

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Non-invasives Monitoring der aktinischen feldkanzerisierten Haut unter der  
Behandlung mit 3.0% Diclofenac in 2.5% Hyaluronsäure mit Hilfe der  
Reflektanz konfokalen Laserscanmikroskopie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alicia Katharina Siebold

aus Vechta

Datum der Promotion: 25.06.2017

Abstract - Deutsch .....	4
Abstract - Englisch .....	6
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Aktinische Keratose</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.1 Definition und Epidemiologie</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.2 Risikofaktoren</b> .....	<b>9</b>
1.1.2.1 Photokarzinogenese .....	9
1.1.2.2 Weitere Risikofaktoren .....	11
<b>1.1.3 Diagnostik</b> .....	<b>13</b>
1.1.3.1 Klinische Merkmale .....	13
1.1.3.2 Histologie .....	15
1.1.3.3 Differentialdiagnosen .....	17
<b>1.1.4 Therapie</b> .....	<b>18</b>
1.1.4.1 Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure .....	19
<b>1.2 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie</b> .....	<b>28</b>
<b>1.2.1 Definition und historische Entwicklung</b> .....	<b>28</b>
<b>1.2.2 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie der gesunden Haut</b> .....	<b>29</b>
<b>1.2.3 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie der aktinischen Keratosen und der periläsionalen subklinischen Haut</b> .....	<b>32</b>
<b>1.2.4 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie der aktinischen Keratosen und der periläsionalen subklinischen Haut unter der Behandlung mit Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure</b> .....	<b>34</b>
<b>1.3 Fragestellung und Kernziel</b> .....	<b>34</b>
<b>2. Patienten und Methoden</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1 Studienpopulation</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.1 Grundprinzip</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.2 Technischer Aufbau</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2.3 Software</b> .....	<b>41</b>
<b>2.3 Studienablauf</b> .....	<b>41</b>
<b>2.4 Statistische Analyse</b> .....	<b>46</b>

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1 Morphologische RCM-Analyse</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1.1 Vor Beginn der Therapie</b> .....	<b>47</b>
3.1.1.1 Einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten .....	47
3.1.1.2 Parakeratose .....	48
3.1.1.3 Impetiginisation .....	49
3.1.1.4 Aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten .....	50
3.1.1.5 Spongiose .....	50
3.1.1.6 Dendritische Zellen .....	51
3.1.1.7 Runde Entzündungszellen .....	53
3.1.1.8 Erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation .....	54
3.1.1.9 Solare Elastose .....	54
<b>3.1.2 Nach 45 Tagen Therapie</b> .....	<b>56</b>
3.1.2.1 Apoptosen .....	56
3.1.2.2 Mikrovesikel .....	56
3.1.2.3 Dendritische Zellen .....	57
3.1.2.4 Runde Entzündungszellen .....	58
3.1.2.5 Leukozytenrolling .....	59
<b>3.1.3 30 Tage nach Beendigung der Therapie</b> .....	<b>59</b>
3.1.3.1 Reguläre polygonale kernlose Korneozyten .....	59
3.1.3.2 Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten .....	60
3.1.3.3 Kein Entzündungsinfiltrat .....	62
3.1.3.4 Normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße .....	63
3.1.3.5 Solare Elastose .....	65
<b>3.2 Statistische Auswertung</b> .....	<b>66</b>
<b>3.2.1 Häufigkeiten</b> .....	<b>66</b>
<b>3.2.2 Kappa-Analyse</b> .....	<b>69</b>
3.2.2.1 Aktinische Keratose .....	70
3.2.2.2 Periläsionale subklinische Haut .....	73
<b>3.2.3 McNemar-Test</b> .....	<b>76</b>
<b>3.2.4 Verlauf der Entzündung</b> .....	<b>77</b>
<b>3.2.5 Vierfelder-Chi<sup>2</sup>-Test</b> .....	<b>78</b>
<b>3.2.6 McNemar-Test</b> .....	<b>81</b>

<b>4. Diskussion</b> .....	<b>82</b>
<b>4.1 Fragestellung und Kernziel</b> .....	<b>82</b>
<b>4.1.1 Detektion der aktinischen Keratose</b> .....	<b>82</b>
<b>4.1.2 Wirkmechanismus von Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure in der aktinischen Keratose</b> .....	<b>85</b>
<b>4.1.3 Detektion der periläsionalen subklinischen Haut</b> .....	<b>92</b>
<b>4.1.4 Wirkmechanismus von Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure in der periläsionalen subklinischen Haut</b> .....	<b>94</b>
<b>4.1.5 Ansprechraten</b> .....	<b>100</b>
<b>4.1.6 Visualisierung des Behandlungseffekts</b> .....	<b>102</b>
<b>4.2 Limitationen und Ausblick</b> .....	<b>103</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>105</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>108</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>109</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>127</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>128</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>129</b>

## **Abstract - Deutsch**

**Einleitung:** Die aktinische Keratose (AK) ist als UV-induziertes Plattenepithelkarzinom in situ definiert. Sie stellt heute das häufigste in-situ-Karzinom des Menschen dar und wird als flächenhafte Erkrankung im Sinne der Feldkanzerisierung verstanden. Ein häufiges in der Therapie der feldkanzerisierten Haut eingesetztes Topikum ist das 3.0% Diclofenac in 2.5% Hyaluronsäure, dessen Wirkmechanismus bisher in der aktinisch geschädigten klinischen und subklinischen Haut nur in einer Studie konfokalmikroskopisch untersucht wurde.

**Ziele:** Kernziel dieser Studie war es, den Wirkmechanismus von Diclofenac in der aktinisch veränderten klinischen und subklinischen Haut mit Hilfe der Reflektanz konfokalen Laserscanmikroskopie (RCM) besser zu verstehen. Dabei interessierte uns auch, ob die RCM die Detektion der im Rahmen der Feldkanzerisierung auftretenden subklinischen Haut ermöglicht. Außerdem ermittelten wir die Ansprechraten auf die Therapie.

**Patienten und Methoden:** Die Daten von 18 Patienten wurden von zwei Untersuchern (U1/ U2) in der Studie ausgewertet. Pro Patient wurde eine klinisch charakteristische AK und eine subklinische Läsion untersucht. Die Behandlung mit 3.0% Diclofenac in 2.5% Hyaluronsäure erfolgte zweimal täglich über einen Zeitraum von 90 Tagen mit konfokalmikroskopischen Untersuchungen vor Beginn, nach 45 Tagen Therapie und 30 Tage nach Therapieende.

**Ergebnisse:** Mit der RCM war die Detektion der subklinischen Läsionen möglich. Dabei zeigte die subklinische Haut entsprechende Parameter, die auch in den AKs vorkommen, jedoch mit anderen Häufigkeiten. Während der Therapie wurden in der klinischen und subklinischen Haut Apoptosen und deren Ansammlung in Form von Mikrovesikeln visualisiert. Gleichzeitig wurde eine mehrheitliche Zunahme der Inflammation beobachtet - runde Entzündungszellen und dendritische Zellen traten auf, die nach Therapieende bei einem Großteil der Patienten persistierten. Es war allerdings nicht möglich, aus der Stärke der Entzündungsreaktion unter der Therapie Aussagen über den Therapieerfolg zu treffen.

Zur Abheilung kam es in der klinischen Haut bei 44.4%/ 38.9% (U1/ U2) und in der subklinischen bei 50.0%/ 33.3% (U1/ U2) der Studienteilnehmer. Dabei reagierten 94.4% der klinischen und subklinischen Läsionen des jeweiligen Patienten gleichermaßen entweder mit einer Abheilung oder einem Nichtansprechen (U1/ U2). Veränderungen des Aussehens der solaren Elastose und der Anzahl der Patienten mit dilatierten Blutgefäßen wurden in der klinischen und subklinischen Haut bei dem Vergleich vor und nach der Therapie mehrheitlich nicht gefunden.

**Schlussfolgerung:** Die RCM ist ein vielversprechendes Verfahren zur Detektion der feldkanzerisierten Haut und zur Visualisierung des Behandlungseffekts. Die beobachteten Effekte in der subklinischen Haut unter der Therapie unterstreichen die Wichtigkeit einer großflächigen Applikation des Gels.

## **Abstract - Englisch**

**Introduction:** Actinic keratosis (AK) is defined as an ultraviolet-induced in situ squamous cell carcinoma. It is the most common in situ carcinoma found in humans today, and it generally affects a large area of cells, presenting in a field cancerization pattern. One frequently used treatment for affected skin is 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel. However, this treatment's mechanism of action in actinic-damaged clinical and subclinical skin has been examined in only one study to date.

**Objectives:** The primary objective of this study was to understand the mechanism of action of diclofenac in actinic-damaged clinical and subclinical skin using reflectance confocal microscopy (RCM). A secondary objective was to determine whether RCM could detect subclinical skin. In addition, we determined the response rate of the treatment.

**Patients and methods:** In this study, two physicians (P1/ P2) analysed data from 18 patients. Each physician examined one typical clinical AK and one subclinical lesion per patient. The treatment took place twice a day for 90 days with RCM examinations conducted before treatment, on day 45 of the treatment and 30 days after the treatment was finished.

**Results:** We detected subclinical skin through RCM. The subclinical skin presented the same parameters found in AK, but they occurred in different frequencies. We visualised apoptoses and microvesicles (a conglomerate of apoptotic cells) in clinical and subclinical skin during treatment. Simultaneously, we observed increased inflammation with the occurrence of round inflammatory cells and dendritic cells. This inflammation persisted in the majority of patients after treatment. However, we did not find any correlation between the intensity of inflammation during treatment and the success of treatment.

Full skin recovery was achieved in clinical skin in 44.4%/ 38.9% (P1/ P2) and in subclinical skin in 50.0%/ 33.3% (P1/ P2) of the participants. In all, 94.4% of the clinical and subclinical lesions responded either with full recovery or nonresponse for the same patient (P1/ P2). There were no differences in the appearance of solar elastosis or in the number of patients with dilated blood vessels before and after treatment.

**Conclusions:** RCM is a promising technique to detect subclinical and clinical AK lesions and to visualize the effectiveness of treatment. The observed effects in the subclinical lesions during treatment show the importance of extensively applying the topical treatment.



## **1. Einleitung**

### **1.1 Aktinische Keratose**

#### ***1.1.1 Definition und Epidemiologie***

Zum wesentlichen Verständnis der aktinischen Keratose (AK) trugen drei Dermatologen bei - Dubreuilh, Freudenthal und Sutton.

W. A. Dubreuilh war der erste Dermatologe, der zwischen seborrhoischen und aktinischen Keratosen unterschied. Des Weiteren entdeckte er, dass AKs die natürliche Tendenz haben, in ein epitheliales Karzinom überzugehen. Mit diesen Entdeckungen prägte W. A. Dubreuilh 1896 das Konzept der Präkanzerosen. Einige Jahre später beschrieb W. Freudenthal 1926 erstmalig die charakteristischen histopathologischen Merkmale aktinischer Keratosen. Ferner bestätigte er die Erkenntnisse Dubreuilhs, dass die AK in ein Karzinom übergehen kann. R. L. Sutton Jr. bezeichnete 1938 die aktinische Keratose als ein oberflächliches Plattenepithelkarzinom (PEK) [Dubreuilh 1896, Freudenthal 1926, Sutton 1938].

Heute ist die aktinische Keratose als Plattenepithelkarzinom in situ definiert, bei der es zu einer Proliferation zytologisch atypischer Keratinozyten im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone in chronisch lichtgeschädigter Haut kommt [Ackermann 2003, Babilas 2003, Bermann 2009].

AKs treten gehäuft in der hellhäutigen Bevölkerung auf und kommen vor allem in Regionen mit hoher UV-Belastung vor. So ist die Prävalenz der aktinischen Keratose in Ländern der südlichen wesentlich höher als in Ländern der nördlichen Hemisphäre [Frost 1994]. Australier zeigen Prävalenzen von ~36.0% bis 37.0% bei den Frauen und ~52.0% bis 55.0% bei den Männern in der Altersgruppe von 30 bis 70 Jahren [Frost 1998, Frost 2000]. Weitere Studien in Australien und den USA ergaben Prävalenzwerte von 11.0% bis 26.0% [Salasche 2000]. In Deutschland geht man nach einer aktuellen Studie davon aus, dass ~3.0% bis 7.0% der Männer und ~1.0% bis 4.0% der Frauen aktinische Keratosen besitzen [Schaefer 2014]. In Großbritannien liegt die Häufigkeit mit 15.0% für Männer und 6.0% für Frauen etwas höher [Memon 2000].

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die genannten Studien eine Zunahme der AK-Prävalenz mit dem Alter und ein häufigeres Auftreten bei Männern zeigen konnten [Frost 1998, Frost 2000, Memon 2000, Schaefer 2014]. So ist die AK mittlerweile

weltweit das häufigste Carcinoma in situ des Menschen mit steigender Tendenz [Glass 1989, Green 1992, Holme 2000, Stockfleth 2006, Schaefer 2014]. Dabei wird die Dunkelziffer um ein Vielfaches höher geschätzt, da nicht jeder Mensch ärztliche Hilfe in Anspruch nimmt [Jorizzo 2005].

Neben den hohen Prävalenzraten dürfen auch die Transformationsraten in ein invasives PEK nicht unterschätzt werden. Exakte Zahlen sind aber nur im begrenzten Umfang vorhanden. Bei Immunkompetenten kommt es bei ca. 8.0% zu einer malignen Entartung [Glogau 2000]. Die durchschnittliche Zeit bis zum Übergang in ein invasives PEK beträgt dabei 24.6 Monate. Es lässt sich allerdings nicht vorhersagen, welche AK in ein PEK übergeht [Fuchs 2007].

## **1.1.2 Risikofaktoren**

### *1.1.2.1 Photokarzinogenese*

Den wichtigsten Mechanismus für die Entstehung der AKs stellt die chronische Ultraviolettexposition dar [Diepgen 2002]. Die heutige verstärkte kumulative UV-Exposition ist bedingt durch die sich wandelnden Freizeitgewohnheiten, die steigende Lebenserwartung sowie die sich verändernden Umweltbedingungen in den Industriestaaten. Die Menschen verbringen mehr Freizeit und Urlaub in der Sonne und Solarien werden immer populärer [Callen 1997, Kunstfeld 2008]. Als wesentlicher Umweltfaktor spielt dabei der Ozonabbau in der Stratosphäre eine Rolle. Durch das Ozonloch nimmt die UVA- und UVB-Exposition auf der Erde und somit auch das Risiko für Hautkrebs zu [Jones 1987, Madronich 1994, Slaper 1996, Lee 2013].

Bei den UV-Strahlen unterscheidet man zwischen UVA- (320-400 nm), UVB- (280-320 nm) und UVC-Strahlen (200-280 nm). Am bedeutendsten für die Entstehung von lichtinduziertem Hautkrebs sind dabei UVA- und UVB-Licht. Der größte Teil der UVC-Strahlung wird von der Ozonschicht absorbiert [Berking 2007].

Chronische und intermittierend-hochdosierte UVB-Strahlung verursacht Mutationen - ein wichtiger Faktor für die Photokarzinogenese. Die Ringstruktur der DNS-Basen ist dabei direkter Angriffsort der UVB-Strahlung. Durch die Absorption von UVB-Licht kommt es zur Quervernetzung zweier nebeneinander liegender Basen. Besonders

Pyrimidinbasen (Thymin und Cytosin) werden UV-induziert quervernetzt - Cyclobutanpyrimidin-Dimere und Pyrimidin-(6,4)-Pyrimidon-Fotoprodukte entstehen [Setlow 1966, Mitchell 1988, Mitchell 1989].

UVA-Strahlung wird hingegen nicht direkt von den DNA-Basen absorbiert. Das UVA-Licht wird durch noch nicht identifizierte körpereigene Photosensibilisatoren absorbiert und führt über die Fotooxidation indirekt zu DNS-Schäden. Bei der Fotooxidation entstehen reaktive Sauerstoffspezies wie beispielsweise Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, die die indirekten DNS-Schäden verursachen [Berking 2007].

Vor allem UV-induzierte Mutationen in Genen, die die Zellzyklusregulation verantworten, sind für die Entstehung von Hautkrebs entscheidend. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Mutation des Tumorsuppressor-Gens p53. Das p53 initiiert normalerweise die Reparatur von UV-bedingten DNA-Schäden und fördert den Zelltod von irreparablen Zellen. Dieser Tumorsuppressor wird durch UV-bedingte Mutationen im zugehörigen Gen inaktiviert - die ungehemmte Proliferation aktinisch geschädigter Zellen als Grundlage der Photokarzinogenese kann die Folge sein. Dabei geht man davon aus, dass es von der Art der p53-Mutation abhängt, ob ein Keratinozyt in eine Karzinomzelle übergeht. Mutationen des Tumorsuppressors p53 liegen insgesamt in aktinischen Keratosen zu 53.0% bis 66.0% vor. Ferner wird diskutiert, ob nach der klassischen Karzinogenesetheorie für die vollständige Ausbildung von Krebs neben der Inaktivierung eines Tumorsuppressors wie p53 auch die Aktivierung eines Onkogens notwendig ist. Ein wichtiges durch UV-Licht aktiviertes Onkogen ist dabei das Ras (rat sarcoma) [Ziegler 1994, Lefell 2000, Fu 2003, Berking 2007, Dornelas 2009, Bagazgoitia 2010].

Neben den UV-bedingten Veränderungen der DNA kann es durch ultraviolette Strahlung auch zur Immunsuppression kommen. Dabei wird zwischen lokaler und systemischer Immunsuppression unterschieden. Die genauen Ursachen für die Immunsuppression sind sehr komplex und noch nicht abschließend geklärt. Fest steht, dass durch die Immunsuppression die Karzinogenese gefördert werden kann. Dabei besitzt UVB-Licht im Gegensatz zu UVA-Licht schon in geringen Dosen immunsuppressorische Wirkung [Bestak 1996].

Folgende Mechanismen sind an der UV-induzierten Immunsuppression beteiligt:

- Photoisomerisierung von trans- zu cis-Urokaninsäure
- Verlust von antigenpräsentierenden Langerhanszellen, Vermehrung von T-Suppressorzellen
- Stimulation regulatorischer T-Zellen in der Freisetzung immunsuppressiver Mediatoren
- Anregung von Keratinozyten in der Ausschüttung immunsuppressiver Faktoren

Urokaninsäure ist ein Photorezeptor, der im Stratum corneum in der trans-Form vorkommt. Absorbiert Urokaninsäure UV-Licht kommt es zur Isomerisierung in die cis-Form und einer daraus folgenden verminderten Immunabwehr [de Fabo 1983, Noonan 1992]. Durch die UV-bedingte Reduktion der Langerhanszellen in der Haut findet außerdem eine verminderte Antigenpräsentation im bestrahlten Gebiet statt. Die herabgesetzte immunologische Reaktion auf transformierte Zellen ist die Folge [Halliday 1998].

Zu den von den T-Zellen und bestrahlten Keratinozyten freigesetzten immunsuppressiven Mediatoren gehören u. a. Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 10 (IL-10) [Brink 2000]. Dabei nimmt besonders das Interleukin 10 eine Schlüsselrolle ein. Es verhindert die Antigenpräsentation der Langerhanszellen mit nachfolgender Behinderung der Differenzierung der naiven T-Zelle. Des Weiteren beeinflusst es das Wachstum und die Differenzierung der Mast- und B-Zelle [Weiss 2004].

#### *1.1.2.2 Weitere Risikofaktoren*

Neben dem bereits beschriebenen Hauptrisikofaktor der chronischen UV-Exposition gibt es weitere Strahlenquellen, die die Entstehung aktinischer Keratosen fördern können. Dazu gehören UVA-Licht mit Psoralen (PUVA), Röntgenstrahlung und Radioisotope [Fu 2003, Karagas 2007]. Des Weiteren spielen chemische Noxen wie Arsen und Teerprodukte eine wesentliche Rolle [Diepgen 2002, Stockfleth 2006]. Weitere Risikofaktoren sind physikalische Noxen wie ionisierende Strahlung und Infrarotstrahlen [Fu 2003, Altmeyer 2016].

Humane Papillomaviren (HPV) sind ebenfalls mit der Entstehung aktinischer Keratosen assoziiert. Diese kommen bei Immunkompetenten sowie häufiger bei Immunsupprimierten vor [Harwood 2000, Pfister 2003, Stockfleth 2004]. Der exakte Mechanismus der Beteiligung von HPV an der Entstehung von aktinischen Keratosen ist weiterhin unbekannt. Fest steht aber, dass vor allem HPV 5, 8 und 23 durch unterschiedliche Mechanismen eine Rolle spielen. Dabei ist besonders das virale Protein E6 durch seine kanzerogene Wirkung in den Fokus geraten [Jackson 2000a, Jackson 2000b, Pfister 2003, Stockfleth 2004, Muschik 2011].

Auch Immunsupprimierte haben insgesamt ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von AKs. So bekommen 40.0% der Immunsupprimierten innerhalb der ersten 5 Jahre der Erkrankung prä-maligne und maligne Hautveränderungen [Ulrich 2002, Stockfleth 2002]. Besonders organtransplantierte Immunsupprimierte haben ein deutlich erhöhtes Risiko für AKs und Plattenepithelkarzinome. So ist das Risiko für Organtransplantierte gegenüber Gesunden 250-fach höher aktinische Keratosen zu bekommen und 100-fach höher hinsichtlich der Entstehung eines invasiven PEK [Stockfleth 2002, Ulrich 2002].

Des Weiteren steigt das Risiko bei genetischen Erkrankungen wie der Xeroderma pigmentosum, dem Albinismus, dem Rothmund-Thomson-, Cockayne- und Bloom-Syndrom [Diepgen 2002, Fu 2003, Schäfer 2006]. Hohes Alter, männliches Geschlecht, Hauttyp I-II nach Fitzpatrick sowie Beruf und Freizeitaktivitäten unter freiem Himmel erhöhen ebenfalls das Risiko für die Entstehung von AKs [Holme 2000, Stockfleth 2006, Traianou 2012]. Als möglicher Grund für das gehäufte Auftreten der AKs beim männlichen Geschlecht wird die verstärkte Exposition von Sonnenlicht in Beruf und Privatleben und die verminderte Verwendung von Sonnenschutzcremes und schützender Kleidung angesehen [Hall 1997, Kütting 2010]. Als weitere Ursache wird die sich gegenüber Frauen unterscheidende Kopfbehaarung diskutiert [Schwartz 2008]. Ferner ist das Risiko für aktinische Keratosen signifikant erhöht nach Sonnenbränden in der Kindheit und beim Vorliegen von multiplen solaren Lentiginen am Körper. Darüber hinaus wird eine vermehrte Assoziation mit der Vitiligo und mit Melanomen in der Vorgeschichte diskutiert [Schaefer 2014]. Daneben stehen bestimmte photosensibilisierende Herzmedikamente und Thiaziddiuretika unter Verdacht, das Risiko für AKs zu erhöhen [Traianou 2012].

### **1.1.3 Diagnostik**

Typischerweise erfolgt die Diagnosestellung der AK nach dem klinischen Erscheinungsbild. Bei Unsicherheit, ob es sich bereits um ein invasives PEK handelt, besonders bei hypertrophen und hyperkeratotischen Läsionen, muss die Diagnose durch eine Biopsie und die histopathologische Untersuchung bestätigt werden. Die Histologie gilt dabei nach wie vor als Goldstandard für die Diagnosestellung [Stockfleth 2011]. Es gibt weitere neue Techniken wie die Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie (RCM), den Hochfrequenzultraschall und die optische Kohärenztomographie, die ebenfalls gute Ergebnisse bei der Diagnose der AK zeigen konnten [Korde 2007, Mogensen 2007, Ulrich 2007a].

#### *1.1.3.1 Klinische Merkmale*

Klinisch imponieren die aktinischen Keratosen als rötliche Maculae, Papeln oder Plaques mit oberflächlicher rauer Schuppung. Die Farbe reicht von hautfarben bis rötlich/ rotbraun oder leicht gelblich (Abbildung 1). Sie sind meistens besser zu palpieren als sichtbar [Hauschild 2006]. Ihre Größe variiert zwischen wenigen Millimetern und einigen Zentimetern. Sie kommen in sonnenexponierten Hautrealen, den sogenannten „Sonnenterassen“ vor. Dazu gehören Kopf, Hals, Dekolleté, Nacken, Arme, Handrücken sowie das Lippenrot. Im Bereich des Lippenrots wird die aktinisch geschädigte Haut als Cheilitis actinica bezeichnet [Cavalcante 2008]. Die AK wird heute als flächenhafte Erkrankung im Sinne der Feldkanzerisierung verstanden. Dabei geht man davon aus, dass sowohl in den aktinischen Keratosen, d. h. in der klinischen Haut, als auch in der periläsionalen, d. h. klinisch gesunden bzw. subklinischen Haut, transformierte Keratinozyten in unterschiedlicher Graduierung vorliegen [Slaughter 1953, Braakhuis 2003]. Der Übergang in ein invasives PEK ist dabei fließend. Parameter zur Identifikation risikoreicher AKs sind Induration, Blutung, Zunahme des Durchmesser, Rötung und Ulzeration. Als Nebenbefunde für risikoreiche aktinische Keratosen gelten Schmerzen, Tastbarkeit, Hyperkeratose, Juckreiz und Pigmentierung [Quaedvlieg 2006].



Abb. 1

***Multiple AKs auf der Kopfhaut bei einem der untersuchten Patienten.***

Bei den AKs werden klinisch verschiedene Subtypen unterschieden [Altmeyer 2016]:

- erythematöser Typ
- keratotischer Typ
- Cornu-cutaneum-Typ
- pigmentierter Typ
- Lichen-planus-Typ

Der erythematöse Typ zeigt sich durch wenige Millimeter große, scharf begrenzte gerötete Papeln oder Plaques mit rauer Oberfläche und sie durchziehende Teleangieektasien. Dieser Typ nimmt schnell an Größe zu. Der keratotische Typ zeichnet sich hingegen klinisch durch eine Plaque mit verstärkter Hornauflagerung aus. Die Farbe dieser Auflagerung reicht von gelblich bis braun bzw. grau-schwarz. Das Cornu cutaneum stellt dabei die Maximalvariante dar mit einem zentralen festhaftenden Hornhautzapfen. Kennzeichnend für den pigmentierten Typ ist seine bräunliche Farbe und seine spreitende Wachstumstendenz. Unterschiedlich große Läsionen mit geröteter, zumeist glatter Oberfläche kommen beim Lichen-planus-Typ vor [Altmeyer 2016].

### 1.1.3.2 Histologie

Wie bereits beschrieben, ist die aktinische Keratose als Plattenepithelkarzinom in situ definiert. Sie ist im Bereich der Epidermis von einem PEK nicht zu unterscheiden [Ackerman 2006].

Die AKs werden je nach Ausprägung der zellulären Atypien in 3 unterschiedliche Grade eingeteilt (Tabelle 1). In der Frühphase kommt es zur Vermehrung basaler Keratinozyten. Diese Veränderung wird als „Crowding“-Phänomen beschrieben, bei dem die Zellkerne dicht gedrängt stehen. Des Weiteren treten erste atypische Keratinozyten im Stratum basale auf. Je weiter die Krankheit fortschreitet, desto mehr atypische Keratinozyten sind in der Epidermis zu finden bis sie die gesamte Epidermis ausfüllen [Stockfleth 2011].

Wesentliche histologische Kriterien für die Diagnose der AK lassen sich Tabelle 2 entnehmen.

Tabelle 1

#### ***Klassifizierung der AK nach Ausprägung der zellulären Atypien.***

Grad	Evaluationskriterien
I (mild)	Atypische Keratinozyten im unteren Drittel der Epidermis
II (moderat)	Atypische Keratinozyten bis zum mittleren Drittel der Epidermis; ggf. Knospen von Keratinozyten in der oberen Dermis
III (ernsthaft)	Atypische Keratinozyten in mehr als zwei Drittel der Epidermis; ggf. Knospen von Keratinozyten in der oberen Dermis

*Modifiziert und übersetzt nach [Röwert-Huber 2007].*



Tabelle 2

**Histologische Evaluationskriterien der klinischen Haut.**

Hautschicht	Evaluationskriterien
Stratum corneum	Einzelne vom Zellverband losgelöste Kerneozyten Alternierend Hyperparakeratose und Orthohyperkeratose (Akrotrichium, Akrosyngium) Impetiginisation
Stratum granulosum/ spinosum	Abnorme Architektur Zellulärer/ nukleärer Pleomorphismus Fehlende Reifung der Keratinozyten und Verlust der nukleären Polarität Akanthose/ Atrophie der Epidermis Mitosen/ atypische Mitosefiguren Spongiose Exozytose
Stratum basale	„Crowding-Phänomen“ - dicht gedrängt stehende Zellkerne Mitosen/ atypische Mitosefiguren Zellulärer/ nukleärer Pleomorphismus
Dermis	Superfiziellies Entzündungsinfiltrat Erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation Solare Elastose

*Modifiziert und übersetzt nach [Ulrich 2007a, Ulrich 2008, Kempf 2010].*

Akrotrichium und Akrosyngium sind bei den aktinischen Keratosen von den Veränderungen nicht betroffen. Das daraus folgende alternierende Auftreten von Para- und Orthokeratose in der Epidermis wird „Flaggenzeichen“ genannt [Stockfleth 2011].

Bei den AKs werden histologisch verschiedene Subtypen unterschieden [Stockfleth 2011, Altmeyer 2016]:

- bowenoider/ atrophischer Typ
- hypertropher Typ
- akantholytischer Typ
- pigmentierter Typ
- lichenoider Typ

Neben den bereits in Tabelle 2 beschriebenen charakteristischen Evaluationskriterien treten je nach AK zusätzlich unterschiedliche Merkmale auf.

Die bowenoide aktinische Keratose ähnelt histologisch dem M. Bowen ohne Beteiligung der Adnexstrukturen, während die hypertrophe AK im histologischen Bild eine vermehrte Hyper-, Parakeratose und Akanthose aufweist. Der histologische Befund deckt sich mit dem des Cornu cutaneum. Akantholytische dyskeratotische Zellen treten über suprabasalen Spalten in akantholytischen AKs auf. Pigmentierte Zellen der unteren epidermalen Zellreihen können bei der pigmentierten AK gefunden werden und beim lichenoiden Typ findet man ein dichtes lichenoides (bandförmiges) lymphozytäres Infiltrat im Stratum papillare, wobei dieses dem histologischem Bild des Lichen planus ähnelt [Stockfleth 2011, Altmeyer 2016].

#### *1.1.3.3 Differentialdiagnosen*

Differentialdiagnostisch sind folgende Hauteffloreszenzen nach der aktuellen Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) zu berücksichtigen [Stockfleth 2011] :

benigne Neubildungen:

- Verruca seborrhoica
- Lentigo solaris
- aktinische Porokeratose
- Verruca vulgaris
- Tinea
- Ekzem
- Psoriasis vulgaris
- Lupus erythematoses

maligne Neubildungen:

- Plattenepithelkarzinom
- Morbus Bowen/ Bowen-Karzinom

- Superfizielles Basaliom
- Lentigo maligna
- Keratoakanthom
- Extramammärer M. Paget

#### **1.1.4 Therapie**

Vor dem Hintergrund der Unberechenbarkeit der Transformation einer aktinischen Keratose in ein invasives PEK ist ein umfassendes frühzeitiges therapeutisches Vorgehen unabdingbar [Heaphy 2000]. Es stehen verschiedene Behandlungsansätze zur Verfügung. Neben operativen und physikalischen Methoden gibt es topische pharmakologische Therapieoptionen [Stockfleth 2011].

Ablativ kann die Therapie durch operative Entfernung, Kürettage oder Kryotherapie erfolgen. Diese Verfahren werden vor allem beim Vorhandensein einzelner Läsionen eingesetzt. Topische Substanzen eignen sich gut für den Einsatz bei flächenhaften Läsionen im Sinne der Feldkanzerisierung. Dazu gehören 5.0%-Fluorouracil (Efudix<sup>®</sup>), 0.5%-Fluorouracil in Kombination mit Salicylsäure 10.0% (Actikerall<sup>®</sup>), Imiquimod 5.0% (Aldara<sup>®</sup>), Imiquimod 3.75% (Zyclara<sup>®</sup>), die Photodynamische Therapie mit Hilfe von Gels und Cremes (Ameluz<sup>®</sup>, Metvix<sup>®</sup>) sowie Pflastern (Alacare<sup>®</sup>) und Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure (Solaraze<sup>®</sup>). Weitere seltener verwendete Behandlungsoptionen sind die Anwendung von topischen Retinoiden, Dermabrasio, chemischem Peeling, Laser und der Einsatz von Röntgenstrahlen [Jorizzo 2005, Shoimer 2010, Stockfleth 2009, Stockfleth 2011, Stockfleth 2012]. Eine neuere Therapieoption stellt das topisch applizierbare Ingenolmebutat (Picato<sup>®</sup>) dar, das seit 2012 zugelassen ist und eine Kurzzeittherapie aktinischer Keratosen ermöglicht [Fallen 2012, Lebwohl 2012, Gras 2013]. Ein weiteres Therapeutikum mit bisher guten Ergebnissen ist das Resiquimod, die Nachfolgesubstanz von Imiquimod, das sich noch in der Entwicklung befindet [Szeimies 2008, Meyer 2013].

Ferner sollte ein konsequenter Lichtschutz zur Verhinderung der Entstehung weiterer Läsionen durchgeführt werden. Dieser erfolgt durch die Verwendung von Lichtschutzmitteln, die Vermeidung der direkten Sonneneinstrahlung und das Tragen von schützender Kleidung. Auch die regelmäßige Ganzkörperuntersuchung der Haut

durch den Arzt sowie den Patienten selbst ist unabdingbar [Naylor 1995, Zalaudek 2013].

Wichtig ist, dass die Entscheidung für eine bestimmte Therapieform individuell erfolgen sollte. Dabei spielen die Lokalisation und Ausdehnung der Läsionen genauso wie das Alter des Patienten und seine Komorbiditäten eine Rolle. Besonders der Risikofaktor der Immunsuppression sollte bei der Auswahl der geeigneten Therapie beachtet werden. Des Weiteren gilt es den Leidensdruck des Patienten zu berücksichtigen und die Therapieform nach der Compliance des Patienten zu richten. Auch vorangegangene Behandlungen und Nebenwirkungen sollten erörtert werden. Die Entscheidung für eine bestimmte Therapie erfolgt somit letzten Endes nach den Präferenzen von Arzt und Patient [Hauschild 2006, Stockfleth 2008, Stockfleth 2009, Stockfleth 2012, Zalaudek 2013].

#### *1.1.4.1 Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure*

Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure wird als Solaraze<sup>®</sup> Gel vertrieben und ist für die Therapie der AK seit 1998 in Deutschland zugelassen. Die Hilfsstoffe sind Natriumsalz, Benzylalkohol, Polyethylenglycolmonomethylether und gereinigtes Wasser [Fachinformation Almirall Solaraze<sup>®</sup> 3% Gel 2015]. Der aktive Wirkstoff im Solaraze<sup>®</sup> Gel ist das Diclofenac, während die Hyaluronsäure unterstützende Funktion beim Transport in die Epidermis übernimmt. Dabei besitzt Hyaluronsäure die Fähigkeit, Wasser zu binden und somit die Hornschicht aufzuweichen. Durch die Bildung eines Depots von Diclofenac und Hyaluronsäure erfolgt eine sequentielle Freisetzung von Diclofenac (sog. „slow release effect“). Dieser Vorgang verlängert die Wirkdauer von Diclofenac in der Haut [Moore 1995, Brown 2005, Hauschild 2006].

Der Wirkmechanismus des Diclofenacs in den kutanen neoplastischen Zellen der aktinischen Keratosen wurde bisher in vivo mit Hilfe der RCM nur in einer Studie erforscht [Malveyh 2015a]. Weitere Studien zum Wirkmechanismus von Diclofenac in der Haut und in anderen Organen ohne konfokalmikroskopisches Monitoring gibt es hingegen viele [Phipps 1991, Jones 1999, Masferrer 2000, Gallo 2001, Zimmermann

2001, Harris 2002, Wang 2005, Liu 2006, Wang 2006, Fecker 2007, Ulrich 2010, Fecker 2010, Kaur 2011, Kalinski 2012, Martin 2012, Rodust 2012].

Diclofenac ist ein Arylsäurederivat und kommt aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika - kurz NSAR. Es ist ein unspezifischer Hemmstoff der Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1 und -2). In gesunden Geweben wird in der Regel nur COX-1 exprimiert, während die COX-2 in entzündlichem und neoplastischem Gewebe vorkommt [Dubois 1998, Müller-Decker 2004, Hauschild 2006, Ulrich 2009]. Bei der Wirksamkeit von Diclofenac in der aktinisch geschädigten klinischen und periläsionalen subklinischen Haut scheint demnach vor allem die Hemmung der COX-2 eine Rolle zu spielen.

Bisher ist der genaue Wirkmechanismus der COX-2 noch nicht abschließend geklärt. Im Folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse zur Wirkungsweise der COX-2 näher erläutert und grafisch in Abbildung 2 dargestellt.

Bekannt ist, dass die COX-2 intrazellulär die Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PG E<sub>2</sub>) aus Arachidonsäure (AA) stimuliert. Durch aktiven Transport bzw. Diffusion gelangt PG E<sub>2</sub> nach extrazellulär und kann dort an einen seiner Rezeptoren (EP1 - EP4) binden, um erneut in die Zelle aufgenommen zu werden [Wang 2005, Fecker 2007]. Die verschiedenen EP-Rezeptoren haben dabei unterschiedliche Affinitäten zum PG E<sub>2</sub> und lösen intrazellulär jeweils unterschiedliche Reaktionen aus [Kalinski 2012].

Über die Aktivierung der Ras-MAP-Kinase Kaskade (mitogen-activated protein), einem der wichtigsten intrazellulären Signalwege, wird die Proliferation von Zellen und somit auch Tumoren angeregt. Diese Kaskade induziert wiederum die Expression von COX-2 und hat positive Wirkung auf die Angiogenese [Jones 1999, Wang 2005, Wang 2006]. Des Weiteren induziert Prostaglandin E<sub>2</sub> die Hochregulierung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), die die Angiogenese in Tumoren ebenfalls anregen. Auch diese Faktoren können direkt die Synthese von COX-2 stimulieren [Phipps 1991, Wang 2005].

Zur Immunsuppression kommt es u. A. durch die Downregulation von Th<sub>1</sub>-Mediatoren, während die Th<sub>2</sub>-Mediatoren hochreguliert werden. Dabei übernimmt vor allem der Th<sub>2</sub>-Mediator IL-10 die immunsuppressorische Funktion. Auch die direkte Hemmung der dendritischen Zellen, der T- und B-Zellproliferation und der Antitumoraktivität der Natürlichen Killerzellen und Makrophagen führt zu einer Immunsuppression. Der genaue Wirkmechanismus von PG E<sub>2</sub> bzgl. des Entzündungsverhaltens ist hingegen

sehr komplex und noch umstritten. Eine Studie geht davon aus, dass es durch die PG E<sub>2</sub>-vermittelte Induktion vor allem der Bildung von antiinflammatorischen Botenstoffen (in Abbildung 2 rot markiert) und die verminderte Produktion proinflammatorischer Substanzen (in Abbildung 2 grün markiert) zu einer verminderten Inflammation kommt [Harris 2002]. Ein Review von 2012 bestätigt den immunsuppressorischen Effekt des PG E<sub>2</sub>, kommt aber in Bezug auf das Entzündungsverhalten zu einem differenzierteren Ergebnis. In dieser Studie geht man davon aus, dass es akut zu einer gesteigerten lokalen Inflammation kommt, die u. a. durch die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen entsteht. Die Studie bestärkt aber auch die Annahme, dass das PG E<sub>2</sub> eine unspezifische Inflammation eindämmen kann durch die bereits weiter oben beschriebene Hemmung der Bildung von proinflammatorischen und die Induktion von immunsuppressorischen Zytokinen [Kalinski 2012]. Insgesamt lässt sich daher festhalten, dass es weiterer Studien bedarf, um abschließende Aussagen über das Entzündungsverhalten von PG E<sub>2</sub> treffen zu können. Nur so lässt sich folglich der genaue Mechanismus der COX-Hemmer, NSAR, bei akuten und chronischen Infektionen verstehen.

PG E<sub>2</sub> hat eine weitere Funktion. Es hemmt die Apoptose durch verschiedene Mediatoren wie NFκB (Nuclear Factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells), Proteine der Bcl-2-Familie (B-cell-lymphoma-2-Familie), c-FLIP (cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein) und PPARδ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ), die direkt oder indirekt durch das PG E<sub>2</sub> synthetisiert werden. Um die genauen Wirkorte der einzelnen Mediatoren zu verstehen, muss im Folgenden kurz der allgemeine Ablauf der Apoptose erläutert werden. Bei der Induktion der Apoptose der einzelnen Zelle wird zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg unterschieden. Über den extrinsischen Weg binden Todesliganden wie TNF-α, TRAIL (TNR-Related Apoptosis Inducing Ligand) und CD95L/ FasL (Cluster of differentiation 95 Ligand/ Fas Ligand) an den jeweiligen Todesrezeptor. Diese Bindung führt intrazellulär zu der Aktivierung der Enzyme der Caspase-Kaskade, bei der vor allem die Caspase-3 und -8 eine wichtige Rolle spielen. Diese Kaskade führt innerhalb der Zelle zu der Aktivierung der Apoptose und kann durch das PG E<sub>2</sub>-induzierte Protein c-FLIP gehemmt werden. Der intrinsische Weg umfasst hingegen die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 und der Kaskade der Mitochondrien, die das proapoptotische Cytochrom c freisetzen. Das Cytochrom c kann wiederum die Caspase-Kaskade aktivieren und somit das Auftreten von Apoptosen verstärken. Dabei

wird die mitochondriale Kaskade durch die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie überwacht, die PG E<sub>2</sub>-vermittelt gebildet werden. Über den Transkriptionsfaktor NFκB besteht ein hemmender Einfluss auf die Apoptose. Neben den bereits genannten intrinsischen proapoptotischen Mechanismen gibt es den durch Prostaglandin E<sub>2</sub> aktivierten PI3K-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinasen-Signalweg), der den Peroxisomen Proliferator-Activated Receptor PPARδ aktiviert, der wiederum hemmenden Einfluss auf die Apoptose von Zellen hat [Zimmermann 2001, Wang 2005, Fecker 2007, Ulrich 2009, Fecker 2010]. Ferner induziert der PI3K-Signalweg die Invasion von Zellen [Wang 2005].

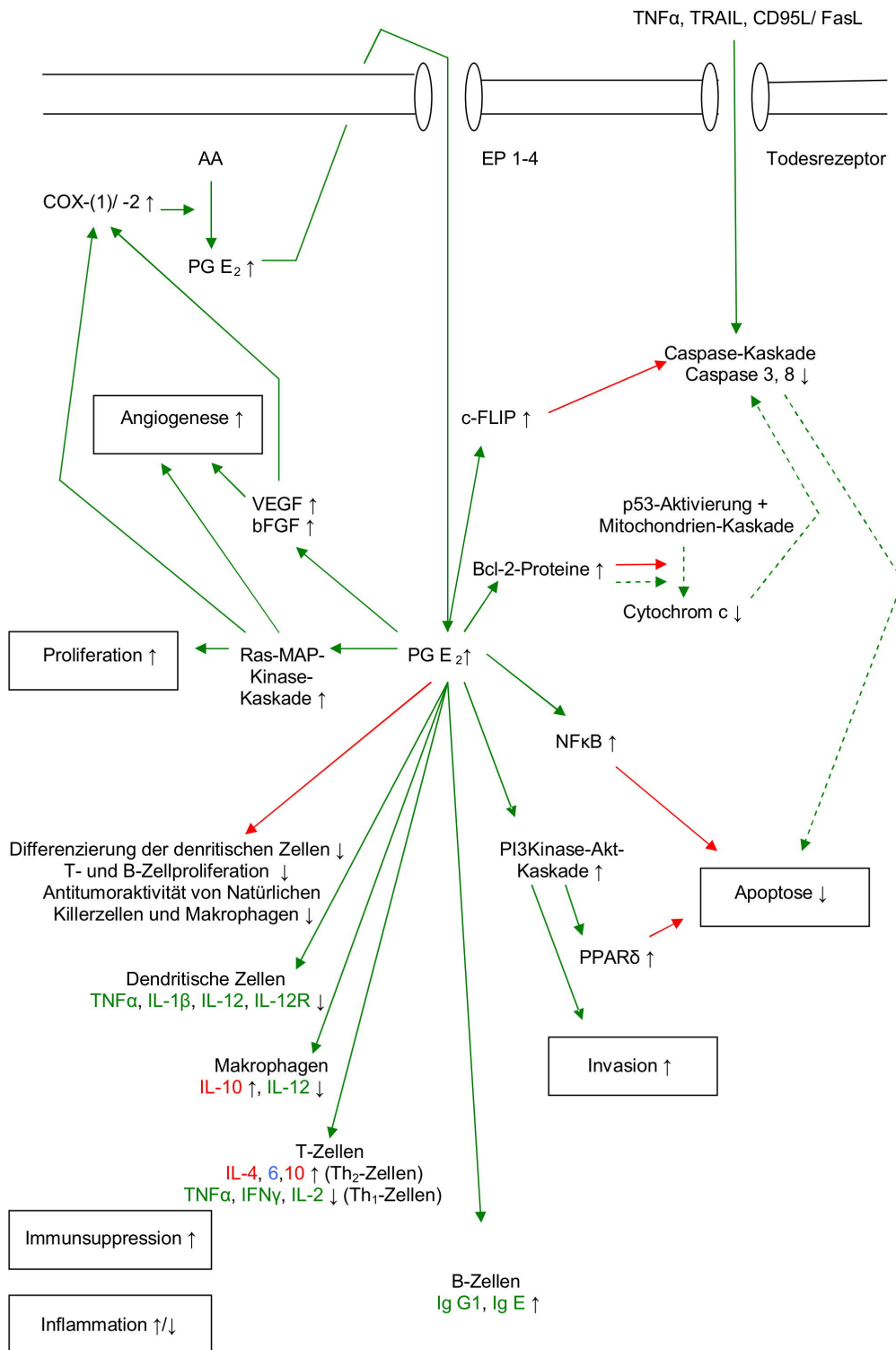


Abb. 2

**Wirkungsweise der Cyclooxygenase-2 und nachfolgend von Prostaglandin E<sub>2</sub>. Grüner Pfeil = aktivierend, roter Pfeil = hemmend, gestrichelt = vermindert ablaufend, grün = proinflammatorischer Botenstoff, rot = antiinflammatorischer Botenstoff, blau = pro- und antiinflammatorischer Botenstoff.**



Die Eigenschaften des Prostaglandins E<sub>2</sub> lassen sich demnach folgendermaßen zusammenfassen:

- Proliferation ↑
- Invasion ↑
- Apoptose ↓
- Inflammation ↑/↓
- Immunsuppression ↑
- Angiogenese ↑

Aus den beschriebenen Mechanismen ergibt sich, dass COX-2 und nachfolgend Prostaglandin E<sub>2</sub> prokarzinogene Wirkung haben [Wang 2005, Wang 2006]. So konnte eine erhöhte Expression von COX-2 u. A. in epithelialen Tumoren nachgewiesen werden [Subbaramaiah 1997, Nijsten 2004, Fecker 2007]. Durch die Hemmung der COX-2 durch Diclofenac, dem aktiven Wirkstoff im Solaraze<sup>®</sup> Gel, und der daraus folgenden Blockierung der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Entstehung aus Arachidonsäure verhindert Diclofenac somit die prokarzinogene Wirkung [Subbaramaiah 1997, Wilgus 2000].

Folgende Eigenschaften des Diclofenacs wurden daher indirekt durch die Hemmung der PG E<sub>2</sub>-Synthese und der daraus resultierenden verminderten aktivierenden Funktion verschiedener Kaskaden, Zellen und Enzymen abgeleitet [Phipps 1991, Zimmermann 2001, Harris 2002, Wang 2005, Wang 2006, Kalinski 2012] sowie aus direkten Untersuchungen der akuten Wirkungsweise des Diclofenacs sowie anderer NSAR in der Haut [Fecker 2007, Ulrich 2009, Dirschka 2010, Fecker 2010, Maltusch 2011, Martin 2012, Rodust 2012] und in anderen Organen gewonnen (Abbildung 3) [Jones 1999, Masferrer 2000, Gallo 2001, Liu 2006, Kaur 2011]:

- Proliferation ↓
- Invasion ↓
- Apoptose ↑
- Inflammation ↓/↑
- Immunsuppression ↓
- Angiogenese ↓

Dabei geht man heute davon aus, dass der Hauptwirkmechanismus des aktiven Wirkstoffes Diclofenac im Solaraze® Gel in der Therapie der aktinischen Keratosen die Induktion der Apoptose ist [Fecker 2007, Ulrich 2009]. Diclofenac soll hierbei selbst die Apoptose nur gering induzieren. Als Hauptfaktor für die unter der Diclofenac-Therapie vermehrt auftretenden Apoptosen wird hingegen die Aktivierung der Caspase-Kaskade durch die bereits benannten Todesliganden angesehen (extrinsischer Weg). Diese erfolgt unabhängig vom Tumorsuppressorgen p53. Dabei werden verschiedene Mechanismen der Aktivierung der Todesliganden-medierten Kaskade diskutiert. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es im Rahmen der Therapie mit dem Solaraze® Gel zu einer Downregulation des anti-apoptotisch wirkenden cFLIP-Proteins kommt, das normalerweise die Caspase-Kaskade und somit die Apoptose hemmt [Liu 2006, Fecker 2010]. In einer neuen Studie zum Wirkmechanismus von Diclofenac in Plattenepithelkarzinomen konnte die Aktivierung der mitochondrialen Kaskade (intrinsischer Weg), die wir bereits weiter oben erklärt haben, direkt nachgewiesen werden. Dabei kam es zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials, zur Freisetzung des Cytochroms c und des apoptose-induzierenden Faktors (AIF). Ferner wurden Veränderungen von verschiedenen Bcl-2-Proteinen durch die Therapie mit dem Solaraze® Gel festgestellt. So sanken die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine Mcl-1 und Bcl-w unter der Therapie im PEK, während das Protein Bad der Bcl-2-Familie anstieg [Rodust 2012].

Auf die Ergebnisse der Studie von Malveyh und Kollegen, die als einzige Studie die klinische und periläsionale subklinische Haut vor, nach 2 und 6 Wochen und am Ende der Therapie mit dem Solaraze® Gel untersuchte, wird in 1.2.4 im Detail eingegangen [Malveyh 2015a].

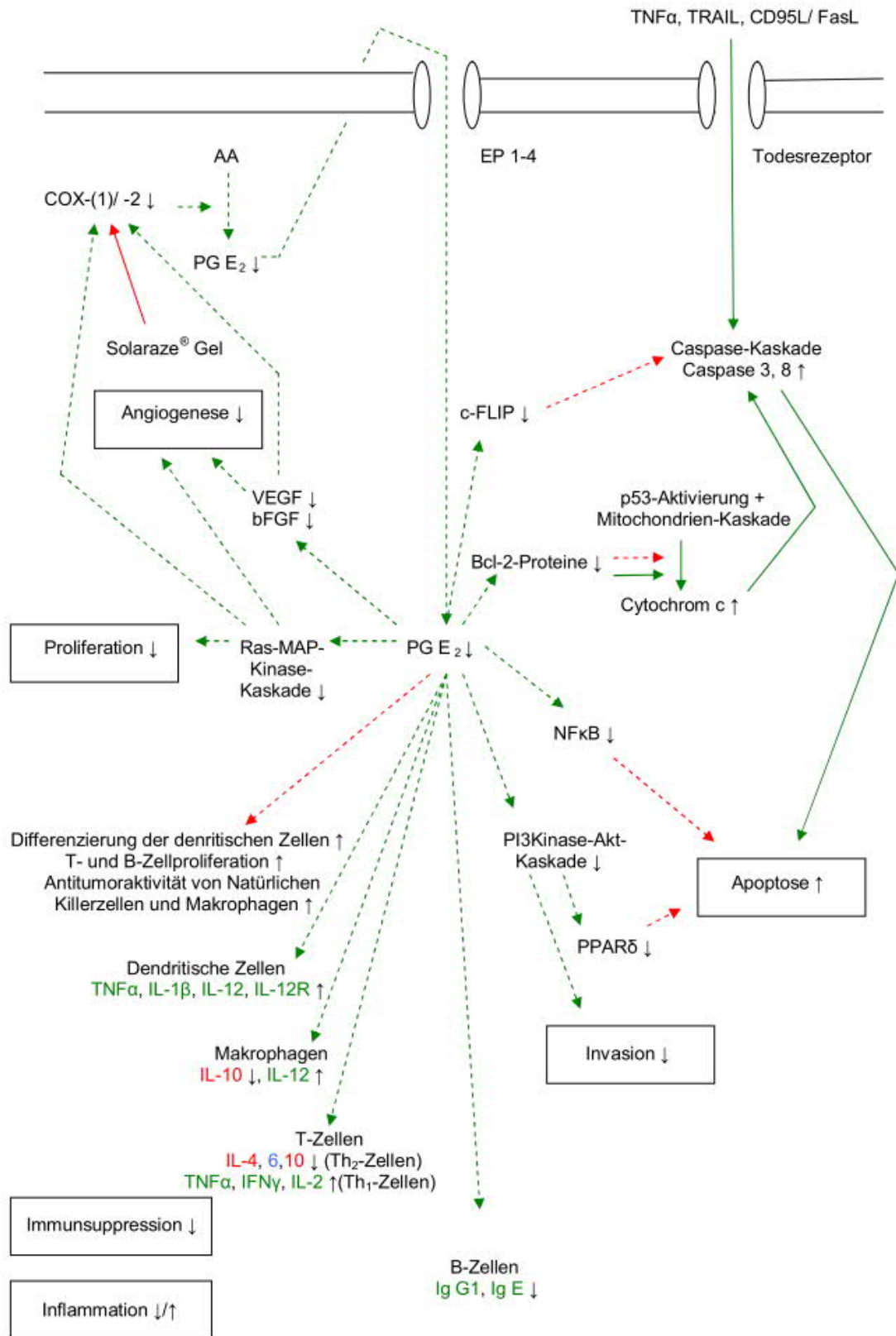


Abb. 3

**Wirkungsweise des Solaraze® Gels. Grüner Pfeil = aktivierend, roter Pfeil = hemmend, gestrichelt = vermindert ablaufend, grün = proinflammatorischer Botenstoff, rot = antiinflammatorischer Botenstoff, blau = pro- und antiinflammatorischer Botenstoff.**

Es liegen zahlreiche Studien vor, die die Wirksamkeit des Solaraze® Gels für die Behandlung der AKs untersucht haben. Zur kompletten klinischen Abheilung kam es bei 14.3% bis 89.0% nach einer 60- bis 90-tägigen Therapie [Wolf 2001, Rivers 2002, Smith 2006, Dirschka 2010, Akarsu 2011]. Eine weitere Studie konnte eine 50-prozentige klinische Verbesserung bei 53.0% der Studienteilnehmer, eine andere eine 75-prozentige Abheilung bei 85.0% der Patienten finden [Gebauer 2003, Nelson 2004].

Laut Fachinformation wird eine 60- bis 90-tägige Therapie empfohlen [Fachinformation Almirall Solaraze® 3% Gel 2015]. Eine Studie von 2012 kommt hingegen zu dem Schluss, dass eine längere Therapie auch höhere Abheilungsraten fördert. Sie verglich die Abheilungsraten einer 3- und einer 6-monatigen Therapie der AKs mit dem Solaraze® Gel. Dabei konnte histologisch eine Abheilung in 30.0% der Patienten nach 3 Monaten Therapie und 40.0% nach 6-monatigem Eincremen erzielt werden. Klinisch kam es bei 40.0% der Patienten nach 3 Monaten zu einem Abheilen, während nach 6 Monaten 45.0% der Probanden eine klinische Clearance zeigten [Pflugfelder 2012].

Die optimale therapeutische Wirkung tritt laut Fachinformation gegebenenfalls erst 30 Tage nach Beendigung der Therapie auf [Fachinformation Almirall Solaraze® 3% Gel 2015]. Eine Studie zur Langzeitwirkung von Solaraze® konnte jedoch 1 Jahr nach der abgeschlossenen Behandlung eine Verbesserung des Hautbefundes gegenüber der Untersuchung 30 Tage nach Beendigung der Therapie finden. Nach 1 Jahr kam es bei 91.0% der Patienten zu einer 75-prozentigen und bei 79.0% der Zielläsionen zu einer 100-prozentigen Abheilung der AKs gegenüber Werten von 85.0% und 58.0% 30 Tage nach der Therapie [Nelson 2009].

Wie bereits beschrieben, sollte die Anwendung zweimal täglich über 60 bis 90 Tage erfolgen. Dabei ist eine erbsengroße Menge von 0,5 g für eine Läsion von 5x5 cm ausreichend. Insgesamt sollten jedoch Werte von 8 g nicht überschritten werden. Ferner darf das Gel bei Patienten mit bekannter Überempfindlichkeit gegenüber Diclofenac, Benzylalkohol, Alpha-Hydro-omega-methoxypolyoxyethylen und Natriumhyaluronat nicht verwendet werden. Aufgrund der nachgewiesenen Kreuzreaktion sollte das Gel außerdem nicht bei allergischen Reaktionen auf Acetylsalicylsäure oder sonstige NSAR aufgetragen werden. Ein besonders vorsichtiger Einsatz ist notwendig bei aktiven Magen-Darm-Geschwüren, -Blutungen und reduzierter Herz-/ Leber- und Nierenfunktion. Durch die thrombozytenhemmende Wirkung ist ferner

Vorsicht bei Patienten mit intrakraniellen Blutungen geboten. Darüber hinaus ist die lokale Verabreichung von Diclofenac im dritten Trimenon einer Schwangeren kontraindiziert, davor muss im Einzelfall entschieden werden. Während der Behandlung ist zusätzlich auf einen konsequenten Lichtschutz zu achten [Fachinformation Almirall Solaraze® 3% Gel 2015].

Die Häufigkeit der Nebenwirkungen bei der lokalen Therapie ist im Vergleich zu der systemischen Applikation sehr selten. Nebenwirkungen der Lokalthherapie sind lokale Hautreaktionen wie Pruritus, Rötung, Trockenheit der Haut, Schmerzen, Ödeme und Blasenbildung, photoallergische Reaktionen, Typ IV-Sensibilisierung sowie Hyp- und Parästhesien [Gebhardt 1994, Kerr 2002, Przybilla 1987, Kleyn 2004, Kowalzik 2006, Fachinformation Almirall Solaraze® 3% Gel 2015].

## **1.2 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie**

Vor dem Hintergrund der Invasivität der Routinehistologie und der Unvollständigkeit der Detektion der klinischen und besonders der periläsionalen subklinischen Läsionen durch die klinische Untersuchung der aktinischen Keratosen ergibt sich zunehmend das Bestreben, neue non-invasive diagnostische Verfahren zu etablieren. In den letzten Jahren wurde daher die Einsetzbarkeit der Reflektanz konfokalen Mikroskopie zur Diagnose der aktinischen Keratose getestet [Malvey 2015b, Welzel 2011]. Die RCM weist, verglichen mit der Routinehistologie, bei der Diagnose der aktinischen Keratosen bereits Sensitivitätsraten von 93.34% bis 97.7% auf und ist daher ein vielversprechendes Instrument zur Diagnose der AK [Ulrich 2007a, Horn 2008].

### ***1.2.1 Definition und historische Entwicklung***

Das Prinzip der Reflektanz konfokalen Mikroskopie wurde bereits 1957 durch den amerikanischen Forscher Marvin Minsky entdeckt. Er verwendete Weißlicht [Minsky 1961, Minsky 1988]. Dieses Verfahren wurde schließlich in den 90er Jahren unter Verwendung von Laserlicht an der Harvard Medical School durch Rajadhyaksha et al. weiterentwickelt [Rajadhyaksha 1995, Rajadhyaksha 1999a, Rajadhyaksha 1999b].

Die RCM ist ein unkompliziertes Verfahren, das die non-invasive Darstellung zellulärer Details in der Haut in vivo und nach Entnahme einer Hautprobe ex vivo ermöglicht. Es erlaubt die Beobachtung größerer Areale im Sinne der Feldkanzerisierung [Aghassi 2000, Horn 2008, Ulrich 2010, Ulrich 2007a, Malvey 2015b]. Das Verfahren wird auch als „optische Biopsie der Haut in Echtzeit“ bezeichnet und ermöglicht den Blick in die Epidermis und Dermis bis in das obere Stratum reticulare durch horizontale Schichtaufnahmen. In vivo wird sie bereits heute zur Diagnosestellung bei verschiedenen Hauterkrankungen wie melanozytären und nicht-melanozytären Läsionen, Verbrennungen, inflammatorischen Erkrankungen, Dermatitiden, Pigmentationen und Vitiligo eingesetzt. Bei den Hauttumoren, wie dem PEK, dient die RCM ferner dazu, die Ausdehnung des Tumors für die spätere Exzision zu bestimmen sowie zur Differenzierung zwischen PEK und AK. Zur Anwendung kommt sie ebenfalls im ästhetischen Bereich. So können Laserbehandlungen und Peelings mit der RCM überwacht und die Hautalterung sowie die Wund- und Narbenheilung dargestellt werden. Des Weiteren findet sie zunehmend Anwendung im therapeutischen Monitoring und bei der Diagnostik periläsionaler subklinischer Läsionen. Ex vivo wird das Verfahren bei der intraoperativen Schnittrandkontrolle von entnommenem Tumorgewebe erprobt [Welzel 2011, Ulrich 2012, Peppelman 2013 und 2014, Malvey 2015b, Blumetti 2016].

Durch die kontinuierliche Arbeit mit der RCM in großen Kliniken und die Durchführung neuer innovativer Studien kommen fortlaufend neue medizinische Einsatzgebiete hinzu. So ist die RCM in vielen Kliniken und einigen Praxen mittlerweile eine Standarduntersuchung.

### ***1.2.2 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie der gesunden Haut***

Um pathologische Muster in der konfokalen Lasermikroskopie zu erkennen, ist es notwendig, die normale Topografie der Haut in der RCM zu kennen und zu verstehen. Dabei ist es für das Verständnis der Bilder der RCM wichtig zu wissen, dass die RCM auf der Reflektion und Streuung von Licht des zu untersuchenden Gewebeabschnittes beruht. Durch Unterschiede in den Brechungsindices der einzelnen Zellstrukturen kommt es zu unterschiedlichen Reflektionsmustern mit daraus resultierenden sich unterscheidenden Graustufen in der computergestützten Darstellung. Dabei werden

verschiedene „endogene Kontrastmittel“ unterschieden [González 2008, Welzel 2011]. Genauere Einzelheiten werden in Kapitel 2.2.1 besprochen.

Aus Tabelle 3 lässt sich die Lokalisation der jeweiligen Hautschicht in der Tiefe und der Durchmesser der einzelnen Keratino-/ Korneozyten entnehmen. Tabelle 4 enthält die Evaluationskriterien der RCM der gesunden Haut mit der Erklärung des genauen Aussehens der konfokalmikroskopischen Bilder. Die Evaluationskriterien der Hautanhangsgebilde sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 3

***Lokalisation der jeweiligen Hautschicht und Durchmesser eines Keratino-/ Korneozyten.***

Hautschicht	Lokalisation	Durchmesser eines einzelnen Keratino-/ Korneozyten
Stratum corneum	0-15µm	25-50µm
Stratum granulosum	10-20µm	25-35µm
Stratum spinosum	20-100µm	15-25µm
Stratum basale	40-130µm	7-12µm
Stratum papillare	50-150µm	-
Stratum retikulare	>150µm	-

*Übernommen aus [González 2008].*

Tabelle 4

**Evaluationskriterien der RCM der gesunden Haut.**

Hautschicht	Evaluationskriterien
Stratum corneum	Polygonale kernlose Kerneozyten - helle Zellen, verwaschene Zellgrenzen Typische Hautfelderung, Furchung, Fältelung
Stratum granulosum	Honigwabenartiges Muster, klare Zellgrenzen Polygonale große Keratinozyten - dunkle zentrale ovale bis rundliche Zellkerne, schmaler heller Zytoplasmasaum mit granulärer Erscheinung
Stratum spinosum	Honigwabenartiges Muster, klare Zellgrenzen Kleinere Keratinozyten - dunkle zentrale ovale bis rundliche Zellkerne, schmaler heller Zytoplasmasaum mit granulärer Erscheinung
Stratum basale	Hauttyp I: gering pigmentierte Basalzellen können schlecht von der Umgebung abgegrenzt werden - insgesamt dunkle Basalzellen mit dunklem Zellkern Hauttyp II-IV: supranukleäre Melaninkappen formen ein regelmäßiges Pflastersteinmuster - helle Basalzellen mit dunklem Zellkern, die Helligkeit der Zellen korreliert mit dem Melaningehalt Vereinzelt runde bis sternförmige Melanozyten
Dermoepidermale Junktionszone	Hauttyp I: abgeflachte Reteleisten, basale Ringe um die dermalen Papillen fehlen, insgesamt dunkles Erscheinungsbild Hauttyp II-IV: Basalzellen formen helle Ringe um die dunklen dermalen Papillen
Dermis	Kollagenbündel mit retikulärem Muster unterschiedlicher Helligkeit Blutgefäße mit dunklem Lumen, im Lumen zirkulieren verschiedene Zellen: gut sichtbar sind Leukozyten, v. A. Granulozyten, und Erythrozyten

*Modifiziert und übersetzt nach [Huzaira 2001, González 2003, Calzavara-Pinton 2008, González 2008].*



Tabelle 5

**Evaluationskriterien der RCM der Hautanhangsgebilde.**

Hautanhangsgebilde	Evaluationskriterien
Haar	Haarfollikel: Aussehen ähnelt einem Donut: dunkles Zentrum, heller Ring Haarschaft: helle längliche azelluläre Struktur ausgehend vom Zentrum des Haarfollikels
Ekrine Drüse	Ausführungsgänge erscheinen als helle rundliche Struktur Schmäler als der Haarfollikel, weniger gerade, Mündung eigenständig auf der Epidermis
Apokrine Drüse	Ausführungsgänge erscheinen gerade, nicht spiralg Assoziation mit Haarfollikel
Talgdrüse	Aufgrund der tiefen Lokalisation physiologisch nicht sichtbar

*Modifiziert und übersetzt nach [González 2003, González 2008, Calzavara-Pinton 2008].*

### **1.2.3 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie der aktinischen Keratosen und der periläsionalen subklinischen Haut**

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Studien durchgeführt, die die aktinischen Keratosen mit der konfokalen Laserscanmikroskopie untersucht haben [Aghassi 2000, Ulrich 2007a, Ulrich 2007b, González 2008, Horn 2008, Longo 2013a, Longo 2013b, Ulrich 2008, Rishpon 2009, Richtig 2010, Ulrich 2010, Ahlgrimm-Siess 2011, Zalaudek 2014, Warszawik-Hendzel 2015, Longo 2016]. Daraus leiten sich verschiedene Kriterien ab, die in Tabelle 6 zu sehen sind. Diese Tabelle enthält ferner Erklärungen zum genauen Aussehen der konfokalmikroskopischen Bilder.

Die Studienlage zu Untersuchungen der periläsionalen subklinischen Haut mit der konfokalen Laserscanmikroskopie ist insgesamt limitiert. Drei Studien untersuchten die periläsionale subklinische Haut einmalig unabhängig von einer Therapie, eine weitere analysierte ihre Veränderungen zusätzlich im Verlauf unter der Verwendung der Creme Aldara®. Diese Studien konnten bei der Minderheit der Patienten das Auftreten von einzelnen vom Zellverband losgelösten Korneozyten, einer aufgehobenen Honigwabenstruktur mit atypischen Zellen im SG sowie dilatierter Blutgefäße finden. Hingegen konnte die Studie von Ulrich et al. bei allen Patienten eine aufgehobene

Honigwabenstruktur mit atypischen Zellen im SS sowie eine solare Elastose in der Dermis finden [Aghassi 2000, Horn 2008, Ulrich 2010].

Wie bei dem Vergleich von Tabelle 2 und 6 zu sehen ist, stimmen die Evaluationskriterien der RCM und der Routinehistologie weitestgehend überein.

Tabelle 6

***Evaluationskriterien der RCM der aktinischen Keratosen und der periläsionalen subklinischen Haut.***

Hautschicht	Evaluationskriterien
Stratum corneum	Einzelne vom Zellverband losgelöste Kerneozyten - helle polygonale Zellen Parakeratose - kleine hochrefraktilen Zellkerne mit granulärer Erscheinung Impetiginisation - inflammatorische Zellen: helle kleine runde Zellen
Stratum granulosum/ spinosum	Aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten - große Variabilität in Form und Größe von Zellen und Zellkern, irreguläre Zellgrenzen
Dermoepidermale Junktionszone/ Dermis	Ansteigende Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation - Blutgefäße mit dunklem vergrößertem Lumen; im Lumen zirkulieren verschiedene Zellen: gut sichtbar sind Leukozyten, v. A. Granulozyten, und Erythrozyten Solare Elastose - „huddled collagen“ - unorganisiertes hyporefraktilen Kollagen, dessen individuelle Fasern nicht erkennbar sind; „curled bright structures“ - wellenförmig verlaufende dicke, kurze hochrefraktilen Fasern

*Modifiziert und übersetzt nach [Aghassi 2000, Ulrich 2007a, Ulrich 2007b, González 2008, Horn 2008, Ulrich 2008, Rishpon 2009, Richtig 2010, Ulrich 2010, Ahlgrimm-Siess 2011, Longo 2013a, Longo 2013b, Zalaudek 2014, Longo 2016].*

#### ***1.2.4 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie der aktinischen Keratosen und der periläsionalen subklinischen Haut unter der Behandlung mit Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure***

Es gibt eine Vielzahl an Studien, die die aktinischen Keratosen unabhängig von einer Therapie einmalig mit dem konfokalen Lasermikroskop untersucht haben [Aghassi 2000, Ulrich 2007a, Ulrich 2007b, González 2008, Horn 2008, Ulrich 2008, Rishpon 2009, Richtig 2010, Ahlgrimm-Siess 2011, Zalaudek 2014]. Nur in einer Studie erfolgte bisher eine Verlaufsbeobachtung der aktinischen Keratosen und der periläsionalen subklinischen Haut vor Beginn der Therapie, nach 2 und 6 Wochen unter Solaraze<sup>®</sup>-Therapie und direkt nach Therapieende mit Hilfe der RCM [Malveyh 2015a].

Diese kam zu dem Ergebnis, dass bei dem Vergleich der verschiedenen Parameter vor und während der Therapie (nach 6 Wochen Therapie) die Schuppung und die atypische Honigwabenstruktur abnahmen, während die individuellen Korneozyten, Parakeratosen und die Inflammation zunahmen. Dieselben Parameterveränderungen wurden auch bei dem Vergleich vor Therapiebeginn und direkt nach dem Therapieende gefunden. Bei dem Vergleich der Parameter während (nach 6 Wochen Therapie) und direkt nach der Therapie kam es zu einem Abfall aller zuvor genannten Parameter. Ferner fiel nach dem Therapieende eine Umstrukturierung der Kollagenstruktur auf - während initial ungeordnetes hyporefraktilen Kollagen, dessen individuelle Fasern nicht zu erkennen waren (sog. „huddled collagen“) sowie wellenförmig verlaufende kurze dicke hochrefraktile Kollagenfasern imponierten (sog. „curled bright structures“), stellten sich nach Therapieende die Kollagenfasern als dünne parallel ausgerichtete Fasern dar [Malveyh 2015a].

### **1.3 Fragestellung und Kernziel**

Vor dem Hintergrund der hohen Prävalenz der AK und der Möglichkeit der Entartung ist es sinnvoll, Patienten mit aktinischen Keratosen frühzeitig zu therapieren. Ein häufig in der Therapie der AK eingesetztes Topikum ist das Solaraze<sup>®</sup> Gel mit dem aktiven Wirkstoff Diclofenac.

Der Wirkmechanismus des aktiven Wirkstoffes Diclofenac ist in der aktinisch geschädigten Haut bisher kaum in-vivo erforscht. Studien, die den Wirkmechanismus von Diclofenac in anderen Organsystemen untersucht haben, gibt es hingegen viele. Da die Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie bisher vielfach zur Visualisierung zellulärer Details in der Haut eingesetzt wurde, entschlossen wir uns, Patienten mit aktinischen Keratosen unter der Behandlung mit dem Solaraze® Gel zu untersuchen. Auch die periläsionale subklinische Haut wurde von uns aufgrund der zum Zeitpunkt der Initiierung und Durchführung unserer Studie dürftigen Studienlage zu 3 Zeitpunkten mituntersucht.

Das Kernziel unserer Studie war demnach, den Wirkmechanismus von Diclofenac in der Haut durch Visualisierung besser zu verstehen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen beschäftigten uns daher folgende Fragen:

- Wie wirkt der aktive Wirkstoff des Solaraze® Gels, Diclofenac, in der klinischen Haut?
- Besteht mit Hilfe der RCM die Möglichkeit der Detektion der periläsionalen subklinischen Läsionen?
- Wie reagiert die periläsionale subklinische Haut unter der Therapie mit dem Solaraze® Gel?
- Stimmen die Ansprechraten der Therapie mit denen der Literatur überein?

In diesem Zusammenhang ergab sich abschließend folgende Frage:

- Eignet sich die RCM zur Visualisierung des Behandlungseffekts des Solaraze® Gels in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut?

Um diese Fragen zu beantworten, führten wir eine deskriptive Analyse und verschiedene statistische Tests anhand der erhobenen Bilder und Daten durch.

Im nachstehenden Kapitel wird auf die Studienpopulation, das verwendete Studiengerät, den Studienablauf und die verwendeten statistischen Tests genauer eingegangen. Im Ergebnisteil werden die Resultate der morphologischen Untersuchung und der statistischen Tests nacheinander aufgeführt und im darauffolgenden

Diskussionsteil im Kontext mit den zu diesem Thema bestehenden Studien kritisch diskutiert. Abschließend erfolgt eine Zusammenfassung mit einem Überblick über die gesamte Arbeit.

## **2. Patienten und Methoden**

### **2.1 Studienpopulation**

Eine Gesamtzahl von 22 kaukasischen Studienteilnehmern mit milden bis moderaten aktinischen Keratosen im Gesicht und an der Kopfhaut wurde initial in die klinische Studie eingeschlossen. Die Patienten waren zwischen 61 und 92 Jahre alt. 2 Frauen und 20 Männer nahmen an der Studie teil. Von den 22 Teilnehmern mussten 4 Teilnehmer aufgrund von lokalen Nebenwirkungen unter der Therapie oder Nichterscheinen zu den vereinbarten Untersuchungsterminen jedoch von der Studie ausgeschlossen werden.

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte aus dem Hauttumorzentrum der Abteilung für Dermatologie und Allergologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Deutschland. Es wurden Patienten mit dem Fitzpatrick-Lichttyp I bis III untersucht.

Einschlusskriterien für diese Studie waren das Vorliegen multipler aktinischer Keratosen mit Zeichen von Feldkanzerisierung, wahlweise im Gesicht oder an der Kopfhaut. Ferner mussten die Studienteilnehmer die Einverständniserklärung nach vorheriger ausführlicher Aufklärung über den Studienablauf unterschreiben.

Als Ausschlusskriterium wurden Patienten mit anderen relevanten Dermatosen im Bereich des gesamten Integuments sowie mit invasiven Tumoren im Untersuchungsareal festgelegt. Ausgeschlossen wurden ebenfalls Patienten mit einer Vortherapie der aktinischen Keratosen in den letzten 3 Monaten und AKs mit signifikanten Hyperkeratosen. Auch das Vorliegen ernsthafter internistischer Vorerkrankungen, eine bekannte Allergie gegen die Inhaltsstoffe der Studienmedikation sowie eine Allergieentstehung im Verlauf der Untersuchung führten zum Studienausschluss.

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte unter Berücksichtigung der für die klinische Diagnose der aktinischen Keratosen vorhandenen international anerkannten Kriterien, die bereits in 1.1.3.1 näher beschrieben wurden. Das Studienvorhaben wurde von der zuständigen Ethikkommission (Ethiknummer EA1/020/09) genehmigt und die Untersuchungen in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Datenschutzgesetz wurde durch Verschlüsselung der Daten der Patienten befolgt. Die Erhebung der Daten erfolgte von November 2009 bis Februar 2011 und wurde ohne das Wissen der parallel dazu ablaufenden Studie von Malvey und Kollegen durchgeführt [Malvey 2015a].

## **2.2 Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie**

### **2.2.1 Grundprinzip**

Das optische Grundprinzip der RCM lässt sich mit dem des Ultraschalls vergleichen. Es besteht aus 3 wesentlichen Komponenten - einer Lichtquelle, einer Lochblende und einem Detektor.

Bei der Lichtquelle handelt es sich um einen Dioden-Laserstrahl, der im nahen Infrarotbereich (830 nm) arbeitet. Sein Strahl tastet die Haut in horizontaler Richtung ab, im Gegensatz zur Routinehistologie, bei der sich die vertikale Schnittführung etabliert hat [<http://www.vivascope.de>, Welzel 2011]. Der Dioden-Laserstrahl wird durch eine Linse auf das zu untersuchende Hautareal fokussiert. Dort wird das Laserlicht durch endogene Chromophore wie Melanin, Zellorganellen, Keratin und andere Mikrostrukturen reflektiert, absorbiert oder gestreut. Der von der Haut reflektierte Laserstrahl gelangt zurück zum Detektor, vor dem sich eine Lochblende befindet, die alle Lichtsignale herausfiltert, die nicht aus der fokussierten Ebene kommen. Der reflektierte Laserstrahl wird durch das Gerät in 2-dimensionale Bilder in unterschiedlichen Graustufen umgewandelt und auf dem hochauflösenden Computerbildschirm dargestellt (Abbildung 4) [Calzavara-Pinton 2008, Welzel 2011]. Die sich unterscheidenden Graustufen in der computergestützten Darstellung beruhen auf den unterschiedlichen Brechungsindices der „endogenen Kontrastmittel“. Dabei gilt grundsätzlich, dass an der Grenzfläche zweier Medien mit sich deutlich unterscheidenden Brechungsindices das Licht umso stärker gebrochen und reflektiert wird. Je höher dabei die Reflexion ausfällt, desto mehr Licht wird vom Detektor

aufgenommen und umso heller ist auch die Farbe der korrespondierenden intrazellulären bzw. extrazellulären Mikrostruktur im konfokalen Bild [González 2008, Welzel 2011]. Melanin hat mit einem Brechungsindex von  $n=1.72$  den höchsten Wert und ist folglich der stärkste Kontrastgeber [Rajadhyaksha 1995, Vitkin 1994]. Weitere starke Kontrastgeber sind Keratin ( $n=1.51$ ) und hydriertes Kollagen ( $n=1.43$ ). So erscheinen basal gelegene Keratinozyten und Melanozyten hell (weiß) im Bild, da sie von Strukturen mit geringeren Brechungsindices umgeben sind [González 2008]. Zu den Strukturen mit geringeren Brechungsindices gehören die Epidermis ( $n=1.34$ ) und Dermis ( $n=1.41$ ) [Tearney 1995, Wang 1996].

Da sich die Lichtquelle, der fokussierte Punkt auf der Haut und die Blendenöffnung des Detektors in optisch konjugierten fokalen Ebenen, aus dem Englischen „conjugated focal planes“, befinden, lässt sich daraus der Name der konfokalen Laserscanmikroskopie ableiten [<http://www.vivascope.de>].

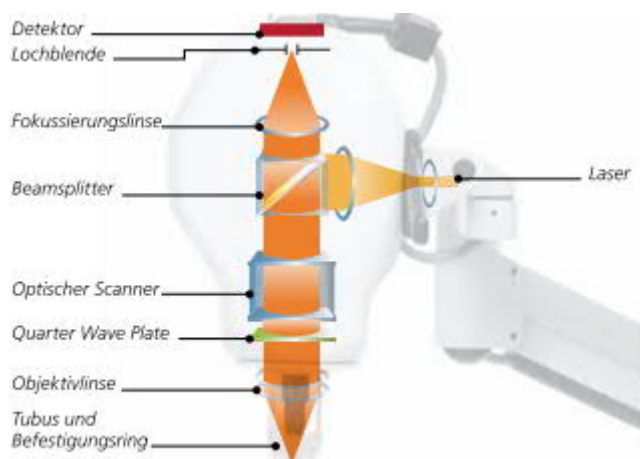


Abb. 4

**Schematische Darstellung des optischen Prinzips des VivaScope<sup>®</sup> 1500. Beamsplitter = Strahlteiler, Quarter Wave Plate =  $\lambda/4$ -Plättchen [<http://www.vivascope.de>].**

### 2.2.2 Technischer Aufbau

Man unterscheidet zwischen verschiedenen erhältlichen konfokalen Laserscanmikroskopen, dem VivaScope<sup>®</sup> 1500, 1500 Multilaser, 2500 Multilaser und 3000. Sie ermöglichen unterschiedliche Untersuchungen und lassen sich demnach in

verschiedenen Bereichen einsetzen. Das RCM VivaScope<sup>®</sup> 1500 (Lucid, Henrietta, NY; <http://www.lucid-tech.com>) wurde für diese Studie verwendet [Welzel 2011] .

Das VivaScope<sup>®</sup> 1500 ist aus verschiedenen Komponenten aufgebaut. Der Gerätwagen besteht aus einer Ablagefläche, Tastatur, Haltefläche inklusive Makrokamera, einem PC inklusive Monitor und einem flexiblen Schwenkarm, an dem der 830 nm Dioden-Laser befestigt ist (Abbildung 5) [<http://www.vivascope.de>]. Das Gerät verwendet Laserlicht der Wellenlänge 830 nm bei einer Beleuchtungsstärke von 5 bis 10 mW. Dabei verursacht es keinen Gewebe- oder Augenschaden. Es ist routinemäßig mit einem 30x Wasserimmersionsobjektiv ausgestattet und verfügt über eine numerische Apertur von 0.9. Durch die vor dem Detektor befindliche Lochblende mit sehr kleiner Apertur wird das reflektierte Licht jenseits der fokalen Ebene herausgefiltert. Daraus ergibt sich das hohe Auflösungsvermögen der RCM [González 2008]. So besteht ein laterales Auflösungsvermögen  $<1\mu\text{m}$  [Rajadhyaksha 1999b, Welzel 2011] bzw.  $<1.25\mu\text{m}$  [<http://www.vivascope.de>]. Es liegt folglich im zellulären Bereich. Die axiale Auflösung beträgt  $<5\mu\text{m}$  und entspricht der Schichtdicke von normalen histologischen Untersuchungen [Rajadhyaksha 1999a, Rajadhyaksha 1999b, Welzel 2011, <http://www.vivascope.de>]. Die Eindringtiefe der RCM liegt bei 250 bis 300 $\mu\text{m}$  [Astner 2010] bzw. 350 $\mu\text{m}$  [Rajadhyaksha 1999a, Rajadhyaksha 1999b] und ermöglicht folglich die Darstellung epidermaler und oberflächlich dermaler Prozesse.



Abb. 5

**Komponenten des VivaScope<sup>®</sup> 1500 [<http://www.vivascope.de>].**



Zur Untersuchung der Patienten wird der wiederverwendbare Edelstahl-Gewebering der RCM mit einem transparenten Klebplättchen versehen. Durch Fixation auf der Haut können bewegungsbedingte Artefakte minimiert werden. Vor der Fixation auf der Haut wird ein kleiner Tropfen Immersionsöl zwischen Haut und Kunststofffenster gegeben. Das Öl verbessert den Kontakt zwischen Haut und transparentem Klebering und steigert somit die Qualität der konfokalen Bilder. Des Weiteren soll es Lufteinschlüsse minimieren und folglich die Entstehung von Bildartefakten unterbinden. Da sich die Refraktionsindices von Öl ( $n=1.50$ ), Stratum corneum ( $n=1.55$ ) und transparentem Klebefenster ( $n=1.52$ ) ähneln, wird verhindert, dass an der Grenzfläche der 3 Medien das Licht frühzeitig gebrochen und reflektiert wird. Als Immersionsmedium wird ein Gel auf Wasserbasis verwendet, zumeist Ultraschallgel ( $n=1.35$ ), da dieses einen ähnlichen Brechungsindex wie die Epidermis ( $n=1.34$ ) besitzt. Das Ultraschallgel wird auf den auf der Haut fixierten Klebering gegeben. Die Verbindung zwischen Edelstahl-Gewebering und dem Gehäuse des Objektivs erfolgt magnetisch (Abbildung 6-10) [González 2008].



Abb. 6-10

**Ablauf der Untersuchung mit dem VivaScope<sup>®</sup> 1500 [http://www.vivascope.de].**

Man unterscheidet eine Vielzahl verschiedener Aufnahmemöglichkeiten der RCM. Neben der Möglichkeit der Erstellung von Einzelbildern (Bildgröße  $500 \times 500 \mu\text{m}$ ) gibt es die Möglichkeit VivaBlocks<sup>®</sup>, VivaStacks<sup>®</sup> und VivaCubes<sup>®</sup> anzufertigen.

Der VivaBlock<sup>®</sup> scannt die Haut in einer Ebene (XY-Ebene) mit einer maximalen Größe von  $8 \times 8 \text{mm}$  mit bis zu  $16 \times 16$  Einzelbildern. Die Auflösung der VivaBlocks<sup>®</sup> beträgt  $2 \text{ Pixel} / \mu\text{m}$ . Der VivaStack<sup>®</sup> stellt hingegen eine „optische Stanzbiopsie“ in der Z-Ebene dar. Die Idee des VivaCubes<sup>®</sup> ist es, ein bestimmtes Hautareal in Ausdehnung und Tiefe durch die Kombination von VivaBlock<sup>®</sup> und VivaStack<sup>®</sup> (XYZ-Ebene) durchzuscannen, d. h. eine 3D-Umwandlung durchzuführen. Da diese Software zum Zeitpunkt der Untersuchung fehlte, werden bei der Verwendung dieses Programmes ausschließlich 3 Blocks von unterschiedlichen zuvor festgelegten Ebenen gemacht. Die

vorhandene Makrokamera namens VivaCam<sup>®</sup>, die über den Standardring auf die Haut aufgesetzt werden kann, erzeugt Bilder mit 5 Megapixeln auf einer Bildfläche von 10x10mm und ermöglicht eine Korrelation zwischen dem makroskopischen Bild und den durch das VivaScope<sup>®</sup> erzeugten konfokalen Bildern. Die Navigation in der Läsion wird auf diese Weise erleichtert [<http://www.vivascope.de>].

### **2.2.3 Software**

Die Software des Gerätes heißt VivaScan<sup>®</sup>. Sie ermöglicht die Darstellung, Bearbeitung sowie Archivierung von konfokalen Bildern, Videos, makroskopischen Aufnahmen und Patientendaten. Weitere Softwaremerkmale sind die „Automatic Image Control“, der „Electronic Zoom“ und das „Video Capture Software Modul“ [<http://www.vivascope.de>].

Mit Hilfe der „Automatic Image Control“ erfolgt eine automatische Anpassung der Bildintensität [<http://www.vivascope.de>]. Das „Video Capture Software Modul“ ermöglicht die Aufnahme von Videosequenzen mit 15 bis 25 Einzelbildern/ Sekunde [González 2008]. Mit dieser Funktion kann zum Beispiel die Adhäsion der Leukozyten und ihr Entlangrollen am Endothel visualisiert werden [González 2001]. Der „Electronic Zoom“ erlaubt die Vergrößerung eines Bildes auf das 1.7-fache [<http://www.vivascope.de>].

## **2.3 Studienablauf**

Pro Patient wurde eine klinisch charakteristische AK wahlweise im Gesicht oder an der Kopfhaut sowie ein periläsionales subklinisches, d. h. klinisch gesundes Hautareal, ausgesucht. Der Abstand der periläsionalen subklinischen Läsion musste mindestens 1 cm zu einer klinisch sichtbaren AK im Behandlungsareal betragen. Die definierten Läsionen wurden auf einer Rasterfolie eingezeichnet, um eine spätere Verwechslung während der Folgeuntersuchungen zu vermeiden. Auf der Rasterfolie wurden sogenannte Landmarken, wie z. B. die Augenbrauen und der Haaransatz, zusätzlich markiert, um ein Wiederauftreten der Läsionen im Zeitverlauf zu erleichtern. Bei 18 in

der Studie ausgewerteten Teilnehmern, von initial 22 eingeschlossenen Patienten, wurde demnach eine Gesamtzahl von 18 klinischen und 18 periläsionalen subklinischen Läsionen zu 3 verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Patienten wurden aufgefordert das Solaraze® Gel zweimal täglich über einen Zeitraum von 90 Tagen großflächig auf die AKs und ihre umliegende Haut aufzutragen. Sie wurden über die genaue Anwendung des Gels und potenzielle Nebenwirkungen aufgeklärt, die bereits in 1.1.4.1 genauer erläutert wurden. Die zuvor definierten klinischen und periläsionalen subklinischen Hautareale wurden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten untersucht, einmal vor Beginn der Applikation des Solaraze® Gels, nach 45 Tagen Therapie und erneut nach 120 Tagen, d. h. 30 Tage nach Beendigung der Therapie (Abbildung 11).

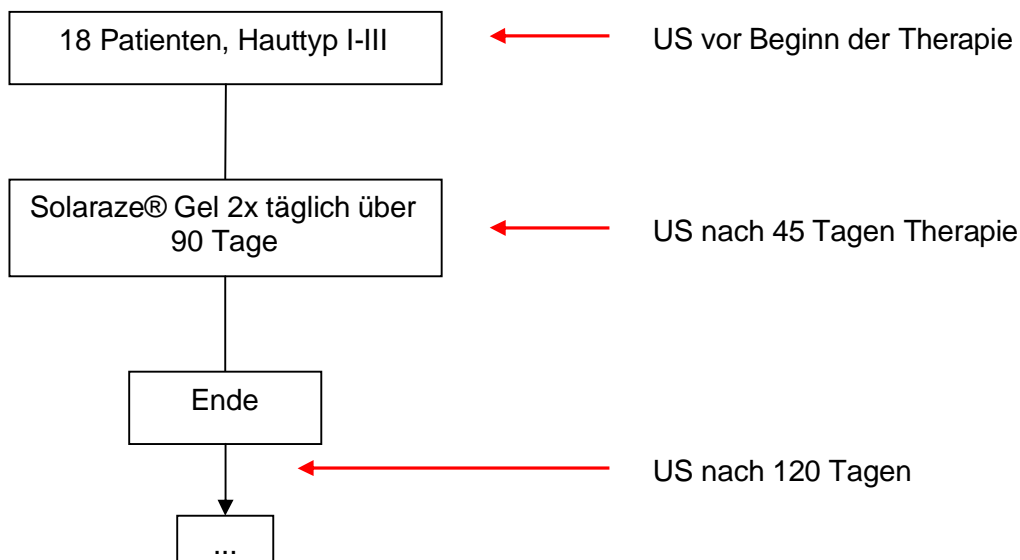


Abb. 11

**Zeitpunkt der 3 Untersuchungen.**

Jede Untersuchung erfolgte nach einem standardisierten Schema. Bei jedem Termin erfolgte zunächst eine Befragung des Patienten über die Verträglichkeit der Therapie und eine klinische Gesamtbeurteilung. Im Anschluss an die klinische Begutachtung wurde die systematische Untersuchung mit der Reflektanz konfokalen Lasermikroskopie durchgeführt.

Jedes zu untersuchende Hautareal wurde dabei vor der Untersuchung zunächst zur Reinigung und Entfettung der Haut desinfiziert. In der Zwischenzeit wurde der Edelstahl-Gewebering der RCM mit einem transparenten Klebering, das für jede

Untersuchung erneuert wurde, versehen. Die Fixation auf der zu untersuchenden Hautstelle erfolgte durch Hinzugabe eines Tropfens Öl zwischen Haut und Kunststofffenster. Im Anschluss wurde ein dermatoskopisches Bild mittels VivaCam<sup>®</sup> durch Positionierung auf dem Metallring aufgenommen, das zur späteren Navigation in der Läsion diente. Anschließend wurde eine kleine Menge Ultraschallgel auf das Klebefenster gegeben. Danach erfolgte eine magnetische Verbindung zwischen Edelstahl-Gewebering und dem Gehäuse des Objektivs. Das gewünschte Hautareal konnte untersucht werden. Zum Abschluss der Untersuchung wurde vom Untersucher die zuvor eingeschaltete Software beendet, der Gewebering von der Haut abgelöst und die Haut von möglichen Rückständen des Untersuchungsmaterials befreit. Des Weiteren erfolgte die Reinigung des Metall- und Entsorgung des Kleberinges.

Bei jedem Patienten erfolgte pro Läsion und Termin die Aufnahme von Einzelbildern (Bildgröße 500x500µm), VivaBlocks<sup>®</sup>, VivaStacks<sup>®</sup> und vereinzelt VivaCubes<sup>®</sup>, so dass genügend Bildmaterial vorhanden war für die differenzierte Beurteilung von Stratum corneum (SC), Stratum spinosum (SS)/ granulosum (SG) und dermoepidermale Junktionszone (DEJ)/ Dermis (D). Einige Einzelbilder oder Serienaufnahmen konnten aufgrund der eingeschränkten Bildqualität nicht ausgewertet werden. Die gesamte klinische und lasermikroskopische Untersuchung dauerte pro Termin ca. 20 bis 30 Minuten.

Das gesamte Bildmaterial wurde durch 2 unabhängige Untersucher evaluiert. Die Auswertung der konfokalmikroskopischen Bilder erfolgte verblindet in Bezug auf Name, Alter und Geschlecht anhand der aufgestellten Tabellen 7-9. Diese Tabellen enthalten die unterschiedlichen beobachteten Evaluationskriterien je nach Zeitpunkt der Untersuchung. In Tabelle 7 wurden dabei die bereits bekannten konfokalmikroskopischen Evaluationskriterien der AK berücksichtigt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe des binären Klassifikationssystems (+/- bzw. vorhanden/nicht vorhanden).

Die Auswertung für die periläsionalen subklinischen Läsionen wurde nach denselben Parametern wie die der klinischen Läsionen vorgenommen, da man davon ausgeht, dass es im Rahmen der Feldkanzerisierung in der periläsionalen subklinischen Haut zu ähnlichen Auffälligkeiten wie in der klinisch auffälligen Haut kommt [Slaughter 1953, Braakhuis 2003]. Diese Annahme konnte durch drei Studien bestätigt werden. Dabei unterschieden sich die Evaluationskriterien nur in den Häufigkeiten des Auftretens in

der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut [Aghassi 2000, Horn 2008, Ulrich 2010].

Neben den in Tabelle 7-9 dargestellten Kriterien wurde im Rahmen dieser Studie auch eine starke Entzündungsreaktion unter der Therapie an Termin 2 sowie ein Abheilen an Termin 3 in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut untersucht (Tabelle 10). Um eine starke Entzündungsreaktion unter der Therapie beurteilen zu können, erfolgte der Vergleich mit den Bildern vor Beginn der Therapie. Die klinische und periläsionale subklinische Haut des jeweiligen Patienten galt als abgeheilt, wenn die Honigwabenstruktur mit regulären Korneozyten wiederhergestellt war. Auch die Auswertung dieser Werte erfolgte binär (+/ - bzw. vorhanden/ nicht vorhanden).

Tabelle 7

**Studienprotokoll: Evaluationskriterien der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut in der RCM vor Beginn der Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterien	+	-
SC	Einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten Parakeratose Impetiginisation		
SG/ SS	Aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten Spongiose Dendritische Zellen Runde Entzündungszellen		
DEJ/ D	Dendritische Zellen Runde Entzündungszellen Erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation Solare Elastose		

*SC = Stratum corneum, SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junctionszone, D = Dermis. Modifiziert und übersetzt nach [Aghassi 2000, Ulrich 2007a, Ulrich 2007b, González 2008, Horn 2008, Ulrich 2008, Rishpon 2009, Richtig 2010, Ulrich 2010, Ahlgrimm-Siess 2011, Longo 2013a, Longo 2013b, Zalaudek 2014, Longo 2016].*

Tabelle 8

**Studienprotokoll: Evaluationskriterien der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut in der RCM nach 45 Tagen Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterien	+	-
SG/ SS	Apoptosen Mikrovesikel Dendritische Zellen Runde Entzündungszellen		
DEJ/ D	Dendritische Zellen Runde Entzündungszellen		

SG = *Stratum granulosum*, SS = *Stratum spinosum*, DEJ = *Dermoepidermale Junctionszone*, D = *Dermis*.

Tabelle 9

**Studienprotokoll: Evaluationskriterien der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut in der RCM 30 Tage nach Beendigung der Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterien	+	-
SC	Reguläre polygonale kernlose Korneozyten		
SG/ SS	Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten Kein Entzündungsinfiltrat		
DEJ/ D	Kein Entzündungsinfiltrat Normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße Solare Elastose		

SC = *Stratum corneum*, SG = *Stratum granulosum*, SS = *Stratum spinosum*, DEJ = *Dermoepidermale Junctionszone*, D = *Dermis*. Modifiziert und übersetzt nach [Huzaira 2001, González 2003, Calzavara-Pinton 2008, González 2008].

Tabelle 10

**Studienprotokoll: Weitere Evaluationskriterien der klinischen bzw. periläsionalen subklinischen Haut.**

Evaluationskriterien	+	-
Starke Entzündungsreaktion nach 45 Tagen Therapie		
Abheilung 30 Tage nach Beendigung der Therapie		

## 2.4 Statistische Analyse

Nach der Durchführung der klinischen Untersuchungen erfolgte die Analyse aller erhobenen konfokalmikroskopischen Bilder durch 2 unabhängige Untersucher anhand der in 2.3 aufgezeigten Evaluationskriterien. Die erhaltenen Daten wurden im Anschluss durch verschiedene Tests statistisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes IBM SPSS STATISTICS 20 für Windows.

Zunächst wurden die Häufigkeiten der einzelnen RCM-Parameter in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut zu 3 verschiedenen Zeitpunkten berechnet. Diese Auswertung fand statt, um die Frage zu beantworten, ob die von uns beobachteten Veränderungen der AKs und der periläsionalen subklinischen Haut mit denen der Literatur übereinstimmen und ob es Merkmale gibt, die in der Literatur zuvor nicht beschrieben wurden. Des Weiteren wurden die Daten einer Konkordanzanalyse zugeführt, um die Ergebnisübereinstimmung und Reproduzierbarkeit der einzelnen Parameter zwischen den beiden Untersuchern zu überprüfen. Die Auswertung des mit der Kappa-Analyse ermittelten Cohens Kappa-Koeffizienten erfolgte nach der Altman-Klassifikation. Danach führten wir den McNemar-Test für verbundene Stichproben durch, um herauszufinden, ob die klinische und periläsionale subklinische Haut unter der Therapie gleich reagieren. Bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  (Irrtumswahrscheinlichkeit 5.0%) wurde das Ergebnis als signifikant gewertet. Die Zunahme der Entzündung unter der Therapie wurde in einer Kreuztabelle dargestellt. Ferner führten wir den Vierfelder-Chi<sup>2</sup>-Test durch, um den Zusammenhang zwischen einer starken Entzündungsreaktion während der Therapie und dem Abheilen 30 Tage nach Beendigung der Therapie näher zu beleuchten. Die mit Hilfe dieses Tests ermittelten Phi-Korrelationskoeffizienten wurden nach der allgemeingültigen Klassifikation von Prof. Brosius, der das Buch „SPSS 19“ verfasst hat, ausgewertet [Brosius 2011]. Abschließend interessierte uns, ob die klinische und periläsionale subklinische Haut in gleicher Weise auf die Therapie mit einer Abheilung/ einem Ausbleiben der Abheilung reagieren. Hierzu führten wir erneut den McNemar-Test durch. Auch hier galt ein p-Wert  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant.

Folgendes muss zu den durchgeführten statistischen Tests abschließend angemerkt werden. Da wir eine Vielzahl von Hypothesen auf einen Datensatz testeten, stieg die Fehlerwahrscheinlichkeit ein falsch-positives Ergebnis zu erhalten - die sogenannte

alpha-Kummulierung. Die relativ kleine Stichprobe und die Tatsache, dass wir selbst bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bei den Hypothesen keine bzw. nur einzelne signifikante Ergebnisse fanden, führten zu einem Verzicht der Durchführung der alpha-Fehlerkorrektur. Es handelte sich demnach bei unserer Studie um eine explorative Datenanalyse. Schlussfolgerungen von der Stichprobe auf die Grundgesamtheit bei den durchgeführten statistischen Tests sind folglich problematisch.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Morphologische RCM-Analyse**

Im Folgenden werden 1 bis 4 charakteristische Bilder zu den jeweiligen Evaluationsparametern gezeigt und im Einzelnen genauer erklärt. Die Anordnung der Bilder entspricht dabei der Reihenfolge der Erhebung der Daten. Die Beschreibung der einzelnen Evaluationskriterien erfolgt von epidermal nach dermal. Dabei ist anzumerken, dass die Parameter, die sich im SG/ SS und in der DEJ/ D wiederholen unter einem Unterpunkt zusammengefasst werden. Wir stellten ferner fest, dass die in der klinischen Haut gefundenen Evaluationskriterien dasselbe Aussehen wie in der periläsionalen subklinischen Haut hatten, so dass aus Übersichtsgründen ausschließlich Bilder aus den aktinischen Keratosen gezeigt werden.

##### **3.1.1 Vor Beginn der Therapie**

###### **3.1.1.1 Einzelne vom Zellverband losgelöste Kerneozyten**

Die vom Zellverband losgelösten Kerneozyten stellten sich als helle polygonale vereinzelt auftretende Zellen im SC dar (Abbildungen 12-13). Sie lösten sich aus dem Verbund von Kerneozyten. Das klinische Korrelat war die Desquamation.



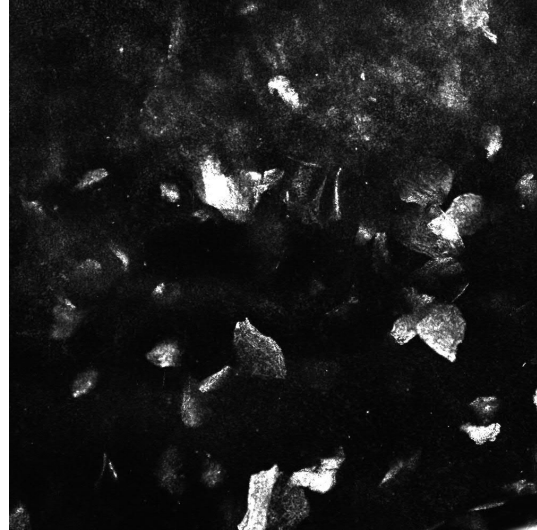
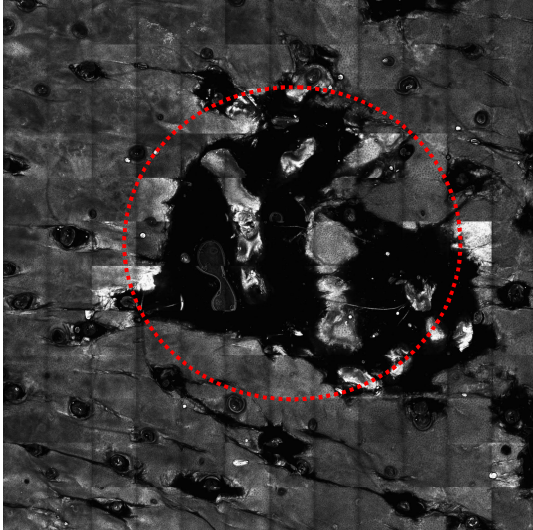


Abb. 12-13

***RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Abb. 12 zeigt einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten in der Übersicht (roter Kreis), in der Nahaufnahme Abb. 13 sind die losgelösten Zellen des Stratum corneum im Detail sichtbar.***

### 3.1.1.2 Parakeratose

Bei der Parakeratose handelt es sich um eine Verhornungsstörung, bei der der Zellkern oder Zellkernreste in den Korneozyten im Stratum corneum verbleiben. Das morphologische Korrelat sind kleine irreguläre hochrefraktilen Zellkerne. Es konnten runde bis ovale Zellen mit granulärer Erscheinung gesehen werden (Abbildung 14). Auch die Parakeratose erschien klinisch als Desquamation.

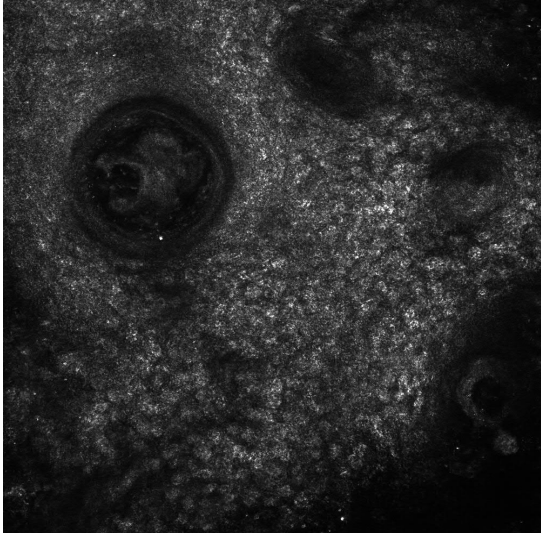


Abb. 14

***RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Multiple Parakeratosen im SC sind dargestellt.***

### *3.1.1.3 Impetiginisation*

Die Impetiginisation beschreibt eine sekundäre bakterielle Infektion der Haut. Dabei kamen kleine runde inflammatorische Zellen im SC vor, die ihm ein graues körniges Aussehen gaben (Abbildung 15).

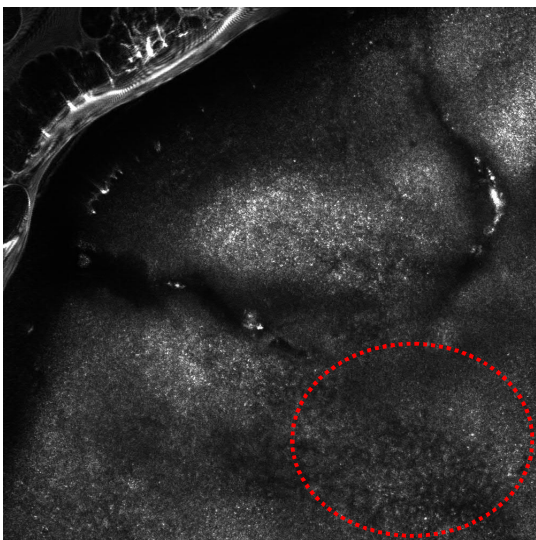


Abb. 15

***RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Eine großflächige Impetiginisation im SC ist in der Darstellung sichtbar (rotes Oval).***

#### *3.1.1.4 Aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten*

Die atypischen Keratinozyten im SG/ SS zeichneten sich durch eine große Variabilität in Form und Größe von Zelle und Zellkern aus. Die Zellgrenzen waren irregulär und die regelhafte epidermale Architektur aufgehoben (Abbildung 16).

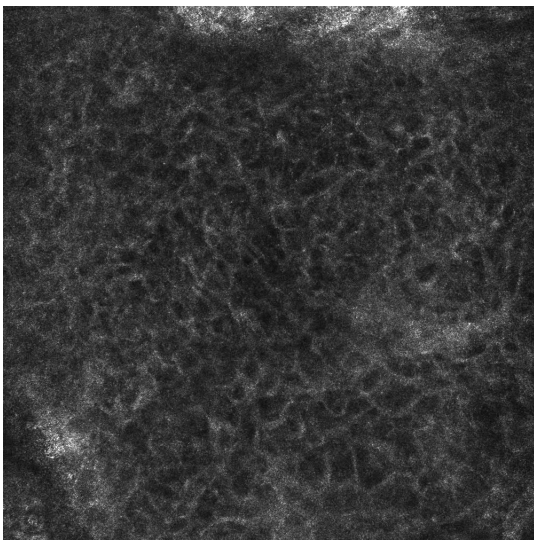


Abb. 16

***RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Die Honigwabenstruktur der Haut im SG/ SS ist durch die atypischen Keratinozyten aufgehoben. Die Zellgrenzen sind irregulär.***

#### *3.1.1.5 Spongiose*

Bei der Spongiose handelt es sich um ein interzelluläres Ödem, das durch die Einwanderung von Entzündungszellen entsteht. Hierbei stellte sich der Interzellularraum im Vergleich zur gesunden Haut heller und insgesamt verbreitert dar (Abbildung 17). Dieses Ödem trat im Stratum granulosum und spinosum auf.

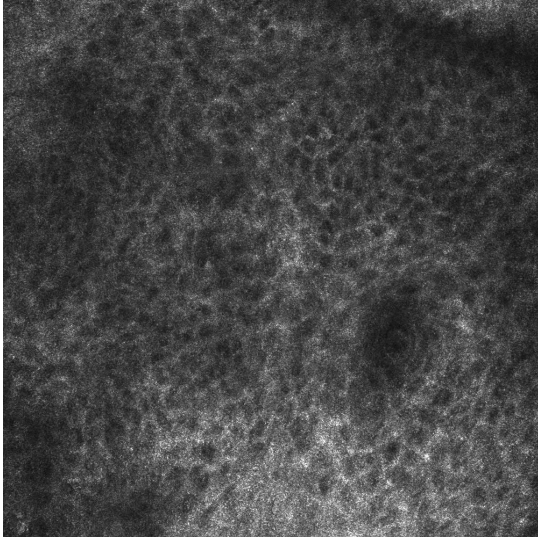


Abb. 17

***RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Die Abbildung zeigt eine ausgeprägte Spongiose des SG/ SS.***

#### *3.1.1.6 Dendritische Zellen*

Als weiteres Merkmal wurden im SG/ SS und der DEJ/ D dendritische Zellen beobachtet. Diese Zellen zeigten sich in Form eines hellen spindelförmigen Zellkörpers und feingliedrig verzweigter Zellfortsätze - den Dendriten (Abbildungen 18-21). Die dendritischen Zellen kamen vereinzelt aber auch gruppiert vor und waren häufig von einem Infiltrat aus hellen kleinen Entzündungszellen umgeben.

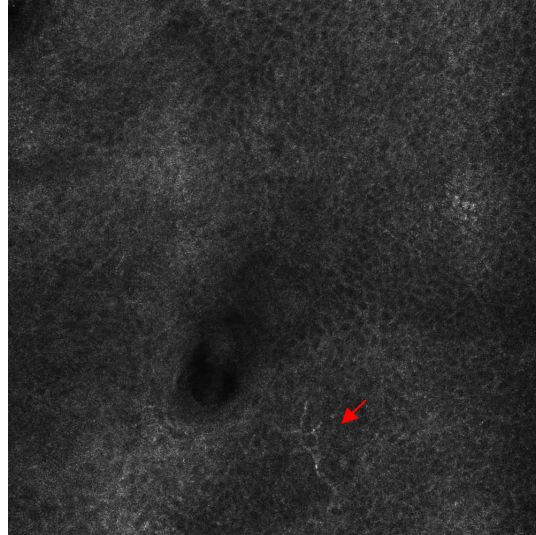
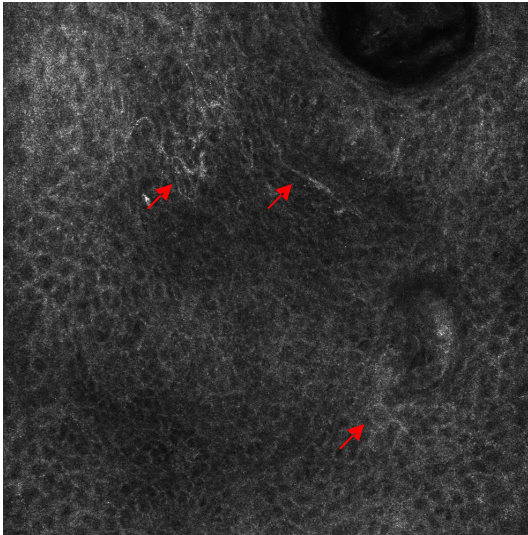


Abb. 18-19

**RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Abb. 18 stellt mehrere Dendriten der dendritischen Zellen dar, in Abb. 19 sieht man eine prominente dendritische Zelle (rote Pfeile). Beide Aufnahmen stammen aus dem SG/ SS.**

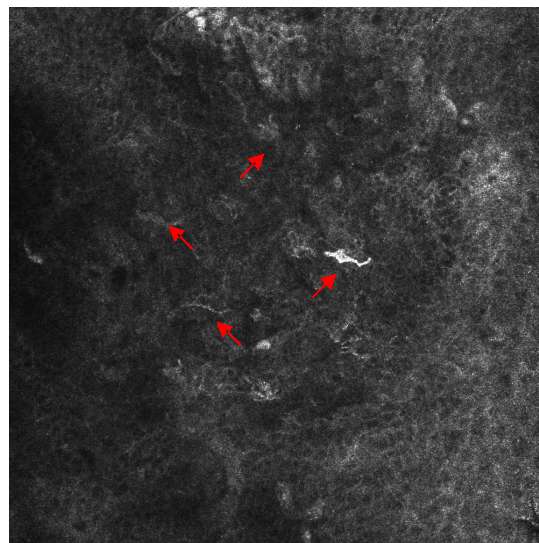
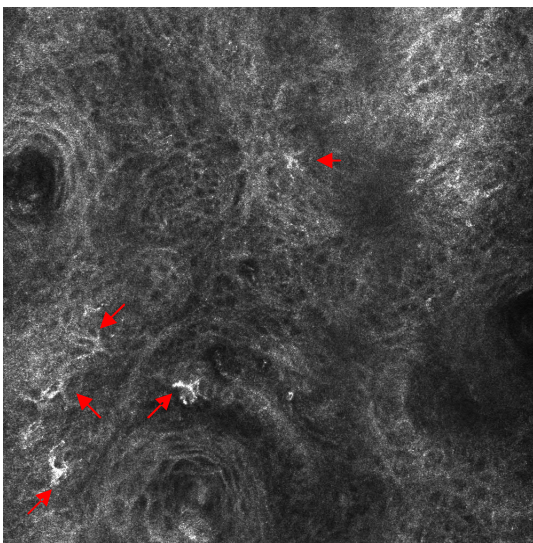


Abb. 20-21

**RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. In Abb. 20 und 21 sind multiple dendritische Zellen dargestellt (rote Pfeile). Die Bilder stammen aus der DEJ/ D.**

### 3.1.1.7 Runde Entzündungszellen

Die hellen kleinen runden Zellen stellten sich als kleine helle Punkte im Bereich des SG/SS und der DEJ/ D dar. Diese kamen im Rahmen eines entzündlichen Prozesses in der Haut zumeist gruppiert vor (Abbildungen 22-23).

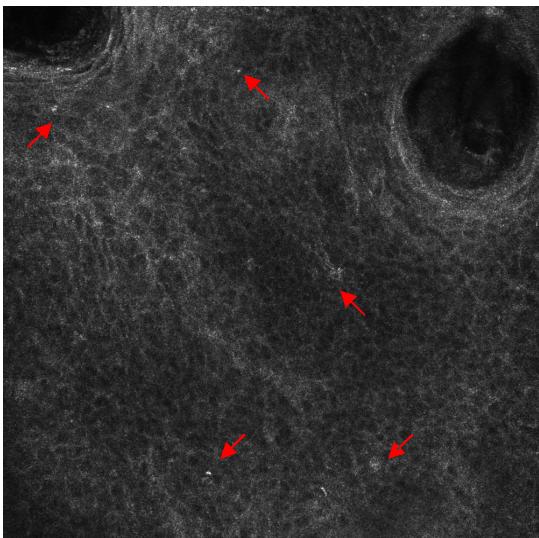


Abb. 22

**RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Ein leichtes Infiltrat in Form von kleinen runden Entzündungszellen ist sichtbar (rote Pfeile). Die Aufnahmen entstanden auf Höhe des SG/ SS.**

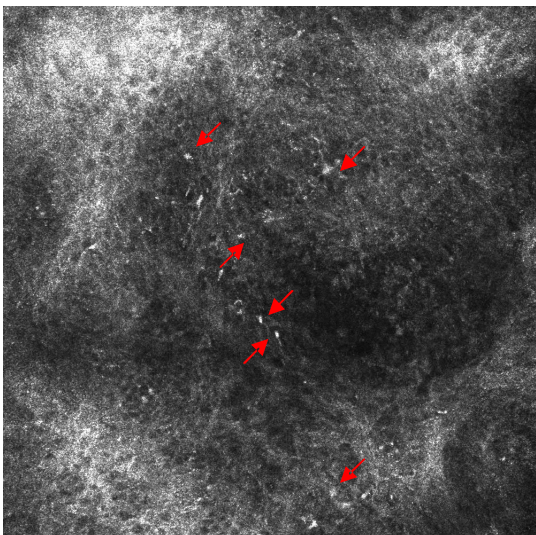


Abb. 23

**RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Eine Vielzahl von Entzündungszellen in der DEJ/ D sind zu sehen (rote Pfeile).**

### 3.1.1.8 Erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation

Die dilatierten dermalen Blutgefäße fielen durch ihr, im Vergleich zur gesunden Haut, dunkles vergrößertes Lumen auf (Abbildungen 24-25). Bei den hellen Strukturen innerhalb des Lumens handelte es sich um Blutzellen - Erythrozyten und Entzündungszellen. Diese konnten wir mit Hilfe des „Video Capture Software Moduls“ der RCM zum Teil beobachten. Bei den sich schnell bewegenden Zellstrukturen im Zentrum der Gefäße handelte es sich um Erythrozyten, während die Leukozyten an der Blutgefäßinnenwand im Rahmen der Diapedese entlangrollten - es kam zum „Leukozytenrolling“. Die im Rahmen der Migration in die Dermis einwandernden Entzündungszellen konnten wir teilweise perivaskulär mit Hilfe der RCM sehen. Klinisch sah man aufgrund der erhöhten Vaskularisierung bzw. Blutgefäßdilatation ein Erythem.

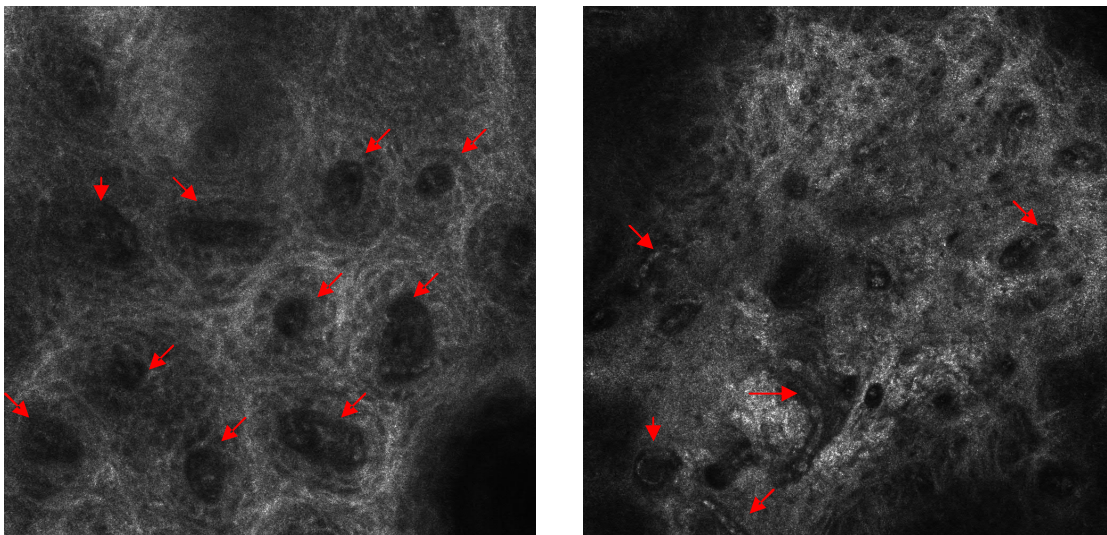


Abb. 24-25

**RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Es fallen viele dilatierte Blutgefäße im Querschnitt in Abb. 24 und im Quer- und Längsschnitt in Abb. 25 auf (rote Pfeile). Die Dichte an Blutgefäßen ist erhöht. Die Aufnahmen wurden in der DEJ/ D gemacht.**

### 3.1.1.9 Solare Elastose

Der Begriff der solaren Elastose beschreibt die UV-bedingte Degeneration der Kollagenfasern in der Dermis. Sie zeichnet sich durch ein unorganisiertes

hyporefraktilen vergrößerten Kollagen aus, dessen individuelle Fasern nicht erkennbar sind - im Englischen sog. „huddled collagen“ (Abbildungen 26-27). Ferner traten wellenförmige dicke, kurze hochrefraktilen Fasern auf - im Englischen sog. „curled bright structures“ (Abbildungen 28-29).

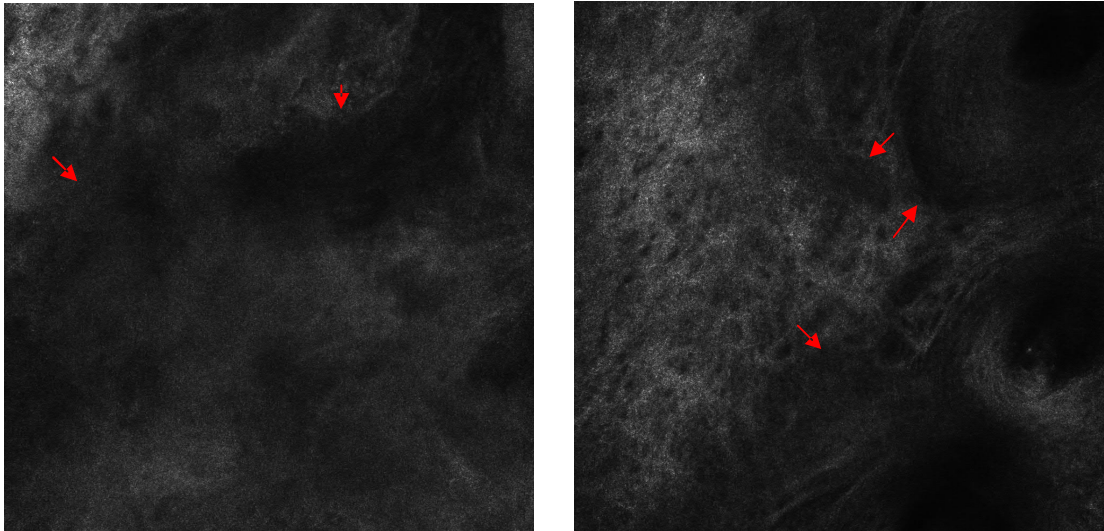


Abb. 26-27

***RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Das unorganisierte hyporefraktil vergrößerte Kollagen ist in der DEJ/ D zu sehen (rote Pfeile).***

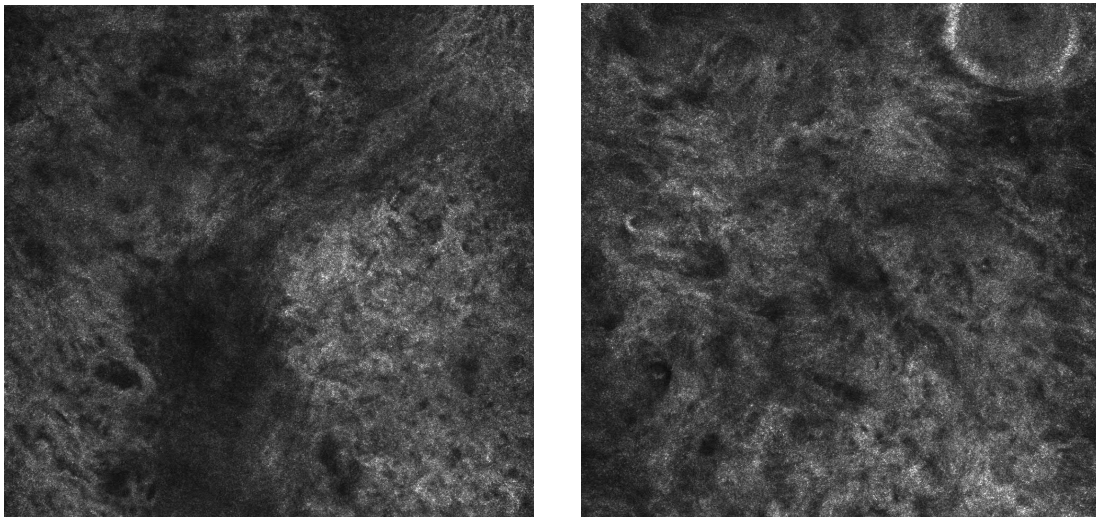


Abb. 28-29

***RCM der aktinischen Keratose vor Beginn der Therapie. Die wellenförmigen dicken, kurzen hochrefraktilen Fasern lassen sich in der DEJ/ D erkennen.***



### **3.1.2 Nach 45 Tagen Therapie**

#### **3.1.2.1 Apoptosen**

Bei den Apoptosen handelt es sich um eine Form des programmierten Zelltodes der Keratinozyten im SG/ SS. Die apoptotischen Keratinozyten lösen sich aus dem Zellverband und lassen sich demnach deutlich von den sie umgebenden Keratinozyten abgrenzen. Sie zeigen ein helles verplumptes rundliches Aussehen. Durch das Lösen aus dem Zellverband kam das sie umgebende Areal dunkel zur Darstellung (Abbildungen 30-31).

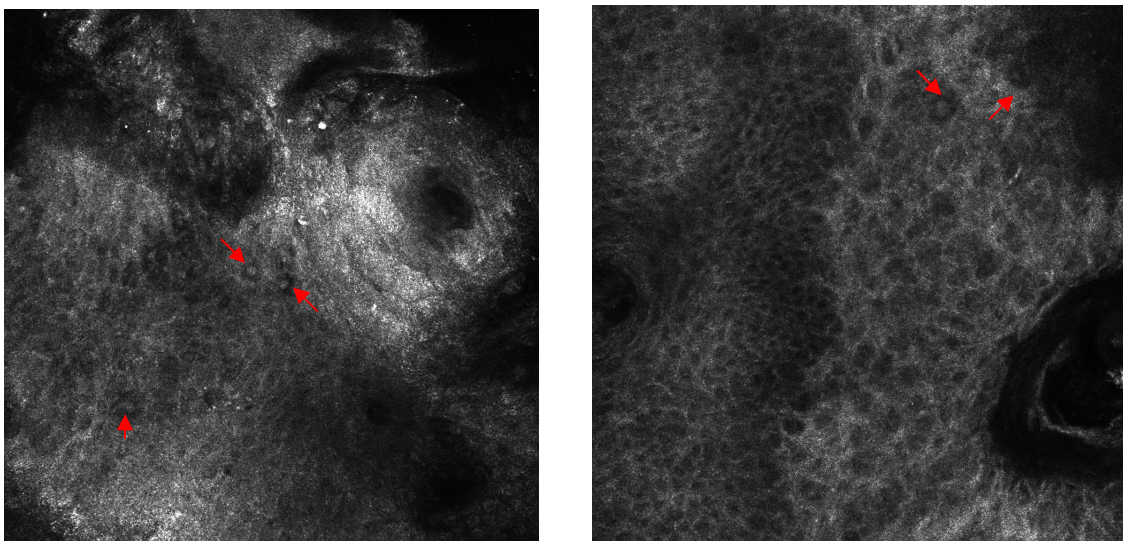


Abb. 30-31

***RCM der aktinischen Keratose nach 45 Tagen Therapie. In beiden auf Höhe des SG/ SS aufgenommenen Bildern sieht man mehrere apoptotische Zellen (rote Pfeile).***

#### **3.1.2.2 Mikrovesikel**

Die in unserer Studie auftretenden Mikrovesikel zeigten sich als eine Ansammlung von, bereits unter 3.1.2.1 im Detail beschriebenen, apoptotischen Zellen, die ein großes umschriebenes Vesikel bilden (Abbildungen 32-33).

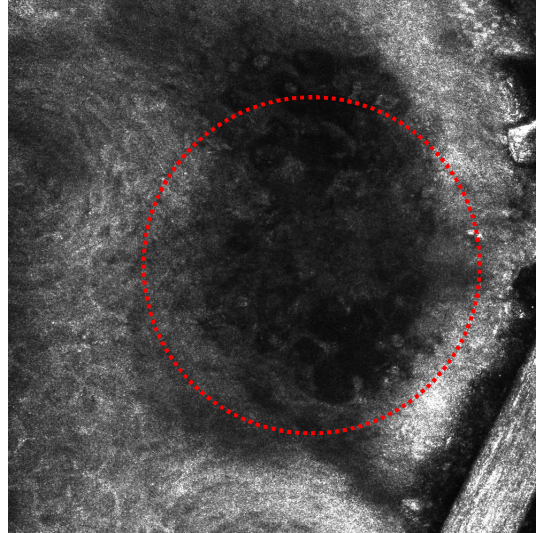
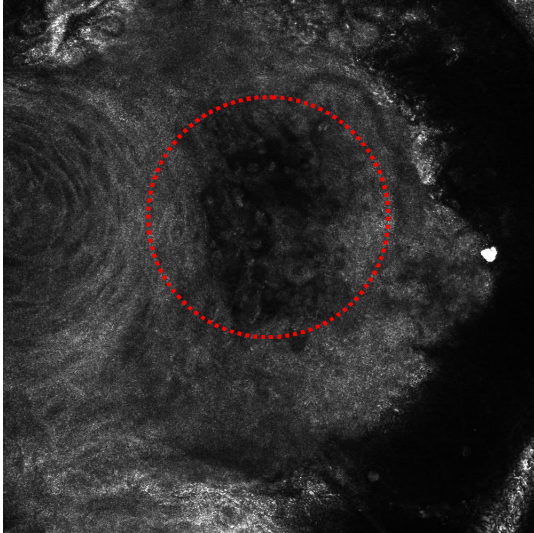


Abb. 32-33

**RCM der aktinischen Keratose nach 45 Tagen Therapie. Beide Abbildungen zeigen ein Mikrovesikel aus apoptotischen Zellen im SG/ SS (runde Kreise).**

### 3.1.2.3 Dendritische Zellen

Die dendritischen Zellen sahen genauso aus, wie unter 3.1.1.6 bereits beschrieben (Abbildungen 34-37).

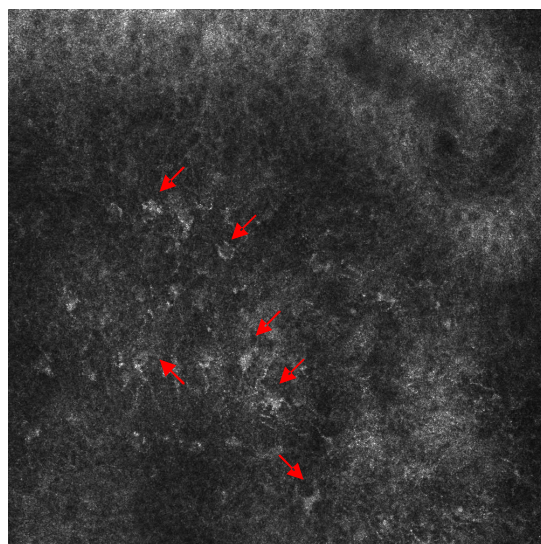
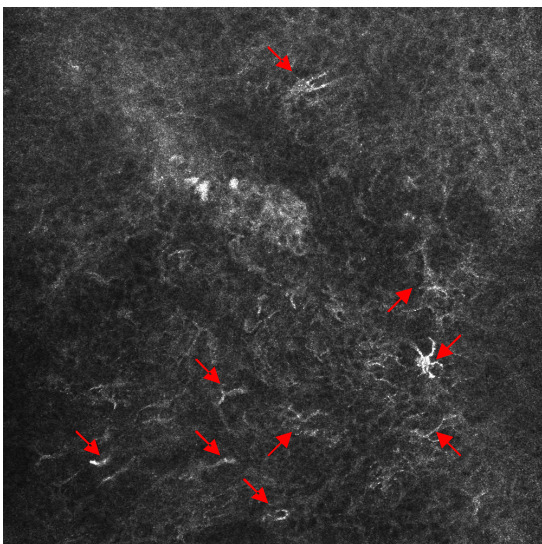


Abb. 34-35

**RCM der aktinischen Keratose nach 45 Tagen Therapie. Zahlreiche dendritische Zellen sind in Abb. 31 und 32 zu sehen (rote Pfeile). Die Bilder entstanden auf Höhe des SG/ SS.**

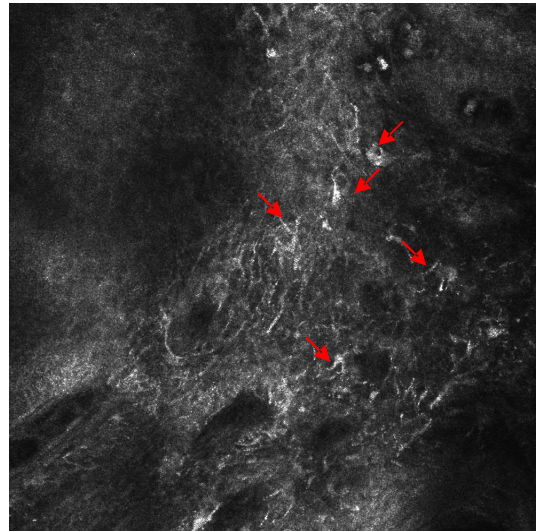
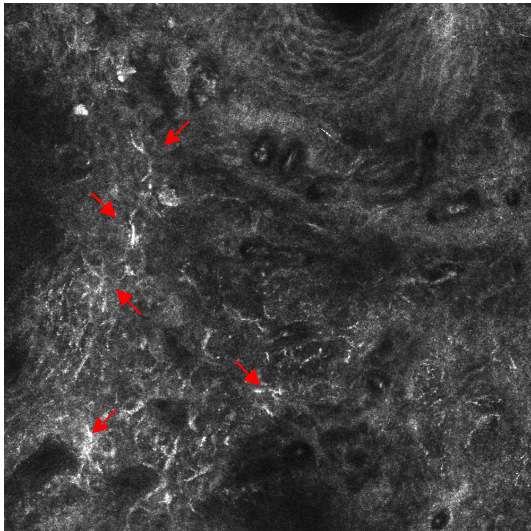


Abb. 36-37

**RCM der aktinischen Keratose nach 45 Tagen Therapie. Massenhaft dendritische Zellen sind in Abb. 34 und 35 in der DEJ/ D vorhanden (rote Pfeile).**

#### 3.1.2.4 Runde Entzündungszellen

Das Aussehen der runden Entzündungszellen stimmte mit dem der runden Entzündungszellen vor dem Beginn der Therapie überein und wurde bereits unter 3.1.1.7 näher erläutert (Abbildungen 38-40).

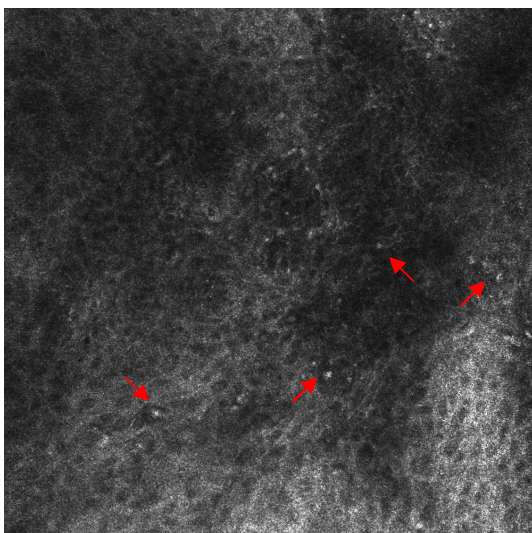


Abb. 38

**RCM der aktinischen Keratose nach 45 Tagen Therapie. Auch unter der Therapie treten runde Entzündungszellen im SG/ SS auf (rote Pfeile).**

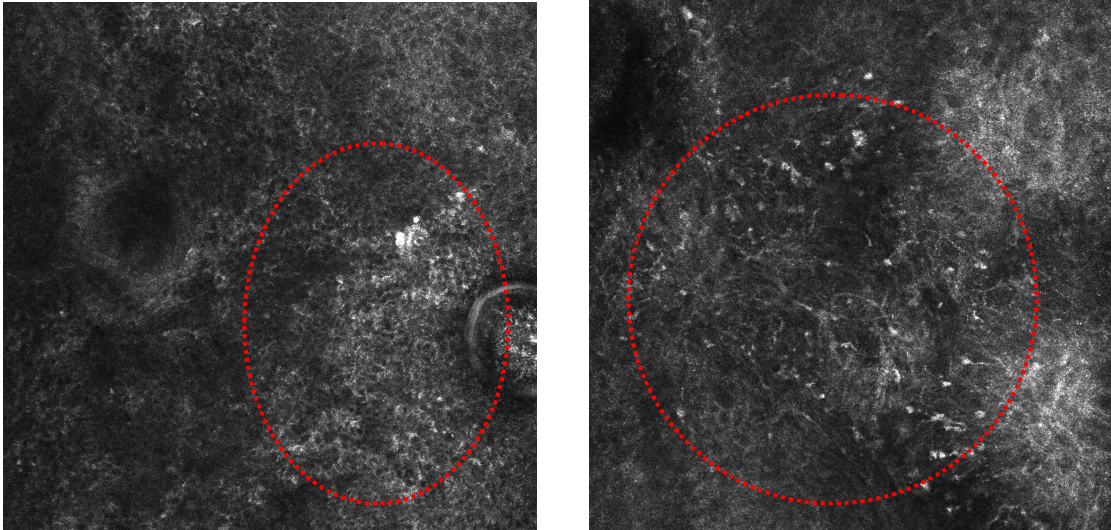


Abb. 39-40

***RCM der aktinischen Keratose nach 45 Tagen Therapie. Zahlreiche kleine runde Entzündungszellen zeigen sich in der DEJ/ D (rotes Oval, roter Kreis).***

#### *3.1.2.5 Leukozytenrolling*

Während der Therapie konnten vereinzelt Videosequenzen aufgezeichnet werden, die dilatierte Gefäße zeigten, an deren Endothel helle kleine runde Zellen im Rahmen der Diapedese entlangrollten - es handelt sich dabei um das unter 3.1.1.8 bereits beschriebene „Leukozytenrolling“.

Das Videomaterial wurde dem USB-Speichermedium beigefügt und wird im Rahmen der mündlichen Präsentation der Dissertation gezeigt.

### ***3.1.3 30 Tage nach Beendigung der Therapie***

#### *3.1.3.1 Reguläre polygonale kernlose Korneozyten*

Bei den regulären polygonalen Korneozyten im Stratum corneum handelte es sich um im Verbund vorkommende helle anukleäre Zellen mit verwaschenen Zellgrenzen, die im Rahmen der Abheilung auftraten (Abbildung 41).

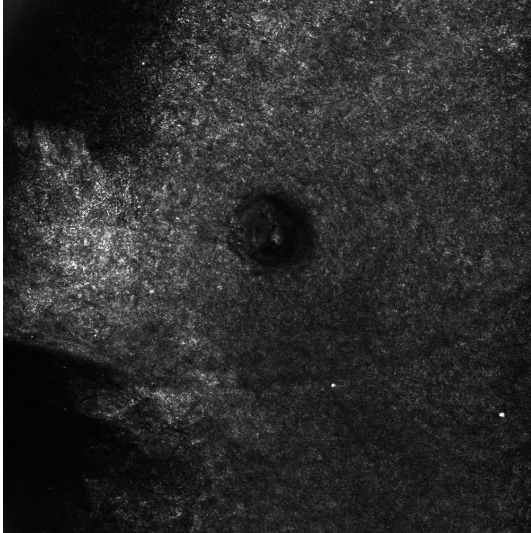


Abb. 41

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Es handelt sich um reguläre Keratinozyten im SC.***

#### *3.1.3.2 Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten*

Die Keratinozyten im SG/ SS lagen in einem regelhaften Verbund vor, der an Honigwaben erinnert. Die Zellgrenzen waren klar abgrenzbar. Der einzelne Keratinozyt zeigte einen ovalen bis runden Zellkern mit dunkler Erscheinung und einem weißen Punkt als Nukleolus. Der schmale Zytoplasmasaum des Keratinozyten erschien hell mit granulärem Muster (Abbildungen 42-43). Abbildung 44 enthält Bilder zu der nicht abgeheilten Haut.

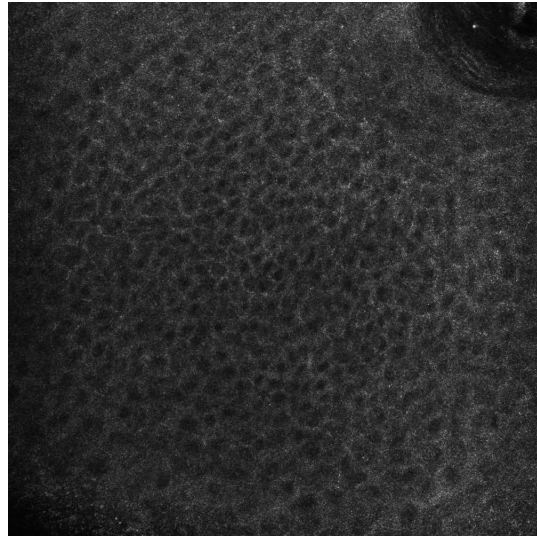
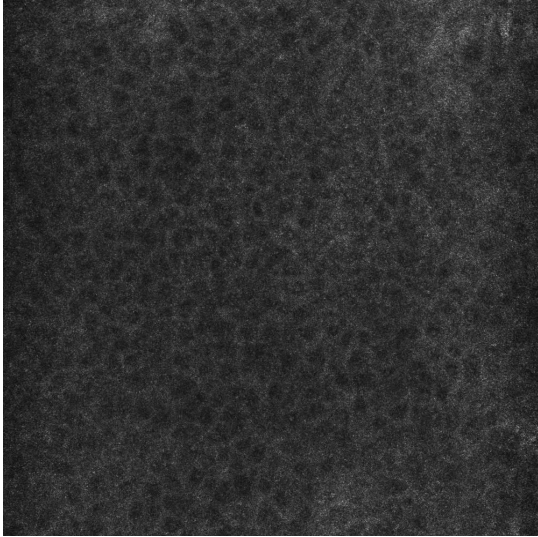


Abb. 42-43

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Die im Verbund vorliegenden Keratinozyten des SG/ SS erinnern morphologisch an eine Honigwabe. Die Zellgrenzen sind klar abzugrenzen. Die Haut ist abgeheilt.***

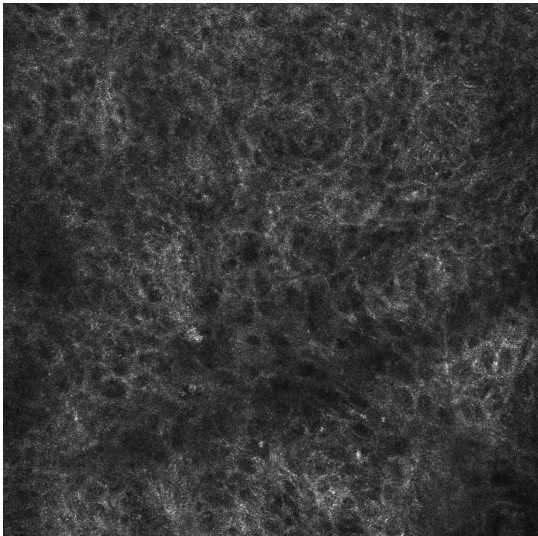


Abb. 44

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Als Gegendarstellung ein Patient mit nicht abgeheilter Haut. Die Zellgrenzen sind verwaschen. Die Honigwabenstruktur im SG/ SS ist nicht vorhanden.***

### 3.1.3.3 Kein Entzündungsinfiltrat

In der abgeheilten Haut konnte bei einigen Patienten kein Entzündungsinfiltrat mehr mit der RCM im SG/ SS bzw. der DEJ/ D gefunden werden (Abbildungen 45-46). Bei einigen persistierte hingegen das Entzündungsinfiltrat (Abbildungen 47-49).

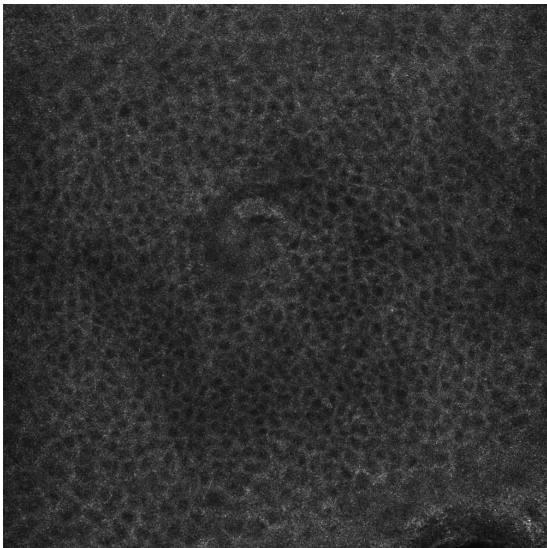


Abb. 45

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Die Abbildung zeigt keine Entzündungszellen im SG/ SS.***

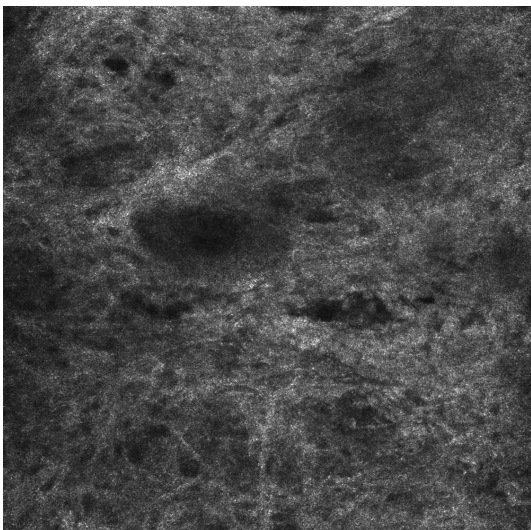


Abb. 46

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Auch in der DEJ/ D zeigen sich keine Entzündungszellen mehr.***

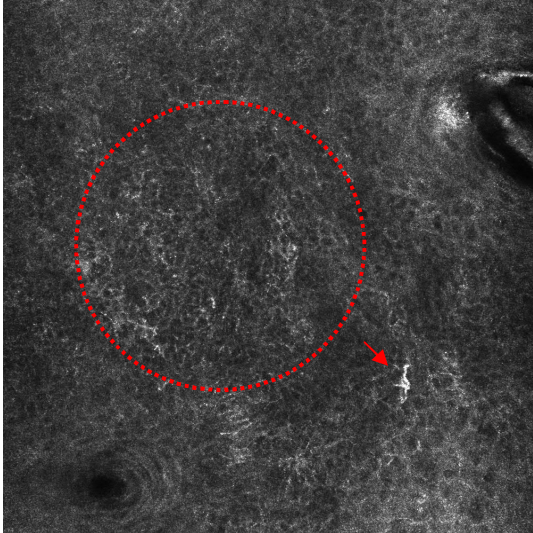


Abb. 47

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Bei dem Großteil der Patienten wird hingegen nach der Therapie noch ein Entzündungsinfiltrat im SG/ SS gefunden (roter Kreis, roter Pfeil).***

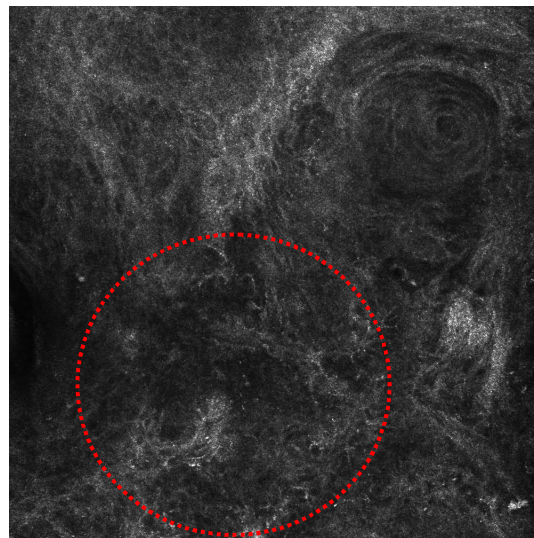
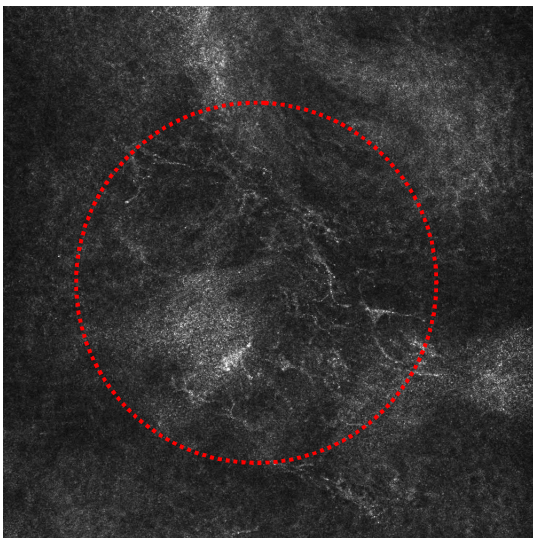


Abb. 48-49

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Auch in der DEJ/ D fällt bei vielen Patienten noch ein ausgeprägtes Infiltrat auf (rote Kreise).***

#### 3.1.3.4 Normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße

Eine normale Vaskularisierung zeichnete sich durch die im Vergleich zum Zeitpunkt 0 verminderten Blutgefäße aus. Diese waren insgesamt im Querschnitt schmaler und



weniger gewunden (Abbildung 50). Bei der Mehrzahl der Patienten persistierten hingegen dilatierte Blutgefäße (Abbildungen 51-52).

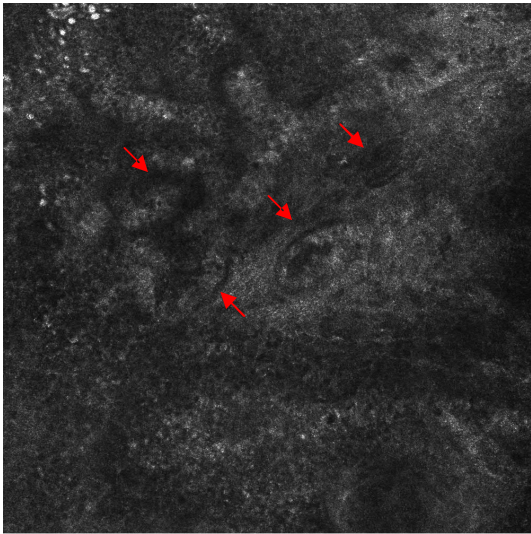


Abb. 50

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Ein normaler Durchmesser der Blutgefäße und nur wenige Gefäße sind sichtbar (rote Pfeile).***

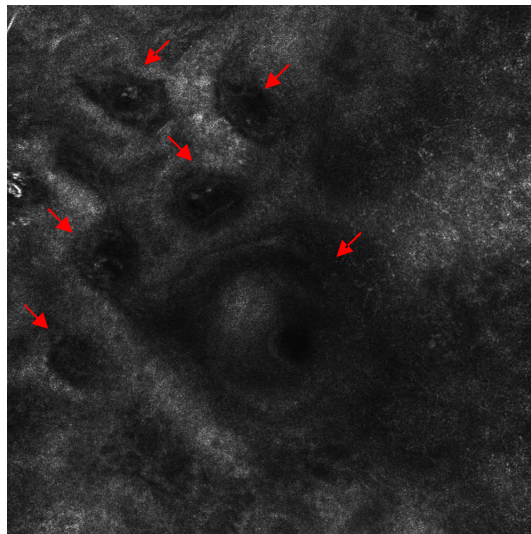
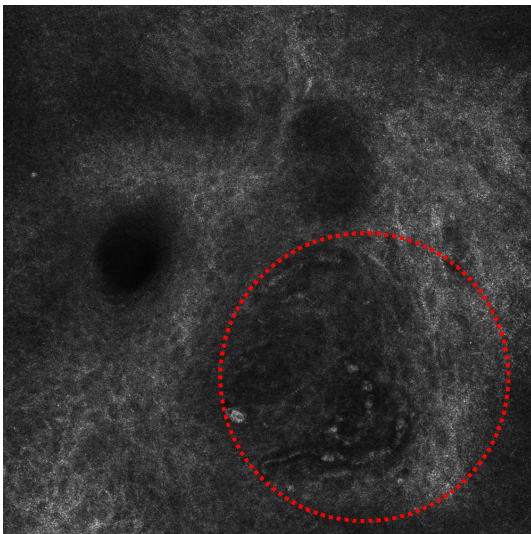


Abb. 51-52

***RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Deutlich elongierte Blutgefäße sind im Längs- (Abb. 51) und Querschnitt (Abb. 52) in der DEJ/ D zu erkennen (roter Kreis, rote Pfeile).***

### 3.1.3.5 Solare Elastose

Das Aussehen der solaren Elastose in der DEJ/ D mit dem konfokalen Laserscannmikroskop wurde bereits unter 3.1.1.9 im Detail beschrieben (Abbildung 53-56).

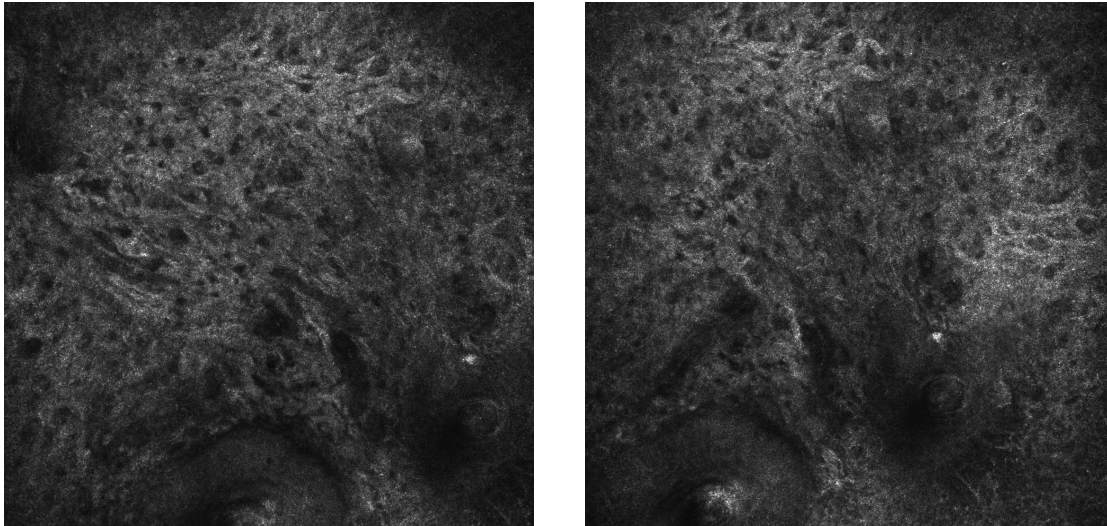


Abb. 53-54

**RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Die dicken wellenförmigen hochrefraktilen Fasern persistieren. Die Bilder stammen aus der DEJ/ D.**

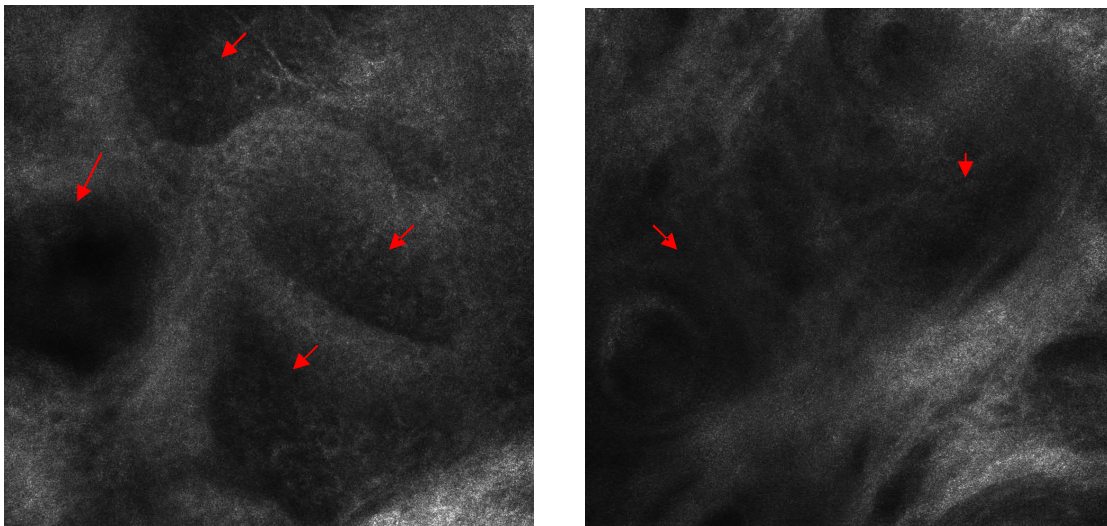


Abb. 53-54

**RCM der aktinischen Keratose 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Das vergrößerte hyporefraktile Kollagen in der DEJ/ D ist weiterhin vorhanden (rote Pfeile).**

## **3.2 Statistische Auswertung**

Um die Übersicht zu bewahren wird unter 3.2.1 und 3.2.2 im Text nur auf die wichtigsten RCM-Parameter und ihre Auffälligkeiten eingegangen. Nähere Informationen lassen sich den einzelnen Tabellen entnehmen.

### **3.2.1 Häufigkeiten**

Zunächst erfolgte mit Hilfe von SPSS die Berechnung der Verteilungseigenschaften der einzelnen RCM-Parameter in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut. Da die Unterschiede in der Auswertung der Daten zwischen den Untersuchern unter 3.2.2 näher besprochen werden, wird an dieser Stelle auf die detaillierte Beschreibung der Unterschiede zwischen den ermittelten Häufigkeiten der Untersucher verzichtet.

Vor dem Beginn der Therapie traten in der klinischen Haut bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“, „Parakeratosen“ im SC, eine „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ sowie „runde Entzündungszellen“ im SG/ SS auf (Tabelle 11). Zu diesem Ergebnis kamen beide Untersucher. Auch eine erhöhte „Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation“ und eine „solare Elastose“ in der DEJ/ D konnten durch beide Untersucher bei der Mehrheit der Patienten in der AK-geschädigten Haut gefunden werden.

In der periläsionalen subklinischen Haut trat die „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ bei 100.0% bzw. 94.4% sowie die „solare Elastose“ bei 100.0% der Patienten auf. Einer der Untersucher fand mehrheitlich „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“, eine „Spongiose“ und „runde Entzündungszellen“ im SG/ SS und der DEJ/ D. Auch eine „erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation“ konnte durch einen Untersucher bei dem Großteil der Probanden ermittelt werden.

Ausgeprägte Unterschiede zwischen der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut lagen für die Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“, die „Parakeratose“, „runde Entzündungszellen“ im SG/ SS und die „Blutgefäßdilatation/ erhöhte Vaskularisierung“ nach den Ergebnissen mindestens eines Auswerters vor.

Diese Parameter kamen häufiger in der aktinisch geschädigten als in der periläsionalen subklinischen Haut vor.

Tabelle 11

**Häufigkeit der Evaluationskriterien in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut vor Beginn der Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Anwesend in der klinischen Haut in ...%	Anwesend in der subklinischen Haut in ...%
SC	Einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten	88.9 (100.0)	50 (85.7)
	Parakeratose	83.3 (56.3)	11.1 (30.8)
	Impetiginisation	5.6 (0)	0 (0)
SG/ SS	Aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten	100.0 (100.0)	100.0 (94.4)
	Spongiose	38.9 (94.4)	22.2 (94.4)
	Dendritische Zellen	38.9 (22.2)	22.2 (38.9)
	Runde Entzündungszellen	72.2 (88.9)	33.3 (94.4)
DEJ/ D	Dendritische Zellen	5.6 (55.6)	5.6 (50.0)
	Runde Entzündungszellen	33.3 (94.4)	33.3 (83.3)
	Erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilata-tion	72.2 (88.9)	35.3 (83.3)
	Solare Elastose	94.4 (100.0)	100.0 (100.0)

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junctionszone, D = Dermis. Angabe der Ergebnisse von 2 Untersuchern. Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers befinden sich in Klammern.*

Während der Therapie traten alle zuvor definierten Parameter in der klinischen Haut bei einem Großteil der Studienteilnehmer auf. Zu diesem Ergebnis kam mindestens einer der Untersucher (Tabelle 12).

In der periläsionalen subklinischen Haut war das ebenfalls bis auf den Parameter der „Mikrovesikel“ im SG/ SS der Fall.

Unterschiede zwischen der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut konnten nur für den Parameter der „Apoptosen“ und der „Mikrovesikel“ durch einen der

Auswerter gefunden werden. Alle anderen Evaluationskriterien lagen in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut annähernd in gleicher Häufigkeit vor.

Tabelle 12

**Häufigkeit der Evaluationskriterien in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut nach 45 Tagen Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Anwesend in der klinischen Haut in ...%	Anwesend in der subklinischen Haut in ...%
SG/ SS	Apoptosen	88.9 (88.9)	55.6 (83.3)
	Mikrovesikel	55.6 (0)	11.1 (11.1)
	Dendritische Zellen	66.7 (72.2)	55.6 (72.2)
	Runde Entzündungszellen	83.3 (100.0)	72.2 (100.0)
DEJ/ D	Dendritische Zellen	50.0 (94.4)	61.1 (83.3)
	Runde Entzündungszellen	77.8 (100.0)	77.8 (100.0)

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junctionszone, D = Dermis. Angabe der Ergebnisse von 2 Untersuchern. Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers befinden sich in Klammern.*

30 Tage nach der Beendigung der Therapie wurde die „solare Elastose“ bei allen in die Studie eingeschlossenen Probanden in der klinischen Haut gefunden (Tabelle 13). Alle anderen Parameter kamen bei weniger als der Hälfte der Patienten vor.

Die periläsionale subklinische Haut zeigte mehrheitlich „reguläre polygonale kernlose Korneozyten“. Auch in ihr persistierte die „solare Elastose“ bei allen Patienten.

Wesentliche Unterschiede in den Häufigkeiten der evaluierten Kriterien zwischen den AKs und der periläsionalen subklinischen Haut lagen für den Parameter der „regulären polygonalen kernlosen Korneozyten“ und der „normalen Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße“ vor.

Tabelle 13

**Häufigkeit der Evaluationskriterien in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut 30 Tage nach Beendigung der Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Anwesend in der klinischen Haut in ...%	Anwesend in der subklinischen Haut in ...%
SC	Reguläre polygonale kernlose Korneozyten	38.9 (29.4)	66.7 (60.0)
SG/ SS	Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten	44.4 (38.9)	50 (33.3)
	Kein Entzündungsinfiltrat	38.9 (0)	27.8 (11.1)
DEJ/ D	Kein Entzündungsinfiltrat	33.3 (0)	38.9 (5.6)
	Normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße	27.8 (11.1)	58.8 (16.7)
	Solare Elastose	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junctionszone, D = Dermis. Angabe der Ergebnisse von 2 Untersuchern. Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers befinden sich in Klammern.*

### 3.2.2 Kappa-Analyse

In diesem Abschnitt beschäftigt uns die Frage, ob die Untersucher bei den RCM-Parametern der AK und der periläsionalen subklinischen Haut jeweils zu übereinstimmenden Ergebnissen kommen. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Kappa-Analyse durchgeführt.

Die nachstehende Tabelle 14 enthält die Matrix, nach der die Stärke der Übereinstimmung ausgehend von den Cohens Kappa-Koeffizienten beurteilt wurde. Es gibt eine Vielzahl von Klassifikationen. Wir entschieden uns für die weit verbreitete Klassifikation nach Altman [Altman 1991]. Soweit möglich, wurde der Cohens Kappa-Koeffizient, die dazugehörige Stärke der Übereinstimmung und die Übereinstimmung in % angegeben. Vielfach war es jedoch nicht möglich, den Cohens Kappa-Koeffizienten zu bestimmen, da in diesen Fällen mindestens eine Variable in jeder 2-Wege-Tabelle,

aus denen die Zusammenhangmaße berechnet wurden, eine Konstante war. In diesen Fällen wurde ausschließlich die Übereinstimmung in % aufgeführt.

Die Werte der Cohens Kappa-Koeffizienten für die einzelnen Evaluationsparameter werden mit 3 Nachkommastellen angegeben. Um nur 2 Nachkommastellen zu erhalten und folglich eine Einordnung in die Klassifikation nach Altman zu ermöglichen, erfolgte ein Auf- und Abrunden nach den mathematischen Regeln.

Tabelle 14

***Übereinstimmungsmatrix, um aus der Höhe des Cohens Kappa-Koeffizienten die Stärke der Übereinstimmung zwischen den Untersuchern abzuleiten.***

Cohens Kappa-Koeffizient	Stärke der Übereinstimmung
<0,20	Schwach
0,21 - 0,40	Leicht
0,41 - 0,60	Mittel
0,61 - 0,80	Gut
0,81 - 1,00	Sehr gut

*Klassifikation nach Altman [Altman 1991].*

### 3.2.2.1 Aktinische Keratose

Vor Beginn der Therapie zeigte sich in der klinischen Haut eine hohe Interobserver-Reproduzierbarkeit für die Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Zellen“, „Impetiginisation“, „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ und „runde Entzündungszellen“ im SG/ SS (Tabelle 15). Auch die Parameter der „erhöhten Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation“ und der „solaren Elastose“ hatten eine hohe Übereinstimmung zwischen den Untersuchern.

Parameter mit nur schwacher bzw. leichter Übereinstimmung waren das Kriterium „Parakeratose“, „dendritische Zellen“ im SG/ SS sowie die „dendritischen Zellen“ und „runden Entzündungszellen“ in der DEJ/ D. Das Kriterium der „Spongiose“ zeigte einen negativen Cohens Kappa-Koeffizient, d. h. es lag eine schlechtere Übereinstimmung vor als zufällig zu erwarten. In der Statistik wird ein negativer Wert als zufallsbedingte Übereinstimmung gewertet.

Tabelle 15

**Konkordanzwerte zwischen den 2 Untersuchern für die einzelnen Evaluationskriterien der klinischen Haut vor Beginn der Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Cohens Kappa- Koeffizient	Stärke der Überein- stimmung	Übereinstim- mung in ...%
SC	Einzelne vom Zellverband losgelöste Kerneozyten	-	-	93.8
	Parakeratose	0.310	Leicht	68.8
	Impetiginisation	-	-	100.0
SG/ SS	Aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten	-	-	100.0
	Spongiose	-0.113*	Keine	33.3
	Dendritische Zellen	0.366	Leicht	72.3
	Runde Entzündungszellen	0.491	Mittel	83.3
DEJ/ D	Dendritische Zellen	0.090	Schwach	50.0
	Runde Entzündungszellen	0.057	Schwach	38.9
	Erhöhte Vaskularisierung/ Blut-gefäßdilatation	0.491	Mittel	83.3
	Solare Elastose	-	-	100.0

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junctionszone, D = Dermis. \*Negative Werte implizieren eine schlechtere Übereinstimmung als zufällig zu erwarten und werden in der Statistik als zufallsbedingte Übereinstimmungen interpretiert.*

Nach 45 Tagen lagen hohe Übereinstimmungen für die „Apoptosen“, „dendritischen Zellen“ und „runden Entzündungszellen“ des SS/ SG vor. Auch für die „runden Entzündungszellen“ der DEJ/ D wurde eine hohe Übereinstimmung zwischen den Untersuchern gefunden (Tabelle 16).

„Mikrovesikel“ und „dendritische Zellen“ der DEJ/ D zeigten keine hohen Interobserver-Übereinstimmungen.



Tabelle 16

**Konkordanzwerte zwischen den 2 Untersuchern für die einzelnen Evaluationskriterien der klinischen Haut nach 45 Tagen Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Cohens Kappa- Koeffizient	Stärke der Überein- stimmung	Übereinstim- mung in ...%
SG/ SS	Apoptosen	0.438	Mittel	88.9
	Mikrovesikel	-	-	44.4
	Dendritische Zellen	0.609	Gut	83.3
	Runde Entzündungszellen	-	-	83.3
DEJ/ D	Dendritische Zellen	0.111	Schwach	55.6
	Runde Entzündungszellen	-	-	77.8

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junktionszone, D = Dermis.*

30 Tage nach Beendigung der Therapie traten hohe Übereinstimmungswerte für das Kriterium „reguläre polygonale kernlose Korneozyten“, „Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten“ und die „solare Elastose“ auf (Tabelle 17).

Geringe Konkordanzen wurden für die Parameter „kein Entzündungsinfiltrat“ im SG/ SS und der DEJ/ D gefunden. Eine schlechtere Übereinstimmung als zufällig zu erwarten, fanden wir bei dem Parameter „normale Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße“. Es lag demnach für diesen Parameter keine Übereinstimmung vor.

Tabelle 17

**Konkordanzwerte zwischen den 2 Untersuchern für die einzelnen Evaluationskriterien der klinischen Haut 30 Tage nach Beendigung der Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Cohens Kappa- Koeffizient	Stärke der Überein- stimmung	Übereinstim- mung in ...%
SC	Reguläre polygonale kernlose Korneozyten	0.598	Mittel	82.3
SG/ SS	Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten	0.886	Sehr gut	94.5
	Kein Entzündungsinfiltrat	-	-	61.1
DEJ/ D	Kein Entzündungsinfiltrat	-	-	66.7
	Normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße	-0.189*	Keine	61.1
	Solare Elastose	-	-	100.0

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junctionszone, D = Dermis. \*Negative Werte implizieren eine schlechtere Übereinstimmung als zufällig zu erwarten und werden in der Statistik als zufallsbedingte Übereinstimmungen interpretiert.*

### 3.2.2.2 Periläsionale subklinische Haut

In der periläsionalen subklinischen Haut kamen vor Beginn der Therapie mit dem Solaraze® Gel hohe Übereinstimmungen zwischen den Untersuchern für das Evaluationskriterium „Impetiginisation“, „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ und „dendritische Zellen“ im SG/ SS vor (Tabelle 18). Auch die „solare Elastose“ wies eine 100-prozentige Übereinstimmung auf.

Schwache Konkordanzen zeigten die Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“, „Parakeratose“ und die „runden Entzündungszellen“ des SG/ SS und der DEJ/ D. Dasselbe gilt für die „dendritischen Zellen“ in der DEJ/ D und die „erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation“. Für das Kriterium der „Spongiose“ lag erneut ein negativer Cohens Kappa-Koeffizient vor.

Tabelle 18

**Konkordanzwerte zwischen den 2 Untersuchern für die einzelnen Evaluationskriterien der perilesionalen subklinischen Haut vor Beginn der Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Cohens Kappa- Koeffizient	Stärke der Überein- stimmung	Übereinstim- mung in ...%
SC	Einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten	0.045	Schwach	57.1
	Parakeratose	0.316	Leicht	76.9
	Impetiginisation	-	-	100.0
SG/ SS	Aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten	-	-	94.4
	Spongiose	-0.116*	Keine	16.7
	Dendritische Zellen	0.366	Leicht	72.3
	Runde Entzündungszellen	0.057	Schwach	38.9
DEJ/ D	Dendritische Zellen	0.111	Schwach	55.6
	Runde Entzündungszellen	0.182	Schwach	51.0
	Erhöhte Vaskularisierung/ Blut-gefäßdilatation	0.209	Leicht	52.9
	Solare Elastose	-	-	100.0

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junctionszone, D = Dermis. \*Negative Werte implizieren eine schlechtere Übereinstimmung als zufällig zu erwarten und werden in der Statistik als zufallsbedingte Übereinstimmungen interpretiert.*

Während der Therapie wurden gute Übereinstimmungswerte für die verschiedenen Parameter erzielt. Nur das Kriterium der „Apoptose“ zeigte lediglich eine leichte Übereinstimmung (Tabelle 19).

Tabelle 19

**Konkordanzwerte zwischen den 2 Untersuchern für die einzelnen Evaluationskriterien der periläsionalen subklinischen Haut nach 45 Tagen Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Cohens Kappa- Koeffizient	Stärke der Überein- stimmung	Übereinstim- mung in ...%
SG/ SS	Apoptosen	0.400	Leicht	72.3
	Mikrovesikel	1.000	Sehr gut	100.0
	Dendritische Zellen	0.649	Gut	83.4
	Runde Entzündungszellen	-	-	72.2
	Dendritische Zellen	0.478	Mittel	77.8
	Runde Entzündungszellen	-	-	77.8

SG = *Stratum granulosum*, SS = *Stratum spinosum*, DEJ = *Dermoepidermale Junctionszone*, D = *Dermis*.

Eine gute Übereinstimmung zwischen den Werten der Untersucher wurde für die „regulären polygonalen kernlosen Korneozyten“, die „Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten“ und den Parameter der „solaren Elastose“ gefunden (Tabelle 20).

Eine geringe Übereinstimmung lag für das Kriterium „kein Entzündungsinfiltrat“ im SG/ SS vor, keine Übereinstimmung bestand für den Parameter in der DEJ/ D. Der Parameter „normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße“ zeigte nur eine leichte Übereinstimmung.

Tabelle 20

**Konkordanzwerte zwischen den 2 Untersuchern für die einzelnen Evaluationskriterien der periläsionalen subklinischen Haut 30 Tage nach Beendigung der Therapie.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Cohens Kappa- Koeffizient	Stärke der Überein- stimmung	Übereinstim- mung in ...%
SC	Reguläre polygonale kernlose Korneozyten	0.857	Sehr gut	93.3
SG/ SS	Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten	0.667	Gut	83.3
	Kein Entzündungsinfiltrat	0.151	Schwach	72.3
DEJ/ D	Kein Entzündungsinfiltrat	-0.108*	Keine	55.6
	Normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße	0.261	Leicht	58.8
	Solare Elastose	-	-	100.0

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junktionszone, D = Dermis. \*Negative Werte implizieren eine schlechtere Übereinstimmung als zufällig zu erwarten und werden als zufallsbedingte Übereinstimmungen interpretiert.*

### 3.2.3 McNemar-Test

Mit Hilfe des McNemar-Tests wollten wir herausfinden, ob die klinische und periläsionale subklinische Haut gleichermaßen nach 45 Tagen Therapie reagieren.

Soweit möglich wurde die Anwesenheit des jeweiligen RCM-Parameters in % sowie der dazugehörige p-Wert angegeben (Tabelle 21). Zum Teil war es jedoch nicht möglich den p-Wert zu bestimmen, da mindestens eine Variable in jeder 2-Wege-Tabelle, aus denen die Zusammenhangmaße berechnet wurden, eine Konstante war.

Tabelle 21 zeigt, dass nur einer der Untersucher einen signifikanten Unterschied während der Therapie für das Auftreten von „Apoptosen“ und „Mikrovesikeln“ finden konnte, mit den dazugehörigen p-Werten von 0.031 und 0.008. Diese Parameter kamen bei einem Untersucher signifikant häufiger in der klinischen als in der periläsionalen subklinischen Haut vor. Für alle anderen unter der Therapie erhobenen

Evaluationskriterien konnten durch diesen Auswerter keine signifikanten Unterschiede zwischen den AKs und der periläsionalen subklinischen Haut entdeckt werden.

Der andere Untersucher fand bei keinem erhobenen Parameter unter der Therapie einen signifikanten Unterschied. Alle p-Werte lagen bei >0.05.

Tabelle 21

**Ergebnisse des McNemar-Tests, der nach 45 Tagen Therapie das Auftreten der verschiedenen Evaluationskriterien zwischen der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut vergleicht.**

Hautschicht	Evaluationskriterium	Anwesend		p-Wert
		in klinischen Haut in ...%	in der subklinischen Haut in ...%	
SG/ SS	Apoptosen	88.9 (88.9)	55.6 (83.3)	0.031 (1.000)
	Mikrovesikel	55.6 (0)	11.1 (11.1)	0.008 (-)
	Dendritische Zellen	66.7 (72.2)	55.6 (72.2)	0.625 (1.000)
	Runde Entzündungszellen	83.3 (100.0)	72.2 (100.0)	0.500 (-)
DEJ/ D	Dendritische Zellen	50.0 (94.4)	61.1 (83.3)	0.625 (0.500)
	Runde Entzündungszellen	77.8 (100.0)	77.8 (100.0)	1.000 (-)

*SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum, DEJ = Dermoepidermale Junctionszone, D = Dermis. Angabe der Ergebnisse von 2 Untersuchern. Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers befinden sich in Klammern.*

### **3.2.4 Verlauf der Entzündung**

Als Nächstes interessierte uns, ob es während der Therapie mit dem Solaraze<sup>®</sup> Gel zu einer Zunahme der Entzündung im Vergleich zum Zeitpunkt 0 vor Beginn des Eincremens kam.

Eine starke Reaktion unter der Therapie konnte durch den einen Untersucher bei 10 von 18 Patienten in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut gefunden werden. Mit anderen Worten: es kam bei 55.6% zu einer Zunahme der Entzündung. Der zweite Untersucher beobachtete, dass es in der klinischen Haut bei 14 von 18 Patienten

(77.8%) und in der periläsionalen subklinischen Haut bei 13 von 18 Patienten (72.2%) zu einer Zunahme der Entzündung unter der Therapie kam (Tabelle 22).

Tabelle 22

**Kreuztabelle, die die Zunahme der Entzündung nach 45 Tagen Therapie zwischen der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut vergleicht.**

		Klinische Haut	Subklinische Haut
Zunahme der	Vorhanden	10/18 (14/18)	10/18 (13/18)
Entzündung unter	Nicht	8/18 (4/18)	8/18 (5/18)
der Therapie	vorhanden		

*Angabe der Ergebnisse von 2 Untersuchern. Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers befinden sich in Klammern.*

### 3.2.5 Vierfelder- $\chi^2$ -Test

Im weiteren Verlauf stellten wir uns die Frage, ob es eine Korrelation zwischen einer starken Entzündungsreaktion unter der Therapie und dem Abheilen 30 Tage nach Beendigung der Therapie in der klinischen und periläsionalen subklinischen Therapie gab. Für die Auswertung wurde eine Kreuztabelle aufgestellt und der Vierfelder- $\chi^2$ -Test verwendet.

Wie sich aus Tabelle 23 entnehmen lässt, kam es bei 6 von 10 (60.0%) bzw. 7 von 14 Studienteilnehmern (50.0%) in der klinischen Haut durch eine starke Entzündungsreaktion unter der Therapie mit dem Solaraze<sup>®</sup> Gel auch zu einer Abheilung. In der periläsionalen subklinischen Haut war das bei 6 von 10 (60.0%) bzw. 5 von 13 (38.5%) der Fall. Umgekehrt zeigten 6 von 8 (75.0%) bzw. 4 von 4 Patienten (100.0%) in der klinischen und 5 von 8 (62.5%) bzw. 4 von 5 (80.0%) in der periläsionalen subklinischen Haut bei einer schwachen Reaktion unter der Therapie auch ein Ausbleiben der Abheilung.

Aus diesen Daten erfolgte die Korrelationsbestimmung zwischen einer starken Reaktion unter der Therapie und dem Abheilen nach der Therapie bzw. zwischen einer schwachen Reaktion unter der Therapie und dem Ausbleiben der Abheilung. Tabelle 24 enthält dabei die Matrix, nach der die Auswertung der Phi-Korrelationskoeffizienten

vorgenommen wurde. In der Literatur findet man zum Teil leicht abweichende Intervalle. Unsere verwendete Matrix basiert auf der Einteilung von Prof. Brosius, der das Buch „SPSS 19“ verfasst hat [Brosius 2011]. Wie Tabelle 25 entnommen werden kann, war die Korrelation in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut nicht sehr ausgeprägt. Zu einer schwachen bzw. mittleren Korrelation kam es in der klinischen Haut mit Werten von 0.350 und 0.426, zu einer sehr schwachen bzw. schwachen in der periläsionalen subklinischen Läsion (Phi-Korrelationskoeffizient 0.224 bzw. 0.175). Es war demnach in unserer Studie nicht möglich, aus der Reaktion unter der Therapie eindeutige Vorhersagen über den weiteren Verlauf der klinischen/ periläsionalen subklinischen Läsion zu treffen.

Tabelle 23

***Kreuztabelle, die bei einer starken bzw. schwachen Entzündungsreaktion nach 45 Tagen Therapie die Abheilung bzw. das Ausbleiben der Abheilung in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut zeigt.***

	Klinische Haut	Subklinische Haut
Starke Reaktion unter der Therapie und Abheilung	6/10 (7/14)	6/10 (5/13)
Schwache Reaktion unter der Therapie und Ausbleiben der Abheilung	6/8 (4/4)	5/8 (4/5)

*Angabe der Ergebnisse von 2 Untersuchern. Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers befinden sich in Klammern.*



Tabelle 24

**Übereinstimmungsmatrix, um aus der Höhe der Phi-Korrelationskoeffizienten die Stärke der Korrelation zwischen einer starken Entzündungsreaktion nach 45 Tagen Therapie und dem Abheilen 30 Tage nach Beendigung der Therapie bzw. einer schwachen Entzündungsreaktion nach 45 Tagen Therapie und dem Ausbleiben der Abheilung 30 Tage nach Beendigung der Therapie abzuleiten.**

Phi-Korrelationskoeffizient	Stärke der Korrelation
0	Keine
1-0,2	Sehr schwach
0,2 - 0,4	Schwach
0,4 - 0,6	Mittel
0,6 - 0,8	Stark
0,8 - 1	Sehr stark
1	Perfekt

*Klassifikation nach Brosius [Brosius 2011].*

Tabelle 25

**Ergebnisse des Vierfelder- $\chi^2$ -Tests, der Aussagen über die Korrelation zwischen einer starken Entzündungsreaktion nach 45 Tagen Therapie und dem Abheilen 30 Tage nach Beendigung der Therapie bzw. einer schwachen Entzündungsreaktion nach 45 Tagen Therapie und dem Ausbleiben der Abheilung 30 Tage nach Beendigung der Therapie in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut trifft.**

Hautareal	Phi-Korrelationskoeffizient	Korrelation zwischen den Variablen
Klinische Haut	0.350 (0.426)	Schwach (Mittel)
Subklinische Haut	0.224 (0.175)	Schwach (Sehr schwach)

*Angabe der Ergebnisse von 2 Untersuchern. Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers befinden sich in Klammern.*

### 3.2.6 McNemar-Test

Des Weiteren war die Frage von Interesse, ob die klinische bzw. periläsionale subklinische Haut des jeweiligen Patienten gleich auf die Therapie, d. h. mit einer Abheilung/ einem Ausbleiben der Abheilung reagieren. Hierzu führten wir den McNemar-Test durch.

Wie sich aus Tabelle 26 entnehmen lässt, reagierten bei 17 von 18 Patienten (94.4%) die klinische und periläsionale subklinische Haut gleichermaßen auf die Therapie. Zu diesem Ergebnis kamen beide Untersucher. Bei einem p-Wert von 1.000, ermittelt durch beide Untersucher, lag somit kein signifikanter Unterschied zwischen der zu Zeitpunkt 3 untersuchten klinischen und periläsionalen subklinischen Haut in Bezug auf die Abheilung/ einem Ausbleiben der Abheilung vor.

Die Tabelle lässt auch Aussagen über die allgemeinen Abheilungsraten unter der Solaraze® Gel-Therapie zu. So kam es bei 8 von 18 (44.4%) bzw. 7 von 18 Patienten (38.9%) in der klinischen Haut zu einer Abheilung 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Die periläsionale subklinische Haut heilte bei 9 von 18 (50.0%) bzw. 6 von 18 (33.3%) Studienteilnehmern ab.

Tabelle 26

**Kreuztabelle, die die Reaktion auf die Therapie 30 Tage nach Beendigung der Therapie zwischen klinischer und periläsionaler subklinischer Haut vergleicht .**

		Abheilung in der subklinischen Haut	
		vorhanden	nicht vorhanden
Abheilung in der klinischen Haut	Vorhanden	8 (6)	0 (1)
	Nicht vorhanden	1 (0)	9 (11)
	Gesamt	9 (6)	9 (12)

$p = 1,000$ . ( $p = 1,000$ ). Angabe der Ergebnisse von 2 Untersuchern. Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers befinden sich in Klammern.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Fragestellung und Kernziel**

Das Kernziel der Studie war es, den Wirkmechanismus von Diclofenac, dem aktiven Wirkstoff im Solaraze® Gel, in der aktinisch geschädigten Haut und der periläsionalen subklinischen Haut besser zu verstehen. Um dieses Ziel zu erreichen, werteten wir die Daten von 18 Patienten mit multiplen aktinischen Keratosen und deren periläsionale subklinische Haut zu drei verschiedenen Zeitpunkten aus. Die Erhebung der Daten erfolgte einmal vor Beginn der Applikation des Solaraze® Gels, nach 45 Tagen Therapie und erneut nach 120 Tagen, d. h. 30 Tage nach Beendigung der Therapie. Wir führten eine deskriptive Untersuchung der Daten sowie verschiedene statistische Tests durch.

Im Rahmen der Untersuchungen ergaben sich 5 wesentliche Fragen, die unter 1.3 bereits aufgeführt wurden und die im Rahmen der Diskussion immer nach dem gleichen Muster abgehandelt werden.

Zuvor wird in einem Unterpunkt kurz auf die erhobenen Daten der klinischen Haut vor Beginn der Therapie eingegangen, da es bereits eine Vielzahl von Studien gibt, die sich mit den grundsätzlichen Evaluationskriterien der AK mit der RCM beschäftigt haben.

#### **4.1.1 Detektion der aktinischen Keratose**

Um die Evaluationsparameter für die Detektion der AK mit den bereits bestehenden Studien vergleichen zu können, führten wir eine deskriptive Untersuchung der Bilder, eine Häufigkeitsberechnung und eine Konkordanzanalyse der Evaluationskriterien durch.

Vor Beginn der Therapie traten in unserer Studie eine Vielzahl von Parametern auf. In diesem Zusammenhang wird auf Abschnitt 3.1.1 verwiesen, der diese Evaluationskriterien im Detail aufführt.

In der deskriptiven Analyse fallen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Beschreibung der sichtbaren Hautveränderungen bei dem Vergleich mit der Literatur

auf [Aghassi 2000, Ulrich 2007a, Ulrich 2007b, Horn 2008, Ulrich 2008, González 2008, Rishpon 2009, Ulrich 2010, Ahlgrimm-Siess 2011, Longo 2013a, Longo 2013b, Zalaudek 2014, Malvey 2015a, Blumetti 2016, Longo 2016]. Nur der Parameter „Parakeratose“ wurde in der Literatur zum Teil anders beschrieben. In 2 Studien zeigte sich die Parakeratose als hochrefraktiler Korneozyt mit zentralem dunklem Nukleus [González 2008, Rishpon 2009]. Wir beobachteten hingegen, wie eine weitere Studie, Korneozyten mit irregulärem hochrefraktilem Nukleus [Ulrich 2008]. Neue für die AK charakteristische Evaluationsparameter wurden nicht gefunden.

Es gibt einige Studien, die die Häufigkeiten der Beobachtungskriterien für die aktinischen Keratosen bzw. die aktinische Cheilitis untersucht haben [Aghassi 2000, Horn 2008, Rishpon 2009, Ulrich 2010, Ulrich 2011, Maier 2014].

Das wichtigste Kriterium für die Diagnose der AK war in unserer Studie die „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ mit Häufigkeitswerten von 100.0%. Dies korreliert sehr gut mit den Angaben in der Literatur. Auch die unter 3.2.1 ermittelten Prozentzahlen der restlichen AK-Parameter stimmen mit denen der Literatur weitestgehend überein [Aghassi 2000, Rishpon 2009, Ulrich 2010, Maier 2014].

Geringe bis gar keine Konkordanzen zeigten sich in der Studie für die Parameter „Parakeratose“ des SC, „Spongiose“ des SG/ SS, „dendritische Zellen“ und „runde Entzündungszellen“ in der DEJ/ D mit Übereinstimmungswerten von 68.8%, 33.3%, 50.0% und 38.9%.

Als Ursache für die geringen Konkordanzwerte für die Parakeratose ist anzunehmen, dass sie schnell übersehen und dann fälschlicherweise als nicht vorhanden interpretiert wurde. Sie war insgesamt nur gering ausgeprägt mit einer Konkordanz von 68.8%, was als leichte Übereinstimmung in der Matrix klassifiziert wird. Dabei ist grundsätzlich festzuhalten, dass bei einer geringen Ausprägung eines Parameters der Graubereich, ab wann man den Parameter als positiv bzw. negativ bezeichnet, besonders groß ist. Bei Kriterien mit geringer Konkordanz tendierte der eine Untersucher wahrscheinlich dazu, den Parameter mit geringer Ausprägung gerade schon als positiv zu bewerten, während der andere ihn negativ beurteilte. Auch bei der nicht vorhandenen Übereinstimmung für das Merkmal „Spongiose“ treffen diese Überlegungen zu. Die geringen Werte bei den Parametern „dendritische Zellen“ und „runde

Entzündungszellen" in der DEJ/ D mit 50.0% und 38.9%, was einer schwachen Übereinstimmung entspricht, lassen sich durch die abnehmende Auflösung der konfokalmikroskopischen Bilder in der Tiefe der Haut erklären. Dabei war es zum Teil schwierig, die Dendriten der dendritischen Zellen von Kollagenfasern zu unterscheiden, wenn die Zelleiber der dendritischen Zellen nicht angeschnitten waren. Die nur leichte Konkordanz dieses Parameters auf Höhe des SG/ SS (72.3%) ist darauf zurückzuführen, dass die Dendriten von den zum Teil vermehrt reflektierenden Konturen der Keratinozyten teilweise nur schwer abgegrenzt werden konnten. Die schwache Ergebnisübereinstimmung der runden Entzündungszellen in der DEJ/ D hat eine andere Ursache. Es war zum Teil schwer, die Reflexionen der Kontur der Keratinozyten und des Interzellularraumes in der DEJ, die auch in gesunder Haut ohne Entzündung vorkommen, von einer leichten Entzündung mit wenigen kleinen, runden Entzündungszellen zwischen den Keratinozyten zu unterscheiden. Ferner war die Abgrenzung der in der Basalzellschicht vorkommenden Pigmentzellen und der natürlichen Reflexionen des Kollagens in der Dermis von den runden Entzündungszellen nicht immer eindeutig und machte folglich eine falsche Interpretation der Bilder möglich. Hinzu kommt folgender Aspekt, der auch grundsätzlich für andere Evaluationskriterien im Bereich der unteren Epidermis/ DEJ gilt: Es war nicht immer einfach einzuordnen, in welcher Schicht der Haut man sich befand. Es gab Situationen, in denen die Bilder eines VivaBlocks<sup>®</sup>, die normalerweise Bildern einer Ebene entsprechen, Bilder unterschiedlicher Ebenen enthielten. Das ist auf ein versehentlich leicht schräges Aufsetzen des Geweberinges auf die Haut zurückzuführen und machte die Unterscheidung zwischen tiefen epidermalen Bildern des SS und Bildern der DEJ/ D nicht immer einfach. Darauf sind sicherlich auch die zum Teil geringen Konkordanzen in der Tiefe der Epidermis und Dermis zurückzuführen.

Es gibt 2 weitere Studien, die ebenfalls die Interobserverübereinstimmung für verschiedene Evaluationsparameter der AK therapieunabhängig ermittelten [Horn 2008, Ulrich 2008]. In der Studie von Ulrich und Kollegen kam es zu einer ähnlichen prozentualen Übereinstimmung für die Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten" und „Parakeratose" im SC, „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Korneozyten" im SG/ SS und die Kriterien „erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation" und „solare Elastose" in der DEJ/ D. Für das Evaluationskriterium „Spongiose" im SG/ SS wurden hingegen in der Studie von Ulrich und Kollegen mit

87.5% bzw. 89.3% im SG und SS höhere Übereinstimmungswerte gefunden im Vergleich zu 33.3% in unserer Studie mit einem negativen Cohens-Kappa-Koeffizienten von -0.113, der als zufallsbedingte Übereinstimmung interpretiert wird [Ulrich 2008]. Die Cohens-Kappa-Koeffizienten in der Studie von Horn und Kollegen für die Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“ im SC und „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ im SG/ SS lagen zwischen 0.4-0.6, was einer mittleren Übereinstimmung entspricht [Horn 2008]. Da sich für diese Parameter, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, in unserer Studie kein Cohens-Kappa-Koeffizient berechnen lässt, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Es ist aber davon auszugehen, dass unsere Übereinstimmungswerte mit 93.8% für den Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“ im SC und 100.0% für das Kriterium „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ im SG/ SS etwas höher ausfielen.

#### ***4.1.2 Wirkmechanismus von Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure in der aktinischen Keratose***

Im Rahmen unserer Studie stellten wir uns folgende Frage:

- Wie wirkt der aktive Wirkstoff des Solaraze® Gels, Diclofenac, in der klinischen Haut?

Um den Wirkmechanismus von Diclofenac während und nach Abschluss der Therapie besser zu verstehen, führten wir eine deskriptive Analyse der konfokalmikroskopischen Bilder durch und beobachteten den Verlauf der Entzündung unter der Therapie. Ferner interessierte uns die Ergebnisübereinstimmung und Reproduzierbarkeit der verschiedenen zuvor festgelegten Parameter. Dafür wurde eine Konkordanzanalyse durchgeführt.

Mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskops war es uns möglich, während der Therapie mit dem Solaraze® Gel das Auftreten von Entzündungszellen (dendritischen Zellen, runden Entzündungszellen) im SS/ SG und der DEJ/ D sowie von Apoptosen und Mikrovesikeln zu visualisieren. Diese Parameter wurden bei der Mehrheit der

Studienteilnehmer mindestens durch einen Untersucher gefunden. Dabei kam es bei 55.6% bzw. 77.8% der Patienten in der untersuchten AK zu einer Zunahme der Entzündung während der Therapie im Vergleich zum Zeitpunkt 0 vor Beginn des Eincremens.

30 Tage nach der Beendigung der Therapie wurde bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten durch beide Untersucher eine solare Elastose gefunden. Ferner zeigten sich die zuvor aufgestellten Kriterien „reguläre polygonale kernlose Korneozyten“ im SC, „Honigwabenstruktur und reguläre Keratinozyten“ im SG/ SS sowie „normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße“ in der DEJ/ D in weniger als der Hälfte der aktinischen Keratosen. Entzündungszellen im SG/ SS und in der DEJ/ D traten hingegen mehrheitlich auf.

Wie bereits unter 1.2.4 beschrieben, gibt es bisher nur eine Studie zu der Wirkungsweise des Solaraze® Gels in den AKs unter konfokalmikroskopischem Monitoring [Malvey 2015a]. Dabei zeigten in unserer Studie die unter der Therapie aufgetretenen dendritischen Zellen und runden Entzündungszellen dieselbe Morphologie wie in der Studie von Malvey et al. Die in unserer Studie gefundenen Apoptosen und Mikrovesikel traten in der Studie von Malvey et al. hingegen nicht auf, wurden aber in der konfokalmikroskopischen AK-Studie unter der Therapie mit dem Topikum Ingenolmebutat (Picato®) mit vergleichbarer Morphologie gefunden [Maier 2014].

Die 30 Tage nach der Beendigung der Therapie aufgestellten RCM-Kriterien zeigten dasselbe konfokalmikroskopische Aussehen wie die Bilder in der gesunden Haut bis auf den Parameter „solare Elastose“ [Huzaira 2001, Calzavara-Pinton 2008, González 2003, González 2008]. Sie zeichnete sich in unserer Studie durch persistierende „curled bright structures“ und „huddled collagen“ aus (s. 3.1.3.5). Diese Parameter wurden bereits zuvor in 2 Studien von Longo und Kollegen im Rahmen der Hautalterung beschrieben [Longo 2013a, Longo 2013b]. Die solare Elastose persistierte auch in einer weiteren konfokalmikroskopischen AK-Studie unter der Therapie mit dem Externum Imiquimod 5.0% (Aldara®) nach Abschluss der Therapie und zeigte eine ähnliche Morphologie [Ulrich 2010]. In der Studie von Malvey und Kollegen wurde hingegen am Therapieende eine Umstrukturierung der vergrößerten Kollagenbündel in dünnere parallel ausgerichtete Fasern beobachtet [Malvey 2015a].

In der Studie von Malvehy et al. wurden keine Häufigkeiten für das Auftreten bestimmter Parameter in der klinischen bzw. periläsionalen subklinischen Haut angegeben [Malvehy 2015a]. Ein Vergleich der ermittelten Häufigkeiten der Evaluationsparameter in unserer Studie mit denen anderer Studien ist folglich nicht möglich.

Im Folgenden wird auf die Konkordanzen der verschiedenen Evaluationskriterien eingegangen. Eine geringe Übereinstimmung zwischen den Untersuchern bestand während der Therapie für den Parameter „Mikrovesikel“ im SG/ SS und „dendritische Zellen“ in der DEJ/ D mit Konkordanzen von 44.4% bzw. 55.6%. Die restlichen Kriterien zeigten akzeptable Konkordanzwerte. Die geringen Übereinstimmungswerte für die Mikrovesikel sind auf ihr zum Teil sehr unscheinbares Aussehen zurückzuführen. Als Ursache für die geringe Interobserverübereinstimmung bei den dendritischen Zellen in der DEJ/ D sind die bereits unter 4.1.1 aufgeführten Ursachen zu nennen.

Die geringen Konkordanzwerte 30 Tage nach Beendigung der Therapie für den Parameter „kein Entzündungsinfiltrat“ im SG/ SS und der DEJ/ D (Übereinstimmung 61.1% und 66.7%) lassen sich ebenfalls mit den unter 4.1.1 aufgeführten Gründen erklären. Eine schlechtere Übereinstimmung als zufällig zu erwarten und somit keine Konkordanz lag für den Parameter „normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße“ vor. Auch dieses Ergebnis lässt sich mit der Subjektivität der Bewertung begründen. So gibt es keine Richtgröße, ab welchem Quer-/ Längendurchmesser ein Gefäß als dilatiert gewertet wird.

Da es sich bei der Studie von Malvehy und Kollegen um die einzige konfokalmikroskopische in-vivo-Studie der aktinischen Keratosen unter der Therapie mit dem Solaraze® Gel handelt, werden ihre Ergebnisse als am Aussagekräftigsten eingestuft [Malvehy 2015a]. Die ermittelten Wirkungen dieser Studie werden nachfolgend mit den Ergebnissen unserer Studie verglichen.

Wirkungen während der Therapie bei dem Vergleich der AKs vor und während (nach 6 Wochen Therapie) der Therapie [Malvehy 2015a]:

- Schuppung ↓
- individuelle Korneozyten ↑
- Parakeratose ↑



- atypische Honigwabenstruktur ↓
- Inflammation ↑ (unser Ergebnis: ↑)

Auch in unserer Studie trat eine Zunahme der Inflammation bei 55.6% bzw. 77.8% unter der Therapie im Vergleich zum Zeitpunkt 0 auf (grüner Pfeil in Klammern).

Aus der Studie von Malvey et al. resultieren bei dem Vergleich vor und direkt nach der Therapie folgende Ergebnisse:

- Schuppung ↓
- individuelle Korneozyten ↑
- Parakeratose ↑
- atypische Honigwabenstruktur ↓ (unser Ergebnis: ↓)
- Inflammation ↑ (unser Ergebnis: ↑)
- dünne parallel ausgerichtete Kollagenfasern ↑ (unser Ergebnis: ↔)

Die in unserer Studie gefundene Abnahme der atypischen Honigwabenstruktur und Zunahme der Inflammation bei dem Vergleich der Werte vor und nach der Therapie decken sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Studie von Malvey und Kollegen (grüne Pfeile in Klammern). Während zu Beginn bei allen Patienten in unserer Arbeit eine atypische Honigwabenstruktur vorlag, wurde diese 30 Tage nach der Therapie nur noch bei 55.6% bzw. 61.1% der Patienten gefunden - die Patientenzahl nahm insgesamt ab. 30 Tage nach der Beendigung des Eincremens lagen in unserer Studie bei der Mehrheit (1. Untersucher: 61.1% im SG/ SS bzw. 66.7% in der DEJ/ D) bzw. bei allen Patienten (2. Untersucher: 100.0% im SG/ SS und in der DEJ/ D) in den AKs Entzündungszellen vor. Nach den Ergebnissen des 2. Untersuchers zeigten dabei mehr Patienten nach als vor der Therapie in den aktinischen Keratosen Entzündungszellen. Der 1. Untersucher kam bei 3 von 4 Evaluationskriterien, die die Entzündung beschreiben, zu demselben Ergebnis. Nur für die „runden Entzündungszellen“ im SG/ SS konnte er eine diskrete Abnahme der Patientenzahl nach der Therapie verzeichnen. Insgesamt lässt sich daraus eine mehrheitliche Zunahme der Patientenzahl für den Parameter „Inflammation“ ableiten. Eine genaue differenzierte Analyse des Entzündungsverhaltens bei dem jeweiligen Patienten gab die Datenlage hingegen nicht her, denn wir untersuchten nach dem binären Klassifikationssystem nur, ob der jeweilige

Entzündungsparameter vor und nach der Therapie vorhanden war und verglichen nicht die Veränderungen des Entzündungsverhaltens bei dem jeweiligen Patienten. Eine Veränderung der Kollagenstruktur bei dem Vergleich vor und nach der Therapie, wie in der Studie von Malvehy und Kollegen bereits am Anfang von 4.1.2 beschrieben, konnten wir in unserer Studie hingegen nicht beobachten (grüner Pfeil in Klammern).

Bei dem Vergleich der Parameter während (nach 6 Wochen Therapie) und direkt nach der Therapie fallen folgende Veränderungen auf [Malvehy 2015a]:

- Schuppung ↓
- individuelle Korneozyten ↓
- Parakeratose ↓
- atypische Honigwabenstruktur ↓
- Inflammation ↓ (unser Ergebnis: ↑↔↓)

Eindeutige Aussagen zu den Veränderungen der Inflammation bei dem Vergleich der Anzahl der Patienten während und 30 Tage nach der Therapie sind in unserer Studie nicht möglich. So kam es bei den dendritischen Zellen im SG/ SS zu einer Abnahme (66.7% → 61.1%) bzw. Zunahme der Patientenzahlen (72.2% → 100.0%) nach den Auswertungen je eines Untersuchers und in der DEJ/ D zu einer Zunahme (50.0% → 66.7%, 94.4% → 100.0%) diagnostiziert durch beide Untersucher. Die Patientenzahl sank (83.3% → 61.1%, 77.8% → 66.7%) bzw. blieb gleich (100.0% → 100.0%, 100.0% → 100.0%) für die runden Entzündungszellen im SG/ SS und in der DEJ/ D (grüne Pfeile in Klammern). Erneut muss betont werden, dass wir im Unterschied zu Malvehy und Kollegen nicht die Veränderungen des Entzündungsverhaltens bei dem jeweiligen Patienten verglichen.

Neben der Studie von Malvehy und Kollegen gibt es weitere Studien, die die Wirkung des Diclofenacs in der aktinisch geschädigten Haut und in anderen Organen ex vivo ohne RCM untersucht haben (s. 1.1.4.1 ) [Jones 1999, Masferrer 2000, Gallo 2001, Liu 2006, Fecker 2007, Ulrich 2009, Dirschka 2010, Fecker 2010, Kaur 2011, Maltusch 2011, Martin 2012, Rodust 2012]. Diese Beobachtungen werden indirekt durch die Untersuchungen weiterer Studien zu dem Wirkmechanismus der Prostaglandine

gestützt [Phipps 1991, Zimmermann 2001, Harris 2002, Wang 2005, Wang 2006, Kalinski 2012]:

- Proliferation ↓ (unser Ergebnis: ↓)
- Invasion ↓ (unser Ergebnis: ↓)
- Apoptose ↑ (unser Ergebnis: ↑)
- Inflammation ↓/↑ (unser Ergebnis: ↑)
- Immunsuppression ↓ (unser Ergebnis: ↓)
- Angiogenese ↓ (unser Ergebnis: ↔)

In unserer Studie gelang es uns erneut mehrere der bekannten Wirkungsweisen des Diclofenacs direkt nachzuweisen - Apoptosen traten unter der Therapie bei 88.9% der Patienten auf und es kam, wie bereits beschrieben, zu einer Zunahme der Patientenzahl für den Parameter „Inflammation“ bei dem Vergleich der AKs vor und während der Therapie bzw. vor und nach Therapieende (grüne Pfeile in Klammern). Dabei muss jedoch zu den Apoptosen einschränkend gesagt werden, dass wir diese nicht an Termin 1 vor Beginn der Therapie untersuchten. Folglich sind Aussagen zu dem Verlauf des Parameters nur eingeschränkt aussagekräftig. Indirekt lässt sich aus der mehrheitlichen Zunahme der Entzündungszellen während der Therapie auf eine abnehmende Immunsuppression schließen, denn unter einer Immunsuppression ist ein vermindertes Auftreten von inflammatorischen Zellen in dem jeweiligen Zielorgan anzunehmen (blauer Pfeil in Klammern) [Zhu 2012].

Neben den Apoptosen konnte ein Untersucher Mikrovesikel finden (55.6%). Diese kommen bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen vor. Sie sind u. a. an der Koagulation, inflammatorischen Reaktionen, der interzellulären Kommunikation, sekretorischen Prozessen und an der Immunmodulation beteiligt. Dennoch ist ihre biologische Rolle nicht ausreichend verstanden [Astner 2005, Al-Nedawi 2009]. Wir interpretierten sie aufgrund ihres Aussehens, als Ansammlung von apoptotischen Zellen, die ein großes Vesikel bilden. Zu diesem Ergebnis kommen auch Rothmund in seiner Dissertation sowie 2 weitere Studien [Hugel 2005, Rothmund 2011, Maier 2014]. Eine abnehmende Proliferation und Invasion lassen sich in unserer Studie indirekt aus der bereits weiter oben beschriebenen abnehmenden Patientenzahl für den Parameter „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ 30 Tage nach Therapieende ableiten (blaue Pfeile in Klammern). Als ein weiteres Kriterium

untersuchten wir die Vaskularisierung bzw. den Durchmesser der Blutgefäße. Die Zahl der Patienten mit erhöhter Vaskularisierung bzw. Blutgefäßdilataion blieb vor und nach der Therapie gleich mit Werten von 72.2% vor und nach bzw. 88.9% vor und nach der Therapie je Untersucher (grüner Pfeil in Klammern). Eine differenzierte Untersuchung der Beschaffenheit der Blutgefäße während der Therapie erfolgte in unserer Studie hingegen nicht.

Die im Rahmen unserer Studie zu allen 3 Zeitpunkten der Untersuchung aufgetretenen Entzündungszellen lassen sich im Rahmen der natürlicherweise vorkommenden Tumorabwehr des menschlichen Organismus erklären. So werden grundsätzlich im Rahmen des Abwehrprozesses die Gefäße in der Haut weit gestellt und der Blutfluss erhöht - dieses Verhalten ließ sich auch im Rahmen unserer Studie beobachten (s. 3.1.1.8). Per Diapedese gelangen vermehrt Entzündungszellen, zumeist CD4- und zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten, Makrophagen und Natürliche Killerzellen in die Haut. Das dabei auftretende Phänomen des „Leukozytenrollings“ der Entzündungszellen entlang des Endothels der Blutgefäße ließ sich dabei vereinzelt mit Hilfe der RCM visualisieren. Die in die Haut gelangten Immunzellen regen wiederum die Apoptose der atypisch veränderten Zellen an, um die Normalisierung des Hautbildes voranzutreiben. Auch dieses Verhalten war in unserer Studie nachweisbar - so ließ sich unter der Therapie mit dem Solaraze® Gel eine Zunahme der Inflammation finden und es traten Apoptosen auf. Dabei können die in die Haut gelangten Natürlichen Killerzellen, als Teil der unspezifischen humoralen Immunabwehr, in den veränderten Keratinozyten der Haut durch deren direkte Bindung den programmierten Zelltod anregen. Auch Makrophagen können Tumorzellen direkt lysieren. Des Weiteren ist bekannt, dass dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen im Rahmen der spezifischen erworbenen Immunabwehr als antigenpräsentierende Zellen für die naiven T-Zellen fungieren, die im Anschluss zu CD4- oder CD8-T-Zellen ausreifen und dann direkt oder indirekt die Apoptose der veränderten Keratinozyten veranlassen [Dzivenu 2003, Maltusch 2011, Silbernagl 2012].

Aufgrund des Aussehens der in unserer Studie gefundenen Zellen ist insgesamt anzunehmen, dass es sich bei den kleinen runden Entzündungszellen um Lymphozyten, d. h. B- und T- Zellen sowie Natürliche Killerzellen, und bei den Zellen mit dendritischen Fortsätzen um Langerhanszellen handelt. Zu diesem Ergebnis kommen auch Malvey und Kollegen [Malvey 2015a]. Eine genaue Typisierung der

einzelnen Zellen ist jedoch nur mit Hilfe der Immunhistologie bzw. Genotypisierung möglich [Longo 2012].

Abschließend lässt sich unsere eingangs gestellte Frage folgendermaßen beantworten. Während der Therapie mit dem Solaraze® Gel konnten wir das Auftreten von Apoptosen und deren Zusammenschlüsse in Form von Mikrovesikeln visualisieren. Ferner kam es unter der Therapie zu einer Zunahme der Zahl der Patienten mit inflammatorischen Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt 0, die nach Therapieende bei einem Großteil der Patienten persistierten. Indirekt wurde eine mehrheitliche Abnahme der Immunsuppression, der Invasion und der Proliferation geschlussfolgert. So lag 30 Tage nach Beendigung der Therapie bei 38.9% bis 44.4% der Patienten eine Honigwabenstruktur im SG/ SS vor. Die Zahl der Patienten mit dilatierten Blutgefäßen blieb vor und nach der Therapie gleich und Veränderungen der solaren Elastose im Therapieverlauf konnten nicht festgestellt werden.

#### ***4.1.3 Detektion der periläsionalen subklinischen Haut***

Im weiteren Verlauf interessierte uns folgende Fragestellung:

- Besteht mit Hilfe der RCM die Möglichkeit der Detektion der periläsionalen subklinischen Läsionen?

Um diese Frage zu beantworten, führten wir eine deskriptive Analyse, eine Häufigkeitsberechnung sowie eine Untersuchung der Konkordanz durch.

In der periläsionalen subklinischen Haut traten eine Vielzahl von Parametern auf. Diese wurden bereits unter 3.1.1 detailliert dargestellt.

Bei der Beschreibung der Morphologie der Evaluationskriterien fallen keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu anderen Studien auf, die die periläsionale subklinische Haut ebenfalls mit der RCM untersuchten [Aghassi 2000, Horn 2008, Ulrich 2010, Ulrich 2015, Malveyh 2016]. Auch bei dem Vergleich des Aussehens der

einzelnen Evaluationskriterien der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut kam es zu keinem Unterschied.

In der Mehrzahl der Fälle zeigte sich kein Unterschied zwischen den in anderen Studien gefundenen Häufigkeiten der Evaluationskriterien und den in unserer Studie ermittelten [Aghassi 2000, Horn 2008, Ulrich 2010]. Allerdings fielen für den Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“ in unserer Untersuchung höhere Werte als in Vergleichsstudien auf. In der Literatur wurde dieser Parameter bei 18.2% bzw. 26.7% der periläsionalen subklinischen Läsionen gefunden [Horn 2008, Ulrich 2010]. Wir beobachteten die einzelnen Korneozyten hingegen bei 50.0% bzw. 85.7%. Als Ursache dafür ist zu nennen, dass die Patienten dazu aufgefordert wurden am Tag der Untersuchung keine Hautpflegecremes zu benutzen, um die Gefahr von zusätzlichen Reflexionen durch Cremereste, die die Aussagekraft des Bildmaterials beeinträchtigen, zu verhindern. Ohne das vorherige Eincremen ist es möglich, dass man mit der RCM einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten findet, die klinisch nicht sichtbar sind. Für die Merkmale „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ und „solare Elastose“ fanden sich in Vergleichsstudien ähnliche Werte [Aghassi 2000, Horn 2008, Ulrich 2010]. Eine „erhöhte Vaskularisierung/ Blutgefäßdilatation“ wurde in der Literatur bei 27.3% gefunden [Ulrich 2010]. Bei uns trat diese häufiger mit 35.3% bzw. 83.3% auf. Erklären lässt sich dieser Unterschied über die bereits zuvor beschriebene Subjektivität bei der Beurteilung der Gefäße.

Viele der Evaluationskriterien kamen in der klinischen in ähnlicher Häufigkeit wie in der periläsionalen subklinischen Haut vor. Für die Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“ und „Parakeratosen“ zeigten sich hingegen bei beiden Untersuchern ein etwas selteneres Auftreten in den periläsionalen subklinischen Läsionen („einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“ bei 88.9% bzw. 100.0% in der klinischen Haut, bei 50.0% bzw. 85.7% in der periläsionalen subklinischen Haut, „Parakeratosen“ bei 83.3% bzw. 56.3% in der klinischen Haut, bei 11.1% bzw. 30.8% in der periläsionalen subklinischen Haut). Das lässt sich damit begründen, dass es sich bei der periläsionalen subklinischen Haut um klinisch gesunde Haut handelt, in der natürlicherweise keine klinisch sichtbare Desquamation in Form von „einzelnen vom Zellverband losgelösten Zellen“ und „Parakeratosen“ vorkommt. Dass diese Parameter trotzdem in der periläsionalen subklinischen Haut vorkamen, lässt sich mit der weiter oben bereits erklärten Trockenheit der Haut durch den Verzicht auf ein Eincremen

sowie durch den fließenden Übergang zwischen einer periläsionalen subklinischen AK und einer klinisch sichtbaren AK erklären. Bei allen anderen Parametern waren die Häufigkeitswerte zwischen der klinischen/ periläsionalen subklinischen Haut bei beiden Untersuchern entweder gleich oder nur einer der Untersucher fand einen Unterschied.

Eine schwache Konkordanz zeigte sich für den Parameter „einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten“ (57.1%). Dies lässt sich damit erklären, dass sich die Hornzellen hyperrefraktil verhalten und es daher nicht immer einfach war, dieses Kriterium klar einzuordnen. Mögliche Gründe für die Konkordanzunterschiede bei den einzelnen Entzündungszellen im SG/ SS und der DEJ/ D und den Unterschieden bei den Blutgefäßen, dem Parameter „Spongiose“ und „Parakeratose“ wurden bereits unter 4.1.1 und 4.1.2 im Detail erläutert. Die Übereinstimmungen für diese Kriterien lag zwischen 16.7% und 72.3%.

Abschließend kann unsere eingangs gestellte Frage wie folgt beantwortet werden. Mit Hilfe der Reflektanz konfokalen Laserscanmikroskopie war die frühe Detektion der periläsionalen subklinischen Läsionen möglich, d. h. die RCM besitzt die Fähigkeit, Veränderungen der epidermalen Morphologie zu visualisieren bevor diese klinisch sichtbar werden [Aghassi 2000, Horn 2008, Ulrich 2010, Malvey 2015a]. Sie bietet daher einen klaren Vorteil gegenüber der klinischen Inspektion. Dabei zeigte die periläsionale subklinische Haut dieselben Parameter, die wir auch in den aktinischen Keratosen finden konnten. Die Häufigkeitsverteilung war jedoch besonders im Stratum corneum eine andere.

#### ***4.1.4 Wirkmechanismus von Diclofenac 3.0% in 2.5% Hyaluronsäure in der periläsionalen subklinischen Haut***

Ferner beschäftigte uns folgende Frage:

- Wie reagiert die periläsionale subklinische Haut unter der Therapie mit dem Solaraze® Gel?

Um eine Antwort auf diese Frage zu finden, analysierten wir erneut die Morphologie der verschiedenen Parameter und beobachteten den Verlauf der Entzündung der periläsionalen subklinischen Haut unter der Solaraze<sup>®</sup>-Therapie. Eine Konkordanzanalyse erfolgte mit Hilfe des Kappa-Tests. Ferner interessierte uns, ob die periläsionale subklinische Haut dasselbe Reaktionsverhalten nach 45 Tagen Therapie und 30 Tage nach Therapieende wie die klinische Haut zeigt. Diese Fragen beantworteten wir mit der zweimaligen Durchführung des McNemar-Tests.

Auch in der periläsionalen subklinischen Haut traten Apoptosen und Entzündungszellen (dendritische Zellen, runde Entzündungszellen) im SG/ SS und in der DEJ/ D bei der Mehrheit der Patienten nach 45 Tagen Therapie auf. Mikrovesikel konnten hingegen nur bei 11.1% der Probanden beobachtet werden.

30 Tage nach der Beendigung der Therapie zeigten sich mehrheitlich im SC reguläre polygonale kernlose Korneozyten und im SG/ SS und in der DEJ/ D ein Entzündungsinfiltrat. Eine normale Vaskularisierung bzw. ein normaler Durchmesser der Blutgefäße wurde bei 58.8% bzw. 16.7% der Probanden gefunden. Ferner trat bei allen Versuchspersonen eine solare Elastose auf.

Es gibt bisher nur eine Studie, die die periläsionale subklinische Haut der AK im Verlauf unter der Therapie mit dem Solaraze<sup>®</sup> Gel konfokalmikroskopisch untersucht hat [Malvey 2015a].

Da sich die Parameter der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut in unserer Studie und der von Malvey und Kollegen morphologisch nicht unterscheiden, verweisen wir auf den Abschnitt 4.1.2..

Die Studie von Malvey und Kollegen ermittelte keine Häufigkeiten für die klinische und subklinische Haut für das Auftreten des jeweiligen Parameters während und nach der Therapie [Malvey 2015a]. Ein Vergleich der Häufigkeiten der verschiedenen Evaluationskriterien mit anderen Studien kann an dieser Stelle demnach nicht erfolgen.

Bei dem Vergleich der aktinischen Keratose und der periläsionalen subklinischen Haut nach 45 Tagen Therapie lagen Apoptosen und Mikrovesikel seltener in der periläsionalen subklinischen Haut vor. Zu diesem Ergebnis kam einer der Untersucher mit 88.9% bzw. 55.6% Apoptosen und 55.6% bzw. 11.1% Mikrovesikeln in der klinischen bzw. periläsionalen subklinischen Haut. Dieses Ergebnis konnte auch durch



den unter 3.2.3 durchgeführten McNemar-Test mit einem signifikanten Unterschied zwischen der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut für beide Parameter als Ergebnis eines Untersuchers bestätigt werden (p-Wert 0.031 und 0.008). Eine Erklärung für den Unterschied wurde nicht gefunden, denn aufgrund der ähnlichen Häufigkeiten für die aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut mit einem Auftreten von 94.4% bis 100.0% zu Zeitpunkt 0 hätten wir auch ähnliche Werte an zugrunde gehenden Zellen unter der Therapie erwartet. Es ist anzunehmen, dass sich der Unterschied über die unterschiedliche Schwere der Honigwabenstrukturstörung bei der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut erklären lässt, die wir jedoch nicht im Detail untersuchten. Bei allen anderen Evaluationskriterien zeigten sich bei beiden Untersuchern ähnliche Häufigkeitswerte zwischen den AKs und der periläsionalen subklinischen Haut.

30 Tage nach der Beendigung der Therapie waren reguläre polygonale kernlose Korneozyten häufiger in der periläsionalen subklinischen als in der klinischen Haut vorhanden mit Werten von 66.7% bzw. 60.0% gegenüber 38.9% bzw. 29.4%. Dieser Zustand ist damit vereinbar, dass bei dem ersten Termin vor Einleitung der Therapie in der periläsionalen subklinischen Haut im Vergleich zu der klinischen Haut weniger einzelne vom Zellverband losgelöste Korneozyten gefunden werden konnten. Außerdem ermittelte einer der Untersucher in der periläsionalen subklinischen Haut den Parameter „normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße“ häufiger als in der klinischen Haut (58.8% in der periläsionalen subklinischen gegenüber 27.8% in der klinischen Haut). Auch dieser Unterschied lässt sich damit begründen, dass dieser Untersucher vor Beginn der Therapie in der periläsionalen subklinischen Haut weniger dilatierte Blutgefäße beobachtete als in den aktinischen Keratosen. Alle weiteren Kriterien der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut kamen in ähnlicher Häufigkeit vor.

Die Konkordanzwerte waren während der Therapie in der periläsionalen subklinischen Haut akzeptabel mit Übereinstimmungen zwischen 72.2% und 100.0%.

Am Ende der Therapie fanden sich geringe Übereinstimmungswerte für den Parameter „kein Entzündungsinfiltrat“ im SG/ SS und das Kriterium „normale(r) Vaskularisierung/ Durchmesser der Blutgefäße“ mit Übereinstimmungswerten von 72.3% und 58.8%. Keine Konkordanz lag für das Merkmal „kein Entzündungsinfiltrat“ in der DEJ/ D vor.

Die Ursachen für die geringe Reproduzierbarkeit dieser Kriterien wurden bereits unter 4.1.1 und 4.1.2 im Detail dargestellt.

Wie bereits zuvor unter 1.2.4 im Detail beschrieben, ist die Studie von Malvey und Kollegen die einzige, die den Wirkmechanismus der periläsionalen subklinischen Haut der AK im Verlauf unter der Therapie mit dem Solaraze® Gel beobachtete [Malvey 2015a]. Zunächst werden die Wirkungen dieser Studie mit den Ergebnissen unserer Studie verglichen.

Wirkungen während der Therapie bei dem Vergleich der periläsionalen subklinischen Haut vor und während (nach 6 Wochen) der Therapie [Malvey 2015a]:

- Schuppung ↓
- individuelle Korneozyten ↑
- Parakeratose ↑
- atypische Honigwabenstruktur ↓
- Inflammation ↑ (unser Ergebnis: ↑)

Auch in unserer Studie stieg die Inflammation bei 55.6% bzw. 72.2% der Patienten (grüner Pfeil in Klammern).

Aus der Studie von Malvey et al. resultieren bei dem Vergleich vor und direkt nach der Therapie folgende Ergebnisse:

- Schuppung ↓
- individuelle Korneozyten ↑
- Parakeratose ↑
- atypische Honigwabenstruktur ↓ (unser Ergebnis: ↓)
- Inflammation ↑ (unser Ergebnis: ↑)
- dünne parallel ausgerichtete Kollagenfasern ↑ (unser Ergebnis: ↔)

Auch wir konnten eine Abnahme der Patientenzahl mit einer atypischen Honigwabenstruktur bei dem Vergleich vor und 30 Tage nach der Therapie in der periläsionalen subklinischen Haut finden (100.0% bzw. 50.0% und 94.4% bzw. 66.7%, grüner Pfeil in Klammern). Bei dem Vergleich der Entzündung zwischen der 1. und 3.

Untersuchung konnte ein Bewerter bei mehr Patienten nach als vor der Therapie Entzündungszellen im SG/ SS und der DEJ/ D erkennen. Der 2. Untersucher kam bei 3 von 4 Evaluationskriterien, die die Entzündung beschreiben, zu demselben Ergebnis - erneut schlussfolgerten wir, wie in der klinischen Haut, eine mehrheitliche Zunahme der Patientenzahl für den Parameter „Inflammation“ (grüner Pfeil in Klammern). Aussagen zu dem genauen Verhalten der Inflammation bei dem jeweiligen Patienten waren erneut in unserer Studie nicht möglich. Auch in der periläsionalen subklinischen Haut konnte keine Veränderung der Kollagenstruktur gefunden werden - die solare Elastose blieb bei allen Patienten vorhanden (grüner Pfeil in Klammern).

Bei dem Vergleich der Parameter während (nach 6 Wochen Therapie) und direkt nach der Therapie fallen folgende Veränderungen auf [Malvey 2015a]:

- Schuppung ↓
- individuelle Korneozyten ↓
- Parakeratose ↓
- atypische Honigwabenstruktur ↓
- Inflammation ↓ (unser Ergebnis: ↑↔↓)

Genauere Angaben zu den Veränderungen der Inflammation bei dem Vergleich der Anzahl der Patienten während und 30 Tage nach Therapieende können in unserer Studie in der periläsionalen subklinischen Haut nicht gemacht werden. So kam es zum Teil bei dem jeweiligen Evaluationsparameter zu einer Zu-/ Abnahme bzw. einem Gleichbleiben der Patientenzahlen (grüne Pfeile in Klammern). Für nähere Einzelheiten siehe 3.2.1.

Die bereits unter 1.1.4.1 im Detail beschriebenen Studien kommen zu folgendem Ergebnis [Phipps 1991, Jones 1999, Masferrer 2000, Gallo 2001, Zimmermann 2001, Harris 2002, Wang 2005, Liu 2006, Wang 2006, Fecker 2007, Ulrich 2009, Dirschka 2010, Fecker 2010, Kaur 2011, Maltusch 2011, Kalinski 2012, Martin 2012, Rodust 2012]:

- Proliferation ↓ (unser Ergebnis: ↓)
- Invasion ↓ (unser Ergebnis: ↓)

- Apoptose ↑ (unser Ergebnis: ↑)
- Inflammation ↓/↑ (unser Ergebnis: ↑)
- Immunsuppression ↓ (unser Ergebnis: ↓)
- Angiogenese ↓ (unser Ergebnis: ↔)

Apoptosen kamen unter der Therapie in der periläsionalen subklinischen Haut mehrheitlich bei 55.6% bzw. 83.3% der Patienten vor (grüner Pfeil in Klammern). Auch die Inflammation der periläsionalen subklinischen Haut stieg, wie bereits beschrieben, bei dem Vergleich vor und während der Therapie und vor und nach Therapieende (grüner Pfeil in Klammern). Daraus lässt sich, wie zuvor in der klinischen Haut, indirekt eine abnehmende Immunsuppression schlussfolgern (blauer Pfeil in Klammern).

Aus der abnehmenden Patientenzahl für den Parameter „aufgehobene Honigwabenstruktur mit atypischen Keratinozyten“ schlussfolgerten wir indirekt erneut eine abnehmende Proliferation und Invasion (blaue Pfeile in Klammern). Die Zahl der Patienten mit erhöhter Vaskularisierung bzw. Blutgefäßdilatation blieb vor und nach Therapieende konstant mit Werten von 35.3% bzw. 83.3% vor der Therapie und 41.2% bzw. 83.3% nach der Therapie (grüner Pfeil in Klammern). Eine Analyse der Beschaffenheit der Gefäße unter der Therapie fand in unserer Studie allerdings erneut nicht statt.

Differenzierte Äußerungen zu der Ursache für das Auftreten der Apoptosen und Entzündungszellen in unserer Studie lassen sich Abschnitt 4.1.2 entnehmen.

Zusätzlich fanden wir im Rahmen unserer Studie mit Hilfe des McNemar-Tests unter 3.2.6 heraus, dass die klinische und periläsionale subklinische Haut bei 17 von 18 Patienten (94.4%) gleichermaßen auf die Therapie mit einer Abheilung/ einem Ausbleiben der Abheilung reagierte. Zu diesem Ergebnis kamen beide Untersucher.

Unsere Ergebnisse zeigen die Wichtigkeit der Mitbehandlung der periläsionalen subklinischen Haut während der Therapie der aktinischen Keratosen. Dieses Vorgehen wird bereits in der Leitlinie und verschiedenen anderen Therapiealgorithmen empfohlen [Stockfleth 2008, 2009, 2011, 2015]. Vor dem Hintergrund der geringen Kosten für das Präparat ist eine großflächige Applikation sicherlich vertretbar. Ferner stellt sich die Frage, ob eine generelle Therapie mit dem Solaraze<sup>®</sup> Gel von Patienten mit chronischer

Sonnenexposition ohne klinisch sichtbare AKs regelmäßig durchgeführt werden sollte, um die möglicherweise in der Tiefe der Epidermis bereits vorhandenen Atypien zur Abheilung zu bringen bevor aus diesen aktinische Keratosen entstehen.

Abschließend lässt sich unsere eingangs gestellte Frage wie folgt beantworten. Unsere Studie konnte zeigen, dass auch die periläsionale subklinische Haut unter der Therapie mit dem Solaraze<sup>®</sup> Gel mitreagiert und zur Abheilung gebracht werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die klinische und periläsionale subklinische Haut bei 17 von 18 Patienten gleichermaßen auf die Therapie mit einer Abheilung/ einem Ausbleiben der Abheilung reagierte. Während der Therapie wurde auch in der periläsionalen subklinischen Haut das Auftreten von Apoptosen und Mikrovesikeln und eine mehrheitliche Zunahme der Inflammation im Vergleich zum Zeitpunkt 0 beobachtet. Eine Abnahme der Immunsuppression, Invasion und Proliferation wurde indirekt für den Großteil der Studienteilnehmer abgeleitet. 30 Tage nach Therapieende bestand bei 50.0% bzw. 33.3% der Patienten eine Honigwabenstruktur im SG/ SS. Veränderungen des Aussehens der solaren Elastose und der Anzahl der Patienten mit dilatierten Blutgefäßen wurden bei dem Vergleich vor und nach der Therapie nicht gefunden.

#### **4.1.5 Ansprechraten**

Weiterhin fragten wir uns:

- Stimmen die Ansprechraten der Therapie mit denen der Literatur überein?

Die Ansprechraten auf die Therapie mit dem Solaraze<sup>®</sup> Gel waren mit 44.4% bzw. 38.9% in der klinischen und 50.0% bzw. 33.3% in der periläsionalen subklinischen Haut gering. In vergleichbaren Studien kam es nach 60 bis 90 Tagen bei 14.3% bis 89.0% zu einer kompletten klinischen Abheilung der aktinischen Keratosen [Wolf 2001, Rivers 2002, Smith 2006, Dirschka 2010, Akarsu 2011].

Die durchweg geringen Abheilungsraten der aktinischen Keratosen in unserer Studie lassen sich damit begründen, dass die RCM im Vergleich zu der rein klinischen Evaluation die Fähigkeit besitzt, residuale Atypien bei klinischer Clearance

aufzudecken. Das heißt, dass trotz klinischer Abheilung in der Tiefe der Epidermis 30 Tage nach Therapieende noch Atypien vorhanden sein können, die von der RCM detektiert werden und die die Wahrscheinlichkeit für ein Wiederauftreten von AKs erhöhen. Dementsprechend können wir davon ausgehen, dass unsere Ansprechraten bei einer reinen klinischen Evaluation der AKs etwas höher gewesen wären.

Die periläsionale subklinische Haut ließ sich vor, während und nach der abgeschlossenen Therapie klinisch von der gesunden Haut nicht unterscheiden. Mit Hilfe der RCM war es uns jedoch möglich genaue Aussagen über den Therapieerfolg in der periläsionalen subklinischen Haut zu treffen. Das ist von enormer Wichtigkeit, um zu verhindern, dass die periläsionale subklinisch veränderte Haut langfristig in eine aktinische Keratose übergeht.

Bei den geringen von uns beobachteten Abheilungsraten muss diskutiert werden, ob eine 60- bis 90-tägige Therapie, die laut Fachinformation und Leitlinie empfohlen wird, für die Mehrheit der Patienten ausreicht [Stockfleth 2011, Fachinformation Almirall Solaraze® 3% Gel 2015]. Diese Überlegung wird durch eine Studie gestützt, in der die Abheilungsraten der AKs zwischen einer 3- und 6-monatigen Therapie mit dem Solaraze® Gel verglichen wurden. Unter klinischer Evaluation kam es dabei nach 3 Monaten bei 40.0% der Patienten zu einer Abheilung, während nach 6 Monaten 5.0% mehr eine Clearance zeigten. Histologisch konnte eine 10-prozentige Verbesserung von 30.0% auf 40.0% nach 6 Monaten Therapie verzeichnet werden [Pflugfelder 2012]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine individuelle zumeist längere Therapie einer strikten 60- bzw. 90-Tage-Therapie vorzuziehen ist. Die Kontrollen lassen sich dabei sehr genau mit der RCM durchführen.

Die in 3.2.5 in Tabelle 25 gezeigte schwache Korrelation in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut zwischen einer starken Entzündungsreaktion während der Therapie und dem Abheilen 30 Tage nach Therapieende bzw. einer schwachen Entzündung nach 45 Tagen Therapie und dem Ausbleiben der Abheilung (Phi-Korrelationskoeffizient 0.350 und 0.426 in der klinischen bzw. 0.224 und 0.175 in der periläsionalen subklinischen Haut) machen es nicht möglich, aus der Reaktion unter der Therapie eindeutige Aussagen über den weiteren Verlauf der Läsionen zu treffen. Allerdings konnte in unserer Studie in 3.2.5 in Tabelle 23 gezeigt werden, dass bei einer schwachen Reaktion unter der Therapie bei 75.0% bzw. 100.0% in der klinischen Haut

und 62.5% bzw. 80.0% der Patienten in der periläsionalen subklinischen Haut auch keine Abheilung stattfand. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass eine ausbleibende immunologische Auseinandersetzung des Körpers mit den sich in der Haut befindlichen atypischen Zellen die Wahrscheinlichkeit für persistierende Atypien erhöht. Bevor jedoch aus diesen Ergebnissen weitergehende Schlussfolgerungen gezogen werden können, müssen zur Untermauerung weitere Studien durchgeführt werden.

Die zu Beginn dieses Unterpunktes gestellte Frage lässt sich auf folgende Weise beantworten. Die geringen Ansprechraten in unserer Studie in der klinischen und in der periläsionalen subklinischen Haut stimmen weitestgehend mit den Ergebnissen vieler anderer Studien überein. Dennoch lässt sich vermuten, dass wir höhere Ansprechraten bei einer reinen klinischen Evaluation ermittelt hätten.

#### **4.1.6 Visualisierung des Behandlungseffekts**

Abschließend ergab sich folgende Frage:

- Eignet sich die RCM zur Visualisierung des Behandlungseffekts des Solaraze<sup>®</sup> Gels in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut?

Die Studie konnte zeigen, dass uns die RCM durch die Visualisierung und das Monitoring der pharmakodynamischen Veränderungen von Diclofenac in der AK und der periläsionalen subklinischen Haut ermöglichte, den Wirkmechanismus dieses Therapeutikums besser zu verstehen. Dennoch zeigen die teilweise vorhandenen großen Konkordanzunterschiede zwischen den Untersuchern für die einzelnen Evaluationskriterien, dass die Bewertung der einzelnen Kriterien zum Teil doch auch subjektiven Faktoren unterliegen und es demnach viel Erfahrung braucht, um das Bildmaterial interpretieren zu können. Dabei fiel auf, dass eine besondere Schwierigkeit darin lag die rein deskriptiven Parameter in ein binäres System (vorhanden/ nicht vorhanden) zu überführen. Ferner konnten wir feststellen, dass die konfokalmikroskopische Untersuchung aufgrund der nahezu histologischen Auflösung genauer war als die rein klinische Evaluation. Dabei glichen die Parameter der AKs in der RCM denen der Routinehistologie.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die RCM ein vielversprechendes diagnostisches Mittel ist. Die Noninvasivität gepaart mit der Möglichkeit der visuellen Kontrolle des Therapieerfolges der feldkanzerisierten Haut machen die RCM so attraktiv. Dennoch ist es fraglich, ob die hohen Anschaffungskosten des konfokalen Lasermikroskops und der hohe Zeitaufwand der Untersuchung pro Patient für den einzelnen Arzt bzw. das Gesundheitssystem als Routineuntersuchung tragbar sind. So wird die Zukunft zeigen, ob die RCM flächendeckend in dem therapeutischen Monitoring der AKs und anderer Hauterkrankungen eingesetzt werden wird. Es lässt sich vermuten, dass das wesentlich von der Preisentwicklung für das Gerät und die Einführung noch kostengünstigerer schneller zu nutzender Geräte abhängen wird. So reagierte der Hersteller bereits mit der Einführung des VivaScope<sup>®</sup> 3000, das als Handgerät die Handlichkeit und Schnelligkeit der Untersuchung durch die fehlende Notwendigkeit der Ring-Fixierung erhöht [<http://www.vivascope.de>].

#### **4.2 Limitationen und Ausblick**

Es gibt mehrere Schwachpunkte unserer Studie, die im Folgenden aufgeführt werden. Sie geben Anlass für die Durchführung weiterer Studien.

Als begrenzender Faktor für die in dieser Studie diskutierten Ergebnisse ist die geringe Patientenzahl von 22 eingeschlossenen und 18 ausgewerteten Studienteilnehmern zu nennen. Eventuell haben die Einzelergebnisse bei der kleinen Stichprobe einfach nicht genügend Trennschärfe, um eine echte Überlegenheit zu zeigen. Ein nicht-signifikantes Ergebnis schließt demnach tatsächliche Unterschiede nicht aus. Ferner handelt es sich bei der von uns durchgeführten Studie um eine explorative Datenanalyse, so dass eine Übertragung auf die Grundgesamtheit auch aus diesem Grund, unabhängig von der geringen rekrutierten Patientenzahl, nicht möglich ist. Zudem wären die Aussagen zur Wirkung von Diclofenac während und nach der Therapie noch genauer gewesen, wenn wir die Entzündungszellen an Termin 3 differenziert und zu allen 3 Zeitpunkten die Apoptosen und die Blutgefäßbeschaffenheit untersucht hätten. Des Weiteren sind durch unsere Studie nur Aussagen zu der Zu- oder Abnahme der Patientenzahlen für den jeweiligen Parameter möglich. Wir untersuchten nach dem binären Klassifikationssystem nur, ob der jeweilige Parameter zu den verschiedenen



Untersuchungszeitpunkten vorhanden war oder nicht. Eine differenzierte Analyse der Veränderung des jeweiligen Parameters bei dem jeweiligen Patienten im Therapieverlauf, wie in der Studie von Malveyh und Kollegen, erfolgte hingegen nicht. Eine Ausnahme stellt die Veränderung des Entzündungsverhaltens dar, die wir im Detail bei dem jeweiligen Patienten durch den Vergleich von Zeitpunkt 1 und 2 untersuchten.

Neben den Schwachpunkten im Studiendesign fielen weitere Nachteile der Reflektanzkonfokalen Lasermikroskopie auf. Die RCM ermöglichte uns ausschließlich morphologische Aussagen über die epidermalen und oberflächlich dermalen Vorgänge. Eine genaue Typisierung der auftretenden Zellen ist hingegen nur durch die Biopsieentnahme mit anschließender Immunhistologie bzw. Genotypisierung möglich. Die zum Teil großen Konkordanzunterschiede zwischen den Untersuchern zeigen auch, dass die Beurteilung bestimmter RCM-Parameter sehr subjektiven Faktoren unterliegen und folglich die Aussagekraft der RCM-Bilder teilweise eingeschränkt ist. Dabei konnte man in dieser Studie sehen, dass die Konkordanzen besonders in der Tiefe der Haut sanken, was auf die abnehmende Eindringtiefe der RCM mit einer Abnahme der Auflösung der Bilder in der Tiefe zurückzuführen ist. Der hohe Zeitaufwand bei der Untersuchung und die hohen Kosten im Vergleich zu der reinen visuellen Kontrolle wurden bereits kritisch unter 4.1.6 angemerkt.

Vor dem Hintergrund der Schwachpunkte des Studiendesigns und der RCM sind zukünftige Studien notwendig, die ein größeres Kollektiv untersuchen. In unserer Studie fiel ferner auf, dass viele Patienten erst am 3. Untersuchungstermin eine Reaktion auf die Therapie in Form von Entzündungszellen und Apoptosen zeigten. Außerdem wurden viele Patienten beobachtet, deren Läsionen abgeheilt waren, bei denen aber noch ein Restentzündung und dilatierte Blutgefäße vorlagen. In diesem Zusammenhang wäre interessant gewesen, diese Patienten über einen längeren Zeitraum als 120 Tage nach 90-tägiger Solaraze<sup>®</sup>-Therapie zu untersuchen, um zu ermitteln, ob die klinischen und periläsionalen subklinischen Läsionen noch zur Abheilung gebracht worden wären bzw. ob sich die Entzündung und Blutgefäßdilatation zurückgebildet hätte. Unsere Überlegungen werden von der in der Einleitung unter 1.1.4.1 im Detail beschriebenen Studie von Nelson und Kollegen gestützt [Nelson 2009]. Aufgrund der geringen von uns beobachteten Abheilungsraten wäre ferner eine Studie aufschlussreich, die Patienten mit einer 90-tägigen und einer längeren Solaraze<sup>®</sup>-Therapie vergleicht, um unsere

Vermutung und die Beobachtungen in einer anderen Studie zu stützen, dass eine längere Therapie der AKs auch in höheren Ansprechraten resultiert auch wenn damit die Compliance der Patienten laut gängiger Meinung abnimmt [Pflugfelder 2012, Stockfleth 2015]. Für die Zukunft wäre ferner die Durchführung einer histokorrelativen Studie interessant, wie diese von Pellacani und Kollegen durchgeführt wurde [Pellacani 2016]. Durch die Aufnahme von konfokalmikroskopischen Bildern und die darauffolgende Biopsie dieser Läsion wären Aussagen zu den vorhandenen Zellen in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut möglich.

Werden diese Überlegungen in zukünftigen Studien berücksichtigt, wird es noch einfacher, definitive Aussagen über den Wirkmechanismus des Diclofenacs in der Haut zu tätigen und klare, eventuell im Vergleich zu der Leitlinie von 2011, veränderte Therapieempfehlungen in Bezug auf das Solaraze® Gel aufzustellen. So gelten unsere Ergebnisse nur für das von uns untersuchte Patientenkollektiv. Die aus unseren Ergebnissen abgeleiteten Schlussfolgerungen müssen durch zukünftige Studien untermauert werden.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung:** Die aktinische Keratose ist als UV-induziertes Plattenepithelkarzinom in situ definiert. Sie stellt heute das häufigste in-situ-Karzinom des Menschen dar und wird als flächenhafte Erkrankung im Sinne der Feldkanzerisierung verstanden. Aufgrund der hohen Prävalenz und der Möglichkeit der Entartung ist eine frühzeitige Therapie sinnvoll. Ein häufiges in der Therapie der feldkanzerisierten Haut eingesetztes Topikum ist dabei das 3.0% Diclofenac in 2.5% Hyaluronsäure, dessen Wirkmechanismus bisher in der aktinisch geschädigten klinischen und periläsionalen subklinischen Haut nur in einer Studie konfokalmikroskopisch untersucht wurde.

**Ziele:** Das Kernziel dieser Studie war es, den Wirkmechanismus von Diclofenac in der aktinisch veränderten klinischen und periläsionalen subklinischen Haut mit Hilfe der Reflektanz konfokalen Laserscanmikroskopie durch Visualisierung besser zu verstehen. Dabei interessierte uns auch, ob die RCM die Detektion der im Rahmen der

Feldkanzerisierung auftretenden periläsionalen subklinischen Haut ermöglicht. Außerdem ermittelten wir die Ansprechraten auf die Therapie.

**Patienten und Methoden:** Die Daten von 18 Patienten wurden in der Studie ausgewertet. Pro Patient wurde eine klinisch charakteristische AK und eine periläsionale subklinische Läsion untersucht. Die Behandlung mit 3.0% Diclofenac in 2.5% Hyaluronsäure erfolgte zweimal täglich über einen Zeitraum von 90 Tagen mit konfokalmikroskopischen Untersuchungen vor Beginn, nach 45 Tagen Therapie und 30 Tage nach Therapieende. Die Auswertung der Bilddaten wurde dabei anhand von verschiedenen Evaluationskriterien je Zeitpunkt und Läsion nach dem binären Klassifikationssystem 1/ 0 bzw. vorhanden/ nicht vorhanden durch 2 unabhängige Untersucher (U1/ U2) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Daten verschiedenen statistischen Tests zugeführt.

**Ergebnisse:** Im Rahmen dieser Studie stellten wir fest, dass sich die RCM neben der klinischen Haut auch zur Detektion der periläsionalen subklinischen Läsionen eignet. Dabei zeigte die periläsionale subklinische Haut entsprechende Parameter, die auch in den AKs vorkommen, jedoch mit anderen Häufigkeiten. Ferner ermöglichte die RCM die Visualisierung des Behandlungseffekts des Diclofenacs in der aktinisch geschädigten klinischen und periläsionalen subklinischen Haut. Während der Therapie konnten wir das Auftreten von Apoptosen und deren Zusammenschlüsse in Form von Mikrovesikeln visualisieren. Gleichzeitig wurde eine mehrheitliche Zunahme der Inflammation beobachtet - runde Entzündungszellen und dendritische Zellen traten auf, die nach Therapieende bei einem Großteil der Patienten persistierten. Es war allerdings nicht möglich aus der Stärke der Entzündungsreaktion unter der Therapie Aussagen über den Therapieerfolg zu treffen.

Zur Abheilung kam es in der klinischen Haut bei 44.4%/ 38.9% (U1/ U2) und in der periläsionalen subklinischen bei 50.0%/ 33.3% (U1/ U2) der Studienteilnehmer. Dabei reagierten 94.4% der klinischen und periläsionalen subklinischen Läsionen des jeweiligen Patienten gleichermaßen entweder mit einer Abheilung oder einem Nichtansprechen (U1/ U2). Veränderungen des Aussehens der solaren Elastose und der Anzahl der Patienten mit dilatierten Blutgefäßen wurden in der klinischen und periläsionalen subklinischen Haut bei dem Vergleich vor und nach der Therapie mehrheitlich nicht gefunden.

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse unserer Studie konnten zeigen, dass die RCM ein vielversprechendes diagnostisches Mittel ist. Die Noninvasivität gepaart mit der Fähigkeit der Detektion der feldkanzerisierten Haut und des Monitorings der pharmakodynamischen Veränderungen des Diclofenacs in der aktinisch geschädigten klinischen und periläsionalen subklinischen Haut während der Therapie ermöglichte uns den Wirkmechanismus besser zu verstehen. Dabei unterstreicht die visualisierte periläsionale Mitreaktion unter der Therapie die Wichtigkeit der großflächigen Applikation des Gels. Auch die Evaluation des Therapieerfolges war mit Hilfe der RCM möglich.

Bei der von uns durchgeführten Studie handelt es sich um eine explorative Datenanalyse. So gelten unsere Ergebnisse nur für das von uns untersuchte Patientenkollektiv. Ferner schränken die zum Teil gefundenen großen Konkordanzunterschiede zwischen den Untersuchern für einzelne Evaluationsparameter die Aussagekraft unserer Ergebnisse ein. So sind zukünftige Studien zur Untermauerung unserer Ergebnisse notwendig. Der zukünftige Einsatz der RCM bei dem Monitoring der aktinischen Keratosen und anderer Hauterkrankungen wird dabei wesentlich vom technischen Fortschritt und der Kostenentwicklung abhängen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

<b>AA</b>	Arachidonsäure
<b>AIF</b>	apoptose-induzierender Faktor
<b>AK</b>	aktinische Keratose
<b>bcl-2</b>	B-cell-lymphoma-2
<b>bFGF</b>	basic Fibroblast Growth Factor
<b>CD95L</b>	Cluster of differentiation 95 Ligand
<b>c-FLIP</b>	cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>D</b>	Dermis
<b>DDG</b>	Deutsche Dermatologische Gesellschaft
<b>DEJ</b>	Dermoepidermale Junctionszone
<b>FasL</b>	Fas Ligand
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INF</b>	Interferon
<b>MAP</b>	mitogen-activated protein
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
<b>NSAR</b>	nicht-steroidale-Antirheumatika
<b>PEK</b>	Plattenepithelkarzinom
<b>P</b>	physician
<b>PG E<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinasen-Signalweg
<b>PPAR<math>\delta</math></b>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\delta$
<b>Ras</b>	rat sarcoma
<b>RCM</b>	Reflektanz konfokale Laserscanmikroskopie
<b>SC</b>	Stratum corneum
<b>SG</b>	Stratum granulosum
<b>SS</b>	Stratum spinosum
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha
<b>TRAIL</b>	TNR-Related Apoptosis Inducing Ligand
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>U</b>	Untersucher

**7. Literaturverzeichnis**

Ackerman AB. Solar keratosis is squamous cell carcinoma. Arch Dermatol 2003;139(9):1216-7.

Ackerman AB, Mones JM. Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. Br J Dermatol 2006;155(1):9-22.

Aghassi D, Anderson RR, González S. Confocal laser microscopic imaging of actinic keratoses in vivo: a preliminary report. J Am Acad Dermatol 2000;43(1 ):42-8.

Ahlgrimm-Siess V, Cao T, Oliviero M, Hoffmann-Wehenhof R, Rabinovitz HS, Scope A. The vasculature of nonmelanocytic skin tumors on reflectance confocal microscopy: vascular features of squamous cell carcinoma in situ. Arch Dermatol 2011;147(2):264.

Akarsu S, Aktan S, Atahan A, Koç P, Özkan S. Comparison of 3% diclofenac sodium gel and 5% imiquimod cream for the treatment of actinic keratoses. Clinic Exp Dermatol 2011;36(5):479-84.

Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumour-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(19):3794-9.

Altman DG. Practical statistics for medical research. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, 1991.

Altmeyer P, Paech V. Online-Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin. Keratosis actinica. 2. Auflage, 2016.

Astner S, González E, Cheung AC, Rius-Diaz F, Doukas AG, William F, González S. Non-invasive evaluation of the kinetics of allergic and irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2005;124(2):351-9.

Astner S, Ulrich M. Konfokale Laserscan-Mikroskopie. *Hautarzt* 2010;61:421-8.

Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM. Aktinische Keratosen. *Hautarzt* 2003;54(6):551-60.

Bagazgoitia L, Cuevas J, Juarranz A. Expression of p53 and p16 in actinic keratosis, bowenoid actinic keratosis and Bowen's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24(2):228-30.

Berking C. Photokarzinogenese - molekulare Mechanismen und präventive Strategien. *Hautarzt* 2007;58(5):398-05.

Berman B, Amini S, Valins W, Block S. Pharmacotherapy of actinic keratosis. *Expert Opin Pharmacother* 2009;11(18):3015-31.

Bestak R, Halliday GM. Chronic low-dose UVA irradiation induces local suppression of contact hypersensitivity, langerhans cell depletion and suppressor cell activation in C3H/HeJ mice. *Photochem Photobiol* 1996;64(6):969-74.

Blumetti TP, Scope A, de Macedo MP, Ferreira JB, Gomes EE, Enokihara MY, Pinto CA, Nascimento MM, Rezza GG, Braga JC. Dermoscopic and reflectance confocal microscopy findings in extra-genital HPV16-associated pigmented squamous cell carcinoma in situ. *Acta Derm Venereol* 2016; Epub ahead of print. [Eingesehen am 25.06.2016]

Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003;63(8):1727-30.

Brosius F. In: SPSS 19. 1. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Verlagsgruppe Hüthig-Jehle-Rehm 2011;23:523.

Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. Comparative quantification of IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-10r, TNF- $\alpha$  and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflam Res* 2000;49(6):290-6.

Brown MB, Jones SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19(3):308-18.

Callen JP, Bickers DR, Moy RL. Actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* 1997;36(4):650-3.

Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M, Sala R, Pellacani G. Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochem Photobiol* 2008;84(6):1421-30.

De Fabo EC, Noonan FP. Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J Exp Med* 1983;158(1):84-9.

Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Brit J Dermatol* 2002;146(61):1-6.

Dirschka T, Bierhoff E, Pflugfelder A, Garbe C. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel induces regression of cancerous transformation in actinic keratoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24(3):258-63.

Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *An Bras Dermatol* 2009;84(5):469-75.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12(12):1063-73.



Dubreuilh WA. Des hyperkeratoses circonscrites. *Ann Dermatol Venereol* 1896;27: 1158-64.

Dzivenu OK, Phil D, O'Donnell-Tormey J. In: *Cancer and the immune system:the vital connection*. *Canc Res Inst*;2003;7-16.

Fachinformation Almirall Solaraze® 3% Gel. Rote Liste Service GmbH, 2015.

Fallen RS, Gooderham M. Ingenol mebutate: an introduction. *Skin Therapy Lett* 2012;17(2):1-3.

Fecker LF, Stockfleth E, Nindl I, Ulrich C, Firschner T, Eberle J. The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Br J Dermatol* 2007;156(3):25-33.

Fecker LF, Stockfleth E, Braun FK, Rodust PM, Schwarz C, Köhler A, Leverkus M, Eberle J. Enhanced death ligand-induced apoptosis in cutaneous SCC cells by treatment with diclofenac/hyaluronic acid correlates with downregulation of c-FLIP. *J Invest Dermatol* 2010;130(8):2098-109.

Freudenthal W. Verruca senilis und Keratoma senile. *Arch Dermatol Syph* 1926;152(2): 505-28.

Frost C, Green A. Epidemiology of solar keratoses. *Brit J Dermatol* 1994;131(4):455-64.

Frost C, Green A, Williams G. The prevalence and determinants of solar keratoses at a subtropical latitude (Queensland, Australia). *Brit Ass Dermatol* 1998;139(6):1033-9.

Frost C, Williams G, Green A. High incidence and regression rates of solar keratoses in a Queensland community. *J Invest Dermatol* 2000;115(2):273-7.

Fu W, Cockerell CJ. The actinic (solar) keratosis: a 21st-century perspective. *Arch Dermatol* 2003;139(1):66-70.

Fuchs A, Marmur E. The kinetics of skin cancer: progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2007;33(9):1099-101.

Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumour angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3(1):53-61.

Gebauer K, Brown P, Varigos G. Topical diclofenac in hyaluronan gel for the treatment of solar keratoses. *Australas J Dermatol* 2003;44(1):40-3.

Gebhardt M, Reuter A, Knopf B. Allergic contact dermatitis from topical diclofenac. *Contact Dermatitis* 1994;30(3):183-4.

Glass AG, Hoover RN. The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer. *JAMA* 1989;262(15):2097-100.

Gras J. Ingenol mebutate: a new option for actinic keratosis treatment. *Drugs Today* 2013;49(1):15-22.

Green A. Changing patterns in incidence of non-melanoma skin cancer. *Epithelial Cell Biol* 1992;1(1):47-51.

Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol* 2000;42(1):23-4.

González S, Sackstein R, Anderson RR, Rajadhyaksha M. Real-time evidence of in vivo leukocyte trafficking in human skin by reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2001;117(2):384-6.

González S, Swindells K, Rajadhyaksha M, Torres A. Changing paradigms in dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology. *Clin Dermatol* 2003;21(5):359-69.

González S, Gill M, Halpern AC. In: Reflectance confocal microscopy of cutaneous tumors: An atlas with clinical, dermoscopic and histological correlations. 1. Auflage. Zug, Schweiz: Informa Healthcare 2008;1(1):1-29,(3):49-59.

Hall HI, May DS, Lew RA, Koh HK, Nadel M. Sun protection behaviors of the U.S. white population. *Prev Med* 1997;26(4):401-7.

Halliday GM, Bestak R, Yuen KS, Cavanagh LL, Barnetson RS. UVA-induced immunosuppression. *Mutat Res* 1998;422(1):139-45.

Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Immunol Today* 1991;12(10):349-52.

Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Sprink PJ, Leigh IM, Breuer J, Proby CM. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000;61(3):289-97.

Hauschild A, Kähler KC, Egberts F. Modern treatment modalities in actinic keratoses of the skin. *Dtsch Med Wochenschr* 2006;131(9):447-52.

Heaphy MR Jr, Ackerman AB. The nature of solar keratosis: a critical review in historical perspective. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(1):138-50.

Holme SA, Malinovsky K, Roberts DL. Changing trends in non-melanoma skin cancer in South Wales, 1988-98. *Brit J Dermatol* 2000;143(6):1224-9.

Horn M, Gerger A, Ahlgrim-Siess V, Weger W, Koller S, Kerl H, Samonigg H, Smoke J, Hofmann-Wellenhof R. Discrimination of actinic keratoses from normal skin with reflectance mode confocal microscopy. *Dermatol Surg* 2008;34(5):620-5.

<http://www.vivascope.de> [Eingesehen am 25.06.2016]

Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology* 2005;20:22-7.

Huzaira M, Rius F, Rajadhyaksha M, Anderson RR, González S. Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2001;116(6):846-52.

Jackson S, Storey A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000a;19(4):592-8.

Jackson S, Harwood F, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 2000b;14(23):3065-73.

Jones RB. Ozone depletion and cancer risk. *The Lancet* 1987;330(8556):443-6.

Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999;5(12):1418-23.

Jorizzo JL. Current and novel treatment options for actinic keratosis. *J Cut Med Surg* 2005;8(3):13-21.

Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Immunol* 2012;188(1):21-8.

Karagas MR, Nelson HH, Zens MS, Linet M, Stukel TA, Spencer S, Applebaum KM, Mott L, Mabuchi K. Squamous cell and basal cell carcinoma of the skin in relation to radiation therapy and potential modification of risk by sun exposure. *Epidemiol* 2007;18(6):776-84.

Kaur J, Sanyal SN. Diclofenac, a selective COX-2 inhibitor, inhibits DMH-induced colon tumorigenesis through suppression of MCP-1, MIP-1 $\alpha$  and VEGF. *Mol Carcinog* 2011;50(9):707-18.

Kempf W, Hantschke M, Kutzner H, Burgdorf WHC. In: Dermatopathologie. 2. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag 2010;2(4):170-1.

Kerr OA, Kavanagh G, Horn H. Allergic contact dermatitis from topical diclofenac in Solaraze gel. *Contact Dermatitis* 2002;47(3):175.

Kleyn CE, Bharati A, King CM. Contact dermatitis from 3 different allergens in Solaraze gel. *Contact Dermatitis* 2004;51(4):215-6.

Korde VR, Bonnema GT, Xu W, Krishnamurthy C, Ranger-Moore J, Saboda K, Slayton LD, Salasche SJ, Warneke JA, Alberts DS, Barton JK. Using optical coherence tomography to evaluate skin sun damage and precancer. *Lasers Surg Med* 2007;39(9):687-95.

Kowalzik L, Ziegler H. Photoallergic contact dermatitis from topical diclofenac in Solaraze gel. *Contact Dermatitis* 2006;54(6):348-9.

Kunstfeld R, Pehamberger H. Aktinische Keratosen. *Krebs:Hilfe!* 2009;V-VII.

Kütting B, Drexler H. UV-induced skin cancer at workplace and evidence-based prevention. *Int Arch Occup Environ Health* 2010;83(8):843-54.

Lebwohl M, Swanson N, Anderson LL, Melgaard A, Xu Z, Berman B. Ingenol mebutate gel for actinic keratoses. *N Engl J Med* 2012;366(11):1010-9.

Lee SG, Ko NY, Son SW, Bae H, Ha JS, Pak HY, Shin YS. The impact of ozone depletion on skin cancer incidence in Korea. *Br J Dermatol* 2013;196(5):1164-5.

Lefell DJ. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 2000;42(1):18-22.

Liu X, Yue P, Schönthal AH, Khuri FR, Sun SY. Cellular FLICE-inhibitory protein down regulation contributes to celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Cancer Res* 2006;66(23):11115-9.

Longo C, Zalaudek I, Argenziano G, Pellacani G. New directions in dermatopathology: in vivo confocal microscopy in clinical practice. *Dermatol Clin* 2012;30(4):799-814.

Longo C, Casari A, De Pace B, Simonazzi S, Mazzaglia G, Pellacani G. Proposal for an in vivo histopathologic scoring system for skin aging by means of confocal microscopy. *Skin Res Technol* 2013a;19(1):167-73.

Longo C, Casari A, Beretti F, Cesinaro AM, Pellacani G. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2013b;68(3):73-82.

Longo C, Borsari S, Benati E, Moscarella E, Alfano R, Argenziano G. Dermoscopy and reflectance confocal microscopy for monitoring the treatment of actinic keratosis with ingenol mebutate gel: report of two cases. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2016;16(1):81-7.

Madronich S, de Gruijl FR. Stratospheric ozone depletion between 1979 and 1992: implications for biologically active ultraviolet-B radiation and non-melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol* 1994;59(5):541-6.

Maier T, Cekovic D, Ruzicka T, Sattler E, Berking C. Treatment monitoring of topical ingenol mebutate in actinic keratoses with the combination of optical coherence tomography and reflectance confocal microscopy: a case series. *Br J Dermatol* 2015;172(3):816-8.

Maltusch A, Röwert-Huber J, Matthies C, Lange-Aschenfeldt S, Stockfleth E. Modes of action of diclofenac 3% hyaluronic acid 2.5% in the treatment of actinic keratosis. *JDDG* 2011;9(12):1011-7.

Malveyh J, Roldán-Marín R, Iglesias-García P, Díaz A, Puig S. Monitoring treatment of field cancerisation with 3% diclofenac sodium 2.5% hyaluronic acid by reflectance confocal microscopy: a histologic correlation. *Acta Derm Venereol* 2015a;95(1):45-50.

Malveyh J. A new vision of actinic keratosis beyond visible clinical lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015b;29(1):3-8.

Malvey J, Alarcon I, Montoya J, Rodríguez-Azaredo R, Puig S. Treatment monitoring of 0.5% 5-fluorouracil and 10% salicylic acid in clinical and subclinical actinic keratoses with the combination of optical coherence tomography and reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30(2):258-65.

Martin GM, Stockfleth E. Diclofenac sodium 3% gel for the management of actinic keratosis: 10+ years of cumulative evidence of efficacy and safety. *J Drugs Dermatol* 2012;11(5):600-8.

Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumour activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000;60(5):1306-11.

Meyer T, Surber C, French LE, Stockfleth E. Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2013;22(1):149-59.

Memon AA, Tomenson JA, Bothwell J, Friedmann PS. Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *Brit J Dermatol* 2000;142(6):1154-9.

Minsky M. Microscopy Apparatus. US Patent 3013467,1961.

Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 1988; 10(4):123-8.

Mitchell DL. The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol* 1988;48(1):51-7.

Mitchell DL, Nairn RS. The biology of the 6-4 photoproduct. *Photochem Photobiol* 1989;49(6):805-19.

Mogensen M, Jemec GB. Diagnosis of nonmelanoma skincancer/ keratinocyte carcinoma: a review of diagnostic accuracy of nonmelanoma skin cancer diagnostic tests and technologies. *Dermatol Surg* 2007;33(10):1158-74.

Montoro J, Rodriguez M, Diaz M, Bertomeu F. Photoallergic contact dermatitis due to diclofenac. *Contact Dermatitis* 2003;48(2):115.

Moore AR, Willoughby DA. Hyaluronan as a drug delivery system for diclofenac: a hypothesis for mode of action. *Int J Tissue React* 1995;17(4):153-6.

Müller-Decker K. Cyclooxygenase in the skin. *J Dtsch Dermatol Ges* 2004;2(8):668-75.

Muschik D, Braspenning-Wesch I, Stockfleth E, Rösl F, Hofmann TG, Nindl I. Cutaneous HPV23 E6 prevents p53 phosphorylation through interaction with HIPK2. *PLoS One* 2011;6(11):e27655.

Naylor MF, Boyd A, Smith DW, Cameron GS, Hubbard D, Neldner KH. High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. *Arch Dermatol* 1995;131(2):170-5.

Nelson C, Rigel D, Smith S, Swanson N, Wolf J. Phase IV, open-label assessment of the treatment of actinic keratosis with 3.0% diclofenac sodium topical gel (Solaraze). *J Drugs Dermatol* 2004;3(4):401-7.

Nelson C, Rigel D. Long-term follow-up of diclofenac sodium 3% in 2.5% hyaluronic acid gel for actinic keratosis: one-year evaluation. *J Clin Aesthet Dermatol* 2009;2(7):20-5.

Nijsten T, Colpaert CG, Vermeulen PB, Harris AL, Van Marck E, Lambert J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Brit J Dermatol* 2004;151(4):837-45.

Noonan FP, De Fabo EC. Immunosuppression by ultraviolet B radiation: initiation by urocanic acid. *Immunol Today* 1992;13(7):250-4.



Pellacani G, Ulrich M, Casari A, Prow TW, Cannillo F, Benati E, Losi A, Cesinaro AM, Longo C, Argenziano G, Soyer HP. Grading keratinocyte atypia in actinic keratosis: a correlation of reflectance confocal microscopy and histopathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29(11):2216-21.

Peppelman M, Wolberink EAW, Koopman RJJ, van Erp PEJ, Gerritsen MJP. In vivo reflectance confocal microscopy: a useful tool to select the location of a punch biopsy in a large, clinically indistinctive lesion. *Case Rep Dermatol* 2013;5(1):129-32.

Peppelman M, Nguyen KP, Hoogedoorn, van Erp PEJ, Gerritsen MJP. Reflectance confocal microscopy: non-invasive distinction between actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29(7):1302-9.

Pfister H, Fuchs PG, Majewski S, Jablonska S, Pniewska I, Malejczyk M. High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population. *Arch Dermatol Res* 2003;295(7):273-9.

Pflugfelder A, Welter AK, Leiter U, Weide B, Held L, Eigentler TK, Dirschka T, Stockfleth E, Nashan D, Garbe C. Open label randomized study comparing 3 months vs. 6 months treatment of actinic keratoses with 3% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel: a trial of the german dermatologic cooperative oncology group. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26(1):48-53.

Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 1991;12(10):349-52.

Przybilla B, Ring J, Schwab U, Galosi A, Dorn M, Braun-Falco O. Photosensibilisierende Eigenschaften nichtsteroidaler Antirheumatika im Photopatch-Test. *Hautarzt* 1987;38:18-25.

Quaedvlieg PJ, Tirsi E, Thissen MR, Krekels GA. Actinic keratosis: how to differentiate the good from the bad ones? *Eur J Dermatol* 2006;16(4):335-9.

Rajadhyaksha M, Grossmann M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol* 1995;104(6):946-52.

Rajadhyaksha M, Anderson RR, Webb RH. Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo. *Appl Opt* 1999a;38(10):2105-15.

Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 1999b;113(3):293-303.

Richtig E, Ahlgrimm-Siess V, Koller S, Gerger A, Horn M, Smolle J, Hofmann-Wellenhof R. Follow-up of actinic keratoses after shave biopsy by in-vivo reflectance confocal microscopy - a pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24(3):293-8.

Rishpon A, Kim N, Scope A, Porges L, Oliviero MC, Braun RP, Marghoob AA, Fox CA, Rabinovitz HS. Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2009;145(7):766-72.

Rivers JK, Arlette J, Shear N, Guenther L, Carey W, Poulin Y. Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Brit J Dermatol* 2002;146(1):94-100.

Rodust PM, Fecker LF, Stockfleth E, Eberle J. Activation of mitochondrial apoptosis pathways in cutaneous squamous cell carcinoma cells by diclofenac/hyaluronic acid is related to upregulation of Bad as well as downregulation of Mcl-1 and Bcl-w. *Exp Dermatol* 2012;21(7):520-5.

Rothmund M. Veränderungen der Haut durch Sonnenlicht: Beobachtungen in der Konfokalen Reflektionsmikroskopie. Dissertation, Graz 2011;4:37.

Röwert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, Sterry W, Stockfleth E. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol* 2007;156:8-12.

Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:4-7.

Schaefer I, Augustin M, Spehr C, Reusch M, Kornek T. Prevalence and risk factors of actinic keratoses in Germany - analysis of multisource data. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28(3):309-13.

Schärer L. Die aktinische Keratose. *Ars Medici Dossier VII* 2006;23-7.

Schwartz RA, Bridges TM, Butani AK, Ehrlich A. Actinic keratosis: an occupational and environmental disorder. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22(5):606-15.

Setlow RB, Carrier WL. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J Mol Biol* 1966;17(1):237-54.

Shoimer I, Rosen N, Muhn C. Current management of actinic keratoses. *Skin Therapy Lett* 2010;15(5):5-7.

Silbernagl S. In: *Taschenatlas der Physiologie*. 8. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag 2012;46-51.

Slaper H, Velders GJM, Daniel JS, de Gruijl FR, van der Leun JC. Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna convention achievements. *Nature* 1996;384(6606):256-8.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 1953;6(5):963-8.

Smith SR, Morhenn VB, Piacquadio DJ. Bilateral comparison of the efficacy and tolerability of 3% diclofenac sodium gel and 5% 5-fluorouracil cream in the treatment of actinic keratoses of the face and scalp. *J Drugs Dermatol* 2006;5(2):156-9.

Stockfleth E, Ulrich C, Meyer T, Christophers E. Epithelial malignancies in organ transplant patients: clinical presentation and new methods of treatment. *Recent Results Cancer Res* 2002;160:251-8.

Stockfleth E, Nindl I, Sterry W, Ulrich C, Schmook T, Meyer T. Human papillomaviruses in transplant-associated skin cancers. *Dermatol Surg* 2004;30(4):604-9.

Stockfleth E, Kerl H. Guidelines for the management of actinic keratoses. *Europ J Dermatol* 2006;16(6):599-606.

Stockfleth E, Ferrandiz C, Grob JJ, Leigh I, Pehamberger H, Kerl H. Development of a treatment algorithm for actinic keratoses: a european consensus. *Eur J Dermatol* 2008;18(69):651-9.

Stockfleth E. Topical management of actinic keratosis and field cancerisation. *G Ital Dermatol Venereol* 2009;144(4):459-62.

Stockfleth E, Terhorst D, Hauschild A, Zouboulis CC, Schlaeger M, Oster-Schmidt C, Diepgen T, Gollnick H, Korting C, Merk H, Sterry W, Kerl H, Berking C. Leitlinie zur Behandlung der aktinischen Keratosen. *AWMF S1 Leitlinie* 2011;1-57.

Stockfleth E. The paradigm shift in treating actinic keratosis: a comprehensive strategy. *J Drugs Dermatol* 2012;11(12):1462-7.

Stockfleth E, Peris K, Guillen C, Cerio R, Basset-Sequin N, Foley P, Sanches J, Culshaw A, Erntoft S, Lebwohl M. Physician perceptions and experience of current treatment in actinic keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29(2):298-306.

Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216(2):201-10.

Sutton RL Jr. Early epidermal neoplasia: description and interpretation - the theory of mutation in the origin of cancer. *Arch Derm Syphil* 1938;37(5):737-80.

Szeimies RM, Bichel J, Ortonne JP, Stockfleth E, Lee J, Meng TC. A phase II dose-ranging study of topical resiquimod to treat actinic keratosis. *Brit J Dermatol* 2008;159(1):205-10.

Tearney G, Brezinski M, Southern JF, Bourma BE, Hee MR, Fujimoto JG. Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography. *Opt Lett* 1995;20(21):2258-60.

Traianou A, Ulrich M, Appalla Z, De Vries E, Bakirtzi K, Kalabalikis D, Ferrandiz L, Ruiz-de-Casas A, Moreno-Ramirez D, Sotiriadis D, Ioannides D, Aquilina S, Apap C, Micallef R, Scerri L, Pitkänen S, Saksela O, Altsitsiadis E, Hinrichs B, Magnoni C, Fiorentini C, Majewski S, Ranki A, Proby CM, Stockfleth E, Trakatelli M. Risk factors for actinic keratosis in eight European centres: a case-control study. *Br J Dermatol* 2012;167(2):36-42.

Ulrich C, Christophers E, Sterry W, Meyer T, Stockfleth E. Hauterkrankungen bei organtransplantierten Patienten. *Hautarzt* 2002;53:524-33.

Ulrich M, Maltusch A, Röwert-Huber J, González S, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Actinic keratoses: non-invasive diagnosis for field cancerisation. *Br J Dermatol* 2007a;156 (3):13-7.

Ulrich M, Forschner T, Röwert-Huber J, González S, Stockfleth E, Sterry W, Astner S. Differentiation between actinic keratoses and disseminated superficial actinic porokeratoses with reflectance confocal microscopy. *Brit J Dermatol* 2007b;156 (3):47-52.

Ulrich M, Maltusch A, Rius-Diaz F, Röwert-Huber J, González S, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of actinic keratoses. *Dermatol Surg* 2008;34(5):610-9.

Ulrich M, Stockfleth E. Field treatment of actinic keratoses - focus on COX-2-inhibitors. *Actas Dermosifiliogr* 2009;100(2):55-8.

Ulrich M, Krueger-Corcoran D, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Reflectance confocal microscopy for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses. *Dermatolog* 2010;220(1):15-24.

Ulrich M, González S, Lange-Aschenfeldt, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Non-invasive diagnosis and monitoring of actinic cheilitis with reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25(3):276-84.

Ulrich M, Lange-Aschenfeldt S, González S. In vivo reflectance microscopy for early diagnosis of nonmelanoma skin cancer. *Actas Dermosifiliogr* 2012;103(9):784-9.

Ulrich M, Alarcon I, Malveyh J, Puig S. In vivo reflectance confocal microscopy characterization of field-directed 5-fluorouracil 0.5%/salicylic acid 10% in actinic keratosis. *Dermatology* 2015;230(3):193-8.

Wang X, Milner TE, Chang MC, Nelson JS. Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry. *J Biomed Opt* 1996;1(2):212-6.

Wang D, Buchanan FG, Wang H, Dey KD, DuBois RN. Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res* 2005;65(5):1822-9.

Wang D, DuBois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut* 2006;55(1):115-22.

Weiss E, Mamelak AJ, La Morgia S, Wang B, Feliciani C, Tulli A, Sauder DN. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *J Am Acad Dermatol* 2004;50(5):657-75.

Welzel J, Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S, Hohenleutner U. Konfokale Lasermikroskopie in der Dermatologie. *AWMF S1 Leitlinie* 2011;1-23.

Wilgus TA, Ross MS, Parrett ML, Oberyszyn TM. Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;62(4):367-84.

Wolf JE, Taylor JR, Tschene E, Kang S. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol* 2001;40(11):709-13.

Vitkin IA, Woolsey J, Wilson BC, Anderson RR. Optimal and thermal characterization of natural (*Sepia officinalis*) melanin. *Photochem Photobiol* 1994;59(4):455-62.

Zalaudek I, Piana S, Moscarella E, Longo C, Zendri E, Castagnetti F, Pellacani G, Lallas A, Argenziano G. Morphologic grading and treatment of facial actinic keratosis. *Clin Dermatol* 2014;32(1):80-7.

Zhu X, McTiernan CF, Rajagopalan N. Immunosuppression decreases inflammation and increases AAV6-hSERCA2a-mediated SERCA2a expression. *Hum Gene Ther* 2012;23(7):722-32.

Ziegler A, Jonason AS, Lefell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994;372(6508):773-6.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001;92(1):57-70.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alicia Katharina Siebold, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Non-invasives Monitoring der aktinischen feldkanzerisierten Haut unter der Behandlung mit 3.0% Diclofenac in 2.5% Hyaluronsäure mit Hilfe der Reflektanz konfokalen Laserscanmikroskopie" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Eggert Stockfleth, bin ich für die Überlassung des Themas und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Meiner Betreuerin, Frau Dr. med. Martina Ulrich, gilt besonderer Dank für die produktive und angenehme Zusammenarbeit während der Durchführung der Arbeit. Ihre fachliche Kompetenz und Hilfestellungen bei der Auswertung sowie ihre gewissenhaften Korrekturen haben maßgeblich zu der Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen.

Meinem Freund, Oliver Feldkamp, sowie meinen guten Freunden gilt ein besonderer Dank dafür, dass sie mir stets den Rücken freigehalten haben und mich bestärkten, wenn ich ins Zweifeln kam.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir diesen Bildungsweg ermöglicht haben und fortwährend an mich geglaubt haben.

Schließlich danke ich insbesondere den freiwilligen Studienteilnehmern, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre.