

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE ROLLE VON PIMECROLIMUS UND BETAMETHASON BEI DER  
NORMALISIERUNG DER GESTÖRTEN EPIDERMALEN  
PERMEABILITÄTSBARRIERE BEIM ATOPISCHEN EKZEM**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**MAGDALENA WITT**  
aus Leimen

Kiel 2010

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Regina Fölster-Holst*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Dietrich Kabelitz*

Tag der mündlichen Prüfung: *02.12.2011*

Zum Druck genehmigt,  
Kiel, den *02.12.2011*

gez. \_\_\_\_\_

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das atopische Ekzem	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Klinik und Verlauf	1
1.1.4 Diagnostik	2
1.1.5 Ätiopathogenese	3
1.1.5.1 Die Rolle der genetischen Prädisposition	3
1.1.5.2 Die Rolle des Immunsystems	4
1.1.5.3 Risikofaktoren	4
1.1.6 Therapie	5
1.1.6.1 Kortikosteroide	5
1.1.6.2 Calcineurininhibitoren	5
1.2 Die epidermale Barriere	6
1.2.1 Aufbau der Epidermis	6
1.2.2 Die Funktion der epidermalen Differenzierung	7
1.2.3 Die Funktion der epidermalen Lipide	8
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	8
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1 Studie	9
2.1.1 Studienziele	9
2.1.2 Studiendesign	9
2.1.3 Studienpopulation	9
2.1.4 Studienmedikation	10
2.1.5 Randomisierung und Behandlungsgruppen	10
2.1.6 Studienablauf	10
2.1.7 Visitenablauf	11
2.2 Methodik	12
2.2.1 Klinische Beurteilung	12
2.2.2 Biophysikalische Messungen	13
2.2.2.1 Prinzip des Tewameter®	13

2.2.2.2	Durchführung der TEWL-Messung.....	14
2.2.2.3	Prinzip des Corneometer® .....	15
2.2.2.4	Durchführung der Hydratationsmessung.....	16
2.2.3	Tapestripping.....	16
2.2.4	Gewinnung von Hautbiopsien.....	16
2.2.5	Immunhistochemie (IHC).....	17
2.2.5.1	Fixierung und Einbettung.....	17
2.2.5.2	Färbung.....	17
2.2.5.3	Proliferationsmarker Ki-67.....	19
2.2.5.4	Auswertung.....	20
2.2.6	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	20
2.2.6.1	Chemische Fixierung.....	20
2.2.6.2	Schnittanfertigung und Mikroskopie.....	21
2.2.6.3	Auswertung.....	21
2.3	Ethikvotum.....	21
2.4	Statistische Analyse.....	22
 <b>III. Ergebnisse</b>		<b>23</b>
3.1	Klinische Beurteilung.....	23
3.1.1	Partial Eczema Area Severity Index (pEASI).....	23
3.1.2	Größe der behandelten Läsionen .....	25
3.1.3	Pruritus.....	25
3.2	Biophysikalische Messungen.....	26
3.2.1	Transepidermaler Wasserverlust (TEWL).....	26
3.2.2	Hydratation.....	27
3.3	Tapestripping und Stratum corneum-Integrität.....	28
3.4	Immunhistochemie.....	28
3.4.1	Epidermale Proliferation.....	28
3.4.2	Epidermale Differenzierung.....	29
3.5	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	35
3.5.1	Physiologische und pathologische Lamellarkörperchen .....	35
3.5.2	Lipidstrukturen.....	37

## Glossarium

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex-Methode
AE	Atopisches Ekzem
Aqua dest.	Aqua destillata
CE	Cornified Envelope
CLE	Corneocyte-Lipid-Envelope
CRF	Case report form
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
EDC	Epidermaler Differenzierungskomplex
FLG	Filaggrin-Gen
GM-CSF	Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor
IgE	Immunglobulin E
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
NMF	Natural moisturizing factor
pEASI	Partial Eczema Area Severity Index
SC	Stratum corneum
SG	Stratum granulosum
TBS	Tris-buffered saline
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
Th-Zellen	T-Helferzellen

## **I. Einleitung**

### **1.1 Das atopische Ekzem (AE)**

Das AE ist eine häufige Hauterkrankung aus dem Formenkreis der Atopie, die durch komplexe Wechselwirkungen zwischen Umwelt und Organismus charakterisiert ist (Leung und Bieber 2003). Die multifaktorielle Genese des AE basiert auf immunologischen, epidermalen und neurovegetativen Anomalien mit einem genetischen Hintergrund und stellt somit eine ausgesprochene Herausforderung bezüglich des Krankheitsverständnisses und der Therapie dar.

Das AE ist eine chronisch-rezidivierende, entzündliche Hauterkrankung, die mit extensivem Pruritus einhergeht und vielfältige klinische Ausprägungen bietet (Beltrani 1999). „Prurigo diathésique“, „endogenes Ekzem“, „Neurodermitis constitutionalis“ und „atopisches Ekzem“ sind nur einige Krankheitsbezeichnungen, die seit der Prägung des Begriffs durch Brocq und Jacquet 1891 Eingang in die Literatur fanden, sie weisen auf den multifaktoriellen Hintergrund der Erkrankung hin (Johansson et al. 2001). Der Begriff Atopie wurde von Coca und Cooke 1923 geprägt und beschreibt heute die persönliche und/oder familiäre Überempfindlichkeitsreaktion auf Allergenexposition mit Bildung von IgE-Antikörpern, die meist im Kindesalter auftritt. Als Folge können diese Personen die typischen Symptome Asthma bronchiale, atopisches Ekzem und Rhinokonjunktivitis entwickeln (Johansson et al. 2004).

#### **1.1.2 Epidemiologie**

Die Prävalenz des AE zeigt weltweit geographische Unterschiede, wobei ein hohes Vorkommen in Nordeuropa und Australien zu beobachten ist (Williams 2000). Migrantenstudien wiesen nach, dass Personen, in deren Herkunftsländern eine niedrige Prävalenz herrscht, beim Umzug in Länder mit hoher Prävalenz dort auch eine entsprechend höhere Krankheitsentwicklung zeigten (Burrell-Morris und Williams 2000). In den letzten 30 Jahren hat sich die Prävalenz verdoppelt bis verdreifacht, heute sind 10-20% der Kinder und 2-10% der Erwachsenen betroffen (Illi et al. 2004, Worm et al. 2006).

#### **1.1.3 Klinik und Verlauf**

Die klinischen Ausprägungen des AE sind vielfältig, sie variieren in ihrer Morphologie und Lokalisation und zeigen eine altersabhängige Verteilung. Im akuten Stadium des

Ekzems zeigt sich eine papulöse Infiltration auf erythematösen, nässenden Plaques; im subakuten Stadium finden sich Exkoriationen als Sekundärererscheinung des Kratzens und eine beginnende Schuppung. Im chronischen Stadium entwickeln sich zusätzlich stärkere Schuppung und Lichenifikation. Begleitet werden alle Stadien von dem Kardinalsymptom des Pruritus (Beltrani 1999). Die Lokalisation der Läsionen ist abhängig von der Altersphase: In der Säuglings- und Kleinkindphase manifestiert sich das AE um den 3. postnatalen Monat als Milchschorf im Gesichts- und Kopfbereich. In der infantilen und juvenilen Phase findet sich das Ekzem dann zunehmend an den großen Gelenkbeugen, Hals und Händen, welche auch die Prädilektionsstellen der adulten Phase darstellen. Der symmetrische Befall und der schubförmige Verlauf ist ein Charakteristikum in jedem Alter (Hornstein und Klatschka 1991). Das AE beginnt zu 87% vor dem 5. Lebensjahr und kann sich über die Adoleszenz bis ins Erwachsenenalter hinziehen oder auch dort erst beginnen (Bardana 2004, Bieber 2008).

Man unterscheidet beim AE eine intrinsische (nicht-allergische) von einer extrinsischen (allergischen) Form. 70-85% der Patienten zeigen die klassische extrinsische Form, die mit erhöhten IgE-Serumspiegeln und positiven Pricktest-Reaktionen auf Umweltallergene einhergeht (Bardana 2004). Die IgE-Sensibilisierung korreliert dabei mit dem Krankheitsausmaß (Tan et al. 1996). Die intrinsische (nicht-atopische) Form hingegen zeigt normale IgE-Serumspiegel und keine Sensibilisierung auf Umweltallergene, sie wird mit einer Prävalenz von 15-30% beschrieben (Bardana 2004). Das intrinsische Ekzem manifestiert sich später als das extrinsische und zeigt eine mildere Ausprägung, während sich das extrinsische Ekzem in der Kindheit manifestiert und ein schwereres Krankheitsbild bietet (Fölster-Holst et al. 2006).

#### **1.1.4 Diagnostik**

Als diagnostisches Instrument etablierten Hanifin und Rajka 1980 eine Auswahl klinischer Merkmale, die aus 4 Haupt- und mehreren Nebenkriterien bestehen, von denen mindestens 3 Kriterien jeder Gruppe erfüllt sein müssen (Hanifin und Rajka 1980). Die Diagnose des AE wird primär klinisch und aufgrund von anamnestischen Angaben gestellt. Zusätzliche spezifische Untersuchungen erleichtern die Identifikation von Provokationsfaktoren. Eine große Rolle hierbei spielt die allergologische Diagnostik. Dazu gehören neben der Untersuchung des Gesamt-IgE

in vivo-Untersuchungen wie Pricktest, Intrakutantest, Epikutantest und der Atopy-Patch-Test, die dem Nachweis einer kutanen Sensibilisierung auf applizierte Allergene dienen. In-vitro wird die IgE-Sensibilisierung mit der RAST-Methode (Radio-Allergo-Sorbent-Test) nachgewiesen (Zollner et al. 2002).

### **1.1.5 Ätiopathogenese**

Die Pathogenese des AE ist multifaktoriell. Mehrere Krankheitsmechanismen sind bekannt, die sich gegenseitig verstärken und zu einem Circulus vitiosus ergänzen. Sowohl die Dysregulation des Immunsystems als auch die beeinträchtigte Hautbarriere könnten der Auslöser dieses Circulus vitiosus sein, der sich aus überschießender Immunantwort auf harmlose Allergene, konsekutiver Entzündung und konsekutivem Barrierschaden mit wiederum verstärkter Allergenpenetration ergibt.

Eine Störung der epidermalen Hautbarriere ist ein wesentliches Merkmal des AE.

Die vielfältigen Erklärungsmöglichkeiten für die Barriestörung lassen sich im Wesentlichen mit der „inside-outside“ und „outside-inside“-Hypothese zusammenfassen. Das „inside-outside“-Konzept geht davon aus, dass beim AE primär eine Immundysregulation vorliegt, welche eine epidermale Entzündungsreaktion mit konsekutiver Barriestörung hervorruft. Beim „outside-inside“-Konzept wird eine Barrierschädigung der Epidermis als primäres pathogenetisches Ereignis angenommen, welche eine immunologische Reaktion mit Entzündungsreaktion nach sich zieht (Elias und Feingold 2001). Ungeachtet der Frage der kausalen Störung kommt es zu einem Circulus vitiosus aus verstärkter Allergenpenetration mit entsprechender Immunantwort, vermehrter Entzündung mit vermehrtem Pruritus, der mit Kratzen beantwortet wird und eine weitere Barrierschädigung verursacht.

#### **1.1.5.1 Die Rolle der genetischen Prädisposition**

Dem AE liegt ein polygenes und variables Vererbungsmuster zugrunde. Das empirische Erkrankungsrisiko liegt bei einem erkrankten Elternteil bei 25-30%, bei zwei erkrankten Elternteilen bei 50-75% (bei respiratorischer Atopie ist der jeweils niedrigere Wert anzunehmen) (Ruzicka et al. 1991). Zwillingsstudien zeigten, dass die Konkordanzrate für das AE bei monozygoten Zwillingen 77% beträgt gegenüber 15% bei dizygoten Zwillingen (Schultz Larsen und Holm 1985). Um mögliche Atopie-

prädisponierende Gene zu identifizieren, wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt; bislang sind mindestens 20 Gene identifiziert worden, die eine Assoziation mit dem AE aufweisen (Brown und McLean 2009). Die Assoziation mit der stärksten Aussagekraft fand sich bislang in Mutationen des Filaggrin-Gens (FLG), das für das epidermale Barriereprotein Filaggrin kodiert (Palmer et al. 2006) – diese recht junge Entdeckung bietet einen neuen Ansatz im Krankheitsverständnis und wird im Verlauf noch diskutiert.

#### **1.1.5.2 Die Rolle des Immunsystems**

Bei der allergischen Entzündungsreaktion kommt es im Rahmen der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (wie die epidermalen Langerhanszellen) zur Sensibilisierung naiver T-Zellen. Daraus resultiert entweder eine Aktivierung von Typ1-Helferzellen (Th1-Zellen) oder Typ2-Helferzellen (Th2-Zellen), die über die Produktion unterschiedlicher Zytokine verschiedene Effektormechanismen initiieren. Beim AE dominiert die Aktivierung von allergenspezifischen Th2-Zellen, die durch Ausschüttung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 die IgE-Bildung durch B-Zellen stimulieren, dafür genügen minimale Allergenmengen. Ebenso werden IL-6, IL-9, IL-10 und Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor (GM-CSF) sezerniert (Oettgen und Geha 1999). Die Endstrecke der IgE-Produktion besteht in der Bindung des IgE-Antikörpers an den hochaffinen FcεR1-Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten, die daraufhin Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotriene und Zytokine freisetzen. Dies ruft die für das AE typische Entzündung und den Pruritus hervor (Koblenzer 1999, Milgrom 2002). Die überschießende Reaktion des Immunsystems bei AE spiegelt sich nicht nur in der Th2-vermittelten Antwort auf harmlose Antigene, sondern auch in einer Vielzahl weiterer immunologischer Anomalien wider (Leung 1999, Giustizieri et al. 2001, Novak et al. 2003).

#### **1.1.5.3 Risikofaktoren**

Einer der wesentlichen Risikofaktoren ist die positive atopische Familienanamnese und die genetische Prädisposition. Da die geographische Verteilung des AE eine erhöhte Prävalenz in industrialisierten Ländern sowie in städtischen Räumen, verglichen mit ländlichen Räumen, zeigt, wird ein Zusammenhang mit Umweltnoxen angenommen (Ben-Gashir et al. 2004). Die oft diskutierte Hygiene-Hypothese wurde

2004 von einer dänischen Kohortenstudie thematisiert. Sie zeigte, dass eine mikrobielle Exposition, wie sie beispielsweise bei Haustierhaltung, hoher Geschwisteranzahl oder Leben auf dem Bauernhof auftritt, einen protektiven Effekt auf die Entwicklung des AE hat. Infektionskrankheiten während der ersten 6 Lebensmonate sollen jedoch das Erkrankungsrisiko in den ersten 18 Monaten erhöhen (Benn et al. 2004). Nikotinkonsum in der Schwangerschaft und Stillzeit erhöht ebenfalls das kindliche Risiko für die Entwicklung eines AE (Schäfer et al. 1997).

### **1.1.6 Therapie**

Eine wichtige Behandlungsgrundlage stellen Pflegemaßnahmen dar, dabei werden Substanzen mit Zusätzen von Moisturizern wie Urea oder Glycerin verwendet. Die Wiederherstellung der Barrierefunktion ist mit einer klinischen Besserung verbunden, so dass Pflegemaßnahmen eine tragende Säule der AE-Therapie darstellen (Lebwohl und Herrmann 2005). Ihre Wirksamkeit spiegelt sich auch im kortikosteroidsparenden Effekt in Vor- und Nachsorge des AE wider (Hanifin et al. 2004).

#### **1.1.6.1 Kortikosteroide**

Die Anwendung topischer Kortikosteroide stellt seit den 50er Jahren einen Standard in der Therapie des AE dar. Es existieren über 30 verschiedene Präparate, die sich in ihren Wirkungsklassen und Rezepturen unterscheiden, von diesen konnte jedoch keines als das „beste“ identifiziert werden (Hoare et al. 2000). Kortikosteroide bewirken eine starke Antiinflammation sowie Antiproliferation, Immunsuppression und Vasokonstriktion, ihre Anwendung ist somit durch zahlreiche Nebenwirkungen limitiert (Zollner et al. 2002). Die häufigste Nebenwirkung topischer Kortikosteroide ist die Hautatrophie, weiterhin treten Teleangiektasien, Striae und maskierte mikrobielle Infektionen an der Haut auf (Hengge et al. 2006).

#### **1.1.6.2 Calcineurininhibitoren**

Der topische Einsatz der Calcineurininhibitoren Pimecrolimus und Tacrolimus (EU-Zulassung 2002), die bislang Verwendung in der Transplantationsmedizin fanden, stellt einen großen Fortschritt in der Therapie des AE dar. Ihre immunsupprimierende Wirkung beruht im Wesentlichen auf der Hemmung der Ausschüttung

proinflammatorischer Zytokine aus T-Zellen über die Inhibition der Phosphatase Calcineurin (Grassberger et al. 1999, Novak et al. 2005). Dies führt bei topischer Anwendung zu einer selektiven antiinflammatorischen Wirkung (Stuetz et al. 2006). Die Sicherheit und die Effektivität von Pimecrolimus-Creme 1% für die Kurzzeitbehandlung von Exazerbationen sowie für die Langzeitbehandlung wurde in mehreren kontrollierten, klinischen Studien nachgewiesen (Stuetz et al. 2006). Die Langzeitanwendung von Pimecrolimus und Tacrolimus bei Kindern wurde in zahlreichen Studien in bis zu 4-Jahres-Follow-up-Studien als effizient und sicher beschrieben (Papp et al. 2005, Reitamo et al. 2008). Die Nebenwirkungen beschränken sich im Wesentlichen auf vorübergehende lokale Reaktionen. Es werden jedoch vermehrt virale Hautinfektionen beschrieben, die Inzidenz mykotischer oder bakterieller Hautinfektionen ist aber nicht verändert. Im Vergleich zu den Kortikosteroiden rufen Calcineurininhibitoren keine Hautatrophie hervor (Langley et al. 2007). Bei topischer Anwendung von Pimecrolimus findet eine nur minimale systemische Absorption statt, die keine systemischen Nebenwirkungen bewirkt (Stuetz et al. 2006).

Die systemische Therapie des AE bleibt schweren, therapierefraktären Fällen vorbehalten; hier kommen systemische Kortikosteroide sowie Immunsuppressiva wie Ciclosporin in Betracht. Dabei sollte dem Ciclosporin der Vorzug gegeben werden (Schmitt et al. 2010).

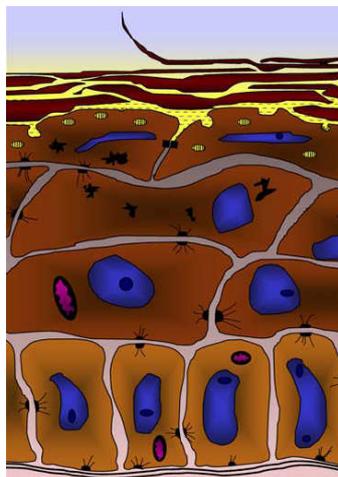
## **1.2 Die epidermale Barriere**

Die Epidermis bildet als äußerste der 3 Hautschichten die Grenzschicht zur Umwelt und stellt nicht nur eine physikalische, sondern auch eine chemische und immunologische Barriere dar – so schützt sie den Organismus vor Austrocknung und der Penetration von Umweltstoffen (Proksch et al. 2008). Sie besteht vorwiegend aus Plattenepithel und enthält neben Keratinozyten Langerhanszellen, Melanozyten und Merkelzellen. Die Epidermis ist mit der unter ihr liegenden Dermis sägezahnartig verknüpft, letztere besteht aus fibroelastischem Gewebe und enthält hautversorgende Gefäße, Nerven sowie Hautanhangsgebilde. Die unterste Schicht der Haut bildet die Subcutis, die aus Fettgewebe besteht und als Schutzpolster dient.

### **1.2.1 Aufbau der Epidermis**

Die Epidermis ist aus 4 Schichten aufgebaut und ist je nach Körperareal ca. 0,1 mm

dick. Die Schichten verändern sich nach außen hin morphologisch und funktionell, siehe Abb.1. Auf das zylindrische Stratum basale folgt das Stratum spinosum, in



**Abb.1** Schema der Epidermis  
(modifiziert aus: Proksch et al. 2006)

dem die Zellen bereits zunehmend flacher werden. Darüber liegt das Stratum granulosum, in dem die Zellen durch Differenzierungsprozesse eine platte Form annehmen. Dies geht in das Stratum corneum über, hier liegen die Zellen durch den vollzogenen Verhornungsprozess in einer starren, dichtgepackten Plättchenform vor und bieten somit einen effektiven Schutz nach außen.

### 1.2.2 Die Funktion der epidermalen Differenzierung

Das Stratum corneum (SC) lässt sich als 2-Kompartiment-Modell veranschaulichen: Korneozyten (kernlose, proteinreiche, „tote“ Zellen) liegen in der Interzellulärmatrix eingebettet, die aus Lipiddoppelschichten besteht; zusammen bilden die Kompartimente die schützende Permeabilitätsbarriere der Epidermis (Elias 2005). Im Laufe des Durchwanderungsprozesses der Keratinozyten durch die Epidermis, die in der Desquamation der Korneozyten mündet, findet die Differenzierung und Proliferation statt. Sie beginnt im Stratum basale, wo die Keratinozyten im Laufe der Differenzierung spezifische Keratine bilden: Keratin 5 und Keratin 14 werden in den basalen Zellschichten produziert, Keratin 1 und Keratin 10 in suprabasalen Keratinozyten (Ekanayake-Mudiyanselage et al. 1998). Keratin 1 und Keratin 10 sind Markerproteine der frühen terminalen Differenzierung, während der späten terminalen Differenzierung entstehen die Proteine Involucrin, Loricrin und Filaggrin. Gegen Ende der Differenzierung sind die intrazellulären Organellen abgebaut und mit der Bildung des Cornified-Envelope (CE) verwandelt sich der Keratinozyt in den Korneozyten (Lee et al. 2006). Der CE umhüllt das Zytosol und besteht aus quervernetzten Proteinen, v.a. Involucrin, Loricrin, Elafin und Envoplakin. Er wird von einer Lipidhülle umgeben, die aus  $\omega$ -Hydroxyceramiden besteht und kovalent an die Proteine des CE gebunden ist, dieser Corneocyte-Lipid-Envelope (CLE) ersetzt die frühere Plasmamembran. Die Interaktion des CE mit den interzellulären Lipiddoppelschichten ist ein wichtiger Garant der mechanischen Barrierefunktion.

Eine wesentliche Bedeutung besitzt auch das Protein Filaggrin, es vernetzt die Keratinfilamente (K1/K10) zu Bündeln, was zur Einleitung der Verhornung führt (Howell et al. 2007).

### **1.2.3 Die Funktion der epidermalen Lipide**

Ein wichtiger Teil des Differenzierungsprozesses ist die Bildung von Lipiden in kernhaltigen Keratinozyten des Stratum spinosum und Stratum granulosum. Sie werden zunächst in Lamellarkörperchen gespeichert und im Laufe der Differenzierung exozytotisch in den Interzellularraum zwischen Stratum granulosum und SC entleert. Lamellarkörperchen sind rundliche Organellen, im Durchmesser ca. 200 nm lang, die dichtgepackte Lipidlamellen und amorphe Substanz enthalten (Wertz 2000). Zum Exozytosezeitpunkt enthalten die Lamellarkörperchen hauptsächlich Phospholipide, Glykolipide, Cholesterol sowie hydrolytische Enzyme. Diese Enzyme, v.a. saure Sphingomyelinase und  $\beta$ -Glucocerebrosidase, produzieren daraufhin im Interzellularraum die 3 Hauptlipide des SC: Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterol (Wertz 2000). Die relativ unpolare, hydrophobe Lipidmischung formt die lamellären Lipidmembranen des Interzellularraums des SC und trägt in ihrer Zusammensetzung entscheidend zur Erhaltung der Barrierehomöostase und des Wasserhaushalts bei (Elias 2005).

### **1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Ein erhöhter transepidermaler Wasserverlust (TEWL), verminderter Wassergehalt (Hydratation) des Stratum corneum, beeinträchtigte epidermale Lipidzusammensetzung sowie eine beeinträchtigte epidermale Differenzierung sind Ursachen für die erhöhte Permeabilität der Epidermis, welche die physiologische Barrierefunktion aufhebt. Die gestörte Barrierefunktion kennzeichnet das Krankheitsbild des AE; die Wiederherstellung der gestörten epidermalen Barriere ist daher ein wichtiger Ansatz in der Therapie des AE.

Wir fragten uns somit, welchen Einfluss die am häufigsten zur Therapie des AE eingesetzten antiinflammatorisch wirksamen Substanzen, Kortikosteroide und Calcineurininhibitoren, auf die epidermale Barriere aufweisen. Hierfür initiierten wir eine kontrollierte klinische Studie, bei der die Wirkung von Pimecrolimus im Vergleich zu Betamethason auf die Barriere untersucht wurde. Als Messinstrumente dienen biophysikalische, klinische, histologische sowie ultrastrukturelle Parameter.

## **II. Material und Methoden**

### **2.1 Studie**

#### **2.1.1 Studienziele**

Das Ziel der Studie war die Erfassung der epidermalen Barriere-reparatur über 4 Wochen bei 3-wöchiger topischer Anwendung von Pimecrolimus 1% und Betamethason 0,1% als Vergleichstherapie mit einer anschließenden einwöchigen wirkstofffreien Nachkontrolle.

Als primäres Ziel wurden zunächst biophysikalische Parameter ermittelt, die die Hautbarrierefunktion wesentlich bestimmen. Hierbei wurde als wegweisende Zielgröße der Transepidermale Wasserverlust (TEWL) gemessen, ferner wurden die Hydratation sowie die Integrität des Stratum corneum (SC) untersucht. Begleitend fand eine klinische Beurteilung statt. Als weiteres primäres Ziel wurden histologische Parameter erfasst. Aus Hautbiopsien wurde die Proliferationsrate der Epidermis (Ki-67 Antikörper) bestimmt und die epidermale Differenzierung anhand der Zytokeratine Keratin 5, Keratin 14, Keratin 10 und Keratin 16 sowie der Proteine Filaggrin, Involucrin und Loricrin untersucht. Ein sekundäres Untersuchungsziel stellte die ultrastrukturelle Analyse der Epidermis mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) dar.

#### **2.1.2 Studiendesign**

Die vorliegende Studie ist eine doppelblinde, randomisierte, explorative, intraindividuelle klinische Studie. Die Durchführung fand zwischen Mai 2005 und Februar 2006 in der Neurodermitisambulanz der Universitätshautklinik Kiel statt. Die Studie wurde auf einen Zeitraum von 4 Wochen angelegt; der dreiwöchigen Behandlung mit den Studienmedikationen folgte eine einwöchige wirkstofffreie Pflegephase.

#### **2.1.3 Studienpopulation**

Die Studienpopulation bestand aus 15 erwachsenen Patienten mit atopischem Ekzem (AE), die symmetrische Läsionen an beiden Armen aufwiesen. Die Patienten befanden sich entweder in ambulanter Behandlung der Neurodermitisambulanz oder in stationärer Behandlung der Universitätshautklinik Kiel. Das Alter der 10 weiblichen und 5 männlichen Patienten lag zwischen 21 und 38 Jahren. Für die Teilnahme an

der Studie erhielten die Patienten je eine pauschale Aufwandsentschädigung von 300 €.

#### **2.1.4 Studienmedikation**

Pimecrolimus Creme 1% (Elidel® 1% Creme, Novartis Pharma GmbH, A)

Betamethasonvalerat Creme 0,1% (Betnesol® - V Creme 0,1%, GlaxoSmithCline GmbH und Co.KG, München) als Vergleichstherapie

Pflegesubstanz: Unguentum leniens

#### **2.1.5 Randomisierung und Behandlungsgruppen**

Die Patienten bekamen nach Studieneinschluss eine Patientenummer sowie eine Randomisierungsnummer zugewiesen, nach dieser wurden sie (im Verhältnis 1:1) in eine der beiden Behandlungsgruppen randomisiert:

Gruppe 1: Applikation von Pimecrolimus 1% auf dem rechten Arm und Betamethason 0,1% auf dem linken Arm.

Gruppe 2: Applikation von Betamethason 0.1% auf dem rechten Arm und Pimecrolimus 1% auf dem linken Arm.

#### **2.1.6 Studienablauf**

Nach einer 2-wöchigen Screening-Phase vor Studienbeginn, in der die Studienteilnehmer gebeten wurden, nicht erlaubte Medikation wie Kortikosteroide, Calcineurininhibitoren, weitere antiinflammatorische Externa oder Pflegesubstanzen abzusetzen, erfolgte der Einschluss in die Studie. Tab.1 zeigt den detaillierten Visitenplan. An beiden Armen des Patienten, eine symmetrische Verteilung vorausgesetzt, wurde neben der betroffenen Zielläsion auch ein nicht-läsionales Areal mitbehandelt. Die Applikation der Studienmedikation erfolgte zweimal täglich (morgens und abends) durch den Patienten. Die Visiten fanden in wöchentlichen Abständen statt und wurden konstant von einem Untersucher durchgeführt. Vor dem ersten Auftrag der Studienmedikation am Tag 1 wurde aus einem läsionalen Areal eines Armes eine Hautbiopsie entnommen, nach Behandlungsende am Tag 22 wurden Hautbiopsien aus den Zielläsionen beider Arme entnommen. Jede Visite beinhaltete eine klinische Beurteilung des Hautstatus mittels Partial Eczema Area Severity Index (pEASI) sowie die Durchführung biophysikalischer Messungen; die Induktion einer Barrierestörung mittels Tapestripping fand an Tag 1, 22 und 29 statt.

Alle erhobenen Anamnese- und Visitendaten wurden im Studientagebuch (Case report form, CRF) dokumentiert. Die Patienten erhielten ein Patiententagebuch, in dem über die gesamte Zeit des Studienverlaufes der Pruritus protokolliert wurde. Von dem Hautbiopsiematerial wurden jeweils 5 Patientensets der histologischen Untersuchung, der transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchung und einer weiteren Untersuchung zugeführt, die jedoch nicht Teil dieser Arbeit ist.

Visite (V) Tag (T)	V0 T0	V1 T1	V2 T8	V3 T15	V4 T22	V5 T29
Screening-Phase	x	-	-	-	-	-
Basisanamnese	-	x	-	-	-	-
Klinische Beurteilung	-	x	x	x	x	x
Biophysikalische Messungen	-	x	x	x	x	x
Tapestripping (Barrierestörung)	-	x	-	-	x	x
Hautbiopsie einseitig	-	x	-	-	-	-
Hautbiopsie zweiseitig	-	-	-	-	x	-

**Tab.1** Visitenplan

### 2.1.7 Visitenablauf

Nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung des Patienten erfolgte der Studieneinschluss. Der Basisbesuch (V1) diente einer umfassenden Anamnese. Hierbei wurden neben den persönlichen Patientendaten der Hauttyp (Typ 1-6) erfasst und bei weiblichen Studienteilnehmern ein Schwangerschaftstest durchgeführt. Die atopische Anamnese erfragte das Vorliegen von allergischer Rhinitis, Allergien, Asthma, anderen Ekzemerkrankungen, Familienanamnese, Gesamt-IgE -falls bekannt- sowie den Zeitpunkt des aktuellen Ekzem-Schubes. Ferner wurden Begleit- und Vorerkrankungen sowie eine eventuelle Begleitmedikation erfasst, die hinsichtlich ihres Einflusses auf die Studie beurteilt wurde. Die jeweiligen Einschluss- und Ausschlusskriterien finden sich im Anhang. Die Visiten erfolgten nach o.g. Visitenplan, bei jeder Visite wurde zusätzlich der persönliche Studienverlauf (Adverse events/Serious adverse events, Änderung der Vorerkrankungen/Begleitmedikation) erfasst.

## 2.2 Methodik

Die verwendeten Materialien, Chemikalien und Antikörper werden namentlich bei den jeweiligen Methoden erwähnt, Herkunft und Zusammensetzung finden sich im Anhang.

### 2.2.1 Klinische Beurteilung

Zur klinischen Beurteilung des AE wurde die pEASI-Klassifikation verwendet. pEASI steht für "Partial Eczema Area Severity Index" und ist ein Schema, das die Intensität und das Ausmaß des AE erfasst, indem es die typischen Symptome der betroffenen Hautareale in Schweregrade einteilt. So wird eine differenzierte Beurteilung der Symptome als auch eine Gesamtbeurteilung ermöglicht. Die pEASI - Klassifikation umfasst die für das AE typischen Symptome Erythem, Infiltration, Exkoration und Lichenifikation und teilt diese in Schweregrade von 0 bis 3 Punkte ein (Tab.2). Die Gesamtpunktzahl aller Symptome ergibt ein Bild des Schweregrades der Läsion. Beurteilt wurden die Zielläsionen beider Arme, Abb.2 zeigt die Zielläsion eines Studienpatienten mit exemplarischer Berechnung des Partial Eczema Area Severity Index (pEASI).



**Abb.2** Zielläsion eines Studienpatienten mit exemplarischer Erfassung des pEASI: Erythem: 2 Punkte, Infiltration: 2 Punkte, Exkoration: 3 Punkte, Lichenifikation: 1 Punkt, pEASI-Score: 8 Punkte

Punkte	Symptomausprägung
0	Nicht ausgeprägt
1	Milde Ausprägung
2	Moderate Ausprägung
3	Schwere Ausprägung

**Tab.2** Partial Eczema Area Severity Index (pEASI)

Als weiterer klinischer Parameter wurde die Läsionsgröße der jeweiligen Zielläsionen bestimmt. Sie wurde erfasst als prozentualer Anteil der Läsion am gesamten Arm, die Fläche der Ellenbeuge wurde dabei mit 10% angegeben. Weiterhin wurde der Pruritus ermittelt, der auf einer visuellen Analogskala von 0 (kein Juckreiz) bis 10 (quälender Juckreiz) anzugeben war.

## 2.2.2 Biophysikalische Messungen

Um das Permeabilitätsverhalten der Epidermis zu untersuchen, wurden Messungen des Transepidermalen Wasserverlust (TEWL) mittels Tewameter® sowie der Hydratation mittels Corneometer® durchgeführt.

### 2.2.2.1 Prinzip des Tewameter®

Zur Messung des TEWL wurde das Gerät Tewameter® TM 210 (Fa. Courage+Khazaka Electronic GmbH, Köln) verwendet. Das Tewameter® misst die Wasserverdunstung einer Oberfläche in Gramm pro Quadratmeter pro Stunde (g/hm<sup>2</sup>). Dieses Messverfahren basiert auf dem Fick'schen Diffusionsgesetz:

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = -D \cdot A \cdot \frac{\Delta p}{\Delta x}$$

Hierbei gilt:

m = transportiertes Wasser (in g)

t = Zeit (in h)

D = Diffusionskoeffizient von Wasserdampf in Luft [ 0,67 x 10<sup>-3</sup> g/mhPa ]

A = Oberfläche (in m<sup>2</sup>)

p = Dampfdruck der Atmosphäre (in Pa)

x = Distanz von der Hautoberfläche zum Messpunkt (in m)

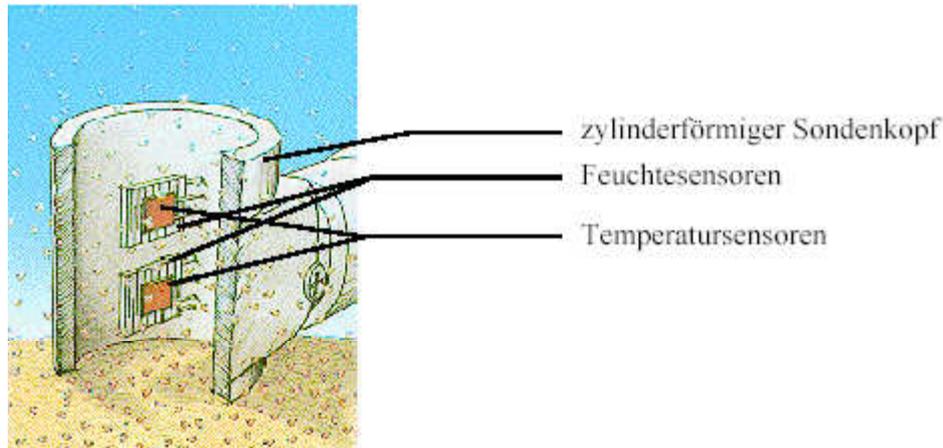
Der Diffusionsstrom m/t gibt an, wieviel Wasser pro Zeiteinheit transportiert wird, er ist der Oberfläche A und dem Dichtegradienten p/x proportional.

Der Wasseraustausch an einer wasserdurchlässigen Oberfläche (z.B. Haut) kann

- fehlende Konvektion vorausgesetzt und bei Vernachlässigung der thermischen Diffusion - anhand des Wasserdampfdruckgradienten (Dichtegradienten) in einer Zone direkt über der Oberfläche erfasst werden. Dieser auch als Diffusionszone bezeichneter Bereich befindet sich ca. 10 mm über der Hautoberfläche, innerhalb der Diffusionszone kann auch mit steigendem Abstand zur Haut ein konstanter Dichtegradient beobachtet werden (Nilsson 1977).

Auf diesen Beobachtungen beruht die Messmethode des Tewameter®. Die Sonde des Gerätes besteht aus einem Hohlzylinder, in dem sich 2 Paar Sensoren befinden, die Temperatur und relative Feuchtigkeit messen (siehe Abb.3). Wird die Sonde auf die Haut aufgelegt, tritt das von der Hautoberfläche verdunstende Wasser durch den Hohlzylinder aus, dabei verändert sich der Dichtegradient, der über die Sensoren indirekt gemessen wird. Die Auswertung erfolgt mit einem Mikroprozessor. Durch die geringe Größe der Tewameter®-Sonde (Innendurchmesser 10 mm, Höhe 20 mm,

Gewicht 25 g) wird der Einfluss von Luftturbulenzen minimiert. Die Architektur eines Zylinders, die einer offenen Kammer gleicht, schafft annäherungsweise die homogene Diffusionszone, die für die Gültigkeit des Fick'schen Diffusionsgesetzes notwendig ist.



**Abb.3** Aufbau der Sonde des Tewameter® TM 210  
(mit freundlicher Genehmigung der Fa. Courage+Khazaka, Köln)

Das Tewameter® misst den TEWL in einem Bereich von 0-90 g/hm<sup>2</sup> (Standardabweichung von  $\pm 10\%$  bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $> 30\%$ ) (Fischer et al. 2001). Die Normwerte des TEWL liegen je nach anatomischer Messlokalisierung im Bereich von 10-20 g/hm<sup>2</sup>. Zusätzlich hängen die Werte von Raumbedingungen, Jahreszeit und geographischer Lokalisation ab (Pinnagoda et al 1990).

### 2.2.2.2 Durchführung der TEWL-Messung

Um exakte, reproduzierbare Messungen zu erhalten, die über einen längeren Zeitraum verglichen werden können, sind konstante Raumbedingungen notwendig. Die Raumtemperatur betrug  $22 \pm 1$  °C, die relative Luftfeuchtigkeit betrug  $45\% \pm 2\%$ . Jegliche Luftbewegungen sowie Wärmestrahlung oder direkte Lichtquellen wurden vermieden, vor Beginn der Messungen hielt die Versuchsperson eine ca. 10-15 minütige Akklimatisierungsphase mit unbedeckten Messarealen ein.

Die Sonde wurde mit nur leichtem Druck auf die Haut aufgelegt und dort über den Verlauf der Messung ruhig gehalten. Die Messung erfolgte kontinuierlich bis zur Einstellung eines stabilen Wertes, in der Regel ergab sich eine Messdauer von 1-2 Minuten. Der angezeigte TEWL-Wert wurde dokumentiert, die Messung wurde jeweils dreimal durchgeführt und daraus der Mittelwert errechnet.

### 2.2.2.3 Prinzip des Corneometer®

Zur Messung der Hydratation wurde das Gerät Corneometer® CM 820 (Fa. Courage +Khazaka Electronic GmbH, Köln) verwendet. Das Corneometer® misst die Hydratation des Stratum corneum (SC), die einen entscheidenden Anteil an der Barrierefunktion der Epidermis hat.

Die Hydratationsmessung beruht auf der kapazitiven Messmethode: Das SC ist ein dielektrisches Medium, bei Änderung des Wassergehalts ändern sich die dielektrischen Eigenschaften und damit die Kapazität (Fischer et al. 2001).

Der Messkondensator der Corneometer®-Sonde besitzt ein Messvolumen, in das die Probe eingebracht wird, je nach Wassergehalt der Probe reagiert der Messkondensator mit unterschiedlichen Kapazitätsänderungen. Während der Messung wird das SC von einem elektrischen Streufeld durchdrungen und so die Dielektrizität gemessen. Der Messfühler des Sondenkopfs hat eine Fläche von 49 mm<sup>2</sup> und übt auf die Hautoberfläche einen nur geringen Druck von 1.6 N aus. Durch die kurze Messzeit bei Einzelmessungen (1 Sekunde) werden Okklusionseffekte verhindert.

Die Messgenauigkeit des Corneometer® liegt bei  $\pm 3\%$  (Gebrauchsanweisung Corneometer® CM 820, Fa.Courage und Khazaka, Köln). Die Messwerte der Hydratation werden in relativen Messwerten (Arbitrary units) zwischen 0 und 130 angegeben, Tab.3 zeigt Referenzwerte für gesunde Haut unter normalen Raumbedingungen (20 °C und 40-60% Luftfeuchtigkeit). Diese Werte können jedoch je nach Messbedingungen abweichen.

	sehr trocken	trocken	ausreichend feucht
<b>Hydratation (Arbitrary units)</b> Stirn, T-Zone, Kopfhaut, Wange, Augenlid, Schläfe, Mundwinkel, Oberkörper, Rücken, Hals	75	75-85	85
Arme, Hand, Beine, Ellenbogen	60	60-75	75

**Tab.3** Hydratation – Referenzwerte für gesunde Haut (modifiziert aus: Gebrauchsanweisung Corneometer® CM 820, Fa.Courage+Khazaka, Köln)

#### **2.2.2.4 Durchführung der Hydratationsmessung**

Die Messung wurde bei gleichen Raumbedingungen wie bei der TEWL-Messung durchgeführt. Die Sonde des Corneometer® wurde senkrecht auf die Haut aufgesetzt und kurz aufgedrückt, die Messung war nach einer Sekunde beendet. Es wurden drei Messungen auf demselben Areal durchgeführt und der Mittelwert errechnet.

#### **2.2.3 Tapestripping**

Dieses Verfahren diente der Beurteilung der Integrität des SC läsionaler und nicht-läsionaler Areale. Um eine Barrierestörung hervorzurufen und das SC zu entfernen, wurden Klebestreifen auf der Haut aufgeklebt, fest angedrückt und zügig wieder abgerissen. Es wurden 3-4 cm lange Klebestreifen (tesafilm® kristall-klar, Fa. Tesa, Hamburg) verwendet, die unter kontinuierlicher Messung des TEWL so oft abgerissen wurden, bis die Barrierestörung mit einem TEWL ab 40 g/hm<sup>2</sup> eintrat. Nach jedem 10. Abriss wurde der TEWL gemessen, der letztendlich erreichte Barrierestörungswert sowie die Zahl der benötigten Abrisse wurden festgehalten.

#### **2.2.4 Gewinnung von Hautbiopsien**

Zur Gewinnung von Hautgewebe für die immunhistologische Untersuchung und die ultrastrukturelle Untersuchung wurde eine Stanzbiopsie durchgeführt, für beide Untersuchungen wurden jeweils die Biopsien von 5 Patienten verwendet.

Mit einer Stanze kann ein Hautzylinder entnommen werden, der bis zur Subcutis vordringt und damit die für die Untersuchung relevanten Hautschichten Epidermis und Dermis mit ausschneidet. Für die Entnahme wurden Einweg-Stanzen mit 5 mm Durchmesser (Fa. Stiefel, Offenbach) sowie Hautbiopsie-Sets mit steril verpackten Utensilien (Lochtuch, Schere, Pinzette, Nadelhalter, Nahtmaterial, Tupfer) verwendet. Die Zielläsion wurde zunächst gründlich mit Octenisept® desinfiziert, anschließend wurde eine lokale Infiltrationsanästhesie mit ca. 0,5-1 ml des Lokalanästhetikums Prilocain gesetzt (Prilocain mit Zusatz von Adrenalin 1:200000, Xylonest® 1%, Fa. AstraZeneca, Wedel). Nach Prüfung der Anästhesie des Exzisionsareals wurde unter sterilen Bedingungen die Hautproben entnommen. Die Biopsie wurde unmittelbar nach Entnahme in ein tiefgekühltes beschriftetes Eppendorf Tube (Fa. Eppendorf, Hamburg) gegeben, daraufhin in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und schließlich in einer Kühltruhe bei - 80 °C endgelagert. Der Hautdefekt wurde mit

einer Einzelknopfnahm vernäht (Nahtstärke 4, Fa. Ethicon, Norderstedt), Wundkontrolle und Fadenzug erfolgten bei den nächsten Visiten.

### **2.2.5 Immunhistochemie (IHC)**

Eine gestörte epidermale Differenzierung und verstärkte Proliferation spiegeln die Barrierefunktionsstörung atopischer Haut wider.

Zum Nachweis der Differenzierungsproteine Involucrin, Loricrin und Filaggrin, der Proliferation (Ki-67) sowie zum Nachweis der Zytokeratine Keratin 5, Keratin 14, Keratin 10 und Keratin 16 wurde das Gewebe immunhistochemisch untersucht.

Mittels histologischer Verfahren können die Struktur und Funktion von Geweben erfasst werden, dabei werden nach Fixierung Gewebsschnitte angefertigt und diese zur Kontrastierung der einzelnen Zell- und Gewebsbestandteile angefärbt, danach können die Schnitte unter lichtmikroskopischer oder elektronenmikroskopischer Vergrößerung beurteilt werden. Eine wichtige Stellung nimmt die Immunhistochemie (IHC) ein. Sie ermöglicht, die Lokalisation von Proteinen und anderen chemischen Substanzen im Gewebe darzustellen und so das dynamische Zellgeschehen zu erfassen. Bei dieser Methode werden Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Hierbei wird der spezifische primäre Antikörper über einen Brückenantikörper an einen Enzymkomplex gebunden und über die Zugabe eines Chromogens farblich sichtbar gemacht.

#### **2.2.5.1 Fixierung und Einbettung**

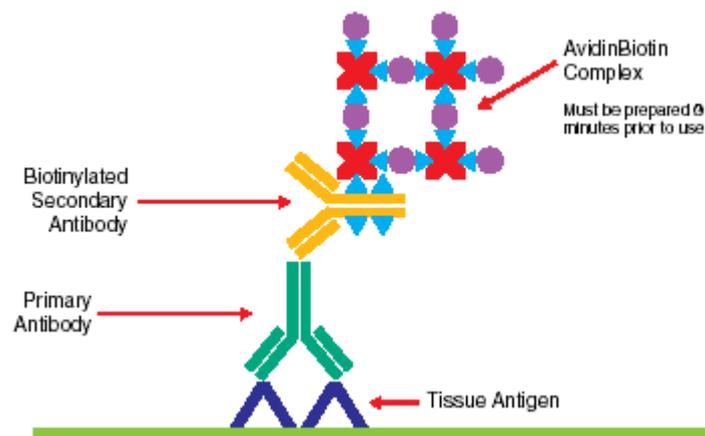
Nach Fixierung der Gewebeproben in Formalin wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe im Entwässerungsautomaten dehydriert (Tissue-Tek® VIP, Fa. Sakura Finetek, USA) und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet (De- und Rehydrierungsprotokoll im Anhang). Mit dem Mikrotom (HN 40, Fa. Jung AG, Heidelberg) wurden 5 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt, welche auf beschichtete Objektträger (SuperFrost® Plus, Fa. Menzel, Braunschweig) aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet, anschließend in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert.

#### **2.2.5.2 Färbung**

Es erfolgte zunächst eine Vorbehandlung des Gewebes: Zum Blockieren der endogenen Peroxidase wurde eine 5-minütige Spülung in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fa. Merck,

Darmstadt) vorgenommen. Im folgenden Schritt wurden die Schnitte zur Antigen-Demaskierung in eine 10mM Citratpuffer-Lösung getaucht (pH 6,0) und darin 30 min bei 90 ° C in einer Plastikkuvette im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen der Schnitte in der Pufferlösung über 30 min wurden sie kurz in Aqua destillata (Aqua dest.) gespült und für 5 min in TBS-Puffer (Tris-buffered saline) (pH 7,6) gewaschen. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu blockieren, erfolgte die Vorinkubation mit normalem Tierserum. Für die später verwendeten monoklonalen Antikörper Anti-Filaggrin, Anti-Involucrin, Anti-Keratin 10 und Anti-Keratin 16 erfolgte eine Vorinkubation für 30 min in normalem Kaninchenserum (Fa. Dako, Hamburg), verdünnt 1:5 in TBS-Puffer. Für die polyklonalen Antikörper Anti-Loricrin, Anti- Ki-67, Anti-Keratin 5 und Anti-Keratin 14 wurde zur Blockierung des nicht-spezifischen Hintergrundes normales Schweineserum (Fa. Dako, Hamburg), verdünnt 1:20 in TBS-Puffer, verwendet.

Zur Antigen-Antikörper-Reaktion wurde die Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC) eingesetzt, eine schematische Darstellung zeigt Abb.4. Sie beruht auf der starken Affinität der Proteine Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) und Avidin (aus Hühnereinweiß) zu dem Vitamin Biotin.



**Abb.4** Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode  
(mit freundlicher Genehmigung der Fa.Dako; aus: Education Guide Pathology – Immunohistochemical Staining Methods, Fourth Edition, Fa. Dako, Kalifornien)

Zunächst wurden die vorbehandelten Schnitte, in denen das Antigen nachgewiesen werden sollte, nach Entfernung des Tierserums mit den jeweiligen spezifischen, primären Antikörpern 30 min inkubiert (Anti-Filaggrin, Anti-Involucrin, Anti-Loricrin, Anti- Ki-67, Anti-Keratin 5, Anti-Keratin 10, Anti-Keratin 14, Anti-Keratin 16). Die

Herkunft und Verdünnung der Antikörper findet sich im Anhang. Als Zwischenschritt wurden sie 3 mal jeweils 5 min in TBS-Puffer gespült, daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper für 30 min. Für die aus der Maus stammenden monoklonalen Antikörper Anti-Filaggrin, Anti-Involucrin, Anti-Keratin 10 und Anti-Keratin 16 wurde Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Fa. Dako, Hamburg) verwendet. Die aus dem Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper Anti-Loricrin, Anti-Ki-67, Anti-Keratin 5 und Anti-Keratin 14 wurden mit Schweine-anti-Kaninchen-Antikörper (Fa. Dako, Hamburg) inkubiert. Es schloss sich erneut ein 3 maliger Spülvorgang in TBS-Puffer für jeweils 5 min an. Der sekundäre Antikörper dient als Brückenantikörper zu dem nachfolgend zugefügten Enzymkomplex StreptABCComplex/HRP (Fa. Dako, Hamburg), dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, welcher als tertiärer Antikörper fungiert. Es erfolgte eine 30 minütige Inkubation. Nach erneutem Spülvorgang mit TBS-Puffer wurde der Komplex mit dem Chromogen DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid, Fa. BioGenex, Duiven, NL), einer Peroxidase-Substrat-Lösung, für 5-15 min inkubiert. Durch die Enzymreaktion entsteht ein sichtbarer Farbstoff und die Lokalisation des Antigens, das an den primären und indirekt an den sekundären Antikörper gebunden ist, wird farblich markiert. Nachdem eine sichtbare Färbung beobachtet werden konnte, wurde das DAB in Aqua dest. abgespült.

Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde anschließend eine Färbung mit Mayers Hämalaunlösung (Fa. Merck, Darmstadt) für ca. 5-10 sek durchgeführt. Dies ist ein Teilschritt der in der Histologie weit verbreiteten Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die als Übersichtsfärbung angewendet wird. Hämalaun ist ein Produkt des Hämatoxylins, es bindet in saurem Milieu an die Nukleinsäuren des Zellkerns, wobei eine Blaufärbung der Kerne jedoch erst sichtbar wird, nachdem die Präparate in Leitungswasser gespült werden (für ca. 10 min, „Bläuung“) und damit ein alkalisches Milieu erzielt wird. Nach diesem Schritt wurden die Präparate abschließend mit Glycergel® Mounting Medium (Fa. Dako, Hamburg) eingedeckt.

### **2.2.5.3 Proliferationsmarker Ki-67**

Ki-67 ist ein Antigen, das in proliferierenden Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Dies wird sich zunutze gemacht, indem man einen Antikörper gegen Ki-67 verwendet und so eine Aussage über die Zellwachstumsfraktion erhält (Scholzen und Gerdes 2000). Diese Methode der Proliferationsbestimmung ist ein Standard in

histologischen Routinediagnostik und hat vor allem für die Tumordiagnostik eine wesentliche Bedeutung. Der Name von Ki-67 geht auf die Entwicklung durch Kieler Pathologen im Jahr 1983 zurück (Gerdes et al. 1983).

#### **2.2.5.4 Auswertung**

Die Auswertung der Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch (Axioskop 40, Fa. Zeiss, Jena) unter 400-facher Vergrößerung. Die Auswertung der histologischen Schnitte wurde deskriptiv nach semiquantitativen Aspekten vorgenommen. Die Proliferation wurde quantitativ erfasst, indem die Anzahl der mit dem Proliferationsmarker Ki-67 markierten Keratinozytenkerne in durchschnittlich 7 mikroskopischen Gesichtsfeldern pro Schnitt ausgezählt wurde. Die Dicke der Epidermis wurde unter 100-facher Vergrößerung in mm-Einheiten ausgemessen. Zum Vergleich mit gesunder Haut wurde ein Kontrollkollektiv (n=5, aus dem Archiv der Universitätshautklinik Kiel) herangezogen.

#### **2.2.6 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)**

Mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie kann eine 100-500000 fache Vergrößerung erzielt werden, das Auflösungsvermögen liegt bei 0,2 nm (Flegler et al. 1995). In der vorliegenden Studie wurde die TEM zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der epidermalen Lamellarkörperchen herangezogen.

Bei der TEM wird das Objekt von einem Elektronenstrahl durchdrungen, wobei die Objektstrukturen die Elektronen unterschiedlich stark absorbieren und so eine unterschiedliche Streuung des Strahls bewirken. Da das Bild durch die Streuung zustandekommt und eine niedrige Dichte eines Objekts (hier organisches Material mit vorwiegend C, N, O, H-Atomen) eine schwache Streuung der Elektronen bewirkt, muss zur Bildverbesserung eine Kontrastierung mit Schwermetallionen erfolgen. Nach Objektdurchtritt wird der Elektronenstrahl durch ein Projektiv vergrößert und auf einen Photofilm gelenkt.

Die Anfertigung der TEM-Bilder wurde von der Fa. Microscopy Services, Flintbek, durchgeführt.

##### **2.2.6.1 Chemische Fixierung**

Die Hautproben wurden in modifizierte Karnovsky-Lösung (Fa. Fluka, Buchs, CH) gegeben und über Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden sie 2 mal über 10

min in 0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,3) gespült und dann entweder für 60 min in Osmiumtetroxid-Lösung (Fa. Plano, Wetzlar) oder 45 min in Rutheniumtetroxid-Lösung (Fa. Plano, Wetzlar) nachfixiert. Osmiumtetroxid wurde zur Darstellung der Lamellarkörperchen-Exozytose, Rutheniumtetroxid zur Darstellung der Lipiddoppelschichten des SC verwendet. Nach erneuter 2 maliger Spülung in 0,1M Natriumcacodylatpuffer für 5 min wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Protokoll siehe Anhang). Danach erfolgte zur Verfestigung der Strukturen die Einbettung in Kunstharz (Epon 812, Fa. Plano, Wetzlar).

#### **2.2.6.2 Schnitthanfertigung und Mikroskopie**

Aus den Einbettungsblöcken wurden Ultradünnschnitte angefertigt, hierfür wurde ein Ultramikrotom (Ultracut S, Fa. Leica Microsystems, Wetzlar) mit einem Diamantmesser (Messerbreite 2,1 mm, Messerwinkel 45 °, Fa. Diatome, Biel, CH) verwendet. Die Schnitte wurden auf unbefilmte Kupfergrids (Fa. Plano, Wetzlar) aufgefangen und anschließend 3 min mit Uranylacetat-Lösung (Fa. Fluka, Biel, CH) sowie 5 min mit Bleicitrat-Lösung (Fa. Fluka, Buchs, CH) kontrastiert. Die Schnitte konnten nun im Transmissions-Elektronenmikroskop TEM 910 (Fa. Zeiss, Oberkochen) beurteilt werden, als Photomaterial wurde Electron Image Film SO-163™ von Kodak verwendet.

#### **2.2.6.3 Auswertung**

Es wurden je nach Schnitt 200-250 Lamellarkörperchen ausgezählt und diese hinsichtlich ihrer Morphologie und des Exozytoseprozesses beurteilt. Die Anzahl der physiologischen, vollständig gefüllten Lamellarkörperchen sowie die Anzahl der pathologischen, angehäuften oder im Sekretionsprozess unterbrochenen, Lamellarkörperchen wurde gezählt. Zum Vergleich mit gesunder Haut wurde ein Kontrollkollektiv (n=3) herangezogen.

### **2.3 Ethikvotum**

Vor Beginn der Studie erfolgte die Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Kiel. Die Studienteilnehmer erhielten eine Patienten-Information sowie eine Aufklärung und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

## **2.4 Statistische Analyse**

Die Unterschiede der beiden Medikationsgruppen wurden mit dem ungepaarten, zweiseitigen Student-t-Test statistisch analysiert. Dieser Test eignet sich, weil davon ausgegangen werden kann, dass die beiden Populationen die gleichen Varianzen aufweisen. Er vergleicht die Mittelwerte der beiden, voneinander unabhängigen Gruppen, der Mittelwert wurde hierbei mit dem Standardfehler bemessen (Standard Error of the Mean, SEM). Der Standardfehler erfasst wie stark der Mittelwert einer Stichprobe von dem tatsächlichen Wert der Population entfernt ist. Die Daten wurden mit dem Programm GraphPadPrism 4 (GraphPad Software, La Jolla, USA) tabellarisch und graphisch erfasst sowie statistisch ausgewertet.

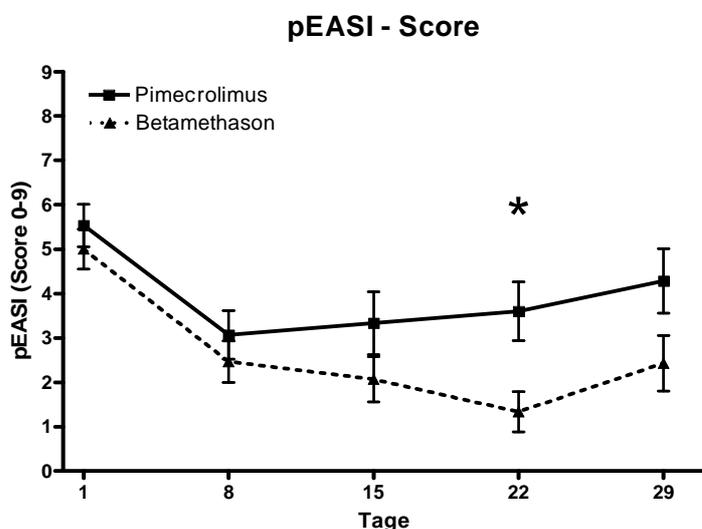
Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### III. Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Beurteilung

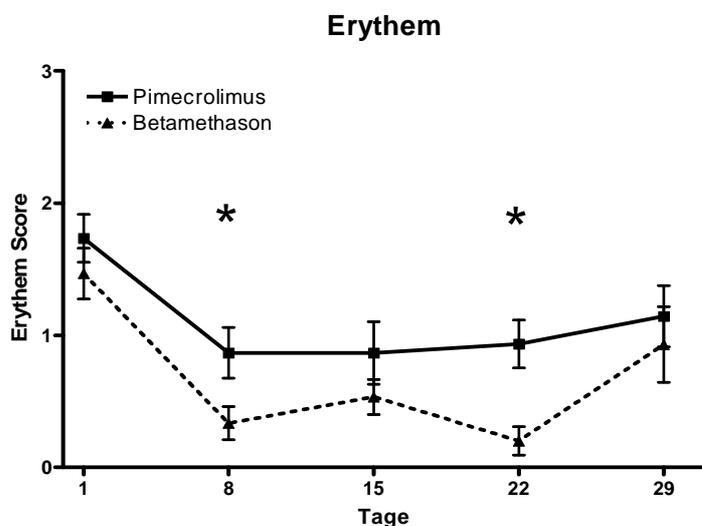
##### 3.1.1 Partial Eczema Area Severity Index (pEASI)

Beide Behandlungen führten zu einer klinischen Besserung, die sich am deutlichsten innerhalb der ersten Woche zeigte, siehe Abb. 5-9 (Signifikanzen werden in den folgenden Abbildungen mit einem Sternchen markiert). Betamethason zeigte eine stärkere Wirksamkeit als Pimecrolimus, signifikante Unterschiede zeigten sich an Tag 22 ( $p=0,008$ ). Die Einzelparameter des pEASI werden nachfolgend beschrieben.



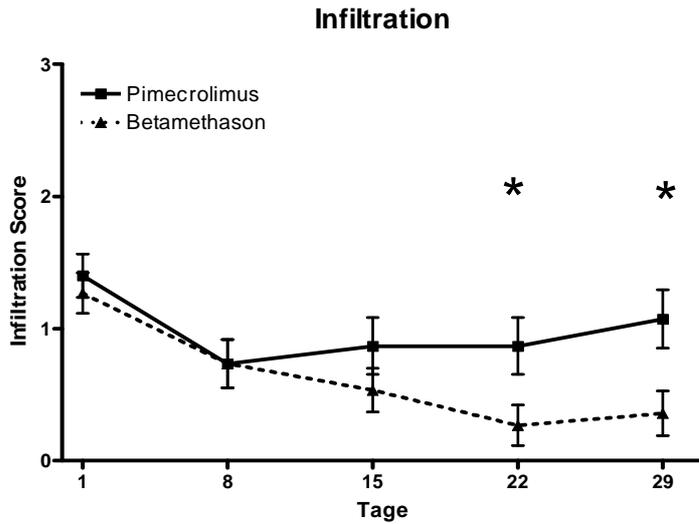
**Abb.5** Partial Eczema Area Severity Index (pEASI):

Während Betamethason über die gesamte Behandlungsperiode eine konstante Verbesserung zeigte, war bei Pimecrolimus ab Tag 8 wieder ein leichter Anstieg des pEASI-Scores zu beobachten. Nach Betamethason-Therapie kam es zu einer stärkeren Verschlechterung, das Ausgangsniveau wurde jedoch unter beiden Medikationen nicht erreicht.

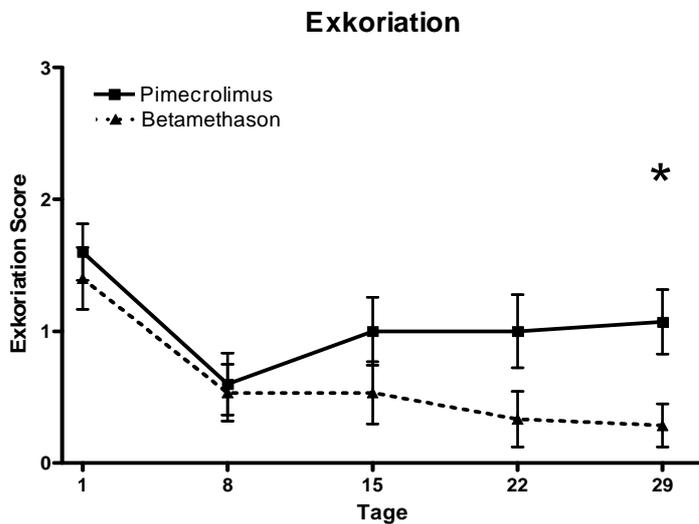


**Abb. 6** Erythem:

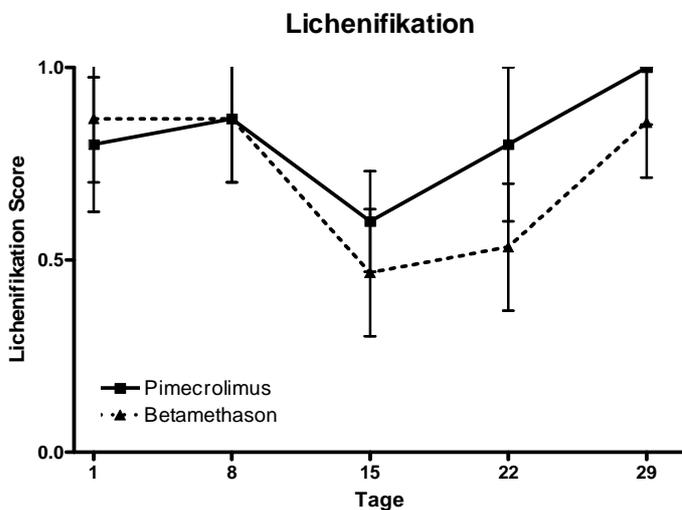
Das Erythem wurde durch beide Behandlungen verbessert, wobei sich Betamethason über den gesamten Zeitraum überlegen zeigte. In der follow-up-Phase zeigte sich eine Verschlechterung, die bei Betamethason ausgeprägter ausfiel. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Medikationen zeigten sich an Tag 8 ( $p=0,027$ ) und Tag 22 ( $p=0,0017$ ).

**Abb.7** Infiltration:

Die Infiltration wurde in der Behandlungsphase ebenfalls vermindert und zeigte in der follow-up-Phase einen nur dezenten Anstieg, Betamethason erreichte über den gesamten Zeitraum eine bessere Wirksamkeit. Signifikante Unterschiede zeigten sich an Tag 22 ( $p=0,031$ ) und Tag 29 ( $p=0,016$ ).

**Abb.8** Exkoration:

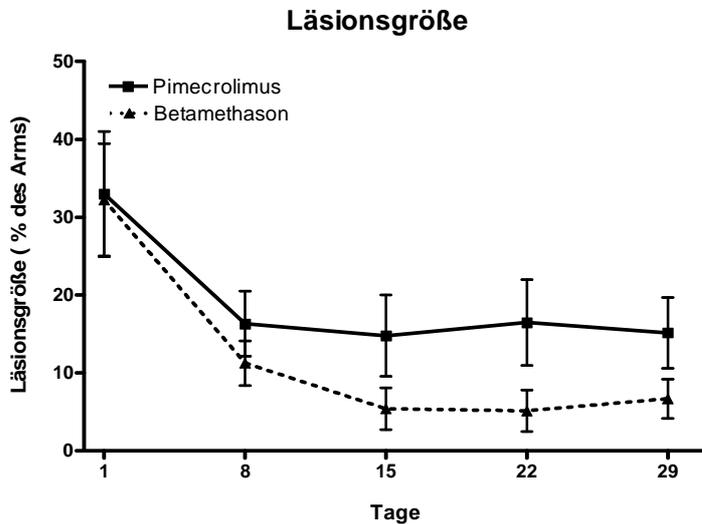
Die Exkorationen konnten durch beide Medikationen während der Behandlungsphase reduziert werden. Betamethason zeigte sich insbesondere ab Tag 8 im gesamten Zeitraum überlegen. In der follow-up-Phase konnte keine wesentliche Veränderung mehr festgestellt werden, jedoch zeigte sich an Tag 29 ein signifikanter Unterschied der beiden Pharmaka ( $p=0,013$ ).

**Abb.9** Lichenifikation:

Erst in der zweiten Behandlungswoche ließ sich eine deutliche Reduktion der Lichenifikation beobachten, wobei der Effekt bei Betamethason ausgeprägter war. Ab Tag 15 zeigten beide Medikationen jedoch eine Verschlechterung, unter Pimecrolimus-Therapie lag die Lichenifikation sogar leicht über dem Ausgangsniveau. Signifikante Unterschiede ergaben sich zu keinem Zeitpunkt.

### 3.1.2 Größe der behandelten Läsionen

Abb.10 zeigt, dass die Größe der läsionalen Areale deutlich reduziert wurde, sie sank in der ersten Behandlungswoche um ca. zwei Drittel bei Betamethason und um ca. die Hälfte bei Pimecrolimus.

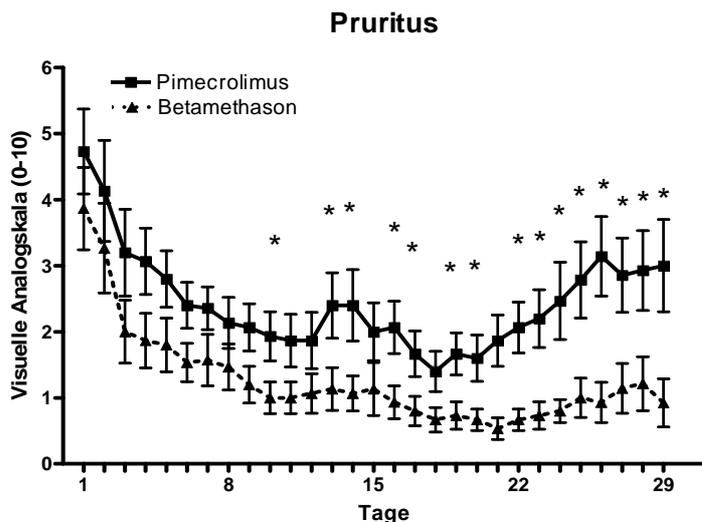


**Abb.10** Größe der behandelten Läsionen:

Nach Tag 8 konnte sie durch Betamethason noch weiter deutlich verringert werden und blieb dann in beiden Gruppen bis zum Ende der follow-up-Phase weitgehend konstant. Insgesamt zeigte sich Betamethason Pimecrolimus überlegen, Signifikanzen bestanden jedoch nicht.

### 3.1.3 Pruritus

Der Pruritus verbesserte sich bei beiden Medikationen deutlich bis zum Tag 11, erst in der follow-up-Phase fand eine konstante Verstärkung statt, insbesondere bei Pimecrolimus. Betamethason erwies sich insgesamt als effektiver, siehe Abb.11.



**Abb.11** Pruritus:

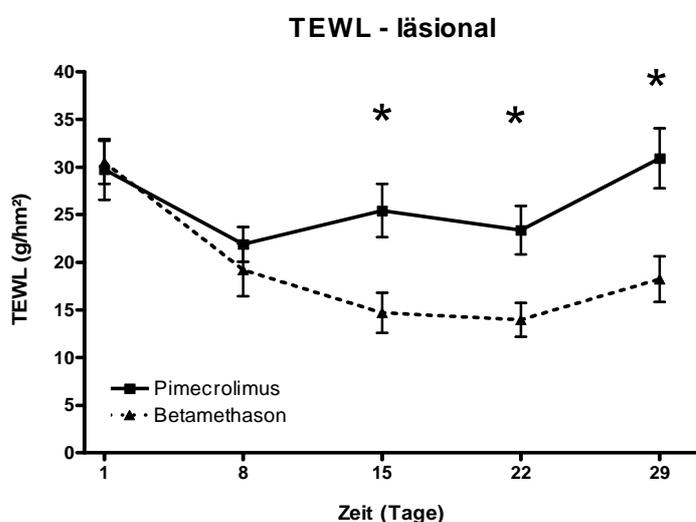
Signifikante Unterschiede bestanden an Tag 10 ( $p=0,043$ ), Tag 13 ( $p=0,04$ ), Tag 14 ( $p=0,035$ ), Tag 16 ( $p=0,02$ ), Tag 17 ( $p=0,044$ ) und Tag 19-29 ( $p$ -Werte zwischen 0,0029 und 0,027).

Die klinische Untersuchung des atopischen Ekzems (AE) erwies, dass Betamethason eine stärkere Verbesserung klinischer Symptome bewirkt als Pimecrolimus.

### 3.2 Biophysikalische Messungen

Die biophysikalischen Messungen läSIONaler und nicht-läSIONaler atopischer Haut zeigten in beiden Behandlungsgruppen eine Reduktion des läSIONalen Transepidermalen Wasserverlust (TEWL) sowie eine Erhöhung der läSIONalen Hydratation, siehe Abb.12-15. Die biophysikalischen Parameter nicht-läSIONaler Hautareale zeigten sich weitgehend stabil.

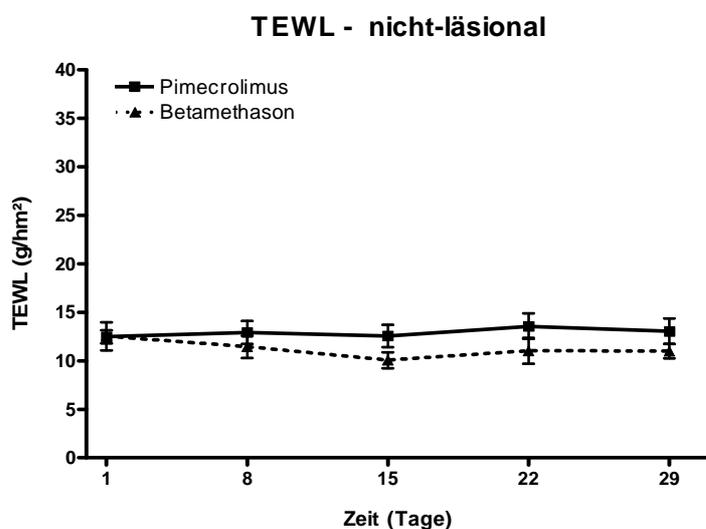
#### 3.2.1 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)



**Abb.12** Transepidermaler

Wasserverlust (TEWL) - läSIONal: Beide Medikationen reduzierten den läSIONalen TEWL bis Tag 8, Betamethason zeigte daraufhin noch eine leichte Verbesserung, Pimecrolimus erhöhte den TEWL wieder. In der follow-up-Phase war in beiden Gruppen ein TEWL-Anstieg zu beobachten, der unter Pimecrolimus wieder das Ausgangsniveau erreichte.

Signifikante Unterschiede zeigten sich an Tag 15 ( $p=0,0049$ ), Tag 22 ( $p=0,0053$ ) und Tag 29 ( $p=0,0035$ ).



**Abb.13** Transepidermaler

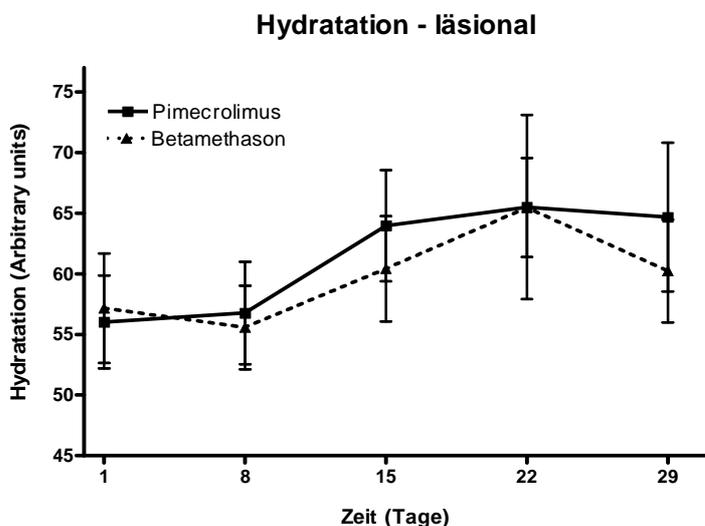
Wasserverlust (TEWL)

- nicht-läSIONal:

Der nicht läSIONale TEWL blieb bei nur leichter Überlegenheit des Betamethason über die gesamte Zeit weitgehend konstant, Signifikanzen waren hier nicht zu beobachten.

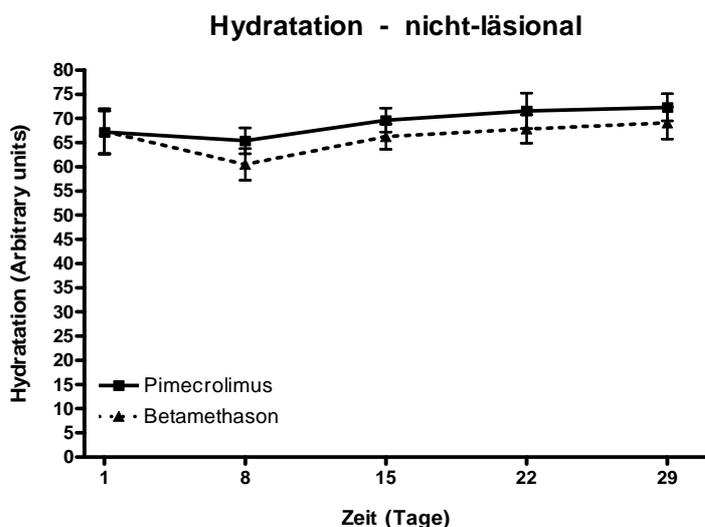
### 3.2.2 Hydratation

Die Hydratation läSIONaler Hautareale wurde durch beide Behandlungen gesteigert.



**Abb.14** Hydratation - läSIONal:

Sie stieg in Behandlungswoche 2 und 3 an, bei leichter Überlegenheit von Pimecrolimus. In der follow-up-Phase zeigte Betamethason wieder sinkende Hydratationswerte, Pimecrolimus hingegen blieb auf nahezu konstantem Niveau. Signifikante Unterschiede wurden nicht beobachtet.



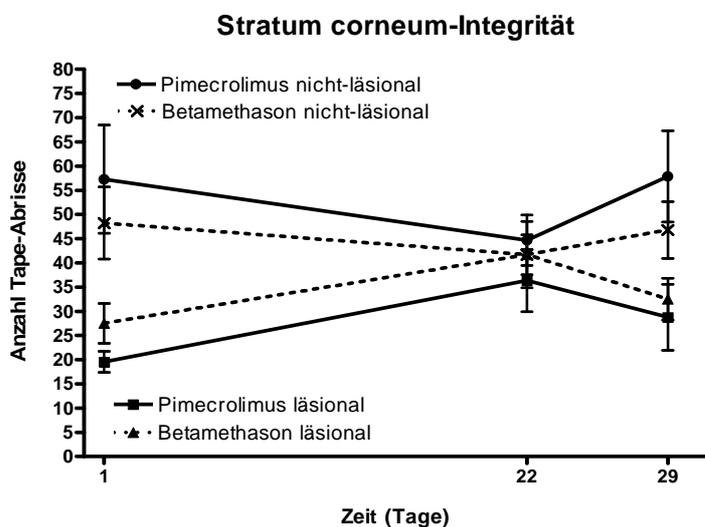
**Abb.15** Hydratation - nicht-lésional:

Sie zeigte im Verlauf nur minimale Unterschiede, Pimecrolimus war dem Betamethason hier leicht überlegen. Signifikante Unterschiede wurden nicht beobachtet.

Die biophysikalischen Messungen zeigten, dass Betamethason bei der Reduktion des läSIONalen TEWL gegenüber Pimecrolimus signifikant überlegen war, Pimecrolimus erzielte jedoch eine stärkere Verbesserung der Hydratation. Beobachtet man den Verlauf der follow-up-Phase, so zeigt sich, dass Pimecrolimus hinsichtlich des Partial Eczema Area Severity Index (pEASI) und der läSIONalen Hydratation einen längerfristigen Wirkeffekt aufwies, Betamethason hingegen zeigte eine langsamere Verschlechterung des Pruritus und des läSIONalen TEWL.

### 3.3 Tapestripping und Stratum corneum-Integrität

Die Integrität des Stratum corneum (SC), gemessen an Anzahl der Tape-Abrisse bis zur Barrierestörung, zeigte eine Verbesserung läSIONALER Areale während der Behandlung, siehe Abb.16.



**Abb.16** Stratum corneum-Integrität:

Mit Betamethason behandelte Hautareale tolerierten ca. 14 Tapes mehr bis zur Barrierestörung als zu Beginn, mit Pimecrolimus behandelte Areale ca. 17 Tapes. In der follow-up-Phase zeigte sich wieder eine Verschlechterung, insgesamt bot die Integrität läSIONALER Areale jedoch eine leichte Verbesserung.

Die Veränderungen der nicht-läsionalen Areale zeigten sich reziprok. Signifikante Unterschiede zwischen Betamethason und Pimecrolimus bestanden zu keinem Zeitpunkt.

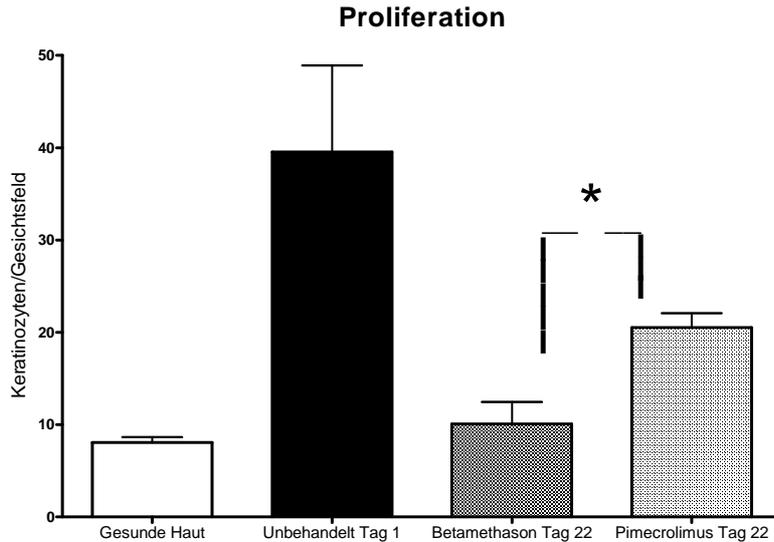
Die Untersuchung zur Integrität des SC zeigte, dass die Barriere läSIONALER Haut unter Therapie mit Pimecrolimus und Betamethason gestärkt wurde, wohingegen sich an nicht-läsionaler Haut unter der Medikation eine zunehmende Barrierestörung manifestierte.

### 3.4 Immunhistochemie

Zur Darstellung der epidermalen Proliferation und Differenzierung wurden die Hauptbiopsien von 5 Patienten immunhistochemisch gefärbt.

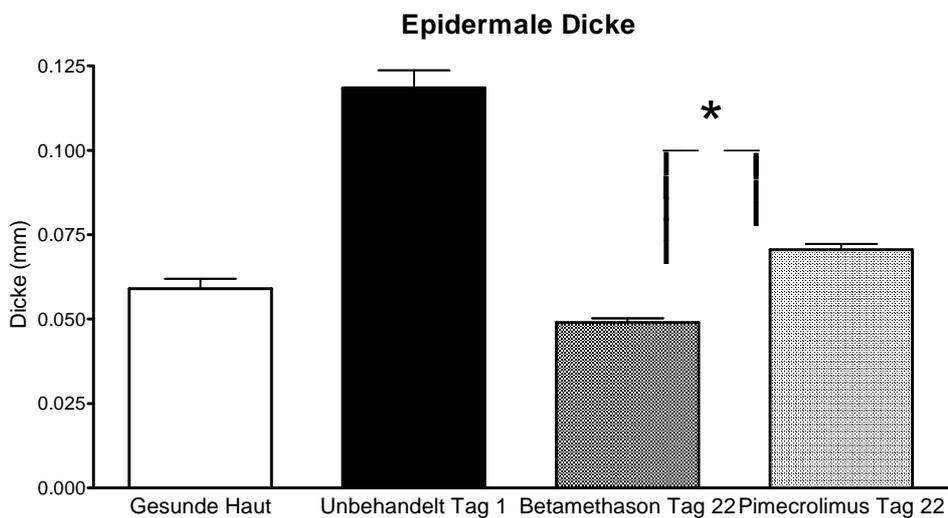
#### 3.4.1 Epidermale Proliferation

Beide Medikationen zeigten eine reduzierte epidermale Proliferation nach der Behandlungsphase, siehe Abb. 17. Betamethason erzielte eine Reduktion um 75% und wies damit einen signifikanten Unterschied ( $p=0,0061$ ) zu Pimecrolimus auf, welches eine Reduktion um 48% erreichte.



**Abb.17** Proliferation unter Therapie mit Betamethason und Pimecrolimus

Hierdurch reduzierte sich die Dicke der Epidermis entsprechend, siehe Abb.18, und unterschritt nach Behandlung mit Betamethason die Werte gesunder Haut. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) gegenüber Pimecrolimus, welches die epidermale Dicke ebenfalls deutlich verringerte.

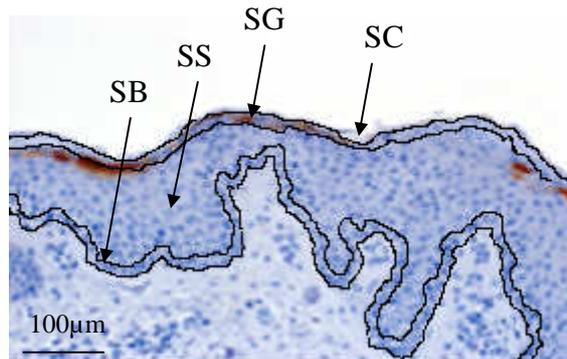


**Abb.18** Dicke der Epidermis unter Therapie mit Betamethason und Pimecrolimus

### 3.4.2 Epidermale Differenzierung

Der gestörte epidermale Differenzierungsprozess beim AE trägt wesentlich zur verminderten Barrierefunktion bei. Beide Medikationen führten nach der 3-wöchigen

Behandlungsphase zu einer zunehmenden Normalisierung der Expression der Differenzierungsproteine auf Proteinebene. Die Beurteilung der histologischen Schnitte erfolgte nach deskriptiven Kriterien, die Unterschiede wurden nicht quantitativ erfasst. Abb.19 zeigt schematisch die Darstellung der epidermalen Schichten in den vorliegenden Schnitten.



**Abb.19** Epidermale Schichten: Stratum corneum (SC), Stratum granulosum (SG), Stratum spinosum (SS), Stratum basale (SB)

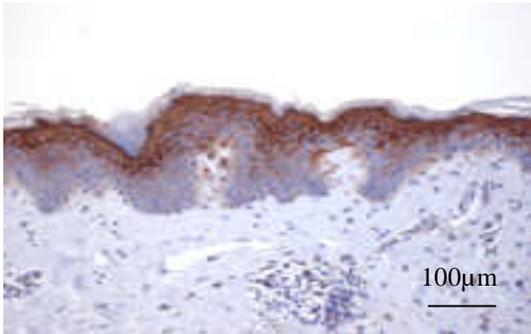
## Involucrin



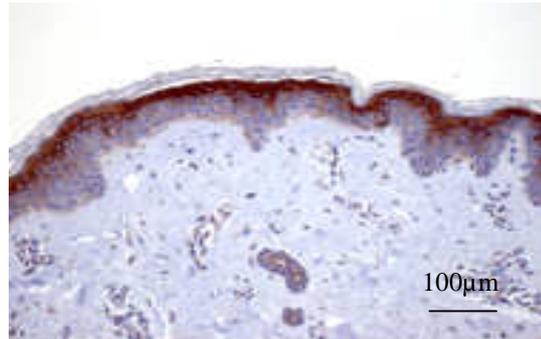
Abb.20 zeigt, dass die Expression von Involucrin in unbehandelter Haut bis in das (untere) Stratum spinosum, stellenweise bis in das Stratum basale reichte.

**Abb.20** Involucrin-Expression Unbehandelt Tag 1

Nach der Behandlung zeigte sich eine Normalisierung der Involucrin-Verteilung, siehe Abb.21 und Abb.22. Die Expression reduzierte sich auf das Stratum granulosum und das obere Stratum spinosum, was einem Normalbefund entspricht. Der Effekt war unter Betamethason etwas stärker zu beobachten, wozu jedoch auch die stärker reduzierte epidermale Dicke beitrug.

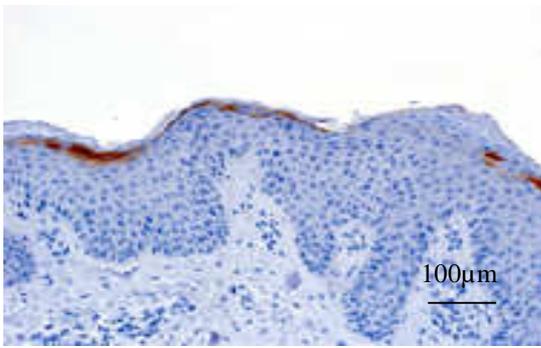


**Abb.21** Involucrin-Expression unter Pimecrolimus Tag 22



**Abb.22** Involucrin-Expression unter Betamethason Tag 22

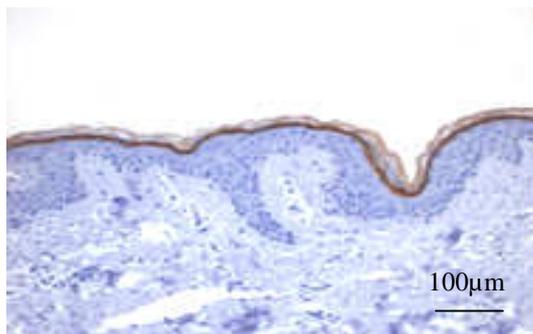
### Loricrin



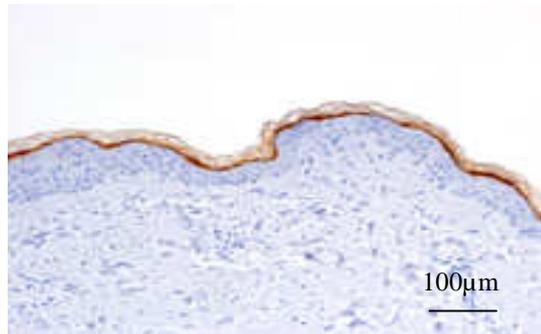
**Abb.23** Loricrin-Expression Unbehandelt Tag 1

Abb.23 zeigt, dass Loricrin in unbehauelter Haut vermehrt im unteren Stratum spinosum und Stratum basale exprimiert wurde.

Nach der Behandlung wies die Loricrin-Expression eine homogenere Verteilung auf, die dann auch zunehmend im Stratum granulosum ausgeprägt war, siehe Abb.24 und Abb.25.

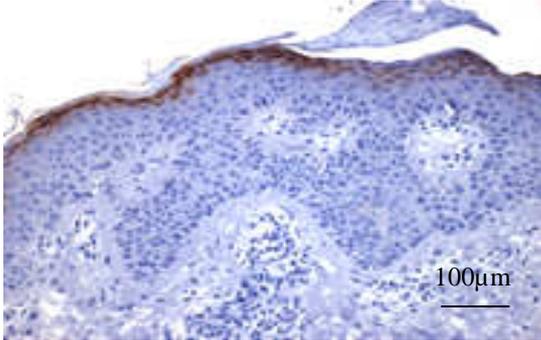


**Abb.24** Loricrin-Expression unter Pimecrolimus Tag 22



**Abb.25** Loricrin-Expression unter Betamethason Tag 22

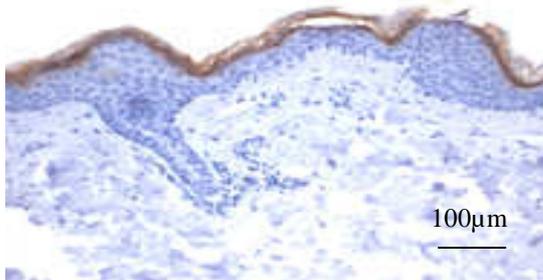
## Filaggrin



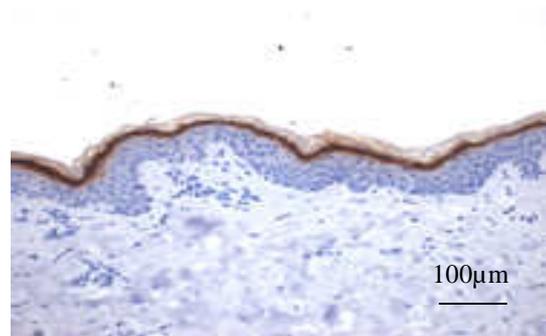
**Abb.26** Filaggrin-Expression Unbehandelt Tag 1

Abb.26 zeigt die Verteilung von Filaggrin in unbehandelter Haut, die sich vermehrt im Stratum spinosum feststellen ließ, im Stratum granulosum erschien die Färbung ausgedünnt.

Nach der Behandlung, siehe Abb.27 und Abb.28, zeigte die Filaggrin-Expression eine homogenere Verteilung, im Stratum granulosum war ein durchgehendes Färbeband erkennbar.

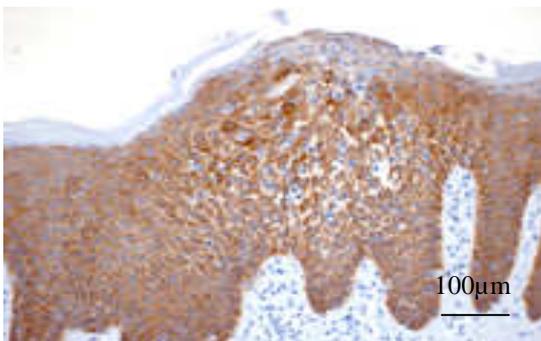


**Abb.27** Filaggrin-Expression unter Betamethason Tag 22



**Abb.28** Filaggrin-Expression unter Pimecrolimus Tag 22

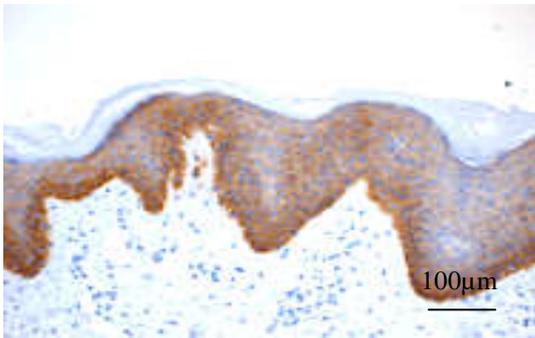
## Zytokeratin K 5



**Abb.29** Keratin 5-Expression Unbehandelt Tag 1

Abb.29 zeigt, dass die Expression des basalen Keratin 5 in unbehandelter Haut nicht nur basal, sondern auch im Stratum spinosum und Stratum granulosum stattfand.

Nach der Behandlung zeigte sich eine normalisierte Verteilung vorwiegend im Stratum basale und unteren Stratum spinosum, siehe Abb.30 und Abb.31.

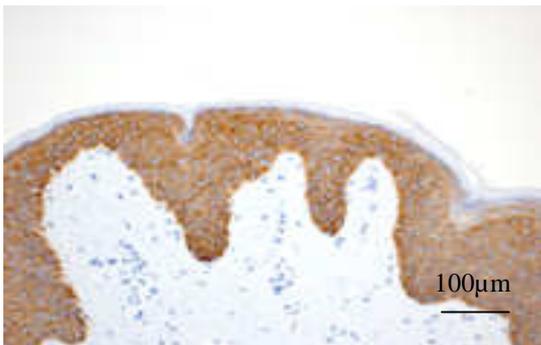


**Abb.30** Keratin 5-Expression unter Pimecrolimus Tag 22



**Abb.31** Keratin 5-Expression unter Betamethason Tag 22

### Zytokeratin K 14



**Abb.32** Keratin 14-Expression Unbehandelt Tag 1

In Abb.32 zeigt die breite Färbung, dass das basale Keratin 14 in unbehauelter Haut von der Basalzellschicht bis in das Stratum granulosum exprimiert wurde.

Nach der Behandlung wurde, ebenso wie bei Keratin 5, eine Normalisierung der Keratin 14-Expression mit einer basalbetonten Verteilung erreicht, siehe Abb.33 und Abb.34.

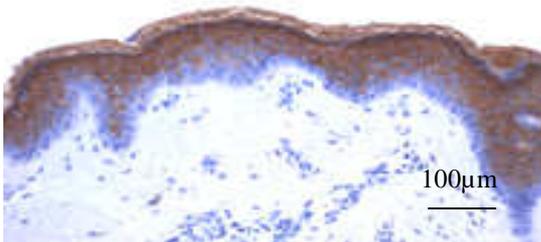


**Abb.33** Keratin 14-Expression unter Pimecrolimus Tag 22



**Abb.34** Keratin 14-Expression unter Betamethason Tag 22

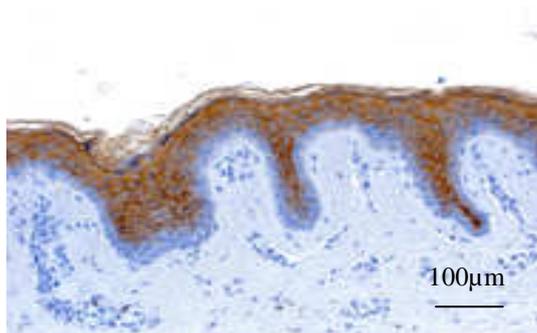
## Zytokeratin K 10



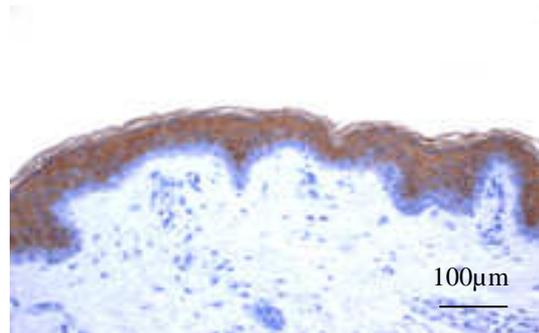
**Abb.35** Keratin 10-Expression Unbehandelt Tag 1

Abb.35 zeigt, dass in unbehandelter Haut das suprabasale Keratin 10 vorwiegend im Stratum granulosum sowie dem oberen und mittleren Stratum spinosum exprimiert wurde.

Nach der Behandlung, siehe Abb. 36 und Abb.37 war eine Verlagerung der Keratin 10-Expression auf das suprabasale Niveau erkennbar (unteres Stratum spinosum), wobei auch im Stratum granulosum noch eine Färbung zu beobachten war. Der Effekt war unter Betamethason etwas ausgeprägter.

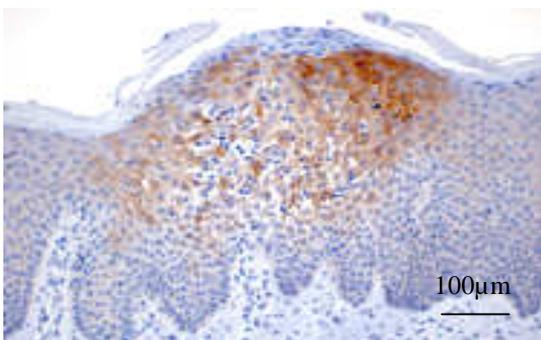


**Abb.36** Keratin 10-Expression unter Pimecrolimus Tag 22



**Abb.37** Keratin 10-Expression unter Betamethason Tag 22

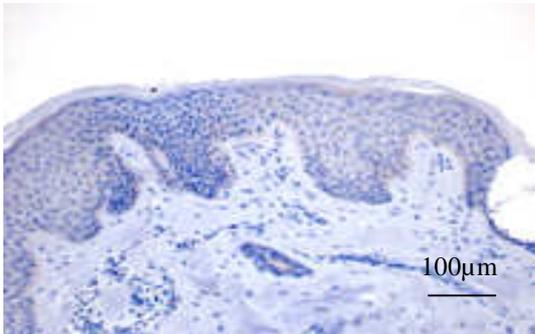
## Zytokeratin K 16



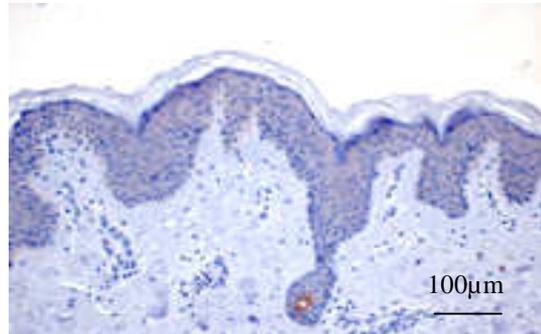
**Abb.38** Keratin 16-Expression Unbehandelt Tag 1

Abb.38 zeigt die fokale Expression des mit Hyperproliferation assoziierten Keratin 16 im Stratum granulosum und Stratum spinosum in unbehandelter Haut.

Nach der Behandlung kam es zu einer fast kompletten Reduktion von Keratin 16, siehe Abb.39 und Abb.40.



**Abb.39** Keratin 16-Expression unter Pimecrolimus Tag 22



**Abb.40** Keratin 16-Expression unter Betamethason Tag 22

Zusammenfassend konnte die deskriptive Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen (außer Ki-67) keine klaren Unterschiede zwischen Betamethason und Pimecrolimus aufzeigen. Eine quantitative Analyse der Schnitte erschien aufgrund der stark reduzierten epidermalen Dicke nach Betamethason-Therapie sowie der kleinen Anzahl des untersuchten Patientenkollektivs (n=5) nicht sinnvoll.

### **3.5 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)**

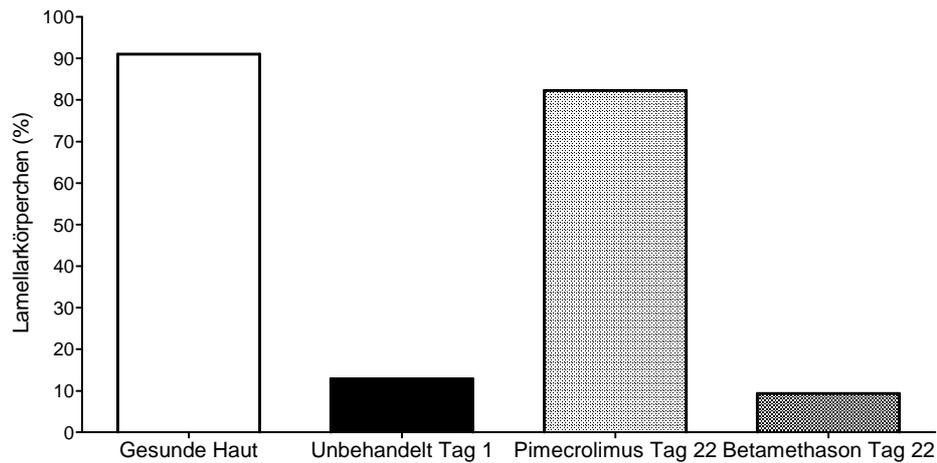
Mikroskopische Ultrastrukturanalysen atopischer läsionaler Epidermis zeigen eine gestörte Lipidprozessierung, die auf eine Barrierestörung hinweist.

Nach der Behandlung mit Pimecrolimus ließen sich im Vergleich zu Betamethason regelrechte Lipidstrukturen mit einem höheren Anteil „physiologischer“ Lamellarkörperchen feststellen.

#### **3.5.1 Physiologische und pathologische Lamellarkörperchen**

Für die Auswertung wurden je nach Schnitt 200-250 Lamellarkörperchen ausgezählt. Abb.41 zeigt, dass in einem gesunden Hautkollektiv der Anteil „physiologischer“, vollständig gefüllter Lamellarkörperchen bei 91% lag. Dieser Anteil lag bei den Hautläsionen vor der Behandlung bei 13%, nach Pimecrolimus-Behandlung konnten 82% „physiologische“ Lamellarkörperchen beobachtet werden, nach Betamethason-Behandlung waren es 9%.

### Physiologische Lamellarkörperchen



**Abb.41** Physiologische Lamellarkörperchen unter der Therapie mit Betamethason und Pimecrolimus

In gesunder Haut wird ein Anteil von ca. 9% „pathologischer“, akkumulierter (im Zytoplasma angehäufter, unsezernerter) Lamellarkörperchen beobachtet, siehe Abb.42. Dieser Anteil lag nach Pimecrolimus-Behandlung bei 20%, nach Betamethason-Behandlung bei 43%.

### Akkumulierte Lamellarkörperchen

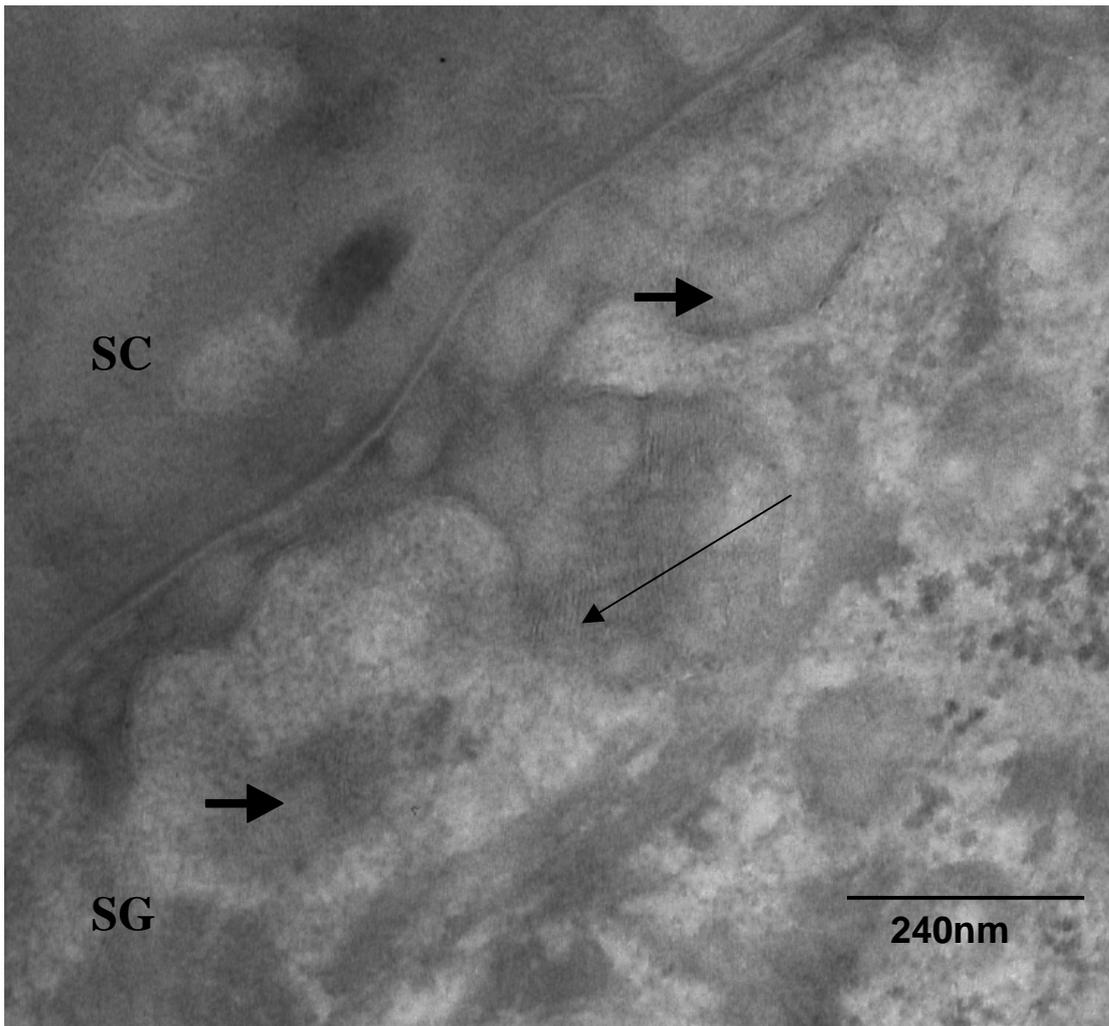


**Abb.42** Pathologische Lamellarkörperchen unter der Therapie mit Betamethason und Pimecrolimus

### 3.5.2 Lipidstrukturen

Abb.43 zeigt ein Transmissions-Elektronenmikroskopie-Bild (TEM) der unbehandelten Haut an Tag 1. Die Lamellarkörperchen wiesen vorwiegend einen morphologisch dichten, fusionierten Inhalt auf, wohingegen die physiologische lamelläre Anordnung nur teilweise zu beobachten war.

#### Morphologie (Transmissions-Elektronenmikroskopie) der Lamellarkörperchen vor der Behandlung

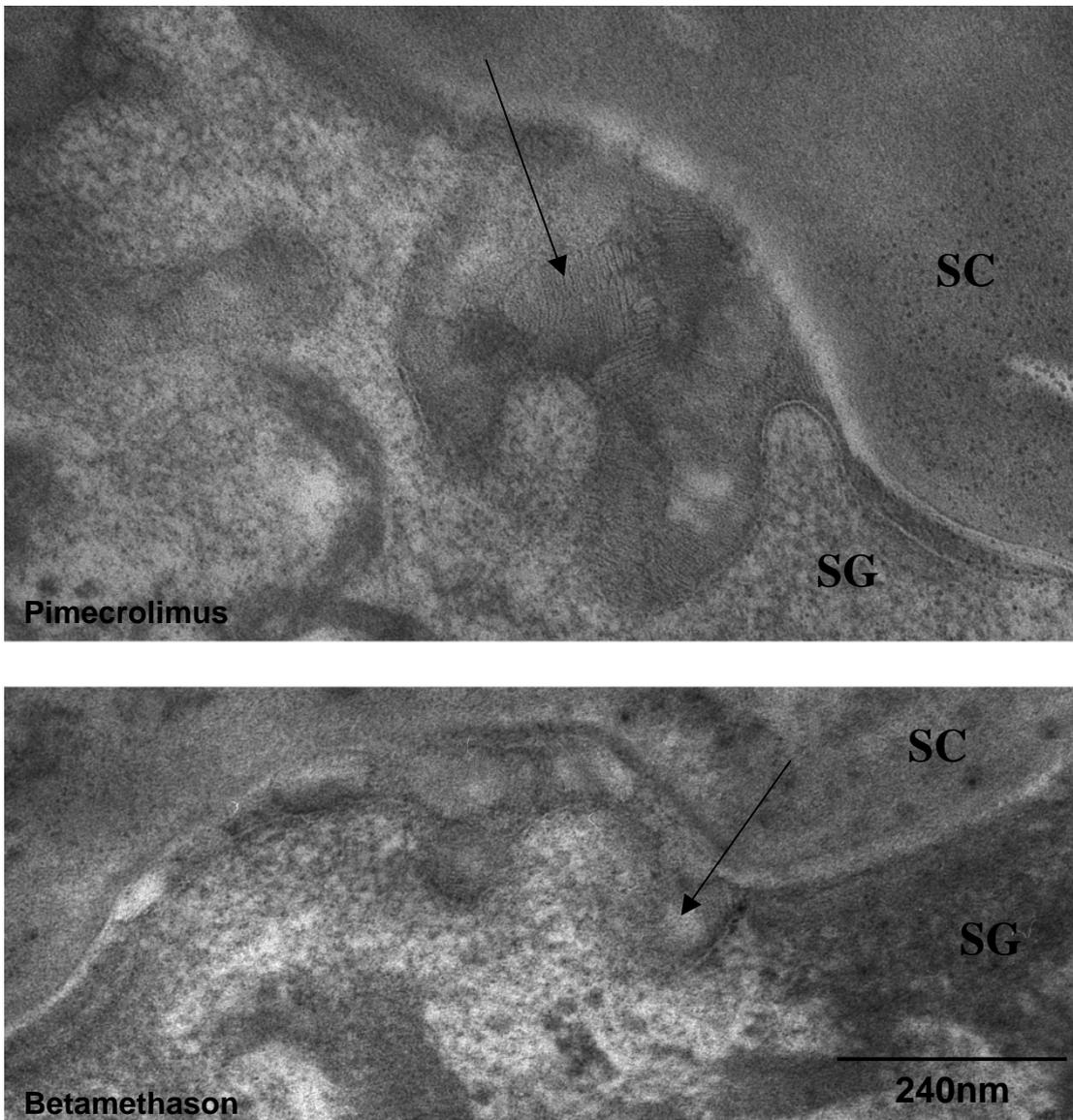


**Abb.43** Lamellarkörperchen in unbehandelter atopischer Haut an der Transitionszone zwischen Stratum granulosum (SG) und Stratum corneum (SC). Zumeist ist ein fusionierter, verklumpter Inhalt der Lamellarkörperchen erkennbar (dicke Pfeile). Eine geordnete, lamelläre Anordnung der Lipidsubstanz (dünner Pfeil) zeigt sich selten.

Nach der Behandlung mit Pimecrolimus konnte eine Normalisierung der Lipidstrukturen beobachtet werden. Abb.44 zeigt Lamellarkörperchen, welche nach Betamethason-Behandlung vorwiegend unstrukturierten, akkumulierten Inhalt enthielten und nach Pimecrolimus-Behandlung reguläre, dichtgepackte Lipidlamellen aufwiesen. Pimecrolimus zeigte häufigere Fusionen der Lamellarkörperchen mit der

Zellmembran in der Transitionszone, wohingegen unter Betamethason häufiger intrazelluläre Fusionen vor dem eigentlichen Exozytoseprozess beobachtet wurden.

### Morphologie (Transmissions-Elektronenmikroskopie) der Lamellarkörperchen unter Therapie mit Betamethason und Pimecrolimus

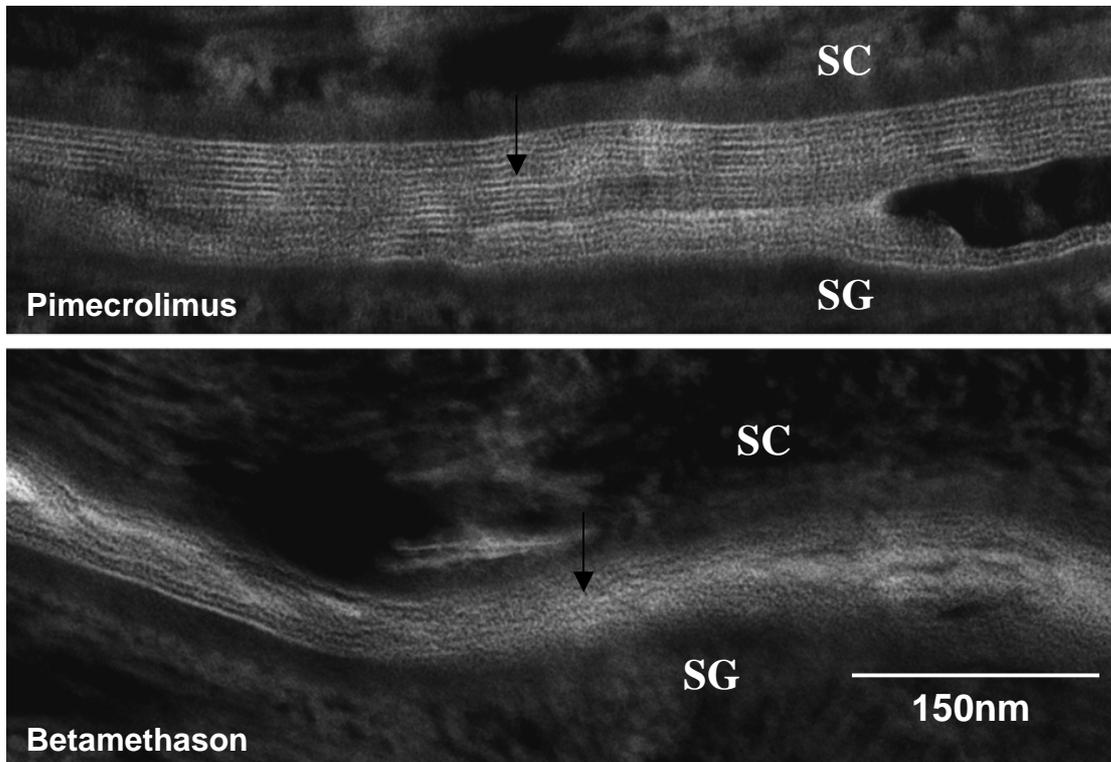


**Abb.44** Lamellarkörperchen-Exozytose an der Transitionszone zwischen Stratum granulosum (SG) und Stratum corneum (SC): Die Morphologie der Lamellarkörperchen zeigt nach der Behandlung mit Pimecrolimus (oben) vollständig gefüllte Lamellarkörperchen, die Lamellen sind regelrecht angeordnet. Nach Behandlung mit Betamethason (unten) zeigen sich die Lamellarkörperchen mit verklumptem Inhalt, der Exozytoseprozess scheint gestört.

Abb.45 zeigt, dass die interzellulären Lipiddoppelschichten nach Pimecrolimus-Behandlung eine reguläre mehrschichtige Anordnung an der Grenzzone des Stratum granulosum/Stratum corneum aufwiesen, ähnlich wie bei gesunder Haut. Nach Betamethason-Behandlung wurden nur rudimentär reguläre Lipiddoppelschichten festgestellt, vorwiegend waren die Schichten nicht klar voneinander abgrenzbar und

zeigten eine irreguläre, unterbrochene Anordnung. Weiterhin wiesen die Corneozyten des SC vermehrt intrazelluläre Lamellareinlagerungen (nicht dargestellt) nach Behandlung mit Betamethason auf.

### Morphologie (Transmissions-Elektronenmikroskopie) der interzellulären Lipiddoppelschichten unter Therapie mit Betamethason und Pimecrolimus



**Abb.45** Die interzellulären Lipidlamellen (Pfeile) an der Grenze zwischen Stratum granulosum (SG) und Stratum corneum (SC) nach Behandlung mit Pimecrolimus (oben) und Betamethason (unten). Nach Behandlung mit Pimecrolimus weisen die Lipiddoppelschichten eine reguläre Anordnung mit voneinander abgrenzbaren Lipidlamellen auf, nach Betamethason-Behandlung zeigen die Lipiddoppelschichten keine klare Abgrenzung und eine irreguläre Strukturierung.

Die ultrastrukturelle Analyse läsionaler atopischer Epidermis zeigte, dass Pimecrolimus die physiologischen Lipidstrukturen wiederherstellt und somit die Barrierefunktion stärkt. Unter Betamethason-Behandlung konnte keine Verbesserung der gestörten Lipidstrukturen beobachtet werden; jedoch wurden aufgrund des aufwändigen Verfahrens nur 3 Patienten untersucht und somit können keine statistisch signifikanten Schlüsse gezogen werden.

## **IV. Diskussion**

Die Wiederherstellung der gestörten Permeabilitätsbarriere stellt einen wesentlichen Faktor in der Therapie des atopischen Ekzems (AE) dar. Kortikosteroide und Calcineurininhibitoren sind weitverbreitete Therapeutika, die durch ihre klinische Wirksamkeit überzeugen, ihre Wirkung auf die epidermale Barriere war jedoch bislang nicht detailliert geklärt. Um diese Wirkung weiter zu klären, untersuchten wir die Reparatur der epidermalen Barriere durch Betamethason und Pimecrolimus anhand klinischer, biophysikalischer, histologischer und ultrastruktureller Parameter. Unsere Ergebnisse zeigten, dass beide Medikationen nach 3-wöchiger Anwendung neben der klinischen Verbesserung eine Stärkung der Barrierefunktion bewirkten, die sich anhand verbesserter biophysikalischer Parameter und einer normalisierten Differenzierung erfassen ließ. Die ultrastrukturelle Untersuchung ließ jedoch einen anhaltenden Barrieredefekt nach Betamethason-Therapie erkennen während es unter Pimecrolimus-Therapie zu einer weitgehenden Barriere-reparatur kam. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen näher beleuchtet.

### **4.1 Klinische Beurteilung und Stratum corneum-Integrität**

Nach der 3-wöchigen Behandlungsphase konnte eine deutliche Verbesserung des klinischen Bildes beobachtet werden, der Schweregrad (Partial Eczema Area Severity Index) wurde nach der ersten Behandlungswoche bereits halbiert. Betamethason zeigte sich hier als Klasse-III-Kortikosteroid erwartungsgemäß wirksamer, wie bereits in vielfachen Effizienzstudien (Ashcroft et al. 2005) bewiesen.

Die Potenz der topischen Kortikosteroide ergibt sich anhand ihrer Fähigkeit zur Vasokonstriktion, diese wird durch Messungen der Wärme und der Blutflussgeschwindigkeit abgeschätzt. Die Vasokonstriktion hat einen entscheidenden Einfluss auf die biophysikalischen Parameter, insbesondere auf den Transepidermalen Wasserverlust (TEWL). Die vasokonstriktive Komponente trägt zur besseren klinischen Wirksamkeit der Kortikosteroide bei, insbesondere lässt sich die rasche Verbesserung des Erythems nach Behandlungsbeginn sowie die rapide Verschlechterung nach Behandlungsende unter Betamethason-Therapie nicht nur durch die antiinflammatorische Wirkung des Kortikosteroids, sondern auch durch die Vasokonstriktion erklären.

Die topische Anwendung von Pimecrolimus bewirkt im Gegensatz zu Kortikosteroiden eine selektive antiinflammatorische Wirkung, dies wird über die selektive Modulation von T-Zellen und Mastzellen erzielt (Grassberger et al. 1999).

Topische Kortikosteroide bewirken ihren lokalen immunsupprimierenden Effekt u.a. über eine Schädigung epidermaler Langerhanszellen, die in ihrer Rolle als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) für die Immunantwort auf eindringende Antigene verantwortlich sind. Weiterhin findet eine Beeinflussung epidermaler T-Zellen, Basophiler und Mastzellen statt (Hoetzenecker et al. 2004).

In entzündeter Haut mit gestörter epidermaler Barriere ist die Absorption beider Pharmaka erhöht, die Absorption der topischen Kortikosteroide ist im Vergleich zu gesunder Haut 2-10 fach erhöht (Hengge et al. 2006). Die perkutane Permeation von Pimecrolimus zeigte sich bei in-vitro-Versuchen an gesunder Haut 70-110 fach niedriger als die der Kortikosteroide, dies könnte auf der vielfach höheren Lipophilie und des höheren Molekulargewichts von Pimecrolimus beruhen (Billich et al. 2004). Eine höhere perkutane Absorption sowie der breitere immunsupprimierende Effekt des Betamethason im Vergleich zu Pimecrolimus könnten die stärkere antiinflammatorische Wirkung von Betamethason erklären. So zeigte sich die potentere Wirkung nicht nur am Partial Eczema Area Severity Index (pEASI) insgesamt, sondern auch an jedem der Einzelparameter – Erythem, Infiltration, Exkoration und Lichenifikation – sowie an dem Pruritus.

Die Integrität des Stratum corneum (SC) wurde durch Induktion einer Barrierestörung mittels Tapestripping untersucht und erwies, dass die Integrität läsionaler Haut durch beide Pharmaka gleichermaßen verbessert wurde. Die Anwendung der Medikation auf nicht-läsionaler Haut zeigte nach 3-wöchiger Behandlung jedoch einen gegenteiligen Effekt im Sinne einer Barrierestörung, die sich nach Beendigung der Behandlung und 1-wöchiger Anwendung der Pflegesubstanz bereits wieder ausglich. Diese Beobachtung ist rein deskriptiv und stützt sich auf keine statistische Signifikanz. Da die biophysikalischen Parameter TEWL und Hydratation der nicht-läsionalen Haut jedoch durch die Medikation weitgehend unbeeinflusst blieben, erscheint ein schädigender Effekt der Wirkstoffe auf nicht-läsionale Haut unwahrscheinlich.

Die Methode des Tapestripping ist eine einfache, nicht-invasive Technik zur Induktion einer Barrierestörung und wird seit langem angewendet (Jenkins und Tresise 1969,

Kalia et al. 1996, Chamlin et al. 2002). Der TEWL-Wert, der benötigt wird, um die Barrierestörung zu erreichen und das SC zu entfernen, wird dabei unterschiedlich definiert, wesentlich für die Bestimmung der Integrität ist jedoch die Konstanz der Messverfahren.

#### **4.2 Der epidermale Wasserhaushalt und biophysikalische Messungen**

Der gestörte Wasserhaushalt ist ein offensichtliches Merkmal des AE, das sich sowohl in läsionaler als auch in nicht-läsionaler Haut als trockene und schuppene Haut widerspiegelt. Die Störung beruht auf erhöhtem Transepidermalen Wasserverlust (TEWL) und verminderter Hydratation.

Die biophysikalischen Messungen zeigten nach der Behandlungsphase einen verbesserten Wasserhaushalt an, die läsionalen Areale wiesen einen niedrigeren TEWL und erhöhte Hydratation auf. Nicht-läsionale Areale blieben hingegen weitgehend unbeeinflusst. Betamethason verbesserte den TEWL deutlich stärker als Pimecrolimus, was vermutlich auf die vasokonstriktive Wirkung des Kortikosteroids zurückzuführen ist. Pimecrolimus bewirkte eine bessere Hydratation als Betamethason, dieser Effekt lässt sich durch die normalisierte Anordnung der interzellulären Lipiddoppelschichten mit verbesserter Wasserbindung erklären.

Der TEWL ist einer der wesentlichen Messparameter bei der Untersuchung der Hautfunktion. Für seine Bestimmung eignet sich das Tewameter, das weltweit verbreitet ist und als verlässliches Instrument zur Einschätzung der Hautbarriere in vielen Studien beschrieben wurde (Fluhr et al. 2006). Der TEWL beschreibt theoretisch den passiven Wasserstrom durch das SC, praktisch enthält er aber auch den durch Schweißdrüsenaktivität bedingten Wasserverlust (Rogiers und EEMCO-Group 2001). Um letzteren so gering wie möglich zu halten sowie eine Beeinflussung des TEWL durch exogene Störfaktoren (wie z.B. Luftzirkulation, Raumtemperatur) zu vermeiden, werden bei der Messung konstante Bedingungen eingehalten. Mögliche Verfälschungen der Messergebnisse durch diese Störfaktoren wurden zum einen durch standardisierte Messungen minimiert, zum anderen handelt es sich nicht um absolute, sondern um relative Werte.

Bei der Barrierestörung korreliert der erhöhte TEWL mit verminderter Hydratation, was sich in einer deutlich vermehrten Permeabilität des SC bereits in nicht-läsionaler Haut äußert (Yoshiike et al. 1993). In einer Penetrationsstudie zeigte sich, dass zwischen der Dicke des SC von nicht-läsionaler und gesunder Haut kein Unterschied

bestand, wohl aber bei der Höhe des TEWL, der in nicht-läsionaler Haut erhöht war (Jakasa et al. 2006). Dies weist darauf hin, dass auch bei unbetreffener Haut der Patienten mit AE eine strukturelle Barrierestörung vorliegt und stützt die „outside-inside“-Hypothese, bei der die gestörte Barriere das pathogenetisch primäre Ereignis darstellt.

Zu der verminderten Hydratation trägt nicht nur die beeinträchtigte Lipidbarriere, sondern auch der reduzierte Wassergehalt innerhalb des Korneozyten bei. Die Wasserbindung innerhalb der Korneozyten wird durch den Natural moisturizing factor (NMF) gewährleistet. Er bildet sich beim Abbau von Filaggrin, wobei die entstehenden freien Aminosäuren und ihre Derivate (z.B. Urocansäure, Harnstoff, Pyrolidoncarboxylsäure, Laktatsäure) über ihre hygroskopische Wirkung zur Bindung atmosphärischen Wassers führen (Harding et al. 2000). Beim AE ist für die verminderte Hydratation der genetisch bedingte, reduzierte Filaggringehalt mit ursächlich, der sich sowohl in läsionaler als auch in nicht-läsionaler atopischer Haut zeigt (Seguchi et al. 1996).

Ein physiologischer Wasserhaushalt sorgt nicht nur für Barriereerhaltung und Flexibilität, sondern auch für die ungestörte Bildung von Differenzierungsproteinen und regelrechte Desquamationsprozesse (Nikolovski et al. 2008). Beim AE ist jedoch neben der verminderten Filaggrinsynthese auch die Bildung weiterer Differenzierungsproteine gestört.

#### **4.3 Die epidermale Proliferation, Differenzierung und Immunhistochemie**

Eine normale Differenzierung mündet in der Bildung des Cornified-Envelope (CE), der in Interaktion mit den interzellulären Lipidlamellen wesentlich für die Funktion der mechanischen Barriere sorgt. Eine akute oder chronische Barrierestörung, wie sie beim AE vorliegt, führt zu epidermaler Hyperproliferation und einer überstürzten, gestörten Differenzierung der Keratinozyten (Ekanayake-Mudiyanselage et al. 1998). Die immunhistochemische Untersuchung läsionaler Haut anhand des Proliferationsmarker Ki-67 zeigte einen antiproliferativen Effekt nach der 3-wöchigen Behandlung. Beide Medikationen boten eine deutliche Reduktion der epidermalen Proliferation und Dicke, wobei Betamethason mit einer Reduktion der Proliferation um 75% eine Atrophie bewirkte. Pimecrolimus zeigte keinen atrophogenen Effekt, dies entspricht den bereits beschriebenen Merkmalen der Calcineurininhibitoren (Queille-Roussel et al. 2001). Der antiproliferative Effekt der topischen

Kortikosteroide ist durch eine supprimierende Wirkung auf das Zellwachstum bedingt und führt nicht nur zu einer epidermalen und dermalen Atrophie, sondern auch zu verminderter Größe der Keratinozyten (Kolbe et al. 2001).

Neben dem antiproliferativen Effekt der Kortikosteroide kommt es auch zu einer Beeinflussung der epidermalen Differenzierung, so wurde eine Supprimierung der Differenzierungsproteine nach Langzeitanwendung beschrieben (Sheu et al. 1991), wobei es sich jedoch nicht um Patienten mit AE handelte. Die vorliegenden Ergebnisse können eine Schädigung der Differenzierung atopischer Haut nach Betamethason-Behandlung nicht bestätigen, allerdings erfolgte keine quantitative Bewertung.

Die immunhistochemischen Färbungen ließen nach der 3-wöchigen Behandlung eine Normalisierung der Differenzierung durch beide Medikationen erkennen; es resultierten eine physiologische und homogenere Verteilung der Differenzierungsproteine in den jeweiligen Schichten der Epidermis. Dabei wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen Betamethason und Pimecrolimus festgestellt. Die Schnitte wurden aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Patienten (n=5) jedoch nur semiquantitativ beurteilt. Somit sind keine statistisch messbaren Unterschiede aufzuzeigen.

In läSIONALER atopischer Haut findet sich immunhistologisch und quantitativ neben verfrühter Involucrin-Expression, die bereits im Stratum spinosum erkennbar ist, ein verminderter Gehalt an differenziertem Involucrin (Jensen et al. 2004). Dieses könnte eine Ursache für den reduzierten Gehalt an  $\omega$ -Hydroxy-Ceramiden sein, die kovalent an die Proteine des CE gebunden sind (Proksch et al. 2006). Unsere Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass Involucrin in unbehandelter atopischer Haut im Stratum spinosum, teilweise im Stratum basale exprimiert wurde, nach der Behandlung mit Betamethason und Pimecrolimus war eine regelrechte Expression im Stratum granulosum erkennbar.

Ein weiteres Strukturprotein des CE, Loricrin, zeigt sich in atopischer läSIONALER Haut unphysiologisch im gesamten Stratum granulosum sowie im oberen Stratum spinosum ausgeprägt (Proksch et al. 2006). Dieser Befund konnte bestätigt werden, so zeigte sich die Loricrin-Expression vor der Behandlung nicht nur im Stratum spinosum sondern auch deutlich im Stratum basale. Durch die Medikationen wurde eine homogenere Verteilung mit vermehrter Expression im Stratum granulosum

erzielt, eine Färbung im Stratum spinosum und Stratum basale blieb jedoch noch erkennbar.

Das Strukturprotein Filaggrin, das für die Wasserbindungskapazität des SC essentiell ist, zeigt in läSIONALER atopischer Haut eine verminderte Expression und ist vor allem im Stratum granulosum festzustellen, die Transitionszone zum SC wird nicht erreicht (Jensen et al. 2004). Unsere Ergebnisse zeigten die Filaggrin-Expression in unbehandelter Haut vor allem im Stratum spinosum, nach der Behandlung wurde Filaggrin homogener mit Einbezug des gesamten Stratum granulosum exprimiert.

Eine Abweichung von der normalen Zytokeratin-Expression trägt ebenfalls zur Strukturstörung der epidermalen Barriere beim AE bei. So wurde in läSIONALER Haut eine veränderte Verteilung der basalen Keratine Keratin 5 und Keratin 14 mit Expression in allen kernhaltigen Schichten der Epidermis nachgewiesen (Proksch et al. 2006). Dies bestätigte sich in unserer Untersuchung, nach der Behandlung konnte ein deutlich basalbetontes Färbepband beobachtet werden.

Das differenzierungsspezifische Keratin 10 wird suprabasal exprimiert, zeigt aber in läSIONALER atopischer Haut eine unphysiologische Verteilung im Stratum granulosum und oberen Stratum spinosum (Proksch et al. 2006). Unsere Ergebnisse zeigten ebenso, dass in unbehandelter atopischer Haut eine Keratin 10-Expression im Stratum granulosum und weiten Teilen des Stratum spinosum stattfand. Nach der Behandlung war zwar eine zunehmend suprabasale Verteilung erkennbar, die unphysiologische Expression von Keratin 10 blieb jedoch bestehen.

Weiterhin zeigen sich in läSIONALER atopischer Haut eine vermehrte Ausprägung des mit Hyperproliferation assoziierten Keratin 16 sowie die Präsenz von entzündungsspezifischem Keratin 17, die in gesunder Haut nicht vorkommen. Eine deutlich erhöhte Proliferation ist bereits in nicht-läSIONALER Haut nachzuweisen (Jensen et al. 2004). Die Untersuchung von Keratin 16 ergab vor der Behandlung ein fokales Vorkommen, das nach der Behandlung fast komplett reduziert wurde. Das Vorkommen von Keratin 16 spiegelt die epidermale Hyperproliferation mit erhöhter epidermaler Dicke wider, die sich nach Anwendung der Medikationen deutlich reduzierte. Keratin 17 wurde nicht untersucht.

Der genetische Ursprung terminaler Differenzierungsproteine, u.a. Involucrin, Loricrin und Filaggrin liegt auf dem Chromosom 1q21 in einem Abschnitt, der als „epidermaler Differenzierungskomplex“ (EDC) bezeichnet wird. Dort konnten bislang

mehrere Mutationen entdeckt werden, die zu einer gestörten Bildung des CE führen und mit Erkrankungen wie Ichthyosis vulgaris und AE assoziiert sind (Kalinin et al. 2002, Ruether et al. 2006, Esparza-Gordillo et al. 2009). Trotz des gemeinsamen genetischen Ursprungs scheinen die Proteine der terminalen Differenzierung nicht in derselben Weise reguliert zu werden (Yoneda et al. 1992, Jarzab et al. 2010). So zeigte sich bei der Untersuchung der Genexpression der EDC-Gene in läsionaler atopischer Haut eine Down-Regulation von Loricrin und Filaggrin, jedoch eine Up-Regulation von Involucrin (Jarzab et al. 2010). Diese Ergebnisse weichen jedoch von anderen Studienergebnissen ab, die eine Down-Regulation von Involucrin auf mRNA- und Proteinebene zeigen (Jensen et al. 2004, Kim et al. 2008). Der unterschiedlichen Regulierung der Differenzierungsproteine könnte ein Kompensationsmechanismus zugrunde liegen: In Tiermodellen mit Loricrin-knockout-Mäusen wurde beschrieben, dass das Fehlen von Loricrin durch einen Kompensationsmechanismus mit verstärkter Bildung eines anderen CE-Proteins ausgeglichen wird und so einen unveränderten Phänotyp ergibt, dies konnte jedoch für Involucrin oder Filaggrin nicht gezeigt werden (Koch et al. 2000). Um die Zusammenhänge aufzuklären, sind weitere Studien notwendig, die die Bildung der CE-Proteine auf genetischer, immunhistologischer und quantitativer Ebene parallel untersuchen.

#### **4.4 Die Stratum corneum-Lipidstrukturen und Transmissions-Elektronenmikroskopie**

Die interzellulären Lipiddoppelschichten des SC übernehmen eine wesentliche wasserbindende Funktion, welche beim AE durch gestörte Lipidprozessierung und eine veränderte Lipidzusammensetzung, u.a. durch verminderten Ceramidgehalt, nicht gewährleistet ist (Imokawa et al. 1991 a). Werden die Lipiddoppelschichten extrahiert, kommt es zu verminderter Hydratation (Imokawa 1991 b). Für die wasserbindende Funktion sind auch kovalent gebundene  $\omega$ -Hydroxy-Ceramide bei der Interaktion zwischen dem Cornified-Envelope (CE) und den Lipiddoppelschichten von Bedeutung, ein verminderter Anteil dieser Ceramide korreliert mit einem erhöhten TEWL (Meguro et al. 2000). Bereits nicht-läsionale atopische Haut weist eine gestörte Lipidprozessierung auf, ultrastrukturell sichtbar anhand verzögerter Fusionsprozesse und einer höheren Anzahl unsezernerter Lamellarkörperchen (Fartasch et al. 1992).

Die Ergebnisse unserer ultrastrukturellen Untersuchung zeigten eine schädigende Wirkung von Betamethason auf das Lipidgerüst und die Lipidprozessierung. Nach Betamethason-Behandlung lag der Anteil physiologischer Lamellarkörperchen bei lediglich 9% im Vergleich zu 13% vor der Behandlung. Pimecrolimus normalisierte den Befund und zeigte einen Anteil physiologischer Lamellarkörperchen von 82 % nach der Behandlung, was nahezu dem gesunden Befund aus Kontrollkollektiven entsprach. Auch zeigte Pimecrolimus nur ca. halb so viele pathologische Lamellarkörperchen wie Betamethason. Morphologisch bot der Inhalt der physiologischen Lamellarkörperchen eine regelrechte Lamellierung der Lipide, wohingegen bei den pathologischen Lamellarkörperchen akkumulierte, unstrukturierte Lipidmatrix auffielen. Die gestörte Prozessierung der Lipide der Lamellarkörperchen führt zu einer insuffizienten Bildung der interzellulären Lipiddoppelschichten, deren Struktur wesentlich für die Funktion der Permeabilitätsbarriere ist. Diese interzelluläre Struktur zeigte sich nach Betamethason-Behandlung deutlich gestört, die Lipidschichten ließen keine klare Anordnung erkennen. Nach Pimecrolimus-Behandlung hingegen konnte eine deutlich voneinander abgrenzbare Schichtung beobachtet werden. Somit zeigte sich, dass Pimecrolimus eine Normalisierung der Lipidstrukturen bewirkt und damit ultrastrukturell die gestörte Permeabilitätsbarriere beim AE wiederherstellt. Betamethason hingegen bietet ultrastrukturell keine Verbesserung der Barrierefunktion. Die transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchung wurde jedoch nur an 3 Patienten durchgeführt, so dass dieser Befund statistisch nicht belegt werden kann. Die Ergebnisse stimmen jedoch mit den bisherigen Erkenntnissen überein, dass eine Langzeitanwendung topischer Kortikosteroide ultrastrukturell zu verminderten Interzellulärlipiden, weniger Lipiddoppelschichten und einer geringeren Anzahl an Lamellarkörperchen führt (Sheu et al. 1997).

Kao et al. wiesen nach, dass bereits eine Kurzzeitanwendung topischer Kortikosteroide eine verzögerte Barriere-reparatur und verminderte SC-Integrität bewirkt, darüber hinaus zeigte sich eine reduzierte Lipidsynthese in Keratinozyten. In Versuchen mit Mäusen wurde deutlich, dass die verminderte Lipidsynthese und gestörte Lipidprozessierung nach Kurzzeitanwendung topischer Kortikosteroide durch die Applikation einer physiologischen Lipidmischung wieder behoben werden kann (Kao et al. 2003).

Eine Kortikosteroid-induzierte Schädigung der Permeabilitätsbarriere ermöglicht weitere Exazerbationen des AE, demzufolge ist die Behandlung akuter Schübe mit Kortikosteroiden auf einen kurzen Zeitraum zu begrenzen (AWMF-Leitlinien-Register a).

#### **4.5 Die Rolle der Mutationen im Filaggrin-Gen (FLG)**

Im Jahr 2006 wurden als Ursache für Ichthyosis vulgaris 2 Mutationen im Filaggrin-Gen (R501X und 2282del4) entdeckt, die zu einem kompletten Funktionsverlust des Proteins Filaggrin führen (Smith et al. 2006). Da die betroffenen Patienten der Studie teilweise auch an AE litten, wurde ein Zusammenhang vermutet und die FLG-Mutationen nachfolgend auch bei Patienten mit AE untersucht. Hierbei machten Palmer et al. die wegweisende Entdeckung, dass eine Assoziation der FLG-Mutationen mit dem AE besteht; der Anteil der Patienten, die mindestens eine der Mutationen tragen, lag dabei bei 56% (Palmer et al. 2006).

Weiterhin zeigte sich eine Assoziation der Mutationen mit Asthma bronchiale, was den bekannten Zusammenhang zwischen den beiden Erkrankungen unterstreicht. Diesbezüglich wurde jedoch gezeigt, dass die FLG-Mutationen nur einen Risikofaktor für den kombinierten Phänotyp Asthma bronchiale/AE darstellen, nicht aber für Asthma bronchiale allein (Palmer et al. 2006). Diese Ergebnisse wurden mehrfach in großen Studien bestätigt (Marenholz et al. 2006, Ruether et al. 2006, Weidinger et al. 2006), der Anteil der Mutationsträger wurde dabei mit 17.5 – 56% angegeben (Irvine 2007). Die Assoziation der FLG-Mutationen wurde vor allem mit der extrinsischen, IgE-medierte Form des AE beobachtet, so dass die These des „outside-inside“-Konzept gestützt wird – eine gestörte epidermale Barriere durch genetisch bedingten, verminderten Filaggringehalt führt zu erhöhter Allergenpenetration und Sensibilisierung (Weidinger et al. 2007).

Einen Risikofaktor für die Entwicklung eines AE stellen sowohl die heterozygote als auch die homozygote Vererbung des FLG-Null-Allels dar, die heterozygote Vererbung führt zu einer verminderten Filaggrin-Expression, wohingegen für einen kompletten Funktionsverlust des Proteins eine homozygote Vererbung der Mutation notwendig ist (Palmer et al. 2006, Howell et al. 2007).

Die verminderte Filaggrin-Expression beim Vorliegen einer FLG-Mutation zeigt sich in akuten Hautläsionen deutlicher als in unbetreffener Haut. Dies weist darauf hin, dass auch das inflammatorische Milieu der Hautläsionen mit verminderter Filaggrin-

Expression verbunden ist, so konnte gezeigt werden, dass die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 zu einer Reduktion der FLG-Expression führt, was für den verminderten Filaggrin-Gehalt bei Patienten ohne FLG-Mutation verantwortlich sein könnte (Howell et al. 2007).

Auch unsere Ergebnisse zeigten in unbehandelter läsionaler atopischer Haut einen gestörten Filaggringehalt, der sich nach der Behandlung mit Betamethason und Pimecrolimus normalisierte. Um zu klären, inwieweit die genetische Prädisposition zum Filaggrinverlust durch eine Normalisierung der Barrierefunktion, wie hier durch eine topische Therapie, ausgeglichen werden kann, sind weitere Studien mit Mutationsträgern notwendig.

#### **4.6 Klinische Implikationen**

Die bislang in der Therapie des AE eingesetzten Medikationen zielten vorwiegend auf eine Beeinflussung des Immunsystems im Sinne der „inside-outside“-Pathogenese ab, der Aspekt der gestörten Barrierefunktion blieb sekundär.

In den vergangenen Jahrzehnten dominierte die „inside-outside“- Hypothese und eine Vielzahl immunologischer Einzelaspekte wurden aufgedeckt, das Gesamtbild blieb nichtsdestotrotz ungeklärt. Im letzten Jahrzehnt kam es, u.a. bedingt durch genauere Erkenntnisse über genetische Ursachen, zu einem Paradigmenwechsel.

Mit der zunehmenden Erkenntnis, dass die epidermale Barrierestörung das primär pathogenetische Ereignis darstellen könnte, stellte sich die Frage, auf welche Weise Kortikosteroide und Calcineurininhibitoren die Barrierefunktion beeinflussen. Nach 3-wöchiger Anwendung zeigte sich, dass sowohl Betamethason als auch Pimecrolimus klinisch die Barrierefunktion stärken, messbar anhand verbesserter klinischer Symptome und biophysikalischer Parameter, wobei sich Betamethason als wirksamer erwies. Beide Medikationen hatten einen positiven Effekt auf die Differenzierung; Betamethason erzielte jedoch eine Hautatrophie, die nach Pimecrolimus-Behandlung nicht beobachtet wurde. Als imponantes Merkmal erzielte Pimecrolimus eine Normalisierung der Lipidstrukturen, die mit verbesserter Hydratation einhergeht und damit die Permeabilitätsbarriere wiederherstellt – ein Effekt, der vor Invasion von Umweltfaktoren wie Allergenen und Infektionserregern schützt. Nach Betamethason-Therapie hingegen besteht durch eine persistierende Schädigung der Permeabilitätsbarriere sowie die Hautatrophie eine höhere Anfälligkeit für eindringende Umweltfaktoren, dies kann den Circulus vitiosus

aufrechterhalten. Die trotz der ultrastrukturellen Barrierschädigung bestehende offensichtliche Überlegenheit des Betamethason hinsichtlich klinischer und biophysikalischer Parameter beruht am ehesten auf der vasokonstriktiven Komponente, die zu vermindertem TEWL und stärkerer Antiinflammation beiträgt. Das nach Kortikosteroid-Therapie oft beobachtete Rebound-Phänomen wurde nach der 1-wöchigen follow-up-Phase noch nicht festgestellt, jedoch zeigte Betamethason im Partial Eczema Area Severity Index (pEASI) eine raschere Verschlechterung als Pimecrolimus. Da sich das Rebound-Phänomen zumeist 2 Wochen nach Therapieende zeigt, wäre hier nach Betamethason-Therapie ein Auftreten wahrscheinlich. Eine Erklärung des Rebound-Phänomens besteht darin, dass nach Beendigung der Kortikosteroid-Therapie die antiinflammatorische Wirkung beendet ist, die medikamentös aufrechterhaltene Barriestörung jedoch ein Fortbestehen der Inflammation erlaubt (Cork et al. 2009).

Die Studienergebnisse implizieren, dass Pimecrolimus aufgrund der Fähigkeit zur Barriere-reparatur und des fehlenden atrophogenen Potentials für eine Langzeitbehandlung des AE eher geeignet ist als Betamethason. Ein weiterer Vorteil liegt in der geringen perkutanen und systemischen Absorption und der geringeren Nebenwirkungsrate. Jedoch lassen sich Langzeitunbedenklichkeiten nach 8 Jahren des Einsatzes noch nicht ausstellen, dies erfordert die Beobachtung eines Zeitraums von mindestens 15 Jahren. Aufgrund einzelner Fälle von Hautmalignomen und Lymphomen im Zusammenhang mit topischer Anwendung von Calcineurininhibitoren wurde 2006 von der amerikanischen Zulassungsbehörde „Food and Drug Administration“ (FDA) ein Warnhinweis herausgegeben. Der kausale Zusammenhang konnte jedoch nicht gesichert werden (Lebwohl und Gower 2006), so dass sich die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) lediglich für größere Vorsichtsmaßnahmen bei der Anwendung ausgesprochen hat (EMA 2006).

Betamethason hingegen vermittelt die stärkere klinische Wirkung und ist daher zur Kurzzeitintervention akuter Schübe des AE nach wie vor unerlässlich und als Therapie der ersten Wahl anzusehen. In der Stufentherapie des AE, welche 4 Stufen umfasst, wird der Einsatz von topischen Kortikosteroiden ab Stufe 2 (leichte Ekzeme) vorgesehen, im Falle der Unverträglichkeit/Nichtwirksamkeit werden topische Calcineurininhibitoren empfohlen; hierbei besteht kein festes zeitliches Schema (AWMF-Leitlinien-Register b). Eine neuere Behandlungsstrategie besteht in der proaktiven Therapieform: Bis zur Abheilung der Effloreszenzen werden

antiinflammatorische Externa (Kortikosteroide oder Calcineurininhibitoren) eingesetzt, diese werden in der Remissionsphase weiterhin niedrig dosiert (2 mal wöchentlich) auf den klinisch symptomfreien, vorherigen Ekzempläsionen angewendet (Wollenberg et al. 2008). Dieses immunologische Konzept beruht auf einer Kontrolle der entzündlichen Restaktivität im symptomfreien Intervall, es hat sich gegenüber den konventionellen Therapieschemata als vorteilhaft erwiesen, wobei sich weniger Exazerbationen zeigten (Thaçi et al. 2008).

Die Stabilisierung und Wiederherstellung der gestörten epidermalen Barriere beim AE ist somit ein wesentliches Therapieziel, um das Eindringen von Umweltstoffen zu verhindern und damit den Circulus vitiosus zu unterbinden. Das SC hat als Träger der Barrierefunktion verschiedene protektive Eigenschaften: es bildet die Permeabilitätsbarriere, eine mechanische und antimikrobielle Barriere, eine psychosensorische Barriere und beherbergt zahlreiche weitere biochemische Abwehrmechanismen (Elias und Steinhoff 2008 a). Die steigende Prävalenz des AE verdeutlicht die Rolle der Umweltfaktoren und rückt die Bedeutung einer intakten epidermalen Barriere in den Vordergrund. Exogene Faktoren wie zunehmende schädigende Stoffe aus der Umwelt, trockene Umgebungsluft oder der Gebrauch von alkalischen Detergenzien sowie endogene Faktoren wie psychologischer Stress führen zu einer Barriereverschlechterung (Elias et al. 2008 b).

Interessanterweise wurde gezeigt dass eine Genvariante auf Chromosom 11q13.5 nicht nur ein erhöhtes Risiko für AE sondern auch für Morbus Crohn, eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, darstellt (Esparza-Gordillo et al. 2009). Dies lässt vermuten, dass genetisch bedingte Barrieredefekte zur Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen an Grenzorganen beitragen.

Mit der Entdeckung der FLG-Mutationen wurde zwar ein wesentlicher Faktor der primären Barriestörung beim AE identifiziert, welche Mechanismen jedoch zur Barriestörung bei den Nicht-Mutationsträgern beitragen, bleibt weitgehend ungeklärt (Scharschmidt et al. 2009). Ein bereits beschriebener Mechanismus könnte das inflammatorische Th2-Milieu der Hautläsionen sein (Howell et al. 2007). Die FLG-Mutationen sind jedoch auch mit der Ichthyosis vulgaris assoziiert, so dass für das Entstehen des AE weitere pathogenetische Mechanismen, ggf. mit Beteiligung der oben erwähnten exogenen und endogenen Faktoren verantwortlich sein müssen.

#### **4.7 Therapeutischer Ausblick**

Als therapeutische Konsequenz ergibt sich aus den derzeitigen Erkenntnissen, dass die Therapie zukünftig die gestörte Epidermalbarriere fokussieren muss. Neben der generellen Anwendung von Moisturizern kann eine gezielte Substitutionstherapie eingesetzt werden, so ließ sich durch die Anwendung physiologischer Lipidmixturen eine Verbesserung der Barrierefunktion erzielen (Berardesca et al. 2001, Chamlin et al. 2002). Hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit derartiger Lipidrezepturen zeigte sich kürzlich eine vergleichbare Wirkung mit Fluticasonpropionat, einem Klasse-III-Kortikosteroid (Sugarman und Parish 2009). Die umfangreichen Studien zum FLG-Status und den möglichen phänotypischen Ausprägungen könnten zukünftig bei Trägern der FLG-Mutationen eine Risikostratifizierung bezüglich der Entwicklung weiterer atopischer Symptome ermöglichen (Henderson et al. 2008). Dies würde frühzeitigere therapeutische Interventionen im Sinne einer Barriestabilisierung ermöglichen. Zukünftige Fragestellungen sollten sich auch mit den Möglichkeiten beschäftigen, den Funktionsverlust von Filaggrin zu kompensieren. Dies könnte eine exogene Zufuhr von Filaggrin bzw. dessen Metaboliten sein oder die Zuführung von Substanzen, die die Expression bzw. Synthese von Filaggrin steigern.

#### **4.8 Schlussfolgerungen**

Cork et al. betrachten das AE als eine Krankheit des „Gen-Dosiseffekts und umweltbedingten Dosiseffekts“ - je mehr genetische und umweltbedingte Faktoren vorliegen, desto ausgeprägter ist der Schweregrad des AE. So sehen die Autoren von einer dogmatischen Beantwortung nach der Frage der korrekten Hypothese („outside-inside“ vs. „inside-outside“) ab, gehen jedoch davon aus, dass eine Barriestörung das primäre pathogenetische Ereignis in der Entwicklung atopischer Symptome darstellt (Cork et al. 2009).

Ungeachtet einer „richtigen“ Hypothese hat sich gezeigt, dass die Barriestörung als essentielle Komponente des AE zukünftig stärker in den therapeutischen Fokus gerückt werden muss. Auch wenn die Wiederherstellung der epidermalen Barriere keine vollständige Symptombefreiheit erzielen kann, so ist doch eine Verbesserung der Lebensqualität möglich, die für den Patienten mit AE von größtem Wert ist.

## V. Zusammenfassung

Das atopische Ekzem (AE) ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die vor allem Kinder betrifft und mit einer Prävalenz von ca. 15% (Kindesalter) zu einer der häufigsten Hauterkrankungen in den industrialisierten Ländern zählt.

Die multifaktorielle Pathogenese des AE, bei der Umwelt- und genetische Faktoren miteinander interagieren, wurde über lange Zeit unter immunologischen Gesichtspunkten betrachtet. Mit steigender Inzidenz und Umweltbelastung rückte jedoch die epidermale Barriere als Abwehrorgan in den Vordergrund. Für das AE ist die Dysfunktion der epidermalen Barriere kennzeichnend, an der eine genetische Prädisposition maßgeblich beteiligt ist. So gilt die Entdeckung der Filaggrin-Gen-Mutationen, die eine Defizienz des Barriereproteins Filaggrin bewirken, als Meilenstein in der Aufklärung der Pathogenese des AE. Weitere Bedeutung erhält die Barriere durch Identifizierung von Genen, die ein gemeinsames Risiko für die Entwicklung von Entzündungen im Bereich von Grenzorganen tragen, wie kürzlich für AE und Morbus Crohn gezeigt wurde (gemeinsame Mutation eines Gens auf Chromosom 11q13.5).

Um eine Aussage über die barriestabilisierenden Eigenschaften des Kortikosteroids Betamethason und des Calcineurininhibitors Pimecrolimus zu erhalten, die einen breiten Einsatz in der Therapie des AE finden, führten wir eine klinische Studie durch. In dieser wurden während 3-wöchiger Anwendung und einwöchiger Nachbeobachtung klinische Symptome, biophysikalische, histologische und ultrastrukturelle Parameter erfasst. Es zeigte sich, dass Betamethason die klinischen Symptome und den Transepidermalen Wasserverlust signifikant stärker verbesserten als Pimecrolimus. Hingegen bewirkte Pimecrolimus eine Wiederherstellung der gestörten Lipidstrukturen, die essentiell für die Erhaltung der epidermalen Barrierefunktion ist. Da Pimecrolimus darüberhinaus keine Hautatrophie bewirkt, erscheint es für eine Langzeitbehandlung des AE geeigneter als Betamethason, welches der Kurzzeitintervention vorbehalten werden sollte.

Die Stabilisierung der epidermalen Barriere stellt ein therapeutisches Ziel beim AE dar. Jedoch fordern hohe Inzidenzen atopischer Erkrankungen sowie zunehmende Umweltbelastung im Kontext der Barriestörung nicht nur neue therapeutische Strategien, sondern auch neue Strategien der Primärprävention. In diesem

Zusammenhang wäre die Basistherapie mit Hautpflegemitteln bereits bei Neugeborenen aus Atopie-Risikofamilien zu diskutieren.

## VI. Literaturverzeichnis

Ashcroft DM, Dimmock P, Garside R, Stein K, Williams HC (2005): Efficacy and tolerability of topical pimecrolimus and tacrolimus in the treatment of atopic dermatitis: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, 330(7490): 516

AWMF-Leitlinien-Register a: Nr. 013/034 - Topische Dermatotherapie mit Glukokortikoiden, Stand 01/2009

AWMF-Leitlinien-Register b: Nr. 013/027 – Neurodermitis, Stand 04/2008

Bardana EJ Jr. (2004): Immunoglobulin E- (IgE) and non-IgE-mediated reactions in the pathogenesis of atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS). *Allergy*, 59 Suppl 78: 25-9

Beltrani VS (1999): The clinical spectrum of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 104(3 Pt 2): S87-98

Ben-Gashir MA, Seed PT, Hay RJ (2004): Predictors of atopic dermatitis severity over time. *J Am Acad Dermatol*, 50(3): 349-56

Benn CS, Melbye M, Wohlfahrt J, Björkstén B, Aaby P (2004): Cohort study of sibling effect, infectious diseases, and risk of atopic dermatitis during first 18 months of life. *BMJ*, 328(7450): 1223

Berardesca E, Barbareschi M, Veraldi S, Pimpinelli N (2001): Evaluation of efficacy of a skin lipid mixture in patients with irritant contact dermatitis, allergic contact dermatitis or atopic dermatitis: a multicenter study. *Contact Dermatitis*, 45(5): 280-5

Bieber T (2008): Atopic dermatitis. *N Engl J Med*, 358(14): 1483-94

Billich A, Aschauer H, Aszódi A, Stuetz A (2004): Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus. *Int J Pharm*, 269(1): 29-35

Brown SJ, McLean WH (2009): Eczema genetics: current state of knowledge and future goals. *J Invest Dermatol*, 129(3): 543-52

Burrell-Morris C, Williams HC. Atopic dermatitis in migrant populations. In: Williams HC, ed. *Atopic Dermatitis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 169-82

Chamlin SL, Kao J, Frieden IJ, Sheu MY, Fowler AJ, Fluhr JW, Williams ML, Elias PM. (2002): Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: Changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *J Am Acad Dermatol*, 47(2): 198-208

Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, Guy RH, Macgowan AL, Tazi-Ahnini R, Ward SJ (2009): Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129(8): 1892-908

Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E (1998): Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol*, 111(3): 517-23

Elias PM, Feingold KR (2001): Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications. *Arch Dermatol*, 137(8): 1079-81

Elias PM (2005): Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol*, 125(2): 183-200

Elias PM, Steinhoff M (2008 a): "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 128(5): 1067-70

Elias PM, Hatano Y, Williams ML (2008 b): Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, 121(6): 1337-43

EMA - European Medicines Agency 23.03.2006: Questions and answers on Protopic/Protopy and Elidel

Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Fölster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G, Rohde K, Marenholz I, Schulz F, Kerscher T, Hubner N, Wahn U, Schreiber S, Franke A, Vogler R, Heath S, Baurecht H, Novak N, Rodriguez E, Illig T, Lee-Kirsch MA, Ciechanowicz A, Kurek M, Piskackova T, Macek M, Lee YA, Ruether A (2009): A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nat Genet*, 41(5): 596-601

Fartasch M, Bassukas ID, Diepgen TL (1992): Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. *Br J Dermatol*, 127(3): 221-7

Fischer TW, Wigger-Alberti W, Elsner P (2001): Assessment of 'dry skin': current bioengineering methods and test designs. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14(4): 183-95

Flegler SL, Heckman JW, Klomparens KL (1995): *Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford

Fluhr JW, Feingold KR, Elias PM (2006): Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol*, 15(7): 483-92

Fölster-Holst R, Pape M, Buss YL, Christophers E, Weichenthal M (2006): Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients. *Allergy*, 61(5): 629-32

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31(1): 13-20

Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, De Pità O, Chinni LM, Giannetti A, Girolomoni G, Pastore S (2001): Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 107: 871–77

Grassberger M, Baumruker T, Enz A, Hiestand P, Hultsch T, Kalthoff F, Schuler W, Schulz M, Werner FJ, Winiski A, Wolff B, Zenke G (1999): A novel anti-inflammatory drug, SDZ ASM 981, for the treatment of skin diseases: in vitro pharmacology. *Br J Dermatol*, 141(2): 264-73

Hanifin JM, Rajka G (1980): Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 92(Suppl): 44-47

Hanifin JM, Cooper KD, Ho VC, Kang S, Krafchik BR, Margolis DJ, Schachner LA, Sidbury R, Whitmore SE, Sieck CK, Van Voorhees AS (2004): Guidelines of care for atopic dermatitis, developed in accordance with the American Academy of Dermatology (AAD)/American Academy of Dermatology Association "Administrative Regulations for Evidence-Based Clinical Practice Guidelines". *J Am Acad Dermatol*, 50(3): 391-404

Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, Scott IR (2000): Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *International Journal of Cosmetic Science*, 22: 21-52

Henderson J, Northstone K, Lee SP, Liao H, Zhao Y, Pembrey M, Mukhopadhyay S, Smith GD, Palmer CN, McLean WH, Irvine AD (2008): The burden of disease associated with filaggrin mutations: a population-based, longitudinal birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol*, 121(4): 872-7.e9

Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ (2006): Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol*, 54(1): 1-15

Hoare C, Li Wan Po A, Williams H (2000): Systematic review of treatments for atopic eczema. *Health Technol Assess*, 4(37): 1-191

Hoetzenecker W, Meingassner JG, Ecker R, Stingl G, Stuetz A, Elbe-Bürger A (2004): Corticosteroids but not pimecrolimus affect viability, maturation and immune function of murine epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol*, 122(3): 673-84

Hornstein OP, Klatschka F (Hrsg) (1991): Atopische Diathese und Ekzem: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. In: Aktuelle Beiträge zu Umwelt- und Berufskrankheiten der Haut 3, BMV, Berlin

Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, De Benedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DY (2007): Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol*, 120(1): 150-5

Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Grüber C, Niggemann B, Wahn U; Multicenter Allergy Study Group (2004): The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5): 925-31

Imokawa G, Kuno H, Kawai M (1991 b): Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *J Invest Dermatol*, 96(6): 845-51

Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A (1991 a): Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol*, 96(4): 523-6

Irvine AD (2007): Fleshing out filaggrin phenotypes. *J Invest Dermatol*, 127(3): 504-7

Jakasa I, de Jongh CM, Verberk MM, Bos JD, Kezic' S. (2006): Percutaneous penetration of sodium lauryl sulphate is increased in uninvolved skin of patients with atopic dermatitis compared with control subjects. *Br J Dermatol*, 155(1): 104-9

Jarzab J, Filipowska B, Zebracka J, Kowalska M, Bozek A, Rachowska R, Gubala E, Grzanka A, Hadas E, Jarzab B (2010): Locus 1q21 Gene expression changes in atopic dermatitis skin lesions: deregulation of small proline-rich region 1A. *Int Arch Allergy Immunol*, 151(1): 28-37

Jenkins HL, Tresise JA (1969): An adhesive-tape stripping technique for epidermal histology. *J Soc Cosmet Chem*, 20: 451-466

Jensen JM, Fölster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schütze S, Proksch E (2004): Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 122(6): 1423-31

Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wüthrich B; EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force (2001): A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 56: 813-24

Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. (2004): Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5): 832-6

Kalia YN, Pirot F, Guy RH. (1996): Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. *Biophys J*, 71(5): 2692-700

Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM (2002): Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*, 24(9): 789-800

Kao JS, Fluhr JW, Man MQ, Fowler AJ, Hachem JP, Crumrine D, Ahn SK, Brown BE, Elias PM, Feingold KR (2003): Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities. *J Invest Dermatol*, 120(3): 456-464

Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD (2008): Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol*, 126(3): 332-7

Koblenzer CS (1999): Itching and the atopic skin. *J Allergy Clin Immunol*, 104(3 Pt 2): S109-13

Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M, Hohl D, Kartasova T, Jarnik M, Steven AC, Roop DR (2000): Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol*, 151(2): 389-400

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): 73-7

Langley RG, Luger TA, Cork MJ, Schneider D, Paul C. (2007): An update on the safety and tolerability of pimecrolimus cream 1%: evidence from clinical trials and post-marketing surveillance. *Dermatology*, 215 Suppl 1: 27-44

Lebwohl M, Herrmann LG (2005): Impaired skin barrier function in dermatologic disease and repair with moisturization. *Cutis*, 76(6 Suppl): 7-12

Lebwohl M, Gower T (2006): A safety assessment of topical calcineurin inhibitors in the treatment of atopic dermatitis. *MedGenMed*, 8(4): 8

Lee SH, Jeong SK, Ahn SK (2006): An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J*, 47(3): 293-306

Leung DY (1999): Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 104 (Suppl): S 99-108

Leung DY, Bieber T (2003): Atopic dermatitis. *Lancet*, 361(9352): 151-60

Marenholz I, Nickel R, Rüschenhoff F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, Grüber C, Lau S, Worm M, Keil T, Kurek M, Zaluga E, Wahn U, Lee YA (2006): Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*, 118(4): 866-71

Meguro S, Arai Y, Masukawa Y, Uie K, Tokimitsu I (2000): Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL). *Arch Dermatol Res*, 292(9): 463-8

Milgrom H (2002): Attainments in atop: special aspects of allergy and IgE. *Adv Pediatr*, 49: 273-97

Nikolovski J, Stamatatos GN, Kollias N, Wiegand BC (2008): Barrier function and water-holding and transport properties of infant stratum corneum are different from adult and continue to develop through the first year of life. *J Invest Dermatol*, 128(7): 1728-36

Nilsson GE (1977): Measurement of water exchange through skin. *Med Biol Eng Comput*, 15(3): 209-18

Novak N, Bieber T, Leung DY (2003): Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 112(6 Suppl): S128-39

Novak N, Kwiek B, Bieber T (2005): The mode of topical immunomodulators in the immunological network of atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol*, 30(2): 160-4

Oettgen HC, Geha RS (1999): IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J Clin Invest*, 104(7): 829-35

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH (2006): Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*, 38(4): 441-6

Papp KA, Werfel T, Fölster-Holst R, Ortonne JP, Potter PC, de Prost Y, Davidson MJ, Barbier N, Goertz HP, Paul C (2005): Long-term control of atopic dermatitis with pimecrolimus cream 1% in infants and young children: a two-year study. *J Am Acad Dermatol*, 52(2): 240-6

Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J (1990): Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*, 22(3): 164-78

Proksch E, Fölster-Holst R, Jensen JM. (2006): Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci*, 43(3): 159-69

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. (2008): The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17(12): 1063-72

Queille-Roussel C, Paul C, Duteil L, Lefebvre MC, Rapatz G, Zagula M, Ortonne JP (2001): The new topical ascomycin derivative SDZ ASM 981 does not induce skin atrophy when applied to normal skin for 4 weeks: a randomized, double-blind controlled study. *Br J Dermatol*, 144(3): 507-13

Reitamo S, Rustin M, Harper J, Kalimo K, Rubins A, Cambazard F, Brenninkmeijer EE, Smith C, Berth-Jones J, Ruzicka T, Sharpe G, Taieb A (2008): A 4-year follow-up study of atopic dermatitis therapy with 0.1% tacrolimus ointment in children and adult patients. *Br J Dermatol*, 159(4): 942-51

Rogiers V, EEMCO Group (2001): EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14(2): 117-28

Ruether A, Stoll M, Schwarz T, Schreiber S, Fölster-Holst R (2006): Filaggrin loss-of-function variant contributes to atopic dermatitis risk in the population of Northern Germany. *Br J Dermatol*, 155(5): 1093-4

Ruzicka T, Ring J, Przybilla B (Hrsg) (1991): *Handbook of Atopic Eczema*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

Schäfer T, Dirschedl P, Kunz B, Ring J, Uberla K (1997): Maternal smoking during pregnancy and lactation increases the risk for atopic eczema in the offspring. *J Am Acad Dermatol*, 36(4): 550-6

Scharschmidt TC, Man MQ, Hatano Y, Crumrine D, Gunathilake R, Sundberg JP, Silva KA, Mauro TM, Hupe M, Cho S, Wu Y, Celli A, Schmith M, Feingold KR, Elias PM (2009): Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. *J Allergy Clin Immunol*, 124(3): 496-506, 506.e1-6

Schmitt J, Schäkel K, Fölster-Holst R, Bauer A, Oertel R, Augustin M, Aberer W, Luger T, Meurer M (2010): Prednisolone vs. ciclosporin for severe adult eczema. An investigator-initiated double-blind placebo-controlled multicentre trial. *Br J Dermatol*, 162(3): 661-8

Scholzen T, Gerdes J (2000):  
The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3): 311-22

Schultz Larsen FV, Holm NV (1985): Atopic dermatitis in a population based twin series: concordance rates and heritability estimation. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 114: 159

Seguchi T, Cui CY, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T (1996): Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res*, 288(8): 442-6

Sheu HM, Tai CL, Kuo KW, Yu HS, Chai CY (1991): Modulation of epidermal terminal differentiation in patients after long-term topical corticosteroids. *J Dermatol*, 18(8): 454-64

Sheu HM, Lee JY, Chai CY, Kuo KW (1997): Depletion of stratum corneum intercellular lipid lamellae and barrier function abnormalities after long-term topical corticosteroids. *Br J Dermatol*, 136(6): 884-90

Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean WH (2006): Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*, 38(3): 337-42

Stuetz A, Baumann K, Grassberger M, Wolff K, Meingassner JG (2006): Discovery of topical calcineurin inhibitors and pharmacological profile of pimecrolimus. *Int Arch Allergy Immunol*, 141(3): 199-212

Sugarman JL, Parish LC (2009): Efficacy of a lipid-based barrier repair formulation in moderate-to-severe pediatric atopic dermatitis. *J Drugs Dermatol*, 8(12): 1106-11

Tan BB, Weald D, Strickland I, Friedmann PS (1996): Double-blind controlled trial of effect of housedust-mite allergen avoidance on atopic dermatitis. *Lancet*, 347(8993): 15-8

Thaçi D, Reitamo S, Gonzalez Ensenat MA, Moss C, Boccaletti V, Cainelli T, van der Valk P, Buckova H, Sebastian M, Schuttelaar ML, Ruzicka T; European Tacrolimus Ointment Study Group (2008): Proactive disease management with 0.03% tacrolimus ointment for children with atopic dermatitis: results of a randomized, multicentre, comparative study. *Br J Dermatol*, 159(6): 1348-56

Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CN, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WH, Novak N (2006): Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1): 214-9

Weidinger S, Rodríguez E, Stahl C, Wagenpfeil S, Klopp N, Illig T, Novak N (2007): Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 127(3): 724-6

Wertz PW (2000): Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 208: 7-11

Williams HC (2000): Epidemiology of atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol*, 25(7): 522-9

Wollenberg A, Reitamo S, Girolomoni G, Lahfa M, Ruzicka T, Healy E, Giannetti A, Bieber T, Vyas J, Deleuran M; European Tacrolimus Ointment Study Group (2008): Proactive treatment of atopic dermatitis in adults with 0.1% tacrolimus ointment. *Allergy*, 63(7): 742-50

Worm M, Forschner K, Lee HH, Roehr CC, Edenharter G, Niggemann B, Zuberbier T (2006): Frequency of atopic dermatitis and relevance of food allergy in adults in Germany. *Acta Derm Venereol*, 86(2): 119-22

Yoneda K, McBride OW, Korge BP, Kim IG, Steinert PM (1992): The cornified cell envelope: loricrin and transglutaminases. *J Dermatol*, 19(11): 761-4

Yoshiike T, Aikawa Y, Sindhvananda J, Suto H, Nishimura K, Kawamoto T, Ogawa H. (1993): Skin barrier defect in atopic dermatitis: increased permeability of the stratum corneum using dimethyl sulfoxide and theophylline. *J Dermatol Sci*, 5(2): 92-6

Zollner TM, Boehncke W-H, Kaufmann R (Hrsg) (2002): *Atopische Dermatitis*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien

## VII. Anhang

### Zu 2.1 Studie

#### Einschlusskriterien:

- Erwachsene > 18 Jahre.
- atopisches Ekzems nach Definition der Hanifin und Rajka Kriterien.
- mild bis moderat ausgeprägt vorliegendes atopisches Ekzem.
- die Läsionen müssen mindestens 10% des Arms betreffen, exklusive der Handoberfläche.
- ein spezifisches Läsionsareal gleicher Größe und Ausprägung an beiden Armen, das als Zielläsion festgelegt wird.
- ein Zielläsions-Score von mindestens 3 bis 8 Punkten (auf einer Skala von 0-12) für jeweils beide Arme, der sich nicht mehr als 1 Punkt voneinander unterscheiden darf.
- andere Therapien des atopischen Ekzems müssen für die Dauer der Studie abgesetzt werden.
- Aufklärung und schriftliches Einverständnis.

#### Ausschlusskriterien:

- bei Patientinnen: Schwangerschaft und Stillzeit, fehlende Kontrazeption.
- andere Therapien/ Medikamente:
  - eine vorhergehende Phototherapie oder systemische Therapie, die einen bekannten oder vermuteten Einfluss auf das atopische Ekzem hat und die weniger als 14 Tage vor Studienbeginn zurückliegt. (Die Einnahme von niedrig und stabil dosierten, inhalativen Steroiden, deren Dosis eine vernachlässigbare systemische Absorption haben, sowie von systemischen Antihistaminika ist erlaubt).
  - topische Therapie, die einen bekannten oder vermuteten Effekt auf das atopische Ekzem hat und die an den oberen Extremitäten weniger als 7 Tage vor Studienbeginn angewendet wurde (einschließlich der topischen Anwendung von Kortikosteroiden und der topischen Anwendung von Tacrolimus Salbe oder Pimecrolimus Creme).
  - topische Therapie, die einen bekannten oder vermuteten Effekt auf das

atopische Ekzem hat, und die weniger als 7 Tage vor Studienbeginn an anderen Körperarealen als den oberen Extremitäten angewendet wurde, sofern die behandelte Oberfläche größer als 20% ist (wegen des höheren Risikos einer systemischen Absorption, die die Läsionen der oberen Extremitäten beeinflussen könnte).

- Begleiterkrankungen/ Vorerkrankungen:
  - Patienten, die Zeichen einer Hautatrophie und eines Kortikosteroidschadens in den Zielregionen zeigen.
  - Patienten, die immunsupprimiert sind (z.B. Lymphome, AIDS, Wiskott-Aldrich-Syndrom).
  - Patienten, die eine begleitende Hauterkrankung (z.B. Impetigo) im Bereich der oberen Extremitäten oder deren Nähe zeigen, die einen Einfluss auf die Auswertung der Studie haben kann.
  - Patienten, die eine akute virale Hauterkrankung haben (z.B. Herpes Simplex, Varizella Zoster).
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie: Patienten, die eine andere Studienmedikation innerhalb einer anderen medizinischen Studie 8 Wochen vor dem ersten Auftragen der Studienmedikation benutzt haben; oder Patienten, die vorhaben, Medikamente einer anderen klinischen Studie zu benutzen.
- Kontaktsensibilisierungen: Patienten, die eine bekannte Kontaktsensibilisierung gegenüber einem Inhaltsstoff der Studienmedikation haben.
- Compliance/ Zuverlässigkeit/ andere Ausschlussgründe: Patienten, die nach Meinung des Untersuchers unzuverlässig oder nicht compliant sind, die Studienmedikation anzuwenden oder davon auszugehen ist, dass sie die Besuchstermine nicht einhalten werden (entsprechend der Patientenakte).
- Patienten, die Drogenprobleme haben, geistige Störungen haben oder andere limitierende Faktoren, die ihre Kooperation beeinträchtigen könnten.
- Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen, früherer oder aktueller Behandlungen nach Meinung des Untersuchers für die Studienteilnahme ungeeignet sind.

## Zu 2.2 Methodik

### 1. Immunhistochemie

#### Chemikalien und Substanzen

Äthanol [C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O]	Fa. Merck, Darmstadt
Aqua destillata [H <sub>2</sub> O]	Fa. Delta Select, Pfullingen
Citronensäure-Monohydrat [C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O]	Fa. Merck, Darmstadt
3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) [C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>4</sub> ]	Fa. BioGenex, NL
Formalin [CH <sub>2</sub> O]	Fa. Fluka, Buchs, CH
Glycergel Mounting Medium	Fa. Dako, Hamburg
Isopropanol [C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O]	Fa. Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaulösung	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid [NaCl]	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Monohydrat [C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O]	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraffin	Fa. Klinika Medical, Usingen
StreptABComplex /HRP	Fa. Dako, Hamburg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan [C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ]	Fa. Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 3% [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	Fa. Merck, Darmstadt
Xylol [C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ]	Fa. Merck, Darmstadt

#### Puffer und Lösungen

<b>Citratpuffer</b>	Stammlösung A: 0,1 M Citronensäure-Monohydrat-Lösung (21,01g ad 1000 ml H <sub>2</sub> O)
	Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat-Monohydrat-Lösung (29,41 g ad 1000 ml H <sub>2</sub> O)
	9 ml Stammlösung A
	41 ml Stammlösung B
	Ad 450 ml H <sub>2</sub> O, pH-Wert 6,0
<b>TBS-Puffer</b>	6g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	5g Natriumchlorid
	Ad 1000ml H <sub>2</sub> O, pH-Wert 7,6

**DAB-Lösung**            Ansatz für 2,5 ml:  
 2250 µl H<sub>2</sub>O  
 250 µl TBS-Puffer  
 2 Tropfen DAB  
 1 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Antikörper und Seren

	<b>Klonalität</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>1. Antikörper</b>				
Anti-Filaggrin	Monoklonal	Maus	Fa. Abcam, UK	1:75 in TBS
Anti-Involucrin	Monoklonal	Maus	Fa. Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen	1:150 in TBS
Anti-Keratin 10	Monoklonal	Maus	Fa. Dako Cytomation, Hamburg	1:100 in TBS
Anti-Keratin 16	Monoklonal	Maus	Fa. Acris Antibodies GmbH	1:50 in TBS
Anti-Loricrin	Polyklonal	Kaninchen	Fa. Covance, USA	1:500 in TBS
Anti- Ki-67	Polyklonal	Kaninchen	Fa. Acris Antibodies GmbH	1:75 in TBS
Anti-Keratin 5	Polyklonal	Kaninchen	Fa. Covance, USA	1: 500 in TBS
Anti-Keratin 14	Polyklonal	Kaninchen	Fa. Covance, USA	1:500 in TBS
<b>2. Antikörper</b>				
Anti-Maus	-	Kaninchen biotinyliert	Fa. Dako, Hamburg	1:250 in TBS
Anti-Kaninchen	-	Schwein biotinyliert	Fa. Dako, Hamburg	1:500 in TBS
<b>Blockierung</b>				
Normales Kaninchenserum		Kaninchen	Fa. Dako, Hamburg	1:5 in TBS
Normales Schweineserum		Schwein	Fa. Dako, Hamburg	1:20 in TBS

### **Dehydrierungsprotokoll für Immunhistochemie-Präparate**

(Entwässerungsautomat Tissue-Tek ® VIP, Fa. Sakura)

- Formalin 10% für 2 min
- Äthanol 50% für 1 h
- Äthanol 60% für 1 h
- Äthanol 70% für 1 h

- Äthanol 96% für 30 min
- Äthanol 96% für 1 h
- Isopropanol 100% für 1:30 h
- Isopropanol 100% für 2 h
- Xylol für 1:30 h
- Xylol für 1:30 h
- Xylol für 30 min
- Paraffin für 30 min
- Paraffin für 1 h
- Paraffin für 1 h

### **Entparaffinierungs- und Rehydrierungsprotokoll für Immunhistochemie- Präparate**

Erwärmung für ca. 40 min bei max. 68 °C im Wärmescrank

- Xylol für 2 x 5 min
- Äthanol 100% für 2 x 1 min
- Äthanol 96% für 2 x 1 min
- Äthanol 70% für 2 x 1 min
- H<sub>2</sub>O 2 x Spülung

## 2. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von der Fa. Fluka, Buchs (CH) bezogen.

### Chemikalien und Substanzen

Äthanol [C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O]

Aqua destillata und tridestillata [H<sub>2</sub>O]

Bleinitrat [Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

Calciumdichlorid [CaCl<sub>2</sub>]

DDSA (Dodecenybersteinsäureanhydrid) [C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>]

DMP 30 (2,4,6-Trisdimethylaminomethylphenol) [C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O]

EPON 812 (Kunstharz)

Fa. Plano, Wetzlar

Glutaraldehyd-Lösung 25%

Kalium-eisen-II-cyanid [K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>]

MNA (Methyl-endomethylen-

Tetrahydrophthalsäureanhydrid) [C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>]

Natriumcacodylat [C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsNaO<sub>2</sub>]

Natriumcitrat-Dihydrat [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> x 2 H<sub>2</sub>O]

Natriumhydroxid [NaOH]

Osmiumtetroxid [OsO<sub>4</sub>]

Fa. Plano, Wetzlar

Paraformaldehyd-Lösung 20%

Propylenoxid [C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O]

Rutheniumtetroxid [RuO<sub>4</sub>]

Fa. Plano, Wetzlar

Salzsäure [HCl]

Uranylacetat [C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>U]

### Puffer und Lösungen

#### **Karnovsky-Medium**

Ansatz für 50ml:

0,5 ml Paraformaldehyd-Lösung 20%

2,5 ml Glutaraldehyd-Lösung 25%

40 ml 0,2M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,3)

7 ml H<sub>2</sub>O

30 mg CaCl<sub>2</sub>

<b>Natriumcacodylatpuffer 0,2M</b>	32g Natriumcacodylat Ad 800 ml H <sub>2</sub> O Titrierung mit 0,1N HCl auf pH 7,3 Auffüllen mit H <sub>2</sub> O auf 950 ml pH-Kontrolle und ggf. Korrektur, pH-Wert 7,3
<b>Natriumcacodylatpuffer 0,133M</b>	100 ml 0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,3) Ad 50 ml H <sub>2</sub> O pH-Kontrolle, ggf. Korrektur, pH-Wert 7,3
<b>Osmiumtetroxid-Lösung</b>	10 ml Osmiumtetroxid 4% 30 ml 0,133M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,3) 200 mg Kalium-eisen-II-cyanid
<b>Rutheniumtetroxid-Lösung</b>	10 ml Rutheniumtetroxid 0,5% 10 ml 0,133M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,3) 100 mg Kalium-eisen-II-cyanid
<b>Uranylacetat-Lösung</b>	Lösung von Uranylacetat bei Raumtemperatur in 70% Äthanol/H <sub>2</sub> O bis zur Sättigung.
<b>Bleicitrat-Lösung</b>	1,33 g Bleinitrat 1,76 g Natriumcitrat-Dihydrat Ad 30 ml Aqua tridest 30 min auf dem Magnetrührer mischen 0,8 ml 10N Natriumhydroxid hinzufügen bis Erreichen eines pH-Wertes von ca. 12 Auffüllen mit Aqua bidest auf 50 ml Lagerung im Gefrierschrank bei -20 °C
<b>Harzgemisch</b>	Lösung A: 29,4 g EPON 812 + 21,8 g DDSA Lösung B: 27,4 g EPON 812 + 24,4 g MNA

Lösung A und B jeweils 30 min auf dem  
Magnetrührer mischen  
Zusammengeben, erneut 30 min rühren  
Mit 1,8 g des Härtingsbeschleunigers DMP  
30 versetzen  
30 min rühren, Lagerung bei  $-20\text{ °C}$

**Dehydrierungsprotokoll für TEM-Präparate:**

- Äthanol 50% für 2 x 10 min
- Äthanol 70% für 2 x 10 min
- Äthanol 95% für 2 x 5 min
- Äthanol 100% für 4 x 20 min
- Propylenoxid für 2 x 5 min
- Harz/Propylenoxid (1:1) für 1 h
- Harz/Propylenoxid (2:1) für 1 h
- Harz für 1 h
- Harz für 1 h

### **VIII. Danksagung**

Mein wesentlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Regina Fölster-Holst für die Überlassung des Themas sowie für die hervorragende Kooperation bei der Erstellung dieser Arbeit. Weiterhin gilt Herrn Dr. med. Jens-Michael Jensen mein besonderer Dank für die gute Betreuung im Rahmen der Studiendurchführung.

Ebenfalls möchte ich Frau Claudia Neumann, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ehrhardt Proksch sowie den Assistenzärzten der Neurodermitisambulanz der Universitätshautklinik Kiel danken, die mir immer zur Seite standen.

Des weiteren gilt mein Dank den Studienteilnehmern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Familie, insbesondere meinen Großeltern, möchte ich für die liebevolle Unterstützung und Ermunterung während meines Studiums und der Erstellung dieser Arbeit danken.

**IX. Lebenslauf****Persönliche Daten:**

Name: Magdalena Witt  
 Geburtsdatum/Ort 15.06.1983 / Leimen  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

**Schulbildung:**

1989 - 1993 Grundschule Rohrbach  
 1993 - 2002 Gymnasium Eppingen  
 2002 Abitur

**Studium:**

2002 - 2004 Vorklinisches Studium an der Ruprecht-Karls-  
 Universität Heidelberg  
 02.09.2004 Ärztliche Vorprüfung in Heidelberg  
 2004 - 2008 Klinisches Studium an der Christian-Albrechts-  
 Universität Kiel  
 05/2005 Beginn der Studiendurchführung für die  
 vorliegende Dissertation  
 16.12.2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Kiel

**Praktisches Jahr:**

08/2007 – 10/2007 Chirurgie, Westküstenklinikum Heide  
 10/2007 – 12/2007 Chirurgie, Kantonsspital Sursee-Wolhusen,  
 Wolhusen, Schweiz  
 12/2007 – 04/2008 Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Kiel,  
 I.medizinische Klinik  
 04/2008 – 07/2008 Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus  
 Kiel

**Ärztliche Tätigkeit:**

05/2009 – 06/2010 Assistenzärztin in der Kompass-Klinik Kiel

10/2010 – 12/2010      Assistenzärztin in der Klinik für Dermatologie und  
Venerologie, UKSH Campus Kiel

**Publikationen:**

Jensen JM, Pfeiffer S, Witt M, Bräutigam M, Neumann C, Weichenthal M, Schwarz T,  
Fölster-Holst R, Proksch E

*Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients  
with atopic dermatitis.*

J Allergy Clin Immunol 2009; 124(3 Suppl 2): R19-28

**Fremdsprachen:**      Englisch, Französisch

Kiel, den 11.12.2010

Magdalena Witt