

Diplomarbeit

**Monitoring verschiedener therapeutischer Möglichkeiten
von aktinischen Keratosen mittels konfokaler
Laserscanning-Mikroskopie**

eingereicht von

Petra Schreiner

Geb.Dat.: 10.05.1990

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 Graz

unter der Anleitung von

**Ao.Univ.-Prof. Dr.med.univ. Rainer Hofmann-Wellenhof
Dr.med.univ. Edith Johanna Arzberger**

Graz, 14.4.2014

Petra Schreiner

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 14.04.2014

Petra Schreiner

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt meinen Betreuern Univ-Prof.Dr. Hofmann-Wellenhof und Dr. Edith Arzberger, die es mir ermöglicht haben, ein Teil dieses internationalen Projektes zu sein. Ich möchte mich insbesondere dafür bedanken, dass mir die Gelegenheit geboten wurde, dieses spannende Thema praxisnah und mit einem eigenständigen Beitrag zu erarbeiten.

Danke für die wertvolle fachliche und persönliche Unterstützung, aber auch für die zahlreichen Ratschläge rund um die Erstellung dieser Arbeit.

Weiters gilt mein Dank Frau Clara Curiel,MD und den Statistikern Herrn Chengcheng Hu,Ph.D und Frau Kathylynn Saboda, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Thank you for your valuable support, advice and expertise!

Mein Dank gilt auch ganz besonders meinen Eltern Johann und Waltraud Schreiner. Ohne ihre unerschöpfliche menschliche, moralische und finanzielle Unterstützung wäre mein Studium nicht möglich gewesen.

Danke, dass ihr immer hinter mir steht.

Zusammenfassung

Hintergrund: Bisher war die Therapiekontrolle aktinischer Keratosen (AK), die mit Kryotherapie und Photodynamischer Therapie (PDT) behandelt wurden, nur mittels klinischer und histologischer Untersuchung möglich. Mittels des konfokalen Lasermikroskopes ist es nun möglich, nicht-invasiv und in regelmäßigen zeitlichen Abständen, den Therapieverlauf zu beurteilen. **Zielsetzung:** Das übergeordnete Ziel des Projektes war es, Kriterien zu entwickeln, die es ermöglichen, mittels RCM (reflectance confocal microscopy) die Therapie von AKs zu überwachen. In der Diplomarbeit wurden die Therapieformen Kryotherapie und PDT anhand eines Experten-/Studentin Vergleiches getestet und statistisch ausgewertet. Dabei wurde die prozentuelle Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen der Expertengruppe sowie der Therapieerfolg über den Beobachtungszeitraum evaluiert. In einer weiteren Gruppe wurde mittels Biopsie die klinische Diagnose AK überprüft. **Methoden:** Im Rahmen einer prospektiven Studie wurden 3 Therapiegruppen (Kryotherapie, PDT und Biopsie) zu je 10 Studienteilnehmern/ Studienteilnehmerinnen an der Universitätsklinik für Dermatologie Graz rekrutiert. Beim Patientenkollektiv handelte es sich um Männer und Frauen mit chronischer Lichthaut, welche mindestens 2 AKs aufwiesen. Es erfolgten RCM Aufnahmen bei Erstbesuch und nach Therapie sowie ein Follow-up nach 1 Woche, 3 und 6 Monaten. **Ergebnisse:** In der statistischen Auswertung konnte eine deutliche Remission der RCM Kriterien für AKs über den Beobachtungszeitraum von 6 Monaten gezeigt werden. Insbesondere in der PDT Gruppe zeigte sich ein statistisch signifikanter Rückgang der Kriterien *ungeordnetes Epidermismuster*, *Hyperkeratose*, *Entzündungszellen in der Epidermis* und *Unterbrechung des Stratum corneum* (dichotome Kriterien) sowie der kategorischen Deskriptoren *atypisches Honigwabenmuster* und *Entzündungszellen in der Dermis*. Deutlich konnte auch ein häufigeres Auftreten aller pathologischen Kriterien in AKs im Vergleich zu sonnengeschädigter Haut beobachtet werden. In der erstbeurteilten Kryotherapiegruppe stellte sich ein deutlicher Bewertungsunterschied zwischen Studentin und der Expertengruppe in dar, welcher in der zweitbeurteilte PDT Gruppe mit zunehmender Übung verbessert und für einzelne Kriterien um bis zu +39 Prozentpunkte gesteigert werden konnte. **Schlussfolgerung:** RCM ist eine hilfreiche Methode zur Überwachung des Therapieerfolges aktinischer Keratosen, setzt jedoch Übung im Anwenden der Beurteilungskriterien voraus.

Abstract

Background: To date, the monitoring of actinic keratoses which underwent cryotherapy or photodynamic therapy primarily relied on naked eye clinical and histological assessment. However, both of these approaches have significant limitations such as low sensitivity and subjectivity. Histological evaluation is effective but requires a surgical intervention for repeated tissue sampling and may often not be feasible. Therefore, by means of confocal laser microscope, it is now possible to assess lesions at regular time intervals non-invasively.

Objective: The overall goal of the project was to develop RCM criteria to minor topical therapeutic approaches for actinic keratoses (AKs). In this theses, those defined criteria were evaluated in the images and statistically analyzed on the basis of an expert group/student comparison. These results were evaluated with the success of treatment over the observation period. In a group who underwent biopsy, the clinical diagnose AK was verified or a differential diagnose was made.

Methods: In a prospective study, 3 treatment groups (cryotherapy, PDT and Biopsy) were recruited with 10 study participants each, at the Department of Dermatology Graz. In the study groups, men and women with light-damaged skin who showed at least 2 AKs, were treated in the study. RCM images were provided after baseline (post-light) in a 1 week, 3 month and 6 month follow-up.

Results: The statistical analysis of the images showed significant remission of RCM criteria of AK over the observation period of 6 month. Specifically in the PDT group the criteria *disarranged epidermal pattern*, *hyperkeratosis*, *presence of inflammatory cells* and *stratum corneum disruption* (dichotomous criteria) as well as *atypical honeycomb* and *inflammatory infiltrate in dermis* (multi-scale descriptors) showed significant improvement over time. It could be shown, that there is a higher incidence of all defined pathological criteria in AK, compared to sun- damaged skin. Additionally a significant difference between novice reader and expert reader at the time of the first evaluation was proven. PDT demonstrated higher matching probability between novice and expert, as correlation could be improved with increasing exercise in average up to +39 percentage points.

Conclusions: Reflectance confocal microscopy is a useful tool for monitoring the success of treatment of actinic keratoses, but the assessment of the images requires practice in performance.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Glossar und Abkürzungen	vi
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Aktinische Keratosen und Plattenepithelkarzinom	1
1.2 Ausgesuchte Therapiemöglichkeiten aktinischer Keratosen	5
Kryotherapie	6
Photodynamische Therapie mit Aminolävulinsäure	7
Medikamentöse Immunmodulatoren	8
Shaving, Chirurgische Intervention	9
1.3 Therapiekontrolle aktinischer Keratosen in der RCM	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Reflectance Confocal Microscopy	11
2.2 Beschreibung der Studie, des Studiendesigns und der Studienteilnehmer	14
2.2.1 Kriterien zur Auswahl der Läsionen (AK1, AK2, PD)	16
2.2.2 Vermessung und Dokumentation (klinische Bilder, Dermatoskopie)	16
2.2.3 Ablauf und Zeitplan	17
2.2.4 Statistik	18
2.2.5 Biopsie und Histologie	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Auswertung der RCM Bilder	20
3.1.1 Hyperkeratose	21
3.1.2 Parakeratose	22
3.1.3 Diskontinuität des Stratum corneum	23
3.1.4 Atypisches Honigwabenmuster	24
3.1.5 Round nucleated cells	25
3.1.6 Ungeordnetes Epidermismuster	26
3.1.7 Entzündungsinfiltrat der Epidermis	27
3.1.8 Dendritische Zellen	28
3.1.9 Entzündungsinfiltrat der Dermis	29
3.1.10 Solare Elastose	30
3.1.11 Runde Kapillaren	31
3.1.12 Polymorphe Kapillaren	32
3.2 Histologische Ergebnisse der Läsionen	32
3.3 Statistische Ergebnisse und deren Vergleich mit denen der Experten- gruppe/Expertinnengruppe	34
3.3.1 Veränderung der Kriterien über die Kontrollzeitpunkte mit Ansprechen auf die Therapie	35
3.3.2 Vergleich AK und PD	39
3.3.3 Vergleich AK1 und AK2	40
3.3.4 Ergebnisvergleich von Kryotherapie und Photodynamischer Therapie ...	41
4 Diskussion	42
5 Literaturverzeichnis	48
Anhang Fragebogen	54

Glossar und Abkürzungen

RCM: Reflectance Confocal Microscopy

AK: Aktinische Keratosen

AK 1: Aktinische Keratose minimaler Dicke

AK 2: Aktinische Keratose moderater-starker Dicke

PD: Photodamaged skin, sonnengeschädigte Haut

SCC: Squamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinom

5 FU- Inhibitoren: 5- Fluoruracil Inhibitoren

MAL: Methyl-5-amino-4-oxopentanoat

ALA: 5- Aminolävulinsäure

µm: Mikrometer

IFN alpha: Interferon alpha

s.: statistisch signifikant

n.s. : statistisch nicht signifikant

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise und Bildkonstruktion in der RCM (65)	12
Abbildung 2 Bildbeispiel einer RCM Aufnahme (Viva Block)	13
Abbildung 3 Beispiel für die schichtweise Aufnahme	13
Abbildung 4 a) Dermatoskopische Makroaufnahme	16
Abbildung 5 b) Markierung mittels grünen Pfeilen der der Lokalisation der RCM Aufnahmen (Stacks)	16
Abbildung 6 Zeitintervalle der RCM Aufnahmen Photodynamische Therapie	18
Abbildung 7 Zeitintervalle der RCM Aufnahmen Kryotherapie	18
Abbildung 8 Hyperkeratose	21
Abbildung 9 Parakeratose	22
Abbildung 10 Diskontinuität des Stratum corneum	23
Abbildung 11 Atypisches Honigwabenmuster	24
Abbildung 12 Round nucleated cells	25
Abbildung 13 Ungeordnetes Epidermismuster	26
Abbildung 14 Entzündungszellen der Epidermis	27
Abbildung 15 Dendritische Zellen	28
Abbildung 16 Entzündungsinfiltrat der Dermis	29
Abbildung 17 Solare Elastose	30
Abbildung 18 Runde Kapillaren	31
Abbildung 19 Polymorphe Kapillaren	32
Abbildung 20 prozentuelle Darstellung der Biopsieergebnisse	33
Abbildung 21 Histologisches Bild einer aktinischen Keratose	33
Abbildung 22 Dermatoskopische und RCM Darstellung der Progredienz in eine AK (vergrößerter Bildausschnitt, 1 Feld =500 µm)	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Histopathologisches Grading aktinischer Keratosen (63)	4
Tabelle 2 histopathologische Kriterien für die Diagnose einer AK (1).....	5
Tabelle 3 zeitlicher Ablauf der Studie	17
Tabelle 4 Übereinstimmungsergebnisse der Studentin und der Expertengruppe sowie Übereinstimmung der Grazer Expertengruppe und Dr. Pellacani (Italien)..	35
Tabelle 5 Veränderungen von Baseline zu 6 Monaten nach Kryotherapie	37
Tabelle 6 Veränderungen von Baseline zu 6 Monate nach PDT	38

1 Einleitung

1.1 Aktinische Keratosen und Plattenepithelkarzinom

Aktinische Keratosen (AK, keratosis solaris, keratosis senilis) zählen zu den häufigsten kutanen Neoplasien in der weißen Bevölkerung (2). Seit 1896 der französische Dermatologe Dubreuilh die Keratosis senilis als eigene Entität definierte, wurde intensiv an der Dermatose geforscht. Er begründete die Anschauung, dass die Keratosis senilis Gemeinsamkeiten mit dem Squamous cell carcinoma (SCC), dem Plattenepithelkarzinom, aufweist und postulierte, dass die AK eine natürliche Tendenz zur Entartung besitzt. Er schuf damit das Konzept der Präkanzerose, für welche er die aktinische Keratose als Stereotypen hielt (60). Exakt 30 Jahre nach diesen Beschreibungen definierte Freudenthal 1926 die definitiven histopathologischen Kriterien. Jahrzehntlang galt die aktinische Keratose als Präkanzerose, also als Carcinoma in situ des Plattenepithelkarzinoms. Diese Auffassung spiegelte sich in den internationalen Leitlinien wider. Der amerikanische Dermatologe R.L. Sutton Jr. postulierte bereits 1938 mit den Worten *“They (keratoses seniles) are called precancerous lesions: they are in fact cancerous already-early superficial and requiring time to manifest those characteristics of cancer with which all clinicians are familiar, but cancerous, nevertheless“* die These, dass es sich um eine frühe Form eines Plattenepithelkarzinomes handelt (69). Viele Forscher haben sich in den letzten Jahren eben dieser Anschauung angenähert, dass AKs eine incipiente Form des Plattenepithelkarzinoms sind, was durch die neue Namensgebung KIN I-III (keratotic intraepidermal neoplasia) betont wird (1).

Resultierend aus diversen Risikofaktoren, in erster Linie aber durch chronische, kumulative Lichteinwirkung bei langjähriger Sonnenexposition oder Licht-Therapie, kommt es zu den Hautveränderungen. Daher weisen Personen, die sich in der Freizeit oder berufsbedingt häufig im Freien aufhalten, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten aktinischer Keratosen auf (3). Prädilektionsstellen sind stark sonnenexponierte Haut im Gesicht, an der Kopfhaut und den Handrücken, den sogenannten „Sonnterrassen“ (62).

Auch histochemische Untersuchungen bestätigen den Einfluss der UV Strahlung auf genetische Mutationen im Tumorsupressorgen p53 (4). Insbesondere UVB Strahlung ist in der Lage, direkt DNS Schäden zu verursachen, welche zu unkontrollierter Zellklonbildung führt (5). Genetische Aberrationen scheinen also eine ganz bedeutende Rolle in der Pathogenese der AK zu spielen. Die p53 Mutation am Chromosom 17p132 wurde in 53% der AKs und in 69% der SCCs gefunden(6). Als weiteres Kokanzero-gen zur Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms gilt das Humane Papilloma Virus (HPV) (7). Im Detail konnte gezeigt werden, dass das antiapoptotisch wirksame virale E6 und E7-Protein eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen scheint (8,9,62).

Die *Prävalenz* der Actinica solaris ist daher in Regionen intensiver UV- Strahlung höher, als in Regionen mit niedriger Strahlenbelastung. In Australien beispielsweise konnte in einer Gruppe von 30-70 jährigen bei 55 % der Männer und 37% der Frauen eine aktinische Keratose gefunden werden(61). In Deutschland hingegen ist eine Prävalenz von 11.5 % in einer Gruppe von 60-70 jährigen beschrieben worden, wobei auch hier die Prävalenz der Männer höher war(68). Aus diesen Ergebnissen lassen sich die Risikofaktoren Geschlecht wie auch Alter relativ eindeutig darstellen. Für die erhöhte Prävalenz aktinischer Keratosen bei Männern, wird in erster Linie berufliche und freizeitbedingte Exposition und die geringere Kopfbehaarung verantwortlich gemacht(11,62).

Der bedeutendste protektive Faktor ist daher ein konsequenter Sonnenschutz. In einer hochqualitativen Präventionsstudie konnte ein signifikanter Schutzeffekt gegenüber schwachem Sonnenschutz nachgewiesen werden (12). Des Weiteren bestehen Hinweise, dass eine regelmäßige Einnahme von Aspirin oder nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAIDs) und eine gesunde Ernährung reich an grünem Gemüse, das Risiko der Entstehung eines Plattenepithelkarzinomes reduzieren kann (13,14).

An den Ursachen für die potentielle Progression in ein invasives Karzinom, wird seit Jahren intensiv geforscht. Inzwischen wird das Progressionsrisiko in verschiedenen Studien zwischen 0.1% und 20% eingeschätzt (15,16). Die meisten aktinischen Keratosen verbleiben also in situ oder es kommt zu einer spontanen Regression, die in etwa bei 25% liegt (17,18).

Durchschnittlich dauert es, im Falle einer Progression, 26.6 Monate bis eine AK das Stadium eines SCC erreicht(19).Das Risiko der Progression steigt mit der Dicke der Läsion, der Lokalisation (z.B. mukosal) und einer Immunsuppression des Patienten.(4), insgesamt metastasieren Plattenepithelkarzinome mit einer Rate von 2% bis 6% aber relativ selten (16,20).Mikroskopische Metastasen können jedoch besonders in der Umgebung von high-risk SCCs auftreten (21).

Makroskopisch stellen sich aktinische Keratosen als schuppende, raue Maculae oder Plaques, teils mit durch Teleangliktasien durchzogenen Papeln, auf entzündlich-rötlichen Grund, dar. Im Allgemeinen tendieren AKs zur Inflammation bevor sie in ein invasives Karzinom übergehen (22). Als malignomverdächtig gelten AKs auch, sobald sie palpabel sind und Kriterien wie Induration oder Ulzeration aufweisen (23).

Dermatoskopisch zeigt sich klassischerweise ein rötliches Pseudonetzwerk um die Haarfollikel, feine linear verlaufende Gefäße und hyperkeratotische Pfropfen innerhalb des Haarfollikels. Zusammen kann von einem erdbeerähnlichem Erscheinungsbild gesprochen werden (24). Die Auflichtmikroskopie kann daher in der differentialdiagnostischen Abgrenzung beispielsweise gegenüber der Verruca seborrhoica oder dem Basalzellkarzinom hilfreich sein. Andere bedeutende **Differentialdiagnosen** wie Verruca vulgaris, Tinea, Ekzeme, Psoriasis vulgaris, oder Lupus erythematodes sollten in der Diagnosefindung ebenso in Betracht gezogen werden wie auch maligne Entitäten wie Morbus Bowen, Lentigo maligna, Keratoakanthom oder extramammärer Morbus Paget (62).

AKs treten meist in lichtexponierten Arealen, disseminiert, und in verschiedenen klinischen Stadien auf, was als *Feldkanzerisierung* bezeichnet wird (25). Beinahe 100% der „gesunden Haut“ in der unmittelbaren Umgebung einer AK, weist charakteristische Veränderungen einer AK auf (26). Dieses Phänomen erschwert die gezielte, topische Behandlung, da das Behandlungsareal nicht immer klar abgrenzbar ist. Besonders frühe klinische Formen sind in der Inspektion schwierig zu erfassen (62).

Histologisch sind AKs durch Hyperkeratose, Parakeratose und pleomorphe Keratinozyten sowie dermales Entzündungsinfiltrat und solarer Elastose definiert (1).Die Kerne pathologischer Keratinozyten sind groß, pleomorph, teils

heterochromatisch und weisen ein eosinophiles Zytoplasma auf. Neoplastische Zellen sind zum Teil dyskeratotisch oder nekrotisch (27). Je nach Auftreten der neoplastischen Zellen, werden AKs wie in

Tabelle 1 dargestellt, in drei histomorphologische Grade unterteilt:

Tabelle 1 Histopathologisches Grading aktinischer Keratosen (63)

Grading der AKs	Histopathologie der AKs
<i>Grading 1 (KIN1)</i>	<i>Neoplastische Zellen im unteren Drittel der Epidermis</i>
<i>Grading 2 (KIN2)</i>	<i>Neoplastische Zellen in den unteren zwei Dritteln der Epidermis</i>
<i>Grading 3 (KIN3)</i>	<i>Atypische Zellen in der gesamten Epidermis</i>

Typisch für frühe Formen aktinischer Keratosen ist das sogenannte „Crowding“ Phänomen, bei welchem es zu einer Anhäufung einzelner atypischer Keratinozyten im Stratum basale kommt, die sich mit Fortschreiten der Erkrankung auf höhere Epidermislagen ausweiten (sog. bowenoides Bild)(62). In der oberen Dermis zeigt sich häufig eine solare Elastose, die jedoch bei immunsupprimierten Patienten/Patientinnen fehlen kann(28).

Tabelle 2 histopathologische Kriterien für die Diagnose einer AK (1)

Etablierte histopathologische Kriterien für die Diagnose aktinischer Keratosen	
Stratum corneum	Parakeratose, Hyperkeratose, Orthokeratose
Stratum granulosum/spinosum	Atypische Architektur, irreguläre Akanthose, Reifungsstörung der Keratinozyten
Stratum basale	Anhäufung von Keratinozyten, Mitose/atypische mitotische Figuren Pleomorphismen der Zellen und Nuclei
Dermis	Solare Elastose, gesteigerte Vaskularisierung, superfizielles Entzündungsinfiltrat

1.2 Ausgesuchte Therapiemöglichkeiten aktinischer Keratosen

In der Therapie aktinischer Keratosen, haben sich zahlreiche operative und konservative Behandlungsmethoden etabliert. Die endgültige Wahl einer Therapiemodalität hängt von diversen Faktoren wie Stadium der Erkrankung, Lokalisation, Komorbiditäten, Alter und Compliance des Patienten/der Patientin ab. Des Weiteren hängt die Wahl des Verfahrens auch wesentlich von der Erfahrung des Anwenders/der Anwenderin, insbesondere bei der Wahl der Kryotherapie oder Kürretage, ab. In die Studie wurden daher die etablierten Therapieverfahren Kryotherapie und Photodynamische Therapie eingeschlossen. Vorweg kann gesagt werden, dass es sich in der Therapie aktinischer Keratosen meist um läsionsbezogene Verfahren handelt (PDT, Kryotherapie und Shaving), die das Problem der Feldkanzerisierung weitestgehend unberücksichtigt lassen. Der Vorteil topischer Anwendungen liegt in der flächenhaften Behandlung ganzer Körperregionen und damit in der Erfassung makroskopischer unsichtbarer Frühformen. Zahlen über die Häufigkeit einer Anwendung und deren Kosten sind

für Europa derzeit noch nicht bekannt, aus einer amerikanischen Studie lässt sich jedoch ableiten, dass destruktive Verfahren hinsichtlich der geringen Anwendungshäufigkeit, Effizienz und Kosten jedoch Standard bleiben werden (29).

Kryotherapie

Definitionsgemäß umfasst die dermatologische Kryotherapie alle Arten des Einsatzes von Gefriertechniken um mittels Kälte krankhaft verändertes Gewebe oder Gewebekomponenten zu zerstören. Im speziellen Fall der Behandlung aktinischer Keratosen sollen atypische Zellen innerhalb der Epidermis zerstört werden (30). Da keine exakten Anwendungsvorgaben bestehen, hängt der Ablauf und in Folge dessen, das Ergebnis des Verfahrens, im Wesentlichen von der Erfahrung des Arztes/der Ärztin ab.

Die Therapie beruht auf einem aus verschiedenen Phasen bestehenden Wirkmechanismus, der zur Bildung extra- und intrazellulärer Eiskristalle in den Läsionen führt. Die zu Beginn einsetzende physikalische Phase führt zur direkten Zerstörung von Zellen sowie zu sekundären Strukturveränderungen beim Auftauen. Die darauf folgende Gefäßphase ist gekennzeichnet durch die Destruktion der Mikrozirkulation und dem damit verbundenen Gewebsuntergang. Erst in der immunologischen Phase führen antigene Eigenschaften zu sekundären Wirkungen außerhalb des eigentlichen Behandlungsbereiches(64). Zu den typischen Nebenwirkungen der Kryotherapie zählen Blasen und Krustenbildung, lokaler Schmerz und Pigmentstörung des behandelten Areales, die sich als Hypo- oder Hyperpigmentierung manifestieren können(31). Des Weiteren wurden ebenso kurze Kopfschmerzattacken, sogenanntes „ice cream headache“ beschrieben, die eine lokalanästhetische Vorbehandlung notwendig machen kann (32).

An der Dermatologischen Klinik Graz wurden die Läsionen zuerst mittels eines 22Mhz Ultraschallgerätes die Tiefe der Läsion ermittelt. Beim Kryotherapiegerät handelt es sich um eine N₂O Druckflasche mit Temperaturmesssonde „Cry-AC, Brymill Corporation“. Mittels flüssigen Stickstoffes, bei einer Verdampfungstemperatur von 77,4 K, entspricht -195,8 C°, wurde mittels „Probentechnik“ die Läsion behandelt. Wiederholte Temperaturmessungen mittels Aufsatz gewährleisteten die optimale

Temperatur von -50° innerhalb der Läsion. Beim angewandten Verfahren, handelt es sich um ein sogenanntes offenes Behandlungsverfahren, bei dem flüssiger Stickstoff auf die Keratose über eine offene Sonde gesprüht wird. Bei einem Sprühabstand von etwa 1cm, wird die Läsion gezielt behandelt und das umliegende Gewebe geschützt. In der Studie wurde das Verfahren einmalig auf den aktinischen Keratosen angewandt.

Photodynamische Therapie mit Aminolävulinsäure

Die PDT wird in internationalen Leitlinien als First Line Therapie für dünne, nicht hyperkeratotische AKs und als Second Line Therapie für fortgeschrittene Plattenepithelkarzinome genannt(62). Besonders beim Auftreten aktinischer Keratosen in Langzeit- immunsupprimierten bzw. organtransplantierten Patienten/Patientinnen, kann die PDT ein Auftreten von AKs verzögern und die Weiterentwicklung reduzieren(33).

Die Therapie basiert auf dem Prinzip der Photochemotherapie, also einer Lichttherapie in Kombination mit einem Photosensibilisator. Die häufig eingesetzten Photosensibilisatoren 5-Aminolävulinsäure (ALA) und Methyl-5-amino-4-oxopentanoat (MAL) wirken als Hämoglobinvorstufen und werden daher in der Zelle zu Porphyrinen verstoffwechselt. Diese akkumulieren in der Zelle und werden durch Bestrahlung mit hochenergetischem, sichtbarem Licht angeregt, sodass zytotoxische Sauerstoffmoleküle entstehen (34). Schmalband UV Licht besitzt dabei eine wesentlich höhere Effizienz als Breitbandlampen(35) .

In der Studie wurde als Photosensibilisator METVIX® (Methyl 5-amino-4-oxopentanoat) nach Entfernung der Hyperkeratosen mittels scharfen Löffels, auf die Läsionen aufgetragen. Innerhalb einer 3 bis 4 stündigen Einwirkzeit unter einem lichtundurchlässigen Verbandstoff, wurde der Wirkstoff von den Tumorzellen aufgenommen.

Nach Entfernung der Creme und Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung, wird die aktinische Keratose mit einer maximalen Wellenlänge von 630 nm mit einer Dosis von $37\text{J}/\text{cm}^2$ bestrahlt (mittels Aktilie Lampe, Galderma®).

Die Patienten/Patientinnen wurden mittels Informationsblatt darüber aufgeklärt, dass als Nebenwirkungen der Therapie in den ersten Stunden nach Bestrahlung mit auftretenden Empfindungen wie Hitzegefühl, Brennen oder Schmerzen zu

rechnen ist. Häufig kommt es des Weiteren zu einem Erythem, Schwellung und Blasen. Als häufige Allgemeinsymptomatik sind außerdem Parästhesien Hyperpigmentierungen an der behandelten Lokalisation auftreten (34). In einer großen, randomisierten Studie von Dirschka et al. wird über eine Langzeit follow-up die PDT als sehr effektiv und sicher eingestuft. Mehr als 80% waren 6 Monate nach Therapieende mit BF-200 ALA frei von aktinischen Keratosen. Auch das kosmetische Ergebnis wurde nach 12 Monaten von 45% der Behandelten als sehr gut oder gut befunden (36).

Medikamentöse Immunmodulatoren

Alternativ zu invasiven Verfahren wird in den Leitlinien der deutschen dermatologischen Gesellschaft auch eine medikamentöse Therapie (isoliert oder kombiniert mit anderen Therapiemöglichkeiten) empfohlen. Imiquimod, Diclofenac-Gel und 5-FU Inhibitoren ist gemein, dass sie zu einer Immunmodulation im Sinne einer Entzündungsinduktion bzw. Veränderung der DNA Synthese führen(62).

Topisches 5 Floururacil

5-Floururacil(5-FU) ist ein topisches Chemotherapeutikum das als Antimetobolit in DNA und RNA eingebaut wird und die Methylierungsreaktion von Desoxyuridylsäure zu Thymidylsäure hemmt. Daher greift 5 Floururacil in die DNA Synthese, und in geringerem Ausmaß, in die RNA Synthese ein (70). Üblicherweise werden aktinische Keratosen mit 5-FU Inhibitoren über 2-4 Wochen behandelt, die Abheilung erfolgt möglicherweise jedoch erst nach 1-2 Monaten(62).

Imiquimod bindet als Agonist an den Toll like Rezeptor 7 und führt so zu einer Zytokininduktion von IFN alpha, Interleukinen wie IL1, IL-6 und IL-12 und Tumornekrosefaktor alpha. Dies führt zu einer Aktivierung von Th1 Zellen und damit zu einer Entzündungsreaktion welche antiviral und antitumorös wirkt (37,38). Imiquimod gilt als sichere und effektive Behandlungsmethode aktinischer Keratosen (39). In einer Metaanalyse über 10 Studien lag die mittlere Wirksamkeitsrate von Imiquimod mit 70% (+/-12%) über der von 5-FU, die bei 52% (+/-18%) lag (40). Als problematisch hinsichtlich der Patienten/Patientinnen Compliance wird jedoch die starke Entzündungsreaktion angesehen.

Diclofenac Natrium 3% in Hyaluronsäuregel ist eine weitere etablierte Therapieform aktinischer Keratosen. Der Cyclooxygenase 2(COX-2) Hemmer hemmt die Angiogenese und induziert Apoptose (41). Des Weiteren aktivieren nicht steroidale Antirheumatika wie Diclofenac vermutlich den Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-gamma), welcher die Proliferation von Tumorzellen hemmt (42). Als 3%iges Gel (Solaraze®) ist das Medikament zur Therapie aktinischer Keratosen zugelassen und scheint eine signifikante Besserung der Neoplasien zu bewirken. Eine Metaanalyse kam zum Ergebnis, dass es zu einer kompletten Abheilung der aktinischen Keratosen in 40% kommen kann (43).

Shaving, Chirurgische Intervention

Eine chirurgische Abtragung mittels Skalpell oder scharfem Löffel, macht in erster Linie dann Sinn, wenn das gewonnene Material histopathologisch untersucht werden soll. Durch Kürretage gewonnenes Material bietet jedoch häufig unübersichtliches Material für die histologische Untersuchung, sodass dieses Verfahren ungeeignet zur Behandlung eines Lokalrezidives ist (44).

Ein weiterer Nachteil einer chirurgischen Intervention liegt darin, dass nur makroskopisch sichtbare Keratosen erfasst werden können und so die Feldkanzerisierung in der Behandlung keine Berücksichtigung findet. Prinzipiell ist aber auch ein Kombinationsverfahren aus chirurgischer Intervention und beispielsweise Kryotherapie möglich (44).

1.3 Therapiekontrolle aktinischer Keratosen in der RCM

Bisher war die Therapiekontrolle aktinischer Keratosen, die mit Kryotherapie oder Photodynamischer Therapie behandelt wurden, nur mittels klinischer und histologischer Untersuchung möglich. Die klinische Beurteilung unterliegt jedoch geringer Sensitivität und Spezifität, die histologische Beurteilung ist effektiv, setzt aber eine chirurgische Intervention zur Gewebeentnahme voraus und ist nicht beliebig oft wiederholbar. Besonders an Lokalisationen wie im Gesicht kann die Biopsie mit kosmetisch störendem Ergebnis einhergehen. Des Weiteren repräsentiert eine Biopsie nur einen kleinen Teil der Läsion. Besonders in größeren Läsionen kann es zu daher zu falsch negativen Ergebnissen kommen.

Mittels der konfokalen Lasermikroskopie wurde in dieser Studie ein neues Instrument zur Evaluierung des Therapieerfolges eingesetzt. Die RCM bietet als nicht-invasive Diagnostikmethode die Möglichkeit, die Läsionen auf zellulärer Ebene zu beurteilen. In den letzten Jahren wurde mittels des Verfahrens, verschiedene entzündliche und neoplastische Dermatosen untersucht (17,45-49). Da es sich um eine nichtinvasive Untersuchungsmethode handelt, ist das Verfahren besonders für Verlaufsbeobachtungen von Therapieeffekten geeignet und kann wiederholt, an beliebig vielen Hautarealen angewendet werden. Da aktinische Keratosen im Anfangsstadium oder im Sinne der Feldkanzerisierung häufig inapparent verlaufen, bietet die RCM die Möglichkeit zelluläre Atypien darzustellen, noch bevor sie klinisch erkennbar werden. Des Weiteren kann die RCM hilfreich sein um eine geeignete Biopsielokalisation auszuwählen (23,50). Horizontale Bilder wie in der Dermatoskopie sowie in vivo Bilder der Epidermis und Dermis können in nahezu histologischer Auflösung dargestellt werden (51).

2 Material und Methoden

2.1 Reflectance Confocal Microscopy

Die konfokale Reflexionsmikroskopie ist eine nichtinvasive Aufnahmetechnik, die es erlaubt, zelluläre Strukturen in vivo darzustellen. Für die Studie wurde das Vivascope® 1500 verwendet, das zusätzlich über eine dermatoskopische Kamera verfügt (Vivacam, Lucid Inc). Diese Kamera schießt Bilder in 5 Megapixel Qualität in einem 10 mm Feld und ermöglicht so das Navigieren innerhalb der Läsion zur Auswahl einer geeigneten Stelle für die RCM Aufnahme. Die Funktionsweise des Mikroskops ist in Abbildung 1 dargestellt. Monochromatisches und kohärentes Licht aus einem Diodenlaser wird auf die Läsion gerichtet und das reflektierte Licht zu einem Detektor zurückgesendet. Es wird jedoch nur das reflektierte Licht einer fokalen Region detektiert und am Bildschirm dargestellt, daher der Begriff „Konfokales Lasermikroskop“. Der Laser verfügt über eine Leistung von 1 mW bis 20mW, sodass keine Gefahr einer Schädigung des Gewebes besteht und das Verfahren ist für den Patienten ungefährlich und schmerzlos ist (52). Insbesondere die Kombination aus einer Wellenlänge von 830 nm und einer Leistung von 20 mW ermöglicht Eindringtiefen des Lasers von 200-500 µm, sodass die Epidermis und obere Dermis darstellbar ist (52).

Zur Aufnahme der Bilder wird der RCM Metallring mit Polycarbonatfenster auf die Keratose aufgeklebt um Bewegungsartefakte zu minimieren. Mittels eines Tropfens kosmetischen Öls zwischen dem Glasfenster und der Haut, werden Furchen aufgefüllt und somit die Oberfläche konsistenter. Zwischen dem Ring und dem Lasermikroskop wird ein Gel auf Wasserbasis mit einem Refraktionsindex von 1.34 aufgetragen, sodass dieser dem der Epidermis annähernd entspricht (65). Im Anschluss wird der Ring magnetisch mit dem Mikroskop konnektiert. Zur Bilderzeugung wird ein Lichtstrahl mit der Wellenlänge von 830nm über die Linse auf die Läsion gesendet und dort reflektiert. Da die verschiedenen Strukturen der Läsion einen unterschiedlichen Brechungsindex aufweisen, kommt es zu einer unterschiedlichen Streuung und Brechung, welche sich in Graustufen auf der Aufnahme darstellen. Das reflektierte Licht wird von einer Lochblende fokussiert und so an den Detektor gesendet. Dieser leitet das Licht an den angeschlossenen Computer weiter, welcher das reflektierte Licht auf ein Bild zurückrechnet (65).

RCM Bilder sind horizontale, also parallel zur Hautoberfläche liegende Bilder (Blocks;Mosaik), zu denen zusätzlich vertikale Sequenzen(Stacks) und damit die Tiefe des Bildes dargestellt werden kann. (Abbildung 3) Die Kombination aus beiden schafft ein dreidimensionales Bild und wird als *Cube* bezeichnet. *Stacks* sind eine Sequenz von horizontaler Aufnahmen in gleicher Position (x,y), aber unterschiedlicher Tiefe (z) und kann daher auch als optische Biopsie bezeichnet werden(52). Die gewünschte Tiefe zwischen den einzelnen Aufnahmen ist dabei individuell bestimmbar. *Blocks* hingegen sind hochaufgelöste, horizontale Bilder, bestehend aus bis zu 256 Einzelbildern und wurden in erster Linie zur Beurteilung der Läsion herangezogen (Abbildung 2). Blocks bieten einen Überblick über ein Areal in einer bestimmten Tiefe. Die Größe der Einzelbilder kann individuell bestimmt werden und reicht von 1×1mm bis 8×8mm(entspricht 2×2 bzw. 16×16 Bildern auf einem Block Bild)(65).

Das *Einzelbild* besteht somit aus einem 500×500µm großen Areal, für das ein Übersichtsbild von bis zu 8×8 mm (entspricht 4×4 mm der Läsion) erreicht werden kann. Die Auflösung von 1024×1024 Pixel, ermöglicht ein späteres „herauszoomen“ einzelner Strukturen (65).

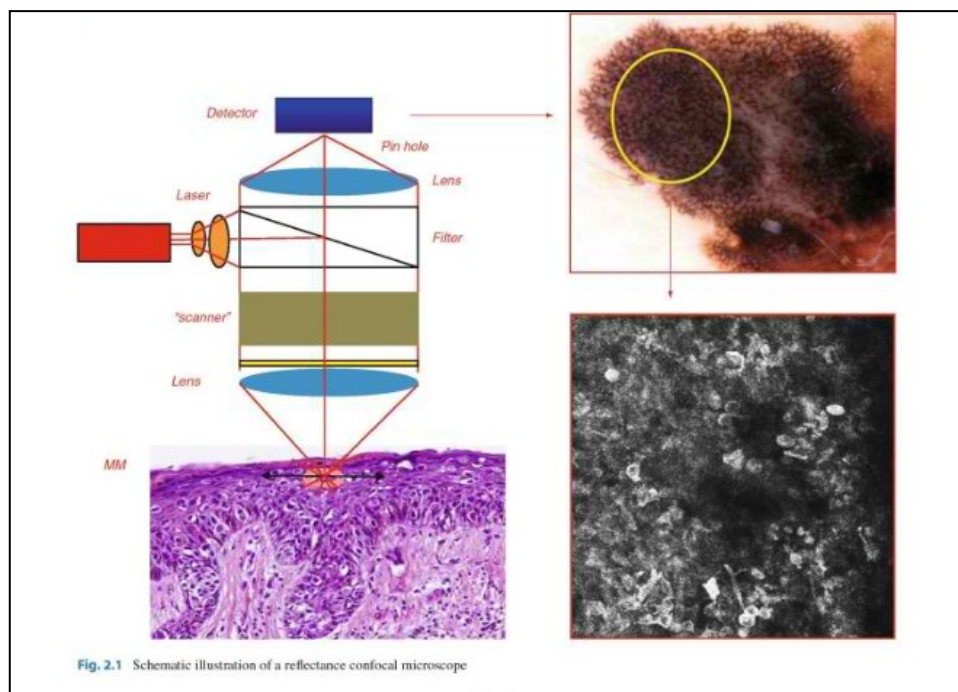


Abbildung 1: Funktionsweise und Bildkonstruktion in der RCM (65)

Zu Beginn erstellt eine, an das RCM angeschlossene, Digitalkamera ein dermatoskopisches Bild, welches direkt mit den RCM Bildern in Korrelation gebracht werden kann (53). Um die Aufnahme zu optimieren, ist es notwendig, den Patienten/die Patientin in einer angenehmen Position zu lagern, da die Aufnahmen 5-15 Minuten dauern(65). Bei Läsionen an den Händen wurden die Patienten/die Patientinnen beispielsweise aufrecht hingesezt und die Hand flach auf der Tischfläche positioniert. Des Weiteren kann es notwendig sein, die zu untersuchende Region zu rasieren um eine bessere Darstellung zu erreichen.

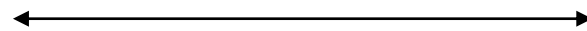
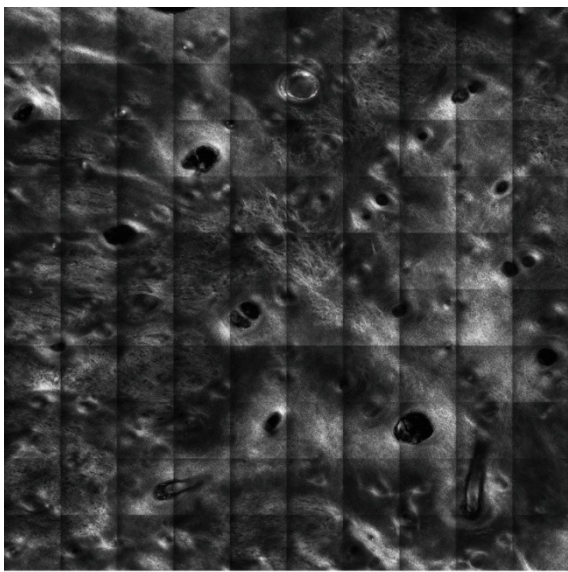


Abbildung 2 Bildbeispiel einer RCM Aufnahme (Viva Block)

VivaBlock. 5×5 mm Aufnahme der Läsion bestehend aus 100 Einzelbildern. Jedes Einzelbild ist 500 µm×500 µm groß.(Darstellung der Dermis einer aktinischen Keratose)

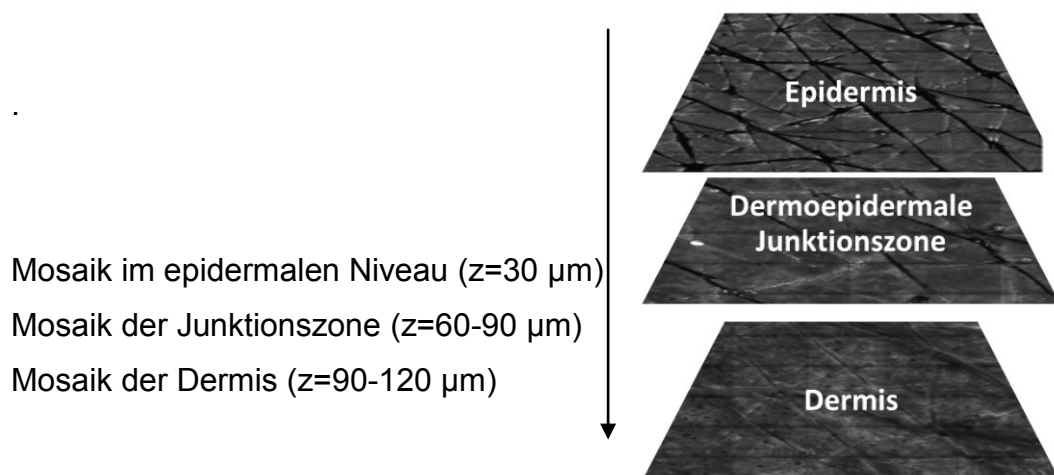


Abbildung 3 Beispiel für die schichtweise Aufnahme

2.2 Beschreibung der Studie, des Studiendesigns und der Studienteilnehmer

Das übergeordnete Ziel der Studie war es, gut definierte, reproduzierbare Kriterien für die Beurteilung von AKs in der konfokalen Laserscanningmikroskopie (RCM, reflectance confocal microscopy) zu entwickeln, die es ermöglichen sollen die Therapie von AKs zu überwachen. Bisher war es nur mittels histologischer Beurteilung nach Gewebeentnahme möglich, einen Therapieerfolg auf zellulärer Ebene zu beurteilen. Die klinische Beurteilung unterliegt jedoch geringer Sensitivität und Spezifität. Studien schätzen die Übereinstimmung makroskopischer Beurteilung gegenüber histopathologischer Untersuchung auf etwa 80-90 % (66,67).

Die RCM bietet auch den Vorteil einer längerfristigen Überwachung des individuellen Ansprechens. Ein therapieorientierter Zeitplan wurde erstellt, in dem die Patienten an definierten Zeitpunkten nachkontrolliert wurden.

Die Bilder wurden an der Universitätsklinik Graz erstellt und zusammen von einem Expertenteam bestehend aus Dr. Hofmann-Wellenhof (Graz), Dr. Arzberger (Graz) und Dr. Curiel (USA) beurteilt. Des Weiteren wurden die Aufnahmen nach einer Selbsteinschulung mittels Tutorial (erstellt von Dr. Clara Curiel) und einer dreitägigen Teilnahme an den Beurteilungstagen der Expertengruppe, von der Studentin beurteilt. Ein Hauptziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, die RCM Kriterien zu erproben und die Ergebnisse in direkten Vergleich mit denen der Expertengruppe/Expertinnengruppe zu stellen.

Zusätzlich wurden die Bilder vom italienischen Experten Dr. Giovanni Pellacani in Modena beurteilt, dessen Ergebnisse ebenfalls in direkten Vergleich mit denen der Expertengruppe gestellt wurden.

Im Folgenden ist die tabellarische Aufschlüsselung der prozentuellen Übereinstimmungen der Kryotherapie- und PDT- Gruppe zu den Ergebnissen des Expertenteams aus Graz dargestellt. Weiters ist der direkte Übereinstimmungsvergleich der Expertengruppe mit den Ergebnissen des italienischen Beurteilers, der Tabelle zu entnehmen.

Es handelte sich um eine prospektive Studie, für welche 30 männliche und weibliche Patienten an der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie Graz unter der Leitung von Univ-Prof. Dr. Rainer Hofmann- Wellenhof und MD

Clara Curiel rekrutiert wurden. Zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie, wurden die Patienten über den Ablauf, die Voraussetzungen sowie die Fotodokumentation und die jeweilige Behandlungsmodalität aufgeklärt.

In der Studie wurden insgesamt 30 gesunde Patienten/Patientinnen im Alter zwischen 45 und 85 Jahren mit einem Fitzpatrick Hauttyp I, II oder III eingeschlossen. Ausgewählt wurden in erster Linie kaukasische Patienten/Patientinnen mit moderat bis schwer sonnengeschädigter Haut.

Je 10 Patienten/Patientinnen wurden zu 3 Therapiegruppen, Kryotherapie, Photodynamischer Therapie und Shave Biopsie zugeteilt. Die Teilnehmer wurden dazu angehalten, mindestens 15 Tage vor der geplanten RCM Aufnahme Sonnenlichtexposition einzuschränken und während des Studienzeitraumes adäquaten Sonnenschutz zu verwenden.

Zu den *Ausschlusskriterien* zählten

- Entzündungen oder Irritationen der Haut in der Testumgebung, einschließlich atopischer Dermatitis und Psoriasis sowie Hauttumore oder melanozytäre Läsionen.
- Patienten/Patientinnen, die an einem invasiven Tumor litten und/oder sich einer Chemotherapie oder Bestrahlung in den letzten 2 Jahren unterziehen mussten (ausgenommen nicht-melanozytäre Tumoren).
- Immunsupprimierte Patienten/Patientinnen aus dem Grund einer Grunderkrankung oder idiopathisch/medikamentös (einschließlich Steroide, immunsuppressive Substanzen, Biologika).
- Patienten, die unter einer schwerwiegenden Erkrankung leiden, eingeschlossen aktiver Infektionen, psychiatrischer Erkrankung oder anderen Gründen, die die Compliance des Patienten/Patientinnen limitieren.

Zur Evaluierung des Gesundheitszustandes des Patienten/der Patientin wurde mittels Karnofsky Index die Eignung zur Teilnahme an der Studie evaluiert. Ein Prozentsatz unter 70% führte zum Ausschluss. (siehe Anhang Fragebogen)

2.2.1 Kriterien zur Auswahl der Läsionen (AK1, AK2, PD)

An jedem Patienten wurde mittels makroskopischer und dermatoskopischer Beurteilung eine AK1 (minimale Dicke), eine AK2 (moderate-starke Dicke) sowie eine Stelle sonnengeschädigter Haut (PD) (in der Umgebung der AK und AK2), ausgewählt. Die Läsionen sollten >3 mm und <6 mm im Durchmesser halten und mussten am Arm, den Händen, Kopf oder Gesicht lokalisiert sein.

2.2.2 Vermessung und Dokumentation (klinische Bilder, Dermatoskopie)

Die Voraussetzung für das Wiederauffinden und die Folgedokumentation war eine genaue Vermessung der Läsionen. In einem vorskizzierten Bild (siehe Anhang Fragebogen) von Hand und Caput wurden die Läsionen in ihrem Durchmesser und in Bezug auf Referenzstrukturen (z.B. Knöchel, Fingernagel) eingezeichnet. Im Folgenden wurden dermatoskopische Makroaufnahmen erstellt (Abbildung 4) und mittels Pfeilmarkierungen die Aufnahmelokalisationen der Stacks markiert. (Abbildung 5) Ein klinisches Bild wurde mittels einer Canon Powershot digital camera (Canon Inc., Tokyo, Japan) fotografiert und im Fotolabor archiviert. Die dermatoskopische Aufnahme erfolgte mittels angeschlossener Vivacam (Lucid Inc) und wurde ebenso im Fotolabor gespeichert.

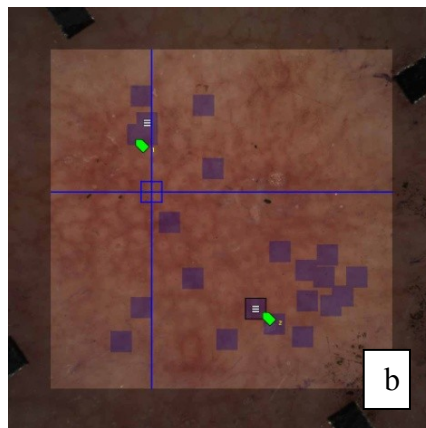
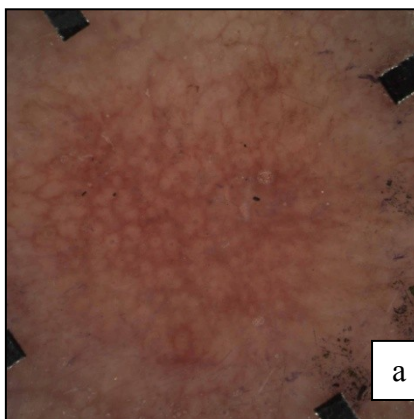


Abbildung 4 a) Dermatoskopische Makroaufnahme

Abbildung 5 b) Markierung mittels grünen Pfeilen der der Lokalisation der RCM Aufnahmen (Stacks)

2.2.3 Ablauf und Zeitplan

Der zeitliche Ablauf der Studie wurde zu Beginn genau festgelegt und ist in Tabelle 3 näher dargestellt.

Tabelle 3 zeitlicher Ablauf der Studie

Screening	
1. Untersuchung	<ul style="list-style-type: none">✓ Untersuchung der Haut, Auswahl geeigneter Läsionen✓ Informed Consent(Aufklärung, Einverständniserklärung)✓ Baseline Fotodokumentation✓ Baseline RCM Aufnahmen #1 (AK und PD)
PDT und Kryotherapie	
2. Untersuchung	<ul style="list-style-type: none">✓ Follow- up Fotodokumentation am Therapietag✓ RCM Aufnahme #2 nach Inkubation von Mal✓ RCM Aufnahme #2 nach Kryotherapie
Postinterventionelle Kontrolltermine	
3. Untersuchung	<ul style="list-style-type: none">✓ 6-9 Tage nach Photodynamischer Therapie✓ 4 Wochen nach Kryotherapie✓ Follow- up Fotodokumentation✓ RCM Aufnahmen #3
4. Untersuchung	<ul style="list-style-type: none">✓ 12-14 Wochen nach der jeweiligen Therapie✓ Follow- up Fotodokumentation✓ RCM Aufnahmen #4
5. Untersuchung	<ul style="list-style-type: none">✓ 24-27 Tage nach der jeweiligen Therapie✓ Follow- up Fotodokumentation✓ RCM Aufnahmen #5

Nach der Auswahl dreier, den Kriterien entsprechenden Läsionen wurde jede Läsion nach einem standardisierten Protokoll mit einer Canon Powershot digital camera (Canon Inc., Tokyo, Japan) fotografiert, und eine dermatoskopische Nahaufnahme erstellt.

Zur RCM Aufnahme wurde der „Ring“ auf der Läsion aufgebracht und diese in Nahaufnahme nochmals fotografiert, um jede Lokalisation für die folgenden Kontrollbesuche wieder erkennbar zu machen. Die Bilder wurden im Fotolabor der Dermatologischen Klinik Graz archiviert.

Nach Eingabe der Patientendaten, wurde die RCM Linse auf den Ring (mit einer Wassergelschicht) platziert und die Aufnahme-region markiert. Insgesamt wurden je 4 Blocks des *Stratum corneum*, der *Epidermis*, der *epidermalen Junctionszone* und der *Dermis* erstellt. Es wurde nicht zwischen papillärer und retikulärer Dermis differenziert. Die Unterscheidung der Schichten erfolgte weitestgehend orientierend an den epidermalen und dermalen Strukturen durch Erfahrung des/der aufnehmenden Arztes/Ärztin sowie der erwarteten Tiefe z der jeweiligen Schichten. Des Weiteren wurden je zwei sogenannte „Stacks“ aufgenommen, eine vertikale Bildabfolge von 30 Bildern durch die genannten Schichten.

Im Falle des Auftretens von Artefakten, die das Bild nicht ausreichend darstellten, was bei höhergradigen AKs durch die Hyperkeratose der Fall sein konnte, wurden einzelne, repräsentative Bildabschnitte gesondert ausgewählt.

Mittels *Photoshop CS6* wurden die Aufnahmen zur Beurteilung und Anonymisierung zurechtgeschnitten. Das Speichern und Verwalten der Bilder erfolgte am lokalen Datenträger. In der beschriebenen Weise wurden nach der Baseline Aufnahme noch fünf weitere Termine in der PDT Gruppe (Abbildung 6) und vier weitere Aufnahmetermine in der Kryotherapie-Gruppe durchgeführt.(Abbildung 7)



Abbildung 6 Zeitintervalle der RCM Aufnahmen Photodynamische Therapie

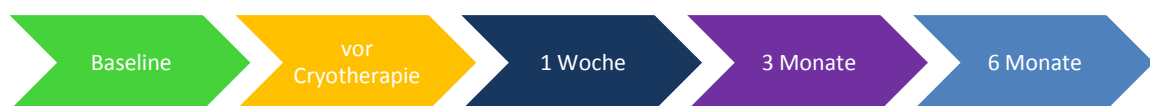


Abbildung 7 Zeitintervalle der RCM Aufnahmen Kryotherapie

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte am *Arizona Cancer Center-Skin Cancer Institute Tucson, AZ, USA* ausgeführt von *ChengCheng Hu, Ph.D* sowie *Kathylynn Saboda* unter Verwendung einer *Stata 11/IC* Software (StataCorp. College Station, TX).

Stetige Variablen wurden mittels Mann-Whitney U oder Kruskal- Wallis Tests ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte für den Kryotherapie Zweig und den PDT Zweig getrennt. Das Übereinstimmungsverhältnis zwischen Studentin und Expertenbeurteilung wurde für jeden Wert einzeln mittels 95% Konfidenzintervalls und der GEE (generalized estimating equations) errechnet.

Des Weiteren wurden die Veränderung zwischen Baseline und jeder der post light Aufnahmen mittels Odds ratio unter Bestimmung eines Signifikanzniveaus mit logistischer Regression (für die Ja/Nein- Deskriptoren) und linearer Regression (für die Multi-Skalen-Deskriptoren) errechnet. Dasselbe Verfahren wurde verwendet, um AK1 und AK2 sowie AK1/AK2 desselben Patienten/ derselben Patientin zum selben Zeitpunkt, kombiniert gegenüber den PD Bildern zu vergleichen.

2.2.5 Biopsie und Histologie

In der Biopsie-Gruppe wurden Stanzbiopsien der klinisch diagnostizierten AKs nach einem standardisierten Verfahren angefertigt und histologisch untersucht. Nach entsprechender Aufklärung des Patienten wurden die Läsionen mit einem Lokalanästhetikum betäubt und anschließend ein Stanzzylinder mit einem Durchmesser von 4 mm angefertigt. Die Wunden wurden mit Einzelknopfnähten oder Steristrips versorgt und steril verbunden. Zur mikroskopischen Beurteilung wurden die Präparate mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung gefärbt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der RCM Bilder

Die Beurteilung aktinischer Keratosen in der RCM erfolgt nach Kriterien, die in Studien eine hohe Sensitivität und Spezifität in Korrelation zur Histologie gezeigt haben (26,54). In der Studie wurden die Kriterien *atypisches Honigwabenmuster*, *ungeordnetes Epidermismuster* und *round nucleated cells im Stratum spinosum* sowie *Parakeratose*, *Hyperkeratose*, *solare Elastose*, *inflammatorisches Infiltrat* und *atypische Keratinozyten* beurteilt. Grundsätzlich werden die RCM Kriterien nach ihrem Auftreten in den verschiedenen Hautschichten untersucht. Im Stratum corneum wurden die RCM Kriterien Parakeratose, Hyperkeratose und Diskontinuität des Stratum corneum evaluiert. In der Epidermis wurde das Epidermismuster sowie das atypische Honigwabenmuster und sogenannte round nucleated cells sowie die Präsenz eines Entzündungsinfiltrates beurteilt. Für die obere und mittlere Dermis wurden wiederum das Vorhandensein eines Entzündungsinfiltrates, dendritischer Zellen, solarer Elastose, sowie runder und polymorpher Kapillaren beurteilt. Diese Kriterien sind im Folgenden mittels der Abbildungen 8-19 dargestellt.

Für die Kryotherapie-Gruppe wurden rund 480 Bilder und in der PDT Gruppe, aufgrund eines weiteren Kontrolltermins, rund 600 Bilder ausgewertet. Da die Bilder direkt während der Aufnahmen kontrolliert wurden, konnten für alle Bilder eine sehr gute Bildqualität gewährleistet werden.

3.1.1 Hyperkeratose

AKs sind durch eine oberflächliche Schuppung im Rahmen des verdickten Stratum corneums gekennzeichnet, was als Hyperkeratose bezeichnet wird. *Differentialdiagnostisch* sollte an Warzen, seborrhoische Keratosen oder inflammatorische Erkrankungen wie z.B. Psoriasis gedacht werden (65).

RCM Beurteilung: im Mikroskop zeigen sich oberflächliche, hyperreflektive Areale. in den RCM Mosaiken sind einzelne Korneozyten im Einzelbild erkennbar.

Beurteilungsschema:

- Ja (vorhanden)
- Nein (nicht vorhanden)
- Nicht beurteilbar

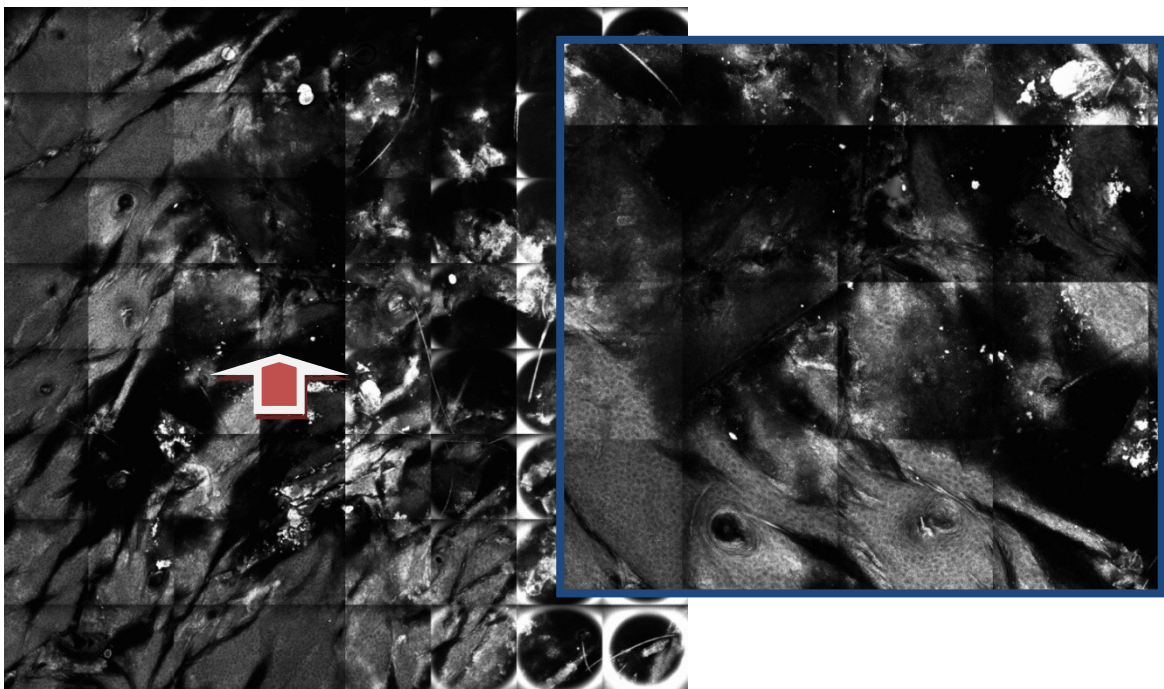


Abbildung 8 Hyperkeratose

3.1.2 Parakeratose

RCM Beurteilung: Im Stratum corneum fallen zur Umgebung refraktile, polygonale Strukturen auf, die ähnlich oder gleich groß wie normale Keratinozyten sind. Sie entsprechen residueller Kerne von Keratinozyten. Die Parakeratose kommt häufig zusammen mit einem Entzündungsinfiltrat vor.

Differentialdiagnostisch kommen Ekzeme, Psoriasis und Porokeratosen in Betracht (65).

Beurteilungsschema:

- Ja
- Nein
- Nicht beurteilbar

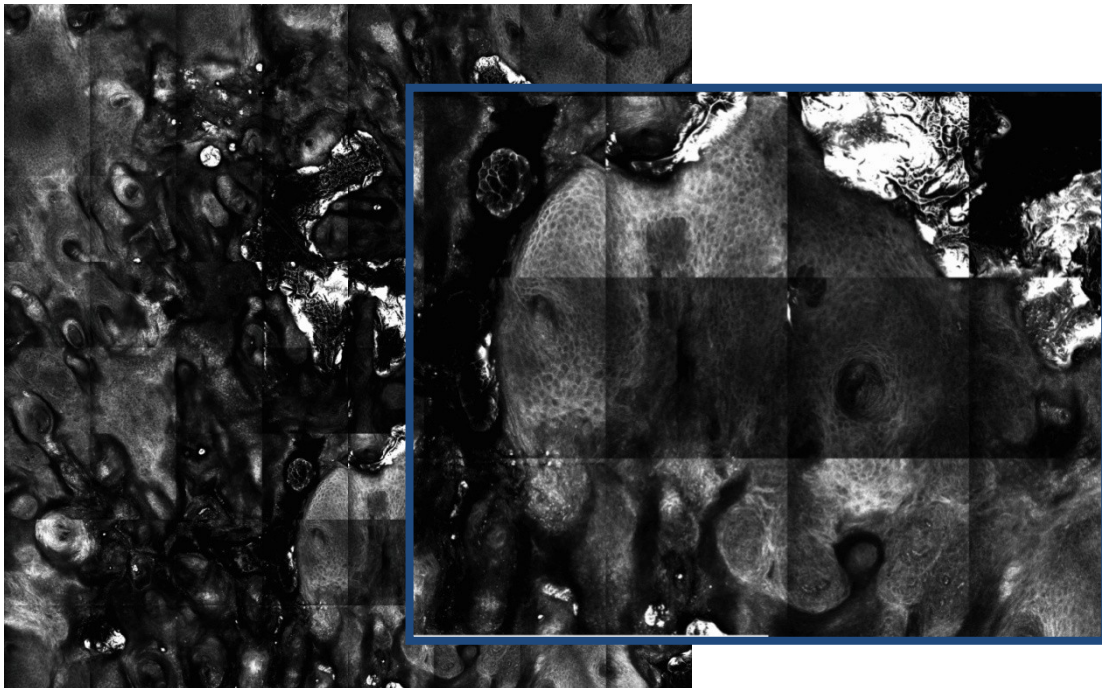


Abbildung 9 Parakeratose

3.1.3 Diskontinuität des Stratum corneum

RCM Beurteilung: In der Mosaikaufnahme des Stratum corneum zeigt sich eine Unterbrechung des Mosaik Musters.

Beurteilungsschema:

- Ja
- Nein
- Nicht beurteilbar

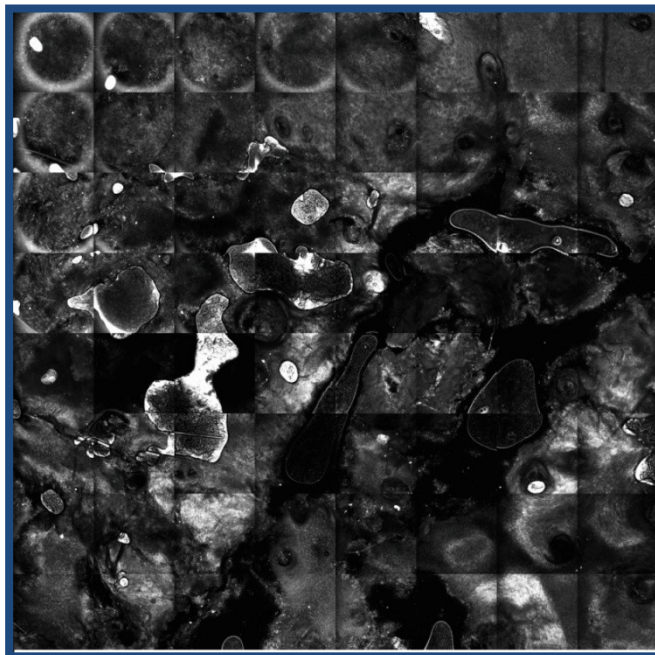


Abbildung 10 Diskontinuität des Stratum corneum

3.1.4 Atypisches Honigwabenmuster

RCM Beurteilung: Polygonale Zellen (10 bis 20 um im Durchmesser) mit dunklen Kernen und hellen Interzellularräumen zeichnen ein Honigwabenmuster aus. Ist dieses Muster unregelmäßig in Größe, Form oder Anordnung ist es als atypisch zu werten.

Differentialdiagnostisch kommt eine Proliferation atypischer Keratinozyten auch im malignen Melanom und Basalzellkarzinom sowie im Morbus Bowen vor (65).

Beurteilungsschema:

- Nicht vorhanden
- Mild
- Moderat
- Stark
- Nicht beurteilbar

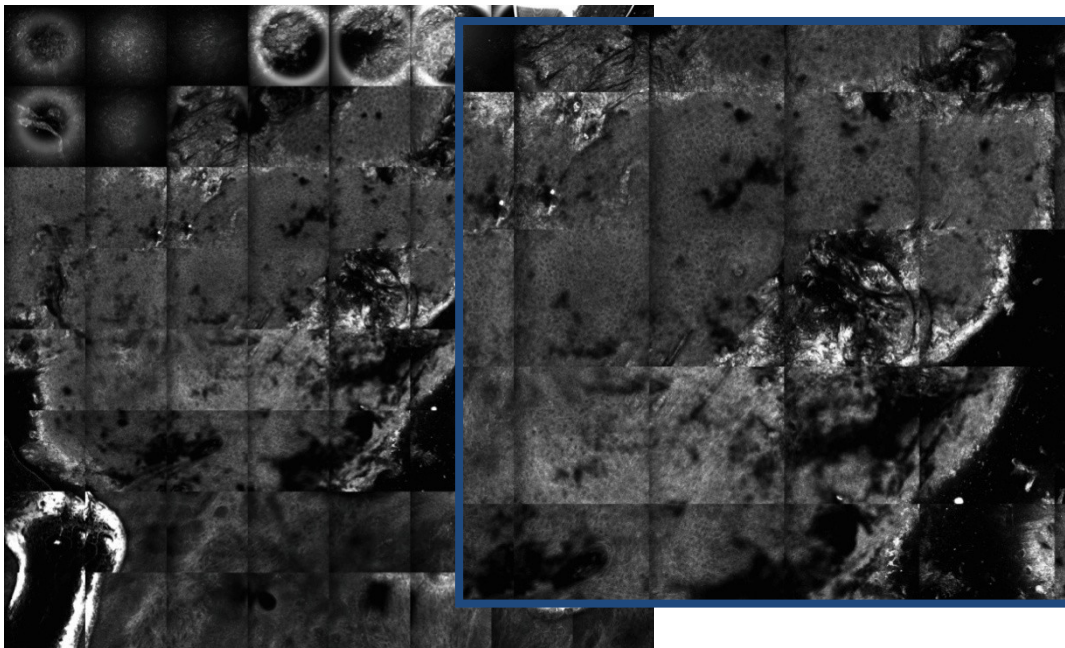


Abbildung 11 Atypisches Honigwabenmuster

3.1.5 Round nucleated cells

RCM Beurteilung: Round nucleated cells stellen sich als scharf begrenzte Zellen mit heller Außenlinie und dunklem Nukleus, entsprechend atypischer Keratinozyten oder dyskeratotischen Zellen dar (56). Ihr Vorkommen wurde gehäuft im SCC beobachtet (55).

Beurteilungsschema:

- Ja
- Nein
- Nicht beurteilbar

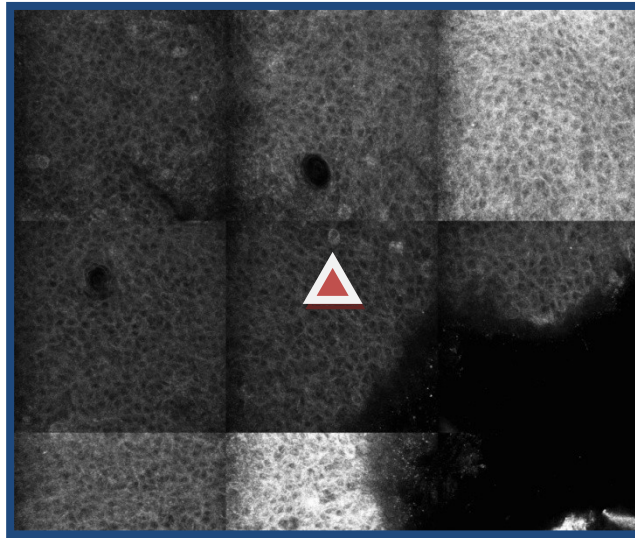


Abbildung 12 Round nucleated cells

3.1.6 Ungeordnetes Epidermismuster

RCM Kriterien: Es zeigt sich eine ungeordnete Architektur des Stratum spinosum mit Verlust des Honigwabenmusters. Die zellulären Grenzen sind nicht mehr klar erkennbar, es kommt zu einem Verlust der netzförmigen Anordnung (56).

Beurteilungsschema

- Ja
- Nein
- Nicht beurteilbar

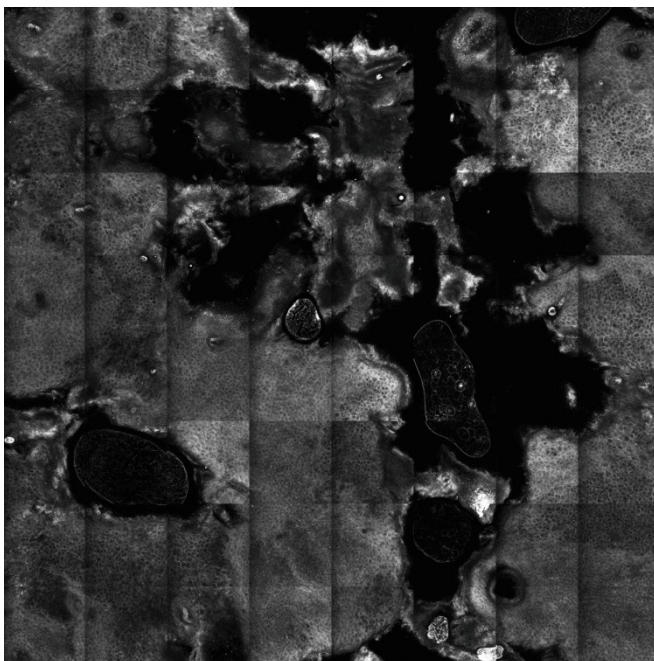


Abbildung 13 Ungeordnetes Epidermismuster

3.1.7 Entzündungsinfiltrat der Epidermis

RCM-Beurteilung: Ein Entzündungsinfiltrat stellt sich als einzelne oder in Gruppen vorkommende rund bis polygonale, helle Spots (<10 µm) dar. Die leicht bis stark reflektierenden Zellen im Stratum spinosum sind zwischen den Keratinozyten lokalisiert.

Differentialdiagnostisch kommen Entzündungszellen bei entzündlichen Hauterkrankungen wie Psoriasis, aber auch bei kutanen T- Zell Lymphomen vor (65).

Beurteilungsschema:

- Nicht vorhanden
- Mild
- Moderat
- Stark
- Nicht beurteilbar

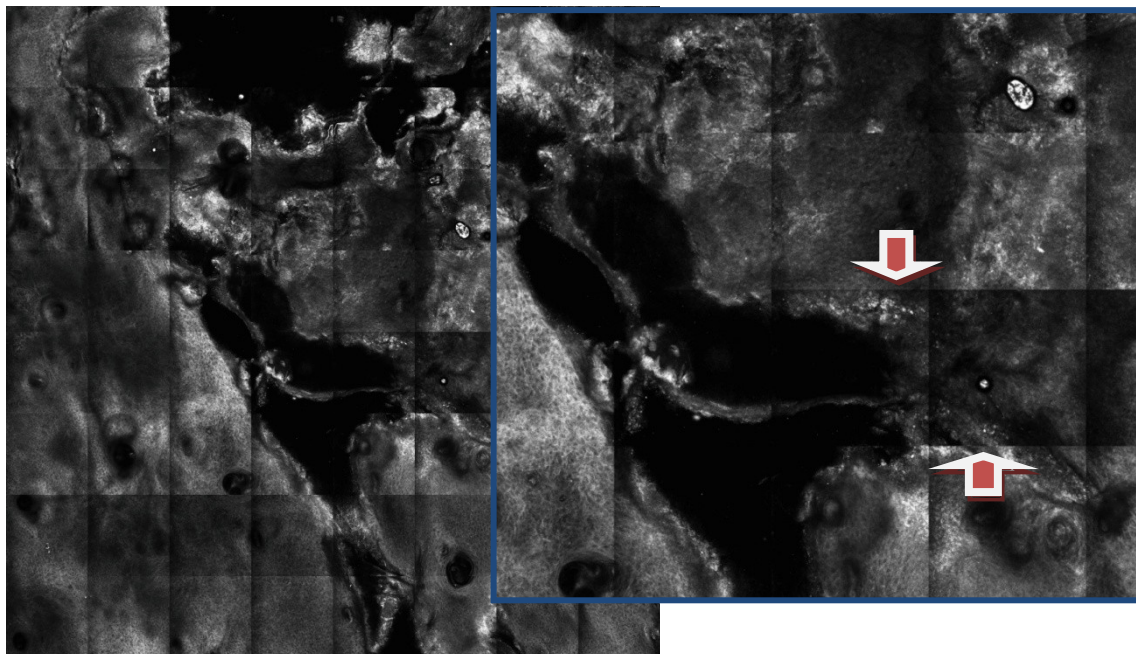


Abbildung 14 Entzündungszellen der Epidermis

3.1.8 Dendritische Zellen

RCM Beurteilung: Helle, fadenförmige Strukturen in der gesamten Dermis

Beurteilungsschema:

- Ja
- Nein
- Nicht beurteilbar

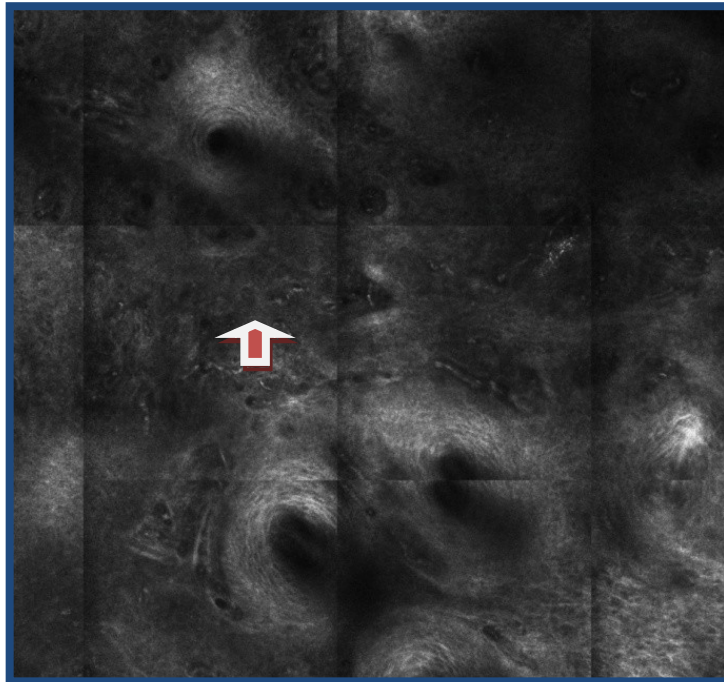


Abbildung 15 Dendritische Zellen

3.1.9 Entzündungsinfiltrat der Dermis

RCM Beurteilung: Es stellen sich einzelne oder gruppierte rund bis ovale, wenig reflektierende Zellen, die kleiner als 10 um sind, dar. Sie kommen in der papillären Dermis, häufig zusammen mit Melanophagen (polygonale Strukturen), vor.

Differentialdiagnostisch ist, wie bei einem Entzündungsinfiltrat in der Epidermis, an entzündliche Hauterkrankungen wie auch an ein kutanes T Zell Lymphom zu denken (65).

Beurteilungsschema:

- Nicht vorhanden
- Mild
- Moderat
- Stark
- Nicht beurteilbar

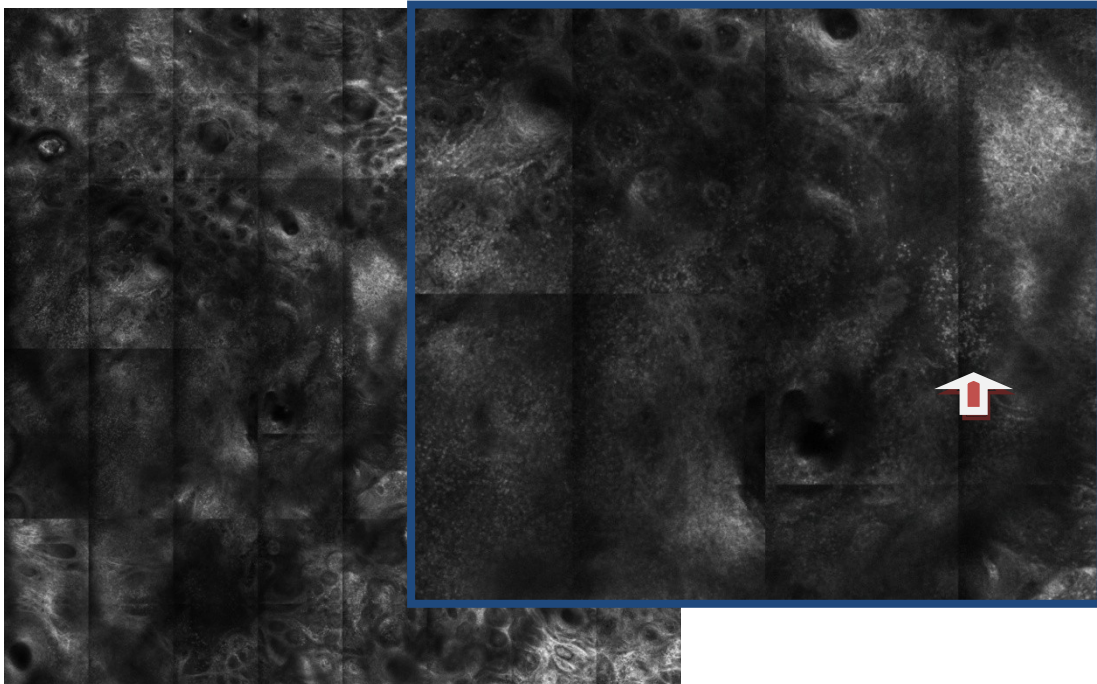


Abbildung 16 Entzündungsinfiltrat der Dermis

3.1.10 Solare Elastose

RCM Beurteilung: Im Elektronenmikroskop zeigt sich ein mäßig reflektierendes, schnurartiges Material, häufig in der Nähe zu kollagenen Bündeln. (Ulrich und Astner, reflectance confocal microscopy hofmann wellenhof)

Die solare Elastose kann *differentialdiagnostisch* auch in anderen epithelialen Tumoren, wie auch in Lentigo maligna Melanomen vorkommen (65):

Beurteilungsschema:

- Ja
- Nein
- Nicht beurteilbar

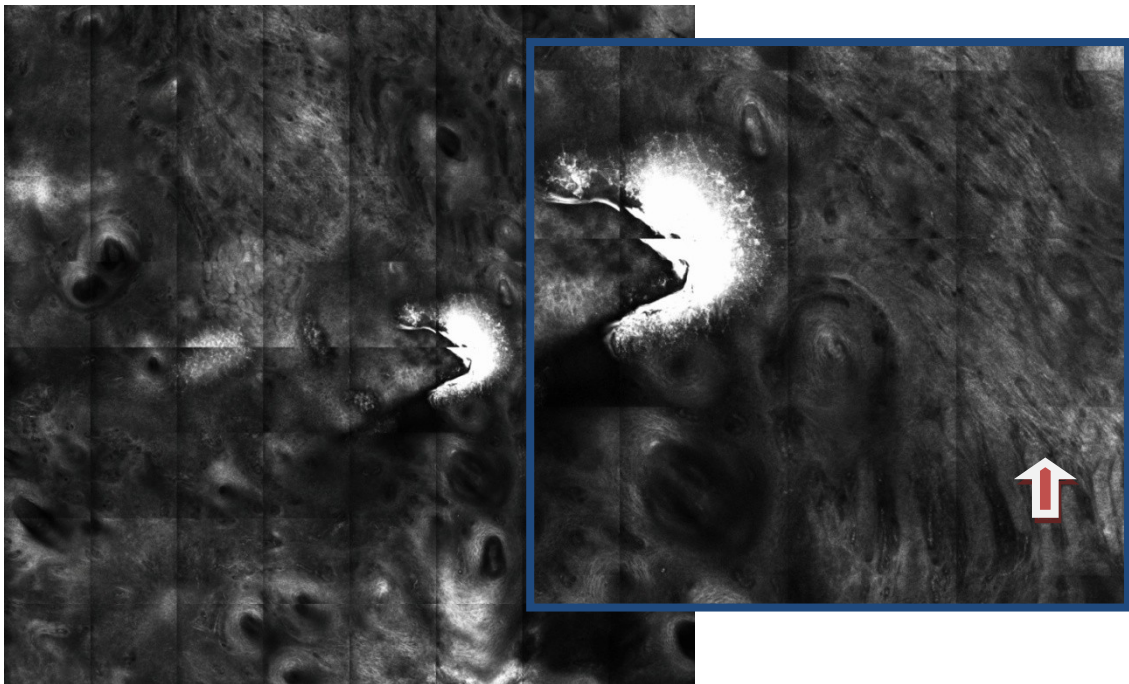


Abbildung 17 Solare Elastose

3.1.11 Runde Kapillaren

RCM Beurteilung: Runde Kapillaren stellen sich als dunkle, oval - runde Felder, in der papillaren Dermis dar. Bei der in vivo Darstellung kann man darin kleine, sich bewegende Zellen erkennen, die den Erythrozyten entsprechen.

Runde Kapillaren kommen zwar in entzündlichen Hauterkrankungen und anderen Hauttumoren vor, weisen jedoch eine andere Morphologie in der RCM Darstellung auf. Im Basalzellkarzinom sind beispielsweise eher horizontal ausgerichtete, lineare und aufgezweigte Gefäße erkennbar. In der Seborrhoischen Keratose stellen sich häufig gewundene Gefäße dar. (65)

Beurteilungsschema:

- Nicht vorhanden
- Mild
- Moderat
- Stark
- Nicht beurteilbar

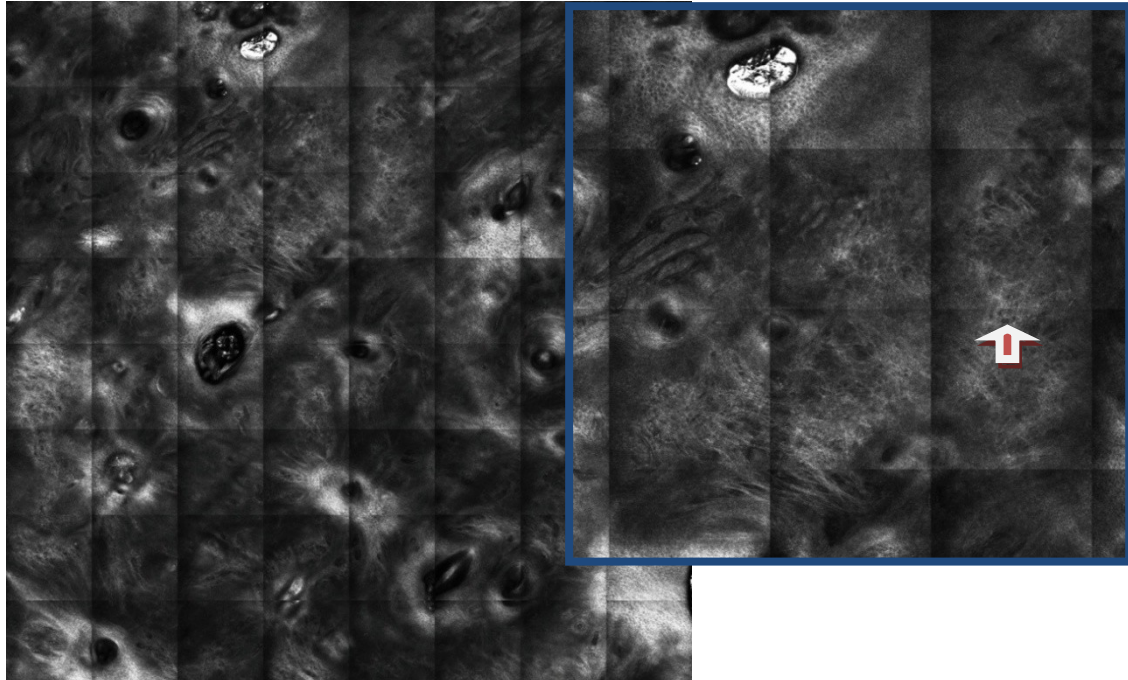


Abbildung 18 Runde Kapillaren

3.1.12 Polymorphe Kapillaren

RCM Beurteilung: Polymorphe Kapillaren stellen sich als dunkle Felder diverser Form dar. Häufig sind die Gefäße häkchenförmig, länglich oder dilatiert.

Beurteilungsschema:

- Nicht vorhanden
- Mild
- Moderat
- Schwer
- Nicht beurteilbar

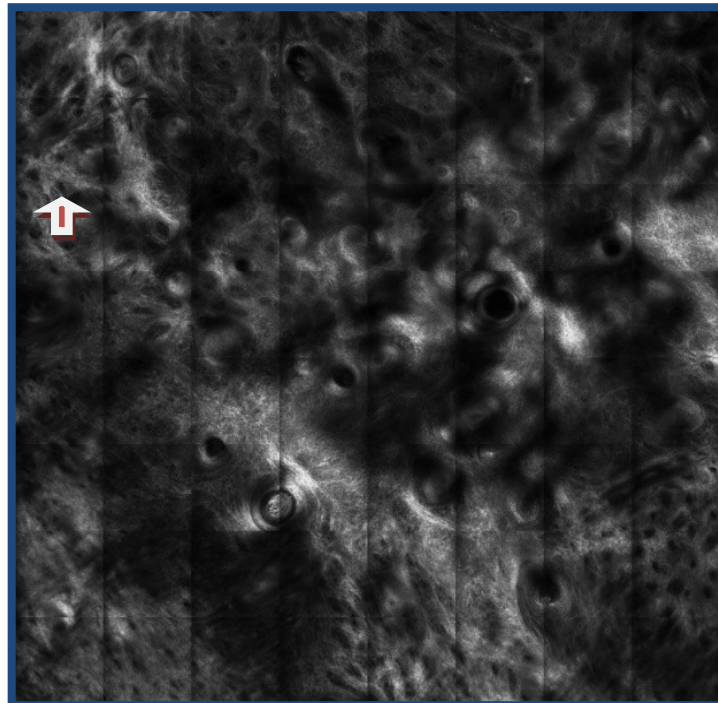


Abbildung 19 Polymorphe Kapillaren

3.2 *Histologische Ergebnisse der Läsionen*

In der Biopsie Gruppe wurden 10 Patienten/Patientinnen eingeschlossen. Insgesamt 22 Läsionen, die klinisch als AK eingeschätzt wurden, konnten zur histologischen Beurteilung herangezogen werden. Nach der klinischen Auswahl der AK wurde eine RCM Aufnahme erstellt und eine Stanze der Läsion zur Differenzierung der AK zu einem Plattenepithelkarzinom durchgeführt. 13 der 22

biopsierten Läsionen wurden korrekt als aktinische Keratose identifiziert (59%), zwei davon wiesen bereits einen Übergang in ein SCC auf. Dieses Ergebnis liegt unter dem Erwartungswert von 81%-91%, wie er in verschiedenen Studien angenommen wird (66,67).

In sieben weiteren Läsionen konnte eine eindeutige histologische Differentialdiagnose gestellt werden. In zwei Läsionen konnte ein hochdifferenziertes SCC nachgewiesen werden. Vier der vermuteten AKs, stellten sich histologisch als Basaliome, eine weitere als Verruca seborrhica heraus und konnten in der RCM nicht als solche identifiziert werden. Zwei Läsionen waren aufgrund schlechter Materialqualität nicht eindeutig beurteilbar.

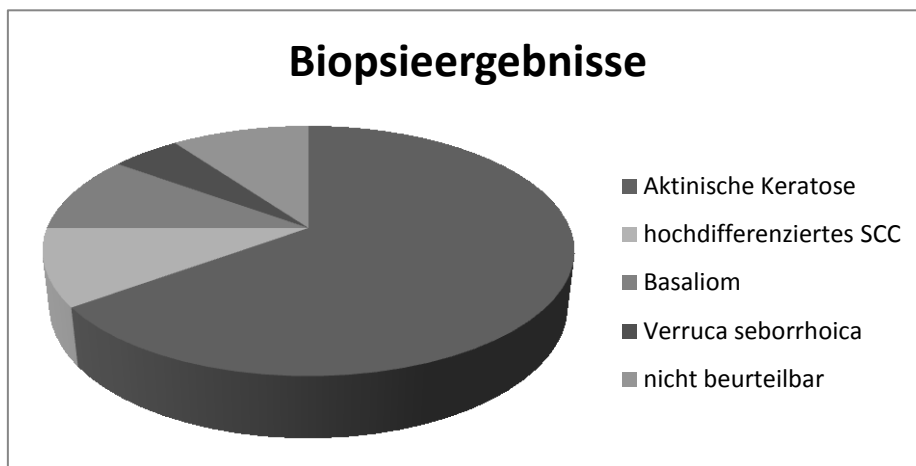


Abbildung 20 prozentuelle Darstellung der Biopsieergebnisse

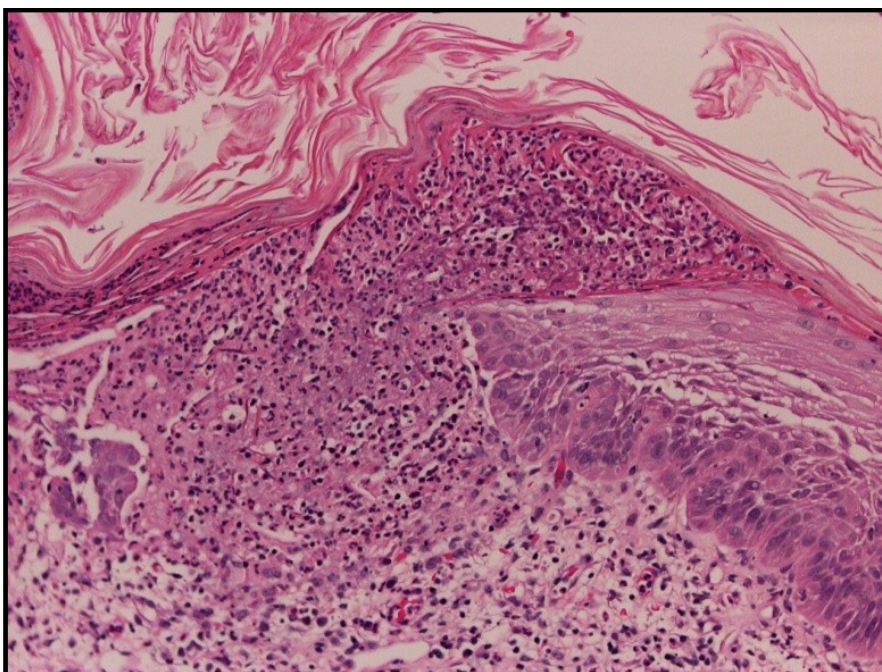


Abbildung 21 Histologisches Bild einer aktinischen Keratose

3.3 Statistische Ergebnisse und deren Vergleich mit denen der Expertengruppe/Expertinnengruppe

In der tabellarischen Aufschlüsselung sind die prozentuellen Übereinstimmungen der Studentin und des Expertenteams für die Kryotherapie- und PDT- Gruppe dargestellt. Weiters wurden die Ergebnisse des Grazer Expertenteams mit denen des italienischen Facharztes Dr. Pellacani für die PDT Gruppe verglichen (71).

Deutlich ist im Folgenden, dass die prozentuelle Beurteilungsübereinstimmung der Studentin und der Experten-/Expertinnengruppe, in der erstbeurteilten Kryotherapie Gruppe schlechtere Ergebnisse aufwies, als in der zweitbeurteilten PDT Gruppe. Insgesamt konnte die Beurteilungsübereinstimmung der zweitbeurteilten PDT Gruppe in 11/12 Kriterien mit steigender Übung verbessert werden. Vor Allem die Übereinstimmung bei der „solaren Elastose“, die um 39 Prozentpunkte gegenüber der Kryotherapie-Gruppe gesteigert werden konnte, scheint von repetitiver Einschätzung zu profitieren. Einzig das Kriterium „runde Blutgefäße“ konnte keinen Übereinstimmungszuwachs erreichen. Weiters ist aus Tabelle 4 zu entnehmen, dass in der Kryotherapie-Gruppe nur 2/12 Kriterien eine Übereinstimmung von >50% erreichen konnten, in der PDT Gruppe hingegen bereits 8/12 Kriterien.

Des Weiteren wurde eine Auswertung in den kategorischen Kriterien vorgenommen, also für Deskriptoren die als *nicht vorhanden(1)*, *mild(2)*, *moderat(3)* oder *stark(4)* beurteilt wurden und zwischen welchen maximal 1 Punkt in der Beurteilung lag. In den kategorischen Kriterien lag die Übereinstimmung zwischen 53% und 67% in der Kryotherapie-Gruppe, in der PDT Gruppe konnte die Studentin bereits eine Übereinstimmungsrate zwischen 69% bis 88% erreichen.

Die niedrigste Übereinstimmung von 26% in der Beurteilung des *Entzündungsinfiltrat der Dermis* (Kryotherapie) könnte an der Fehlinterpretation hyperreflektiver Strukturen liegen. Der höchste Übereinstimmungswert von 88% konnte für das *atypische Honigwabenmuster* in der kategorischen Beurteilung erreicht werden und liegt damit über der Beurteilungsübereinstimmung der Experten untereinander. Mit steigender Übung in der Beurteilung der Bilder, konnte sich die Studentin an die Ergebnisse der Experten-/Expertinnengruppe untereinander annähern.

Tabelle 4 Übereinstimmungsergebnisse der Studentin und der Expertengruppe sowie Übereinstimmung der Grazer Expertengruppe und Dr. Pellacani (Italien)

Deskriptor Dichotomes Kriterium (JA/NEIN)	% Übereinstimmung CRYOTHERAPIE	% Übereinstimmung PDT	% Übereinstimmung EXPERTEN PDT
Ungeordnetes Epidermismuster	48	60	37
Hyperkeratose	47	59	63
Parakeratose	35	53	54
Dendritische Zellen	62	66	87
Inflammation Epidermis	40	52	61
Round nucleated cells	51	62	52
Solare Elastose	37	76	--
Stratum corneum Unterbrechung	43	64	37
Atypisches Honigwabenmuster	29	40	--
Inflammation Dermis	26	40	--
Polymorphe Blutgefäße	32	39	--
Runde Blutgefäße	34	43	--
Kategorisches Kriterium % innerhalb eines Punktes*			
Atypisches Honigwabenmuster	65	88	80
Inflammation Dermis	60	78	85
Polymorphe Gefäße	53	69	53
Runde Gefäße	67	82	69

*Pearson Korrelation wurde nur für die dichotomen Kriterien berechnet

- Daten wurden nicht verglichen

Signifikante Parameter sind **blau** gekennzeichnet

3.3.1 Veränderung der Kriterien über die Kontrollzeitpunkte mit Ansprechen auf die Therapie

Ein weiteres Ziel der Studie war es, die Veränderungen der Läsionen unter den Therapien mittels konfokalen Lasermikroskops darzustellen, zu beurteilen und statistisch auszuwerten. Erwartet wurde eine relative bis absolute Verbesserung der Kriterien über die Zeit, welche waren: Strukturverbesserung der Epidermis und Wiederherstellen des Honigwabenmusters. Des Weiteren wurde mit dem

Verschwinden der Hyperkeratose, vermehrte Parakeratose zu Beginn der Therapien durch vermehrten Zellzerfall, danach mit deren Verschwinden gerechnet. Das Auftreten dendritischer Zellen sowie Entzündungszellen in Epidermis und Dermis als Zeichen der körpereigenen Reaktion auf die Therapie, Verschwinden der sog. round nucleated cells, deren Auftreten häufig in Plattenepithelkarzinomen beobachtet wurde(55), sowie einem Rückgang der Zahl an polymorphen Blutgefäßen, wurde ebenso erwartet. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse stellen die berechneten Veränderungen, der von der Studentin beurteilten Bilder, dar. In der Auswertung wurde die Veränderung der Parameter mittels der Odds Ratio statistisch errechnet und dafür der p-value<0,05 als Signifikanzparameter herangezogen.

Wie bereits erläutert, konnte die erstbeurteilte Kryo-Gruppe wegen niedriger Übereinstimmung mit den Experten und eines unzureichenden Signifikanzniveaus für die meisten Parameter keine eindeutigen Ergebnisse darstellen. Daher konnte für die Gruppe der Kryotherapie nur ein Trend beobachtet werden, welcher an dieser Stelle trotzdem erwähnt werden soll.

So wurde beim Kontrollzeitpunkt 1 Woche nach Kryotherapie, eine signifikante Regredienz der Häufigkeit der des *ungeordneten Epidermismusters*, der *Entzündungszellen in der Dermis* und des *atypischen Honigwabenmusters*, beobachtet.

12 Wochen nach Therapie konnten bereits 10/12 Parametern seltener nachgewiesen werden als zu Beginn der Studie. Bei einem p- value <0,05 erreichten jedoch nur 3/12 Parameter statistische Signifikanz.

Tabelle 5 Veränderungen von Baseline zu 6 Monaten nach Kryotherapie

Deskriptor	Odds Ratio für "Ja"	95% Konfidenzintervall	p-value
Ungeordnetes Epidermismuster	0,07	(0.03, 0.161)	4,25E-10
Hyperkeratose	NA	(NA, NA)	NA
Parakeratose	0,978	(0.476, 2.01)	0,9512581
Dendritische Zellen	0,522	(0.106, 2.568)	0,4240131
Inflammation Epidermis	1,275	(0.477, 3.41)	0,6284014
Round nucleated cells	0,276	(0.066, 1.149)	0,07685232
Solare Elastose	1,898	(0.762, 4.728)	0,1685788
Stratum corneum Unterbrechung	0,669	(0.209, 2.146)	0,4994705
Deskriptor	Change in Score	95% Konfidenzintervall	p-value
Atypisches Honigwabenmuster	-0,8885	(-1.245, -0.532)	1,04E-06
Inflammation Dermis	-0,1672	(-0.353, 0.019)	0,07787861
Polymorphe Gefäße	-0,0222	(-0.397, 0.352)	0,907462
Runde Gefäße	0,4	(0.125, 0.675)	0,004420192

Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Ergebnisse nach 6 Monaten gelegt, um einen etwaigen stabilen Therapieerfolg beurteilen zu können. Nach 24 Wochen wurde ein Trend des Therapieerfolges sichtbar (Tabelle 5). 8/11 Kriterien wurden nach 6 Monaten seltener beobachtet als zu Beginn der Studie. In der Kryotherapie-Gruppe scheint solare Elastose langfristig häufiger aufzutreten und auch Entzündungszellen in der Epidermis wurden erst am letzten Kontrollzeitpunkt häufiger gesehen. Beide Ergebnisse erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Die Beurteilung der **PDT Gruppe** durch die Studentin konnte wesentlich aussagekräftigere Ergebnisse abbilden, da die Übereinstimmung mit den Experten gesteigert werden konnte und das Signifikanzniveau $p < 0,05$ von mehreren Parametern erreicht wurde (in Tabelle 6 fett gekennzeichnet). In der PDT Gruppe wurden neben der Baseline und den beschriebenen Kontrollterminen, zusätzlich direkt vor und nach PDT RCM Aufnahmen erstellt. Das *ungeordnete Epidermismuster*, die *Hyperkeratose* und *Parakeratose* sowie *dendritische Zellen* und *Stratum corneum Unterbrechung* wurden sofort nach der Therapie häufiger beobachtet. Diese Tatsache könnte damit erklärt werden, dass die aufgetragene Aminolävulinsäurecreme die Strukturen im RCM hyperreflektiver und damit deutlicher erscheinen ließ.

Bei der Kontrolle nach **1 Woche** zeigte sich in den Bildern eine signifikante Zunahme der *Parakeratose* durch posttherapeutischen Zellzerfall und bereits eine Abnahme an Häufigkeit der *Stratum corneum Unterbrechung* und *polymorpher Gefäße*(signifikante Parameter). Auch zu Beginn vorhandene *Entzündungszellen der Epidermis* waren seltener zu beobachten(n.s.). Bereits nach 7 Tagen war das *atypische Honigwabenmuster* (n.s.) seltener zu beobachten.

12 Wochen nach PDT kam es zu einer Abnahme der Beurteilungshäufigkeit aller Parameter, einzig runde Gefäße scheinen gehäuft aufzutreten. Diese Tatsache kann als Darstellung des therapeutischen Erfolges interpretiert werden. Die Kriterien ungeordnetes Epidermismuster, Entzündungszellen in der Epidermis und Stratum corneum Unterbrechung, sowie die kategorischen Kriterien atypisches Honigwabenmuster und Entzündungsinfiltrat in der Dermis konnten in dieser Gruppe das Signifikanzniveau $p < 0,05$ erfüllen.

Beim letzten Kontrolltermin **6 Monate** nach PDT (Tabelle 6) zeigte sich im Vergleich zur Voruntersuchung eine konstante Befundregredienz. *Alle Parameter (ausgenommen Parakeratose, n.s.)* der dichotomen und kategorischen Deskriptoren zeigten eine konstante Abnahme der Befundhäufigkeit im Vergleich zur Baseline. Die *Kriterien ungeordnetes Epidermismuster, Hyperkeratose, Entzündungszellen in der Epidermis und Stratum corneum Unterbrechung* wie auch die dichotomen Kriterien *atypisches Honigwabenmuster und Inflammation der Dermis* erreichten mit $p < 0,05$ statistische Signifikanz.

Tabelle 6 Veränderungen von Baseline zu 6 Monate nach PDT

Deskriptor	Odds Ratio für "Ja"	95% Konfidenzintervall	p-value
Ungeordnetes Epidermismuster	0,262	(0.152, 0.453)	1,66E-06
Hyperkeratose	0,413	(0.207, 0.823)	0,01197897
Parakeratose	1,004	(0.634, 1.59)	0,9880921
Dendritische Zellen	0,481	(0.068, 3.387)	0,4619674
Inflammation Epidermis	0,336	(0.135, 0.838)	0,01929408
Round nucleated cells	0,58	(0.276, 1.217)	0,1496716
Solare Elastose	0,494	(0.078, 3.112)	0,4526339
Stratum corneum Unterbrechung	0,245	(0.137, 0.437)	2,02E-06

Deskriptor	Change in Score	95% Konfidenzintervall	p-value
Atypisches Honigwabenmuster	-0,7407	(-0.917, -0.564)	1,73E-16
Inflammation Dermis	-0,5068	(-0.815, -0.199)	0,001272016
Polymorphe Gefäße	-0,1511	(-0.351, 0.049)	0,1389929
Runde Gefäße	-0,0542	(-0.315, 0.207)	0,6836252

3.3.2 Vergleich AK und PD

Sonnengeschädigte Haut in der Nähe aktinischer Keratosen weisen häufig bereits Kriterien von AKs auf(26). In der unten dargestellten Grafik (Abbildung 22), ist anhand des Beispiels der Epidermis, der Vergleich gesunder Haut an einer lichtgeschützten Stelle im Vergleich zu PD und einer klinisch fortgeschrittenen AK (AK2) dargestellt. Die Darstellung gesunder Haut zeichnet sich durch Blässe und homogener Struktur aus. Die RCM Aufnahme zeigt ein geordnetes Epidermismuster, gleich großer, regelmäßig angeordneter Zellen und ein geordnetes Honigwabenmuster. Es sind keine Entzündungszellen vorhanden.

Die PD stellt sich dagegen dermatoskopisch bereits als entzündlich gerötete Haut mit Teleangliektasien dar. In der RCM zeigt das Epidermismuster eine beginnende Unordnung des Honigwabenmusters und vereinzelte Entzündungszellen. Sehr deutlich erkennbar am dermatoskopischen Bild der AK, ist die rötliche Makulae auf entzündlichem Grund durchzogen mit Teleangliektasien und kleinen Papeln. Die RCM Aufnahme der AK zeigt bereits ein stark ungeordnetes Epidermismuster, das zentral ein dunkles Areal aufweist, das der Hyperkeratose entspricht.

Zur Beurteilungsauswertung in diesem Vergleich wurden Odds ratios mit einem 95% Konfidenzintervall und einem p-value <0,05 zur Bestimmung der Parameterveränderung zwischen den beiden AKs (AK1 und AK2) und PD errechnet. In dieser Studie konnte in den Ergebnissen der Studentin gezeigt werden, dass 8/8 der dichotomen Kriterien (PDT) und 6/7 dichotomen Kriterien in der Kryotherapie-Gruppe häufiger in AKs vorkommen als in sonnengeschädigter Haut. 5 der 7 Kriterien der Kryotherapie- Gruppe, jedoch nur 3 der 8 Kriterien der PDT Gruppe erreichten statistische Signifikanz. In der Kryotherapie-Gruppe konnten einzig Entzündungszellen in der Epidermis häufiger in PD als in AK gesehen werden.

Zusammengefasst entspricht dies einem signifikant gehäuften Vorkommen von *ungeordnetem Epidermismuster, Hyperkeratose und round nucleated cells in beiden Therapiegruppen sowie Entzündungszellen in der Epidermis, und solare Elastose in der Kryotherapiegruppe. Insgesamt ist die Progredienz der Kriterien von PD zu AK also deutlich darstellbar.*

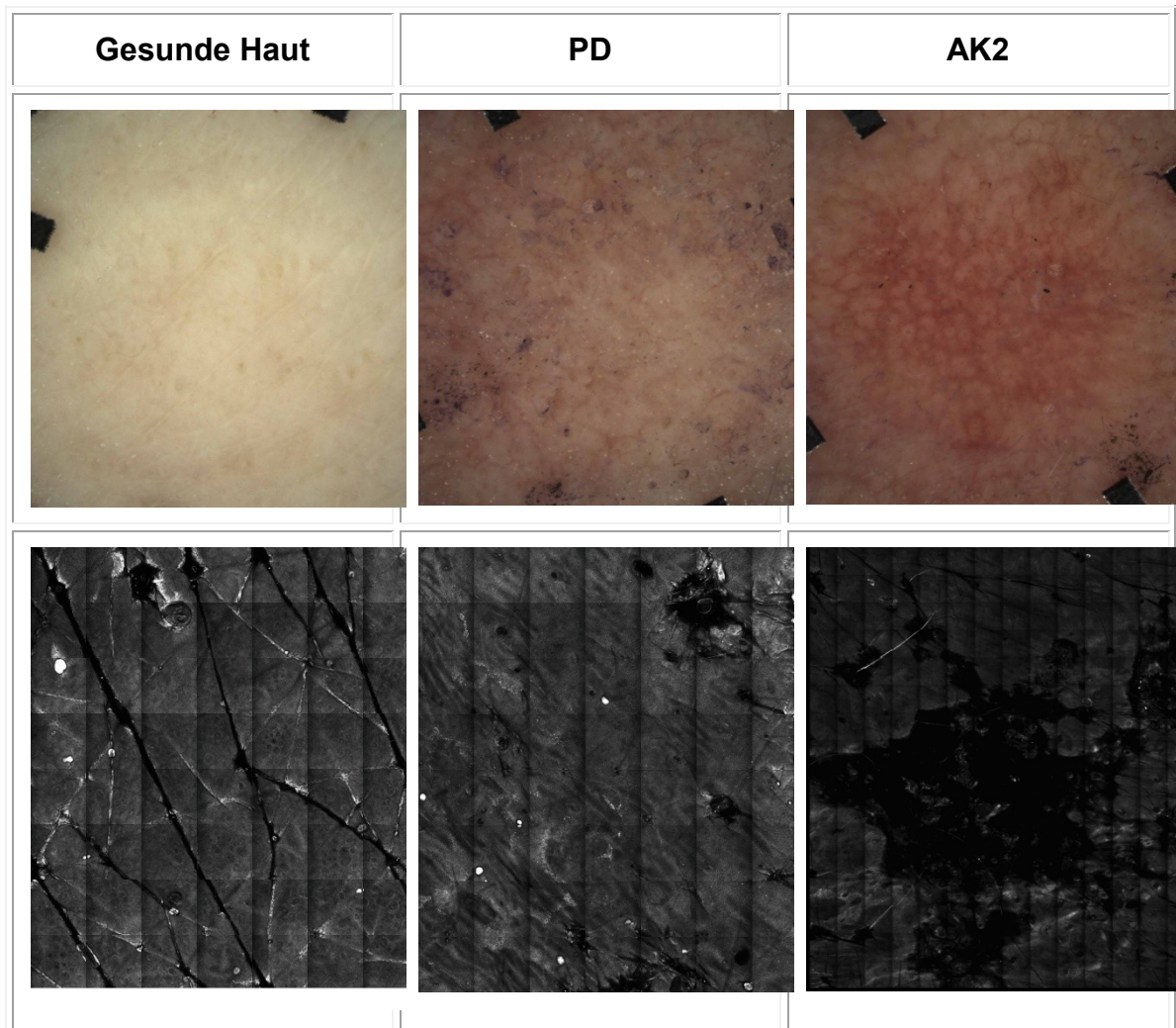


Abbildung 22 Dermatoskopische und RCM Darstellung der Progredienz in eine AK (vergrößerter Bildausschnitt, 1 Feld =500 µm)

3.3.3 Vergleich AK1 und AK2

Die klinische Differenzierung zwischen AK1 und AK2 erfolgte anhand makroskopischer Kriterien, also Dicke der Hyperkeratose, Rauigkeit und/oder Rötung und dermatoskopischer Kriterien wie Teleangiektasien und erdbeerartigem Aussehen.

Im Gegensatz zum eindeutig häufigeren Vorkommen der Kriterien in AK als in PD, geht aus den statistischen Ergebnissen kein eindeutiger Unterschied zu einer Progredienz im Vergleich AK1 zu AK2 hervor. In der Kryotherapie Gruppe konnten einzig die Parameter round nucleated cells und solare Elastose statistisch relevant häufiger in AK2 beobachtet werden.

3.3.4 Ergebnisvergleich von Kryotherapie und Photodynamischer Therapie

Beide Therapieverfahren konnten sich in der Behandlung aktinischer Keratosen etablieren. In beiden Fällen handelt es sich um potente Methoden einen Zellzerfall hervorzurufen, und so Tumorzellen zu zerstören. Insgesamt wird die Wirksamkeit der Kryotherapie in der Behandlung der AK auch in Studien evaluiert. Mehrere prospektive, randomisierte Studien weisen auf vergleichbare Ergebnisse mit denen der PDT hin, wobei hinsichtlich des kosmetischen Outcomes, Patienten die PDT zu bevorzugen scheinen (57, 58).

Auch in dieser Studie konnte ein errechneter Trend über alle Kontrollzeitpunkte die Wirksamkeit beider Therapieformen zeigen. Alle evaluierten Parameter der PDT Gruppe, mit Ausnahme der runden Blutgefäße, verzeichneten einen Rückgang, wobei auch hier nur 5/12 Kriterien statistische Signifikanz erreichten. Auch in der Kryotherapie-Gruppe konnte ein klarer Trend zur Regression aller Parameter, mit Ausnahme der solaren Elastose (n.s.) und runder Blutgefäße(s.), dargestellt werden.

4 Diskussion

Die Verwendung der RCM in der Progressionsüberwachung und Therapiekontrolle therapeutischer Maßnahmen von AKs ist eine neuartige Möglichkeit in der Dermatologie. Die Diagnose von AKs erfolgte bisher in klinischer Beurteilung und mittels nachfolgender Biopsie um ein invasives Plattenepithelkarzinom oder andere Differentialdiagnosen auszuschließen. Das bedeutsamste Argument für das Verfahren ist daher unbestritten die nichtinvasive Möglichkeit, zelluläre Strukturen darzustellen und zu interpretieren. Bisher haben sich jedoch noch keine klaren Deskriptoren zur Interpretation und Evaluierung aktinischer Keratosen in der RCM etabliert, sodass es das Hauptziel der Studie war, mögliche zelluläre und architektonische Kriterien in ihrer Anwendung zu testen. Eine der bedeutsamsten Arbeiten zu diesem Thema stammt von Ulrich et al(59), in welcher einige Kriterien zur Evaluierung im Setting einer Imiquimod Therapie vorgeschlagen werden. Hierzu entschied sich das Projektteam für die Kriterien: *Hyperkeratose, Parakeratose, das Vorhandensein dendritischer Zellen, inflammatorischer Zellen in Epidermis und Dermis, solarer Elastose* sowie *Diskontinuität des Stratum corneums*. Auch das Vorhandensein sogenannter *round nucleated cells* wurde beurteilt. Die Vaskularisierung der Keratosen wurden auf *polymorphe und runde Blutgefäße* untersucht.

In der Studie wurden 30 Patienten/Patientinnen in 3 Therapiegruppen (PDT, Kryotherapie und Shave-Biopsie) zu je 10 Studienteilnehmern aufgeteilt. Die Basis dieser Arbeit stützt sich im Wesentlichen auf die Interpretation der Bilder der PDT und Kryotherapie Gruppe durch die Studentin. Überprüft wurden die Kriterien hinsichtlich ihrer **Veränderung über den Kontrollzeitraum und im direkten Vergleich zueinander (AK/PD und (AK1/AK2))** sowie dem **Vergleich der Bildbeurteilung der Anfängerin und geschulter Fachärzte/Fachärztinnen**. Insgesamt wurde ein deutlicher Bewertungsunterschied erwartet, da das Erkennen und Interpretieren von einzelnen Kriterien auf den schwarz-weißen Aufnahmen sich beim ersten Versuch von studentischer Seite als stark fehlerbehaftet herausstellte. Daher erfolgten eine Selbsteinschulung anhand eines selbstgestalteten Tutorials von Clara Curiel,MD und eine Teilnahme an den Bewertungssitzungen der Expertinnen/Experten. Die Auswertung zeigte deutliche

Bewertungsunterschiede zwischen der Gruppe der Fachärzte/Fachärztinnen und der Studentin. Die erstbeurteilte Gruppe der Kryotherapie schnitt hinsichtlich Signifikanz der Ergebnisse sowie prozentueller Übereinstimmung mit den Expertinnen/Experten deutlich schlechter ab als die darauffolgend beurteilte PDT Gruppe. Dies lässt vermuten, dass es im Rahmen der Beurteilung der Kryo-Gruppe zu einer durch Übung erzielten Verbesserung gekommen ist. Das Erkennen und Differenzieren der zahlreichen Strukturen auf den RCM Aufnahmen, unterscheidet sich in beiden Therapiegruppen kaum, daher kann eine Verbesserung der Beurteilungsfähigkeiten als Grund für die verbesserte Übereinstimmung angenommen werden.

Das beste Übereinstimmungsergebnis von 88% konnte somit in der PDT Gruppe für das *atypische Honigwabenmuster* (kategorisches Kriterium) erreicht werden und liegt somit 23% über dem Ergebnis der Kryotherapie Gruppe. Im Mittel konnte eine prozentuelle Übereinstimmungsrate von 39,5%(dichotome Deskriptoren) bzw. 60,5%(kategorische Deskriptoren) für die Kryotherapie-Gruppe und 49,5% (dichotome Deskriptoren) bzw. 79%(kategorische Deskriptoren) für die PDT-Gruppe deutlich gemacht werden. Dies entspricht einer prozentuellen Steigerung von bis zu +39% (solare Elastose).Einzig in der Beurteilung runder Blutgefäße konnte keine Verbesserung erreicht werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in der Kryotherapie-Gruppe nur 2/12 Kriterien eine Übereinstimmung von >50% erreichen konnten, in der PDT Gruppe hingegen bereits 8/12 Kriterien. Die Studentin konnte sich mit steigender Übung also dem Übereinstimmungsergebnis der Experten/Expertinnen untereinander annähern. Insgesamt scheinen einige Kriterien leichter erlernbar zu sein als andere. Diese Annahme spiegelte sich im stark schwankenden Übereinstimmungszuwachs unter den Kriterien wider. Die Kriterien *solare Elastose*, *dendritische Zellen* sowie *die Unterbrechung des Stratum corneum* scheinen auch für einen Anfänger leicht interpretierbar zu sein, da diese Kriterien die höchsten Übereinstimmungsergebnisse erzielten. Die Beurteilung runder und polymorpher Gefäße brachte jedoch größtenteils statistisch unzureichende Ergebnisse, sodass ein erhöhter Schwierigkeitsgrad für diese Kriterien annehmbar ist.

Die Ursache für die starke Schwankungsbreite der prozentuellen Übereinstimmung könnte an einer für Anfänger unzureichender Definition der

Parameter im Tutorial liegen. Hier ist besonders der Parameter der „polymorphen Gefäße“ hervorzuheben, dessen Beurteilung subjektiv schwierig war und sich im relativ niedrigen Übereinstimmungsergebnis mit der Expertengruppe (Kryotherapie 32%, PDT 39%) bestätigte. Dieses Ergebnis könnte verbessert werden, indem die Beurteilung in Live-Aufnahme geübt wird, da hierbei der Blutfluss durch das Gefäß darstellbar ist und somit eine Hilfe in der Interpretation darstellt.

Ein anderer Grund für Beurteilungsunterschiede, insbesondere für die kategorischen Kriterien, lag vermutlich in der groben Unterteilung der Kriterien. Es wurde lediglich zwischen nicht vorhanden/mild/moderat/stark unterschieden, eine genaue Zellzahl zur Zuordnung wurde nicht festgelegt. Daher unterliegt die Zuteilung zum Häufigkeitsgrad stark der subjektiven Einschätzung. Für zukünftige Projekte dieser Art wäre es daher hilfreich, Zellzahlen zur Einteilung des Schweregrads festzulegen.

Ein weiteres Hauptziel dieser Arbeit war die Beurteilung der Veränderung der Kriterien über den Zeitraum von insgesamt 6 Monaten. Im Detail wurden die **Veränderungen über den Kontrollzeitraum** mittels Odds Ratio in statistischen Zusammenhang gebracht: Veränderung von Baseline zu (post light) 1 Woche/ 3 Monaten und 6 Monaten wurden für beide Therapiemodalitäten dargestellt. Beide Therapien gehören zu den lokal stark destruktiven Verfahren, sodass mit einem guten therapeutischem Outcome gerechnet wurde. Erwartet wurde eine reaktive Häufung von Entzündungszellen, dendritischen Zellen sowie von Zelldetritus in Form von Parakeratose sowie eine Verminderung der für AK typischen, pathologischen Kennzeichen. Da die prozentuelle Übereinstimmung mit den Experten, wie auch die statistische Signifikanz in der Kryotherapie-Gruppe unzureichend war, können über die Ergebnisse dieser Gruppe nur eingeschränkt Aussagen getroffen werden. Die Ursache dafür liegt in erster Linie in der Unerfahrenheit der Studentin im Beurteilen der Bilder. Für zukünftige Studenten/Experten Vergleiche sollte daher der Übungszeitraum länger sein, um auch für die erstbeurteilte Gruppe aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Ein weiterer Grund für eine unzureichende Signifikanz kann auf die relativ geringe Patientenzahl (n=10/ Gruppe) sein. Um generell die statistische Signifikanz zu erhöhen, könnte in Folgestudien das Patientenkollektiv umfangreicher sein, wobei

in den Ergebnissen der Experten/Expertinnen trotz geringer Fallzahl signifikante Verbesserungen zu sehen waren.

Bereits **12 Wochen** nach photodynamischer Therapie kam es zu einer Abnahme der Beurteilungshäufigkeit aller Parameter, einzig runde Gefäße scheinen gehäuft aufzutreten. Diese Tatsache kann als Darstellung des therapeutischen Erfolges interpretiert werden. Die Kriterien ungeordnetes Epidermismuster, Entzündungszellen in der Epidermis und Stratum corneum Unterbechung, sowie die kategorischen Kriterien atypisches Honigwabenmuster und Entzündungsinfiltrat in der Dermis konnten in dieser Gruppe das Signifikanzniveau $p < 0,05$ erfüllen. Beim letzten Kontrolltermin **6 Monate** nach PDT zeigte sich im Vergleich zur Voruntersuchung eine konstante Befundregredienz. *Alle Parameter (ausgenommen Parakeratose, n.s)* der dichotomen und kategorischen Deskriptoren zeigten eine konstante Abnahme der Befundhäufigkeit im Vergleich zur Baseline. Die *Kriterien ungeordnetes Epidermismuster, Hyperkeratose, Entzündungszellen in der Epidermis und Stratum corneum Unterbrechung* wie auch die dichotomen Kriterien *atypisches Honigwabenmuster und Inflammation der Dermis* erreichten mit $p < 0,05$ statistische Signifikanz.

Dies entspricht einer deutlichen Darstellung des Therapieerfolges insbesondere der PDT. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussagen zahlreicher Studien zu diesem Thema, in welchen ähnliche Ansprechraten auf die Therapieformen bereits gezeigt werden konnten. (57,58)

Ein weiteres Ziel der Studie war der **Vergleich der Läsionen AK1 und AK2 sowie der Vergleich der AK zu sonnengeschädigter Haut (PD)**. Die Progredienz in einer AK konnte in dieser Studie nicht nur in klinischer und dermatoskopischer Beurteilung gezeigt werden, sondern auch in den Aufnahmen des RCM. Alle evaluierten Kriterien konnten in AKs häufiger beobachtet werden als in PD. In dieser Studie konnte in den Ergebnissen der Studentin gezeigt werden, dass 8/8 der dichotomen Kriterien (PDT) und 6/7 dichotomen Kriterien in der Kryotherapie-Gruppe häufiger in AKs vorkommen als in sonnengeschädigter Haut. 5 der 7 Kriterien der Kryotherapie- Gruppe, jedoch nur 3 der 8 Kriterien der PDT Gruppe erreichten statistische Signifikanz. In der Kryotherapie-Gruppe konnten einzig Entzündungszellen in der Epidermis häufiger in PD als in AK gesehen werden.

Zusammengefasst entspricht dies einem signifikant gehäuften Vorkommen von *ungeordnetem Epidermismuster, Hyperkeratose und round nucleated cells in beiden Therapiegruppen sowie Entzündungszellen in der Epidermis, und solare Elastose in der Kryotherapiegruppe*. Insgesamt ist die Progredienz der Kriterien von PD zu AK also deutlich darstellbar.

Die Unterscheidung von AK1 und AK2 brachte in der studentischen Beurteilung hingegen weniger deutliche Ergebnisse. In der Kryotherapie Gruppe konnten einzig die Parameter round nucleated cells und solare Elastose statistisch relevant häufiger in AK2 beobachtet werden. Alle anderen getesteten Parameter in den Therapiegruppen erreichten keine statistische Signifikanz und zeichneten auch unter Zusammenschau keinen verfolgbaren Trend ab. Infolgedessen kann interpretiert werden, dass insbesondere im Erkennen feiner Unterschiede, wie sie in der Differenzierung von AK1 und AK2 vorhanden sind, noch weitere Übung notwendig ist.

In der **histologischen Beurteilung** konnte gezeigt werden, dass nur 59% der 22 klinisch beurteilten AKs verifiziert werden konnten. Zwei Läsionen stellten sich bereits als Plattenepithelkarzinome dar. Auch andere Differentialdiagnosen konnten gestellt werden. So handelte es sich in vier weiteren Läsionen um Basaliome und eine Läsion stellte sich als Verruca seborrhoica heraus. Diese Ergebnisse zeigen, dass die klinische Diagnose der AK als alleiniges Instrument unzureichend ist und ein zusätzliches diagnostisches Verfahren notwendig ist. Die RCM bietet hierfür eine sensitive Methode, zelluläre Veränderungen nicht-invasiv, darzustellen. Die Untersuchungen sind beliebig oft wiederholbar und stellen somit eine mögliche Alternative zur Biopsie dar. Diese Tatsache impliziert des Weiteren die Möglichkeit einer Therapiekontrolle wie sie mittels keines anderen Verfahrens gegeben ist.

Limitierend ist jedoch anzumerken, dass die Interpretation der Bilder eine profunde Erfahrung des Anwenders/der Anwenderin voraussetzt. Es konnte gezeigt werden, dass das Erlernen der Interpretation der Aufnahmen eine gute Einschulung, sowie das Üben anhand von mehreren hundert Bildern, voraussetzt.

Insgesamt ist die RCM ein vielversprechendes Verfahren, das in der Diagnostik, aber auch in der Verlaufskontrolle aktinischer Keratosen, großes Potential birgt.

Das bedeutsamste Argument für das Untersuchungsverfahren ist mit Sicherheit die detaillierte Darstellung der Läsion auf zellulärer Ebene, ohne invasiv vorgehen zu müssen. Das RCM könnte somit die Lücke zwischen klinischer und histologischer Beurteilung schließen. Für die Zukunft ist jedoch eine detaillierte Beschreibung der Kriterien zur weiteren Standardisierung der Interpretation notwendig. Die Ergebnisse verschiedener Beurteiler/Beurteilerinnen werden so vergleichbarer, und für Anfänger/Anfängerinnen leichter und schneller erlernbar.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol* 2000 Jan;42(1 Pt 2):11-17.
- (2) Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 2002 Apr;146 Suppl 61:1-6.
- (3) Goodman GJ, Marks R, Selwood TS, Ponsford MW, Pakes W. Non-melanotic skin cancer and solar keratoses in Victoria--clinical studies II. *Australas J Dermatol* 1984 Dec;25(3):103-106.
- (4) Schwartz RA. The actinic keratosis. A perspective and update. *Dermatol Surg* 1997 Nov;23(11):1009-19; quiz 1020-1.
- (5) Brash DE, Ziegler A, Jonason AS, Simon JA, Kunala S, Leffell DJ. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996 Apr;1(2):136-142.
- (6) Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL, et al. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett* 1994 Sep 30;85(1):23-29.
- (7) Stockfleth E, Nindl I, Sterry W, Ulrich C, Schmook T, Meyer T. Human papillomaviruses in transplant-associated skin cancers. *Dermatol Surg* 2004 Apr;30(4 Pt 2):604-609.
- (8) Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 2000 Dec 1;14(23):3065-3073.
- (9) Jackson S, Storey A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000 Jan 27;19(4):592-598.
- (10) Memon AA, Tomenson JA, Bothwell J, Friedmann PS. Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *Br J Dermatol* 2000 Jun;142(6):1154-1159.
- (11) Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol* 2004 May-Jun;22(3):189-196.
- (12) Green A, Williams G, Neale R, Hart V, Leslie D, Parsons P, et al. Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999 Aug 28;354(9180):723-729.
- (13) Butler GJ, Neale R, Green AC, Pandeya N, Whiteman DC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of actinic keratoses and squamous cell cancers of the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005 Dec;53(6):966-972.

- (14) Hughes MC, van der Pols JC, Marks GC, Green AC. Food intake and risk of squamous cell carcinoma of the skin in a community: the Nambour skin cancer cohort study. *Int J Cancer* 2006 Oct 15;119(8):1953-1960.
- (15) Mittelbronn MA, Mullins DL, Ramos-Caro FA, Flowers FP. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol* 1998 Sep;37(9):677-681.
- (16) Callen JP, Bickers DR, Moy RL. Actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* 1997 Apr;36(4):650-653.
- (17) Aghassi D, Anderson RR, Gonzalez S. Confocal laser microscopic imaging of actinic keratoses in vivo: a preliminary report. *J Am Acad Dermatol* 2000 Jul;43(1 Pt 1):42-48.
- (18) Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol* 2000 Jan;42(1 Pt 2):23-24.
- (19) Fuchs A, Marmur E. The kinetics of skin cancer: progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2007 Sep;33(9):1099-1101.
- (20) Schwartz RA. Premalignant keratinocytic neoplasms. *J Am Acad Dermatol* 1996 Aug;35(2 Pt 1):223-242.
- (21) Epstein E, Epstein NN, Bragg K, Linden G. Metastases from squamous cell carcinomas of the skin. *Arch Dermatol* 1968 Mar;97(3):245-251.
- (22) Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RS. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br J Dermatol* 2002 May;146(5):810-815.
- (23) Marks VJ. Actinic keratosis. A premalignant skin lesion. *Otolaryngol Clin North Am* 1993 Feb;26(1):23-35.
- (24) Zalaudek I, Giacomel J, Argenziano G, Hofmann-Wellenhof R, Micantonio T, Di Stefani A, et al. Dermoscopy of facial nonpigmented actinic keratosis. *Br J Dermatol* 2006 Nov;155(5):951-956.
- (25) Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003 Apr 15;63(8):1727-1730.
- (26) Ulrich M, Maltusch A, Rius-Diaz F, Rowert-Huber J, Gonzalez S, Sterry W, et al. Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of actinic keratoses. *Dermatol Surg* 2008 May;34(5):610-619.
- (27) Ackerman AB, Mones JM. Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2006 Jul;155(1):9-22.
- (28) Ackerman AB. Solar keratosis is squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2003 Sep;139(9):1216-1217.

- (29) Warino L, Tusa M, Camacho F, Teuschler H, Fleischer AB, Jr, Feldman SR. Frequency and cost of actinic keratosis treatment. *Dermatol Surg* 2006 Aug;32(8):1045-1049.
- (30) Zouboulis CC. Principles of cutaneous cryosurgery: an update. *Dermatology* 1999;198(2):111-117.
- (31) Zouboulis CC, Rohrs H. Cryosurgical treatment of actinic keratoses and evidence-based review. *Hautarzt* 2005 Apr;56(4):353-358.
- (32) Burkhart CG, Burkhart CN. Ice cream headaches with cryotherapy of actinic keratoses. *Int J Dermatol* 2006 Sep;45(9):1116-1117.
- (33) Basset-Seguin N, Baumann Conzett K, Gerritsen MJ, Gonzalez H, Haedersdal M, Hofbauer GF, et al. Photodynamic therapy for actinic keratosis in organ transplant patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013 Jan;27(1):57-66.
- (34) Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology*, 2005. *J Am Acad Dermatol* 2007 Jan;56(1):125-143.
- (35) Dirschka T, Radny P, Dominicus R, Mensing H, Bruning H, Jenne L, et al. Photodynamic therapy with BF-200 ALA for the treatment of actinic keratosis: results of a multicentre, randomized, observer-blind phase III study in comparison with a registered methyl-5-aminolaevulinate cream and placebo. *Br J Dermatol* 2012 Jan;166(1):137-146.
- (36) Dirschka T, Radny P, Dominicus R, Mensing H, Bruning H, Jenne L, et al. Long-term (6 and 12 months) follow-up of two prospective, randomized, controlled phase III trials of photodynamic therapy with BF-200 ALA and methyl aminolaevulinate for the treatment of actinic keratosis. *Br J Dermatol* 2013 Apr;168(4):825-836.
- (37) Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai MA. Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 1999 Jan;21(1):1-14.
- (38) Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002 Feb;3(2):196-200.
- (39) Crain B, Yao S, Keophilaone V, Promessi V, Kang M, Barberis A, et al. Inhibition of keratinocyte proliferation by phospholipid-conjugates of a TLR7 ligand in a Myc-induced hyperplastic actinic keratosis model in the absence of systemic side effects. *Eur J Dermatol* 2013 Oct 1;23(5):618-628.
- (40) Gupta AK, Davey V, Mcphail H. Evaluation of the effectiveness of imiquimod and 5-fluorouracil for the treatment of actinic keratosis: Critical review and meta-analysis of efficacy studies. *J Cutan Med Surg* 2005 Oct;9(5):209-214.

- (41) Martin GM, Stockfleth E. Diclofenac sodium 3% gel for the management of actinic keratosis: 10+ years of cumulative evidence of efficacy and safety. *J Drugs Dermatol* 2012 May;11(5):600-608.
- (42) Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in rheumatoid synovial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 Jul;302(1):18-25.
- (43) Pirard D, Vereecken P, Melot C, Heenen M. Three percent diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses: a meta-analysis of the recent studies. *Arch Dermatol Res* 2005 Nov;297(5):185-189.
- (44) Motley R, Kersey P, Lawrence C, British Association of Dermatologists, British Association of Plastic Surgeons. Multiprofessional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Plast Surg* 2003 Mar;56(2):85-91.
- (45) Nori S, Rius-Diaz F, Cuevas J, Goldgeier M, Jaen P, Torres A, et al. Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: a multicenter study. *J Am Acad Dermatol* 2004 Dec;51(6):923-930.
- (46) Pellacani G, Guitera P, Longo C, Avramidis M, Seidenari S, Menzies S. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2007 Dec;127(12):2759-2765.
- (47) Ardigo M, Cota C, Berardesca E, Gonzalez S. Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and histology in the evaluation of plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009 Jun;23(6):660-667.
- (48) Astner S, Gonzalez S, Gonzalez E. Noninvasive evaluation of allergic and irritant contact dermatitis by in vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatitis* 2006 Dec;17(4):182-191.
- (49) Langley RG, Walsh N, Sutherland AE, Propperova I, Delaney L, Morris SF, et al. The diagnostic accuracy of in vivo confocal scanning laser microscopy compared to dermoscopy of benign and malignant melanocytic lesions: a prospective study. *Dermatology* 2007;215(4):365-372.
- (50) Peppelman M, Wolberink EA, Koopman RJ, van Erp PE, Gerritsen MJ. In vivo Reflectance Confocal Microscopy: A Useful Tool to Select the Location of a Punch Biopsy in a Large, Clinically Indistinctive Lesion. *Case Rep Dermatol* 2013 Apr 25;5(1):129-132.
- (51) Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 1999 Sep;113(3):293-303.

- (52) Gerger A, Hofmann-Wellenhof R, Samonigg H, Smolle J. In vivo confocal laser scanning microscopy in the diagnosis of melanocytic skin tumours. *Br J Dermatol* 2009 Mar;160(3):475-481.
- (53) Scope A, Ardigo M, Marghoob AA. Correlation of dermoscopic globule-like structures of dermatofibroma using reflectance confocal microscopy. *Dermatology* 2008;216(1):81-82.
- (54) Horn M, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V, Weger W, Koller S, Kerl H, et al. Discrimination of actinic keratoses from normal skin with reflectance mode confocal microscopy. *Dermatol Surg* 2008 May;34(5):620-625.
- (55) Rishpon A, Kim N, Scope A, Porges L, Oliviero MC, Braun RP, et al. Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2009 Jul;145(7):766-772.
- (56) Rishpon A, Kim N, Scope A, Porges L, Oliviero MC, Braun RP, et al. Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2009 Jul;145(7):766-772.
- (57) Szeimies RM, Karrer S, Radakovic-Fijan S, Tanew A, Calzavara-Pinton PG, Zane C, et al. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2002 Aug;47(2):258-262.
- (58) Freeman M, Vinciullo C, Francis D, Spelman L, Nguyen R, Fergin P, et al. A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat* 2003 Jun;14(2):99-106.
- (59) Ulrich M, Krueger-Corcoran D, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Reflectance confocal microscopy for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses. *Dermatology* 2010;220(1):15-24.
- (60) Dubreuilh WA. Des hyperkeratoses circonscrites. *Ann Dermatol Venereol*. 1896;27:1158–1204.
- (61) Frost C, Williams G, Green A. High incidence and regression rates of solar keratoses in a queensland community. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 273-277.
- (62) Deutsche Dermatologische Gesellschaft. Leitlinie zur Behandlung der aktinischen Keratosen C44.X 12/2011. URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-041l_S1_Aktinische_Keratose_2012-01.pdf
- (63) Ulrich M, Maltusch A, Rowert-Huber J, Gonzalez S, Sterry W, Stockfleth E, et al. Actinic keratoses: non-invasive diagnosis for field cancerisation. *Br J Dermatol* 2007 May;156 Suppl 3:13-17.

- (64) Empfehlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG). Kryochirurgie in der Dermatologie. URL: http://www.derma.de/fileadmin/derma/pdfs/II_kryochirurgie.pdf
- (65) Hofmann-Wellenhof R, Pellacani G, Malvehy J, Soyer HP. Reflectance Confocal Microscopy for skin diseases. Springer Verlag Heidelberg Berlin; 2012.
- (66) Thompson SC, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. N Engl J Med 1993 Oct 14;329(16):1147-1151.
- (67) Frost CA, Green AC, Williams GM. The prevalence and determinants of solar keratoses at a subtropical latitude (Queensland, Australia). Br J Dermatol 1998 Dec;139(6):1033-1039.
- (68) Schaefer I, Augustin M, Spehr C, Reusch M, Kornek T. Prevalence and risk factors of actinic keratoses in Germany - analysis of multisource data. J Eur Acad Dermatol Venereol 2014 Mar;28(3):309-313.
- (69) Sutton RL Jr. Early epidermal neoplasia: Description and interpretation-The theory of mutation in the origin of cancer. Arch Derm Syphil 1938;37:737-80.
- (70) Stockfleth E, Kerl H, Guideline Subcommittee of the European Dermatology Forum. Guidelines for the management of actinic keratoses. Eur J Dermatol 2006 Nov-Dec;16(6):599-606.
- (71) Curiel-Lewandowski C, Legat FL, Pellacani G, Arzberger E, Hofer A, Gruber-Wackernagel A, Hofmann-Wellenhof R. Reflectance confocal microscopy for the monitoring of actinic keratoses undergoing photodynamic therapy. J Invest Dermatol. 2013;133:S179-S179.

Anhang Fragebogen

Protocol #: _____ **Local Protocol #:** _____
Reflectance Confocal Microscopy Response Monitoring for Actinic Keratoses
Undergoing Local Therapeutic Intervention

SCREENING EVALUATION BY M.D. Subject

Name: _____

Subject ID: _____

Visit Date: _____ / _____ / _____

Karnofsky Performance Status Assessment

Check the box that applies for this subject. (Note: $\leq 70\%$ = Ineligible to participate in study.)

Applies	Percent	Description
<input type="checkbox"/>	100	Normal, no complaints, no evidence of disease.
<input type="checkbox"/>	90	Able to carry on normal activity; minor signs or symptoms of disease.
<input type="checkbox"/>	80	Normal activity with effort; some signs or symptoms of disease.
<input type="checkbox"/>	70	Cares for self, unable to carry on normal activity or to do active work.
<input type="checkbox"/>	60	Requires occasional assistance, but is able to care for most of his/her needs.
<input type="checkbox"/>	50	Requires considerable assistance and frequent medical care.
<input type="checkbox"/>	40	Disabled, requires special care and assistance.
<input type="checkbox"/>	30	Severely disabled, hospitalization indicated. Death not imminent.
<input type="checkbox"/>	20	Very sick, hospitalization indicated. Death not imminent.
<input type="checkbox"/>	10	Moribund, fatal processes progressing rapidly.
<input type="checkbox"/>	0	Dead.

Vital Signs

Height: _____ . _____ <input type="checkbox"/> cm <input type="checkbox"/> in <input type="checkbox"/> Not Obtained	Weight: _____ . _____ <input type="checkbox"/> kg <input type="checkbox"/> lb <input type="checkbox"/> Not Obtained	Temperature: _____ . _____ <input type="checkbox"/> °C <input type="checkbox"/> °F <input type="checkbox"/> Not Obtained
Pulse Rate: _____ <input type="checkbox"/> Not Obtained		Blood Pressure: _____ / _____ <small>Systolic (mm Hg) / Diastolic (mm Hg)</small> <input type="checkbox"/> Not Obtained

Skin Phototype

After 45-60 minutes of unprotected exposure to the summer sun between 12:00 to 1:00 p.m., this subject reports that they would:

- [] I – Always burn; never tan
- [] II – Always burn; tan minimally
- [] III – Burn moderately; tan gradually
- [] IV – Burn minimally; tan well
- [] V – Rarely burn; tan profusely

[] VI – Never burn; deeply pigmented

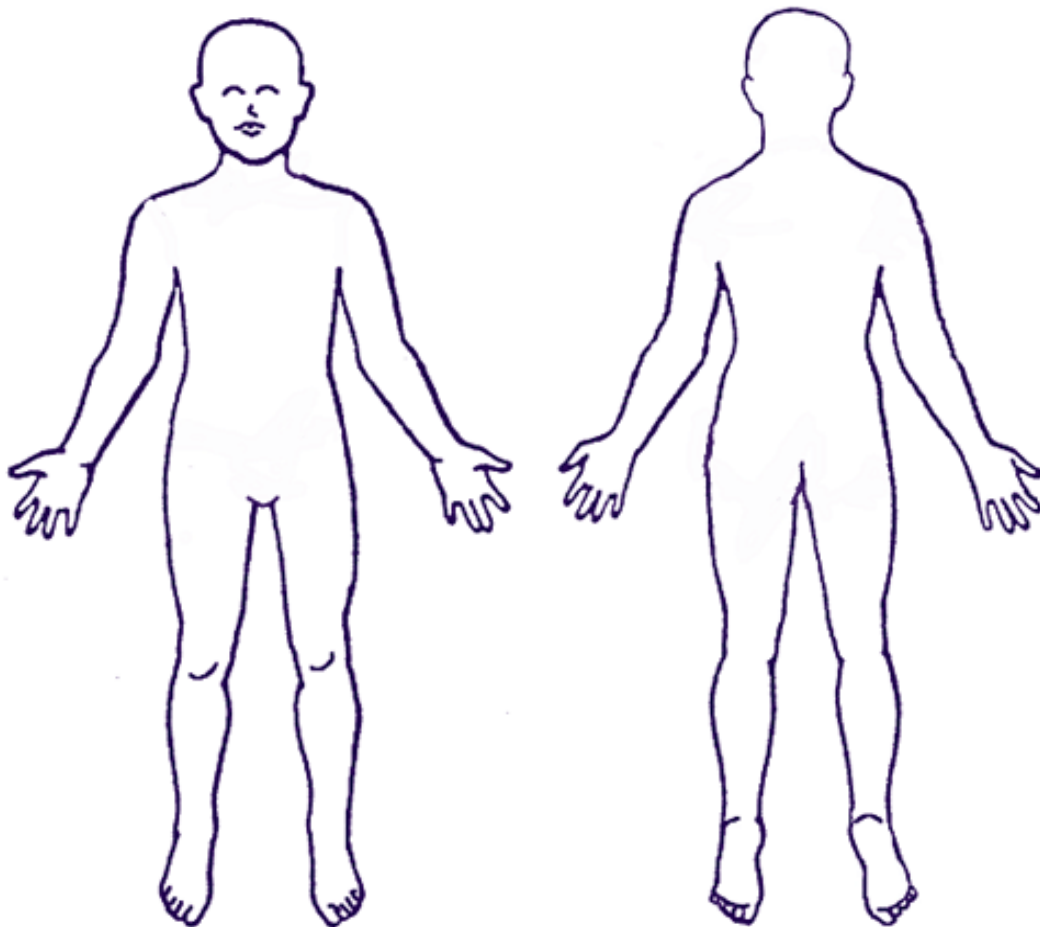
Subject ID #: _____

Skin Examination (Forehead, scalp, and/or forearm)

Subjects must have ≥ 2 Actinic Keratoses (each ≥ 3 mm and ≥ 6 mm), plus at least moderate skin photodamage.

Mark and label the selected AKs as #1, and #2

Obtain: Regional, close-up and dermoscopy photographs according to clinic protocol



Subject ID #: _____

Are there any disqualifying conditions on the skin at the study sites?

Includes a history of SCC or BCC in the past 6 months, melanocytic lesions, confluent AK, psoriasis, absent or mild actinic damage, excessive inflammation or irritation, or evidence of natural or artificially induced sun-tanning.

No

Yes

If yes, describe: _____

Skin Photodamage:

CLINICAL SIGN	ABSENT	MILD	MODERATE	SEVERE
Fine Wrinkling Visible creases or folds < 1 mm* in width and depth	0	1 2 3	4 5 6	7 8 9
Coarse Wrinkling Thickening of skin causing visible creases or folds ≥ 1 mm* in width and depth	0	1 2 3	4 5 6	7 8 9
Abnormal Pigmentation Abnormally increased or decreased coloration of skin; may be localized or diffuse	0	1 2 3	4 5 6	7 8 9
Global Overall assessment of sun damage	0	1 2 3	4 5 6	7 8 9

* < and ≥ 1 mm is used here as a general guide

Personal History of Skin Cancer

This subject does not report a personal hx of skin cancer.

This subject does report a personal hx of skin cancer.

SCC: Number:___ Body site(s): _____

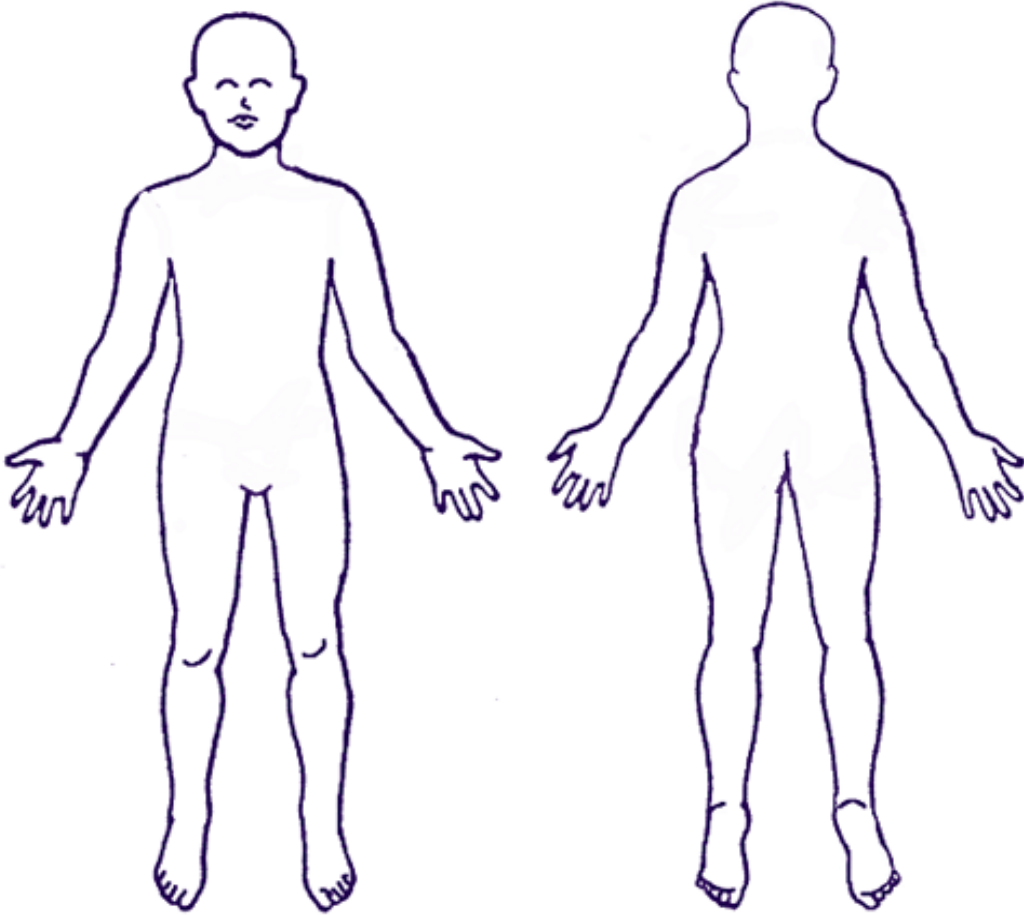
Approximate date(s): _____

BCC: Number:___ Body site(s): _____

Approximate date(s): _____

Melanoma: Number:___ Body site(s): _____

Approximate date(s): _____



Physician's Signature: _____ Date: _____