

DIPLOMARBEIT

ANTINUKLEARE ANTIKÖRPER UND PHOTOTHERAPIE

eingereicht von

Eva Bartenstein

0311427

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Dr. Peter Wolf

Dr. Franz Quehenberger

Ort, Datum

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei Herrn Professor Wolf für die Möglichkeit an diesem Projekt zu arbeiten und für seine Betreuung bedanken.

Weiters gilt mein Dank Herrn Doktor Quehenberger für die statistische Analyse der Daten, Prof. Salmhofer für die Erläuterungen der verwendeten Antikörpertests sowie Frau Joch und Frau Krainberger, Bioanalytikerinnen im Labor für Spezielle Dermatologie der Univ.Klinik für Dermatologie und Venerologie, für ihre Unterstützung bei der Datenaufbereitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Freund und meinen Freundinnen für ihre Unterstützung und Motivation während der gesamten Studienzeit und während des Entstehungsprozesses meiner Diplomarbeit. Besonders dankbar bin ich meiner Mutter und meinen Freundinnen: Babsi, Eva und Vali.

Für eine unvergessliche Studienzeit danke ich all meinen Freunden, die mich durch diese Zeit begleitet haben.

Zusammenfassung

Bestimmte Erkrankungen mit erhöhter Lichtempfindlichkeit wie Lupus erythematoses weisen im Blut antinukleäre Antikörper (ANA) auf und diese scheinen in der Pathogenese von entscheidender Bedeutung zu sein. Es ist allerdings nicht geklärt, wieso es zur Bildung von ANA bei diesen Erkrankungen kommt. Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob UV-Bestrahlung initial zur Entstehung von ANA beiträgt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden vorhandene Daten von insgesamt 1094 Patienten, welche im Zeitraum von 1994 bis 2007 eine UV-Phototherapie zur Behandlung einer Hautkrankheit (einschließlich Psoriasis, Ekzeme, Vitiligo, Mastozytose, polymorphe Lichtdermatose und kutane T-Zell-Lymphome) erhalten hatten und von denen ANA mittels Immunfluoreszenz und/oder ELISA im Serum bestimmt worden waren, analysiert. Von diesen 1094 Patienten hatten 259 eine ANA-Bestimmung zu zwei Zeitpunkten und die restlichen 835 zu einem; diese wurden als Vergleichsgruppe mit in die Studie aufgenommen, um einen möglichen Alterseffekt zu ermitteln und dafür zu kontrollieren. Die statistische Analyse ergab einen Einfluss des Patientenalters auf den ANA-Titer. Die Odds-Ratio des Alterseffektes, welche die relative Zunahme der ANA-Positivität (gemessen mittels Immunfluoreszenz) bezogen auf einen Zeitraum von 10 Jahren beschreibt, betrug 1,29 (Konfidenzintervall: 1,11-1,50) ($p=0,0011$). Der Zeiteffekt, d.h. der alterskorrigierte Unterschied zwischen dem ANA-Ergebnis vor der ersten Phototherapie im Vergleich zu dem nach der letzten Phototherapie, war sowohl beim Immunfluoreszenztest als auch bei der ELISA-Analyse nicht signifikant. Diese Ergebnisse zeigen in aller Deutlichkeit, dass das Alter die Entstehung von ANA begünstigt. Einen Effekt der Phototherapie auf die Entstehung von ANA konnten wir in dieser Studie jedoch nicht nachweisen.

Summary

Certain diseases with increased light sensitivity such as lupus erythematosus exhibit antinuclear antibodies (ANA) in the serum and these antibodies seem to be pathogenic. However, it is not clear why these antibodies are formed in these diseases. The aim of this study was to analyze existing data of 1094 patients who had been treated for a skin disease (including psoriasis, eczema, vitiligo, mastocytosis and cutaneous T cell lymphoma) with phototherapy between 1994 and 2007 and from whom results of ANA testing through immunofluorescence and/or ELISA was available. Of those 1094 patients 259 had had ANA test at least at two occasions and the remaining 835 at one; the later were enrolled in the study to determine and control for a potential age effect on ANA formation. The statistical analysis revealed that the patients' age affected the ANA titer. The odds ratio of the age effect that describes the relative increase of ANA positivity (determined through immunofluorescence testing) throughout a period of 10 years was 1.29 (confidence interval, 1.11-1.50) (P=0.0011). The time effect, i.e. the age-adjusted difference of ANA positivity before phototherapy vs. after phototherapy was not significant for both immunofluorescence testing and ELISA. These results unambiguously show that age favors the formation of ANA. However, we were unable to detect an effect of phototherapy on the formation of ANA in this study.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	III
Zusammenfassung.....	IV
Summary	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Tabellenregister.....	IX
Abbildungsverzeichnis	X
1. Antinukleare Antikörper:	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Einteilung der ANA	2
1.2.1. Autoantikörper gerichtet gegen DNA und Histone.....	2
1.2.2. Autoantikörper gerichtet gegen andere nukleare Antigene.....	2
1.3. ANA im Zusammenhang mit systemischen Autoimmunerkrankungen	3
1.4. Methoden zur ANA Diagnostik	5
1.4.1. Immunofluoreszenztest für ANA.....	5
1.4.1.1. Immunofluoreszenzmuster	7
1.4.1.2. Verwendetes Substrat.....	8
1.4.1.3. ANA-Titer	8
1.4.2. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)/Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	9
1.5. Methoden zur spezifischen ANA-Diagnostik	9
1.5.1. Methoden zur Diagnostik von ANA gegen ds-DNA	9
1.5.1.1. IF-ANA-Test mit Crithidia luciliae als Substrat (CLIF).....	10
1.5.1.2. Farr Verfahren.....	10
1.5.2. Methoden zur Diagnostik von ANA gegen ENA.....	11
1.5.2.1. Ältere Verfahren.....	11
1.5.2.2. Moderne Verfahren	11
2. Ultraviolette Strahlung:.....	12
2.1. Einleitung	12
2.2. Historische Aspekte der UV-Strahlentherapie	12
2.3. Auswirkungen der ultravioletten Strahlung auf das Immunsystem	14

2.4.	Phototherapie:	16
2.4.1.	Mechanismen der UV-Therapie	17
2.4.2.	Aktionsspektrum	18
2.4.3.	Agenzien in der Phototherapie	19
2.4.3.1.	Teer	19
2.4.3.2.	UVA	21
2.4.3.3.	Topische Kortikoide	21
2.4.3.4.	Bäder	21
2.4.4.	Therapiekombinationen	22
2.4.5.	Toxizität	22
2.4.6.	Anwendungsgebiete der Phototherapie	23
2.4.6.1.	UVB	23
2.4.6.2.	UVA	23
2.5.	PUVA	25
2.5.1.	Einleitung	25
2.5.2.	Geschichte der PUVA	25
2.5.3.	Wirkmechanismus der Phototherapie	26
2.5.4.	Photobiologische Wirkung von Psoralen	27
2.5.5.	Effekte der PUVA auf die Haut	28
2.5.6.	Alternative Psoralenformen	28
2.5.7.	Therapiekombinationen	28
2.5.7.1.	UVB	29
2.5.7.2.	Retinoide	29
2.5.7.3.	Topische Adjuvantien	30
2.5.7.4.	Methotrexat	30
2.5.8.	Nebenwirkungen	30
2.5.8.1.	Kurzzeitnebenwirkungen	30
2.5.8.2.	Langzeitnebenwirkungen	31
	Hautalterung	31
	Ophthalmologisches Risiko	31
	Karzinogenität	31

Effekte auf das Immunsystem	32
2.5.9. Anwendungsgebiete der PUVA	32
2.6. Topische PUVA	33
2.6.1. Nebenwirkungen der topischen PUVA	33
2.6.1.1. Akute Nebenwirkungen.....	33
2.6.1.2. Langzeitnebenwirkungen	34
3. Methoden.....	35
4.1. ANA und HEP-Verfahren	38
4.1.1. ANA im HEP-Verfahren in Bezug auf das Patientenalter	38
4.1.1.1. ANA-HEP-Häufigkeit vor und nach Phototherapie.....	39
4.2. ANA und ELISA.....	40
4.2.1. ANA im ELISA-Verfahren in Bezug auf das Patientenalter	40
4.3. HEP und ELISA	45
5. Diskussion	46
6. Literaturverzeichnis.....	48

Tabellenregister

Tabelle 1: Korrelation von Antinuklearen Antikörpern mit Kollagenosen.....	3
Tabelle 2: Häufige ANA Muster mit dazugehörigem Krankheitsbild ¹	7
Tabelle 3: Indikationen zur UVA-1 Therapie	24
Tabelle 4: Absolute Anzahl der negativen, grenzwertigen und positiven ANA-HEP-Titer vor und nach Phototherapie	39
Tabelle 5: Absolute Anzahl der negativen, grenzwertigen und positiven ANA-HEP-Titer vor und nach Phototherapie	40
Tabelle 6: ANA-Werte in Bezug auf das ELISA-Verfahren	42
Tabelle 7: Verlauf von ELISA bei Analyse AA in absoluten Zahlen	43
Tabelle 8: Verlauf von ELISA bei Analyse AA in Prozent	43
Tabelle 9: Verlauf von ELISA bei Analyse BA in Zahlen	43
Tabelle 10: Verlauf von ELISA bei Analyse BA in Prozent	43
Tabelle 11: Verlauf von ELISA bei Analyse BB in Zahlen.....	44
Tabelle 12: Verlauf von ELISA bei Analyse BB in Prozent.....	44
Tabelle 13: Odds-Ratio für den Verlauf der ANA im HEP- und ELISA-Verfahren.....	45

Abbildungsregister

Abbildung 1: Bildliche Darstellung von nuklearen Mustern dargestellt mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	8
Abbildung 2: HEP und Patientenalter	39
Abbildung 3: ELISA und Alter	41
Abbildung 4: ELISA und Alter	42

1. Antinukleare Antikörper:

1.1. Einleitung

Antinukleare Antikörper sind Autoantikörper, die sich gegen Antigene des eigenen Organismus (Autoantigene) richten. ANA stellen eine Gruppe von Autoantikörpern dar, die in der Lage sind, an nukleäre Antigene im Zellkern zu binden und diese auch zu zerstören.¹ ANA sind gegen die Nukleinsäure gerichtet und gegen die Struktur- und Funktionsproteine, welche im Aufgabenbereich der Nukleinsäure mitwirken. Zum größten Teil handelt es sich hierbei um Determinanten des Zellkerns. Antikörper gegen nicht-nukleäre Zellbestandteile wie solche des Zytoplasmas, wie zum Beispiel Ribosomen oder Mitochondrien, treten seltener auf.²

ANA sind bereits seit über 50 Jahren bekannt und man weiß, dass sie bei unterschiedlichen Erkrankungen auftreten, dennoch ist die pathogene Bedeutung der ANA nur bei bestimmten Erkrankungen gesichert, wie zum Beispiel Anti-dsDNA bei Lupusnephritis.² Während die pathogene Bedeutung der ANA nicht gesichert ist, ist deren Bedeutung in der Diagnostik unumstritten.

Zu den mit ANA in Verbindung stehenden Krankheiten zählen unter anderem die Kollagenosen. Diese Bindegewebserkrankungen stellen eine Form von Autoimmunerkrankungen dar, welche durch das Auftreten von ANA im Blut der Patienten charakterisiert sind. ANA sind in niedriger Titerhöhe nicht selten auch bei gesunden Personen nachzuweisen, höhere Titer weisen jedoch meist auf das Vorliegen einer Bindegewebserkrankung hin. Daher zählt die Bestimmung der ANA zu den grundlegenden Labortests in der Diagnostik der Autoimmunerkrankungen.³

1.2. Einteilung der ANA

ANA können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die sich durch ihre Zielkomponente unterscheiden:

1. Autoantikörper gerichtet gegen DNA und Histone
2. Autoantikörper gerichtet gegen andere nukleare Antigene.

1.2.1. Autoantikörper gerichtet gegen DNA und Histone

Hierzu zählen Antikörper, die gegen Einzel und Doppelstrang DNA (ss und ds DNA) gerichtet sind, welche zur Diagnose von systemischem Lupus erythematodes (SLE) wichtig sind, und anti-Histon Antikörper, welche auf einen durch Medikamente induzierten SLE hinweisen.

Anti-dsDNA Antikörper sind die spezifischen Antikörper beim SLE und werden aus diesem Grund zur Diagnose herangezogen. Anti-ssDNA und anti-Histonantikörper sind meistens in anti-dsDNA Antikörperpositiven Seren zu finden. Die anti-Histonantikörper sind direkt gegen die Histone gerichtet, welche sehr kleine Kernproteine sind, die zur Verpackung der DNA in Nukleosomen beitragen. Sie kommen bei mehreren Krankheiten vor wie zum Beispiel bei medikamenten-induziertem Lupus, SLE oder rheumatoider Arthritis.

1.2.2. Autoantikörper gerichtet gegen andere nukleare Antigene

Zu dieser Gruppe zählen jene Antikörper, die gegen die nuklearen Antigene gerichtet sind, welche auch als ENA (extractable nuclear antigens)² bezeichnet werden.

Bisher konnten zudem noch folgende andere Autoantikörper nachgewiesen werden: anti-Sm Antikörper (Smith), anti-RNP Antikörper (Ribonukleoprotein), SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1 und M1.¹ Der erste anti-ENA Antikörper, der beschrieben wurde, war 1996 der anti-Sm Antikörper. Man fand heraus, dass er relativ spezifisch für den SLE ist.⁴

1.3. ANA im Zusammenhang mit systemischen Autoimmunerkrankungen

Anti-Sm Antikörper und anti-U1-RNP Antikörper treten sehr häufig in Kombination auf, wobei ein vermehrtes Auftreten der anti-Sm Antikörper bei Menschen aus Afrika und Asien festgestellt wurde.

Wenn anti-U1-RNP Antikörper alleine und mit sehr hohem Titer auftreten, dann deutet dies meist auf Patienten mit SLE, DM-PM, MCTD oder Sklerodermie hin. Diese Patienten weisen einige typische Merkmale auf, wie zum Beispiel einen milderen Krankheitsverlauf, geringere Gefahr für Nephritiden, häufiges Vorkommen des Raynaud's Phänomen, Schwellung der Finger und Hände und Myositis.

Anti-Ro/SSA und anti-La/SSB sind weitere antinukleare Antikörper, deren Anstieg auf einen SLE hinweisen kann, allerdings kommen sie auch sehr häufig beim Sjögren Syndrom vor und stellen hier wichtige Klassifikationskriterien dar. Das Vorkommen dieser beiden Autoantikörper ist assoziiert mit einem häufigen Auftreten von Purpura, Hypergammaglobulinämie, einer Speicheldrüsendysfunktion, die zur Sicca Symptomatik führt,⁵ sowie dem Anstieg von Rheumafaktoren.³

Tabelle 1: Korrelation von Antinuklearen Antikörpern mit Kollagenosen³

ANA	HÄUFIGKEIT DES AUFTRETENS	GENETISCHER MARKER	KLINISCHER ZUSAMMENHANG
ds-DNA (SLE spezifisch)	30-70% SLE	DR2	SLE bei Titer > 1: 640 wahrscheinlich, häufig bei Lupus nephritis
Sm (SLE spezifisch)	15-30% SLE (Nephritis, ZNS)	DR2, DQw6	Assoziiert mit U1-RNP
Histone H2A,H2B	50-70% SLE		Assoziiert mit anti-DNA

	> 95% Medikamenteninduzierter SLE		Antikörpern
Ro/SSA	24-26% SLE	DR3, DQw2	Subakuter cutaner SLE, neonatales SLE-Syndrom
	88-96% Sjögren Syndrom		Bei Patienten mit Sjögren Syndrom assoziiert mit Vaskulitis, Hypergammaglobulinämie und/oder RF
	18% PM-DM, 5% PSS, 5% RA		
La/SSB	9-34% SLE	DR3, DQw2	Bei bis zu 90% der Mütter von Kindern mit neonatalem Lupussyndrom
	71-87% Sjögren Syndrom		
U1-RNP	30-40% SLE	DR4, DQw8	Oft assoziiert mit Sm Antikörpern
	Beinahe bei allen Patienten mit MCTD		
Scl-70	Diffus systemische Sklerodermie		
Jo-1	Poly (Dermato-) myositis	DR3	

1.4. Methoden zur ANA Diagnostik

Zu Beginn der ANA Forschung galt der Immunfluoreszenztest als Goldstandard. Mittlerweile konnten jedoch Methoden mit einer höheren Sensitivität und Spezifität entwickelt werden und der IF-ANA Test wurde von dem ELISA Verfahren abgelöst. Doch welcher Test sich jetzt wirklich zur Diagnose von ANA besser eignet ist abhängig von dem klinischen Nutzen und nicht nur von der technischen und logistischen Leistung.⁶

1.4.1. Immunfluoreszenztest für ANA

Der IF-ANA Test wurde 1957 von George Friou entwickelt und zählt heute zu den weitverbreitetsten Testverfahren zur Diagnose von CTD. Dieses Testverfahren ist kostengünstig und verhältnismäßig unaufwändig und daher für das Routine-Screening gut geeignet.^{7,8} Mit diesem Test ist es möglich, das Vorhandensein von ANA im Blut nachzuweisen, denn diese binden sich an ein Reagens und wodurch deutliche Fluoreszenzmuster entstehen, die mit bestimmten Autoimmunerkrankungen assoziiert werden können. Es wurden verschiedene Substrate zur Bindung der ANA versucht, doch wurden Bindegewebsabschnitte aus Rattenlebern, Rattennieren und Mäusemägen zum Standard, bis 1975 erstmals HEP2-Zellen aus dem squamösen Laryngealzellkarzinom kultiviert werden konnten. Mittlerweile werden diese Zellen in den meisten Labors weltweit als Substrate eingesetzt und die Sensitivität des IF-ANA Tests konnte noch weiter gesteigert werden.⁹ Es gibt zwei verschiedene Arten des Immunfluoreszenztests: die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode wird ein fluoreszin-markierter Antikörper in einem Präparat mit den korrespondierenden Antigenen angelegt, wobei ein Antigen-Antikörperkomplex entsteht, welcher sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist. Bei der indirekten Methode werden Antigene mit den korrespondierenden, nicht markierten Antikörpern behandelt, woraus Antigen-Antikörperkomplexe entstehen, welche anschließend mit fluoreszin-markierten Antikörpern behandelt werden, die zu den Immunglobulinen der Tierart gehören, die zur Bildung des unmarkierten Komplexes verwendet wurden.¹⁰

Auch wenn der IF-ANA Test zum Routinescreening eingesetzt wird, kommt es doch immer wieder zu Missinterpretationen der Ergebnisse.

Es kann durch verschiedenen Ursachen zu falschen Ergebnissen kommen, wie zum Beispiel durch Kreuzreaktionen der verschiedenen Antikörper, oder wenn der Patient sich in einer Remissionsphase befindet. In einem milden Stadium kann es häufig zu falsch negativen Ergebnissen kommen, oder durch einen starken Anstieg oder Abfall der Symptome zu einem falsch positiven Ergebnis.^{11,12}

Die Aussagekraft des IF-ANA Test ist abhängig von der richtigen Interpretation und der Korrelation mit den Symptomen der Patienten.

Drei Parameter sind zur Interpretation des Tests nötig:³

1. Immunofluoreszenzmuster
2. Verwendetes Substrat
3. ANA-Titer

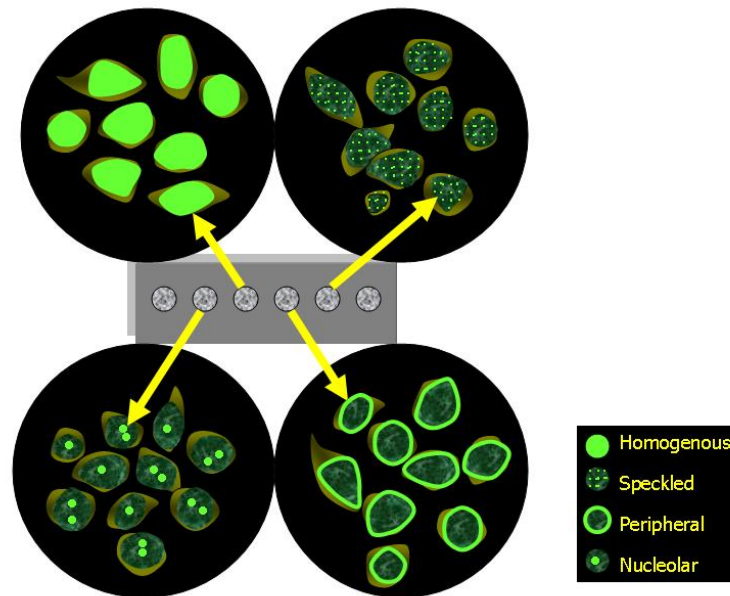
1.4.1.1. Immunofluoreszenzmuster

Es gibt verschiedene ANA-Muster die für die jeweilige CTD ausschlaggebend sind: zytoplasmatisches Muster (gefleckt, mitochondrial-förmig, Ribosomal-förmig, Golgi Apparat etc), nukleares Muster (homogen, peripher, gefleckt, nukleolär, nukleare Punkte, zentromer etc) und mitotisches Muster (Spindelapparat, Zentrosomen etc).^{1,3}

Tabelle 2: Häufige ANA Muster mit dazugehörigem Krankheitsbild¹

ANA Muster	Antigen	Krankheit
Gefleckt	ENA, RNP, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1, ribosomal-P	SLE, Mixed CTD, SS, Primary Sjögren Syndrom, PM
Homogen	dsDNA, Histones	SLE, Drug induced SLE
Peripher	RNP, Sm, SSA/Ro	SLE, SS
Nukleolär	Anti-PM-Scl, anti-RNA polymerase I-III, anti-U3-RNP, To RNP	SS, PM
Zentromer	CENP A-E	Limited SS

Abbildung 1: Bildliche Darstellung von nuklearen Mustern dargestellt mittels Fluoreszenzmikroskopie¹



1.4.1.2. Verwendetes Substrat

Früher wurden verschiedene Substrate aus Bindegewebeanteilen von Tieren verwendet, wie zum Beispiel aus Teilen von Rattenlebern oder Mäusemägen. Es zeigte sich jedoch, dass die Sensitivität für die humanen Hep2-Zellen deutlich höher ist, da die Seren einiger SLE Patienten bei tierischen Substraten negativ reagierten und bei Hep2-Zellen positiv.^{13,14,15}

1.4.1.3. ANA-Titer

Die Höhe des ANA-Titers ist entscheidend für die Aussagekraft des IF-ANA Tests: je höher der Titer, desto wahrscheinlicher liegt eine Autoimmunerkrankung vor. Ein niedriger ANA-Titer hat meist keine Aussagekraft, da solche Titer auch in der gesunden Bevölkerung vorkommen können. In den meisten Labors gilt daher erst ein Titer von größer oder gleich 1:160 als positiv und wahrscheinlich für die Diagnose CTD.^{16,17}

1.4.2. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)/Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

EIA und ELISA gehören zur Gruppe der Immunoassay-Verfahren die auf einer enzymatischen Farbreaktion basieren.¹⁸ Hierbei gibt es zwei verschiedenen Methoden, um ANA im Patientenserum nachzuweisen. Die eine Methode ähnelt dem IF-ANA Test, und gilt als eher generelles Verfahren mit einer breit gefächerten Spezifität, die zweite Methode ist sehr antigenspezifisch, welche ANA erfasst und nur mit einem bestimmten Antigen reagiert, wie zum Beispiel: dsDNA, Ro, SM etc.

Das antigenspezifische Verfahren weist eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität auf, ist einfach in der Durchführung, kann automatisiert werden und ist zudem kostengünstig. Aus diesen Gründen wird dieses Verfahren weltweit am häufigsten eingesetzt und dient nicht nur zum Routinescreening, sondern auch zur Erfassung spezifischer ANA.¹ In aktuellen Studien wurden die Ergebnisse des ELISA Tests und des IF-ANA Tests miteinander verglichen. Die Übereinstimmung der beiden Testverfahren für positive ANA-Tests lag bei 87%-95%, unter der Voraussetzung, dass die ANA-Positivität beim IF-ANA Test bei mindestens 1:160 lag.¹⁹ Die Aussagekraft der ELISA-Bestimmung wurde in zahlreichen Studien überprüft, wobei man zu unterschiedlichen, zum Teil hinsichtlich falsch positiver Werte differierenden Ergebnissen kam.^{20,21}

1.5. Methoden zur spezifischen ANA-Diagnostik

Zusätzlich zu den Routinescreening-Methoden wurden auch diverse Verfahren zur Diagnostik spezifischer antinuklearer Antikörper entwickelt. Hierbei unterscheidet man die Methoden zur Diagnostik von ANA gerichtet gegen ds-DNA und ANA gegen ENA.

1.5.1. Methoden zur Diagnostik von ANA gegen ds-DNA

Es gibt drei verschiedene Methoden zur Diagnostik von ANA gegen ds-DNA: zum einen das ELISA-Verfahren, dann ein spezieller IF-ANA Test und das Farr-Verfahren.

1.5.1.1. IF-ANA-Test mit Crithidia luciliae als Substrat (CLIF)

Dieses Verfahren wurde 1975 entwickelt²² und gilt als hilfreichste Methode zur erstmaligen Diagnose von SLE, da es eine hohe Spezifität aufweist und sehr einfach durchzuführen ist.²³ Die *Crithidia luciliae* stellt einen Microorganismus dar, welcher als intrazelluläre Organelle einen Kinetoplasten oder Mitochondrium beinhaltet, welcher als einziges nachweisbares nukleares Antigen die ds-DNA in hohen Konzentrationen aufweist. Bei den Tests stellte sich heraus, dass sich die Antikörper gegen ds-DNA an diese Organelle binden und dann mit indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden können.²⁴

1.5.1.2. Farr Verfahren

Beim Farr Verfahren handelt es sich um eine spezielle Methode zur Darstellung von anti ds-DNA Antikörpern mittels radioaktiv markierter Antigene. Es werden dem Serum Antigene hinzugefügt und durch Zugabe einer Ammoniumsulfatkonzentration kommt es zum Ausfall von Antikörper-Antigenkomplexen, bei denen sich die Anzahl der Antikörper durch die radioaktiv markierten Antigene leicht nachweisen lässt.

Dieses Verfahren ist sehr spezifisch und gilt als die zuverlässigste Methode, allerdings weist es auch einige Nachteile auf: es ist sehr zeitintensiv, man arbeitet mit radioaktivem Material und man hat festgestellt, dass dieses Verfahren anti ds-DNA mit geringer Avidität nicht erfasst. Es gibt Studien, die belegen, dass die mit 50% gesättigte Ammoniumsulfatkonzentration, die zum Ausfall der Antikörper-Antigenkomplexe verwendet wird, zum Zerfall von Interaktionen mit geringer Avidität führt. Es wurde ein neues Verfahren entwickelt, das PEG (polyethylen glykol) Verfahren, das auch jene Komplexe mit geringer Avidität erfassen soll.^{25,26}

1.5.2. Methoden zur Diagnostik von ANA gegen ENA

1.5.2.1. Ältere Verfahren

Zu diesen Verfahren zählten die Gel-Immunopräzipitation und die passive Hämagglutination (PHA).

Die Erfassung von ANA gegen ENA beruhte früher auf der Methode der Gel-Immunopräzipitation. Hierzu zählten das Verfahren der Doppel-Immunodiffusion (DID) und der „counter Immunoelktrophorese“ (CIE).²⁷ Da diese beiden Verfahren einige Nachteile aufweisen, sie sind nicht quantitativ und liefern keine krankheitsspezifischen Ergebnisse,²⁸ wurden diverse andere Verfahren zu Erfassung von ANA gegen ENA entwickelt.

Die passive Hämagglutination wurde früher häufiger eingesetzt, doch wurde sie durch modernere und spezifischere Methoden ersetzt, da sie zwar eine relativ hohe Sensitivität aufweist, allerdings in einigen Studien festgestellt wurde, dass die Spezifität nicht sehr hoch ist.²⁹

1.5.2.2. Moderne Verfahren

Zu diesen Verfahren zählen: Western (immuno) Blot, Dot Blot, Line Blot, Multiplex Immunoassay, Flusszytometrie und Antigen-Mikroarray.

Der Western Blot ist ein Verfahren, das sehr häufig bei Patienten mit einer CTD angewendet wird, zur Darstellung von Autoantikörpern, die gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind. Unter Western Blot versteht man die Übertragung von Proteinen auf eine Trägersubstanz, wo sie dann durch verschiedene Verfahren nachgewiesen werden können.³⁰ Dieses Verfahren weist eine höhere Sensitivität bei der Darstellung spezifischer Antikörper auf, als das EIA oder das DID und ermöglicht eine gleichzeitige Erkennung der Epitopspezifität mehrerer dieser Antikörper.³¹ Die Nachteile dieses Verfahrens sind, dass es nicht sehr krankheitsspezifisch ist, dass es relativ häufig zu falsch positiven Ergebnissen bei der gesunden Bevölkerung kommt und dass es nur lineare Epitope darstellt.³²

2. Ultraviolette Strahlung:

2.1. Einleitung

Die UV-Strahlentherapie ist ein relativ häufig angewandtes Verfahren zur Therapie unterschiedlicher Hauterkrankungen, wie zum Beispiel Psoriasis, Neurodermitis, Pruritus, Mastozytose, Lichen ruber planus, Mycosis fungoides und zur vorbeugenden Behandlung einer UV-Überempfindlichkeit bei Photodermatosen. Man unterscheidet hierbei prinzipiell zwei Arten: die Phototherapie (ohne Photosensibilisator) und die Psoralen+UVA (PUVA)-Photochemotherapie. Bei der PUVA werden, im Gegensatz zur reinen Phototherapie, Photosensibilisatoren systemisch oder topisch eingesetzt, welche die Wirkung der UV-Strahlung verstärken, und u.a. verbunden damit, auch zu einem erhöhten Langzeitrisiko führen.

Die UV-Strahlentherapie wird bereits seit vielen Jahren zur Behandlung von Hautkrankheiten eingesetzt, obgleich deren Wirkmechanismen nicht genau bekannt sind. Es wurden verschiedene Hypothesen über die therapeutische Wirkungsweise aufgestellt, wobei eine besagt, dass bei Hauterkrankungen mit erhöhten Zellproliferationsraten die UV-Bestrahlung zu einer Verminderung der DNA-Synthese führen und somit die normale Zellkinetik wieder herstellen kann.

2.2. Historische Aspekte der UV-Strahlentherapie

Sonnenlicht wurde bereits vor Jahrtausenden wie zum Beispiel in Griechenland, in Ägypten und im antiken Rom, zur Therapie unterschiedlicher Erkrankungen eingesetzt.³³ Vor allem in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts rückte die Heliotherapie immer weiter ins Zentrum des Interesses und 1855 wurde von dem Schweizer Arnold Rikli die erste Heilanstalt für Licht- und Luftbäder gegründet.³⁴ Am Ende des 19. Jahrhunderts erkannte die Wissenschaft die Bedeutung der UV-Strahlen. Dass der therapeutische Effekt, der mit der Sonnenbestrahlung einher geht, durch die UV-Strahlen induziert ist führte zum therapeutischen Gebrauch von gefilterten Sonnenstrahlen und künstlichen Lichtquellen. Die erste Quecksilberlampe wurde zwischen 1856 und 1860 gebaut³⁵ und der Deutsche Heinrich Lahman war der Erste,

der 1984 eine künstliche Lichtquelle zur Therapie von Hauterkrankungen einsetzte.³⁴ Niels Finsen war einer der großen Revolutionäre, wenn es um UV-Therapie geht. Er verwendete bereits 1893 gefiltertes Sonnenlicht zur Therapie von Lupus vulgaris, eröffnete 1896 das Medical Light Institute, verwendete eine neue Kohlebogenlampe mit Quarzfilter und entwickelte eine Methode zur Kühlung, da die damaligen UV-Quellen enorm hohe Temperaturen erzeugten. Im Jahre 1901 veröffentlichte er seine Ergebnisse in der Therapie des Lupus vulgaris und bekam dafür den Nobelpreis für Medizin, 1903. Dies war der einzige Nobelpreis, der jemals für Dermatologie vergeben wurde.³⁶

Um 1900 starteten die ersten Experimente mit photosensibilisierenden Substanzen und sichtbarem Licht zur Behandlung von Hautkrebs und diese Entdeckungen wurden zu den Grundbestandteilen der Photodynamischen Therapie fast ein Jahrhundert später.³³ Es wurde sehr viel Forschung in die Entwicklung von neuen Apparaturen für die Phototherapie gesteckt. 1906 entwickelte Richard KÜch in Deutschland die erste Quarzlampe, indem er das Bleiglas durch Quarz ersetzte, und somit eine Hochdruckschwefellampe mit höherem Output erzeugte.³⁷ Der Deutsche Ernst Krohmayer entwickelte 1912 eine Quarzlampe mit hohem UV-Output, die es ermöglichte, verschiedene Hauterkrankungen zu therapieren. Diese Lampe war sowohl in Europa, als auch Amerika und Asien für Jahrzehnte die populärste Lampe in der Dermatologie.^{38,39} 1925 veröffentlichte William Henry Goeckermann die Ergebnisse seiner Forschungen über photosensibilisierende Substanzen in der Psoriasis-therapie.⁴⁰ Diese Therapie wurde weltweit bekannt und über einen sehr langen Zeitraum zur Behandlung von Psoriasis eingesetzt. Später wurde diese Therapie von John Ingram mit Dithranol kombiniert.⁴¹ 1927 konnte Erich Uhlmann durch die Kombination eines Öles mit natürlichem oder künstlichem UV-Licht eine Repigmentierung bei Vitiligo bewirken.⁴²

2.3. Auswirkungen der ultravioletten Strahlung auf das Immunsystem

Es ist bereits seit über 25 Jahren bekannt, dass die UV-Strahlen das Immunsystem beeinflussen, und es gibt viele Studien, die sich mit den Auswirkungen der Strahlen auf das Immunsystem befassen. Die Ergebnisse zeigen, dass der meiste photoimmunologische Einfluss von UVB-Strahlen ausgeht, allerdings gibt es auch Studien, die den immunmodulierenden Einfluss der UVA-Strahlen aufzeigen.

Die Auswirkungen auf das Immunsystem sind nicht alleine von der Intensität der verschiedenen Wellenbänder abhängig, sondern auch von der Absorption der Moleküle in der Haut (auch Chromophore genannt) und von der Penetration der Haut. Strahlen mit kürzerer Wellenlänge (UVB) dringen nicht so tief in die Haut ein wie Strahlen mit längerer Wellenlänge (UVA), aber die UVB-Strahlen haben dafür einen höheren Energiegehalt pro Photon. Weitere Komplikationen für die Identifikation des ausschlaggebenden Wellenbandes ist die Interaktion zwischen UVA und UVB und die unterschiedlichen Inkubationszeiten zur Immunsuppression⁴³. Diese Tatsachen erklären die Komplexität dieses Themas und belegen, dass die Intensität der verschiedenen Wellenbänder nur experimentell bestimmt werden kann.³³

Die UV-Strahlen unterdrücken sowohl die humorale, als auch die zelluläre Immunabwehr, die lokale oder systemische primäre Immunantwort, sowie die sekundäre Immunantwort. Die ersten Beweise für die immunsupprimierende Wirkung der UV-Strahlung ergaben sich aus Experimenten mit Mäusen. Es zeigte sich, dass wenn einer Maus ein Tumor implantiert wird, deren Immunsystem den Tumor abstößt, wenn man der Maus aber Immunsuppressiva verabreicht, oder sie mit UVB bestrahlt, es zu keiner Abstoßungsreaktion kommt. Dies zeigt, dass der UV-Strahlung eine ähnliche Wirkung wie immunsupprimierenden Medikamenten zugeschrieben werden kann.⁴⁴

Weltweit bestätigen Studien die immunsupprimierende Wirkung der UVB-Strahlen. Im Gegensatz dazu es gibt Studien, die den langwelligen Strahlen sogar einen schützenden Effekt auf die immunsupprimierende Wirkung der UVB-Strahlen zuschreiben.^{45,46} Die Dosis-Wirkungskurve der UVB-Strahlen zeigt im Gegensatz zu der der UVA Strahlen einen klaren Anstieg der immunsupprimierenden Wirkung mit dem Anstieg der Strahlendosis. Die Kurve der UVA-Strahlen ist hingegen unter manchen Umständen eher glockenförmig, sodass nach einem Maximum an immunsupprimierender Dosis die Wirkung auf das Immunsystem nachlässt, bis es zu gar keiner supprimierenden

Wirkung mehr kommt.⁴⁷ Demzufolge schreibt man den UVB-Strahlen einen größeren Einfluss auf das Immunsystem zu, obwohl die UVA-Strahlen sicherlich auch immunsupprimierende Wirkungen aufweisen.^{48,49}

Die biologische Relevanz der UV-induzierten Immunsuppression liegt unter anderem in der verminderten Immunantwort gegen virale, bakterielle oder fungale Infektionen.⁵⁰ Dieses Phänomen wurde sehr häufig experimentell geprüft und die am öftesten verwendeten infektiösen Agenzien sind: Herpesviren, Listerien, Mykobakterien, und *Candida albicans*.⁵¹

Eine weitere biologische Relevanz stellt die Verschlechterung von Infektionen dar, obwohl nicht ganz geklärt ist, ob die immunsupprimierende Wirkung der UV-Strahlung oder eine direkte Aktivierung von Krankheitserregern dafür verantwortlich ist. Es ist lange bekannt, dass es bei Patienten, die zu Herpes labiales neigen, unter Einfluss von UV-Strahlung zur Eruption von herpetischen Hautveränderungen kommen kann.^{52,53}

Untersuchungen in Tiermodellen zeigen, dass UV-Strahlung auch Auswirkungen auf das Immunsystem hat. Das Immunsystem dient nicht nur zum Schutz vor Mikroorganismen, sondern auch zur Abwehr maligner Zellen: vor allem in frühen Tumorstadien kann es transformierte Zellen als „fremde Zellen“ erkennen und eine Abwehrreaktion starten. Dieser Abwehrmechanismus trifft sowohl für den hellen Hautkrebs („non-melanoma skin cancer“) als auch für das Melanom zu, doch kann dieser Effekt durch die Wirkung der UV-Strahlen beeinträchtigt werden. Die Erfahrung zeigt, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen dem Risiko von Hauttumoren und einer Immunsuppression.³³

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl die kurzwellige als auch die langwellige UV-Strahlung großen Einfluss auf das Immunsystem hat, doch dass das Zusammenspiel beider Wellenbänder die stärkste immunsuppressive Wirkung erzielt. Bis heute ist der genaue Effekt der UV-Strahlung noch nicht geklärt, da dieser sowohl von der Dosis und den Wellenbändern einerseits als auch vom Hauttyp andererseits abhängig ist.³³

2.4. Phototherapie:

Die Geschichte der Phototherapie begann am Ende des 19. Jahrhunderts mit Niels Finsens Therapieverfahren gegen Lupus vulgaris.³³ Die Phototherapie, oder auch UV-Therapie, ist ein Verfahren, bei dem UVA- und UVB-Strahlen gezielt eingesetzt werden. Diese Therapie weist zwei sehr bedeutende Vorteile gegenüber anderen Verfahren auf. Zum einen entstehen die chemotherapeutischen Moleküle erst in der Haut selbst. Das bedeutet, dass das therapeutische Agens, nämlich elektromagnetische Energie, in die Haut eindringt und hier bestimmte Biomoleküle verändert und aktiviert. Das hat den Vorteil, dass keine zusätzlichen Stoffe dem Körper zugefügt werden müssen.

Zum anderen werden die Hautzellen von Natur aus mit der zytotoxischen Wirkung des Agens (der UV-Strahlen) konfrontiert. Der Mensch entwickelt sich unter UV-Strahlen und die Haut ist somit ständig dem angewandten Agens ausgesetzt und hat daher diverse Reparaturmechanismen gegen die zytotoxische Wirkung entwickelt. Zu diesen Mechanismen zählen Enzyme zur Beseitigung oder Umkehrung von DNA Photoprodukten, Zellreparaturmechanismen und Schutzfaktoren der Haut, welche eine Barriere für die Strahlen bilden. Einige dieser Urmechanismen der Haut werden bei der Phototherapie aktiviert und richten sich gegen die UV-induzierten Schäden.

Dieser Aspekt könnte eine Erklärung dafür liefern, warum sowohl die Effizienz als auch das Langzeitrisiko der PUVA sich derart von dem der Phototherapie unterscheiden. Denn die Lichtschäden der PUVA-Therapie sind, im Gegensatz zu denen der Phototherapie, etwas vollkommen Neues für die Reparaturmechanismen der Haut, womit auch andere Mechanismen in Gang gesetzt werden.

Die Phototherapie ist eine relativ effektive und gut anwendbare Behandlungsform, bei der die akuten Nebenwirkungen zumeist ganz zu verhindern sind, oder zumindest auf ein tolerierbares Maß reduziert werden können, und deren therapeutische Effekte ein gewisses Langzeitrisiko in Kauf nehmen lassen.⁵⁴

2.4.1. Mechanismen der UV-Therapie

Der genaue Wirkungsmechanismus der UV-Therapie ist noch nicht geklärt, doch weiß man, welche Reaktionen durch die Strahlen ausgelöst werden. Die ultravioletten Strahlen treffen auf die Haut auf und werden von verschiedenen intra- und extrazellulären Molekülen absorbiert. Die Absorption der Strahlung führt in wichtigen Biomolekülen zu energetischen Veränderungen und chemischen Reaktionen, Beeinflussung von Zellmetabolismen und zur Zellreplikationskinetik. Wenn genügend Zellen betroffen werden, kommt es zur Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren, wodurch eine entzündliche Reaktion ausgelöst wird und Reparaturmechanismen auf zellulärer, molekularer und geweblicher Ebene aktiviert werden. Die Schädigung der Zellen kann jedoch nicht vermieden werden, da sie ausschlaggebend ist für die Einleitung des therapeutischen Effekts.⁵⁵

Die durch die Strahlen verursachte Schädigung geschieht innerhalb von Sekunden, doch die Antwortreaktion des Körpers dauert Stunden bis Wochen, wobei die Reaktion stark von der Dosis und Wellenlänge der Strahlen abhängig ist.⁵⁵

Es zeigte sich, dass wenn man die Haut von Tieren oder Menschen mit UV-Strahlung behandelt, es zuerst zu einer leichten Verminderung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese kommt, dann aber kommt es zu einem Umschlag: zu einer Steigerung der Synthese und zu einer Hyperproliferation. In gesunder Haut kann die Hyperproliferation zu einer Verdickung der Epidermis oder zur Abschuppung führen, was bedeuten würde, dass zum Beispiel in psoriatischer Epidermis eine Normalisierung der Verhältnisse stattfinden würde. Zusätzlich geht man davon aus, dass kranke Zellen, zum Beispiel psoriatische Zellen, eine höhere Sensitivität für die Strahlen aufweisen, da sie eine höhere metabolische Aktivität und einen höheren Replikationszyklus haben.

Weitere Erklärungsversuche über die Wirkungsweise der UV-Strahlung sind, dass sie zur Beeinträchtigung von Lymphozyten und Leukozyten und zur Veränderung von Metaboliten oder Mediatoren, wie zum Beispiel, Prostaglandine oder Leukotriene führen. Die genaue Wirkungsweise der UV-Strahlung auf erkrankte Zellen konnte jedoch noch nicht geklärt werden, und daher kann es auch sein, dass sich die Wirkung der Strahlen auf abnormale Zellen vollkommen von der auf gesunde Zellen unterscheidet. Am wahrscheinlichsten ist es jedoch, dass der Erfolg der Therapie auf einem Zusammenspiel mehrerer dieser Veränderungen beruht.^{56,57,58,59}

2.4.2. Aktionsspektrum

Die Definition des Aktionsspektrums ergibt sich durch die Effektivität der Abheilung von Psoriasisherden, im Vergleich zu dafür benötigten Wellenlängen. Es ist wünschenswert, die maximal therapeutische und minimal erythemauslösende Wellenlänge zu verwenden, da gesunde Haut auch meistens mitbetroffen ist und man die Entstehung von Erythemen und Entzündungen vermeiden will.⁵⁴

Vergleicht man das Aktionsspektrum zur Abheilung von Psoriasisherden, mit dem zur Entstehung von Erythemen, zeigt sich, dass im Bereich von 295nm bis 365nm, das therapeutische und das erythemauslösende Aktionsspektrum sehr ähnlich sind. Zusätzlich stellte sich heraus, dass die UV-Strahlen von 290-320nm noch mehr Vorteile aufweisen, da sie eine kürzere Bestrahlungszeit benötigen als Strahlen mit Wellenlängen von mehr als 320nm⁴⁰ und Strahlen mit Wellenlängen von weniger als 295nm eine viel stärker erythemauslösende als therapeutische Wirkung haben.⁶⁰

Es zeigte sich, dass UVB ein viel höheres Wirkungsspektrum als UVA auf die menschliche Haut aufweist. UVB erzielt höhere Effekte in Bezug auf Erytheme^{61,62} verzögerte Pigmentierung,⁶³ DNA bezogene Lichtschäden,⁶⁴ Harnsäurephotoisomeration⁶⁵ und „non melanoma“ Hauttumoren.⁶⁶

UVA ist nachweislich weniger erythemauslösend, da es 1000-mal mehr Energie benötigt als UVB, um in gesunder Haut eine Rötung zu erzeugen,⁶⁷ es scheint auch nicht zielführend, UVB mit UVA zu kombinieren, da dies nur zu einer minimalen Effektsteigerung führen würde und dieser Unterschied nicht wirklich messbar wäre.⁶⁸

Um eine hohe Effektivität bei UVA Strahlen zu erreichen, muss man sehr hohe Dosen verwenden, was in vielerlei Hinsicht unpraktisch ist. Man geht davon aus, dass sich die akute und chronische Toxizität der UVA Strahlen von der der UVB Strahlen, sowohl qualitativ als auch quantitativ unterscheidet, und unter Umständen ein höheres Risiko für Blutgefäße und dermale Strukturen besteht. Allerdings darf man auch nicht missachten, dass auf Grund der längeren Wellenlänge der UVA Strahlen tiefere Gewebsschichten und vielleicht auch mehr veränderte Zellen und Blutgefäße erfasst werden.⁶⁸

Eine wichtige Rolle für den Therapieerfolg sind nicht nur die richtige Strahlendosis und Frequenz, sondern entscheidend ist auch die Auswahl der Strahlenquelle. Die Wahl der Strahlenquelle ist abhängig vom Aktionsspektrum, von der geplanten Phototherapie, vom optischen Erscheinungsbild der Haut und von den geometrischen und spektralen Eigenschaften der Strahlenquellen.⁵⁴

2.4.3. Agenzien in der Phototherapie

Schon seit vielen Jahren weiß man, dass die photozytotoxische Wirkung der UV-Strahlen durch gewisse Hilfsmittel, gesteigert werden kann. Diese Substanzen, genannt Photosensibilisatoren, können entweder topisch oder systemisch angewendet werden. Sie bewirken eine ausgeprägte Sensibilisierung auf Strahlung im UVA-Bereich, worauf deren Wirkung beruht.

2.4.3.1. Teer

Schon vor über 80 Jahren fand man heraus, dass die photozytotoxische Wirkung der UV-Strahlen durch die Anwendung von topischen Agens verstärkt werden konnte. Im Jahre 1925 beschrieb Goeckerman die Wirkung von Steinkohlenteer als photosensibilisierendes Agens. Es wurde daraufhin als Standardtherapie zur Behandlung von Psoriasis eingesetzt und bis heute steht seine Effektivität außer Frage.^{69,70,71}

Bei der Goeckerman Behandlung wird das Steinkohleteer für 24 Stunden auf die Haut aufgetragen, dann ohne feste Reibung mit Olivenöl abgewaschen, anschließend wird die Haut mit einer heißen Quecksilverdampfampe bestrahlt und abschließend folgt ein therapeutisches Bad, welches Haferflocken und Soda oder Seife und Wasser beinhaltet.⁷² Wie bereits erwähnt, ist die Wirkung dieser Methode unumstritten, doch blieben jegliche Versuche zur Definition der wirkungstragenden Komponenten insuffizient, da zuwenig genaue Daten über die UV-Dosis oder die Radiometrie vorliegen.⁵⁴

Die therapeutischen Effekte von Teer sind durch die komplexen aromatischen Kohlenwasserstoffe gegeben, die durch Destillation in hohen Temperaturen entstehen. Steinkohlenteer wird schon seit jeher zur Therapie von Hauterkrankungen eingesetzt, doch konnten bisher erst etwa 400 von den 10 000 Komponenten identifiziert werden.^{73,74}

Die lichtsensibilisierenden Komponenten von Steinkohlenteer sind unter anderem: Anthrazene, Phenanthrene, Pyrene und Fluoranthrene. Ihr Aktionsspektrum liegt für die verspätete Entstehung eines Erythems im langwelligem UV-Bereich (UVA: 320-400).^{73,75,76,77,78}

Es zeigte sich, dass durch die Anwendung von Steinkohlenteer die Dosis an benötigten UVA-Strahlen zur Erzeugung eines Erythems, um den Faktor 2-10 vermindert werden kann. Dennoch geben die meisten Lichtquellen der Phototherapie genug UVB ab, um ein Erythem in gesunder Haut zu erzeugen, bevor sie ausreichend UVA abgeben könnten, auch wenn Steinkohlenteer zur Unterstützung eingesetzt würde. Dies beruht auf der Tatsache, dass UVB tausendmal leichter ein Erythem hervorrufen kann als UVA. Daher sind die Erythementstehung und die klinischen Ergebnisse unter der Quecksilberdampfampe eher auf die mittlere UV-Wellenlänge (UVB: 290-320 nm) zurückzuführen.⁷⁶

Es gibt diverse Studien, welche die Effektivität von Teer als topisches Agens in Frage stellen und überprüfen, und man fand recht unterschiedliche Ergebnisse. Einige Studien belegen, dass die Kombination von Teer mit UVB sehr effektiv ist,^{79,80} andere wiederum belegen die therapeutische Wirkung von Teer mit UVA⁸¹ und einigen Berichten zufolge könnte der therapeutische Effekt sogar durch die Eigenschaften des Teers selbst und nicht durch dessen Phototoxizität erfolgen.^{82,83}

Alles in allem kann man davon ausgehen, dass Teer einen UV-Strahlung sparenden Effekt hat.

2.4.3.2. UVA

UVA wurde teilweise auch zur Effektsteigerung von UV Therapien eingesetzt. Es gibt jedoch vergleichende Studien die darlegen, dass die Zugabe von UVA (in ausreichend hohen Dosen) keine Verbesserung der Effekte von UVB bewirkt.⁸⁴

2.4.3.3. Topische Kortikoide

Topische Kortikosteroide werden manchmal als unterstützende Agenzien bei der UV-Therapie eingesetzt. Es gibt jedoch einige Studien, welche die positiven Effekte der Steroide widerlegen. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass die Dauer bis zum Wirkungseintritt der Therapie nicht verkürzt werden konnte,⁸⁵ zum anderen weist der Einsatz von Steroiden viele Nachteile auf: sie sind sehr teuer, können zur Tachyphylaxie^{86,87} und Hautatrophie führen, und unter Umständen sogar die Remissionszeit verkürzen.⁵⁴

2.4.3.4. Bäder

Eine weitere Methode zur Reduktion der Strahlendosis, sind 30 Minuten währende Bäder. Psoriasis-Patienten werden für 30 Minuten in ein warmes Wasserbad gelegt. Dadurch kommt es teilweise zur Abschuppung der Psoriasisherde und die Therapie ist sehr entspannend für die Patienten. Der unterstützende Effekt der Bäder besteht darin, dass es durch die Hydratation zu einer Veränderung des Stratum corneum (Hornhaut) kommt, durch Extraktion von endogenen Sonnenschutzfaktoren (wie zum Beispiel Harnsäure), wodurch die Sensitivität der Haut gegenüber UV Licht mit weniger als 320nm Wellenlänge steigt. Allerdings ist der therapeutische Effekt dieser Bäder nicht sehr ausgeprägt.⁸⁸

2.4.4. Therapiekombinationen

Es ist die Aufgabe des behandelnden Arztes, die Langzeitschäden so gering wie möglich zu halten und die bestmögliche Therapieform für den jeweiligen Patienten zu finden. Eine Variante zur Verwirklichung dieser Ziele besteht darin, verschiedene Therapieformen zu kombinieren. Durch diese Kombinationsprogramme kann die Strahlendosis reduziert und unter Umständen therapieresistenten Patienten eher geholfen werden. Zur Reduktion der kumulativen UVB Dosis, können Kombinationen mit PUVA, Retinoiden und Methotrexat angewendet werden. Auf Grund der Tatsache, dass jede dieser Therapien auf unterschiedliche Weise wirkt und unterschiedliche Langzeitrisiken birgt, kann es durch eine Kombination zu einer Verminderung der Langzeitfolgen kommen.⁵⁴

2.4.5. Toxizität

Die UV Therapie verursacht eine symptomatische Entzündungsreaktion der Haut. Die UV-Strahlung wird von wichtigen Biomolekülen aufgenommen und verursacht lichtbedingte Veränderungen in den Zellen der Dermis und der Epidermis. Die akuten Nebenwirkungen der UV-Strahlung manifestieren sich als: Rötung, Schmerz, Brennen und Schwellungen. All diese Nebenwirkungen können durch eine behutsame Dosierung und durch genaue Protokolle bis zu einem gewissen Grad verhindert oder zumindest stark reduziert werden.

Die UV-Strahlung hat unerwünschte lokale und systemische Wirkungen auf das Immunsystem. Bis dato sind noch keine ernsthaften Folgeerkrankungen aufgetreten, doch könnte eine Veränderung des Immunsystems eine Erklärung für das gehäufte Auftreten von Herpes Simplex und bestimmten Autoimmunerkrankungen sein.⁵⁴

Das erwartete Langzeitrisiko der Phototherapie ist vermutlich mit den Schäden chronischer Sonnenbelastung gleichzusetzen, allerdings gibt es keine Studien, die diese Aussage belegen können. Selbst sehr genau ausgeführte Studien können das Risiko von Langzeitschäden schwer eruieren, da eine zu große Unregelmäßigkeit und zu große Unterschiede in der Sonnenbelastung der Probanden bestehen.⁵⁴

2.4.6. Anwendungsgebiete der Phototherapie

Anhand jahrelanger Beobachtungen und Forschungen setzt man heute die UVA und UVB Therapie gezielt für bestimmte Hauterkrankungen ein. Die Effektivität der beiden Therapien für selektive Erkrankungen und klinische Studien stellen die Basis für die Auswahl des Therapieverfahrens.

2.4.6.1. UVB

Die UVB Therapie ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Therapie von lichtempfindlichen Dermatosen. Es gibt verschiedene Quellen für UVB Strahlen: die Breitband- und Schmalbandtherapie, sowie Excimer Laser.³³

Der Unterschied von Breitband UVB (BBUVB)-Lampen und Schmalband UVB (NBUVB)-Lampen liegt darin, dass BBUVB-Lampen ein weites Emissionsspektrum haben und NBUVB-Lampen mit 87% der Strahlen im Bereich von 311nm und nur 0,1% der Strahlen kürzer als 290nm, ein relativ schmales Emissionsspektrum aufweisen. Der Excimer Laser wird zur Behandlung bestimmter Plaques bei Psoriasis eingesetzt.³³

Das Einsatzgebiet der UVB Therapie erstreckt sich von Psoriasis, über atopische Dermatitis, Vitiligo, cutanes T-Zell Lymphom, Pruritus, polymorphe Lichtdermatose, Lichen planus, Granuloma Annulare, bis zur Urticaria.³³

2.4.6.2. UVA

Erstmals wurde 1981 von einer Lampe berichtet, welche nur im Bereich von langwelligen UVA Strahlen, UVA-1(340-400nm), strahlte. Durch die Kombination einer Metall-Halidlampe mit einem neuen Filterungssystem, war es erstmals möglich, Haut mit sehr hohen Dosen von UVA-1 zu bestrahlen, ohne einen Sonnenbrand hervor zurufen.⁸⁹

Zu Beginn wurde UVA-1 nur zur Therapie von atopischer Dermatitis eingesetzt, doch zeigte sich mit der Zeit, dass es auch bei anderen Hauterkrankungen sehr wirkungsvoll sein kann. Heutzutage wird UVA-1 zur Therapie von durch T-Zellen und Mastzellen verursachten Hauterkrankungen, sowie bei Bindegewebserkrankungen und bei HIV positiven Patienten eingesetzt.⁸⁹

Tabelle 3: Indikationen zur UVA-1 Therapie³³

Indikation	Art der Studie	Kommentar
Atopische Dermatitis	Mehrere offene Studien, ein multizentrischer Test	bestehende Indikation
Urticaria pigmentosa	2 offene Studien	vielversprechende Ergebnisse, fehlende Studie über die Langzeiteffekte
lokalisierte Sklerodermie	2 offene Studien	sehr vielversprechend, kontrollierte Vergleichsstudien fehlen
systemische Sklerodermie	1 offene Studie	sehr vielversprechend, kontrollierte Vergleichsstudien fehlen
Kutanes T-Zell Lymphom	2 offene Studien, 1 Vergleichsstudie	vielversprechende Testreihen werden durchgeführt
Psoriasis/HIV+	1 offene Studie	sehr vielversprechend, Therapie der Wahl
Psoriasis/HIV-	Fallbericht	enttäuschend
Alopezia areata	unveröffentlichte Studie	kein Effekt
Lichen planus		kein Effekt

2.5. PUVA

2.5.1. Einleitung

PUVA steht als Abkürzung für Psoralen plus UVA. Dies ist eine Kombination von UVA Licht mit dem Naturstoff Psoralen, dessen photosensibilisierende Wirkung zur Therapie von Hauterkrankungen, wie zum Beispiel Psoriasis, Neurodermitis oder Vitiligo verwendet wird. In den späten 70er Jahren kam es zur Einführung dieser neuen Form von Lichttherapie in die Westliche Welt, obwohl es diese Therapieart eigentlich schon seit Tausenden von Jahren gibt. Zur PUVA Therapie gehört die orale Einnahme oder die topische Anwendung von Medikamenten mit photosensitivierender Wirkung, üblicherweise handelt es sich hierbei um 8-Methoxypsoralen. Die Patienten werden anschließend mit UVA Licht bestrahlt, wodurch das 8-Methoxypsoralen aktiviert wird. Durch die Aktivierung des Psoralens kommt es zu Querverbindungen der DNA Stränge, zur verminderten Replikation von Keratinozyten und zum Zelltod von aktivierten T-Zellen in der Haut.

Die Effektivität der PUVA gegenüber der UVB-Therapie ist unumstritten, dennoch sollte die PUVA nur sehr bedacht eingesetzt werden, da sie mit diversen Langzeitschäden assoziiert ist und viele Folgewirkungen noch nicht geklärt sind.⁹⁰

2.5.2. Geschichte der PUVA

Bereits vor Tausenden von Jahren nutzte man in Ägypten und Indien die Wirkung von Psoralen. Damals verwendete man bestimmte Pflanzenextrakte, welche natürliche Psoralene beinhalten, und das UV Licht und nutzte es zur Behandlung von Vitiligo.⁹¹

Im Jahre 1974 wurde bewiesen, dass die Kombination von 8-Methoxypsoralen (8MOP) und UVA Strahlen eine ausgezeichnete Methode zur Behandlung von Psoriasis ist.⁹²

Dieses neue Behandlungskonzept wird als Photochemotherapie oder als PUVA (Psoralen+ UVA) bezeichnet und brachte enorme Fortschritte im Bereich der Dermatologie, da es nicht nur die Therapie von Psoriasis, sondern auch diverser anderer Hauterkrankungen maßgebend beeinflusste.⁹³ Seitdem diese Therapie eingeführt wurde, gab es bereits enorme Fortschritte und Optimierungsprozesse aufgrund von klinischer

und wissenschaftlicher Forschung. Dadurch konnte man die optimale Dosimetrie, das richtige Patientengut, die Bedeutung von Protokollen, sowie die richtigen Kombinationsmöglichkeiten mit Methotrexat, UVB und Retinoiden festlegen. Trotz intensiver Forschung gibt es aber noch immer zwei bedeutende Fragen, welche noch nicht restlos geklärt werden konnten: hierzu zählen der Wirkungsmechanismus und die Langzeitschäden.⁵⁴

2.5.3. Wirkmechanismus der Phototherapie

Der genaue Wirkungsmechanismus der PUVA Therapie ist noch nicht ganz geklärt. Man weiß aber, dass die Auswirkungen auf die DNA eine große Rolle spielen. Entscheidend für die Wirkungsweise sind unter anderem die Dosis und das Intervall der Psoraleneinnahme, sowie die Bestrahlung mit UVA. Die Grundstruktur der Psoralene entspricht dem von Cumarin mit einem Furanring, auch als Furanocumarin bezeichnet, welches ursprünglich aus Pflanzen gewonnen wurde. Die heutzutage am häufigsten verwendeten Psoralene sind 8-Methoxypsoralen (8-MOP) und 5-MOP und das synthetische Furocumarin 4,5',8-Trimethylpsoralen (TMP), welches für die Bade-PUVA verwendet wird. 8-MOP und 5-MOP sind als Tabletten erhältlich, in denen das Psoralen entweder in kristalliner Form oder aufgelöst in Gel vorliegt. Im Unterschied zur kristallinen Form führt die Gelvariante zu einem schnelleren, höheren und eher reproduzierbaren Peak-Plasma-Level. Die oralen Psoralene werden in der Leber metabolisiert und innerhalb von 24 Stunden mit dem Harn ausgeschieden. Es ist erwiesen, dass der Psoralen-Plasma-Level sowohl bei den einzelnen Patienten als auch unter den Patienten großen Schwankungen ausgesetzt ist. Es wird angenommen, dass diese Schwankungen auf einen First-pass-Effekt zurückzuführen sind, durch welchen kleinste Veränderungen in der Psoralendosierung zu erheblichen Veränderungen des Plasmalevels führen. Ein weiterer entscheidender Faktor, in Bezug auf den Blutspiegel von Psoralen, ist die Nahrungsaufnahme. Daher versucht man, die Therapie so anzusetzen, dass sie immer im gleichen Verdauungsstadium stattfindet. Aufgrund der Schwankungen im Blutspiegel kann es leicht zu Unter- oder Überdosierungen während der einzelnen Therapien kommen.^{33,91}

Psoralen wird nur durch die UV-Strahlung aktiviert und auch nur in Bereichen, welche von den UVA Strahlen betroffen sind: die Epidermis, die papilläre Dermis und die oberflächlichen Gefäße.⁹¹

Die Wechselwirkungen von Psoralen mit der DNA spielen eine sehr große Rolle für die PUVA Therapie und wurden sowohl in vitro, als auch in vivo sehr genau untersucht.^{94,95} Man weiß heute, dass das Psoralen in die DNA Doppelstränge eingebaut wird und durch die Aktivierung mit UVA kommt es zu erst zur Bildung von Monoaddukten aus Psoralen und Pyrimidinbasen und dann zur Bildung von Biaddukten.^{54,91} Solche bifunktionalen Addukte entstehen aus Querverbindungen mit Pyrimidinmolekülen aus Schwestersträngen der DNA.^{33,96}

Die therapeutische oder toxische Wirkung dieser monofunktionalen und bifunktionalen Addukte ist derzeit noch nicht bewiesen und es könnte sein, dass der therapeutische Effekt der Psoralen und DNA Wechselwirkung darin besteht, dass es zu einer verminderten Proliferation der Epidermis kommt⁵⁴. Es gibt auch Theorien darüber, dass das Zusammenspiel von Psoralen mit DNA gar nichts zum therapeutischen Effekt der PUVA beiträgt, sondern ganz andere Faktoren eine Rolle spielen: wie zum Beispiel die Wirkung auf das Immunsystem oder die Zerstörung von Zellorganellen, welche zur Proliferation benötigt werden.⁹⁷

2.5.4. Photobiologische Wirkung von Psoralen

Die photosensitivierende Wirkung von Psoralen entsteht bei der Bestrahlung mit Wellenlängen über 320 nm. Aufgrund von früheren Studien an Schweinen und Menschen wurden UVA Lichtquellen produziert, deren Emissionsmaximum im Bereich von 340-380nm liegen. Diese Lichtquellen sind heutzutage noch immer in Verwendung, obwohl aktuellere Studien zeigen, dass die maximale photosensitivierende Wirkung bei kürzeren Wellenlängen, 320-340nm, entsteht.⁹⁸

2.5.5. Effekte der PUVA auf die Haut

PUVA führt zur Bildung von Erythemen und zu verstärkter Melanogenese. Jene Erytheme die durch PUVA verursacht sind, entstehen wesentlich langsamer als die von UVB Strahlen hervorgerufenen Erytheme. Das Zeitfenster für die durch PUVA verursachten Erytheme beträgt in etwa 36-72 Stunden. Sie können, je nach Patient, bis zu 3 Wochen anhalten.⁹⁹

Ein weiterer Effekt der PUVA Therapie ist ein Pruritus, der teilweise Wochen bis Monate anhalten kann und für die Patienten äußerst unangenehm ist.³³

In seinen Ursprüngen wurde die PUVA zur Therapie von Vitiligo verwendet. Daher kommt es bei ihren jetzigen Einsatzgebieten auch zur verstärkten Pigmentierung und so ist es nicht immer einfach, das richtige Mittelmaß zwischen therapeutischer und toxischer Dosis zu finden. Die durch PUVA verursachte Pigmentierung entspricht in etwa der durch UVB verursachten Melanogenese. Die orale PUVA führt zur Verstärkung der Melanozytenreaktion und zur Anregung des Melanosomentransports von den Melanozyten zu den epithelialen Zellen. Sie hat allerdings keine Wirkung auf das Verteilungsmuster oder die Größe der Melanosomen¹⁰⁰, so wie es bei der topischen Auftragung von TMP vorkommt.^{54,101}

2.5.6. Alternative Psoralenformen

Die mit Abstand am häufigsten eingesetzte Psoralenform ist das 8-Methoxypsoralen. Dieses Psoralen kann sowohl zur oralen als auch zur topischen PUVA eingesetzt werden. Das 5-Methoxypsoralen hat die gleichen therapeutischen Effekte wie das 8-MOP, kann dabei aber eine geringere Phototoxizität aufweisen, da es viel seltener zu Erythemen, Blasenbildung und Pruritus kommt.^{54,102}

2.5.7. Therapiekombinationen

Eine gute Möglichkeit die Wirksamkeit der PUVA zu steigern, ist die Kombination von Therapien. Mit diesen Kombinationen können die therapeutischen Effekte verbessert und die toxischen Nebenwirkungen teilweise vermindert werden.

2.5.7.1. UVB

Ein gutes Beispiel für den Wirkungseffekt von Kombinationstherapien ist die Kombination von PUVA mit UVB. Es zeigt sich, dass hierbei nur die Hälfte an Bestrahlungen nötig sind, um ein Abklingen der Psoriasisherde zu erzielen. Die Patienten werden nach der Einnahme von 8 MOP zeitgleich mit UVA und UVB bestrahlt. Dabei beträgt die Gesamtdosis an UVA und UVB um einiges weniger als bei den Einzeltherapien. Aufgrund dieser Reduzierungen kommt es zu einem verminderten Schaden an der Haut, allerdings kann eine verstärkte Langzeittoxizität nicht ausgeschlossen werden.⁵⁴

2.5.7.2. Retinoide

Die Kombination von PUVA mit Retinoiden stellt eine Option bei der Behandlung der Psoriasis dar. Diese Methode ist eine der wirkungsvollsten therapeutischen Maßnahmen gegen Psoriasis. Die therapeutische Wirkung steigt deutlich an, wenn die PUVA Therapie mit der täglichen Einnahme von Retinoiden kombiniert wird. Die Retinoide (Etretinate, Acitretinate, Isotretinoin) werden 5-7 Tage vor der Bestrahlung in der Dosis von 1mg pro kg Körpergewicht eingenommen. Dieses Verfahren muss nach Abklingen der Herde weitergeführt werden, damit die volle Wirkung in Kraft treten kann. Es kommt hierbei zu einem sehr guten Ansprechen der Läsionen, zur Reduktion der Anzahl der Behandlungen um 1/3, zur Verminderung der Gesamtdosis der PUVA auf die Hälfte und auch „non responder“ sprechen auf diese Kombination gut an.^{54,91,103,104}

Aufgrund dieser bemerkenswerten Erfolge wird die Chemophotochemotherapie heute in vielen europäischen Ländern als Routinemethode eingesetzt.⁵⁴

Dieses Verfahren weist auch einige Nebenwirkungen auf, welche für den Patienten zwar unangenehm, aber dennoch reversibel sind. Es kann zu Rhinitis, trockener Haut, spröden Lippen und diffusem Haarausfall kommen. All diese Symptome verschwinden wieder sobald die Therapie gestoppt wird.

Ein wichtiger Gefahrenpunkt ist die Teratogenität der Retinoide. Aufgrund der langsamen Elimination der Retinoide muss abhängig von der Art des Retinoids eine Kontrazeption für bis zu einem Jahr nach der Behandlung erfolgen.⁵⁴

2.5.7.3. Topische Adjuvantien

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kombination von PUVA mit topischen Adjuvantien wie Kortikosteroiden, Teerpräparaten, Anthralin und mittlerweile immer häufiger mit Calcipotriol.⁹¹

2.5.7.4. Methotrexat

Die Kombination von PUVA mit Methotrexat kann zu einer Verminderung der Therapiedauer, der Anzahl der Bestrahlungen und der UVA Dosis führen. Weiters wird diese Methode bei sehr schwierigen Fällen angewandt und zeigt hier einige Erfolge. Aufgrund der Karzinogenität von Methotrexat wird diese Methode aber nicht als Dauertherapie eingesetzt.^{54,91}

2.5.8. Nebenwirkungen

Bei all den Vorteilen und positiven Effekten der PUVA Therapie darf man die Nebenwirkungen nicht außer Acht lassen. Es gibt einige Nebenwirkungen, die nur von kurzer Dauer und zumeist vollkommen reversibel sind, allerdings gibt es auch Langzeitnebenwirkungen, welche größere Bedenken verursachen.

2.5.8.1. Kurzzeitnebenwirkungen

Es gibt eine Reihe von Kurzzeitnebenwirkungen, die relativ geringe Auswirkungen haben und reversibel sind, sodass nur ein kleiner Prozentsatz der Patienten deshalb die Therapie abbrechen muss. Relativ häufig kann es zu gastrointestinalen Problemen, wie Übelkeit und Erbrechen, oder zu Störungen des zentralen Nervensystems, wie Schwindel und Schlaflosigkeit, kommen. Es zeigt sich, dass diese Nebenwirkungen mit 5 MOP seltener vorkommen als mit 8 MOP, was auch einer der Gründe sein dürfte, weswegen es immer häufiger zum Einsatz kommt. Weitere nicht phototoxische Nebenwirkungen können Hypertrichosis, kardiovaskuläre Störungen und Herpes Simplex sein.³³

Das größte phototoxische Problem ist das PUVA induzierte Erythem. Dieses kann sehr unangenehm sein und bis zu mehreren Wochen anhalten. Weiters kann es zu Pruritus, Photo-onycholysis, Köbner Phänomen und Phytophotodermatitis kommen. Selten kommt es während der Therapie zur Entwicklung von neuen Dermatosen.³³

2.5.8.2. Langzeitnebenwirkungen

Hautalterung

Die durch Phototherapie induzierte Hautalterung wird als Dermatoheliose bezeichnet. Dieser Begriff fasst folgende Symptome zusammen: Pigmentveränderungen, Xerosis, Elastizitätsverlust, Faltenbildung, Aktinische Keratose und die Bildung von dunklen Lentiginen.⁹¹

Ophthalmologisches Risiko

Es gibt einige Fallberichte über den Zusammenhang zwischen der Entstehung von Katarakt und PUVA Therapie; allerdings zeigte sich in großen prospektiven Studien, dass die Gefahr für die Entstehung von Linsenabnormalitäten nicht signifikant mit der PUVA Therapie ansteigt.¹⁰⁵

Karzinogenität

Die meisten Bedenken bezüglich der PUVA Therapie richten sich aufgrund der karzinogenen Eigenschaft gegen die Langzeittherapie. Es gibt viele Studien, welche die Karzinogenität von PUVA bestätigen können.^{106,107} An Hand dieser Studien zeigt es sich, dass es durch große Dosen an PUVA zu einem gehäuften Auftreten von Plattenepithelkarzinomen kommen kann. Weiters zeigt sich ein leichter Anstieg im Vorkommen von Basalzellkarzinomen.¹⁰⁸

Es stellt sich hierbei die Frage, ob PUVA selbst onkogenetisch wirkt, oder ob die PUVA Therapie als Promotor bei jenen Patienten wirkt, welche von vornherein Risikofaktoren aufweisen.⁵⁴

Es besteht auch ein gewisses Risiko für die Entstehung von malignen Melanomen. Wie bereits erwähnt, führt PUVA zur Stimulation der Pigmentierung, womit ein Effekt auf Melanozyten bestätigt ist. Es gibt eine Multicenter Studie, welche den Anstieg von Melanomen bestätigt. Laut dieser Studie steigt das Risiko für die Entstehung von Melanomen 15 Jahre nach Beginn der Behandlung an. Dieser Anstieg wurde vor allem bei Patienten mit mehr als 250 Therapien festgestellt.¹⁰⁹

Effekte auf das Immunsystem

PUVA hat u.a. auch Auswirkungen auf das Immunsystem. Es kommt durch PUVA zur Veränderung der Oberflächenmarker und der Funktion von Lymphozyten.¹¹⁰ Weiters kann es zu einer verminderten Hypersensitivitätsreaktion auf Kontaktallergene und zu einer Verminderung der Anzahl der Langerhans'schen Zellen in der Epidermis kommen. Therapeutisch führt PUVA u.a. höchstwahrscheinlich über eine Wirkung auf das Immunsystem zu einem längeren Überleben von Hauttransplantaten.^{54,111,112}

2.5.9. Anwendungsgebiete der PUVA

Die PUVA Therapie wird zur Behandlung vieler Hauterkrankungen eingesetzt. Psoriasis stellt die häufigste Indikation für die PUVA dar. Hierbei sollte sich eine Besserung nach 6-10 Behandlungen und eine Abheilung nach 20-30 Bestrahlungen zeigen.^{92,113} Weitere Anwendungsgebiete der PUVA sind Vitiligo, Mycosis Fungoides, Ekzeme und Photodermatosen. Es gibt noch eine Reihe weiterer Dermatosen bei denen PUVA zur Therapie angewandt wird, wie zum Beispiel Alopecia areata, Amyloidose, Erythema multiforme, Lichen planus, Vasculitis etc. Jedoch gibt es bei diesen Erkrankungen noch kaum Erfahrungen und nur vereinzelte Fallberichte, welche die Effizienz der PUVA bestätigen.³³

2.6. Topische PUVA

Die topische PUVA Therapie ist ein Behandlungskonzept, welches sehr häufig in Europa eingesetzt wird. Bei dieser Methode wird Psoralen direkt auf die Haut aufgetragen und mit der Bestrahlung von UVA kombiniert. Das Psoralen wird entweder in einer Wanne für die Bade PUVA, oder in einem kleineren Gefäß für die lokale Behandlung von Händen und Füßen als verdünnte Lösung zubereitet. Am häufigsten wird heute Methoxsalen eingesetzt, da es den Vorteil aufweist, dass die photosensitivierende Wirkung nur wenige Stunden anhält.^{33,114}

Bei der Bade PUVA baden die Patienten für 15 Minuten in einer verdünnten Methoxsalenlösung bei 37 Grad. Anschließend an das Bad werden die Patienten mit UVA bestrahlt, wobei die Strahlendosis vom Hauttyp und der minimal phototoxischen Dosis (MPD) abhängig ist. Die Wassertemperatur spielt eine große Rolle, da sich die Absorptionskinetik von Psoralen mit Anstieg und Fall der Temperatur verändern kann. Daher wird eine konstante Temperatur von 37 Grad für optimal erachtet und sollte auch bei jeder Therapie beibehalten werden, damit es nicht zu Verbrennungen oder Misserfolgen kommt.¹¹⁴

2.6.1. Nebenwirkungen der topischen PUVA

2.6.1.1. Akute Nebenwirkungen

Vergleichende Studien ergaben, dass die Inzidenz für die Entstehung eines Erythems oder Sonnenbrandes für die orale und die topische 8 MOP ident ist.^{114,115,116}

Weiters zeigte sich, dass Pruritus bei der oralen und der topischen Form gleich häufig auftritt, aber die topische im Gegensatz zur oralen PUVA viel seltener zu gastrointestinalen Problemen führt. Vereinzelt kann es während der topischen Therapie zur Entstehung von Kontaktdermatitis und Photokontaktdermatitis kommen.¹¹⁴

2.6.1.2. Langzeitnebenwirkungen

Es gibt keinen relevanten Hinweis darauf, dass die topische PUVA zur Entstehung von Katarakt führen kann, da das Serumlevel bei dieser Therapie einfach zu gering ist, um Auswirkungen in diese Richtung haben zu können. Derzeit gibt es noch keine Langzeitstudien über die Karzinogenität der topischen PUVA, doch sollte man, solange das Gegenteil noch nicht bewiesen werden konnte, der topischen PUVA die gleichen karzinogenen Eigenschaften wie der oralen PUVA zuschreiben.¹¹⁴

3. Methoden

Patienten: Diese Studie wurde zur Untersuchung der möglichen Auswirkungen einer Behandlung mit Phototherapie auf das Vorhandensein von ANA bei Patienten mit unterschiedlichen Hauterkrankungen durchgeführt. Es wurden hierfür die Daten der Datenbank der PUVA-Ambulanz und die des Immunlabors der Univ.Klinik für Dermatologie und Venerologie des Landeskrankenhauses Graz verwendet. Bei dieser Studie handelt es sich um eine retrospektive Studie, bei der Daten von Patienten von 1994 bis 2007 miteinbezogen wurden. Die Daten der PUVA-Ambulanz umfassten 2348 Patienten. Die Daten dieser Patienten wurden mit den Daten des Immunlabors verglichen, und nur jene Patienten in die Studie miteinbezogen, welche mindestens eine Blutabnahme zur Bestimmung von ANA vor Beginn einer Phototherapie hatten. 1094 Patienten erfüllten diese Anforderung und wurden in die Studie aufgenommen. Es handelte sich bei den Patienten um 561 Frauen und 533 Männer. Die Patienten hatten aufgrund unterschiedlicher Dermatosen eine Phototherapie erhalten.

Zu den häufigsten Diagnosen zählten (in abfallender Reihenfolge):

- Psoriasis
- Atopische Dermatitis
- Prurigo
- Polymorphe Lichtdermatose
- Urticaria pigmentosa
- Pruritus
- Lichen ruber exanthematicus
- Lichen ruber planus

Je nach Hauterkrankung hatten die Patienten unterschiedliche Formen der Phototherapie erhalten (in abfallender Reihenfolge):

- UVB-311nm
- 8-MOP+UVA (oral)
- UVA1
- 5-MOP+UVA (oral)
- 8-MOP +UVA (topisch)
- UVB-Breitband
- Targeted UV
- UVA-Breitband

Labor: Die ANA-Bestimmung erfolgt mittels einem Immunofluoreszenztest und zwei verschiedenen ELISA-Verfahren.

- **Immunofluoreszenztest**

Material: Objektträger (Kallestad Hep2 CELL LINE SLIDE), einen PBS-Buffer (5 „Phosphat Buffered Saline Tablets (SIGMA)) und eine Probenverdünnung (10 µl Serum + 800µl PBS-Puffer).

Testablauf: 70µl der Probe werden auf die Auftragsstelle des Objektträgers (OT) aufgetragen → der OT für 30 min in eine feuchte Kammer legen → OT kurz abrinnen lassen, in PBS Puffer spülen und für 20-30 Minuten im PBS-Puffer stehen lassen (Puffer 1x wechseln) → Konjugat (Kallestad Universal FITC-Konjugat) auf Raumtemperatur bringen → OT mit beiliegenden Zellstoff um die Auftragsstellen herum abtupfen → 1 Tropfen Konjugat auf jede Auftragsstelle auftragen → 30 Minuten in feuchter Kammer inkubieren → Spülen → Eindeckmedium (Kallestad Mounting Media) auf Raumtemperatur bringen → Eindeckeln mit Kallestad Media+ Deckgläser 24x60 mm → Beurteilung mittels Fluoreszenzmikroskop B x 60, Filter „WIBA“

Beurteilung: Folgende Zellbestandteile werden beurteilt: Zellkern, Zytoplasma, Zytoskelett

- **ELISA**

Beim ELISA Testverfahren muss man zwischen dem Alten, von 1994 bis 2002, und dem Neuen, ab 2003, unterscheiden. Der alte ELISA wurde händisch durchgeführt und hatte eine geringere Spezifität.

a) ELISA neu

Material: Serum und ImmunoCAP 100

Testablauf: Der ImmunoCAP 100 arbeitet vollautomatisch und druckt am Ende des Laufes die Ergebnisse aus.

Statistische Analyse: Für die statistische Analyse wurde mit dem proportionalen Odds Modell und der Methode des GEE (generalized estimating equations) gearbeitet. Die Signifikanzgrenze wurde mit einem P-Wert von $< 0,05$ festgelegt. Der Faktor "Diagnose" wurde in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt, sehr wohl aber der Faktor "Therapieart". Nachdem einige Studien gezeigt hatten, dass das Alter zu einem Anstieg von ANA-Titer führen kann, wurde vor allem der Faktor "Alter" berücksichtigt.

4. Ergebnisse

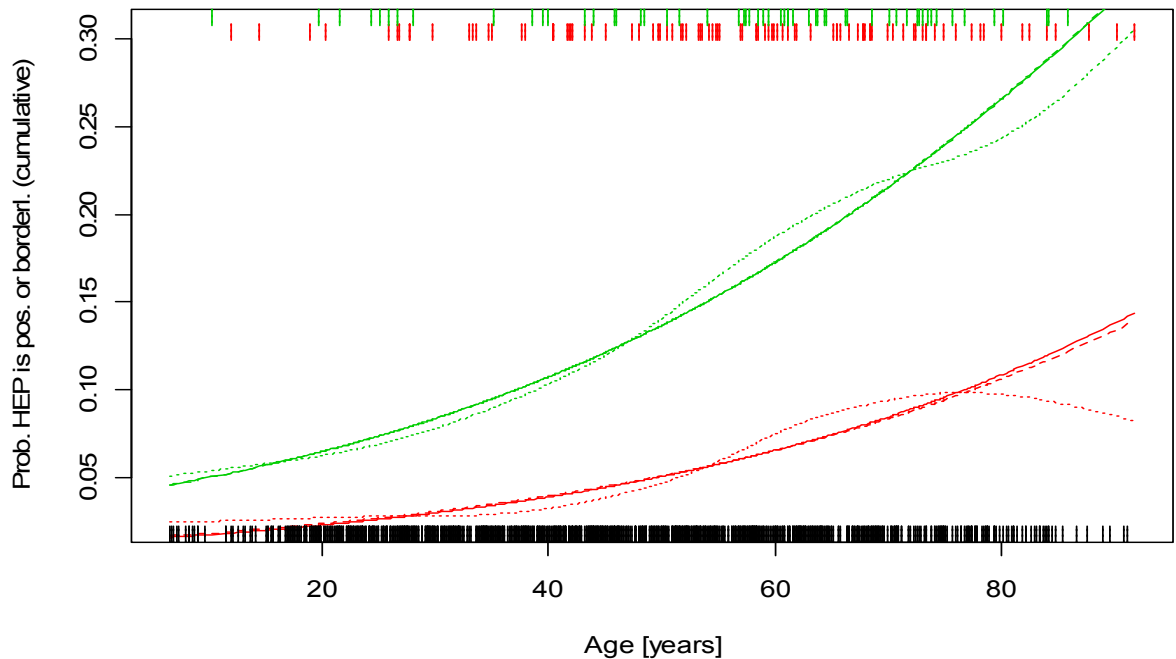
Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob UV-Bestrahlung initial zur Entstehung von ANA beiträgt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden vorhandene Daten von Patienten, welche eine UV-Phototherapie zur Behandlung einer Hautkrankheit (einschließlich Psoriasis, Ekzeme, Vitiligo, Mastozytosen, polymorphe Lichtdermatose und kutane Z-Zell-Lymphome) erhalten hatten und von denen ANA vor und nach Therapie bestimmt worden waren, analysiert. Folgende Prävalenzen wurden bestimmt: ANA-Positivität bei Patienten vor erster Phototherapie, ANA-Positivität nach letzter Phototherapie sowie Abhängigkeit der ANA-Positivität vom Patientenalter. Die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben und statistisch-analytisch dargestellt.

4.1. ANA und HEP-Verfahren

4.1.1. ANA im HEP-Verfahren in Bezug auf das Patientenalter

Die statistische Auswertung im Kapitel 4.1 beinhaltet die Ergebnisse der ANA-Testung mittels dem HEP-Verfahren. Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit der Höhe der ANA-Titer vom zunehmenden Patientenalter.

Abbildung 2: HEP und Patientenalter



Legende: Wahrscheinlichkeit für ein positives HEP (rot) oder ein positives oder grenzwertiges HEP (grün) in 3 Modellen: verallgemeinertes additives logit Modell (fein strichliert), multinomiales (kumulatives) logit Modell (grob strichliert) und proportional Odds Modell (durchgezogen).

4.1.1.1. ANA-HEP-Häufigkeit vor und nach Phototherapie

Tabelle 4: Absolute Anzahl der negativen, grenzwertigen und positiven ANA-HEP-Titer vor und nach Phototherapie

Ausgangsbefund		Befund nach Phototherapie		
		negativ	grenzwertig	positiv
negativ	225	201	20	4
grenzwertig	28	12	10	6
positiv	21	3	6	12
Summe	274	216	36	22

Tabelle 5: Absolute Anzahl der negativen, grenzwertigen und positiven ANA-HEP-Titer vor und nach Phototherapie

Ausgangsbefund		Befund nach Phototherapie		
		negativ	grenzwertig	positiv
negativ	82,1	73,4	7,3	1,5
grenzwertig	10,2	4,4	3,6	2,2
positiv	7,7	1,1	2,2	4,4
Summe	100	78,9	13,1	8,1

Tabelle 4 zeigt die absolute Häufigkeit und Tabelle 5 die relative Häufigkeit der ANA-HEP-Titer vor und nach Phototherapie. Insgesamt hatten vor der ersten Phototherapie 225 Patienten negative Titer, 28 Patienten grenzwertige Titer und 21 Patienten positive Titer. Zwischen der ersten und der letzten Therapie hat sich der HEP Wert bei 51 von 274 (18.6%) Patienten geändert. Allerdings änderten sich die Werte beinahe ebenso oft in Richtung positiv wie in Richtung negativ. (Der gepaarte Wilcoxon-Test ergibt $p=0.25$)

4.2. ANA und ELISA

4.2.1. ANA im ELISA-Verfahren in Bezug auf das Patientenalter

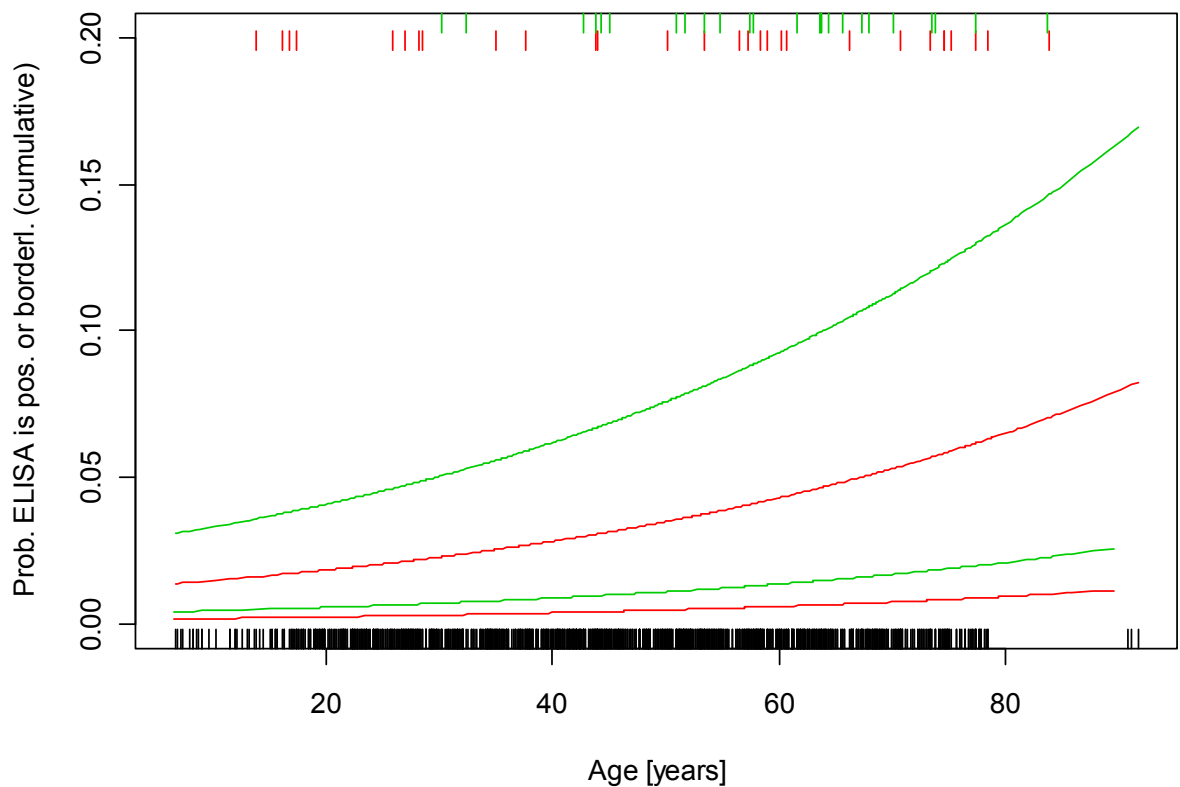
Bei der ELISA-Bestimmung der ANA kam bis zum Jahre 2002 Verfahren B und ab 2003 Verfahren A zur Anwendung. Verfahren A ist die modernere Methode, welche vollautomatisch durchgeführt wird und erfahrungsgemäß eine höhere Spezifität aufweist. Dies lassen auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie vermuten, da es beim Verfahren A deutlich weniger grenzwertige und positive Ergebnisse gab als beim Verfahren B. Die Auswertung erfolgte daher wie folgt:

AA: Analyse der Daten der Patienten, bei welchen Verfahren A vor der ersten Phototherapie und nach der letzten Phototherapie zur Anwendung kam.

AB: Analyse der Daten der Patienten, bei welchen Verfahren A vor der ersten Phototherapie und Verfahren B nach der letzten Phototherapie zur Anwendung kam.

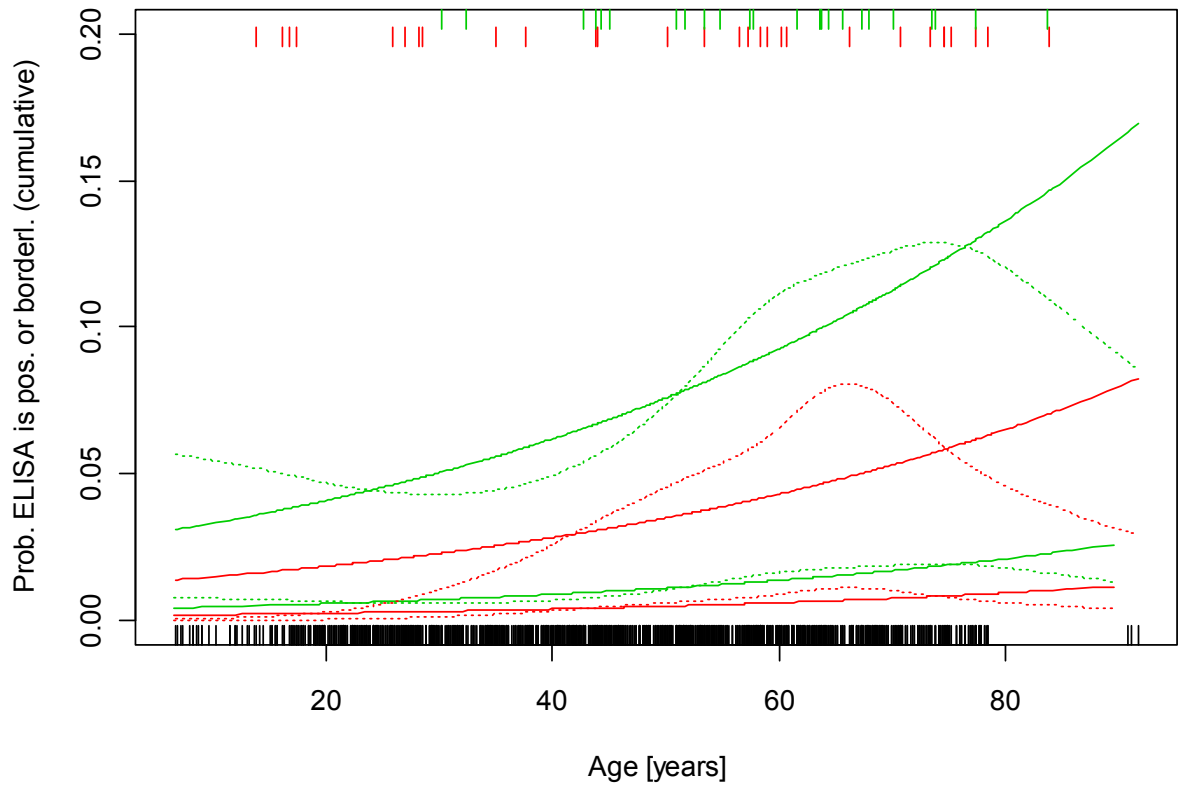
BB: Analyse der Daten der Patienten, bei welchen Verfahren B vor der ersten Phototherapie und nach der letzten Phototherapie zur Anwendung kam.

Abbildung 3: ELISA und Alter



Legende: Wahrscheinlichkeit für ein positives ELISA (rot) oder ein positives oder grenzwertiges HEP (grün) im proportional Odds-Modell mit den Faktoren Alter und Verfahren. Untere Linie jeweils Verfahren A, ab 1.1.2003.

Abbildung 4: ELISA und Alter



Legende: Wie bei Abbildung 3. Fein strichlierte Linien geben altersabhängige Wahrscheinlichkeiten des verallgemeinerten linearen Modells wieder.

Tabelle 6: ANA-Werte in Bezug auf das ELISA-Verfahren

ELISA-Verfahren	Anzahl der Patienten
AA	52
BA	92
BB	115

Tabelle 7: Verlauf von ELISA bei Analyse AA in absoluten Zahlen

Ausgangsbefund		Befund nach Phototherapie		
		negativ	grenzwertig	positiv
negativ	49	49	0	0
grenzwertig	1	0	1	0
positiv	2	0	0	2
Summe	52	49	1	2

Tabelle 8: Verlauf von ELISA bei Analyse AA in Prozent

Ausgangsbefund		Befund nach Phototherapie		
		negativ	grenzwertig	positiv
negativ	94,2	94,2	0	0
grenzwertig	1,9	0	1,9	0
positiv	3,8	0	0	3,8
Summe	100	94,2	1,9	3,8

Tabelle 9: Verlauf von ELISA bei Analyse BA in Zahlen

Ausgangsbefund		Befund nach Phototherapie		
		negativ	grenzwertig	positiv
negativ	79	78	0	1
grenzwertig	6	6	0	0
positiv	7	5	0	2
Summe	92	89	0	3

Tabelle 10: Verlauf von ELISA bei Analyse BA in Prozent

Ausgangsbefund		Befund nach Phototherapie		
		negativ	grenzwertig	positiv
negativ	85,9	84,7	0	1,1
grenzwertig	6,5	6,5	0	0
positiv	7,6	5,4	0	2,2
Summe	100	96,8	0	3,3

Tabelle 11: Verlauf von ELISA bei Analyse BB in Zahlen

Ausgangsbefund		Befund nach Phototherapie		
		negativ	grenzwertig	positiv
negativ	97	93	2	2
grenzwertig	10	6	2	2
positiv	8	3	2	3
Summe	115	102	6	7

Tabelle 12: Verlauf von ELISA bei Analyse BB in Prozent

Ausgangsbefund		Befund nach Phototherapie		
		negativ	grenzwertig	positiv
negativ	84,3	80,9	1,7	1,7
grenzwertig	8,7	5,2	1,7	1,7
positiv	7	2,6	1,7	2,6
Summe	100	88,7	5,2	6,1

Im Verlauf zwischen dem Zeitpunkt der ersten und der letzten Phototherapie kam es bei den Patienten nicht sehr oft zu Veränderungen der ELISA-ANA-Werte. So gab es z.B. in der AA-Analyse keine einzige Veränderung. Es ist daher nicht unerwartet, dass in der Analyse BA einige Patienten nach der letzten Phototherapie negative Werte aufwiesen, obwohl sie vorher nicht-negative Werte aufwiesen, da Verfahren A viel seltener grenzwertige bzw. positive Werte liefert. In der BB-Analyse überwiegen die Wechsler zu einem niedrigeren Titer gegenüber den Wechslern in die umgekehrte Richtung (Der gepaarte Wilcoxon-Test für BB ergibt $p=0.32$). Insgesamt sind es 17 von 115 (14.8%) Patienten, bei denen das Ergebnis in die eine oder andere Richtung wechselte.

4.3. HEP und ELISA

Tabelle 13: Odds-Ratio für den Verlauf der ANA im HEP- und ELISA-Verfahren

	P-Wert	Odds-Ratio	Konfidenzintervall
HEP (Alterseffekt)	0,0011	1,29	1,11-1,50
HEP (Zeiteffekt)	0,32	1,15	0,87-1,52
ELISA (Alterseffekt)	0,16	1,20	0,93-1,54
ELISA (Zeiteffekt)	0,14	0,67	0,39-1,14

Der Alterseffekt gibt die relative Zunahme der ANA-Positivität bezogen auf einen Zeitraum von 10 Jahren an. Die statistische Analyse der HEP-Daten ergab, dass der Alterseffekt, der 1,29 betrug, d.h. 29% ANA-Konversion, hoch signifikant war. Bei der statistischen Analyse der ELISA-Daten konnte ein signifikanter Alterseffekt nicht nachgewiesen werden. Der Zeiteffekt, d.h. der alterskorrigierte Unterschied zwischen dem ANA-Ergebnis vor der ersten Phototherapie im Vergleich zu dem nach der letzten Phototherapie, war sowohl bei der HEP-Analyse als auch bei der ELISA-Analyse nicht signifikant. Diese Ergebnisse zeigen in aller Deutlichkeit, dass das Alter die Entstehung von ANA begünstigt. Ein Effekt der Phototherapie auf die Entstehung von ANA konnten wir bei unserem Patientenkollektiv jedoch nicht nachweisen.

5. Diskussion

Phototherapie und insbesondere PUVA verursachen Veränderungen der DNA und/oder des Immunsystems und können so zur Entstehung von systemischen Erkrankungen wie Lupus erythematoses zumindest beitragen. Dies ist durch einzelne Fallberichte belegt.^{117,118} Eine tierexperimentelle Studie zeigte, dass Mäuse nach Bestrahlung mit UVA von Schwarzlichtfluoreszenzröhren erhöhte ANA-Titer entwickeln können.¹¹⁹

Eine klinische Studie¹²⁰ aus dem Jahre 1987 konnte bei 497 getesteten Patienten keinen Zusammenhang zwischen einer PUVA-Therapie und dem Auftreten von ANA finden. Von diesen 497 Psoriasispatienten waren 269 länger als 3 Monate mit PUVA therapiert worden. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den ANA-Titern vor und nach PUVA-Therapie festgestellt werden. Es zeigte sich, dass bei jenen Patienten, welche einen positiven ANA-Titer entwickelt hatten, auch keine Symptome eines systemischen Lupus erythematoses auftraten.¹²¹ Eine 1994 in Italien durchgeführte Studie zeigte, dass die PUVA-Therapie keinen Risikofaktor für das Auftreten von ANA darstellt.¹²² In Anbetracht der Besorgnis über den möglichen Zusammenhang von PUVA und der Entwicklung von ANA führten Stern et al. eine prospektive Studie über 5 Jahre durch. Auch hier zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den ANA-Werten vor und nach PUVA Therapie bestand. Weiters berichteten Stern et al, dass kein Zusammenhang zwischen der Frequenz der PUVA-Behandlungen und einem positiven ANA-Titer bestand.¹²³

Da die zuvor erwähnten klinischen Studien relativ kurze Beobachtungszeiträume aufwiesen, führten wir nun eine retrospektive Analyse über den möglichen Einfluss einer Phototherapie auf die Entstehung von ANA für einen Zeitraum von mehr als 14 Jahren durch, nämlich von 1994 bis 2007. Dazu erfassten wir die Daten von insgesamt 1094 Patienten, welche eine UV-Phototherapie zur Behandlung einer Hautkrankheit (einschließlich Psoriasis, Ekzeme, Vitiligo, Mastozytose, polymorphe Lichtdermatose und kutane T-Zell-Lymphome) erhalten hatten und von denen ANA mittels Immunfluoreszenz und/oder ELISA im Serum bestimmt worden waren. Von diesen 1094 Patienten hatten 259 eine ANA-Bestimmung zu zwei Zeitpunkten und die restlichen 835 zu einem; diese Patienten wurden als Vergleichsgruppe mit in die Studie aufgenommen, um einen möglichen Alterseffekt zu ermitteln und dafür zu

kontrollieren. Die statistische Analyse ergab einen Einfluss des Patientenalters auf den ANA-Titer. Die Odds-Ratio des Alterseffektes, welche die relative Zunahme der ANA-Positivität (gemessen mittels Immunfluoreszenz) bezogen auf einen Zeitraum von 10 Jahren beschreibt, betrug 1,29 (Konfidenzintervall: 1,11-1,50) ($p=0,0011$). Der Zeiteffekt, d.h. der alterskorrigierte Unterschied zwischen dem ANA-Ergebnis vor der ersten Phototherapie im Vergleich zu dem nach der letzten Phototherapie, war sowohl beim Immunfluoreszenztest als auch bei der ELISA-Analyse nicht signifikant. Diese Ergebnisse zeigen in aller Deutlichkeit, dass das Alter die Entstehung von ANA begünstigt, übereinstimmend mit den Daten einer Studie über PUVA und ANA aus dem Jahre 1981, welche zeigte, dass jene Patienten mit positiven ANA-Tests signifikant älter waren als jene mit negativen ANA-Tests.¹²⁴ Einen Effekt der Phototherapie (d.h. Zeiteffekt) auf die Entstehung von ANA konnten wir in unserer Studie jedoch auch langfristig nicht nachweisen. Unsere Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit denen der zuvor besprochenen Studien und bestätigen erstmals, dass die Phototherapie auch langfristig betrachtet nicht zum Auftreten von ANA führt.

6. Literaturverzeichnis

¹Yashwant K; Alka B; Ranjana Walker M(2009): Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diag Pathol* 2009; 1.

² Fritsch P. *Dermatologie Venerologie. Grundlagen, Klinik, Atlas.* 2nd ed., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2004.

³ Johnson KD.: Antinuclear antibodies. *J Med* 2008; 8:4391-4455.

⁴ Tan EM, Kunke HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1966; 96: 464.

⁵ Hoffman I, Penne I, Meheus L, Huizinga T, Cebecauer L, Isenberger D et al. Specific antinuclear antibodies are associated with clinical features in systemic lupus erythematosus, *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1155–1158.

⁶ Rondeel JM. Immunofluorescence versus elisa for the detection of antinuclear antigens. *Exp Rev Mol Diagn* 2002; 2:226-232.

⁷ Friou CJ: Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 1957; 36:890-897.

⁸⁸ Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Auto antibodies to Nuclear Antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:71-81.

⁹ Lightfoote MM, Chirmule N, Homburger HA, Kavanaugh A, Nakamura RM, Papisch W, Tetin SY. Quality Assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods; Approved Guideline-Second Edition. *CLSI* 2006; Volume 26: Number 13.

¹⁰ Bigazzi P, Rose N. *Methods in immundiagnosis*, Center of immunology State University of New York at Buffalo, John Wiley and Sons. 107-108.

¹¹ Feltkamp TE. Antinuclear antibody determination in a routine laboratory. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:723-727.

¹² Greidinger E, Hoffman R. Antinuclear Antibody Testing: Methods, Indications, and Interpretation, *CE Update Course in Laboratory Medicine* 2003; 34:113-118.

-
- ¹³ Cook L. New methods for detection of anti-nuclear antibodies. *Clin Immunopathol* 1998; 88: 211-220.
- ¹⁴ Saitta MR, Keene JD. Molecular biology of nuclear antigens. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18:283-310.
- ¹⁵ Evans J. Antinuclear antibody testing in systemic autoimmune disease. *Clin Chest Med* 1998; 19:613-625.
- ¹⁶ Ghosh P, Dwivedi S, Naik S, Agarwal V, Verma A, Aggarwal A, Misra R. Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence: Optimum screening dilution for diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Indian J Med Res* 2007; 126:34-38.
- ¹⁷ Kiuttu J, Hartikainen A, Makitalo R. Occurrence of antinuclear antibodies in an unselected pregnancy population. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 37:160-163.
- ¹⁸ Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. & Kuby, J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: *Immunology*, 5th ed., pp. 148-150. W. H. Freeman, New York, 2003
- ¹⁹ Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Mouritsen CL, Litwin CM, Hill HR. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 468-473.
- ²⁰ Charles PJ, van Venrooij WJ, Maini RN, and the Consensus Finding Group for Autoantibodies. The consensus workshops for the detection of auto antibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases: 1989–1992. *Clin Exp Rheum* 1992; 10: 507-511.
- ²¹ Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A Bassetti D, Villalta D, Pradella M, Rizzotti P. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA auto antibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J Immunol Methods* 1998; 219: 99-107.
- ²² Aarden LA, de-Groot ER, Feltkamp TEW. Immunology of DNA III: *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-ds-DNA with the immunofluorescent technique. *Proc N Y Acad Sci* 1975; 254: 505.
- ²³ Slater NGP, Cameron JS, Lessof MH. The *Crithidia luciliae* kinetoplast immunofluorescence test in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1976; 25: 480-486.
- ²⁴ Herbert KE, Jeffery E, Scott DL. Effect of fibronectin on the *Crithidia luciliae* test for anti-double-stranded DNA antibodies. *Ann Rheum Dis* 1990; 49:705–707.

-
- ²⁵ R Smeenk, G van der Lelij, and L Aarden. Avidity of antibodies to dsDNA: comparison of IFT on *Crithidia luciliae*, Farr assay, and PEG assay. *J Immunol* 1982; 128: 73 -78.
- ²⁶ Aarden, L., R. Smeenk. Measurements of antibodies specific for DNA. *Immunol Meth* Vol. 11. 1. Lefkovits and B. Pernis. eds. Academic Press, New York. p. 75.
- ²⁷ Susan M. Orton, Amy Peace-Brewer, John L. Schmitz, Kristie Freeman, William C. Miller, and James D. Folds. Practical Evaluation of Methods for Detection and Specificity of Autoantibodies to Extractable Nuclear Antigens, *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:297–301.
- ²⁸ Feltkamp TE. Antinuclear antibody determination in a routine laboratory. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 723-727.
- ²⁹ Siracusano A, Agelli M, Ioppolo S: Detection of antiextractable nuclear antigens in connective tissue diseases: comparison between passive haemagglutination, counterimmunoelectrophoresis and double immunodiffusion. *Ric Clin Lab* 1985; 15:33-38.
- ³⁰ Towbin, H. et al. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Bd. 76, S. 4350–4354.
- ³¹ Zampieri S, Ghirardello A, Doria A, Tonello M, Bendo R, Rossini K, Gamberi PF. The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J Immunol Meth* 2000; 239:1–11.
- ³² Boire G, Lopez-Longo FJ, Lapointe S: Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-kd Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum* 1991; 34:722-730.
- ³³ Lim HW, Hönigsmann H, Hawk J. *Photodermatology*. Informa Healthcar New York/ London 2007.
- ³⁴ Barth J, Köhler U. *Photodermatologie in Dresden-ein historischer Abriss*. Festschrift anlässlich des 75. Geburtstags von Prof. Dr. h.c. H.-E. Kleine Natrop (1917-1985) Dresden 1992.
- ³⁵ Saidman J. *Les rayons ultra-violets en thérapeutique*. Paris: Gaston Doin & Cie, 1982.
- ³⁶ Roelandts R. A new light on Niels Finsen, a century after his nobel prize. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005; 21:115-117.

-
- ³⁷ Küch R, Retschinsky T. Photometrische und spektralphotometrische Messungen am Quecksilverbogen bei hohem Dampfdruck. *Ann Physik* 1906; 20:563:583.
- ³⁸ Kromayer E. Quecksilber-Wasserpumpen zur Behandlung von Haut und Schleimhaut. *Dtsch med Wochenschr* 1906; 32:377-380.
- ³⁹ Rollier A. *Heliotherapy*. Oxford: Oxford Medical Publications, 1923.
- ⁴⁰ Parrish JA. The treatment of psoriasis with longwave ultraviolet light (UV-A). *Arch Dermatol* 1977; 113:1525.
- ⁴¹ Ingram JT. The approach to psoriasis. *Br Med J* 1953; 2:591-594.
- ⁴² Uhlmann E. Pigmentbildung bei Vitiligo. *Med Klein* 1927; 23:279-280.
- ⁴³ Poon TSC, Barnetson RSC, Halliday GM. Sunlight-induced Immunosuppression in humans is initially because of UVB, then UVA, followed by interactive effects. *J Invest Dermatol* 2003; 121:1080-1087.
- ⁴⁴ Kripke ML. Immunologic unresponsiveness induced by UV radiation. *Immunol Rev* 1984; 80:87-102.
- ⁴⁵ Reeve VE, Bosnic M, Boehm-Wilcox C, Nishimura N, Ley RD. Ultraviolet A radiation (320-400 nm) protects hairless mice from immunosuppression induced by ultraviolet B radiation (280-320 nm) or cis-urocanic acid. *Int Arch Allergy Immun* 1998; 115:316-322.
- ⁴⁶ Reeve VE, Tyrrell RM. Heme oxygenase induction mediates the photoimmunoprotective activity of UVA radiation in the mouse. *P Natl Acad Sci USA* 1999; 96:9317-9321.
- ⁴⁷ Byrne SN, Spinks N, Halliday GM. The induction of immunity to a protein antigen using an adjuvant is significantly compromised by ultraviolet A radiation. *J Photoch Photobio B* 2006; 84:128:134.
- ⁴⁸ LeVee GJ, Oberhelman L, Anderson T, Koren H, Cooper KD. UVA II exposure of human skin results in decreased immunization capacity, increased induction of tolerance and a unique pattern of epidermal antigen-presenting cell alteration. *Photochem Photobiol* 1997; 65:622-629.
- ⁴⁹ Damian DL, Barnetson RS, Halliday GM. Low dose UVA and UVB have different time courses for suppression of contact hypersensitivity to a recall antigen in humans. *J Invest Dermatol* 1999; 112:939-944.
- ⁵⁰ Norval M. Effects of solar radiation on the human immune system. *J Photochem Photobio B* 2001; 63:28-40.

-
- ⁵¹ Chapman RS, Cooper KD, Defabo EC, et al. Solar ultraviolet radiation and the risk of infectious disease: Summary of a workshop. *Photochem Photobiol* 1995; 61:223-247.
- ⁵² Perna JJ, Mannix ML, Rooney JF, Notkins AL, Straus SE. Reactivation of latent herpes simplex virus infection by ultraviolet light: a human model. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17:473-478.
- ⁵³ Rooney JF, Bryson Y, Mannix ML, et al. Prevention of ultraviolet-light-induced Herpes Labialis by sunscreen. *Lancet* 1991; 338:1419-1422.
- ⁵⁴ Roenigk H, Maibach H. *Psoriasis-Dermatology*, New York/ Basel, Marcel Dekker Inc., Vol 5, S. 373-381.
- ⁵⁵ Anderson R, Parrish J.A. Optical properties of human skin. *The Science of Photomedicine*. Regan J.D, Parrish J.A. Plenum Press, New York, pp 3-17.
- ⁵⁶ Pullman H, Galosi A, Jakobeit C, Steigleder G.K. Effects of selective ultraviolet phototherapy (SUP) and local PUVA treatment on DNA synthesis in guinea pig skin. *Arch Dermatol Res* 1980; 267:37.
- ⁵⁷ Epstein J.H, Fukuyama K, Epstein W.L. UVL-induced stimulation of DNA synthesis in hairless mouse epidermis. *J Invest Dermatol* 1968; 51:445.
- ⁵⁸ Kramer D.M, Pathak M.A, Kornhauser A, Wisekmann A. Effect of ultraviolet irradiation on biosynthesis of DNA in guinea pig skin. *J Invest Dermatol* 1974; 62:388.
- ⁵⁹ Epstein W, Fukuyama K, Epstein J.H. Early effects of ultraviolet light on DNA synthesis in human skin in vivo. *Arch Dermatol* 1969; 100:84.
- ⁶⁰ Parrish JA, Jaenicke KF. Action spectrum for phototherapy of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1981; 76:359.
- ⁶¹ Anders A, Altheide AJ, Knälmann M, Tronnier H. Action spectrum for erythema in humans investigated with dye lasers. *Photochem Photobiol* 1995; 61:200-205.
- ⁶² Diffey BL. Observed and predicted minimal erythema doses: a comparative study. *Photochem Photobiol* 1994; 60: 380-381.
- ⁶³ Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem Photobiol* 1982; 36:187-191.
- ⁶⁴ Young AR, Chadwick CA, Harrison GI, Nikaido O, Ramsden J, Potten CS. The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *J Invest Dermatol* 1998; 111:982-988.

-
- ⁶⁵ McLoon P, Simics E, Barton A, Norval M, Gibbs NK. An action spectrum for the production of cis-urocanic acid in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2005; 124:1071-1074.
- ⁶⁶ Commission Internationale de l'Eclairage, Vienna. CIE 132/2; TC6-32 report: action spectrum for photocarcinogenesis (non melanoma skin cancers) 2000.
- ⁶⁷ Parrish JA, Anderson RR, Urbach F, Pitts D. UVA: Biologic effects of ultraviolet radiation with emphasis on human response to longwave ultraviolet. Plenum press, New York, p.262.
- ⁶⁸ Van Weelden H, Young E, van der Leun JC. Therapy of psoriasis: comparison of photochemotherapy and several variations of phototherapy. *Br J Dermatol* 1980; 103:1.
- ⁶⁹ Goeckerman W.H. Treatment of psoriasis: continued observations on the use of crude coal tar and ultraviolet light. *Arch Dermatol Syphilol* 1931; 24:440.
- ⁷⁰ Muller S.A, Kierland R.R. Crude coal tar in dermatology therapy. *Mayo Clin Proc* 1964; 39:275.
- ⁷¹ Perry H.O, Soderstrom C.W, Schulze R.W. The Goeckerman treatment of psoriasis. *Arch Dermatol* 1968; 98:178.
- ⁷² Goeckerman W.H. The treatment of psoriasis. *Northwest Med* 1925; 24:229.
- ⁷³ Obermeyer ME, Becker SW. A study of crude coal tar and allied substances. *Arch Dermatol Syphilol* 1935; 31:796.
- ⁷⁴ Rasmussen JE. The crudeness of coal tar. *Progr Dermatol* 1978; 12:23.
- ⁷⁵ Everett MA, Miller JV. Coal tar and ultraviolet light: cumulative effects. *Arch Dermatol* 1961; 84:937.
- ⁷⁶ Tanenbaum L, Parrish JA, Pathak MA, et al. Tar phototoxicity and phototherapy for psoriasis. *Arch Dermatol* 1975; 111:467.
- ⁷⁷ Foerster HR, Schwartz L. Industrial dermatitis and melanosis due to photosensitization. *Arch Dermatol* 1939; 39:55.
- ⁷⁸ Kochevar IE, Armstrong RB, Einbinder J, Walther RR, Harber LC. Coal tar phototoxicity: active compounds and action spectra. *Photochem Photobiol* 1982; 36:65.
- ⁷⁹ Bowers RE, Dalton D, Fursdon D, Knoweldon J. The treatment of psoriasis with UV-STRAHLUNG, dithranol paste and tar baths. *Br J Dermatol* 1966; 78:273.
- ⁸⁰ Marisco AR, Eaglestein WH. Role of longwave ultraviolet light in the Goeckerman treatment. *Arch Dermatol* 1973; 108:48.

-
- ⁸¹ Parrish, JA, Morison WL, Ganzales E, Krop TM, White HAD, Rosario R. Therapy of psoriasis by tar photosensitization. *J Invest Dermatol* 1978; 70:111.
- ⁸² Lowe NJ, Worzmann MS, Breeding JH, Koulsi H, Taylor L. Coal tar phototherapy for psoriasis re-evaluated: erythema versus suberythemogenic ultraviolet with a tar extract in oil and crude coal tar. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8:781.
- ⁸³ Crow KD, Alexander E, Buck WHL, Johnson BE, Magnua IA, Porter AD. Photosensitivity due to pitch. *Br J Dermatol* 1961; 73:220.
- ⁸⁴ Diette KM, Momtaz K, Stern RS, Arndt KA, Parrish JA. The role of UVA in phototherapy. *J Am Acad Dermatol* 1984; In press.
- ⁸⁵ LeVine MJ, Parrish JA. The effect of topical fluocinonide ointment on phototherapy of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1982; 78:175.
- ⁸⁶ DuVivier A, Stoughton RB. Tachyphylaxis to the action of topically applied corticosteroids. *Arch Dermatol* 1975; 111:581.
- ⁸⁷ DuVivier A. Tachyphylaxis to topically applied steroids. *Arch Dermatol* 1976; 112:1245.
- ⁸⁸ Momtaz TK, Tanghetti E, Parrish JA. Effect of warm water soaks on phototherapy of psoriasis. *Clin Res* 1983; 31:589.
- ⁸⁹ Mutzhas MF, Hölzle E, Hofmann C, et al. A new apparatus with high radiation energy between 320-460 nm: physical description and dermatological applications. *J Invest Dermatol* 1981; 76:42-47.
- ⁹⁰ Lebwohl M, Ting P, Koo J. Psoriasis treatment: traditional therapy. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:83-86.
- ⁹¹ Hönigsmann H. Phototherapy for psoriasis. *Clinical & Experimental Dermatology* 2001; 4:343-350.
- ⁹² Parrish JA, Fitzpatrick TB, Tanenbaum L, Pathak MA. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N Engl J Med* 1974; 291:1207-11.
- ⁹³ Honig B, Morison WL, Karp D. Photochemotherapy beyond psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31:775-90.
- ⁹⁴ Cech T, Pathak MA, Biswas RK. An electron microscopic study of the photochemical cross-linking of DNA in guinea pig epidermis by psoralen derivatives. *Biochem Biophys Acta* 1979; 562:342.

-
- ⁹⁵ Lerche A, Sondergaard J, Wadskov S, Leick V, Bohr V. DNA interstrand crosslinks visualized by electron microscopy in PUVA-treated psoriasis. *Acta Derm Venereol* 1979; 59:15.
- ⁹⁶ Heald P, Yan SL, Latkowski J, Edelson R. Profound deficiency in normal circulating T-cells in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 1994; 130:198-203.
- ⁹⁷ Morison WL, Parrish JA, Bloch KJ et al. Transient impairment of peripheral blood lymphocyte function during PUVA therapy. *Br J Dermatol* 1979; 101:391-397.
- ⁹⁸ Cripps DJ, Lowe NJ, Lerner AB. Action spectra of topical psoralens: a re-evaluation. *Br J Dermatol* 1982; 107:77-82.
- ⁹⁹ Ibbotson SH, Farr PM. The time-course of psoralen ultraviolet A (PUVA) erythema. *J Invest Dermatol* 1999; 113:346-349.
- ¹⁰⁰ Zaynoun S, Konrad K, Gschnait F, Wolff K. The pigmentary response to photochemotherapy. *Acta Dermatovener* 1977; 57:431.
- ¹⁰¹ Toda K, Pathak MA, Parrish JA, Fitzpatrick TB, Quevedo WC Jr. Alteration of racial differences in melanosome distribution in human epidermis after exposure to ultraviolet light. *Nature New Biol* 1972; 236:143.
- ¹⁰² Hönigsmann H, Jaschke E, Gschnait F, Brenner W, Fritsch P, Wolff K. 5-Methoxypsoralen (Bergapten) in photochemotherapy of psoriasis. *Br J Dermatol* 1979; 101:369.
- ¹⁰³ Hönigsmann H, Wolff K. Results of therapy for psoriasis using retinoid and photochemotherapy (RePUVA). *Pharmacol Ther* 1989; 40:67-73.
- ¹⁰⁴ Fritsch PO et al. Augmentation of oral methoxsalen-photochemotherapy with an oral retinoic acid derivative. *J Invest Dermatol* 1978; 70:178.
- ¹⁰⁵ Melanos D, Stern RS. Psoralen plus ultraviolet A does not increase the risk of cataracts: a 25-year prospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2007; 57:231-7.
- ¹⁰⁶ Stern RS, Thibodeau LA, Kleinerman RA, Parrish JA, Fitzpatrick TB. Risk of cutaneous carcinoma in patients treated with oral methoxsalen photochemotherapy for psoriasis. *N Engl J Med* 1979; 300:809-813.
- ¹⁰⁷ Roelandts R. Mutagenicity and Carcinogenicity of Methoxsalen Plus UV-A. *Arch Dermatol* 1984;120:662-669.

-
- ¹⁰⁸ Katz KA, Marcil I, Stern RS. Incidence and risk factors associated with a second squamous cell carcinoma or basal cell carcinoma in psoralen+ ultraviolet A light-treated psoriasis patients. *J Invest Dermatol* 2002; 118:1038-1043.
- ¹⁰⁹ Stern RS, Nochls KT, Väkevä LH. Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). *N Engl J Med* 1997; 336:1041-1045.
- ¹¹⁰ Morison WL, Parrish JA, Bloch KJ, Wimberly J. Abnormal lymphocyte function following long-term PUVA therapy for psoriasis. *Br J Dermatol* 1983; 108:445-450.
- ¹¹¹ Briffa DV, Parker D, Tosca N, Turk JL and Greaves MW. The effect of photochemotherapy (PUVA) on cell mediated immunity in the guinea pig. *J Invest Dermatol* 1981; 77:377-380.
- ¹¹² Horio T, Okamoto H. The mechanisms of inhibitory effect of 8-methoxypsoralen and long-wave ultraviolet light on experimental contact sensitization. *J Invest Dermatol* 1982;78:402-405.
- ¹¹³ Melski JW, Tanenbaum L, Fitzpatrick TB et al. Oral methoxsalen photochemotherapy for the treatment of psoriasis: a cooperative clinical trial. *J Invest Dermatol* 1977; 68:328-335.
- ¹¹⁴ Halpern SM, Anstey AV, Dawe RS et al. Guidelines for topical PUVA: a report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol* 2000; 142:22-31.
- ¹¹⁵ Lowe NJ, Weingarten D, Bourget T, Moy LS. PUVA therapy for psoriasis: comparison of oral and bath-water delivery of 8-methoxypsoralen. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14:754-760.
- ¹¹⁶ Collins P, Rogers S. Bath-water compared with oral delivery of 8-methoxypsoralen PUVA therapy for chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 1992; 127:392-395.
- ¹¹⁷ Domke HF, Ludwiggen E, Thormann J. Discoid lupus erythematosus possibly due to photochemotherapy. *Arch Dermatol* 1979; 115:642.
- ¹¹⁸ Eyanson S, Greist MC, Brandt KD et al. Systemic lupus erythematosus: association with psoralen--ultraviolet-A treatment of psoriasis. *Arch Dermatol* 1979; 115:54-56.
- ¹¹⁹ Bruze M, Forsgren A, Ljunggren B. Antinuclear antibodies in mice induced by long wave ultraviolet radiation (UVA). *Acta Dermatol Venerol* 1985; 65:25-30.
- ¹²⁰ Picascia DD, Rothe M, Goldberg NS, Roenigk HH Jr. Antinuclear antibodies during psoralens plus ultraviolet A (PUVA) therapy: are they worthwhile? *J Am Acad Dermatol* 1987; 16:574-577.

¹²¹ Picascia DD, Rothe M, Goldberg NS, Roenigk HH Jr. Antinuclear antibodies during psoralens plus ultraviolet A (PUVA) therapy: are they worthwhile? *J Am Acad Dermatol* 1987; 16:574-577.

¹²² Calzavara-Pinton P, Franceschini F, Rastrelli M, Manera C, Zane C, Cattaneo R et al. Antinuclear antibodies are not induced by PUVA treatment in patients with uncomplicated psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30:955-958.

¹²³ Stern RS, Morison WL, Thibodeau LA, Kleinerman RA, Parrish JA, Geer DE, Fitzpatrick TB. Antinuclear antibodies and oral methoxsalen photochemotherapy (PUVA) for psoriasis. *Arch Dermatol* 1979; 115:1320-1324.

¹²⁴ Kubba R, Steck WD, Clough JD. Antinuclear antibodies and PUVA photochemotherapy. *Arch Dermatol* 1981; 117:474-477.