

Aus der Abteilung für Dermatologie und Venerologie
der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg
Albert Ludwigs Universität Freiburg im Breisgau



Behandlung aktinischer Keratosen mit Birkenoleogel- eine klinische Phase 2a- Studie mit histologischen Untersuchungen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2008

von Mirko Rödiger

geboren in Köln

Dekan: _____ Prof. Dr. C. R. Peters _____

1.Gutachter: _____ Prof. Dr. med. Dipl. Biol. C. Schempp _____

2.Gutachter: _____ Prof. Dr. med. S. Ehl _____

Jahr der Promotion: _____ 2008 _____

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aktinische Keratosen	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Hauptrisikofaktor: Ultraviolettes Licht	3
1.1.3	Klinik und Histologie	6
1.2	Klinische Studie mit Birken- Oleogel	7
1.3	Histologie und untersuchte molekulare Marker	9
1.3.1	Cyclooxygenase-2	9
1.3.2	Ki67	11
1.3.3	S-100 und CD1a	11
2	Fragestellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Klinische Studie	15
3.1.1	Studiendesign	15
3.1.2	Einschluss- und Ausschlusskriterien Patienten	15
3.1.3	Durchführung der Studie	17
3.1.4	Zielkriterien und Auswertung	17
3.2	Experimenteller Teil	18
3.2.1	Zelllinien	18
3.2.2	Zellkultur	19
3.2.3	Vorbereitung der Zellen für die UVB- Bestrahlung	20
3.2.4	UVB- Bestrahlung der Zellen	21
3.2.5	Vorbereitung der Zellen für den Cytospin	22
3.2.6	Durchführung des Cytospins	22
3.2.7	Vorbereitung der Paraffinschnitte	23
3.2.8	Immunhistologische Färbung	24
3.2.9	Kernfärbung	26
3.2.10	Fotodokumentation	26
3.2.11	Vorbehandlung und Evaluation der Biopsien	26
3.3	Verwendete Gebrauchsmaterialien	27
3.4	Geräte	28
3.5	Medien und Reagenzien	28
3.6	Antikörper	29

4	Ergebnisse	31
4.1	Ergebnisse der klinischen Studie	31
4.1.1	Hauptzielkriterium Wirksamkeit.....	31
4.1.2	Nebenzielkriterium Verträglichkeit.....	33
4.2	Etablierung von Färbungen ausgewählter molekularer Marker.....	34
4.2.1	COX-2: Färbung und Nachweis der Induktion durch UV- Licht.....	34
4.2.2	Ki67: Färbung	39
4.3	Histologische Färbungen der Biopsien.....	40
4.3.1	HE- Färbung.....	40
4.3.2	Ki67- Färbung	43
4.3.3	COX-2 Färbung.....	46
4.3.4	S-100 und CD1a- Färbungen.....	49
5	Diskussion	54
6	Zusammenfassung	69
7	Literaturverzeichnis	70
8	Danksagung	79
9	Lebenslauf	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: aktinische Keratosen	1
Abbildung 2: Spinaliom präaurikulär links.....	2
Abbildung 3: Eindringtiefen der UV-Strahlung in die Epidermis	4
Abbildung 4: Bildung des Pyrimidin- Pyrimidon 6,4- Photoprodukts.....	4
Abbildung 5: Bildung eines Thymin dimers	5
Abbildung 6: Cortex der Betula pendula.....	7
Abbildung 7: Strukturformel des Betulins und der Betulinsäure	8
Abbildung 8: Entstehung der Prostaglandine	9
Abbildung 9: Bestrahlung der Zellen	21
Abbildung 10: Cytospin.....	22
Abbildung 11: Einspannen des Cytofunnel in den Cytoclip	23
Abbildung 12: Ansprechraten in % der Patienten nach Responder.....	31
Abbildung 13: Ansprechraten in % der Patienten nach Abheilung	31
Abbildung 14: Einzelverläufe nach klinischem Score vor und nach der Studie	32
Abbildung 15: Verlaufsbilder Patient 18, Studienarm 1, rechter Handrücken.....	33
Abbildung 16: Verlaufsbilder Patient 10, Studienarm 1, linke Schläfe.....	34
Abbildung 17: Verlaufsbilder Patient 16, Studienarm 3, Unterarm	34
Abbildung 18: HaCaT unbestrahlt, COX-2 DCS 1:50	36
Abbildung 19: HaCaT bestrahlt, COX-2 DCS 1:50	36
Abbildung 20: HaCaT unbestrahlt, COX-2 Santa Cruz 1:500.....	37
Abbildung 21: HaCaT bestrahlt, COX-2 Santa Cruz 1:500.....	37
Abbildung 22: HaCaT unbestrahlt, COX-2 Santa Cruz 1:1000.....	38
Abbildung 23: HaCaT bestrahlt, COX-2 Santa Cruz 1:1000.....	38
Abbildung 24: Jurkat, IgG-Rabbit, 1:200, Negativkontrolle	39
Abbildung 25: Jurkat, Ki 67 1:200.....	39
Abbildung 26: 5.1 Aktinische Keratose vor Behandlung.....	41
Abbildung 27: 5.2 Aktinische Keratose nach 3monatiger Behandlung mit Oleogel..	41
Abbildung 28: 4.1 Aktinische Keratose vor Behandlung.....	43
Abbildung 29: 4.2 Aktinische Keratose nach 3monatiger Behandlung mit Oleogel..	43
Abbildung 30: COX-2 Färbung vor Birkenoleogel- Behandlung	46
Abbildung 31: COX-2 Färbung nach 3 monatiger Birkenolegel- Behandlung.....	46
Abbildung 32: 4.1, S-100 Färbung vor Birkenoleogel Behandlung.....	49
Abbildung 33: 4.2, S-100 Färbung nach Birkenoleogel Behandlung	49

Abbildung 34: 4.1, CD1a Färbung, vor Behandlung mit Birkenoleogel	50
Abbildung 35: 4.2, CD1a Färbung, nach Behandlung mit Birkenoleogel.....	50
Abbildung 36: Regulation der Cyclooxygenase-2.....	62
Abbildung 37: Imiquimod als Ligand für Toll- Like Rezeptoren	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich COX-1, COX-2.....	10
Tabelle 2: Beispiel für eine Verdünnungsreihe.....	25
Tabelle 3: Auswertung von Biopsien in der HE-Färbung.....	42
Tabelle 4: Auswertung von Biopsien in der Ki 67-Färbung.....	45
Tabelle 5: Auswertung von Biopsien in der COX-2-Färbung.....	48
Tabelle 6: Auswertung von Biopsien in der S-100-Färbung.....	52
Tabelle 7: Auswertung von Biopsien : Vergleich S-100 / CD 1a – Färbung.....	53

1 Einleitung

1.1 Aktinische Keratosen



Abbildung 1: aktinische Keratosen (aus Cancer of the Skin, 2005)

Es zeigen sich an beiden Handrücken wenige Millimeter große, hyperkeratotische, teils leicht schuppende Papeln auf dem Boden von umschriebenen erythematösen Makulae. Die Hautveränderungen entsprechen dem Bild eines langjährigen, chronischen Sonnenschadens der Haut.

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Aktinische Keratosen (AK) sind in der Literatur definiert als Proliferation zytologisch atypischer Keratinozyten im Bereich der epidermodermalen Junctionszone in chronisch lichtgeschädigter Haut (Babilas et al, 2003). AK stellen eine Präkanzerose des spinözellulären Karzinoms (Spinaliom) dar (Hurwitz und Monger, 1995). AK sind eine häufige Erkrankung der Haut, bei der ein klarer Zusammenhang zwischen chronischer UVA/UVB Lichtexposition und Genese besteht (Moy, 2000). Epidemiologische Studien berichten von einer Prävalenz der AK in der nördlichen

Hemisphäre von 15 % der über 40jährigen (Memon et al, 2000). Das heißt, dass in Deutschland rund 10 Millionen Menschen von AK betroffen sind. Amerikanische Studien zeigen eine Prävalenz von 11 % der über 20jährigen und 25 % der über 30jährigen Amerikaner (Frost und Green, 1994). Hellhäutige, blauäugige Individuen haben bei chronischer Sonnenlichtexposition ein deutlich erhöhtes Risiko aktinische Keratosen zu entwickeln, im Gegensatz zu dunkel pigmentierten Individuen, bei denen praktisch keine aktinischen Keratosen beobachtet werden (Memon et al, 2000). Bei etwa 10 % aller Patienten mit aktinischen Keratosen und etwa 30 % der Patienten mit zusätzlicher Immunsuppression wird im weiteren Verlauf das Auftreten eines invasiven Plattenepithelkarzinoms der Haut beobachtet. Dies bedingt die Indikation für eine Behandlung aktinischer Keratosen (Glogau 2000).



Abbildung 2: Spinaliom präaurikulär links (aus Cancer of the Skin, 2005)

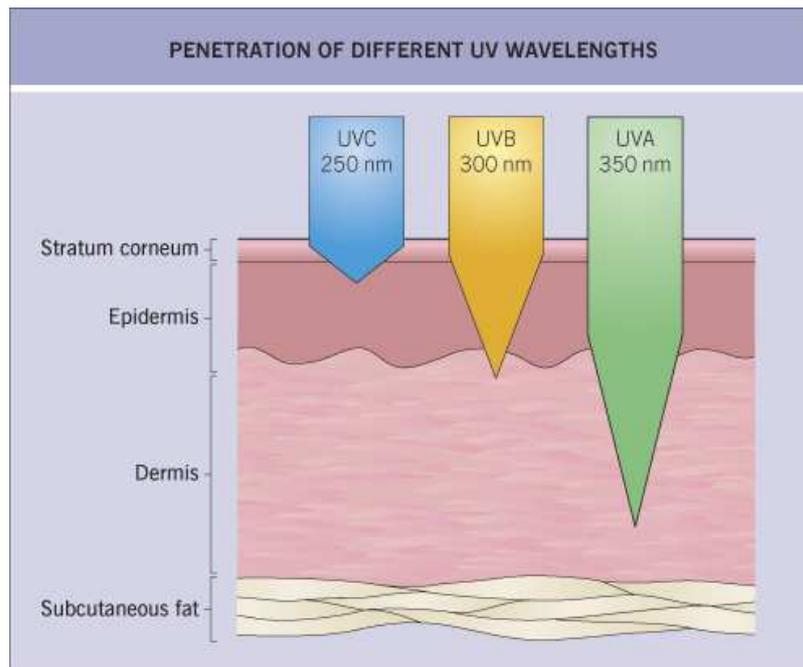
Es zeigen sich links präaurikulär zum einen, eine ca 1cm große rund-ovale, ulzerierte, hautfarbene Hautveränderung mit abgeblasstem Randwall und diskreten Teleangiectasien in der Umgebung und zum anderen, ein ca 1 cm ovaler verruköser, derber, fleischiger Knoten. Die Hautveränderungen stellen Spinaliome dar, jenen Krebs, der aus aktinischen Keratosen hervorgehen kann.

1.1.2 Hauptrisikofaktor: Ultraviolettes Licht

Das elektromagnetische Spektrum des Lichts reicht von UVC, mit sehr kurzwelliger Strahlung (<290 nm) bis Infrarot mit sehr langwelliger Strahlung (>700nm). Ultraviolett- B (290-320 nm), Ultraviolett- A (320- 400 nm) und Ultraviolett- C (200-290 nm) Strahlen können sowohl die DNA schädigen als auch weitere negative Auswirkungen auf zelluläre Strukturen und Funktionen haben. Am bedeutendsten in der Entstehung Licht- induzierten Hautkrebses sind UVA- und UVB- Strahlung. UVC- Strahlung wird von der Ozonschicht absorbiert und erreicht dementsprechend nur zu einem geringen Teil die Erdoberfläche (Cancer of the Skin, 2005).

UVB- Strahlung verursacht Mutationen und Immunsuppression, die bedeutend für die Karzinogenese sind. Der DNA- Schaden führt zu Veränderungen in der Onkogen und Tumorsuppressor- Genexpression. Die immunmodulatorischen Effekte entstehen durch die Induktion der Apoptose, durch die Expression von Zelloberflächenrezeptoren und durch die Produktion von löslichen Botenstoffen. Beispiele sind die Abnahme der Anzahl an Langerhans Zellen in der Epidermis und die negative Modifikation ihrer Antigen- präsentierenden Eigenschaften (Meunier et al, 1998). Außerdem hat eine Studie gezeigt, dass durch systemische Effekte der UVB- Strahlung die natürlichen Host- Kontroll- Mechanismen derart beeinflusst werden, dass es zur Krebsentstehung an entfernten Orten kommen kann (Strickland et al, 1985). Nicht außer Acht gelassen werden sollte die Aktivierung der Phospholipase A (1, 2) und der Lysophospholipase, die Auswirkungen auf die UVB- induzierte Entzündung und das Zellwachstum haben (DeLeo et al, 1988).

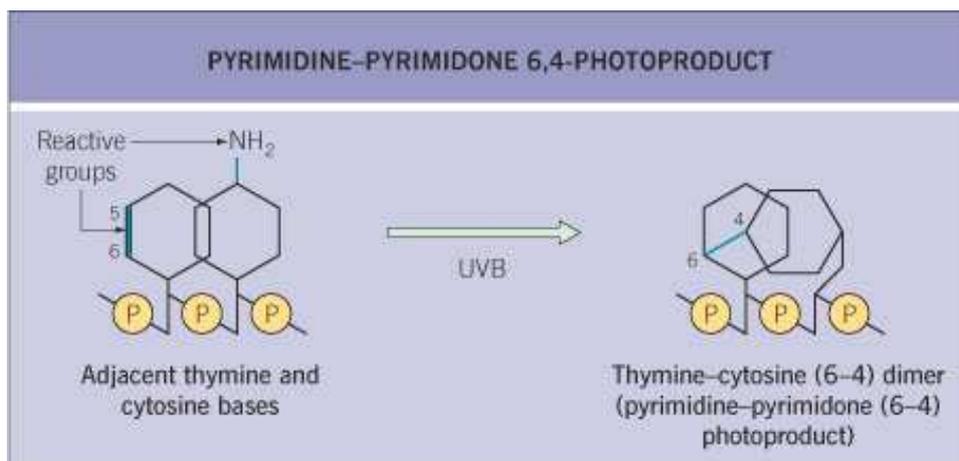
Die UVB- Effekte beschränken sich primär auf die Epidermis und beinhalten eine sehr typische Veränderung der DNA. Das ultraviolette Licht wird von Pyrimidin- Basen absorbiert und bewirkt die Entstehung von Thymidin- Dimeren, die die beiden DNA- Stränge quervernetzen. Diese Veränderungen der DNA stellen meist den Beginn der Karzinogenese dar (Peak et al, 1987).



© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini: Dermatology - www.dermtext.com

Abbildung 3: Eindringtiefen der UV-Strahlung in die Epidermis (aus Cancer of the Skin, 2005)

Dargestellt sind die verschiedenen Eindringtiefen des UVA-, UVB- und UVC- Lichts. Das UVA- Licht dringt mit seiner langwelligen Strahlung bis in die tiefen Dermis-schichten und somit von den drei Wellenlängen am tiefsten ein. Dort bewirkt es vor allem eine vorzeitige Hautalterung, was sich in einer solaren Elastose darstellt. Das UVB- Licht dringt bis in die Epidermis ein und führt dort zu charakteristischen Strangbrüchen und Mutationen der DNA. Die UVC- Strahlung schädigt als kurzwelliges Licht am potentesten, wird jedoch zum größten Teil von der Ozonschicht absorbiert.

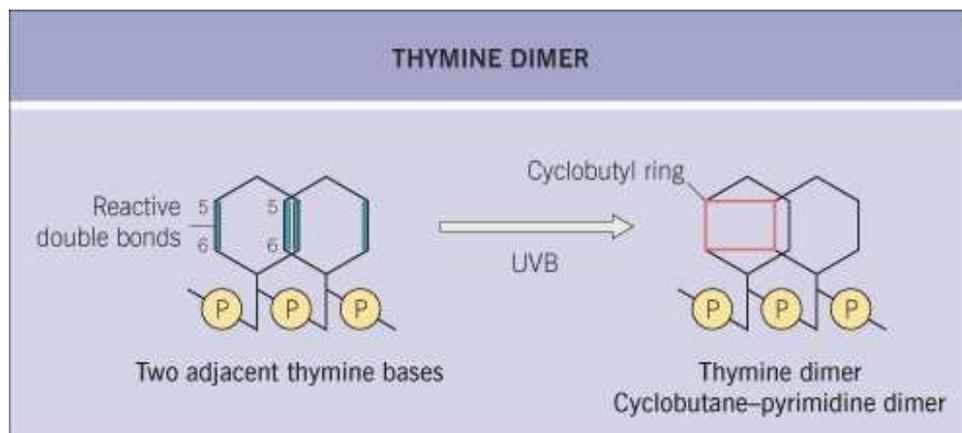


© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini: Dermatology - www.dermtext.com

Abbildung 4: Bildung des Pyrimidin- Pyrimidon 6,4- Photoprodukt, ein Thymin-Cytosin- Dimer (aus Cancer of the Skin, 2005)

Durch UVB- Licht kommt es zwischen 2 nebeneinander liegenden Thymin- Basen über die Interaktion reaktiver Gruppen zu einer Mutation, die als Thymin- Cytosin- Dimer bezeichnet wird.

Unreparierte oder fehlerhaft reparierte Pyrimidin- Dimere führen zu typischen Mutationen. In solchen Mutationen wird Cytosin zu Thymin umgewandelt, häufig wenn 2 Cytosine nebeneinander liegen, oder wenn ein Cytosin neben einem Thymin liegt. Diese Mutationen werden auch als der Fingerabdruck der UVB- Strahlung bezeichnet (Cancer of the Skin, 2005).



© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini: Dermatology - www.dermtext.com

Abbildung 5: Bildung eines Thymin-Dimers (aus Cancer of the Skin, 2005)

Bei zwei nebeneinander liegenden Thymin-Basen kann UVB- Licht zur Bildung eines Cyclobutyl-Rings und somit zu einem Thymin- Dimer führen, welches eine weitere typische Sonnenlicht-induzierte Mutation der DNA darstellt.

Neben der direkten Schädigung der DNA, kommt es zur indirekten Schädigung durch Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. Wasserstoffperoxid, Superoxid- Anionen oder Sauerstoff als solchem. Sie verursachen Einzelstrangbrüche in der DNA (Peak et al, 1987 und 1989), Purin- Basen Modifikationen (Runger et al, 1995) und Alkali- labile Stellen (Danpure und Tyrrell, 1976).

Die UVA- Strahlung macht 90-95% der Strahlung aus, die auf die menschliche Haut trifft und ist somit, auch wenn sie nicht so effizient schädigt wie die UVB- Strahlung, ein wichtiger Kofaktor bei der Entstehung von Hautkrebs. Sie dringt sowohl in die Epidermis als auch in die Dermis ein (Krutmann, 2001). Sie wirkt ebenfalls über reaktive Sauerstoffspezies, Hauptkomponente ist das hoch mutagene 8-Hydroxyguanin, was zu einer persistenten Instabilität des Keratinozytengenoms führt (Phillipson et al, 2002). Weitere Effekte sind die Aktivierung der Phospholipase (Hanson und DeLeo, 1990), die vermehrte Produktion der Arachidonsäure, die erhöhte Aktivität der Cyclooxygenase-2 (Hanson und DeLeo, 1989) und die

Aktivierung der Proteinkinase C (Matsui und DeLeo, 1990). UVA bricht vorübergehend Gap Junctions in Keratinozyten (Provost et al, 2003).

1.1.3 Klinik und Histologie

Aktinische Keratosen manifestieren sich als rauhe, schuppige Maculae, Papeln oder Plaques, die hautfarben bis rötlich oder rötlich- braun imponieren. Die Größe kann dabei von etwa einem Millimeter bis zu etwa zwei Zentimeter im Durchschnitt reichen. Klinisch werden verschiedene Subtypen unterschieden, die auch histologisch unterschiedliche Merkmale zeigen. Unterschieden werden können der hyperkeratotische, der atrophische, der bowenoide, der Cornu- Cutaneum- artige und der pigmentierte Typ. Aktinische Keratosen treten nahezu ausschließlich in UV-exponierten Hautarealen auf, insbesondere an Kopf und Hals, Dekolleté, Armen, Handrücken, sowie am Lippenrot, hier als Cheilitis actinica. Sie treten oft multipel in größeren Arealen auf.

In der Histologie sind die frühen Veränderungen durch eine Vermehrung basaler Keratinozyten (Crowding Phänomen) und den Nachweis einzelner atypischer Keratinozyten in der basalen Zone gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf beobachtet man atypische Keratinozyten in höheren Epidermislagen und schließlich findet man eine Beteiligung der gesamten Epidermis. Dyskeratotische Zellen und Mitosen findet man häufig. Charakteristisch ist auch das Vorliegen einer alternierenden Ortho- und Parakeratose (Flaggenzeichen). Die Epidermis zeigt häufig eine unregelmäßige Hyperplasie mit in das Stratum papillare reichenden Knospen; manchmal findet man eine Atrophie der Epidermis mit schmalen Stratum Corneum oder auch eine Hyperkeratose wie beim Cornu Cutaneum. Eine übermäßige basale Hyperpigmentierung wird bei der pigmentierten atinischen Keratose beobachtet. In der oberen Dermis liegen meist eine ausgeprägte solare Elastose und lymphozytäre Infiltrate vor (Ackerman 2003, Cockerell 2000, Fu und Cockerell 2003).

1.2 Klinische Studie mit Birken- Oleogel



Abbildung 6: Cortex der Betula pendula

Der Birkenkork beinhaltet in großer Menge pentazyklische Triterpene vom Olean- und Lupantyp. Zu den Lupantriterpenen gehört das Betulin, welches bis zu 34% des Trockengewichtes des Birkenkorks ausmacht.

Aufgrund der Tatsache, dass aktinische Keratosen eine obligate Präkanzerose darstellen, sollte unbedingt eine Therapie erfolgen. Diese erfolgt üblicherweise mit Laser, Kryotherapie oder dem Auftragen von zytostatischen oder immunmodulierenden Cremes.

Birken-Oleogel ist eine konzentrierte Version eines neuen, zunächst kosmetisch verwendeten Präparates zur intensiven Pflege von trockener, zu Entzündungen neigender Haut. Es enthält Birkenkork-Trockenextrakt mit den Inhaltsstoffen Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Erythrodiol und Lupeol, sowie weiteren Triterpenen.

Für diese Stoffe ist eine Vielzahl von Wirkungen beschrieben: sie wirken antiviral, antibakteriell, antimykotisch, antientzündlich, antiproliferativ und antikanzerogen (Del Carmen RM 1998, Hayek 1989, Jay 2000, Mellanen et al. 1996, Metz 2000, Miura 1999, Sheth 1973, Yasukawa et al 1991). Besonders die letzten Wirkungen sind für den Einsatz bei aktinischen Keratosen interessant.

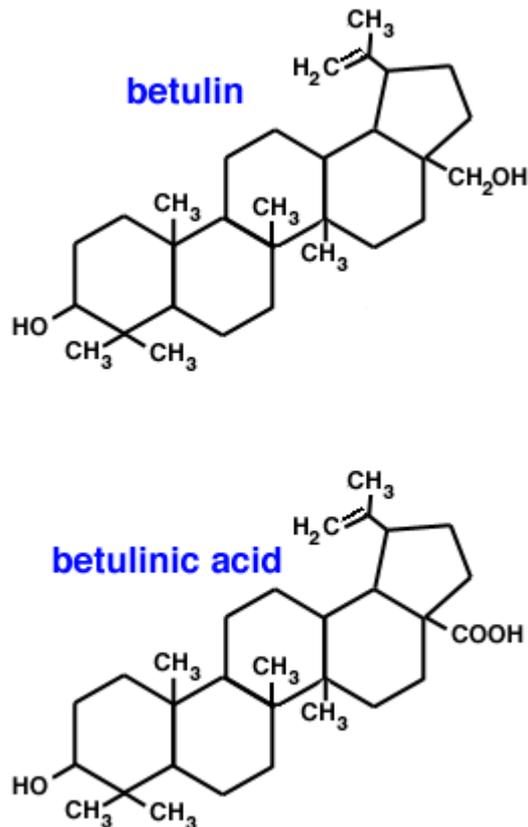


Abbildung 7: Strukturformel des Betulins und der Betulinsäure

Für die Triterpene Betulin und Betulinsäure sind antivirale, antibakterielle, antimykotische, antiproliferative, antientzündliche und antikanzerogene Wirkungen beschrieben.

Betulin, das den Hauptanteil der Inhaltsstoffe des Birkenkorks ausmacht, hat antientzündliche (Del Carmen RM 1998, Hayek 1989, Jay 2000) und antitumorogene Wirkungen (Sheth 1973, Hua 1991, Kahlos 1987). Auch für Betulinsäure sind antikanzerogene Wirkungen belegt (Hua 1991, Baglin 2003, Fulda et al. 1999). Lupeol und Oleanolsäure besitzen ebenfalls antientzündliche und antiproliferative Effekte (Metz 2000, Sheth 1973, Yasukawa et al. 1991, Baskar 1996, Fernandez 2001, Geetha 1998, Giner-Larza et al. 2001, Moriarity et al. 1998, Wang 1996, Ying et al. 1991). In vitro- Experimente zeigten, dass Betulinsäure Apoptose bei Melanom-Zellen induzieren kann (Chowdhury 2002). Sie ist selektiv zytotoxisch für Tumorzell-Linien (Fulda et al. 1999, Fulda et al. 2000), normale Zellen werden nicht beeinträchtigt. Außerdem ist eine Hemmung der Tumor- Angiogenese durch Betulinsäure beschrieben (Kwon 2002). In vivo- Versuche am Mausmodell zeigten eine Hemmung von Tumorpromotoren durch Betulinsäure und Oleanolsäure.

Im Birken-Oleogel liegen alle beschriebenen Inhaltsstoffe erstmals in ausreichend hoher Konzentration vor (10% Trockenextrakt mit ca. 80 % Betulin, >95% Gesamttriterpenoidgehalt). Bereits bei der Empfehlung der Birkencreme an Patienten mit trockener, schuppender Haut konnte ein Rückgang der aktinischen Keratosen beobachtet werden (Huyke et al. 2006). Eine offene Anwendungsbeobachtung (Votum der Ethikkommission 115/04) mit 15 Patienten konnte diese Einzelerfahrungen bestätigen. Die Wirkung des Birken-Oleogels auf aktinische Keratosen soll nun in dieser Studie klinisch und immunhistologisch untersucht werden.

1.3 Histologie und untersuchte molekulare Marker

1.3.1 Cyclooxygenase-2

Ultraviolettes (UV) Licht bewirkt in der Haut zunächst eine Entzündung, ein Erythem, bei dessen Entstehung eine Reihe proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. Prostaglandine und Leukotriene beteiligt sind (Filipe et al, 1995; Hruza und Pentland, 1993).

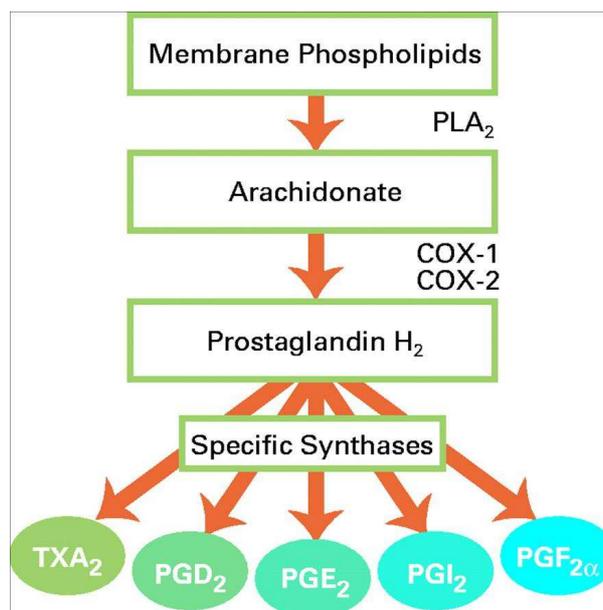


Abbildung 8: Entstehung der Prostaglandine (aus Journal of clinical oncology, 2005, vol 23, num 2)

Chronische Sonnenlichtexposition führt zum gehäuften Auftreten von Prostaglandinen, die ihrerseits mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden. Die Synthese erfolgt, nach Abspaltung von Arachidonsäure durch die Phospholipase A2, über die Cyclooxygenase 1 und 2.

Das gehäufte Auftreten von Prostaglandinen, induziert durch UV-Licht, wird mit der erhöhten Aktivität der Phospholipase A2 erklärt, die die Verfügbarkeit von Arachidonsäure erhöht (Gresham et al, 1996; Punnonen et al, 1987). Der nächste Schritt bei der Synthese der Prostaglandine ist die enzymatische Umwandlung der Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase.

Diese baut molekularen Sauerstoff in die Arachidonsäure ein, welche daraufhin ein instabiles Intermediat, das PGG₂ bildet. Dieses Intermediat konvertiert schnell zu PGH₂, welches durch verschiedene Isomerasen in die einzelnen Prostaglandine und das Thromboxan umgewandelt wird (Löffler und Petrides, 2003). Die Cyclooxygenase (COX) kommt in 2 Isoformen vor, der COX-1 und der COX-2 (Feng et al, 1993). Diese beiden Enzyme unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht (Smith et al, 2000). Die COX-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert und übernimmt die Produktion von Prostaglandinen, die physiologische Funktionen übernehmen, wie die Aufrechterhaltung der bikarbonatreichen Schutzschicht der Magenschleimhaut, die Beeinflussung der renalen Durchblutung und die Thrombozytenaggregation (Löffler und Petrides, 2003). Demgegenüber wird die COX-2 in den meisten Geweben unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert. Sie wird jedoch schnell durch inflammatorische und mitogene Stimuli induziert, was zu einer erhöhten Konzentration von Prostaglandinen in neoplastischen und entzündlichen Geweben führt (Subbaramaiah et al, 1996). Vermehrte Expression von COX-2 findet sich sowohl in prämaligen als auch in malignen Geweben (Buckmann et al, 1998).

Tabelle 1: Vergleich COX-1, COX-2

	COX-1	COX-2
Expression	Konstitutiv, unter physiologischen Bedingungen	induziert durch inflammatorische und mitogene Stimuli
Lokalisation	Verschiedene Gewebe, u.a. Magen, Niere	Entzündliche und neoplastische Gewebe
Funktion	-Schutzschicht Magen -renale Durchblutung -Thrombozytenaggregation	Entzündungsreaktion

1.3.2 Ki67

Das Ki67- Antigen ist ein Proliferationsmarker. Es färbt die Zellen im Gewebe an, die sich vermehren, die sogenannte Wachstumsfraktion. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2 und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0- Phase befinden, exprimieren das Ki67- Antigen nicht. Die Färbung für Ki67 gibt also mittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors und ist deshalb in der Routinediagnostik wichtig. Ebenso in der Entscheidung zwischen benignen, präneoplastischen und malignen Veränderungen, kann die Darstellung des Ki67- Antigen hilfreich sein (Brown und Gatter, 2002).

1.3.3 S-100 und CD1a

S-100 gehört zu den Calcium-bindenden Proteinen. Es ist an der Regulation intrazellulärer Prozesse wie Zellwachstum, Zellzyklus-Regulation, Transkription und Differenzierung beteiligt. S-100 Proteine werden relativ gewebespezifisch von Zellen neuraler Herkunft, Melanomzellen (Heizmann et al, 2002) und auch dendritischen Zellen exprimiert (Coppola et al, 1998). Der Antikörpernachweis für S-100 ist für den Nachweis dendritischer Zellen in paraffinierten Gewebeschnitten etabliert (Hammar et al, 1986).

Außer dendritischen Zellen werden Ependymzellen, Gliazellen und diverse Tumoren des Gehirns, Schwann-Zellen des PNS, diverse Speicheldrüsentumore, melanozytäre Hauttumore und Metastasen des Melanoms durch S-100 angefärbt (Moore, 1965). Die Unterscheidung dendritischer Zellen von anderen evtl. gefärbten Geweben ist jedoch durch ihre charakteristische Form der dendritischen, zytoplasmatischen Ausläufer, die Verteilung als einzelne abgrenzbare Zellen und die kräftige Anfärbung von Zellkern und Zytoplasma zu treffen (Schaller, 2005).

CD1a ist ein Oberflächenantigen epidermaler Langerhanszellen (Rowden, 1977), welches die Präsentation nicht-peptiden Antigens T-Zellen gegenüber vermittelt (Mizumoto und Takashima, 2004). Unter den dendritischen Zellen, wird CD1a von Langerhanszellen spezifisch exprimiert (Fithian et al, 1981). Es stellt somit einen molekularen Marker dar, der bei der histologischen Identifizierung von Langerhanszellen hilft.

Dendritische Zellen gehören zur zellulären Komponente angeborener Immunität und

umfassen ein System Antigen präsentierender Zellen (APC) mit entscheidenden immunstimulatorischen und -modulatorischen Fähigkeiten. Die dendritische Zellpopulation der Haut sind die Langerhans- Zellen, erstmalig beschrieben von Paul Langerhans (Langerhans, 1868).

Aufgaben und Funktionen der dendritischen Zellen sind die Aufnahme, Prozessierung, Transport und Präsentation von Antigenen. Diese werden je nach Reifungsgrad der Zelle ausgeführt. Unreife dendritische Zellen nehmen Antigene auf. Dies geschieht durch Mechanismen wie Pinocytose oder Makropinocytose, rezeptorvermittelter Aufnahme via Fc-Rezeptoren und Lektine wie dem Makrophagen Mannose-Rezeptor (MMR) (Sallusto et al, 1995), oder Phagozytose von Mikroben und Zelldetritus (Albert et al, 1998). Durch Aufnahme von Antigen, bzw. bestimmten aufgenommenen Substanzen reift die dendritische Zelle. Mit zunehmender Reifung verlieren die dendritischen Zellen die Fähigkeit der Endocytose und ändern ihre Gestalt (Honig, 2005). Von großer Bedeutung für die Antigenpräsentation sind die Major-Histokompatibilitäts-Moleküle der Klasse II (MHC II), an die Antigene gebunden werden und die typisch für Antigen-präsentierende Zellen (APC) sind (Mohty und Gaugler, 2003). Dendritische Zellen besitzen im Gegensatz zu anderen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) deutlich mehr MHC-II und verfügen über Mechanismen, welche die Antigenaufnahme und die Expression über MHC-II noch verstärken können (Mahnke et al, 2000).

Außerdem können dendritische Zellen Fremdantigene auf MHC-I Molekülen präsentieren. Auf MHC-I Molekülen werden normalerweise nur zelleigene Antigene präsentiert, oder von der Zelle selbst hergestellte Substrate. Die Präsentation zellfremder Substrate oder Immunkomplexe auf MHC-I Molekülen stellt eine Besonderheit dar (Albert et al, 1998; Rodriguez et al, 1999; Regnault et al, 1999). Da dendritische Zellen die Fähigkeit besitzen Antigene auf beiden MHC Typen zu präsentieren, aktivieren sie sowohl MHC-II abhängige CD-4 Lymphozyten als auch MHC-I abhängige CD8- Lymphozyten.

Mit wachsendem Reifungsgrad verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme und steigern sowohl ihre Präsentation auf MHC als auch die Expression costimulatorischer Moleküle, die eine spätere T-Zell Aktivierung ermöglichen. Nach der Antigenaufnahme beginnen die Zellen über die Lymphe (Veiled Cells) oder das Blut in die sekundär lymphatischen Organe zu wandern (Brand et al, 1995; Larsen et al, 1990). Dort erfolgt der Kontakt mit den T-Lymphozyten in den parakortikalen Zonen (T-Zellregion) der Lymphknoten, oder den

periarteriellen Lymphozytenscheiden der Milz und die Induktion einer Immunantwort. Aktivierte dendritische Zellen (interdigitierende dendritische Zellen) haben das Potential, naive T- Zellen zu stimulieren, da sie außer MHC Molekülen auch costimulatorische Moleküle wie z.B. CD 40 und B7 an ihrer Oberfläche exprimieren (Van Kooten und Banchereau, 1997). Über MHC-II werden Th- Zellen aktiviert, die wiederum weitere immunologische Reaktionen einleiten, wie z.B. die Antikörperproduktion durch B- Zellen oder eine Makrophagen-Aktivierung. Über MHC-I Moleküle werden zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert, die direkt infizierte Zellen abtöten können.

Dendritische Zellen sind eine heterogene Zellpopulation, die in der Lage sind, ein breites Spektrum von Pathogenen als Antigene aufzubereiten und in einem wachsenden Reifungsprozess durch Migration in lymphatische Organe zu transportieren, um sie dort auf MHC Klasse-I und -II Molekülen den dortigen T und B Lymphozyten zu präsentieren. Daraus resultierend ergibt sich die immunstimulatorische und immunmodulatorische Funktion dieser Zellen.

2 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte die Wirksamkeit einer Behandlung aktinischer Keratosen mit einem innovativen Birken-Oleogel untersucht werden. Außerdem wurden histologische Färbungen für die Beurteilung des Therapieerfolges etabliert.

Hierzu wurde eine monozentrische, randomisierte, dreiarmlige vergleichende Studie durchgeführt. In dieser Studie erhielten 45 Patienten mit aktinischen Keratosen eine Behandlung mit Birken-Oleogel (n=15), eine Behandlung mit Kryotherapie (n=15), oder eine Kombinationsbehandlung mit Kryotherapie plus Birken-Oleogel (n=15). Die Behandlung wurde über drei Monate durchgeführt.

Primäres Studienziel war die Ermittlung der Wirksamkeit von Birken-Oleogel bei der Behandlung von aktinischen Keratosen. Nebenzielkriterien waren das kosmetische Ergebnis und die Verträglichkeit von Birken-Oleogel durch die Erfassung objektiver Parameter (Erythem, Schuppung, palpable Rauigkeit) und subjektiver Parameter (Juckreiz, Brennen unter Therapie). Ergänzend wurden bei 8 Patienten Verlaufsbiospien aus den behandelten Arealen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Die histologischen Färbungen für COX-2, Ki67, S-100 und CD1a wurden, soweit notwendig, zuvor an Zellkulturen etabliert, um das wertvolle Biopsiematerial zu schonen. Mit der histologischen Untersuchung der Biospien sollten geeignete Marker für die histologische Beurteilung des Therapieerfolges etabliert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Klinische Studie

3.1.1 Studiendesign

Die Studie war monozentrisch, prospektiv, vergleichend, 3armig, randomisiert und umfasste ein Kollektiv von 45 Patienten mit aktinischen Keratosen. Das Studiendesign entsprach dem einer klinischen Phase 2a- Studie.

3.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien Patienten

Einschlusskriterien

Als spezielle Einschlusskriterien galten:

- Erwachsene männliche und weibliche Patienten mit < 10 klinisch oder histologisch diagnostizierten aktinischen Präkanzerosen.

Als allgemeine Einschlusskriterien galten:

- Keine Geschäftsunfähigkeit oder andere Umstände, die es dem Patienten unmöglich machten, Art, Umfang und mögliche Konsequenzen der Studie zu verstehen.
- Abgabe der unterschriebenen Einverständniserklärung, nach Aufklärung sowohl über die Art als auch über die erwarteten gewünschten und möglichen unerwünschten Nebenwirkungen des Produktes.
- Bei Frauen im gebärfähigen Alter, Durchführung einer zuverlässigen Empfängnisverhütung (hormonelle Kontrazeption) während und vier Wochen nach der Studie.

Ausschlusskriterien

Als spezielle Ausschlusskriterien galten:

- Vorliegen von mehr als 10 aktinischen Keratosen
- Vorliegen von pigmentierten Hautveränderungen
- Gleichzeitige UV- Therapie
- Medizinisch erforderliche Begleitmedikation mit Substanzen, die anti-inflammatorische, immunmodulierende oder antibiotische (Begleit-) Wirkungen besaßen
- Erfolgte Behandlung der aktinischen Keratosen in den letzten 4 Wochen
- Bekannte Überempfindlichkeit gegen Birkenkorkpräparate oder Sonnenblumenöl

Als allgemeine Ausschlusskriterien galten:

- Infektionskrankheiten
- Schwere internistische Grunderkrankung (z. B. schwere kardiale, renale oder hepatische Funktionsstörung)
- Maligne Grunderkrankung
- Stark reduzierter Allgemeinzustand (z. B. Karnovski Index < 80 %)
- Bekannte Alkohol-, Drogen- oder Medikamentenabhängigkeit
- Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung in den letzten 4 Wochen
- Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung
- Patienten, die nicht in der Lage waren, Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie zu verstehen
- Schwangerschaft, Stillzeit
- Patienten mit dermatologischen Erkrankungen, die systemischer Therapie bedurften.

3.1.3 Durchführung der Studie

Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten und bei denen keine Ausschlusskriterien vorlagen, wurden nach Aufklärung und Einverständniserklärung in die Studie eingeschlossen. Die Studie war dreiarstig aufgebaut: Behandlung nur mit Birken-Oleogel, Behandlung nur mit Kryotherapie als Standardtherapie, und kombinierte Behandlung mit Kryotherapie plus Birken-Oleogel. Die Patienten wurden randomisiert auf die jeweiligen Studienarme verteilt, sodass pro Studienarm 15 Patienten eingeschlossen waren. Die einzelnen Therapien wurden nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Der erste Studienarm erhielt die Behandlung mit Oleogel, wobei das Oleogel 2 X täglich durch den Patienten selbst auf die aktinischen Keratosen aufgetragen wurde.

Der zweite Studienarm erhielt Kryotherapie, wobei die Durchführung gemäß hausinterner Standards erfolgte: aktinische Keratosen im Gesicht wurden 1 X für 20-45 Sekunden und aktinische Keratosen am Körper wurden 2 X für 20-45 Sekunden behandelt.

Der dritte Studienarm erhielt eine Kombination der oben genannten Therapien.

Die Evaluation jedes Therapiearms erfolgte ein, zwei und drei Monate nach der ersten Behandlung.

Die Kryotherapie wurde dabei vom Prüfarzt ausgeführt. Ebenso wurde der Patient vor der ersten Behandlung mit Birken-Oleogel vom Prüfarzt genau über die richtige Anwendung informiert. Jede Untersuchung und Behandlung wurde schriftlich im CRF dokumentiert. Die Compliance wurde durch das Wiegen der Tuben bei den Untersuchungsterminen überprüft.

3.1.4 Zielkriterien und Auswertung

Hauptzielkriterium war die Wirksamkeit von Birken-Oleogel. Nebenzielkriterien waren Vergleich der Wirksamkeit mit dem Therapiearm Kryotherapie und Kryotherapie + Birken-Oleogel, sowie die objektiven Parameter in einem Referenzareal (Erythem,

Schuppung, palpable Rauigkeit), und die subjektiven Parameter (Juckreiz, Brennen unter Therapie).

Alle Non-Responder (Abheilung < 75%) wurden einer Standardtherapie zugeführt, die nach ausführlicher Rücksprache zwischen Prüfarzt und Patient vereinbart wurde.

Der Therapieerfolg wurde nach 3 Monaten evaluiert. Die Wirksamkeit wurde wie folgt definiert: komplette Abheilung der Läsionen (100 %), gutes Ansprechen (> 75 % Abheilung), mäßiges Ansprechen (< 75 % Abheilung).

Bei der Auswertung wurde der Therapieerfolg wie folgt definiert: Patienten mit komplettem Ansprechen (100 % Abheilung) und gutem Ansprechen (75 % Ansprechen) wurden als Responder zusammengefasst. Patienten mit mässigem Ansprechen (\leq 75 % Ansprechen) auf die Therapie galten als Non- Responder.

Das Hauptzielkriterium, die Wirksamkeit, wurde in % Responder angegeben. Die Nebenzielkriterien wurden deskriptiv beschrieben.

3.2 Experimenteller Teil

3.2.1 Zelllinien

HaCaT Zelllinie

Die HaCaT - Zelllinie besteht aus spontan transformierten humanen Hautepithelzellen, die ihre volle epidermale Differenzierungsfähigkeit beibehalten haben. Die Zellen stammen aus histologisch gesunder, adulter, humaner Haut, die jenseits des Sicherheitsabstandes eines malignen Melanoms eines 62jährigen Mannes gewonnen werden konnten. Beschrieben wurde sie 1988 von der Arbeitsgruppe Boukamp et al. in Heidelberg. Der Name geht auf den Ursprung der Zelllinie und die ursprünglichen Kulturbedingungen zurück (**H**uman **a**dult skin keratinocytes, low **C**alcium [0,2 mM], high **T**emperature [38,5°C]). Trotz der Immortalisierung und des transformierten Phänotyps in vitro bleibt die Zelllinie nicht-tumorös. Nach der Transplantation auf Nacktmäuse, formieren sie ähnlich wie natürliche Keratinozyten, ein geordnetes, strukturiertes und differenziertes epidermales Gewebe. Keratine, die spezifisch für die Differenzierung sind (Keratine 1

und 10) und andere Marker (Involucrin und Filagrin) werden exprimiert und sind entsprechend lokalisiert. Insofern bietet die Zelllinie eine gute Möglichkeit die Regulation von Keratinozyten in humanen Zellen zu studieren.

HaCaT - Zellen sind adhärent wachsend. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's modified minimum essential- Medium (DMEM) mit Zusatz von 1 % Glutamin (Glu; 2mM), 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep-Lsg.) und 10 % fetales Kälberserum (fetal bovine serum= FBS) verwendet. Magermedium unterschied sich vom Vollmedium insofern, als es nur 1 % FBS beinhaltete. Dies hatte den Vorteil, dass es die Zellen empfindlicher für weitere Behandlungen machte.

Jurkat Zelllinie

Jurkat Zellen konnten 1977 durch Scheider et al. etabliert werden. Die Zellen stammen aus dem Blut eines 14jährigen Jungen mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) vom T- Zelltyp. Die runden Zellen wachsen einzeln oder in Haufen in Suspension. Als Medium wurde 90 % RPMI 1640+ 10 % FBS+ 2 mM L- Glutamin verwendet. Kulturen wurden 3X pro Woche im Verhältnis 1:2 geteilt.

Alle Arbeiten im Rahmen der adhärenen Zellreihen wurden mit 1x Phosphate Buffered Saline- Waschpuffer (PBS) durchgeführt und zum Ablösen und Passagieren der Zellen wurde Trypsin- EDTA verwendet. Die Inkubation aller Zellreihen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2.2 Zellkultur

Bei allen Arbeiten im Rahmen der Zellkultur wurde auf steriles Arbeiten geachtet. Die Stammkulturen wurden je nach Bedarf in Kulturflaschen Typ 1 (175 cm³/ 750 ml) bzw. Typ 2 (75 cm³/ 250 ml) kultiviert. Alle Lösungen wurden vor Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt. Das Passagieren der adhärenen Zellkulturen unterschied sich von dem der in Suspension wachsenden Zellkultur. Die adhärenen Zellen wurden einmal durch Zugabe von 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin/ EDTA für 5 Minuten zum Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Kontrolle, ob sich der Zellrasen von seiner Unterlage gelöst hat, erfolgte unter dem

Mikroskop. Anschließend wurden 5 ml FBS- haltiges Vollmedium zur Inaktivierung des Trypsins hinzugegeben und die gesamte Zellsuspension dann in ein Einmalröhrchen mit Verschluss aufgenommen. Das Zentrifugieren erfolgte bei 1200 rpm, 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt. Dazu wurden in einem Eppendorfröhrchen 90 µl Trypanblau vorgelegt und 10 µl Zellen darin suspendiert. Der Farbstoff Trypanblau kann eine zerstörte, nicht jedoch eine intakte Zellmembran penetrieren und bindet an zytosolische Proteine. Diese Methode lässt avitale Zellen lichtmikroskopisch blau erscheinen und erleichtert es somit vitale von avitalen Zellen zu differenzieren. Die in der Pipettenspitze aufgenommene Zellsuspension wurde in die Zählkammer pipettiert. Die 4 großen Quadrate wurden ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Um die tatsächliche Zellzahl zu ermitteln, musste diese Zahl mit dem Faktor der Kammer (10^4), dem Verdünnungsfaktor (hier: 10) und der Milliliteranzahl in der die Zellen aufgenommen wurden (hier: 2) multipliziert werden. Die Zellen wurden für die Weiterführung der Zellkultur oder für Experimente in Zellkulturflaschen bzw. in Petrischalen überführt.

Die Kultivierung der Jurkat - Zellen gestaltete sich dadurch, dass sie in Zellsuspension wachsen, einfacher. Die Zellkulturflasche wurde gut gemischt, um eine einheitliche Zellzahl zu erreichen. Dann wurde mittels einer 10 µl Probe die Zellzahl in der Zählkammer nach oben beschriebener Methode ermittelt. Anschließend wurde die gewünschte Zellzahl (10^5 / ml) mittels einer sterilen Pipette entnommen und in eine neue Flasche, die bereits vorgewärmtes frisches Medium enthielt, pipettiert.

3.2.3 Vorbereitung der Zellen für die UVB- Bestrahlung

Das Passagieren und die Bestimmung der Zellzahl erfolgten nach oben beschriebener Methode (siehe Zellkulturarbeit). Für das Experiment wurden für kleine Petrischalen 2×10^6 Zellen in 3 ml c'DMEM + 10 % FBS und für mittlere Petrischalen 6×10^6 Zellen in 9 ml c'DMEM + 10 % FBS benötigt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht oder bis zur Adhärenz (ca. 4 Stunden).

Nach Adhärenz der Zellen erfolgte der Wechsel auf Magermedium (c'DMEM + 1 % FBS). Dazu wurde der Monolayer einmal mit PBS 1X gespült und Magermedium

hinzugegeben, und zwar pro kleine Petrischale 3 ml und pro mittlere Petrischale 9 ml. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.2.4 UVB- Bestrahlung der Zellen

Zur Bestrahlung der Zellen wurde ein PUVA- 800- Teilbestrahlungsgerät (Waldmann GmbH, Schwenningen) verwendet. Das Gerät ist mit Fluoreszenzröhren (Philips TL 12/20 Watt) bestückt, die Breitband - UVB mit einem Spektrum von 280 - 320 nm und einem Peak bei 312 nm emittieren. Zunächst wurde der Zellmonolayer zweimal mit PBS 1 x gespült. Dann wurde zu den kleinen Petrischalen 1 ml PBS 1 x und zu den mittleren Petrischalen 3 ml PBS 1 x hinzugegeben. Die Bestrahlung erfolgte auf Eis. Dazu wurde eine Wanne mit zerkleinertem Eis gefüllt und die Petrischalen darin eingebettet. Der Abstand zwischen Petrischalen und der Bestrahlungsquelle betrug 30 cm. Das Bestrahlungsgerät sollte 2 Minuten warmlaufen. Es wurde dann der Deckel der Petrischalen entfernt und die Zellen mit einer Bestrahlungsdosis von 30 mJ/ cm² bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen erneut in Magermedium über Nacht inkubiert.



Abbildung 9: Bestrahlung der Zellen

Die Bestrahlung der HaCaTs erfolgte mittels PUVA- 800 Teilbestrahlungsgerät für 2 Minuten in einem Abstand von 30 cm zur Lichtquelle und auf Eis. Es sollte die Induzierbarkeit der COX-2 Expression durch UV- Licht gezeigt werden.

3.2.5 Vorbereitung der Zellen für den Cytospin

Die Zellen wurden erneut mit 5 ml Trypsin/ EDTA vom Boden der Petrischale abgelöst. Auffüllen mit 5 ml Medium, Zentrifugieren und Zählen der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Für den Cytospin wurden folgende Zellzahlen benötigt: für die HaCaT Zellkultur 6×10^4 Zellen/ 300 μ l (ca. 2×10^5 Zellen/ ml) und für die Jurkat Zellkultur 2×10^5 Zellen/ 300 μ l (ca. 6×10^5 Zellen/ ml).

3.2.6 Durchführung des Cytospins



Abbildung 10: Cytospin

Die Übertragung der Zellen von der Kultur auf den Objektträger erfolgte mittels Cytospin.

Die Objektträger wurden mit Bleistift beschriftet. Wichtig waren die Beschreibung der Zellreihe, ob bestrahlt oder unbestrahlt, Färbung, Verdünnung des primären Antikörpers und das Datum. Die Objektträger wurden dann zusammen mit den Cytofunnels in den Cytoclip eingespannt. Danach wurden 300 μ l der Zellsuspension in die Probenkammern des Cytofunnels pipettiert. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 6 Minuten abzentrifugiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Cytoclip entspannt und die Objektträger entnommen. Sie wurden bei Raumtemperatur für 10-15 Minuten luftgetrocknet. Im Anschluss daran erfolgte die Fixierung der Zellen für 15 Minuten in Fixierungslösung (PBS 1X / 4 % Formaldehyd / 0,1 % Tween) ohne

Schütteln. Die Lösung wurde mit 500 ml PBS 1 x 20 ml Formaldehydlösung und 0,5 ml Tween 20 angesetzt. Nach dem Fixieren wurden die Zellen unter Schütteln für 5 Minuten in PBS 1 x gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen in PBS 1X/ 0,5 % Tween 20 - Permeabilisierungslösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von 2 x 5minütigen Waschschritten in PBS 1 x bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur und unter Bewegung in einer Wasserstoffperoxid / Methanol Lösung (3 % H₂O₂ in Methanol) geschwenkt.

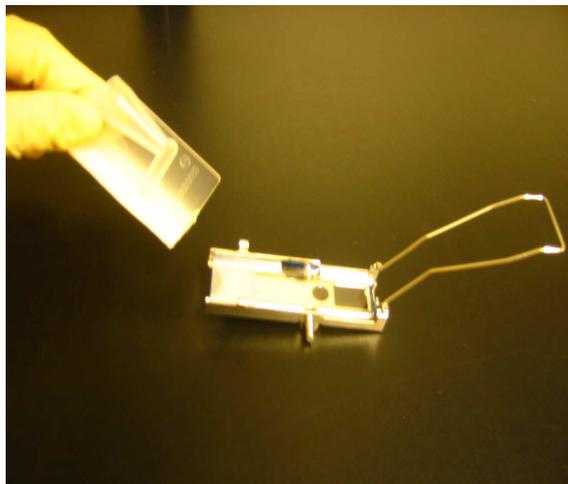


Abbildung 11: Einspannen des Cytofunnel in den Cytoclip

3.2.7 Vorbereitung der Paraffinschnitte

Zunächst wurden die Paraffinschnitte auf beschichtete Objektträger fixiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Schnitte auf Objektträgern, die schon länger gelagert wurden, sollten vor dem Entparaffinieren mindestens 30 Minuten bei 37°C erwärmt werden. Die Entparaffinierung erfolgte nach folgendem Schema:

- 3 x 7 Minuten Rotihistol (oder Xylol)
- 2 x 3 Minuten 100% Ethanol
- 2 x 2 Minuten 95% Ethanol
- 1 x 2 Minuten 80% Ethanol
- 1 x 2 Minuten 70% Ethanol
- 1 x 2 Minuten 50% Ethanol
- 1 x 5 Minuten Millipore-Wasser.

Die Antigendemaskierung erfolgte im Dampfgerar, worin die Schnitte bei 100°C für 20 Minuten gekocht wurden und dann für 10 Minuten im auf 95 °C erhitzten Citratpuffer abgekühlt wurden. Es folgte ein Waschschrift von 5 Minuten in TBS. Die Permeabilisierung und die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgten genau wie bei den Cytospins für 15 Minuten in Permeabilisierungslösung bei Raumtemperatur respektive 20 Minuten unter Bewegung in einer Wasserstoffperoxid/ Methanol Lösung.

3.2.8 Immunhistologische Färbung

Die immunhistologische Färbung der Cytospinpräparate erfolgte nach der LSAB-Methode (**L**abeled **S**trept**A**vidin - **B**iotin). Bei dieser indirekten Nachweismethode bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen der Zellen, gegen das er gerichtet ist. Diese spezifische Antigen - Antikörper - Bindung wird für die lichtmikroskopische Auswertung sichtbar gemacht. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an den Antigen - Antikörper - Komplex. Anschließend wird ein Komplex aus Streptavidin und biotinyliertem Enzym (Peroxidase) hinzugegeben. Nach Zugabe von AEC (Substrat für die Horseradish Peroxidase) kommt es zu einer roten Farbreaktion. AEC bildet während der Peroxidasereaktion mit Wasserstoffperoxid als Substrat ein rotbraunes Endprodukt, welches alkohollöslich ist und folglich eine wässrige Gegenfärbung mit Hämatoxin und ein wässriges Eindeckmedium erfordert.

Nach der Blockierung der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid / Methanol wurde die feuchte Kammer vorbereitet. Dazu wurde Zellstoffpapier mit destilliertem Wasser angefeuchtet und in einen Objektträgerkasten eingebettet. Es folgte die Applikation der Blockierungslösung, die aus 10 % NGS bzw. 1 % BSA in PBS bestand. Sie verhindert die Bindung des Primärantikörpers an unspezifische Bindungsstellen (stark geladene Kollagen - und Bindegewebelemente) im Gewebe. Es wurde jeweils das Serum verwendet, das aus der Tierspezies des Sekundärantikörpers stammte, um zu vermeiden, dass der Sekundärantikörper an Komponenten der Blockierungslösung bindet. Durch Abtropfenlassen des Schnittes und vorsichtiges Abtupfen der Umgebung der Zellen mit Kim Wipe - Tüchern wurden die Objektträger für das Auftragen des Serums vorbereitet. In der feuchten Kammer erfolgte das Auftragen von 200 µl Blockierungslösung pro Schnitt, so dass die Zellen

gut mit Lösung bedeckt waren. Die Präparate inkubierten danach für 1 Stunde in der feuchten Kammer. Während der Inkubation wurde der Primärantikörper (siehe Tabelle Antikörper) angesetzt. Die Verdünnung erfolgte in 10 % NGS bzw. 1 % BSA in PBS und gemäß Protokoll. In der Regel wurden 100 µl pro Schnitt eingesetzt. Die Cytospins inkubierten zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur bevor sie zur Inkubation über Nacht in den Kühlschrank gelegt wurden. Am nächsten Tag wurden die Cytospins gewaschen, indem der Primärantikörper abpipettiert wurde und die Objektträger für 3 x 5 Minuten in PBS 1 X geschwenkt wurden. Die Auswahl des Sekundär - Antikörpers richtete sich nach der Herkunft des Primärantikörpers. Es wurden Proben von 100 µl pro Cytospin mit einer Verdünnung von 1:200 in 10 % NGS bzw. 1 % BSA in PBS angesetzt. Nach Auftragen des Sekundärantikörpers wurden die Cytospins für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Objektträger einmal in PBS 1 x gespült und für 3 x 5 Minuten in PBS 1 x auf dem Schüttler geschwenkt. Während der Waschschrte wurde das HRP Label (Streptavidin- Peroxidase- Konjugat) angesetzt, welches 10 Minuten inkubieren sollte. Es wurde 1:20 in Streptavidin- Peroxidase Diluent verdünnt bei 100 µl pro Schnitt.

Tabelle 2: Beispiel für eine Verdünnungsreihe

Schnitte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Label µl	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Diluent µl	95	190	285	380	475	570	665	760	855	950

Die Präparate wurden nach Auftragen des Labels für 20 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Es schlossen sich erneut 3 Waschschrte von je 5 Minuten in PBS an. Während des letzten Waschvorgangs wurde das AEC - Kit (3- Amino- 9- Ethylcarbazol) angesetzt. Dabei kamen 20 µl AEC Konzentrat auf 1 ml Substratpuffer. Es wurden erneut 100 µl pro Schnitt aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und unter mikroskopischer Kontrolle. Hierbei war es wichtig, dass der Hintergrund ungefärbt blieb. Die fertig gefärbten Präparate wurden in Aqua bidest. gestellt und für 5 Minuten darin gespült.

3.2.9 Kernfärbung

Die Objektträger wurden für 10 Sekunden in Hämatoxylin Lösung getaucht und in zwei Schritten in Leitungswasser gewaschen. Sie wurden im Anschluss daran für 10 Minuten zum Bläuen ins Leitungswasser gestellt. Die trockenen Objektträger wurden zum Schluss mit Glyceringelatine eingedeckt.

3.2.10 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation der Präparate erfolgte mittels AxioCam MR. Hierbei handelt es sich um eine professionelle, hochauflösende Digitalkamera. Sie hat eine CCD Basisauflösung von 1,4 Megapixel (1388 X 1040) bei einer Pixelgröße von 6,45 µm X 6,45 µm. Ihre spektrale Empfindlichkeit befindet sich im Wellenlängenbereich von ca 400 nm- 700 nm. Durch das sehr niedrige Eigenrauschen der Kamera kann mit der erreichbaren Belichtungszeit von 1 ms bis zu 20 sec ein sehr breites Anwendungsspektrum in der Mikroskopie abgedeckt werden.

3.2.11 Vorbehandlung und Evaluation der Biopsien

Es wurden aus dem ersten Studienarm an 4 Patienten und aus den weiteren beiden Studienarmen jeweils an 2 Patienten zu Beginn und Ende der Behandlung Proben aktinischer Keratosen gewonnen. Diese wurden immunhistologisch gefärbt (siehe Punkt 3.1.8) und evaluiert (siehe unten). Die Behandlung bestand im ersten Studienarm in der zweimal täglichen topischen Anwendung des Oleogels auf die aktinischen Keratosen durch den Patienten. Im zweiten Studienarm erfolgte die Kryotherapie gemäß hausinterner Standards, was eine einmal tägliche Anwendung im Gesicht für 20-45 Sekunden und eine zweimal tägliche Anwendung am Körper für 20-45 Sekunden bedeutete. Der dritte Studienarm bestand aus der Kombination der beiden oben genannten Therapien. Die Kryotherapie wurde vom Prüfarzt ausgeführt. Auch wurde der Patient vor der ersten Behandlung mit Birkenoleogel vom Prüfarzt genau über die richtige Anwendung informiert. Jede Untersuchung (nach 1, 2 und 3 Monaten) und Behandlung wurde schriftlich dokumentiert. Die Compliance wurde durch das Wiegen der Tuben bei den Untersuchungsterminen überprüft. Die beiden

Präparate, vor und nach Therapiebeginn, wurden auf Dicke, Dysplasiegrad, Keratose, Kernzahl und Expressionsmuster der folgenden molekularen Marker verglichen: COX-2, Ki67, S-100, CD1a. Pro Präparat wurden 10 high power fields (HPF) ausgezählt. Ein high power field zeigte den jeweiligen Abschnitt des Präparates in 40facher Vergrößerung. Die gezählten Werte wurden notiert und als Mittelwerte in Tabellen dargestellt. Zusätzlich erfolgten die Dokumentation der jeweiligen Histologien und Illustration der aussagekräftigsten Vorher- Nachher-Pärchen.

3.3 Verwendete Gebrauchsmaterialien

Petrischalen, beschichtet 100X20mm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschl.
Pipetten (Glas) 5/10/25/50ml	Corning, Hamburg, Deutschland
Pipet-Boy	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschl.
Neubauer- Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Deckgläser	R.Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Kim- Wipe	Kimberly-Clark, Forchheim, Deutschl.
Pasteurpipette	Dr.Thorns Handel, Göttingen, Deutschl.
Objektträger, beschichtet	R.Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Einweg Cytofunnel	Thermo, Dreieich, Deutschland
Cytoclip	Termo, Dreieich, Deutschland
Bluecap 15ml, 50ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Einfrierröhrchen 1,2ml	Corning, Hamburg, Deutschland
Röhrchen 5ml, mit Deckel	Merck, Darmstadt, Deutschland
Röhrchen 14ml, mit Verschluss	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschl.
Zellkulturflasche 175cm ³ , 750ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche 75cm ³ , 250ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschl.
Objektträgerkasten für feuchte Kammer	Zitt- Thoma GmbH, Freiburg, Deutschl.
Zellstoffpapier	Zentrallager Uniklinikum, Freiburg, Deutschland
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche, Mannheim, Deutschland

3.4 Geräte

Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Atmos S 351, Saugsystem	Atmos Medizin Technik GmbH&Co. KG, Lenzkirch, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
UVB- Bestrahlungsquelle	Waldmann, Villingen-Schwenningen, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Cytospin	Termo, Dreieich, Deutschland
Axio Cam MR	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Vortexer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schüttler (Titramax 1000)	Heidolph, Darmstadt, Deutschland

3.5 Medien und Reagenzien

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin EDTA	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L- Glutamin	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin 100X	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FBS 1%, 10%	Biochrom Seromed, Berlin, Deutschl.
PBS 1X, 10X	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe,

	Deutschland
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS) 10%	Dianova, Hamburg, Deutschland
Normal Donkey Serum (NDS) 5%	Dianova, Hamburg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Streptavidin-Peroxidase Diluent	DCS Innovative Diagnostic Systeme, Hamburg, Deutschland
AEC-Kit	DCS Innovative Diagnostic Systeme, Hamburg, Deutschland
Glyceringelatine 100g	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin 500ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's MEM	Gibco Invitrogen GmBH, Karlsruhe, Deutschland
Staurosprin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Hydrokortison	Sigma, Steinheim, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	SERO- Med GmbH, Wien, Österreich

3.6 Antikörper

Rabbit IgG Immunglobulinfraktion	DAKO, Hamburg, Deutschland
Goat IgG Immunglobulinfraktion	Dianova, Hamburg, Deutschland
Mouse IgG Immunglobulinfraktion	DAKO, Hamburg, Deutschland
Mouse- anti- Human Caspase 3	# F2304, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Rabbit- anti- Human COX-2	# A617, DCS, Hamburg, Deutschland
Goat- anti- Human COX-2	# B1804, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Rabbit- anti- Human EGFR	# K1204, Santa Cruz, Heidelberg,

	Deutschland
Mouse- anti- Human EGFR	M7239, DAKO, Hamburg, Deutschland
Goat- anti- Human EGRF	s.c-03G1005, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Mouse- anti- Human bcl-2	# A933, DCS, Hamburg, Deutschland
Rabbit- anti- Human Ki 67	# B004, DCS, Hamburg, Deutschland
Donkey- anti- Human p53	# E1606, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Donkey- anti- Goat- Biotin	# 67478, Dianova, Hamburg, Deutschl.
Goat- anti- Mouse- Biotin	115-065-003 Dianova, Hamburg, Deutschland

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der klinischen Studie

4.1.1 Hauptzielkriterium Wirksamkeit

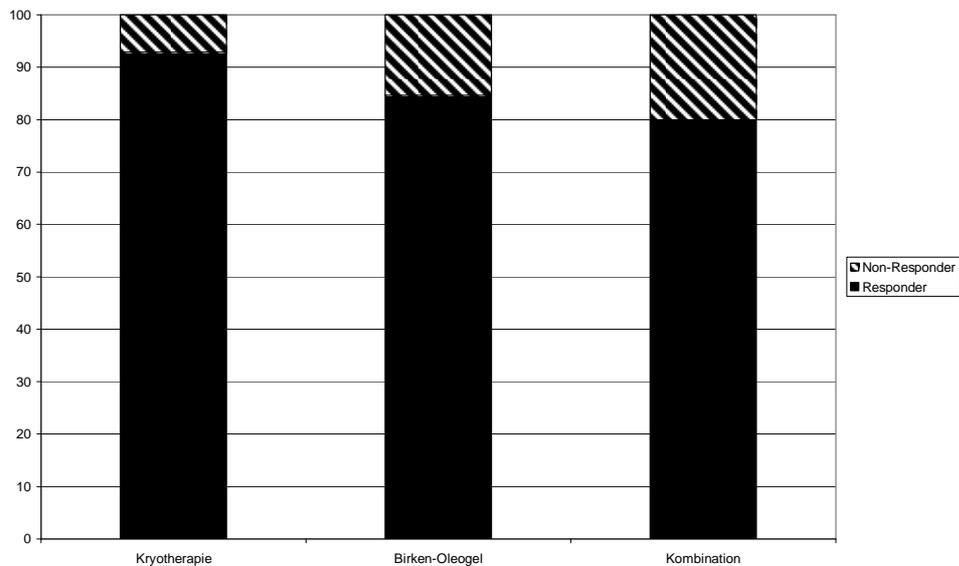


Abbildung 12: Ansprechraten (% der Patienten) nach Responder und Non-Responder. Pro Studienarm wurden 15 Patienten eingeschlossen und ausgewertet.

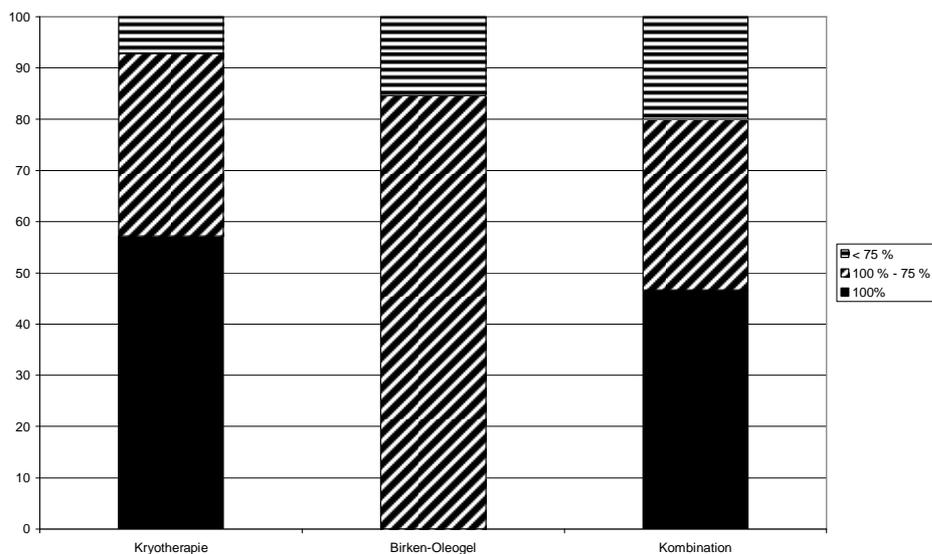


Abbildung 13: Ansprechraten (% der Patienten) nach Abheilung zu 100 %, >75 %, <75 %. Pro Studienarm wurden 15 Patienten eingeschlossen und ausgewertet.



Abbildung 14: Einzelverläufe nach klinischem Score vor und nach der Studie. Pro Studienarm wurden 15 Patienten eingeschlossen und ausgewertet.

Ad Abb. 14: Die Ordinate zeigt zum einen die Ausprägung der aktinischen Keratosen (linke Seite), zum anderen den Therapieerfolg respektive Misserfolg (Responder/ Nonresponder, rechte Seite). Die Abszisse zeigt die 3 Studienarme jeweils vor und nach der Behandlung. Es wird deutlich, dass aufgrund der Randomisierung ein Selektionsbias stattgefunden hat mit verhältnismäßig stark ausgeprägten aktinischen Keratosen im Kombinations- Arm im Vergleich zu den beiden anderen Studienarmen zu Beginn der Therapie. Dies erklärt die Tatsache, dass der Studienarm mit der Kombinationsbehandlung schlechter abschneidet als der jeweilige Einzeltherapie- Studienarm.

Nach dem Einschluss von 45 Patienten konnten 42 auswertbare CRF's erzielt werden. Drei Patienten schieden vorher aus persönlichen Gründen aus der Studie aus. Es traten keine schweren unerwünschten Ereignisse auf.

Von den 15 in den Birkenoleogel- Monotherapie- Arm eingeschlossenen Patienten wurden 13 ausgewertet. 14 Patienten aus der Kryotherapie- Gruppe und alle Patienten aus der Kombinationsgruppe konnten ausgewertet werden.

In allen drei Therapie- Armen kam es zu einem sehr deutlichen Ansprechen. In der Birkenoleogel -Gruppe zeigten 85 % der Patienten eine > 75 %ige Abheilung, während 15 % eine unter 75 %ige Abheilung zeigten und somit als Nonresponder zu werten sind. Eine 100 % klinische Abheilung wurde bei keinem Patienten gesehen, alle wiesen ein leichtes Resterythem ohne Rauigkeit und Schuppung auf.

Bei der Kryotherapie-Gruppe zeigte sich eine 100 %ige Abheilung bei 57 % der Patienten, diese waren klinisch völlig erscheinungsfrei ohne Resterythem. 36 % der Patienten heilten zu > 75 % ab, während 7 % unter 75 % abheilten (Non-Responder).

Bei der Kombinationsgruppe zeigten sich bei 47 % der Patienten eine 100 %ige Abheilung sowie bei 33 % der Patienten eine > 75 %ige Abheilung (Responder). 20 % der Patienten sprachen mit < 75 % auf die Behandlung an und gelten somit als Nonresponder.

Zusammenfassend bestanden bei der Birkenoleogel-Gruppe 85 % Responder und 15 % Non-Responder, während die Kryotherapie-Gruppe 93 % Responder und 7 % Non-Responder zeigte. Bei der Kombinationsbehandlung konnten 80 % Responder nachgewiesen werden.

4.1.2 Nebenzielkriterium Verträglichkeit

Bei 41 der 42 (98 %) behandelten Patienten wies das Prüfpräparat Birkenoleogel eine sehr gute Verträglichkeit auf. Es bestand in 41 Fällen kein Juckreiz oder Brennen nach Auftragen des Präparates.

Ein Patient berichtete zunächst über kurz anhaltenden Juckreiz, im weiteren Verlauf entwickelte er eine Folliculitis im behandelten Areal, welche sich nach Absetzen vollständig zurückbildete.



Abbildung 15: Verlaufsbilder Patient 18, Studienarm 2 (Oleogel), rechter Handrücken, vor und am Ende der Therapie

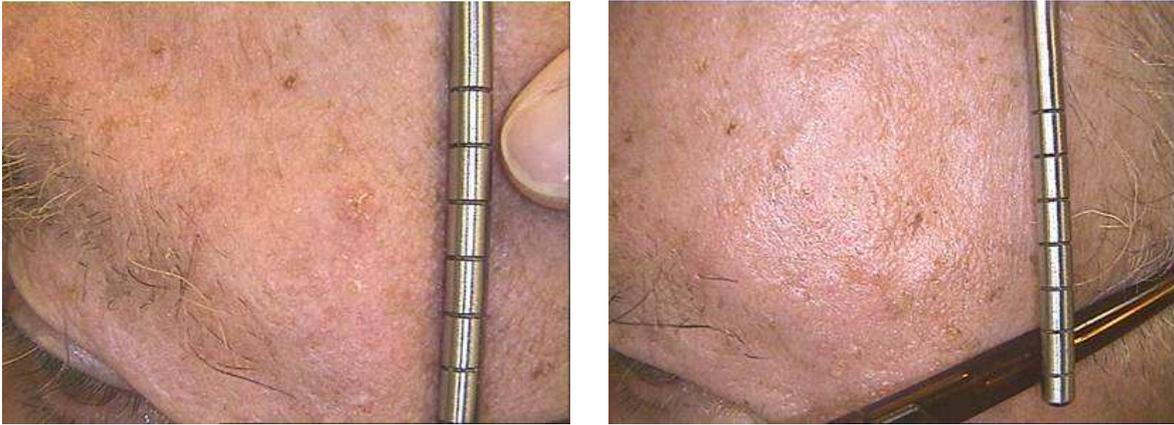


Abbildung 16: Verlaufsbilder Patient 10, Studienarm 2 (Oleogel), linke Schläfe, vor und am Ende der Therapie



Abbildung 17: Verlaufsbilder Patient 16, Studienarm 3 (Kombinationstherapie), Unterarm, vor und am Ende der Therapie

Ad Abb. 15, 16, 17: Es sind Verlaufsbilder (vor und nach Behandlung) dreier Patienten gezeigt, die eine Therapie mit Birkenoleogel erhielten, respektive in Kombination mit Kryotherapie bei Patient 16. Es zeigt sich bei allen Patienten ein deutlicher Rückgang der Hyperkeratosen und Schuppung. Ein leichtes Resterythem blieb nach 3monatiger Behandlung mit Birkenoleogel noch bestehen.

4.2 Etablierung von Färbungen ausgewählter molekularer Marker

4.2.1 COX-2: Färbung und Nachweis der Induktion durch UV- Licht

Folgende Bilder zeigen immunhistochemische Färbungen an Zellen der HaCaT Zelllinie. Es wurde die Aufregulation des Enzyms COX-2 nach UVB Bestrahlung untersucht. Die COX-2 ist ein Enzym, das durch inflammatorische und mitogene Stimuli induziert wird und so zu einer erhöhten Konzentration von Prostaglandinen in

neoplastischen und entzündlichen Geweben führt. Das Enzym befindet sich im Zytoplasma.

Die quantitative Auswertung erfolgte durch Zählen der positiv gefärbten Zellen in 2 unterschiedlichen Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung. Es konnte so der prozentuale Anteil derjenigen Zellen ermittelt werden, in denen COX-2 durch UVB Bestrahlung induziert wurde. Zur qualitativen Bewertung wurden das Färbeverhalten und die Spezifität der Färbung bewertet.

In den unbestrahlten Zellen der HaCaT- Zelllinie konnte mit Hilfe des DCS Antikörpers in der 1:50 Verdünnung eine Positivität von 9,7 % für das Enzym COX-2 nachgewiesen werden.

Es konnten nach Bestrahlung mit 30 mJ/ cm^2 UVB Strahlung mit Hilfe des gleichen Antikörpers in der gleichen Verdünnung 39,5 % positive Zellen nachgewiesen werden. Durch UVB bedingte Induktion konnte die Expression der COX-2 um das 4fache gesteigert werden.

Zusätzlich wurde ein zweiter COX-2 Antikörper der Firma Santa Cruz getestet. Dieser zeigte keine positive Reaktion in unbestrahlten Zellen. Nach Bestrahlung mit 30 mJ/ cm^2 konnten in der 1:500 Verdünnung 17 % positive Zellen gezählt werden.

Weiterhin wurde der Antikörper der Firma Santa Cruz in einer höheren Verdünnung (1:1000) auf den Cytospin der Zelllinie HaCaT aufgetragen, was zu vergleichbaren Ergebnissen führte. Unbestrahlte Zellen zeigten keine Positivität, während in zuvor bestrahlten Zellen ein Anteil von 14 % positiver Zellen gezählt werden konnte.

Qualitativ gesehen, färbten die Antikörper das Zytoplasma der Zellen. Zellen, die eine rosa bis rote Färbung ihres Zytoplasmas erkennen ließen, wurden als positive Zellen gewertet.

Der Antikörper von DCS erwies sich in der vorliegenden Untersuchung als der Sensitivere.

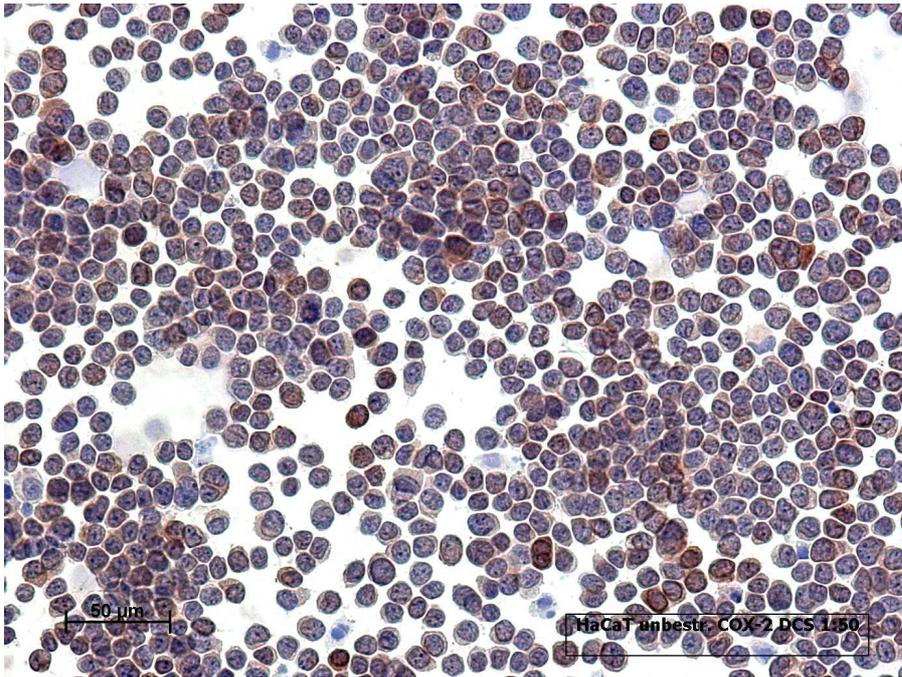


Abbildung 18: HaCaT unbestrahlt, COX-2 DCS 1:50

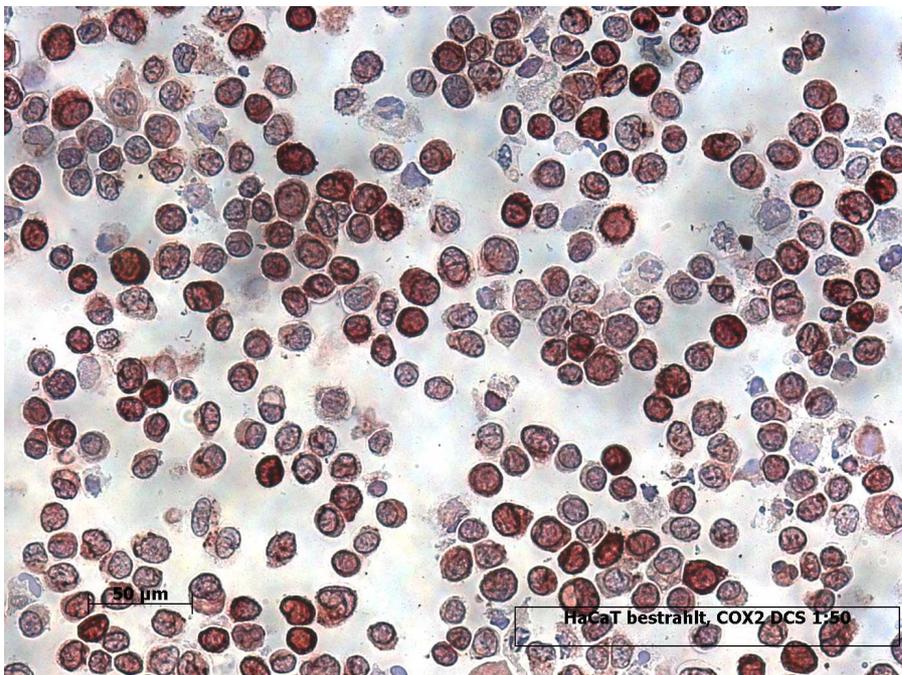


Abbildung 19: HaCaT bestrahlt, COX-2 DCS 1:50

Ad Abb. 18,19: Zellen, die das Enzym COX-2 exprimieren, stellen sich rot dar. Es zeigt sich eine deutliche Aufregulation der Expression der COX-2 durch die UVB- Bestrahlung.

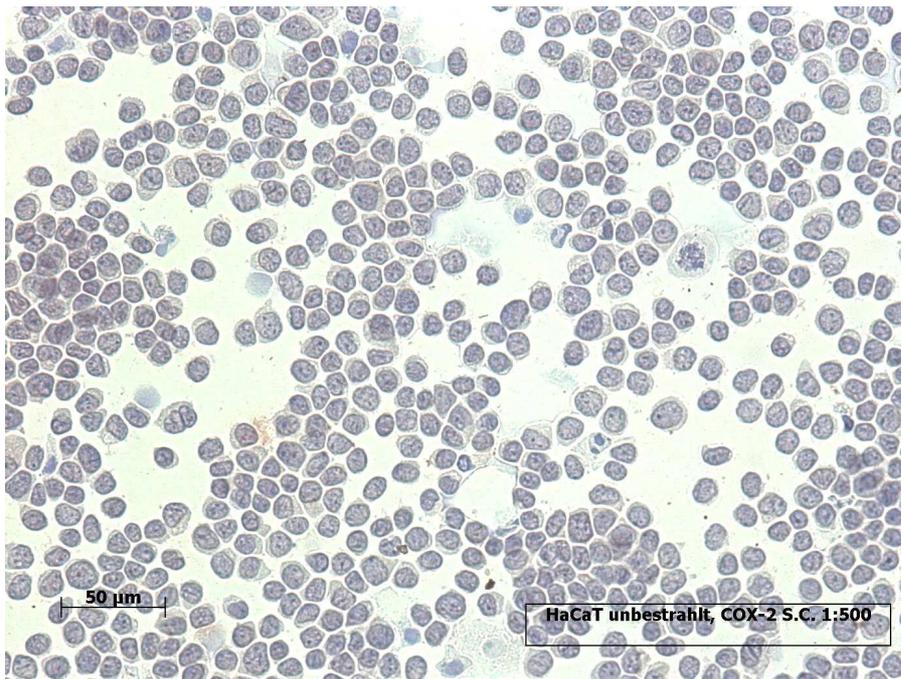


Abbildung 20: HaCaT unbestrahlt, COX-2 Santa Cruz 1:500

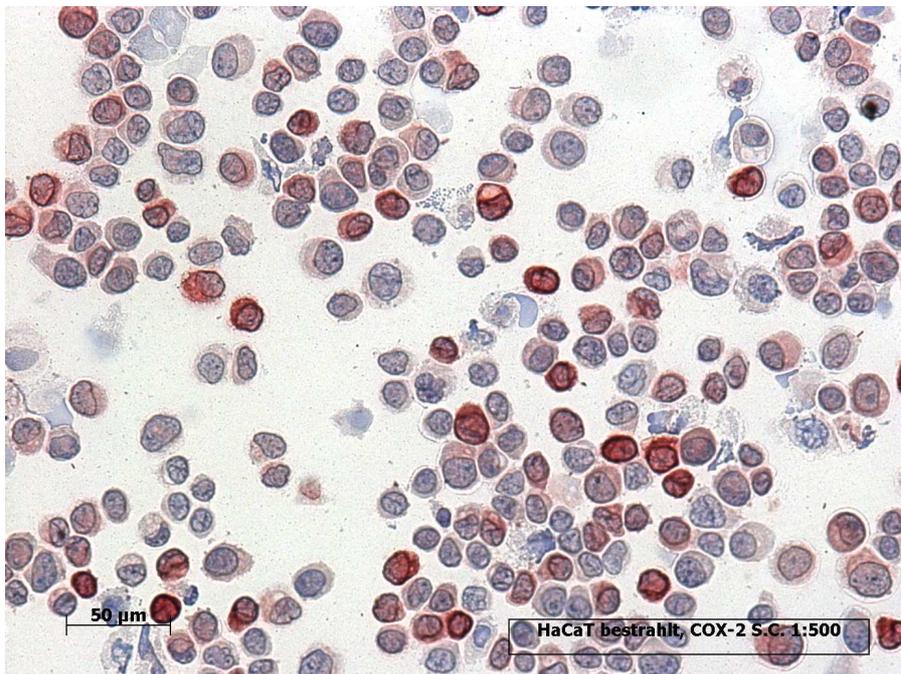


Abbildung 21: HaCaT bestrahlt, COX-2 Santa Cruz 1:500

Ad Abb.. 20, 21: In den unbestrahlten Zellen ließ sich mit Hilfe des Antikörpers von Santa Cruz keine COX-2 Aktivität nachweisen. Nach der Bestrahlung exprimieren ca 17 % der Zellen COX-2.

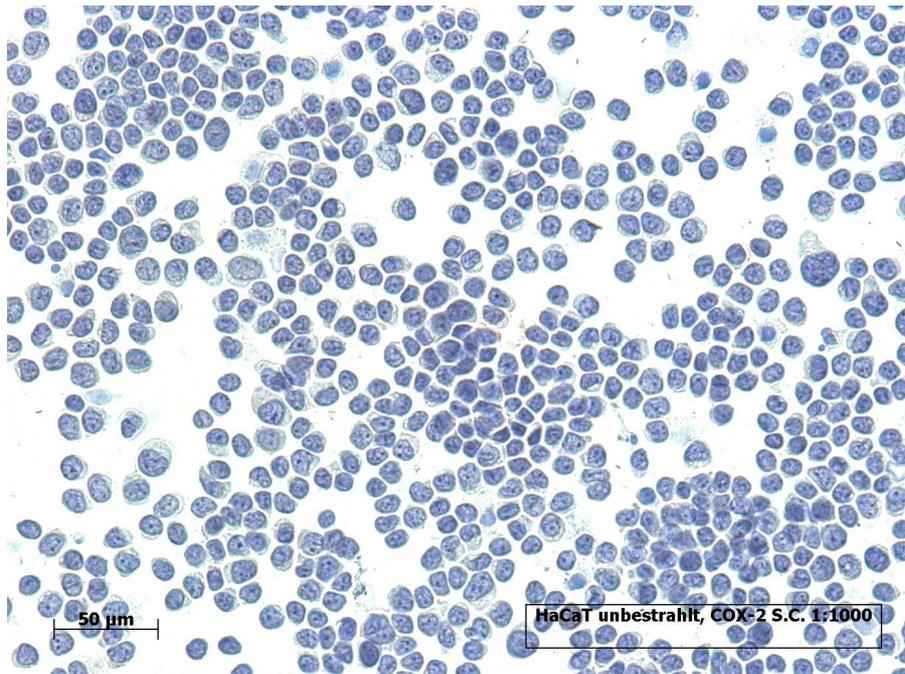


Abbildung 22: HaCaT unbestrahlt, COX-2 Santa Cruz 1:1000

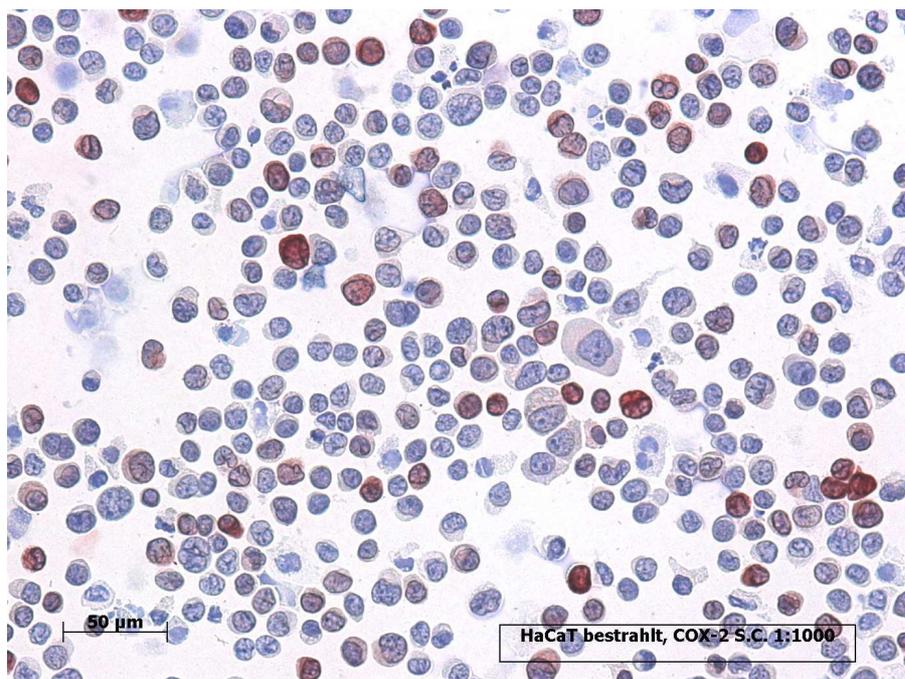


Abbildung 23: HaCaT bestrahlt, COX-2 Santa Cruz 1:1000

Ad Abb. 22, 23: Die Anwendung des Antikörpers Santa Cruz in einer höheren Verdünnung führte zu ähnlichen Ergebnissen wie zuvor (siehe oben). Deutlich wird die rote Färbung des Zytoplasmas derjenigen Zellen, die COX-2 exprimieren.

4.2.2 Ki67: Färbung

Folgende Bilder zeigen die immunhistochemische Färbung an Cytospinpräparaten der Jurkat- Zelllinie. Zunächst wurde versucht, das Protein Ki67 nachzuweisen. Ki67 ist ein Zellzyklus assoziiertes Antigen (Sawhney, 1992), das in allen Phasen des Zellzyklus, außer in der G0- Phase, exprimiert wird. Es bleibt auf die basale Keratinozytenschicht (McCormick et al, 1993) beschränkt.

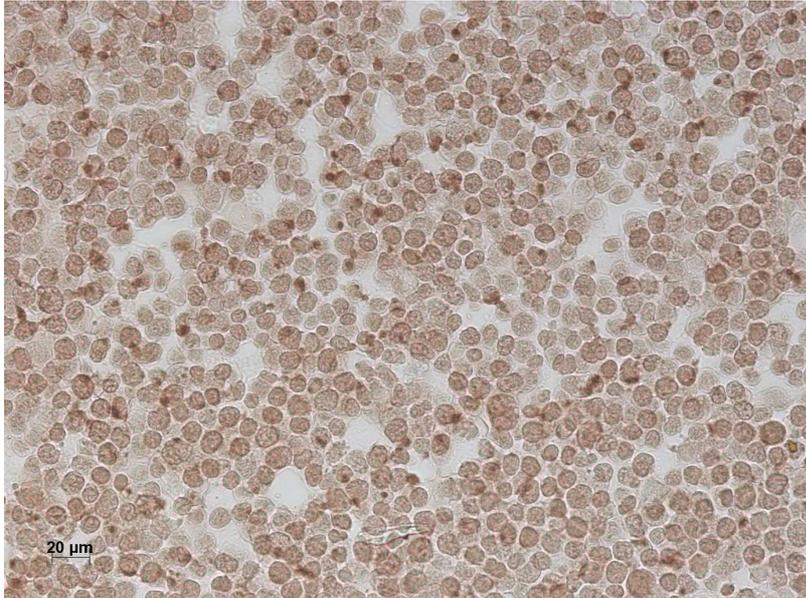


Abbildung 24: Jurkat, IgG-Rabbit, 1:200, Negativkontrolle

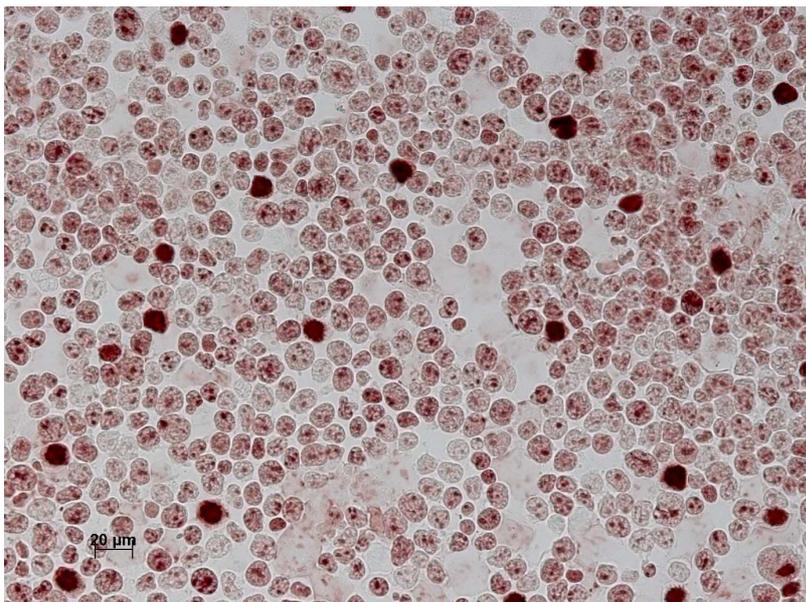


Abbildung 25: Jurkat, Ki67 1:200

Ad Abb. 24, 25: Ki67 positive Zellen der Jurkat- Zelllinie färben sich kräftig rot an. Ki67 wird als Proliferationsmarker von Zellen exprimiert, die sich im aktiven Zellzyklus befinden.

Als Negativkontrolle wurde anstatt des Primärantikörpers, der gegen Ki67 gerichtet war, ein wirtsspezifisches Immunglobulin, in diesem Fall des Hasen, appliziert. Die Verdünnung betrug 1:200. Die Färbung zeigte, dass 5 % der Jurkat Zellen Ki67 exprimierten.

4.3 Histologische Färbungen der Biopsien

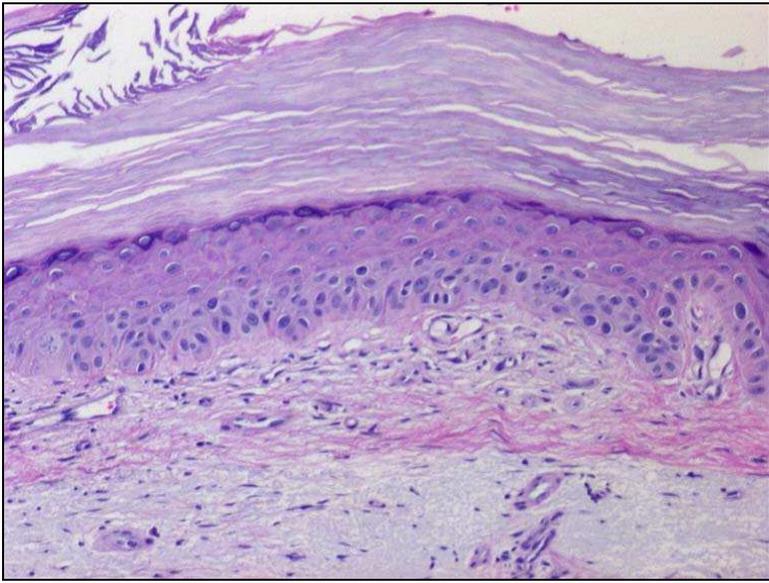
4.3.1 HE- Färbung

Es konnte gezeigt werden, dass in 3 bis 4 Biopsien aktinischer Keratosen von Patienten des Birkenolegel- Studienarms der Dysplasiegrad zurückging. In einer Biopsie persistierte der Dysplasiegrad. In allen Biopsien nahm die Anzahl dyskeratotischer Zellen sowie die Dicke der Epidermis ab. Eine solare Elastose blieb in allen Fällen unbeeinträchtigt von der Birkenolegelbehandlung. In Bezug auf die Entzündung, nahm in 2 von 4 Fällen die Entzündung im Interface- Bereich ab, während bei den 2 weiteren Proben bei einer schon zu Beginn keine Entzündung nachweisbar war und bei der anderen die Entzündung im Interface- Bereich gleich blieb. Interessanterweise, nahm in 2 von 4 Fällen das perivaskuläre Entzündungsinfiltrat zu.

Die histologisch untersuchten Präparate des 2. und 3. Studienarms wiesen ähnliche Ergebnisse auf wie die der Birkenolegelgruppe.

Exemplarisch zeigte sich bei aktinischen Keratosen des Patienten 5 (Studienarm: Birkenolegel) vor Behandlung ein deutlicher bis ausgeprägter Dysplasie Grad und eine erhöhte Anzahl dyskeratotischer Zellen (7/ Gesichtsfeld). Die Dicke der Epidermis ohne die des Str. Corneum betrug 0,1 mm. Die Dicke des Stratum corneum maß 0,2 mm. Es war eine ausgeprägte Elastose erkennbar. Entzündungsinfiltrate waren eher in der dermoepidermalen Junctionszone lokalisiert.

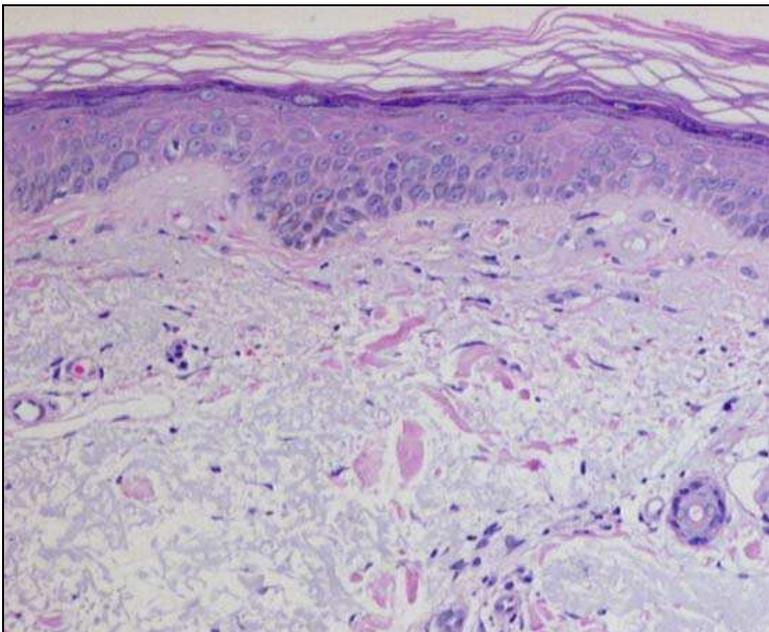
Demgegenüber nahm der Dysplasiegrad bei Patient 5 nach 3monatiger Behandlung mit Oleogel ab und es präsentierten sich eine geringere Anzahl dyskeratotischer Zellen (1/Gesichtsfeld). Die Dicke sowohl der Epidermis (0,08 mm) als auch des Str. Corneum (0,05 mm) war regredient. Eine ausgeprägte Elastose blieb bestehen. Die Entzündungsinfiltrate waren bei diesem Patienten nach Oleogel- Behandlung eher perivaskulär lokalisiert.



Es zeigt sich:

- massive Hyperkeratose
- unregelmäßige Schichtung der Epidermis
- dysplastische Zellen
- diffuses lymphozytäres Entzündungsinfiltrat

Abbildung 26: 5.1 Aktinische Keratose vor Behandlung



Es zeigt sich:

- Rückgang der Hyperkeratose
- Normalisierung des Aufbaus der Epidermis
- Rückgang dysplastischer Zellen
- Rückgang des Entzündungsinfiltrates

Abbildung 27: 5.2 Aktinische Keratose nach 3monatiger Behandlung mit Oleogel

Tabelle 3: Auswertung von Biopsien in der HE-Färbung

Probe	Dyspl. Grad	Dysker. Zahl/HPF	Dicke Epid.	Dicke St.corneum	Parakeratose	Elastose	Entzündung interface	perivasc.
4.1. (AK, atropher Typ)	2	11	0.15		-	3	0	1
4.2 (nach Oleogel)	1	1	0.1		-	3	0	2
5.1 (AK, atropher Typ)	2-3	7	0.1	0.2	-	3	1	0
5.2 (nach Oleogel)	1-2	1	0.08	0.05	-	3	0	1
32.1 (AK, hypertropher Typ)	2	2	0.15	0.5	3	3	2	2
32.2 (nach Oleogel)	1	0	0.13	0.15	2	3	2	2
45.1 (AK, hypertropher Typ)	1	1	0.15	0.1	3	3	3	2
45.2 (nach Oleogel)	1	0	0.1	0.05	2	3	2	1
12.1 (AK, atropher Typ)	1	0	0.1	0.01-0.03	2	3	2	1
12.2 (nach Kombi)	2!	0	0.1	0.05-0.15	2	3	2	1
16.1 (AK, atropher Typ)	2(-3)	3	0.18	0.1	-	3	0	0
16.2 (nach Kombi)	1	0	0.1	0.05	-	3	0	1
34.1 (AK, atropher Typ)	1-2	0	0.1	0.1	3	2	0	2
34.2 (nach Kryo)	1	0	0.1	0.02	-	2	0	1
38.1 (AK, atropher Typ)	1	1	0.05	0.01	-	3	0	0
38.2. (nach Kryo)	0	0	0.05	0.01	-	3	0	1

0 = fehlend; 1 = mässig; 2 = deutlich; 3 = ausgeprägt.

4.3.2 Ki67- Färbung

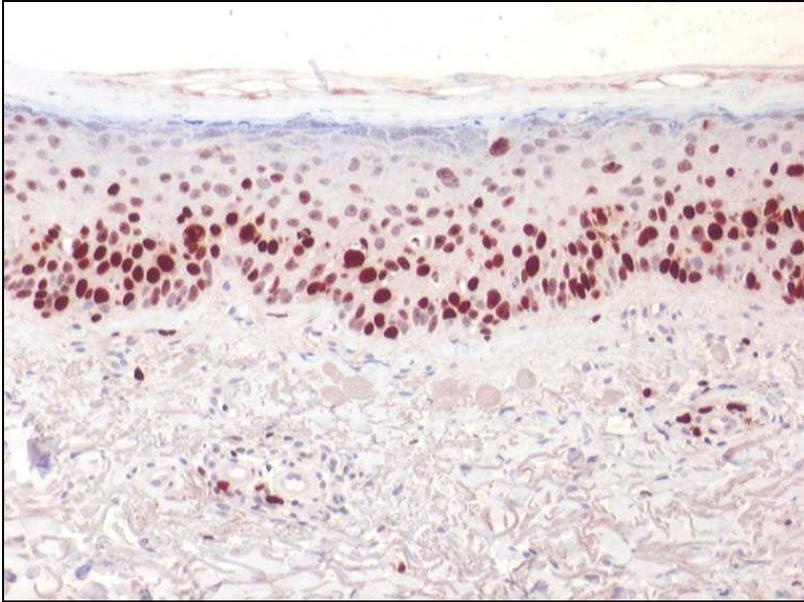


Abbildung 28: 4.1 Aktinische Keratose vor Behandlung

Es zeigt sich eine ausgeprägte Proliferationsaktivität weit über die basalen Schichten hinaus, z.T. bis in die oberen Zellschichten.

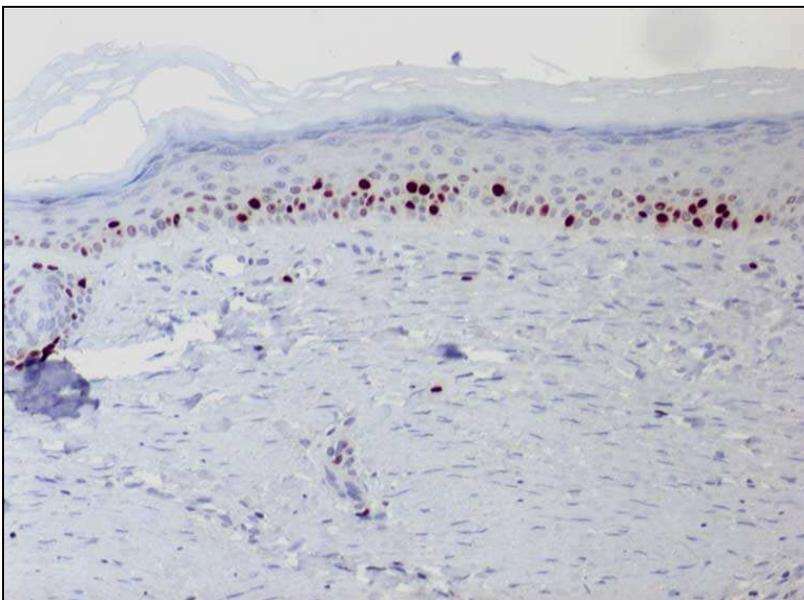


Abbildung 29: 4.2 Aktinische Keratose nach 3monatiger Behandlung mit Oleogel

Es zeigt sich eine weitgehende Normalisierung der Proliferationsaktivität mit einer Beschränkung der Ki67- Aktivität auf die basalen Schichten der Epidermis.

Insgesamt ließen ließ sich bei allen Biopsien der Patienten aus Studienarm 1 (Birkenoleogel) ein Rückgang der Ki67 positiven Keratinozyten nachweisen. Die Zahl der Zelllagen war in 3 von 4 Fällen regredient, in einem Fall stieg sie leicht an. In den 3 von 4 Proben ließ sich ebenso ein Rückgang der Ki67 Expression auf die basalen Schichten zeigen.

Exemplarisch zeigten sich im Präparat 4 vor Behandlung mit Oleogol mehr als 200 positive Zellen pro Gesichtsfeld bei 40facher Vergrößerung. Es ließen sich 12 Zelllagen der Epidermis zählen, positive Zellen ließen sich bis in die 11. Zelllage nachweisen.

Nach Behandlung mit Oleogel war die Anzahl der Zellen, die auf den Proliferationsmarker Ki67 positiv färbten, stark regredient (31 nach Behandlung vs. >200 vor Behandlung). Die Epidermisdicke nahm ab (10 Zelllagen nach Behandlung vs. 12 vor Behandlung). Ebenso beschränkte sich die Ki67 Expression auf die basalen Zelllagen (positive Zellen bis zur 4. Zelllage nachweisbar nach Behandlung vs bis zur 11. Zelllage vor Behandlung).

Im Studienarm 2 (Kryotherapie) zeigte sich ein eher gemischtes Bild mit sowohl Rückgang als auch Progredienz der Ki67 Expression in den Präparaten.

Im Studienarm 3 (Kombinationstherapie) zeigte sich eine einheitliche Regredienz der Ki67 Expression mit Beschränkung der Expression auf die basalen Schichten und ein Rückgang der Zelllagen.

Tabelle 4: Auswertung von Biopsien in der Ki67-Färbung

Probe	Ki67 pos. Keratinocyten/HPF*	Epidermisdicke Zahl der Zell-Lagen	Ki67 positive Zellen bis Zell-Lage
4.1. (AK, atropher Typ)	> 200	12	11
4.2 (nach Oleogel)	31	10	4
5.1 (AK, atropher Typ)	57	8	4
5.2 (nach Oleogel)	46	6	3
32.1 (AK, hypertropher Typ)	48	10	3
32.2 (nach Oleogel)	45	8	4
45.1 (AK, hypertropher Typ)	41	8	3
45.2 (nach Oleogel)	30	11	2
12.1 (AK, atropher Typ)	60	10	3
12.2 (nach Kombi)	20	9	2
16.1 (AK, atropher Typ)	67	9	3
16.2 (nach Kombi)	36	8	2
34.1 (AK, atropher Typ)	20	9	1
34.2 (nach Kryo)	64	8	3
38.1 (AK, atropher Typ)	55	6	3
38.2. (nach Kryo)	48	6	3

* HPF = high power field = 40-fache Vergrößerung

4.3.3 COX-2 Färbung

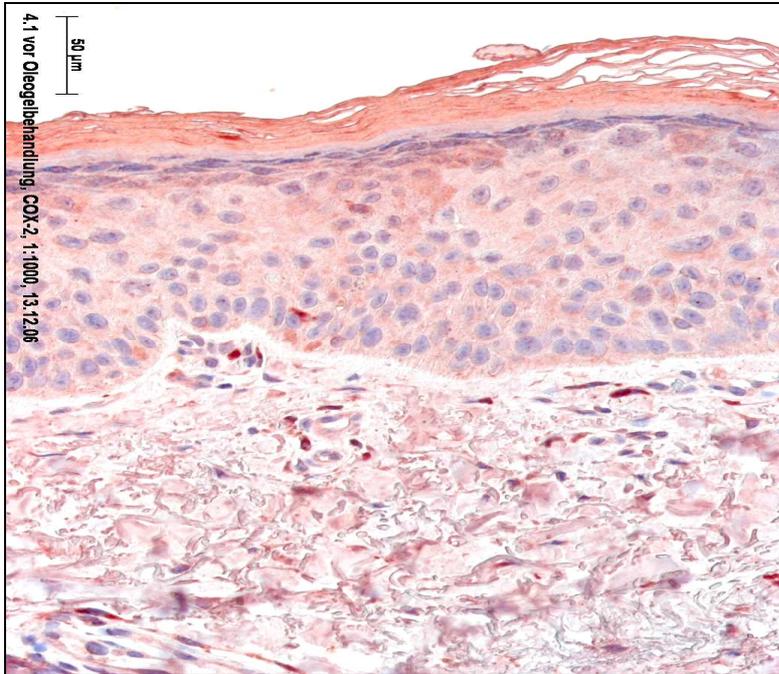


Abbildung 30: COX-2 Färbung vor Birkenolegel- Behandlung

Es zeigen sich vereinzelte Keratinozyten in der Epidermis und vereinzelte Fibrozyten in der Dermis, die COX-2 exprimieren. Die Epidermis weist eine relativ homogene Hintergrundaktivität für den Marker COX-2 auf.

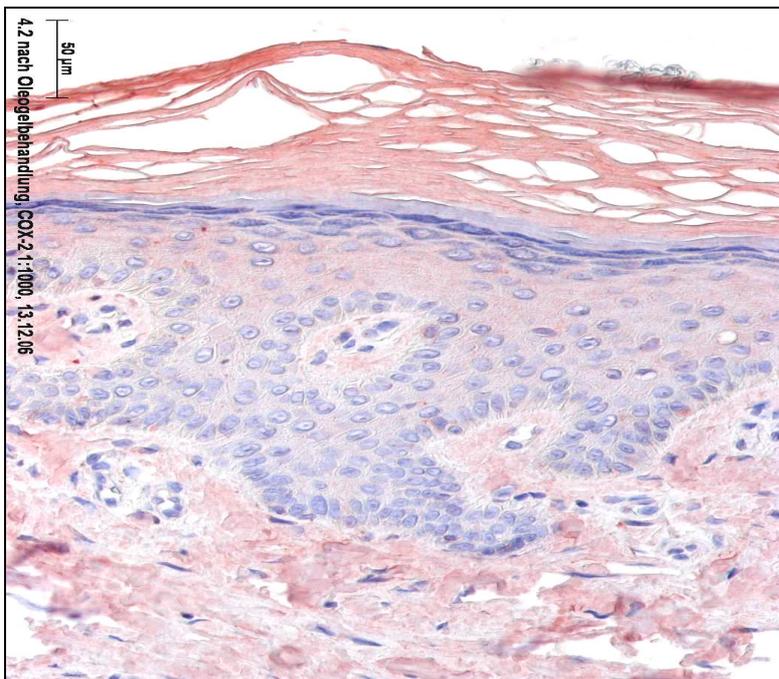


Abbildung 31: COX-2 Färbung nach 3 monatiger Birkenolegel- Behandlung

Es stellen sich keine Zellen dar, die sich spezifisch auf den Marker COX-2 färben. Es zeigt sich eine diskrete Hintergrundaktivität sowohl dermal als auch epidermal.

Die auf den Marker COX-2 gefärbten Biopsien wurden auf die diffuse epidermale Expression der COX-2, die spezifische Expression in Keratinozyten und die Expression in Entzündungszellen hin untersucht.

Im ersten Studienarm (Birkenoleogel) zeigte sich vor Therapiebeginn in 3 von 4 Fällen eine diffuse epidermale Expression der COX-2. In einem Fall nahm die diffuse epidermale Expression im Verlauf der Therapie zu, in einem nahm sie ab und in zwei persistierte sie. In Bezug auf die spezifische COX-2 Expression in Keratinozyten, konnte in 2 von 4 Fällen keine Expression weder vor noch nach Therapie nachgewiesen werden, in einem Fall nahm die Anzahl positiver Zellen im Verlauf der Therapie diskret zu, in einem weiteren Fall nahm sie diskret ab.

In 3 von 4 Fällen färbten sich Entzündungszellen sowohl vor Therapiebeginn als auch nach der Therapie mäßig positiv auf den Marker COX-2, in einem Fall zeigte die Expression Progredienz unter der Therapie.

In den beiden weiteren Studienarmen zeigte sich ein ähnlich gemischtes Bild der COX-2 Expression ohne einen wirklichen Trend erkennen zu lassen.

In dem illustrierten Beispiel sieht man vor Therapie eine diffuse dermale und epidermale Hintergrundaktivität mit einzelnen positiven Keratinozyten und Fibrozyten. Nach der Therapie ließen sich keine positiven Zellen nachweisen, eine diskrete dermale und epidermale Hintergrundaktivität blieb bestehen.

Tabelle 5: Auswertung von Biopsien in der COX-2-Färbung

Probe	Epidermis Diffus 0-3	Keratinocyten Zytopl. 0-3	Entzündungszellen 0-3
4.1. (AK, atropher Typ)	0-1	0	1
4.2 (nach Oleogel)	0-1	0	1
5.1 (AK, atropher Typ)	0-1	0	1
5.2 (nach Oleogel)	0-2	0	1
32.1 (AK, hypertropher Typ)	0	2	1
32.2 (nach Oleogel)	0-1	3	2
45.1 (AK, hypertropher Typ)	2	2	1
45.2 (nach Oleogel)	0	1	1
12.1 (AK, atropher Typ)	0-1	1	1
12.2 (nach Kombi)	0	1-2	2
16.1 (AK, atropher Typ)	1-2	2	2
16.2 (nach Kombi)	0-1	1	1
34.1 (AK, atropher Typ)	0	2	2
34.2 (nach Kryo)	0-1	0	1
38.1 (AK, atropher Typ)	2-3	2	2
38.2. (nach Kryo)	2	2	2

0 = fehlend; 1 = mässig; 2 = deutlich; 3 = ausgeprägt

4.3.4 S-100 und CD1a- Färbungen

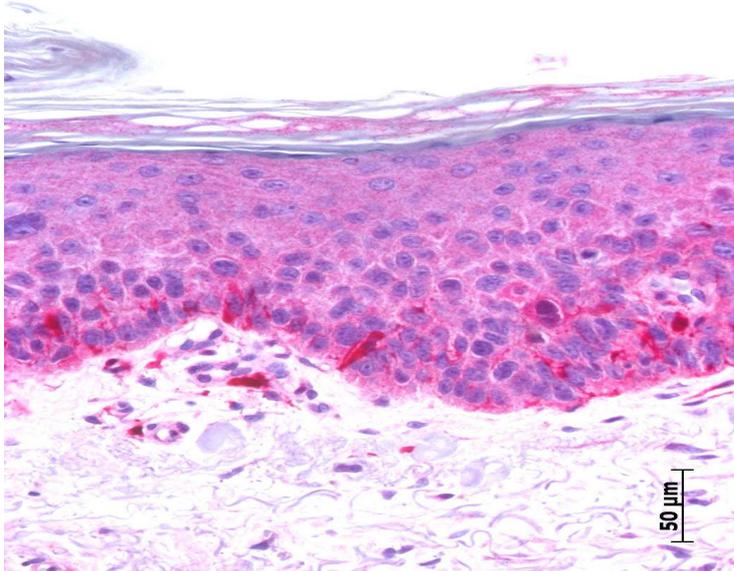


Abbildung 32: 4.1, S-100 Färbung vor Birkenoleogel Behandlung

Es zeigen sich rote positiv gefärbte dendritische Zellen mit typischer Form zwischen den Keratinozyten in den basalen Schichten der Epidermis. Vereinzelt positive Zellen perivaskular.

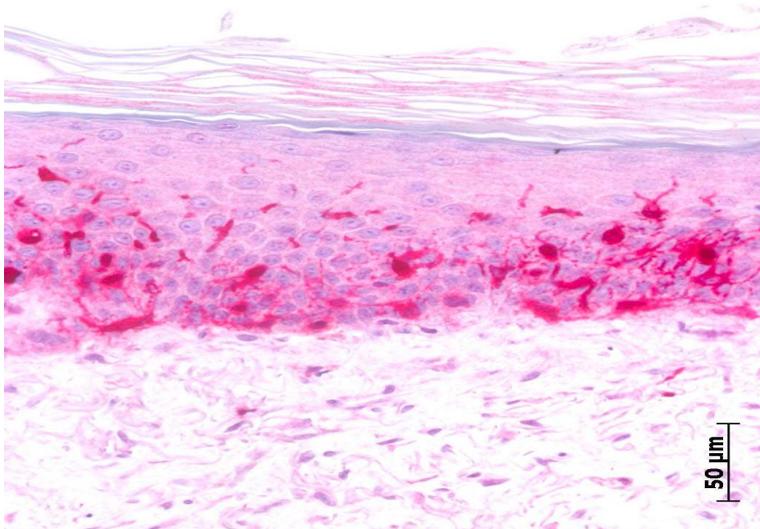


Abbildung 33: 4.2, S-100 Färbung nach Birkenoleogel Behandlung

Es zeigt sich eine deutliche Zunahme roter positiv gefärbter dendritischer Zellen mit typischer Form, die bis in die höheren Epidermisschichten nachweisbar sind. Vereinzelt positive Zellen in der Dermis.

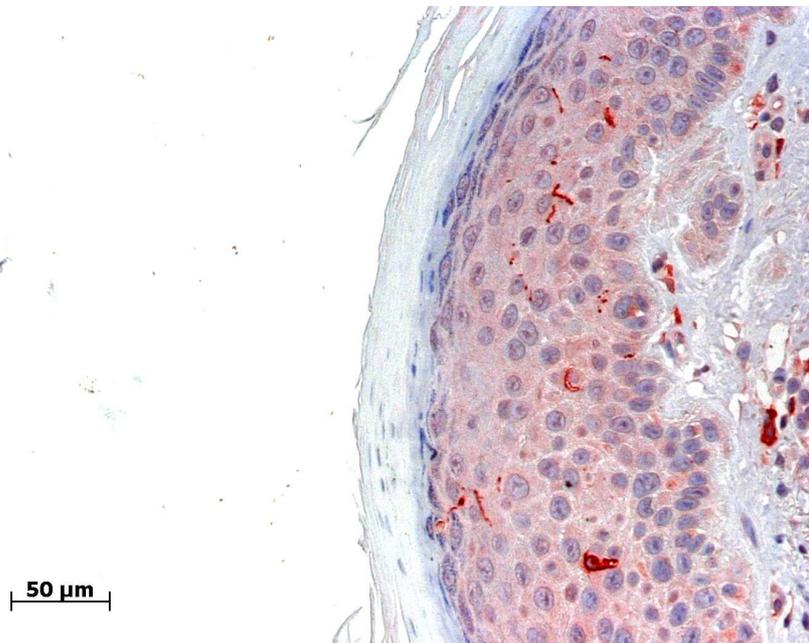


Abbildung 34: 4.1, CD1a Färbung, vor Behandlung mit Birkenoleogel

Es zeigen sich in der gesamten Epidermis vereinzelt rot gefärbte Langerhanszellen. In der Dermis stellen sie sich vereinzelt perivaskulär dar.

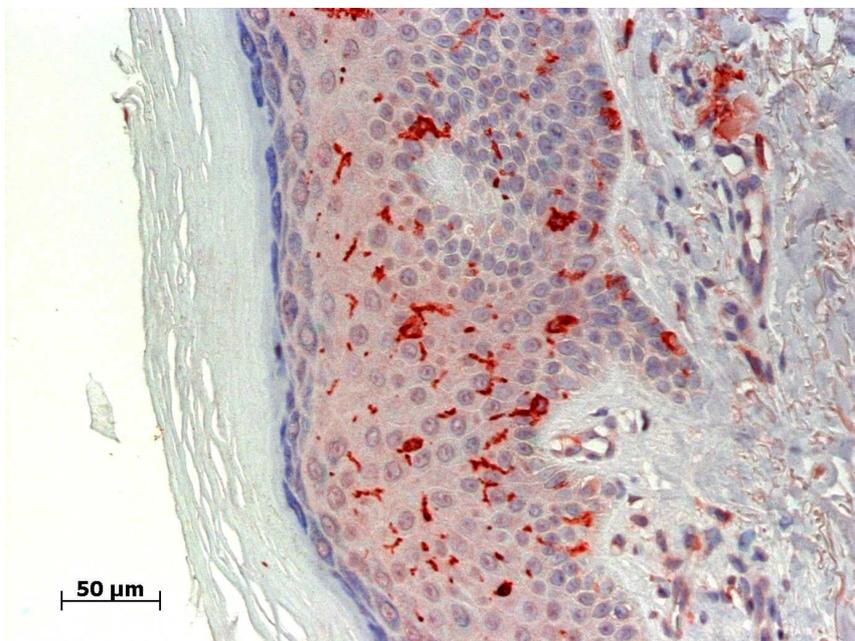


Abbildung 35: 4.2, CD1a Färbung, nach Behandlung mit Birkenoleogel

Es zeigt sich eine deutliche Zunahme positiv gefärbter Langerhanszellen die gesamte Epidermis betreffend. Dermal stellen sie sich zum Teil in Form von Clustern perivaskulär dar.

S-100 ist ein Protein, das von dendritischen Zellen exprimiert wird. Dendritische Zellen, also auch die Langerhanszellen der Haut lassen sich mit Antikörpern, die gegen das S-100- Protein gerichtet sind, gut darstellen. Da das S-100 nicht spezifisch für Langerhanszellen ist (siehe oben), erfolgte eine weitere Färbung mit einem Antikörper gegen CD1a. CD1a ist ein Oberflächenmolekül, das spezifisch von Langerhanszellen der Haut exprimiert wird.

Die Behandlung mit Birkenoleogel sowie die Kryotherapie und Kombinationsbehandlung zeigten eine deutliche Zunahme der S-100- positiven Zellen in der Epidermis. Die Untersuchung nach der Lokalisation der Langerhanszellen, zeigte sich als nicht sehr aussagekräftig. Es war kein genauer Trend ersichtlich, in Bezug auf eine eher perivaskuläre oder interstitielle Verteilung der Zellen vor oder nach Behandlung.

Die Färbung auf den Marker CD1a zeigte ebenso wie die Färbung auf den Marker S-100 in allen Studienarmen bei allen Proben eine Zunahme positiver Zellen im Verlauf der Therapie.

Tabelle 6: Auswertung von Biopsien in der S-100-Färbung

Probe	Zahl in Epid./HPF	Langerhanszellen	
		L. perivaskulär	interstitiell
4.1. (AK, atropher Typ)	15	2	1
4.2 (nach Oleogel)	25	3	2
5.1 (AK, atropher Typ)	11	0	0
5.2 (nach Oleogel)	25	1	1
32.1 (AK, hypertropher Typ)	17	2	1
32.2 (nach Oleogel)	19	1	1
45.1 (AK, hypertropher Typ)	16	1	1
45.2 (nach Oleogel)	17	2	2
12.1 (AK, atropher Typ)	13	0	1
12.2 (nach Kombi)	15	1	2
16.1 (AK, atropher Typ)	6	0	0
16.2 (nach Kombi)	19	1	1
34.1 (AK, atropher Typ)	2	0	0
34.2 (nach Kryo)	4	1	1
38.1 (AK, atropher Typ)	0	0	0
38.2. (nach Kryo)	14	0	0

* HPF = high power field = 40-fache Vergrößerung

Tabelle 7: Auswertung von Biopsien : Vergleich S-100 / CD 1a - Färbung

Probe	Langerhanszellen (Zahl in Epid./HPF)	
	S-100	CD 1a
4.1. (AK, atropher Typ)	15	3,7
4.2 (nach Oleogel)	25	10,5
5.1 (AK, atropher Typ)	11	1,9
5.2 (nach Oleogel)	25	7,7
32.1 (AK, hypertropher Typ)	17	7,2
32.2 (nach Oleogel)	19	17
45.1 (AK, hypertropher Typ)	16	8,3
45.2 (nach Oleogel)	17	13
12.1 (AK, atropher Typ)	13	6,8
12.2 (nach Kombi)	15	8,8
16.1 (AK, atropher Typ)	6	3,4
16.2 (nach Kombi)	19	7,2
34.1 (AK, atropher Typ)	2	3,6
34.2 (nach Kryo)	4	13,8
38.1 (AK, atropher Typ)	0	extern
38.2. (nach Kryo)	14	5,1

* HPF = high power field = 40-fache Vergrößerung

5 Diskussion

Die klinischen Daten zeigen, dass Birken-Oleogel im Vergleich zur Kryotherapie als Standard-Therapieverfahren eine durchaus vergleichbare Wirkung zeigt. Die Rate der Responder bei der alleinigen Anwendung der Kryotherapie beträgt 93 %. Damit liegt die Ansprechrate der Kryotherapie im Rahmen der in der Literatur ermittelten Daten (Graham 1993). Unter denjenigen Patienten, die nur mit Birken-Oleogel behandelt wurden, sind 85 % Responder. Jedoch wies der rein klinische Befund noch ein leichtes Resterythem auf, so dass kein Fall zunächst als 100 %ige Abheilung definiert wurde. Die histologische Nachuntersuchung zeigt jedoch eine deutliche Abnahme der Dysplasie-Zeichen. Somit können auch diese Fälle als abgeheilt bewertet werden. Die Differenz zwischen 93 % (Kryotherapie) und 85 % (Birken-Oleogel) sollte aufgrund der relativ kleinen Fallzahlen nicht überbewertet werden. Faktisch ist eine topische Behandlung mit Birken-Oleogel der Kryotherapie äquivalent.

Auffallend ist, dass die Kombinationsgruppe nur 80 % Responder und 20 % Non-Responder aufweist und somit schlechter abschneidet als beide Einzeltherapie-Arme. Dieser scheinbare Widerspruch kann durch die Bildung eines unbeabsichtigten Selektionsbias erklärt werden: es wurden bei relativ kleinen Fallzahlen in die Kombinationsgruppe sehr viele Patienten mit einem stärkeren Befall von aktinischen Keratosen gegenüber den beiden Einzelarmen eingeschlossen. Ob die kombinierte Anwendung einen Vorteil bietet, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht entschieden werden.

Auch war die Verträglichkeit des Präparates in allen Fällen bis auf einen Patienten, der eine Folliculitis entwickelte, sehr gut. Brennen oder Juckreiz nach der Anwendung traten nicht auf.

Somit scheint Birken-Oleogel eine wirksame, einfach anzuwendende, kostengünstige und schonende Therapiealternative zur Behandlung aktinischer Keratosen darzustellen.

Eine interessante Fragestellung wäre, ob das vermeintliche Resterythem nach einer längeren Therapiedauer noch verschwindet. Hierzu wäre eine Studie mit einem längeren Anwendungszeitraum sinnvoll.

Neben den klinischen Daten wurden Histologien aktinischer Keratosen aus den drei Studienarmen angefertigt. Zuvor wurden die Färbungen erfolgreich an Zytospins etabliert, um sie dann auf das wertvolle Biopsiematerial anwenden zu können.

Mit der Intention, den Wirkmechanismus von Birkenoleogel besser beleuchten und die Wirksamkeit qualitativ anschaulich darstellen zu können, erfolgten an 4 Studienpatienten aus dem Studienarm Monotherapie mit Birkenoleogel Probebiopsien. Aus den beiden anderen Studienarmen erfolgten zum Vergleich je zwei Biopsien. Die Probebiopsien wurden vor Therapiebeginn und nach 3monatiger Applikation von Birkenoleogel- Creme auf die betroffenen Hautareale respektive Kryotherapie und Kombinationstherapie, entnommen. Es wurden HE-, Ki67-, COX-2- und S-100 Färbungen durchgeführt.

Es sollte untersucht werden, ob Birkenoleogel die Differenzierungsfähigkeit der Keratinozyten fördert und somit zur Normalisierung der morphologisch-histologischen Struktur der Epidermis führt.

Hierzu wurde in den HE- Färbungen der Dysplasie Grad, die Zahl der Dyskeratosen/ High Power Gesichtsfeld, die Dicke der Epidermis und des Stratum Corneum, Parakeratose, Elastose und der Ort der Entzündung untersucht.

Der Dysplasiegrad wurde als Kriterium einer malignen Differenzierung herangezogen. Er nahm bei 3 von 4 aktinischen Keratosen während der Behandlung mit Birkenolegel ab, eine Biopsie zeigte nach Behandlung keinen Unterschied zum Ursprungspräparat. Birkenoleogel zeigte somit bei 75 % der untersuchten Präparate den Effekt, dass Zellen, die auf dem Weg zu einer malignen Entartung waren, ihre Malignitätskriterien verlieren und ihre normale Zellintegrität wiedererlangen. Dies konnte ebenso bei einer von 2 Proben nach Kryotherapie und bei zwei von zwei Biopsien nach Kombinationsbehandlung beobachtet werden.

Unter Dyskeratose versteht man eine Verhornungsstörung einzelner Stachelzellen unter Bildung von "Ballon-" oder "Mantelzellen", die zu kernhaltigen Hornzellen zusammenschrumpfen (Roche Lexikon Medizin, 1999). Dyskeratosen konnten in den Biopsien der 4 Patienten vor Birkenoleogel Behandlung gefunden werden. Interessanterweise, zeigten alle Biopsien nach Behandlung mit Birkenoleogel einen

Rückgang in der Anzahl der Dyskeratosen, bei 2 Biopsien sogar drastisch. Eine weitere Verhornungsstörung, die man bei aktinischen Keratosen häufig findet, ist die Parakeratose. Sie beschreibt das Verschwinden des Stratum Granulosum und die Erhaltung des Zellkerns bis ins Stratum corneum (Roche Lexikon Medizin, 1999). In den untersuchten Präparaten, zeigten 2 Präparate der Birkenoleogelgruppe eine ausgeprägte Parakeratose, die nach Therapie an Intensität abnahm. Ein weiteres Charakteristikum aktinischer Keratosen ist eine Verdickung der Epidermis, insbesondere eine Verdickung des Stratum Corneum im Sinne einer Hyperkeratose. In 3 Fällen bewirkte die Anwendung von Birkenoleogel einen Rückgang der Dicke des Stratum Corneum auf bis ein Viertel der ursprünglichen Dicke. In allen Fällen konnte ebenfalls eine Abnahme der Dicke der restlichen Epidermis beobachtet werden. Im Vergleich zur Birkenoleogelgruppe zeigten die Biopsien der Kryotherapie- Patienten in einem Fall eine dezente Zunahme der Dicke der Hornschicht, bei gleich bleibender Dicke der restlichen Epidermis und im anderen Fall eine Verkleinerung beider Schichten um die Hälfte.

Eine Wirkung auf die Elastose, d.h. auf die Sonnenlicht bedingte Schädigung des dermalen Bindegewebes, konnte weder durch Birkenoleogel- Behandlung noch durch Kryotherapie erzielt werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der histologischen Untersuchung der Biopsien, war die Beurteilung entzündlicher Infiltrate. Es stellte sich die Frage, in welchem Ausmaß ein entzündliches Infiltrat vorhanden war und wo dieses Infiltrat hauptsächlich lokalisiert war. Vor Behandlung konnte je nach Präparat eine Entzündung in der dermo-epidermalen Junctionszone und/ oder in der perivaskulären Region beobachtet werden. Die Entzündung in der dermo-epidermalen Junctionszone wird auch als Interface Dermatitis bezeichnet und ist für die aktinische Keratose beschrieben. Ursächlich ist ein phototoxischer Schaden nach langjähriger UV- Licht Exposition (Kerl et al, 2003). Bei den mit Birkenoleogel behandelten Patienten zeigte sich der Trend, dass sich die Entzündung weg von der dermo-epidermalen Junctionszone, hin zur perivaskulären Zone verlagerte. Eine mögliche Erklärung könnten die entzündungshemmenden Eigenschaften der Wirkstoffe im Birkenoleogel liefern, die unter Umständen die UV- Licht bedingte Interface- Dermatitis beeinflussen. Es sind verschiedene anti-entzündliche Wirkungen des Birkenkork- Extraktes bzw. seiner einzelnen Wirkstoffe beschrieben. In vitro konnte die Hemmung der Phospholipase A2- Aktivität zu 50 % mit 0,04%igem

Birkenkork- Extrakt gezeigt werden. Die Phospholipase A2 ist ein Schlüsselenzym im Entzündungsgeschehen (Ying et al, 1991). Für Oleanolsäure konnte gezeigt werden, dass es die humane Leukozyten Elastase (HLE) hemmt. Die HLE wird bei Entzündungen von Neutrophilen Granulozyten freigesetzt (Ying et al, 1991). Lupeol reduzierte in vitro die Prostaglandin E2 – Produktion in A23187- induzierten Makrophagen und inhibierte die damit zusammenhängende Zytokinproduktion (Fernandez et al, 2001). In vivo konnten ebenfalls verschiedene antientzündliche Eigenschaften nachgewiesen werden: Betulinsäure und Betulin sind hochwirksam beim Carregin-, Serotonin-, TPA- und EPP- induzierten Photenödem der Maus und Ratte (del Carmen et al, 1995). Lupeol zeigt antioxidative und zytoprotektive Aktivität. Der Wirkstoff hemmt die Lipidperoxidation bei der Adjuvans- induzierten Arthritis der Ratte. Topisch angewandt, wirkt Lupeol beim TPA- induzierten Ohrödem der Maus (Geetha und Varalakshmi, 1998). Für Oleanolsäure konnte gezeigt werden, dass es die Leukotriensynthese hemmt und somit antientzündlich wirkt (Giner- Larza, 2001).

Zur gleichen Zeit könnte es durch den positiven Einfluss der Birkenoleogelwirkstoffe auf die dendritischen Zellen zu einer Mobilisation von Zellen des spezifischen Immunsystems kommen (Ayala- García et al, 2005), die sich in den hier dargestellten Präparaten perivaskulär anfärben lassen. Um eine definitive Aussage treffen zu können, müsste in weiteren Experimenten eine nähere Immunphänotypisierung der Entzündungszellen stattfinden. Insgesamt muss die hier beschriebene Beobachtung über die Lokalisation der Entzündungsinfiltrate als kritisch eingestuft werden, da ein eindeutiger Trend in der Färbung dendritischer Zellen mittels S-100 nicht nachvollzogen werden konnte (siehe unten) und das Kollektiv untersuchter aktinischer Keratosen insgesamt sehr klein war.

Es konnte in der HE- Färbung ein Rückgang des Dysplasiegrades, eine reduzierte Anzahl dyskeratotischer Zellen, eine verminderte Cutis- Dicke und eine Abnahme der Parakeratose nach Birkenoleogel- Behandlung gezeigt werden. Die Epidermis und Dermis wirken insgesamt wieder normal differenziert, eine Normalisierung der Morphologie tritt ein. Ähnliche Beobachtungen an Keratinozyten konnten in anderen Studien nach Behandlung mit Calcium, respektive Vitamin D- Präparaten gemacht werden. Für die Differenzierung von Keratinozyten ist die intrazelluläre Erhöhung des Calcium- Spiegels ein entscheidender Faktor. Nukleäre Vitamin D- Rezeptoren (VDR) wurden in Zusammenhang gebracht mit Zelldifferenzierung, Hemmung der Zellproliferation und mit Immunmodulation (Nagpal et al, 2005). Bei humanen

Keratinozyten inhibiert 1,25(OH)₂-D₃, aktiver Metabolit des Vitamin D, das Zellwachstum und fördert die Differenzierung zu Korneozyten (Manggau, 2001). Die Bindung an den Rezeptor führt über 2 Mechanismen zur intrazellulären Calcium-Erhöhung, zum einen wird die Expression von Calcium- Rezeptoren gesteigert und zum anderen kommt es zur Erhöhung der PLC- γ (Phospholipase C) (Nagpal et al, 2005). Liganden der Vitamin D- Rezeptoren werden bereits erfolgreich bei der Psoriasis, einer entzündlichen Hauterkrankung mit gestörter terminaler Differenzierung der Keratinozyten, eingesetzt (Nagpal et al, 2005). Denkbar wäre eine mögliche Aktivierung von Vitamin D- Rezeptoren durch Birkenoleogel oder die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade, die einen Influx von Calcium in den Keratinozyten zur Folge hat. Dies würde die in der HE- Färbung gemachten Beobachtungen erklären können. In Folgestudien könnte diesem Denkansatz nachgegangen werden und somit eine weitere noch unbekannte Signalkaskade des Birkenoleogels untersucht werden.

Außerdem interessierte uns, ob Birkenkork- Creme antiproliferativ wirkt. Das Ki 67 Protein ist ein Proliferationsmarker, der Zellen markiert, die sich in der Zellteilung befinden. Aktinische Keratosen stellen eine obligate Präkanzerose dar und besitzen somit eine erhöhte Wachstumsfraktion im Vergleich zu nicht- präkanzeröser Epidermis. Da in der Literatur mehrfach antitumoröse Eigenschaften einiger Wirkstoffe des Birkenoleogels beschrieben sind, sollte hier untersucht werden, ob die Applikation des Birkenoleogels auf aktinische Keratosen, einen Einfluss auf deren Proliferationsaktivität hat.

Zunächst wurde an der Jurkatschen Zellkultur ein entsprechender Antikörper getestet und etabliert, um das wertvolle Biopsiematerial im weiteren Schritt nicht zu verschwenden. Die Jurkatsche Zelllinie ist eine Krebszelllinie und sollte damit einen guten Eindruck über das Färbeverhalten des Antikörpers liefern. Die Färbungen demonstrierten, dass die hier untersuchte Jurkat Zelllinie 5 % positive Ki 67 Zellen exprimiert. Die Färbungen zeigten insgesamt eine gute Qualität bei guter Differenzierung zwischen positiv- und negativ gefärbten Zellen. Somit konnte der Antikörper im nächsten Schritt bei den Hautbiopsien der Birkenoleogel- Studie Anwendung finden.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Birkenoleogel- Behandlung der Anteil der Zellen, die sich auf den Proliferationsmarker Ki 67 positiv anfärbten, rückläufig war. Während bei der aktinischen Keratose, positiv gefärbte Zellen in großem Maße auch

noch bis in die oberen Epidermisschichten nachzuweisen waren, zeigte das Färbemuster der mit Birkenoleogel behandelten aktinischen Keratosen insgesamt weniger positive Zellen bei Verteilung der positiven Zellen in den basalen und parabasalen Epidermisschichten. Das Ki67 Expressionsmuster in den mit Birkenoleogel behandelten Biopsien ähnelte stark dem Expressionsmuster des Markers in gesunder Haut. Die hier beschriebenen Färbemuster für aktinische Keratosen und gesunde Haut stehen in Einklang mit den Beobachtungen von Oh et al, 2004.

Durch Birkenoleogel Behandlung normalisiert sich das Expressionsmuster des Ki 67, das heißt, dass sich weniger Zellen in ihrer proliferativen Phase befinden und somit das Tumorwachstum regredient ist. Ein möglicher Mechanismus, der diese Beobachtung erklären könnte, wäre, dass proliferative Zellen unter der Behandlung mit Birkenoleogel in die Apoptose übergehen. Die proapoptotische Wirkung ist für einige Wirkstoffe, die im Birkenoleogel in hoher Konzentration vorhanden sind, beschrieben. Besonders gut untersucht wurde die zur Apoptose führende Signaltransduktionskaskade der Betulinsäure. Fulda et al, 1998, beschrieb erstmalig, dass Betulinsäure die Apoptose über einen CD 95- unabhängigen, intrinsischen Weg aktiviert. Betulinsäure führt zu einem Verlust des Transmembranpotentials in Mitochondrien. Dies führt zur Freisetzung von löslichen Apoptosefaktoren, wie Cytochrom C und AIF ins Zytosol, wo sie wiederum Caspasen und Endonukleasen aktivieren (Kroemer et al, 1997). Aktivierung der Caspase 3 und 8 führt letztendlich zur DNA Fragmentation und Zelldegradation (Fulda et al, 1998). Eine Besonderheit der Betulinsäure ist, dass sie selektive Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen besitzt und gesunde Zellen nicht beeinflusst werden (Zuko et al, 2002). Es wurde außerdem beschrieben, dass Betulinsäure die Wachstumsfaktor- induzierte in- vitro Angiogenese hemmt. Der Mechanismus liegt wahrscheinlich in der Modulation der mitochondrialen Funktion (Kwon et al, 2002). Antitumorogene Wirkungen wurden ebenfalls für Lupeol (Sheth et al, 1973), Betulin (Hayek et al, 1989) und Oleanolsäure (Yasukawa et al, 1991) beschrieben. Die näheren Wirkmechanismen sind jedoch noch nicht gut erforscht.

Zusammenfassend, konnte durch die verminderte Expression Ki 67 positiver Zellen nach Birkenoleogel- Behandlung eine geringere Proliferationsbereitschaft aktinischer Keratosen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist am ehesten auf die in der

Literatur beschriebene proapoptische Wirkung der Wirkstoffe im Birkenoleogel zurückzuführen, hier sei insbesondere die Betulinsäure genannt.

In der Literatur wird beschrieben, dass Entzündungen ein adäquates Signal für die Induktion der COX-2 Expression darstellen (Isoherranen et al, 1999). Chronische Entzündungen werden mit der Hautkrebsentstehung in Verbindung gebracht. Durch chronische Licht- Exposition kommt es zu einer chronischen Entzündung der Haut. Es wird diskutiert, dass die COX-2 in Keratinozyten, Epithelien und Entzündungszellen chronisch Licht- geschädigter Haut verstärkt exprimiert wird (Chan et al, 1999). Es interessierte uns, ob sich die COX-2 als Marker für aktinische Keratosen eignet.

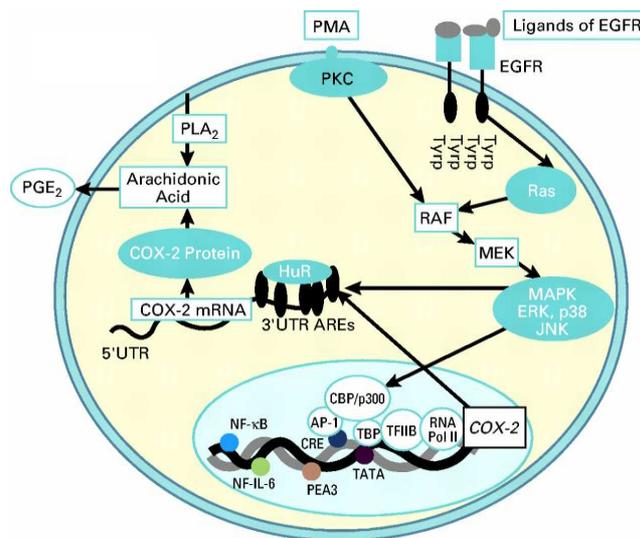
Zunächst wurde in Vorexperimenten an der Zellreihe HaCaT versucht, einen Antikörper für die Färbung der COX-2 zu etablieren, um ihn in späteren Versuchen auf die Hautschnitte der klinischen Studie zu übertragen. Nebenbei sollte die Induktion der COX-2 Expression nach UV- Lichtexposition nachvollzogen werden. Es wurden 3 Versuchsreihen an der Zelllinie HaCaT durchgeführt. Dabei wurden zwei Antikörper getestet, zum einen der Antikörper der Firma DCS und zum anderen der Antikörper der Firma Santa Cruz. Ersterer wurde in einer Konzentration von 1:50 und letzterer in den Konzentrationen 1:500 und 1:1000 aufgetragen. Es fiel auf, dass der Antikörper der Firma DCS in der 1:50 Verdünnung sowohl das nicht bestrahlte als auch das bestrahlte Präparat sehr intensiv färbte. Im Vergleich zu den anderen Präparaten wirkten die DCS Präparate überfärbt, was eventuell auf eine zu niedrig gewählte Verdünnung zurückzuführen ist. Es fiel außerdem auf, dass sich bereits im nicht bestrahlten Präparat fast 10 % der Zellen auf COX-2 anfärben ließen. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die mit dem Santa Cruz Antikörper erzielt wurden. Hier ließen sich in den nicht UV-Licht behandelten Präparaten keine COX-2 positiven Zellen nachweisen. Die Versuche haben an Zellproben stattgefunden, die aus der selben HaCaT- Zellreihe entnommen wurden. Insofern wird nach gleicher Aufbereitung der Zellen erwartet, dass sich zumindest im unbestrahlten Cytospinpräparat die Ergebnisse nicht unterscheiden. Es ist möglich, dass es aufgrund der Überfärbung im DCS Präparat zu unspezifischen Bindungen an Zellproteine gekommen ist, die in der Vorbereitung nicht ausreichend gesättigt wurden. Denkbar ist aber auch, dass in der Keratinozytenzellreihe schon eine latente

COX-2 Expression bestand, was jedoch mit den Ergebnissen der COX-2 Färbung durch den Antikörper von Santa Cruz im Widerspruch steht.

Im Vergleich der Präparate, die mit Hilfe des Antikörpers von Santa Cruz entstanden sind, lässt sich der 1:500 verdünnte Cytospin als leicht überfärbt einstufen. Es imponiert ein zart rosafarbener Hintergrundton, der immer dann unspezifisch auftritt, wenn der Antikörper in einer zu niedrigen Verdünnung gewählt wird. Der 1:1000 verdünnte Cytospin demgegenüber erscheint klar und die positiven Zellen sind im bestrahlten Präparat deutlich von den nicht gefärbten Zellen zu unterscheiden. Es empfiehlt sich, den Antikörper der Firma Santa Cruz in einer 1:1000 Verdünnung beim Nachweis der COX-2 anzuwenden. Der Antikörper der Firma DCS wird aufgrund der besprochenen Experimente als Antikörper 2. Wahl beurteilt. Dennoch sollte darauf aufmerksam gemacht werden, dass bei der Anwendung des DCS Antikörpers beim Nachweis der COX-2 eine höhere Verdünnung als 1:50 erfolgen sollte.

Mit beiden Antikörpern war es möglich, die UV- Licht bedingte Induktion der COX-2 nachzuvollziehen. Die Resultate bestätigen Studien, die von Isoherranen et al, 1999, erhoben wurden. Er hat durch Bestrahlung von HaCaTs und anschließender Analyse der RNA im Northern Blot nachgewiesen, dass die COX-2 durch UVB- Bestrahlung induzierbar ist. Oshima et al, 1996, konnte zeigen, dass durch das Ausschalten des COX-2 Gens in Mäusen mit familiärer adenomatöser Polypose (FAP) eine markante Reduktion im Auftreten und der Größe der einzelnen Polypen resultierte. Chan et al, 1999, zeigte, dass die COX-2 im Spinaliom und lichtgeschädigter Haut signifikant gegenüber normaler nicht lichtexponierter Haut (hier Mundschleimhaut) überexprimiert wird. Er beschrieb 250fach erhöhte mittlere mRNA Level der COX-2 im Spinaliom des Kopfes und Nackens (n=24) gegenüber Mundschleimhaut und ungefähr 50fach erhöhte Spiegel in der dem Spinaliom umliegenden Haut verglichen mit Spiegeln in der Mundschleimhaut.

Generell resultiert eine Überexpression von COX-2 aus fehlregulierter Kontrolle auf transkriptioneller und/ oder posttranskriptioneller Ebene, welches durch ein Ungleichgewicht zwischen aktivierten Onkogenen und inaktivierten Tumorsuppressorgenen entsteht.



Aus Dannenberg, A. J. et al. *J Clin Oncol*; 23:254-266, 2005

Abbildung 36: Regulation der Cyclooxygenase-2

COX-2 wird über eine Vielzahl von Stimuli, darunter Oncogene, Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren (Phorbolster, PMA) reguliert. Stimulation des Ras oder der Proteinkinase C (PKC) führt zur MAP-Kinase Aktivität, die wiederum die COX-2 Transkription verstärkt. Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, darunter AP-1 und PEA3 vermitteln die Induktion der COX-2. COX-2- Level können ebenso durch posttranskriptionelle Mechanismen beeinflusst werden. Das freie 3' Ende der COX-2 mRNA beinhaltet eine Reihe von AU- reichen Elementen (ARE), die die mRNA Stabilität regulieren. Vermehrtes Binden von HuR, einem RNA- Bindeprotein, erklärt z.T. die erhöhte Stabilität der COX-2 mRNA in einigen Tumoren.

Wachstumsfaktoren, Onkogene, Zytokine, Tumorpromoter und reaktive Sauerstoffintermediate stimulieren die Transkription der COX-2 via Proteinkinase C und Ras vermittelter Signalwege (Buckman et al, 1998; Gupta et al, 2001; Smith et al, 2000; Subbaramaiah et al, 1996 und 2002; Inoue et al, 1995; Sheng et al, 1998 und 2001; Cohen et al, 2003). Hierbei aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren, u.a. Aktivator Protein-1, NF-IL6, NF-κB, NFAT und PEA3 die Transkription der COX-2 (Smith et al, 2000; Inoue et al, 1995; de Gregorio et al, 2001). Posttranskriptionell scheint die Menge des produzierten Enzyms durch verschiedene mRNA bindende Proteine reguliert zu werden, die an das AU- reiche 3' terminale Ende der COX-2 mRNA binden und so deren Zerfall und Translation beeinflussen (Dixon et al, 2001). Dieser Einfluß kann entweder in Richtung einer erhöhten Stabilität der mRNA mit erhöhten Translationsraten gehen wie Dixon et al, 2001, es für das Protein HuR in Colon Karzinomen zeigte, oder in Richtung einer

vermehrten Degradation der mRNA. Dies trifft für das Protein AUF1 zu (Sawaoka et al, 2003). Ausfall eines Proteins mit negativem Einfluss auf die Translation, wie dem TIA-1, kann zu erhöhten Expressionsraten des COX-2 Enzyms führen. Auch dies wurde in Colon- Karzinomzellen nachgewiesen (Dixon et al, 2001).

Durch die vermehrte Expression der COX-2 im Tumorgewebe werden verstärkt Prostaglandine gebildet, die über verschiedene Mechanismen zur Tumorgenese beitragen. Die Effekte sind eine erhöhte Zellproliferation und Motilität, während das Immunsystem negativ beeinflusst wird, d.h. es kann nicht mehr effektiv mit seinen körpereigenen Abwehrmechanismen der Tumorentstehung entgegenwirken (Cohen et al, 2003; Tsuji et al, 1995; Huang et al, 1998). Außerdem wird die Apoptose inhibiert und die Angiogenese induziert. Die Angiogenese wird angeregt durch die Produktion proangiogenetischer Faktoren. Ein Faktor ist der endotheliale Wachstumsfaktor (Ben-Av et al, 1995; Tsuji et al, 1998). Die Signaltransduktion der Prostaglandine läuft über G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 transmembranären Domänen, sogenannte EP- Rezeptoren. Thompson et al, 2001, fand heraus, dass Keratinozyten in Spinaliomen die Prostaglandinrezeptoren EP1 und EP4 exprimieren. Maligne Spinaliomzellen, die in Anwesenheit von Indomethacin ihre Wachstumsrate verringerten, steigerten diese wieder nach Zugabe von Prostaglandin E2 oder einem EP1- Agonisten. PGE2 zeigt immunsuppressive Effekte. Dendritische Zellen büßen ihre Fähigkeit Antigene zu prozessieren und zu präsentieren, die Alloreaktivität zu induzieren und IL-12 zu sezernieren, ein (Sharma et al, 2002). Es wird postuliert, dass die PGE2 vermittelte Suppression der Differenzierung und Funktion dendritischer Zellen und die damit zusammenhängende reduzierte zelluläre antitumor- immun- Antwort via EP2 Rezeptor vermittelt wird (Yang et al. 2003). In vitro Studien haben weitere Erkenntnisse über die PGE2- getriggerten, prokarzinogenen Signalmechanismen erbracht. Zum Beispiel führt die Bindung an EP2- oder EP4- Rezeptor zu einer TCF- β -catenin vermittelten Transkription einiger Gene wie *Cyclin D1* und *c-myc*, die mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden (Fujino et al, 2002).

Weitere Hinweise, dass COX-2 maßgeblich an UV-Licht bedingter Hautkrebs Entstehung beteiligt ist, liefern Studien, die sich mit COX-2 Blockern beschäftigten. Fischer et al, 2003, zeigte, dass die Entwicklung von Hautkrebs ausgelöst durch UVB- Bestrahlung bis zu 89 % durch den selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib vermindert werden kann.

Eine zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob die Behandlung mit Birkenoelgel einen Einfluss auf die Expression der COX-2 in aktinischen Keratosen hat. In der immunhistologischen Färbung aktinischer Keratosen vor Behandlung konnte die Expression der COX-2 sowohl dermal als auch epidermal nachgewiesen werden. Leider zeigte sich bei Auswertung der Histologien nach Behandlung mit Birkenoleogel ein relativ gemischtes Bild mit 2 Proben, die in der Expression der COX-2 persistent waren. Eine Probe zeigte sogar eine Progredienz der COX-2 Expression nach Therapieabschluss. Bei lediglich einer von vier Proben konnte eine Regredienz der COX-2 Expression gezeigt werden. In der Literatur wird beschrieben, dass die COX-2 durch den Wirkstoff Betulinsäure in Konzentrationen von 2,5- 20 µg/ml gehemmt wird (Yun et al. 2003). Takada und Aggarwal, 2003, zeigten, dass Betulinsäure bei stimulierter Entzündung die Produktion von NF-κB regulierten Genprodukten, wie z. B. COX-2, hemmt. Für die erneute Beurteilung des Einflusses des Birkenoleogels auf die Expression der COX-2 in aktinischen Keratosen, müssten weitere Studien folgen, idealerweise in einem größeren Kollektiv. Die hier erhobenen Ergebnisse können keinen Trend erkennen lassen, dass die Anwendung von Birkenoleogel einen positiven Einfluss auf die Expression der COX-2 ausübe.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Birkenoleogel eine Immunantwort induziert, wodurch es zu einem vermehrten Einstrom von Langerhans Zellen in die Dermis und Epidermis kommt.

Wir vermuteten einen möglichen immunmodulatorischen Effekt der Wirkstoffe des Birkenoleogels. Um diesen Punkt näher zu beleuchten, färbten wir Probiopsien auf den Marker S-100, ein Marker für dendritische Zellen (Coppola et al, 1998) und auf CD1a, ein spezifischer Marker für Langerhanszellen (Fithian et, 1981).

Dendritische Zellen gehören zur zellulären Komponente angeborener Immunität und umfassen ein System Antigen präsentierender Zellen (APC) mit entscheidenden immunstimulatorischen- und immunmodulatorischen Fähigkeiten (Ayala- Garcia et al, 2005). Die dendritischen Zellen der Haut sind die Langerhans- Zellen, erstmalig beschrieben von Paul Langerhans 1868 (Langerhans, 1868). Sie sind in den basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis lokalisiert und bilden dort durch ihre

dendritischen Zellausläufer in den interzellulären Räumen zwischen den Keratinozyten ein regelrechtes Netzwerk (Breathnach, Birbeck, 1963).

Langerhans- Zellen ließen sich in der Epidermis aktinischer Keratosen bereits vor Birkenoleogel- Behandlung mittel Antikörper gegen S100 und CD1a gut darstellen. Es fiel auf, dass nach 3- monatiger Birkenoleogelbehandlung die Zahl der Langerhans- Zellen intraepidermal zunahm. Die Zunahme war bei den zwei Präparaten atropher aktinischer Keratosen deutlich, bei den Präparaten hypertropher aktinischer Keratosen leicht ausgeprägt. Eine eindeutige Aussage bezüglich einer Zunahme der Langerhans- Zellen perivaskulär respektive interstitiell ließ sich nicht treffen. Eine intraepidermale Zunahme der Langerhans- Zellen konnte ebenfalls für die Präparate nach Kombinationsbehandlung und Kryotherapie gezeigt werden.

Die vermehrte Anzahl von Langerhans- Zellen nach Birkenoleogel- Behandlung, könnte durch verstärktes Einwandern von Langerhans- Zellen aus dem peripheren Blut in die Dermis während der Birkenoleogel- Behandlung erklärt werden. Es ist zu vermuten, dass es unter der Behandlung zu Stimuli kommt, im Sinne von Chemokinen bzw. Zytokinen, die zu einer Infiltration von Langerhans- Zellen in die Epidermis führen könnten.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Behandlung aktinischer Keratosen mit der immunmodulatorischen Substanz Imiquimod gemacht. Es konnte nachgewiesen werden, dass es in aktinischen Keratosen unter Imiquimod- Therapie zu einem Anstieg aktivierter Langerhanszellen in der Epidermis kommt (Ooi et al, 2006).

Es wird postuliert, dass Imiquimod über Toll- like Rezeptoren eine zelluläre Immunantwort auslöst (Hemmi et al, 2002). Toll- like Rezeptoren werden hauptsächlich von dendritischen Zellen und Monozyten exprimiert. Sie sind Strukturen des angeborenen Abwehrsystems und dienen der Erkennung von Antigenen, welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen und steuern entsprechende Aktivierung von Genen (Fritsch, Dermatologie und Venerologie, 2004). Die Effekte beinhalten eine Stimulation der lokalen Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen wie TNF- α , IFN- α , IL- 1, IL- 6, IL- 8 und IL- 12 (Sidky et al, 1992). Dies stimuliert die Migration von dendritischen Zellen in die regionalen Lymphknoten und induziert daraufhin eine adaptive zelluläre Immunantwort (Suzuki, 2000). Für IL-12 wurde gezeigt, dass es ein Hauptzytokin für die Stimulation der T- Zell Antwort vom Typ I ist (Schwarz et al, 1996).

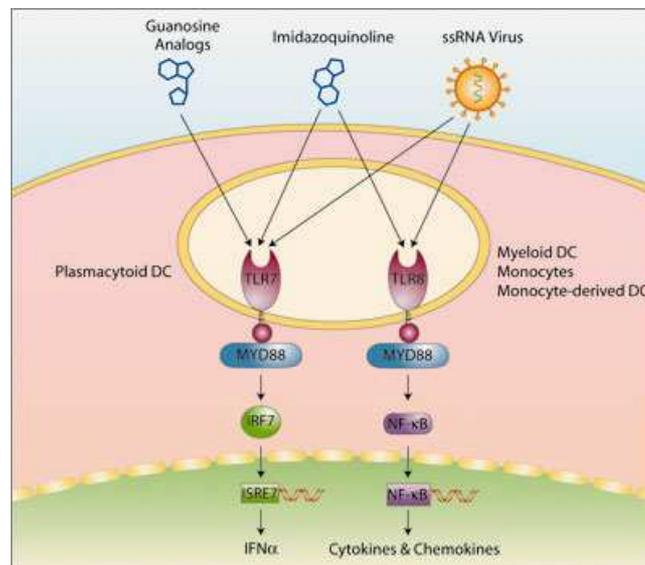


Abbildung 37: Imiquimod als Ligand für Toll- Like Rezeptoren

Guanosin Analoga, Imiquimod und Einzelstrang- RNA- Viren, gelten als Liganden der Toll-like Rezeptoren (TLR) 7 und 8. Ligand- Rezeptor- Bindung führt zur Rekrutierung des Adapter- Moleküls MYD88, welches seinerseits NF-κB und andere Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche durch Bindung an die DNA zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führen.

In diesem Mechanismus liegt wahrscheinlich die Antitumorigenität: Die Präsentation von Tumorantigenen erfolgt über Antigen- präsentierende Zellen, die daraufhin prozessiertes Antigen den T- Lymphozyten in den regionalen Lymphknoten präsentieren (Cavanagh, 1996). Dies führt zur Aktivierung und Proliferation von Antigen- spezifischen T- Zellen, die die spezifische Immunantwort einleiten (Reinherz et al, 1983). In der Epidermis repräsentieren die Langerhans- Zellen die Antigen- präsentierenden Zellen und sie sind in der Lage Tumor- Antigene zu präsentieren (Memar et al, 1995). Eine Reihe von Studien beschreibt einen positiven Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten dendritischer Zellen und verbesserter Prognose für das Endometriumkarzinom (Honig, 2005), das Ösophaguskarzinom (Hiroyuki et al, 1990), das Larynxkarzinom (Gallo et al, 1991), das Harnblasenkarzinom (Inou et al, 1993), das Ovarialkarzinom (Avi Eisenthal et al, 2001) und das Zervixkarzinom (Bethwaite et al, 1996).

In chronisch Licht- geschädigter Haut, wie es bei aktinischen Keratosen der Fall ist, kommt es zu einer Suppression des Immunsystems, teils durch die Reduktion und

Funktioneinschränkung von Langerhans- Zellen (Stingl et al, 1981) und die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen, die die Expression der CD1a und ATPase Aktivität der Langerhans- Zellen negativ modulieren. Durch oben beschriebenen Mechanismus könnte die Applikation von Birkenoleogel, die Immunerkennung von dysplastischen Zellen in aktinischen Keratosen erhöhen und möglicherweise die Immunsuppression bedingt durch exzessive UV- Licht Belastung umkehren.

Ob die von uns beobachtete Vermehrung von Langerhans- Zellen in der Cutis nach Birkenoleogel- Behandlung wirklich mit einer Provokation der Immunantwort gegen dysplastische Zellen einhergeht, sollte in weiteren Studien näher erforscht werden. In einem nächsten Schritt könnte man versuchen in einer größeren Population als in unserer Studie T- Zellen (CD3), T- Helfer Zellen (CD4), zytotoxische T- Zellen (CD8), dendritische Zellen (CD11c), aktivierte dendritische Zellen (CD86/ CD11c), Monozyten und Makrophagen (CD68), MHC II positive Zellen (HLA- DR) und apoptotische Zellen (TUNEL) immunhistochemisch vor und nach Birkenoleogel- Behandlung zu analysieren (Ooi et al, 2005). Die hier ermittelten Ergebnisse geben Hinweise auf immunmodulatorische Wirkungen des Birkenoleogels, eine genauere Charakterisierung mittels oben beschriebener Marker wird jedoch noch nötig sein.

Interessant ist, dass es ebenfalls unter Kryotherapie und unter Kombinationstherapie zu einem verstärkten Einwandern von Langerhanszellen in die Epidermis kommt. Die Kryotherapie ist ein ablatives Verfahren, insofern als es Zellen durch lokal applizierte Vereisung tötet. Der Zelluntergang löst vermutlich eine Entzündungsreaktion aus, die mit adäquaten Signalen zur Einwanderung von Langerhans- Zellen einhergeht. Grundlage dieses Verfahrens ist also in erster Linie ein zytotoxischer Mechanismus aufgrund von Kälte im Gegensatz zu dem in diesem Abschnitt für das Birkenoleogel postulierten immunmodulatorischen Effekt.

Zusammenfassend konnte in einer klinischen Studie gezeigt werden, dass aktinische Keratosen auf Birkenoleogel ansprechen und Birkenoleogel im Vergleich zur Kryotherapie als Standard- Therapieverfahren eine durchaus vergleichbare Wirkung zeigt. Jedoch muss hervorgehoben werden, dass es sich hier erst um eine Phase 2a- Studie handelt und das Patientenkollektiv noch relativ klein war. Es müssen zur weiteren Etablierung des Birkenoleogels in der Therapie aktinischer Keratosen,

Phase 3- Studien im Rahmen eines multizentrischen, plazebokontrollierten, doppelblinden Studiendesign, folgen.

Es konnten außerdem erfolgreich Marker an Zellkulturen etabliert werden und Anwendung an einer begrenzten Anzahl von Biopsien finden. Es zeigte sich bei der histologischen Begutachtung der Trend, dass nach durchgeführter Behandlung mit Birkenoleogel, Hyperkeratosen und Entzündungsinfiltrate aktinischer Keratosen rückläufig waren. Außerdem konnten eine Normalisierung im Aufbau der Epidermis und ein Rückgang dysplastischer Zellen gezeigt werden.

Auf immunologischer Ebene zeigte sich eine verstärkte Expression von Langerhanszellen nach der Behandlung mit Birkenoleogel. Es wird daher hier postuliert, dass Birkenoleogel über einen immunmodulierenden Wirkmechanismus zur Abheilung aktinischer Keratosen führt.

6 Zusammenfassung

Aktinische Keratosen sind Sonnenlicht-induzierte, obligate Präkanzerosen der Haut, aus denen bei Nichtbehandlung Plattenepithelkarzinome entstehen können. Eine Therapie ist daher dringend indiziert, allerdings weisen etablierte Therapieverfahren Nebenwirkungen wie Schmerzhaftigkeit, Entzündung, Blasen- und Krustenbildung auf. In dieser Arbeit wurde ein innovatives Birken-Oleogel, das Wirkstoffe des Birkenkorks wie Betulin, Betulinsäure, Lupeol und Oleanol in hochkonzentrierter Form enthält, als neue Therapieoption für aktinische Keratosen untersucht.

In einer monozentrischen, dreiarmigen, randomisierten Phase 2a-Studie wurden 45 Patienten 2x täglich mit Birken-Oleogel, oder mit einer Kryotherapie mit flüssigem Stickstoff (initial zwei mal), oder mit einer Kombinationstherapie (Kryotherapie plus Birken-Oleogel) über einen Zeitraum von drei Monaten behandelt. Von 8 Patienten konnten zu Beginn und am Ende der Studie Biopsien aus Behandlungsarealen entnommen werden. Die Biopsien wurden mit einer Routinefärbung und zusätzlich, nach Etablierung der Färbungen an Zellkulturen, mit den Markern Ki67, COX-2, S-100 und CD1a gefärbt und ausgewertet.

Die klinische Auswertung ergab für die Monotherapie mit Birken-Oleogel einen mit der Kryotherapie vergleichbaren Therapieerfolg mit Ansprechraten um 80%. Die Kombinationstherapie von Kryotherapie plus Birken-Oleogel brachte keine weitere Steigerung der Wirksamkeit. Histologisch führte die Behandlung mit Birken-Oleogel zu einer Reduktion des Dysplasiegrades, der Dyskeratosen, der Dicke der Epidermis und des Stratum corneum und der Parakeratose. Mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki 67 konnte ein Rückgang der Proliferationsaktivität der Keratinozyten nach Birken-Oleogelbehandlung gezeigt werden. Die Behandlung mit Birken-Oleogel führte ausserdem zu einer verstärkten Rekrutierung von Langerhanszellen in die Epidermis. Eine eindeutige Beeinflussung der COX-2 Expression in der Haut konnte nicht gezeigt werden.

Insgesamt zeigt die vorgelegte Arbeit, daß die topische Anwendung von Birken-Oleogel bei der Behandlung aktinischer Keratosen wirksam ist. Anhand ausgewählter Biopsien konnte der klinische Eindruck bestätigt werden.

7 Literaturverzeichnis

- A. B. Ackerman. (2003) Solar keratosis is squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 139: 1216-7.
- M. L. Albert, S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, N. Bhardwaj. (1998) Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1359-68.
- I. Ayala-Garcia, A.M. Hernandez-Segura, A. Castell-Rodriguez, S.J. Alvarez-Perez, B. Hernandez Tellez, M.D. Ramirez-Gonzales. (2005) Participation of epidermal Langerhans Cells in human pathology and their potential as targets for drug development: a review of literature. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 48: 13-20.
- P. Babilas, M. Landthaler, and R. M. Szeimies. (2003) Aktinische Keratosen. *Hautarzt* 54 (6):551-560.
- I. Baglin. (2003) A review of natural modified betulinic , ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini Rev Med Chem (Netherlands)* 3: 525-529.
- R. Baskar. (1996) Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvula* stem bark against free radical- induced toxicity in experimental urolithiasis. *Fitoterapia LXVII*: 121-125.
- P. Ben-Av, L. J. Crofford, R. L. Wilder, and T. Hla. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 372 (1):83-87.
- P. B. Bethwaite, L. J. Holloway, A. Thornton, B. Delahunt. (1996) Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology* 28: 321-7.
- C. Brand. (1995) Studies on Langerhans cell phenotype in human afferent skin lymph from allergic contact dermatitis. *Adv Exp Med Biol*, 378: 523-5.
- A. S. Breathnach, M. S. Birbeck, J. D. Overall. (1963) Observations bearing on the relationship between langerhans cells and melanocytes. *Ann N Y Acad Sci* 100: 223-38.
- D. C. Brown, K. C. Gatter. (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40: 2-11.
- S. Y. Buckman, A. Gresham, P. Hale, G. Hruza, J. Anast, J. Masferrer, and A. P. Pentland. (1998) COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 19 (5):723-729.
- R. M. Del Carmen. (1998) Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyrus leucomelas*. *Planta Med* 64: 370-372.

- L. L. Cavanagh, R. Sluyter, K. G. Henderson, R. S. Barnetson, G. M. Halliday. (1996) Epidermal Langerhans' cell induction of immunity against an ultraviolet-induced skin tumour. *Immunology* 87: 475-80.
- G. Chan, J. O. Boyle, E. K. Yang, F. Zhang, P. G. Sacks, J. P. Shah, D. Edelstein, R. A. Soslow, A. T. Koki, B. M. Woerner, J. L. Masferrer, and A. J. Dannenberg. (1999) Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 59 (5):991-994.
- Chowdhury. (2002) Betulinic acid, potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit.* 8: 254-265.
- C. J. Cockerell. (2000) Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol* 42: 11-7.
- E. G. Cohen, T. Almahmeed, B. Du, D. Golijanin, J. O. Boyle, R. A. Soslow, K. Subbaramaiah, and A. J. Dannenberg. (2003) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 9 (9):3425-3430.
- D. Coppola, L. Fu, S. V. Nicosia, S. Kounelis, M. Jones. (1998) Prognostic significance of p53, bcl-2, vimentin, and S100 protein-positive Langerhans cells in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 29: 455-62
- H. J. Danpure and R. M. Tyrrell. (1976) Oxygen-dependence of near UV (365 NM) lethality and the interaction of near UV and X-rays in two mammalian cell lines. *Photochem. Photobiol.* 23 (3):171-177.
- W. Fu, C. J. Cockerell. (2003) The actinic (solar) keratosis: a 21st-century perspective. *Arch Dermatol* 139: 66-70
- Gregorio R. de, M. A. Iniguez, M. Fresno, and S. Alemany. (2001) Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J Biol. Chem.* 276 (29):27003-27009.
- V. DeLeo, S. Scheide, J. Meshulam, D. Hanson, and A. Cardullo. (1988) Ultraviolet radiation alters choline phospholipid metabolism in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 91 (4):303-308.
- D. A. Dixon, N. D. Tolley, P. H. King, L. B. Nabors, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, and S. M. Prescott. (2001) Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest* 108 (11):1657-1665.
- A. Eisenthal, N. Polyvkin, L. Bramante-Schreiber, F. Misonznik, A. Hassner, B. Lifschitz-Mercer. (2001) Expression of dendritic cells in ovarian tumors correlates with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Hum Pathol* 32: 803-7.

L. Feng, W. Sun, Y. Xia, W. W. Tang, P. Chanmugam, E. Soyoola, C. B. Wilson, and D. Hwang. (1993) Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem. Biophys.* 307 (2):361-368.

A. Fernandez. (2001) New insight into the mechanism of action of the anti-inflammatory triperene Lupeol. *J Pharm Pharmacol.* 53: 1533-1539.

P. M. Filipe, J. P. Freitas, M. Castro, R. Pinto, A. Fernandes, L. C. de Castro, T. Rico, and F. G. Rodrigo. (1995) Lipid peroxidation, production of PGE₂ and cellular mortality induced by UV in cultured human skin fibroblasts. *C.R. Seances Soc. Biol Fil.* 189 (3):443-451.

S. M. Fischer, C. J. Conti, J. Viner, C. M. Aldaz, and R. A. Lubet. (2003) Celecoxib and difluoromethylornithine in combination have strong therapeutic activity against UV-induced skin tumors in mice. *Carcinogenesis* 24 (5):945-952.

E. Fithian, P. Kung, G. Goldstein, M. Rubinfeld, C. Fenoglio, R. Edelson. (1981) Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 2541-4.

Fritsch (2003): *Dermatologie und Venerologie*, 2. Auflage, Springer, Berlin 2003.

C. A. Frost and A. C. Green. (1994) Epidemiology of solar keratoses. *Br J Dermatol* 131 (4):455-464.

S. Fulda, K.M. Debatin. (2000) Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. *Med Pediatr Oncol.* 35: 616-618.

S. Fulda, C. Scaffidi, S. A. Susin, P. H. Krammer, G. Kroemer, M. E. Peter, K. M. Debatin. (1998) Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem* 273: 33942-8.

H. Fujino, K. A. West, and J. W. Regan. (2002) Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP₂ and EP₄ prostanoid receptors by prostaglandin E₂. *J Biol Chem* 277 (4):2614-2619.

S. Fulda, I. Jeremias, H.H. Steiner, T. Pietsch, K.M. Debatin. (1999) Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer* 82: 435-441.

T. Geetha, P. Varalakshmi, R. M. Latha. (1998) Effect of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark on lipid peroxidation in adjuvant induced arthritis in rats. *Pharmacol Res* 37: 191-5.

L. Giannetti, U. Consolo, C. Magnoni and L. Lo Muzio. (2004) Apoptosis: Escaping strategies in human skin cancers (Review). *Oncology Reports* 11: 401-405.

D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, and W. P. Parks. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl. Cancer Inst.* 51 (5):1417-1423.

E.M. Giner-Larza, S. Manez, M.C. Recio, R.M. Giner, J.M. Prieto, M. Cerda-Nicolas, J.L. Rios. (2001) Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *Eur J Pharmacol.* 428: 137-143.

R. G. Glogau. (2000) The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol* 42: 23-4

G. F. Graham. (1993) Advances in cryosurgery during the past decade. *Cutis* 52: 365-72.

A. Gresham, J. Masferrer, X. Chen, S. Leal-Khoury, and A. P. Pentland. (1996) Increased synthesis of high-molecular-weight cPLA2 mediates early UV-induced PGE2 in human skin. *Am J Physiol* 270 (4 Pt 1):C1037-C1050.

R. A. Gupta and R. N. DuBois. (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat.Rev.Cancer* 1 (1):11-21.

S. Hammar, R. A. Weaver, V. J. Keranen. (1986) Left temporal lobe cerebral cortex mass in a 19-year-old male. *Ultrastruct Pathol* 10: 583-91.

D. Hanson and V. DeLeo. (1990) Long-wave ultraviolet light induces phospholipase activation in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 95 (2):158-163.

D. L. Hanson and V. A. DeLeo. (1989) Long wave ultraviolet radiation stimulates arachidonic acid release and cyclooxygenase activity in mammalian cells in culture. *Photochem.Photobiol.* 49 (4):423-430.

E. Hayek. (1989) A bicentennial of Betulin. *Phytochemistry* 28: 2229-2242.

C. W. Heizmann, G. Fritz, B. W. Schafer. (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7: d1356-68.

H. Hemmi, T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, S. Akira. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3: 196-200.

Hiroyuki, Matsuda, Masaki Mori, Shunichi Tsujitani, Shinji Ohno, Hiroyuki Kuwano, Keizo Sugimachi. (1990) Immunohistochemical Evaluation of Squamous Cell Carcinoma Antigen and S100 Protein-Positive Cells in Human Malignant Esophageal Tissues. *Cancer*, 65(10); May 15: 2261-2265.

A. Honig, N. Schaller, J. Dietl, J. Backe, U. Kammerer. (2005) S100 as an immunohistochemically-detected marker with prognostic significance in endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 25: 1747-53.

L. L. Hruza and A. P. Pentland. (1993) Mechanisms of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol* 100 (1):35S-41S.

Y. Hua. (1991) Triterpenes from outer bark of *Betula nigra*. *J Wood Chem Technol* II: 503-516.

- M. Huang, M. Stolina, S. Sharma, J. T. Mao, L. Zhu, P. W. Miller, J. Wollman, H. Herschman, and S. M. Dubinett. (1998) Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res.* 58 (6):1208-1216.
- R. M. Hurwitz and L. E. Monger. (1995) Solar keratosis: an evolving squamous cell carcinoma. Benign or malignant? *Dermatol Surg.* 21 (2):184.
- C. Huyke, M. Laszczyk, A. Scheffler, R. Ernst, C. M. Schempp. (2006) Treatment of actinic keratoses with birch bark extract: a pilot study. *J Dtsch Dermatol Ges* 4: 132-6.
- H. Inoue, C. Yokoyama, S. Hara, Y. Tone, and T. Tanabe. (1995) Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol.Chem.* 270 (42):24965-24971.
- K. Isoherranen, K. Punnonen, C. Jansen, P. Uotila. (1999) Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol* 140: 1017-22.
- V. Jay. (2000) An innovative ingredient for a better skin protection. *SÖFW-Journal* 126: 24-27.
- K. Kahlos. (1987) Antitumor activity of some compounds and fractions from an – hexane extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharmaceut Fennica* 96: 33-40.
- H. Kerl, C. Garbe, L. Cerroni, H.H. Wolff (2003): *Histopathologie der Haut*, Springer, Berlin, 2003.
- G. Kroemer. (1997) Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ* 4: 443-56.
- J. Krutmann. (2001) Photocarcinogenesis. *Schweiz Rundsch Med Prax* 90 (8):297-299.
- H. Kwon. (2002) Betulinic acid inhibits Growth factor- induced in vitro Angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Jpn J Cancer res.* 93: 417-425.
- P. Langerhans. (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Archives of Pathological Anatomy* 44:325–37.
- C. P. Larsen, R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris, J. M. Austyn. (1990) Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172: 1483-93.
- G. Löffler, P. Petrides. (2003) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin.

- K. Mahnke, M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig, R. M. Steinman. (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151: 673-84.
- M. Manggau, D. S. Kim, L. Ruwisch, R. Vogler, H. C. Korting, M. Schafer-Korting, B. Kleuser. (2001) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate. *J Invest Dermatol* 117: 1241-9.
- M. S. Matsui and V. A. DeLeo. (1990) Induction of protein kinase C activity by ultraviolet radiation. *Carcinogenesis* 11 (2):229-234.
- D. McCormick, H. Chong, C. Hobbs, C. Datta, P. A. Hall. (1993) Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 22: 355-60.
- P. Mellanen, T. Petanen, J. Lehtimaki, S. Makela, G. Bylund, B. Holmbom, E. Mannila, A. Oikari, R. Santti. (1996) Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicol Appl Pharmacol* 136: 381-388.
- O. M. Memar, I. Arany, S. K. Tyring. (1995) Skin-associated lymphoid tissue in human immunodeficiency virus-1, human papillomavirus, and herpes simplex virus infections. *J Invest Dermatol* 105: 99S-104S.
- A. A. Memon, J. A. Tomenson, J. Bothwell, and P. S. Friedmann. (2000) Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *Br J Dermatol* 142 (6):1154-1159.
- G. Metz. (2000) Terpenoide. Häufig, vielfältig, aber wenig beachtet. *Pharm Ztg* 145: 4400-4405.
- L. Meunier, N. Raison-Peyron, and J. Meynadier. (1998) UV-induced immunosuppression and skin cancers. *Rev Med Interne* 19 (4):247-254.
- N. Miura, Y. Matsumoto, S. Miyairi, S. Nishiyama, A. Naganuma. (1999) Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells. *Mol Pharmacol* 56: 1324-1328.
- N. Mizumoto, A. Takashima. (2004) CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. *J Clin Invest* 113: 658-60.
- M. Mohty, B. Gaugler. (2003) Dendritic cells: interfaces with immunobiology and medicine. A report from the Keystone Symposia Meeting held in Keystone, 3-8 March 2003. *Leukemia* 17: 1753-8.
- D.M. Moriarity, J. Huang, C.A. Yancey, P. Zang, W.N. Setzer, R.O. Lawton, R.B. Bates, S. Caldera. (1998) Lupeol is the cytotoxic principle in the leaf extract of *Dendropanax cf. querceti*. *Planta Med.* 64: 370-372.
- R. L. Moy. (2000) Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 42 (1 Pt 2):8-10.

- S. Nagpal, S. Na, R. Rathnachalam. (2005) Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 26: 662-87
- C.W. Oh, N. Penneys. (2004) P27 and mib1 expression in actinic keratosis, Bowen disease, and squamous cell carcinoma. *Am - J- of- Dermatopathol.* 26 (1): 22-6.
- T. Ooi, R. S. Barnetson, L. Zhuang, S. McKane, J. H. Lee, H. B. Slade, G. M. Halliday. (2006) Imiquimod-induced regression of actinic keratosis is associated with infiltration by T lymphocytes and dendritic cells: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 154: 72-8.
- M. Oshima, J. E. Dinchuk, S. L. Kargman, H. Oshima, B. Hancock, E. Kwong, J. M. Trzaskos, J. F. Evans, and M. M. Taketo. (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87 (5):803-809.
- M. J. Peak, J. G. Peak, and B. A. Carnes. (1987) Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochem.Photobiol.* 45 (3):381-387.
- M. J. Peak and J. G. Peak. (1989) Solar-ultraviolet-induced damage to DNA. *Photodermatol.* 6 (1):1-15.
- R. P. Phillipson, S. E. Tobi, J. A. Morris, and T. J. McMillan. (2002) UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism. *Free Radic.Biol Med* 32 (5):474-480.
- N. Provost, M. Moreau, A. Leturque, and C. Nizard. (2003) Ultraviolet A radiation transiently disrupts gap junctional communication in human keratinocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 284 (1):C51-C59.
- K. Punnonen, T. Puustinen, and C. T. Jansen. (1987) Ultraviolet B irradiation induces changes in the distribution and release of arachidonic acid, dihomogammalinolenic acid, and eicosapentaenoic acid in human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 88 (5):611-614.
- E.L. Reinherz, S.C. Meuer, S. F. Schlossman. (1983) Delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunology today* 4: 5 – 8.
- D. Rimoldi, R. Lemoine, A. M. Kurt, S. Salvi, M. Berset, M. Matter, B. Roche, J. P. Cerottini, D. Guggisberg, J. Krischer, R. Braun, J. P. Willi, C. Antonescu, D. Slosman, F. J. Lejeune, D. Lienard. (2003) Detection of micrometastases in sentinel lymph nodes from melanoma patients: direct comparison of multimarker molecular and immunopathological methods. *Melanoma Res* 13: 511-20.
- A. Rodriguez, A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli, S. Amigorena. (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1: 362-8.
- G. Rowden, M. G. Lewis, A. K. Sullivan. (1977) Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268: 247-8.

- F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400.
- H. Sawaoka, D. A. Dixon, J. A. Oates, and O. Boutaud. (2003) Tristetraprolin binds to the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 mRNA. A polyadenylation variant in a cancer cell line lacks the binding site. *J Biol.Chem.* 278 (16):13928-13935.
- N. Sawhney, P. A. Hall. (1992) Ki67--structure, function, and new antibodies. *J Pathol* 168: 161-2.
- T. Schwarz. (1996) Production of interleukin-12 by keratinocytes and its role in contact hypersensitivity. *Ann N Y Acad Sci* 795: 82-7.
- S. Sharma, M. Stolina, S. C. Yang, F. Baratelli, J. F. Lin, K. Atianzar, J. Luo, L. Zhu, Y. Lin, M. Huang, M. Dohadwala, R. K. Batra, and S. M. Dubinett. (2003) Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res.* 9 (3):961-968.
- H. Sheng, J. Shao, J. D. Morrow, R. D. Beauchamp, and R. N. DuBois. (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 58 (2):362-366.
- H. Sheng, J. Shao, M. K. Washington, and R. N. DuBois. (2001) Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol.Chem.* 276 (21):18075-18081.
- K. Sheth. (1973) Antitumor Agents from *Alnus oregona* (Betulaceae). *J Pharmaceut Sci* 62: 139-140.
- Y. A. Sidky, E. C. Borden, C. E. Weeks, M. J. Reiter, J. F. Hatcher, G. T. Bryan. (1992) Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. *Cancer Res* 52: 3528-33.
- W. L. Smith, D. L. Dewitt, and R. M. Garavito. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu.Rev Biochem.* 69:145-182.
- G. Stingl, L. A. Gazze-Stingl, W. Aberer, K. Wolff. (1981) Antigen presentation by murine epidermal langerhans cells and its alteration by ultraviolet B light. *J Immunol* 127: 1707-13.
- P. T. Strickland, D. Creasia, M. L. Kripke. (1985) Enhancement of two-stage skin carcinogenesis by exposure of distant skin to UV radiation. *J Natl Cancer Inst* 74: 1129-34.
- K. Subbaramaiah, N. Telang, J. T. Ramonetti, R. Araki, B. DeVito, B. B. Weksler, and A. J. Dannenberg. (1996) Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 56 (19):4424-4429.

K. Subbaramaiah, L. Norton, W. Gerald, and A. J. Dannenberg. (2002) Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol.Chem.* 277 (21):18649-18657.

H. Suzuki, B. Wang, G. M. Shivji, P. Toto, P. Amerio, M. A. Tomai, R. L. Miller, D. N. Sauder. (2000) Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 114: 135-41.

Y. Takada, B. B. Aggarwal. (2003) Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9. *J Immunol* 171: 3278-86.

E. J. Thompson, A. Gupta, G. A. Vielhauer, J. W. Regan, and G. T. Bowden. (2001) The growth of malignant keratinocytes depends on signaling through the PGE(2) receptor EP1. *Neoplasia.* 3 (5):402-410.

M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoka, M. Hori, and R. N. DuBois. (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93 (5):705-716.

R. Tsukifuji, K. Tagawa, A. Hatamochi, and H. Shinkai. (1999) Expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *Br J Cancer* 80 (7):1087-1091.

C. van Kooten, J. Banchereau. (1997) Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* 9: 330-7.

B.H. Wang, G.M. Polya. (1996) Selective inhibition of cyclic AMP- dependent protein kinase by amphiphilic triterpenoids and related compounds. *Phytochemistry.* 41: 55-63.

L. Yang, N. Yamagata, R. Yadav, S. Brandon, R. L. Courtney, J. D. Morrow, Y. Shyr, M. Boothby, S. Joyce, D. P. Carbone, and R. M. Breyer. (2003) Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *J Clin Invest* 111 (5):727-735.

K. Yasukawa, M. Takido, T. Matsumoto, M. Takeuchi, S. Nakagawa. (1991) Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology* 48: 72-76.

Q.L. Ying, A.R. Rinehard, S.R. Simon, J.C. Cheronis. (1991) Inhibition of human leukocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. *Biochem J.* 277 (Pt 2): 521-526.

Y. Yun, S. Han, E. Park, D. Yim, S. Lee, C. K. Lee, K. Cho, K. Kim. (2003) Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Arch Pharm Res* 26: 1087-95.

V. Zuco, R. Supino, S.C. Righetti, L. Cleris, E. Marchesi, C. Gambacorti-Passerini, F. Formelli. (2002) Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer letters* 175 (1): 17-25

8 Danksagung

Zum Abschluss meiner Doktorarbeit möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Dipl. Biol. C. Schempp für das Thema meiner Doktorarbeit und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und seiner Erfahrung vorangetrieben und hat stets ein offenes Ohr für anfallende Probleme gehabt. Ich danke ihm außerdem für die Hilfe beim Auswerten der Histologien und Erstellen der Tabellen.

Herrn Professor Dr. med. S. Ehl danke ich recht herzlich für das Übernehmen der Zweitkorrektur.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Constance Huyke, die stets Zeit fand, um mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Danke für die Möglichkeit betreuend bei der Studie mitgewirkt zu haben.

Ein recht herzlicher Dank gilt dem Laborteam der Arbeitsgemeinschaft um Herrn Professor Dr. med. Dipl. Biol. C. Schempp. Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Frau Birgit Simon- Haarhaus und Herrn Bernhard Kremer, die mir mit ihrem labortechnischen Wissen und ihren guten Ratschlägen eine große Hilfe waren. Außerdem war es eine Freude mit ihnen zusammen zu arbeiten.

An dieser Stelle möchte ich mich nochmals bei meiner Familie bedanken, die mir das Medizinstudium an der Universität Freiburg ermöglicht und mich in meinem Werdegang tatkräftig unterstützt.

9 Lebenslauf

Name: Mirko Rödиг

Geburtsdatum: 03.10.1981

Geburtsort: Köln

Eltern: Rudolf Rödиг, Ingenieur
Monika Rödиг, geb. Hurtz, MTA

Geschwister: Maren Rödиг

Schulbildung: 1988 – 1992 Grundschule Rommerskirchen
1998 – 1999 Episcopal Highschool Jacksonville, Florida
1992 – 2001 Norbert- Gymnasium Knechtsteden

Studium: 2001 – heute Albert- Ludwig Universität Freiburg
2003 Physikum
2005 – 2006 Auslandsstudium in Valencia/ Spanien
2007 Praktisches Jahr:

1. Innere Medizin, Schlieren (Schweiz)
2. Dermatologie, Freiburg
3. Chirurgie, Buenos Aires (Argentinien)