

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen  
Klinik für Hand-, Plastische,  
Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-E. Schaller

**Morphologische und immunhistochemische  
Untersuchungen zu Proliferation und Apoptose nach  
thermischem Stress der Haut**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Indra Natalie Mertz  
aus  
Stuttgart

2011

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H-O. Rennekampff

2. Berichterstatter:

Professor Dr. K. Dittmann



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1.	Aufbau und Funktionen der Haut	7
1.2.	Die Wundheilung der Haut	9
1.3.	Apoptose	13
1.4.	Pathophysiologie der Verbrennungswunde	17
1.5.	Fragestellungen der Arbeit	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1.	Patientengut	24
2.1.1.	Verbrennungswunden	24
2.1.2.	Normale Haut	24
2.2.	Immunhistologische Anfärbung	25
2.2.1.	Verwendete Reagenzien	27
2.2.2.	Verwendete Primärantikörper	28
2.2.3.	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	29
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1.	Histomorphologie der Wunden	32
3.2.	Mitoseindex in normaler Haut und Verbrennungswunden	33
3.2.1.	Nachweis von KI 67	33
3.3.	Apoptose in normaler Haut und in Verbrennungswunden	35
3.3.1.	Nachweis von TUNEL (TdT-mediated dUTP Biotin Nick End-Labeling)	35
3.3.2.	Nachweis von Aktiver Caspase 3	38

3.3.3.	Nachweis von Aktiver Caspase 8	40
3.3.4.	Nachweis von Aktiver Caspase 9	43
3.4.	Zellzyklusassoziierte Proteine	44
3.4.1.	Nachweis von p 16	44
3.4.2.	Nachweis von p 53	46
3.5.	"death-receptors"	48
3.5.1.	Nachweis von TNF- $\alpha$ -Rezeptor 1	48
3.5.2.	Nachweis von FAS	51
3.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse	54
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
4.1.	Kritik der Methode	55
4.1.1.	Materialgewinnung	55
4.1.2.	Immunhistochemische Untersuchungen	56
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	57
4.2.1.	Ki 67	57
4.2.2.	Aktive Caspase 3 und TUNEL	59
4.2.3.	Proteine der Tumorsuppressorgene p16 und p53	59
4.2.4.	Aktive Caspase 8 und Aktive Caspase 9	61
4.2.5.	TNF- $\alpha$ -R1 und FAS	62
4.3.	Klinische Bedeutung und Ausblick	64
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>78</b>



# 1. Einleitung

## 1.1. Aufbau und Funktionen der Haut

Die Haut als größtes Organ des Menschen mit einer Fläche von ca. 2 m<sup>2</sup> und einem Gewicht von bis zu 10 kg hat neben der Stabilität des Integumentes vielfältige andere Funktionen. Ein ausgedehnter Hautverlust ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden.

Die Haut besteht aus einer dünneren epithelialen Schicht aus verhorntem mehrschichtigem Plattenepithel, der Epidermis, und einer dickeren bindegewebigen Schicht, der Dermis. Die beiden Schichten sind voneinander durch eine Basalmembran getrennt (Abb. 1). Das Unterhautfettgewebe, die Subkutis, in welche die Dermis übergeht, verbindet die Haut mit ihrer Unterlage. Die Haut besitzt verschiedene Anhangsstrukturen wie Haare, Nägel und Drüsen, welche sich von der Epidermis ableiten. Die Epidermis besteht aus mehreren Schichten von Hautzellen, den Keratinozyten. Andere Zelltypen wie Melanozyten und Langerhans-Zellen sind in der Epidermis verstreut. Sie produzieren das schützende Hautpigment bzw. spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Bei der Epidermis unterscheidet man die basalen und suprabasalen Schichten. Die Keratinozyten der basalen Schicht, des Stratum basale, stehen im Kontakt zur Basalmembran. Im Stratum basale sind teilungsfähige Zellen angesiedelt. Die Zellen der suprabasalen Schicht bestehen aus mehreren Zelllagen und besitzen keine Teilungsfähigkeit. In der Dermis werden zwei Schichten unterschieden. Die obere zellreichere Dermissschicht, das Stratum papillare und das untere Stratum reticulare. Die ortsständigen Zellen der Dermis sind zum größten Teil Fibroblasten. Sie bilden die Grundsubstanz der Dermis, die extrazelluläre Matrix. Diese besteht aus Kollagen, retikulären Fasern, Elastin und Glykosaminoglykanen. In der Dermis findet man auch Nervenfasern. Die Blutversorgung der Haut erfolgt über arterielle Äste der Subkutis, die sich meistens von den muskulären Perforansgefäßen abzweigen. Sie bilden in der Dermis das oberflächliche und das tiefe Kapillarnetz

aus. Die Epidermis selbst besitzt keine Blutgefäße und wird durch die Diffusion aus der Dermis mit Nährstoffen versorgt. Dem Hautorgan kommen wichtige physiologische Funktionen zu. Die Haut erfüllt eine Schutzfunktion u.a. gegen mechanische, chemische, thermische und bakterielle Einwirkungen. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Thermoregulation des Körpers und reguliert den Flüssigkeits-, Eiweiß- und Elektrolythaushalt. Die Haut besitzt weiterhin immunologische, endokrinologische sowie sensorische Funktionen.

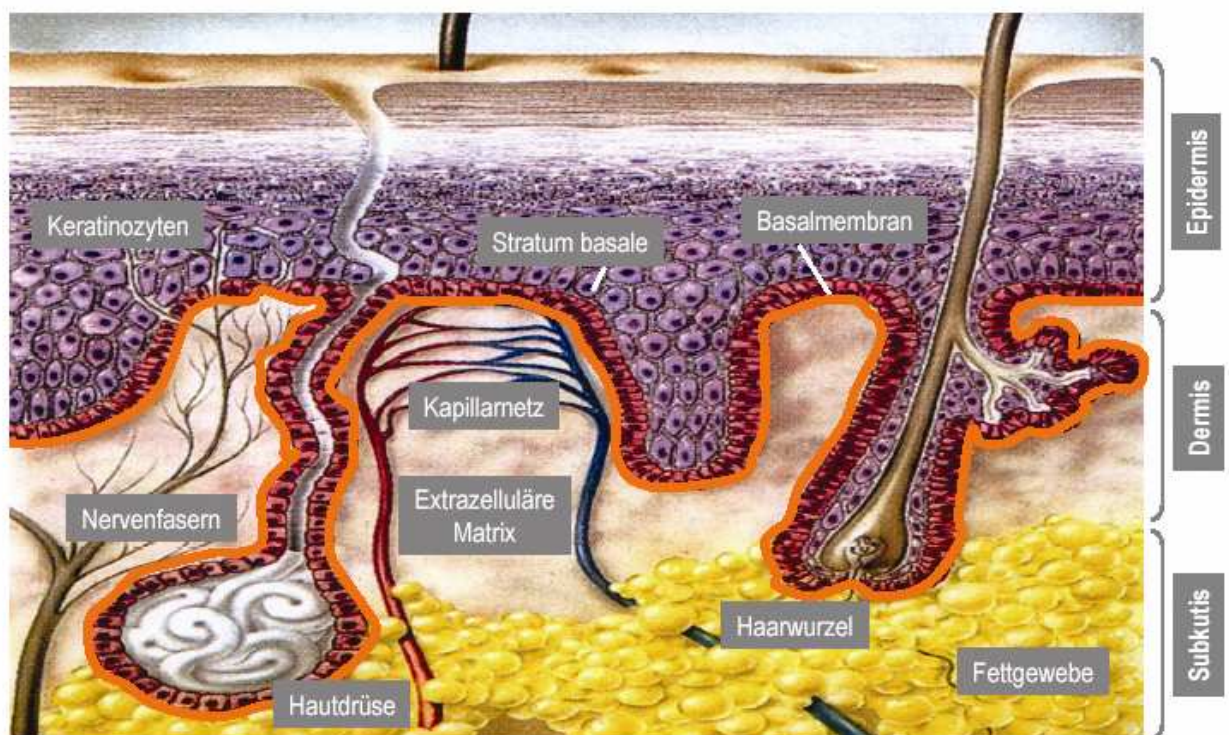


Abbildung 1: Schematische Darstellung der epithelialen sowie der bindegewebigen Hautschichten. Epidermis und Dermis sind durch die Basalmembran, mit der die teilungsfähigen Keratinozyten des Stratum basale in Kontakt stehen, getrennt. [modifiziert nach G.H. von Donnersmarck: Verbrennungen, Zuckschwerdt, 1998]



## 1.2. Die Wundheilung der Haut

Schon seit jeher war die Haut Verletzungen und Noxen ausgesetzt. Die Behandlung von Wunden der Haut ist eines der ältesten Probleme in der Medizin und stellt eine besondere Herausforderung dar.

Nicht nur chronische Wunden mit ihrer hohen Morbidität, sondern auch Verbrennungswunden mit ihren oft unbefriedigenden, ästhetischen Resultaten bedeuten für die betroffenen Patienten einen erheblichen Leidensdruck. Folgen von Wunden der Haut und insbesondere Verbrennungswunden können hypertrophe Narben mit Beeinträchtigung des äußeren Erscheinungsbildes oder kontrakte Narben mit Funktionseinschränkungen bis hin zur Invalidität und Berufsunfähigkeit sein (Kremer und Berger, 2000).

Aus dem statistischen Jahrbuch ist zu ersehen, dass sich in Deutschland jährlich mehr als 2 Mio. Patienten eine behandlungsbedürftige akute Oberflächenwunde zuziehen und die Zahl der Patienten mit chronischen Wunden ist pro Kalenderjahr noch höher zu veranschlagen (Hirner und Weise, 2004). Diese Statistiken veranschaulichen, dass der Behandlung von Wunden eine immense volkswirtschaftliche Bedeutung zukommt. Das Verständnis der Pathophysiologie der Wundheilung ist aber eine Voraussetzung für eine Optimierung der Wundheilung.

Das Ziel der kutanen Wundheilung ist der Verschluss der Haut. Die ungestörte Heilung einer Hautwunde durchläuft kontrolliert Stadien mit Eliminierung zerstörten Gewebes, Aufbau einer neuen Stützmatrix, Revaskularisierung und Wiederherstellung der zellulären Integrität der Dermis und Epidermis. Dieser Prozeß wird durch unterschiedliche Mediatoren gesteuert, die lokal als Wachstumsfaktor oder Zytokin sezerniert werden oder als extrazelluläre Matrix bereitgestellt werden.

Man unterscheidet drei Phasen der Wundheilung :

1. Phase oder Exsudationsphase (1.-5. Tag nach Wundsetzung) :

Diese Entzündungsphase ist durch exsudative und resorptive Vorgänge gekennzeichnet. Es kommt zu einer Ausfüllung des Defektes durch Blut und Lymphe, wobei Fibronectin die Wunde durch Quervernetzungen zwischen Fibrin und der extrazellulären Matrix des Wundbettes stabilisiert (Hirner und Weise, 2004). Die gestörte Mikrozirkulation führt zur Aktivierung des Gerinnungssystems und Komplementsystems sowie zur Freisetzung von biogenen Aminen, vasoaktiven Substanzen und Prostaglandinen (Friedl et al., 1989). Die Gerinnungskaskade, das Komplementsystem und die geschädigten Zellen setzen weiterhin chemotaktische Stoffe frei, welche phagozytierende Leukozyten zur Migration in das Wundgebiet veranlassen. Hierbei kommt es zu einer zeitlich genau abgestimmten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen in das Wundgebiet. Neutrophile Granulozyten migrieren innerhalb der ersten 24 Stunden in das Wundgebiet. In den folgenden 48 bis 72 Stunden wandern Makrophagen als zweite Zellpopulation in das Wundgebiet ein (Clark et al., 1993). Neben der Beseitigung von Zelldetritus und Granulozyten aus der Wunde besteht die weitere Aufgabe der Makrophagen in der Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Riches et al., 1988). Beispielsweise wurde in der Wundflüssigkeit Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  nachgewiesen (Rennekampff et al., 1998), der u.a. Fibroblasten und Endothelzellen zur Ausschüttung sekundärer Mediatoren wie Interleukin-8 veranlasst (Sticherling et al., 1993). Die freigesetzten Wachstumsfaktoren leiten die nächste Phase der Wundheilung ein.

## 2. Phase oder Proliferationsphase (2.-7. Tag nach Wundsetzung) :

In dieser Phase überlagern die reparativen Prozesse die katabolen Vorgänge der Entzündungsphase. Es kommt zur Gefäßsprossung und zur Defektauffüllung durch Granulationsgewebe. Die Proliferation von Endothelzellen und die Differenzierung, Proliferation und Migration von Fibroblasten sind wesentliche Faktoren dieser Phase. Das Ergebnis von proliferierenden Fibroblasten, extrazellulärer Matrixsynthese und Angiogenese wird nach zirka fünf Tagen als Granulationsgewebe sichtbar.

Die Fibroblasten nehmen hierbei eine zentrale Stellung in der Modulation der Wunde ein. Zum einen produzieren sie eine Anzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, z.B. KGF (Keratinocyte Growth Factor), zum anderen synthetisieren sie Glykosaminoglykane und Matrixproteine wie Kollagen, die Teil einer temporären extrazellulären Wundmatrix sind. Zusätzlich üben Fibroblasten über ihr Zytoskelett eine kontraktile Kraft auf die Wunde aus (Baur et al., 1977; Tredget et al., 1997), was klinisch als Wundkontraktion in Erscheinung tritt.

Die Reepithelisierung der Wunde erfolgt nahezu zeitgleich mit der Ausbildung des Granulationsgewebes.

Es kommt zur mitotischen Zellvermehrung der Keratinozyten am Wundrand und zur Migration der Keratinozyten in die Wunde. Beide Vorgänge zusammen führen zu dem epithelialen Verschluss der Wunde (Garlick und Taichman, 1994; Stenn und Malhotra, 1992). Abhängig von Tiefe und Ausdehnung der kutanen Wunde stammen die proliferierenden Keratinozyten aus dem Wundrand oder den epidermalen Anhangsgebilden. So epithelisiert die oberflächliche, zweitgradige Verbrennungswunde aus den verbleibenden Hautanhangsgebilden, während bei der drittgradigen Verbrennungswunde die Haarschäfte zerstört sind und die Reepithelisierung ausschließlich aus den Wundrändern erfolgen kann.

### 3. Phase oder Reparationsphase (ab 7. Tag nach Wundsetzung) :

Als letzte Phase der Wundheilung stellt diese Reifungsphase den Abschluß der Wundheilung dar und nimmt dabei zeitlich den größten Anteil ein. Sie beginnt etwa ab dem siebten Tag nach der Verletzung und hält ein Jahr oder länger an.

In dieser Phase organisieren sich die Kollagenfasern und es kommt zur ersten Kontinuität des Bindegewebes. Es findet eine Reifung von Typ-III-Kollagen in Typ-I-Kollagen im Verhältnis 1:4 statt. Die zunächst noch völlig ungeordneten kollagenen Fasern beginnen sich nach physikalischen Gesichtspunkten parallel auszurichten, verdicken sich, und es erfolgt eine Wundkontraktion. Die von den Wundrändern migrierenden Keratinozyten verschließen die Wunde und inhibieren die Mitosen und die Migration.

Histologisch findet sich das Bild eines dreidimensionalen Netzwerks mit einem mehrschichtigen Epithel.

Die Narbe altert, enthält weniger Zellen und gewinnt an Belastungsfähigkeit und Reißfestigkeit.

Die Narbe besitzt nach Abschluss dieser Reifungsphase 80% der ursprünglichen Stärke, bleibt aber stets dem Originalgewebe in der Struktur unterlegen.

### 1.3. Apoptose

Apoptose ist eine Form des Zelltodes, der durch ein reguliertes intrazelluläres Programm ausgelöst wird und damit einen aktiven, genetisch hoch regulierten Prozess darstellt. Die Apoptose unterscheidet sich somit grundsätzlich von der Nekrose, bei der es zu einem passiven Kollaps der Zelle kommt.

Der apoptotische Prozess, den eine Zelle durchläuft, kann in drei Phasen unterteilt werden (Saikumar et al., 1998). Zu Beginn steht die Induktionsphase, während der die Zellen stimuliert werden, in Apoptose zu gehen (Baatout et al., 2002; Erkan et al., 2005). Es erfolgt die Effektorphase, während der ein Apoptoseexekutionsmechanismus in der Zelle durchlaufen wird (Ginski et al., 1997; Mignotte und Vayssiere et al., 1998). Daran schließt sich die Degradierungsphase an, während der in den Zellen morphologische und molekulare Zeichen der Apoptose deutlich werden (Rogalinska et al., 2002).

In vielen verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Zellen über ganz unterschiedliche Wege in der Induktionsphase stimuliert werden können, apoptotisch zu werden. Apoptose kann beispielsweise extrinsisch über das Binden von Molekülen wie dem Fas-Liganden oder dem Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) an ihren jeweiligen Rezeptoren an der Oberfläche einer Zelle induziert werden. Auch intrazelluläre Stimuli wie das Auftreten von DNA-Schäden, die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen sowie die Aktivierung von Molekülen im Zytosol oder an der Zellmembran können Apoptose in Zellen auslösen (Baatout et al., 2002; Erkan et al., 2005; Kulms und Schwarz et al., 2002). Dieser Reaktionsweg wird als intrinsische Aktivierung bezeichnet.

Während der sich an die Induktionsphase anschließenden Effektorphase findet in der Zelle je nach Apoptose-induziertem Stimulus ein Apoptoseexekutionsmechanismus in Form einer definierten Reaktionskaskade statt. Im Zentrum dieser vielfältigen Reaktionskaskaden stehen zumeist Cystein-Aspartat-haltige Proteasen, sogenannte Capasen, die durch Spaltung aus ihren inaktiven Vorläuferformen in ihre aktiven Formen überführt werden (Grutter et al.,

2000).

So führt beispielsweise das Binden des FAS-Liganden an den FAS/CD95-Rezeptor über die Aktivierung der Caspasen 8 und 10 zu einer Aktivierung der Caspase 3 (Gastman et al., 2003). Die aktivierte Caspase 3 verursacht dann über weitere Reaktionswege die typischen morphologischen Veränderungen in der Zelle. Caspase 8 kann aber auch direkt Caspase 7 aktivieren (Hirata et al., 1998). Beide aktivierten Caspasen 3 und 7 können dann wiederum über PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)-Inaktivierung zu DNA-Spaltung und damit zu Apoptose führen. Caspase 9 gehört ebenfalls in die Gruppe der Cysteinproteasen und wird durch mitochondriales Cytochrom C aktiviert. Über eine Caspase-Kaskade mit Caspase 3 und Caspase 7 wird dann Apoptose eingeleitet.

Es wurden allerdings auch Caspase unabhängige Apoptosemechanismen beschrieben (Kolenko et al., 2000).

Apoptose kann beispielsweise auch über p16 und p53 eingeleitet werden. Diese sind Proteine, die über die Blockierung von cyclinabhängigen Kinasen zu einem Zellzyklusstop führen.

P 16 zum Beispiel hat eine inhibitorische Wirkung auf die cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 und wird deshalb auch als Inhibitor von CDK4 und CDK6 bezeichnet. Voraussetzung für die Zellzyklusprogression in der G1-Phase ist die Assoziation von D-Typ-Cyclinen mit CDK4 und CDK6, was p16 als kompetitiver Inhibitor durch direkte Bindung an CDK4 und CDK6 verhindert. Somit wird auch der G1-S-Übergang verhindert.

Aktiviert wird p 16 wiederum über einen p53-abhängigen Signalweg, der durch zellulären Stress wie DNA-Schäden oder deregulierte Aktivierung zellzyklusfördernder Gene ausgelöst wird.

Als Folge eines genotoxischen Stresses akkumuliert p53-Protein in der Zelle und führt über die transkriptionelle Aktivierung von p21 zum vorübergehenden Zellzyklusarrest, der die DNA-Reparatur ermöglicht oder zur Einleitung der Apoptose und Elimination der Zelle führt. P21 inhibiert nach seiner Bindung an Cyclin-Kinase-Komplexe ebenfalls die Progression von der G1- in die S-Phase.

Dies konnte unter anderem in Studien von Helton et al. und in Studien von Schwartz et al gezeigt werden.

In Zellen mit p53-Verlust oder inaktivierender Mutation ist p21 nur in ca. 20% nachweisbar, während in Zellen, die p53 überexprimieren, auch p21 in Assoziation mit der Zellzyklussuppression induziert ist. So finden sich auch beispielsweise p53-Deletionen bzw. Mutationen gehäuft in Tumoren, beispielsweise in 75-80% der kolorektalen Karzinome (Hilgers et al., 1996).

An die Effektorphase schliesst sich die Degradierungsphase der Apoptose in den Zellen an. In der Degradierungsphase werden morphologische und molekulare Zeichen der Apoptose deutlich. Im Kern einer apoptotischen Zelle zeigen sich während der Degradierungsphase mit Chromatinkondensation, Volumenverlust des Kerns, Fragmentierung der DNA und der Formierung von in Vesikeln abgeschnürten Kernbestandteilen, den sogenannten apoptotischen Körperchen, typische Zeichen der Apoptose. Während der Degradierungsphase finden im Kern der apoptotischen Zelle auch Veränderungen auf der molekularen Ebene statt. Diese beinhalten unter anderem ein Zerschneiden der DNA in kurze Abschnitte, Modifizierungen an Polypeptiden des Kerns und die Proteolyse von einigen für die Erhaltung der Zelle wichtigen Proteinen (Rogalinska et al., 2000).

Neben den Veränderungen im Zellkern einer apoptotischen Zelle kommt es auch zu Veränderungen der gesamten Zelle. Die Zelle verliert an Volumen und kann sich von den umliegenden Zellen lösen (Brancolini et al., 1997). Es finden auch Veränderungen an der Zellmembran statt. Phosphatidylserin, das normalerweise unter physiologischen Bedingungen ausschließlich an der inneren Seite der Zellmembran lokalisiert ist, befindet sich bei apoptotischen Zellen auch auf der Außenseite der Zellmembran (Pepper et al., 1998). In weiteren Studien wurde berichtet, dass Zellen während der Apoptose Knospungen in Form von Bläschen an der Außenseite ihrer Zellmembran bilden (Blandino und Strano et al., 1997).

Bei der Apoptose degradieren also aktivierte Enzyme die zelleigene DNA und Proteine. Die Plasmamembran der Zelle wird strukturell verändert, bleibt aber

vorerst intakt. Die tote Zelle wird dann unverzüglich phagozytiert und es kommt zu einem zellulär erkennbaren inflammatorischen Prozess.

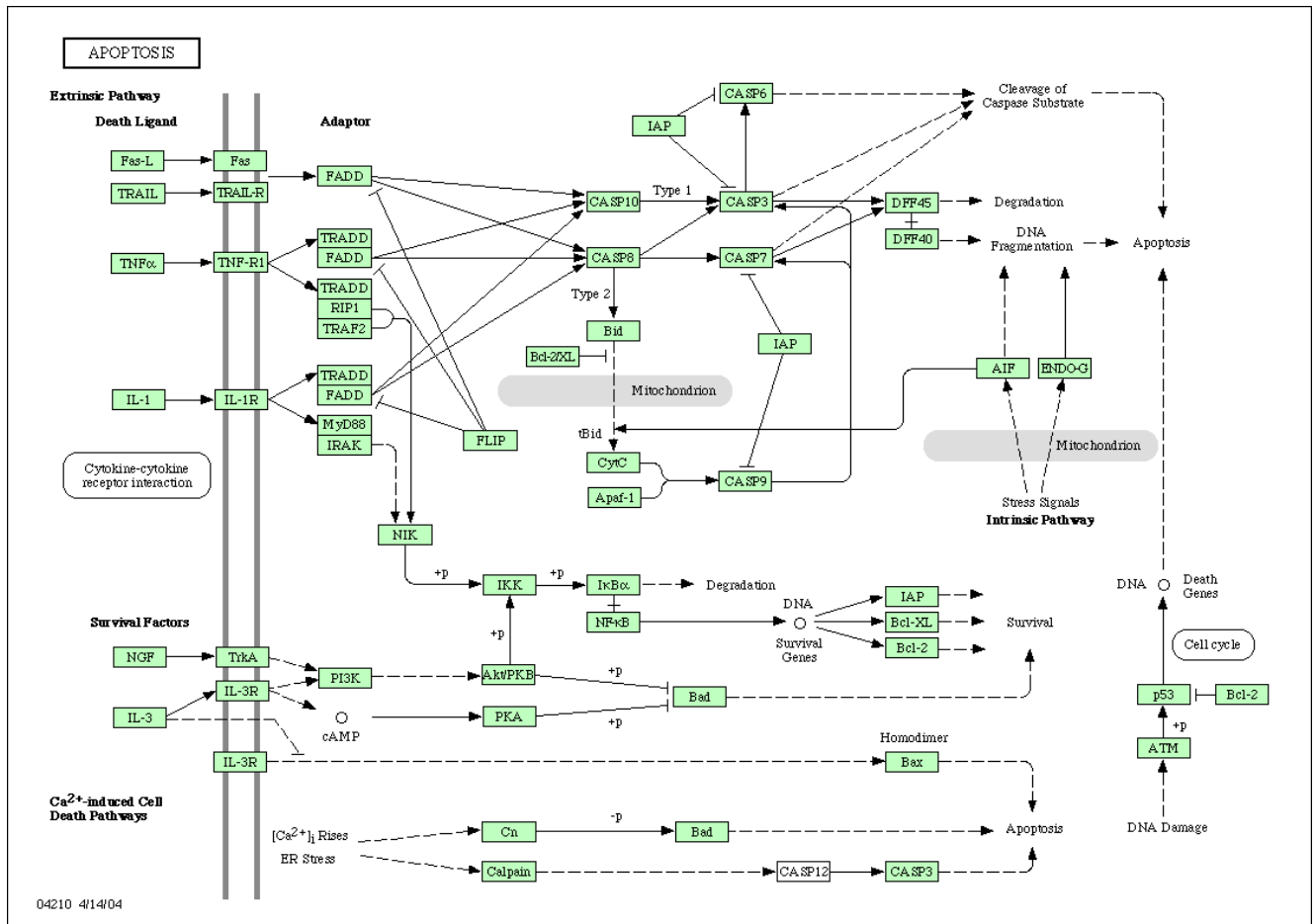


Abb.2: Apoptoseschema (aus Experimental Medicine 19(13):1690-1694(2001): Apoptosis induced by death receptors)



#### 1.4. Die Pathophysiologie der Verbrennungswunde

Ein thermisches Trauma wie die Verbrennung, welches zur Störung der Hautfunktionen führt, ist nicht nur durch lokale pathologische Vorgänge in der Brandwunde gekennzeichnet, sondern kann darüber hinaus tiefgreifende systemische Auswirkungen auf den gesamten Organismus zur Folge haben (Abb. 3). Bei Einwirkung großer Mengen an thermischer Energie auf die Haut kommt es zur sofortigen Denaturierung der Proteine mit Verlust der Enzymfunktion und Zerstörung der Zellen im Sinne einer Nekrose. Dabei werden Proteine bzw. Lipoproteine freigesetzt, die toxisch und antigen wirken können.

Bei einem thermischen Trauma werden drei Zonen der Verbrennungswunde unterschieden. Nekrotische Hautareale und der Verbrennungsschorf, die durch Proteindenaturierung gekennzeichnet sind, werden als Koagulationszone bezeichnet. Umgeben wird diese Zone von der sog. Stasezone mit eingeschränkter Mikrozirkulation, bedingt durch Vasokonstriktion, Schwellung der Endothelzellen und Mikrothrombosierung der Gefäße. Die Stasezone wird von der Hyperämiezone umgeben, die durch Vasodilatation mit erhöhter Durchblutung gekennzeichnet ist. Eine zunehmende Einschränkung der Mikrozirkulation in den schwergeschädigten Arealen der Stasezone wird als Ursache zu einer Konversion dieser Zone in eine Koagulationszone führen. Die Faktoren, welche zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation führen können sind u.a. Dehydrierung, Hypovolämie, Druck, vasokonstriktorisches Medikamente und Infektionen. Auch ein Ischämie-Reperfusionsschaden, in dessen Folge es zu Endothelzellveränderungen und Adhärenz der Leukozyten an der Gefäßwand kommt, kann zu einer weiteren Perfusionseinschränkung des Gewebes führen.

Bei einer tiefen Verbrennung gehen alle Funktionen der Haut in diesem Bereich verloren. Das Zusammenbrechen der Isolierfunktion der Haut führt zu einem hohen Wasserverlust durch Verdunstung, der mit Elektrolyt- und Eiweißverlusten einhergeht. Auch fehlt der Schutz gegen eine bakterielle Invasion und die Gewebnekrose bietet zugleich einen idealen Nährboden für Bakterien. Die aus

dem nekrotischen Gewebe freigesetzten Toxine und Mediatoren wie z.B. Zytokine und Proteinase bedingen durch ihre systemischen Wirkungen einen generalisierten Kapillarschaden (sog. capillary leak) mit erhöhter Kapillarpermeabilität und Austritt von Plasmaproteinen in das Interstitium. Ein interstitielles Ödem mit intravasalem Flüssigkeitsmangel ist die Folge. Die Wirkung der verschiedenen Mediatoren führt weiterhin zur Aktivierung von Thrombozyten, Granulozyten, des Gerinnungs- und Komplementsystems. Eine schwere verbrennungsinduzierte Immunsuppression in Verbindung mit einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS, systemic inflammatory response syndrome) können zu einer Multiorgandysfunktion mit Herz-, Lungen-, Nieren- und Leberversagen, führen.

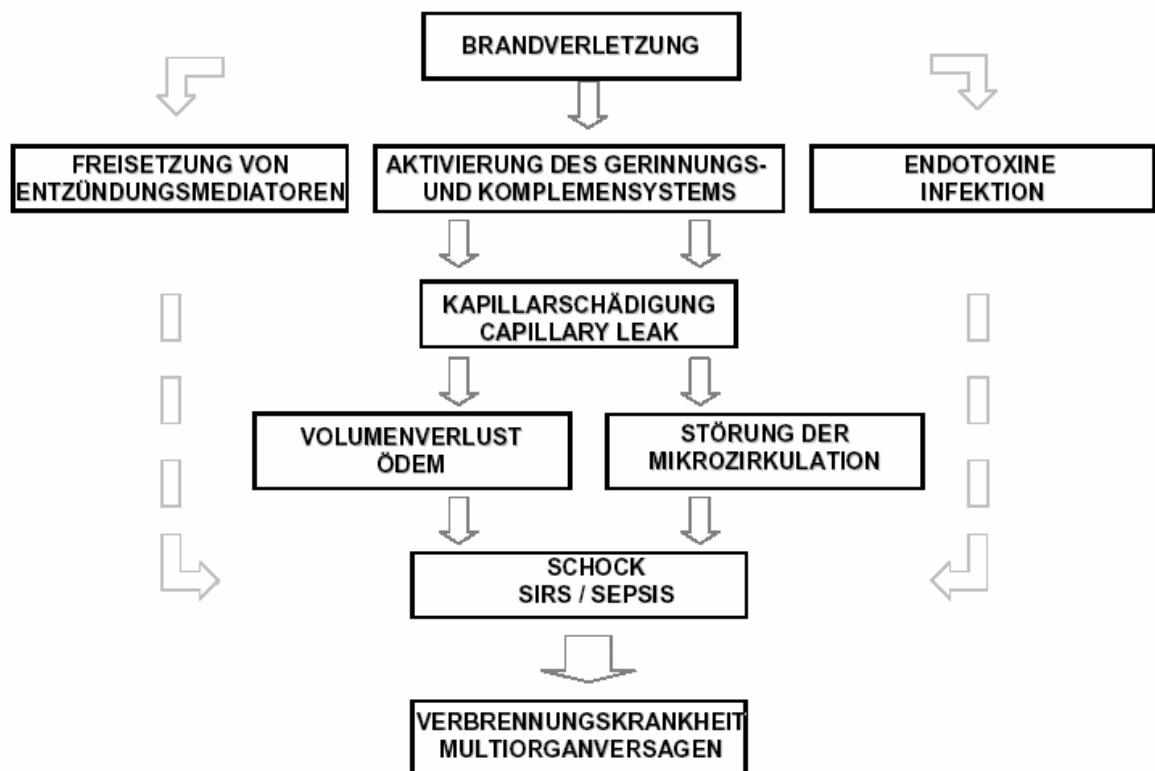


Abbildung 3: Schematische Darstellung pathophysiologischer Reaktionen und komplexer systemischer Effekte eines schweren Verbrenungstraumas. [in Anlehnung an Germann, G. und H.U. Steinau, Zentralbl Chir 118 (1993), 293]

Die Tiefenausdehnung der Hautverbrennung wird in vier Grade (Abb. 4) eingeteilt. Verbrennungen ersten Grades (I<sup>o</sup>) betreffen hauptsächlich die epidermale Hautschicht. Sie führen zudem zu einer Gefäßerweiterung mit vermehrtem Blutzustrom in den kleinen Hautgefäßen. Charakteristisch ist ein schmerzhaftes Erythem und Ödem der Haut. Diese Verletzungen heilen ohne Narben ab.

Bei zweitgradigen Verbrennungen reicht die Koagulationszone bis in die Dermis. Hier besteht eine deutliche Veränderung der Mikrozirkulation. Es kommt zu einer Trennung von Epidermis und Dermis mit subepidermaler Brandblasenbildung. Abhängig von der Tiefe werden oberflächlich-zweitgradige (II a<sup>o</sup>) und tief-zweitgradige (II b<sup>o</sup>) Verbrennungen unterschieden. Bei der oberflächlich-zweitgradigen Verbrennung ist die Epidermis komplett zerstört und die Dermis nur in ihrer papillären Schicht betroffen. Die Heilung erfolgt durch Migration und Proliferation von Keratinozyten, die in der bulge-Region der Haarschäfte in der tieferen Dermis überleben. Bei tief-zweitgradigen Verbrennungen ist die Haut bis in die retikuläre Dermis zerstört. Hier ist die bulge-Region ebenfalls durch den thermischen Schaden betroffen. Erfolgt keine operative Intervention, heilt eine solche Verletzung unter Bildung von Granulationsgewebe mit starker Narbenbildung aus.

Die Verbrennungen dritten Grades (III<sup>o</sup>) sind durch tiefgreifende Nekrosen und Zerstörung aller Hautschichten gekennzeichnet. Sie bedürfen einer chirurgischen Exzision und nachfolgender Hauttransplantation.

Bei Verbrennungen vierten Grades (IV<sup>o</sup>) kommt es zur Verkohlung der Haut und der tiefen Strukturen wie Muskel, Sehnen oder Knochen. Diese Verletzungen erfordern eine ausgedehnte chirurgische Therapie.

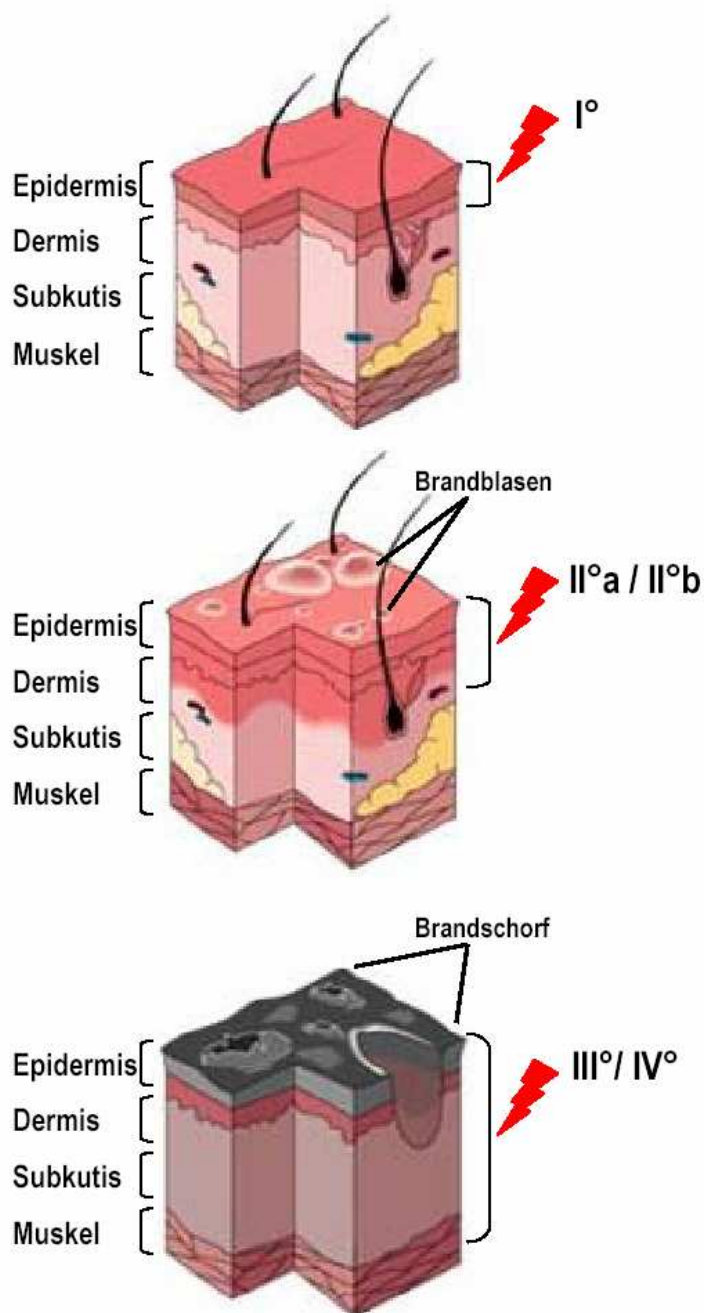


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schweregrade der Hautverbrennung. Abgebildet ist eine zunehmende Zerstörung der Hautschichten entsprechend der Tiefenausdehnung der Verbrennung. [modifiziert nach G.H. von Donnersmarck: Verbrennungen, Zuckschwerdt, 1998]

Die modernen Therapiekonzepte zur Versorgung schwerer Verbrennungsverletzungen haben in den vergangenen Jahren zu einer deutlichen Senkung der Letalität beigetragen. Entscheidende Verbesserungen in der Therapie schwerbrandverletzter Patienten konnten auf den Gebieten der initialen Schock – und Flüssigkeitsersatztherapie erzielt werden. Das Ziel dieser Behandlung ist die Vermeidung eines Multiorganversagens durch Kreislaufstabilisierung und ausreichende Organperfusion. Des Weiteren sind die Beherrschung der respiratorischen Insuffizienz, des Inhalationstraumas und der Katabolie wichtige Ziele in der Therapie Schwerbrandverletzter. Auch durch systemische und lokale antibiotische Behandlung sowie optimierte chirurgische Therapie von Verbrennungswunden wurden große Erfolge erzielt. Insbesondere durch eine frühzeitige radikale Entfernung von nekrotischem Gewebe, dem Hauptauslöser vieler pathologischer Vorgänge, werden Schocksymptomatik, Infektion und weitere Dauerschäden reduziert bzw. ganz vermieden. Die Wunde stellt den zentralen Angriffspunkt in der Verbrennungstherapie dar. Viele schwerwiegende pathologische Vorgänge als Folge der Verbrennung können zum Teil vermieden werden, wenn die Gewebnekrosen frühzeitig abgetragen werden. Erfolgt jedoch kein Wundverschluss, gehen die Vorteile einer solchen Frühexzision verloren. Wenn die Wiederherstellung einer suffizienten Barriere zur Umgebung nicht gewährleistet wird, droht erneut durch eine bakterielle Wundbesiedelung die Sepsis mit weiteren lebensbedrohlichen Komplikationen.

Um derartige Wunden in Zukunft einer effizienteren Therapie zugänglich zu machen, ist ein besseres Verständnis der Vorgänge, die zum Versagen der Heilung führen, unbedingt erforderlich (Falanga et al., 1995).

## 1.5. Fragestellungen der Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Studie ist, das Verständnis der Pathophysiologie der Verbrennungswunden zu verbessern, um hieraus möglicherweise eine spezifische Therapie abzuleiten.

Im einzelnen soll die Proliferation von Keratinozyten am Wundrand von humanen Verbrennungswunden über die Zeit dargestellt werden.

Weiteres Ziel ist es, Apoptose in humanen Verbrennungswunden nachzuweisen.

Ziel ist es, mögliche intrinsische und extrinsische Regulationswege des Zelltodes durch immunhistologische Darstellung der zugehörigen Proteine in humanen Verbrennungswunden aufzuzeigen.

## **2. Material und Methoden**

### 2.1. Patientengut

Es wurde Gewebe aus tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden untersucht. Das Gewebe wurde in der Klinik für Plastische-, Hand-, Rekonstruktive- und Verbrennungschirurgie der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen im Zeitraum von 2001 bis 2004 im Rahmen medizinisch notwendiger Operationen gewonnen. Es handelt sich um debridiertes Gewebe von Verbrennungswunden. Für die Gewebebiopsien der Studie wurde eine Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen eingeholt.

Insgesamt wurden Gewebeproben von 30 Patienten untersucht. Davon waren 9 Frauen und 21 Männer. Die Patienten waren durchschnittlich 43 Jahre alt, wobei der jüngste Patient 26 Jahre alt war und der älteste Patient 79 Jahre alt war.

#### 2.1.1. Verbrennungswunden

Es wurden Gewebeproben von 25 Patienten mit tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden entnommen. Diese Biopsien stammen aus exzidiertem Gewebe von Patienten, die aufgrund ihrer Verbrennung einer tangentialen oder epifaszialen Nekrektomie unterzogen werden mussten. Die Wunden waren durch offene Flammen, Kontaktverbrennung oder Verbrühung entstanden. Die Biopsien wurden zwischen dem 0. und 24. Tag nach der Verbrennung gewonnen.

#### 2.1.2. Normale Haut

Zum Vergleich mit dem Wundgewebe wurde von 5 Patienten normale, unverletzte Haut untersucht, die bei plastisch-chirurgischen Operationen abfiel und für keine medizinische Behandlung notwendig war. Auch hierfür lag die Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen vor.



## 2.2. Immunhistologische Anfärbung

Der größte Teil der Hautbiopsien wurde sofort nach der Entnahme durch Immersionsfixierung mit Formalin konserviert und in Paraffin eingebettet. Für die Histologie wurden 5 µm dicke Schnitte auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die restlichen Hautbiopsien wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Sie wurden in 7 µm dicken Kryoschnitten auf Objektträger aufgebracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C aufbewahrt.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst 30 Minuten bei 56 °C auf eine Heizplatte gelegt, 2x15 Minuten in Xylol entparaffinisiert und dann einer absteigenden Alkoholreihe zugeführt (je 5 Minuten in 100, 80, 70%igem Alkohol+ 2x5 Minuten in Aqua dest). Anschließend wurden die Präparate 5x5 Minuten in Citratpuffer (Mikrowelle, Stufe II) gekocht, wobei nach jedem Durchgang die verdampfte Flüssigkeit mit Aqua dest aufgefüllt wurde. Danach ließ man die Objektträger 20 Minuten im Citratpuffer abkühlen und spülte anschließend mit Waschpuffer.

Die Kryoschnitte wurden in der Gefriertruhe in -20 °C kaltem Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) acht Minuten fixiert. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und anschließend in Waschpuffer rehydriert.

Anschließend wurde sowohl auf die Paraffin- als auch auf die Kryoschnitte 0,3%iges Wasserstoffperoxid gegeben, um die gewebeeigene Peroxidase zu blockieren. Nach 30minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurde wieder mit Waschpuffer gespült. Daraufhin erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1%iger BSA(Bovines Serum-Albumin)-Waschpuffer-Lösung für 15 Minuten.

Jetzt wurden die Gewebeschnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper in unterschiedlicher Konzentration 60 Minuten inkubiert. Die entsprechenden Konzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt. Die Objektträger wurden gespült und dann je nach verwendetem Primärantikörper mit einem gegen Maus, Ratte oder Kaninchen gerichteten, biotinilierten Sekundärantikörper 30 Minuten

inkubiert (Biotinylated Anti-mouse/-rat/-rabbit Ig G der Firma Vector Laboratories). Der Sekundärantikörper wurde 1:200 mit 1%iger BSA-Waschpufferlösung verdünnt.

Die Schnitte wurden nochmals gespült und schließlich mit dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex (Vectastain ABC KIT, Fa. Vector Laboratories) 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Spülvorgang wurde die chromogene Substratlösung 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Vector NovaRED Substrate Kit for Peroxidase, Fa. Vector Laboratories) auf die Schnitte gegeben und 15 Minuten inkubiert. Die positive Anfärbung ergab ein rotes Präzipitat. Die Schnitte wurden nun in destilliertem Wasser gespült und mit Hämatoxylin 45 Sekunden gegengefärbt, dann unter fließendem Leitungswasser 5 Minuten gebläut. Zum Schluss folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (je 5 Minuten in 70,80,100%igem Alkohol), die mit 2× 5minütiger Xylolbehandlung abgeschlossen wurde. Dann wurden die Schnitte eingedeckt.

## 2.2.1. Verwendete Reagenzien

Waschpuffer:

NaCl	8,8g/l
Tris	6,1g/l
BSA	1,0g/l
Aqua dest	950ml
PH	7,4

Stammpuffer A :

Zitronensäure	10,6g
Aqua dest	500ml

Stammpuffer B:

Natriumzitat	14,7g
Aqua dest	500ml

Citratpuffer :

Stammpuffer A	9ml
Stammpuffer B	41ml
Aqua dest	450ml
PH	6,0

## 2.2.2. Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Beschreibung	Positivkontrolle	Verw.Konzentration	Hersteller	Klon	Bestell-Nr.
Ki 67	Das Antigen Ki 67 ist ein Kernprotein, das in proliferierenden Zellen in den G1-, G2-, S- und M-Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, während ruhende Zellen in der G0-Phase Ki67-negativ sind (Gerdes et al., 1983/1984). Ki67 dient daher als Proliferationsmarker, der unter anderem auch zur Malignitätsbeurteilung von Neoplasien Verwendung findet (Schauer et al., 1988; Weikel et al., 1989; Horlock et al., 1997).		20 µl/ml	DAKO	MIB-1	M7240
Caspase3	Caspase 3 ist eine der Cysteinproteasen, die im Rahmen des apoptotischen Zelltodes früh aktiviert werden. Die aktivierte Form kann immunhistologisch gefärbt werden und weist auf Apoptose hin, da in nekrotischen Zellen keine Caspase- Aktivierung erfolgt.		2,5µl/ml	R&D Systems	Aa163-175	AF835
Caspase8	Caspase 8 ist die Cysteinprotease, die über den Fas-Regulationsweg aktiviert wird und im weiteren zu apoptotischem Zelltod führt. Der immunhistologische Nachweis dieser Caspase zeigt auf, daß dieser Regulationsweg aktiviert ist. In Zusammenhang mit einer vermehrten Fas-Expression kann damit ein Regulationsweg der Apoptose nach Zellstress aufgezeigt werden.	Lymphknoten	40µl/ml	Cell Signaling	Asp 374	9749
Caspase9	Caspase 9 gehört in die Gruppe der Cysteinproteasen und wird durch mitochondriales Cytochrom C aktiviert. Über eine Caspase-Kaskade mit Caspase 3 und 7 wird Apoptose eingeleitet.		10/20/40 µl/ml	Cell Signaling	Asp 330	9501
Fas	Fas stellt einen Rezeptor dar, über den ein apoptotischer Regulationsweg vermittelt werden kann. Eine vermehrte Expression dieses Rezeptors gepaart mit seinem Liganden führt zur Einleitung von apoptotischem Zelltod.	TEN	20µl/ml	dianova	1517P107	12392
TNF-α-R1	TNF-α-R1 gehört zur Gruppe der death-receptors und aktiviert über eine sog. death-domain Initiatorcaspasen, die wiederum Apoptose induzieren	Psoriasis	150µl/ml	R&D Systems	BGB 025021	AF 225
TUNEL	Dieser Antikörper markiert DNA-Bruchstellen (TdT-mediated dUTP Biotin Nick End-Labeling). Derartige Bruchstellen weisen auf apoptotische Zellen hin.	DNase Vorbehandlung	nach Herstellerangabe	Roche		11684809910
P16	P16 ist ein cyclinabhängiger Kinase-4-Inhibitor, der die im G1-Zyklus vorkommenden cyclinabhängigen Kinasen hemmt und somit einen Übergang in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. Es kommt zu einem Stopp in der Zellzykluspassage.	Cervix-dysplasie	2,5/5/10 µl/ml	CHEMICON	ZJ11	MAB88057
P53	p53 kann direkt oder indirekt zu einem Zellzyklusstop aber auch zur Einleitung von Apoptose führen.	Plattenepithel carcinom	5/10/20 µl/ml	CYMBUS	Pab 1801	CBL420

### 2.2.3. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

#### 2.2.3.1. Verbrennungswunden

##### a) Inflammatorische Phase der Wundheilung:

Proben mit einem Wundalter von null bis drei Tagen

Probe	Wundalter(Tage)
V1	0
V2	1
V3	1
V4	1
V5	1
V6	1
V7	2
V8	2
V9	2
V10	3
V11	3
V12	3

b) frühe Proliferations- und Reparationsphase der Wundheilung:

Proben mit einem Wundalter von vier bis sieben Tagen

Probe	Wundalter(Tage)
V13	4
V14	4
V15	4
V16	7
V17	7

c) Proliferations- und Reparationsphase der Wundheilung:

Proben mit einem Wundalter von mehr als sieben Tagen

Probe	Wundalter(Tage)
V18	8
V19	8
V20	8
V21	9
V22	12
V23	12
V24	21
V25	24

Bei Ki 67- und TUNEL-Färbung wurden unter dem Mikroskop die positiven Zellen der Basalzellschicht und der untersten suprabasalen Keratinozyten entlang einer Strecke von 500 µm vom Wundrand ausgehend gezählt. Es wurde der prozentuale Anteil positiver Zellen von der Gesamtzellzahl ermittelt. Diese Auszählung erlaubt die Berechnung des Mitoseindex in der Wunde. Vergleichbare Untersuchungen wurden bereits an chronischen Wunden durchgeführt (Rennekampff et al., 1997; Rennekampff et al., 2007).

Bei allen anderen Färbungen wurde die Anfärbung der Hautschichten semiquantitativ ausgewertet.

Zur Dokumentation der Intensität diente dabei folgendes Schema:

- 0 – keine Anfärbung
- 1 – gering positive Anfärbung
- 2 – deutlich positive Anfärbung
- 3 – stark positive Anfärbung

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Histomorphologie der Verbrennungswunde ( HE – Färbung)

In Abbildung 5 ist der Wundrand einer tief zweitgradigen Verbrennungswunde am 8. Tag nach der Verbrennung zu sehen. Von Interesse ist hier vor allem der Übergang von gesunder Haut (Hyperämiezone), über den Wundrand (Stasezone) bis zum Wundgrund (Nekrosezone). Die Nekrosezone ist durch den kompletten Verlust der Epidermis gekennzeichnet.

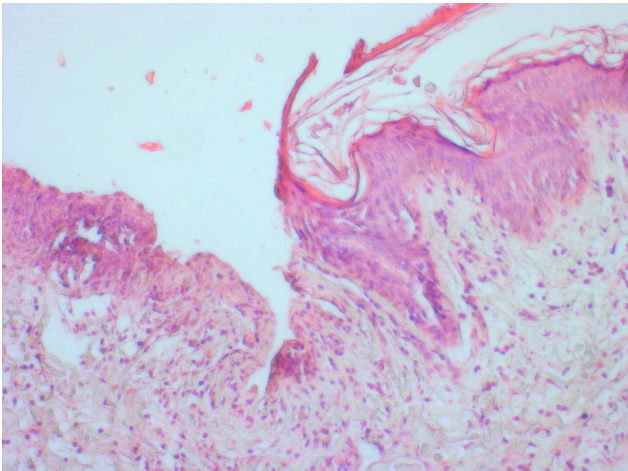


Abb.5:

Tangential exzidierte, tief zweitgradig verbrannte Haut vom 8. Tag nach der Verbrennung  
HE-Färbung, Originalvergrößerung x 200



## 3.2.Mitoseindex in normaler Haut und in Verbrennungswunden

### 3.2.1 KI 67

#### Normale Haut

Nach Anfärbung mit dem Ki 67-Antikörper finden sich im Epithel normaler Haut in den untersten Zellschichten (Stratum germinativum) einzelne positive Zellen. Der Anteil der Ki67-positiven Zellen unter den ausgezählten Zellen beträgt im Median 2,5% (n=5).

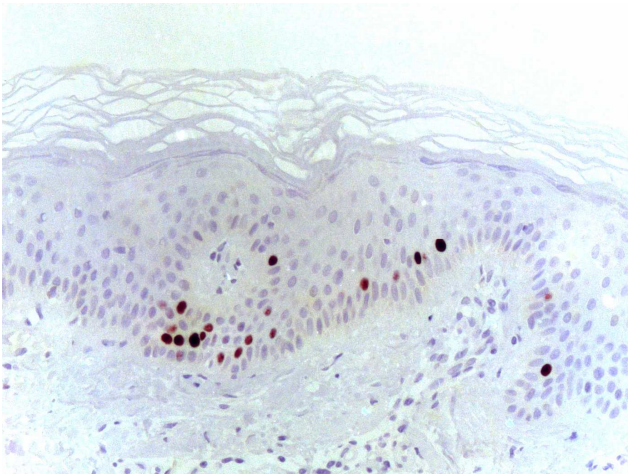


Abb.6:

Gesunde, unverletzte Haut wurde mit dem Ki 67-Antikörper angefärbt. Einzelne basale und suprabasale Keratinozyten (Stratum germinativum) zeigen eine positive Anfärbung, was durch ein rotes Präzipitat erkennbar ist. Braun dargestellte Zellen entsprechen Melanozyten. Originalvergrößerung x 200.

#### Verbrennungswunden

Die tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden weisen am Wundrand eine, gegenüber gesunder Haut, um mehr als das 9fache erhöhte Proliferationsrate auf. Der Median des Mitoseindex am Wundrand der Biopsien beträgt 22,8% (n=11) mit einer Spannweite von 3,64 % bis 50 %. Tendenziell zeigt sich in der Gruppe der Verbrennungswunden eine Zunahme des Mitoseindex mit zunehmendem Wundalter.

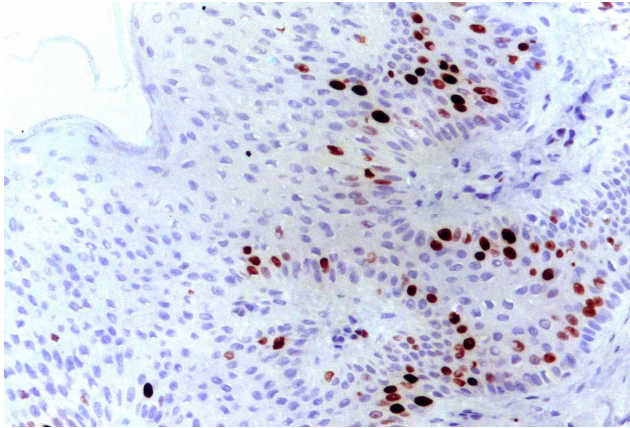


Abb. 7:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 9. Tag nach der Verbrennung wurde mit dem Ki 67-Antikörper angefärbt. Im Bereich der basalen und suprabasalen Keratinozyten ist am Wundrand eine deutliche positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates zu erkennen. Originalvergrößerung x 200

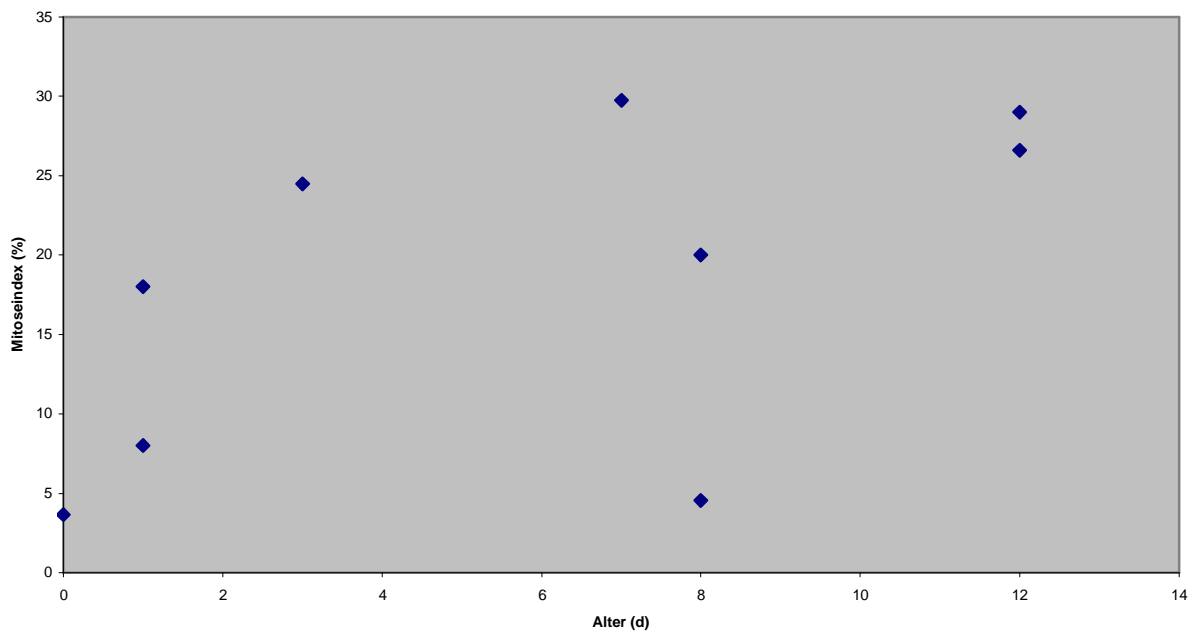


Abb. 8: Verhältnis von Mitoseindex (in Prozent) zum Wundalter (in Tagen) bei Verbrennungswunden, die mit Ki 67 angefärbt wurden

### 3.3 Apoptose in normaler Haut und in Verbrennungswunden

#### 3.3.1. TUNEL-Färbung

##### Normale Haut

In gesunder Haut zeigt sich nach der Anfärbung keinerlei Expression von TUNEL in den Epithelzellen (Stufe 0).

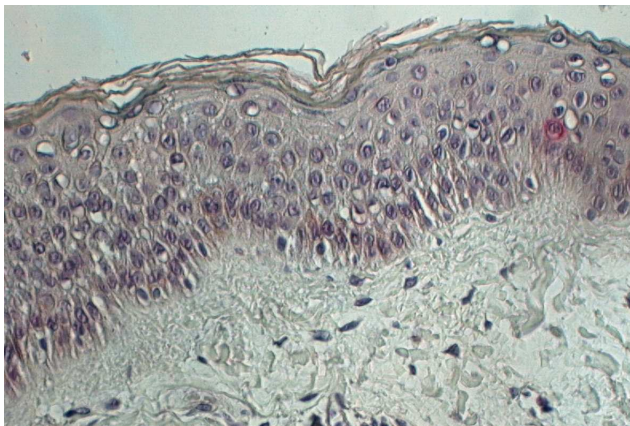


Abb.9:

Gesunde, unverletzte Haut wurde mit TUNEL angefärbt. Es ist keine Anfärbung zu erkennen. Originalvergrößerung x 200.

##### Negativkontrolle

Auch bei der Negativkontrolle ohne Primärantikörper konnte keine Anfärbung beobachtet werden.

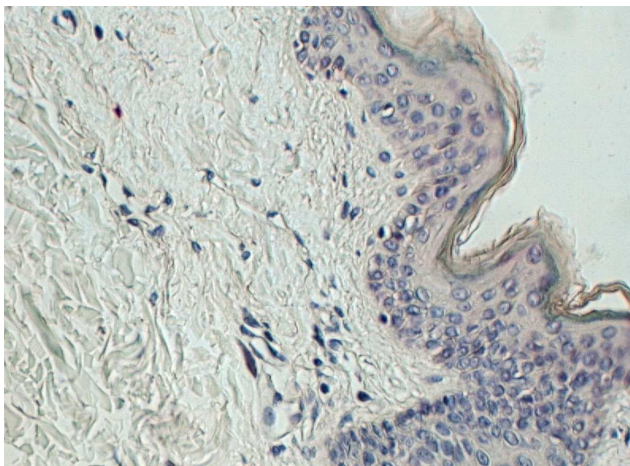


Abb.10:

Die Negativkontrolle wurde ohne Primärantikörper angefärbt. Es ist keine Anfärbung zu erkennen. Originalvergrößerung x 200.

## Verbrennungswunden

Es wurden insgesamt 17 Biopsien von tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden untersucht. Zwei Biopsien mussten aufgrund mangelnder Anfärbung (technisch bedingt) von der Auswertung ausgeschlossen werden. Es wurden also insgesamt 15 Biopsien ausgewertet. Der Apoptoseindex lag zwischen 34,7 % und 65,5 % bewegt. Der Median lag bei 54,6 %. In der Gruppe der Verbrennungswunden zeigte sich tendenziell eine Abnahme des Apoptoseindex mit zunehmendem Wundalter.

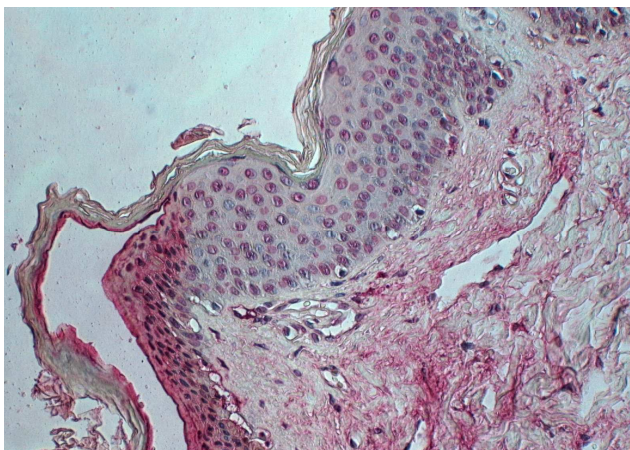


Abb.11:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 1. Tag nach der Verbrennung wurde mit dem TUNEL-Antikörper angefärbt. Dargestellt ist der Läsionsrand, wobei das Epithel innerhalb der Läsion durch eine deutliche positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates gekennzeichnet ist. Originalvergrößerung x 200

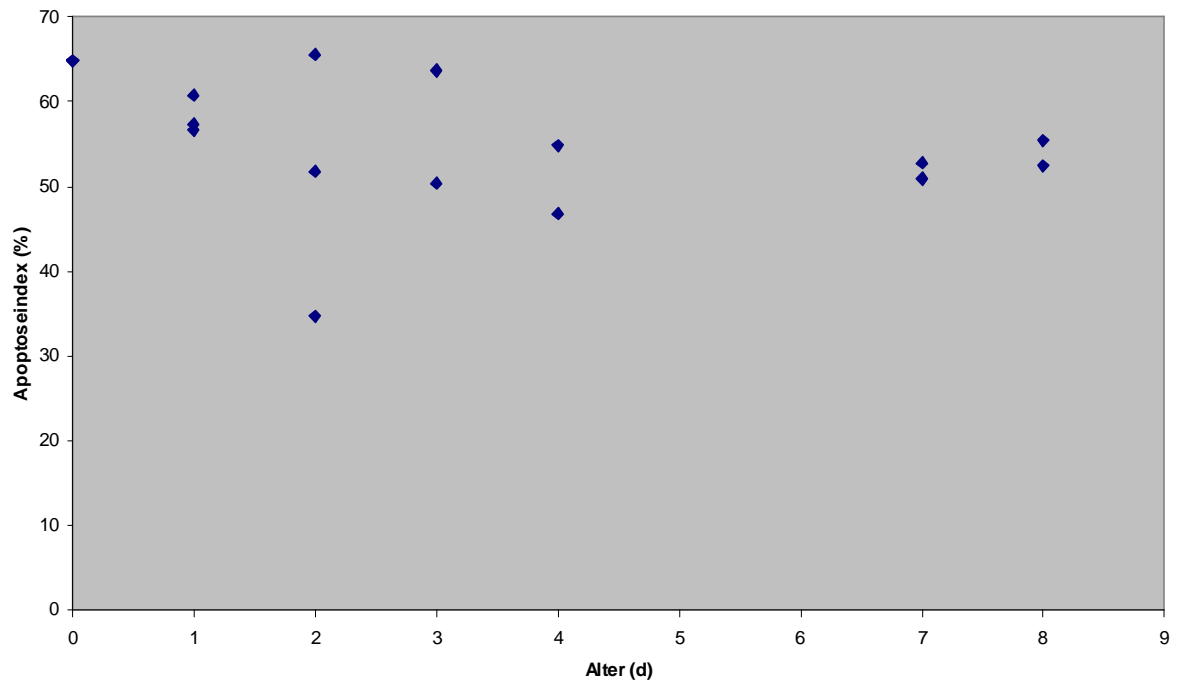


Abb. 12: Verhältnis von Apoptoseindex (in Prozent) zum Wundalter (in Tagen) bei Verbrennungswunden, die mit TUNEL angefärbt wurden

### 3.3.2. Aktive Caspase 3

#### Normale Haut

In gesunder Haut zeigt sich nach der Anfärbung keinerlei Expression von Aktiver Caspase 3 in den Epithelzellen (Stufe 0).

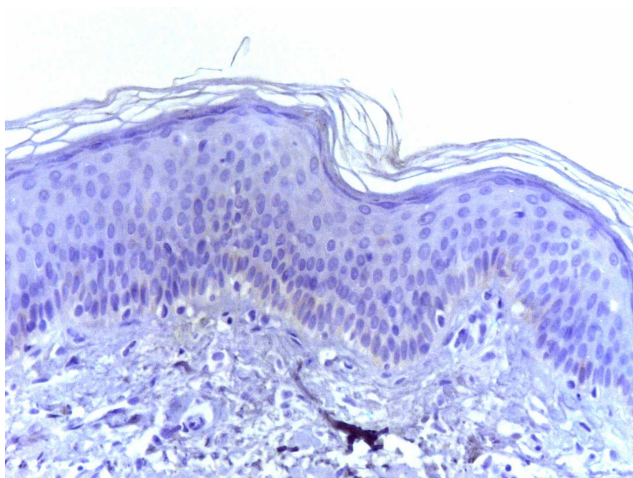


Abb.13:

Gesunde, unverletzte Haut wurde mit Aktiver Caspase 3 angefärbt. Es ist keine Anfärbung zu erkennen.

Originalvergrößerung x 200.

#### Verbrennungswunden

In den untersuchten tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden findet sich bei zwei der elf untersuchten Wunden eine stark positive Anfärbung mit jeweils positiv angefärbten Haarbälgen (Stufe 3). Drei weitere Präparate sind deutlich positiv angefärbt, wobei die Färbung vom Wundrand zur Peripherie hin abnimmt (Stufe 2). Bei einer Biopsie findet sich eine geringe positive Anfärbung (Stufe 1) und fünf Biopsien sind nicht angefärbt (Stufe 0). Tendenziell nimmt die Expression von Aktiver Caspase 3 mit steigendem Wundalter ab.

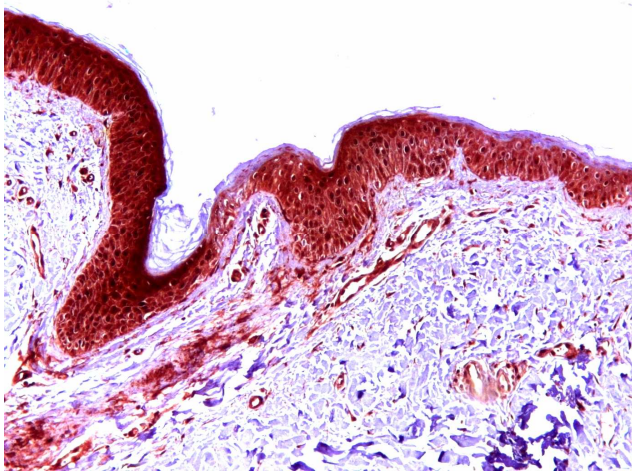


Abb. 14:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 7. Tag nach der Verbrennung wurde mit Aktiver Caspase 3 angefärbt. Es ist eine deutliche positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates in den Keratinozyten des Epithels des Wundrandes zu erkennen. Originalvergrößerung x 200

### 3.3.3. Aktive Caspase 8

#### Positiv-/ Negativkontrolle

Als Positivkontrolle wurde ein Lymphknotenpräparat (dankenswerte Leihgabe des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen) mitgefärbt. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Anfärbung im Bereich der Lymphfollikel. Bei der Negativkontrolle ohne Primärantikörper konnte keine Anfärbung beobachtet werden.

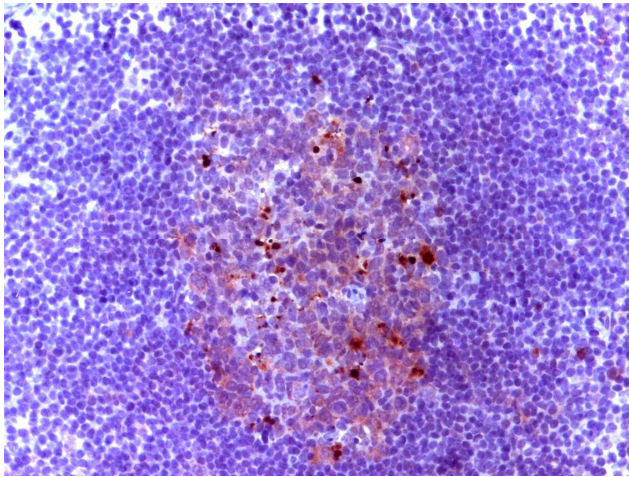


Abb. 15:

Das Lymphknotenpräparat wurde gegen Aktive Caspase 8 angefärbt. Es zeigt sich eine deutlich positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates im Lymphfollikel.  
Originalvergrößerung x200



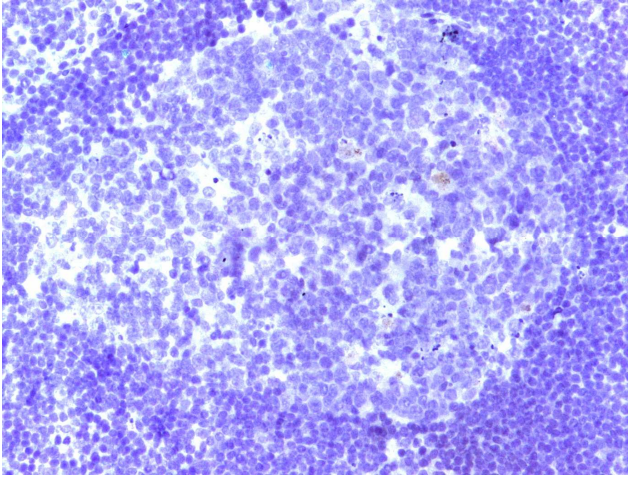


Abb. 16:  
Das Lymphknotenpräparat wurde bei der Negativkontrolle ohne den Primärantikörper angefärbt. Es zeigt sich hierbei keinerlei Anfärbung.  
Originalvergrößerung x200

### Normale Haut

Vier Präparate mit gesunder Haut wurden gefärbt. Es zeigt sich hierbei keinerlei Anfärbung der Epithelzellen (Stufe 0).

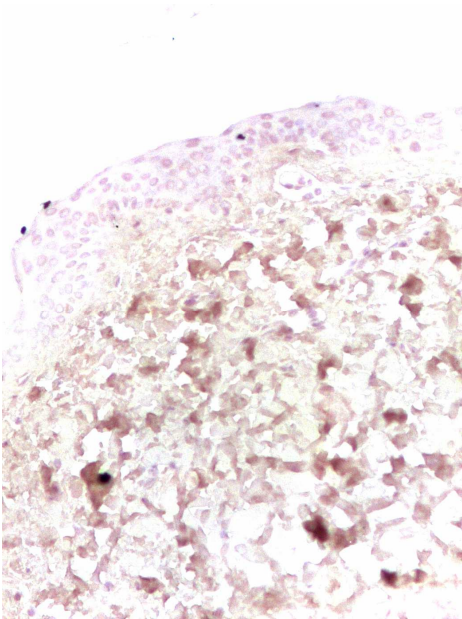


Abb.17:  
Gesunde, unverletzte Haut wurde gegen Aktive Caspase 8 angefärbt. Es ist keinerlei positive Anfärbung zu erkennen.  
Originalvergrößerung x 200.

## Verbrennungswunden

Es wurden insgesamt 15 tief zweit- und drittgradige Verbrennungswunden untersucht, wobei drei Präparate aufgrund eines falschen Anschnittes und zwei Präparate aufgrund einer Artefaktbildung nicht ausgewertet werden konnten. Bei einem Präparat zeigt sich eine stark positive Anfärbung (Stufe 3), bei vier Präparaten ist eine deutliche Anfärbung zu erkennen (Stufe 2), zwei Präparate sind gering positiv angefärbt (Stufe 1) und drei Präparate zeigen keinerlei Anfärbung (Stufe 0). Bei den positiv angefärbten Präparaten liegt die Anfärbung ab Wundrand bei einer Länge zwischen drei und neun Millimetern. Tendenziell nimmt mit steigendem Wundalter die positive Anfärbung und die Länge der Anfärbung zu.

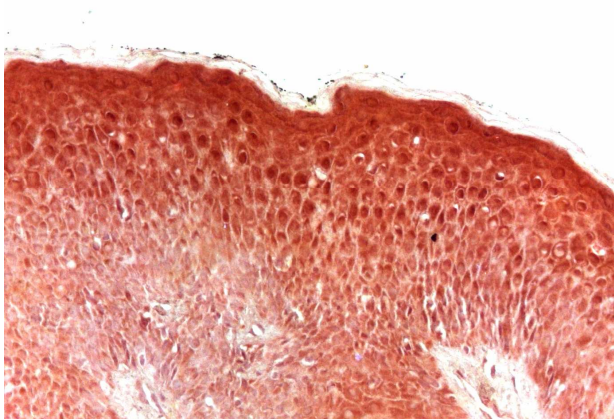


Abb. 18:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 2. Tag nach der Verbrennung wurde mit Aktiver Caspase 8 angefärbt. Es ist eine deutliche positive Anfärbung (Stufe 3) in Form eines roten Präzipitates in den Keratinozyten des Epithels des Wundrandes zu erkennen. Originalvergrößerung x 200

### 3.3.4. Aktive Caspase 9

#### Verbrennungswunden

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen (1:25/1:50/1:100) und unterschiedliche Vorbehandlungen (5x5 Minuten Citratpuffer/ 0,05% Trypsin) an 10 Präparaten von Verbrennungswunden ausgetestet. Bei allen 10 Präparaten konnte keinerlei Anfärbung beobachtet werden (Stufe 0).

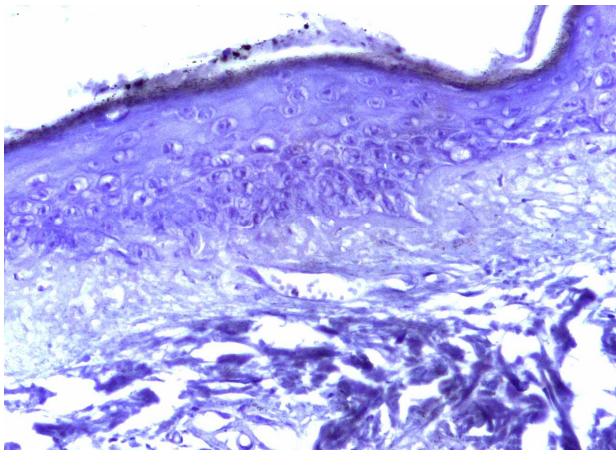


Abb. 19:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 7. Tag nach der Verbrennung wurde gegen Aktive Caspase 9 angefärbt. Es ist keinerlei Anfärbung zu erkennen.  
Originalvergrößerung x 200

### 3.4. Zellzyklusassistierte Proteine

#### 3.4.1. p 16

##### Positivkontrolle

Als Positivkontrolle wurde ein Präparat einer Cervixdysplasie (dankenswert zur Verfügung gestellt seitens des Pathologischen Instituts des Klinikums Ludwigsburg) mitgefärbt. Es zeigt sich eine deutlich positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates.

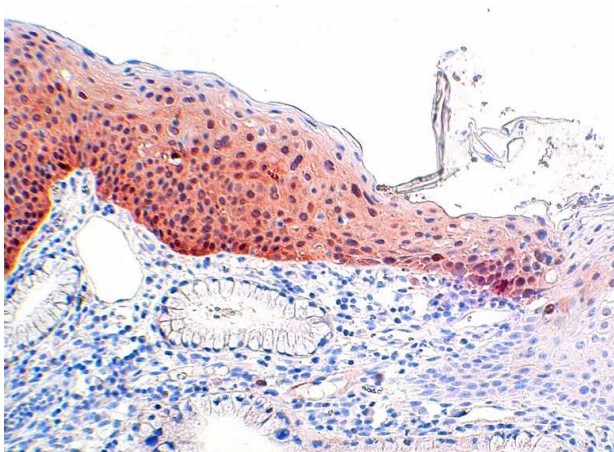


Abb. 20:

Das Präparat der Cervixdysplasie wurde mit p 16 angefärbt. Es zeigt sich eine deutlich positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates.  
Originalvergrößerung x200

##### gesunde Haut

In gesunder Haut zeigt sich nach der Anfärbung keinerlei Expression von p 16 in den Epithelzellen (Stufe 0).

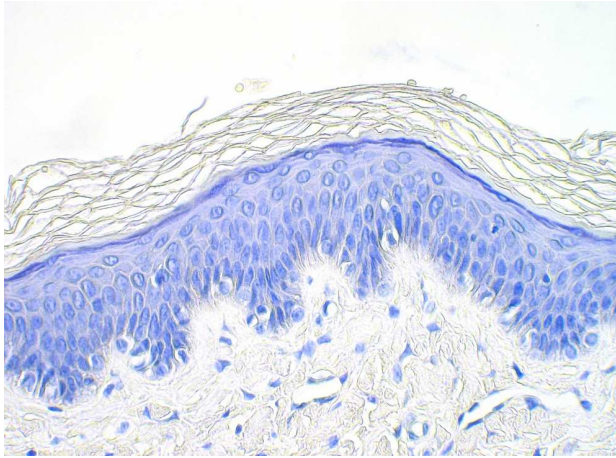


Abb.21:

Gesunde, unverletzte Haut wurde mit p 16 angefärbt. Es ist keine positive Anfärbung zu erkennen. Originalvergrößerung x 200

### Verbrennungswunden

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen (1:25/1:50/1:100) und unterschiedliche Vorbehandlungen ( ohne Citratpuffer / mit 5X5 Minuten Citratpuffer) ausgetestet. Keines der Präparate wies eine positive Anfärbung auf (Stufe 0, n=8).

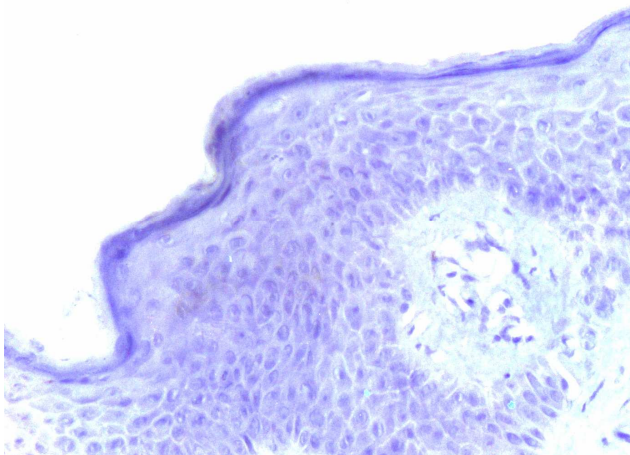


Abb.22:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 7. Tag nach der Verbrennung wurde mit anti-p 16 angefärbt. Es ist keinerlei Anfärbung in den Keratinozyten des Epithels des Wundrandes zu erkennen. Originalvergrößerung x 200

### 3.4.2. p 53

#### Positiv-/Negativkontrolle

Als Positivkontrolle wurde ein Plattenepithelcarcinom-Präparat (dankenswerte Gabe der Universitätshautklinik Kiel) mitgefärbt. Bei der Positivkontrolle ist eine deutliche Anfärbung der basalen und suprabasalen Keratinozyten zu erkennen (Stufe 2). Die Negativkontrolle weist keine Anfärbung auf.

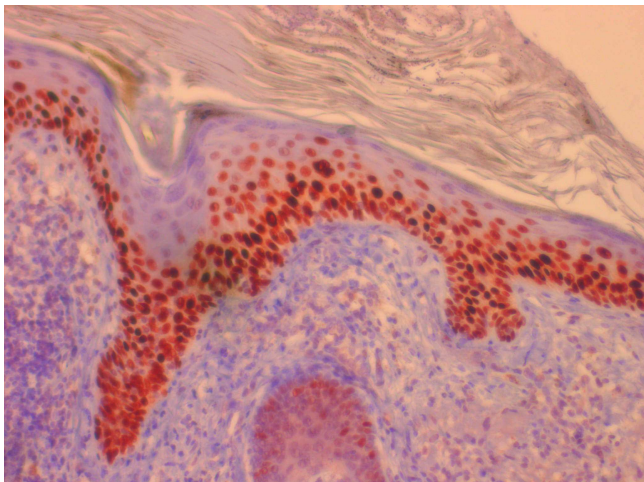


Abb.23:

Das Plattenepithelcarcinom-Präparat wurde mit dem p 53-Antikörper angefärbt. Es ist eine deutlich positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates vor allem im Bereich der basalen und suprabasalen Keratinozyten zu erkennen.  
Originalvergrößerung x 200.

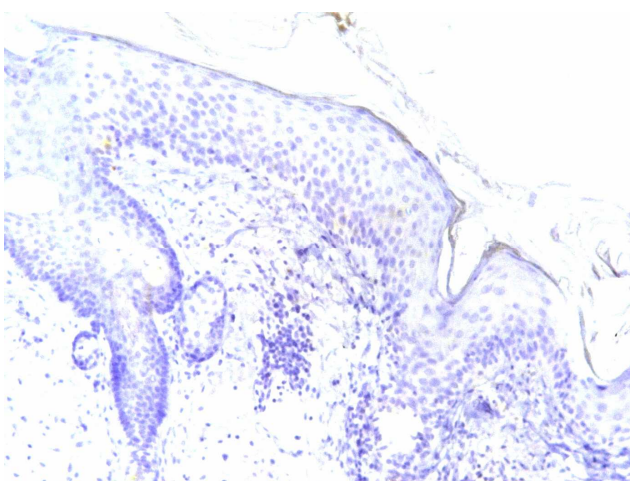


Abb.24:

Das Plattenepithelcarcinom-Präparat wurde bei der Negativkontrolle ohne den Primärantikörper angefärbt. Es zeigt sich hierbei keinerlei Anfärbung.  
Originalvergrößerung x 200

### Gesunde Haut

In gesunder Haut zeigt sich nach der Anfärbung keinerlei Expression von p 53 in den Epithelzellen (Stufe 0).

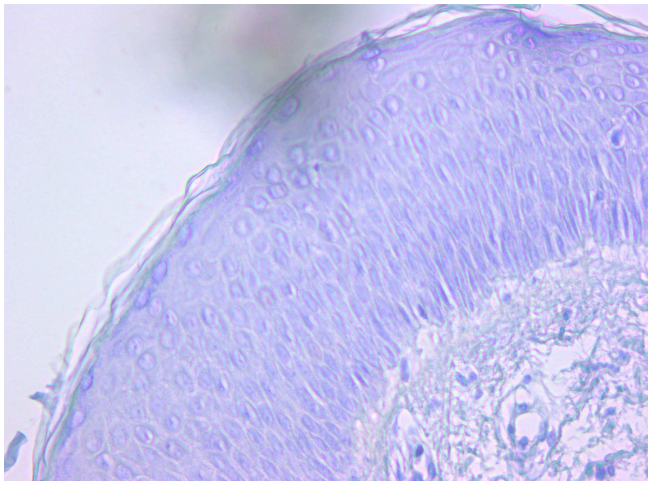


Abb.25:

Gesunde, unverletzte Haut wurde mit p 53 angefärbt. Es ist keine positive Anfärbung zu erkennen.  
Originalvergrößerung x 200

### Verbrennungen

In keinem der Präparate konnte eine Anfärbung beobachtet werden ( Stufe 0, n=25).

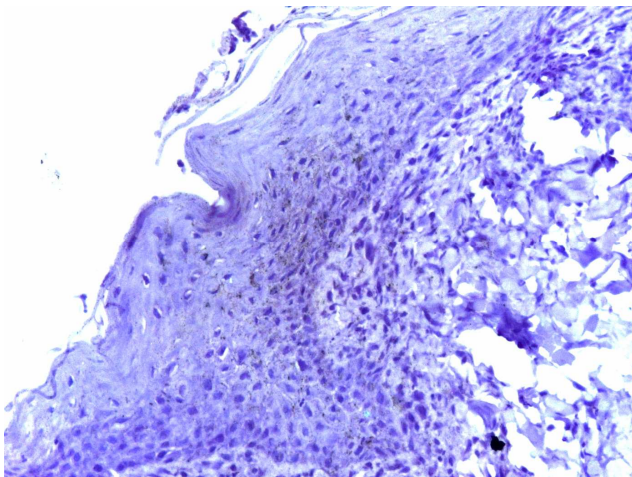


Abb.26:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 12. Tag nach der Verbrennung wurde gegen p 53 gefärbt. Es ist keinerlei Anfärbung zu erkennen.  
Originalvergrößerung x 200

### 3.5. "death-receptors"

#### 3.5.1. TNF- $\alpha$ -Rezeptor 1

##### Positiv-/ Negativkontrolle

Als Positivkontrolle wurde eine Biopsie aus einer Psoriasis-Läsion der Haut (dankenswerte Gabe der Universitätshautklinik Kiel, Prof. J.M.Schröder) mitgefärbt. Bei der Positivkontrolle ist eine deutliche Anfärbung des Epithels zu erkennen (Stufe 2). Die Negativkontrolle weist keine Anfärbung auf (Stufe 0).

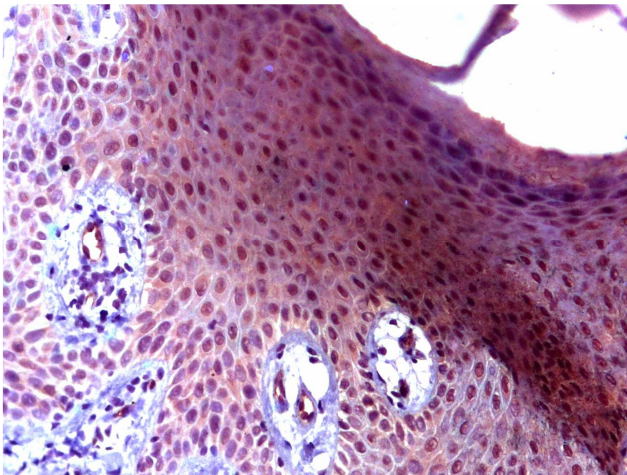


Abb 27:

Das Psoriasis-Präparat wurde mit dem TNF- $\alpha$ -R1-Antikörper angefärbt. Es ist eine deutlich positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates im gesamten Epithelbereich zu erkennen. Originalvergrößerung x 200.

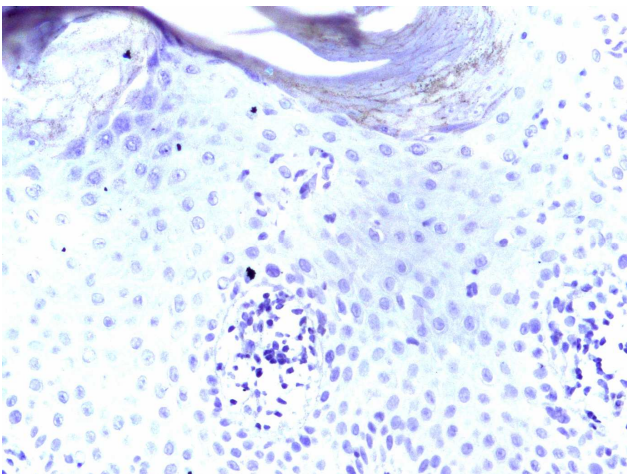


Abb. 28:

Das Psoriasis-Präparat wurde bei der Negativkontrolle ohne den Primärantikörper angefärbt. Es zeigt sich hierbei keinerlei Anfärbung. Originalvergrößerung x200



## Normale Haut

In gesunder Haut zeigt sich nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ -Rezeptor 1 durchgehend nur eine geringe Anfärbung der basalen und suprabasalen Keratinozyten (Stufe1). Auch das Endothel ist angefärbt.

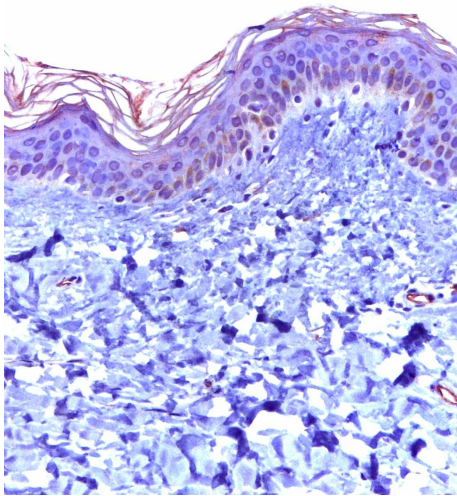


Abb. 29:

Gesunde, unverletzte Haut wurde mit TNF- $\alpha$ -R1 angefärbt. Es ist eine geringe Anfärbung der basalen und suprabasalen Keratinozyten sowie des Endothels erkennbar. Originalvergrößerung x 200.

## Verbrennungswunden

In den untersuchten tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden findet sich bei zwei der zwölf untersuchten Präparate kein Epithel auf den Objektträgern. Ein Präparat zeigt keinerlei Anfärbung. Bei den restlichen neun Präparaten sind die basalen und suprabasalen Keratinozyten deutlich angefärbt (Stufe1-2). Das Endothel ist überwiegend sogar stark angefärbt (Stufe2-3). Tendenziell nimmt die Expression mit steigendem Wundalter bis zum siebten Tag nach der Verbrennung zu, danach wieder ab.

Im Vergleich zu gesunder Haut ist eine deutlich vermehrte Anfärbung zu erkennen.

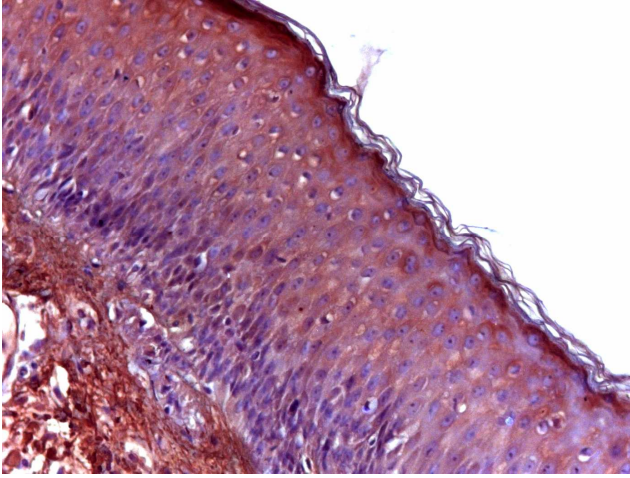


Abb. 30:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 2. Tag nach der Verbrennung wurde mit TNF- $\alpha$ -R1-Antikörper angefärbt. Es ist eine deutliche positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates im gesamten Epithel des Wundrandes zu erkennen.

Originalvergrößerung x 200

### 3.5.2. FAS

#### Positiv-/Negativkontrolle

Als Positivkontrolle wurde eine Biopsie aus einer Toxischen Epithelialen Nekrolyse (TEN)-Läsion (dankenswerte Gabe der Universitätshautklinik Tübingen, Prof. Breuninger) mitgefärbt. Bei der Positivkontrolle ist eine deutliche Anfärbung der Keratinozyten des Epithels und der Zellen im Bindegewebe zu erkennen. Bei der Negativkontrolle findet sich keine Anfärbung.

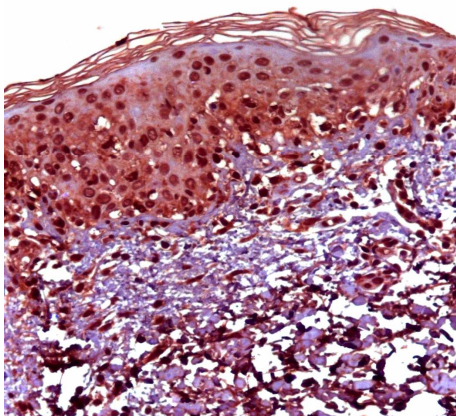


Abb. 31:

Das TEN-Präparat wurde mit dem FAS-Antikörper angefärbt. Es ist eine deutlich positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates im Bereich des Epithels und in Zellen des Bindegewebes zu erkennen. Originalvergrößerung x 200.

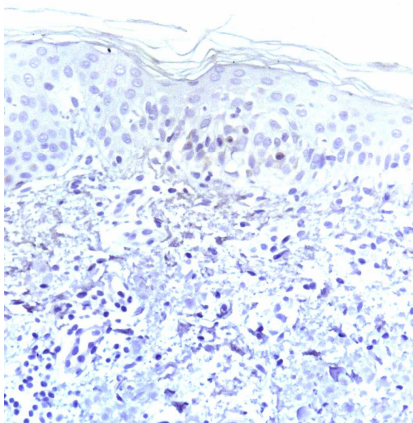


Abb. 32:

Das TEN-Präparat wurde bei der Negativkontrolle ohne den Primäantikörper angefärbt. Es zeigt sich hierbei keinerlei Anfärbung. Originalvergrößerung x200

## Normale Haut

In gesunder Haut zeigt sich nach Färbung gegen FAS eine deutliche Anfärbung der Keratinozyten des Epithels (Stufe2). Sämtliche basalen und suprabasalen Keratinozyten sind dabei angefärbt. Das Endothel ist nicht angefärbt.

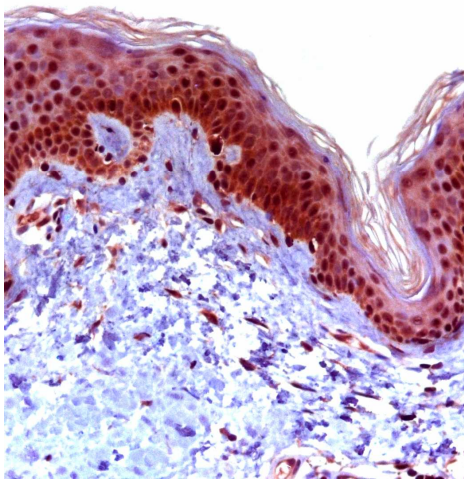


Abb. 33:

Gesunde, unverletzte Haut wurde gegen FAS gefärbt. Es ist eine Anfärbung in Form eines roten Präzipitates im Epithelbereich, vor allem basal, zu erkennen. Originalvergrößerung x 200.

## Verbrennungswunden

In den untersuchten tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden findet sich bei zwei der dreizehn untersuchten Präparate wiederum kein Epithel auf den Objektträgern. Bei den restlichen elf Präparaten sind die basalen und suprabasalen Keratinozyten sowie das Endothel stark angefärbt (Stufe 3). Tendenziell nimmt auch hier die Expression mit steigendem Wundalter bis zum siebten Tag nach der Verbrennung zu, danach wieder ab.

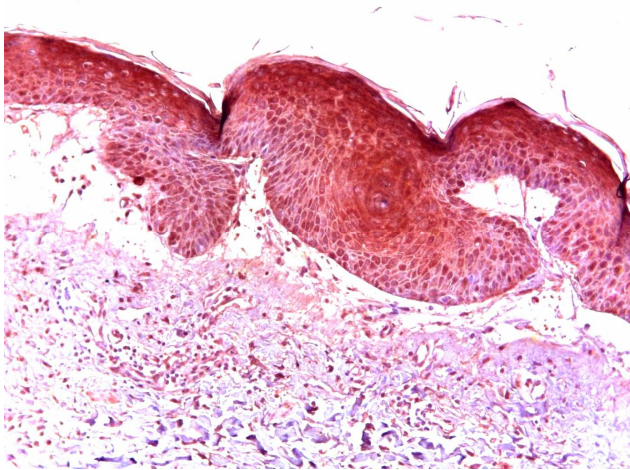


Abb. 34:

Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut vom 8. Tag nach der Verbrennung wurde gegen FAS gefärbt. Es ist eine deutliche positive Anfärbung in Form eines roten Präzipitates in den Keratinozyten des Epithels des Wundrandes zu erkennen. Originalvergrößerung x 200

### 3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die untersuchten Proben bestanden zum einen aus normaler Haut und zum anderen aus tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden.

Die Proliferation der Keratinozyten wurde mittels KI 67 erfasst. Bei den Verbrennungswunden fand sich hierbei im Vergleich zu gesunder Haut eine um das neunfach erhöhte Proliferationsrate, wobei mit zunehmendem Wundalter eine Zunahme des Mitoseindex beobachtet werden konnte.

Für die Überprüfung auf Apoptose wurden unterschiedliche Marker mit unterschiedlichen Ansatzpunkten verwendet.

Mit der TUNEL-Färbung konnte bei Verbrennungswunden ein durchschnittlicher Apoptoseindex von 54,6% ermittelt werden. Mit steigendem Wundalter zeigte sich eine Abnahme des Apoptoseindex.

In Verbrennungswunden konnte außerdem eine deutliche Aktive Caspase 3 - Immunreaktion beobachtet werden. Die nachgewiesene Apoptose nahm mit zunehmendem Wundalter tendenziell ab. Gesunde Haut zeigte keine Aktive Caspase 3 – Immunreaktivität.

Bei den Verbrennungswunden konnte auch eine deutliche Aktive Caspase 8 – Immunreaktivität gefunden werden. Hier nahm mit steigendem Wundalter die positive Anfärbung und die Länge der Anfärbung zu. Normale Haut zeigte keine Expression.

Aktive Caspase 9 – Immunreaktivität konnte mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper in Verbrennungswunden nicht nachgewiesen werden.

Die zellzyklusassistierten Proteine p 16 und p53 waren in den Verbrennungswunden nicht nachweisbar.

Bei den Todesrezeptoren TNF-R1 und FAS konnte sowohl bei gesunder Haut als auch bei den Verbrennungswunden eine Expression nachgewiesen werden, wobei die Anfärbung bei den Verbrennungswunden im Vergleich zu gesunder Haut deutlich vermehrt war. Tendenziell nahm hier die Expression mit steigendem Wundalter bis zum siebten Tag nach der Verbrennung zu, danach wieder ab.

## 4. Diskussion

### 4.1. Kritik der Methode

#### 4.1.1. Materialgewinnung

Durch die in Kapitel 2 beschriebene Gewinnung und Paraffinkonservierung bzw. Kryokonservierung des biopsierten Materials ließ sich in nahezu allen Biopsien eine gute Erhaltung der Gewebestrukturen erzielen.

Ein Problem stellten die für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörper dar, die zum Teil nicht für formalinfixierte Proben geeignet waren, da durch diese Art der Konservierung eine Zerstörung der Antikörperbindungsstellen nicht auszuschließen ist. Vorteile boten hier die Kryoschnitte, die unter anderem einer kürzeren Vorbehandlung bedurften und eine gute optische Beurteilbarkeit aufwiesen.

Die Proben aus Verbrennungswunden wurden ausschliesslich im Rahmen notwendiger chirurgischer Eingriffe gewonnen, die mit dem Ziel durchgeführt wurden, einen Gewebsverlust möglichst gering zu halten. Daher enthielten nicht alle gewonnenen Biopsien einen Anschnitt aus völlig unverändertem , gesundem Gewebe. Hinzu kam, dass nicht von allen Zeiträumen (Tagen) nach der Verbrennung Gewebe vorhanden war.

Im Tierversuch wäre es möglich gewesen, umfangreichere Proben zu gewinnen. Zusätzlich wäre eine bessere Probengewinnung möglich gewesen. Das Tiermodell lässt sich jedoch nicht immer auf den Menschen übertragen. Nagetiere wie Ratten, die besonders häufig als Modell für Wundheilungsstudien verwendet werden, zeigen zwar ähnlich wie Menschen eine Wundheilung, die mit der Bildung von kollagenfaserreichen Narben einhergeht, jedoch kommen bestimmte Wundheilungsstörungen wie beispielsweise hypertrophe Narben und Keloide bei Nagetieren nicht vor (Cohen und Mast et al., 1990 ).

Auch Kulturmodelle sind nur teilweise auf die Wundheilung in vivo übertragbar. Da

die Pathophysiologie der Verbrennungswunden noch nicht umfassend geklärt ist, ist es schwierig, eine Kultursituation zu schaffen, die den tatsächlichen Wundverhältnissen einer Verbrennung in vivo entspricht.

In der vorliegenden Studie sollten deshalb vorerst in vivo entstandene, humane Wunden untersucht werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte außerdem die Expression solcher Proteine untersucht werden, die im Rahmen des Zelltodes eine Rolle spielen und bei anderen Erkrankungen der Haut, z.B. Toxische Epithelial Nekrolyse (TEN) oder auch UV-Bestrahlung der Haut, bereits nachgewiesen wurden.

Auch wenn die untersuchten Biopsien einen repräsentativen Gewebsanschnitt enthalten, besteht die Möglichkeit, dass die Wunden nicht in allen Bereichen uniform sind. Von Wunden, in denen eine Biopsierung des gesamten Wundgebietes möglich ist, hätte durch Serienschnitte eine genauere Untersuchung erfolgen können.

#### 4.1.2. Immunhistochemische Untersuchungen

Mit allen für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Reagenzien und Antikörpern, bis auf Caspase 9, ließen sich sowohl hinreichend sensitive als auch hinreichend spezifische Anfärbungen vornehmen. Für aktive Caspase 9 gelang keine Anfärbung. Als technisches Problem stellte sich die fehlende Positivkontrolle dar.

Das Ergebnis einer immunhistochemischen Anfärbung von Gewebe ist jedoch auch bei sorgfältigster Durchführung der Färbeschnitte Schwankungen unterworfen. Deshalb wurde das Ziel verfolgt, für jeden Antikörper alle Biopsien im selben Durchgang zu färben. Insgesamt wurden durch dieses Vorgehen gut auswertbare Färbeergebnisse erzielt. Nach einer längeren Lagerzeit der fertigen Schnitte trat eine Verblässung der Hämatoxylin-Gegenfärbung ein. Das durch die immunhistochemischen Färbungen entstandene rote Präzipitat zeigte jedoch auch nach Monaten kaum Qualitätsverluste.



Die anschließend bei einem Großteil der Färbungen durchgeführte semiquantitative Auswertung (vgl. Kapitel 2.4.3) erlaubt zwar prinzipiell keine vollkommen objektiven Aussagen über den Grad der Anfärbung, ist aber bei immunhistologischen Untersuchungen ein durchaus gängiges Verfahren, das auch eine statistische Auswertung erlaubt (Tettelbach et al., 1993; Nanney et al., 1995).

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1. Ki 67

Bei den untersuchten tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden ist der Mitoseindex gegenüber gesundem Epithel um das Neunfache erhöht, wobei der Mitoseindex mit steigendem Wundalter zunimmt.

Bei Verbrennungswunden mit einheilenden Spalthauttransplantaten wurde ein um das Elfache höherer Mitoseindex im Vergleich zu gesundem Epithel gefunden. Bei dieser Wundart nimmt der Mitoseindex jedoch mit steigendem Wundalter ab. Vergleichbar sind diese Ergebnisse auch mit Studien von Rennekampff et al. (2007), wo mit steigendem Wundalter ebenfalls ein abnehmender Mitoseindex beobachtet wurde. Hier lag der Mitoseindex beispielsweise am dritten postoperativen Tag bei 54 % im Vergleich zu 12 % am fünfzehnten postoperativen Tag.

Der hohe, mit dem Verschluss der Wunde abnehmende Mitoseindex in mit Spalthaut gedeckten Verbrennungswunden spricht dafür, dass in diesen Wunden eine bedarfsgerechte Proliferation mit adäquatem Ersatz der für den Wundverschluss benötigten Keratinozyten abläuft. Die hohe Zellproduktion scheint bei dieser Wunde von einer schnellen Migration der Keratinozyten begleitet zu sein, so dass ein Verschluss der Wunde zeitgerecht erfolgen kann.

Das Wundrandepithel der noch nicht nekrotomierten Verbrennungswunden zeigt also einen gegenüber den mit Spalthaut gedeckten Verbrennungswunden geringeren Proliferationsindex.

Auch De Cherney et al. (1997) stellten bei einer Untersuchung an Meerschweinchen-Brandwunden ebenfalls eine nur gering erhöhte Proliferationsrate der Basalzellen in den ersten zwei Wochen nach der Verbrennung fest. Erst ab Tag 17 nach der Verbrennung kam es zu einem zunehmenden Anstieg des Proliferationsindex, der zwischen Tag 20 und 28 die höchsten Werte erreichte.

Vergleichbar sind diese Ergebnisse auch mit Studien von Langlois et al. (2005), die bei Verbrennungswunden teilweise erst nach 2 Tagen einen deutlichen Anstieg von Ki 67 und damit einen Anstieg des Mitoseindex beobachten konnten.

Die Ergebnisse von De Cherney et al. (1997) und von Langlois et al. (2005) sowie die hier vorgestellten Beobachtungen sprechen also für einen verzögerten Ablauf der Proliferation in den noch nicht nekrotomierten, nicht mit Spalthaut gedeckten Verbrennungswunden.

Die Untersuchungen geben aber keinen Aufschluss darüber, ob insgesamt weniger vitale Keratinozyten vorhanden sind oder ob der Eintritt in den Zellzyklus blockiert ist. Im ersten Fall wäre der Zellzyklus und die Zellzykluszeit normal. Im zweiten Fall wären genügend vitale Zellen vorhanden, die aber in einer Zellzyklusphase blockiert sind und damit nicht in eine aktive Zellteilung eintreten können.

Eine weitere Ursache der relativ verminderten Proliferationsrate des Wundrandepithels könnte auch eine verminderte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren in der noch nicht nekrotomierten Verbrennungswunde sein. Möglicherweise stellt das thermisch veränderte Wundgebiet eine Barriere für Wachstumsfaktor-produzierende Zellen und die Wachstumsfaktoren selbst dar.

Interessanterweise konnte bei chronischen Wunden gegenüber Spalthaut-transplantierten Wunden ein deutlich erhöhter Mitoseindex beobachtet werden. Dies konnte beispielsweise in Studien von Rennekampff et al. (2006) gezeigt werden. Hier wurde in chronischen Wunden ein Mitoseindex von 38,7% gefunden wohingegen bei Spalthaut-transplantierten Wunden nur ein Mitoseindex von 22,25% gefunden wurde. Dementsprechend war auch die Epitheldicke bei

chronischen Wunden am Wundrand mit 0,69 mm deutlich höher als bei Spalthaut-transplantierten Wunden mit 0,15 mm.

#### 4.2.2. Aktive Caspase 3 und TUNEL

Aktive Caspase 3 ist eine Cysteinprotease, die im Rahmen des apoptotischen Zelltodes aktiviert wird und die Funktion einer Initiatorcaspase einnimmt. Mit dem TUNEL-Antikörper werden DNA-Bruchstellen markiert.

Während die Immunreaktivität auf Aktive Caspase 3 auf die Einleitung der Apoptose hindeutet, was unter anderem schon bei Leukämie-Zellen von Gao et al. (2007) nachgewiesen wurde, so weist die TUNEL-Färbung bereits auf die fortgeschrittene Apoptose oder den Zelltod hin.

Beide Untersuchungen ergaben, dass am Wundrand der Verbrennungswunden fast ausschließlich apoptotische Keratinozyten vorhanden sind. Mit zunehmendem Wundalter konnte jedoch eine Abnahme der apoptotischen Zellen beobachtet werden. Dies mag darauf hindeuten, dass diese Zellen über die Zeit abgeräumt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse aber, dass tatsächlich in vivo durch das thermische Trauma induzierte Apoptosevorgänge nachweisbar sind. Auch wenn inzwischen TUNEL-positive Zellen auch der Nekrose zugeordnet werden, was in Studien von Muppidi et al. (2004) gezeigt werden konnte, so zeigt die aktive Caspase 3-Färbung, dass Apoptoseregulationswege aktiviert sind.

#### 4.2.3. Proteine der Tumorsuppressorgene p16 und p53

##### Protein p16

Das Protein des p16 Gens führt über eine Bindung an die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und CDK 6 zu einem G1 Phasestopp des Zellzyklus mit nachfolgendem Zellzyklusarrest (Guan et al., 1994). In einer Reihe von malignen

Tumoren und malignen Zelllinien konnte eine Deletion oder Mutation des p16 gefunden werden, welches die Rolle als Tumorsuppressor unterstreicht. In unseren Untersuchungen konnte keine Expression des p16 Proteins in Verbrennungswunden gefunden werden. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit in vitro Versuchen an thermisch geschädigten humanen Keratinozyten, die ebenfalls eine vermehrte Proteinexpression ausschließen konnten (Promotionsarbeit Michael Sauter, Eberhard Karls Universität Tübingen). Zusammenfassend kann damit geschlossen werden, dass dieses Protein keine Rolle in einem möglichen Zellzyklusstopp und Einleitung von Apoptose in der Verbrennungswunde spielt.

### Protein p53

Auch das Protein p53 kann als Tumorsuppressor bzw. Wachstumshemmer bezeichnet werden. In Einklang hiermit führen Mutationen des p53 Gens zu malignen Tumoren. Das Protein p53 stellt ein Schlüsselprotein nach DNA Schäden dar. Die Hochregulation von p53 führt letztlich zu einem Zellzyklusstopp in der G1 Phase. Somit kann dann in Abhängigkeit der Schädigung die DNA Reparatur oder die Einleitung der Apoptose erfolgen. Typischerweise führt die Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen zu einem Anstieg an Protein p53 in der Zelle (Kuerbitz et al., 1992). Auch in vivo konnte in Ulcera, die durch Gamma-Bestrahlung induziert wurden, eine p53 Immunreaktivität in der Epidermis gesehen werden (Gu et al., 1999). In strahleninduzierten Nekrosen konnte Lindsay et al. (2007) bei Mäusen vermehrt p53 nachweisen. Auch andere Formen von exogenem Stress führen zu einer p53 Expression im Gewebe. In mehreren Studien (de Gruijl et al., 2008; Ouhtit et al., 2000) konnte nach UV-Bestrahlung der Haut p53 in der Epidermis nachgewiesen werden, während normale, gesunde Haut keine Immunreaktivität aufwies. Auch die UV-Bestrahlung von primären Keratinozyten und der Keratinozytenzelllinie HaCaT führt zu einer Induktion von p53 und p21 Protein mit nachfolgender Apoptose (Abd Elmageed et al., 2009). Im Gegensatz zu den

Untersuchungen nach UV-Bestrahlung konnten wir in der Epidermis von humanen Verbrennungswunden keine Immunreaktivität für p53 nachweisen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wies Nagata et al. in Verbrennungswunden p 53 nach. Bei genauer Analyse der Histologien der Arbeit von Nagata et al. (1999) zeigt sich jedoch, dass nur vereinzelte Anfärbungen in der Zone der Stase in der Dermis erkennbar sind. Eine Zuordnung zu einem speziellen Zelltyp insbesondere Keratinozyten kann nicht gemacht werden. Somit wird auch durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte fehlende Immunreaktivität für p53 deutlich, dass sich die Verbrennungswunde grundsätzlich von UV- bzw Gamma-Strahlunginduzierten Wunden und kutanen Veränderungen unterscheidet.

#### 4.2.4. Caspase 8 und Caspase 9

Caspase 8 ist die Cysteinprotease, die über den Fas-Regulationsweg aktiviert wird und im weiteren zu apoptotischem Zelltod führt. Der immunhistologische Nachweis von aktivierter Caspase 8 zeigt auf, daß dieser Regulationsweg aktiviert ist. In Zusammenhang mit einer deutlichen Fas-Expression ist damit ein Regulationsweg der Apoptose nach thermischem Zellstress möglich.

In den untersuchten Verbrennungswunden konnte mit steigendem Wundalter eine vermehrte Caspase 8-Expression beobachtet werden.

Caspase 9 gehört ebenfalls zu den Cysteinproteasen und wird unter anderem durch mitochondriales Cytochrom C aktiviert. Über eine Kaskade mit Caspase 3 und 7 wird die Apoptose eingeleitet. Ein Nachweis dieses Proteins gelang bei den untersuchten Verbrennungswunden nicht, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Antikörperbedingt war. Eine Positivkontrolle war auch über den technischen Service des Herstellers für die Immunhistologie nicht zu erhalten. Alle bisherigen Untersuchungen mit diesem Antikörper waren Westernblot-Analysen (Wang et al., 2007).

In Studien von Daher et al. (2006) konnte bei UV-B induzierten Strahlenschäden in Keratinozyten, die mit humanem Papillomavirus infiziert waren, sowohl ein Anstieg

von aktivierter Caspase 9 als auch von aktivierter Caspase 3 und Caspase 8 nachgewiesen werden.

In Studien von Hsin-Su et al. (2006) konnte in UV-B exponierten Keratinozyten ebenfalls ein Anstieg von p 53, Caspase 3, Caspase 8 und Caspase 9 beobachtet werden.

In Keratinozyten nach Arsen-Exposition zeigte sich in diesen Studien sowohl ein Anstieg von FAS als auch von aktivierter Caspase 3 und aktivierter Caspase 8. Bei Keratinozyten mit UV-B-Exposition kombiniert mit Arsen-Exposition zeigte sich eine vermehrte Caspase 3-, Caspase 8- und Caspase 9-Aktivität.

Somit kann festgestellt werden, dass verschiedene Stressformen (Strahlung, UV-B, Hitze) unterschiedliche Regulationswege triggern. Unsere histologischen Ergebnisse zeigen, dass das thermische Trauma im Hinblick auf die Caspase-Aktivierung vergleichbar mit der toxischen Noxe Arsen sein kann.

#### 4.2.5. TNF-R1 und FAS

TNF-R1 und FAS gehören zu der Gruppe der death-receptors, die Caspase 8 aktivieren und dadurch im weiteren Apoptose einleiten.

Wie in Studien von Weisfelner et al. gezeigt, werden der TNF-Rezeptor 1 und der FAS-Rezeptor auch auf Keratinozyten in gesunder Haut exprimiert. Auch auf kultivierten Keratinozyten konnten beide Rezeptoren nachgewiesen werden (Soroka et al., 2008)

In unserer Arbeit konnte für TNF-R1 und FAS bis zum siebten Tag eine Zunahme der Immunreaktivität in den Keratinozyten des Wundrandes beobachtet werden, danach zeigte sich wieder eine Abnahme der Immunreaktivität.

In einer Publikation von Gravante et al. (2006) konnte in Verbrennungswunden FAS und TUNEL nachgewiesen werden. In einer weiteren Arbeit von Gravante et al. (2007) wurde vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit eine Quantifizierung der Apoptose über TUNEL und FAS Expression durchgeführt. Dabei fand sich eine Apoptoserate in der Dermis bei gesunder Haut von 18,6% +/- 7,2% im Vergleich zu

48,15% +/- 17,22% bei Verbrennungswunden. In dieser Arbeit wurden jedoch alle in der Dermis vorliegenden Zellen betrachtet – sowohl hinsichtlich der TUNEL positiven Zellen als auch hinsichtlich der Referenzpopulation. Damit sind aber auch alle hämatogenen Zellen miterfasst. In der vorliegenden Arbeit war es jedoch von Interesse, die an der Reepithelisierung beteiligten Zellen, d.h. die Keratinozyten, zu betrachten. Auch in unserer Arbeit exprimierten die Keratinozyten des Wundrandes FAS.

In Studien von Zhang et al. (2007) bzw. Abe et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass der FAS-Ligand über FAS in Keratinozyten in vivo bzw in vitro Apoptose induzieren kann.

Interessanterweise lässt sich in Brandblasenflüssigkeit etwas mehr FAS-Ligand als in Wundflüssigkeit von Hautentnahmestellen nachweisen (92,39 pg/ml +/- 21,66 pg/ml versus 66,35 +/- 44,28 pg/ml), was in letzteren nicht zu einer reduzierten Wundheilung führte (unveröffentlichte Ergebnisse). Der Wert der Wundflüssigkeit von Hautentnahmestellen war nahezu identisch mit dem Serumwert dieser Patienten (59,67 +/- 29,80 pg/ml). Bei gesunden Probanden wurde FAS-Ligand im Serum <40pg/ml gemessen (Abe et al, 2003). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass FAS- Ligand aus Keratinozyten keinen apoptischen Effekt auf FAS-Ligand sensible Zellen hat (Viard et al, 1998).

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so müsste eine Apoptoseinduktion über den extrinsischen FAS-Regulationsweg ausschließlich über die vermehrte FAS Expression bedingt sein. Ob damit tatsächlich über FAS die Apoptose in Verbrennungswunden initiiert wird, erscheint eher unwahrscheinlich.

Auch für die TNF- $\alpha$ -Aktivierung liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. In der Mehrzahl der Publikationen wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  Apoptose in Keratinozyten initiieren kann (Roujeau et al., 2006). Es wurde aber auch gezeigt, dass TNF- $\alpha$  zur Proliferation von Keratinozyten führt (Yan et al., 1991).

In einer Untersuchung von Rennekampff et al. (1998) konnte nachgewiesen werden, dass TNF- $\alpha$  in Brandblasen mit 0,96 pg/ml vorliegt und in Wundflüssigkeit

zwischen 4,1-23,1 pg/ml. In einer Studie von Paquet et al. (1998) konnte TNF- $\alpha$  vermehrt in TEN-Blasen nachgewiesen werden.

Obgleich die nachgewiesene Immunreaktivität von Aktiver Caspase 8 auf eine extrinsische Apoptoseeinleitung hindeutet, sind weitere Untersuchungen notwendig, um diesen Reaktionsweg für die Verbrennungswunde eindeutig zu beweisen.

#### 4.3. Klinische Bedeutung und Ausblick

Verbrennungswunden wie auch chronische Wunden sind durch eine gestörte epidermale Wundheilung gekennzeichnet.

Es konnte für die Verbrennungswunde gezeigt werden, dass die regelhafte epidermale Wundheilung durch Apoptose bzw. eingeleiteten Zelltod am Wundrand gestört ist. Die Proliferationsrate der Keratinozyten am Wundrand bleibt hinter der von Inzisionswunden zurück (Varedi et al., 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen mögliche therapeutische Ansätze auf. So wäre es zum einen möglich, die verbleibende Anzahl an vitalen Keratinozyten in ihrer Proliferation zu steigern und zum anderen könnten Apoptosewege blockiert werden. Erste therapeutische tierexperimentelle Untersuchungen zur Applikation von Keratinocyte Growth Factor deuten auf einen günstigen Effekt hin (Liu et al., 2005; Kopp et al., 2004). Die klinisch topische Anwendung von Zelllysaten auf Verbrennungswunden zeigen gleichartig günstige Wirkungen.

Bisherige Therapieansätze in der akuten Behandlung von Verbrennungswunden beschränken sich auf die Kühlung der verbrannten Haut. Ob durch die Kühlung die Apoptose gestoppt werden kann, bleibt zu prüfen.

Die Hypothermie spielt jedoch in der Neuroprotektion eine große Rolle. Hier konnte bereits nachgewiesen werden, dass es durch Hypothermie zu einer deutlichen Reduktion der Apoptose kommt. Es konnte sowohl weniger Caspase 3 als auch weniger FAS, TUNEL und TNF-R1 nachgewiesen werden (Phanithi, 2000).



In eigenen Untersuchungen zur Kühlung konnte die reduzierte Koloniebildungsfähigkeit von Keratinozyten nach thermischem Trauma nicht günstig beeinflusst werden (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Blockierung der Caspasen – hier Caspase 8 und Caspase 9 – könnte zum einen einen kausalen Beweis für die Beteiligung dieser Caspasen erbringen und zum anderen einen therapeutischen Ansatz darstellen. Dies bleibt in weiteren Untersuchungen zu überprüfen.

## **5. Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen zu Proliferation und Apoptose nach thermischem Stress der Haut (Zusammenfassung)**

Die Behandlung von Problemwunden wie z.B. Verbrennungswunden stellt eine große Herausforderung im klinischen Alltag dar. Die Klärung der Mechanismen der Wundheilung und deren Regulation kann neue Therapieformen ermöglichen und damit zu einer verbesserten Heilung führen.

In dieser vergleichenden Studie zur Wundheilung sollte untersucht werden, ob die Störung der Wundheilung in Verbrennungswunden mit einer veränderten Expression von Proteinen, die in der Proliferation und Apoptose von Keratinozyten relevant sind, verbunden ist. Im speziellen sollten untersucht werden: der Proliferationsmarker Ki 67, die assoziierten Zellzyklus-Proteine p16 und p53, aktive Caspase 3, aktive Caspase 8 und aktive Caspase 9, die Death Receptors TNF-R1 und FAS.

Es wurden Biopsien aus gesunder Haut sowie aus tief zeit- und drittgradigen Verbrennungswunden untersucht. Die Hautbiopsien wurden teils in Paraffinschnitten und teils in Kryoschnitten den immunhistochemischen Färbungen zugeführt.

Bei den untersuchten tief zweit- und drittgradigen Verbrennungswunden war der Proliferationsindex gegenüber gesundem Epithel um das Neunfache erhöht, wobei der Proliferationsindex mit steigendem Wundalter zunahm.

Bei TUNEL und aktive Caspase 3 war mit zunehmendem Wundalter eine Abnahme an apoptotischen Zellen zu verzeichnen. Bei TUNEL konnte ein Apoptoseindex zwischen 34,7% und 65,5% gefunden werden.

Bei aktive Caspase 8 nahm die Proteinexpression mit steigendem Wundalter (erster bis zwölfter Tag nach der Verbrennung) zu. Aktive Caspase 9 konnte nicht angefärbt werden.

Bei TNF-R1 und FAS konnte bis zum siebten Tag nach der Verbrennung eine Zunahme der Expression auf den Keratinozyten des Wundrandes im Vergleich zu gesunder Haut beobachtet werden. Danach fand sich wieder eine Abnahme.

Die Proteine p16 und p53 konnten immunhistologisch in den Biopsien der Verbrennungswunden nicht nachgewiesen werden.

Die pathophysiologischen Ursachen der verzögerten Wundheilung in Verbrennungswunden sind bislang noch nicht ausreichend geklärt. Die Untersuchungen zeigen, dass in den Verbrennungswunden Proteine der Apoptosekaskade exprimiert sind. War man bisher davon ausgegangen, dass die Nekrose die hauptsächliche Ursache des Zelltodes von Keratinozyten in der Verbrennungswunde ist, so zeigen die vorliegenden Daten, dass die Apoptose eine weitere Art des Zellunterganges des Wundrandepithels darstellt. Mögliche Regulationswege stellen die extrinsische Aktivierung über die deutlich exprimierten Death Receptors ( FAS und TNF-R1) auf den Keratinozyten dar. Eine Einleitung der Apoptose über einen Zellzyklusstop scheint nicht vorzuliegen, da die typischen zellzyklusassoziierten Proteine (p 16 und p53) nicht nachgewiesen wurden. Der im Vergleich zu akuten Wunden verminderte Proliferationsindex in Verbrennungswunden spricht somit für eine verminderte Anzahl an vitalen Keratinozyten nach thermischem Stress der Haut.

## 6. Literatur

Abe R, Shimizu T, Shibaki A, Nakamura H, Watanabe H, Shimizu H:  
Toxic Epidermal Necrolysis and Stevens-Johnson Syndrome are induced by  
soluble FAS ligand  
American Journal of Pathology. 2003; 162: 1515-1520

Abd Elmageed ZY, Gaur RL, Williams M, Abdraboh ME, Rao PN, Raj MH, Ismail  
FM, Ouhtit A:  
Characterization of coordinated immediate responses by p 16 and p 53 pathways  
in UVB-irradiated human skin cells  
Journal of Investigative Dermatology, 2009, 129, 175-183

Andriessen MP, van Bergen BH, Spruijt KI, Go ICH, Schalkwijk J, van de Kerkhof  
PC:  
Epidermal proliferation is not impaired in chronic venous ulcers  
Acta Derm Venereol 1995, 75 (6): 459-462

Baatout S, Derradji H, Petitfour O, von Suchodoletz H, Mergeay, M :  
Mechanisms of radio-induced apoptosis  
Can J Physiol Pharmacol. 2002, 80, 629-37

Baird A, Mormede P, Bohlen P:  
Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exsudate suggests its  
identity with macrophage-derived growth factor.  
Biophys Res Commun 1985, 126(1):358-364

Barrandon Y, Green H:  
Cell migrations is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles  
of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor  
Cell 1987, 50 (7):1131-1137

Baur PS, Parks DH, Larrson DL:  
The healing of burn wounds.  
Clin Plast Surg 1977, 4 (3): 389-407

Bereiter-Hahn J, Strohmeier R, Kunzenbacher I, Beck K, Voth M:  
Locomotion of Xenopus epidermis cells in primary culture  
J Sci 1981, 52:289-311

Berger A, Hierner R:  
Plastische Chirurgie, Band I, 2003,60-61

- Berger A, Tizian C:  
Circulation in myocutaneous flaps in the area of the tibia.  
Handchir Mikrochir Plast Chir 1985, 17(3): 161-165
- Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tubel J, Penning R, Eisenberger W:  
The timedependent localization of Ki67 antigen positive cells in human skin wounds.  
Int J Legal Med 1993, 106(1):35-40
- Böcker W, Denk H, Heitz PU:  
Regeneration und Reperation  
Pathologie. Urban und Schwarzenberg, München 1997, 93-96
- Brancolini, C., Benedetti, M., Schneider, C:  
Microfilament reorganisation during apoptosis: the role of Gas 2, a possible substrate for the ICE-like proteases.  
EMBO J. 1997, 14, 5179-90
- Breitkreutz D, Schoop VM, Mirancea N, Baur M, Stark HJ, Fusenig NE:  
Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCat cells in surface transplants.  
Eur J Cell Biol 1998, 75(39):273-286
- Chen IT, Akamatsu M, Smith M:  
Characterization of p 21 peptide domains required for cyclin E/Cdk2 and PCNA interaction  
Oncogene 1996: 12: 595-607
- Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB:  
Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal migration during wound reepithelialization.  
J Invest Dermatol 1982, 79:264-269
- Cohen IK, Mast BA:  
Models of wound healing.  
J Trauma 1990, 30(12Suppl.): S 149-S155
- Daher A, Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS:  
Apoptosis induced by ultraviolet B in HPV-immortalized human keratinocytes requires caspase9 and is death receptor independent  
Exp Dermatol. 2006 Jan; 15 (1):23-24

DeCherney AH, Dougherty WR, Felix JC, Rodgers KE, Girgis W, Abiko M, diZerega GS: Expression of cyclin protein after thermal skin injury in guinea pig model

J Burn Care Rehabil 1997, 18: 292-298

De Gruijl FR, Rebel H:

Early events in UV-carcinogenesis – DNA damage, target cells and mutant p 53 foci

Photochem Photobiol. 2008,84(2):382-7

EI-Deiry WS, Harper JW, O`Connor PM:

WAF1/CIP1 is induced in p 53-mediated G1 arrest and apoptosis

Cancer Res 1994; 54: 1169-1174

Elbendary A, Berchuck A, Davis P:

Transforming growth factor beta 1 can induce CIP1/WAF1 expression independent of the p 53 pathway in ovarian cancer cells

Cell Growth Differ 1994; 5: 1301-1307

Erkan E, Garcia CD., Patterson LT, Mishra J, Misnefes MM, Kaskel FJ, Devajaran P:

Induction of renal tubular cell apoptosis in focal segmental glomerulosclerosis: role of proteinuria and Fas-dependent pathways

J Am Soc Nephrol. 2005,16, 398-407

Falanga V, Eaglstein WH:

The “trap” hypothesis of venous ulceration.

Lancet 1993, 341(8851):1006-1008

Falanga V, Grinnell F, Glichrest B, Maddox YT, Moshell A:

Experimental approaches to chronic wounds

Wound Rep Reg 1995, 3:132-140

Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB:

Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme

Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 8655-8659

Gabbiani G, Chapponier C, Huttner I:

Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing

J Cell Biol 1978, 76(3):561-568

- Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G:  
Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function  
J Exp Med 1972, 135(4): 719-734
- Gao L, Sun Y, Chen C, Xi Y, Wang J, Wang Z:  
Primary mechanisms of apoptosis induction in a leukaemia cell line by fraction FA-  
2-b-ss prepared from the mushroom *Agaricus blazei* Murill  
Braz J Med Biol Res. 2007
- Garlick JA, Taichmann LB:  
Fate of human keratiocytes during reepithelialization in an organotypic culture  
model. Lab Invest 1994,70(6):916-924
- Gastman BR, Futrell JW, Manders EK:  
Apoptosis and plastic surgery  
Plast Reconstr Surg. 2003,111, 1481-96
- Gerdes J, Lemke U, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H:  
Cell cycle analysis of a cell proliferation human nuclear antigen defined by the  
monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell  
proliferation  
Int J Cancer 1983, 31: 13-20
- Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ:  
Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer  
cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution  
mechanisms  
Cancer Lett. 1997,115, 185-93
- Gravante G, Palmieri M, Esposito G, Delogu D, Santeusanio G, Filingeri V,  
Montone A:  
Apoptotic death in deep partial thickness burns vs. normal skin of burned patients  
J of Surgical Research 141, 141-145 (2007)
- Gravante G, Palmieri M, Esposito G, Delogu D, Santeusanio G, Filingeri V,  
Montone A:  
Apoptotic cells are present in ischemic zones of deep partial-thickness burns  
Journal of Burn Care & Research 27,5:688-693 (2006)
- Grinnell F:  
The activated keratinocyte: up regulation of cell adhesion and migration during the  
wound healing  
J Trauma 1990, 30( 12 Suppl): S144-S149

- Grinnell F:  
Wound repair, kreatinocyte activation and intgrin modulation  
J Cell Sci 1992, 101(5): 1-5
- Grinnell F, Billigham RE, Burgess L:  
Distribution of fibronectin during wound healing in vivo  
J Invest Dermatol 1981, 76: 181-189
- Grutter MG:  
Caspases: key players in programmed cell death  
Curr Opin Struct Biol. 2000,10, 649-55
- Gu Q, Gao Y, Li Y, Yang Z, Zhou J, Wang X, Wang D, Zhao P:  
Overexpression of p 53 and MDM2 proteins in rat radiation-induced skin ulcers  
J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1999; 18 (4): 319-22
- Guan KL, Jenkins CW, Li Y:  
Growth suppression by p 18, a p 16- and p 14-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function  
Genes Dev 1994; 8: 2939-2952
- Haapasalmi K, Mäkela M, Oksala O, Heino J, Yamada KY, Uitto VJ, Larjava H:  
Expression of epithelial adhesion proteins and integrins in chronic inflammation  
Am J Pathol 1995, 147(1). 193-206
- Helton ES, Chen X:  
P53 modulation of the DNA damage response  
J Cell Biochem. 2007 Mar 1; 100(4): 883-96
- Hilgers W, Schmiegel W:  
Zellzyklusregulation und gastrointestinale Tumoren  
European Journal of Clinical Research, 1996;2(1):8-9
- Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamaoto K, Sasada M:  
Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis  
J Exp Med. 1998,187, 587-600
- Horlock NM, Wilson GD, Daley FM, Richman PI, Sanders R:  
Cellular proliferation of basal cell carcinoma: relationship to clinical subtype and histopathology  
Eur J Surg Oncol 1997, 23(3): 247-253

Hsin-Su Y, Wei-Ting L, Chee-Yin C :  
Arsenic carcinogenesis in the skin  
Journal of Biomedical Science (2006) 13:657-666

Hynes RO:  
Integrins: A family of cell surface receptors  
Cell 1987, 48: 549-554

Ipaktchi K, Mattar A, Niederbichler AD, Hoesel LM, Hemmila MR, Su GL, Remick DG, Wang SC, Arabi S:  
Topical p38MAPK inhibition reduces dermal inflammation and epithelial apoptosis in burn wounds  
Shock 2006 Aug; 26 (2): 201-9

Kolenko VM, Uzzo RG, Bukowski R, Finke JH:  
Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy  
Apoptosis 2000, 5, 17-20

Kopp J, Wang GY, Kulmburg P, Schultze-Mosgau S, Huan JN, Ying K, Seyhan H, Jeschke MD, Kneser U, Bach AD, Ge SD, Dooley S, Horch RE:  
Accelerated wound healing by in vivo application of keratinocytes overexpressing KGF  
Mol Ther. 2004Jul; 10(1):86-96

Krawczyk WS, Wilgram G:  
Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing  
Ultrastructure Research 1973, 45:93-101

Kremer M, Berger A:  
Plastisch-chirurgische Therapie beckennaher Dekubitaluzera  
Chirurg 1999, 70(6): 726-740

Kremer M, Berger A:  
Perspektiven des künstlichen Hautersatzes  
Dt Ärzteztbl 2000, 97, B-1045-1050

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV:  
Wild-type p 53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation  
Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 7491-7495

Kzlms, D., Schwarz, T:  
Independent contribution of the different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis  
Biochem Pharmacol. 2002, 64, 837-41



Langlois NE, Tarran S, Dziewulski P:

A study of burns for wound ageing reveals changes in unburnt skin with implications for future research

Med Sci Law. 2005, 45(3):205-10

Leibovich SJ, Ross R:

The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum.

Am J Pathol 1975, 78:71-100

Liebau J, Heidrich S, Berger A, Tenenhaus M, Rennekampff H-O:

Expression of epithelial matrix molecules collagen and laminin and corresponding integrins in chronic wounds

Eur J Plast Surg (2007), 29:235-242

Lindsay KJ, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG:

The genetic basis of tissue responses to ionizing radiation

Br J Radiol. 2007 Sep; 80 Spec No 1: S2-6

Liu L, Li YP, Huang SQ, Lin JX, Zhang WX:

Mechanism of keratinocyte growth factor-2 accelerating corneal epithelial wound healing on rabbit alkali burned cornea

Zhonghua Yn Ke Za Zhi, 2005 Apr; 41(4): 364-8

Mansbridge JN, Hanawalt PC:

Role of transforming growth factor beta in the maturation of human epidermal keratinocytes

J Invest Dermatol 1988,90(3):336-341

Mansbridge JN, Knapp AM:

The binding of Helix pomatia and Ulex europeus agglutinins to normal and psoriatic epidermis

J Invest Dermatol 1984a, 82(2): 170-175

Mansbridge JN, Knapp AM:

Changes in keratinocyte maturation during wound healing

J Invest Dermatol 1987, 253-263

Mignotte B, Vayssiere, JL:

Mitochondria and apoptosis.

Eur J Biochem. 1998, 252, 1-15

Möller M, Wink M :  
Characteristics of Apoptosis Induction by the Alkaloid Emetine in Human Tumor  
Cell Lines  
Planta Med. 2007

Muppidi J, Porter M, Siegel RM:  
Measurement of apoptosis and other forms of cell death  
Curr Protoc Immunol. 2004,3: 3.17

Murakawa M, Yonehara S :  
Apoptosis induced by death receptors  
Experimental Medicine 2001, 19(13): 1690-1694

Murphy D, Smoller B, Gottlieb AB, Hsu A, Carter DM, Krüger JG:  
Chronic, nonhealing skin ulcers display a growth-activated epidermis (regenerative  
maturation) high level TGF-alpha and EGF-receptor expression (abstract)  
J Invest Dermatol 1990, 94: 557

Nagata M, Takenaka H, Shibagaki R, Kishimoto S:  
Apoptosis and p 53 protein expression increase in the process of burn wound  
healing in guinea-pig skin  
Br J Dermatol. 1999 May; 140(5): 829-38

Nanney LB, Müller SG, Büno R, Peiper SC, Richmond A:  
Distributions of melanoma growth stimulatory activity or growth-regulated gene and  
interleukin-8 receptor B in human wound repair  
Am J Pathol 1995, 147: 1248-1260

Ouhtit A, Muller K, Davis D, Ullrich S, McConkey D, Ananthaswamy H:  
Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-  
irradiated mouse skin  
Am J Pathol 2000; 156: 201-207

Paquet P, Pierard GE :  
Soluble fractions of tumor necrosis factor-alpha, interleukin- 6 and of their  
receptors in toxic epidermal necrolysis:a comparison with second-degree burns  
Int J Mol Med 1998, 459-62

Pepper, C, Thomas, A, Tucker, H, Hoy, T, Bentley, P:  
Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in  
vitro apoptosis  
Leuk Res. 1998, 22, 439-44

Phanithi PB, Yoshida Y, Santana A, Su M, Kawamura S, Yasui N:  
Mild hypothermia mitigates neuronal death following focal cerebral ischemia in rat  
brain

Neuropathology 2000, 273-82

Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z:

Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis  
by mRNA phenotyping

Science 1988, 241(4866): 708-712

Rennekampff H-O, Hansbrough JF, Woods V Jr., Dore C, Kiessig V, Schröder J-M:  
Role of Melanoma growth stimulatory activity (MGSA/gro) on keratinocyte function  
in wound healing

Arch Dermatol Res 1997,289:204-212

Rennekampff H-O, Kehlenbeck S, Berger A, Schaller HE:

Failure of keratinocyte migration in chronic wounds is not due to different matrix  
and integrin expression

Poster mit publiziertem Abstract auf dem Eighth Annual Meeting of the European  
Tissue Repair Society. Copenhagen, Dänemark, 27.-30. August 1998

Riede U-N, Wiestler OD, Müller HJ:

Regeneration - Allgemeine und spezielle Pathologie

4. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1995, 58-60

Rogalinska, M:

Alterations in cell nuclei during apoptosis.

Cell Mol Biol Lett. 2002, 7, 995-1018

Roujeau JC, Gelard K, Benussan A:

Epidermal necrolysis : mechanisms of keratinocyte apoptosis

Med Sci, 2006 Feb; 22(2): 188-91

Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE: Kalinin:

An epitheliumspecific basement membrane adhesion molecule that is a component  
of anchoring filaments

J Cell Biol 1991, 114(3): 567-576

Ruoslahti E:

Integrins

J Clin Invest 1991, 87(1): 1-5

Ruoslahti E, Pierschbacher MD:

New perspective in cell adhesion: RGD and integrins

Science 1987, 238: 491-49

Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA:  
Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury  
Oncogene 1998, 17,3341-9

Schwartz D, Rotter V:  
P53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress  
Semin Cancer Biol. 1998; 8(5):325-36

Shim J, Lee H, Park J:  
A non-enzymatic p 21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases  
Nature 1996; 381: 804-807

Soroka Y, Ma'or Z, Leshem Y, Verochovsky L, Neuman R, Brégégère FM, Milner Y:  
Aged keratinocyte phenotyping: morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals  
Exp Gerontol. 2008 Oct;43(10):947-57

Torres M, Al-Buhairi M, Alsbeih G:  
Induction of p 53 and p 21 proteins by gamma radiation in skin fibroblasts derived from breast cancer patients  
Int J Radiat Oncol Biol Phys., 2004 Feb 1; 58(2): 479-84

Varedi M, Chinery R, Greeley GH Jr, Herndon DN, Englander EW:  
Thermal injury effects on intestinal crypt cell proliferation and death are cell position dependent  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.2001:G157-63

Viard I, Wehrli P, Bullani R, Schneider P, Holler N, Salomon D, Hunziker T, Saurat JH, Tschopp J, French LE:  
Inhibition of Toxic Epidermal Necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin  
Science, Oct 1998, Vol. 282, 5388: 490-493

Wang LS, Yu LJ, Shao XM:  
Mild hypothermia attenuates neuronal apoptosis after cerebral hypoxia-ischemia in neuronal rats  
Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2007 Feb; 9(1):37-41

Weisfelner ME, Gottlieb AB:  
The role of apoptosis in human epidermal keratinocytes  
J Drugs Dermatol. 2003 Aug; 2(4): 385-91

Winkeltau G, Schumpelick V:  
Wunde, Wundheilung und Wundbehandlung  
Chirurgie. 4. Aufl. Enke, Stuttgart 1999, 37

Winter GD:  
Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the  
skin of the young domestic pig  
J Wound Care 1995, 4 (8): 366-367; discussion 368-371

Yan SD, Huang CC:  
Tumor necrosis factor alpha in middle ear cholesteatoma and its effects on  
keratinocytes in vitro  
Ann Otol Rhinol Laryngol., 1991 Feb; 100(2): 157-61

Zeng YX, El-Deiry WS:  
Regulation of p 21 expression by p 53-independent pathways  
Oncogene 1996; 12: 1557-1564

Zhang H, Sun XF, Synnerstad I, Rosdahl I:  
Importance of FAS-1377, FAS-670, and FASL-844 polymorphisms in tumor onset,  
progression, and pigment phenotypes of Swedish patients with melanoma: a case-  
control analysis  
Cancer J., 2007 Jul-Aug; 13(4): 233-7

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der epithelialen sowie der bindegewebigen Hautschichten.....	8
Abbildung 2:	Apoptoseschema.....	16
Abbildung 3:	Schematische Darstellung pathophysiologischer Reaktionen und komplexer systemischer Effekte eines schweren Verbrennungstraumas.....	19
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Schweregrade der Hautverbrennung.....	21
Abbildung 5:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 8. Tag nach der Verbrennung, HE-Färbung.....	32
Abbildung 6:	Gesunde Haut, Ki 67-Antikörper.....	33
Abbildung 7:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 9. Tag nach der Verbrennung, Ki 67-Antikörper.....	34
Abbildung 8:	Verhältnis von Mitoseindex zum Wundalter bei Verbrennungswunden, die mit Ki 67 angefärbt wurden.....	34
Abbildung 9:	Gesunde Haut, TUNEL.....	35
Abbildung 10:	Negativkontrolle, TUNEL.....	35
Abbildung 11:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 1. Tag nach der Verbrennung, TUNEL.....	36
Abbildung 12:	Verhältnis von Apoptoseindex zum Wundalter bei Verbrennungswunden, die mit TUNEL angefärbt wurden.....	37

Abbildung 13:	Gesunde Haut, Caspase 3.....	38
Abbildung 14:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut,7. Tag nach der Verbrennung, Caspase 3.....	39
Abbildung 15:	Lymphknotenpräparat, Positivkontrolle, Caspase 8.....	40
Abbildung 16:	Lymphknotenpräparat, Negativkontrolle, ohne Caspase 8.....	41
Abbildung 17:	Gesunde Haut, Caspase 8.....	41
Abbildung 18:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 2. Tag nach der Verbrennung, Caspase 8.....	42
Abbildung 19:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 7.Tag nach der Verbrennung, Caspase 9.....	43
Abbildung 20:	Cervixdysplasie-Präparat, Positivkontrolle, mit p 16.....	44
Abbildung 21:	Gesunde Haut, p 16.....	45
Abbildung 22:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 7.Tag nach der Verbrennung, p 16.....	45
Abbildung 23:	Plattenepithelcarcinom-Präparat, Positivkontrolle, mit p 53.....	46
Abbildung 24:	Plattenepithelcarcinom-Präparat, Negativkontrolle, ohne p 53.....	46
Abbildung 25:	Gesunde Haut, p 53.....	47
Abbildung 26:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 12. Tag nach der Verbrennung, p53.....	47

Abbildung 27:	Psoriasis-Präparat, Positivkontrolle, mit TNF-R1.....	48
Abbildung 28:	Psoriasis-Präparat, Negativkontrolle, ohne TNF-R1.....	48
Abbildung 29:	Gesunde Haut, TNF-R1.....	49
Abbildung 30:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 2. Tag nach der Verbrennung, TNF-R1.....	50
Abbildung 31:	TEN-Präparat, Positivkontrolle, mit FAS.....	51
Abbildung 32:	TEN-Präparat, Negativkontrolle, ohne FAS.....	51
Abbildung 33:	Gesunde Haut, FAS.....	52
Abbildung 34:	Tangential exzidierte, tief zweit- bis drittgradig verbrannte Haut, 8. Tag nach der Verbrennung, FAS.....	53



## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Familienname	Mertz
Vornamen	Indra Natalie
Geboren am/in	14.12.1978/Stuttgart
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig
Religion	Katholisch
Sprachkenntnisse	Englisch, Französisch

### Arbeitsverhältnisse

Seit November 2010	Assistenzärztin am Martin-Luther-Krankenhaus Berlin (Plastische Chirurgie)
Juli 2010 – Oktober 2010	Assistenzärztin am St. Joseph-Hospital Bremerhaven (Plastische Chirurgie)
September 2009 – Juni 2010	Assistenzärztin an der Berufsgen. Unfallklinik Hamburg (Hand-, Plast., Rek. und Mikrochirurgie)
Mai 2007 – August 2009	Assistenzärztin an der Orth. Klinik Markgröningen (Hand- u. Plast. Chirurgie)
Dezember 2004 – April 2007	Assistenzärztin an der Bodenseeklinik Lindau (Ästhetische Chirurgie)

### Studium

1998-1999	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
1999-2004	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

### Studienweg

August 2000	Ärztliche Vorprüfung (Physikum) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September/Oktober 2000	2-monatige Famulatur auf der Station der Plastischen Chirurgie am Marienhospital in Stuttgart (Prof. Gubisch / Prof. Greulich / Prof. Wangerin)
August 2001	Erstes Staatsexamen an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September/Oktober 2001	2-monatige Famulatur an der Bodenseeklinik in Lindau (Prof. Mang)
August 2003	Zweites Staatsexamen an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Oktober 2003 – September 2004	Praktisches Jahr am Marienhospital in Stuttgart (Innere Medizin / Chirurgie / Plastische Chirurgie)
09. November 2004	Drittes Staatsexamen an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Note: 1,0)

### Schulische Ausbildung

1985-1989	Grundschule in Stuttgart
1989-1998	Ferdinand-Porsche-Gymnasium in Stuttgart
1998	Abitur (Note: 1,4)

