

## **2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Klinische Studie: Dusch-PUVA vs. Berliner Schema bei Psoriasis vulgaris**

Im Zeitraum von Oktober 1998 bis August 2000 wurden 50 ambulante sowie stationäre Patienten mit Psoriasis vulgaris der Klinik und Poliklinik für Dermatologie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin in eine randomisierte, prospektive Studie eingeschlossen und anhand eines standardisierten Dokumentationsbogens erfasst.

#### 2.1.1. Patientenkollektive

Über eine Teilnahme an der Studie entschieden folgende Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien:

- Manifeste Psoriasis vulgaris (Plaque- und Guttata-Typ)
- Alter zwischen 18 und 75 Jahren
- Teilnahme sowohl von Männern als auch von Frauen möglich

Ausschlusskriterien:

- Photoallergische und photoinduzierbare Dermatosen
- Photosensibilisierende Medikamente (relative Kontraindikation)
- Spinozelluläre Karzinome der Haut
- Schwangerschaft und Stillzeit
- Herz-Kreislauf-Erkrankungen
- Systemische Psoriasis-therapie mit immunmodulierenden Medikamenten (musste mindestens 4 Wochen vor Studienbeginn abgesetzt sein)
- Alter unter 18 und über 75 Jahren

Die Ein- und Ausschlusskriterien wurden für jeden Patienten anhand der Anamnese und des klinischen Befundes überprüft. Miterfasst wurden für jeden Patienten das Vorhandensein von Pruritus, Nagelveränderungen, Arthropathien und Lichtempfindlichkeit.

Mittels entsprechender Laboruntersuchungen (BSG, AST, HIV-Serologie), Stuhl- und Harnuntersuchungen sowie bei entsprechendem Verdacht auch Röntgenuntersuchungen (OPTG, NNH, Thorax) wurde eine infektiöse Fokussuche durchgeführt.

Die Patienten wurden randomisiert und entweder dem Dusch-PUVA-Schema unter Einsatz von TMP oder dem klassischen Berliner Schema ( LCD plus SUP plus Dithranol) zugeordnet.

#### 2.1.2. Evaluierung anhand des Psoriasis Area and Severity Index (PASI)

Zur Beurteilung der Schwere und der Ausdehnung der Psoriasis vulgaris wurden verschiedene „Scores“ weltweit erarbeitet und beschrieben: der *Body Surface Area* (BSA), der *Psoriasis Disability Index* (PDI), der *Self Administrated Psoriasis Area and Severity Index* (SAPASI) und der *Dermatology Index of Disease Severity* (DIDS), um nur einige zu nennen (Stern et al., 1986; Finlay et al., 1990; Feldman et al., 1996; Faust et al., 1997).

Wir haben uns in dieser Arbeit für den *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI) entschieden, der erstmalig 1978 von Fredriksson und Petersson im Rahmen von Studien über die Wirkung von systemischen Retinoiden in der Psoriasisbehandlung eingeführt wurde. Trotz bekannter Mängel, insbesondere der geringen Sensitivität, findet dieser in zahlreichen Studien zu Antipsoriatika als Erfolgskontrolle vor und nach Therapie weltweit Anwendung (Fredriksson & Petersson, 1978; Gollnick et al., 1988; Collins & Rogers, 1992; Kristensen et al., 1995; Molin et al., 1997; Ruzicka & Lorenz, 1998; Ashcroft et al., 1999).

Der PASI erfasst neben der Ausdehnung des Hautbefundes (A), Schuppung (D), Erythem (E) und Infiltration (I) der psoriatischen Plaques. Die vier Hauptkörperteile werden wie folgt erfasst: Kopf (*head*) entsprechend 10% der Körperoberfläche (KOF), Stamm (*trunk*) entsprechend 30% der KOF, obere Extremitäten (*arms*) entsprechend 20% der KOF und

untere Extremitäten (*legs*) entsprechend 40% der KOF. Die Ausdehnung des Hautbefundes (A) wird wie folgt beurteilt: < 10%: 1; 10-29%: 2; 30-49%: 3; 50-69%: 4; 70-89%: 5; 90-100%: 6. Die Beurteilung der jeweiligen Kriterien d. h. Schuppung, Erythem und Infiltration wird in einem Score von 0 bis 3 (fehlt: 0; mild: 1; mäßig: 2; schwer: 3) festgelegt.

Der PASI variiert in 0,1 Einheiten, von 0,0 bis 72,0, entsprechend 0,0 für fehlende psoriatische Plaques (Normalbefund) bis 72,0 für komplette psoriatische Erythrodermie (Maximalbefund). Der PASI wurde bei den Patienten durch eine klinische Untersuchung des gesamten Integumentes jeweils vor Therapiebeginn sowie 3 Wochen und 6 Wochen nach Therapiebeginn ermittelt.

Der PASI ergibt sich aus:

$$\begin{aligned} \text{PASI} = & 0,1 (E + I + D)_{\text{head}} \times A_{\text{head}} \\ & + 0,2 (E + I + D)_{\text{arms}} \times A_{\text{arms}} \\ & + 0,3 (E + I + D)_{\text{trunk}} \times A_{\text{trunk}} \\ & + 0,4 (E + I + D)_{\text{legs}} \times A_{\text{legs}} \end{aligned}$$

|            |   |   |         |
|------------|---|---|---------|
| A = Areal: | ⇒ | 1 | < 10%   |
|            |   | 2 | 10-29%  |
|            |   | 3 | 30-49%  |
|            |   | 4 | 50-69%  |
|            |   | 5 | 70-89%  |
|            |   | 6 | 90-100% |

|                  |   |   |        |
|------------------|---|---|--------|
| D = Desquamation | ⇒ | 0 | fehlt  |
| E = Erythem      |   | 1 | mild   |
| I = Infiltration |   | 2 | mäßig  |
|                  |   | 3 | schwer |

### 2.1.3. Durchführung der Dusch-PUVA

**Technische Ausstattung.** Als Psoralen wurde 4,5',8-Trimethylpsoralen (Synonym Trioxsalen) (TMP, Tripsor<sup>®</sup> 0,5 mg/ml in alkoholischer Lösung, Fa. Orion OTC, Esbo, Finnland) in einer Konzentration von 0,27 mg/l Duschwasser verwendet.

Die Dusch-PUVA erfolgte in einem geschlossenen, rezirkulierendem Dusch-System (*Balneoplus*<sup>®</sup>, Fa. Saalman, Herford, Deutschland). Das Wasser kommt aus seitlichen Düsen, wobei der Kopf des Patienten ausgespart bleibt. Durch ein Heizsystem und eine Schaltuhr werden die Duschtemperatur konstant auf 37°C und die Duschzeit auf 5 min reguliert. Zur Bestimmung der minimalen phototoxischen Dosis (MPD) wurde ein Polychromator (*Waldmann PUVA 800*, Fa. Waldmann, Villingen-Schwenigen, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 315-400 nm verwendet. Die UVA-Ganzkörperbestrahlung erfolgt in der *Waldmann-Kabine UV 7001 K* mit einer Wellenlänge von 315-400 nm (Max. 365 nm).

**Ablauf der Dusch-PUVA.** Die *Dusch-PUVA* ist ein Hydrophototherapieverfahren, bei dem der Patient in einem geschlossenen Duschsystem mit TMP-haltigem Wasser duscht und anschliessend einer UVA-Bestrahlung ausgesetzt wird. Der Patient duscht unbekleidet unter Aussparung des Kopfes und ohne zuvor Externa angewandt zu haben. Die Duschzeit beträgt 5 Minuten bei einer Wassertemperatur von 37°C. Die TMP-Konzentration beträgt 0,27 mg/l Wasser. Nach dem Duschen trocknet sich der Patient mit einem Handtuch vorsichtig ab und vermeidet dabei stärkere Reibung.

Vor Therapiebeginn wird die *minimale phototoxische Dosis* (MPD) ermittelt indem nach dem oben beschriebenen Duschverfahren, UVA in 5 verschiedenen Dosierungen auf einem zuvor gekennzeichneten, unpigmentierten Hautareal am Gesäß appliziert wird. Die Dosierungen erfolgen mit 0,06-0,125-0,25-0,375-0,5 J/cm<sup>2</sup> für Hauttyp I und II bzw. 0,25-0,375-0,5-0,625-0,75 J/cm<sup>2</sup> für Hauttyp III und IV. Nach 72 Stunden wird die Entstehung eines Erythems für die jeweilige Dosis beurteilt und wie in Tab. 3 dargestellt dokumentiert.

Die MPD entspricht der niedrigsten UVA-Dosis, welche nach 72 Stunden ein Erythem erzeugt hat.

|      |  |
|------|--|
| +/-  | gerade noch erkennbare erythematische Verfärbung           |
| +    | hellrosa, inhomogen  |
| +/+  | hellrosa, homogen  |
| ++   | deutlich rot, kein Ödem                                    |
| +++  | feuerrot, Ödem, Schmerzhaftigkeit                          |
| ++++ | violett, starkes Ödem, eventuell Blasen, Schmerzhaftigkeit |

**Tab. 3:** Beurteilung der ermittelten MPD

Nach Ermittlung der MPD folgt die Einleitung der Dusch-PUVA-Therapie. Der Patient duscht wie oben beschrieben und wird im Anschluß mit einer initialen UVA-Dosis entsprechend 30-50% der zuvor ermittelten MPD bestrahlt mit anschließender Steigerung der Dosis um 0,125- 0,25 J/cm<sup>2</sup> nach jeder 2. Sitzung. Die Behandlung erfolgt 4x pro Woche mit jeweils einem Tag Pause nach 2 aufeinanderfolgenden Behandlungstagen (z. B. Montag-Dienstag-Donnerstag-Freitag).

#### 2.1.4. Durchführung des Berliner Schemas

In der Dermatologischen Klinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin hat sich seit Jahren das klassische *Berliner Schema* als Routinebehandlung stationärer Patienten mit Psoriasis vulgaris bewährt. Es besteht aus der 3-fach-Kombinationstherapie mit Liquor carbonis detergens (LCD), selektiver UVB-Phototherapie (SUP) und Dithranol (in Vaseline).

Dem Patienten wird abends LCD 10% auf alle betroffenen Hautareale appliziert. Am nächsten Morgen wird das gesamte Integument mit SUP-Phototherapie, Wellenlänge 300-320 nm (*Saalmann- Universal-Kabine Typ ES I*) bestrahlt und anschliessend Dithranol streng auf die psoriatischen Plaques aufgetragen, um Reizungen der nicht-psoriatischen Haut zu vermeiden.

Die SUP-Bestrahlung erfolgt je nach Hauttyp (nach Fitzpatrick) bzw. nach Durchführung einer UVB-Lichttreppe. Bei Hauttyp I wird mit 15 mJ/cm<sup>2</sup>, ab Hauttyp II mit 30 mJ/cm<sup>2</sup>

begonnen. Die Dosis wird jeweils um die Anfangsdosis nach jeder 2. Sitzung bis zu einer Maximaldosis von 225 mJ/cm<sup>2</sup> gesteigert.

Dithranol wird in aufsteigenden Konzentrationen von 1/32%-1/16%-1/8%-1/4%-1/2%-1%-2% in Vaseline zubereitet. Es wird je nach Hauttyp mit einer niedrigen Dosierung begonnen bis eine leichte Reizung der periläsionalen gesunden Haut auftritt. Ist dies der Fall, wird die Konzentrationsstufe beibehalten und die Behandlung fortgesetzt. Andernfalls wird die Konzentration stufenweise wie oben beschrieben gesteigert. Die Steigerungsintervalle sollen jeweils mindestens 3-5 Tage betragen, auch wenn keine Reizung der Haut auftritt. Ist hingegen die Reizung stark und für den Patienten nicht tolerabel, so wird die Behandlung mit einer niedrigeren Konzentrationsstufe fortgeführt. Dieses Behandlungsschema erfolgt an den Tagen der Phototherapie (in der Regel Montag, Dienstag, Mittwoch, Donnerstag, Freitag). An den übrigen Tagen erfolgt eine Lokaltherapie mit Dithranol und Salicylvaseline 10% im Wechsel.

Die Nachuntersuchungen der Patienten mit erneuter Bestimmung des PASI erfolgten für beide Behandlungsgruppen jeweils 3 Wochen und 6 Wochen nach Therapiebeginn.

#### 2.1.5. Statistische Methoden

Die statistischen Analysen mit Ermittlung der Signifikanz anhand des p-Wertes wurden mittels t-Test-Verfahren durchgeführt (ANOVA) und ausgewertet.

## **2.2. Experimentelle Studie: Nachweis von TMP in psoriatischen Hautschuppen**

### 2.2.1. Gewinnung von Hautschuppen

Es wurden Hautschuppen von 21 Patienten mit Psoriasis vulgaris nach dem Duschen mit TMP-haltigem Wasser in dem Balneoplus-Duschsystem mittels eines Holzspatels durch Abkratzen gewonnen. Diese wurden in einem mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Röhrchen gesammelt, zentrifugiert (Upm 1000) und bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren (-30°C). Die Abnahme der Hautschuppen erfolgte in der Regel an Effloreszenzen am lateralen Stamm. Die Patienten hatten vor der Schuppenentnahme keine Externa auf die Haut aufgetragen.

### 2.2.2. TMP-Nachweis

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Substanzen waren:

- Tripsor<sup>®</sup> (4,5',8-Trimethylpsoralen, TMP) in einer Lösung von 0,5 mg/ml (Fa. Orion OTC, Esbo, Finnland)
- Meladinine (8-Methoxypsoralen) in einer 0,3%igen Lösung (Fa. Galderma Laboratorium, Freiburg, Deutschland)

**TMP-Extraktion.** Die Erstbeschreibungen der Extraktion von 8-MOP aus Zellen erfolgten 1977 durch Puglisi bzw. TMP 1982 durch Chakrabarti (Puglisi et al., 1977; Chakrabarti et al., 1982). Für unsere Arbeit war es notwendig, die beschriebenen Methoden unseren Anforderungen entsprechend zu adaptieren.

Die Hautproben mit einem Mindestgewicht von 5 mg wurden in 2 ml Eppendorf-Röhrchen gesammelt. 500 µl einer 1M Natrium Borat-Puffer-Lösung (pH 9.0) wurden zur Extraktion des TMP aus den Schuppen einer 8 µg/ml 8-MOP-Lösung als interner Standard zugegeben. Der interne Standard wurde benötigt zur Erstellung einer Standardkurve für die spätere Quantifizierung und zur Registrierung von Verlusten, welche durch Pipettieren, Schütteln etc. entstehen können. Die Proben wurden aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Substanzen unter Lichtschutz 30 min geschüttelt. Danach wurden die Proben tiefgefroren (-30°C) und zweimal aufgetaut, um durch mechanische Zerstörung der Schuppen eine weitere Ablösung des TMP zu bewirken. Die

abschliessende Extraktion von TMP aus den Schuppen erfolgte mit 1 ml einer n-Hexan-Isopropanol-Lösung (im Verhältnis 95:5) unter Schütteln (220 Upm) über 6 h, ebenfalls unter Lichtschutz. Die organische Phase wurde durch Zentrifugieren (1000 Upm) getrennt. Die wässrige Phase wurde wie oben beschrieben erneut extrahiert. Beide organischen Phasen wurden zusammen unter Vakuum vollständig eingedampft. Kurz vor der HPLC-Analyse wurden 200 µl reines Ethanol den trockenen Proben zugefügt und über 10 min vermischt, um das TMP zu lösen.

**HPLC-Analyse.** Aliquots von 50-100 µl wurden in die HPLC-Säule eingespritzt. Die mobile Phase bestand aus 64,96%igem Methanol. Diese Konzentration wurde gewählt, da es sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass es bei diesem Gradienten zu einer optimalen Trennung von TMP und 8-MOP und somit zu einer optimalen Differenzierung der Peaks beider Substanzen kommt. Die mobile Phase wurde vor dem Gebrauch in der HPLC zur Eliminierung von festen Bestandteilen mit dem HPLC-Vakuumfiltersystem gefiltert sowie entgast, da Blasen Verfälschungen der Messergebnisse sowie Schädigungen der Säulen zur Folge haben können. Für die Messungen wurden jeweils 50-100 µl der Aliquots mittels einer speziellen HPLC-Injektionsspritze in das Einspritzventil der Gradientenpumpe injiziert. Zwischen Einspritzventil und Trennsäule befand sich eine vorgeschaltete Probenschleife mit einer Kapazität bis 250 µl. Die Injektion der vollständig gelösten Proben durch das Einspritzventil in die Säule erfolgte rasch, wodurch das Einspritzen von Luft in die Säule vermieden wurde. Als Trennsäulen dienten folgende HPLC-Trennsäulen: Silikagel mit C18-Ketten modifiziert, endcapped, mit einer Porengröße von 100 Å und einer Korngröße von 5 µm (Hypersil ODS, Knauer GmbH). Die mobile Phase mit den eluierten Substanzen wurde nach Verlassen der Trennsäule dem Detektor zugeführt, der die Verteilungsfunktion der im Eluat gelösten Komponenten registrierte. Der Gehalt an TMP wurde anhand der Absorption bei 246 nm mit Hilfe eines Durchflußphotometers mit variablem Wellenlängenbereich gemessen. Die vom Detektor registrierten Impulse wurden einem Integralschreiber übermittelt, der diese als Chromatogramm aufzeichnete. Die Signale, sogenannte Peaks, von TMP und 8-MOP gaben Auskunft über Qualität sowie Quantität der Proben. Die Retentionszeit einer Komponente, d. h. vom Injizieren einer Probe bis zum Erscheinen des maximalen Signals auf dem Schreiber, ist unter gleichen

Bedingungen (Trennsäule, Zusammensetzung und Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, Probengröße, Temperatur) gleich groß. Zur qualitativen Identifizierung eines Peaks wurden die Reinsubstanzen injiziert und die Retentionszeiten verglichen. Die quantitative Bestimmung erfolgte nach der Anfertigung von Eichkurven von verschiedenen TMP- und 8-MOP-Lösungen mit bekannter Konzentration über die Messung der Peakfläche, welche proportional zur injizierten Substanzmenge war.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Dusch-PUVA vs. Berliner Schema

##### 3.1.1. Patientenkollektive

**Patienten.** 50 Patienten mit Psoriasis vulgaris wurden in die Studie aufgenommen (39 Männer, 11 Frauen). Das Hauptmanifestationsalter lag zwischen 40 und 49 Jahren (Median 47,5 J.). Die durchschnittliche Bestandsdauer der Psoriasis lag bei 15 Jahren (½ J.-50 J.). Durch Randomisierung wurden die Patienten entweder der Dusch-PUVA-(DP)-Gruppe oder der Berliner-Schema-(BS)-Gruppe zugeordnet.

Die gleichmäßige Alters- und Geschlechtsverteilung in beiden Gruppen wurde statistisch überprüft (Altersverteilung: two-tailed unpaired t-Test,  $p=0,112$ ; Geschlechtsverteilung: two-tailed unpaired t-Test,  $p=0,191$ ) (siehe Abb.4 und 5).

Das Patientenprofil betreffend Alter, Geschlecht, Psoriasisstyp und Nebenfunden ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Die meisten Patienten hatten in der Vergangenheit lokale und /oder systemische antipsoriatische Behandlungen erfahren: mit Steroiden (21 Patienten), Teer (11 Patienten), Dithranol (14 Patienten), Calcipotriol (9 Patienten), UVB (28 Patienten), Bade-PUVA (2 Patienten), systemischer PUVA (2 Patienten), oralen Retinoiden (5 Patienten), Methotrexat (2 Patienten), Fumarsäure (1 Patient), Mycophenolatmofetil (1 Patient) und Ciclosporin A (1 Patient).