardabweichung indiziert wurde.

3.7 Herstellung eines autologen Hautäquivalentes auf der Grundlage der Wundauflage Matriderm[®]

Die Versorgung großflächiger, tiefer, schwer heilender Wunden wie z.B. bei Ulcus cruris (offene Beine) oder höhergradiger Verbrennungen stellt besondere Anforderungen an die Medizin. So ist eine zeitnahe Versorgung und Wiederherstellung der Barrierefunktion der Haut essentiell für einen positiven Heilungsverlauf. Aufgrund der bereits vorgestellten Erfahrungen mit drei-dimensionalen FTSMs wurden diese zur Herstellung autologer Hautäquivalente genutzt. Die verwendeten primären Zellen wurden aus Spalthautgewebe, deren Entnahme im Klinikum Offenbach erfolgte, isoliert (siehe „Material und Methoden“) und bis zur Konfluenz in Zellkulturflaschen kultiviert. Anschließend wurden sie auf die als

Wundaufgabe zugelassene Biomatrix Matriderm® eingesät. Im Zuge der prä-klinischen Phase der Wundversorgung schwerstverbrannter Patienten ist es wichtig, das zur Verfügung gestellte Patientenmaterial optimal zu nutzen und maximale Zellzahlen zu isolieren. Die Effektivität der enzymatischen Aufarbeitung des Spalthautgewebes (Abb. 3.31 A) wurde anhand von H/E gefärbten Gewebeschnitten dokumentiert. Thermolysin eignete sich sehr gut zur Trennung von Epidermis (Abb. 3.31 B) und Dermis (Abb. 3.31 C).

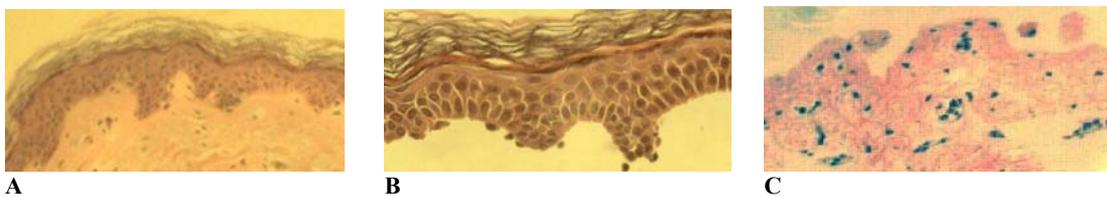


Abb. 3.31 Histologische Dokumentation der Spalthaut-Aufarbeitung

Enzymatische Aufarbeitung ermöglichte distinkte Trennung des Spalthautgewebes (A) unterhalb des Stratum basale in Epidermis (B) und Dermis (C). Exemplarisch sind Aufnahmen von H/E gefärbten Paraffinschnitten dargestellt. (A: 10x; B und C: 40x)

3.7.1 Entwicklung der Hautäquivalente

Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen gaben Aufschluss über die Struktur der Matrix und der Hautäquivalente. Die Proben wurden, wie unter „Material und Methoden“ ausgeführt, aufgearbeitet und an einem REM analysiert. Es zeigte sich, dass die die Biomatrix aufbauenden Kollagen- und Elastinfasern homogen innerhalb der Matrix verteilt waren (Abb. 3.32 A). Die Porengröße, welche den eingesäten Fibroblasten als „Gerüst“ diente, lag zwischen 15µm und 30µm. Nach Einsaat der Fibroblasten veränderte sich die Matrixstruktur (Abb. 3.32 B). Am Tag 14 nach der Fibroblasten Einsaat konnten neusynthetisierte Kollagenfasern in REM Aufnahmen eindeutig identifiziert werden. Das Kollagengerüst war engmaschiger als das Kollagengerüst der zellfreien Matrix. Die initial vorhandenen Poren waren durch die neusynthetisierten Kollagenfasern fast vollständig ausgefüllt.

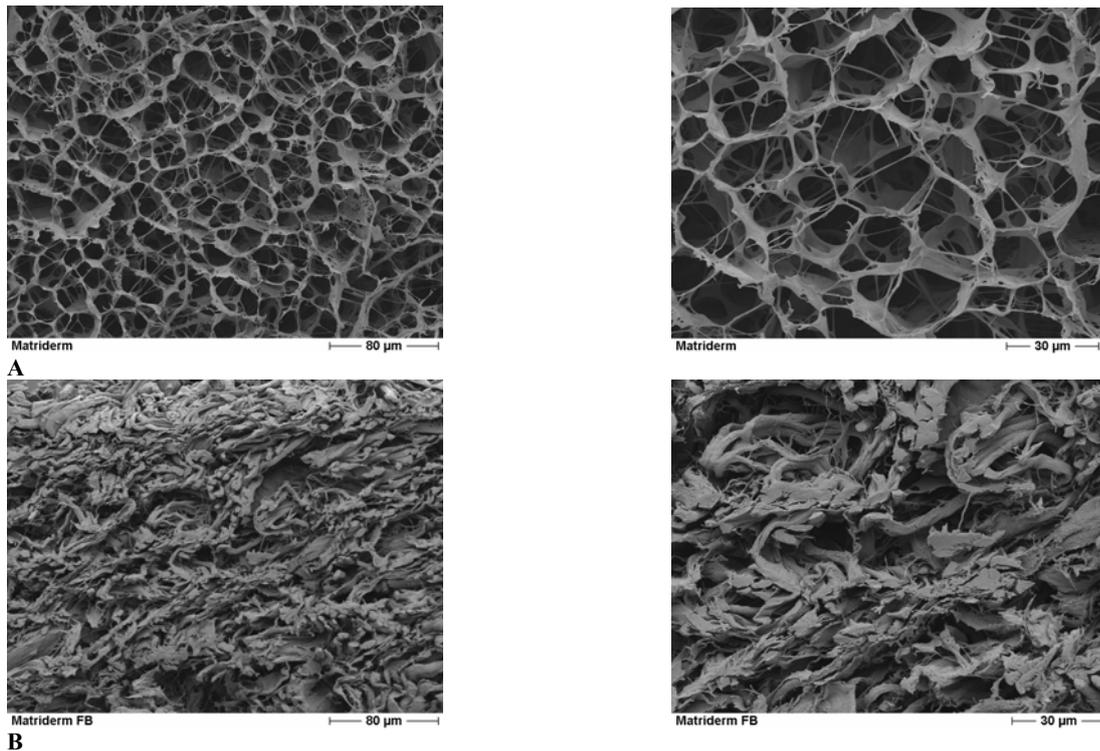


Abb. 3.32 REM Aufnahmen der Biomatrix Matriderm[®]

Fibroblasten sekretierten Kollagen in den extrazellulären Raum der Biomatrix. REM Aufnahmen der Biomatrix Matriderm[®] ohne Zellen (A) und 14 Tage nach Inokulation mit Fibroblasten (B).

Eine histologische Analyse von Hautäquivalenten, welche parallel zur Probenentnahme der REM Analysen fixiert wurden, zeigte, dass sich im apikalen Bereich des Hautäquivalentes eine geschlossene Fibroblastenschicht gebildet hatte (Abb. 3.33 A). Die anhand der REM Aufnahmen postulierte These, dass der Matrixbereich vollständig von Fibroblasten besiedelt wurde, bestätigte sich durch die H/E Aufnahmen des inneren Bereiches der Matrix. Im gesamten dermalen Äquivalent wurden Fibroblasten (Abb. 3.33 B, mit Pfeilen markiert) identifiziert. Aufgrund ihrer distinkten Morphologie waren sie deutlich von Kollagenfasern zu unterscheiden.

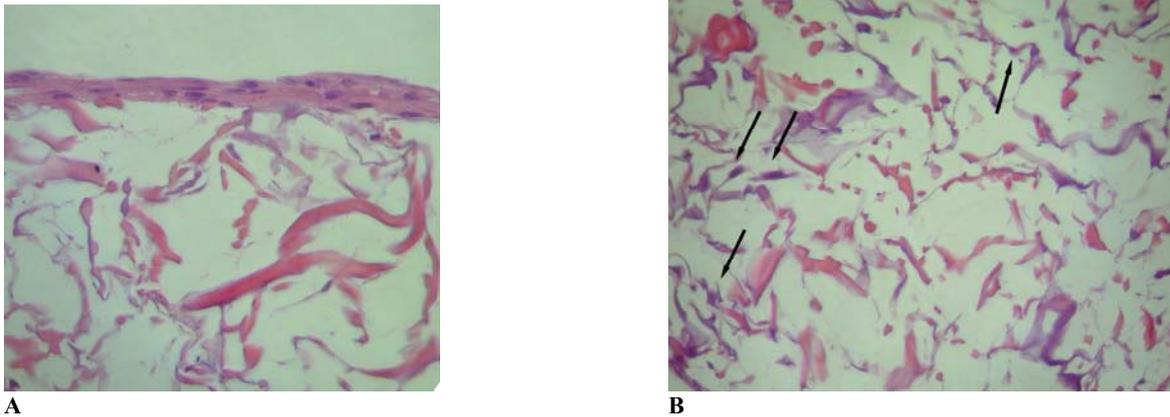


Abb. 3.33 Besiedelung der Biomatrix Matriderm® mit Fibroblasten

Die Biomatrix Matriderm® war 14 Tage nach der Fibroblasten Einsaat dicht besiedelt. Autologe Kollagensekretion wurde in H/E gefärbten Paraffinschnitten nachgewiesen. In vertikalen Schnitten konnte eine geschlossene apikale Fibroblastenschicht gezeigt werden (A). Der dermale Bereich war homogen von Fibroblasten (Pfeile) besiedelt (B).

Die REM Aufnahmen und histologischen Schnitte der Hautäquivalente zeigten, dass Matriderm® zur Kultivierung dermalen Zellen und somit zum Aufbau eines Dermisersatzes geeignet ist. Im Folgenden wurden zeitkinetische Analysen der Entwicklung des dermalen Bereichs des Äquivalentes durchgeführt, um die Herstellungsphase zu verkürzen. Hierbei wurde die Inokulationsmenge der Fibroblasten variiert. Es zeigte sich, dass $2 \cdot 10^4$ Fibroblasten/ml ausreichend waren, um den dermalen Bereich innerhalb der submersen Kultivierungsphase vollständig zu besiedeln. Die Fibroblastenphase konnte auf 2 Tage verkürzt werden.

Die Herstellung eines autologen Hautäquivalentes beinhaltet neben einem mit Fibroblasten besiedelten dermalen Bereich auch die Ausbildung einer Epidermis ähnlichen Struktur. Zunächst wurde die Keratinozytenzelllinie HaCaT verwendet. In REM Aufnahmen (Abb. 3.34 A, B) zeigte sich, dass sich während der Keratinozytenphase eine geschlossene Oberflächenstruktur des Hautäquivalentes ausbildete. Die Struktur des dermalen Bereiches (Abb. 3.34 C und D) entsprach den nur mit Fibroblasten inokulierten Hautäquivalenten.

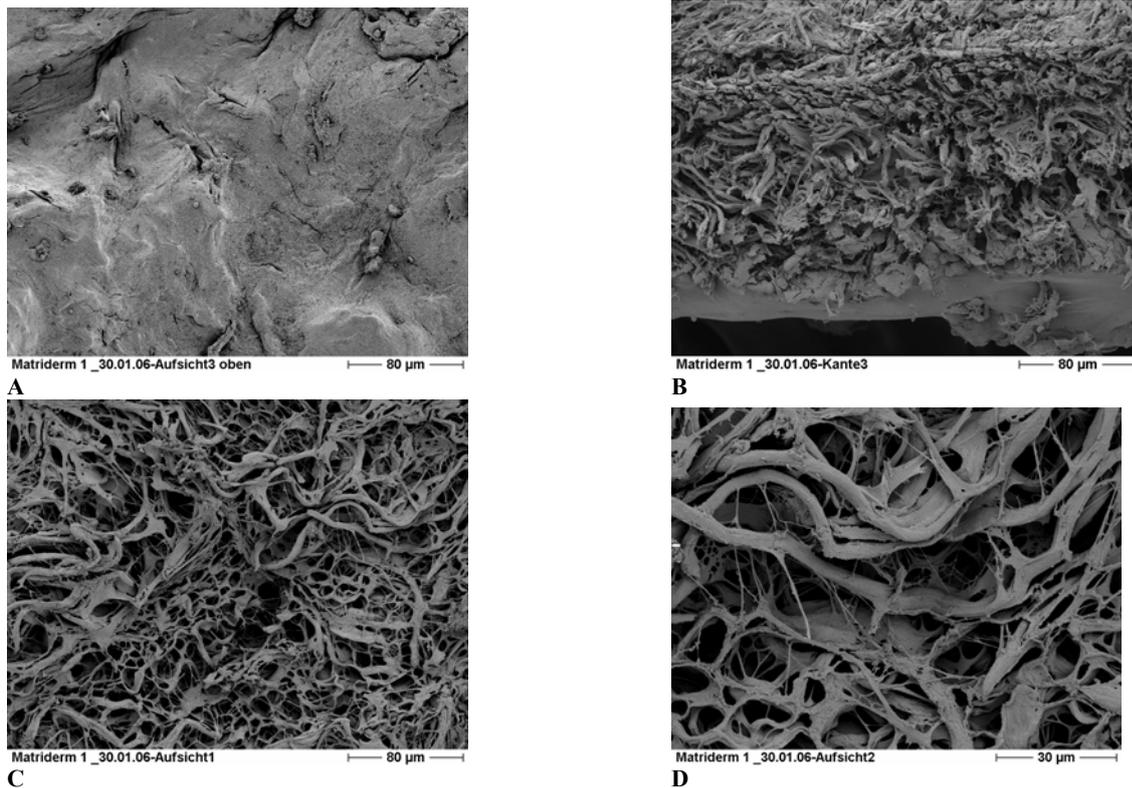


Abb. 3.34 REM Aufnahmen des Hautäquivalentes

Auf einem dichten Kollagennetzwerk bildete sich nach Keratinozyten Einsaat eine geschlossene epidermale Schicht. Dargestellt sind REM Aufnahmen von Hautäquivalenten 21 Tage nach Fibroblasten Einsaat und 12 Tage nach Einsaat der Keratinozytenzelllinie HaCaT. Die apikale (A) und vertikale (B) Ansicht der FTSMs zeigte die Entwicklung einer geschlossenen epidermalen Schicht. In axialen Schnitten (C und D) war das dichte Kollagennetzwerk erkennbar.

Während der Optimierung des Kultivierungsprotokolls des Hautäquivalentes wurde u. a. untersucht, welche Korrelation zwischen der Differenzierung und dem Modus der Kultivierung besteht. Hierzu wurden Hautäquivalente nach Adhäsion der epidermalen Zellen an die ALI überführt. Es zeigte sich, dass die Ausbildung einer mehrschichtigen Epidermis nur nach Überführen an die ALI stattfand (Abb. 3.35 B). Wurde das Hautäquivalent über den gesamten Kultivierungszeitraum submers kultiviert (Abb. 3.35 A), so bildete sich eine einschichtige Epidermis aus. Bereits am Tag 2 der ALI Phase konnten Ansätze zur Ausbildung Reteleiste ähnlicher Strukturen erkannt werden. Am Tag 9 der ALI Phase waren diese eindeutig identifizierbar. Im apikalen Bereich des Äquivalentes bildete sich eine 5-8 Zelllagen umfassende Epidermis aus (Abb. 3.36 A). Von dieser erstreckten sich in den

dermalen Bereich Strukturen, welche morphologisch den in nativer Haut ausgebildeten Reteleisten entsprachen. Diese waren in den von Fibroblasten besiedelten Bereich eingebunden (Abb. 3.36 B).

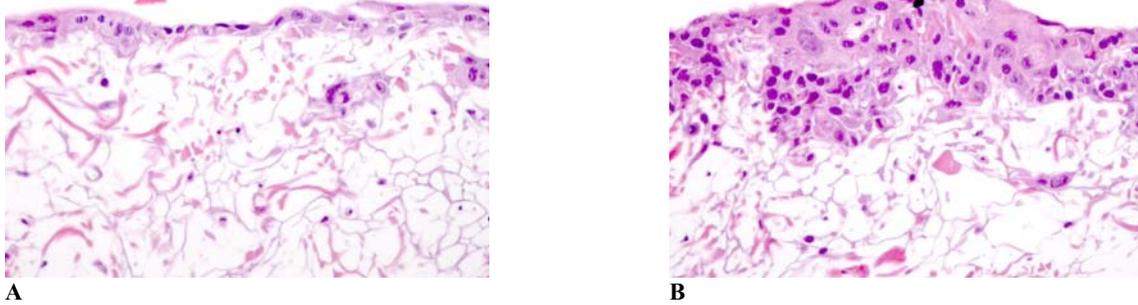


Abb. 3.35 Entwicklung einer mehrschichtigen Epidermis nach Überführung des Hautäquivalentes an die ALI
 Histologische Aufnahmen (H/E-Färbung) zeigten, dass 7 Tage nach Fibroblasten Einsaat und 5 Tage nach HaCaT-Keratinocyten Einsaat der dermale Bereich von Fibroblasten besiedelt war und die Entwicklung einer mehrschichtigen Epidermis begann. Für die Ausbildung einer mehrschichtigen Epidermis war die Überführung des Hautäquivalentes an die ALI essentiell. Unterblieb diese, so entwickelte sich eine einschichtige Epidermis (A), wohingegen bereits am Tag 2 nach Überführung an die ALI eine mehrschichtige Epidermis (B) zu erkennen war. (40x)

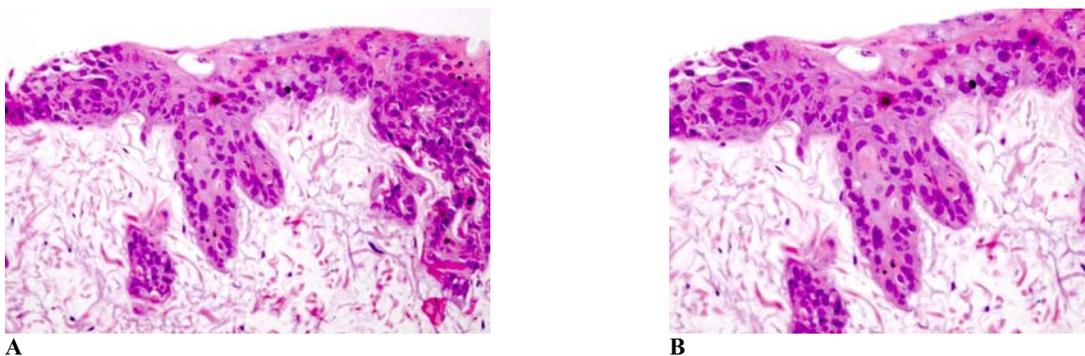


Abb. 3.36 HaCaT bildeten Reteleiste ähnliche Strukturen

Dargestellt wurden H/E Aufnahmen eines Hautäquivalentes am Tag 16 der Fibroblasten Kultivierung, Tag 14 der HaCaT Kultivierung und Tag 9 der ALI. (A: 40x, B: Detailaufnahme aus A)

Nachdem, wie in dem vorausgehenden Abschnitt beschrieben, die Eignung der Biomatrix Matrigel® zur Kultivierung primärer dermaler Zellen und HaCaT Keratinocyten zwecks Herstellung eines Hautäquivalentes gezeigt werden konnte, wurden die verwendeten HaCaT

Keratinocyten in den im Folgenden dargestellten Versuchsergebnissen durch primäre Keratinocyten ersetzt. Der dermale Bereich war, wie in den bereits vorgestellten Versuchen, vollständig von primären Fibroblasten besiedelt. Auf dem Dermisersatz bildete sich nach einer Gesamtkultivierungszeit an der ALI von 9 Tagen eine 1-2 Zellschichten umfassende Epidermis. Den Ergebnissen mit HaCaT Keratinocyten entsprechend, konnte die Bildung Reteleiste ähnlicher Strukturen auch in diesen Hautäquivalenten beobachtet werden (Abb. 3.37 A, B). In der Übersicht (Abb. 3.37 A) wird deutlich, dass es sich nicht um punktuelle Erscheinungen handelte, sondern, dass diese Strukturen homogen über das gesamte Hautäquivalent verteilt waren. Detailaufnahmen der genannten Strukturen zeigten, dass diese morphologisch den Reteleisten entsprechen.

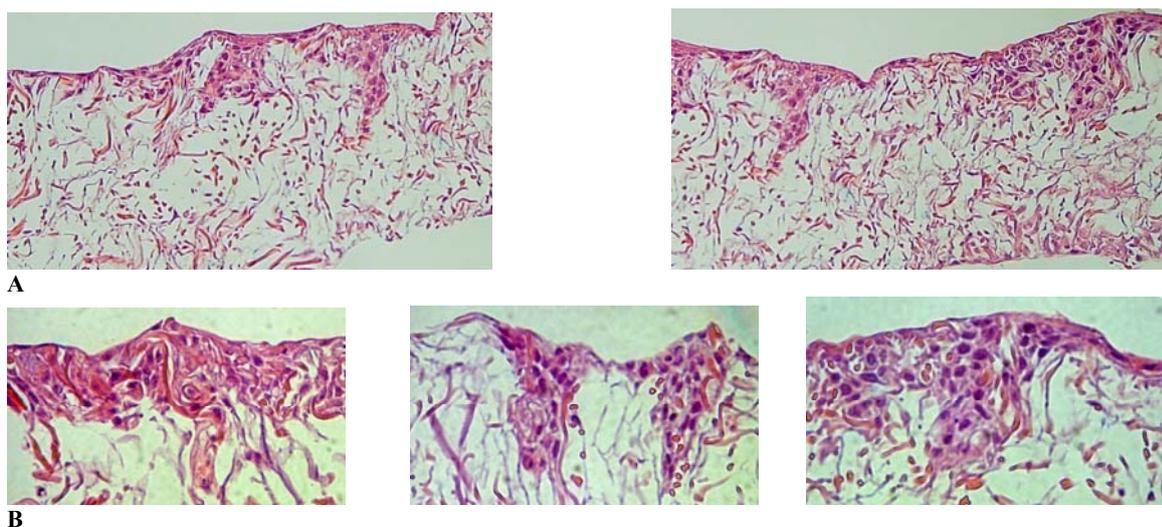


Abb. 3.37 Primäre Keratinocyten bildeten Reteleiste ähnliche Strukturen

Dargestellt wurden H/E Aufnahmen von Hautäquivalenten am Tag 16 der Fibroblasten Kultivierung, Tag 14 der Kultivierung der primären Keratinocyten und Tag 9 der ALI. (A: 10x, B: 100x)

3.7.2 Differenzierungsmarker

Die Expression und Lokalisation charakteristischer Differenzierungsmarker wurden am Hautäquivalent untersucht. Zur Bestimmung der Differenzierungsstadien der Keratinocyten wurden proliferative Zellen mit Ki-67 angefärbt. Im Bereich des Stratum basale sowie in den

Spitzen der Reteleiste ähnlichen Strukturen waren Ki-67 positive Zellen (Abb. 3.38) zu finden. Die proliferativen Zellen waren homogen über die gesamte Epidermis verteilt.

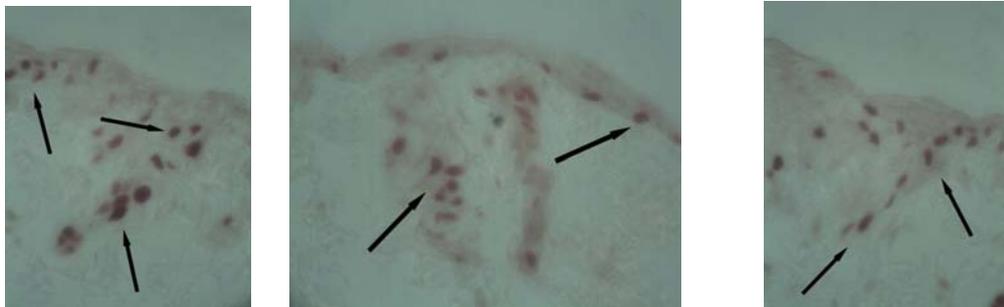
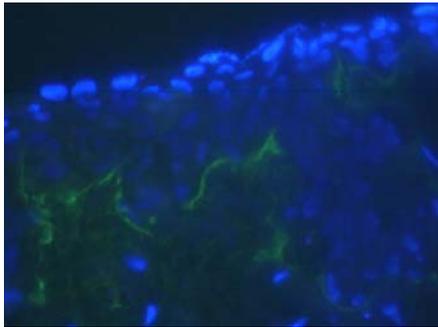


Abb. 3.38 Nachweis proliferativer Zellen im Hautäquivalent

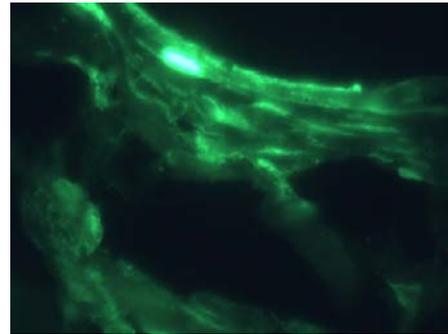
In den Regionen des Stratum basale und in den Reteleiste ähnlichen Strukturen waren proliferative Keratinozyten erkennbar. In immunhistologischen Färbungen von Hautäquivalenten am Tag 16 nach Fibroblasten Einsaat, Tag 14 nach Einsaat primärer Keratinozyten und Tag 9 der ALI wurden Ki-67 positive Zellen (Pfeile) in den basalen Zellschichten der Epidermis identifiziert. (100x)

Die immunhistochemische Färbung der beiden Differenzierungsmarker Laminin und Elastin zeigte, dass deren Lokalisation, der nativer Haut entsprach. So war Laminin ausschließlich in der Junctionszone zwischen Dermis und Epidermis zu beobachten (Abb. 3.39 A). Dies entspricht der Expression in nativer Haut, welche auf die Basallamina beschränkt ist. Eine geschlossene Lamininschicht bildete eine distinkte Abgrenzung zwischen der mehrschichtigen Epidermis und dem darunter liegenden dermalen Bereich. Zur eindeutigeren Identifikation der Lokalisation von Laminin wurden die Zellen mit DAPI gegengefärbt.

Die Expression und Struktur von Elastin kann als weiteres Qualitätskriterium von FTSMs und Hautäquivalenten verwendet werden. In der dargestellten Färbung zeigte sich, dass Elastin (Abb. 3.39 B) im oberen Bereich der Dermis exprimiert wurde. Die einzelnen Elastinfasern waren horizontal angeordnet und bildeten ein dichtes Netzwerk.



A



B

Abb. 3.39 Expression von Laminin und Elastin im Hautäquivalent

Immunhistochemische Analyse der Lokalisation und Expression von Laminin (A) und Elastin (B) zeigte, dass diese vom Hautäquivalent exprimiert und sekretiert wurden. Paraffinschnitte ausdifferenzierter Hautäquivalente wurden mit anti-Laminin bzw. anti-Elastin gefärbt. (100x)

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Biomatrix Matriderm zur Herstellung eines Hautäquivalentes geeignet ist.

4. Diskussion

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollten drei-dimensionale Vollhautmodelle (FTSMs), in Bezug auf pharmakologische und medizinische Anwendungen, entwickelt und untersucht werden. Aufgrund des wachsenden Widerstandes gegen Tierversuche kam es in der 7.Änderung der Kosmetikrichtlinie (www.efci.com/FILES/BE/EFfCI%20Position%20Paper/legal.pdf; www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1976/L/01976L0768-20070508-en.pdf) zu einem generellen Verbot der Durchführung von Tierversuchen für Kosmetikprodukte und deren Inhaltsstoffe. Daraus ergab sich, dass adäquate alternative Methoden entwickelt und evaluiert werden müssen (Curren et al., 2006, Roguet et al., 2000). Neben der Untersuchung kosmetischer Inhaltsstoffe bieten Hautmodelle die Möglichkeit, wirkstoffbedingte Effekte an einem dem in vivo Zustand entsprechenden Modell zu untersuchen. Epidermismodelle werden bereits seit langer Zeit zu diesem Zweck eingesetzt (Coquette et al., 2003). Zur Beurteilung des FTSMs wurden sowohl morphologische Kriterien als auch das in der Literatur beschriebene anti-inflammatorische und atrophische Potential verschiedener Glukocorticoide (GC) (Hettmannsberger et al., 1992; Stein et al., 1997; Lange et al., 2000, Korting et al., 2002) ausgewählt. Die Vergleichbarkeit des FTSMs mit den in der Literatur beschriebenen etablierten Testverfahren sollte Aufschluss über die Einsatzmöglichkeiten geben. Der Aspekt des medizinischen Einsatzes eines FTSMs wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes, das die Verbesserung der Versorgung von schwerstverbrannten Patienten zum Ziel hatte, untersucht. Die Entwicklung eines autologen Vollhautäquivalentes und die Optimierung von Zellexpansion und Logistik bildeten einen weiteren Schwerpunkt meiner Arbeit.

4.1 Morphologische Kriterien des FTSMs

Die Annäherung an den in vivo Zustand ist eines der essentiellen Ziele der Entwicklung neuer Testmethoden. Wachsender Widerstand und Kritik an Tierversuchen ist nicht allein für die

verstärkten Bestrebungen, adäquate Tierversuchersatzmodelle zu entwickeln, verantwortlich. Indem humanes Zellmaterial zur Herstellung von ex vivo kultivierten Organmodellen wie z.B. Retinamodellen, Epidermismodellen und FTSMs verwendet wird, ist die Korrelation zu Anwendungen an Patienten bzw. Konsumenten (Kosmetikprodukte), erleichtert. Hautmodelle, ob es sich um Epidermismodelle oder FTSMs handelt, bieten der kosmetischen Industrie eine große Bandbreite an Möglichkeiten, um Wirkstoffe zu testen. Aufgrund der Eigenschaft, dass FTSMs über einen dermalen und epidermalen Bereich verfügen, ist die Analyse von Zell-Zellinteraktionen, unter physiologischen Bedingungen, möglich. Der Austausch von Informationen über Botenstoffe wie z.B. Cytokine ist in der Reaktion auf irritierende oder sensibilisierende Stimulatoren von großer Bedeutung. Die Wundheilung ist ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit des intimen cross-talks zwischen den epidermalen und dermalen Zellen (Giltzer und Goebeler, 2001). Die Kenntnisse der synergistischen Beziehungen zwischen Fibroblasten und Keratinozyten beeinflusste die Entwicklung von Hautäquivalenten. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren durch das Kulturmedium (extern) kann aufgrund der von beiden Zellspezies sekretierten Wachstumsfaktoren und Mediatoren (intern) minimiert werden. Dieses Konzept der synergistischen Beziehungen zwischen dermalen und epidermalen Zellen wurde durch das in meiner Doktorarbeit untersuchte FTSM bestätigt. Die exzeptionelle Langlebigkeit des FTSMs, welches ohne Zugabe von externen Wachstumsfaktoren bis zu 55 Tage (Mewes et al., 2007) kultiviert werden kann, ohne dass morphologische Veränderungen zu beobachten sind, begünstigt dessen Anwendung für Langzeitstudien. Ferner zeigen FTSMs hautähnliche Charakteristika wie z.B. Stratifizierung (3.1), Homeostase, Expression und Lokalisation spezifischer Differenzierungsmarker (3.2.1) (Kurzen et al., 2006; Mewes et al., 2007). Normale Haut und das vorgestellte Modell ähneln sich zu einem großen Anteil. Daraus ergibt sich, dass dieses FTSM eine mögliche Substitutionsmethode für Tierversuche in prä-klinischen Studien und insbesondere in kosmetischen Studien darstellt. Dies zeigte sich im direkten Vergleich der Morphologie

normaler Haut mit FTSM Schnitten. Die epidermalen Strata konnten eindeutig differenziert werden. Morphologische Eigenschaften insbesondere des Stratum basale, mit den in diesem Bereich palisadenförmig angeordneten Keratinozyten, und des Stratum granulosum, welches eindeutig durch die granulären Strukturen von den übrigen Strata unterschieden werden konnte, zeigten die Homologie zur humanen Haut (3.1). Neben den morphologischen Charakteristika stimmte auch die Anzahl der einzelnen Strata mit der in vivo Situation überein. Der Hautaufbau variiert je nach Belastungsprofil und Lokalisation der untersuchten Stelle. So umfasst das Stratum corneum durchschnittlich 14-27 Zellschichten in vivo. Die Dicke dieser epidermalen Schicht liegt somit zwischen 6µm und 15µm. Im Bereich der Fußsohlen und der Handflächen sind diese jedoch stärker ausgeprägt. Die Zahlen geben lediglich einen Richtwert an. Die Anzahl der einzelnen Strata variiert sowohl zwischen Individuen als auch in einem Individuum im Laufe der Zeit. So nimmt mit zunehmendem Alter die epidermale Dicke ab (Contet-Audonneau et al., 1999).

Ein weiteres Unterscheidungskriterium der einzelnen Körperregionen sind die, die Epidermis und Dermis verzahnenden Reteleisten. Im Bereich der Gesichtshaut sind diese nur in sehr geringem Umfang ausgebildet. Epidermis und Dermis sind fast planar miteinander verbunden. Das Phenion® FTSM entspricht somit in seinem morphologischen Aufbau am ehesten der Gesichtshaut, es bildeten sich keine Reteleiste ähnliche Strukturen. Die Ausbildung von Reteleiste ähnlichen Strukturen ex vivo wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Durch die Variation der als Trägermaterial dienenden Matrix unter stringenter Beibehaltung des zur Kultivierung des Phenion® FTSM verwendeten Kultivierungsprotokolls, bildeten sich in den autologen Vollhautäquivalenten Reteleiste ähnliche Strukturen (3.8.1). Diese Struktur wurde sowohl von normalen Keratinozyten als auch von HaCaT Keratinozyten ausgebildet. In den basalen, epidermalen Zellschichten, unabhängig von deren Lokalisation ob planar (3.2.1) oder in den Spitzen der Reteleisten (3.8.2), waren proliferative Keratinozyten in einem Verhältnis von 1:4 durch Ki-67 Färbung identifizierbar. Die Expression ausgewählter

Differenzierungsmarker werden als Bewertungskriterien der Qualität und Vergleichbarkeit zu humaner Haut genutzt. Hierbei nehmen dermale Proteine wie z.B. Elastin, welches der Haut Elastizität und Dehnbarkeit verleiht, eine zentrale Rolle ein. Das Expressionsmuster, die Lokalisation und morphologischen Strukturen entsprechen den Erkenntnissen der Untersuchungen an Patienten und Monolayerstudien (Mewes et al., 2007; Schlotmann et al., 2001). Laminin war ausschließlich unter dem Stratum basale in der dermalen-epidermalen Junctionszone exprimiert. Die Expression der weiteren Differenzierungsmarker wie Fibronectin, MMP-2 und Keratin stimmten ebenfalls mit den in vivo beobachteten und dokumentierten Lokalisationen überein. Aus diesen Expressionsmustern kann geschlossen werden, dass die in meiner Doktorarbeit untersuchten und weiterentwickelten FTSMs eine deutliche Ähnlichkeit zum in vivo Zustand aufweisen. Das Modell eignet sich auch dazu, andere Zellarten in das Modell zu integrieren, um die Analysemöglichkeiten den zu untersuchenden Fragestellungen anpassen zu können. Es zeigte sich, dass die durch Melanozyteneinsaat modifizierte FTSMs ebenfalls dem histologischen in vivo Zustand entsprachen. Die Melanozyten ordneten sich im Stratum basale (3.7.1) an und die charakteristischen dendritischen Fortsätze erstreckten sich bis in die oberen epidermalen Zellschichten.

Epidermismodelle, welche nur einen Teil der Hautphysiologie widerspiegeln können, sind bereits als Testsystem zur Untersuchung von Wirkstoffen anerkannt (Rouget et al., 2000; Cario-André et al., 2002; Schlotmann et al., 2001). Sowohl Epidermismodelle als auch FTSMs ermöglichen dem Experimentator Substanzen in Cremes oder Salben zu emulgieren und topisch aufzutragen. Das Phenion[®]FTSM eignet sich aufgrund seiner mechanischen Stabilität besonders für die topische Applikation von Substanzen über einen längeren Zeitraum. Die initiale Anzahl der epidermalen Strata und die nur sehr langsam stattfindende Reduktion der Strata (3.5) sind weitere begünstigende Faktoren bezüglich Langzeit-Wirkstoffstudien.

4.2 Anti-inflammatorisches Potential der GC

Die Charakterisierung des FTSMs allein gibt noch keinen Aufschluss darüber, ob es sich eignet, bestimmte Tierversuche zu ersetzen oder zumindest als Ergänzung von Monolayerversuchen zu dienen. Um dies zu prüfen, wählte ich die Stoffklasse der GC. Diese Stoffklasse ist bereits durch Tests an Zellkulturen, Tieren und auch aufgrund der Erfahrungsberichte von Patientenstudien gut untersucht. Mit den positiven Wirkungen wie z.B. der Minderung inflammatorischer Reaktionen sind unerwünschte Wirkungen wie z.B. allergische Reaktionen, Atrophie u.a. assoziiert. Diese unerwünschten Wirkungen sind ein Aspekt, welcher den Bedarf an Neuentwicklungen, deren Charakterisierung und weitere Modifikation der bereits bestehenden Wirkstoffe deutlich macht. Die Charakterisierung sollte möglichst an einem System vorgenommen werden, welches dem in vivo Zustand sehr ähnlich ist. Monolayerstudien bieten den Vorteil, dass nur eine geringe Menge an Zellmaterial zur Analyse benötigt wird. Die zellspezifischen Reaktionen auf diverse Stimuli, wie z.B. inflammatorische Parameter, osmotisch wirkende Substanzen, UV-Strahlung oder auch Pharmaka, können so dargestellt werden. Diesem Analyseverfahren fehlen jedoch organotypische Eigenschaften. FTSMs bieten den Vorteil, dass Analysen anhand von proliferierenden, differenzierenden Zellen, in physiologischem Verhältnis, durchgeführt werden können. Die Reaktion auf externe wie auch interne Reize/Signale ist in vivo nicht auf eine Zellspezies beschränkt. Insbesondere bei inflammatorischen Reaktionen ist cross-talk, nicht nur zwischen immunkompetenten und nicht-immunkompetenten Zellen, sondern auch zwischen Zellen einer Spezies von Bedeutung. Die Sekretion von Botenstoffen wie z.B. den Cytokinen vermittelt eine schnelle Reaktion und kumulierende Signalweitergabe von irritierten zu nicht irritierten Zellen. Auf diese Weise kann ein Signal verstärkt werden. Ein singuläres Ereignis kann somit eine globale Reaktion auslösen. Epidermismodelle oder FTSMs bieten die Chance diesen cross-talk zu ermöglichen, da der Aufbau eines dem in vivo Zustand entsprechenden Gewebes ermöglicht wird. Cytokine nehmen eine zentrale Rolle der

chemischen Signaltransduktion zwischen den epidermalen Keratinozyten und den dermalen Fibroblasten ein. In der Literatur ist beschrieben, dass Cytokine in der Lage sind, die Basalmembran zu durchqueren (El Ghalbzouri et al., 2005). Sie nehmen somit die Rolle zellulärer Mediatoren ein, welche die Information eines Reizes auf chemischer Ebene weiterleiten. Dies zeigte sich daran, dass nicht nur in den UVB stimulierten epidermalen Regionen aktivierende Effekte nachgewiesen werden konnten, sondern auch in den nicht direkt stimulierten dermalen Regionen (Kondo et al., 1997). Diese Kommunikation konnte immunhistochemisch am FTSM nachgewiesen werden. UVB dringt lediglich bis in die basalen Schichten der Epidermis ein (www.mqw.de/thema/sonnenbrand.html; Fritsch, 1998), somit wird der dermale Bereich nicht direkt durch die Strahlung beeinflusst. Dennoch wurde im dermalen Bereich des FTSMs IL-6 nachgewiesen (3.4.1). Die UVB stimulierten epidermalen Zellen sekretierten Botenstoffe, welche ihrerseits die Cytokinsekretion in nicht stimulierten Zellen (dermalen und epidermalen) auslösten.

Obwohl die Penetrationsbarriere des FTSMs sicherlich nicht genauso ausgeprägt ist wie in vivo, ist bei topischer Applikation ein Konzentrationsgradient innerhalb des Modells zu erwarten. Ferner können applizierte Wirkstoffe enzymatisch metabolisiert werden. So ist die Einarbeitung von Vorstufen aktiver Wirkstoffe bzw. der Einsatz maskierter Wirkstoffe, die erst am Zielorgan ihre Wirkung ausüben, möglich. Dieser Mechanismus wird in vivo u.a. in der Krebstherapie eingesetzt, indem Vorstufen der Wirkstoffe, sogenannte pro-drugs verabreicht werden, welche erst nach Aktivierung durch z.B. die Strahlentherapie (Seo et al., 2005) ihre Wirkung entfalten. Der Aspekt der enzymatischen Umwandlung von dargereichten Wirkstoffen hat, besonders im Evaluationsprozess von Substanzen in Bezug auf sensibilisierende Wirkung, einen großen Stellenwert (Lallemand et al., 2005). Der Einsatz von Hautmodellen als mögliche Untersuchungsmethoden zur Diskriminierung zwischen sensibilisierenden und irritierenden Substanzen wird kontrovers gesehen. FTSMs enthalten

zwar keine immunkompetenten Zellen, jedoch würde das differentielle Cytokinexpressionsmuster ausreichen, um zwischen sensibilisierenden und irritierenden Substanzen unterscheiden zu können (Coquette et al., 2003). Ein weiterer Aspekt der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist die Auswahl einer adäquaten Trägersubstanz, welche gewährleistet, dass der Wirkstoff bzw. die pro-drug zum Zielorgan gelangt. Bisher wird im Rahmen von Penetrationsstudien und pro-drug delivery Analysen hauptsächlich Schweinehaut verwendet (Graf et al., 2008). Die Anwendbarkeit von FTSMs in Bezug auf diese Fragestellung könnte Gegenstand künftiger Studien sein. FTSMs ermöglichen außerdem die Untersuchung der Filteraktivität von Sonnenschutzmitteln unter physiologischen Bedingungen (Bernerd and Asselineau, 2001; Gélis et al., 2003). Hierbei dient die Modulation inflammatorischer Marker nach UVB Irritation als read-out Parameter. UVB ist für seine komplexe Wirkung auf Proliferation und Differenzierung (Lee et al., 2002; Lee et al., 2005), wie auch auf die Induktion pro-inflammatorischer Cytokine wie IL-6 und IL-8 (Yokoyama et al., 2005; Clingen et al., 2001) bekannt. Der direkte Vergleich der Bildung von sunburn cells nach UVB Behandlung in Tierversuchen und in Epidermismodellen zeigte, dass die generierten Ergebnisse miteinander korrelierten (Gélis et al., 2003).

In der vorgestellten Arbeit wurde das FTSM eingesetzt, um zu untersuchen, ob GC in der Lage sind die UVB- vermittelte Induktion pro-inflammatorischer Cytokine zu hemmen bzw. aufzuheben. GC sind sehr effektive anti-inflammatorische Wirkstoffe. In vivo werden diese zur systemischen oder topischen Therapie inflammatorischer Krankheiten wie z.B. Psoriasis eingesetzt (Berti et al., 1998; Kreuter et al., 2006; Warino et al., 2006). Untersuchungen an Monolayerkulturen zeigten, dass inflammatorische Mediatoren sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell durch GC gehemmt werden (de Bosscher et al., 2003; Schäfer-Korting et al., 2005; Vanden Berghe et al., 1999; Lange et al., 2000). Diese Studien waren auf die Untersuchung von Reinsubstanzen, welche dem Medium zugefügt werden konnten,

limitiert. Gerade im klinischen Einsatz ist die Behandlung mit der Reinsubstanz eher eine Ausnahme. Im Regelfall wird der Wirkstoff erst mit einer Trägersubstanz oder durch ein Trägermittel zum target gelangen. Der Einfluss dieses Trägers bleibt bei Monolayerstudien vollkommen unberücksichtigt. Ich konnte zeigen, dass die Reinsubstanz Betamethason-17-valerat die Konzentration der basal und UVB induzierten pro-inflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-8 deutlich reduzierte (3.4). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in der Klinik angewendete Betamethason-17-valerat enthaltende Salbe ebenfalls die UVB vermittelte Cytokinsynthese und Sekretion deutlich hemmte. Diese Wirkung ist von besonderem Interesse, da die Freisetzung der aktiven Komponente aus der Trägersubstanz manchmal so gering ist, dass keine klinischen Effekte beobachtet werden können. In einigen Fällen sind intensive Recherchen und Versuche notwendig, um ein adäquates Lösungsmittel bzw. eine Cremegrundlage zu finden, die eine kontinuierliche, gleichbleibende Freisetzung des Wirkstoffes gewährleistet. Der Einsatz von FTSMs könnte die Entwicklung dieser Trägersubstanzen deutlich beschleunigen. Die FTSMs wurden nicht speziell daraufhin untersucht, welche Konzentrationen der applizierten Wirkstoffe die Keratinozyten und Fibroblast erreichen. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die beobachteten regulatorischen Effekte der Cytokinfreisetzung nach UVB Bestrahlung, unmittelbar auf das zugegebene GC Betamethason-17-valerat zurückzuführen sind (3.4.1, 3.4.2). In den Versuchen der topischen Applikation zeigte sich, dass die Applikationskontrolle keine anti-inflammatorische Regulation der Cytokine vermittelte. Das GC Präparat reduzierte die Cytokin Konzentration hingegen eindeutig und signifikant. Die vorgestellten Ergebnisse der GC behandelten FTSMs zeigten deutlich, dass diese mit der in der Literatur beschriebenen Wirkung der GC übereinstimmen. Das FTSM ist somit dazu geeignet, anti-inflammatorische Reaktionen abzubilden.

Der Vergleich verschiedener kommerzieller GC Salben zeigte keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Cremes. Dies kann einerseits mit der Variabilität der Modelle

zwischen den verschiedenen Chargen/Versuchen begründet werden und andererseits mit der Auswahl der untersuchten Cremes. Es wurden Salben und Cremes ausgewählt, welche in der Behandlung inflammatorischer Krankheiten und Phänomene eingesetzt werden. Die einzelnen Cremes unterscheiden sich zwar aufgrund ihrer Wirkstoffe und der Zugehörigkeit zu unterschiedlichen GC Klassen, jedoch konnte keine eindeutig differentielle Induktion anti-inflammatorischer Reaktionen nachgewiesen werden. Das Hauptunterscheidungsmerkmal besteht in unterschiedlich stark ausgeprägten atrophischen Risiken.

4.3 Atrophisches Potential der GC

Die Klassifizierung von GC erfolgt nicht ausschließlich aufgrund des anti-inflammatorischen Potentials. Ein entscheidendes Kriterium der Zugehörigkeit zu verschiedenen GC Klassen definiert sich über das atrophische Potential der einzelnen Wirkstoffe. Der morphologische Aufbau des FTSMs ermöglicht neben dem Monitoring der anti-inflammatorischen Wirkung der GC auch die Überwachung und Darstellung von möglichen Nebenwirkungen. Zu den häufigsten und schwerwiegendsten Nebenwirkungen zählt die Hautatrophie. Hautatrophien manifestieren sich durch Verdünnung der Epidermis und Dermis. Insbesondere sind GC der Klasse III dafür bekannt, nach Langzeitbehandlung ein hohes Risiko der Ausbildung atrophischer Veränderungen zu vermitteln (Korting et al., 2002; Schackert et al., 2000). Meine Studien zeigten, dass FTSMs dazu geeignet sind, Substanzen und Formulierungen über einen längeren Zeitraum aufzutragen und die in vivo beobachteten, physiologischen Effekte abzubilden (3.5.1-3.5.3). Von großer Bedeutung ist, dass eine distinkte Differenzierung zwischen handelsüblichen GC Salben möglich war. Salben, die GC der Klassen I, II und III enthielten, konnten, aufgrund des respektiven Potentials, Hautverdünnungen hervorzurufen, eindeutig voneinander unterschieden werden. Das ermittelte atrophische Potential der untersuchten handelsüblichen Cremes korrelierte mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (3.5.3). GC der Klasse I vermitteln kein bzw. ein sehr geringes atrophisches

Potential. Die ausgewählten Repräsentanten der GC Klassen II und III vermittelten ein signifikant höheres atrophisches Potential. Sie unterschieden sich sowohl signifikant von der unbehandelten Kontrolle und der Applikationskontrolle als auch von der Hydrocortison (Klasse I GC) enthaltenden Creme. Dies ist bereits als Kriterium der Qualität und des Einsatzes des Modells zur Evaluation neu entwickelter Substanzen anzusehen. Der signifikante Unterschied der GC, der Klassen II (Advantan[®]) und III (Diprosis[®] und Ecural[®]) fundierte meine Annahme, der Eignung des FTSMs für diese Analysen und der Vergleichbarkeit zu in vivo generierten Ergebnissen. Ob dieser Effekt als ausreichend anzusehen ist, um zwischen den erwähnten GC Klassen eine eindeutige Klassifizierung durchzuführen erfordert weitere Studien. Die signifikante Differenzierung zwischen den einzelnen Cremes und die geringe Standardabweichung zwischen den unterschiedlichen Experimenten, macht deutlich, dass von der Eignung des Phenion[®] FTSMs zu diesem Zwecke auszugehen ist (Zöller et al., 2008). Ein weiteres Kriterium der Eignung des FTSMs für Analysen dieser Art ist, dass die beobachtete epidermale Hautverdünnung mit den in vivo zu beobachtenden Phänomenen übereinstimmt (Schoepe et al., 2006). Darüber hinaus zeigte das Phenion[®] FTSM den Einfluss von GC auf die Dermis. Dermale Hautverdünnung wird hauptsächlich auf reduzierte Proliferation der Fibroblasten (Görmar et al., 1990) und Veränderungen des Aufbaus und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) (Schoepe et al., 2006) zurückgeführt. GC inhibieren im Besonderen die Expression von Kollagen, eines der Hauptbestandteile der ECM (Gras et al., 2001; Oishi et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass P1NP, welches mit Kollagen Typ I korreliert (Harrisson et al., 2006), nach der Behandlung mit handelsüblichen GC reguliert wurde. Diese inhibierende Regulation der P1NP Konzentration (3.5.5) spiegelte das in vivo auftretende atrophische Risiko wider. Ich konnte zeigen, dass das atrophische Potential mit dem anti-inflammatorischen Potential korrelierte. GC, die ein hohes anti-inflammatorisches Potential zeigten, verursachten ebenfalls stärkere atrophische Veränderungen als GC, die schwächere

anti-inflammatorische Potentiale hatten. Eingehendere Untersuchungen der atrophischen Veränderungen zeigten, dass die GC bedingte Atrophie nicht auf Apoptose (3.5.4) zurückzuführen war. Dies korreliert mit Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, welche beschrieben, dass GC einen protektiven Effekt gegenüber apoptotischen Stimuli auf die behandelten Zellen ausüben (Hammer et al., 2004).

4.4 Einsatzmöglichkeiten und Eigenschaften eines Vollhautäquivalentes

Autologe Hautäquivalente können vielfältig eingesetzt werden, u.a. in der Behandlung schwerheilender Wunden und Verbrennungen. Aufgrund der Tatsache, dass Zellen des Spenders verwendet werden, müsste das Risiko der Abstoßung bzw. von Abwehrreaktionen deutlich gemindert sein. In der Therapie von schwerheilenden Wunden und Verbrennungen wird in den meisten Fällen auf die Transplantation von Fremdgewebe oder Spalthautgewebe zurückgegriffen (Coruh et al., 2005). Die Transplantation von allographem Gewebe, auch wenn es von nahen Verwandten stammt, birgt immer das Risiko einer Immunreaktion. Um diese Reaktion zu verhindern bzw. zu mindern, muß das Immunsystem suprimiert werden, welches schon durch die Verletzung oder Wunde deutlich geschwächt ist. Bei Verbrennungsoptionen ist die Barrierefunktion der Haut ohnehin bereits sehr stark beeinträchtigt und das Risiko einer Infektion um ein Vielfaches höher als bei unverletzten Personen. Die Transplantation von autologem Gewebe verhindert bzw. mindert das Risiko einer Abwehrreaktion auf das Transplantat, jedoch wird durch den Exzisionsprozess eine neue Wundsituation geschaffen. Die Fläche des „unversehrten“ Gewebes nimmt somit erneut ab. Der Vorteil der Transplantation von Spalthautgewebe kann durch ex vivo Expansion der aus dem Gewebe isolierten Zellen und Einsaat in eine Biomatrix gesteigert werden. Vollhautäquivalente beinhalten neben der geschlossenen epidermalen Zellschicht einen dermalen Bereich, welcher morphologisch dem exzidierten Gewebe entspricht. Im dermalen Bereich meines autologen Hautäquivalentes befand sich ein dichtes Kollagenfasernetz (3.8).

Proliferative Fibroblasten waren im gesamten Bereich des Dermisäquivalentes verteilt. Darauf bildete sich eine geschlossene Epidermis, welche neben der Differenzierung auch morphologische Charakteristika der „normalen“ humanen Haut aufwies. Die entscheidende Funktion der Dermis in der Entwicklung des Äquivalentes zeigt sich u.a. auch darin, dass nicht nur die primären Keratinozyten, sondern auch die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, Reteleiste ähnliche Strukturen ausbildeten (3.8.1). Die geschlossene Lamininschicht (3.8.2) unterhalb des Stratum basale zeigte die Funktionalität und Homologie des Äquivalentes zum exzidierten Gewebe. Die verwendete Matrix wurde bereits erfolgreich als dermale Grundlage von Spalthautgewebe in Behandlung von Verbrennungen eingesetzt (Ryssel et al., 2007). Jedoch wurde der Aspekt die Biomatrix als Trägermaterial eines Hautäquivalentes zu nutzen bisher nicht erfolgreich bearbeitet. Meine Untersuchungen zeigten, dass Matriderm® mit menschlichen Hautzellen besiedelt werden kann.

Ein weiterer Vorteil der Auswahl von Hautäquivalenten zur Therapie großflächiger Wunden ist, dass die zu exzidierende Fläche durch solche Modelle deutlich gemindert bzw. das Abdeckungsareal deutlich vergrößert werden kann. Spalthautgewebe für Transplantationen erreichen durch die Mesh-Technik einen Vergrößerungsfaktor von 1:1,5-1:4 (<http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/II-na/009-014.htm>). Durch die ex vivo Kultivierung der Zellen wurde ein Vergrößerungsfaktor von 1:100 für das autologe Vollhautäquivalent erreicht. Aus einem 1cm² großen Spalthautgewebe konnte ein 100cm² großes Hautäquivalent hergestellt werden. Das kosmetische Ergebnis der Wundversorgung könnte durch Vollhautäquivalente verbessert werden. Hypotrophe, keloide Narbenbildung zählt zu den häufigsten Gründen der Nachbehandlungen von Verbrennungsoffern (Mensik et al., 2002; Fujimori et al., 2006). Die sich stark kontrahierenden Wundränder und Narben machen korrigierende Operationen notwendig. Vollhautäquivalente, die einen funktionellen dermalen Bereich enthalten, könnten dieses Risiko mindern (Cedidi et al., 2007). In Wundsituationen werden die Zellen zur

Proliferation, Synthese und Sekretion von Komponenten der ECM angeregt. Wird dieser Stimulus nach dem Wundschluss nicht reprimiert, kann es zu überschießender Narbenbildung kommen. Der Einsatz zellenthaltender Wundauflagen zur Abdeckung großflächiger Wunden, könnte sich positiv auf die Narbenbildung auswirken. Möglicherweise könnte der die Synthese von ECM Bestandteilen fördernde Reiz gemindert werden. Infolge dieser inhibierten Synthese und Sekretion von ECM Bestandteilen, wie z.B. Kollagen, könnte das Risiko der Kontraktion des Gewebes reduziert werden. Die Aufrechterhaltung der Mobilität der verbrannten Areale gewinnt besondere Bedeutung bei Verbrennungen z. B. der Hände. Klinische Erfahrungen mit dem Epithelersatz Suprathel[®] zeigte, dass frühere Mobilisierung der Patienten möglich war (Uhlig et al., 2007). Diese Art der Mobilisierung erwarte ich auch durch die Anwendung des entwickelten autologen Vollhautäquivalentes.

Das bei Spalthauttransplantationen immer bzw. über einen sehr langen Zeitraum eindeutig identifizierbare Meshingmuster entsteht bei Vollhautäquivalenten nicht. Vollhautäquivalente werden nicht gemesht, somit kann das beschriebene Muster nicht entstehen. Ferner ist die abzudeckende Wunde unmittelbar nach der Transplantation vollständig bedeckt. Bei der Transplantation von Spalthautgewebe ist das Wundareal nur partiell mit Gewebe bedeckt. Der Zeitraum des vollständigen Wundverschlusses liegt zwischen 2 und 75 Tagen (Jewell et al., 2007). Diese Phase könnte möglicherweise durch das Vollhautäquivalent verkürzt werden. Somit ist durch Äquivalente die Wiederherstellung der Barrierefunktion der Haut zu einem früheren Zeitpunkt möglich. Bei Spalthaut therapierten Patienten kann diese erst nach Schluss der Stellen zwischen den Meshing-Bereichen wiederhergestellt werden.

Im Vergleich zur Transplantation von zellfreien Dermisersatzten, erwiesen sich autologe oder allographe Transplantate als zu bevorzugen. Die Wundheilung ist aufgrund der sekretierten Botenstoffe deutlich verbessert (Kuroyanagi et al., 2004). Erste Transplantationen, des von mir entwickelten autologen Hautäquivalentes, stehen unmittelbar bevor.

4.5 Ausblick

Das Spektrum der Einsatzmöglichkeiten von FTSMs ist sehr groß. In meiner Doktorarbeit habe ich mich auf die Entwicklung des FTSMs und dessen Einsatz zur Analyse von GC und als mögliches autologes Hautäquivalent konzentriert. Je nach Anforderungen an das Testsystem könnten in zukünftigen Studien immunkompetente Zellen in das Modell integriert werden. Dies könnte das Modell dazu qualifizieren, eindeutige Differenzierung zwischen sensibilisierenden und irritierenden Substanzen zu ermöglichen. Die Tumorgenese könnte durch ein FTSM ebenfalls näher untersucht werden. Hierbei könnten verschiedene Tumorzelllinien oder primäre Tumorzellen auf das Modell aufgebracht und über einen definierten Zeitraum das Wachstumsverhalten der Zellen beobachtet werden. Möglicherweise könnten so Aussagen über Invasivität der Tumorzellen getroffen werden. Im Folgenden könnten Zytostatika an diesen Tumormodellen getestet werden. Der Vorteil dieser Testmethode besteht, wie bereits für die GC in meiner Doktorarbeit gezeigt, darin, dass das Testsystem dem in vivo Zustand sehr nahe kommt.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass das untersuchte Phenion® FTSM geeignet ist GC Klassen spezifische Effekte abzubilden, bietet sich die Analyse weiterer GC an. Des Weiteren könnten, wie bereits anhand von Epidermismodellen durchgeführt (Bernerd und Asselineau, 2001), Sonnenschutzmittel eingehender untersucht werden. Besonders für die kosmetische Industrie bietet sich ein nahezu unerschöpfliches Spektrum an Analysemöglichkeiten. Besonders die mechanische Stabilität des Modells ermöglicht die topische Applikation, welche bei den meisten kosmetischen Produkten die bevorzugte Variante der Wirkstoffdarreichung darstellt. Die Modifikation der Matrix oder der verwendeten Spenderhaut könnte zur Entwicklung eines Altersmodells führen.

Die im Rahmen meiner Doktorarbeit durchgeführten prä-klinischen Studien des autologen Hautäquivalentes sollten in der klinischen Phase fortgeführt werden. Erst in der Auswertung der kosmetischen Ergebnisse nach Transplantation des Hautäquivalentes kann eine abschließende Beurteilung der Anwendbarkeit des entwickelten Äquivalentes erfolgen. Augenmerk sollte darauf gelegt werden, wie gut und angenehm der Umgang mit dem Äquivalent für den operierenden Arzt ist. Der Patient sollte Auskunft über die Zufriedenheit mit dem erzielten kosmetischen Resultat geben. Interessant ist auch die histologische Dokumentation des „Einheilungsprozesses“. Zu untersuchen ist u.a. ob die in vitro entstandenen Reteleiste ähnlichen Strukturen auch nach der Transplantation erhalten bleiben. Vergleichende Studien zwischen Spalthauttransplantaten und Vollhautäquivalenten sind notwendig, um direkte Vergleiche ziehen zu können. Unterschiede im Heilungsverhalten zwischen verschiedenen Patienten erfordern, dass diese Vergleichsstudien an einem Patienten durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Die menschliche Haut schützt vor exogenen mechanischen, physikalischen und mikrobiellen Einflüssen. Sie stellt die erste und eine essentielle Barriere gegenüber exogenen Keimen und Bakterien dar. Die Reaktion auf die von außen auf den Körper einwirkenden Stressoren erfolgt über die Aktivierung zellspezifischer Antworten. So induziert Infektion durch Pathogene oder der Kontakt mit als Allergen wirkenden Substanzen u.a. die Synthese und Freisetzung pro-inflammatorischer Botenstoffe, die ihrerseits intrazelluläre Signalkaskaden initiieren. Keratinozyten sind die ersten Zelle, die Kontakt zu diesen Substanzen, Organismen oder Umwelteinflüssen haben. Diese rekrutieren über die von ihnen sekretierten Botenstoffe z.B. immunkompetente Zellen zum Ort einer Infektion. Es besteht die stetige Bestrebung bereits etablierte pharmakologische Wirkstoffe zu verbessern und neue zu entwickeln. Hierzu werden adäquate Testsysteme benötigt, welche dem in vivo Zustand so nahe wie möglich kommen sollten. In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass FTSMs morphologisch mit humaner Haut übereinstimmen. Das Expressionsmuster von Differenzierungsmarkern und die Stratifizierung der FTSMs entsprachen dem in vivo Zustand. Die mechanische Stabilität des Modells ermöglichte sowohl die Untersuchung von Reinsubstanzen als auch die topische Applikation von wirkstoffhaltigen Salben und Cremes. Hierbei wurden das anti-inflammatorische und atrophische Potential handelsüblicher GC evaluiert. Es zeigte sich, dass die UVB induzierte Cytokinsekretion (IL-6 und IL-8) durch die untersuchten GC deutlich reduziert wurde. Hierbei ist besonders die anti-inflammatorische Wirkung von Betamethason-17-valerat zu erwähnen. Die Langlebigkeit des Phenion® FTSMs begünstigt die Analyse von Wirkstoffen oder Substanzen über einen längeren Zeitraum. Besonders in der Beurteilung der Wirkung von GC sind die, erst nach wiederholter Behandlung auftretenden, unerwünschten Effekte zu berücksichtigen und zu analysieren. Nach der Behandlung mit verschiedenen GC über einen Zeitraum von 14 Tagen waren

signifikante Veränderungen der Hautstruktur des FTSMs zu beobachten. Die Anzahl der epidermalen Zellschichten war in Abhängigkeit der zur Behandlung verwendeten GC reduziert. Ein Aspekt der epidermalen Atrophie bestand in der Reduktion der proliferativen Zellen (Ki-67 positiv) im Bereich des Stratum basale. Im dermalen Bereich gab die, durch die GC reduzierte, Kollagensynthese Aufschluss über atrophische Veränderungen.

Im Rahmen der Weiterentwicklung des Phenion[®] FTSMs wurden Melanozyten integriert. Morphologisch entsprachen die Melanozyten-FTSMs wie auch die „klassischen“ FTSMs dem nativen Zustand. Dies beinhaltete u.a. auch das Verhältnis von Keratinozyten zu Melanozyten. Die Melanozyten ordneten sich im Stratum basale an und bildeten Dendriten, welche bis in die oberen Strata der Epidermis reichten. Unterschiedliche UV-Toleranz der einzelnen Hauttypen konnte in vitro am Melanozyten-FTSM dadurch nachgewiesen werden, dass Melanozyten von Spendern unterschiedlicher ethnischer Abstammung eingesetzt wurden.

Das Phenion[®] FTSM stellt ein vielseitiges Testsystem dar, welches viele Charakteristika der normalen gesunden Haut aufweist. FTSMs können zur Reduzierung von Tierversuchen beitragen.

Ein weiterer Aspekt des Einsatzes von FTSMs ist im medizinischen Bereich die Behandlung schwerheilender Wunden. Die ex vivo Kultivierung und Expansion der autologen Zellen ermöglicht, die zu exzidierende Hautfläche zu minimieren. Auf und in der als Trägermaterial dienenden Biomatrix bildete sich ein ausdifferenziertes Vollhautäquivalent. Die Biomatrix, welche den dermalen Anteil des Hautäquivalentes bildete, war vollständig von neusynthetisierten Kollagenfasern durchzogen. Der Bereich des Stratum basale wies proliferative Zellen auf. Dermis und Epidermis waren über Reteleiste ähnliche Strukturen miteinander verzahnt. Deren Ausbildung stellt ein zusätzliches Qualitätsmerkmal des Äquivalentes dar, da es dem nativen Zustand entspricht.

FTSMs bieten eine große Variation an Einsatzmöglichkeiten zu pharmazeutischen, kosmetischen und medizinischen Zwecken.

6. Literatur

Afaq F, Syed DN, Malik A, Hadi N, Sarfaraz S, Kweon MH, Khan N, Zaid MA, Mukhtar H (2007).

Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis.

J Invest Dermatol **127**(1): 222–232

Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S (1990)

Cytokine modulation of keratinocyte cytokines

J Invest Dermatol **94** (6): 101-107

Autio P, Oikarinen A, Melkko J, Risteli J, Risteli L (1994).

Systemic glucocorticoids decrease the synthesis of type I and III collagen in human skin in vivo, whereas isotretinoin treatment has little effect.

Br J Dermatol **131**(15): 660-663

Bernerd F, Asselineau D (2001).

Reconstructed human skin: Effect of solar UV light and use to evaluate efficiency of sunscreens in vitro.

Cosmetic Dermatology April: 15-19

Berti E, Cerri A, Marzano AV, Richelda R, Bianchi B, Caputo R (1998).

Mometasone furoate decreases adhesion molecule expression in psoriasis.

Eur J Dermatol **8**(6): 421-426

Bessou-Touya S, Picardo M, Maresca V, Surlève-Bazeille JE, Pain C, Taïeb A (1998)

Chimeric human epidermal reconstructs to study the role of melanocytes and keratinocytes in pigmentation and photoprotection.

J Invest Dermatol **111**: 1103-1108

Brattsand R, Linden M (1996).

Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies.

Aliment Pharmacol Ther **10**(2): 81-92

Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J (2000).

Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo.

Inflamm Res **49**(6): 290-296

Capewell S, Reynolds S, Shuttleworth D, Edwards C, Finlay AY (1990).

Purpura and dermal thinning associated with high dose inhaled corticosteroids.

BMJ **300**(6739): 1548-1551

Cario-André M, Briganti S, Picardo M, Nikaido O, Gall Y, Ginestra J, Taïeb A (2002).

Epidermal reconstructs: a new tool to study topical and systemic photoprotective molecules.

J Photochem Photobiol B **68**(2-3): 79-87

Castells-Rodellas A, Castell JV, Ramirez-Bosca A, Nicolas JF, Valcuende-Cavero F, Thivplet J (1992)

Interleukin-6 in normal skin and psoriasis.

Acta Derm Venereol. **72**(3): 165-168

- Cedidi CC, Wilkens L, Berger A, Ingianni G (2007).
Influence of human fibroblasts on development and quality of multilayered composite grafts in athymic nude mice.
Eur J Med Res. **12**(11): 541-555
- Chan D, Lamande SR, Cole WG, Bateman JF (1990).
Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation in vitro.
Biochem J. **269**: 175-181
- Chen M, Doostan A, Bandyopadhyay P, Remington J, Wang X, Hou Y, Liu Z, Woodley DT (2007).
The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita.
Am J Pathol. **170**(6): 2009–2018
- Clingen PH, Arlett CF, Roza L, Mori T, Nikaido O, Green MH (1995).
Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells.
Cancer Res **55**(11): 2245-2248
- Clingen PH, Berneburg M, Petit-Frère C, Woollons A., Lowe JE, Arlett CF, Green MH (2001).
Contrasting effects of an ultraviolet B and an ultraviolet A tanning lamp on interleukin-6, tumour necrosis factor- α and intercellular adhesion molecule-1 expression.
Br J Dermatol; **145** (1): 54-62
- Contet-Audonneau JL, Jeanmaire C, Pauly G (1999).
A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas.
British Journal of Dermatology **140** (6): 1038–1047
- Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y (2003).
Analysis of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization.
Toxicol in Vitro **17**: 311-321
- Coruh A, Tosun Z, Ozbebit U (2005)
Close relative intermingled skin allgraft and autograft use in the treatment of major burns in adults and children.
J Burn Care Rehabil **26**(6): 471-477
- Costello, B (2000).
A cell pigmentation assay suitable for screening of cosmetic raw materials. *Journal of Cosmetic Science* 51, (1) 71,
- Curren RD, Mun GC, Gibson DP, Aardema MJ (2006).
Development of a method for assessing micronucleus induction in a 3D human skin model (EpiDermTM).
Mutation Research **607**: 192-204

- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2000).
Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors.
J Neuroimmunol **109**(1): 16-22
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2003).
The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression.
Endocr Rev **24**(4): 488-522
- El Ghalbzouri A, Lamme EN, van Blitterswijk C, Koopman J, Ponc M (2004).
The use of PEGT/PBT as a dermal scaffold for skin tissue engineering.
Biomaterials **25**: 2987-2996
- El Ghalbzouri A, Jonkman MF, Dijkman R, Ponc M (2005).
Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes.
J Invest Dermatol **124**: 79-86
- Fritsch, P. (1998)
Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas
Springer Verlag Berlin
- Fujimori Y, Ueda K, Fumimoto H, Kubo K, Kuroyanagi Y (2006).
Skin regeneration for children with burn scar contracture using autologous cultured dermal substitutes and superthin auto-skin grafts: preliminary clinical study.
Ann Plast Surg. **57**(4):408-414.
- Fukuoka M, Ogino Y, Sato H, Ohta T, Komoriva K, Nishioka K, Katayama I (1998)
RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D3 (tacalcitol).
Br J Dermatol **138**(1): 63-70
- Gélis C, Girard S, Mavon A, Delverdier M, Paillous N, Vicendo P (2003).
Assessment of the skin photoprotective capacities of an organo-mineral broad-spectrum sunblock on two ex vivo skin models.
Photodermatol Photoimmunol Photomed **19**: 242-253
- Gilitzer R, Goebeler M (2001).
Chemokines in cutaneous wound healing.
J Leukoc Biol **69**(4): 513-521
- Görmar FE, Bernd A, Holzmann H (1990).
The effect of hydrocortisone aceponate on proliferation, total protein synthesis and collagen synthesis in human fibroblast in vitro.
Arzneimittelforschung **40**: 192-196
- Graf R, Kock M, Bock A, Schubert-Zsilavec, Steinhilber D, Kaufmann E, Gassenmeier T, Bernd A, Kippenberger S (2008).
Lipophilic prodrugs of amino acids and vitamin E as osmolytes for the compensation of hyperosmotic stress in human keratinocytes.
submitted

- Gras MP, Verrecchia F, Uitto J, Mauviel A (2001).
Downregulation of human type VII collagen (COL7A1) promoter activity by dexamethasone.
Identification of a glucocorticoid receptor binding region.
Exp Dermatol **10**: 28-34
- Grellner W, Georg T, Wilske J (2000)
Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human
skin wounds.
Forensic Sci Int **113**(1-3): 251-264
- Grossmann RM et al. (1989)
Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of
cultured human keratinocytes.
Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **86**: 6367-
6371
- Haapasaari KM, Risteli J, Karvonen J, Oikarinen A (1997).
Effect of hydrocortisone, methylprednisolone aceponate and mometasone furoate on
collagen synthesis in human skin in vivo.
Skin Pharmacol **10**(5-6): 261-264
- Haapasaari KM, Rossi O, Risteli J, Oikarinen A (1998).
Effects of long-term inhaled corticosteroids on skin collagen synthesis and thickness in
asthmatic patients.
Eur Respir J **11**(1): 139-143
- Hammer S, Sauer B, Spika I, Kleuser B, Schäfer-Korting M (2004).
Glucocorticoids mediate differential anti-apoptotic effects in human fibroblasts and
keratinocytes via sphingosine-1-phosphate formation.
J Cell Biochem **91**: 840-851
- Harrison CA, Gossiel F, Bullock AJ, Sun T, Blumsohn A, Mac Neil S (2006).
Investigation of keratinocyte regulation of collagen I synthesis by dermal fibroblasts in a
simple in vitro model.
Br J Dermatol **154**: 401-410
- Harrison CA, Heaton MJ, Layton CM, Mac Neil S (2006).
Use of an in vitro model of tissue-engineered human skin to study keratinocyte attachment
and migration in the process of reepithelization.
Wound Rep Reg **14**: 203-209
- Hata R, Senoo H (1989).
L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and
formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts.
J Cell Physiol **138**(1): 8-16
- Hettmannsperger U, Detmar M, Owsianowski M, Tenorio S, Kammler HJ, Orfanos CE
(1992)
Cytokine-stimulated human dermal microvascular endothelial cells produce interleukin-6
inhibition by hydrocortisone, dexamethasone, and calcitriol.
J Invest Dermatol **99** (5): 531-536

- Hofmann M, Guschel M, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Tandi C, Wiig H, Kippenberger S (2006).
Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model.
Neoplasia **8**(2): 89-95
- Hofmann-Wellenhof R, Smolle J, Roschger A, Strunk D, Hubmer M, Hoffmann C, Quehenberger F, Horn M, Kerl H, Wolf P (2004).
Sunburn Cell Formation, Dendritic Cell Migration, and Immunomodulatory Factor Production After Solar-Simulated Irradiation of Sunscreen-Treated Human Skin Explants In Vitro. *J Invest Dermatol* **123**: 781–787
- Hurwitz SA, Spandau DF (2000).
Quantitative analysis of UVB-induced apoptosis in human epidermis.
Exp Dermatol **9**(3): 185–191
- Jewell L, Guerrero R, Quesada AR, Chan LS, Garner WL (2007).
Rate of healing in skin-grafted burn wounds.
Plast Reconstr Surg **120**(2): 451-456
- Kawakami M, Kaneko N, Anada H, Terai C, Okada Y (1997)
Measurement of interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis-factor-alpha levels in tissues and plasma after thermal injury in mice.
Surgery **121**(4):440-448
- Kawakami M, Terai C, Okada Y (1998)
Changes of the interleukin-6 levels in skin at different sites after thermal injury.
J Trauma **44**(6): 1056-1063
- Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA (2002).
Elastic fibres.
J Cell Sci **11**: 2817-2828
- Kirnbauer R, Charvat B, Schauer E, Köck A, Urbanski A, Förster E, Neuner P, Assmann I, Luger TA, Schwarz T (1992).
Modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human melanocytes and melanoma cells: evidence for a regulatory role of IL-6, IL-7, TNF beta, and UVB light.
J Invest Dermatol **98**(3):320-326
- Köck A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA (1990)
Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light.
J Exp Med **172**: 1609-1614
- Kolbe L, Kligman AM, Schreiner V, Stoudemayer T (2001).
Corticosteroid-induced atrophy and barrier impairment measured by non-invasive methods in human skin.
Skin Res Technol **7**(2): 73-77
- Kondo S, Kooshesh F, Sauder DN (1997).
Penetration of keratinocyte-derived cytokines into basement membrane.
J Cell Physiol **171**: 190-195

- Korting HC, Unholzer A, Schäfer-Korting M, Tausch I, Gassmueller J, Nietsch KH (2002). Different skin thinning potential of equipotent medium-strength glucocorticoids. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15**: 85-91
- Kreuter A, Sommer A, Hyun J, Bräutigam M, Brockmeyer NH, Altmeyer P, Gambichler T (2006). 1% pimecrolimus, 0.005% calcipotriol, and 0.1% betamethasone in the treatment of intertriginous psoriasis: a double-blind, randomized controlled study. *Arch Dermatol* **142**(9): 1138-1143
- Kripke ML, Cox PA, Alas LG, Yarosh DB (1992) Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(16): 7516-7520
- Krueger J, Ray A, Tamm I, Sehgal PB (1991) Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells *J Cell Biochem* **45**(4): 327-334
- Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsuo H, Kim HJ, Numari S, Mabuchi Y, Kagawa S (2004) Establishment of banking system for allogeneic cultured dermal substitute. *Artif Organs* **28**(1): 13-21
- Kurzen H, Henrich C, Booken D, Poenitz N, Gratchev A, Klemke CD, Engstner M, Goerdts S, Maas-Szabowski N (2006). Functional characterization of the epidermal cholinergic system in vitro. *J Invest Dermatol* **126**(11): 2458-2472
- Lallemand F, Furrer P, Felt-Baeyens O, Gex-Fabry M, Dumont JM, Besseghir K, Gurny R (2005). A novel water-soluble cyclosporine A prodrug: ocular tolerance and in vivo kinetics. *Int J Pharm.* **295** (1-2): 7-14
- Lange K, Gysler A, Bader M, Kleuser B, Korting HC, Schäfer-Korting M (1997). Prednicarbate versus conventional topical glucocorticoids: pharmacodynamic characterization in vitro. *Pharm Res* **14**(12): 1744-1749
- Lange K, Kleuser B, Gysler A, Bader M, Maia C, Schneidereit C, Korting HC, Schäfer-Korting M (2000). Cutaneous inflammation and proliferation in vitro: Differential effects and mode of action of topical glucocorticoids. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **13**: 93-103
- Langenbrink L (2002). Diagnostischer und prognostischer Wert der quantitativen und qualitativen Messung von kardialem Troponin I bei Patienten mit Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom – Evaluierung des AxSYM-cTnI Immunoassay-
Dissertation Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- Lee JH, An HT, Chung JH, Kim KH, Eun HC, Cho KH (2002). Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **18**(5): 253-261

Lee KM, Lee JG, Seo EY, Lee WH, Nam YH, Yang JM, Kee SH, Seo YJ, Park JK, Kim CD, Lee JH (2005).

Analysis of genes responding to ultraviolet B irradiation of HaCaT keratinocytes using a cDNA microarray.

Br J Dermatol **152**: 52-59

Lewis DA, Spandau DF (2007).

UVB activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes occurs via a unique mechanism.

Arch Dermatol Res **299**(2): 93-101

Lukiw WJ, Pelaez RP, Martinez J, Bazan NG (1998).

Budesonide epimer R or dexamethasone selectively inhibit platelet-activating factor-induced or interleukin 1beta-induced DNA binding activity of cis-acting transcription factors and cyclooxygenase-2 gene expression in human epidermal keratinocytes.

Proc Natl Acad Sci USA. **95**(7): 3914-3919

Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S (1993).

Transcription factors NF-IL6 and NF-kappaB synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8.

Proc Natl Acad Sci USA. **90**(21): 10193-10197

Mensik I, Lamme EN, Riesle J, Brychta P (2002).

Effectiveness and Safety of the PEGT/PBT Copolymer Scaffold as Dermal Substitute in Scar Reconstruction Wounds.

Cell Tissue Bank. **3**(4): 245-253

Mewes KR, Raus M, Bernd A, Zöller NN, Sättler A, Graf R (2007).

Elastin expression in a newly developed full-thickness skin equivalent.

Skin Pharmacol Physiol **20**: 85-95

Miyachi Y, Horio T, Imamura S (1983)

Sunburn cell formation is prevented by scavenging oxygen intermediates

Clinical and Experimental Dermatology **8** (3): 305–310

Muto J, Kuroda K, Wachi H, Hirose S, Tajima S (2007).

Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation.

J Invest Dermatol **127**(6): 1358-1366

Norris P, Bacon K, Bird C, Hawk J, Camp R (1999)

The role of interleukins 1, 6 and 8 as lymphocyte attractants in the photodermatoses polymorphic light eruption and chronic actinic dermatitis.

Clin Exp Dermatol **24**: 321-326

Nuutinen P, Riekkilä R, Parikka M, Salo T, Autio P, Risteli J, Oikarinen A (2003).

Modulation of collagen synthesis and mRNA by continuous and intermittent use of topical hydrocortisone in human skin.

Br J Dermatol **148**(1): 39–45

- Oishi Y, Fu ZW, Ohnuki Y, Kato H, Nogushi T (2002).
Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases.
Br J Dermatol **147**(5): 859-868
- Onuma H, Mastui C, Morohashi M (2001).
Quantitative analysis of the proliferation of epidermal cells using a human skin organ culture system and the effect of DbcAMP using markers of proliferation (BrdU, Ki-67, PCNA).
Arch Dermatol Res **293**(3): 133–138
- Paquet P, Piérard GE (1996)
Interleukin-6 and the skin.
International Archives of Allergy and Immunology **109**: 308-317
- Petit-Frère C, Clingen PH, Grewe M, Krutmann J, Roza L, Arlett CF, Green MH (1998)
Induction of interleukin-6 production by ultraviolet radiation in normal human epidermal keratinocytes and in a human keratinocyte cell line is mediated by DNA damage.
J Invest Dermatol **111**: 354-359
- Pupe A, Moison R, De Haes P, van Henegouwen G, Rhodes L, Degreef H, Garmyn M (2002).
Eicosapentaenoic acid, a n-3 polyunsaturated fatty acid differentially modulates TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6 and PGE2 expression in UVB-irradiated human keratinocytes.
J Invest Dermatol **118**(4): 692-698
- Riedel S (2003), Dissertation zum Thema
Vergleichende Untersuchungen zur dermalen Penetration und Permeation in Diffusionszellen.
- Roguet R, Cohen C, Tessonnaud E, Gagne C, Teissier MH, Leclaire J (2000).
Use of a standardized reconstructed epidermis kit to assess in vitro the tolerance and the efficacy of cosmetics.
Int J Cosmet Sci **22** : 409-419
- Ryssel H, Gazyakan E, Germann G, Ohlbauer M (2007).
The use of Matriderm[®] in early excision and simultaneous autologous skin grafting in burns-a pilot study.
Burns **16** [Epub ahead of print]
- Sasaki T, Kano R, Sato H, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A (2003)
Effects of staphylococci on cytokine production from human keratinocytes.
Br J Dermatol **148**(1): 46-50
- Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I (1999)
In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form.
Arch Dermatol Res **291**(7-8): 400-404
- Sawamura D, Meng X, Ina S, Sato M, Tamai K, Hanada K, Hashimoto I (1998)
Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocytes gene therapy or inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes.
J Immunol **161**(10): 5633-5639

- Schackert HK, Korting HC, Schäfer-Korting M (2000).
Qualitative and quantitative assessment of the benefit-risk ratio of medium potency topical corticosteroids in vitro and in vivo.
BioDrugs **13**: 267-277
- Schäfer-Korting M, Kleuser B, Ahmed M, Höltje HD, Korting HC (2005).
Glucocorticoids for human skin: New aspects of the mechanism of action.
Skin Pharmacol Physiol **18**: 103-114
- Schlotmann K., Kaeten M, Black AF, Damour O, Waldmann-Laue M, Förster T (2001).
Cosmetic efficacy claims in vitro using a three-dimensional human skin model.
Int J Cosmet Sci **23**: 309-318
- Schoepe S, Schäcke H, May E, Assadullah K (2006).
Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy.
Exp Dermatol **15**(6): 406-420
- Sibbald RG, Zucker R, Coutts P, Coelho S, Williamson D, Queen D (2005)
Using a dermal skin substitute in the treatment of chronic wounds secondary to recessive dystrophic epidermolysis bullosa: a case series.
Ostomy/Wound Management **51** (11): 22 - 46
- Skiba B, Neill B, Piva TJ (2005).
Gene expression profiles of TNF-alpha, TACE, furin, IL-1beta and matrilysin in UVA- and UVB-irradiated HaCaT cells.
Photodermatol Photoimmunol Photomed **21**(4): 173–182
- Sonesson B, Rosengren E, Hansson AS, Hansson C (2003)
UVB-induced inflammation gives increased d-dopachrome tautomerase activity in blister fluid which correlates with macrophage migration inhibitory factor.
Exp Dermatol **12**(3): 278-282
- Stead RJ, Cooke NJ (1989).
Adverse effects of inhaled corticosteroids.
BMJ **298**(6671): 403-404
- Stein M, Bernd A, Ramirez-Bosca A, Kippenberger S, Holzmann H (1997).
Measurement of anti-inflammatory effects of glucocorticoids on human keratinocytes in vitro. Comparison of normal human keratinocytes with the keratinocyte cell line HaCaT.
Arzneimittelforschung **47**(11): 1266–1270
- Stenderup K, Rosada C, Worsaae A, Clausen JT, Norman Dam T (2007).
Interleukin-20 as a target in psoriatic treatment.
Ann N Y Acad. Sci **1110**: 368-381
- Storey A, McArdle F, Friedmann PS, Jackson MJ and Rhodes LE (2005).
Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduce UVB and TNF-alpha-induced IL-8 secretion in keratinocytes and UVB-induced IL-8 in fibroblasts.
J Invest Dermatol **124**(1): 248-255
- Tomic-Canic M, Komine M, Freedberg IM, Blumenberg M (1998)
Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes.
J Dermatol Sci **17**(3): 167-181

- Tsai JC, Feingold KR, Crumrine D, Wood LC, Grunfeld C, Elias PM (1994)
Permeability barrier disruption alters the localization and expression of TNF alpha/protein in the epidermis.
Arch Dermatol Res **286**(5): 242- 248
- Uhlig C, Rapp M, Dittel KK (2007).
New strategies for the treatment of thermally injured hands with regard to the epithelial substitute Suprathel
Handchir Mikrochir Plast Chir. **39**(5): 314-319
- Vanden Berghe W, Francesconi E, De Bosscher K, Resche-Rigon M, Haegeman G (1999).
Dissociated glucocorticoids with anti-inflammatory potential repress interleukin-6 gene expression by a nuclear factor- κ B-dependent mechanism.
Mol Pharmacol **56**: 797-806
- van der Vleuten CJ, Kroot EJ, de Jong EM, van de Kerkhof PC (1996).
The immunohistochemical effects of a single challenge with an intermediate dose of ultraviolet B on normal human skin.
Arch Dermatol Res **288**(9): 510-516
- Van Snick J (1990)
Interleukin-6: An overview.
Annu Rev Immunol **8**: 253-258
- Wang XP, Schunck M, Kallen KJ, Neumann C, Trautwein C, Rose-John S, Proksch E (2004).
The interleukin-6 cytokin system regulates epidermal permeability barrier homeostasis.
J Invest Dermatol **123**(1): 124-131
- Warino L, Balkrishnan R, Feldman SR (2006).
Clobetasol propionate for psoriasis: are ointments really more potent?
J Drugs Dermatol **5**(6): 527-532
- Watt F M (1983)
Involucrin and other markers of keratinocytes terminal differentiation.
J Invest Dermatol **81**: 100–103
- Werth VP, Bashir MM, Zhang W, (2003).
IL-12 completely blocks ultraviolet-induced secretion of tumor necrosis factor α from cultured skin fibroblasts and keratinocytes.
J Invest Dermatol **120**: 116-122
- Westerhof W (2006).
The discovery of the human melanocyte.
Pigment Cell Res. **19** (3): 183-193
- Yokoyama S, Nakano H, Yamazaki T, Tamai K, Hanada K, Takahashi G (2005).
Enhancement of ultraviolet-induced apoptosis by NF-kappaB decoy oligonucleotides.
Br J Dermatol **153**: 47-51
- Young AR (1987).
The sunburn cell.
Photodermatol. **4** (3): 127-34

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994)

Sunburn and p53 in the onset of skin cancer.

Nature **372**(6508): 773-776

Zöller NN, Kippenberger S, Thaçi D, Mewes K, Spiegel M, Sättler A, Schultz M, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Bernd A (2008).

Evaluation of beneficial and adverse effects of glucocorticoids on a newly developed full-thickness skin model.

Toxicol In Vitro **22** (3): 747-759

www.burnfree.de/info_fach.html

<http://dermatlas.med.jhmi.edu/derm/>

<http://www.dermis.net>

www.effci.com/FILES/BE/EFfCI%20Position%20Paper/legal.pdf

<http://www.emedicine.com/plastic/topic510.htm#target3>

www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1976/L/01976L0768-20070508-en.pdf

www.freenet.de/freenet/fit_und_gesund/gesundheit/kinderheilkunde/verbrennungen/04.html

www.mqw.de/thema/sonnenbrand.html

www.scf-online.com/english/27_e/frontpage27_e.htm

www.sigmaaldrich.com/.../Scientific_Resources/

[Pathway_Slides___Charts/Glucocorticoid_Receptor_Signaling.html](http://www.sigmaaldrich.com/.../Scientific_Resources/Pathway_Slides___Charts/Glucocorticoid_Receptor_Signaling.html)

<http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll-na/009-014.htm>

7. Danksagung

Für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und die Erstellung des Gutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn. Seine persönliche Unterstützung während der Durchführung meiner Doktorarbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen und sein Entgegenkommen während meiner gesamten Studienzeit waren mir eine große Hilfe und Ermutigung.

Herrn Prof. Dr. August Bernd danke ich für die intensive Betreuung, die Kommunikation während des Verlaufes meiner Experimente und für die Erstellung des Zweitgutachtens. Bei Fragen und Problemen stand seine Tür jederzeit offen. Ganz besonders herzlich bedanke ich mich dafür, dass er mir ermöglicht hat meine Ergebnisse auf internationalen Tagungen präsentieren zu können.

Herrn PD Dr. Stefan Kippenberger danke ich für die vielen anregenden Diskussionen und Denkanstöße. Seine Unterstützung beschränkte sich nicht alleine auf wissenschaftliche Themen, seine Lebensphilosophien erheiterten den Laboralltag.

Herrn Prof. Dr. Roland Kaufmann danke ich für die Bereitstellung des Laborplatzes und sein großes Interesse an meinen wissenschaftlichen Ergebnissen.

Für das entgegengebrachte Vertrauen und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danke ich allen Mitarbeiterinnen des B-Labors und der Histologie. Für die Unterstützung in der Herstellung des autologen Hautäquivalentes danke ich Frau Kerstin Görg. Ganz besonders danke ich Frau Maike Schultz für die Unterstützung der histologischen Untersuchungen. Durch ihre freundliche und menschliche Art gerade in schwierigen Situationen war sie immer ein Lichtblick.

Meinen biologischen Mitdoktoranden Annette Dorn, Matthias Hoffmann, Jadranka Dujic und Julijana Ivšoerović-Žaper danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen im Labor und auf den Tagungen. Über die gemeinsamen Experimente, den Erfahrungsaustausch und die Diskussion über zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten des FTSM hinaus, hat mir Annette viel Kraft und Lebensfreude vermittelt.

Herrn Prof. Dr. Henrik Menke bin ich sehr dankbar für die enge Kooperation in der Entwicklung des autologen Hautäquivalentes.

Der Firma Skin&Health Care Dr. Suwelack und der Else Kröner-Fresenius Stiftung danke ich für die großzügige Unterstützung.

Der wissenschaftliche Austausch mit den Mitarbeitern der Firma Phenion GmbH & Co. KG, insbesondere mit Herrn Dr. Karsten Mewes, Frau Martina Spiegel und Herrn Dr. Rüdiger Graf, war immer anregend und zeigte neue Aspekte auf. Die gewonnenen Einblicke in die Industrie waren sehr interessant.

Herrn Prof. Dr. Immo Scheffler und seinem Team, UCSD, danke ich für die herzliche Aufnahme und Bereitstellung eines Laborplatzes. Sie verstanden es, mich in einer sehr angenehmen Atmosphäre wissenschaftlich zu fordern und zu fördern.

Meinem Bruder Sven gilt mein ganz besonderer Dank. Er unterstützt mich zu jeder Zeit mit Rat und Tat. Auch in „kleinen experimentellen“ Rückschlägen konnte er mir immer positive Aspekte aufzeigen. Die Diskussion über Präsentationen, Poster und Vorträge wurde zu einem Ritual, er ist ein unermüdlicher Zuhörer und mein liebster Kritiker und „Glücksbringer“. Seine engelsgleiche Geduld mit mir und meinen „Experimenten“ ist unbezahlbar.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich in allen meinen Entscheidungen immer unterstützt haben und auch weiterhin unterstützen werden.

Meinem Freund Carsten Müller, danke ich für sein großes Verständnis für meinen nie planbaren Arbeitsrhythmus -gerade an den Wochenenden und Feiertagen. Mein „Überflieger“ gab mir viel Kraft und Zuversicht.

Für die Liebe und das Interesse an der Natur und an Biologie danke ich meinen Großeltern, ganz besonders meinem Großvater, den ich nie vergessen werde.

8. Ehrenwörtliche Erklärung

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 03.04.2008

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

"Weiterentwicklung und Evaluation eines drei-dimensionalen Hautmodelles zur pharmakologischen Testung"

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 03.04.2008



ZÖLLER, Nadja Nicole
Lämmerspieler Str. 71
D-63165 Mühlheim a. M.
Tel.: 0049 – 6108 – 6 77 16
Fax.: 0049 – 6108 – 99 17 17
e-mail Adresse: nadjazoeller@netscape.net

Deutschland

Curriculum vitae

Nadja Nicole Zöller

06.09.1978 geboren in Frankfurt

Mutter: Renate Zöller, 01.07.1949, Gymnasiallehrerin

Vater: Hans Zöller, 17.06.1945, Dipl. - Ing., Abteilungsleiter
Hochschulrechenzentrum Universität Frankfurt

Bruder: Sven Zöller, 01.08.1980

August 1985: Einschulung in die Markwald Grundschule in Mühlheim

August 1989: Aufnahme am Friedrich - Ebert - Gymnasium in Mühlheim

Dezember 1994: Wechsel auf die Anna - Schmidt - Schule (staatlich anerkanntes
Gymnasium) in Frankfurt

16. Juni 1998: Abitur an der Anna-Schmidt-Schule

Oktober 1998: Beginn des Diplombiologie Studiums in Frankfurt am Main an der
Johann Wolfgang Goethe-Universität

29. März 2000: Diplom-Vorprüfung in Chemie bei Professor Dr. Engels

10 April 2000: Diplom-Vorprüfung in Physik bei Professor Dr. Schmidt-Böcking

25 Oktober 2000: Diplom-Vorprüfung in Botanik, Zoologie, Genetik und Mikrobiologie,
Zell- und Entwicklungsbiologie

September 2002

bis Juni 2003 Diplomarbeit über das Thema „Wirkung von Heilwässern auf menschliche Keratinozyten in vitro“ am Universitätsklinikum Frankfurt ZDV, B-Labor

07. Juli 2003 Diplom (1,4)

September 2003

bis Februar 2004 Praktikum an der UCSD, Division of Biology, San Diego, USA

01. März 2004 bis

03. April 2008 Doktorarbeit mit dem Thema „Weiterentwicklung und Evaluation eines drei-dimensionalen Hautmodelles zur pharmakologischen Testung“ am Universitätsklinikum Frankfurt ZDV, B-Labor

Aktive Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen:

Mai 2005 Annual SID Meeting, St. Louis, USA

September 2005 Annual ESDR Meeting, Tübingen, Deutschland

März 2006 Annual ADF Meeting, Aachen, Deutschland

Juni 2006 WITE Meeting, Würzburg, Deutschland

Januar 2007 Annual DAV Meeting, St. Anton, Österreich

Best oral presentation for “cell based wound healing”

Juni 2007 ESACT Meeting 2007, Dresden, Deutschland

September 2007 Technical Workshop “The Phenion[®] Full Thickness Skin Model and its applications”, Düsseldorf, Deutschland

Literatur/Referenzen:

Zoeller NN et al.

Evaluation of the anti-inflammatory activity of glucocorticoids using a new full skin model.

66th Annual SID Meeting St. Louis, May 4-7 2005

J. Invest. Dermatol. 124(S4) A5 2005

Zoeller NN et al.

Using a new full skin model to evaluate cell-cell interaction and the anti-inflammatory activity of glucocorticoids.

35th ESDR Annual Meeting, Tuebingen Sept. 22-24 2005

Dorn A, Bock A, Graf R,
Zoeller N et al.

Uptake of CpG Oligonucleotides in in vitro cultured HaCaT cells and in a full thickness skin model.

XXXIII Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung,
March 23-25 2006, Aachen

Dorn A, Bock A, Graf R,
Zoeller N et al.

Monitoring of CpG oligodeoxynucleotide (ODN) uptake in cultured HaCaT keratinocytes and in a full thickness skin model.

Society of Investigative Dermatology, 67th Annual Meeting 2006,
May 3-6 2006, Philadelphia, USA

Zoeller N et al.

Monitoring cell-cell interaction and the anti-inflammatory activity of glucocorticoids with a new full thickness skin model.

13th congress on alternatives to animal testing
Linz, June 2-4 2006, University of Linz, Austria

Mewes KR, Bock A, Raus M,
Goerg K, Prießner A, De Wever B,
Zoeller NN, Bernd A

A full thickness skin equivalent for efficacy for toxicity and penetration studies.

Invitox, Oostende, Belgium, October 2006

Mewes KR, Raus M,
Bernd A, Zoeller NN et al.

Elastin expression in a newly developed full thickness skin equivalent.

Skin Dermatol. Physiol. **20** 85-95, 2007

Mewes KR,
Zoeller NN et al

Expression of dermal extracellular matrix proteins in a newly developed full thickness skin model.

20th Meeting of the European Society for animal cell technology (ESACT) 2007,
Dresden, June 2007

Ehrenamtliche Funktionen

seit 1996	Mitglied SPD, Vorstandsmitglied des Ortsvereins Mühlheim
April 1997-	
März 2001	Abgeordnete des Parlaments der Stadt Mühlheim
seit Mai 2002	Mitglied des Unterbezirks Vorstandes der SPD Kreis Offenbach
seit Mai 2006	Mitglied des geschäftsführenden Vorstandes der SPD Kreis Offenbach
seit März 2006	Abgeordnete des Parlamentes der Stadt Mühlheim

aktives Mitglied in verschiedenen Vereinen