

**Aus der Dermatologischen Klinik  
des St. Josef Hospitals Bochum – Universitätsklinik –  
der Ruhr-Universität Bochum  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Altmeyer**

---

**Immunhistochemische Untersuchungen zum Wirkmechanismus der  
Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie bei  
schwerer atopischer Dermatitis in vivo**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
einer  
Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ruhr-Universität Bochum**

**vorgelegt von  
Frank Breuckmann  
aus Bochum  
2002**

Abstract

Breuckmann

Frank

Immunhistochemische Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie bei schwerer atopischer Dermatitis in vivo

**Problem:** Unter Verwendung spezieller immunhistochemischer Methoden galt es in dieser Promotionsarbeit zu klären, inwieweit die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in der Lage ist, eine Immunmodulation pathogenetisch bedeutsamer Zellpopulationen im dermalen Entzündungsinfiltrat zu induzieren, den Aktivitäts- und Proliferationsstatus zu senken sowie eine Steigerung apoptotischer Kaskaden zu provozieren.

**Methode:** Mittels prä- und posttherapeutischer Biopsien erfolgten bei 15 Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis Nachweis und statistische Auswertung von bcl-2<sup>+</sup>-, p53<sup>+</sup>-, ISEL<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, CD1a<sup>+</sup>-, Kathepsin-G<sup>+</sup>-, EG2<sup>+</sup>-, Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>- sowie HLA-DR<sup>+</sup>- und MIB-1<sup>+</sup>-Zellen im dermalen inflammatorischen Infiltrat.

**Ergebnis:** Im Vergleich zur prätherapeutischen Situation ließ sich nach Beendigung der Therapie eine signifikante Minderung dermalen CD1a<sup>+</sup>-Zellen, Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen sowie MIB-1<sup>+</sup>-Zellen aufzeigen. Ebenso konnte eine Abnahme der EG2<sup>+</sup>-Zellen sowie eine geringe Rezession HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat verzeichnet werden. Bezüglich der Präsenz dermalen Mastzellen konnte keine relevante Änderung konstatiert werden. Zusätzlich wurde die signifikante Abnahme bcl-2<sup>+</sup>-Zellen, kombiniert mit der signifikanten Zunahme p53<sup>+</sup>-Zellen, von einer signifikanten Abnahme CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen begleitet. Simultan kam es zum relativen Anstieg CD8<sup>+</sup>-Zellen sowie dermalen ISEL<sup>+</sup>-Zellen. Alle Veränderungen waren mit einer deutlichen Besserung des Hautzustands assoziiert.

**Diskussion:** Unter Einbeziehung der ermittelten Daten erschließt sich, dass die Befundbesserung der klinischen Symptomatik infolge dieses Therapieregimes mit einer Modulation des Entzündungsinfiltrats hinsichtlich der Präsenz von T-Lymphozyten, Langerhanszellen und Eosinophilen sowie mit einer Reduktion proinflammatorischer Einflüsse, des Aktivitätszustands und des Proliferationsstatus einhergeht. Die Induktion apoptotischer Vorgänge, speziell der T-Lymphozyten, scheint hierbei von besonderer Bedeutung zu sein und ist vermutlich ursächlich für das gute Nutzen-Risiko-Verhältnis.

Dekan: Prof. Dr. med. G. Muhr  
Referent: Prof. Dr. med. P. Altmeyer  
Koreferent: Prof. Dr. med. I. A. Adamietz

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.12.2003

**Meiner Verlobten Katharina Netz und meinen Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Atopische Dermatitis</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Genetische Grundlagen	1
1.1.3	Klinische Symptomatik	2
1.1.4	Realisationsfaktoren	6
1.1.5	Begleiterkrankungen	7
1.1.6	Prognose	7
<b>1.2</b>	<b>Pathophysiologie der atopischen Dermatitis</b>	<b>8</b>
1.2.1	Zelluläre Komponenten	8
1.2.2	Zytokine & Mediatoren	17
<b>1.3</b>	<b>Immunpathogenese der atopischen Dermatitis</b>	<b>25</b>
1.3.1	Allgemeine Histopathologie	25
1.3.2	Immunologische Ereignisse	26
<b>1.4</b>	<b>Therapiemöglichkeiten der atopischen Dermatitis</b>	<b>32</b>
1.4.1	Basistherapie	32
1.4.2	Präventiv- und unterstützende Maßnahmen	33
1.4.3	Phototherapie der atopischen Dermatitis	35
<b>1.5</b>	<b>Aktuelle Zielsetzung</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Klassische Einteilung der atopischen Dermatitis</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>SCORAD-Index</b>	<b>40</b>
<b>2.3</b>	<b>Patienten</b>	<b>42</b>
2.3.1	Patientenkollektiv	42
2.3.2	Ein- und Ausschlusskriterien	43
2.3.3	Lichttreppe	43
2.3.4	Behandlungsmethodik	44
<b>2.4</b>	<b>Technik der Probenentnahme</b>	<b>45</b>
<b>2.5</b>	<b>Immunhistochemische Nachweismethodik</b>	<b>46</b>
<b>2.6</b>	<b>Antikörper</b>	<b>50</b>
2.6.1	bcl-2	50

2.6.2	p53	50
2.6.3	CD3	50
2.6.4	CD4	51
2.6.5	CD8	51
2.6.6	CD1a	51
2.6.7	Kathepsin G	52
2.6.8	EG2	52
2.6.9	Antihumane-Mastzell-Tryptase	52
2.6.10	HLA-DR	53
2.6.11	MIB-1	53
<b>2.7</b>	<b>Auswertung &amp; Statistik</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>Resultate</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeine Prinzipien der Auswertungen</b>	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>Differenzierte Auswertungen der durchgeführten Immunhistochemie</b>	<b>55</b>
3.2.1	bcl-2-Expression	55
3.2.2	p53-Expression	60
3.2.3	CD3-Expression	64
3.2.4	CD4-Expression	68
3.2.5	CD8-Expression	72
3.2.6	CD1a-Expression	76
3.2.7	Kathepsin-G-Expression	80
3.2.8	EG2-Expression	84
3.2.9	Antihumane-Mastzell-Tryptase-Expression	88
3.2.10	HLA-DR-Expression	92
3.2.11	MIB-1-Expression	96
3.2.12	ISEL-Fluoreszenz	100
3.2.13	Klinische Resultate	103
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>105</b>
<b>4.1</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>105</b>
<b>4.2</b>	<b>Die atopische Dermatitis: Klinik und Pathogenese</b>	<b>105</b>
<b>4.3</b>	<b>Die UV-Therapie der atopischen Dermatitis</b>	<b>106</b>
<b>4.4</b>	<b>Aktuelles Studiendesign</b>	<b>108</b>
<b>4.5</b>	<b>Problematik der Testmethode</b>	<b>110</b>

<b>4.6</b>	<b>Bewertung der Ergebnisse</b>	<b>111</b>
4.6.1	Der apoptotische Zelluntergang: Kaskaden und Regulation	111
4.6.2	Gegensätzliche Effekte der UVA1-Phototherapie auf die Expression von bcl-2 und p53	115
4.6.3	Posttherapeutischer Rückgang der T-Lymphozyten	122
4.6.4	Alterationen der T-Zellzusammensetzung: CD4 versus CD8	123
4.6.5	Dermale Langerhanszellen als Ziel der Medium-dose-UVA1-Phototherapie	125
4.6.6	Modulation proteolytischer Aktivität	126
4.6.7	Reduktion des eosinophilen Infiltrats	128
4.6.8	Mastzellen: Resistenz gegenüber Medium-dose-UVA1-Phototherapie?	129
4.6.9	Parallele Depletion von Aktivität und Proliferation	131
<b>4.7</b>	<b>Die Medium-dose-UVA1-Phototherapie: eine innovative Therapie-modalität</b>	<b>132</b>
<b>4.8</b>	<b>Nebenwirkungspotenzial der UVA1-Phototherapie</b>	<b>136</b>
<b>4.9</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>138</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>165</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>167</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Graphische Darstellung der immunpathologisch wegweisenden Interaktionen bei der atopischen Dermatitis	<b>27</b>
<b>Abbildung 2:</b> Wellenlängenbereiche und aktuelle therapeutische Nutzung	<b>44</b>
<b>Abbildung 3:</b> Mechanismus der Strahlungslimitierung und Wärmereduktion der UVA1-Kaltlichtbestrahlungseinheit	<b>45</b>
<b>Abbildung 4:</b> Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte bcl-2 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>58</b>
<b>Abbildung 5:</b> Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte bcl-2 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>58</b>
<b>Abbildung 6:</b> Signifikanter Rückgang der bcl-2 <sup>+</sup> -Zellen im perivaskulären Infiltrat nach Medium-dose-UVA1-Phototherapie (b) im Gegensatz zur Ausgangssituation (a). Vergrößerung x 200 (a), x 160 (b)	<b>59</b>
<b>Abbildung 7:</b> Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte p53 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>62</b>
<b>Abbildung 8:</b> Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte p53 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>62</b>
<b>Abbildung 9:</b> Veränderungen der Expression von p53 vor (a) beziehungsweise nach (b) applizierter Phototherapie mit einer starken Zunahme der immunopositiven Zellen. Vergrößerung x 200	<b>63</b>
<b>Abbildung 10:</b> Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte CD3 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>66</b>

- Abbildung 11:** Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte CD3<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **66**
- Abbildung 12:** Depletion prätherapeutisch in großer Zahl vorhandener CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten (a) infolge der UVA1-Phototherapie mit einer kumulativen Dosis von 750 J/cm<sup>2</sup>. Vergrößerung x 200 **67**
- Abbildung 13:** Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte CD4<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **70**
- Abbildung 14:** Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte CD4<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **70**
- Abbildung 15:** Verminderung der CD4<sup>+</sup>-Zellen (b) im Zuge der starken Reduktion prätherapeutischer dermalen Entzündungsinfiltrate (a). Vergrößerung x 200 **71**
- Abbildung 16:** Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte CD8<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **74**
- Abbildung 17:** Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte CD8<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **74**
- Abbildung 18:** Stagnation der Anzahl CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten trotz sichtbarer Rückbildung der inflammatorischen Infiltrate bei 15 Einzeldosen von je 50 J/cm<sup>2</sup> UVA1. Vergrößerung x 200 **75**
- Abbildung 19:** Graphische Darstellung der Mediane CD1a<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **78**
- Abbildung 20:** Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte CD1a<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **78**

- Abbildung 21:** Posttherapeutisch signifikanter Rückgang (b) abnorm vorhandener CD1a<sup>+</sup>-Zellen vornehmlich im Stratum papillare vor Medium-dosis-UVA1-Phototherapie. Vergrößerung x 200 **79**
- Abbildung 22:** Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **82**
- Abbildung 23:** Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **82**
- Abbildung 24:** Hohe Expression von Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen vor Therapiebeginn (a) sowie starke Abnahme nach erfolgreicher Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie (b). Vergrößerung x 200 **83**
- Abbildung 25:** Graphische Darstellung der Mediane EG2<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **86**
- Abbildung 26:** Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte EG2<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **86**
- Abbildung 27:** Depletion der aktivierten EG2<sup>+</sup>-Eosinophilen im dermalen Infiltrat nach applizierter UVA1-Phototherapie (b) im Gegensatz zum histologischen Bild vor Behandlungsbeginn (a). Vergrößerung x 200 **87**
- Abbildung 28:** Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **90**
- Abbildung 29:** Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt. **90**

<b>Abbildung 30:</b> Überraschende Stagnation beziehungsweise Zunahme des prozentualen Anteils dermalen Antihumane-Mastzell-Tryptase <sup>+</sup> -Zellen im Vergleich zwischen dem Zustand vor (a) und nach (b) Applikation einer Kumulativdosis von 750 J/cm <sup>2</sup> . Vergrößerung x 200	<b>91</b>
<b>Abbildung 31:</b> Graphische Darstellung der Mediane HLA-DR <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>94</b>
<b>Abbildung 32:</b> Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte HLA-DR <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>94</b>
<b>Abbildung 33:</b> Abnahme der HLA-DR <sup>+</sup> -Zellen im immunhistochemischen Bild vor (a) beziehungsweise nach (b) Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie. Vergrößerung x 200	<b>95</b>
<b>Abbildung 34:</b> Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte MIB-1 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>98</b>
<b>Abbildung 35:</b> Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte MIB-1 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.	<b>98</b>
<b>Abbildung 36:</b> Signifikanter Rückgang der Expression von MIB-1 (b) von prätherapeutisch erhöhten Werten immunpositiver Zellen. Vergrößerung x 200	<b>99</b>
<b>Abbildung 37:</b> Einige ISEL <sup>+</sup> -Keratinocyten vor Therapiebeginn (a) sowie deutliche Zunahme ISEL <sup>+</sup> dermalen Zellen nach erfolgreicher Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie (b). Vergrößerung x 200	<b>102</b>
<b>Abbildung 38:</b> Darstellung des Behandlungserfolgs der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie bei 15 Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis (Median, Spannweite).	<b>103</b>

**Abbildung 39:** Klinisches Bild eines repräsentativen Patienten vor (a)  
beziehungsweise nach (b) erfolgreicher Medium-dose-UVA1-  
Phototherapie.

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Diagnostische Kriterien für atopische Dermatitis	<b>2</b>
<b>Tabelle 2:</b> Zytokinprofil der Th1- und Th2-Subsets	<b>9</b>
<b>Tabelle 3:</b> Entscheidende Mastzell-Mediatoren im Krankheitsbild der atopischen Dermatitis	<b>13</b>
<b>Tabelle 4:</b> Zytotoxische Aktivitäten der Eosinophilen	<b>15</b>
<b>Tabelle 5:</b> Abnormalitäten der Immunregulation bei atopischer Dermatitis	<b>28</b>
<b>Tabelle 6:</b> Einteilung der atopischen Dermatitis auf Grund des Schweregrads	<b>39</b>
<b>Tabelle 7:</b> „9er Regel“	<b>40</b>
<b>Tabelle 8:</b> Summierung	<b>40</b>
<b>Tabelle 9:</b> Relative Gewichtung klinischer Kriterien	<b>41</b>
<b>Tabelle 10:</b> Inkubationszeiten und Verdünnungen der Immunhistochemie	<b>48</b>
<b>Tabelle 11:</b> Prozentuale Anteile dermalen bcl-2 <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>56</b>
<b>Tabelle 12:</b> Mittlere prozentuale Anteile der bcl-2 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>57</b>
<b>Tabelle 13:</b> Prozentuale Anteile dermalen p53 <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>60</b>
<b>Tabelle 14:</b> Mittlere prozentuale Anteile der p53 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>61</b>
<b>Tabelle 15:</b> Prozentuale Anteile dermalen CD3 <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>64</b>
<b>Tabelle 16:</b> Mittlere prozentuale Anteile der CD3 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>65</b>
<b>Tabelle 17:</b> Prozentuale Anteile dermalen CD4 <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>68</b>

<b>Tabelle 18:</b> Mittlere prozentuale Anteile der CD4 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>69</b>
<b>Tabelle 19:</b> Prozentuale Anteile dermalen CD8 <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>72</b>
<b>Tabelle 20:</b> Mittlere prozentuale Anteile der CD8 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>73</b>
<b>Tabelle 21:</b> Prozentuale Anteile dermalen CD1a <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>76</b>
<b>Tabelle 22:</b> Mittlere prozentuale Anteile der CD1a <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>77</b>
<b>Tabelle 23:</b> Prozentuale Anteile dermalen Kathepsin-G <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>80</b>
<b>Tabelle 24:</b> Mittlere prozentuale Anteile der Kathepsin-G <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>81</b>
<b>Tabelle 25:</b> Prozentuale Anteile dermalen EG2 <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>84</b>
<b>Tabelle 26:</b> Mittlere prozentuale Anteile der EG2 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>85</b>
<b>Tabelle 27:</b> Prozentuale Anteile dermalen Antihumane-Mastzell-Tryptase <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>88</b>
<b>Tabelle 28:</b> Mittlere prozentuale Anteile der Antihumane-Mastzell-Tryptase <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>89</b>

<b>Tabelle 29:</b> Prozentuale Anteile dermalen HLA-DR <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>92</b>
<b>Tabelle 30:</b> Mittlere prozentuale Anteile der HLA-DR <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>93</b>
<b>Tabelle 31:</b> Prozentuale Anteile dermalen MIB-1 <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>96</b>
<b>Tabelle 32:</b> Mittlere prozentuale Anteile der MIB-1 <sup>+</sup> -Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie	<b>97</b>
<b>Tabelle 33:</b> Semiquantitative Auswertung dermalen ISEL <sup>+</sup> -Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(s)IL-2R	(soluble) interleukin-2-receptor
(s)IL-4R	(soluble) interleukin-4-receptor
AIF	apoptosis inducing factor
APAF	apoptotic protease activating factor
BID	bcl-2 interacting domain
Caspase	cytosolic aspartat-specific protease
CD	clusters of differentiation
CDK	cyclin-dependent kinase
CGRP	calcitonin gene-related peptide
DFF	DNA fragmenting factor
DTH	delayed-type hypersensitivity
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosinophil-derived neurotoxin
ELAM	endothelial leucocyte adhesion molecule
EPO	eosinophile Peroxidase
EPX	eosinophil protein X
FITC	fluorescein isothiocyanate
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HETE	hydroxyeicosatetraenoic acid
HO	Haem-Oxygenase
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISEL	in situ nick end labeling
MBP	major basic protein
MPD	minimale pigmentierende Dosis
MPS	mononukleäres Phagozyten-System
MW	Molekulargewicht
NPY	Neuropeptid-Y
p	probability

PAK2	p21-activated kinase-2
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating-cell nuclear antigen
PGE / PGD	Prostaglandin E / D
PS	Phosphatidylserin
PT	permeability transition
SCORAD	scoring atopic dermatitis
SOS	singlet oxygen species
SP	Substanz-P
Stabw	Standardabweichung
tdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
TGF	tumor growth factor
Th1 / 2	T-Helferzellen vom Typ 1 / 2
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

# 1 Einleitung

## 1.1 *Atopische Dermatitis*

### 1.1.1 Definition

Der Begriff „Atopische Dermatitis“ wurde 1933 durch Hill und Sulzberger unter Anlehnung an die sogenannte respiratorische Allergie eingeführt [87]. Atopische Dermatitis bezeichnet dabei eine ekzematöse Hautreaktion bedingt durch eine genetisch fixierte Prädisposition, deren Manifestation durch multiple Realisationsfaktoren unterstützt wird. Die atopische Dermatitis gehört zum Formenkreis der Atopien und ist demnach eine angeborene Disposition zur Typ-I-Sensibilisierbarkeit gegenüber Allergenen.

Hinsichtlich des aktuellen Standes der Wissenschaft wird üblicherweise die Bezeichnung Atopische Dermatitis gewählt, obwohl, geleitet durch unterschiedliche Auffassungen der betreffenden Ätiologie, eine Vielzahl an Synonymen geschaffen wurde. Infolgedessen beschreiben beispielsweise endogenes Ekzem und konstitutionelles Ekzem, Neurodermitis, Prurigo Besnier, Sulzberger-Garbe-Syndrom oder exsudatives Ekzematoid letztlich dasselbe Phänomen.

### 1.1.2 Genetische Grundlagen

Basierend auf Familienuntersuchungen ist heute kaum daran zu zweifeln, dass die atopische Dermatitis auf dem Boden einer genetischen Prädisposition entsteht [112]. Der in den achtziger Jahren vermutete generell autosomal dominante Erbgang bei Atopien kann unter heutigen Erkenntnissen kaum länger gehalten werden. Hierbei lieferte die Zwillingsforschung entscheidende Hinweise, wobei unter dem Vergleich der Gemeinsamkeiten beziehungsweise der Unterschiede der Krankheitsextension zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen eine genetische Fixierung nachweisbar ist. Darüber hinaus reflektiert der Grad der Reduktion der Übereinstimmungen bei monozygoten Zwillingen die Signifikanz des Einflusses von Umweltfaktoren. Diesbezüglich konnte in Zwillingsstudien eine Übereinstimmungsrate von 77% bei monozygoten sowie eine Rate von nur 15% bei dizygoten Zwillingen registriert werden [29].

Dennoch begründen diese Untersuchungen lediglich die Hypothese der genetischen Disposition, in Hinblick auf ein grundlegendes Vererbungsmuster sind jedoch kaum Schlüsse zu ziehen. Auch in weiteren sich nicht ausschließlich auf die Zwillingsforschung beziehenden Studien ist bis zu diesem Zeitpunkt eine eindeutige Zuweisung nicht zu treffen. Als Basis für weitere Forschungen fungiert daher die weithin akzeptierte Auffassung der atopischen Dermatitis als Produkt eines multifaktoriellen Erbgangs resultierend aus Interaktionen zwischen genetischen Faktoren und Allergenexposition. Deren relative Gewichtung zueinander bleibt aber unpräzise [29].

Allerdings konnten kürzlich erste Hinweise auf eine spezifische Genregion gefestigt werden. Hierbei wurden 199 Familien mit mindestens je zwei betroffenen Kindern auf mögliche Genabnormitäten hin untersucht. Ein sehr auffälliger entsprechender Genlocus konnte am langen Arm des Chromosom 3 identifiziert werden. Interessant hierbei ist, dass am gleichen Genort zudem ein Abschnitt lokalisiert ist, der mit einer erhöhten Allergieneigung in Verbindung gebracht wird [84].

### **1.1.3 Klinische Symptomatik**

#### **1.1.3.1 Allgemeine Symptome**

Die Diagnose zum Krankheitsbild der atopischer Dermatitis basiert in dieser Arbeit – wie in den meisten der entsprechenden letztjährigen Studien – auf den diagnostischen Kriterien nach Hanifin und Rajka (Tabelle 1) [48].

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien für atopische Dermatitis  
(modifiziert nach Hanifin und Rajka [48])

---

Übergeordnete Kriterien:

- 
- Pruritus
  - Typische Morphologie und Verteilung
  - Chronischer Verlauf oder häufige Rückfälle
  - Persönliche oder familiäre Vorgeschichte bezüglich Atopie
-

---

#### Untergeordnete Kriterien:

---

Xerodermie  
Ichthyosis vulgaris / Keratosis pilaris / palmare Hyperlinearität  
Typ-I-Hauttest-Reaktivität  
früher Krankheitsbeginn  
unspezifische Hand- / Fußdermatitis  
erhöhte Anfälligkeit für Hautinfektionen, besonders Staphylococcus aureus  
erhöhter IgE-Spiegel im Serum  
unspezifische Medikamenten- und Nahrungsmittelunverträglichkeit  
Brustwarzenekzem  
Konjunktivitis  
Dennie-Morgan-Falte  
Hertoghe-Zeichen  
Keratokonius  
Gesichtserythem  
Pityriasis alba  
vordere Halsfalten  
Juckreiz durch Schweiß  
Unverträglichkeit gegenüber Wolle und Fettlösungen  
Perifollikuläre Akzentuierung  
Verlaufsbeeinflussung durch Umweltfaktoren / emotionale Faktoren

---

Das Krankheitsbild der atopischen Dermatitis wird von anderen, ebenfalls vererbten Dispositionen begleitet, zu denen zweifellos die Disposition zur Entwicklung von allergischen Reaktionen vom Typ I gezählt werden muss, sowie die überwiegend bei Frauen auftretende Typ IV-Allergie.

Da das klinische Bild polymorph und jeweils charakteristisch für ein spezifisches Lebensalter erscheint, ist es als zweckmäßig anzusehen, die unterschiedlichen Hauterscheinungen getrennt zu beschreiben.

#### 1.1.3.2 Säuglingsalter

Im Säuglingsalter stellt man zumeist auf dem behaarten Kopf eine als grob-lamellös einstuftbare Schuppung mit partiell entzündlichem Untergrund fest. Die assoziierbare Ähnlichkeit zu eingetrockneter Milch ließ den heute gängigen Ausdruck Milchschorf

entstehen. Im weiteren Verlauf sind besonders an Stellen, die mechanischen Irritationen ausgesetzt sind, wie Wangen, Stirn oder Handgelenken, Herde zu erkennen, die man auf Grund ständigen Reibens als gerötete, erodierte, teils nässende, teils verkrustete Haut vorfindet. In schweren Fällen können diese Herde auch auf den Thorax und den behaarten Kopf übergreifen.

#### 1.1.3.3 Kindheit

Bis zu einem Lebensalter von 10-12 Jahren verändert sich das klinische Bild signifikant. Das Ekzema flexurarum mit Befall der Gelenkbeugen, des Halses, der Knöchelgegend sowie der Handgelenke tritt in den Vordergrund und ist differenzialdiagnostisch charakteristisch. Zudem sind oft auch die Augenlider befallen, die Augenbrauen weisen das Hertoghe-Zeichen auf, am Ansatz der Ohrläppchen finden sich Rhagaden. Besonders im Winter sind grob-lamellöse Schuppungen im Bereich der Fingerkuppen und der Zehen beobachtbar. Auch an anderen Körperstellen sind unscharf begrenzte Leukodermie zu erkennen, und eine durchaus als flächenhaft zu bewertende Lichenifikation manifestiert sich zunehmend.

#### 1.1.3.4 Jugendalter

Bei den Halbwüchsigen und Adoleszenten lassen sich auf Grund unterschiedlicher Ausbreitungsgrade vorwiegend drei Typen unterscheiden. Die generalisierte atopische Dermatitis stellt hierbei den ersten Typ dar. Hautrötungen finden sich nahezu über den kompletten Körper verbreitet. Erythrodermie und psoriasiforme Zustandsformen koexistieren nebeneinander – Gesicht, Hals und Brustabschnitt stellen ein bevorzugtes Ziel dar. Darüber hinaus finden sich strichförmige oder punktförmige Exkorationen, welche erstaunliche Ausmaße annehmen, jedoch auch schnell wieder abheilen können. Typ II stellt die ausgedehnte lokalisierte atopische Dermatitis dar. Hierbei sind die betroffenen Gebiete im Allgemeinen die Gelenkbeugen, das Gesicht, der Hals sowie die Arme und Oberschenkel. Im Gegensatz zum Typus der lokalisierten atopischen Dermatitis wirken die Herde diffus und weisen bezüglich ihrer Morphologie teils deutliche Unterschiede auf. Der bereits angesprochene Typ III bezieht sich nunmehr auf die lokalisierte Form. Diese

Patienten leiden vorwiegend an kleineren Herden im Kopfbereich oder an den Händen, manchmal ebenfalls an eher atypischen Lokalisationen. Oft handelt es sich um Patienten, die sich gerade in einer Remissionsphase befinden.

#### 1.1.3.5 Erwachsenenalter

Das klinische Bild im Erwachsenenalter lässt sich grobschematisch in zwei Subtypen untergliedern. Vertreter des ersten Typs leiden bereits seit der Kindheit an den Symptomen, die in ihrer Intensität variieren und teilweise langsam auslaufen, jedoch auch in schwerster generalisierter Form vorkommen können. Die Variabilitätsbreite ähnelt den Stadien des Adoleszenten, wobei sich oftmals eine Stabilisierung eingestellt hat. Bei dem zweiten Typ treten erste Anzeichen mit später besonders schwerer Verlaufsform erst im Erwachsenenalter auf. Das bevorzugte Alter liegt hierbei kurz nach der Pubertät bei zirka 17-21 Jahren, teilweise aber erst mit 30-40 Jahren. Häufig finden sich bei diesen Patienten bemerkenswert ausgeprägte, den kompletten Körper betreffende, erythrodermische Bilder.

#### 1.1.3.6 Verlauf

Weiterhin ist generell eine Unterscheidung in Bezug auf eine akute, subakute oder chronische Verlaufsform zu treffen [87]. Während die akute Phase durch einen intensiven Pruritus, Ödeme sowie erythematöse Papulae gekennzeichnet ist, überwiegen in der subakuten Phase großflächige, ekzematöse, teils schuppige und meist nässende Hautveränderungen. Die chronische Verlaufsform ist klinisch durch großflächig lichenifizierte, ekzematöse, stark juckende Erytheme charakterisiert.

Oftmals ist jedoch eine strenge Einordnung in ein einziges dieser aufgeführten Muster kaum möglich noch erstrebenswert. Die Situation des Patienten stellt sich zumeist als eine Kombination aller drei Stadien dar, wobei jeweils eine Verlaufsform akzentuiert werden kann. Folglich korrelieren die Symptome in jungen Jahren überwiegend mit dem akuten Stadium, bei älteren Patienten mit weitreichender Vorgeschichte mit der chronischen Form der atopischen Dermatitis.

#### 1.1.4 Realisationsfaktoren

Auf der Basis einer genetischen Prädisposition führt eine Vielzahl an Manifestationsfaktoren zur Ausprägung des individuellen Krankheitsgeschehens. Multiple Triggerfaktoren wurden in den letzten Jahren zunehmend kontrovers diskutiert und als relevant in bezug auf die Ausprägung des Phänotyps angesehen. Im Einzelnen betrifft dies Kontaktreizstoffe, Allergene, Aeroallergene, Nahrungsmittel, Mikroorganismen, Hormone, Stress und Klimabedingungen. Infolge der geschwächten Barrierefunktion entwickeln die betroffenen Patienten häufig ausgeprägte Unverträglichkeitsreaktionen sowie erhöhte Typ-I- und Typ-IV-Allergien gegen typische Kontaktstoffe [112].

Ebenfalls wurde durch neuere Studien eine zunehmende Häufigkeit der atopischen Dermatitis in der Zeit nach dem zweiten Weltkrieg konstatiert, wobei die Rate der Betroffenen in urbanisierten derjenigen in agrarwirtschaftlichen Regionen in den meisten Fällen überlegen ist. Diese Beobachtung stellt sich besonders ausgeprägt bei Immigranten von einer ländlichen in eine urbanisierte Region dar und unterstreicht die essenzielle Rolle der Realisationsfaktoren bezüglich der Pathogenese [112].

Bei den Aeroallergenen ist die Signifikanz der Hausstaubmilben nahezu unumstritten und auf Grund ihres ubiquitären Vorkommens ein ernsthaftes Problem. In diesem Zusammenhang werden Exazerbationen der atopischen Dermatitis zum direkten Kontakt und auch zur Inhalation in Relation gesetzt [31].

Hinsichtlich der Mikroorganismen bestätigen weitreichende Untersuchungen eine direkte Einflussnahme auf den Krankheitsverlauf. *Staphylococcus aureus* repräsentiert als die wichtigste Komponente der Mikroorganismen sowohl in den Läsionen der atopischen Dermatitis als auch in den nichtläsionalen Hautabschnitten den wohl bedeutendsten Vertreter. Indizien, wie gefundenes Anti-*Staphylococcus-aureus*-IgE bei den betroffenen Patienten sowie klinische Fortschritte unter Behandlung mit Anti-*Staphylococcus-aureus*-Antibiotika, untermauern diesen Tatbestand anschaulich. Zusätzlich wurde kürzlich die Hypothese aufgestellt, dass *Staphylococcus-aureus*-Superantigene in der Lage sind, T-Lymphozyten unabhängig von ihrer Antigenpezifität aktivieren zu können [27].

Auch die psychische Situation stellt einen nicht zu verachtenden Realisationsfaktor dar, eine entsprechende Betreuung sollte daher Bestandteil der Therapie sein. Diesbezüglich werden Innervation und Neurotransmittern entsprechende Effekte zugeschrieben, präzisere Zusammenhänge werden im Rahmen dieser Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt behandelt.

### 1.1.5 Begleiterkrankungen

Neben den erwähnten Hauptsymptomen und der ausgeprägten Trockenheit der Haut, unter anderem ausgelöst durch Lichenifizierung, verstärkten epidermalen Flüssigkeitsverlust und einer veränderten Lipidzusammensetzung, treten eine Reihe weiterer Begleiterkrankungen auf, zu denen fast ausschließlich Reaktionen allergischer Natur zählen. Oft beobachtete Begleitkrankheiten sind beispielsweise Asthma bronchiale, Rhinitis allergica, Conjunctivitis allergica, Pollinosis, Kontaktallergien sowie unspezifische Nahrungsmittel- und Medikamentenunverträglichkeiten. Generell weisen Patienten mit atopischer Dermatitis eine intensivierete Tendenz zur Entwicklung viraler, mykotischer und bakterieller Infekten auf [87]. Zu den häufigsten viralen Infektionen wird die Infektion mit dem Herpes-simplex-Virus gerechnet, welche üblicherweise lokal begrenzt bleibt, jedoch unter Umständen auch als generalisierte Form auftreten kann (Eczema herpeticatum). Mykotische Infektionen beinhalten oftmals die in den obersten Hautschichten vorkommenden Hefen vom Typ *Pityrosporus ovale*. Auch hier sei die Wichtigkeit der Infektion mit *Staphylococcus aureus* bei den bakteriellen Infektionen erneut erwähnt.

### 1.1.6 Prognose

Die meisten der betroffenen Kinder entwickeln die typischen Symptome der atopischen Dermatitis bereits einige Wochen nach der Geburt. Während bei leichten Fällen die Prognose im Normalfall als eher gut einzustufen ist, muss man sich bei Fällen, bei denen die Hauterscheinungen über das zweite Lebensjahr hinaus persistieren, auf längere Behandlungszeiten einstellen.

Auch bei älteren Kindern sind die Chancen auf einen positiven Verlauf teilweise als gut anzusehen, wie es neuere Studien darlegen. Bei 40 behandelten Kindern im Alter zwischen elf und 13 Jahren wurde in 65% der Fälle eine therapiebedingte Milderung erreicht, bei 18% verschwanden die Symptome vollständig. Allerdings existieren in diesem Bereich in der Literatur eher widersprüchliche Angaben. In einer anderen Studie konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass 72% von 47 untersuchten Patienten mit der Diagnose einer atopischen Dermatitis im Alter von zwei Jahren auch 20 Jahre später noch unter den Auswirkungen litten [112].

Bei Adoleszenten und Erwachsenen verschlechtern sich die Aussichten im Mittel mit steigendem Manifestationsalter zunehmend. Gleichwohl gibt es auch hierzu Studien mit widersprüchlichen Untersuchungsergebnissen. Insgesamt können aber durch vielfältige Therapiemöglichkeiten, darunter die UVA1-Kaltlichtbestrahlung, die Auswirkungen dieser genetisch fixierten Disposition gemildert und teils vollständig zurückgedrängt werden, wobei über die Prognose prinzipiell kein pauschales Urteil gefällt werden sollte.

## **1.2 Pathophysiologie der atopischen Dermatitis**

### **1.2.1 Zelluläre Komponenten**

#### 1.2.1.1 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten repräsentieren als Quelle der für die Entwicklung der atopischen Dermatitis absolut essenziellen Zytokine einen entscheidenden Faktor der Pathogenese. Die Gruppe der CD4<sup>+</sup>-Zellen ist hierbei von besonderem Interesse, jedoch produzieren diese T-Helferzellen nach ihrer Aktivierung nicht alle der verfügbaren Zytokine simultan. Dieser Sachverhalt erlaubt es, eine Kategorisierung in unterschiedliche Subtypen vorzunehmen [16].

Die Dichotomie der T-Helferzellen wurde zunächst in Untersuchungen von T-Zellklonen bei Mäusen identifiziert und auf die Untergruppen T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) und Th2 begrenzt [42]. Zweifellos sind beide Untergruppen in der Lage inflammatorische Reaktionen auszulösen. In Hinblick auf ein auf die Disbalance basierendes Pathogenesekonzept der atopischen Dermatitis ist diese Unterteilung von hoher Bedeutung (Tabelle 2). In späteren Forschungsarbeiten konnte eine Übertragung dieses Konzepts auf den Menschen erreicht werden, zu deren Komplettierung die Entdeckung des Th0-Subsets beitrug.

Tabelle 2: Zytokinprofil der Th1- und Th2-Subsets

Zytokin	Typ-1-Helferzellen	Typ-2-Helferzellen
IL-2	++	-
IL-3	o	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-6	-	++
IL-9	+	+
IL-10	+	++
IL-13	-	++
TNF	++	+
GM-CSF	o	++
IFN- $\gamma$	++	-

T-Helferzellen des Th0-Typs gelten als Vorläuferzellen und zeichnen sich durch die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-5 und IL-6 aus [15]. Verschiedene Faktoren, unter ihnen die genannten Zytokine selbst sowie individuelle Allergenexposition, lösen im weiteren Verlauf eine Differenzierung zugunsten des Th1-beziehungsweise des Th2-Typs aus. IFN- $\gamma$ , IL-12 und tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) provozieren die Bildung des Th1-Subsets, während IL-4, IL-10 und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) die Differenzierung zum Th2-Typ fördern, wobei diese Generierungen nach erfolgter Entwicklung irreversibel determiniert sind. Bereits auf Grund dieser Erkenntnisse wird deutlich, dass bezüglich der Relation von Th1- und Th2-Zellen keineswegs von einem starren Muster die Rede sein kann, vielmehr stellt sich die Situation als ein dynamisches, intraindividuell und temporär differenziertes Gleichgewicht dar, welches im Krankheitsfall starken Schwankungen unterworfen und zugunsten eines der Subtypen verschoben sein kann. Dies kann auf Grund unterschiedlicher Funktionen der Subtypen einen wichtigen Einfluss auf das Immunsystem ausüben. In Hinblick auf die klassische Einteilung der Immunreaktion konnte in weitreichenden Studien die Zuweisung des Th1-Subsets zur zellvermittelten und des Th2-Subsets zur humoralen Immunität nachgewiesen werden. Dementsprechend ist die Manifestierung allergischer Kontaktallergien des Typs der delayed-type hypersensitivity (DTH) auf eine Th1-Antwort zurückführbar, das Auftreten von Soforttypreaktionen resultiert aus einer Dominanz der Th2-Zellen. Zusätzlich verstärkt wird dieses oppositionelle Verhalten durch die grundlegend verschiedenen Zytokinprofile der Subsets, da ein Charakteristikum der Th1-Helferzellen die Produktion von vorwiegend

IFN- $\gamma$ , Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und IL-2 ist, jedoch IL-4, IL-5 oder IL-10 hingegen kaum gebildet werden. Im Gegensatz dazu zeichnen sich diejenigen Zellen des Th2-Subtyps durch eine verstärkte Erzeugung von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sowie IL-13 und dem granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) aus.

Über die Rolle der CD8<sup>+</sup>-Zellen ist indes noch wenig bekannt. Die supprimierenden CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten produzieren INF- $\gamma$ , jedoch kaum IL-4. Während in einigen Studien von einer teils stark erhöhten CD4/CD8-Ratio im dermalen Infiltrat berichtet wurde [31], gibt es ebenfalls Hinweise auf ein vermehrtes Vorkommen CD8<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut [87]. Die entsprechenden Ergebnisse divergieren jedoch abhängig vom Auswertungsprocedere und aktuellen Stadium der atopischen Dermatitis.

### 1.2.1.2 Monozyten

Neben den genannten Zelltypen sind ebenfalls die Monozyten in allergischen Reaktionen aktivierbar und tragen dadurch zur weiteren Entzündung bei. Auch Monozyten haben die Möglichkeit der Sekretion diverser entzündungsfördernder Überträgerstoffe, darunter bestimmte granuläre Peptide, oxidative und Arachidonsäure-Metaboliten, darunter PGE<sub>2</sub> sowie Thrombozytenaktivierungsfaktoren. Zusätzlich ist die Ausschüttung der Zytokine IL-1- $\beta$  und TNF- $\alpha$  als Antwort auf IgE-beinhaltende Immunkomplexe bedeutsam [16]. Als eine den Verlauf der Differenzierung der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen vermutlich stark beeinflussende Komponente wird darüber hinaus eine durch die Monozyten ausgelöste Erhöhung des PGE<sub>2</sub>-Spiegels angeführt.

Generell scheint es gleichwohl sicher zu sein, dass es sich bei Patienten mit atopischer Dermatitis teilweise um eine pathologische Subpopulation von Monozyten handelt, deren Auftreten sowohl mit einer erhöhten Anzahl aktivierter T-Lymphozyten als auch mit einer übermäßigen Exprimierung damit verbundener Zytokine korreliert. Als auslösende Komponenten dieses pathologischen Zustands vermutet man insbesondere die gesteigerten cAMP-Phosphodiesterase- und Adenylat-Cyclase-Spiegel [31]. Monozyten sind in den Läsionen der Haut bei Patienten dieser Erkrankung überrepräsentiert und als Quelle des PGE<sub>2</sub> dementsprechend ein für die Pathogenese absolut konstitutives Element. Daher sind sie sowohl in histologischen Untersuchungen als auch bei Blutuntersuchungen zu berücksichtigen.

Desgleichen haben auch die von Monozyten abgeleiteten Makrophagen eine wesentliche Rolle als eine die Entzündungserscheinungen induzierende Zellpopulation. Auch sie sind in der Lage, eine Anzahl von Mediatoren zu sezernieren, unter ihnen die nunmehr bekannten granulären Peptide, oxidative Metaboliten, Thrombozytenaktivatoren und die Arachidonsäure. Ferner besteht jedoch zusätzlich die Möglichkeit der Produktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , GM-CSF, PGE<sub>2</sub>, IL-1, IL-6 und IL-8, IL-10, die folgeschwer in den Prozess der Umstellung des Immunsystems mitwirken können [16, 87].

### 1.2.1.3 Nervenzellen

Die menschliche Haut beherbergt unter anderem eine Vielzahl unterschiedlicher Elemente des Nervensystems, darunter jene, die einerseits als Rezeptoren und andererseits als Effektoren agieren. Die afferenten, sensorischen Nerven entspringen den Spinalganglien im Bereich der hinteren Wurzel und sind zur Freisetzung von Neuropeptiden befähigt. Umweltbedingte Stimulationen rufen mechanorezeptive, thermale und nozizeptive Empfindungen hervor. Interaktionen zwischen diesen Nerven und dem Immunsystem der Haut führen durch die Freisetzung von Neuropeptiden und anderen proinflammatorischen Mediatoren zu einer Entzündungsreaktion. Betroffen sind an dieser Stelle in besonderem Maße die Fasern der Typen C sowie A in den oberflächlichen Bereichen der Dermis.

Als evozierende Effektorstoffe der weiteren Symptomatik der atopischen Dermatitis gelten die Neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substanz-P (SP), vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Neuropeptid-Y (NPY), die eine Brücke zwischen autonomen und sensorischen Nervensystem sowie dem Immunsystem der Haut schlagen. In Befunden nichtpathologischer Hautabschnitte treten CGRP und SP üblicherweise in der Epidermis kaum in Erscheinung, lediglich in der näheren Umgebung von Blutgefäßen und Nervenbündeln der Dermis ist eine erhöhte Präsenz zu verzeichnen. NPY-immunoreaktive Nervenfasern sind vorwiegend in Nachbarschaft zu Blutgefäßen anzutreffen, intraepidermal kommen sie nicht vor [132]. Da psychischer Stress die Situation bei den betroffenen Patienten eminent verschärfen kann, ist sowohl die Untersuchung der direkten als auch die der indirekten Effekte der Nervenzellen auf das Krankheitsbild von entscheidender Signifikanz. Die Erkenntnis über entsprechende Wirkungen und Zusammenhänge kann in Kombination mit renommierten und innovativen

Behandlungsmethoden eventuell einen zusätzlichen Ansatz zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten bieten.

#### 1.2.1.4 Mastzellen

Die sofortige Antwort auf Allergenkontakt ergibt sich vorwiegend aus der schnellen Freisetzung wirksamer Mediatoren der Mastzellen. Entsprechend werden die Mastzellen durch erhöhte Proliferation und sich anschließende Degranulation in die Pathogenese der atopischen Dermatitis miteinbezogen. Da dieser Zelltyp eine mobile Population im Gewebe darstellt, werden mögliche Effekte entscheidend durch Dichte und Verteilung der Mastzellen im Gewebe sowie ihre relative Nähe zu Zielstrukturen wie Nerven charakterisiert. Diesbezüglich wird den Zytokinen IL-3, IL-9, IL-10 und IL-11 eine besondere Bedeutung zugesprochen, da aus ihnen die gesteigerte Proliferationsrate zu resultieren scheint. Darüber hinaus wird bei einer Reihe von Zytokinen ein direkter Zusammenhang zur Degranulation der Mastzellen erforscht, darunter auch der Einfluss von Neurotransmittern, welche relevant in bezug auf eine Korrelation zur psychischen Situation in Erscheinung treten.

Aktiviert Mastzellen verursachen im weiteren Fortgang inflammatorische Reaktionen, eine Induktion der Vasodilatation, eine Kontraktion der glatten Muskulatur, Sekretion der Drüsen sowie die Stimulation juckreizauslösender Nervenrezeptoren. Diese Folgeerscheinungen werden von einem breiten Spektrum an Überträgerstoffen begleitet und schließen eine Reihe von chemotaktischen und aktivierenden Peptiden, Eikosanoiden, Leukotrienen, verschiedenen Proteasen, Thrombozytenaktivatoren und die von besonderer Wichtigkeit erscheinenden Zytokine ein. Als Konsequenz dieser abnormen Präsenz werden Granulozyten, Lymphozyten und Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems (MPS) rekrutiert sowie aktiviert. Die in diesem Prozess mitwirkenden Mediatoren sind zudem ausführlich in Tabelle 3 zusammengefasst und auf Grund ihrer Freisetzungsgeschwindigkeit in vorgefertigte und schnell erzeugbare Mediatoren differenziert (Tabelle 3) [16].

Tabelle 3: Entscheidende Mastzell-Mediatoren im Krankheitsbild der atopischen Dermatitis (modifiziert nach Borish und Joseph [16])

Neugenerierte Mediatoren:	Funktion:
Thrombozytenaktivierungsfaktor	Thrombozytenaktivierung / -Aggregation Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten Steigerung der vaskulären Permeabilität ECP-Ausschüttung
Prostaglandin	Kontraktion der glatten Muskulatur Erhöhung der Migration neutrophiler Granulozyten Verstärkung der Th2-dominierten Immunantwort
HETE	Zelluläre Infiltration
Respiratorische Produkte	Desquamation / Basalmembranschäden
Leukotriene	Steigerung der vaskulären Permeabilität Kontraktion der glatten Muskulatur Steigerung der Chemotaxis Neutrophiler
Präformierte Mediatoren:	Funktion:
Serotonin	Vasodilatation / Permeabilitätssteigerung
Histamin	Erhöhung der vaskulären Permeabilität Generierung von Prostaglandinen Einflussnahme auf das chemotaktische Verhalten Stimulation der juckreizauslösenden Rezeptoren
Adenosin	Hemmung der Thrombozytenaggregation Steigerung der Mediatorenfreisetzung
Neutrophil chemotactic faktor	Rekrutierung und Aktivierung der Neutrophilen
Eosinophil chemotactic peptide	Rekrutierung und Aktivierung der Eosinophilen
Tryptase, Chymase	Komplement- und Kininaktivierung Abbau von Grundsubstanz Schädigung der Basalmembranen Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten
Saure Hydrolasen	Schädigungen der Basalmembranen Desquamation
Proteoglykane	Antikomplementaktivität Carriersubstanz für granuläre Komponenten Verstärkung der Th2-dominierten Immunantwort
TNF- $\alpha$	Aktivierung der Endothelzellen Induktion von Adhäsionsmolekülen Vermindertes Wachstum bis Nekrose des Epithels Gesteigerte Zytotoxizität durch z.B. Monozyten

Zusätzlich besteht eine enge Relation zwischen der Aktivierung von Mastzellen und des zugunsten des Th2-Subsets verschobenen T-Helferzellverhältnisses bei atopischer Dermatitis. Unter anderem wird die beschriebene Disbalance durch die Fähigkeit der Mastzellen, TNF- $\alpha$  und PGD<sub>2</sub> freizusetzen, verstärkt [31]. In neueren Studien wurden Mastzellen darüber hinaus als mögliche Quelle des IL-4, eines der wichtigsten Zytokine in bezug auf die Immunpathogenese und der Th2-Verschiebung, identifiziert, wobei dieser Sachverhalt in Anbetracht der Variationsbreite verschiedener Mastzellpopulationen kontrovers zu diskutieren bleibt [131].

#### 1.2.1.5 Eosinophile

Obwohl in der Vergangenheit bei histologischen Untersuchungen der atopischen Dermatitis kaum die Anzahl oder Aktivität der eosinophilen Granulozyten berücksichtigt wurde, stellt diese Thematik in den aktuellen wissenschaftlichen Studien einen interessanten Anhaltspunkt dar [47]. Ein maßgebliches Charakteristikum scheint durchaus ein erhöhtes Auftreten dieser Zellart im Gewebe als auch in Serumproben bei den betroffenen Patienten zu sein. Hierauf bezogen wird deren Aktivierung, die zu einem großen Teil mastzellvermittelt auftritt, als eine wichtige Determinante bei der Ausprägung beschriebener inflammatorischer Reaktionen gehandelt.

Zu diesem Sachverhalt trägt die Präsenz des IL-5 in besonderem Maße bei. Dieser Zytokintyp, der in bemerkenswert hohen Dosen von den T-Helferzellen des Th2-Phänotyps ausgeschüttet wird, bewirkt bei den Eosinophilen eine Stimulation sowie eine Aktivierung und löst darüber hinaus ein prolongiertes Überleben dieser Zellgattung aus. Diese Faktoren summieren sich zu einer Blut- und Gewebseosinophilie. Weiterhin werden dem GM-CSF und ebenfalls dem IL-3 unter anderem eine stimulierende Wirkung zugesprochen [16]. Sicher ist allerdings festzuhalten, dass die Eosinophilen einer akuten immunpathologischen Regulation unterliegen. Eosinophile degenerieren im Gewebe unter Abgabe spezifischer granulärer Komponenten [31]. Im weiteren Hergang der Krankheit zeigt sich diesbezüglich, vorwiegend in der chronischen Verlaufsform, eine speziell durch Degranulation bedingte Freisetzung der eosinophilen-typischen Stoffe eosinophil cationic protein (ECP), major basic protein (MBP), eosinophil-derived neurotoxin (EDN), eosinophil protein X (EPX) und eosinophile Peroxidase (EPO) (Tabelle 4) [87].

Tabelle 4: Zytotoxische Aktivitäten der Eosinophilen

Sezernierbare Mediatoren:	Auslösende Faktoren:
ECP	IL-5
MBP	IL-1
EPO	IL-3
EPX	IL-4
EDN	GM-CSF
	TNF- $\alpha$

In den letzten Jahren widmete sich die Forschung intensiv dem MBP sowie dem ECP, ohne jedoch eine einheitliche Bedeutung in bezug auf die Pathogenese formulieren zu können [65]. Diesen Überträgerstoffen konnten indes toxische Eigenschaften nachgewiesen werden [87]. Außer diesen Erkenntnissen zeichnet sich das MBP durch die Möglichkeit der Induktion der Basophilen und der Mastzelldegranulation aus. ECP dagegen repräsentiert einen spezifischen Aktivitätsmarker, der lediglich nach der Aktivierung der Eosinophilen bei atopischer Dermatitis in Erscheinung tritt, aber einen erheblichen Anteil am Krankheitsbild mitverursacht. In diesem Zusammenhang ist es möglich, dass ein erhöhter ECP-Spiegel im Serum, der in den meisten Fällen nachweisbar ist, den Aktivationsstatus des gesamten Eosinophilenpools reflektiert und somit auch Rückschlüsse auf den Grad der Aktivierung der Eosinophilen in den Läsionen zulässt [61].

#### 1.2.1.6 Langerhanszellen

Die Langerhanszellen sind suprabasale, dendritische Epidermissternzellen, die als hochspezifische antigenpräsentierende Effektorzellen in den DTH-Reaktionen in Erscheinung treten. Dabei bedienen sich diese Zellen ihrer Fähigkeit, niedermolekulare Allergene nach erfolgter Bindung mit anschließender Internalisierung zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen antigenspezifischen T-Helferzellen zu präsentieren. Zudem sind sie zur Präsentation hochmolekularer Aeroallergene mittels langerhanszellgebundener IgE-Moleküle in der Lage [15]. Die Entdeckung, dass die Langerhanszellen bei Patienten mit atopischer Dermatitis offenbar die Fähigkeit besitzen, zusätzlich zu Mastzellen und Monozyten, IgE-Moleküle zu binden, erweckte Spekulationen über eine mögliche

Involvierung dieser Zellgattung im pathophysiologischen Verlauf dieser Form der Atopie [43]. In der läSIONalen Haut zeichnen sich die Langerhanszellen sowohl durch ihr gehäuftes Auftreten als auch auf Grund ihres aktivierten Phänotyps aus. In nichtgeschädigter Haut lassen sich die Langerhanszellen infolge ihrer unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren in epidermale und dermale Zellgruppen differenzieren.

Die epidermalen Vertreter sind lediglich durch die Anwesenheit von CD1a gekennzeichnet, die dermalen Zellen sind darüber hinaus in der Lage, CD1b zu exprimieren. Die Existenz eines abnormen Phänotyps bei der atopischen Dermatitis lässt eine derartige Kategorisierung nun nicht mehr zu. Entsprechende Langerhanszellen zeichnen sich durch eine einheitliche Exposition von CD1a, CD1b sowie CD36 aus. Auch haben sie die Fähigkeit der Bindung an die Fc-Region der IgE-Moleküle. Daran scheinen ein erhöhter IgE-Spiegel und die Präsenz inflammatorischer Mediatoren und Zytokine, insbesondere das IL-4, maßgeblich beteiligt zu sein. Entsprechend dieser Fähigkeit stehen den Langerhanszellen in Läsionen die hochaffinen Fc- $\epsilon$ -R1- sowie die niedrigaffinen Fc- $\epsilon$ -R2-Moleküle zur Verfügung [31]. Dadurch wird es für die Immunglobuline der Klasse E möglich, sich an Langerhanszellen, und nicht ausschließlich an den typischen Ort einer Typ-I-Reaktion, zu binden.

In summa ist schließlich zu bemerken, dass die Langerhanszellen im aktivierten Zustand offenbar eminent mitverantwortlich für den sogenannten IgE-switch sind und somit an den verheerenden Circuli vitiosi in der Pathogenese der atopischen Dermatitis mitwirken.

#### 1.2.1.7 Keratinozyten

Keratinozyten weisen in läSIONalen Hautabschnitten augenscheinlich eine Modulation ihres Phänotyps infolge einer Beeinflussung durch Zytokine beziehungsweise Lymphokine sowie durch mechanische Irritationen auf. Daraus resultierend exprimieren aktivierte Formen erhöhte ICAM-1-Werte, auch CD1a und CD36 konnten partiell nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist die Anwesenheit von HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen unter ihnen kaum belegbar. Allerdings scheinen ebenfalls die Keratinozyten auf eine Stimulation durch IgE zu reagieren und mindestens mit einer Produktion der bereits im Überfluss vorliegenden Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF und TNF- $\alpha$  zu antworten, womit das ungewöhnliche Zytokinmilieu im Organismus bei atopischer Dermatitis weiterhin verschärft wird. In Hinblick hierauf potenzieren somit Keratinozyten weiterhin die Freisetzung

gewebescheidigender Mediatoren verbunden mit dem Anstieg der inflammatorischen Reaktionen [87].

## **1.2.2 Zytokine & Mediatoren**

### **1.2.2.1 Interleukin-1**

IL-1 wird hauptsichlich von den Zellen des mononukleären Phagozytensystems produziert und verursacht im Krankheitsfall während der Immunantwort ein facettenreiches Spektrum an pathophysiologischen Veränderungen. Unter den möglichen Folgeerscheinungen befinden sich unter anderem die Akutphase-Reaktion sowie eine generelle Entzündung. Diesen Umstand verdankt das IL-1 vorwiegend dem stimulierenden Effekt sowohl in bezug auf die Endothelzellen als auch auf die Granulozyten. Insbesondere protegiert es hiermit die Produktion von Adhäsionsmolekülen durch die Endothelzellen beziehungsweise die Möglichkeit des Durchtritts entzündungsfördernder Zellen in das Gewebe [16].

### **1.2.2.2 Interleukin-2**

Das Lymphokin IL-2 spielt eine wesentliche Rolle in der Aktivierung von T-Zellen. Neben der direkten Produktion von IL-2 exprimieren aktivierte T-Lymphozyten zusätzlich deren Rezeptoren [30]. IL-2 hat die Wirkung eines autokrinen und parakrinen Wachstumsfaktors für T- und B-Lymphozyten; es synergisiert hierbei mit den Eigenschaften der IL-4, -5 und -6. Resultierend daraus ergibt sich im weiteren Verlauf der atopischen Dermatitis eine zusätzliche lymphokine Produktion sowie zelluläre Proliferation. Die IL-2-Aktivität wird durch adäquate IL-2-Rezeptoren (IL-2R) vermittelt. Diese sind auf Grund unterschiedlicher Affinitätsgrade in drei Untergruppen zu kategorisieren, darunter hochaffine, mediumaffine und niedrigaffine IL-2R [53].

### 1.2.2.3 Interleukin-3

Das IL-3 wird ebenfalls von aktivierten T-Lymphozyten synthetisiert und wirkt vor allem auf die Zellen des hämopoietischen Systems [15]. Bezüglich der speziellen Beziehung zur Pathogenese der atopischen Dermatitis ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch verhältnismäßig wenig bekannt. Dennoch ist unter dem heutigen Erkenntnisstand eine Relation zur Eosinophilie kaum zu leugnen. Hierauf Bezug nehmend wirkt offenbar das IL-3, zusammen mit GM-CSF und IL-5, mittels einer Eosinophilopoietin-Aktivität direkt auf eosinophile Granulozyten und sorgt so für ein prolongiertes Überleben, höhere Aktivität und Hypodensität. Darüber hinaus unterstützt IL-3 das Mastzellwachstum [16, 26].

### 1.2.2.4 Interleukin-4

Das IL-4 repräsentiert das zentrale Zytokin in der Immunregulation der atopischen Dermatitis und ist maßgeblich an der Initialisierung der akuten Verlaufsform beteiligt [47]. Dabei agiert es vielseitig und inhibiert die Th1-dominierte Antwort, fördert hingegen die Th2-Reaktion. Ebenso stellt der besagte Th2-Subtyp die hauptsächliche Quelle des IL-4 dar. Das IL-4 ist in der Lage, ein isotype-switching der jungen B-Lymphozyten in Richtung der Produktion weiterer IgE-Moleküle zu verursachen, ein Umstand, der von diversen anderen Zytokinen unterstützt wird [58]. Zusätzlich besitzt es die Fähigkeit, die Expression niedrigaffiner IgE-Rezeptoren auf Monozyten, Langerhanszellen und B-Zellen, das Wachstum der Mastzellen sowie die Produktion des Adhäsionsmoleküls vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) zu induzieren, welches die transendotheliale Migration entzündungsfördernder Zelltypen ermöglicht.

### 1.2.2.5 Interleukin-5

IL-5 wurde ursprünglich als ein B-Lymphozyten-stimulierendes Zytokin identifiziert, welches die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen vermittelt. Unter heutigen Gesichtspunkten steht das Potenzial des IL-5, durch eine Eosinophilopoietin-Aktivität und Eosinophilaktivitäts-Stimulation eine Eosinophilie via autokrines und parakrines Pathway auszulösen, im Vordergrund [16]. T-Zellen stellen dabei die Hauptquelle dieses

Zytokins dar, obwohl Mastzellen und auch Eosinophile selbst in geringem Maße an der Produktion mitbeteiligt zu sein scheinen. Auch kann das Auftreten des IL-5 in hohen Konzentrationen, wie es bei der atopischen Dermatitis der Fall ist, die Symptome durch Histaminfreisetzung und Aktivierung des VCAM-1 weiterhin forcieren. Demzufolge synergisiert dieses Zytokin mit einem Teil des bekannten Musters der IL-4 und -3. Des Weiteren stellt es nach vollzogenem Zytokin-Shift den vorherrschenden Überträgerstoff der chronischen Verlaufsform dar [47].

#### 1.2.2.6 Interleukin-6

Das IL-6 wird von mehreren Zellen gebildet, von denen jedoch die Zellgruppe des MPS durch eine besonders hohe Herstellungsrate imponiert. Das IL-6 stimuliert den letzten Schritt der B-Lymphozytenmaturation und verhilft auf diese Art den B-Zellen zur weiteren Produktion der Immunglobuline der Klasse E. Entsprechend der Überproduktion des IgE synergisiert auch dieses Interleukin mit dem bekannten Schema des IL-4. Ergänzend korreliert eine Erhöhung des IL-6 mit einer gesteigerten Aktivierung der neutrophilen Granulozyten sowie mit einer übermäßigen Knochenmarkstammzellmaturation seitens der Granulozyten und Makrophagen [16].

#### 1.2.2.7 Interleukin-8

Die Bedeutung des proinflammatorischen IL-8 ist in bezug auf die Pathogenese der atopischen Dermatitis bis zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig aufgeklärt. IL-8 ist ein durch Makrophagen freigesetztes Zytokin, welches die Potenz besitzt, das chemotaktische Verhalten und die Degranulation neutrophiler Granulozyten anzuregen [16]. Zusätzlich steigert sich unter Anwesenheit des IL-8 die Chemotaxis der Makrophagen. Sowie der T-Lymphozyten. Insofern wird die Infiltration des betroffenen Gewebes gefördert [57]. Untersuchungen der chemotaktischen Aktivitäten im Serum wiesen hingegen inverse Resultate auf [148].

#### 1.2.2.8 Interleukin-9

Das IL-9 wird von den Th2-Zellen in mäßigen Konzentrationen synthetisiert [15]. Dabei verhilft es den Mastzellen zur Proliferation und anschließender Aktivierung. Darüber hinaus zeichnet es sich durch eine T-Zell-Wachstumsaktivität aus, was zudem zu einer Verschärfung der IgE-Produktion führen kann.

#### 1.2.2.9 Interleukin-10

Dieses Interleukin gehört neben den IL-4 und -5 zur Gruppe der zentralen Zytokine der atopischen Dermatitis und trägt zur zusätzlichen Produktion der Immunglobuline E bei. IL-10 wird mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl von den Th2-Zellen als auch von Monozyten und Keratinozyten sezerniert [16, 87, 120]. Hierbei erstreckt sich die Wirkung über die Stimulation der Mastzellproliferation bis hin zur äußerst signifikanten Reduktion der IFN- $\gamma$ -Produktion. Offenbar ist dieses Zytokin durch seine immunsuppressive Tendenz auch für eine gesteigerte Anfälligkeit der Haut gegenüber mykotischen, viralen und bakteriellen Erkrankungen verantwortlich [87].

#### 1.2.2.10 Interleukin-12

Antagonistisch zur Majorität der bereits vorgestellten Interleukine repräsentiert das IL-12 einen induzierenden Faktor bezogen auf die Produktion des IFN- $\gamma$  mit der Folge einer zum Th1-Subset verschobenen Balance der T-Helferzellen [100]. Allerdings scheint darüber hinaus eine durch Staphylococcus-aureus-Superantigene ausgelöste Opulenz des IL-12 durch Makrophagen, Monozyten und Langerhanszellen zu persistieren. Dies kann im weiteren Verlauf zu einer Induktion wichtiger Oberflächenrezeptoren der T-Lymphozyten und demzufolge zu einer höheren Effizienz dieser Zellpopulation führen [16]. Im Normalzustand wird das IL-12 fast ausschließlich von den Monozyten synthetisiert [15].

#### 1.2.2.11 Interleukin-13

Das IL-13 ist durch direkte Stimulation der B-Lymphozyten ein die IgE-Herstellung anregendes Lymphokin, welches ebenfalls in bemerkenswerten Mengen von den Th2-Lymphozyten bei Patienten mit atopischer Dermatitis gebildet und freigesetzt wird [15]. Im Vergleich zum IL-4 ist es jedoch weniger wirkungsvoll.

#### 1.2.2.12 Interferon- $\gamma$

IFN- $\gamma$  steht im oppositionellen Verhältnis zum IL-4 und ist vermutlich eines der hauptbeteiligten Zytokine, die der Manifestierung der atopischen Dermatitis zu Grunde liegen. In der gesunden Haut vermag das IFN- $\gamma$  inhibierend in die IgE-Regulation einzugreifen. Gleichzeitig hemmt es die Proliferation der Th2-Lymphozyten und inhibiert als Konsequenz aus diesem Vorgang auch die Stimulation der B-Lymphozyten zur IgE-Erzeugung. Ferner fördert es die Expansion des Th1-Subsets [58]. Resultierend aus den reziproken Eigenschaften des dualistischen Mechanismus zwischen IL-4 und IFN- $\gamma$  sind denkbare Unterproduktionen sowie Synthesedefekte in der Sekretion dieses Markerzytokins bezüglich der Immunpathogenese der atopischen Dermatitis von weitreichender Bedeutung.

#### 1.2.2.13 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

Der TNF- $\alpha$  wird simultan sowohl von Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Keratinozyten, Langerhanszellen ungewöhnlichen Phänotyps als auch Mastzellen synthetisiert und auf unterschiedliche Reize hin sezerniert. TNF- $\alpha$  kann durch Einflussnahme auf eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie auf Makrophagen und, offenbar von besonderer Relevanz, auch durch Wirkung auf Mastzellen inflammatorische Reaktionen begünstigen. Vorstellbar sind darüber hinaus selektive inhibitorische Effekte auf die Th1-Zellen, welche die Signifikanz diese Zytokins im Falle der atopischen Dermatitis potenzieren könnten [31].

#### 1.2.2.14 Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor

In läsionalen Hautabschnitten ist ein erhöhtes Auftreten des GM-CSF nachweisbar, wahrscheinlich ausgelöst durch eine gesteigerte Sekretionsrate der Th2-Lymphozyten. Auch dieser Faktor ist befähigt, inflammatorische Reaktionen bei betroffenen Patienten zu bewirken. Diese sind das Resultat weitreichender Einzelaktivierungen. En detail scheint der GM-CSF eine stimulierende Wirkung auf eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen zu besitzen, ebenso wird eine direkte Einflussnahme auf die Histaminfreisetzung durch Mastzellen nicht ausgeschlossen [16].

#### 1.2.2.15 Prostaglandine

Monozyten eines abnormen Phänotyps konnten in den letzten Jahren als Ursprung erhöhter Konzentrationen des PGE<sub>2</sub> bei Patienten mit atopischer Dermatitis identifiziert werden. Dies führt ebenfalls zu einer Reduktion des IFN- $\gamma$ -produzierenden Th1-Subsets, sodass die Relation der T-Lymphozyten zugunsten der Th2-dominierten Immunantwort zusätzlich nachhaltig verschoben werden kann. Ergänzend erscheint das PGE<sub>2</sub> als ein potenzieller, direkt wirkender Induktor der B-Lymphozyten-medierten IgE-Produktion zu fungieren und damit den IgE-Switch positiv zu beeinflussen. Neben dem genannten PGE<sub>2</sub> erlangt zudem das PGD<sub>2</sub> der Mastzellen Geltung, da es die inflammatorischen Reaktionen im klassischen Sinn unterstützt [16].

#### 1.2.2.16 Adhäsionsmoleküle

Zu den fundamentalen zytokininduzierbaren Adhäsionsmolekülen im Krankheitsbild der atopischen Dermatitis werden endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), VCAM-1 als auch das intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) zugerechnet. ELAM-1 repräsentiert ein Oberflächenglykoprotein, welches in immunhistochemischen Normalbefunden der Haut in nur geringen Dosen exprimiert vorliegt. Im Krankheitsfall hingegen ist auf Grund einer stetigen Stimulation durch die Zytokine IL-1, IL-4 und TNF- $\alpha$  eine relativ ausgeprägte endotheliale Expression wahrnehmbar. Hierbei rekrutiert ELAM-1 insbesondere neutrophile Granulozyten, im geringen Maße ebenso Monozyten,

Eosinophile und T-Zellgruppen. Als Schlussfolgerung dieses Profils scheinen Mastzellen, Monozyten, Keratinozyten und Th2-Lymphozyten nach bereits erläuterten Sekretionsschema für die Rekrutierung verantwortlich zu sein [45].

Der Eintritt von Zellen in Entzündungsgebiete der Haut wird überdies durch ICAM-1 reguliert. ICAM-1 vermag dabei die Extravasation der Granulozyten zu steuern, die lymphozytenvermittelte Zytotoxizität zu potenzieren sowie spezifische immunologisch bedeutsame Zellinteraktionen zu favorisieren. Auch hier können erhöhte Mengen an dermalen endothelialen Zellen detektiert werden. Ebenso sind auch Keratinozyten und mononukleäre Zellgruppen offenbar in diesen Prozess involviert. Stimuliert wird dessen Expressierung durch dieselben Zytokine, jedoch stellt im Gegensatz dazu auch das IFN- $\gamma$  einen profunden Faktor dar [57].

Ferner existiert ein abnorm hoher Spiegel an VCAM-1, einem weiteren Adhäsionsmolekül, das die Migration mononukleärer Zellen sowie eosinophiler Granulozyten als Antwort auf eine Stimulation mit IL-4 und IL-13 lanciert.

#### 1.2.2.17 Neuropeptid-Y

Im Rahmen der noradrenergen Innervation fungiert das NPY als ein eventuell beteiligter Faktor proinflammatorischer Reaktionen. In normaler Haut sind NPY-positive Nervenfasern zirkulär um Blutgefäße gruppiert, intraepidermal gibt es wenig Hinweise auf eine einheitliche Existenz. In Proben läsionaler Hautabschnitte der atopischen Dermatitis ist eine signifikante Präsenz zu erforschen, neuere Studien berichten kontrovers über ein Erscheinen dieses Neuropeptids an epidermalen dendritischen Zellen [106, 132]. Über eine Teilnahme an der Regulation des Blutflusses in der Haut wird spekuliert.

#### 1.2.2.18 Substanz-P

Das Neuropeptid SP kommt vorherrschend in dermalen Nervenendigungen vor und greift in die Pathogenese der atopischen Dermatitis anscheinend konstitutiv ein. Durch adäquate Stimulationen sensorischer Nervenfasern wirkt es sowohl direkt als auch indirekt auf entzündliche Hautreaktionen ein. Hierauf Bezug nehmend sind Vasodilatation, vaskuläre Permeabilitätssteigerungen, Stimulationen der Lymphozyten- sowie der Monozytengnese

und Induktion der mastzellvermittelten Mediatorenfreisetzung anzuführen. Darüber hinaus hat SP einen positiven Einfluss auf die Freisetzung einiger essenzieller Zytokine, wie beispielsweise des IL-1 oder den TNF- $\alpha$ ; unter Umständen wird eine Einflussnahme auf die IFN- $\gamma$ /IL-4-Relation erahnt [42].

#### 1.2.2.19 Calcitonin gene-related peptide

Auch dem CGRP wird eine entsprechende Tragweite im Krankheitsbild der atopischen Dermatitis zuteil. Gleichmaßen, wie es beim NPY der Fall zu sein scheint, ist die Eingliederung in Hinblick auf eine definitive Involvierung bislang ohne Erfolg geblieben und bedarf weiterem Interesse der Forschung. Denkbar ist bis zu diesem Zeitpunkt eine Verstärkung der Immunantwort in der Folge einer erhöhten Suszeptibilität der T-Lymphozyten auf eine derartige Stimulation [132].

#### 1.2.2.20 Vasoaktives intestinales Peptid

Gemessen an ihren immunregulatorischen Eigenschaften stehen VIP und SP in einer Art dynamischer oppositionaler Relation zueinander, wie es Untersuchungen am murinen System suggerieren. Auch am Menschen kam man zu ähnlichen Resultaten, als dass in einigen Forschungsgruppen eine Inhibition der Lymphozytenproliferation beziehungsweise der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch VIP festgestellt werden konnte [31]. Demgegenüber steht indes die Annahme, dass eben dieses Neuropeptid die Fähigkeit zur regionalen Vasodilatation sowie zur Induktion des Pruritus und der weal-and-flare-Reaktionen aufweist [42].

#### 1.2.2.21 Eosinophil cationic proteins

Das ECP ist eines der vier grundlegenden Proteine, die in den Granula der Eosinophilen aufzeigbar sind. Nach einer korrespondierenden Stimulation wird das ECP als Folge einer Degranulation der nunmehr aktivierten eosinophilen Granulozyten sezerniert. Als Konsequenz aus diesem, mit der atopischen Dermatitis einher gehenden Prozess liegt auf

Grund zytotoxischer Aktivitäten eine Schädigung des umgebenden Gewebes begründet. Ursächlich für eine Erhöhung des ECP-Spiegels im Serum beziehungsweise im Gewebe werden in diesem Zusammenhang neben diverser Lymphokine besonders die Mastzellen verantwortlich gemacht, da sie eminent an der prolongierten Überlebensdauer der Eosinophilen beteiligt zu sein scheinen [65].

#### 1.2.2.22 Major basic proteine

Das MBP repräsentiert als polypeptides kristalloides Core eines der in eosinophilen Granulozyten ubiquitär vorkommenden Proteine, welches innerhalb der Granula gespeichert wird. Extrazellulär verzeichnet man in läsionaler Haut der betroffenen Patienten eine gesteigerte Präsenz dieses Proteins, welches vorwiegend in den dermalen Regionen lokalisiert und infolge des Degranulationverhaltens als eventueller Marker aller Eosinophilen dieses Gewebes einsetzbar ist. Zytotoxische Eigenschaften sorgen wahrscheinlich auch hier für Gewebeschädigungen, ebenso werden inflammatorische Aktivitäten durch die Induktion der Mastzellen und basophilen Granulozyten unterstützt [87].

### **1.3 Immunpathogenese der atopischen Dermatitis**

#### **1.3.1 Allgemeine Histopathologie**

Unbetroffene Hautabschnitte weisen oftmals eine leichte Hyperkeratose und eine epidermale Hyperplasie auf. Ebenso finden sich vereinzelt lichte dermale Rundzellinfiltrate.

Die akuten Läsionen sind in der Regel durch inter- sowie intrazelluläre Ödeme charakterisiert. In einigen Präparaten können epidermal spärliche lymphozytäre Infiltrate beobachtet werden. Dermal finden sich hingegen regelmäßig teils massive perivaskuläre inflammatorische Infiltrate, die zumeist aus T-Lymphozyten bestehen. Gleichzeitig finden

sich erhöhte Zahlen von Monozyten/Makrophagen, Eosinophilen, Mastzellen und Langerhanszellen.

Epidermal zeichnen sich chronische Läsionen durch eine Hyperplasie mit Elongation der Reteleisten, auffällige Hyperkeratose und leichte Spongiose aus. Suprabasal findet sich eine erhöhte Anzahl an Langerhanszellen. Die Endothelzellen des oberflächlichen Venenplexus sind hypertrophiert und weisen einen vergrößerten Zellkern mit auffälligem Nucleolus auf. In den prominenten dermalen Infiltraten kann das verstärkte Auftreten von Monozyten/Makrophagen, Mastzellen und Langerhanszellen beobachtet werden. Dennoch dominieren auch hier die Lymphozyten das histologische Bild.

### **1.3.2 Immunologische Ereignisse**

Die spezifische Immunregulation weist bezüglich des Verlaufs der atopischen Dermatitis mehrere Charakteristika auf, deren Relevanz in Hinblick auf den Grad der jeweiligen Ausprägung von enormer Bedeutung ist. Schlüsselstellen umfassen hierbei erhöhte T-Lymphozytenaktivitäten, Anstieg der IL-4 und -6 durch eine Favorisierung der Th2-Zellen, Abnahme IFN- $\gamma$ -produzierender Th1-Zellen, hyperstimulatorische Langerhanszellen, verminderte T-Suppressorzahlen, erhöhte Affinität bei mononukleären Zellen zu IgE und vermehrtes Auftreten sowie gesteigerte Sekretionsraten von Eosinophilen, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen (Tabelle 5). Resultierend aus diesen pathologischen Veränderungen einschließlich der daraus entstehenden Circuli vitiosi ergeben sich sowohl eine defekte zellvermittelte Immunität als auch eine schwerwiegende Beeinträchtigung des humoralen Systems endend in einer weit über das normale Maß hinaus existierenden, B-Zell-vermittelten Immunoglobulin-E-Produktion. Diesem Gedankengang folgend zeigen auch andere Lymphokine und Mediatoren sowie ebenfalls eine Reihe von Neuropeptiden Tendenzen, dieses Bild zu intensivieren (Abbildung 1).

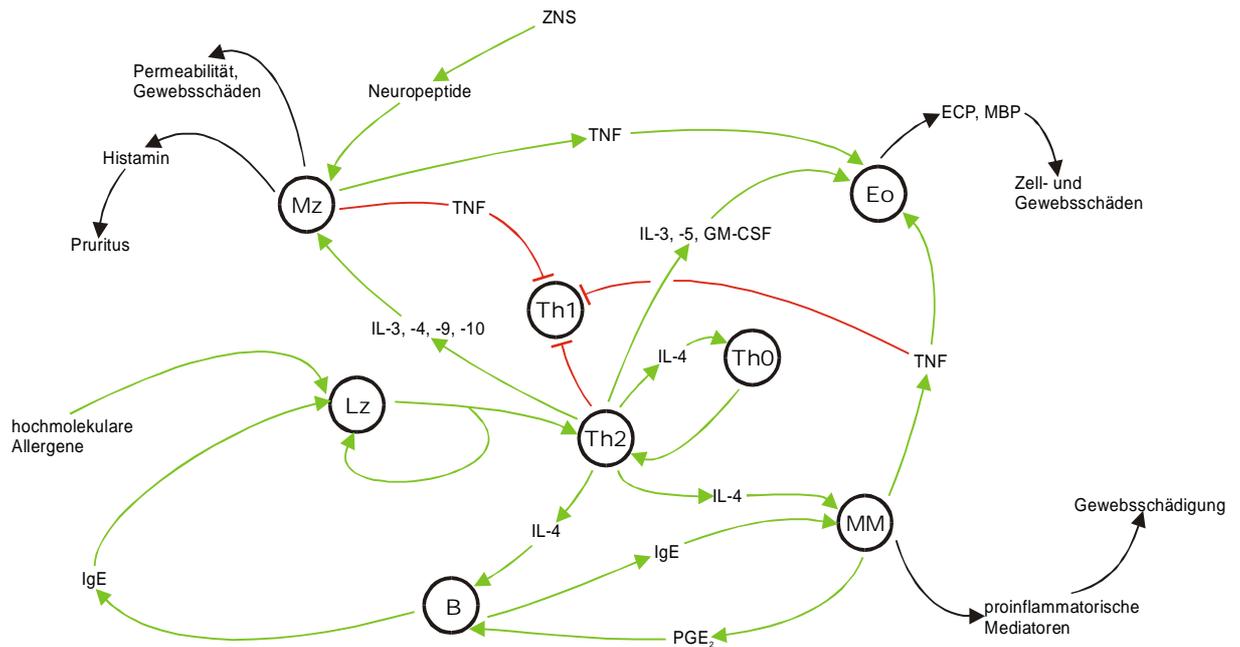


Abbildung 1: Graphische Darstellung der immunpathologisch wegweisenden Interaktionen bei der atopischen Dermatitis (Mz Mastzellen, Eo Eosinophile, Th T-Helferzellen, Lz Langerhanszellen, MM Monozyten/Makrophagen, B B-Lymphozyten, ZNS Zentralnervensystem, TNF Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , ECP eosinophil cationic protein, MBP major basic protein, IL Interleukin, GM-CSF Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor, PGE<sub>2</sub> Prostaglandin E<sub>2</sub>)

Generell lassen sich im Falle der atopischen Dermatitis extrem hohe Infiltrationsraten vornehmlich mononukleärer Zellen konstatieren. In akuten und chronischen Läsionen werden in immunhistologischen Untersuchungen eine besonders hohe Anzahl dermalen T-Zellen beobachtet. Hierbei fällt besonders die erhöhte Ratio bezüglich CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Helferzellen auf, welche weniger auf eine Abnahme bzw. Stagnation der CD8<sup>+</sup>-, als auf eine überdurchschnittlich gesteigerte Präsenz der CD4<sup>+</sup>-Zellen zurückzuführen ist [31]. Im Zentrum des aktuellen Pathogenese-Konzepts steht die Disbalance zwischen den verschiedenen Untergruppen der T-Helferzellen, die im peripheren Blut zirkulieren, aber auch die Haut infiltrieren und infolge ihres spezifischen Zytokinprofils entzündliche Reaktionen in diesen Hautregionen auslösen.

Tabelle 5: Abnormalitäten der Immunregulation bei atopischer Dermatitis

Zellniveau:	Zytokinniveau:
Zellzahl- und Aktivitätsanstieg bei Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen, Langerhanszellen, Makrophagen, Mastzellen	Erhöhte IgE-Produktion
Dominanz der Th2- / Th0-Zellen in der initialen Phase	Verstärkte Freisetzung von IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, PGE2, PGD2, ILAM-1, ELAM-1, VCAM-1
Dominanz der Th1- / Th0-Zellen in der chronischen Phase	Verstärkte Freisetzung von Neuropeptiden
Erhöhte Expression von CD23-Rezeptoren auf den Entzündungszellen	Erniedrigte IL-12- und IFN- $\gamma$ -Spiegel
Reduktion der Anzahl CD8 <sup>+</sup> -Supressorzellen	Deponierung zytotoxischer Inhaltsstoffe eosinophiler Granulozyten
Vielseitige Selbstaktivierungsmechanismen	Histaminüberschuss

### 1.3.2.1 Akutphase-Reaktion

Besonders die Anfangsphase wird von der Th2-Subpopulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen dominiert, die die Initialisierung diverser Circuli vitiosi ermöglicht. Charakteristisch scheint nunmehr die Relation zwischen dem IL-4- und dem IFN- $\gamma$ -Spiegel zu sein, da bei den betroffenen Patienten ein erhöhtes Verhältnis zwischen diesen beiden Zytokinen vermutet wird. Dies wäre die Folge der Th2-dominierten Immunantwort, zumal die T-Lymphozyten des Th2-Subtyps im Gegensatz zu den Th1-Lymphozyten hohe Mengen an IL-4, jedoch lediglich wenig IFN- $\gamma$  sezernieren. Dementsprechend dominieren Zellen des Th2-Phänotyps in der akuten Phase das Geschehen, allerdings zeichnet sich eine spätere Verschiebung zugunsten der Th1- und Th0-Lymphozyten ab [131]. Dennoch konnte in einigen Studien selbst in der akuten Phase keine Erniedrigung der IFN- $\gamma$ -mRNA-Synthese gefunden werden. Als mögliche Gründe für eine trotzdem bestehende Reduktion des IFN- $\gamma$  konnten nachfolgend eine Störung während der posttranskriptionalen Modifikation beziehungsweise ein Defekt im Sekretionsvorgang angeführt werden [42]. Insgesamt stimmen die Meinungen der meisten Autoren letztjähriger Forschungsarbeiten in ihrer Beurteilung des IL-4 und der eng damit verbundenen Th2-Zellen zumeist dahingehend überein, dass diese wichtigen

Komponenten in der Immunregulation von besonderer Bedeutung sind, da aus deren Präsenz die stark erhöhten IgE-Werte zu resultieren scheinen [58]. Unter anderem imponiert das sezernierte IL-4 durch einen inhibitorischen Einfluss auf die Th1-Lymphozyten sowie gegensätzlich dazu durch eine stimulierende Wirkung auf die Th2-Zellen. Ein proliferatorischer Effekt auf die Th0-Th2-Differenzierung wird ebenfalls diskutiert. Auf der anderen Seite initiiert es einen wichtigen Kreislauf, indem es zum erhöhten Stimulationslevel der B-Lymphozyten und somit zur pathologischen Überproduktion der IgE-Moleküle durch die Plasmazellen beiträgt [31]. Die nunmehr freigesetzten IgE-Moleküle treten nach spezifischem Kontakt mit hochmolekularen Allergenen mit den vermehrt auftretenden Langerhanszellen des atypischen Phänotyps in Verbindung. Diese Interaktion erfolgt seitens der Langerhanszellen vornehmlich über ihre abnorme Präsenz von Fc-ε-Rezeptoren der Typen 1 und 2. Die Bindung der hochmolekularen Allergene an die langerhanszellgebundenen allergenspezifischen IgE-Moleküle fördert die weitere Aktivierung allergenspezifischer T-Helferzellen [15]. Zusätzlich werden niedermolekulare Allergene direkt von Langerhanszellen aufgenommen, prozessiert und mit Hilfe von MHC-II-Molekülen exponiert. Während normale Langerhanszellen allerdings eine Stimulation nur in Gegenwart gebundener Immunkomplexe auszulösen vermögen, kommt es bei den veränderten Langerhanszellen des Atopikers darüber hinaus zur besagten Stimulation ohne eine neuerliche allergeninduzierte Bindung derartiger Strukturen [31]. Folglich werden Stimulatoren über das physiologische Maß hinaus präsentiert, welche wiederum T-Helferzellen aktivieren. Einen weiteren Hinweis auf die autoreaktive Hyperstimulation der T-Lymphozyten liefern Erkenntnisse über die spezifische IL-4-induzierte Expression der IgE-Rezeptoren auf den Langerhanszellen [15].

Durch die bereits genannten Gründe, sowie mittels einer Vielzahl weiterer Faktoren, werden die Zellen des Th2-Typs favorisiert und der sich selbst potenzierende Kreislauf geschlossen [31].

Das IL-4 unterstützt jedoch nicht ausschließlich nur diesen Circulus vitiosus, sondern initiiert beziehungsweise protegiert daneben auch diverse andere pathologische Entzündungsmuster. Elementar in bezug auf die Ausprägung der Hauptsymptome ist die gesteigerte Mastzellbeteiligung. Die Rekrutierung der Mastzellen geht hauptsächlich von aktivierten Lymphozyten aus, unter denen die Th2-Zellen vorherrschend in die Ereignisse eingreifen. Hierbei entfalten die IL-3, -9 und -10, aber auch das IL-4, eine besondere Wirkung und dienen der Proliferation der Mastzellen. Als Resultat manifestieren sich ein

ausgeprägter Pruritus sowie Entzündungserscheinungen betroffener Hautabschnitte. Förderlich hierfür sind Prozesse wie Vasodilatation, Erhöhung vaskulärer Permeabilität, Einflussnahme auf das chemotaktische Verhalten entzündungsfördernder Zellgruppen ebenso wie die Stimulation juckreizauslösender Rezeptoren. In dieser Beziehung repräsentieren die vorgefertigten Mediatoren, darunter zum Beispiel das Histamin, sowie die schnell erzeugbaren Mediatoren, einschließlich der Prostaglandine, bedeutende Komponenten. Auch der TNF- $\alpha$  nimmt eine besondere Position ein. Indem er für eine Hemmung der Entwicklung der Th1-Lymphozyten verantwortlich gemacht wird, verursacht dieser Faktor im Zusammenspiel mit den Prostaglandinen, welche die Generierung der Th2-Zellen im Gegensatz zur IFN- $\gamma$ -Produktion begünstigen, eine Stabilisierung der dargelegten Th1/Th2-Disbalance und dem damit eng korrelierenden IgE-Switch [16, 31]. Demnach sorgen also auch die Mastzellen für eine spätere Selbstaktivierung und eine hieraus resultierende Potenzierung der Symptomatik. Zusätzlich sind noch die interessanten Forschungsergebnisse aktueller Studien zu bemerken, in denen teilweise eine Beteiligung der Mastzellen an der Nettoproduktion des überaus wichtigen IL-4 nachgewiesen werden konnte [131].

Ein ähnlich relevantes Schema zeichnet sich bei den Monozyten/Makrophagen ab, da diese niedrigaffine CD23 IgE-Rezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren [87]. Unter nunmehr aktivierten Konditionen steht die Sekretion von sowohl TNF- $\alpha$  als auch PGE<sub>2</sub> im Zentrum des Pathogenesekonzepts. TNF- $\alpha$  scheint in den Monozyten seine Hautquelle zu finden und stellt einen entscheidenden Faktor der Th1/Th2-Verschiebung dar. Wie bereits beschrieben wird seine selektive inhibitorische Wirkung gegenüber der Th1-Population in Erwägung gezogen und festigt demnach weiter das sich zunehmend im pathologischen Zustand stabilisierende Muster der T-Helferzellen [16, 31]. Des weiteren zeigen die von den Monozyten ausgeschütteten Mengen an PGE<sub>2</sub> vergleichbare Effekte auf diese Verschiebung sowie deren anschließende Festigung. Hinzu kommt der Tatbestand, dass das PGE<sub>2</sub> eine direkte Induktion der B-Lymphozyten und außerdem eine Inhibition des IFN- $\gamma$  zu vermitteln scheint. Geschlossen wird der Kreis auf Grund der Fähigkeit des IL-4, die Expressierung entsprechender niedrigaffiner CD23 IgE-Rezeptoren auf den Monozyten/Makrophagen zu stimulieren [87]. Zudem sezernieren auch die Makrophagen infolge dessen neben wenig spezifischen Zytokinen ebenfalls das charakteristische TNF- $\alpha$ . In den letzten Jahren rückten mögliche Effektorfunktionen der Hautnerven wieder nachdrücklich in den Blickpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen, da sie mit der Variation der Expansion entzündlicher Hautregionen und des psychischen Status des

Patienten in Verbindung gebracht werden [31]. Einer derartigen Disregulation des autonomen und sensorischen Nervensystems werden gleichwohl Auswirkungen auf das Immunsystem der Haut zugeschrieben. Bezug nehmend auf diesen Zustand gilt die Freisetzung diverser Neuropeptide als Weg, die inflammatorischen Reaktionen zu initiieren beziehungsweise zu festigen. Dementsprechend scheint eine direkte Korrelation zwischen den entzündungsfördernden Zellen und den Nervenzellen zu existieren, die infolge einer Sekretion spezieller Überträgerstoffe überbrückt werden kann. Demgemäß werden der SP, dem NPY und dem CGRP besondere Bedeutung zugesprochen und mit einer Regulation des läsionalen Blutflusses, der gesteigerten transendothelialen Migration sowie mit einer direkten und indirekten Stimulation der Lymphozyten und Monozyten in Zusammenhang gebracht. Ebenso scheinen die Mastzellen auf einen adäquaten Reiz entsprechender Nervenfasern mit einer erhöhten Sekretion ihrer entzündungs- und juckreizauslösender Mediatoren zu reagieren [42].

Unterstützt wird die Gesamtheit der bereits genannten Prozesse durch eine Anzahl mitwirkender Zytokine und Mediatoren, die in den facettenreichen Abnormalitäten der Immunregulation vielseitig in Erscheinung treten, darunter die IL-6, -10, -1, -2, -8, -12 und IL-13 sowie die Adhäsionsmoleküle.

### 1.3.2.2 Spätphase-Reaktion

Im Anschluss an die akute Phase schließt sich eine Zeitperiode mit einem anderen histologischen Erscheinungsbild an. In der chronischen Verlaufsform treten die Th2-Lymphozyten offenbar zunehmend in den Hintergrund. Die wachsende Aufmerksamkeit fokussiert sich auf die Th1-/Th0-Zellen sowie auf die eosinophilen Granulozyten, die eine kritische Rolle für die pathogenetisch entscheidende Spätphase-Reaktion als Effektorzellen einzunehmen scheinen [131]. Die durch hohe Sekretionsdosen des IL-5 sowie zusätzlich auf Grund höherer Freisetzungsraten an IL-3 und GM-CSF nunmehr aktivierten Eosinophilen deponieren zytotoxische Inhaltstoffe ihrer intrazellulären Granula im Gewebe. Während die Auswirkungen der gestörten IL-4/IFN- $\gamma$ -Relation anscheinend rückläufig sind, stabilisiert sich im Gegensatz dazu der pathologische IL-5-Spiegel zunehmend und fördert unter der Mithilfe einer Vielzahl anderer Komponenten den Einstrom der eosinophilen Granulozyten, die daraufhin im betroffenen Gewebe degranulieren. Infolgedessen wird dieser Zelltyp in der zweiten Phase für die ausgeprägten

Zell- und Gewebeschädigungen verantwortlich gemacht. In diesem wichtigen Prozess imponieren insbesondere die granulären Proteine ECP und MBP. Das ECP sorgt diesbezüglich für einen großen Anteil der Gewebsbeeinträchtigungen, das MBP setzt durch mögliche Interaktionen mit den Mastzellen das Fortbestehen äußerer Symptome fort [65]. Die Dominanz der eosinophilen Granulozyten wird zum einen durch die IL-5-Sekretion der Eosinophilen selbst aufrecht erhalten, zum anderen trägt der TNF- $\alpha$  einen entscheidenden Teil bei [47]. Dieser Faktor wird in der chronischen Phase vorherrschend von den Mastzellen, zudem aber auch von Monozyten, Lymphozyten, Langerhanszellen, Makrophagen und Keratinozyten freigesetzt und sorgt durch stimulatorische Effekte auf Adhäsionsmoleküle und Eosinophile für eine Erhaltung des vorgestellten Bildes.

Eine zusätzliche Intensivierung der Situation wird durch die Keratinozyten gewährleistet. Kratzeffekte, geleitet durch starken Pruritus, führen zu Verletzungen der oberen Hautschichten und schädigen die Keratinozyten, die als Konsequenz unter anderem die IL-1 und -6 sowie den TNF- $\alpha$  sezernieren [87].

Ebenso wie in der Akutphase-Reaktion sind jedoch auch hier eine Reihe weiterer Zytokine und Mediatoren beteiligt, die inhibierend, hauptsächlich aber stimulierend in die Prozesse eingreifen. Zusammenfassend lässt sich bemerken, dass dieses differenzierte, verschiedene Phasen abgrenzende, histologische und serologische Bild trotz einer auffälligen Kontinuität ebenfalls teils größeren Variationen unterworfen sein kann.

## **1.4 Therapiemöglichkeiten der atopischen Dermatitis**

### **1.4.1 Basistherapie**

In der Behandlung der atopischen Dermatitis ist es notwendig, die gesamte Komplexität der genetischen Prädisposition, der Störungen des zellulären und Zytokin-Netzwerks, externer Allergene, neuroendokriner Mechanismen sowie psychosomatischer Komponenten in das Therapiekonzept mit einfließen zu lassen.

Die sogenannte dermatologische Basistherapie schließt zunächst die Hautpflege als Behandlung der Störungen der Hautbarrierefunktion mit ein. Hierzu werden in der Regel Basisexterna verabreicht, deren Gebrauch sich einerseits nach dem jeweiligen individuellen Hautzustand sowie ebenfalls nach der dermatologischen Erfahrung des

behandelnden Arztes richtet. Im akuten Schub sowie in Phasen der Verschlechterung ist die Applikation von Glukokortikoiden das Mittel der Wahl. Mit ihrer antiinflammatorischen, antiproliferativen, immunsuppressiven und vasokonstriktorischen Wirkung gilt diese Therapie als eine der wertvollsten und wichtigsten Maßnahmen zur Behandlung der atopischen Dermatitis. Zu beachten ist hierbei die frühzeitige Gabe des Medikaments bereits bei Beginn eines akuten Schubes als kurzfristige Medikation. Auf Grund des Nebenwirkungsspektrums, dem unsachgemäßen Einsatz der Mittel und der sich zunehmend verschlechternden Compliance ist der Einsatz der Glukokortikoide oft eher problematisch, speziell in Problemarealen und bei geringem Patientenalter. Eine weitere therapeutische Möglichkeit stellt die Gruppe der Antihistaminika dar. Die positive Wirkung dieser Substanzgruppe liegt weitestgehend in der symptomatischen Besserung des Juckreizes und der daraus resultierenden Unterbrechung des Circulus vitiosus der Itch-Scratch-Problematik begründet. In besonders schweren Fällen, in denen die Anwendung von Externa einen nicht ausreichenden Behandlungserfolg erreichen kann, kann auch die kurzfristige Gabe von internen Glukokortikoiden diskutiert werden. Zur Suppression bzw. Modulation der Aktivität des Immunsystems kann bei schweren Verläufen eine Immunmodulation durch Fumarsäureester oder eine Immunsuppression durch Cyclosporin sowie die Behandlung mit Interferon zu guten Heilungserfolgen führen, wobei sich letztere Therapieform noch im Experimentalstadium befindet.

#### **1.4.2 Präventiv- und unterstützende Maßnahmen**

Zum weiteren Patientenmanagement gehört darüber hinaus die Erkennung und – falls realisierbar – die Ausschaltung individueller Provokationsfaktoren. Die richtige Berufswahl ist eine zwingende Notwendigkeit. Es besteht die Gefahr der Kontaktsensibilisierung und damit einer Berufskrankheit. Darüber hinaus besteht die Gefahr der Entwicklung eines allergischen Asthmas durch Einatmen von Stäuben und Dämpfen. Ungeeignete Berufe sind solche, bei denen intensiver Kontakt mit Wasser, Waschmitteln, Ölen, Fetten, Bohrwasser, Desinfektionsmitteln, Klebstoffen, Leder, chemischen Produkten, aber auch mit Tieren, Mehl und Stäuben dauerhaft nicht zu vermeiden sind. Empfehlenswert sind Berufe an trockenen Arbeitsplätzen in sauberer Luft, wobei Bürotätigkeiten prinzipiell am besten geeignet sind. Auch die Kleidung sollte hautfreundlich sein. Tierwolle wird meist nicht vertragen. Am besten bewährt haben sich

Leinen und weiche, locker gewebte Baumwollerzeugnisse ohne Futter aus reinen Kunstfasern oder Wolle. Auch Mischgewebe aus Baumwolle und Kunstfasern jedoch ohne Wollzusatz wird meist gut vertragen. Pelze sollten ebenfalls nicht getragen werden. Unebene, raue Stoffe aus grobgewebten Fasern sowie harte, gestärkte Kragen wirken bereits durch den Scheuereffekt störend. Darüber hinaus ist aus allergologischer Sicht der Umgang mit Haustieren strikt abzulehnen, da die Möglichkeit der allergischen Reaktionen besonders bei hohem Sensibilisierungsgrad besteht. Die Ernährung spielt beim atopischen Ekzem lediglich im Säuglingsalter eine größere Rolle. Kinder ab dem 2. Lebensjahr und Erwachsene sollten Nahrungsmittel, die sie nicht vertragen, vermeiden. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Typ-I-Allergie gegen Hühnerei und Kuhmilch überproportional häufig besteht. Prinzipiell kann allerdings die Ansicht vertreten werden, dass es eine allgemeingültige spezielle Diät für den Patienten mit atopischem Ekzem nicht gibt. Wichtig ist neben den Allergietests die Selbsterfahrung des Patienten. Ein Klimawechsel ist die wirksamste und unschädlichste Maßnahme zur Linderung der Krankheitserscheinung. Der Urlaub ist entsprechend zu planen. Falls Schübe der atopischen Dermatitis im Frühjahr und Herbst auftreten, ist der Klimawechsel möglichst in diese Zeiten legen. Die Klimatherapie ist mindestens über vier Wochen durchzuführen. Am günstigsten hat sich der Klimawechsel ins Reizgebiet der Nordsee oder in das aeroallergenarme Klima im Hochgebirge über 1500 m bewährt. Allerdings ist nicht sicher vorauszusagen, welcher Klimawechsel für den einzelnen Patienten günstiger ist. Zur Verzögerung des Auftretens der atopischen Dermatitis sollten Säuglinge aus Atopiker-Familien mindestens ein halbes Jahr gestillt werden. Den Müttern selbst ist anzuraten, während der Stillzeit nicht zu rauchen und auf Alkohol sowie Medikamente zu verzichten. Die Beifütterung sollte nicht vor dem 5. bis 6. Monat erfolgen, dann zunächst mit Kartoffeln, Karotten, Bananen, später mit anderem Obst und Gemüse. Eier, Fisch, Zitrusfrüchte sind erst nach Vollendung des 1. Lebensjahres empfehlenswert. Milchfreie, allergenarme Säuglingsnahrung ist die beste Vorsorge, um ein erblich belastetes Kind vor dem Ausbruch der atopischen Dermatitis zu bewahren. Von vielen Ärzten wird geraten, grundsätzlich auf Kuhmilch zu verzichten und nur allergenarme Säuglingsnahrung zu füttern. Als Milchersatz wird in den letzten Jahren vielfach eiweißhaltige Soja-Milch eingesetzt. Allerdings kann einseitige Sojaernährung bei Säuglingen und Kleinkindern zu Mangelerscheinungen führen. Beobachtet wurden schon Kropfbildung in Folge Jodmangels, Knochenentkalkung, Rachitis, ferner Eisen-, Vitamin- und Eiweißmangel.

### 1.4.3 Phototherapie der atopischen Dermatitis

#### 1.4.3.1 Einführung

In den letzten Jahren gewinnt die UV-Therapie der atopischen Dermatitis einen zunehmend wachsenden Stellenwert in Hinblick auf innovative Therapiemodalitäten in der Behandlung des akuten atopischen Ekzems. In Klinik und Praxis werden viele Patienten mit mittelschwerer und schwerer atopischen Dermatitis meistens additiv, zunehmend jedoch auch monotherapeutisch mit UV-Strahlung behandelt. Der Einsatz der UV-Therapie mit künstlichen Strahlenquellen basiert auf der Beobachtung, dass bei einer großen Anzahl der Patienten eine oftmals starke Verbesserung des Hautzustands in den Sommermonaten erreichbar ist. Hierbei stehen der modernen Phototherapie mehrere Ansatzmöglichkeiten zur Verfügung.

#### 1.4.3.2 UVA1-Phototherapie

Bereits 1985 wurde über erste gute Behandlungsergebnisse der konventionellen UVA1-Bestrahlung bei atopischer Dermatitis berichtet [10]. Anhand der Einteilung der UV-Strahlen in verschiedene Bereiche durch Coblenz von 1932 bezeichnet man den Bereich der Wellenlängen von 315-400 nm als UVA-Strahlung. Auf Grund unterschiedlicher epidermaler Pigmentierungsreaktionen lässt sich dieser Bereich noch weiter in einen UVA1- und UVA2-Anteil unterteilen. Der UVA1-Anteil umfasst hierbei den Bereich zwischen 340 und 400 nm. Der Begriff der UVA1-Kaltlichttherapie wurde bereits schon 1992 in einer ersten Publikation und damit in die Therapie der akut exazerbierten, schweren atopischen Dermatitis eingeführt [97]. Sie zeichnet sich durch eine schonende, nahezu vollständigen Wärmeelimination aus. In den Folgejahren gliederte sich diese Therapiemodalität zusätzlich in drei wesentliche Untergruppen mit unterschiedlichen Dosierungsschemata auf. Ebenfalls im Jahre 1992 wurde über die Hochdosis-UVA1-Therapie (90-130 J/cm<sup>2</sup> Einzeldosis) als erfolgversprechende Behandlungsmethode berichtet [80]. Seitdem wird bis heute die hochdosierte UVA1-Therapie unter Verwendung von Einzeldosen von bis zu 130 J/cm<sup>2</sup> mit Erfolg appliziert. Dennoch ist diese Dosis in Hinsicht auf die Risiko/Nutzen-Ratio nicht unumstritten. Im selben Jahr wurde nahezu zeitgleich die Therapie der exazerbierten atopischen Dermatitis mit Hilfe der Medium-

dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie (20-90 J/cm<sup>2</sup> Einzeldosis) publiziert [97]. Auch bei dieser Therapieform stellten sich sehr positive Ergebnisse ein und es ist heute eine der meist publizierten UV-Behandlungsmethoden der atopischen Dermatitis. Dennoch ist der den positiven klinischen Resultaten zugrunde liegende immunmodulatorische Wirkmechanismus bisher kaum näher untersucht worden. Daneben konnten sich Studien über den Nutzen der niedrigdosierten UVA1-Therapie mit Einzeldosen unter 20 J/cm<sup>2</sup> auf Grund des schwachen Behandlungserfolges längerfristig nicht durchsetzen [76]. Kürzlich wurde eine weitergehende Einteilung des UVA1-Regimes dahingehend getroffen, dass die hochdosierte UVA1-Phototherapie mit einer kumulativen Dosis von maximal 1840 J/cm<sup>2</sup>, die Medium-dose-UVA1-Phototherapie mit einer Gesamtdosis von bis zu 975 J/cm<sup>2</sup> und die niedrigdosierte UVA1-Behandlung mit einer Kumulativdosis von höchstens 300 J/cm<sup>2</sup> einher geht [35].

#### 1.4.3.3 Alternative phototherapeutische Behandlungsstrategien

Während die UVB-Therapie mit Wellenlängen von 280-315 nm beim chronisch lichenifizierten atopischen Ekzem Anwendung findet und gute Resultate erzielen kann, wird bezüglich der akuten exazerbierten Verlaufsform häufig eine UVB-Intoleranz beobachtet und fällt somit als Therapiemöglichkeit weitestgehend aus [34]. Im Gegensatz zu den positiven Ergebnissen der Kombination von 8-Methoxypsoralen mit UVA-Bestrahlung (PUVA-Therapie) in der Behandlung der Psoriasis erscheint diese Maßnahme bei der atopischen Dermatitis ebenfalls keine ausreichende Wirkung zu entwickeln. Zum Erreichen einer signifikanten Verbesserung des Hautzustands ist die doppelte Anzahl an Sitzungen erforderlich und insbesondere muss nach Beendigung des Behandlungszyklus mit einem Rebound-Phänomen gerechnet werden [10].

Auch die kombinierte UVA/UVB-Therapie konnte in neueren Studien den neuen Behandlungsverfahren, wie der UVA-Phototherapie, nicht standhalten. Diesbezüglich konnte die UVA-Bestrahlung (315-400 nm) als die wirksamere Komponente identifiziert werden und findet seitdem breite Anwendung.

Zu den unterschiedlichen Stadien der in der Evaluation befindlichen Behandlungsstrategien zählen darüber hinaus zum Beispiel der Einsatz systemischer Immunsuppressiva oder auch die extrakorporale Photochemotherapie (Photopherese) des atopischen Ekzems [52].

#### 1.4.3.4 Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Das Patientenkollektiv dieser Studie, 15 Patienten mit der Diagnose der schweren atopischen Dermatitis, wurde mit UVA1-Kaltlichttherapie als Monotherapie behandelt. Die verwendete Medium-dose-UVA1-Kaltlichttherapie wurde mit einer Dosis von  $50 \text{ J/cm}^2$  verabreicht und liegt somit im Bereich der sich mit Dosen zwischen  $20$  und  $90 \text{ J/cm}^2$  befindlichen Medium-dose-UVA1-Therapie. Mittels spezieller Filter- und Kühlsystemen wird die entstehende Wärmestrahlung zurückgehalten und berücksichtigt damit, dass Patienten mit atopischer Dermatitis oft den eigenen Schweiß schlecht vertragen und sich das klinische Bild hierdurch weniger effektiv bessern könnte. Die UVA1-Phototherapie – zunehmend auch speziell die UVA1-Kaltlichttherapie – ist nunmehr zu einer äußerst erfolgreichen Therapiemöglichkeit gewachsen. Sie wird nun nicht länger nur wenigen Universitätshautkliniken vorbehalten sein, sondern findet darüber hinaus auch im Praxisbereich Anwendung.

Ogleich in den letzten Jahren eine Vielzahl klinischer Studien über die Wirksamkeit der Medium-dose-UVA1-Phototherapie verfasst wurden, konnte bisweilen noch kein immunhistologisches Korrelat der therapiebedingten Verbesserung des Hautzustands identifiziert werden. Die Induktion apoptotischer Vorgänge scheint ein möglicher Wirkmechanismus der UVA1-Strahlung in der menschlichen Haut zu sein [69]. Der Begriff der Apoptose beschreibt hierbei den Vorgang des programmierten Zelltods. In der Regulation der Apoptose erlangen diesbezüglich besonders die Proteine p53 und bcl-2 eine entscheidende Bedeutung, da sie direkten Einfluss auf die Induktion beziehungsweise Inhibition apoptotischer Kaskaden ausüben können [127, 138, 141]. Schließlich fungiert das sogenannte in situ nick end labeling (ISEL) als eine mögliche Nachweismethodik des abgelaufenen, programmierten Zelltods mittels Detektierung apoptotisch fragmentierter DNA. Somit ist ein immunmodulierender Effekt der Medium-dose-UVA1-Phototherapie in Hinblick auf eine Reduktion des mononukleären Infiltrats verbunden mit einer Durchbrechung der Circuli vitiosi der komplexen Immunpathogenese der atopischen Dermatitis denkbar. Diesbezüglich konnten in ersten Studien Alterationen der Präsenz von vornehmlich Mastzellen und Langerhanszellen sowie Verschiebungen der IL-4/IFN- $\gamma$ -Relation als möglicher Ansatzpunkt der Hochdosis-UVA1-Phototherapie detektiert werden [43, 44]. Gleichzeitig konnten kürzlich Veränderungen des löslichen IL-4R unter der Medium-dose-UVA1-Phototherapie im Sinne einer posttherapeutisch signifikanten Minderung dargestellt werden [71]. Somit lässt sich auf eine eventuellen Einflussnahme

der Medium-dose-UVA1-Phototherapie auf die Th2-Lymphozyten spekulieren. Dennoch konnte auch hier bislang kein differenzierter Wirkmechanismus evaluiert werden.

## **1.5 Aktuelle Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Studie war der immunhistologische Nachweis des Wirkmechanismus der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie der schweren atopischen Dermatitis *in vivo*.

Die Medium-dose-UVA1-Phototherapie als eine Therapiemodalität mit hervorragenden klinischen Resultaten sowie mit überwiegend positiver Reputation gewinnt in der Behandlung der atopischen Dermatitis zunehmend an Bedeutung. Die immunhistochemischen Färbetechniken zur Visualisierung der Immunmodulation anhand von vor und nach Behandlung entnommener Hautbiopsien umfassen eine Vielzahl der für die Immunpathogenese relevanten Zellpopulationen, darunter die T-Lymphozyten im Gesamten (CD3<sup>+</sup>), die T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>), die T-Suppressorzellen (CD8<sup>+</sup>), die aktivierten Eosinophilen (EG2<sup>+</sup>), die Langerhanszellen (CD1a<sup>+</sup>) sowie Mastzellen (Tryptase<sup>+</sup>). Darüber hinaus befasst sich die vorliegende Arbeit mit dem Aktivierungszustand des dermalen Entzündungsinfiltrats mittels Bestimmung der Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen, HLA-DR<sup>+</sup>- und MIB-1<sup>+</sup>-Zellen sowie mit der Bedeutung apoptotischer Zellvorgänge für den Wirkmechanismus der UVA1-Phototherapie mit Hilfe der Detektierung von ISEL<sup>+</sup>-, p53<sup>+</sup>- und bcl-2<sup>+</sup>-Zellen. Es galt die Hypothesen zu prüfen, ob es im Zuge der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie zu einer Verminderung des prozentualen Anteils bcl-2<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD1a<sup>+</sup>-, Kathepsin-G<sup>+</sup>-, EG2<sup>+</sup>-, Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-, HLA-DR<sup>+</sup>- und MIB-1<sup>+</sup>-Zellen sowie zu einem Anstieg des prozentualen Anteils ISEL<sup>+</sup>-, p53<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat läsionaler Haut von Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis kommt.

Unter Verwendung der speziellen Immunhistochemie sollte demnach der modulierende Effekt der UVA1-Phototherapie auf Zellpopulationen, Aktivierungszustand der Zellen sowie auf die Induktion des programmierten Zelltods untersucht, näher präzisiert und als mögliches histomorphologisches Korrelat mit dem positiven klinischen Behandlungserfolg in Beziehung gesetzt werden.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Klassische Einteilung der atopischen Dermatitis

In der Literatur finden sich zur Charakterisierung der Aktivität der atopischen Dermatitis oftmals unterschiedliche Angaben über die Art der Charakterisierungskriterien. Zweckmäßig scheint eine differenzierte, jedoch nicht übermäßig detaillierte Einteilung zu sein, die eine Gliederung in leichte, mäßige und schwere atopische Dermatitis erlaubt. Als Parameter wird hier auf die Ausdehnung, den Verlauf und die Intensität zurückgegriffen (Tabellen 6-8) [109].

Tabelle 6: Einteilung der atopischen Dermatitis auf Grund des Schweregrads

Ausdehnung:	Punkte:
(a) Kinder und Adoleszenten	
Weniger als ca. 9% des Körpers	1
Ausdehnung innerhalb der Grenzen der Punktzahlen von 1 und 3	2
Mehr als ca. 36% des Körpers	3
(b) Säuglinge	
Weniger als ca. 18%	1
Ausdehnung innerhalb der Grenzen der Punktzahlen von 1 und 3	2
Mehr als ca. 54% des Körpers	3
Intensität:	
Leichter Juckreiz, nur in Ausnahmefällen den nächtlichen Schlaf störend	1
Juckreiz innerhalb der Grenzen der Punktzahlen von 1 und 3	2
Schwerer Juckreiz, üblicherweise den nächtlichen Schlaf störend	3
Verlauf:	
Mehr als drei Monate der Remission innerhalb eines Jahres	1
Weniger als drei Monate der Remission innerhalb eines Jahres	2
Kontinuierlicher Verlauf	3

Tabelle 7: „9er Regel“

Region	Prozent
Kopf	9
Obere Extremität	9
Körper, Vorderseite	18
Körper, Hinterseite	18
Untere Extremität	18
Genitalien	1

Tabelle 8: Summierung

(in Grenzfällen werden auch 1,5 oder 2,5 Punkte vergeben)

Erreichte Punktzahl:	Schweregrad:
3-4	Leicht
4,5-7,5	Mäßig
8-9	Schwer

Mit Hilfe dieser simplifizierten Klassifikation können durch Summierung der ausgewählten Parameter Abstufungen im Schweregrad getroffen werden, die eine verständliche Kategorisierung im Sinne der klinischen Arbeit gewährleisten. In Hinblick auf die Intensität wurde der Juckreiz als ein grundlegendes Leiden der Patienten in den Vordergrund gestellt, welcher erfahrungsgemäß den Gesamtzustand angemessen repräsentiert und sich daher als gemeinsamer Parameter besonders gut eignet.

## 2.2 SCORAD-Index

Zusätzlich zu dieser Form der Einteilung wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nach dem in den letzten Jahren erstellten und bereits bewährten scoring atopic dermatitis- (SCORAD-) Index kategorisiert [37]. Der SCORAD-Index befasst sich mit der Ausdehnung, der Intensität und den subjektiven Symptomen, wobei der jeweilige Einfluss, wie in Tabelle 9 dargestellt, verteilt ist.

Tabelle 9: Relative Gewichtung klinischer Kriterien

Kriterium:	Gewichtung in %:
Ausdehnung	19,4
Kopf	9
Obere Extremität	9
Körpervorderseite	18
Körperhinterseite	18
Untere Extremität	18
Genitalien	1
Intensität	61,2
Erythem	16,6
Ödem / Papulation	16,6
Exsudation / Krusten	16,6
Exkoration	16,6
Lichenifikation	16,6
Trockenheit	16,6
Subjektive Symptome	19,4
Pruritus	50
Schlaflosigkeit	50

Zur prozentualen Errechnung der Ausdehnung über die Körperoberfläche wird auch hier auf die 9er-Regel zurückgegriffen, wobei nur die entzündlichen Hautabschnitte in die Bewertung einbezogen werden, die Trockenheit der Haut bleibt unberücksichtigt.

In die Definition der Intensität fallen sechs Untergruppen, die mit jeweils 16,6% der Gesamtintensität bewertet werden. Hierzu gehören Erythema, Ödeme/Papulationen, Exsudationen/Krusten, Exkorationen, Lichenifikationen und Trockenheit. Jedes dieser Merkmale wird mit Punktzahlen von null bis drei eingestuft, wobei null gleichbedeutend mit dem Fehlen dieses Symptoms ist, die Zahlen eins bis drei beschreiben leichte, mäßige und schwere Erscheinungsformen. Die Einteilung erfolgt unter Verwendung ganzrationaler Zahlen und bezieht sich auf normiertes Bildmaterial, welches in Form von Atlanten durch die European Task Force on Atopic Dermatitis als Maßstab veröffentlicht wurde. Für die jeweilige Beurteilung wird eine repräsentative Region gewählt; die am stärksten betroffene

Stelle ist auszuschließen. Die Trockenheit wird an einem Hautabschnitt bestimmt, der weder in eine akute noch in eine lichenifizierte Läsion involviert ist.

Die subjektiven Symptome umfassen den Juckreiz und die eventuelle Schlaflosigkeit. Die betroffenen Patienten bestimmen hierbei auf einer zehnstelligen Skala ihr durchschnittliches Befinden bezüglich des jeweiligen Symptoms während der letzten drei Tage beziehungsweise Nächte.

Im Anschluss an diese Bewertungen wird die Gesamtpunktzahl berechnet, der folgende Formel zugrunde liegt.

$$SCORAD = \text{Ausdehnung} / 5 + 3,5 * \text{Intensität} + \text{subjektive Symptome}$$

Die nunmehr zu erreichende Gesamtpunktzahl liegt im Bereich zwischen null und 103.

## **2.3 Patienten**

### **2.3.1 Patientenkollektiv**

Das Patientenkollektiv umfasste 15 Patienten mit der Diagnose der schweren atopischen Dermatitis entsprechend den diagnostischen Kriterien von Hanifin und Rajka [48]. Als Maßstab zur Evaluierung des Krankheitsgrades sowie zur Klassifizierung des Schweregrades diente der SCORAD-Score. Der Schweregrad der Hauterscheinungen – inklusive Juckreiz und Schlafstörungen – wurde bei der Eingangsuntersuchung sowie nach der fünften, zehnten und 15. Behandlungssitzung evaluiert. Weitere zwei Wochen nach Therapieende wurde eine Anzahl der Patienten nochmals untersucht, um die Persistenz des Behandlungserfolges zu bestimmen. Als schwere atopische Dermatitis wurde demzufolge ein initialer cut-off SCORAD-Score von mehr als 45 bezeichnet und die Patientengruppe diesbezüglich limitiert. Das Patientenkollektiv setzte sich bezüglich der Geschlechterverteilung aus sieben Frauen und acht Männern zusammen. Das Durchschnittsalter lag bei 47 Jahren, mit einer unteren Altersgrenze von 19 Jahren und dem Höchstalter von 64 Jahren. Zehn der Patienten gehörten dem Hauttyp II und fünf Patienten dem Hauttyp III an. Der mittlere initiale SCORAD-Score betrug 74 (Median) mit einer Spannweite von 89-51. Durchschnittlich persistierte die Erkrankung bereits seit 27

Jahren, davon litten sieben Patienten unter einem stetigen Befall, acht Patienten erlebten einen eher schubweisen Verlauf.

### **2.3.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Aufgenommen in die Studie wurden Männer und Frauen, welche mindestens das 18. Lebensjahr vollendet hatten und seit mindestens drei Jahren an einer schweren atopischen Dermatitis litten. Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft und Stillzeit, Autoimmundermatosen mit bekannter Photosensitivität, polymorphe Lichtdermatosen, schwere Allgemeinerkrankungen, Einnahme lichtsensibilisierender Substanzen, UVA1-sensitives atopisches Ekzem, malignes Melanom und akute virale oder bakterielle Superinfektionen. Patienten, die in den letzten vier Wochen vor Therapiebeginn kortikoidhaltige Interna eingenommen hatten oder in den letzten zwei Wochen Antihistaminika oder kortikoidhaltige Externa verabreicht bekommen oder sich in den letzten neun Wochen einer Phototherapie unterzogen hatten, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Extern wurde allen Patienten dieselbe blande Therapie mit Urea pura 3% in Unguentum leniens verordnet.

Als Abbruchkriterien dienten das spätere Vorliegen eines Ausschlusskriteriums, die fehlende Beachtung des Studienprotokolls durch den Patienten, eine Befundverschlechterung um mehr als 10% des initialen SCORAD-Scores sowie der Wunsch des Patienten.

### **2.3.3 Lichttreppe**

Um pathologische Reaktionen wie phototoxische oder photoallergische Reaktionen, chronische aktinische Dermatitis oder andere lichtaggravierbare Dermatosen auszuschließen, wurde vor Bestrahlungsbeginn eine Phototestung durchgeführt. Die Testfeldbestrahlung erfolgte an nicht chronisch-lichtexponierten Hautarealen der Glutealregion mit Hilfe des Saalman Multitesters (Saalman, Herford, Deutschland) mit jeweils fünf Testfeldern für UVA- beziehungsweise UVB-Bestrahlung. Es wurden abhängig vom Hauttyp Dosen von  $18 \text{ J/cm}^2$  bis  $36 \text{ J/cm}^2$  UVA-Strahlung sowie  $0,010 \text{ J/cm}^2$  bis  $0,048 \text{ J/cm}^2$  UVB-Strahlung appliziert. Die Ablesung erfolgte nach 24

Stunden. Patienten mit einer persistierenden Lichtreaktion beziehungsweise Erythem im UVA-Bereich nach mehr als 24 Stunden wurden von den weiteren phototherapeutischen Maßnahmen ausgeschlossen.

### 2.3.4 Behandlungsmethodik

Die Behandlung erfolgte mittels Medium-dose-UVA1-Kaltlichttherapie (Abbildung 2). Die Patienten wurden hierbei fünfmal pro Woche über einen Zeitraum von drei Wochen mit UVA1-Strahlung therapiert, die UVA1-Bestrahlungen erfolgten demnach – mit Unterbrechungen durch die Wochenenden – jeden Tag. Die tägliche Einzeldosis belief sich auf einen Wert von  $50 \text{ J/cm}^2$ . In summa wurde jeder Patient einer kumulativen Gesamtdosis von  $750 \text{ J/cm}^2$  ausgesetzt.

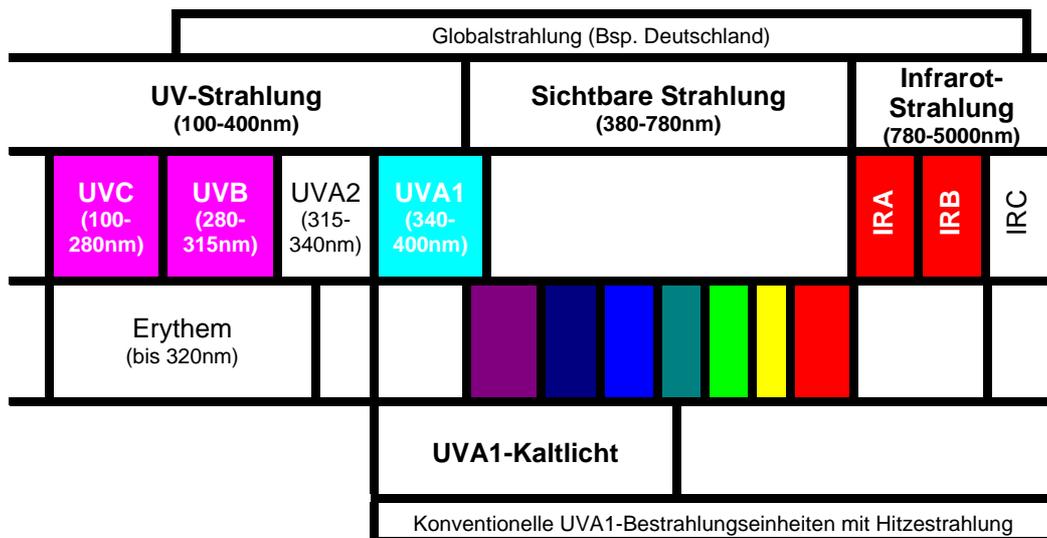


Abbildung 2: Wellenlängenbereiche und aktuelle therapeutische Nutzung

Als Bestrahlungsquelle diente die UVA1-Kaltlichteinheit CL300.000 liquid (Photomed, Wennigsen, Deutschland). Dieses Gerät ist mit vier Hochleistungslampen à 4000 Watt Nennleistung bestückt und emittiert UVA1-Strahlung im Bereich von 340-500 nm. Die im Gegensatz zu UVA- und herkömmlichen UVA1-Geräten älteren Baujahrs auftretende Streustrahlung mit Wellenlängen über 500 nm wird bei diesem Gerät zu nahezu 100% durch ein spezielles Filter- und Kühlsystem eliminiert (Abbildung 3). Somit wird der Infrarotanteil und damit auch die Wärmeabgabe der Bestrahlungsröhren deutlich reduziert.

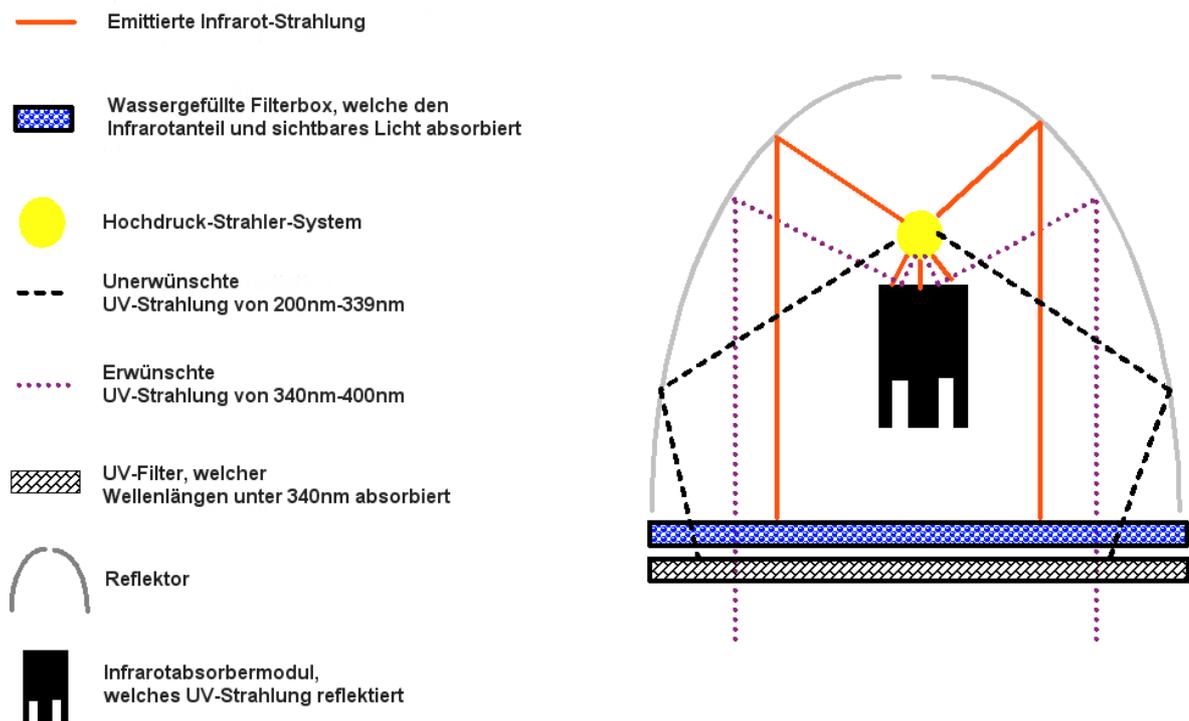


Abbildung 3: Mechanismus der Strahlungslimitierung und Wärmereduktion der UVA1-Kaltlichtbestrahlungseinheit

Die Intensität wurde mit Hilfe eines kalibrierten UV-Meters MP-136U (Photomed, Wennigsen, Deutschland) bestimmt und basierend hierauf die Zeit zum Erreichen der erforderlichen Bestrahlungsdauer berechnet. Die mittlere Leistung dieses Gerätes beträgt bei einem Bestralungsabstand von 75 cm  $32 \text{ mW/cm}^2$ . Die applizierbare UVA1-Dosis liegt demnach bei  $1,9 \text{ J/cm}^2/\text{min}$ . Somit entspricht eine 26-minütige Bestrahlungsdauer einer Dosis von etwa  $50 \text{ J/cm}^2$ .

## 2.4 Technik der Probenentnahme

Nach eingehender Aufklärung und freiwilliger Zustimmung der Patienten erfolgte die Probenentnahme bei jedem Patienten jeweils vor und nach der UVA1-Kaltlichttherapie. Als Entnahmestelle diente die rechte Schulterregion. Im unbehandelten Zustand, das heißt vor Therapiebeginn, wurde eine Stanzbiopsie aus einem läsionalen Abschnitt entnommen. Nach ausreichender Desinfektion der betreffenden Hautregion sowie des nahen Umgebungsbereichs mit einer antiseptischen Flüssigkeit sowie nach anschließendem

sterilen Abdecken des Operationsgebiets erfolgte die intrakutane Gabe eines Milliliters eines Lokalanästhetikums (Scandicain 1%). Etwa fünf Minuten nach Applikation des Anästhetikums wurde eine Stanzbiopsie mittels einer 3 mm-Stanze entnommen und, wie unten beschrieben, weiter behandelt. Einer manuellen Blutstillung folgend wurde die Wunde mit Hilfe einer Kutannaht versorgt und schließlich mit einem Pflasterverband abgedeckt.

Eine Stunde nach der 15. Bestrahlungssitzung erfolgte die zweite Entnahme aus einer weitgehend abgeheilten ehemals entzündeten Region. Als Entnahmeort fungierte ebenfalls die rechte Schulterregion. Ein Abstand zur vorausgehenden Biopsielokalisation von mindestens 4 cm wurde zur Verhinderung einer Interferenz des histologischen Zellbildes infolge der ersten Stanzbiopsie eingehalten. Der Höchstabstand betrug 10 cm.

## **2.5 Immunhistochemische Nachweismethodik**

Direkt im Anschluss an die Entnahme der Stanzbiopsien wurden diese in ein Gefäß mit 5% Formaldehyd für die Dauer von zwei Stunden bei Raumtemperatur gebracht. Die Einbettung der fixierten Präparate erfolgte mit Hilfe eines Vakuum-Infiltrations-Prozessors (Bayer, Leverkusen, Deutschland). Zunächst wurden die Präparate erneut für vier Stunden bei 40°C in 10% neutral gepuffertem Formalin fixiert. Anschließend wurde bei 40°C eine aufsteigende Alkoholreihe mit folgenden Stationen durchlaufen, in denen die Präparate jeweils eine Stunde verblieben.

1. 50% Alkohol
2. 70% Alkohol
3. 70% Alkohol
4. 96% Alkohol
5. 96% Alkohol
6. 99% Alkohol
7. 99% Alkohol
8. Xylol II
9. Xylol I

Abschließend wurden die Präparate viermalig für jeweils eine Stunde bei 60°C in Paraffin eingebettet.

Die in Paraffin gebetteten Präparate wurden in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger gebracht (SuperFrost Plus, Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland). Die Objektträger für die Färbungen bcl-2, p53, CD3, CD4, CD8 und MIB-1 wurden für den Kochvorgang in der Mikrowelle zusätzlich mit Poly-L-Lysin beschichtet. Für die ISEL-Färbung wurden silanisierte Objektträger verwendet (BioGenex, San Ramon, USA).

Die Färbung begann mit der Entparaffinierung im Brutschrank bei 60°C für mindestens 60 Minuten. Es folgte das Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe in Gefäßen mit folgendem Inhalt, in denen sie jeweils fünf Minuten verblieben.

1. Xylol I
2. Xylol II
3. Xylol III
4. Isopropanol I
5. Isopropanol II
6. EtOH 96%
7. EtOH 80%
8. EtOH 70%

Nach einem 5-minütigen Waschvorgang mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte entsprechend ihrer weiteren Färbevorschriften vorbereitet:

- bcl-2, p53, CD3, CD4, CD8, MIB-1

Bei diesen speziellen immunhistochemischen Nachweismethoden musste dem eigentlichen Färbvorgang ein Kochzyklus vorgeschaltet werden. Hierfür wurden die Gewebeschnitte in ein Waschbad mit einer speziellen Pufferlösung zur Mikrowellenbehandlung gebracht (ProTaq IV, Quartett, Berlin, Deutschland). Der Kochvorgang erfolgte in einer 3-Schritt-Technik mit zweimaligem Kochen für sechs Minuten bei 600 Watt sowie einmaligen Kochen für fünf Minuten bei 180 Watt in der Mikrowelle. Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte der Färbvorgang mit Hilfe eines Färbeautomats für Immunhistochemie (Nexes, Ventana, Tuscon, USA).

- Antihumane-Mastzell-Tryptase, HLA-DR

Im Falle der immunhistochemischen Detektierung der Mastzellen musste der ABC-Technik ein Protease-Verdau vorausgehen. Nach Erwärmung auf 41°C,

Waschvorgang, Erwärmung auf 37°C und zwei weiteren Waschvorgängen wurden die Gewebeschnitte enzymatisch mit Hilfe der Protease I für vier Minuten vorbehandelt. Die folgenden Schritte wurden gemäß der unten genannten Technik durchgeführt.

- CD1a, Kathepsin G, EG2

Hierfür wurden keine zusätzlichen Vorbehandlungsmethoden benötigt.

Die Immunhistochemie wird schon seit 1950 genutzt, um spezifische Antigene in Zellen oder im Gewebe zu detektieren. In den letzten Jahren hat besonders die alkalische Phosphatase als Reporterenzym im sogenannten Alkaline Phosphatase Fast Red Detection Kit an Bedeutung gewonnen. Als Nachweismethode für die Immunhistochemie dient das ultraschnelle ABC-Nachweissystem. Es basiert auf der hochempfindlichen Streptavidin-Biotin-Methode. Der biotinylierte Sekundärantikörper ist multivalent und eignet sich zum Nachweis von Primärantikörpern der Maus. Als Enzym steht die alkalische Phosphatase zur Verfügung, als Substrat dient Fast Red. Das System besteht demnach grob aus drei Inkubationsschritten, dem sekundären multivalenten Antikörper, dem Streptavidin-Enzym-Komplex und dem Chromogen-Substrat. Im einzelnen werden die folgenden Einzelschritte durchlaufen:

Die Schnitte werden in einem auf 41°C erwärmten Waschpuffer gewaschen. Nach zwei weiteren Waschvorgängen bei 37°C wird der Primärantikörper in spezieller Verdünnung hinzu gegeben und über einen vorgegebenen Zeitraum inkubiert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Inkubationszeiten und Verdünnungen der Immunhistochemie

Antikörper	Inkubationszeit	Verdünnungen
bcl-2	32 min	1:5
p53	32 min	1:10
CD3	32 min	1:15
CD4	32 min	1:10
CD8	32 min	1:10
CD1a	32 min	1:15
Kathepsin	30 min	1:450
EG2	32 min	1:300
Antihumane-Mastzell-Tryptase	28 min	1:400
HLA-DR	32min	1:40
MIB-1	32 min	1:10

Einem Waschvorgang folgend wird der biotinylierte Sekundärantikörper zugeführt, für acht Minuten inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Als zweiter Inkubationsschritt wird der Streptavidin-Biotin-Komplex mit der alkalischen Phosphatase zugefügt und für weitere zwölf Minuten inkubiert. Nach einem Waschvorgang, Zugabe und Inkubation eines Enhancers über vier Minuten erfolgt die Applikation des Chromogen-Substrats Fast Red A sowie von Naphtol. Das Reagenziengemisch wird für einen Zeitraum von acht Minuten inkubiert. Danach wird Fast Red B zugesetzt und weitere acht Minuten inkubiert. Dem späteren Waschvorgang folgend wird die Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt, sechs Minuten inkubiert sowie Bluing Reagent beigegeben und erneut für sechs Minuten inkubiert. Abschließend durchlaufen die Gewebsschnitte wiederholt die aufsteigende Alkoholreihe und werden schließlich mit Vitro-Clud (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

Für die verschiedenen Färbereien wurden jeweils konsekutive Schnitte verwendet, um eine Zuordnung der verschiedenen positiv gefärbten Zellpopulationen zu gewährleisten.

- ISEL

Die ISEL-Färbung wurde unter Anlehnung an die weitverbreitete terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling- (TUNEL-) Methode durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Vorinkubation in 2x SSC (0,3 mmol/l NaCl, 30 mmol/l Trisodium-Acetat, pH7) bei einer Temperatur von 65°C und einer anschließenden Abkühlungsphase wurde ein Pepsinverdau mit 0,5% Pepsin (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 0,01 mol/l HCl über einen Zeitraum von sieben Minuten bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Einem 5-minütigen Waschvorgang in phosphate buffered saline (PBS) folgend erfolgte die Präinkubation in terminal desoxynucleotidyl transferase- (tdT)-Puffer (30 mmol/l TrisHCl, 140 mmol sodium cacodylate, 1 mmol  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , pH7,3) über fünf Minuten. Anschließend wurde ein Reaktionsmix bestehend aus 4 nmol fluorescein isothiocyanate- (FITC-) dUTP und 25 U tdT in 200 µl tdT-Puffer (Amersham, Braunschweig, Deutschland) auf die Präparate gebracht und über 10 Stunden bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion durch die Überführung der Präparate in 2x SSC über 15 Minuten beendet, die Objektträger in deionisiertem Wasser gespült und mit Mowiol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) eingedeckt.

Zur Positivkontrolle wurde im Anschluss an den Pepsinverdau zusätzlich ein DNase-Verdau mit Hilfe der bovinen Pankreas-DNase I über zehn Minuten zwischengeschaltet.

Um unspezifische FITC-dATP-Bindungen und Autofluoreszenzen festzustellen, wurden ebenfalls Negativkontrollen mit fehlender tdT im Reaktionsmix angefertigt.

## **2.6 Antikörper**

### **2.6.1 bcl-2**

Der bcl-2-Antikörper (Dako, Hamburg, Deutschland) reagiert mit dem bcl-2-Protein. Das bcl-2-Protein ist ein Proto-Onkogen am Chromosom 18q21. Als integrales Membranprotein, das mit der Mitochondrienmembran, dem glatten endoplasmatischen Retikulum und der Kernmembran assoziiert ist, fungiert es als wichtiger Apoptose-Inhibitor. Der Antikörper detektiert im gesunden, nicht-hämatopoietischen Gewebe vorwiegend infiltrierte Leukozyten.

### **2.6.2 p53**

Der p53-Antikörper (Dako, Hamburg, Deutschland) erkennt ein Epitop am N-terminalen Ende des humanen p53-Proteins. Während in der normalen Zelle die p53-Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze liegt, kann im Falle des programmierten Zelltods eine erhöhte Konzentration festgestellt werden. Die Reaktion des Antikörpers umfasst sowohl den Wildtyp als auch die mutierte Form des p53-Proteins.

### **2.6.3 CD3**

Das CD3-Antigen besteht aus fünf Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht (MW) von 16-28 kDa. Der Antikörper (Dako, Hamburg, Deutschland) reagiert mit der intrazellulären zytoplasmatischen Domäne des CD3-Antigenrezeptor-Komplexes. Epitop

des Antikörpers ist die nicht-glykosylierte Epsilon-Kette des Proteins. Die Detektierung des Komplexes ist hochspezifisch für T-Lymphozyten und eines der frühesten Zeichen auf eine Beteiligung des T-Zellsystems.

#### **2.6.4 CD4**

CD4 ist ein integrales monomeres Glykoprotein (MW 59 kD), welches als Korezeptor der T-Helferzellen dient. Die vier extrazellulären Domänen, die an der Zell-Zell-Wechselwirkung mit MHC-Klasse-II-exprimierenden Zellen beteiligt sind, weisen eine Immunglobulin-ähnliche Struktur auf. Der CD4-Antikörper (Loxo, Dossenheim, Deutschland) erkennt spezifisch das humane CD4-Antigen und eignet sich daher für den Nachweis von T-Helferzellen im Gewebe.

#### **2.6.5 CD8**

CD8 ist ein dimeres transmembranöses Glykoprotein (MW 32 kD). Es dient als Korezeptor der Antigen-Erkennung mit Kompatibilität zum MHC-Klasse-I-Protein. Infolge einer Aktivierung kommt es zur Bildung von p56lck am zytoplasmatischen Terminus und zur Initiation der T-Zell-Signalübertragung mit anschließender Zellreaktion. Der Anti-CD8-Antikörper (Dako, Hamburg, Deutschland) dient dem Nachweis von T-Suppressor/zytotoxischen T-Zellen.

#### **2.6.6 CD1a**

Der Antikörper CD1a (Immunotech, Marseille, Frankreich) reagiert mit einem nicht-polymorphen MHC-Klasse-I-assoziierten Zelloberflächenantigen. Der Antikörper ist in der Lage, kortikale Thymozyten, Langerhanszellen sowie interdigitierende Retikulumzellen zu detektieren und eignet sich daher zum Nachweis von Langerhanszellen in der Haut.

### **2.6.7 Kathepsin G**

Der Kathepsin-G-Antikörper (Dako, Hamburg, Deutschland) erkennt eine Gruppe von proteolytischen Enzymen, die normalerweise in den meisten Zellen und Geweben vorkommen. Kathepsin G ist in der Familie dieser Proteasen als Serin-Protease katalogisiert. Im Falle der Aktivierung und Sezernierung katalysiert das Kathepsin G in entzündlichen Prozessen die hydrolytische Spaltung von Serinbindungen des Laminins, der Proteoglykane, unlöslicher Fibronectine und Kollagen der extrazellulären Matrix. Kathepsin G repräsentiert ein Triplet von Isoenzymen (MW 28, 29 und 31,5 kDa). Das höchste Level der Kathepsin-G-Expression wurde bei Promyelozyten festgestellt. Im normalen Gewebe wird darüber hinaus eine positive Reaktion hinsichtlich neutrophiler Granulozyten sowie einiger mononukleärer Phagozyten konstatiert.

### **2.6.8 EG2**

Der EG2-Antikörper (Pharmacia, Uppsala, Schweden) erkennt spezifisch ECP- und EPX/EDN-produzierende Eosinophile und erlaubt demnach die Detektierung der aktivierten eosinophilen Granulozyten, da diese nach ihrer Stimulation neben MBP und EPO ebenfalls die zytotoxischen Proteasen ECP sowie EPX/EDN sezernieren. Der EG2-Antikörper detektiert als Epitop ausschließlich die sezernierte Form des ECP und zeigt zusätzlich eine Kreuzreaktion mit der sezernierten Form der von den Eosinophilen freigesetzten Neurotoxine EPX/EDN.

### **2.6.9 Antihumane-Mastzell-Tryptase**

Der Antikörper Antihumane-Mastzell-Tryptase (Dako, Hamburg, Deutschland) reagiert mit der humanen Mastzell-Tryptase und bindet somit spezifisch an die sekretorischen Granula der Mastzellen. Die Tryptase ist eine tetramere Serin-Protease (MW 132 kDa). Auf Grund der großen freigesetzten Mengen in entzündlichen Erkrankungen scheint dieser Antikörper als sicherer Marker von Mastzellen beziehungsweise eines ihrer Mediatoren auf die Existenz eines entzündlichen Prozesses hinzuweisen.

### **2.6.10 HLA-DR**

Der Antikörper HLA-DR (Dako, Hamburg, Deutschland) detektiert das humane Klasse-II-Histokompatibilitäts-Antigen unter Reaktion mit einem nicht-polymorphen HLA-DR-Epitop. Hiervon sind Monozyten, Makrophagen, aktivierte T-Zellen sowie B-Lymphozyten der Lymphknoten betroffen. Ebenso wird HLA-DR mit Anti-Leu-6 auf den epidermalen Langerhanszellen koexprimiert.

### **2.6.11 MIB-1**

Der Antikörper MIB-1 (Dianova, Hamburg, Deutschland) detektiert das nukleäre proliferationsassoziierte Antigen Ki-67, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Der Antikörper zeigt demnach auf proliferierende Zellen eine ausgeprägte Kernfärbung und gilt somit als wichtiger Proliferations- und Aktivationsmarker im Gewebe.

## **2.7 Auswertung & Statistik**

Zum Zweck der statistischen Auswertung der positiven Zellen in Relation zum gesamten Zellinfiltrat wurden einzelne Zählraster ausgewählt und die positiv angefärbten Zellen ausgezählt sowie die Gesamtzellzahl des Entzündungsinfiltrats bestimmt. In jedem Präparat wurde hierzu eine repräsentative Region mit den typischen morphologischen Kriterien der schweren atopischen Dermatitis gesucht und für das Zählraster eingestellt. Insgesamt wurden pro Präparat drei Zählraster in einer kontinuierlichen Reihe direkt unterhalb der dermoepidermalen Junktion ausgewertet. Die Größe eines Zählrasters betrug 0,25 mm x 0,25 mm. Demnach bestand das Gesamtzählfeld aus einer Länge entlang der dermoepidermalen Junktion von 0,25 mm und einer Tiefe von 0,75 mm. Die die Zählrastergrenze überschreitenden Epidermisanteile wurden von der Gesamtfläche subtrahiert und ihre Zellen nicht in die Auswertung integriert.

Um das Risiko eines Auswertungsfehlers möglichst gering zu halten, wurden die Präparate „blind“ ausgewählt und alle Raster jeweils zweimal ausgezählt. Zudem wurde eine Anzahl von Präparaten zusätzlich von einem zweiten Untersucher begutachtet. Im Falle einer

Abweichung von mehr als 2% zwischen den durchgeführten Auswertungen folgte ein zweiter kompletter Auswertungszyklus.

Zusätzlich zum Zählvorgang wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Verteilung und ihres morphologischen Erscheinungsbildes bewertet.

Im Anschluss an die oben beschriebenen Verfahrenstechniken erfolgte die statistische Auswertung. Die Resultate der Auswertung wurden als positive Zellen pro 100 Zellen pro Zählraster ( $0,0625 \text{ mm}^2$ ) evaluiert. Zudem wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und ebenfalls pro Zählraster angegeben.

Die statistische Evaluation, sämtlich durchgeführt unter Nutzung der Computerprogramme StatsDirect und SPSS for Windows, für die prozentualen Auswertungen der einzelnen dermalen Felder der  $\text{bcl-2}^+$ -,  $\text{p53}^+$ -,  $\text{CD3}^+$ -,  $\text{CD4}^+$ -,  $\text{CD8}^+$ -,  $\text{CD1a}^+$ -,  $\text{Kathepsin-G}^+$ -,  $\text{EG2}^+$ -,  $\text{Antihumane-Mastzell-Tryptase}^+$ - sowie  $\text{HLA-DR}^+$ - und  $\text{MIB-1}^+$ -Zellen wurde mittels deskriptiver Statistik unter Angabe von Mittelwert und Standardabweichung (Stabw), Median und Spannweite der immunpositiven Zellen vor beziehungsweise nach Therapie sowie von Mittelwert und Stabw der Differenzen zwischen prä- und posttherapeutischen Prozentzahlen durchgeführt. Ebenso wurden die Ergebnisse der absoluten Zellzählungen aller Immunmarkierungen mittels selbiger deskriptiver Statistik aufgearbeitet.

Nach explorativer Datenanalyse wurde in Hinblick auf die prozentualen Zellauswertungen der  $\text{bcl-2}^+$ -,  $\text{p53}^+$ -,  $\text{CD3}^+$ -,  $\text{CD4}^+$ -,  $\text{CD8}^+$ -,  $\text{CD1a}^+$ -,  $\text{Kathepsin-G}^+$ -,  $\text{EG2}^+$ -,  $\text{Antihumane-Mastzell-Tryptase}^+$ -,  $\text{HLA-DR}^+$ - sowie  $\text{MIB-1}^+$ -Zellen im Gesamten, das heißt gemessen an allen drei Zählrastern, der parametrische t-Test (Student-Test) für verbundene Stichproben benutzt. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha=5\%$  gewählt. Auf Grund der Verwendung von insgesamt elf Tests ergab sich unter Einbeziehung der Bonferoni-Adjustierung eine Signifikanz bei p-Werten mit  $p < 0,0046$ .

Hinsichtlich der ISEL-Methode erfolgte die Auswertung mittels semiquantitativer Bewertung der positiv markierten Zellen im dermalen Infiltrat. Ebenfalls wurde hierzu in jedem Präparat eine repräsentative Region mit den typischen morphologischen Kriterien der schweren atopischen Dermatitis eingestellt und morphologisch sowie quantitativ bewertet. Die Evaluation des Vorkommens ISEL<sup>+</sup>-Zellen wurde anhand der Einteilung in fehlende, geringe, mittelgradige und hohe Präsenz positiver dermalen Zellen erzielt.

## **3 Resultate**

### **3.1 Allgemeine Prinzipien der Auswertungen**

Die Auswertung der ISEL-Markierung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Axiophot, Zeiss, Jena, Deutschland). Zur semiquantitativen Bewertung der ISEL<sup>+</sup>-Zellen sowie zur morphologischen Begutachtung wurden die Präparate zunächst bei 200-facher Vergrößerung durchgemustert. Anschließend wurde eine jeweils repräsentative Region bei 400-facher Vergrößerung eingestellt. Die Präsenz dermalen ISEL<sup>+</sup>-Zellen wurde als gering (+), mittelgradig (++) oder hoch (+++) eingestuft. Fehlendes Vorkommen wurde mit einem Minus-Symbol (-) gekennzeichnet.

Die Auswertung der übrigen Präparate erfolgte mittels mikroskopischer Untersuchung (SM-LUX, Leitz, Wetzlar, Deutschland). Zur Auszählung sowie zur morphologischen Begutachtung wurde eine 400-fache Vergrößerung gewählt und eine repräsentative Region eingestellt. Bei einer Größe von 0,25 mm x 0,25 mm pro Zählraster wurde insgesamt eine Fläche von 0,25 mm x 0,75 mm unterhalb der dermoepidermalen Junktion des jeweiligen Präparates evaluiert.

Die nachfolgend erhobenen Daten schließen die jeweilige Anzahl der immunmarkierten Zellen pro Feld, angegeben als Mittelwert beziehungsweise Median, sowie deren relative Gewichtung bezogen auf die Gesamtzellzahl in Prozent ein. Die im Text genannten prozentualen Gesamtanteile sowie die Gesamtzellzahlen beziehen sich auf jeweils drei dermale Zählraster, da in der Regel nur hier ein perivaskuläres Infiltrat nachweisbar und somit eine Zuordnung auf das Entzündungsinfiltrat sinnvoll war. Signifikante Werte wurden in den Graphiken mit einem Stern-Symbol (\*) gekennzeichnet.

Zusätzlich wurde das Auftreten von positiven Zellen in epidermalen Abschnitten vermerkt.

### **3.2 Differenzierte Auswertungen der durchgeführten Immunhistochemie**

#### **3.2.1 bcl-2-Expression**

Alle behandelten Patienten reagierten mit einer Verminderung der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen auf die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie (Tabelle 11).

Anhand morphologischer Kriterien und in Verbindung mit den mit Hilfe des CD3-Antikörpers gefärbten Konsekutivschnitten erfolgte die Zuweisung sowohl der bcl-2<sup>+</sup>- als auch der p53<sup>+</sup>-Zellen zum weitläufigen lymphozytären Infiltrat mit vornehmlich T-Lymphozyten.

Tabelle 11: Prozentuale Anteile dermalen bcl-2<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	28,6%	11,8%	40,0%	8,7%	5,3%	6,4%
2	20,6%	9,4%	43,9%	15,6%	11,4%	0%
3	16,3%	3,7%	36,4%	3,8%	16,7%	0%
4	44,7%	12,9%	51,8%	25,5%	8,3%	0%
5	38,1%	13,0%	20,0%	13,3%	19,4%	0%
6	24,5%	5,9%	28,9%	7,7%	12,8%	0%
7	41,1%	21,2%	32,6%	11,1%	13,0%	0%
8	29,5%	2,2%	29,7%	4,5%	12,5%	2,9%
9	58,1%	21,0%	20,0%	5,9%	31,6%	10,8%
10	42,5%	2,1%	28,1%	0%	16,7%	16,3%
11	32,2%	3,3%	30,4%	7,0%	0%	6,5%
12	13,9%	6,1%	23,4%	12,7%	0%	0%
13	27,0%	20,8%	38,6%	27,8%	25,0%	11,1%
14	31,0%	8,5%	35,6%	9,4%	0%	0%
15	27,2%	0%	37,5%	13,2%	0%	0%

Vor Therapiebeginn konnte hinsichtlich der Zellzählungen der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen eine durchschnittliche Gesamtzellzahl von 27,2 ± 14,6 (Mittelwert ± Stabw) pro Raster ausgemacht werden. Prozentual stellten sich 25,4% ± 0,060 bcl-2<sup>+</sup>-Zellen (Mittelwert ± Stabw) insgesamt dar (p < 0,0046). Nach Ende der Therapie wurde eine Zellzahl von 5,6 ± 3,5 bezüglich der bcl-2 immunopositiven Zellen festgestellt. Der prozentuale Anteil der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen betrug posttherapeutisch 8,1% ± 0,045 (Tabelle 12, Abbildungen 4-6).

Tabelle 12: Mittlere prozentuale Anteile der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz (± Stabw)	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	-22,9% (± 0,109)	31,7% (± 0,116)	9,5% (± 0,072)	29,5% (58,1-13,9%)	8,5% (21,2-0%)	
2. dermales Feld	-22,1% (± 0,079)	33,1% (± 0,088)	11,1% (± 0,076)	32,6% (51,8-20,0%)	9,4% (27,8-0%)	
3. dermales Feld	-8,0% (± 0,085)	11,5% (± 0,096)	3,6% (± 0,054)	12,5% (31,6-0%)	0% (16,3-0%)	
Gesamt	-17,4 (± 0,047)	25,4% (± 0,060)	8,1% (± 0,045)	24,6% (36,6-12,4%)	6,3% (19,9-2,5%)	<0,0001

Prätherapeutisch konnte in den meisten Fällen zusätzlich eine Anzahl bcl-2<sup>+</sup>-Zellen im Stratum basale sowie ein therapiebegleitender Rückgang verzeichnet werden.

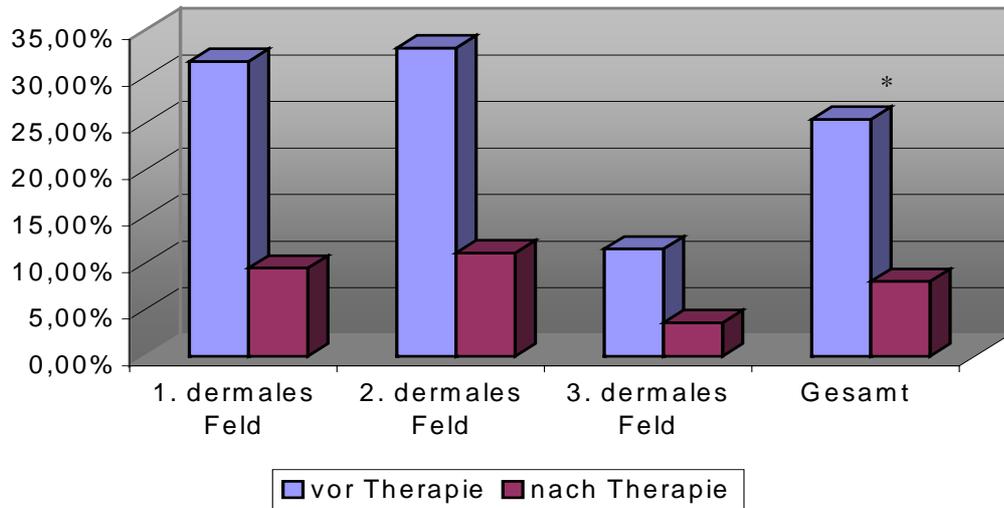


Abbildung 4: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte bcl-2<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046).

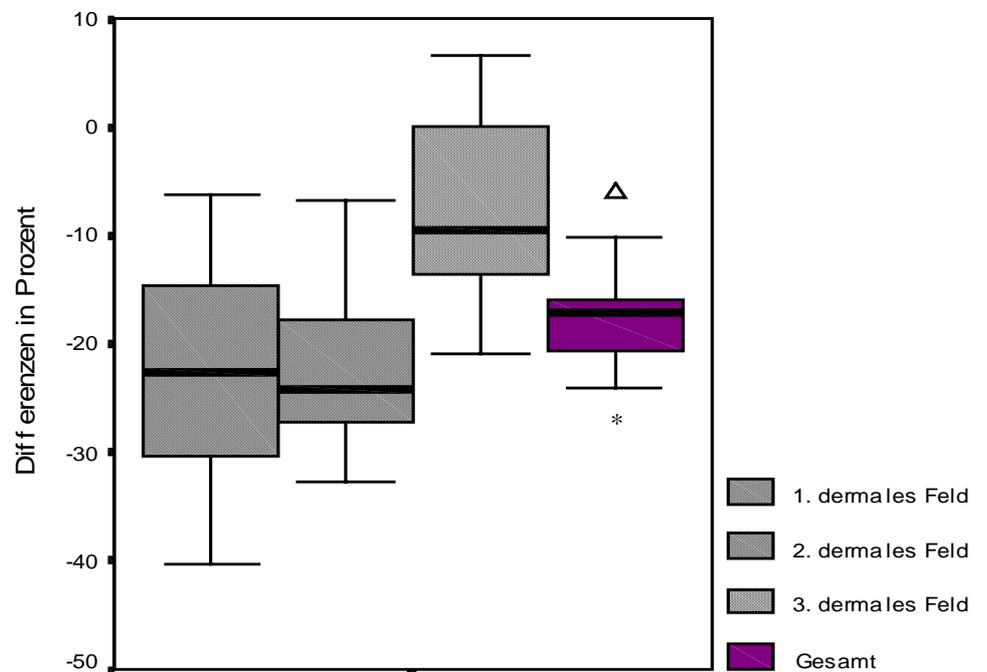


Abbildung 5: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte bcl-2<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046, Δ = Ausreißer).

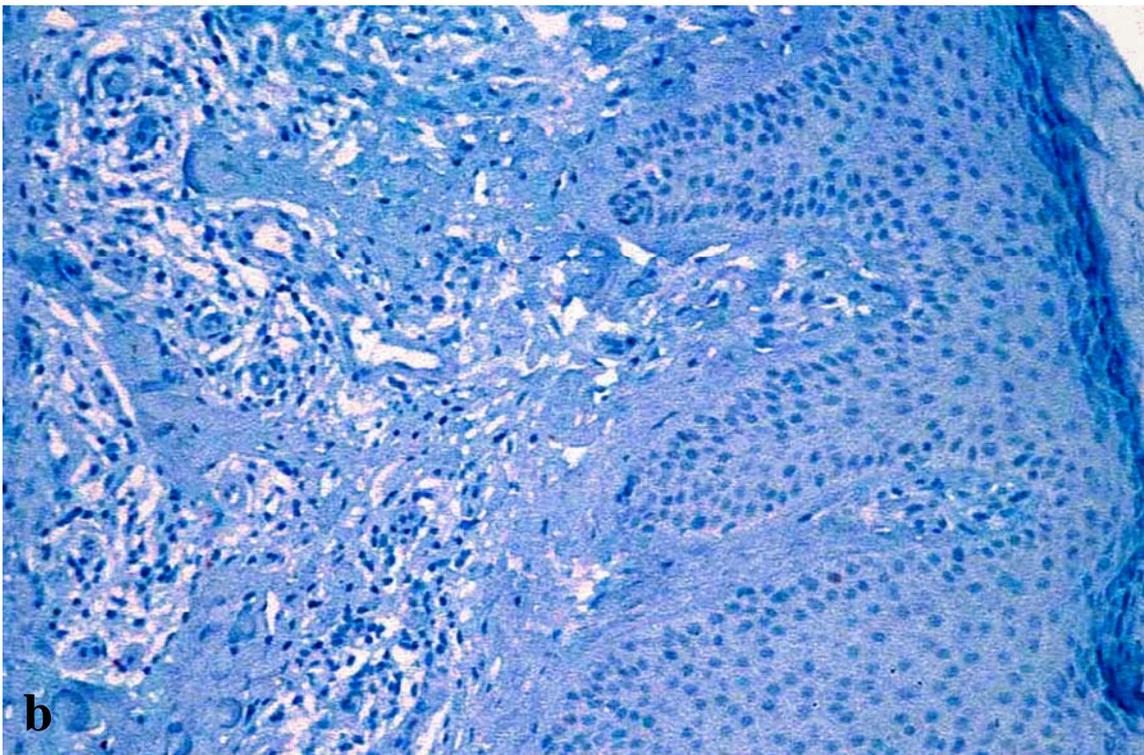
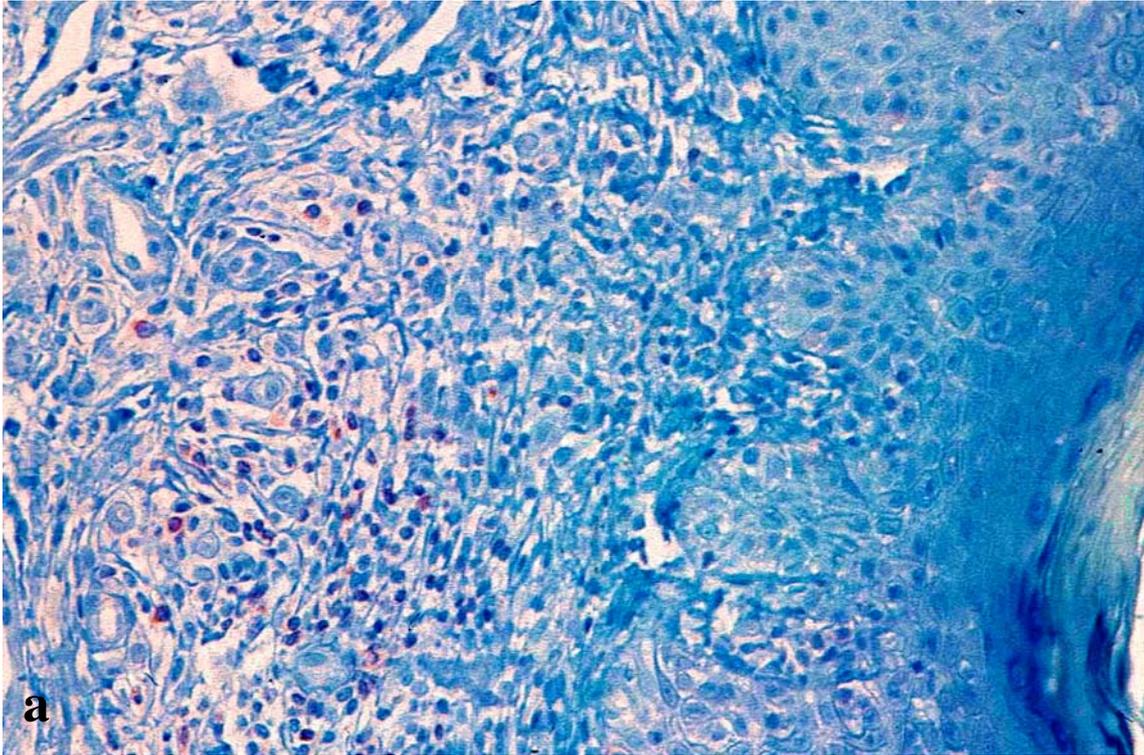


Abbildung 6: Signifikanter Rückgang der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen im perivaskulären Infiltrat nach Medium-dose-UVA1-Phototherapie (b) im Gegensatz zur Ausgangssituation (a). Vergrößerung x 200 (a), x 160 (b)

### 3.2.2 p53-Expression

Posttherapeutisch zeigte sich bei allen 15 Patienten eine signifikante Steigerung der p53<sup>+</sup>-Zellen im dermalen inflammatorischen Infiltrat (Tabelle 13).

Tabelle 13: Prozentuale Anteile dermalen p53<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	16,0%	28,0%	15,4%	40,9%	0%	11,1%
2	9,4%	3,8%	2,0%	8,9%	0%	8,5%
3	1,3%	31,4%	5,1%	33,3%	0%	33,3%
4	1,2%	23,4%	2,0%	21,9%	4,5%	12,7%
5	1,3%	21,2%	16,3%	28,9%	4,0%	14,3%
6	0%	14,2%	0%	11,6%	0,9%	10,8%
7	2,1%	6,6%	3,2%	12,1%	0%	8,7%
8	3,7%	35,1%	8,2%	30,8%	3,6%	25,7%
9	2,9%	8,7%	5,8%	17,7%	5,4%	4,8%
10	0%	15,4%	28,1%	13,2%	16,9%	21,1%
11	14,8%	35,5%	12,5%	25,0%	0%	20,0%
12	1,2%	9,4%	0%	14,0%	1,1%	9,7%
13	0%	0%	0%	7,5%	0%	10,0%
14	0,3%	0%	0%	4,9%	6,8%	6,1%
15	2,9%	5,4%	2,6%	22,2%	0%	8,1%

Die Anzahl p53<sup>+</sup>-Zellen (Mittelwert ± Stabw) konnte vor Bestrahlungsbeginn mit durchschnittlich 4,5% ± 0,043 bestimmt werden. Nach der erfolgreichen UVA1-Phototherapie stieg der prozentuale Anteil auf 16,4% ± 0,094 (p < 0,0046) (Tabelle 14, Abbildungen 7-9). Die Gesamtzellzahl der p53<sup>+</sup>-Zellen (Mittelwert ± Stabw) stieg ebenfalls von 3,8 ± 3,1 bis auf 10,6 ± 6,5 pro Feld an.

Tabelle 14: Mittlere prozentuale Anteile der p53<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	12,1% (± 0,112)	3,8% (± 0,053)	15,9% (± 0,124)	1,3% (16,0-0%)	14,2% (35,5-0%)	
2. dermales Feld	12,8% (± 0,104)	6,8% (± 0,081)	19,5% (± 0,106)	3,2% (28,1-0%)	17,7% (40,9-4,9%)	
3. dermales Feld	9,8% (± 0,081)	2,9% (± 0,045)	13,7% (± 0,080)	0,9% (16,9-0%)	10,8% (33,3-4,8%)	
Gesamt	11,8% (± 0,083)	4,5% (± 0,043)	16,4% (± 0,094)	2,6% (15,0-0,8%)	12,2% (32,7-3,7%)	<0,0001

Darüber hinaus konnten, im Gegensatz zu lediglich vereinzeltem Vorkommen in den prätherapeutischen Präparaten, in den meisten posttherapeutischen Schnittpräparaten einige p53<sup>+</sup>-Zellen im Stratum basale der Epidermis festgestellt werden.

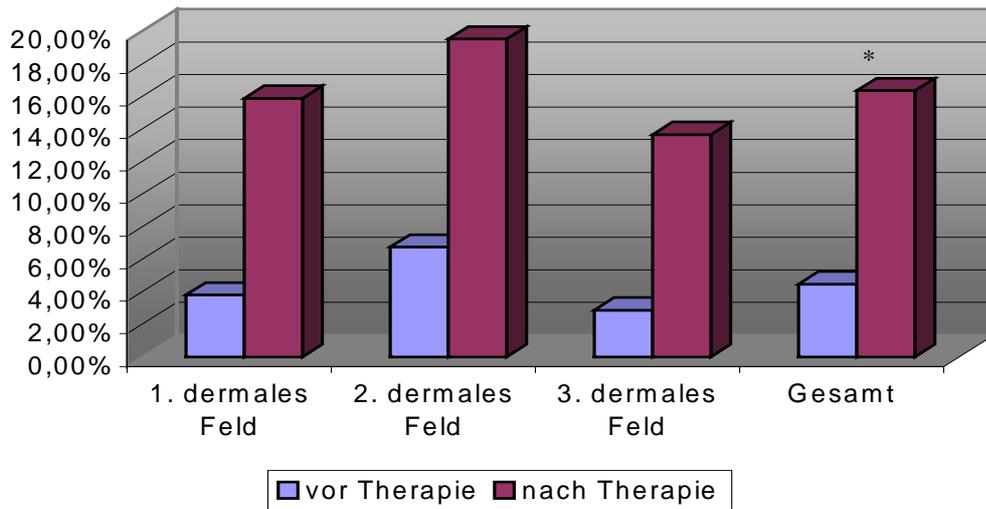


Abbildung 7: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte p53<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* = p < 0,0046).

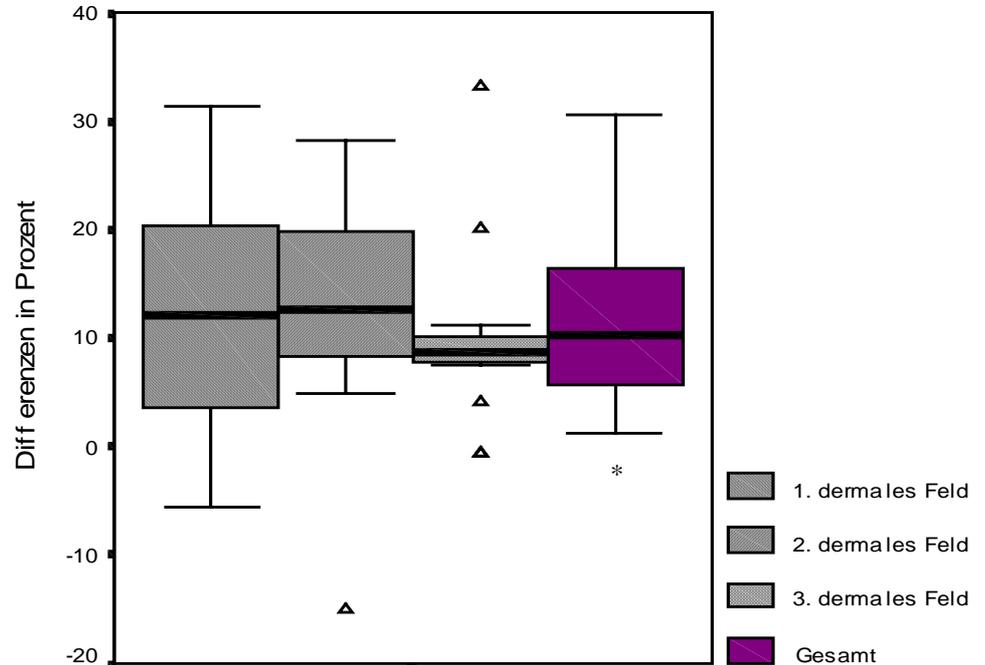


Abbildung 8: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte p53<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* = p < 0,0046, Δ = Ausreißer).

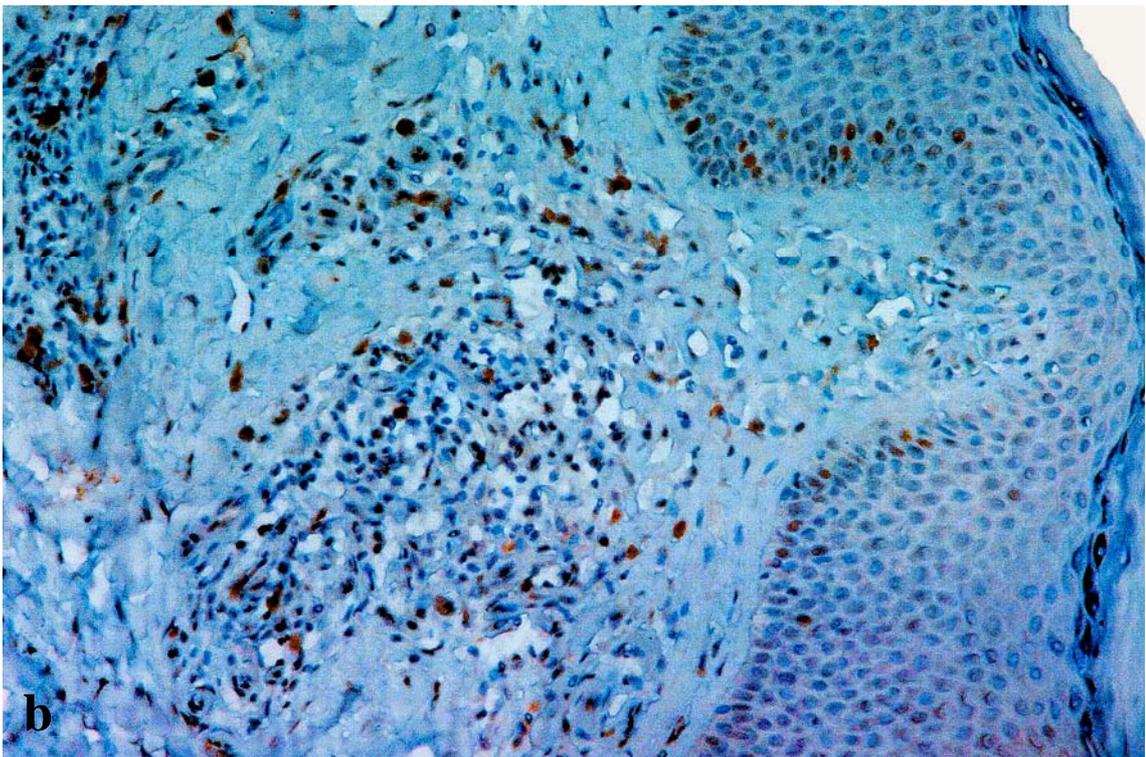
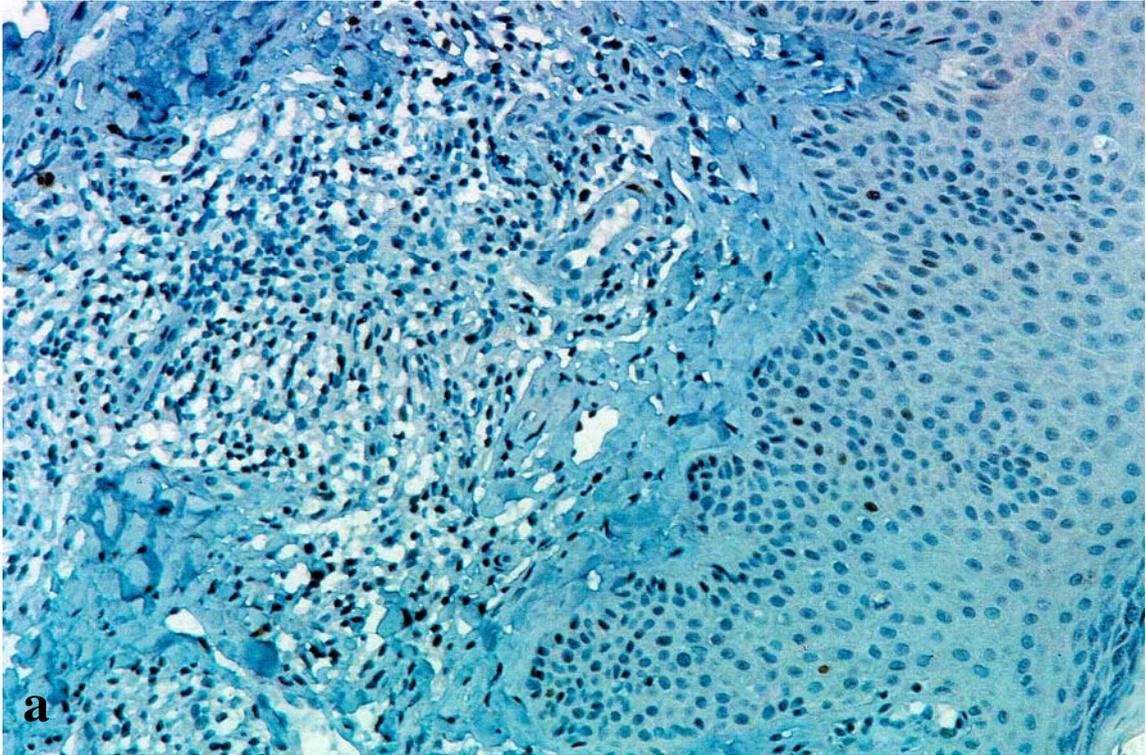


Abbildung 9: Veränderungen der Expression von p53 vor (a) beziehungsweise nach (b) applizierter Phototherapie mit einer starken Zunahme der immunopositiven Zellen. Vergrößerung x 200

### 3.2.3 CD3-Expression

Begleitend zur Modulation von bcl-2 und p53 stellte sich ebenfalls im kompletten Patientenkollektiv eine Reduktion der CD3<sup>+</sup>-Zellen dar (Tabelle 15).

Tabelle 15: Prozentuale Anteile dermalen CD3<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
Patient Nr. 1	25,0%	15,8%	50,0%	13,1%	4,7%	1,4%
2	46,8%	14,4%	37,8%	28,4%	0%	2,9%
3	56,7%	28,2%	30,5%	5,8%	15,6%	0%
4	22,1%	28,3%	61,6%	37,0%	29,1%	4,4%
5	19,4%	13,0%	15,4%	0%	0%	0%
6	36,8%	8,6%	15,5%	17,5%	0%	18,0%
7	23,0%	27,3%	24,7%	0%	2,4%	0%
8	38,4%	0%	56,3%	22,6%	0%	0%
9	48,7%	44,8%	46,7%	0%	56,3%	0%
10	46,4%	11,1%	43,6%	20,0%	0%	0%
11	77,1%	18,6%	40,0%	17,5%	0%	0%
12	14,5%	19,4%	41,5%	12,8%	0%	10,7%
13	35,4%	2,9%	63,9%	10,2%	0%	0%
14	51,6%	31,6%	51,1%	28,2%	0%	5,1%
15	34,7%	7,6%	15,3%	16,9%	0%	0%

Die CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten spielen in der Pathogenese besonders hinsichtlich der Verteilung der unterschiedlichen Subtypen eine entscheidende Rolle. Sie konnten prozentual mit 28,4% ± 0,106 (Mittelwert ± Stabw) vor Therapie bestimmt werden. Nach der Therapie wurde ein Rückgang auf 12,1% ± 0,055 beobachtet (p <0,0046) (Tabelle 16, Abbildungen 10-12). Die Gesamtzellzahl (Mittelwert ± Stabw) verringerte sich von 38,9 ± 26,7 auf 15,5 ± 10,4 pro 0,0625 mm<sup>2</sup>.

Tabelle 16: Mittlere prozentuale Anteile der CD3<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	-19,8% (± 0,195)	38,4% (± 0,167)	18,1% (± 0,121)	36,8% (77,1-14,5%)	15,8% (44,8-0%)	
2. dermales Feld	-24,3% (± 0,154)	39,6% (± 0,163)	15,3% (± 0,111)	41,5% (63,9-15,3%)	16,9% (37,0-0%)	
3. dermales Feld	-4,3% (± 0,174)	7,2% (± 0,158)	2,8% (± 0,052)	0% (56,3-0%)	0% (18,0-0%)	
Gesamt	-16,3% (± 0,097)	28,4% (± 0,106)	12,1% (± 0,055)	30,0% (50,5-11,6%)	11,3% (23,2-4,3%)	<0,0001

Epidermal konnten prätherapeutisch bei einigen Biopsaten vereinzelt CD3<sup>+</sup>-Zellen begleitet von einem posttherapeutischen Rückgang aufgezeigt werden.

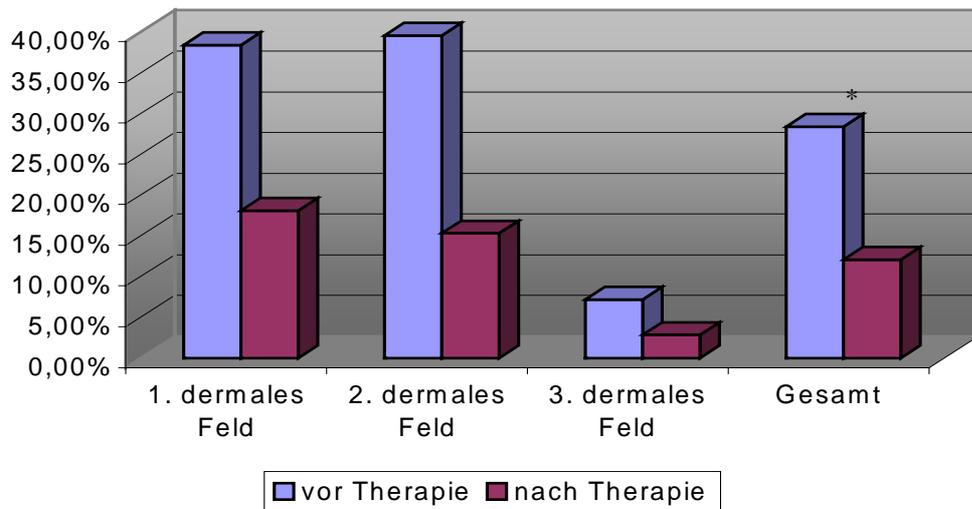


Abbildung 10: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte CD3<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046).

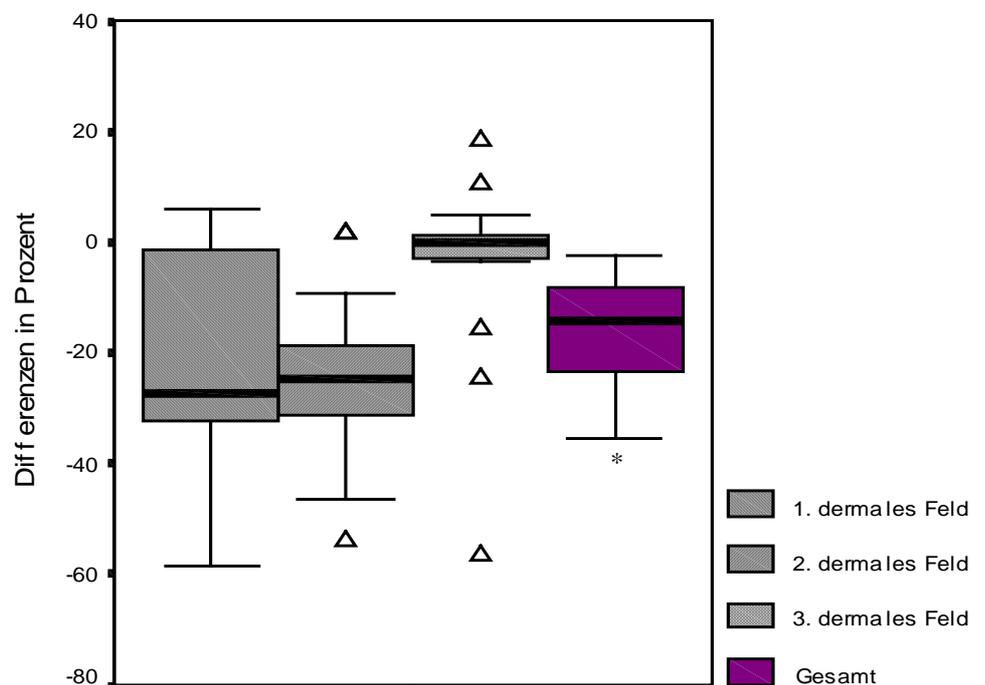


Abbildung 11: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte CD3<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046, Δ = Ausreißer).

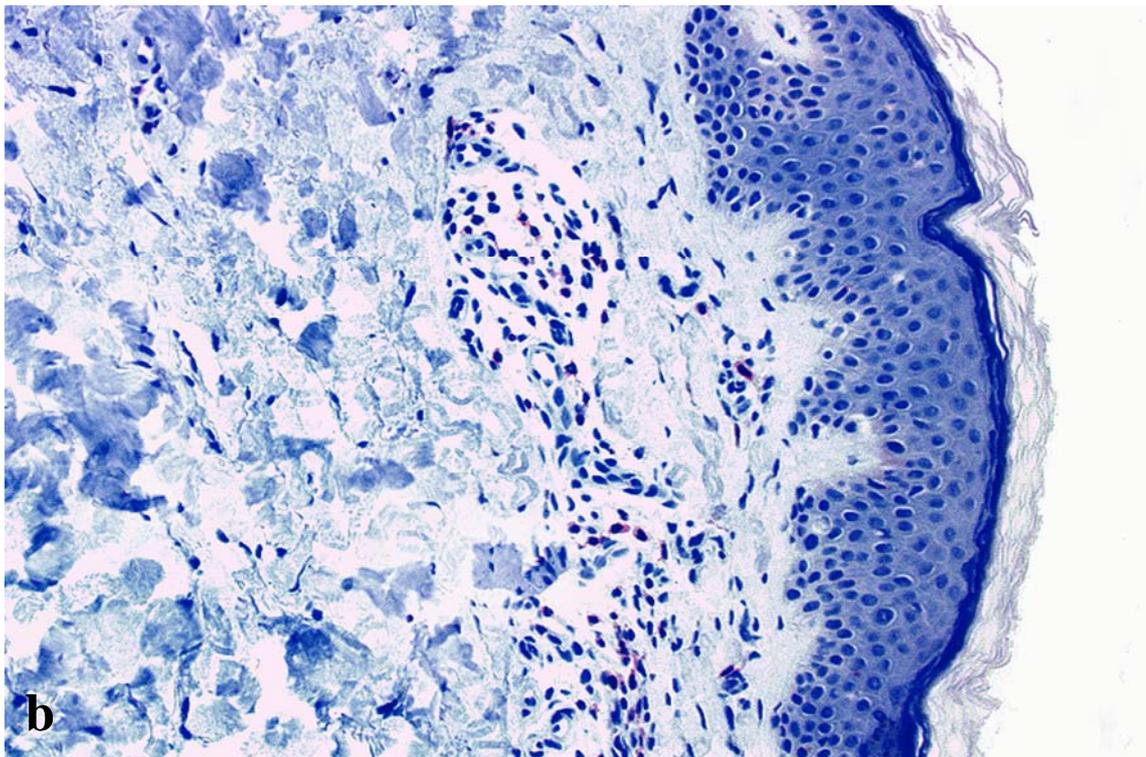
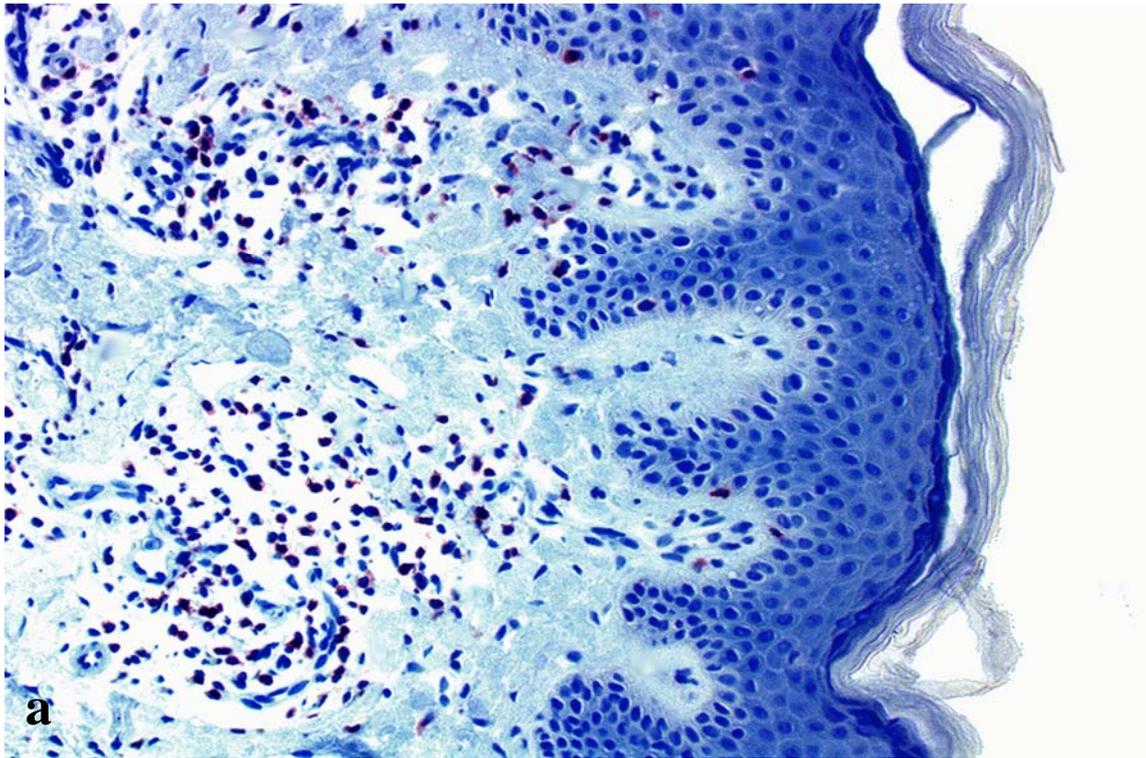


Abbildung 12: Depletion prätherapeutisch in großer Zahl vorhandener CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten (a) infolge der UVA1-Phototherapie mit einer kumulativen Dosis von 750 J/cm<sup>2</sup>. Vergrößerung x 200

### 3.2.4 CD4-Expression

Bei 14 der 15 behandelten Patienten konnte im Zuge der Depletion CD3<sup>+</sup>-Zellen zusätzlich eine Abnahme CD4 immunopositiver Zellen festgestellt werden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Prozentuale Anteile dermalen CD4<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	32,6%	2,1%	7,3%	1,3%	1,6%	0%
2	11,2%	12,2%	26,8%	15,3%	13,8%	0%
3	27,8%	6,2%	28,9%	1,2%	4,3%	0%
4	3,6%	5,1%	26,5%	7,5%	13,1%	0%
5	10,8%	14,8%	8,0%	0%	0,6%	0%
6	8,1%	10,5%	15,4%	13,4%	0%	10,7%
7	29,5%	27,0%	31,3%	13,0%	3,4%	0%
8	22,2%	3,8%	11,4%	0%	0%	0%
9	15,9%	10,6%	0%	9,1%	13,1%	0%
10	50,0%	5,0%	42,9%	11,1%	0%	17,9%
11	36,0%	30,3%	32,6%	24,1%	33,3%	12,0%
12	34,6%	25,0%	47,7%	17,1%	25,5%	0%
13	39,3%	5,0%	46,4%	2,2%	0%	0%
14	22,0%	35,8%	38,2%	0%	0%	0%
15	10,2%	7,6%	21,1%	0%	0%	0%

Vor Beginn des Bestrahlungszyklus konnte eine durchschnittliche Gesamtzellzahl CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen (Mittelwert ± Stabw) von 29,6 ± 19,9 nachgewiesen werden. Prozentual (Mittelwert ± Stabw) stellten sich 18,8% ± 0,097 immunopositiv dar. Nach Beendigung des Bestrahlungszyklus betrug die Gesamtzellzahl durchschnittlich 10,2 ± 7,8 sowie der prozentuale Anteil CD4<sup>+</sup>-Zellen 7,9% ± 0,061 (p < 0,0046) (Tabelle 18, Abbildungen 13-15).

Tabelle 18: Mittlere prozentuale Anteile der CD4<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	-10,2% (± 0,164)	23,6% (± 0,135)	13,4% (± 0,108)	22,2% (50,0-8,1%)	10,5% (35,8-2,1%)	
2. dermales Feld	-18,0% (± 0,145)	25,6% (± 0,149)	7,7% (± 0,077)	26,8% (46,4-0%)	7,5% (24,1-0%)	
3. dermales Feld	-4,5% (± 0,113)	7,3% (± 0,105)	2,7% (± 0,058)	1,6% (33,3-0%)	0% (17,9-0%)	
Gesamt	-11,0% (± 0,082)	18,8% (± 0,097)	7,9% (± 0,061)	17,3% (35,9-6,5%)	6,6% (22,1-1,1%)	<0,0001

Zudem gelang der Nachweis einiger CD4<sup>+</sup>-Zellen in den epidermalen Schichten insbesondere bei unbehandelten Patienten. Nach Therapie konnten nahezu keine positiven Zellen entdeckt werden.

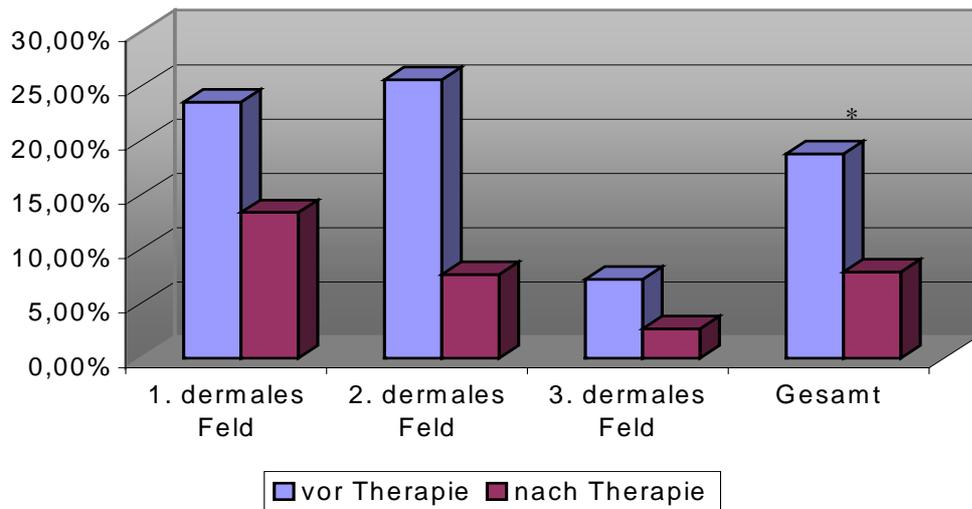


Abbildung 13: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte CD4<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046).

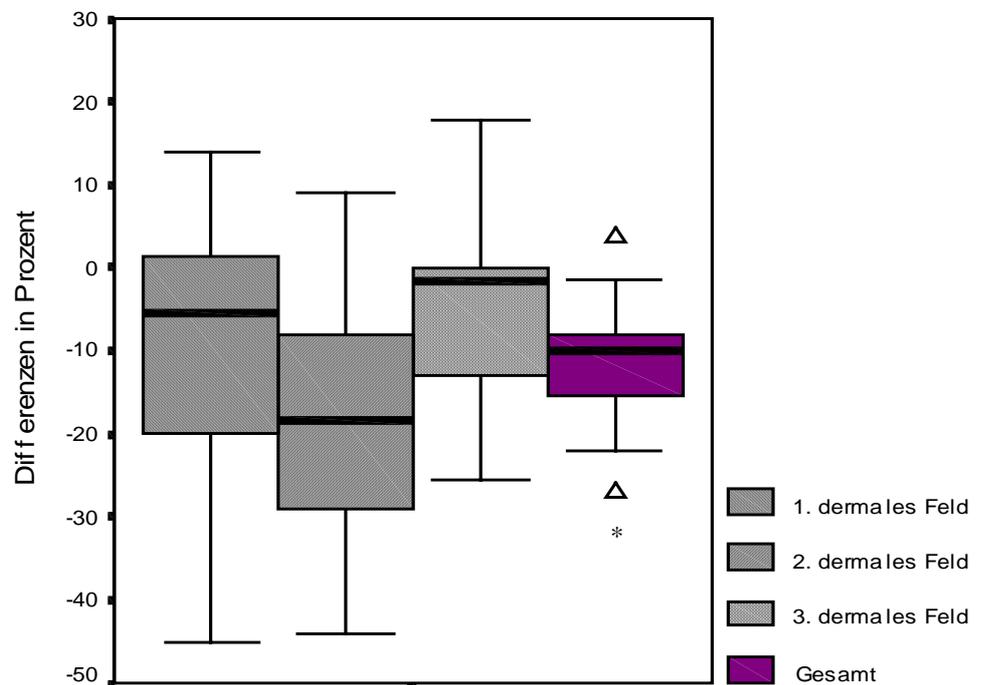


Abbildung 14: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte CD4<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046, Δ = Ausreißer).

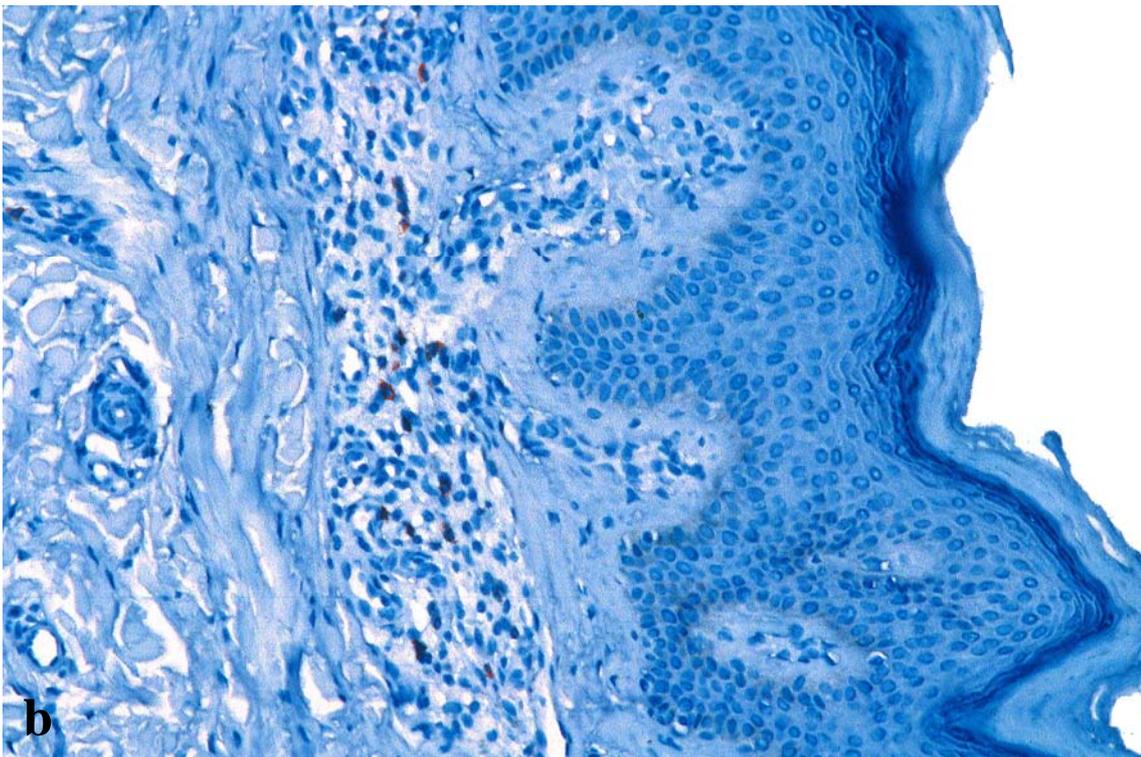
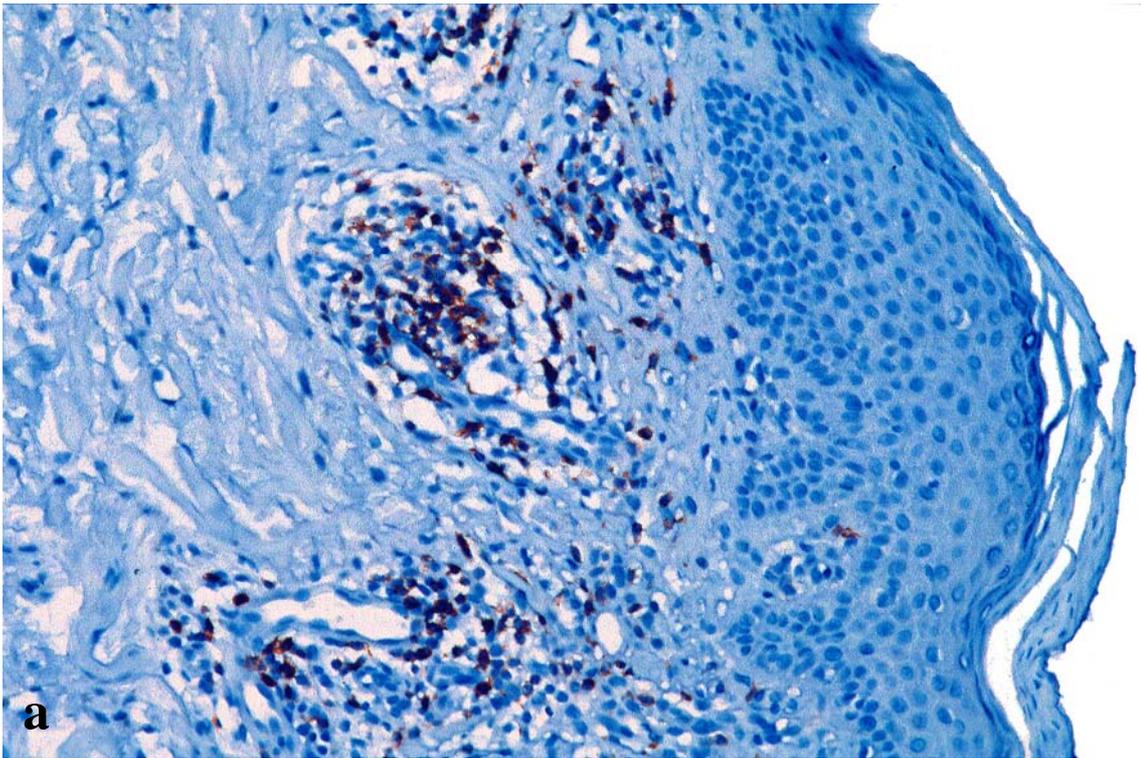


Abbildung 15: Verminderung der CD4<sup>+</sup>-Zellen (b) im Zuge der starken Reduktion prätherapeutischer dermaler Entzündungsinfiltrate (a). Vergrößerung x 200

### 3.2.5 CD8-Expression

Nach erfolgreicher Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie konnte bei 13 Patienten eine Zunahme des prozentualen Anteils CD8<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden. Zwei Patienten zeigten demgegenüber eine Abnahme (Tabelle 19).

Tabelle 19: Prozentuale Anteile dermalen CD8<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	9,4%	25,4%	32,2%	28,8%	26,2%	20,0%
2	2,9%	5,9%	5,2%	18,5%	0,8%	10,0%
3	10,6%	22,5%	10,2%	11,7%	8,8%	7,7%
4	7,8%	10,2%	13,9%	15,3%	13,9%	25,7%
5	17,8%	18,3%	18,9%	13,3%	25,7%	9,1%
6	11,9%	54,4%	18,2%	29,5%	10,5%	15,4%
7	14,9%	22,4%	21,0%	27,4%	14,3%	38,9%
8	6,6%	0%	7,6%	6,3%	11,1%	0%
9	5,2%	6,4%	0%	22,8%	0%	6,7%
10	0,8%	10,5%	0%	4,4%	0%	0%
11	8,1%	6,8%	6,3%	13,7%	0%	0%
12	2,7%	6,8%	13,5%	11,9%	0%	0%
13	5,5%	11,9%	7,7%	12,8%	0%	17,2%
14	18,9%	33,7%	13,6%	12,1%	0%	0%
15	9,1%	12,0%	4,8%	6,6%	0%	23,6%

Im Vergleich zu den Resultaten vor Therapiebeginn konnten CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in einer Gesamtzahl (Mittelwert ± Stabw) von 12,7 ± 6,8 und einem prozentualen Anteil am Gesamtinfiltrat (Mittelwert ± Stabw) von 14,6% ± 0,088 nachgewiesen werden. Prätherapeutische Werte konnten mit 11,4 ± 9,3 bezüglich der mittleren Gesamtzellzahl beziehungsweise mit 9,3% ± 0,068 in Hinblick auf die prozentuale Verteilung bestimmt werden (Tabelle 20, Abbildungen 16-18).

Tabelle 20: Mittlere prozentuale Anteile der CD8<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	7,7% (± 0,114)	8,8% (± 0,053)	16,5% (± 0,138)	8,1% (18,9-0,8%)	11,9% (54,4-0%)	
2. dermales Feld	4,1% (± 0,074)	11,5% (± 0,086)	15,7% (± 0,081)	10,2% (32,2-0%)	13,3% (29,5-4,4%)	
3. dermales Feld	3,4% (± 0,116)	7,4% (± 0,094)	11,6% (± 0,117)	0,8% (26,2-0%)	0,9% (38,9-0%)	
Gesamt	5,1% (± 0,070)	9,3% (± 0,068)	14,6% (± 0,088)	8,4% (22,6-0,3%)	14,0% (33,1-2,1%)	0,0048

Somit konnte entsprechend der Auswertung der prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen eine CD4/CD8-Ratio von 2:1 vor Behandlungsbeginn ermittelt werden. Nach erfolgter UVA1-Phototherapie ließ sich eine Ratio von 1:2 im dermalen Infiltrat nachweisen.

Im Gegensatz zur CD4-Färbung konnte bezüglich der CD8<sup>+</sup>-Zellen keine epidermale Komponente aufgezeigt werden.

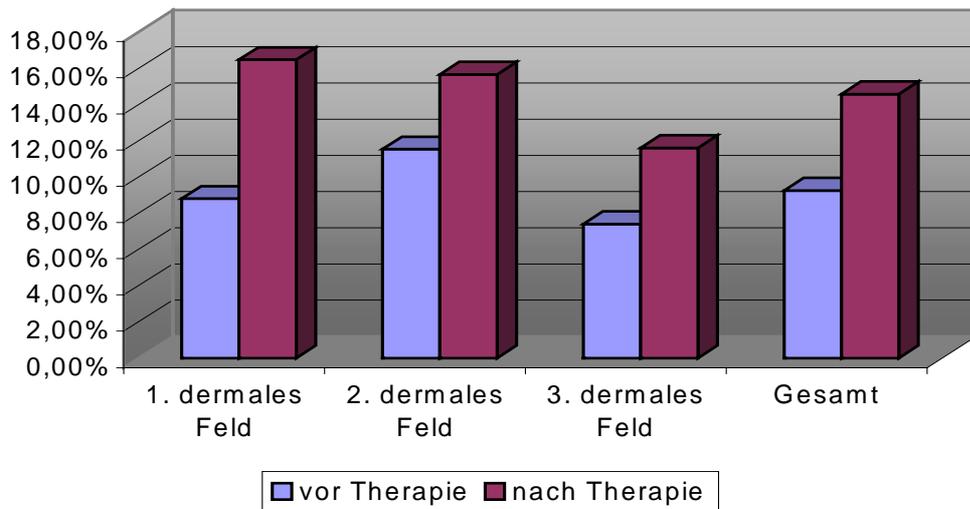


Abbildung 16: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte CD8<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.

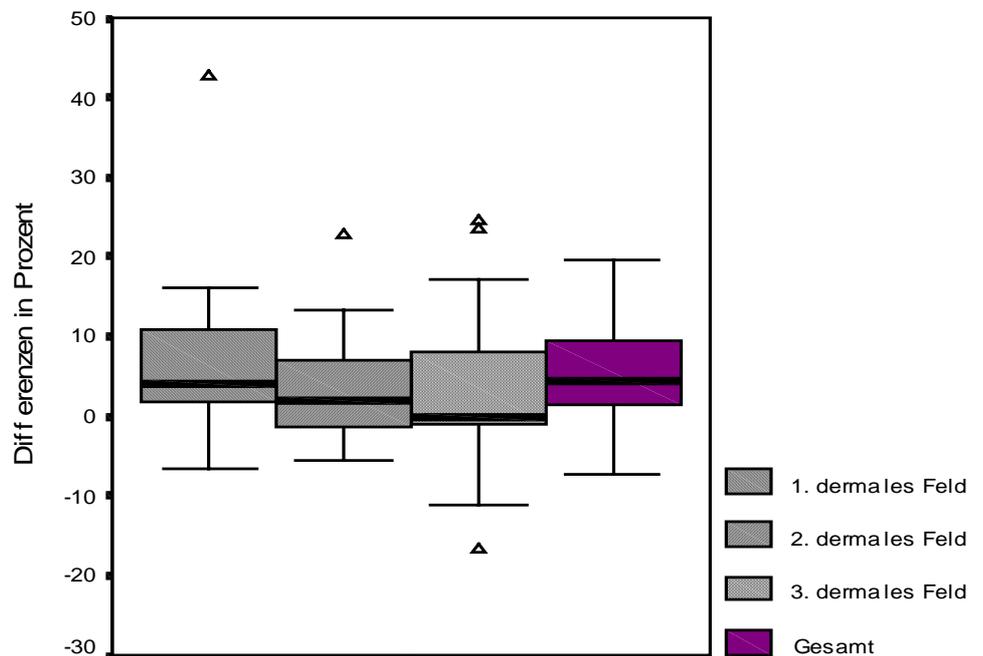


Abbildung 17: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte CD8<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt ( $\Delta$  = Ausreißer).

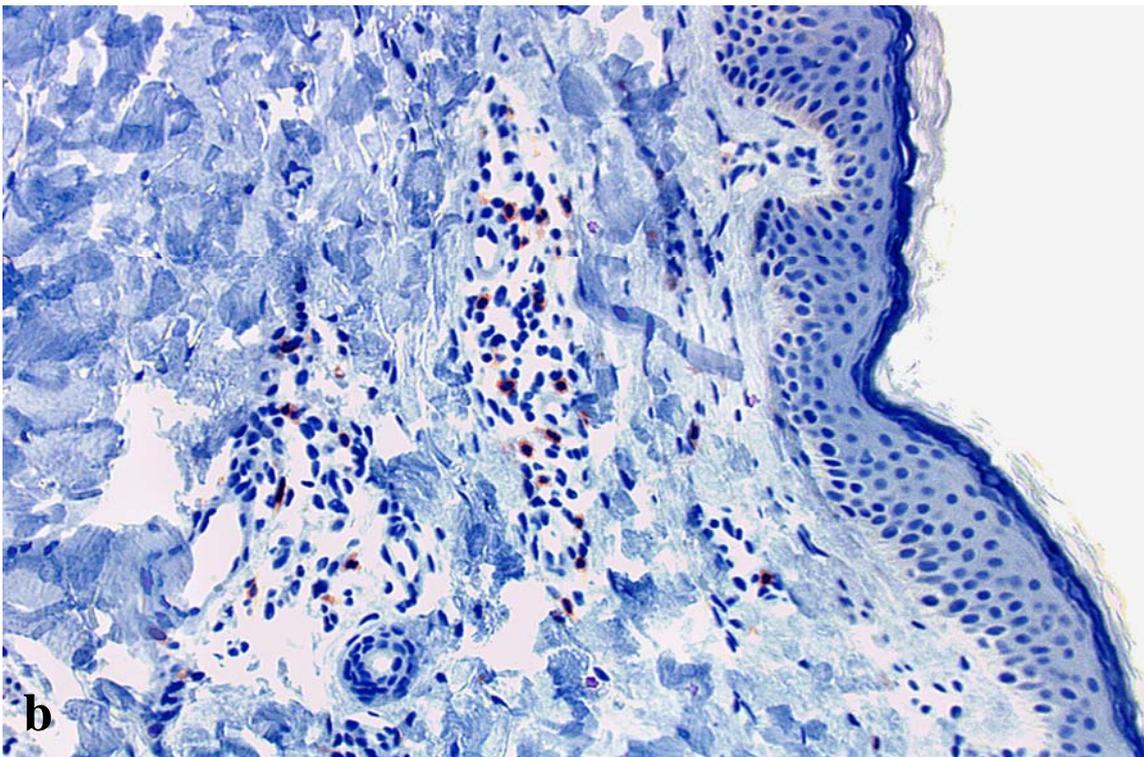
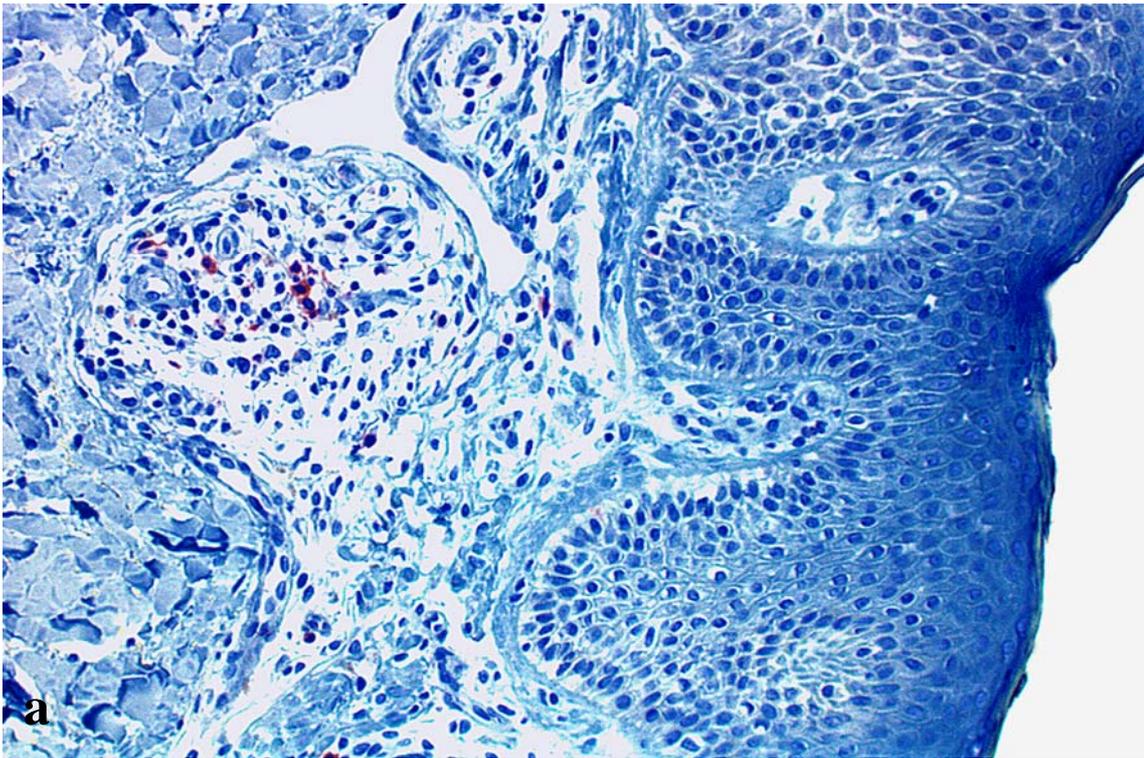


Abbildung 18: Stagnation der Anzahl CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten trotz sichtbarer Rückbildung der inflammatorischen Infiltrate bei 15 Einzeldosen von je 50 J/cm<sup>2</sup> UVA1. Vergrößerung x 200

### 3.2.6 CD1a-Expression

Posttherapeutisch ließ sich bei allen Patienten eine deutliche Abnahme der CD1a<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat demonstrieren (Tabelle 21).

Tabelle 21: Prozentuale Anteile dermalen CD1a<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	4,1%	0,7%	0%	0%	0,9%	0%
2	1,1%	1,3%	1,4%	0%	0%	0%
3	9,0%	2,0%	0%	0%	0%	0%
4	6,6%	14%	29,9%	0%	15,5%	2,4%
5	13,4%	0%	0%	0%	0%	0%
6	15,7%	0%	1,3%	0,8%	0%	0%
7	4,4%	0%	3,6%	0%	0%	0%
8	7,2%	0%	6,9%	0,7%	0%	0%
9	3,3%	0%	0%	0%	4,8%	0%
10	15,9%	1,0%	8,4%	0%	0%	0%
11	7,1%	0,7%	22,3%	1,9%	7,9%	0%
12	20%	0,8%	7,5%	0%	0%	0%
13	1,5%	0%	2,9%	0%	4,8%	0%
14	8,4%	0%	2,5%	0%	0%	0%
15	3,6%	0,7%	0%	0%	0%	0%

Vor Beginn der Bestrahlungssitzungen konnte eine Gesamtzellzahl CD1a<sup>+</sup>-Langerhanszellen von 6,8 (Median) mit einer Spannweite von 22,7-0,7 nachgewiesen werden. Prozentual stellten sich 5,4% ± 0,046 Zellen (Mittelwert ± Stabw) immunopositiv dar. Nach der letzten Bestrahlungssitzung betrug die Gesamtzellzahl 0,4 (Median) mit einer Spannweite von 5,7-0 bei einem prozentualen Anteil CD1a<sup>+</sup>-Zellen von 0,6% ± 0,014 (p <0,0046) (Tabelle 22, Abbildungen 19-21).

Tabelle 22: Mittlere prozentuale Anteile der CD1a<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	-6,5% (± 0,069)	8,1% (± 0,057)	1,4% (± 0,035)	7,1% (20,0-1,1%)	0,7% (14,0-0%)	
2. dermales Feld	-5,4% (± 0,087)	5,8% (± 0,088)	0,2% (± 0,005)	2,5% (29,9-0%)	0% (1,9-0%)	
3. dermales Feld	-1,7% (± 0,029)	2,3% (± 0,044)	0,2% (± 0,006)	0% (15,4-0%)	0% (2,4-0%)	
Gesamt	-4,6% (± 0,034)	5,4% (± 0,046)	0,6% (± 0,014)	3,6% (17,3-0,8%)	0,2% (5,5-0%)	<0,0001

Darüber hinaus konnte, im Gegensatz zum geringeren Auftreten nach erfolgreicher Medium-dose-UVA1-Phototherapie, prätherapeutisch in den meisten Präparaten eine größere Anzahl suprabasal gelegener CD1a<sup>+</sup>-Zellen konstatiert werden.

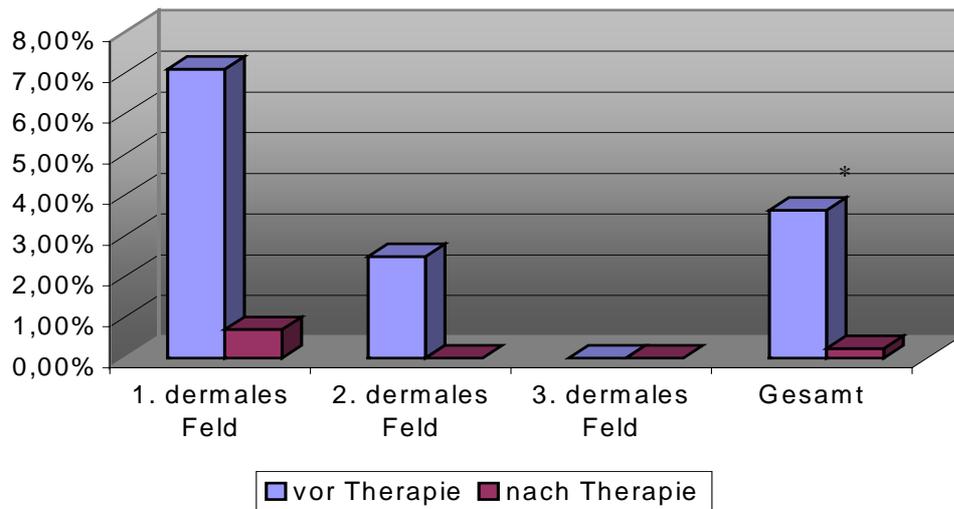


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Mediane CD1a<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046).

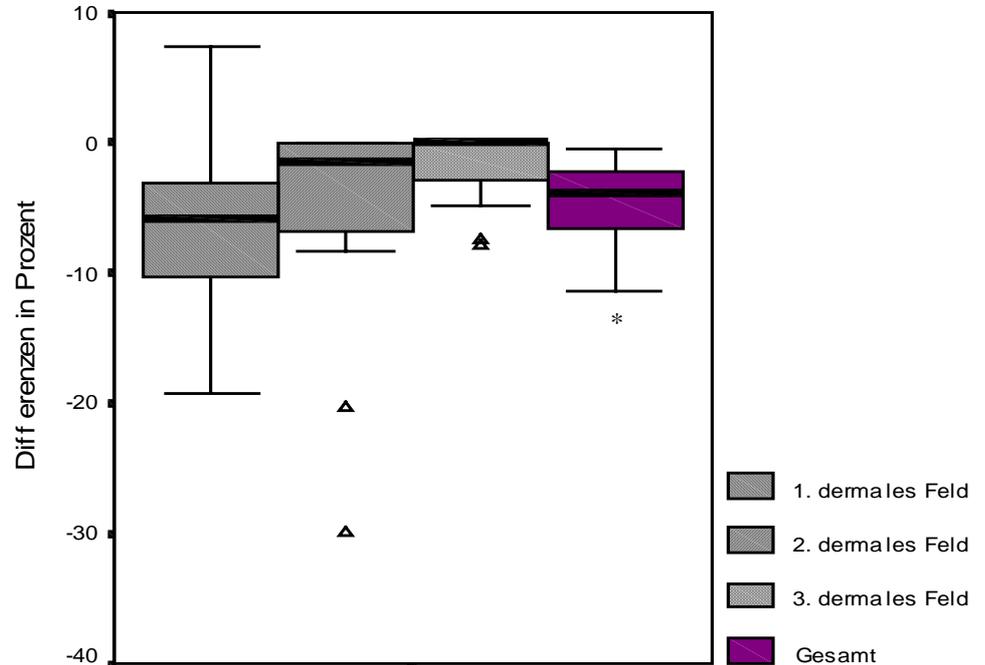


Abbildung 20: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte CD1a<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046, Δ = Ausreißer).

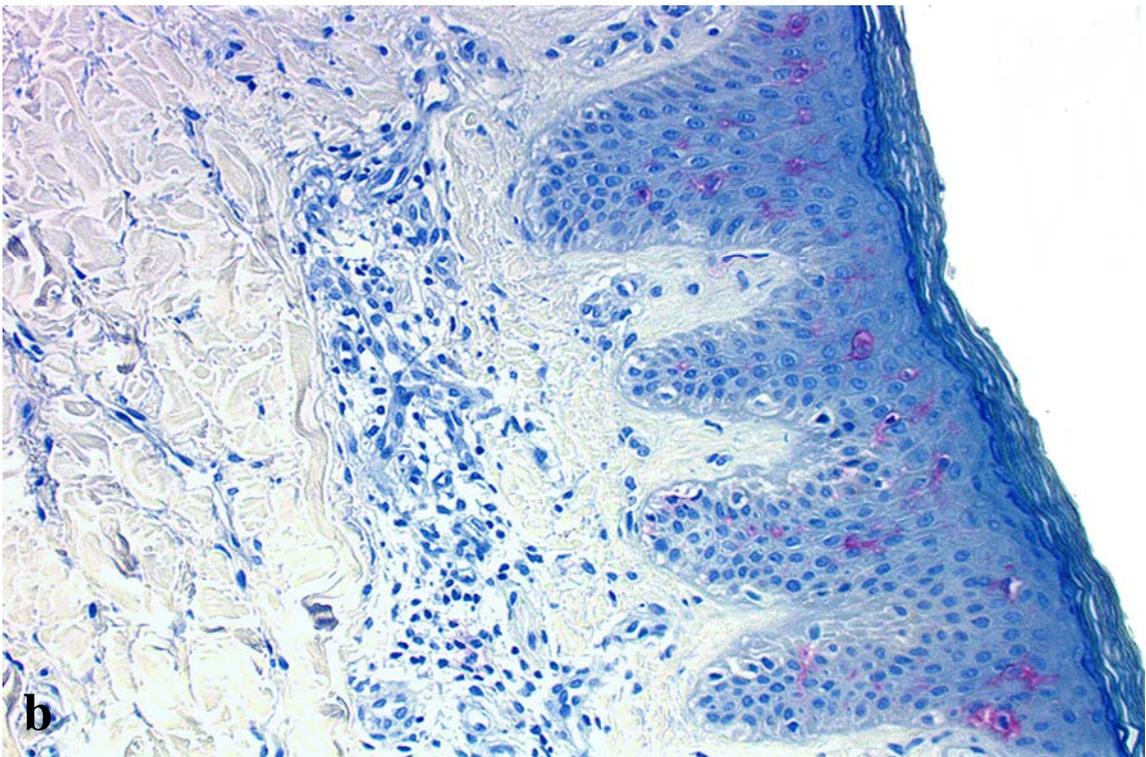
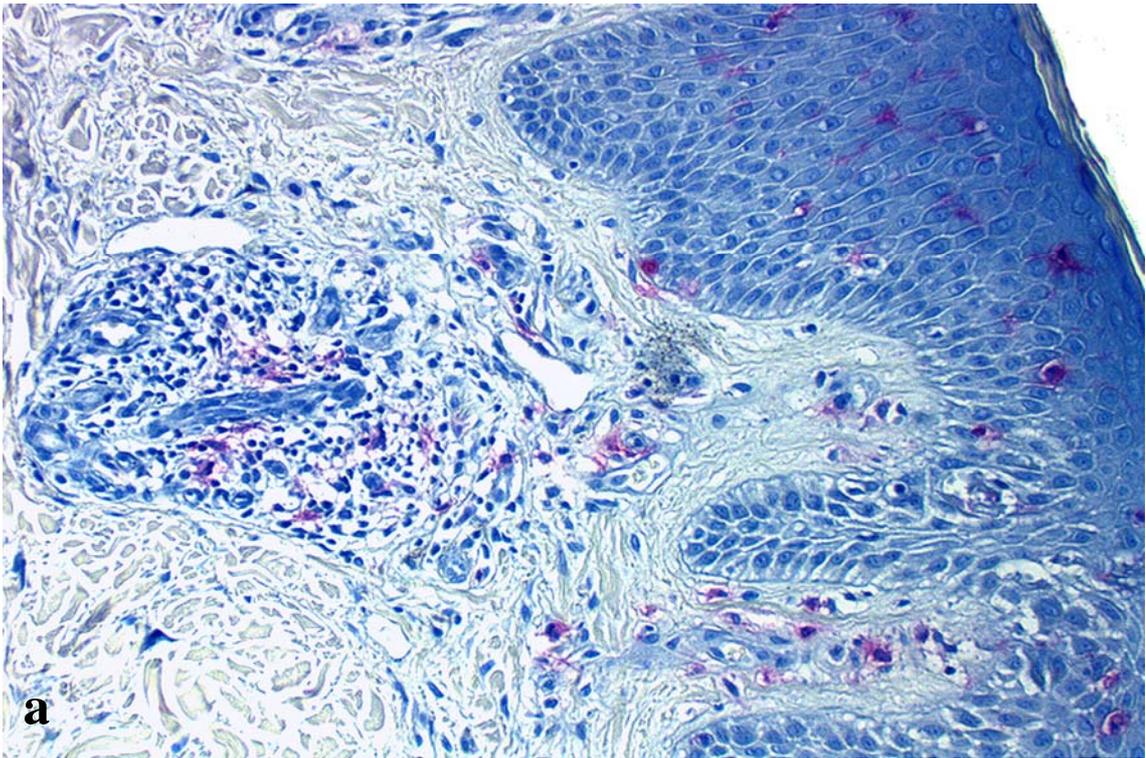


Abbildung 21: Posttherapeutisch signifikanter Rückgang (b) abnorm vorhandener CD1a<sup>+</sup>-Zellen vornehmlich im Stratum papillare vor Medium-dosis-UVA1-Phototherapie. Vergrößerung x 200

### 3.2.7 Kathepsin-G-Expression

Alle 15 Patienten reagierten auf die Behandlung mit einer Reduktion proinflammatorischer, aktiver Zellen im Sinne einer Kathepsin-G-Modulation (Tabelle 23).

Tabelle 23: Prozentuale Anteile dermalen Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	11,4%	12,0%	10,0%	5,1%	4,6%	3,5%
2	12,8%	8,9%	6,8%	12,2%	16,4%	0%
3	12,7%	0,7%	8,7%	0,9%	21,7%	0%
4	7,5%	4,3%	5,4%	3,6%	0%	0%
5	12,8%	9,9%	18,6%	2,3%	0%	0%
6	7,1%	3,1%	0%	0%	0%	0%
7	20,3%	7,0%	20,7%	5,1%	22,4%	15,3%
8	13,3%	5,2%	8,0%	10,9%	10,0%	2,7%
9	8,9%	8,3%	3,4%	7,9%	6,5%	2,5%
10	2,1%	0%	0%	0,5%	0%	0%
11	13,3%	13,3%	7,5%	6,1%	6,2%	5,7%
12	8,5%	0%	3,6%	3,9%	3,6%	3,0%
13	14,5%	4,6%	8,4%	4,9%	6,7%	3,6%
14	1,9%	1,6%	4,5%	0%	3,3%	2,6%
15	3,1%	1,2%	3,4%	0%	0%	0%

Vor Therapie konnte in allen Probebiopsien eine Reihe Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen im Korium dargestellt werden. Die durchschnittliche Zellzahl positiv markierter Zellen (Mittelwert ± Stabw) im dermalen Infiltrat betrug im Mittel 8,0% ± 0,054 Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen. In den im Anschluss an die therapeutischen Maßnahmen entnommenen Hautproben konnte ein prozentualer Anteil von 4,1% ± 0,031 der immunopositiven Zellen festgestellt werden (p < 0,0046). Die Gesamtzahl (Mittelwert ± Stabw) sank von durchschnittlich 8,8 ± 7,1 auf 4,7 ± 4,1 Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen (Tabelle 24, Abbildungen 22-24).

Tabelle 24: Mittlere prozentuale Anteile der Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		P
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	-3,9% (± 0,055)	10,0% (± 0,051)	5,3% (± 0,044)	11,4% (20,3-1,9%)	4,6% (13,3-0%)	
2. dermales Feld	-2,8% (± 0,065)	7,3% (± 0,059)	4,2% (± 0,039)	6,8% (20,7-0%)	3,9% (12,2-0%)	
3. dermales Feld	-4,2% (± 0,067)	6,8% (± 0,077)	2,6% (± 0,040)	4,6% (22,4-0%)	2,5% (15,3-0%)	
Gesamt	-4,0% (± 0,041)	8,0% (± 0,054)	4,1% (± 0,031)	8,7% (21,1-0,7%)	4,1% (9,1-0%)	0,0010

Lediglich in einigen Präparatepaaren fiel eine geringe Anzahl Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen in der Epidermis kombiniert mit einer posttherapeutischen Abnahme auf.

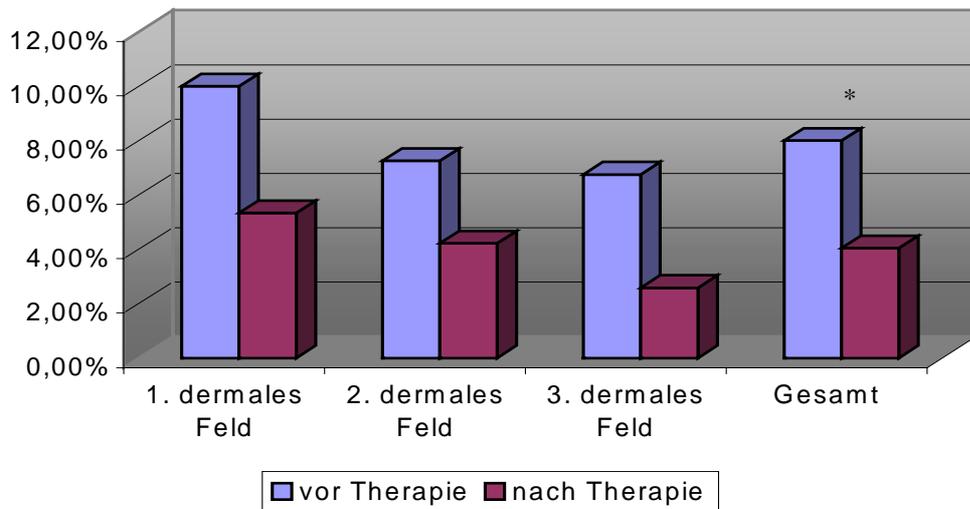


Abbildung 22: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046).

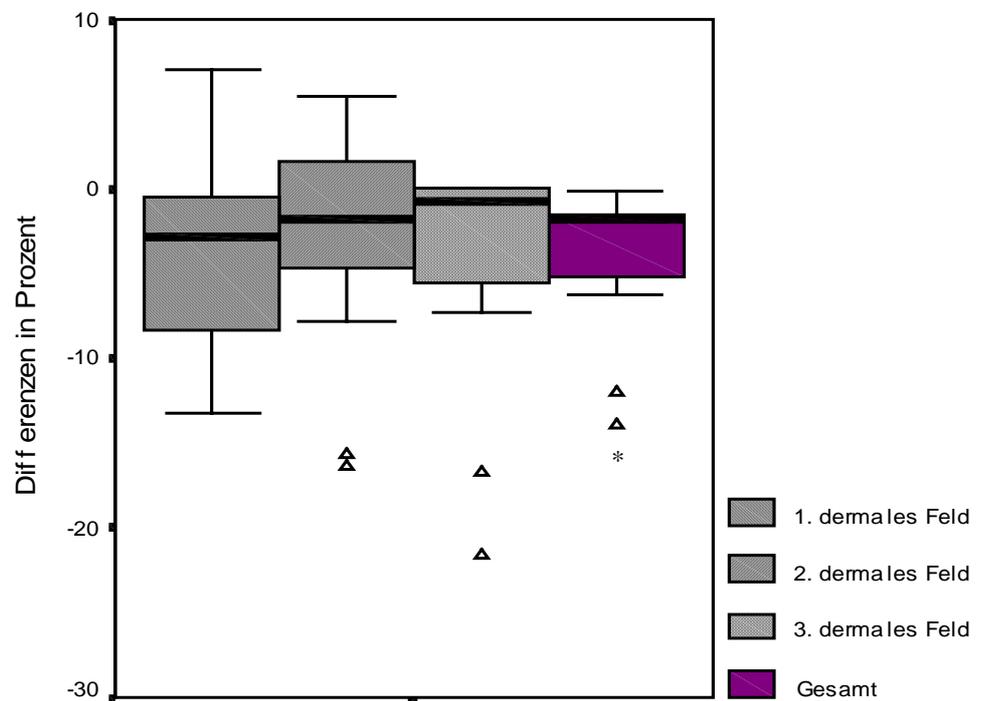


Abbildung 23: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* =p < 0,0046, Δ = Ausreißer).

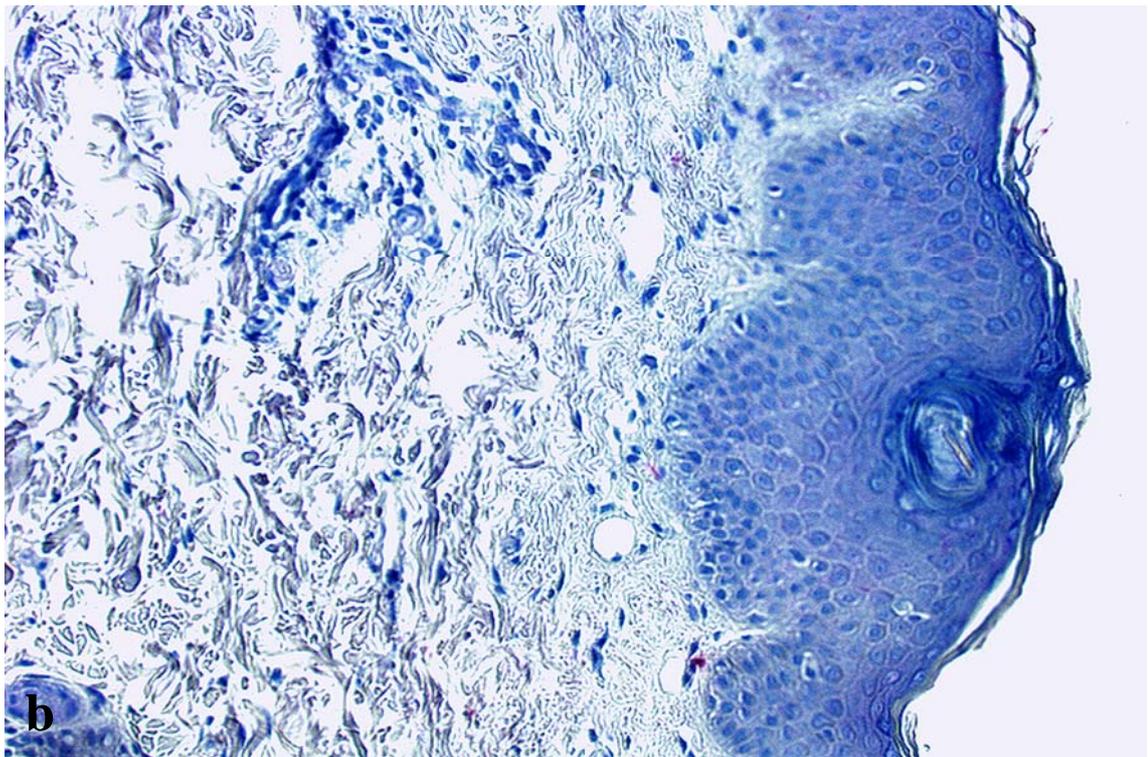
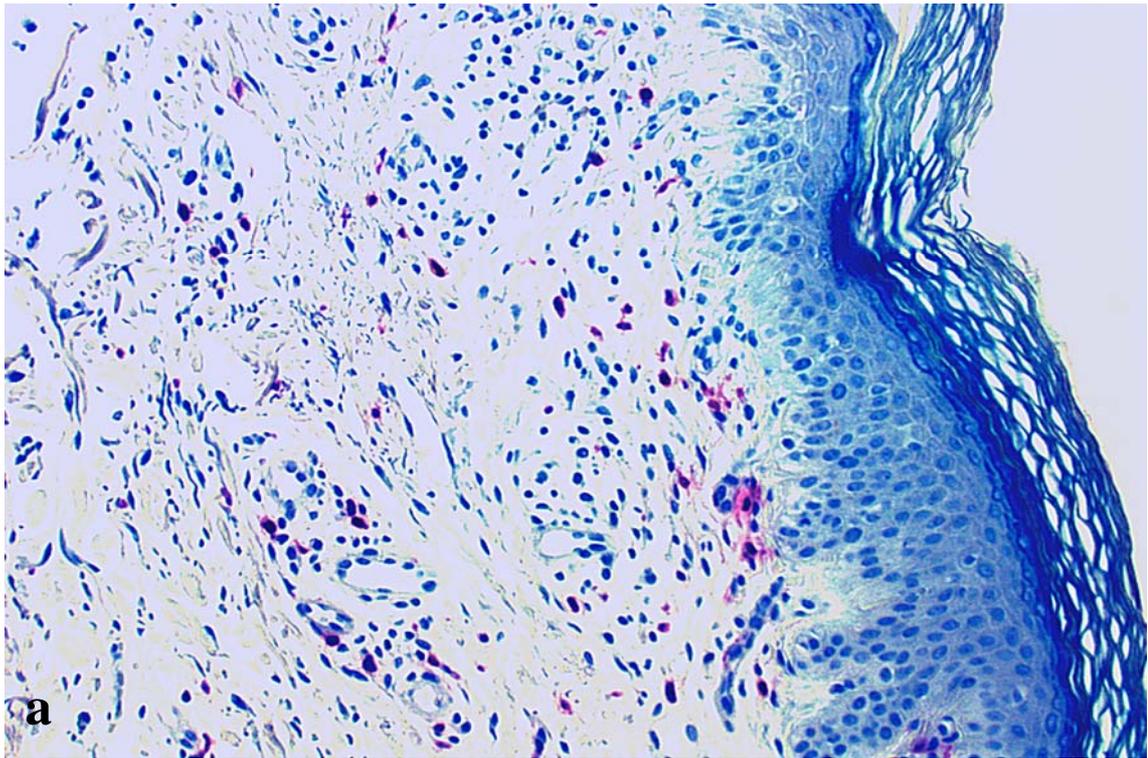


Abbildung 24: Hohe Expression von Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen vor Therapiebeginn (a) sowie starke Abnahme nach erfolgreicher Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie (b). Vergrößerung x 200

### 3.2.8 EG2-Expression

Hinsichtlich der dermalen EG2<sup>+</sup>-Zellen konnte ein Rückgang konstatiert werden. Lediglich ein Patient wies ein inverses histologisches Bild auf (Tabelle 25).

Tabelle 25: Prozentuale Anteile dermalen EG2<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	1,2%	0%	4,1%	1,0%	1,8%	0%
2	0%	0,9%	2,8%	0%	1,1%	0%
3	0%	0%	3,3%	0%	0%	0%
4	0%	0,7%	0,5%	0%	3,4%	0,5%
5	2,7%	0%	1,8%	0%	0%	0%
6	0,8%	1,3%	13,2%	1,1%	2,9%	0%
7	4,6%	0%	17,7%	1,6%	2,5%	0%
8	0%	0%	1,3%	0%	2,5%	0%
9	2,1%	0%	0%	1,1%	0%	0%
10	7,3%	2,7%	16,7%	0%	18,8%	0%
11	0%	0%	3,1%	0,5%	1,1%	0%
12	0%	2,8%	0,8%	0%	0%	2,6%
13	2,3%	0%	2,1%	0%	0%	0%
14	2,8%	1,4%	0%	0%	0%	0%
15	3,9%	0%	0%	1,6%	0%	0%

Im Vergleich zu den prätherapeutischen Ergebnissen konnte im dermalen Infiltrat posttherapeutisch eine durchschnittliche Gesamtzellzahl EG2<sup>+</sup>-Zellen von 0,3 (Median) mit einer Spannweite von 1,1-0 konstatiert werden. Vor Therapiebeginn lag die Gesamtzellzahl bei 1,7 EG2<sup>+</sup>-eosinophiler Granulozyten (Median) und einer Spannweite von 10,0-0,3. Der mittlere prozentuale Anteil der EG2 immunpositiven Zellen (Mittelwert ± Stabw) konnte vor Therapie mit 2,9% ± 0,038 bzw. im Anschluss an die Therapie mit 0,4% ± 0,005 bestimmt werden (Tabelle 26, Abbildungen 25-27).

Tabelle 26: Mittlere prozentuale Anteile der EG2<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	-1,2% (± 0,022)	1,9% (± 0,022)	0,7% (± 0,010)	1,2% (7,3-0%)	0% (2,8-0%)	
2. dermales Feld	-4,0% (± 0,059)	4,5% (± 0,061)	0,5% (± 0,006)	2,1% (17,7-0%)	0% (1,6-0%)	
3. dermales Feld	-2,1% (± 0,047)	2,3% (± 0,047)	0,2% (± 0,007)	1,1% (18,8-0%)	0% (2,6-0%)	
Gesamt	-2,4% (± 0,037)	2,9% (± 0,038)	0,4% (± 0,005)	1,3% (14,3-0,3%)	0,4% (1,8-0%)	0,0126

Epidermal kam es hierbei bei keinem der Patienten zu einer Darstellung immunpositiver Zellen.

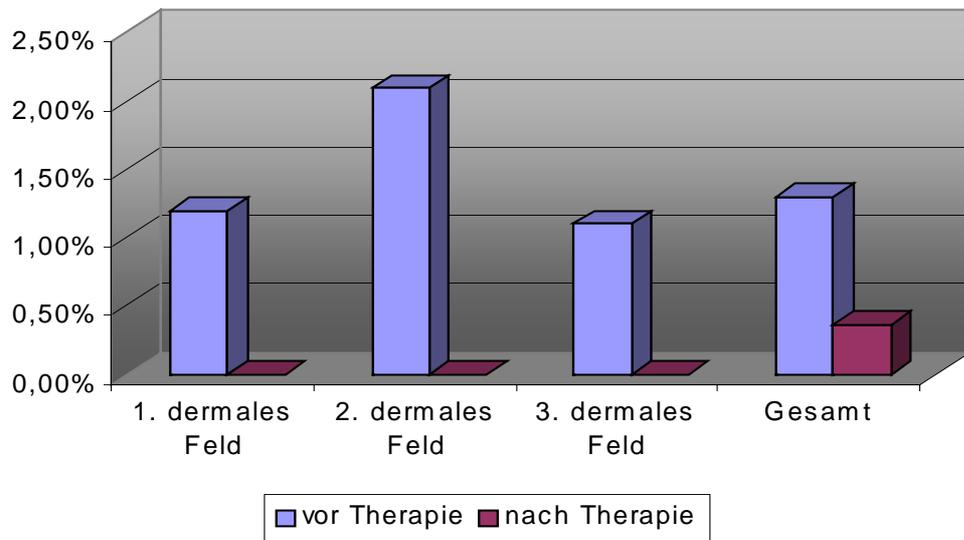


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Mediane EG2<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.

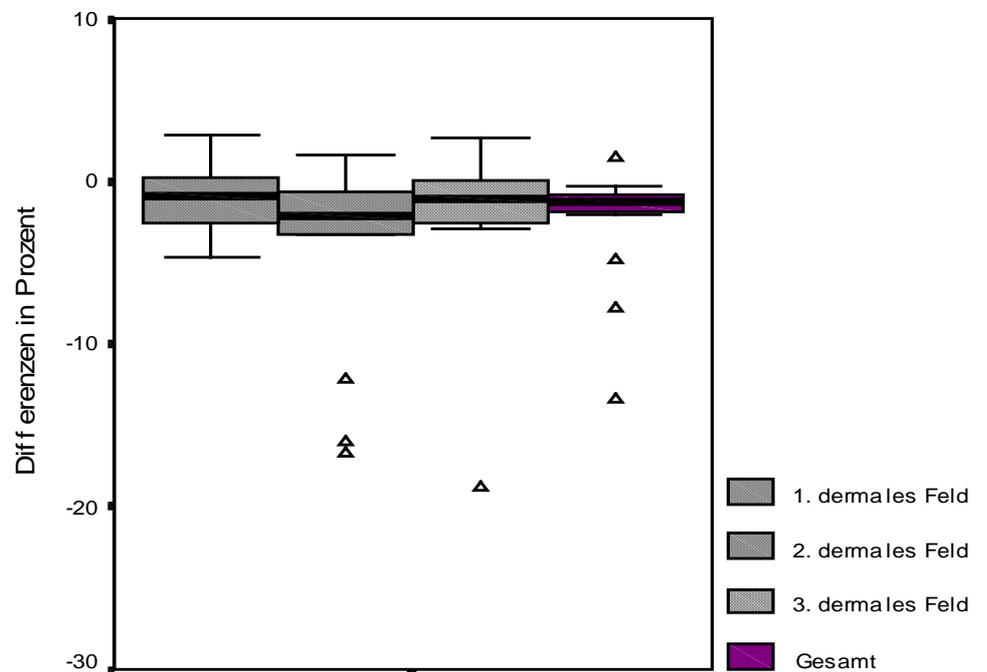


Abbildung 26: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte EG2<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (Δ = Ausreißer).

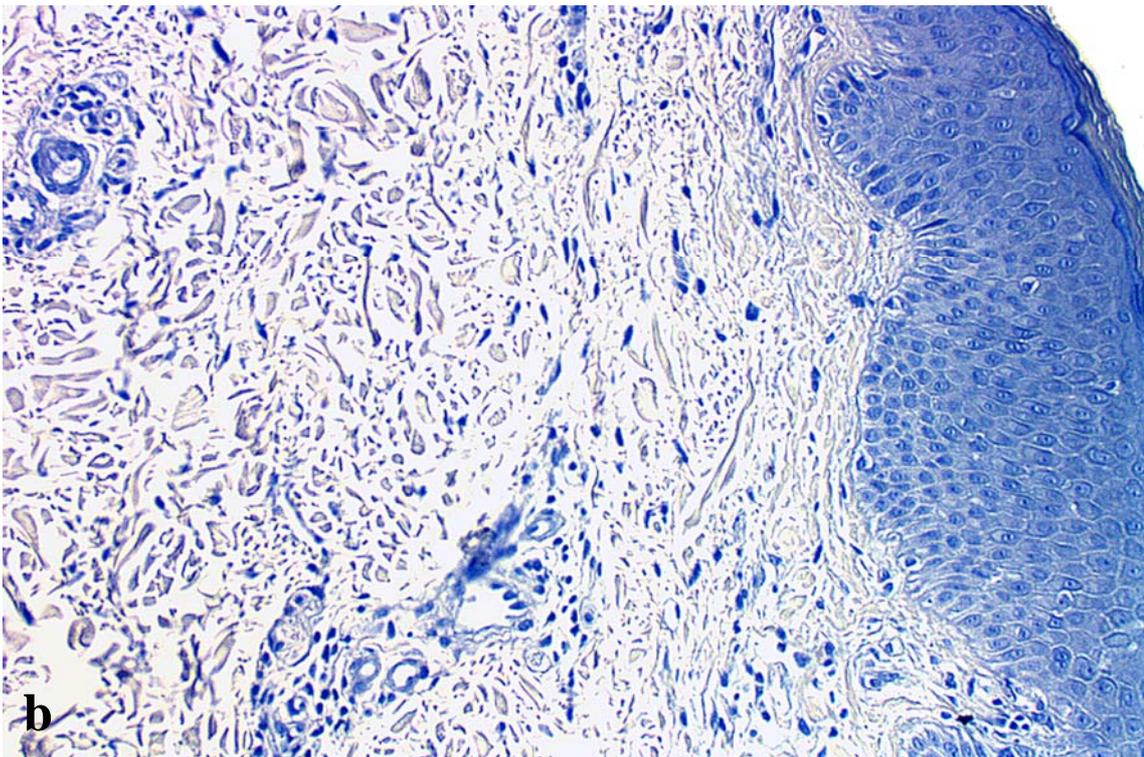
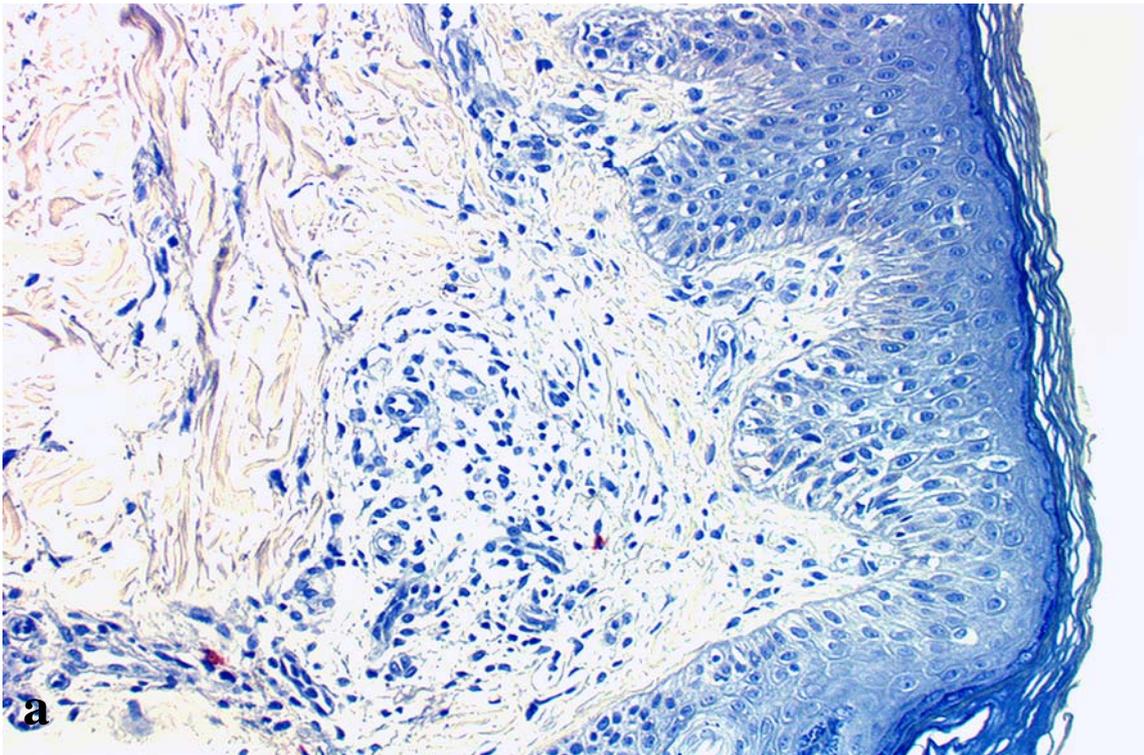


Abbildung 27: Depletion der aktivierten EG2<sup>+</sup>-Eosinophilen im dermalen Infiltrat nach applizierter UVA1-Phototherapie (b) im Gegensatz zum histologischen Bild vor Behandlungsbeginn (a). Vergrößerung x 200

### 3.2.9 Antihumane-Mastzell-Tryptase-Expression

Die Auswertung Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen zeigte im Patientenkollektiv ein uneinheitliches Bild mit einer Steigerung bei neun und einer Minderung bei sechs Patienten (Tabelle 27).

Tabelle 27: Prozentuale Anteile dermalen Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	5,6%	18,6%	13,3%	16,6%	27,0%	21,1%
2	13,2%	11,5%	11,6%	24,0%	17,2%	26,9%
3	20,5%	15,3%	5,4%	35,3%	9,3%	29,3%
4	12,0%	9,4%	15,3%	7,2%	11,5%	15,8%
5	15,8%	4,6%	16,7%	8,5%	12,7%	0%
6	16,1%	16,4%	14,6%	7,8%	0%	17,2%
7	12,0%	31,5%	14,4%	13,2%	17,2%	26,3%
8	19,5%	28,7%	23,8%	16,2%	33,3%	26,0%
9	18,4%	22,0%	15,2%	12,5%	20,9%	8,3%
10	7,8%	19,2%	16,7%	26,1%	0%	21,8%
11	19,0%	19,2%	18,0%	15,5%	12,7%	20,4%
12	16,8%	15,9%	18,2%	7,8%	34,5%	16,7%
13	12,7%	18,7%	18,2%	12,5%	16,7%	20,0%
14	11,0%	9,7%	12,5%	10,9%	26,7%	26,7%
15	7,1%	27,5%	10,2%	17,7%	25,0%	22,0%

Im unbehandelten Zustand konnte eine mittlere Gesamtzellzahl Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen (Mittelwert  $\pm$  Stabw) von  $18,1 \pm 7,9$  Zellen detektiert werden. Der Prozentanteil der Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen (Mittelwert  $\pm$  Stabw) vor Bestrahlungsbeginn belief sich auf  $15,5\% \pm 0,044$  Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen. Der korrespondierende posttherapeutische Anteil betrug demgegenüber  $17,7\% \pm 0,059$  immunopositive Zellen (Tabelle 28, Abbildungen 28-30). Die Bestimmung der Gesamtzellzahl zeigte einen Wert von  $17,8 \pm 8,7$  positiven Zellen auf.

Tabelle 28: Mittlere prozentuale Anteile der Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert ( $\pm$ Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	4,1% ( $\pm 0,091$ )	13,8% ( $\pm 0,047$ )	17,9% ( $\pm 0,075$ )	13,2% (20,5-5,6%)	18,6% (31,5-4,6%)	
2. dermales Feld	0,5% ( $\pm 0,107$ )	14,9% ( $\pm 0,042$ )	15,5% ( $\pm 0,079$ )	15,2% (23,8-5,4%)	13,2% (35,3-7,2%)	
3. dermales Feld	2,8% ( $\pm 0,164$ )	17,7% ( $\pm 0,105$ )	19,9% ( $\pm 0,077$ )	17,2% (34,5-0%)	21,1% (29,3-0%)	
Gesamt	2,3% ( $\pm 0,083$ )	15,5% ( $\pm 0,044$ )	17,7% ( $\pm 0,059$ )	15,1% (25,5-8,2%)	18,4% (26,6-4,4%)	0,1349

Sowohl vor der applizierten UVA1-Phototherapie als auch im geringeren Ausmaß nach der Behandlung konnten vereinzelt Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen in der Epidermis ausgemacht werden.

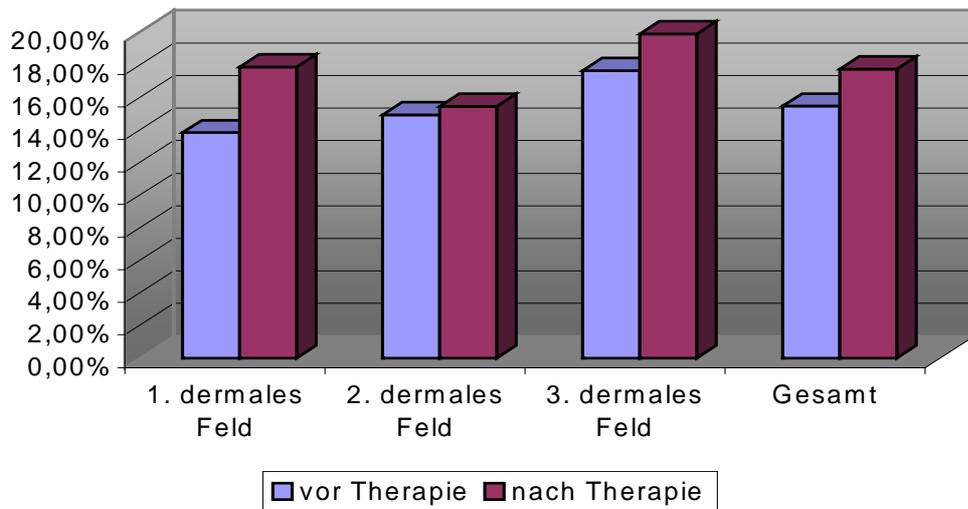


Abbildung 28: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.

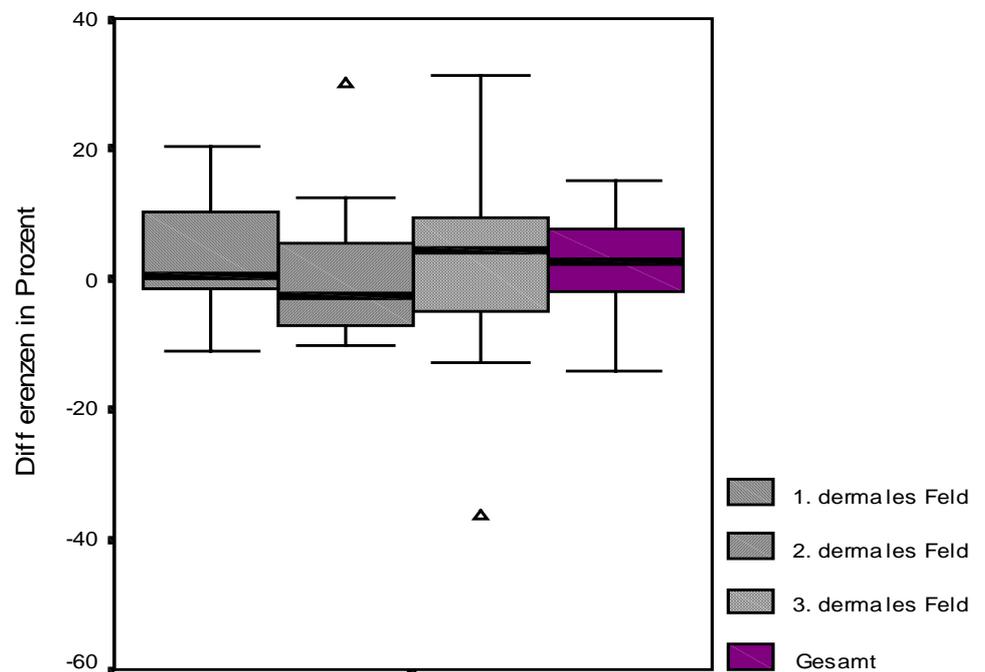


Abbildung 29: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Kollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt ( $\Delta$  = Ausreißer).

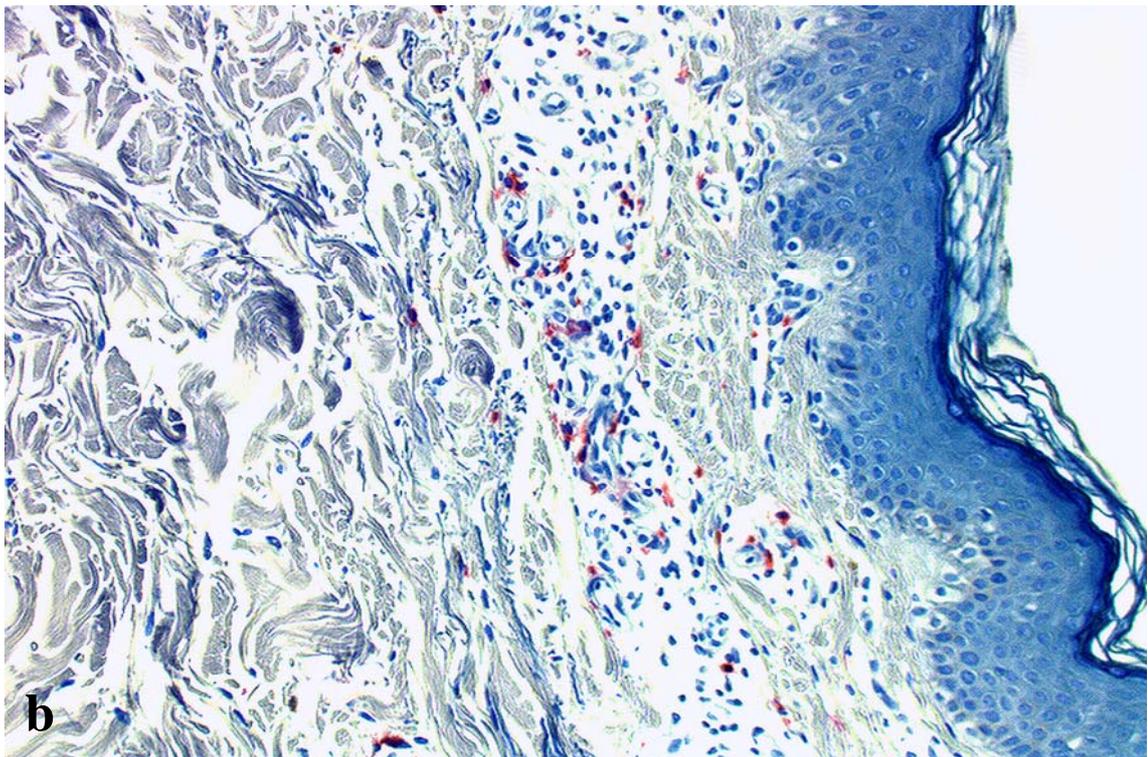
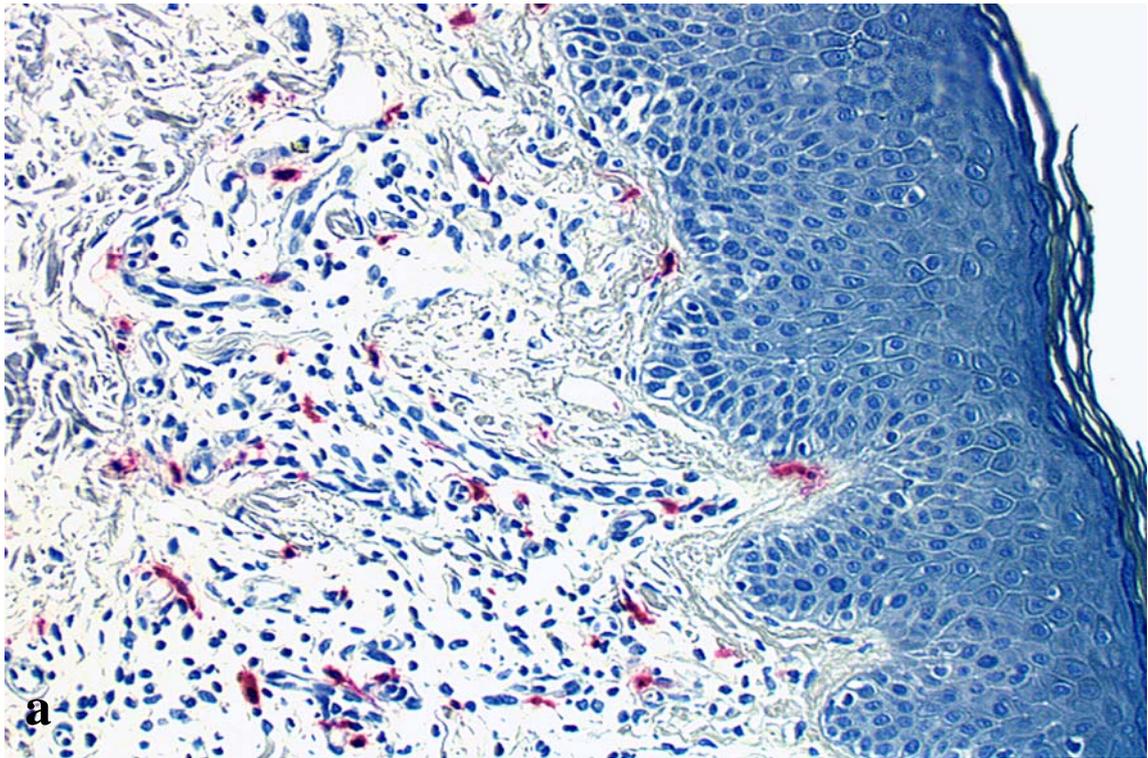


Abbildung 30: Überraschende Stagnation beziehungsweise Zunahme des prozentualen Anteils dermalen Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zwischen dem Zustand vor (a) und nach (b) Applikation einer Kumulativdosis von 750 J/cm<sup>2</sup>. Vergrößerung x 200

### 3.2.10 HLA-DR-Expression

Bei elf der 15 Patienten manifestierte sich eine Reduktion der HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen infolge der Medium-dose-UVA1-Phototherapie (Tabelle 29).

Tabelle 29: Prozentuale Anteile dermalen HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	41,7%	7,4%	27,4%	13,9%	28,6%	6,1%
2	74,2%	55,2%	78,4%	52,3%	33,7%	55,6%
3	54,5%	53,2%	81,5%	80,5%	94,6%	60,5%
4	13,3%	7,3%	22,6%	0%	12,2%	2,9%
5	16,9%	25,7%	0%	18,3%	0%	1,0%
6	70,9%	3,1%	62,2%	45,7%	42,3%	6,0%
7	57,9%	44,8%	77,5%	7,4%	35,8%	0%
8	40,3%	0%	31,3%	0%	28,8%	0%
9	28,3%	63,5%	13,0%	64,0%	6,7%	58,3%
10	31,0%	38,1%	25,0%	27,8%	9,1%	12,7%
11	56,1%	39,2%	71,3%	27,9%	10,3%	10,3%
12	45,7%	46,5%	67,1%	14,0%	47,6%	0%
13	27,6%	56,7%	30,1%	52,1%	0%	53,8%
14	50,3%	16,6%	21,7%	5,7%	0%	7,8%
15	57,1%	16,5%	64,8%	6,7%	7,1%	2,1%

Vor Therapiebeginn konnte hinsichtlich der Zellzählungen der HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen eine Gesamtzellzahl von 56,5 (Median) mit einer Spannweite von 210,9-9,9 pro Raster ausgemacht werden. Prozentual stellten sich 37,7% ± 0,208 HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen (Mittelwert ± Stabw) insgesamt dar. Nach Ende der Therapie wurde eine Zellzahl von 33,1 (Median) mit einer Spannweite von 153,0-0 bezüglich der HLA-DR immunopositiven Zellen festgestellt. Der prozentuale Anteil der HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen betrug posttherapeutisch 25,9% ± 0,219 (Tabelle 30, Abbildungen 31-33).

Tabelle 30: Mittlere prozentuale Anteile der HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert (± Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	-12,8% (± 0,278)	44,4% (± 0,183)	31,6% (± 0,218)	45,7% (74,2-13,3%)	38,1% (63,5-0%)	
2. dermales Feld	-16,5% (± 0,335)	44,9% (± 0,275)	27,8% (± 0,253)	31,3% (81,5-0%)	18,3% (80,5-0%)	
3. dermales Feld	-4,4% (± 0,301)	23,8% (± 0,254)	18,5% (± 0,244)	12,2% (94,6-0%)	6,1% (60,5-0%)	
Gesamt	-11,5 (± 0,258)	37,7% (± 0,208)	25,9% (± 0,219)	33,5% (76,9-5,6%)	18,3% (64,7-0%)	0,0508

Epidermal konnte ebenfalls ein diskretes Vorkommen HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen verbunden mit einem posttherapeutischen Rückgang festgestellt werden.

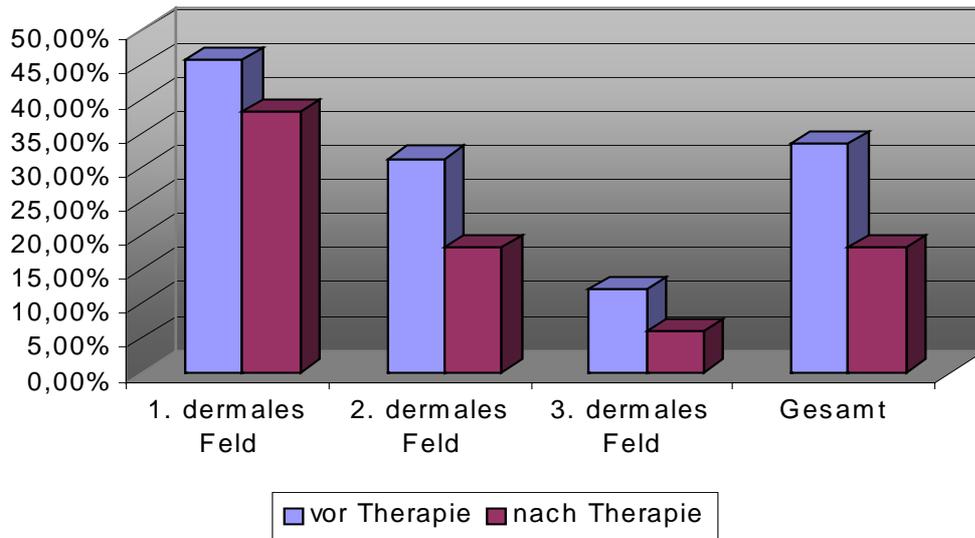


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Mediane HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt.

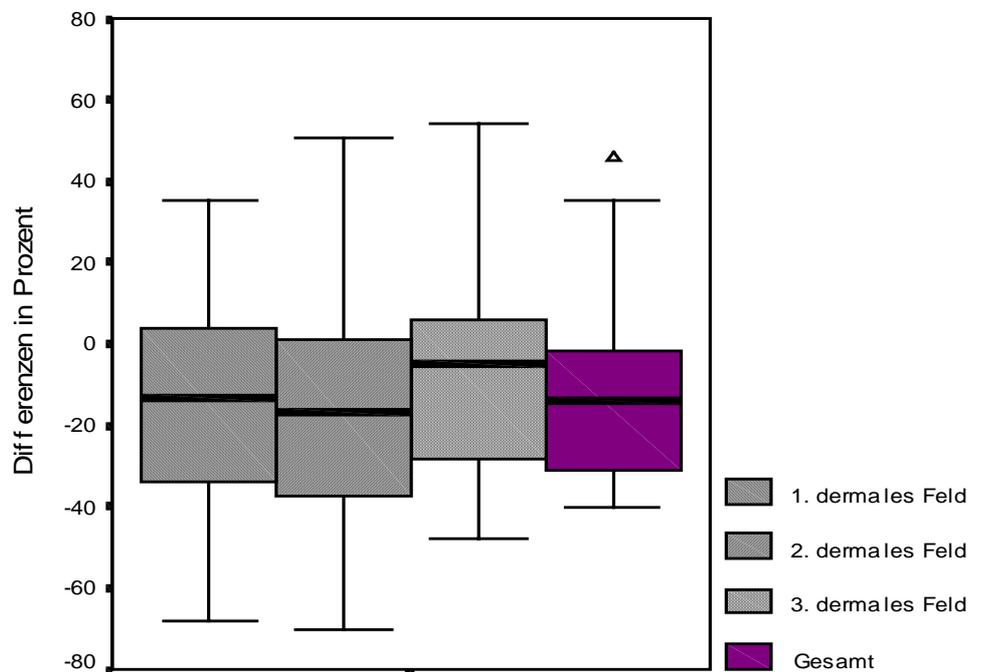


Abbildung 32: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (Δ = Ausreißer).

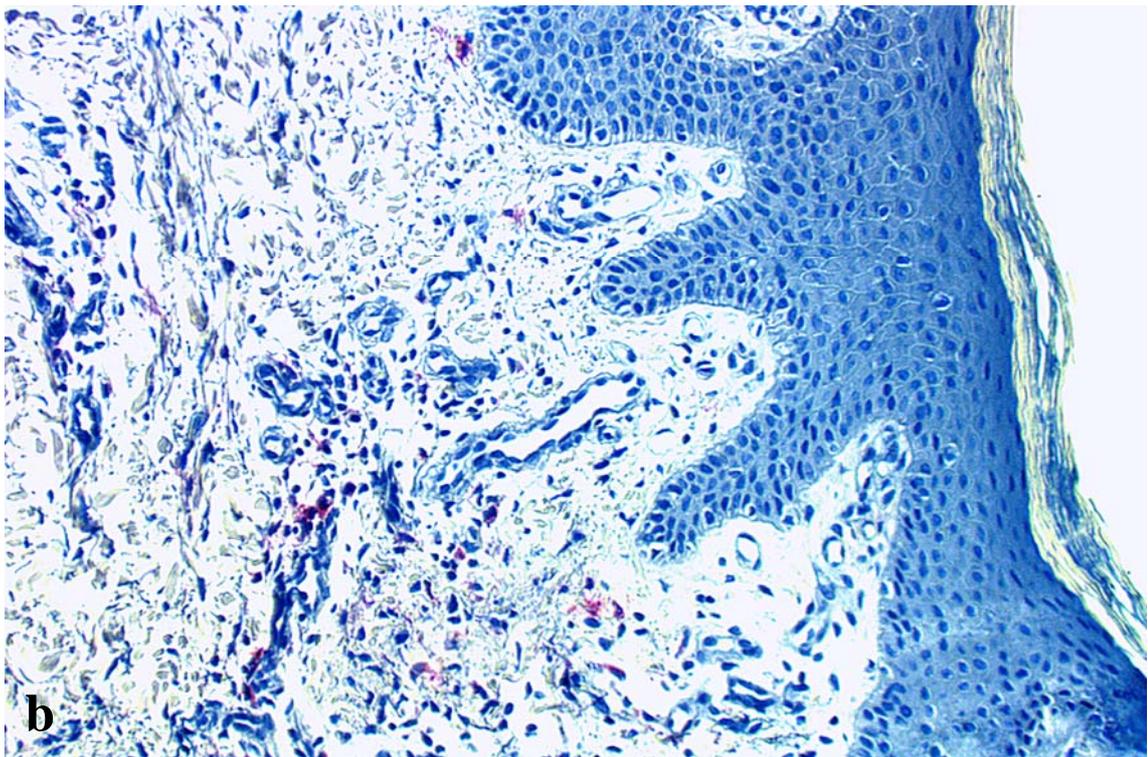
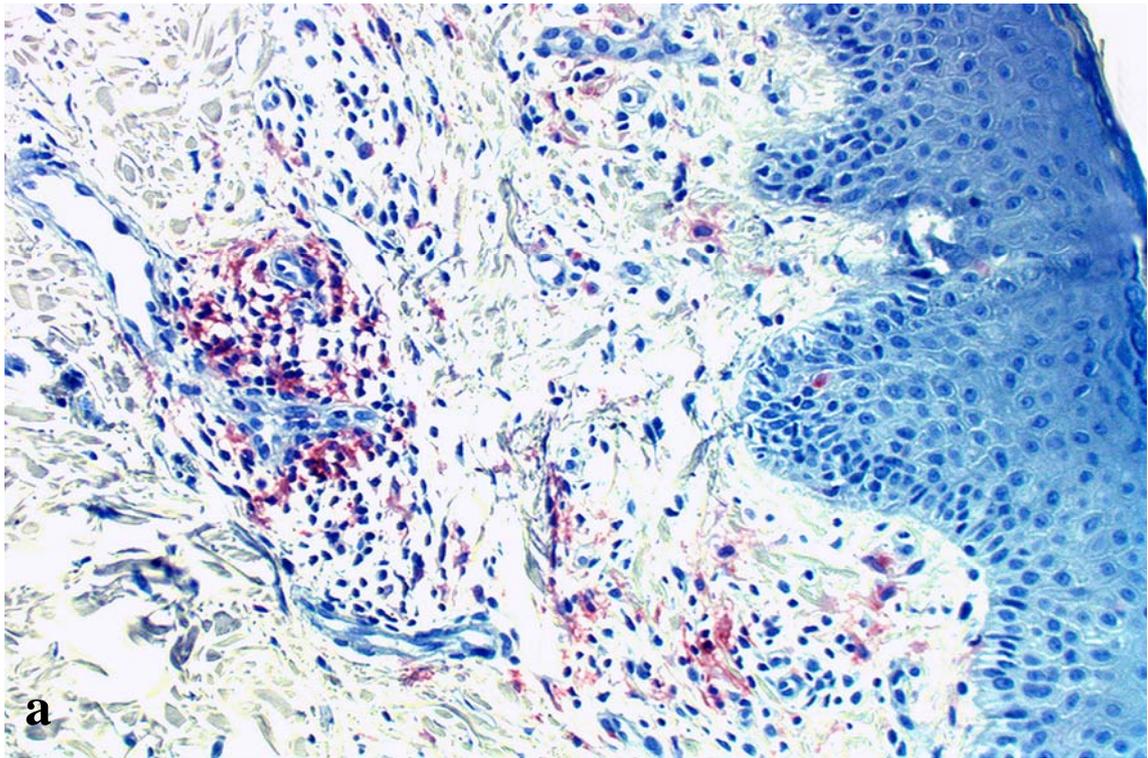


Abbildung 33: Abnahme der HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen im immunhistochemischen Bild vor (a) beziehungsweise nach (b) Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie. Vergrößerung x 200

### 3.2.11 MIB-1-Expression

Nach der phototherapeutischen Behandlung mittels UVA1-Kaltlichtbestrahlung stellte sich ein Rückgang der MIB-1<sup>+</sup>-Zellen bei allen untersuchten Patienten dar (Tabelle 31).

Tabelle 31: Prozentuale Anteile dermaler MIB-1<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	1. dermales Feld		2. dermales Feld		3. dermales Feld	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	0%	2,0%	8,2%	0%	1,3%	0%
2	6,1%	0%	0%	1,5%	7,8%	7,5%
3	13,6%	5,6%	9,4%	0%	0%	0%
4	6,1%	0%	15,1%	1,0%	14,9%	0%
5	7,1%	1,4%	5,6%	8,7%	3,5%	0%
6	5,0%	1,2%	10,6%	1,4%	4,8%	0%
7	4,1%	1,1%	9,5%	1,5%	9,8%	0%
8	26,8%	8,1%	18,6%	0%	6,7%	0%
9	6,7%	2,6%	6,1%	0,8%	2,9%	0%
10	9,3%	3,3%	22,4%	1,6%	3,3%	10,0%
11	9,7%	9,1%	15,6%	0%	6,7%	2,1%
12	1,5%	0%	15,9%	3,2%	0%	0%
13	1,4%	2,7%	8,7%	3,9%	0%	0%
14	6,5%	1,6%	5,6%	2,4%	0%	3,8%
15	3,7%	1,9%	9,8%	2,5%	0%	0%

MIB-1<sup>+</sup>-Zellen konnten vor der UVA1-Bestrahlung mit einer Gesamtzellzahl (Mittelwert  $\pm$  Stabw) von  $9,5 \pm 6,5$  Zellen pro Zählraster detektiert werden. Der Prozentanteil der MIB-1<sup>+</sup>-Zellen (Mittelwert  $\pm$  Stabw) vor Therapiebeginn belief sich auf  $7,3\% \pm 0,040$  immunopositive Zellen. Der korrespondierende posttherapeutische Anteil betrug demgegenüber  $2,1\% \pm 0,013$  MIB-1<sup>+</sup>-Zellen ( $p < 0,0046$ ) (Tabelle 32, Abbildungen 34-36). Die Bestimmung der Gesamtzellzahl zeigte einen Wert von  $2,6 \pm 2,2$  positiven Zellen auf.

Tabelle 32: Mittlere prozentuale Anteile der MIB-1<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie

Status	Differenz	Mittelwert ( $\pm$ Stabw)		Median (Range)		p
		unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	
1. dermales Feld	-4,5% ( $\pm 0,049$ )	7,2% ( $\pm 0,065$ )	2,7% ( $\pm 0,028$ )	6,1% (26,8-0%)	1,9% (9,1-0%)	
2. dermales Feld	-8,8% ( $\pm 0,068$ )	10,7% ( $\pm 0,058$ )	1,9% ( $\pm 0,022$ )	9,5% (22,4-0%)	1,5% (8,7-0%)	
3. dermales Feld	-2,5% ( $\pm 0,054$ )	4,1% ( $\pm 0,044$ )	1,6% ( $\pm 0,031$ )	3,3% (14,9-0%)	0% (10,0-0%)	
Gesamt	-5,3% ( $\pm 0,039$ )	7,3% ( $\pm 0,040$ )	2,1% ( $\pm 0,013$ )	5,8% (17,4-3,2%)	1,9% (5,0-0,7%)	<0,0001

Zusätzlich konnte eine Anfärbung epidermaler Zellen vornehmlich im Stratum basale beobachtet werden. In der Regel nahm deren Anzahl nach erfolgter UVA1-Phototherapie ab.

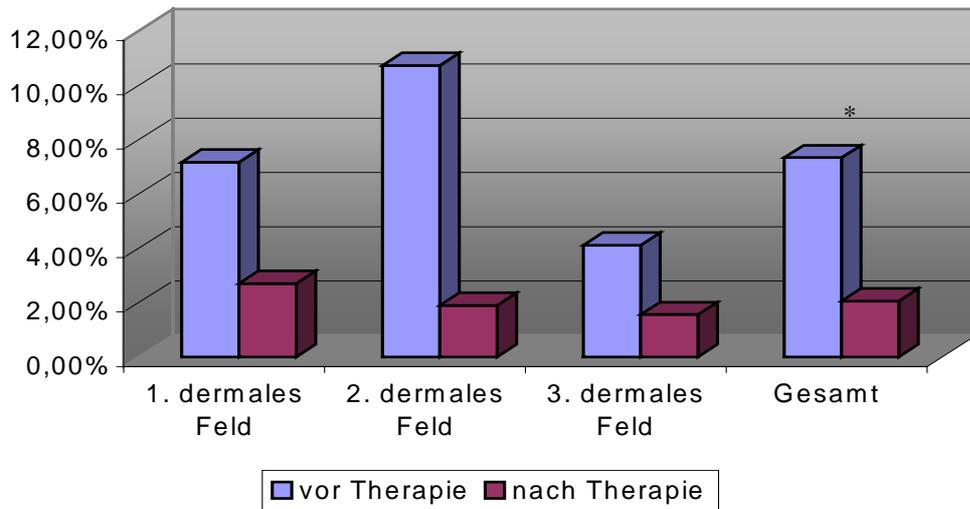


Abbildung 34: Graphische Darstellung der prozentualen Mittelwerte MIB-1<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* = p < 0,0046).

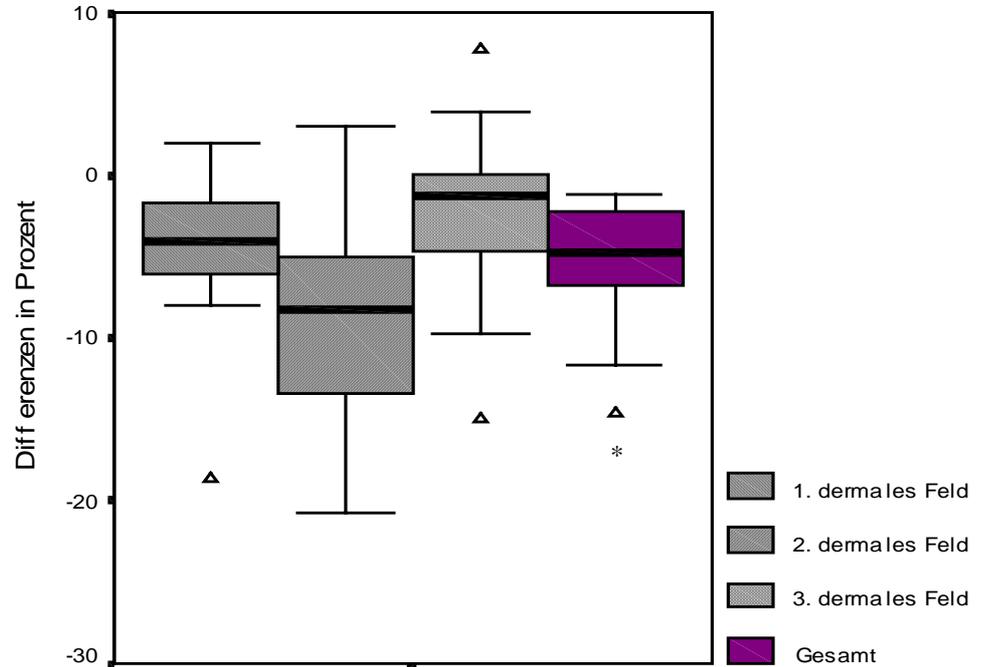


Abbildung 35: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der Differenzen prä- und posttherapeutischer prozentualer Mittelwerte MIB-1<sup>+</sup>-Zellen des gesamten Patientenkollektivs (n=15) in drei dermalen Feldern sowie insgesamt (\* = p < 0,0046, Δ = Ausreißer).

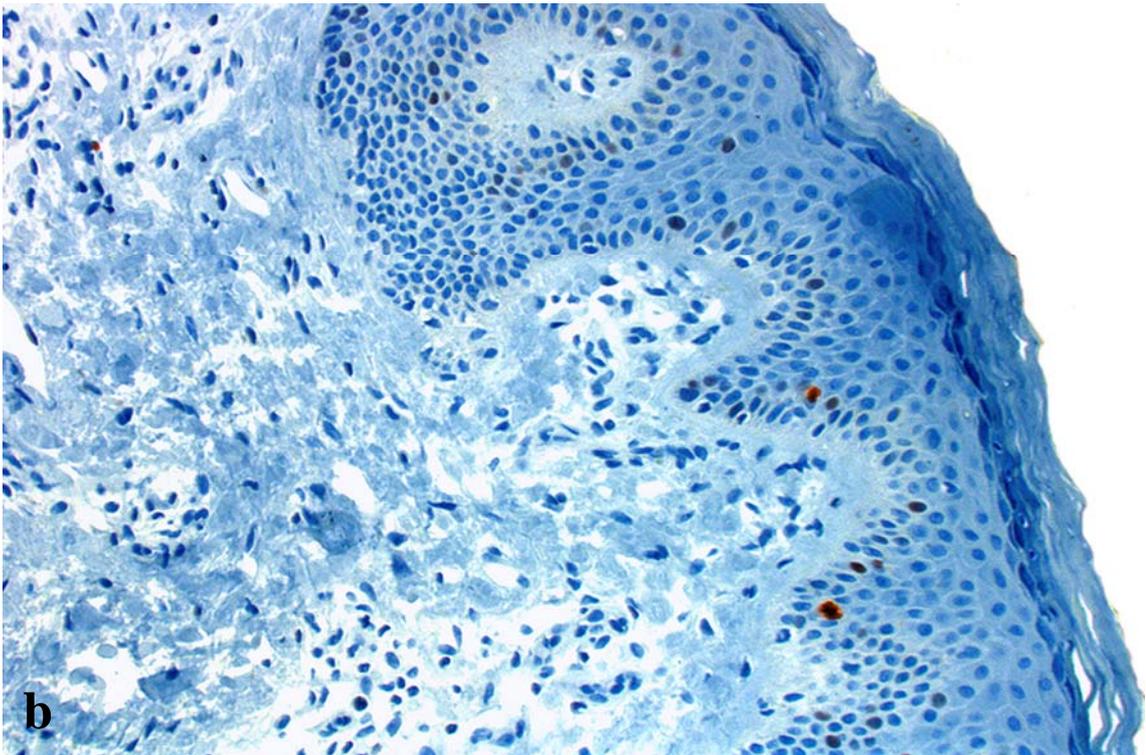
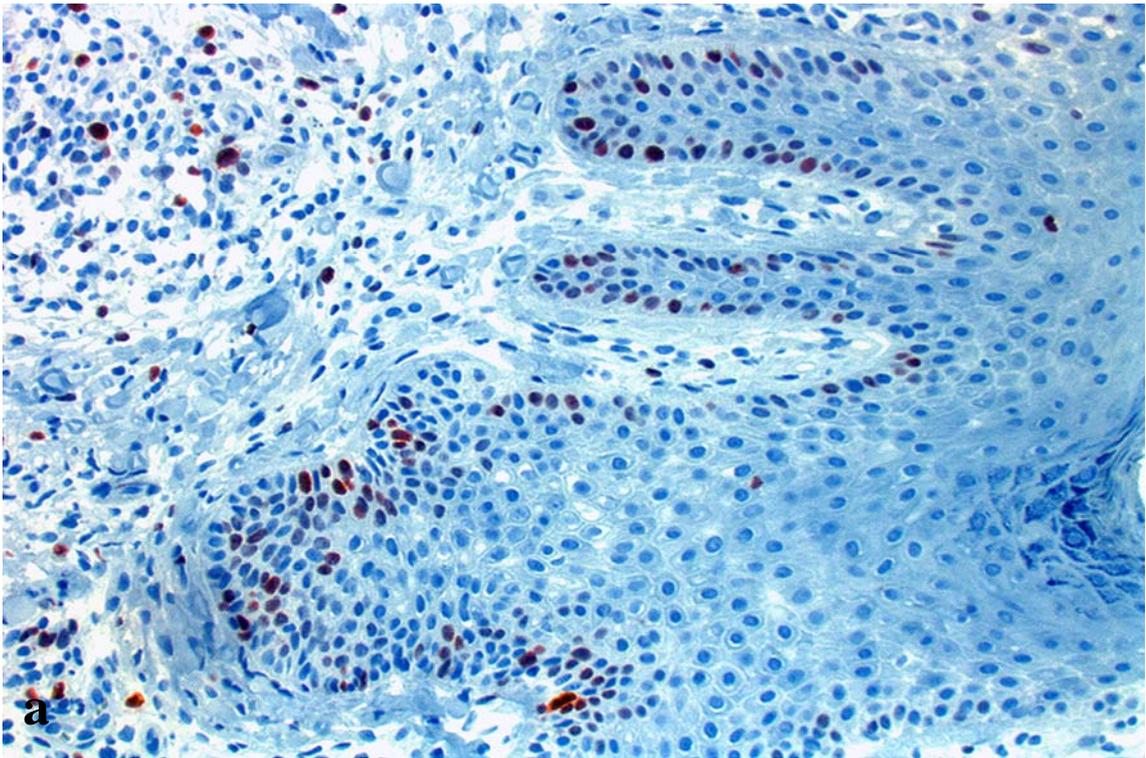


Abbildung 36: Signifikanter Rückgang der Expression von MIB-1 (b) von prätherapeutisch erhöhten Werten immunopositiver Zellen. Vergrößerung x 200

### 3.2.12 ISEL-Fluoreszenz

Bei 14 der 15 Patienten konnte im Rahmen der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie ein Anstieg der ISEL<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat festgestellt werden (Tabelle 33, Abbildung 37).

Tabelle 33: Semiquantitative Auswertung dermaler ISEL<sup>+</sup>-Zellen jeweils vor und nach Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in drei dermalen Feldern unterhalb der dermoepidermalen Junktion

	prätherapeutisch	posttherapeutisch
1	-	+
2	-	++
3	-	+
4	-	+
5	+	+++
6	-	+
7	-	-
8	-	+
9	-	+
10	-	++
11	-	+
12	-	++
13	-	+
14	-	+
15	-	+

Patient Nr.

Epidermal stellten sich bei allen Patienten einige Keratinozyten des Stratum granulosum positiv dar.

In den Negativkontrollen konnten, abgesehen von einer unspezifischen, gelblichen Autofluoreszenz der Erythrozyten, keine ISEL<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden. Demgegenüber wies die Positivkontrolle eine positive Markierung aller Zellkerne auf.

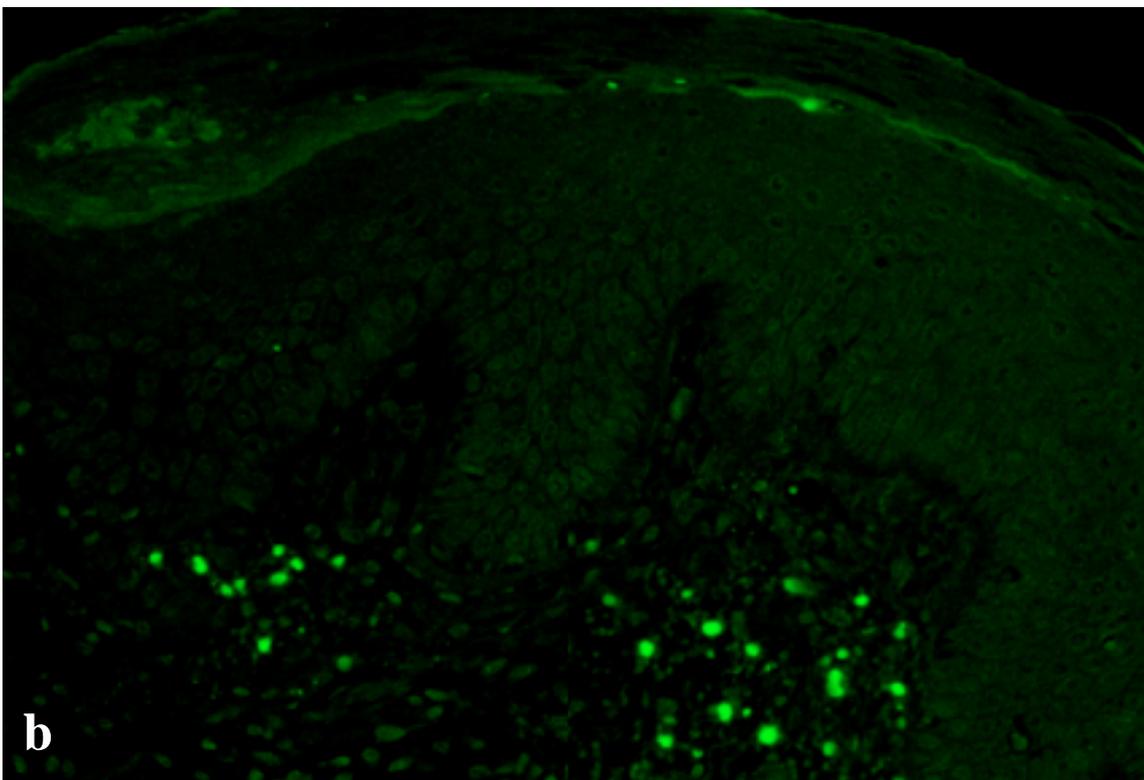
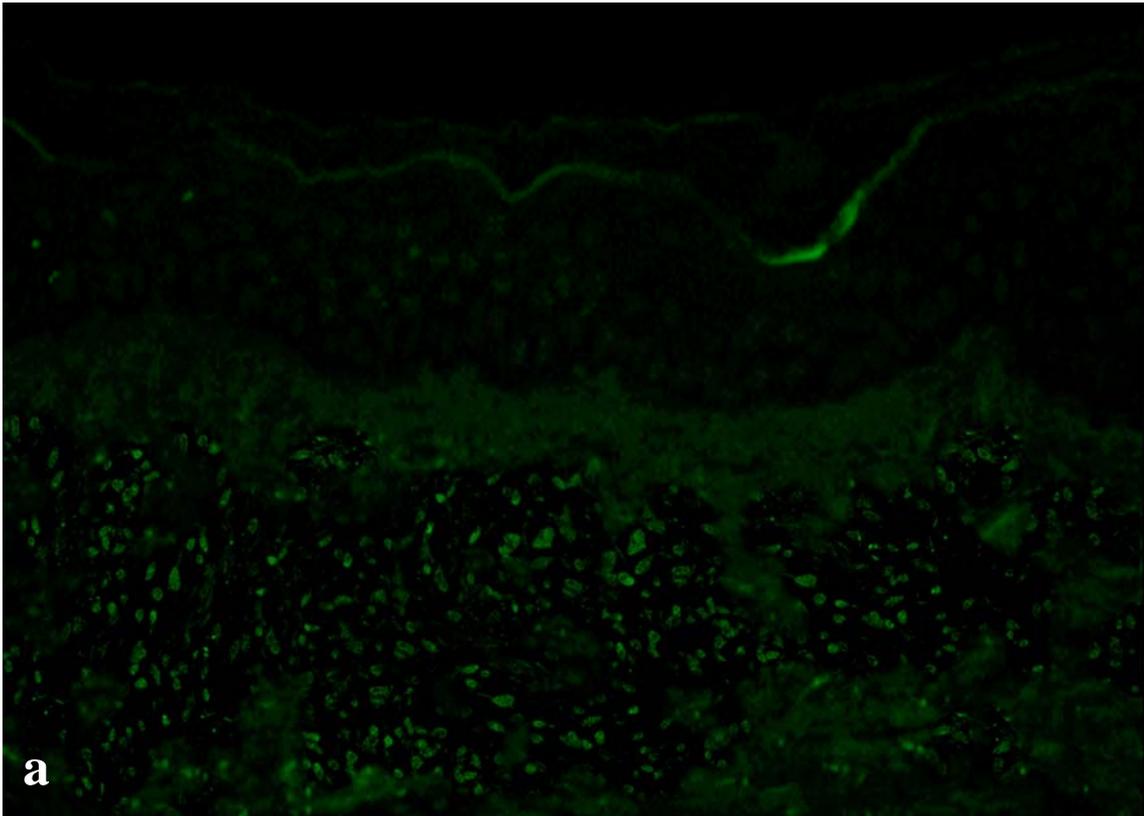


Abbildung 37: Einige ISEL<sup>+</sup>-Keratinozyten vor Therapiebeginn (a) sowie deutliche Zunahme ISEL<sup>+</sup> dermaler Zellen nach erfolgreicher Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie (b). Vergrößerung x 200

### 3.2.13 Klinische Resultate

Vor Beginn der Medium-dose-UVA1-Phototherapie konnte der mittlere SCORAD-Score mit 74 (Median) Punkten und einer Spannweite von 89-51 bestimmt werden. Im Zuge der Behandlung konnte eine kontinuierliche Besserung des Hautzustands beobachtet werden. Posttherapeutisch konnte ein Rückgang des SCORAD-Scores auf einen Wert von 20 (Median) mit einer Spannweite von 55-4 evaluiert werden (Abbildung 38).

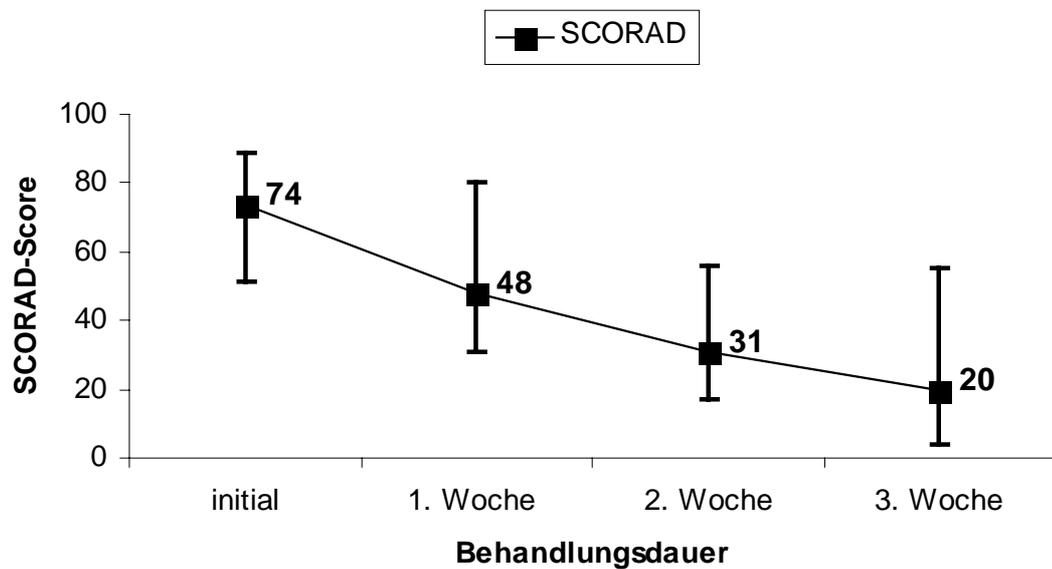


Abbildung 38: Darstellung des Behandlungserfolgs der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie bei 15 Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis (Median, Spannweite).

Abgesehen von einer diskreten Bräunung der Haut wurden bei den Patienten keine Nebenwirkungen beobachtet (Abbildung 39).



Abbildung 39: Klinisches Bild eines repräsentativen Patienten vor (a) beziehungsweise nach (b) erfolgreicher Medium-dose-UVA1-Phototherapie.

## 4 Diskussion

### 4.1 Fragestellung

Zielsetzung der aktuellen Studie war die Durchführung immunhistologischer Untersuchungen zum Wirkmechanismus der UVA1-Phototherapie bei schwerer atopischer Dermatitis *in vivo*. Um die Beeinflussung der immunpathologischen Alterationen durch die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie zu verdeutlichen, erfolgte die Darstellung wichtiger und für die Immunpathogenese relevanter Zellpopulationen mittels immunhistochemischer Färbetechniken, darunter die Gesamtheit der T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>), die T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>), die T-Suppressorzellen (CD8<sup>+</sup>), die aktivierten Eosinophilen (EG2<sup>+</sup>), die Langerhanszellen (CD1a<sup>+</sup>) sowie Mastzellen (Tryptase<sup>+</sup>). Darüber hinaus befasst sich die vorliegende Arbeit mit dem Aktivierungszustand des dermalen Infiltrats mittels Bestimmung der Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen, HLA-DR<sup>+</sup>- und MIB-1<sup>+</sup>-Zellen sowie mit der Beeinflussung apoptotischer Zellvorgänge mit Hilfe der Detektierung von ISEL<sup>+</sup>-, p53<sup>+</sup>- und bcl-2<sup>+</sup>-Zellen.

Unter Verwendung der speziellen Immunhistochemie sollte demnach der modulierende Effekt der UVA1-Phototherapie auf Zellpopulationen, Aktivierungszustand der Zellen sowie auf die Induktion des programmierten Zelltods untersucht als auch mit dem festgestellten klinischen Behandlungserfolg in Korrelation gebracht werden.

### 4.2 Die atopische Dermatitis: Klinik und Pathogenese

Die atopische Dermatitis bezeichnet eine chronisch-ekzematöse, genetisch disponierte Hauterkrankung, die vorwiegend bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen, getriggert durch vielfältige Umweltfaktoren, in Erscheinung tritt. Populationsstudien lassen daran denken, dass bereits 15% der Bevölkerung zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Kindheit betroffen sind [87]. Andere Studien weisen auf eine Prävalenz bei Schulkindern von circa 10% und eine Gesamtzahl der Erkrankten von 3 Millionen in Deutschland hin [14, 97]. Charakterisiert wird die atopische Dermatitis klinisch vornehmlich durch starken Pruritus, trockene Haut, überwiegenden Befall der Beugeseiten, frühe Symptomanifestation, hohe IgE-Level und eine oftmals positive Familienanamnese [15]. Die atopische Dermatitis gehört zur Gruppe der Atopien. Atopie kann als eine

genetische Prädisposition hinsichtlich einer Hypersensibilität von Haut und Schleimhäuten gegen Umweltstoffe einhergehend mit einer vermehrten IgE-Antikörperbildung und modifizierter unspezifischer Reaktionsbereitschaft charakterisiert werden. In Hinblick hierauf wird eine Assoziation der atopischen Dermatitis mit Krankheiten wie der allergischen Rhinitis oder auch Asthma bronchiale festgestellt [87].

Zum Gesamtkomplex der differenzierten pathophysiologischen und immunpathologischen Alterationen des Patienten mit atopischer Dermatitis gehören eine genetischen Prädisposition, Störung der Immunreaktion sowie des Zytokinmusters, Allergenexposition und gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Provokationsfaktoren, aberrierende neuroendokrine Mechanismen, Hautbarriereschäden als auch eine psychosomatische Komponente. Bezüglich der immunologischen Alterationen ist die deutliche Erhöhung der IgE-Antikörper von besonderem Interesse der Forschung.

Neben der Überproduktion an IgE-Antikörpern und der defekten zellulären Immunantwort liegt die atopische Dermatitis histologisch in einer Vielzahl pathophysiologischer Veränderungen begründet. In einer simplifizierten Darstellung erfährt das Bild der Entzündung sein morphologisches Korrelat in einem dichten perivaskulären Infiltrat von Th2-Zellen mit seinem spezifischen Zytokinmuster, darunter besonders das IL-4, einer verminderten Anzahl an CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten sowie der erhöhten Präsenz hyperstimulatorischer Langerhanszellen, mononukleärer Zellen, Mastzellen in unterschiedlichen Degranulationsstadien und eosinophiler Granulozyten [16, 31, 87]. Weiterhin haben Faktoren wie weitere pathologische Zytokinmuster, Neuropeptide, genetische Grundlagen, Provokationsfaktoren und ebenfalls mikrobielle Superinfektionen einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung typischer Läsionen der atopischen Dermatitis.

### ***4.3 Die UV-Therapie der atopischen Dermatitis***

Die polyätiologische Dispositionserkrankung der atopischen Dermatitis stellt mit ihrem schubweisen, oftmals hoch chronischen Verlauf häufig ein großes therapeutisches Problem dar. Während in den freien Intervallen eine blande Basistherapie und Allergenkarenz therapeutisch im Vordergrund stehen, beherrscht die Applikation externer und interner Kortikosteroide im akutem Schub das heutige Bild. Seit den 70er Jahren wurde zunehmend der positive Effekt von UV-Strahlen auf die atopische Dermatitis erkannt und in Form der

UVB-Therapie, der kombinierten UVA-UVB-Therapie wie auch der PUVA-Bad-Photochemotherapie genutzt. Dabei konnte in kontrollierten Therapiestudien eindeutig belegt werden, dass die kombinierte UVA-UVB-Therapie der UVB-Monotherapie deutlich überlegen ist. Die UVA-Bestrahlung stellt in der Kombination offenbar das wirksamere Agens dar [56].

Eine neue, darüber hinaus erfolgversprechendere, phototherapeutische Möglichkeit stellt die Anfang der 90er Jahre entwickelte UVA1-Phototherapie dar, mit der sehr gute Resultate in der Behandlung der atopischen Dermatitis und anderer entzündlichen Dermatosen beschrieben werden konnten. Ein limitierender Faktor der UVA1-Therapie der atopischen Dermatitis kann die ausgeprägte Wärmeentwicklung unter der Therapie sein, welche überwiegend durch den Infrarotanteil herkömmlicher UVA1-Bestrahlungsgeräte hervorgerufen wird. Klinische Beobachtungen weisen darauf hin, dass die hohen Temperaturen unter der Bestrahlungstherapie von einer gewissen Anzahl der Patienten als belastend empfunden werden und sie über Stressgefühl, starkes Schwitzen und damit verbundenen vermehrten Juckreiz klagen.

Auf Grund dessen wurden in den letzten Jahren UVA1-Geräte mit aufwendiger Technik zur Wärmeelimination, sogenannte UVA1-Kaltlichtgeräte, entwickelt, bei welchen in der Regel die Wellenlängen von mehr als 500 nm zu nahezu 100% durch spezielle Filtersysteme eliminiert und somit der Infrarotanteil und damit auch die Wärmeabgabe der Bestrahlungsröhren deutlich reduziert werden konnte [14, 76, 97].

In dieser Promotionsarbeit wurde die UVA1-Therapie als sogenannte Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie angewendet. Die Behandlung erstreckte sich über 15 Behandlungssitzungen im Zeitraum von drei Wochen unter Applikation einer täglichen Dosis – bei Aussparung der Wochenenden – von  $50 \text{ J/cm}^2$  resultierend in einer kumulativen Dosis von  $750 \text{ J/cm}^2$ .

Das in dieser Studie genutzte UVA1-Kaltlichtbestrahlungsgerät erbringt mittels Nutzung dieser speziellen Filter- und Kühlsysteme eine hervorragende Compliance. Im Gegensatz zur konventionellen UVA-Bestrahlungstherapie erreicht die UVA1-Kaltlichtbestrahlung eine Verbesserung der Patientencompliance hinsichtlich zweier Faktoren. Während der UVA1-Kaltlichtphototherapie wird die potenziell proinflammatorisch wirkende, wärmebedingte Steigerung des Erythrozyten-Flux durch Unterbindung der Vasodilatation weitestgehend unterdrückt. Zum anderen unterbleibt eine erhöhte Schweißsekretion unter der Therapie. Patienten mit atopischer Dermatitis erleben häufig einen generalisierten Pruritus infolge des Schwitzens [68]. Ursächlich hierfür scheinen IgE-Antikörper gegen

inhalative Allergene im Schweiß zu sein, welche eine Reaktion im Sinne einer Typ-I-Sofortallergie zur Folge haben können. Somit entfallen bei der UVA1-Kaltlichttherapie das übermäßige Schwitzen, der erhöhte Blutfluss sowie das resultierende Stressempfinden und damit eine mögliche Exazerbation der atopischen Dermatitis.

Die UVA1-Phototherapie führte bei dem Patientenkollektiv dieser Studie zu einer deutlichen Befundbesserung oder sogar zur vollständigen Abheilung der Läsionen bei den klinischen Untersuchungen in der ersten, zweiten und dritten Therapiewoche sowie in der Follow-up-Untersuchung zwei Wochen nach Therapieende. Die signifikante Verbesserung des Hautbefundes konnte mit Hilfe der Reduktion des SCORAD-Scores von initial 74 (Median) mit einer Spannweite von 89-51 auf einen posttherapeutischen Wert von 20 (Median) und einer Spannweite von 55-4 evaluiert und somit eine durchschnittliche Reduktion des SCORAD-Scores um 73% verzeichnet werden.

#### **4.4 Aktuelles Studiendesign**

In die Studie wurden Patienten mit der Diagnose der atopischen Dermatitis in Konkordanz mit den allgemeinen Kriterien der atopischen Dermatitis nach Hanifin und Rajka aufgenommen [48].

Das klinische Staging des aktuellen Schweregrades wurde mit Hilfe des SCORAD-Scores evaluiert. Der SCORAD-Score erfasst hierbei Ausdehnung, Intensität und subjektive Symptome des Patienten. Die Ausdehnungsbestimmung folgt der typischen 9er-Regel, die Intensität lässt sich anhand des Auftretens von Erythemen, Ödemen beziehungsweise Papulationen, Exsudationen beziehungsweise Krusten, Exkorationen, Lichenifikationen und Trockenheit bewerten. Zu den subjektiven Faktoren werden Schlaflosigkeit und Pruritus gerechnet. Auf Grund des Einflusses dieser Faktoren unter spezieller Gewichtung wird ein Wert zwischen 0 und 103 errechnet [37]. Der cut-off SCORAD-Score der Patienten wurde auf 45 festgelegt. Als Ausschlusskriterien fungierten neben Minderjährigkeit, Schwangerschaft und Stillzeit unter anderem jegliche virale und bakterielle Superinfektionen, maligne Melanome, Photosensitivität, polymorphe Lichtdermatose oder schwere Allgemeinerkrankungen.

Um den Einfluss anderer UV-Exposition zu minimieren, wurden lediglich Patienten ohne Einnahme lichtsensibilisierender Substanzen sowie Patienten ohne Teilnahme an phototherapeutischen Maßnahmen während der letzten neun Wochen in die Studie

integriert. Eine übermäßige zusätzliche UV-Exposition in der Freizeit durch eventuelle Hobbies oder Berufe ist auf Grund der Behandlung des Patientenkollektivs vornehmlich während der kalten Jahreszeit nicht zu erwarten. Somit lassen sich die erzielten Ergebnisse nahezu vollständig auf die derzeitige Medium-dose-UVA1-Kaltlichttherapie zurückführen. Die Probenentnahme wurde jeweils vor und nach der UVA1-Therapie durchgeführt. Als Entnahmestelle diente in beiden Fällen die rechte Schulter des Patienten. Prätherapeutische Proben wurden aus makroskopisch entzündlichem Gewebe gewonnen, posttherapeutische Stanzbiopsien aus weitgehend abgeheilten Regionen vorhergehender Entzündungen. Bei den Entnahmen wurde auf einen Abstand zueinander von circa 4 cm geachtet. Die zweite Stanzbiopsie wurde nicht in einer Region mit offensichtlicher entzündlicher Reaktion infolge der ersten Probeexzision entnommen. Mit dieser Maßnahme sollte der mögliche Einfluss einer Modifikation des Zellbildes der posttherapeutischen Probe durch die initiale Exzision verhindert werden.

Im Anschluss an die Entnahme folgte nun die immunhistochemische Markierung der für das Pathogenese-konzept der atopischen Dermatitis ursächlichen Zellpopulationen. Hiermit kamen Anzahl und Verteilung der T-Lymphozyten, Anzahl und Verteilung der T-Helfer- sowie der T-Suppressorzellen, Anzahl und Verteilung der Langerhanszellen, Anzahl und Verteilung der Mastzellen und auch der aktivierten Eosinophilen im dermalen Infiltrat zur Darstellung. Zusätzlich wurden Informationen über Anzahl, Verteilung und morphologisches Muster der ISEL<sup>+</sup>-, p53<sup>+</sup>-, bcl-2<sup>+</sup>-, Kathepsin-G<sup>+</sup>- als auch der HLA-DR<sup>+</sup>- und MIB-1<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat detektiert.

Um eine statistische Auswertung der Ergebnisse zu gewährleisten, erfolgte die Auszählung der Gesamtzellzahl der positiv angefärbten Zellen sowie ebenso die Bestimmung des prozentualen Anteils der immunpositiven Zellen gemessen an der kompletten Zellzahl dermalen Zellen pro Zählraster. Insgesamt wurden drei aneinander gereihte Zählraster (Einzelgröße: 0,25 mm x 0,25 mm) einer repräsentativen Region pro Präparat und somit ein Gesamtfeld von 0,25 mm x 0,75 mm unterhalb der dermoepidermalen Grenze ausgewertet.

Die vorliegende Arbeit befasst sich somit mit den immunhistochemischen Untersuchungen zum Wirkmechanismus der UVA1-Phototherapie bei schwerer atopischer Dermatitis in vivo. Wie unlängst berichtet, gewinnt die UV-Therapie der atopischen Dermatitis seit einigen Jahren einen zunehmend wachsenden Stellenwert in Hinblick auf innovative Therapiemodalitäten in der Behandlung des akuten atopischen Ekzems. In Klinik und Praxis werden viele Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis zunehmend auch

monotherapeutisch mit UV-Strahlung behandelt. Hierbei hat sich die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie zu einer Therapiemodalität mit hervorragenden klinischen Resultaten etabliert. Die hier durchgeführten immunhistochemischen Nachweismethoden erlauben nun Rückschlüsse auf die Immunmodulation einer Vielzahl der für die Immunpathogenese relevanten Zellpopulationen, darunter die T-Lymphozyten im Gesamten (CD3<sup>+</sup>), die T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>), die T-Suppressorzellen (CD8<sup>+</sup>), die Langerhanszellen (CD1a<sup>+</sup>), die aktivierten eosinophilen Granulozyten (EG2<sup>+</sup>) sowie Mastzellen (Tryptase<sup>+</sup>), sowie über deren Therapie-assoziierten Modulationen infolge der dreiwöchigen UVA1-Kaltlichtbestrahlung. Darüber hinaus befasst sich die vorliegende Arbeit mit dem Aktivierungszustand des dermalen Infiltrats mittels Bestimmung der Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen HLA-DR<sup>+</sup>- und MIB-1<sup>+</sup>-Zellen sowie mit der Beeinflussung pathogenetisch bedeutsamer apoptotischer Zellvorgänge mit Hilfe der Detektierung von ISEL<sup>+</sup>-, p53<sup>+</sup>- und bcl-2<sup>+</sup>-Zellen. Zudem wurden die Alterationen des histologischen Zellbildes mit dem positiven Einfluss der Medium-dose-UVA1-Phototherapie auf das klinische Befundbild des Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis in Relation gesetzt.

#### **4.5 Problematik der Testmethode**

Zur Diagnosenstellung der atopischen Dermatitis diente die positive Anamnese, die mittels der Nutzung der Kriterien von Hanifin und Rajka objektiviert wurde [48]. Wie beschrieben erfolgte die Bewertung des individuellen Schweregrads anhand der Erhebung des international anerkannten und zuverlässigen SCORAD-Scores. Somit konnte ein homogenes Patientenkollektiv mit Fällen von ausschließlich schwerer atopischer Dermatitis selektiert werden. Daher gilt anzunehmen, dass das Patientenkollektiv in Hinblick auf das Krankheitsbild der schweren atopischen Dermatitis repräsentativ ist. Trotz der Auswahl einer relativ repräsentativen Gruppe kann hiermit dennoch kein Anspruch auf eine epidemiologisch einwandfreie Darstellung erhoben werden. Auch stieß die Bewertung von Ausdehnung und Schweregrad der atopischen Dermatitis unter Nutzung des SCORAD-Scores kürzlich auf Widerstand. Kritikpunkte waren dabei die Mischung von subjektiven Merkmalen und objektiven Symptomen sowie die Gewichtung zugunsten pädiatrischer Fälle [49].

Darüber hinaus ergaben sich in der vorliegenden Promotionsschrift Variationen hinsichtlich der Auswertungsmethodik. Während eine Beeinflussung der zweiten

Stanzbiopsie infolge der initialen Biopsie durch einen genügend weiten Abstand gering gehalten, Unterschiede der Hautbeschaffenheit durch Wahl der jeweils gleichen Lokalisation verhindert und ein Summationseffekt durch Sonnenbestrahlung in der Freizeit angesichts einer Behandlung vornehmlich in der kalten Jahreszeit minimiert werden konnte, stellte die Auswertungsmethodik einen Unsicherheitsfaktor dar. Ein Problempunkt war hierbei die Auswahl einer repräsentativen Region im histologischen Schnitt, anhand derer die Auswertung stattfand. Um mögliche Fehler in der Auswertung diesbezüglich gering zu halten, erfolgten die Auszählungen ohne Kenntnis der Patientennamen und des jeweiligen Therapiestatus. Weiterhin wurden pro Präparat zwei Bewertungszyklen durchgeführt sowie eine Auswahl an Resultaten den Ergebnissen eines zweiten Untersuchers gegenüber gestellt. Im Falle einer Diskrepanz von mehr als 2% ergab sich ein neuer, kompletter Auswertungsdurchlauf. Des weiteren sind, wie auch in der aktuellen Fachliteratur, Einschränkungen der Aussagekraft der hier getätigten Methodik der Probeentnahme dahingehend zu treffen, dass im klinischen Bild der atopischen Dermatitis intraindividuell mehrere entzündliche Stadien nebeneinander existieren und sich ein Vergleich verschiedener Probebiopsien somit per se schwierig gestaltet.

Insgesamt lässt sich folgern, dass die hier benutzte Testmethodik durchaus Fehlerquellen enthält, allerdings auf Grund der aufgeführten Verfahrenstechniken zur Minimierung der Variationen dennoch aussagekräftig ist und zur Reduktion des  $\beta$ -Fehlers gegebenenfalls mit einem größeren Patientenkollektiv weitergehend validiert werden sollte.

## **4.6 Bewertung der Ergebnisse**

### **4.6.1 Der apoptotische Zelluntergang: Kaskaden und Regulation**

Die Apoptose, die griechisch soviel bedeutet wie das Herabfallen des Laubes im Herbst, beschreibt wissenschaftlich den genetisch determinierten Vorgang des programmierten Zelltods infolge der Einwirkung diverser Stimuli, wie zum Beispiel dem Mangel an Wachstumsfaktoren. Der Begriff der Apoptose erhielt 1972 als eine Art des Zelltods, der für den Zelluntergang individueller Zellen im lebenden Gewebe zuständig ist, Einzug in die Literatur [64]. Der apoptotische Untergang entspricht der terminalen Phase des Zellebens. Im Falle des pünktlichen, regelgerechten programmierten Zelltods werden Nachbarzellen und der Organismus selbst in der Regel nicht affektiert. Dennoch gewinnt

die Apoptose im Falle einer Disregulation an Bedeutung für Gewebe und Organismus. Stimmt die Homöostase zwischen Proliferation und Zelltod nicht länger, kann es, wie im Falle der Alzheimer-Krankheit, zu einer Gewebeinvolution kommen. Falls die Zellen nach Erfüllung ihrer Aufgaben den apoptotischen Untergang verfehlen, wie es in einigen Autoimmunerkrankungen zu sein scheint, können daraus bereits schwerwiegende Folgen resultieren. Besonders im Falle der Resistenz gegenüber des programmierten Zelltods, wie es in einigen malignen Erkrankungen demonstriert werden konnte, werden die Konsequenzen für den Organismus manifest.

Morphologisch korreliert die Apoptose mit einer Kondensation des Chromatins an der Kernmembran, der Erhaltung der Zellorganellen, Schrumpfung der Zelle, Kondensation des Zytoplasmas und der intakt bleibenden Abgrenzung der Zelle gegenüber der extrazellulären Matrix durch eine vollständig bleibende Plasmamembran. Schließlich zerfällt die Zelle in die sogenannten apoptotischen Körperchen. Diese entsprechen von einer Membran umschlossenen Strukturen mit Bruchstücken des fragmentierten Chromatins sowie intakten Organellen. Diese apoptotischen Körperchen werden abgestoßen und phagozytiert. Auf Grund der ausbleibenden Freisetzung des Zellinhalts und des effizienten Mechanismus der Phagozytose bleibt eine Entzündungsreaktion in vivo aus [28, 115].

Unter normalphysiologischen Bedingungen tritt die Apoptose immer in Geweben mit kontinuierlichen Zelluntergängen auf. Als eindrucksvolle Beispiele fungieren diesbezüglich das hochproliferative Dünndarmepithel, das Keimepithel des Hodens und Ovars oder keratinisierende Epithelien.

Während der letzten Dekade lässt sich ein nahezu exponentielles Wachstum an Publikationen, welche sich mit dem Themenkomplex der Apoptose beschäftigen, verzeichnen. Allein in den letzten Jahren konnten mehr als 30 Moleküle identifiziert werden, deren Aufgaben mit der Initiation oder Regulation der Apoptose verbunden sind.

Zu den Hauptelementen des sogenannten apoptotischen Pathways gehören die Initiation einer Protease-Kaskade, mitochondriale Veränderungen, DNA-Fragmentation, Membranalterationen und Rezeptoraktivierungen.

Caspasen (cytosolic aspartat-specific protease) nehmen hierbei eine zentrale Rolle ein [3]. Caspasen scheinen in den meisten Zellen als inaktive Proenzyme vorzuliegen und werden mittels proteolytischer Spaltung aktiviert. Die gegenseitigen Aktivationskaskaden sind recht komplex und wissenschaftlich nicht eindeutig geklärt. Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-3 werden jedoch zentrale Rollen bezüglich der apoptotischen Pathways

zugesprochen. Auch Dimerisierungen und Oligomerisierungen werden hinsichtlich der Initiation der Caspasekaskaden grundlegende Eigenschaften zugesprochen. Die Oligomerisierung des apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1), dem Caspase-9-bindenden Protein, durch Anlagerung von Cytochrom c bewirkt neueren Erkenntnissen zufolge eine Dimerisierung von Caspase-9. Caspase-9 induziert somit Apoptose als Antwort auf eine erhöhte Ausschüttung von Cytochrom c (APAF-2) aus den Mitochondrien [90]. Caspase-9 aktiviert daraufhin Caspase-3 durch proteolytische Spaltung der proenzymatischen Zustandsform. Aktivierte Caspase-3 ist nun in der Lage, vitale Proteine direkt zu spalten sowie über eine Aktivierung weiterer Caspasen zusätzliche Spaltungen und proapoptotische Effekte zu induzieren [139]. Ebenso scheint eine Caspase-3-induzierte Aktivierung von bcl-2 interacting domain (BID) zu existieren, welche eine Amplifikation der mitochondrialen Cytochrom-c-Liberation initiieren kann [121]. Endstation der proteolytischen Kaskade sind die Aktivierung des DNA fragmenting factor (DFF) und p21-activated kinase-2 (PAK-2). DFF kann die internukleosomale DNA-Fragmentation fördern, PAK-2 scheint für die apoptotischen Zytoplasma-Alterationen zuständig zu sein [93, 113].

Zellen, die dem programmierten Zelltod unterliegen, zeigen zudem Alterationen der Mitochondrien. Die Aktivierung der Caspase-8 in der apoptotischen Aktivierungskaskade resultiert unter anderem in einer proteolytischen Spaltung von BID, einem proapoptotischen Protein der bcl-2-Familie. Die zentrale Bedeutung von BID wird unter anderem durch die Tatsache bekräftigt, dass die alleinige Aktivierung von Caspase-8 in Abwesenheit von BID unzureichend für die Auslösung einer Apoptose ist. Der Spaltung als Zymogenaktivierung folgt eine Translokation in die Mitochondrien [121]. Während des Vorgangs verliert die äußere Mitochondrienmembran an Kontinuität. Infolge dessen gelangt, verbunden mit einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran, Cytochrom c in die intrazelluläre Matrix. Die Kombination mit APAF-1, APAF-3 (Caspase-9) und dATP bewirkt eine weitere Aktivierung von zentralen Caspasen [123]. Ebenso kann die gleichzeitige Freisetzung des apoptosis inducing factor (AIF) zu einer Apoptose-Induktion führen [126, 127].

In summa ergibt sich die Möglichkeit, dass antiapoptotische Ereignisse zum einen infolge einer Neutralisation proapoptotisch wirkender Faktoren, zum anderen über eine intrinsische Komponente aktiv werden. Die Überexpression eines antiapoptotischen Agens scheint somit eine Apoptose protegieren zu können.

Die DNA-Fragmentation repräsentiert einen irreversiblen Schritt und tritt bereits vor den Veränderungen der Plasmamembranpermeabilität auf. Ursächlich dafür scheint die Aktivierung endogener Nukleasen zu sein, unter ihnen die DNase I. Im gelelektrophoretischen Bild erscheinen typische Bandenmuster, sogenannte apoptotische Leitern, durch  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonukleaseaktivität mit der Entstehung von Oligomeren mit je circa 180 Basenpaaren [140].

Neben diesen Veränderungen lassen sich zusätzlich Modifikationen der Plasmamembran konstatieren. Hierzu zählt besonders die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Membranschicht [95].

Apoptose wird neben direkten Stimulantien ebenfalls über die Stimulation äußerer Zelloberflächenrezeptoren assoziiert mit der Caspasekaskadenaktivierung eingeleitet. Als wichtiges Beispiel dient hierbei der CD95- (Apo-1-, Fas-) Rezeptor-Liganden-Komplex als Induktor des caspasenabhängigen programmierten Zelltods [55].

Ein weiteres grundsätzliches Ereignis des programmierten Zelltods ist der sogenannte PARP-Abbau. Die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) ist ein Enzym des Zellkerns, welches spezifisch DNA-Strangbrüche erkennt, an ihnen bindet und Poly-ADP-Ribose-Einheiten synthetisiert. Jede bisher diesbezüglich untersuchte Caspase hat die Möglichkeit des PARP-Abbaus, insbesondere der Abbau durch die aktivierte Caspase-3 fällt hier besonders ins Gewicht [63, 128].

Ob der PARP-Abbau jedoch wirklich ein Mechanismus der Apoptose oder eher Konsequenz des programmierten Zelltods ist, bleibt nach widersprüchlichen Befunden an Knock-out-Mäusen kontrovers zu diskutieren [127].

Im Gegensatz zur Apoptose bezeichnet die Zellnekrose die intravital auftretenden, morphologischen Veränderungen einer Zelle infolge endogener oder exogener Noxen. Die betroffenen Zellen schwellen, beginnend im Zytoplasma und in den Mitochondrien, einschließlich der intrazellulären Organellen infolge eines Influx extrazellulärer Flüssigkeit sowie Ionen an und rupturieren schließlich. Resultierend aus dem Membranuntergang kommt es zum Austritt des intrazellulären Inhalts und somit auch der lysosomalen Enzyme. Elektrophoretisch hinterlässt die DNA einen charakteristischen Schmierfilm durch eine zufällige Verdauung der DNA und der postlytischen DNA-Fragmentation. Ein weiteres, wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Apoptose und Nekrose ist der Einfluss der abgestorbenen Zellen und Zellpopulationen auf das Nachbargewebe. Während apoptotische Zellen schnell durch Makrophagen eliminiert werden und somit die Freisetzung proinflammatorische Mediatoren verhindert wird, kommt es durch Nekrose

meist größerer Zellgruppen nahezu unweigerlich zu einer Entzündungsreaktion des Nachbargewebes [38].

Obwohl Nekrose und Apoptose als zwei sehr unterschiedliche Mechanismen des Zelltods angesehen und gewöhnlich getrennt behandelt werden, charakterisieren einige Autoren sie lediglich als Extremformen einer größeren Spanne pathophysiologischer Veränderungen [86]. Der second-messenger  $\text{Ca}^{2+}$  wird beispielsweise beiden Formen zugerechnet [85]. Zudem scheinen selbst einige Caspasen sowie die Aktivierung via CD95 in bestimmten Fällen am nekrotischen Zelluntergang beteiligt zu sein. Neben diesen Faktoren konnte auch die Überexpression von bcl-2 ebenfalls mit einer Inhibition der Nekrose neuronaler Zellen in Beziehung gebracht werden [59, 149].

#### **4.6.2 Gegensätzliche Effekte der UVA1-Phototherapie auf die Expression von bcl-2 und p53**

Der Name bcl-2 ist ursprünglich die Abkürzung für das B-cell lymphoma/leukemia-2 gene [110]. Das bcl-2-Gen ist der Prototyp einer großen Genfamilie, die Regulatorgene des programmierten Zelltods kodiert [138]. Bezug nehmend auf letztjährige Studien scheint bcl-2 eine gewisse Resistenz gegenüber der Apoptose durch die Blockierung der Freisetzung des AIF sowie des Cytochroms c aus den Mitochondrien zu vermitteln. Diese Freisetzungen werden infolge eines Kollaps des Membranpotenzials der Mitochondrienmembran ursächlich für die Induktion der Apoptose in einem frühen Stadium angesehen. Die hierdurch ausgelösten Kaskaden triggern schließlich die irreversiblen apoptotischen Vorgänge [127]. Bcl-2 ist demgegenüber ebenso in der Lage, eine Spaltung von BID zu blockieren [121]. In Hinblick auf diese Erkenntnisse erscheint bcl-2 gut für die Detektierung von Zellen, die sich selbst gegen die Apoptose schützen, geeignet zu sein.

Da es bekannt ist, dass UV-Bestrahlung Einfluss auf die Regulation des programmierten Zelltods nimmt, erschloss sich die Spekulation, dass die Detektierung von bcl-2 und p53 vor und nach einer dreiwöchigen UVA1-Behandlung von Patienten mit einer schweren atopischen Dermatitis einen tieferen Eindruck bezüglich der korrespondierenden regulatorischen Mechanismen bieten könnte. Vor Beginn der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie konnte eine hohe Präsenz immunopositiver sowie mit durchschnittlich  $25,4\% \pm 0,060$  ein hoher prozentualer Anteil bcl-2<sup>+</sup>-Zellen im dermalen

lymphozytären Infiltrat nachgewiesen werden. Posttherapeutisch konnte eine ausgeprägte Depletion der bcl-2-Zellen sowie mit  $8,1\% \pm 0,045$  eine signifikante prozentuale Verminderung in allen drei Feldern des entzündlichen perivaskulären Infiltrats festgestellt werden. Auf Grund morphologischer Kriterien und der Verwendung von Konsekutivschnitten konnte eine Zuweisung des Großteils der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen zur Population der T-Lymphozyten getroffen werden. Die Rate der prätherapeutisch bestimmten bcl-2<sup>+</sup>-Zellen stimmt mit einer früheren Studie, die diese Rate bei Patienten mit atopischer Dermatitis untersuchte, überein [67]. Im Gegensatz zur niedrigen Baseline-Expression von bcl-2 in einer gesunden Kontrollgruppe exprimierten die Patienten dieser Studie, wie auch im vorliegenden Patientenkollektiv, bcl-2 prätherapeutisch in gesteigertem Maße.

Wie bereits erörtert, erfüllt die Aktivierung von Caspasen durch Selbstspaltung oder Spaltung durch andere Caspasen eine Schlüsselposition hinsichtlich der Initiation einer proteolytischen, zur Apoptose führenden Kaskade. Das bcl-2-Protein hingegen scheint diese Kaskade durch die Prävention der Zymogenaktivierung der Caspasen zu durchbrechen und hat somit das Potenzial, den programmierten Zelltod zu verhindern [119, 122].

Der programmierte Zelltod geht in der Regel mit einer Störung des Mitochondrienmembranpotenzials einher. Die Reduktion dieses Potenzials scheint mit der Öffnung der sogenannten permeability transition (PT) pores vergesellschaftet zu sein [11]. Die molekulare Zusammensetzung der PT-Poren ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wurde eine Beteiligung von Hexokinase, Cyclophilin D, Adeninnukleotid-Translokator sowie einem spannungsabhängigen Anionenkanal gezeigt [79]. Das bcl-2-Protoonkogen-Produkt ist nun in der Lage, die PT zu inhibieren. Die PT scheint somit ein wichtiger Checkpoint des bcl-2 in der antiapoptotischen Regulation zu sein.

Modelle des apoptotischen Zelltods beschreiben mindestens eine Zweiteilung dieser Geschehnisse in eine initiale Effektorphase und eine abschließende sogenannte point-of-no-return-Phase. Im Falle des apoptotischen Untergangs ist die Öffnung der PT pores mit der Freisetzung des proapoptotischen Faktors AIF der Mitochondrien assoziiert. Die Öffnung dieser Kanäle signalisiert offenbar den point-of-no-return. AIF kann nun seine proapoptotische Wirkung durch proteolytische Aktivierung der Caspasen in der Zelle entfalten. Die Vorgänge des Zelltods, wie zytoplasmatische Veränderungen oder die erhöhte Produktion von Superoxid-Anionen, werden im Folgenden manifest, jedoch lassen sie sich bisher nicht sicher als Konsequenz der PT beziehungsweise ausgelöst durch eine unabhängige Konstellation darstellen [127]. Das in der Mitochondrienmembran gebundene

bcl-2-Protein scheint im Falle der Reduktion des Membranpotenzials eine Öffnung der Membranporen und die Möglichkeit der Apoptose-Induktion potent blockieren zu können [126, 127, 143].

Neben diesen wichtigen Eigenschaften verhindert bcl-2 ebenfalls die apoptoseassoziierte Repartitionierung des intrazellulären second-messengers  $\text{Ca}^{2+}$ . Hierzu zählen insbesondere die Verminderung an zytoplasmatischem sowie im endoplasmatischen Retikulum gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$  sowie der Anstieg an mitochondrialen und intranukleären  $\text{Ca}^{2+}$  [8, 83, 110].

Eine weitere interessante Hypothese beschreibt den Sachverhalt, dass bcl-2 neben der Modulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung die Akkumulation von Lipid-Peroxiden und anderen reaktiven Sauerstoffradikalen zu inhibieren scheint [107, 110, 136]. Es verhindert so Schädigungen an DNA und Lipiden [136]. Diese Vermutung wird durch die Lokalisation von bcl-2 in Organellen wie den Mitochondrien, die an der Bildung von reaktivem Sauerstoff beteiligt sind, untermauert. UV-Strahlung ist ein potenzieller Auslöser für die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale. Daher kann auch in diesem Punkt eine UVA-induzierte, posttherapeutische Reduktion der bcl-2-Expression, die mit einer Induktion des Markerenzym Haem-Oxygenase I (HO-1) vergesellschaftet ist, mit einer Störung des antioxidativen Abwehrsystems und somit der Einleitung der Apoptose in Beziehung gebracht werden [54]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass UVA1-Strahlung die sogenannte immediate apoptosis innerhalb der ersten 4 Stunden nach Bestrahlung einer Rat-6-Fibroblasten-Zelllinie zu induzieren vermag. Diese Induktion der Apoptose konnte durch eine erhöhte Expression des bcl-2-Proteins inhibiert werden. Als mögliche Ursache der Inhibition kommt die Suppression der Entstehung oder der Effekte freier Sauerstoffradikale in Frage [107].

Neben der Blockade der Apoptose durch das bcl-2-Protein scheint dessen Präsenz zusätzlich das Überleben einzelner Zellen zu fördern. In Studien konnte dieser Einfluss des bcl-2-Proteins in Anwesenheit DNA-schädigender Agenzien nachgewiesen werden. Demzufolge lässt sich hinsichtlich einer Überexpression von bcl-2 in läsionalen Abschnitten der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis durchaus über ein prolongiertes Überleben und folglich eine Unterhaltung des Entzündungsinfiltrats spekulieren [5, 129]. Eigene Studien konnten eine Erhöhung der Baseline-Expression des bcl-2-Proteins bei Patienten mit atopischer Dermatitis und auch mit kutanem T-Zell-Lymphom im Vergleich zu Hautbiopsien einer gesunden Kontrollgruppe demonstrieren [20]. Diese Beobachtungen gehen mit den hier vorliegenden Ergebnissen einer hohen

Expression des bcl-2-Proteins und ebenfalls einer Homogenität des Expressionsmusters innerhalb der untersuchten Kollektive einher. Darüber hinaus konnte ein gesteigertes Überleben bcl-2<sup>+</sup>-Zellen in Entzündungsgebieten autoimmuner und bakterieller Erkrankungen nachgewiesen werden [118, 144].

Zusätzlich ließ sich zeigen, dass die posttherapeutische Down-Regulation des bcl-2-Gens von einer signifikanten Up-Regulation der p53-Genexpression und einem bemerkenswerten Rückgang CD3<sup>+</sup>-Zellen im dermalen lymphozytären Infiltrat begleitet war. Der Rückgang des prozentualen Anteils aller drei Zählraster war signifikant. Ebenso konnte ein bedeutender Anstieg der absoluten Zahl p53<sup>+</sup>-Zellen aufgezeigt werden. Auch hier ließ sich auf Grund morphologischer Kriterien sowie auf Grund des Gebrauchs von Konsekutivschnitten eine Zuweisung der Mehrzahl p53<sup>+</sup>-Zellen zur Population der T-Lymphozyten konstatiert werden. Neben diesem Anstieg an p53<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat fiel ebenfalls eine UVA1-induzierte p53-Expression in der Basalzellschicht der Epidermis auf.

Das Tumorsuppressorgen p53, welches als Gegenspieler des bcl-2 fungiert, kann Apoptose als Antwort auf einen chromosomalen Schaden induzieren. Hierbei verharrt die Zelle am G1/S-Übergang. Kann der chromosomale Schaden nicht innerhalb einer vorgegebenen Zeitspanne repariert werden, reagiert die Zelle mit der Einleitung des programmierten Zelltods. Zellen mit einem Mangel an p53 überwinden den G1/S-Übergang trotz eines DNA-Schadens. Dies kann zu weiteren Mutationen und gegebenenfalls auch zu einer malignen Entartung führen [141]. Daher ergibt sich die Hypothese, dass der Anstieg an p53<sup>+</sup>-Zellen in dermalen entzündlichen Zellen nach erfolgter UVA1-Kaltlicht-Phototherapie Zeit für die Reparatur geschädigter Zellen einräumt und, falls notwendig, den programmierten Zelltod provoziert.

Das p53-Protein wurde zunächst durch die Fähigkeit der Kopräzipitation mit dem T-Antigen des Simian-Virus (SV40) identifiziert [78, 91]. Nach der ersten Charakterisierung als Onkogen folgte später die Revision, dass p53 seine biologischen Eigenschaften als Tumorsuppressorgen erfüllt. Besonders hinsichtlich der Assoziation der Expression von p53 mit der Manifestation von Tumoren erfolgten ausgeprägte Forschungen und bereits 1993 wurde es als „Molekül des Jahres“ betitelt [32].

P53 ist unter anderem verantwortlich für die Wachstumssuppression. Im aktivierten Zustand kann p53 eine Induktion der Apoptose beziehungsweise auch einen Zellzyklus-Arrest induzieren. Auch wird dem p53-Protein eine Rolle in der Regulation der Zelldifferenzierung und Proliferation zugeschrieben. Eine erhöhte Expression des p53-

Gens kann beispielsweise aus einem Zell- und Gewebsschaden durch UV-Strahlung resultieren [94]. Die erhöhte Expression wird zum einen durch eine verstärkte Stabilisierung des ansonsten kurzlebigen Proteins verursacht, zum anderen infolge eines erhöhten mRNA-Levels hervorgerufen [62, 125].

Eine wichtige Aufgabe des p53-Genprodukts ist die Kontrolle und gegebenenfalls der Wachstumsstillstand in der G1-Phase. Daneben scheint p53 auch eine gewisse regulative Wirkung auf die G2-Phase und den Spindelapparat zu besitzen. P53 fungiert hierbei als ein sequenzspezifischer transkriptionaler Aktivator. Ein wichtiges Produkt dieser Regulation ist das p21-Protein [36]. P21 bindet an die zur Zellproliferation notwendigen cyclin-dependent kinases (CDK) und inhibiert diese [50]. Zudem bindet und inhibiert p21 das sogenannte proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) als Untereinheit der Polymerase  $\delta$  [134]. Zusätzlich wird Gadd45 durch p53 transaktiviert, welches neben p21 ebenfalls den G1-Checkpoint kontrolliert [62, 146]. Neben der beschriebenen Kontrolle des Zellzyklus kann p53 eine Induktion des programmierten Zelltods bewirken. P53 entfaltet seine Wirkung dabei offensichtlich sowohl durch einen transaktivationsabhängigen sowie über einen transaktivationsunabhängigen Pathway [6, 135]. In einigen Zellarten konnte eine Assoziation zwischen einer Erhöhung der p53-Expression und der Up-Regulation des bax-Gens aufgezeigt werden [98, 117, 145]. Auf der anderen Seite konnte in einigen Studien sogar die Down-Regulation der Expression von bcl-2 durch p53 nachgewiesen werden.

Bax erfüllt als ein Mitglied der bcl-2-Familie apoptotische Aufgaben. Das bax-Gen besitzt eine signifikante Sequenzübereinstimmung mit dem bcl-2-Gen [9]. Es ist in der Lage, durch Bildung von Heterodimeren mit bcl-2 eine Apoptose zu induzieren. Eine spezifische Interaktion mit einem PT-porenbildenden Molekül und somit eine essenzielle Verbindung von bax im Sinne der PT-Porenbildung ist gesichert [96]. Die Ratio zwischen bcl-2 und bax bestimmt in Kombination mit der Bildung von Heterodimeren die Sensitivität der Zellen zum Übergang in den programmierten Zelltod [9, 129]. Dennoch ist die Beteiligung von bax nicht endgültig für alle Zellen sowie alle apoptoseauslösende Faktoren geklärt. Allerdings scheint es sicher zu sein, dass Veränderungen der Ratio zwischen bcl-2 und bax die betroffenen Zellen zumindest anfälliger bezüglich anderer apoptoseinduzierender Noxen macht [98].

Das Fas/Fas-Liganden-System stellt einen weiteren potenziellen Induktionsweg des durch p53 induzierten programmierten Zelltods dar. Der CD95-Rezeptor ist als Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie ein potenzieller Induktor der Apoptose. Als spezifischer Ligand konnte ein integrales Membranprotein-Homologon vom Typ II sowie eine

korrespondierende lösliche Form nachgewiesen werden. Ferner besteht die Möglichkeit, dass p53, neben der Interaktion mit bcl-2, ebenso die Oberflächenexpression von CD95 im Sinne einer Induktion der Apoptose beeinflusst [150]. P53 hat somit offenbar das Potenzial, die Expression von CD95 zu fördern. Hierfür wird eine p53-abhängige Regulation der Promotorregion des CD95-Gens mitverantwortlich gemacht [114].

Die sich anschließenden apoptotischen Schritte entsprechen offensichtlich dem gewöhnlichen Muster anderer Aktivierungsarten, insbesondere der Aktivierung zymogener Vorstufen der Caspasen.

Langwellige UVA-Bestrahlung, die zu circa 20% das Niveau der dermalen Blutgefäße erreicht, penetriert sehr effektiv die dermalen Abschnitte der menschlichen Haut und besitzt das Potenzial der Beeinflussung intradermaler T-Zellen [142]. Die Eliminierung von T-Lymphozyten infolge einer bcl-2- und p53-abhängigen Apoptose-Regulation repräsentiert einen bemerkenswerten Mechanismus in der UVA1-Phototherapie entzündlicher Erkrankungen. Als Ursache des UVA-induzierten Untergangs der T-Zellpopulationen konnte das sogenannte singlet oxygen species (SOS) identifiziert werden. SOS wird in einer Reihe biologischer Prozesse synthetisiert und ist als wichtiges biochemisches Intermediat in einer Vielzahl wichtiger Teilschritte involviert. Ebenfalls in diesen Apoptoseweg integriert ist das Fas/Fas-Liganden-System. Dies scheint nebst oben beschriebenen Kaskaden infolge einer Stimulation via SOS aktiviert zu werden und weitere apoptotische Vorgänge zu triggern [99].

Im Gegensatz zur UVB-Strahlung wird die UVA-Strahlung zwar kaum von der DNA absorbiert, kann diese jedoch indirekt durch sauerstoffabhängige Veränderungen schädigen. Um die genetische Integrität nach einem DNA-Schaden zu wahren, treten sowohl Zellzyklus-Arrest als auch apoptotische Vorgänge in Erscheinung. Diesbezüglich konnte die UVA-Strahlung als Auslöser für eine erhöhte immunhistochemische Darstellung von p53 identifiziert werden. P53 wird offenbar infolge der DNA-Schädigung, beispielsweise den DNA-Strangbrüchen, sowie durch eine resultierende inhibierte RNA-Synthese getriggert [33]. Die Expressionsveränderung von p53 nach UVA1-Exposition variiert mit der verwendeten Dosis, sodass zunächst der Eindruck entstand, dass lediglich die basalen Keratinozyten der Epidermis mit einer Erhöhung der Expressionsrate reagieren. Dies konnte mittels der Applikation höherer Dosen jedoch widerlegt werden [23]. Es verbleibt jedoch die Frage der Ursache für die fehlende Überexpression von p53 in den oberen epidermalen Schichten [23, 24]. Als eine mögliche Ursache kommt zum einen eine generell zellspezifische Reaktion der Basalzellen auf die Strahlenexposition in

Betracht. Die Möglichkeit, dass die Dosis auf Grund der hohen Eindringtiefe in den oberen Schichten bereits zu groß ist, um eine p53-Up-Regulation zu verursachen, scheint demgegenüber eher unwahrscheinlich zu sein [24]. Die aktuellen Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu den Resultaten einer Studie über die Wirkung der UVA-Bestrahlung an MCF-7-Zellen, bei der kein Anstieg der p53-Expression festgestellt werden konnte und der Schluss gezogen wurde, dass p53 ausschließlich bei der UVB-induzierten verzögerten Apoptose eine Rolle zu spielen scheint [136].

Obwohl auch die Bildung von UVA-induzierten Pyrimidin-Dimeren beschrieben worden ist [23], entfaltet die UVA-Strahlung ihre Wirkung hauptsächlich über oxidative Alterationen, Zellmembranschädigungen durch Lipidperoxidation, Einzelstrangbrüche und Protein-DNA-Crosslinks. Die Konsequenz der Bildung von Sauerstoffradikalen kann somit als Folge eines DNA-Schadens, zum Beispiel via Fas/Fas-Liganden-System oder Transkriptionsfaktor AP-2, zu mutagenen Veränderungen führen. Ebenso kann die UVA1-induzierte Lipidperoxidation strukturelle und funktionelle Modifikationen der Membranen verbunden mit einem veränderten Flüssigkeitszustand, erhöhter Permeabilität sowie Inaktivierung zellulärer Enzyme und Transporter verursachen [19].

Die aufgezeigten Veränderungen der Expression von bcl-2 und p53 konnten mit Hilfe der ISEL-Methode, die die apoptotische Zelleliminierung durch die Anfärbung der 3'-OH-Enden fragmentierter DNA anzeigt, direkt mit einer abgelaufenen Apoptose in Verbindung gebracht werden. Der ISEL-Nachweis apoptotischer Zellen gelingt somit, wie beschrieben, infolge der Degradation der DNA durch spezifische, apoptotische Endonukleasen. Die Durchführung der ISEL-Methodik an den unbestrahlten, prätherapeutischen Präparaten zeigte in der Regel keine positiv markierten, dermalen Zellen auf. Lediglich in einem Präparat konnten einzelne ISEL<sup>+</sup>-Zellen im perivaskulären Infiltrat detektiert werden. Demgegenüber waren bei allen Patienten einige Keratinozyten im Stratum granulosum positiv markiert. Dieses Vorkommen stellt allerdings ein physiologisches Phänomen im Zuge der Zellerneuerung in dieser Zellschicht dar [69]. Gleichzeitig konnte diese Beobachtung als interne Kontrolle der ISEL-Technik zur Visualisierung apoptotischer Zellen hinzugezogen werden. Posttherapeutisch konnte beinahe im gesamten Patientenkollektiv eine deutliche Zunahme der ISEL<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat verzeichnet werden. Anhand der Morphologie erfolgte die Zuweisung eines Großteils dieser Zellen zur Population der dermalen T-Lymphozyten und konnte die mittels der bcl-2- und p53-Färbungen erzielten Resultate untermauern. Somit scheint diesbezüglich die Veränderung der Balance von bcl-2 und p53 mit der Induktion des programmierten

Zelltods gekoppelt zu sein. Zwar können auch nekrotische Zellen infolge der Degradation der DNA den Farbstoff inkorporieren, nichtsdestotrotz betrifft die Nekrose zusammenhängende Zellgruppen, wohingegen das Auftreten einzelner angefärbter Zellen für Apoptose spricht und normalerweise nicht mit der Identifikation individueller apoptotischer Zellen interferiert [18].

Ebenso lässt sich eine Korrelation der hier erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen der UVA-induzierten Apoptose bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom nachweisen. Auch hier konnte eine Apoptose-Induktion im vornehmlich T-lymphozytären, dermalen Infiltrat festgestellt werden [69].

#### **4.6.3 Posttherapeutischer Rückgang der T-Lymphozyten**

Die vorliegende Promotionsarbeit demonstriert, dass der Anstieg der p53<sup>+</sup>-Zellen verbunden mit der Verringerung der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen nach erfolgreicher Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie von einem signifikanten Rückgang des dermalen lymphozytären Infiltrats begleitet war.

Zu den histologischen Besonderheiten der atopischen Dermatitis zählt die erhöhte Präsenz dermalen T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>), die zumeist den T-Helferzellen des Th2-Subtyps angehören und durch ein spezifisches pathologisches Zytokinmuster gekennzeichnet sind [31]. Die UVA1-Phototherapie wurde kürzlich ebenfalls in der Behandlung anderer inflammatorischer, T-Zell-assoziierten Hauterkrankungen eingesetzt [17, 69]. Wie bereits beschrieben fungieren T-Helferzellen in der läsionalen Haut des Patienten mit atopischer Dermatitis als wichtige Zielstrukturen der UVA-Phototherapie. Langwellige UVA1-Strahlung durchdringt die epidermalen Schichten der Haut und kann somit direkt auf die intradermalen T-Lymphozyten Einfluss nehmen. Dies kann in einer Induktion der Apoptose als Konsequenz der SOS-Generierung resultieren.

Die Zunahme der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen sowie die Abnahme der p53<sup>+</sup>-Zellen wurde von einer signifikanten Depletion des prozentualen Anteils und einer Abnahme der absoluten Anzahl infiltrierender CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten begleitet. Es konnte eine mittlere Zellzahl CD3<sup>+</sup>-Zellen (Mittelwert  $\pm$  Stabw) von  $38,9 \pm 26,7$  vor und  $15,5 \pm 10,4$  pro Zählraster nach der UVA1-Phototherapie bestimmt werden. Diese Zahlen belegen deutlich einen hohen Anteil der T-Lymphozyten im dermalen Infiltrat vor Therapie verbunden mit dem bemerkenswerten Rückgang nach erfolgter UVA1-Bestrahlung.

Insgesamt legen die gesammelten Daten den Verdacht nahe, dass die Medium-dose-UVA1-Phototherapie mit einer jeweiligen kumulativen Bestrahlungsdosis von  $750 \text{ J/cm}^2$  die Möglichkeit besitzt, Apoptose in infiltrierenden T-Lymphozyten zu induzieren. Sowohl der Anstieg von p53 als auch die Verminderung von bcl-2 war mit einer Verringerung dermalen  $\text{CD3}^+$ -Zellen vergesellschaftet. In Hinblick auf morphologische Kriterien, Färbemuster sowie unter Verwendung von Konsekutivschnitten konnte eine Zuweisung der Mehrheit der  $\text{p53}^+$ - und  $\text{bcl-2}^+$ -Zellen zum Typus der Lymphozyten erfolgen. Die Einflussnahme auf die Balance zwischen der Genexpression von bcl-2 und p53 im Entzündungsinfiltrat spielt offenbar eine Schlüsselrolle in dem zugrunde liegenden apoptotischen Pathway und kann somit zur signifikanten Reduzierung korrespondierender T-Lymphozyten und zur deutlichen klinischen Verbesserung entsprechender Hautläsionen führen. Diese Ergebnisse bestärken die enge Korrelation zwischen der sichtbaren Verbesserung der klinischen Symptome und der offensichtlichen Hochregulierung apoptotischer Effekte in der läsionalen Haut mittels Medium-dose-UVA1-Bestrahlung und damit dem guten therapeutischen Effekt bezüglich dieser neuen Behandlungsmöglichkeit bei der atopischen Dermatitis.

#### **4.6.4 Alterationen der T-Zellzusammensetzung: CD4 versus CD8**

T-Helferzellen stellen im entzündlichen Infiltrat der atopischen Dermatitis eine immunpathologisch äußerst bedeutsame und häufig vorkommende Zellpopulation dar. Hierbei fällt zumeist ein hohes Verhältnis zwischen  $\text{CD4}^+$ - und  $\text{CD8}^+$ -T-Lymphozyten auf. Diese Ratio scheint jedoch weniger in einer Abnahme der  $\text{CD8}^+$ -Zellen, als in einer drastischen Zunahme der  $\text{CD4}^+$ -T-Helferzellen begründet zu liegen [31]. Es handelt sich hierbei zumeist um  $\text{CD4}^+$ -T-Helferzellen des Th2-Subtyps. Dieser Subtyp infiltriert die läsionale Haut des Patienten mit akuter atopischer Dermatitis und entfaltet durch sein spezifisches Zytokinmuster, wie oben beschrieben, seine stimulatorische Wirkung auf die IgE-Synthese. Ebenso unterhalten die Th2-Zellen besonders durch die Ausschüttung von IL-4 eine lokale inflammatorische Reaktion [15].

Vor Beginn der Therapie ließ sich in dieser Studie eine hohe Anzahl  $\text{CD4}^+$ -Zellen im dermalen Infiltrat nachweisen. Es konnten im Durchschnitt  $18,8 \pm 7,9$   $\text{CD4}^+$ -Zellen (Mittelwert  $\pm$  Stabw) pro 100 Zellen detektiert werden. Im Anschluss an die dreiwöchige Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie konnte ein signifikanter prozentualer

Rückgang der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sowie eine beachtenswerte Reduktion ihrer absoluten Zellzahl beobachtet werden. Dieser Rückgang wurde von einem deutlichen prozentualen Anstieg der CD8<sup>+</sup>-Zellen im perivaskulären Gewebe begleitet.

In einer vorhergehenden Untersuchung betrug die CD4/CD8-Ratio 7:1 [31]. Unsere Resultate zeigen entsprechend der Auswertung der prozentualen Anteile CD4<sup>+</sup>- sowie CD8<sup>+</sup>-Zellen eine CD4/CD8-Ratio von 2:1 vor Behandlungsbeginn.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen läsionaler Abschnitte der Haut wurde unter anderem in einer Studie über eine Erhöhung der CD8<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut berichtet [111]. Es ist allerdings anzunehmen, dass die Funktion dieser CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten hierbei eingeschränkt ist [87]. Dennoch scheint generell die Anzahl der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten je nach erfolgtem Auswertungsprozedere zu divergieren und vom aktuellen Stadium der atopischen Dermatitis abhängig zu sein. Verringerte Zahlen dieser Zellpopulation lassen sich insbesondere bei Patienten in der akuten Phase der atopischen Dermatitis beobachten [88].

Die im Gegensatz zur Analyse zirkulierender CD8<sup>+</sup>-Lymphozytenraten beobachtete erhöhte CD4/CD8-Ratio im dermalen Infiltrat impliziert eine selektive Sequestration der T-Helferzellen in der läsionalen Haut [88].

Der Rückgang der CD4<sup>+</sup>-Zellen verbunden mit dem Anstieg des prozentualen Anteils der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten bei Stagnation der durchschnittlichen Anzahl CD8<sup>+</sup>-Zellen und Verringerung der CD4/CD8-Ratio auf 1:2 durch die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie suggeriert somit ein Durchbrechen des Circulus vitiosus. CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten produzieren IFN- $\gamma$ , jedoch kaum IL-4 [131]. Dies lässt spekulieren, dass der Rückgang IL-4-produzierender CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen in Kombination mit dem eventuellen Anstieg der CD8<sup>+</sup>-Zellen schließlich in einer quantitativen Abnahme des IL-4 resultiert. Als Ergebnis dieses Sachverhalts würde die pathologische IgE-Überproduktion durch direkte B-Lymphozytenstimulation eingeschränkt und somit auch die gesteigerte Reaktion der Langerhanszellen geschmälert werden. Zudem könnte die Down-Regulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen zugleich mit einer Reduktion anderer immunpathogenetisch wichtiger Zytokine und Lymphokine vergesellschaftet sein. Dementsprechend käme es, resultierend aus einer verminderten Aktivierung von Mastzellen, zu einem deutlich verbesserten Hautbefund sowie ebenfalls zu einer Durchbrechung des Itch-Scratch-Phänomens.

In summa lässt sich folgern, dass der UVA1-induzierten Modulation des Verhältnisses zwischen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten im dermalen Infiltrat wahrscheinlich eine enorme Bedeutung in der Normalisierung der Störung des Immunsystems zugewiesen,

sowie, unter Einbeziehung der Untersuchungen CD3<sup>+</sup>-Zellen, eventuell eine selektive Induktion apoptotischer Kaskaden in T-Helferzellen induziert werden kann.

#### **4.6.5 Dermale Langerhanszellen als Ziel der Medium-dose-UVA1-Phototherapie**

Die Langerhanszellen der Dermis sind in den läsionalen Abschnitten der Haut in erhöhten Konzentrationen vorhanden. Diese Langerhanszellen üben hyperstimulatorische Funktionen aus und sind durch einen veränderten Phänotyp charakterisiert. Infolge der gehäuften Präsenz und übersteigerten Funktion im dermalen Infiltrat tragen die Langerhanszellen wesentlich zur Aufrechterhaltung und Potenzierung der Circuli vitiosi der gestörten Immunreaktion bei Patienten mit atopischer Dermatitis bei [31].

Normale epidermale Langerhanszellen exprimieren CD1a, jedoch kein CD1b oder CD36. Normale dermale Langerhanszellen exprimieren demgegenüber CD1a in geringen Mengen, kein CD36, jedoch CD1b. Dieses Schema wird im Falle der atopischen Dermatitis durch ein einheitliches Muster ersetzt. Diese Zellen sind durch hohe Level von sowohl CD1a und CD1b als auch in geringem Maße von CD36 gekennzeichnet [31].

Demnach erfolgte der immunhistochemische Nachweis der Langerhanszellen mit Hilfe der CD1a-Färbung, um so die Detektierung möglichst aller Langerhanszellen sicherzustellen. Vor Therapiebeginn konnte eine hohe Prozentzahl CD1a<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat detektiert werden. Die überwiegende Anzahl dieser Zellen stellte sich im Stratum papillare immunhistochemisch dar. Posttherapeutisch wurde ein signifikanter Rückgang im Entzündungsinfiltrat erreicht.

CD1a<sup>+</sup>-Zellen stellen eine spezielle Differenzierungsstufe der Langerhanszellen dar, deren Präsenz mit einer übersteigerten Funktion zu korrelieren scheint [15, 130]. Dennoch bestehen Hinweise darauf, dass CD1a selbst keinen hyperstimulatorischen Effekt besitzt und, im Gegensatz zu CD1b, weder die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration noch die Freisetzung von Zytokinen begünstigt [130].

Die Reduktion der Anzahl von CD1a<sup>+</sup>-Zellen im inflammatorischen Infiltrat ist ein weiterer Bestandteil der Aufhebung des Teufelskreises in bezug auf die Immunpathogenese der atopischen Dermatitis. Die Langerhanszellen in der läsionalen Haut stellen, wie bereits erörtert, Langerhanszellen eines atypischen Phänotyps dar, die IgE zu binden vermögen und nun die Fähigkeit der Aktivierung allergenspezifischer T-

Helferzellen besitzen. Während normale Langerhanszellen eine Stimulation ausschließlich in Präsenz gebundener Immunkomplexe provozieren, erfolgt im Falle der atopischen Dermatitis eine Stimulation auch in Abwesenheit betreffender Antigene. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Rückgang dermalen CD1a<sup>+</sup>-Langerhanszellen die anschließende Aktivierung von T-Helferzellen und somit den weiteren sich selbst potenzierenden Kreislauf der immunologischen Reaktionen vermindert beziehungsweise blockiert.

Als eine weitere charakteristische Eigenschaft der funktionell und immunpathologisch veränderten dermalen Langerhanszellen fungiert die Expression des humanen Klasse-II-Histokompatibilitäts-Antigens HLA-DR. Dies fördert die Vermutung, dass der intraläsionalen Aktivierung von T-Lymphozyten durch diese antigenpräsentierenden Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis zuteil kommt [130].

Die Minderung der CD1a<sup>+</sup>-Zellen in der Dermis konnte bereits bei der hochdosierten UVA1-Phototherapie als mögliche Ursache für die Verbesserung des Hautzustands quantifiziert werden. Nach erfolgter Therapie fand sich eine signifikante Abnahme der dermalen CD1a<sup>+</sup> dendritischen Zellen. Da die kombinierte UVA-UVB-Therapie dieses Resultat nicht erzielen konnte, wurde die Dosis von 130 J/cm<sup>2</sup> für den positiven Effekt verantwortlich gemacht [43]. Unsere Ergebnisse demonstrieren nun, dass auch die Medium-dose-UVA1-Phototherapie zu einer signifikanten Abnahme der CD1a<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat führt und somit vom Wirkung/Nebenwirkung-Risiko diesbezüglich zu bevorzugen ist.

Trotz des hier dargestellten deutlichen Resultats besteht dennoch eine Diskrepanz zwischen den jetzigen Ergebnissen und den Folgerungen einer älteren Studie, in der lediglich ein positiver Effekt der hochdosierten UVA1-Phototherapie konstatiert werden konnte, jedoch keine vorteilhaften Reaktionen in Hinblick auf eine Reduzierung epidermaler CD1a<sup>+</sup>-Zellen beziehungsweise Affektierung spezifischer Oberflächenmarker nach einer Medium-dose-UVA1-Phototherapie vorzuweisen waren [46].

#### **4.6.6 Modulation proteolytischer Aktivität**

Um den Mechanismus der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie näher zu entschlüsseln, wurden die Biopsate immunhistochemisch in Hinblick auf die proteolytische Aktivität untersucht. Ziel war es herauszufinden, in welchem Ausmaß die UVA1-

Bestrahlung fähig ist, den Status der Proteaseaktivität zu modulieren. Diesbezüglich wurde hier das Vorkommen von Kathepsin G, einer Serin-Protease, im Korium ermittelt.

Die immunhistochemischen Färbungen weisen auf das gehäufte Vorkommen Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat hin. Im Vergleich zur läsionalen Haut des Patienten mit atopischer Dermatitis vor UVA1-Bestrahlung sank die Anzahl der immunpositiven Zellen im dermalen Infiltrat im Rahmen der Therapie stark ab. Ebenso konnte die Reduktion des prozentualen Anteils Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen am dermalen Infiltrat aller drei Zählraster als signifikant gewertet werden.

Unsere Ergebnisse weisen auf eine auffällige Modulation der Expression von Kathepsin G im inflammatorischen Infiltrat infolge der Medium-dose-UVA1-Phototherapie hin. Dennoch bleibt die Quelle der prätherapeutisch hohen Kathepsin-G-Expression unklar.

Neben der Beteiligung der Kathepsine bei der Tumorinvasion und der Metastasierung erfüllt Kathepsin G im Zuge der direkten Proteolyse sowie der indirekten Initialisierung weiterer proteolytischer Kaskaden proinflammatorische Eigenschaften [92, 102]. Kathepsin G ist sowohl an der Degradation der Basalmembran als auch an einer Erhöhung der Permeabilität der Endothelzellen beteiligt. Zudem ist ein destruktives Potenzial gegenüber Laminin, Fibronectin, Proteoglykanen und Kollagen Typ I bekannt. Dies führt teils direkt zur weiteren Verstärkung der Entzündungsreaktion, teilweise aber auch indirekt, beispielsweise durch die Degradation des Laminins, dessen Fragmente proinflammatorische Eigenschaften besitzen [21, 25]. Ein weiteres Charakteristikum der Kathepsin-G-Aktivierung ist die Zerstörung des sogenannten tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). TIMP hemmt die Aktivität der Metalloproteinasen und schützt somit Kollagen und andere Matrixmakromoleküle vor einer möglichen Degradation [66]. Interessant ist zudem die kürzliche Entdeckung, dass Kathepsin G durch Spaltung des humanen brm-Proteins (Homolog des *Drosophila melanogaster* Brahma und *Saccharomyces cerevisiae* Snf-2 Proteins) in der apoptotischen Kaskade in Erscheinung tritt [13].

Auf Grund der beschriebenen Eigenschaften des Kathepsins bezüglich der destruktiven Effekte auf die extrazelluläre Matrix erschließt sich die Hypothese, dass die UVA1-induzierte Down-Regulation der Kathepsin-G<sup>+</sup>-Zellen in einer Minderung der entzündlichen Reaktion des Gewebes verbunden mit der bemerkenswerten Verbesserung der klinischen Symptome resultiert.

#### 4.6.7 Reduktion des eosinophilen Infiltrats

Die atopische Dermatitis zeichnet sich zudem durch eine gesteigerte Präsenz eosinophiler Granulozyten aus. Die Aktivität der Eosinophilen korreliert mit dem Krankheitsgrad und geht mit einer Freisetzung zytotoxischer Proteine der eosinophilen Granula einher [31]. Diese Granula enthalten im wesentlichen vier zytotoxische Proteine. Hierzu zählen MBP, ECP, EPO und EPX/EDN [65]. Studien konnten insbesondere MBP als zellschädigendes Agens mit der Fähigkeit der Stimulation von Mastzellen mit anschließender Degranulation [87], sowie ECP als Marker der Aktivierung eosinophiler Granulozyten identifizieren [71]. ECP scheint in dieser Konstellation nicht nur hinweisend für die Atopie, sondern als Parameter für den Aktivierungszustand des gesamten Pools der Eosinophilen und der klinischen Ausprägung geeignet zu sein [60]. Es gibt darüber hinaus Grund zu der Annahme, dass die erhöhten ECP-Level direkt von den Eosinophilen am Entzündungsherd hervorgerufen werden [61].

Der monoklonale Antikörper EG2 wurde zur Detektierung aktivierter eosinophiler Granulozyten herangezogen. EG2 erkennt die gesplante und sezernierte Form des ECP und erlaubt so die spezifische Selektionierung und Identifizierung aktivierter Eosinophiler im Gewebe [47]. Die prätherapeutische Präsenz einiger EG2<sup>+</sup>-eosinophiler Granulozyten im dermalen Infiltrat wurde von einer nicht-signifikanten Abnahme sowohl hinsichtlich der absoluten als auch der gesamten relativen Präsenz im Anschluss an die durchgeführte Medium-dose-UVA1-Phototherapie begleitet.

Auch in anderen Studien konnte eine Erhöhung der Zellzahl eosinophiler Granulozyten im perivaskulären entzündlichen Infiltrat konstatiert werden. Im Gegensatz dazu konnten EG2<sup>+</sup>-Zellen weder in nicht-läsionalen Abschnitten der Haut noch in Kontrollbiopsien gesunder Probanden gefunden werden [47, 131]. Eosinophile konnten im Falle der atopischen Dermatitis mit einem Peak bei 24-48 Stunden nach epikutaner Applikation von Hausstaubmilben-Allergen im Entzündungsinfiltrat bestimmt werden. Die Hälfte von ihnen reagierte positiv für ECP [40].

Die Eosinophilen stellen eine charakteristische Zellpopulation vornehmlich in der chronischen Phase der atopischen Dermatitis dar und scheinen maßgeblich an der Entwicklung der Entzündung beteiligt zu sein. Somit trägt die Reduktion infolge einer Therapie, in diesem Fall der Medium-dose-UVA1-Phototherapie, erheblich zur Verbesserung des Hautbefundes bei [16]. Dennoch bleibt die Frage offen, ob die Abnahme der EG2<sup>+</sup>-Zellen im Gewebe primär die Folge der UVA1-Strahlung oder indirekt die

Konsequenz der Abnahme der CD3<sup>+</sup>-Zellen ist. IL-5 ist ein essenzieller Faktor für die Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten [16, 22]. Es konnte gezeigt werden, dass CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten die dominante Quelle der IL-5-Expression darstellen. Infolge dessen lässt dies die Spekulation zu, dass die Abnahme der eosinophilen Granulozyten vornehmlich als Ergebnis der Abnahme CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten resultierend aus der Apoptose dieser IL-5-produzierenden Zellen, meist T-Helferzellen des Typs Th2, anzusehen ist.

#### **4.6.8 Mastzellen: Resistenz gegenüber Medium-dose-UVA1-Phototherapie?**

Patienten mit atopischer Dermatitis erleben eine intermittierende Mastzell-Degranulation und somit eine Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren. Diese Ausschüttung kann neben der unmittelbaren Juckreizauslösung ebenso zur Stimulation von Granulozyten, Lymphozyten und Zellen des MPS führen. Zusätzlich können die Mastzellen infolge der TNF- $\alpha$ -Sekretion die Disbalance der T-Helferzellgruppen zugunsten der Th2-Lymphozyten begünstigen [31]. Daneben fördern die Mastzellmediatoren beispielsweise Vasodilatation, Rekrutierung, Aktivierung sowie Infiltration von Entzündungszellen sowie Basalmembranschädigungen.

In den prätherapeutischen Biopsien erfolgte der Nachweis einer Vielzahl von Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen im dermalen inflammatorischen Infiltrat. Nach Applikation der UVA1-Phototherapie wurde allerdings kein eindeutiger Rückgang, sondern teilweise eine prozentuale Zunahme der immunopositiven Zellen bei gleichbleibender mittlerer absoluter Anzahl registriert.

Die Mastzellen treten als mobile Zellpopulation durch Proliferation und Degranulation in der Immunpathogenese der entzündlichen Hautreaktion bei atopischer Dermatitis in Erscheinung. Ein möglicher Mechanismus scheint eine Veränderung des Verhältnisses von cAMP-Agonisten zu sein, die eventuell als Folge einer gesteigerten cAMP-Phosphodiesterase anzusehen ist [31].

Neben der bereits erläuterten Sekretion von Mediatoren [16], die zur Initiierung und Unterhaltung der Entzündung beizutragen vermögen, wird ebenso ein Zusammenhang bezüglich der direkten Involvierung von Nervenzellen diskutiert. Der von den Hautnerven freigesetzte Mediator SP besitzt das Potenzial, Mastzellen zur Degranulation anzuregen und gewinnt somit als mögliches Verbindungsglied zwischen psychischen Stressoren und

der läsionalen Haut zunehmend an Bedeutung [16, 31]. Man nimmt indes an, dass SP im perivaskulären Infiltrat und im Stratum papillare im Falle der atopischen Dermatitis gegenüber gesunden Kontrollpersonen erhöht ist. Zudem wird die Existenz von sogenannten Neuroeffektor-Junktionen zwischen Mastzellen und Nervenfasern postuliert [106]. Dennoch ist die Degranulation nur ein Weg der Gewebeschädigung ausgelöst durch SP. Sogar Mastzellen selbst sind denkbare Quelle von SP und somit für die weitere Rekrutierung von Entzündungszellen mitverantwortlich [116].

Es konnte derweil demonstriert werden, dass UVA1-Bestrahlung in der Lage ist, die TNF- $\alpha$ -Konzentration im sogenannten suction blister fluid zu senken. Da besonders Mastzellen TNF- $\alpha$  beinhalten und der Therapieeffekt der Hochdosis-UVA1-Phototherapie in der Behandlung der Urtikaria pigmentosa belegt werden konnte, scheinen Mastzellen ein wichtiges Ziel der UVA1-Behandlung zu sein [120, 124]. Dies bestätigte auch eine direkte Untersuchung des Zellverhaltens der Mastzellen auf eine Hochdosis-Behandlung. Auch hier konnte der Nachweis einer, wenn auch geringen, Abnahme der Mastzellanzahl in den dermalen Schichten läsionaler Atopikerhaut erfolgen [43].

Die Feststellung, dass die Applikation einer Medium-dose-UVA1-Phototherapie in 15 Behandlungssitzungen über einen Zeitraum von drei Wochen von keiner Verminderung der Antihumane-Mastzell-Tryptase<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat begleitet wurde, wirft nun die Frage auf, ob die beschriebene Beteiligung der Mastzellen in der Immunpathogenese der atopischen Dermatitis hinweisgebend für eine enge Relation zwischen der quantitativen Mastzell-Präsenz und dem Hautzustand, sowie verantwortlich für die klinische Verbesserung ist. Andererseits gibt die therapiebedingte Abheilung der Hautläsionen Anlass zu der Annahme, dass die UVA1-Phototherapie zwar keine Abnahme der Mastzellzahl bedingt, aber sie eventuell in ihrer Aktivität oder Sekretion hemmt. Eigene Erfahrungen in Hinblick auf erfolglose Behandlungsversuche bei der Therapie der Urtikaria pigmentosa unter Nutzung der UVA1-Phototherapie lassen jedoch den Verdacht der Resistenz dermalen Mastzellen gegenüber diesem Regime erhärten [4]. Schließlich ist diesbezüglich auch die Alternative in Betracht zu ziehen, dass sich die nicht zufriedenstellenden Behandlungsversuche der Urtikaria auf Grund der Existenz unterschiedlicher Subklassen von Mastzellen im Gegensatz zur atopischen Dermatitis ergeben und somit die Möglichkeit besteht, dass es sich bei der fehlenden Veränderung lediglich um einen  $\beta$ -Fehler in Anbetracht der geringen Patientenzahl handelt [2]. Es gilt somit in weiteren Studien zu prüfen, ob eine Veränderung bei einem größeren Patientenkollektiv eintritt, ob die Verbesserung des Hautzustands nach erfolgreicher

Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie mit einer Abnahme der relativen Dichte immunreaktiver Nervenfasern korreliert oder auch mit einer verminderten Ausschüttung von Neuropeptiden einher geht. Ebenso interessant wäre eine Darstellung der relativen Nähe zwischen Mastzellen und Nerven, die weitere Einblicke in die Aktivierungskaskade gewährleisten würde [101].

#### **4.6.9 Parallele Depletion von Aktivität und Proliferation**

Histologische Untersuchungen weisen in läsionaler Haut der atopischen Dermatitis häufig auf eine Ähnlichkeit zur Typ-IV-Reaktion hin. Dennoch bleibt hier, im Gegensatz zur konventionellen DTH-Reaktion, die Expression von HLA-DR auf den Keratinozyten weitestgehend aus. Als möglicher Grund wird die verminderte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  diskutiert [47]. Demgegenüber exprimieren T-Helferzellen nach einer intraläsionalen Aktivierung HLA-DR auf ihrer Oberfläche [88].

Die im Rahmen dieser Promotionsschrift erhobenen Daten beinhalten eine große Anzahl HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat. Nach der durchgeführten Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie konnte eine diskrete Verminderung des prozentualen Anteils HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen kombiniert mit einer Minderung der Gesamtzellzahl erkannt werden.

Die erhöhte Expression von HLA-DR<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der läsionalen Dermis sowie im Serum wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen konstatiert [105, 111]. Mittels der hier applizierten UVA1-Behandlung konnte der Anteil HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen leicht gesenkt werden. Diese Depletion steht eventuell im Zusammenhang mit der verminderten Anzahl an CD4<sup>+</sup>-Zellen.

Zusätzlich zur HLA-DR-Präsenz auf aktivierten T-Helferzellen wurde die Expression dieses Oberflächenantigens auch auf den dermalen Langerhanszellen, neben CD1a, CD1b und CD36, konstatiert [130]. Inwieweit die Abnahme von HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen in der vorliegenden Studie mit einer Abnahme der dermalen Langerhanszellen vergesellschaftet ist, bleibt jedoch offen. Da die absoluten Zahlen der HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen allerdings weit über den korrespondierenden Zahlen der dermalen Langerhanszellen liegen, ist eine überlegene Reduzierung der HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen im Zuge der Reduktion CD4<sup>+</sup>-Zellen anzunehmen.

Ergänzend zum Nachweis der HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen erfolgte die immunhistochemische Detektierung des Ki-67-Proteins unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers MIB-1. Das Ki-67-Antigen ist proliferationsassoziiert und wird in allen aktiven Phasen des

Zellzyklus exprimiert. Im Gegensatz zur HLA-DR-Expression kam es hierbei zu einer ausgeprägten Verminderung immunopositiver Zellen verbunden mit einer signifikanten Abnahme des Prozentanteils dieser Zellen im Rahmen der UVA1-Therapie. Somit dient dies als Indikator für eine gesenkte zelluläre Proliferation beziehungsweise für eine Abnahme proliferierender Zellen im dermalen perivaskulären Infiltrat. Auf Grund der beschriebenen Eigenschaften und Einflüsse von p53 auf Zellzyklus und Apoptose-Induktion ist eine Korrelation zwischen Verringerung der MIB-1<sup>+</sup>-Zellen sowie einem Anstieg p53<sup>+</sup>-Zellen zu vermuten. Das p53-Protein, welches posttherapeutisch in erhöhtem Maße detektierbar war, dient der Wachstumssuppression sowie der Induktion apoptotischer Vorgänge. Es kontrolliert diesbezüglich, wie bereits ausführlich beschrieben, in der Hauptsache den G1-Checkpoint und vermag hier einen Zellzyklus-Arrest und folglich eine verminderte MIB-1-Expression hervorzurufen.

#### ***4.7 Die Medium-dose-UVA1-Phototherapie: eine innovative Therapiemodalität***

Die UV-Therapie genießt bereits seit den 70er Jahren im Rahmen der Balneo-, Photo- und Photochemotherapie Ansehen in der praktischen Dermatologie und in der dermatologischen Forschung. Ebenso wie eine Reihe anderer Erkrankungen der Haut lässt sich auch die atopische Dermatitis potent mittels UV-Therapie behandeln.

1990 wurde erstmals in einer kontrollierten Studie die Überlegenheit der kombinierten UVA-UVB-Therapie gegenüber der konventionellen UVB-Phototherapie und somit der Einfluss des UVA1-Phototherapiespektrums in der Behandlung der atopischen Dermatitis beschrieben [56].

Die 1992 publizierte Studie über den Vergleich zwischen der hochdosierten UVA1-Phototherapie und der kombinierten UVA-UVB-Therapie erreichte den Durchbruch in der UVA1-Behandlung der atopischen Dermatitis. Die UVA1-Therapie wurde als Ganzkörperbestrahlung mit einer Einzeldosis von 130 J/cm<sup>2</sup> und einer kumulativen Dosis von 1950 J/cm<sup>2</sup> verabreicht. Bereits nach sechs UVA1-Hochdosis-Behandlungssitzungen wurde eine Abnahme im Schweregrad von 50% verzeichnet. Demgegenüber konnte hier keine signifikante Verbesserung mittels kombinierter UVA-UVB-Therapie beobachtet werden. In derselben Studie war der klinische Erfolg mit einer Reduktion des ECP-Serumspiegels assoziiert. Ob dieser Sachverhalt auf die direkte Modulation der

Eosinophilen zurückführbar oder lediglich im Zuge der allgemeinen Besserung als Marker verwendbar ist, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden.

Neben einer beobachteten leicht therapierbaren Xerose sowie dem Nachteil der enormen Hitzeproduktion und einem teils über 48 Stunden bestehenden sogenannten UVA1-Erythem nach Therapie mit den konventionellen Bestrahlungseinheiten wurden weitere Nebenwirkungen nicht beobachtet [80].

Ebenfalls 1992 konnten mit Hilfe der UVA1-Kaltlicht-Phototherapie gute Ergebnisse in der Behandlung der akuten atopischen Dermatitis erzielt werden. Im Gegensatz zur hochdosierten UVA-Therapie wurden hier nur geringe kumulative Dosen von 218 beziehungsweise 410 J/cm<sup>2</sup> verwendet. Die verwendeten Einzeldosen lagen in der ersten Woche ansteigend zwischen 3,3 J/cm<sup>2</sup> und 26,4 J/cm<sup>2</sup> und wurden über weitere zwei Wochen konstant auf 26,4 J/cm<sup>2</sup> gehalten. Im Vergleich zu den ungewöhnlich großen Dosen der hochdosierten UVA1-Phototherapie erzielte diese Therapieform ein jeweils ungefähr gleichwertiges Behandlungsergebnis. Die im Anschluss an die Behandlung bestimmten Score-Werte wiesen einen posttherapeutischen Rückgang von circa 50% auf. Nach Angaben der Autoren erwies sich die UVA1-Behandlung als sehr wirksam und verträglich, selbst unter Verwendung dieser vergleichsweise geringen kumulativen Dosen [97].

Ebenfalls konnte in einer darauf folgenden Studie die Effizienz der UVA1-Kaltlicht-Phototherapie zusätzlich gestärkt werden. Auch hier betrug die kumulative Dosis lediglich 573 J/cm<sup>2</sup> bei einer Steigerung der Einzeldosis von 3,0 J/cm<sup>2</sup> auf 48 J/cm<sup>2</sup> in der ersten Woche und Fortführung dieser Dosis während weiterer zehn Tage. Im Durchschnitt konnte bei diesem Patientenkollektiv unter Berücksichtigung der Non-Responder eine Verbesserung von 38% erzielt werden [14].

1995 erfolgte nunmehr der Vergleich zwischen der niedrigdosierten und der Medium-dose-UVA1-Behandlung der atopischen Dermatitis. Somit sollte die niedrigste optimale therapeutische Dosis ermittelt werden. Es konnte in der Studie demonstriert werden, dass der SCORAD-Score in beiden Gruppen signifikant reduziert werden konnte. Zusätzlich wurde auch ein signifikanter Unterschied des Therapieerfolges zwischen den beiden Gruppen zugunsten der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie konstatiert [76].

Nahezu zeitgleich erschien eine Studie unter Verwendung derselben UVA1-Kaltlicht-Bestrahlungseinheit. Hier wurden Einzeldosen von 10, 35 beziehungsweise 50 J/cm<sup>2</sup> und kumulative Gesamtdosen von 150, 525 beziehungsweise 750 J/cm<sup>2</sup> appliziert. Gleichermaßen wurde auch an dieser Stelle eine signifikante Beziehung bezüglich der

eingesetzten therapeutischen Dosis und der therapeutischen Wirksamkeit postuliert. Allerdings wird den hohen UVA1-Dosen auf Grund möglicher Langzeitnebenwirkungen kritisch entgegengesehen [74].

Auf Grund der fehlenden Ergebnisse über die Dauer des Therapieeffektes sowie über die Existenz eines eventuellen Rebound-Phänomens wurde später über die Nachbeobachtungskontrolle sechs Wochen nach der letzten Behandlungssitzung berichtet. Die zunächst durchgeführte Therapie bestand aus einer Medium-dose-UVA1-Phototherapie mit einer mittleren kumulativen Dosis von  $615 \text{ J/cm}^2$ . Neun Wochen nach Therapiebeginn stellte sich ein Teil der Patienten zur Nachkontrolle wieder vor. Zur Lokalthherapie wurden lediglich pflegende Basistherapeutika verwendet. Hier konnte demonstriert werden, dass sich der Hautzustand nach sechs Wochen immer noch signifikant gegenüber dem Ausgangswert gebessert hatte [77].

Eine spezifische Begleittherapie zur Behandlung der atopischen Dermatitis erfolgte bei allen angesprochenen Studien nicht.

In der Folge erschien eine dreiarmlige randomisierte Multicenterstudie mit hochdosierter UVA1-Bestrahlung. Die UVA1-Hochdosistherapie wurde der topischen Behandlung mit Fluokortolone sowie der kombinierten UVA-UVB-Therapie gegenüber gestellt. Nach zehn Behandlungstagen ließ sich eine Verbesserung des Hautzustandes in allen drei Gruppen erreichen. Sowohl die Hochdosis-UVA1-Therapie als auch die Fluokortolone-Therapie waren der kombinierten UVA-UVB-Phototherapie signifikant überlegen. Zudem konnten signifikante Unterschiede zugunsten der Hochdosis-UVA1-Therapie im Vergleich zur Fluokortolone-Behandlung beobachtet werden. Eine Verminderung der Serum-ECP-Level wurde mittels Hochdosis- und Steroidtherapie erreicht [82].

1999 erschien nun eine vergleichende Studie über die herkömmliche Medium-dose-UVA1-Therapie, die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht- und die kombinierte UVA-UVB-Therapie. Der Behandlungserfolg wurde mittels der Parameter klinischer Befund unter Ermittlung des SCORAD-Scores, Serologie unter Bestimmung von ECP und sIL-2R, Laser-Doppler-Scanner zur Erfassung der Hautperfusion sowie Schwitzen zur Festlegung einer subjektiven Symptomatik evaluiert. Alle drei Therapiemodalitäten führten zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Erscheinungsbilds. Ebenso wie in Vorstudien bereits belegt, war die UVA1-Therapie der kombinierten UVA-UVB-Behandlung signifikant überlegen. Auch hier ließ sich eine Abnahme des Serum-ECP-Spiegels sowie zusätzlich die Abnahme des soluble interleukin-4-receptor (sIL-4R) lediglich in der UVA1-Gruppe zeigen. Unter Berücksichtigung dieser erzielten Ergebnisse sowie unter

Einbeziehung des kutanen Blutflusses und der Schweißbildung während der Therapie gelang zudem der Nachweis der Überlegenheit der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie gegenüber der konventionellen UVA1-Phototherapie. Ebenso konnte auch hier eine mindestens vier Wochen andauernde Rezidivfreiheit nach erfolgreicher UVA1-Bestrahlung ermittelt werden [68, 70].

Eine im Jahre 2001 erschienene Pilotstudie zur Dosisfindung bei der akut exazerbierten atopischen Dermatitis konnte erneut die Überlegenheit der Medium-dose-UVA1-Phototherapie sowie der High-dose-UVA1-Behandlung gegenüber der niedrigdosierten Therapieform belegen. Ein signifikanter Unterschied der Serum-ECP-Spiegel konnte hingegen nicht beobachtet werden [35].

Der Wirkmechanismus der Medium-dose-UVA1-Phototherapie ist bisher nicht aufgeklärt worden. Frühere in-vivo- und in-vitro-Untersuchungen beziehen sich weitestgehend auf die Effekte, die im Anschluss an die hochdosierte UVA1-Behandlung erzielt werden konnten. Die Hochdosis-UVA1-Phototherapie konnte mit einer Reduzierung der IFN- $\gamma$ -Produktion und mit einer Verminderung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in der läsionalen Haut bei atopischer Dermatitis in Zusammenhang gebracht werden. IL-4-Alterationen wurden dabei nicht nachgewiesen [44, 81]. Die in vitro gefundene Induktion der IL-10-Expression durch Keratinozyten weist auf einen parakrinen Weg zur Unterdrückung der IFN- $\gamma$ -Produktion durch T-Helferzellen des Subtyps I hin. Daneben konnte auch eine Reduktion der Mastzellen infolge der Hochdosis-UVA1-Therapie erfasst werden [43]. Ebenso zeigte sich die Aktivität der Langerhanszellen suppressiv beeinflusst. Im Falle der Medium-dose-Therapie konnte in vitro ein solcher Effekt jedoch nicht gefunden werden [73]. Besonderes Interesse der Forschung gilt der Verminderung der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen resultierend aus einer UVA-induzierten Apoptose. Diese Induktion ließ sich auf die direkten Bestrahlungseffekte und der damit einher gehenden Bildung von SOS zurückführen. Demzufolge kommt es offensichtlich, zusätzlich zu den Veränderungen im Zytokinmuster, zu einer Förderung der T-Zell-Apoptose, welche wahrscheinlich den Hauptmechanismus der positiven Wirkung der Hochdosis-UVA1-Phototherapie darstellt [82].

Im Unterschied zur postulierten fehlenden IL-4-Alteration bei der Hochdosis-UVA1-Phototherapie konnte kürzlich dennoch eine Veränderung des löslichen IL-4R unter Medium-dose-UVA1-Phototherapie dargestellt werden. Die IL-4-Wirkungen werden über die Interaktion mit den auf den Zelloberflächen lokalisierten hochaffinen IL-4-R vermittelt. Dieser Rezeptor ist in relativ geringer Anzahl auf T- und B-Lymphozyten vorhanden und wird über IL-2 und IL-4 hochreguliert. In diesem Prozess wird ein Fragment des IL-4-R

kontinuierlich abgespalten und zirkuliert nun im Serum. In der Untersuchung des sIL-4R-Levels im Serum konnte bei Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswert nach durchgeführter Medium-dose-UVA1-Phototherapie eine signifikante Minderung detektiert werden. Dies weist, entgegen der in-vitro-Resultate, auf eine Einflussnahme dieser Therapieform auf die Zytokinproduktion der Th2-Lymphozyten hin, kann aber auch Ausdruck einer Abnahme der CD4<sup>+</sup>-Zellen insgesamt beziehungsweise speziell der Th2-Lymphozyten sein [71].

Entgegen früherer Meinungen scheint auch die Besiedlung der atopischen Haut mit *Staphylococcus aureus* Ziel der UVA1-Therapie zu sein. Große Zahlen von *Staphylococcus aureus* besiedeln die Hautoberfläche inflammatorischer Läsionen bei atopischer Dermatitis. Diese Kolonien werden als Triggerfaktoren gehandelt. In vitro hat sich unlängst die Reduktion der Bakterienzahl bei 40-80 J/cm<sup>2</sup> bestätigt. Demnach würden in vivo bereits therapeutische Dosen von 50 J/cm<sup>2</sup> ausreichen, um eine wirkungsvolle Minderung des Bakterienwachstums zu erzielen [104].

Dennoch scheint die Medium-dose-UVA1-Phototherapie eine limitierte Effektivität in Hinblick auf Langzeitergebnisse zu besitzen. Während zwei und vier Wochen nach erfolgter Therapie die erzielte Verbesserung des Hautzustands dem unmittelbar erhobenen posttherapeutischen Bild nahezu gleichkommt, konnte kürzlich in einer Studie ein Anstieg des SCORAD-Scores auf prätherapeutische Werte bereits drei Monate nach erfolgreicher Applikation verzeichnet werden [1].

Schließlich muss allerdings betont werden, dass sich die oben genannten Studien in ihrer Methodik nicht nur bezüglich der verwendeten UVA-Dosen, sondern auch hinsichtlich der Emission zusätzlicher Infrarot-Strahlung unterscheiden. Besonders in Hinblick auf die Hochdosis-UVA1-Phototherapie muss mit einer erwähnenswerten Infrarot-Begleitstrahlung gerechnet werden, die die eventuell vorhandenen unterschiedlichen Effekte auf Zellzusammensetzung und Zytokinausschüttung mit zu verursachen vermag.

#### **4.8 Nebenwirkungspotenzial der UVA1-Phototherapie**

Langzeitnebenwirkungen der UVA1-Bestrahlung sind nach nunmehr erst zehn Jahren der breiteren klinischen Anwendung nicht ausreichend erforscht.

Akut wurde von den Patienten in der vorliegenden Studie über keine Nebenwirkungen berichtet. Es fiel lediglich eine diskrete Hyperpigmentierung der Haut auf. Laut

vergleichender Studien liegt die minimale pigmentierende Dosis (MPD) bei dem Großteil der Patienten mit atopischer Dermatitis bei  $50 \text{ J/cm}^2$  bei einmaliger Bestrahlung [73, 103]. UVA1-induzierte Erytheme werden in der Regel erst ab circa  $90 \text{ J/cm}^2$  Einzeldosis beobachtet [74]. Unter Einhaltung der verwendeten Ausschlusskriterien sind darüber hinaus keine weiteren akuten Nebenwirkungen zu erwarten.

Bezüglich möglicher Langzeiteffekte lässt sich hingegen derzeit noch keine definitive Aussage treffen. Es wird vermutet, dass hohe Dosen mit Werten zwischen 4000 und  $8000 \text{ J/cm}^2$  eine Hyperplasie der elastischen Fasern induzieren. Dies trägt ursächlich zur Hautalterung bei [80]. Zusätzlich kann die Induktion von Kollagenase I in dermalen Fibroblasten als möglicher Faktor für die Entstehung einer vorzeitigen Hautalterung angesehen werden [35, 70]. Bezug nehmend auf die denkbare Karzinogenese der UVA1-Strahlung wird derzeit noch geforscht. Die Tatsache, dass die UVA1-Bestrahlung die karzinogene Strahlung mit Wellenlängen zwischen 315 nm und 320 nm nicht beinhaltet, lässt die Spekulation zu, dass ein eher geringes karzinogenes Risiko zu erwarten ist [14]. Dessen ungeachtet konnte am Modell der nichtpigmentierten haarlosen Maus die Induktion eines Plattenepithelkarzinoms nachgewiesen werden. Allerdings war hierfür die Bestrahlung mit  $220 \text{ kJ/m}^2$  über einen Zeitraum von 265 Tagen notwendig [80]. Eine Übertragung auf den Menschen ist indes noch nicht gelungen, dennoch wurde die vermehrte Entstehung von Plattenepithelkarzinomen bei Psoriasispatienten mit konzentrierter PUVA-Photochemotherapie beobachtet [35].

Gleichwohl konnte in einer eigenen Studie kürzlich die Wirkung der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie auf die intrakutanen Endothelzellen aufgezeigt werden. Offenbar ist die UVA1-Bestrahlung selbst in der vergleichsweise geringen Dosis von  $80 \text{ J/cm}^2$  ein potenter Faktor der Apoptose-Induktion der Endothelien. Bereits nach einer einmaligen Bestrahlung konnten nach drei Stunden erste Hinweise auf apoptotische Vorgänge gefunden werden. Da circa 20% der UVA-Strahlen bis zum dermalen Gefäßsystem vordringen können, scheint die Apoptose-Induktion der Endothelzellen eine der möglichen Hauptnebenwirkungen der UVA1-Phototherapie darzustellen [18].

Da bezüglich der therapeutischen Anwendung selbst hoher UVA1-Dosen in der Dermatologie ein stetiger Zuwachs zu verzeichnen ist, ist weiteres wissenschaftliches Engagement zur Abschätzung eventueller Spätwirkungen gefordert. Zusätzlich sollte den Patienten ein UV-Pass ausgestellt, die Therapie auf zwei Zyklen pro Jahr begrenzt und die Behandlung nur durch einen erfahrenen Dermatologen durchgeführt werden.

## **4.9 Schlussfolgerung**

Die Einbeziehung der hier analysierten Daten als auch der umfassenden Forschungsarbeiten der letzten Jahre lässt nunmehr den Schluss zu, dass die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie unter Verwendung eines Bestrahlungsprotokolls von 15 Behandlungssitzungen mit je  $50 \text{ J/cm}^2$  Einzel- und  $750 \text{ J/cm}^2$  Kumulativdosis im Vergleich der verschiedenen phototherapeutischen Ansätze eine durchaus effektive Therapiemodalität darstellt. Den im Rahmen dieser Promotion ermittelten Resultaten zufolge liegt dem Wirkmechanismus der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie insbesondere die anerkennenswerte Reduktion der in die Dermis immigrierten proinflammatorischen Zellen, darunter  $\text{CD3}^+$ - und  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten, eosinophile Granulozyten sowie Langerhanszellen, sowie deren verminderter Aktivierungs- und Proliferationszustand zugrunde. Dennoch scheint der entscheidende Prozess den vorliegenden Hinweisen zufolge in den Alterationen der Apoptoseregulation hinsichtlich der Balance zwischen bcl-2 und p53 und der hiermit assoziierten Induktion des programmierten Zelltods, ausgelöst infolge der Medium-dose-UVA1-Phototherapie, begründet zu liegen. Auf Grund der relativ geringen applizierten kumulativen Dosis von  $750 \text{ J/cm}^2$  bei einer täglichen Einzelbestrahlungsdosis von  $50 \text{ J/cm}^2$  weist die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie unter dem besonderen Gesichtspunkt der eventuell auftretenden UV-induzierten Langzeitnebenwirkungen ein vermutlich sehr gutes Nutzen-Risiko-Verhältnis auf.

## 5 Zusammenfassung

Entgegen der in der letzten Dekade vornehmlich praktizierten Applikation der Hochdosis-UVA1-Phototherapie als phototherapeutisch erfolgreichste Behandlungsmodalität erfolgte im Rahmen dieser Promotion die Gabe einer Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie mit Einzeldosen von  $50 \text{ J/cm}^2$  und einer kumulativen Dosis von  $750 \text{ J/cm}^2$ , die zunehmend positive Reputation erfährt. Obwohl die hochdosierte UVA1-Behandlung zu einer schnelleren Abheilung der Läsionen bei atopischer Dermatitis führt, erzielt die Medium-dose-UVA1-Phototherapie mit einer deutlich geringeren kumulativen Dosis nach Abschluss einer dreiwöchigen Therapie ähnlich vielversprechende Resultate. Unter Verwendung spezieller immunhistochemischer Methoden galt es in der vorliegenden Studie zu klären, inwieweit die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie in der Lage ist, eine Immunmodulation pathogenetisch bedeutsamer Zellpopulationen zu induzieren, den Aktivitäts- und Proliferationsstatus zu senken sowie eine Steigerung apoptotischer Kaskaden zu provozieren.

Nach der Entnahme von Probiopsien aus entzündlich affektierten Arealen im Schulterbereich und Durchführung der immunhistochemischen Färbetechniken zum Nachweis von  $\text{bcl-2}^+$ ,  $\text{p53}^+$ ,  $\text{ISEL}^+$ ,  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD1a}^+$ ,  $\text{Kathepsin-G}^+$ ,  $\text{EG2}^+$ ,  $\text{Antihumane-Mastzell-Tryptase}^+$  sowie  $\text{HLA-DR}^+$  und  $\text{MIB-1}^+$ -Zellen erfolgte bei einem Kollektiv von 15 Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis (SCORAD-Score  $>45$ ) die Beurteilung korrespondierender prä- und posttherapeutischer Präparate unterhalb der dermoepidermalen Junktion mittels einzelner Zählraster. Die statistische Auswertung wurde anhand der prozentualen Anteile der jeweils positiv markierten Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl durchgeführt und mittels t-Test für paarige Stichproben auf ihre Signifikanz ( $p < 0,0046$ ) hin überprüft.

Ähnlich des postulierten Mechanismus der hochdosierte UVA1-Phototherapie ließ sich auch hier eine signifikante Verminderung der dermalen Langerhanszellen (im Mittel 5,4% vs. 0,6%) posttherapeutisch aufzeigen. In Übereinstimmung mit dem postulierten sinkenden Serum-ECP-Level wurde eine Abnahme der eosinophilen Granulozyten im dermalen Infiltrat (im Mittel 2,9% vs. 0,4%) verzeichnet. Einhergehend mit der deutlichen Verbesserung des Hautzustands der Patienten mit atopischer Dermatitis konnte zudem eine signifikante Reduktion der  $\text{Kathepsin-G}^+$ -Zellen (im Mittel 8,0% vs. 4,1%) und somit auch eine Reduzierung proinflammatorischer Einflüsse erzielt werden. Ebenfalls konnte eine geringe posttherapeutische Rezession des Aktivierungszustands seitens  $\text{HLA-DR}^+$ -Zellen

(im Mittel 37,7% vs. 25,9%) sowie eine signifikante Minderung der Proliferationskonstellation der inflammatorischen Zellen anhand des Proliferationsmarkers MIB-1 (im Mittel 7,3% vs. 2,1%) mikroskopisch nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Hochdosis-UVA1-Phototherapie konnte allerdings keine relevante Änderung der Präsenz dermalen Mastzellen (im Mittel 15,5% vs. 17,7%) im Zuge der Medium-dose-UVA1-Phototherapie verzeichnet werden.

Kernelement des Wirkmechanismus der Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie scheint den vorliegenden Daten zufolge jedoch die UVA1-induzierte Apoptose der T-Lymphozyten im dermalen inflammatorischen Infiltrat darzustellen. Die Modulation der Balance zwischen p53 und bcl-2 mit einer signifikanten Abnahme der bcl-2<sup>+</sup>-Zellen (im Mittel 25,4% vs. 8,1%) kombiniert mit einer signifikanten Zunahme der p53 immunopositiven Zellen (im Mittel 4,5% vs. 16,4%) war mit einer ebenfalls signifikanten Reduktion der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (im Mittel 28,4% vs. 12,1%), insbesondere der CD4<sup>+</sup>-Zellen (im Mittel 18,8% vs. 7,9%), assoziiert. Simultan kam es zum relativen Anstieg der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (im Mittel 9,3% vs. 14,6%) sowie der apoptotischen ISEL<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Infiltrat. Dieser vermehrte apoptotische Zelltod der T-Lymphozyten, darunter vermutlich auch einer Vielzahl CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen vom Typ Th2, korreliert demnach mit der bekannten Minderung des IL-4-Rezeptorserumspiegels.

Als Konsequenz der ermittelten Daten erschließt sich, unter Berücksichtigung sowohl der Immunpathogenese der atopischen Dermatitis als auch der vielseitig erforschten Hochdosis-UVA1-Phototherapie, dass die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie unter Verwendung eines Bestrahlungsprotokolls von 15 Behandlungssitzungen mit je 50 J/cm<sup>2</sup> Einzel- und 750 J/cm<sup>2</sup> Kumulativdosis eine vergleichsweise äußerst effektive Therapiemodalität darstellt, die von einer anerkennenswerten Reduktion der in die Dermis immigrierten proinflammatorischen Zellen begleitet wird. Diese Abnahme ist den vorliegenden Hinweisen zufolge insbesondere auf die Alterationen der Apoptoseregulation sowie auf die Minderung von Aktivität und Pathogenität zurückführbar. Aufgrund der relativ geringen applizierten kumulativen Dosis weist die Medium-dose-UVA1-Kaltlicht-Phototherapie, speziell unter dem Aspekt der möglicherweise auftretenden UV-induzierten Langzeitwirkungen, ein gutes Nutzen-Risiko-Verhältnis auf.

## Literaturverzeichnis

1. Abeck D., Schmidt T., Fesq H., Strom K., Mempel M., Brockow K., Ring J.  
Long-term efficacy of medium-dose UVA1 phototherapy in atopic dermatitis.  
J. Am. Acad. Dermatol. 42, 254-257 (2000)
2. Algermissen B., Bauer F., Schadendorf D., Kropp J.D., Czarnetzki B.M.  
Analysis of mast cell subpopulations (MCT, MCTC) in cutaneous inflammation using  
novel enzyme-histochemical staining techniques.  
Exp. Dermatol. 3, 290-297 (1994)
3. Alnemri E.S., Livingston D.L., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong  
W.W., Yuan J.  
Human ICE/CED-3 protease nomenclature.  
Cell 87, 171 (1996)
4. Altmeyer P.  
Persönliche Mitteilung (2001)
5. Amarante-Mendes G.P., Finucane D.M., Martin S.J., Cotter T.G., Salvesen G.S., Green  
D.R.  
Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and -independent commitment  
for cell death.  
Cell Death Differ. 5, 298-3066 (1998)
6. Attardi L.D., Lowe S.W., Brugarolas J., Jacks T.  
Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for  
oncogene-mediated apoptosis.  
EMBO. J. 15, 3702-3712 (1996)

7. Baadsgaard O., Lisby S., Lange Wantzin G., Wulf H.C., Cooper K.D.  
Rapid recovery of Langerhans cell alloreactivity, without induction of autoreactivity, after in vivo ultraviolet A, but not ultraviolet B exposure of human skin.  
J. Immunol. 142, 4213-4218 (1989)
8. Baffy G., Miyashita T., Williamson J.R., Reed J.C.  
Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced bcl-2 oncoprotein.  
J. Biol. Chem. 268, 6511-6519 (1993)
9. Bargou R.C., Bommert K., Weinmann P., Daniel P.T., Wagener C., Mapara M.Y., Dörken B.  
Induction of bax-alpha precedes apoptosis in a human B lymphoma cell line: Potential role of the bcl-2 gene family in surface IgM-mediated apoptosis.  
Eur. J. Immunol. 25, 770-775 (1995)
10. Bayerl C.  
UV-Therapie der atopischen Dermatitis – eine Aufgabe für Pioniere?  
Akt. Dermatol. 23, 30-34 (1997)
11. Bernardi P., Broekemeier K.M., Pfeiffer D.R.  
Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane.  
J. Bioenerg. Biomembr. 26, 509-517 (1994)
12. Bieber T., Dannenberg B., Prinz J.C., Rieber E.P., Stolz W., Braun-Falco O., Ring J.  
Occurrence of IgE-bearing epidermal Langerhans cells in atopic eczema: A study of the time course of the lesions and with regard to the IgE serum level.  
J. Invest. Dermatol. 93, 215-219 (1989)
13. Biggs J.R., Yang J., Gullberg U., Muchardt C., Yaniv M., Kraft A.S.  
The human brm protein is cleaved during apoptosis: The role of cathepsin G.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 3814-3819 (2001)

14. Bohlen F. von, Kallusky J., Woll R.  
Die UVA-1-Kaltlichtbehandlung der atopischen Dermatitis.  
Allergologie 17, 382-384 (1994)
15. Böhm I., Bauer R.  
Th1-Zellen, Th2-Zellen und atopische Dermatitis.  
Hautarzt 48, 223-227 (1997)
16. Borish L., Joseph B.Z.  
Inflammation and the allergic response.  
Med. Clin. North. Am. 76, 765-787 (1992)
17. Breuckmann F., Avermaete A., Kreuter A., Altmeyer P., Kobyletzki G. von  
Indications for UVA1 phototherapy: An Update.  
Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 17, 83 (2001)
18. Breuckmann F., Kobyletzki G. von, Avermaete A., Kreuter A., Mannherz H.G.,  
Altmeyer P.  
Apoptosis of human dermal endothelial cells as a potential side effect following  
therapeutic administration of UVA1 irradiation: preliminary results.  
Arch. Dermatol. Res. 294, 303-309 (2002)
19. Breuckmann F., Kobyletzki G. von, Avermaete A., Radenhausen M., Höxtermann S.,  
Pieck C., Schöneborn P., Gambichler T., Freitag M., Hoffmann K., Altmeyer P.  
Mechanisms of apoptosis: UVA1-induced immediate and UVB-induced delayed  
apoptosis in human T cells in vitro.  
J. EADV 17, 418-429 (2003)
20. Breuckmann F., Kreuter A., Wotzlaw C., Altmeyer P., Kobyletzki G. von  
Increased expression of bcl-2 provides inflammation in atopic dermatitis and cutaneous  
T-cell lymphoma in vivo.  
J. EADV 14 (Suppl. 1), 122 (2000)

21. Bruch M., Landwehr R., Engel J.  
Dissection of laminin by cathepsin G into its long-arm and short-arm structures and localization of regions involved in calcium dependent stabilization and self-association.  
*Eur. J. Biochem.* 185, 271-279 (1989)
22. Bruijnzeel P.L., Kuijper P.H., Rihs S., Betz S., Warringa R.A., Koenderman L.  
Eosinophil migration in atopic dermatitis: Increased migratory responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, neutrophil-activating factor, platelet-activating factor, and platelet factor 4.  
*J. Invest. Dermatol.* 100, 137-142 (1993)
23. Burren R., Scaletta C., Frenk E., Panizzon R.G., Applegate L.A.  
Sunlight and carcinogenesis: Expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations.  
*Int. J. Cancer* 76, 201-206 (1998)
24. Campbell C., Quinn A.C., Angus B., Farr P.M., Rees J.L.  
Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation.  
*Cancer Res.* 53, 2697-2699 (1993)
25. Capodici C., Muthukumaran G., Amoruso M.A., Berg R.A.  
Activation of neutrophil collagenase by cathepsin G.  
*Inflammation* 13, 245-258 (1989)
26. Caproni M., Bianchi B., D'Elisio M.M., De Carli M., Amedei A., Fabbri P.  
In vivo relevance of CD30 in atopic dermatitis.  
*Allergy* 52, 1063-1070 (1997)
27. Chatila T., Geha R.S.  
Signal transduction by microbial superantigens via MHC class II molecules.  
*Immunol. Rev.* 131, 43-59 (1993)

28. Cohen J.J.  
Apoptosis  
Immunol. Today 14, 126-130 (1993)
29. Coleman R., Trembath R.C., Harper J.I.  
Genetic studies of atopy and atopic dermatitis.  
Br. J. Dermatol. 136, 1-5 (1997)
30. Colver G.B., Symons J.A., Duff G.W.  
Soluble interleukin 2 receptor in atopic eczema.  
Br. Med. J. 298, 1426-1428 (1989)
31. Cooper K.D.  
Atopic dermatitis: Recent trends in pathogenesis and therapy.  
J. Invest. Dermatol. 102, 128-137 (1994)
32. Culotta E., Koshland D.E.  
P53 sweeps through cancer research.  
Science 262, 1958-1961 (1993)
33. De Laat A., Kroon E.D., De Gruijl F.R.  
Cell cycle effects and concomitant p53 expression in hairless murine skin after  
longwave UVA (365 nm) irradiation: A comparison with UVB irradiation.  
Photochem. Photobiol. 65, 730-735 (1997)
34. Der-Petrossian M., Seeber A., Honigsmann H., Tanew A.  
Half-side comparison study on the efficacy of 8-methoxypsoralen bath-PUVA versus  
narrow-band ultraviolet B phototherapy in patients with severe chronic atopic  
dermatitis.  
Br. J. Dermatol. 142, 39-43 (2000)

35. Dittmar H.C., Pflieger D., Schöpf E., Simon J.C.  
UVA1-Phototherapie – Pilotstudie zur Dosisfindung bei der akut exazerbierten atopischen Dermatitis.  
Hautarzt 52, 423-427 (2001)
36. El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer E.W., Kinzler K.W., Vogelstein B.  
WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.  
Cell 71, 817-825 (1993)
37. European Task Force on Atopic Dermatitis  
Severity scoring of atopic dermatitis: The SCORAD index.  
Dermatology 186, 23-31 (1993)
38. Furth R. van, Zwet T.L. van  
Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-desoxyuridine incorporation in individual cells.  
J. Immunol. Methods 108, 45-51 (1988)
39. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson A.B.  
Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.  
J. Cell. Biol. 119, 493-501 (1992)
40. Gebhardt M., Wenzel H.C., Hipler U.C., Herrmann D., Wollina U.  
Monitoring of serologic immune parameters in inflammatory skin diseases.  
Allergy 52, 1087-1094 (1997)
41. Godar D.E., Miller S.A., Thomas D.P.  
Immediate and delayed apoptotic cell death mechanisms: UVA versus UVB and UVC irradiation.  
Cell Death Differ. 1, 59-66 (1994)

42. Gordon D.J., Ostere L.S., Holden C.A.  
Neuropeptide modulation on Th1 and Th2 cytokines in peripheral blood mononuclear leucocytes in atopic dermatitis and non-atopic controls.  
Br. J. Dermatol. 137, 921-927 (1997)
43. Grabbe J., Welker P., Humke S., Grewe M., Schöpf E., Henz B.M., Krutmann J.  
High-dose ultraviolet A1 (UVA1), but not UVA/UVB therapy, decreases IgE-binding cells in lesional skin of patients with atopic eczema.  
J. Invest. Dermatol. 107, 419-422 (1996)
44. Grewe M., Gyufko K., Block R., Schöpf E., Krutmann J.  
High-dose-ultraviolet-A1 therapy differentially affects transcript levels of interferon gamma and interleukin-4 in lesional atopic skin.  
Br. J. Dermatol. 129, 28 (1993)
45. Groves R.W., Allen M.H., Barker J.N., Haskard D.O., MacDonald D.M.  
Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation.  
Br. J. Dermatol. 124, 117-123 (1991)
46. Gruner S., Hofmann T., Meffert H., Sönnichsen N.  
Studies on the effect of a high dose UVA-1 radiation therapy on surface markers and function of epidermal Langerhans cells.  
Arch. Dermatol. Res. 285, 283-286 (1993)
47. Hamid Q., Boguniewicz M., Leung D.Y.M.  
Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis.  
J. Clin. Invest. 94, 870-876 (1994)
48. Hanifin J.M., Rajka G.  
Diagnostic features of atopic dermatitis.  
Acta. Derm. Venereol. 92, 44-47 (1980)

49. Hanifin J.M., Thurston M., Omoto M., Cherill R., Tofte S.J., Graeber M., EASI Evaluator Group.  
The eczema area and the severity index (EASI): Assessment of reliability in atopic dermatitis.  
Exp. Dermatol. 10, 11-18 (2001)
50. Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J.  
The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.  
Cell 75, 805-816 (1993)
51. Heijden F. van der, Wierenga E.A., Bos J.D., Kapsenberg M.L.  
High frequency of IL-4 producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin.  
J. Invest. Dermatol. 97, 389-394 (1991)
52. Hoffmann A., Kobyletzki G. von, Kreuter A., Breuckmann F., Freitag M., Altmeyer P., Hoffmann K.  
Circulating activation markers of atopic dermatitis following extracorporeal photochemotherapy.  
J. EADV 14 (Suppl. 1), 239 (2000)
53. Ihn H., Sato S., Fujimoto M., Kikuchi K., Takehara K.  
Clinical significance of serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with localized scleroderma.  
Br. J. Dermatol. 134, 843-847 (1996)
54. Isoherranen K., Sauroja H., Jansen C., Punnonen K.  
UV irradiation induces downregulation of bcl-2 expression in vitro and in vivo.  
Arch. Dermatol. Res. 291, 212-216 (1999)

55. Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S.  
The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.  
Cell 66, 233-243 (1991)
56. Jekler J., Larkö O.  
Combined UVA-UVB versus UVB phototherapy for atopic dermatitis: A paired comparison study.  
J. Am. Acad. Dermatol. 22, 49-53 (1990)
57. Joost T. van, Kozel M.M.A., Tank B., Troost R., Prens E.P.  
Cyclosporine in atopic dermatitis. Modulation in the expression of immunologic markers in lesional skin.  
J. Am. Acad. Dermatol. 27, 922-928 (1992)
58. Jujo K., Renz H., Abe J., Gelfand E.W., Leung D.Y.M.  
Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis.  
J. Allergy. Clin. Immunol. 90, 323-331 (1992)
59. Kane D.J., Örd T., Anton R., Bredesen D.E.  
Expression of bcl-2 inhibits necrotic neuronal cell death.  
J. Neurosci. Res. 40, 269-275 (1995)
60. Kapp A.  
The role of eosinophils in the pathogenesis of atopic dermatitis-eosinophil granule proteins as markers of disease activity.  
Allergy 48, 1-5 (1993)
61. Kapp A., Czech W., Krutmann J., Schöpf E.  
Eosinophil cationic protein in sera of patients with atopic dermatitis.  
J. Am. Acad. Dermatol. 24, 555-558 (1991)

62. Kastan M.B., Zahn Q., El-Deiry W.S., Carrier F., Jacks T., Walsh W.V., Plunkett B.S., Vogelstein B., Fornace A.J.  
A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-teleangiectasia.  
Cell 71, 587-597 (1992)
63. Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E., Poirier G.G.  
Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis.  
Cancer Res. 53, 3976-3985 (1993)
64. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.  
Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics.  
Br. J. Cancer 26, 239-247 (1972)
65. Kim T.Y., Park H.J., Kim C.W.  
Eosinophil cationic protein (ECP) level and its correlation with eosinophil number or IgE level of peripheral blood in patients with various skin diseases.  
J. Dermatol. Sci. 15, 89-94 (1997)
66. Kirk T.Z., Mark M.E., Chua C.C., Chua B.H., Mayes M.D.  
Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1.  
J. Biol. Chem. 270, 3423-3428 (1995)
67. Kobyletzki G. von, Breuckmann F., Kreuter A., Avermaete A., Hoffmann K., Altmeyer P.  
Increased bcl-2 gene expression in severe atopic dermatitis in vivo.  
J. Invest. Dermatol. 117, 533 (2001)

68. Kobyletzki G. von, Freitag M., Herde M., Höxtermann S., Stücker M., Hoffmann K., Altmeyer P.  
Phototherapie bei schwerer atopischer Dermatitis – Vergleich zwischen herkömmlicher UVA1-Therapie, UVA1-Kaltlicht- und kombinierter UVA-UVB-Therapie.  
Hautarzt 50, 27-33 (1999)
69. Kobyletzki G. von, Heine O., Stephan H., Pieck C., Stücker M., Hoffmann K., Altmeyer P., Mannherz H.G.  
UVA1 irradiation induces deoxyribonuclease dependent apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma in vivo.  
Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 16, 271-277 (2000)
70. Kobyletzki G. von, Pieck C., Hoffmann K., Freitag M., Altmeyer P.  
Medium-dose UVA1 cold-light phototherapy in the treatment of severe atopic dermatitis.  
J. Am. Acad. Dermatol. 41, 931-937 (1999)
71. Kobyletzki G. von, Pieck C., Höxtermann S., Freitag M., Altmeyer P.  
Circulating activation markers of severe atopic dermatitis following ultraviolet A1 cold light phototherapy: Eosinophil cationic protein, soluble interleukin-2 receptor and soluble interleukin-4 receptor.  
Br. J. Dermatol. 140, 966-967 (1999)
72. Koning H., Neijens H.J., Baert M.R.M., Oranje A.P., Savelkoul H.F.J.  
T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. analysis of IL-4, IFN- $\gamma$  and IL-13 mRNA expression and protein production.  
Cytokine 9, 416-426 (1997)
73. Kowalzik L.  
UV-A1-Therapie des atopischen Ekzems – derzeitiger Stand.  
Dt. Derm. 45, 930-933 (1997)

74. Kowalzik L., Büttner G., Neuber K., Kleinheinz A., Weichenthal M., Ring J.  
UVA1-Kaltlicht-Bestrahlungsbehandlung des atopischen Ekzems: Positive  
Dosiswirkungskorrelation.  
Hautnah Derm. 11, 374-378 (1995)
75. Kowalzik L., Kleinheinz A., Neuber K., Weichenthal M., Köhler I., Ring J.  
Elevated serum levels of soluble adhesion molecules ICAM-1 and ELAM-1 in patients  
with severe atopic eczema and influence of UVA1 treatment.  
Dermatology 190, 14-18 (1995)
76. Kowalzik L., Kleinheinz A., Weichenthal M., Neuber K., Köhler I., Grosch J.,  
Lungwitz G., Seegeberg C., Ring J.  
Low dose versus medium dose UV-A1 treatment in severe atopic eczema.  
Acta. Derm. Venereol. 75, 43-45 (1995)
77. Kowalzik L., Waldmann Th., Suckow M., Pönninghaus J.-M.  
Dauer des Therapieerfolges bei UVA1-Therapie des schweren atopischen Ekzems.  
Derm. 4, 139-143 (1998)
78. Kress M., May E., Cassingena R., May P.  
Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-  
simian virus 40 tumor serum.  
J. Virol. 31, 472-483 (1979)
79. Kroemer G.  
The proto-oncogene bcl-2 and its role in regulating apoptosis.  
Nat. Med. 6, 614-620 (1997)
80. Krutmann J., Czech W., Diepgen T., Niedner R., Kapp A., Schöpf E.  
High-dose UVA1 therapy in the treatment of patients with atopic dermatitis.  
J. Am. Acad. Dermatol. 26, 225-230 (1992)

81. Krutmann J., Czech W., Parlow F., Trefzer U., Kapp A., Schöpf E., Luger T.A.  
Ultraviolet radiation effects on human keratinocyte ICAM-1 expression.  
J. Invest. Dermatol. 98, 923-928 (1992)
82. Krutmann J., Diepgen T.L., Luger T.A., Grabbe S., Meffert H., Sönnichsen N., Czech W., Kapp A., Stege H., Grewe M., Schöpf E.  
High-Dose UVA1 therapy for atopic dermatitis: Results of a multicenter trial.  
J. Am. Acad. Dermatol. 38, 589-593 (1998)
83. Lam M., Dubyak G., Chen L., Nunez G., Miesfeld R.L., Distelhorst C.W.  
Evidence that bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated  $Ca^{2+}$  fluxes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6569-6573 (1994)
84. Lee Y.A., Wahn U., Kehrt R., Tarani L., Businco L., Gustafsson D., Andersson F., Oranje A.P. Wolkertstorfer A., Berg A.V., Hoffmann U., Kuster W., Wienker T., Ruschendorf F., Reis A.  
A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21.  
Nat. Genet. 26, 470-473 (2000)
85. Leist M., Nicotera P.  
The shape of cell death.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 236, 1-9 (1997)
86. Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kühnle S., Nicotera P.  
Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis.  
J. Exp. Med. 185, 1481-1486 (1997)
87. Leung D.Y.M.  
Atopic dermatitis: The skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases.  
J. Allergy Clin. Immunol. 9,; 302-319 (1995)

88. Lever R., Turbitt M., Sanderson A., MacKie R.  
Immunophenotyping of the cutaneous infiltrate and of the mononuclear cells in the peripheral blood in patients with atopic dermatitis.  
J. Invest. Dermatol. 89, 4-7 (1987)
89. Li G., Ho V.C.  
p53-Dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation.  
Br. J. Dermatol. 139, 3-10 (1998)
90. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X.  
Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.  
Cell 91, 479-489 (1997)
91. Linzer D.J., Levine A.J.  
Characterization of a 54k dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.  
Cell 17, 43-52 (1979)
92. Liotta L.A.  
Tumor invasion and metastases: Role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture.  
Cancer Res. 46, 1-7 (1986)
93. Liu X., Zou H., Slaughter C., Wang X.  
DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.  
Cell 89, 175-184 (1997)

94. Lu X., Lane D.P.  
Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing irradiation radiation: Defects in chromosome instability syndromes?  
*Cell* 75, 765-778 (1993)
95. Martin S.J., Reutelingsperger C.P.M., McGahon A.J., Rader J.A., Schie R.C.A.A. van, LaFace D.M., Green D.R.  
Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of bcl-2 and abl.  
*J. Exp. Med.* 182, 1545-1556 (1995)
96. Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L.A., Prévost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G.  
Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis.  
*Science* 281, 2027-2031 (1998)
97. Meffert H., Sönnichsen N., Herzog M., Hutschenreuter A.  
UVA-1-Kaltlichttherapie des akut exazerbierten, schweren atopischen Ekzems.  
*Dermatol. Monatsschr.* 178, 291-296 (1992)
98. Miyashita T., Reed J.C.  
Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.  
*Cell* 80, 293-299 (1995)
99. Morita A., Werfel T., Stege H., Ahrens C., Karmann K., Grewe M., Grether-Beck S., Ruzicka T., Kapp A., Klotz L.O., Sies H., Krutmann J.  
Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy.  
*J. Exp. Med.* 186, 1763-1768 (1997)

100. Nakagawa S., Aiba S., Tagami H.  
Decreased frequency of interferon-gamma-producing CD4+ cells in the peripheral blood of patients with atopic dermatitis.  
Exp. Dermatol. 7, 112-118 (1998)
101. Naukkarinen A., Harvima I.T., Aalto M.L., Harvima R.J., Horsmanheimo M.  
Quantitative analysis of contact sites between mast cells and sensory nerves in cutaneous psoriasis and lichen planus based on a histochemical double staining technique.  
Arch. Dermatol. Res. 283, 433-437 (1991)
102. Okada Y., Nakanishi I.  
Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 ('gelatinase') by human neutrophil elastase and cathepsin G.  
FEBS Lett. 249, 353-356 (1989)
103. Piazena H., Meffert H., Schmollack K.-P.  
Zum Einfluss von UVA-1-Bestrahlungen auf die Erythemempfindlichkeit des Menschen.  
Dermatol. Monatsschr. 179, 22-24 (1993)
104. Pieck C., Kobyletzki G. von, Schöneborn P., Gattermann S., Altmeyer P.  
Antimicrobial effects of UVA1 in comparison to UVB irradiation in vitro.  
J. EADV 12 (Suppl. 2), 317 (1999)
105. Piletta P.A., Wirth S., Hommel L., Saurat J.H., Hauser C.  
Circulating skin-homing T cells in atopic dermatitis. Selective up-regulation of HLA-DR, interleukin-2R, and CD30 and decrease after combined UV-A and UV-B phototherapy.  
Arch. Dermatol. 132, 1171-1176 (1996)

106. Pincelli C., Fantini F., Massimi P., Girolomoni G., Seidenari S., Gianetti A.  
Neuropeptides in skin from patients with atopic dermatitis: An immunohistochemical study.  
*Br. J. Dermatol.* 122, 745-750 (1990)
107. Pourzand C., Rossier G., Reelfs O., Borner C., Tyrell R.M.  
The overexpression of bcl-2 inhibits UVA-mediated immediate apoptosis in rat 6 fibroblasts: Evidence for the involvement of bcl-2 as an antioxidant.  
*Cancer Res.* 57, 1405-1411 (1997)
108. Rajka G.  
On definition and framework of atopic dermatitis.  
*Acta. Derm. Venereol. Suppl.* 144, 10-12 (1989)
109. Rajka G., Langeland T.  
Grading of the severity of atopic dermatitis.  
*Acta. Derm. Venereol. Suppl.* 144, 13-14 (1989)
110. Reed J.C.  
Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.  
*J. Cell Biol.* 124, 1-6 (1994)
111. Reinhold U., Kukel S., Goeden B., Neumann U., Wehrmann W., Kreysel H.W.  
Interleukin-4 promotes the expansion of skin-infiltrating lymphocytes from atopic dermatitis in vitro.  
*J. Invest. Dermatol.* 96, 370-375 (1991)
112. Rothe M.J., Grant-Kels J.M.  
Atopic dermatitis: An update.  
*J. Am. Acad. Dermatol.* 35, 1-13 (1996)

113. Rudel T., Bokoch G.M.  
Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2.  
*Science* 276, 1571-1574 (1997)
114. Ruiz-Ruiz M.C., López-Rivas A.  
p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells.  
*Cell Death Differ.* 6, 271-280 (1999)
115. Savill J.S., Wyllie A.H., Henson J.E., Walport M.J., Henson P.M., Haslett C.  
Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophils leads to its recognition by macrophages.  
*J. Clin. Invest.* 83, 865-875 (1989)
116. Scholzen T., Armstrong C.A., Bunnett N.W., Luger N.W., Olerud J.E., Ansel J.C.  
Neuropeptides in the skin: Interactions between the neuroendocrine and the skin immune system.  
*Exp. Dermatol.* 7, 81-96 (1998)
117. Selvakumaran M., Lin H.K., Miyashita T., Wang H.G., Krajewski S., Reed J.C., Hoffman B., Liebermann D.  
Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF-beta 1: A paradigm for distinct apoptotic pathways.  
*Oncogene* 9, 1791-1798 (1994)
118. Sheu L.F., Chen A., Meng C.L., Ho K.C., Lin F.G., Lee W.H.  
Analysis of bcl-2 expression in normal, inflamed, dysplastic nasopharyngeal epithelia, and nasopharyngeal carcinoma: Association with p53 expression.  
*Hum. Pathol.* 28, 556-562 (1997)

119. Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Waguri S., Uchiyama Y., Matsuda H., Tsujimoto Y.  
Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors.  
*Oncogene* 13, 21-29 (1996)
120. Skov L., Hansen H., Allen M., Villadsen L., Norval M., Barker J.N.W.N., Simon J., Baadsgaard O.  
Contrasting effects of ultraviolet A1 and ultraviolet B exposure on the induction of tumour necrosis factor-alpha in human skin.  
*Br. J. Dermatol.* 138, 216-220 (1998)
121. Slee E.A., Keogh S.A., Martin S.J.  
Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: A potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release.  
*Cell Death Differ.* 7, 556-565 (2000)
122. Srinivasan A., Foster L.M., Testa M.P., Ord T., Keane R.W., Bredesen D.E., Kayalar C.  
Bcl-2 expression in neural cells blocks activation of ICE/CED-3 family proteases during apoptosis.  
*J. Neurosci.* 16, 5654-5660 (1996)
123. Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S.  
Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization.  
*Mol. Cell.* 1, 949-957 (1998)
124. Stege H., Schöpf T., Ruzicka T., Krutmann J.  
High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa.  
*Lancet* 347, 64 (1996)

125. Sun X., Shimizu H., Yamamoto K.  
Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression.  
Mol. Cell. Biol. 15, 4489-4496 (1995)
126. Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Daugas E., Wang H.G., Geley S., Fassy F., Reed J.C., Kroemer G.  
The central executioner of apoptosis: Multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis.  
J. Exp. Med. 186, 25-37 (1997)
127. Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M., Kroemer G.  
Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease.  
J. Exp. Med. 184, 1331-1341 (1996)
128. Takahashi A., Earnshaw W.C.  
ICE-related proteases in apoptosis.  
Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 50-55 (1996)
129. Tang L., Tron V.A., Reed J.C., Mah K.J., Krajewska M., Li G., Zhou X., Ho V.C., Trotter M.J.  
Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma.  
Clin. Cancer Res. 4, 1865-1871 (1998)
130. Taylor R.S., Baadsgaard O., Hammerberg C., Cooper K.D.  
Hyperstimulatory CD1a+ CD1b+ CD36+ Langerhans cells are responsible for increased autologous T lymphocyte reactivity to lesional epidermal cells of patients with atopic dermatitis.  
J. Immunol. 147, 3794-3802 (1991)

131. Thepen T., Langeveld-Wildschut E.G., Bihari I.C., Wichen D.F. van, Reijssen F.C. van, Mudde G.C., Bruijnzeel-Koomen C.A.  
Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study.  
J. Allergy Clin. Immunol. 97, 828-837 (1996)
132. Tobin D., Nabarro G., de la Faille H.B., Vloten W.A. van, Putte S.C.J. van der, Schuurman H-J.  
Increased number of immunoreactive nerve fibres in atopic dermatitis.  
J. Allergy Clin. Immunol. 90, 613-622 (1992)
133. Toshiyuki M., Reed J.C.  
Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.  
Cell 80, 293-299 (1995)
134. Waga S., Hannon G.J., Beach D., Stillman B.  
The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.  
Nature 369, 574-578 (1994)
135. Wang X.W., Vermeulen W., Coursen J.D., Gibson M., Lupold S.E., Forrester K., Xu G, Elmore L, Yeh H., Hoeijmakers J.H.J., Harris C.C.  
The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway.  
Genes. Dev. 10, 1219-1232 (1996)
136. Wang Y., Rosenstein B., Goldwyn S., Zhang X., Lebwohl M., Wei H.  
Differential regulation of p53 and bcl-2 expression by ultraviolet A and B.  
J. Invest. Dermatol. 111, 380-384 (1998)

137. Wijsman J.H., Jonker R.R., Keijzer R., Velde C.J. van de, Cornelisse C.J., Dierendonck J.H. van.  
A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labeling of fragmented DNA.  
J. Histochem. Cytochem. 41, 7-12 (1993)
138. Williams G.T., Smith C.A.  
Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death.  
Cell 74, 777-779 (1993)
139. Wilson K.P., Black J.A., Thomson J.A., Kim E.J., Griffith P., Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Aldape R.A., Raybuck S.A.  
Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme.  
Nature 370, 270-275 (1994)
140. Wyllie A.H.  
Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.  
Nature 284, 555-556 (1980)
141. Yonish-Rouach E., Grunwald D., Wilder S., Kimchi A., May E., Lawrence J.-J., May P., Oren M.  
p53-mediated cell death: Relationship to cell cycle control.  
Mol. Cell. Biol. 13, 1415-1423 (1993)
142. Yoo E.K., Rook A.H., Elenitsas R., Gasparro F.P., Vowels B.R.  
Apoptosis induction by ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: Relevance to mechanism of therapeutic action.  
J. Invest. Dermatol. 107, 235-242 (1996)
143. Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsh T., Gomez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G.  
Mitochondrial control of nuclear apoptosis.  
J. Exp. Med. 183, 1533-1544 (1996)

144. Zdichavsky M., Schorpp C., Nickels A., Koch B., Pfreundschuh M., Gause A.  
Analysis of bcl-2<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations in inflammatory synovial infiltrates by a double-immunostaining technique.  
Rheumatol. Int. 16, 151-157 (1996)
145. Zhan Q., Fan S., Bae I., Guillouf C., Liebermann D., O'Connor P.M., Forance A.J.  
Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis.  
Oncogene 9, 3743-3751 (1994)
146. Zhan Q., Lord K.A., Alamo I., Hollander M.C., Carrier F., Ron D., Hohn K., Hoffman B., Liebermann D.A., Forance A.J.  
The gaad and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth.  
Mol. Cell. Biol. 14, 2361-2371 (1994)
147. Zhao Z.Z., Savage N.W., Pujic Z., Walsh L.J.  
Immunohistochemical localization of mast cells and mast cell-nerve interactions in oral lichen planus.  
Oral. Dis. 3, 71-76 (1997)
148. Zheng M., Sun G., Mrowietz U.  
The chemotactic activity of T-lymphocytes to interleukin 8 is significantly decreased in patients with psoriasis and atopic dermatitis.  
Exp. Dermatol. 5, 334-340 (1996)
149. Zhong L.-T., Sarafian T., Kane D.J., Charles A.C., Mah S.P., Edwards R.H., Bredesen D.E.  
Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4533-4537 (1993)
150. Zhuang L., Wang B., Sauder D.N.  
Molecular mechanism of ultraviolet-induced keratinocyte apoptosis.  
J. Interferon. Cytokine Res. 20, 445-454 (2000)

## Eigene Publikationen

Breuckmann F., Kobyletzki G. von, Kreuter A., Avermaete A., Hoffmann K., Altmeyer P.  
Modulation of proteolysis and activity in severe atopic dermatitis following medium-dose  
UVA1 phototherapy.  
J. EADV 15 (Suppl. 2), 226 (2001)

Breuckmann F., Pieck C., Kreuter A., Bacharach-Buhles M., Mannherz H.G., Altmeyer P.,  
Kobyletzki G. von  
Opposing effects of UVA1 phototherapy on the expression of bcl-2 and p53 in atopic  
dermatitis.  
Arch. Dermatol. Res. 293, 178-183 (2001)

Breuckmann F., Kobyletzki G. von, Avermaete A., Pieck C., Kreuter A.,  
Brockmeyer N.H., Altmeyer P., Gambichler T.  
Mononuclear cells in atopic dermatitis in vivo: immunomodulation of the cutaneous  
infiltrate by medium-dose UVA1 phototherapy.  
Eur. J. Med. Res. 7, 315-322 (2002)

Breuckmann F., Kobyletzki G. von, Avermaete A., Kreuter A., Altmeyer P.,  
Gambichler T.  
Modulation of cathepsin G in severe atopic dermatitis following medium-dose UVA1  
phototherapy.  
B.M.C. Dermatology 2, 12 (2002)

Breuckmann F., Kobyletzki G. von, Avermaete A., Altmeyer P., Gambichler T.  
Mast cells in atopic dermatitis: resistance against medium-dose UVA1 phototherapy?  
Dermatology 207, 334-336 (2003)

## Lebenslauf

Name: Frank Breuckmann

Geburtsdatum: 02.05.1978

Geburtsort: Bochum

Familienstand: ledig

Konfession: katholisch

Eltern: Vater: Rolf Breuckmann,  
Diplom-Ingenieur  
Mutter: Gabriele Breuckmann geb. Schoop,  
Hausfrau

Schulbildung: 1984-1988: Grundschule Bochum-Dahlhausen  
1988-1997: Gymnasium Theodor-Körner-Schule Bochum  
Abschluss: Abitur 1997

Studium: 1997-2003: Studium der Humanmedizin,  
Ruhr-Universität Bochum  
Ärztliche Vorprüfung: 1999  
Ärztliche Prüfung: 1. Abschnitt 2000  
2. Abschnitt 2002  
3. Abschnitt 2003

Famulaturen: 2000 Dermatologische Praxis, Dr. med. J. Kerner, Bochum  
2001 Dermatologische Klinik, Ruhr-Universität Bochum  
2001 Abt. für Gynäkologie und Geburtshilfe, Elisabeth-  
Krankenhaus Bochum  
2001 Allgemein- und sportmedizinische Praxis, Dres.  
C. & H. Schrenk, Bochum  
2001 Department of Radiology, University of Pennsylvania,  
Philadelphia, USA  
2002 Abt. für Pneumologie und Allergologie,  
Hochgebirgsklinik Davos-Wolfgang, Schweiz

Auszeichnungen: 1999 Posterpreis in der Kategorie „European Photo-  
dermatology Awards“ im Rahmen des 8<sup>th</sup> Congress of  
the European Academy of Dermatology and

Venerology (EADV) in Amsterdam, Niederlande, für den Beitrag: Opposing effects of UVA1 phototherapy on the expression of bcl-2 and p53 in severe atopic dermatitis. Breuckmann F., Kobyletzki G. von, Pieck C., Altmeyer P.

1999 „Resident Symposium Award“ im Rahmen des 8<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology (EADV) in Amsterdam, Niederlande, für den Beitrag: Medium-dose UVA1 cold light phototherapy in the treatment of severe atopic dermatitis. Freitag M., Kobyletzki G. von, Pieck C., Breuckmann F., Hoffmann K., Altmeyer P.

2000 Posterpreis in der Kategorie “European Photodermatology Awards” im Rahmen des 9<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology (EADV) in Genf, Schweiz, für den Beitrag: Mechanisms of apoptosis: UVA1 induced immediate and UVB induced delayed apoptosis in human T-cells in vitro. Kobyletzki G. von, Höxtermann S., Breuckmann F., Kreuter A., Bormann C. von, Altmeyer P.

## Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. P. Altmeyer für die bereitwillige Überlassung des Arbeitsthemas dieser Dissertation.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. P. Altmeyer sowie Herrn Dr. G. von Kobyletzki für ihren kontinuierlichen Einsatz und die hervorragende Betreuung im Rahmen meiner Promotion. Herr Prof. Dr. P. Altmeyer diskutierte mit mir ausführlich wissenschaftliche Fragestellungen und ermöglichte mir, die gefundenen Resultate auf nationalen und internationalen Kongressen erfolgreich vorzustellen sowie in diversen Publikationen zu präsentieren. Überdies möchte ich Herrn Dr. G. von Kobyletzki meinen besonderen Dank aussprechen, der mich während der verschiedenen Phasen meiner Arbeit geleitet, motiviert und inspiriert hat. Die freundschaftliche Zusammenarbeit in organisatorischen und fachlichen Fragen sowie nicht zuletzt hinsichtlich einer Reihe von Kongressen und Publikationen war für mich eine große Freude und konnte maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Mein weiterer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. H.G. Mannherz für seine Hilfestellungen und Denkanstöße bei apoptotischen und immunhistochemischen Fragestellungen, welche mein Verständnis vergrößern und Interpretationen erleichtern konnten, Herrn Dr. T. Gambichler und Herrn Jun.-Prof. Dr. A. Kreuter für wertvolle Anregungen und konstruktive fachliche Unterstützung, sowie Frau Dipl.-Biol. B. Panz, Frau K. Scholz und Frau E. Konieczig für ihre unermüdliche Mithilfe bei der Erstellung der Immunhistochemie.

Meinen persönlichen Dank möchte ich abschließend meiner Verlobten Katharina Netz sowie meinen Eltern aussprechen, welche mir die Promotion ermöglicht, mich gemeinsam während dieser Zeit begleitet sowie auf wunderbare Weise motiviert und unterstützt haben.