



Abbildung 2: Auswirkung von Cox-2 induziertem PGE2 auf die Tumorentstehung durch Induktion der Proliferation über den Ras-„mitogen-activated-protein“-Kinaseweg, durch Induktion der Angiogenese über eine Stimulierung des „vascular endothelial growth factor und durch Hemmung der Apoptose über eine Aktivierung von antiapoptischen Proteinen, wie Bcl-2 und „nuclear factor-κB.

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Studienpopulation

20 männliche Patienten wurden in einem Zeitraum von Oktober 2005 bis Oktober 2006 in die Studie eingebunden. Alle 20 Teilnehmer wiesen einen Fitzpatrick-Lichttyp I bis III auf. Sämtliche Teilnehmer zeigten mindestens drei typische, sichtbare und histologisch gesicherte aktinische Keratosen in einem 50 cm² großen Beobachtungsareal, welches wahlweise an der Stirn, im Gesicht oder an der Kopfhaut vorher festgelegt wurde.

Vor Beginn der Behandlung mit Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure wurde eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Hierbei wurden die Vitalparameter Blutdruck, Puls und Temperatur bestimmt. In der Anamnese wurden Allergien, Hauttyp, Lebensstil und vorherige Behandlungen der aktinischen Keratosen und Begleitmedikationen erfasst.

Ausschlusskriterien für diese Studie waren die folgenden:

- Systemische Behandlung mit Interferon, immunsuppressiver oder zytotoxischer Therapie, Behandlung mit oralen, topischen, inhalativen oder systemischen Kortikosteroiden, nicht-steroidalen-anti-inflammatorischen Medikamenten oder Retinoiden und deren Derivaten innerhalb der letzten zwei Wochen sowie Behandlung mit Medikamenten, die noch in der Testungsphase sind, innerhalb der letzten vier Wochen
- invasive Tumore innerhalb des Untersuchungsareals
- klinisch signifikante kardiovaskuläre, hämatologische, neurologische, renale, endokrine, kollagenös-vaskuläre oder gastrointestinale Fehlbildungen oder Erkrankungen
- dermatologische Erkrankungen im Untersuchungsareal, welche eine Untersuchung in diesem erschweren würden (z.B. Rosazea, Psoriasis, atopische Dermatitis und Ekzeme)
- bekannte Allergien gegen die Inhaltsstoffe der Studienmedikation
- die Benutzung von Sonnencreme innerhalb des Untersuchungsareals während der letzten 24 Stunden.

Alle Teilnehmer unterzeichneten die Patienteninformation zur Studie und zur Biopsieentnahme.

Dreizehn Patienten gaben in der Anamnese eine Vorbehandlung ihrer aktinischen Keratosen an. Diese beinhaltete unter anderem eine Behandlung mit topischem 5-Fluoruracil (n=3), Imiquimod (n=6), Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure (n=4) sowie mit photodynamischer Therapie (n=1) oder chirurgischer Exzision (n=1). Vierzehn Patienten nahmen regelmäßig Begleitmedikationen zu sich. Hierbei machten Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus Typ II und Hypercholesterinämie den Großteil der entsprechenden Begleiterkrankungen aus.

2.2 Diagnosestellung der aktinischen Keratosen

2.2.1. Klinische Kriterien aktinischer Keratosen

In der Gruppe der aktinischen Keratosen ließen sich der keratotische, der atrophische, der verruköse, der pigmentierte, der lichenoiden Typ sowie das Cornu cutaneum unterscheiden. Die aktinischen Keratosen präsentierten sich klinisch hierbei je nach Typ als raue und schuppige, rötlichbraun pigmentierte Maculae, Papulae oder Plaques. Die Größe variierte von einigen Millimetern bis hin zu zwei Zentimetern. Klinisch wurden die aktinischen Keratosen in drei Schweregrade eingeteilt. (8) Bei Grad I zeigten sich flache, rosafarbene Maculae im sonnengeschädigten Hautareal. Die Umgebung erschien fleckig, es ließ sich weder Rauheit noch Hyperkeratose nachweisen. Bei Grad II fanden sich rosafarbene bis rote Papulae oder Plaques mit rauher, hyperkeratotischer Oberfläche und variabler Induration. (Abbildung 3a) Grad III präsentierte sich mit schuppigen, entzündlich-erythematösen, infiltrierten Plaques auf sonnengeschädigter Haut und teilweise irregulär pigmentierter Oberfläche und Umgebung. (Abbildung 3b)



Abbildung 3a: Beispiel einer hypertrophen, aktinischen Keratose mit gelblicher, adhärenter Schuppung (Pfeil).



Abbildung 3b: Beispiel einer flächenhaften aktinischen Schädigung mit Darstellung zahlreicher hyperkeratotischer Papeln und Plaques (Pfeil). Inhomogene Pigmentierung der Umgebung als Ausdruck der chronischen UV-Schädigung.

2.2.2. Histologische Kriterien der aktinischen Keratose

Auch bei der histologischen Untersuchung erfolgte die Einteilung der aktinischen Keratosen nach vorher festgelegten histologischen Kriterien in drei Grade (8): Grad I war durch vereinzelte Atypien der basalen Keratinozyten im unteren Drittel der Epidermis charakterisiert. Grad II präsentierte sich durch vereinzelte Atypien in den unteren zwei Drittel der Epidermis, fokale Hyperkeratose sowie wechselnde Orthokeratose und Parakeratose. Bei Grad III zeigte sich eine diffuse Proliferation von atypischen Keratinozyten und Schichtungsverlust in der gesamten Epidermis sowie Parakeratose, Akanthose und Papillomatose.

2.3 Studienprotokoll

2.3.1 Studiendesign

Es handelte sich um eine randomisierte Cross-Over-Studie über 240 Tage mit 20 Patienten, die zufällig entweder der Behandlungsgruppe A oder der Behandlungsgruppe B zugeordnet wurden. (Tabelle 1)

	Gruppe A	Gruppe B
Screeningvisite Visite 1* Tag 0	Start der Behandlung	Beobachtung
Visite 2 Tag 90	Ende der Behandlung	Beobachtung
Visite 3* Tag 120	Wash-out	Start der Behandlung
Visite 4 Tag 210	Beobachtung	Ende der Behandlung
Visite 5* Tag 240	Beobachtung	Wash-out

Tabelle 1: Einteilung der Patienten in Gruppe A und Gruppe B; Behandlungsprotokoll; *= Biopsieentnahme

2.3.2 Behandlungsprotokoll

Die zehn Patienten der Gruppe A erhielten in den ersten 90 Tagen Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure. Hierauf folgten eine 30-tägige Washout- und eine 90-tägige Beobachtungsphase mit anschließendem 30-tägigem therapiefreiem Intervall.

Die zehn Patienten der Gruppe B begannen mit einer 90-tägigen Beobachtungsphase, auf die ein 30-tägiges therapiefreies Intervall folgte. Von Tag 121-210 erhielten die Teilnehmer der Gruppe B Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure. Die letzten 30 Tage dienten der Washout-Phase. Die Teilnehmer beider Gruppen wurden angeleitet, während der 90-tägigen Behandlungsphase 1 g des Studiengels zweimal täglich auf dem Beobachtungsareal aufzutragen. Zur Beobachtung und Untersuchung erschienen die Teilnehmer zu sechs Visiten in der Klinik (Tabelle 1). Bei jeder dieser Visiten wurden die Teilnehmer körperlich untersucht und die Vitalparameter bestimmt. An den Visiten 0, 3 und 5 wurden bei jedem Patienten jeweils 4 mm Punch-Biopsien aus dem Untersuchungsareal entnommen. Dies diente der histologischen Sicherung der Diagnose der aktinischen Keratose, der Bestätigung der klinischen Gradeinteilung und der Verlaufskontrolle sowie der immunhistologischen Untersuchung. Eine vierte Biopsie wurde während der Screening-Visite aus gesunder, sonnengeschützter Haut des Oberarms entnommen und diente als Vergleichsbiopsie. (Tabelle 1)

2.3.3 Klinisches Untersuchungsprotokoll

Bei der Screeninguntersuchung wurde das Behandlungsareal (Stirn, Gesicht oder Kopfhaut) bestimmt. In einem 5 cm x 10 cm großen Behandlungsareal sollten die Teilnehmer mindestens drei typische, sichtbare und histologisch bestätigte aktinische Keratosen aufweisen. Bei jeder Visite wurde das Beobachtungsareal unter standardisierten Bedingungen fotografiert. Die genaue Lokalisation, die Größe, die Anzahl von bestehenden und neu aufgetretenen Läsionen und die Schweregradeinteilung sowie die Ausbreitung der einzelnen Läsionen wurden auf einer Rasterfolie dokumentiert. Weiterhin wurden unerwünschte Ereignisse, lokale Hautreaktionen, die Hautbeschaffenheit sowie das kosmetische Ergebnis und die Gesamtbeurteilung des Untersuchungsareals in einem Patientenprotokoll bei jeder Visite dokumentiert. Das kosmetische Ergebnis wurde sowohl von dem Untersucher, als auch von dem Patienten selbst mit „sehr gut, gut, befriedigend oder mangelhaft“ bewertet. Die charakteristischen Merkmale der lokalen Hautreaktion, der Hautsymptome sowie der Hautbeschaffenheit wurde vor und nach der Behandlung mit „nicht vorhanden, mild, mäßig und stark“ bewertet und dokumentiert (Tabelle 2).

Lokale Hautreaktion:	Rötung, Schuppung, Exsudation, Bläschenbildung, Erosion/ Ulzeration, Verkrustung und Ödembildung
Subjektive Symptome:	Brennen, Schmerz und Juckreiz
Hautbeschaffenheit:	Hautoberfläche (schuppig, trocken, rau), Rhagaden, Narbenbildung, Atrophie, Hyperpigmentation, Hypopigmentation, inhomogene Pigmentierung

Tabelle 2: charakteristischer Merkmale der lokalen Hautreaktionen, der subjektiven Symptome sowie der Hautbeschaffenheit vor, während und nach Therapie.

2.4 Hautbiopsien

2.4.1 Routinehistologie

Zur histologische Untersuchung wurden die jeweils 4 mm dicken Stanzbiopsien der Haut zunächst für 24 Stunden in 4%-igem PBS-gepufferten (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) Formalin fixiert, durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus diesen Paraffinblöcken konnten dann 4 µm dünne Serienschritte angefertigt werden, die anschließend auf einen selbsthaftenden Objektträger aufgezogen wurden. Die Objektträger mit den Biopsien wurden über Nacht bei 56°C getrocknet. Für die Routinefärbung zur histologischen Sicherung wurden die Gewebeschnitte in Xylen deparaffiniert, durch absteigende Alkoholreihen für je fünf Minuten rehydriert und anschließend in PBS-Lösung gewaschen. Daraufhin folgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Standardvorschrift und schlussendlich die mikroskopische Untersuchung.

2.4.2 Immunhistochemische Untersuchungsparameter

Zur Beurteilung der Entzündung vor und nach der Behandlung im aktinisch geschädigten Areal wurden die jeweiligen Marker für die entzündungstypischen Proteine COX-2, CD3 und CD8 genutzt.

- COX-2 ist ein Induktor der Prostaglandinsynthese und hat darüber einen verstärkenden Einfluss auf die Entzündungsreaktion. (111)
- CD3 ist der T-Zell-Rezeptor, der von allen T-Lymphozyten exprimiert wird.
- CD8 ist ein Rezeptor, der von zytotoxischen T-Lymphozyten und Untergruppen der NK-Zellen exprimiert wird. (71)

Um die Apoptose- und Zellzyklusvorgänge im aktinisch geschädigten epithelialen Gewebe näher zu untersuchen, wurden die Biopsien mit einem Marker für die Proteine Granzyme B und p53 angefärbt.

- Granzyme B ist in den Granula CD8-positiver zytotoxischer Zellen enthalten und kann nach Aktivierung und Ausschüttung in die Zielzelle zur Apoptose führen. Granzyme B diente dem indirekten Nachweis von Apoptosevorgängen. (84)

- p53 ist ein Tumorsuppressorgen und bewirkt eine Induktion von Apoptosevorgängen. p53 diente dem direkten Nachweis von Apoptosevorgängen. (92, 98)

Um Zellzyklusvorgänge zu untersuchen, wurde ein Marker für das Protein p21 genutzt.

- p21 ist an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt, indem es nach Aktivierung durch p53 zu einem Zellzyklusstopp in geschädigten Zellen führen kann. (103-104)

Zur Bestimmung der Proliferationsrate in den aktinisch geschädigten Zellen wurde ein Marker für das Protein Ki67 genutzt.

- Ki67 wird von allen proliferierenden Zellen exprimiert. (71)

Um die Angiogeneseaktivität in den aktinisch geschädigten Arealen nachzuweisen, wurden die Biopsien mit einem Marker für das Protein CD31 angefärbt.

- CD31 ist das „platelet endothelial cell adhesion molecule“ (PECAM), welches auf Endothelzellen und Leukozytensubpopulationen exprimiert wird. Es diente der Einschätzung der Gefäßdichte. (73-74)

2.4.3 Immunhistochemische Färbung

Die in der Routinehistologie aufgearbeiteten Schnitte wurden einer weiteren immunhistochemischen Analyse zugeführt. Für die immunhistochemische Färbung wurden die LSAB2 System-HRP-Methoden (Dako) genutzt, basierend auf einer modifizierten „Labelled avidin-biotin“ (LAB) Technik. (69-70) Um die Antigene zu bestimmen, wurden die Biopsieschnitte in einem 10 mmol Citratpuffer (pH 6,0) inkubiert. Daraufhin wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch 15-minütige Inkubation in 1%-iger Wasserstoffperoxydlösung blockiert. Die Schnitte wurden mit 1,5%-igem normalem Serum für 20 Minuten vorinkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren.

Nach dem Entfernen des Serums wurden die primären Antikörper für COX-2 (Verdünnung 1:700), CD3 (Verdünnung 1:300), CD8 (Verdünnung 1:200), Granzyme B (Verdünnung 1:100), p53 (Verdünnung 1:200), p21 (Verdünnung 1:100), Ki67 (Verdünnung 1:300) und CD31 (Verdünnung 1:50) hinzugefügt. Alle Antikörper wurden von Dako (Hamburg, Deutschland) bereitgestellt. Als zweiter Antikörper wurden biotinylierte Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-Immunglobuline für 30 Minuten hinzugefügt,

gefolgt von einem dreizeitigen Auswaschvorgang mit Wasser und einem einzeitigen Auswaschvorgang mit Trispufferlösung (pH 7,4). Danach erfolgte die Zugabe von Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase in Pufferlösung und jeder Objektträger wurde 30 Minuten inkubiert, gefolgt von einem mehrzeitigen Auswaschvorgang. Der Antigennachweis erfolgte durch siebenminütiges Hinzufügen von 150 µl Fuchsinrot und nachträglicher dreizeitiger Auswaschung mit Wasser. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hemalumlösung für zwei Minuten und sofortiger Inkubation in 37°C warmen Wasser für fünf Minuten. Nachfolgend wurden die Schnitte durch aufsteigende Alkoholreihen dehydriert und in 99%-igem Xylol gereinigt. Das Expressionsverhalten der einzelnen Markerproteine wurde entsprechend in den Biopsien vor und nach der Behandlung untersucht und mit dem Expressionsmuster der Biopsie aus gesunder Haut verglichen.

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 15.0 für Windows unter Verwendung des Wilcoxon-Testes für verbundene Stichproben und des Mann-Whitney-U-Testes für unverbundene Stichproben. Als Signifikanz- bzw. Fehlerniveau wurde $\alpha = 0,05$ angenommen, d.h., dass für alle Signifikanzen $p < 0,05$ die entsprechende Hypothese abgelehnt werden kann. Alle angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwerte bzw. Standardabweichungen (SA).