

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patienten, Patientenakten und Operationsmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurden 60 Patienten (der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Halle-Wittenberg), die im Zeitraum von 1996 bis 2005 aufgrund einer Acne inversa operiert wurden, ausgewählt. Grundlage der Untersuchung stellten die Patientenakten inklusive der Histologiebefunde und die postoperativ angefertigten HE-Präparate (n=262) dar. Nach einer Vorauswahl einzelner Präparate (Begründung siehe 2.2.3) gingen die folgenden in die Gesamtbewertung ein:

1996-2458b	2001-4566b	2002-2698	2003-429a	2003-2569	2004-1450	2004-3662b
1997-2804	2001-4567b	2002-2766a	2003-876a	2003-2656b	2004-1546	2004-3798b
1998-1081b	2001-4568	2002-2848b	2003-921a	2003-2807a	2004-1674a	2004-3884b
1999-677	2001-5201a	2002-2850b	2003-1105a	2003-3348b	2004-1975b	2004-4337a
1999-913b	2002-651	2002-3272c	2003-1106b	2003-3349a	2004-2219b	2004-5151a
200-455c	2002-855b	2002-3274b	2003-1247b	2003-3418b	2004-2370b	2004-5152a
2000-1437b	2002-1090b	2002-3276a	2003-1248	2003-3679	2004-2592b	2005-3348b
2000-1730a	2002-1191a	2002-3277a	2003-1351b	2003-3681a	2004-3058b	2005-3529b
2001-752a	2002-1449	2002-3515a	2003-1353b	2003-5032	2004-3059a	2005-3956
2001-2553	2002-1626	2002-3595	2003-1359d	2003-5033	2004-3114b	2005-4222b
2001-2851	2002-1643	2002-3995b	2003-1707a	2004-283b	2004-3205a	2005-4223a
2001-2852	2002-1944b	2002-4149a	2003-1755a	2004-1180	2004-3238a	2005-4903b
2001-3384a	2002-2149a	2003-248c	2003-1851b	2004-1432b	2004-3576a	2005-5718b
2001-3728c	2002-2291a	2003-265a	2003-2174a	2004-1434b	2004-3586a	

Tab. 3: Untersuchte und bewertete Histologie-Präparate (Kennungsnummern)

#### 2.1.2 Geräte

- Adhäsivobjektträger; MERCK, Darmstadt
- Brutschrank INCO 2; MEMMERT GmbH + Co. KG, Schwabach
- Coverplaces; SHANDON, USA
- Deckglas; MENZEL GmbH + Co. KG, Braunschweig
- Digitalkamera Spot Insight QE; VISITRON SYSTEMS GmbH
- Lichtmikroskop Olympus BX 50 F4; OLYMPUS OPTICAL CO., Tokio, Japan
- Microtom Jung RM 2035; LEICA INSTRUMENTS, Bensheim
- Mikrowellenküvette Chem Mate Incubation Container; DAKO CYTOMATION DENMARK A/S, Glostrup
- Dampfgarkochtopf; SIEMENS, Frankfurt/M.
- Objektträger Super Frost Plus; MENZEL GmbH + Co. KG, Braunschweig
- Sequenzerkammern; SHANDON, USA

### 2.1.3 Chemikalien

- AEC-Farbstoff (AEC-Substrat-System, chromogen); DAKO CYTOMATION DENMARK A/S, Glostrup
- Anti-CD-3-Antikörper (polyclonal rabbit anti-human CD-3), Verdünnung 1:25; DAKO CYTOMATION DENMARK A/S, Glostrup
- Anti-CD-4-Antikörper (monoclonal mouse anti-human CD-4), Verdünnung 1:10; VISIONBIOSYSTEMS NOVOCASTRA, Newcastle
- Anti-CD-8-Antikörper (monoclonal mouse anti-human CD-8), Verdünnung 1:50; DAKO CYTOMATION DENMARK A/S, Glostrup
- Anti-CD-45RO (monoclonal mouse anti-human UCHL-1), Verdünnung 1:50; DAKO CYTOMATION DENMARK A/S, Glostrup
- Anti-CD-56-Antikörper (monoclonal mouse anti-human CD-56), Verdünnung 1:50; DAKO CYTOMATION DENMARK A/S, Glostrup
- Anti-CD-68-Antikörper (monoclonal mouse anti-human CD-68), Verdünnung 1:50; DAKO CYTOMATION DENMARK A/S, Glostrup
- Anti-CD-79-Antikörper (monoclonal mouse anti-human CD-79), Verdünnung 1:25; DAKO CYTOMATION DENMARK A/S, Glostrup
- Biotinylated anti-rabbit (polyclonal) IgG (H+L); VECTOR DIAGNOSTICA Vertrieb GmbH, Eching
- Biotinylated anti-mouse (monoclonal) IgG (H+L); VECTOR DIAGNOSTICA Vertrieb GmbH, Eching
- Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); MERCK, Darmstadt
- Elite-ABC-Kit; (Herstellung: 20  $\mu\text{l}$  A + 20  $\mu\text{l}$  B in 1,0 ml PBS), VECTOR DIAGNOSTICA Vertrieb GmbH, Eching
- Glycerolgelatine (Mounting-Medium); DAKO CYTOMATION GmbH, Hamburg
- Kaliummetabisulfat; MERCK, Darmstadt
- Kaliumchlorid (KCl); MERCK, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); MERCK, Darmstadt
- Mayer's Hämlaun; MERCK, Darmstadt
- Methanol-Gemisch 3%ig; Herstellung: Methanol 200 ml +  $\text{H}_2\text{O}_2$  6ml
- Natriumchlorid (NaCl); MERCK, Darmstadt
- Rotisol; ROTH, Karlsruhe

- Salzsäure (HCl); MERCK, Darmstadt
- Tri-Natriumcitrat-2-hydrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$ ); ROTH, Karlsruhe
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris); DAKO CYTOMATION GmbH, Hamburg
- Xylol; MERCK, Darmstadt

#### **2.1.4 Lösungen und Puffer**

- Citratpuffer (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat) pH=6,0; Herstellung:  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$  (10x) 29,4 g in 1000 ml Aqua dest. lösen, mit 1n HCl auf pH=6,0 einstellen, in Aqua dest. 1:10 verdünnen
- PBS-Puffer (phosphat buffered saline), pH=7,4; Herstellung: NaCl 8,0 g + KCl 0,2 g +  $Na_2HPO_4$  1,16 g +  $KH_2PO_4$  ad 1000 ml Aqua dest.
- TBS-Tween, pH=7,4; Herstellung: NaCl (10x) 53 g + Tris (10x) 12 g ad 1000 ml Aqua dest. und in 1000 ml Aqua dest. 1:10 verdünnen

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Patientenbezogene Daten**

Durch Einsichtnahme in die Patientenakten wurden folgende Daten ermittelt:

- a) Geschlecht
- b) Alter bei Erkrankungsbeginn (krankheitstypische Symptome)
- c) Alter zum Operationszeitpunkt
- d) Erkrankungsdauer (Zeitraum zwischen Beginn der Erkrankung und Operation)
- e) Raucherstatus
- f) Hinweise auf Familiarität (Auftreten einer Acne inversa bei den Eltern, Großeltern, Kindern)
- g) Assoziierte wesentliche Hauterkrankungen (Vorkommen einer Acne vulgaris vor oder zum Zeitpunkt der Operation, einer aktuellen Hyperhidrosis axillaris, einer Psoriasis vulgaris zum Operationszeitpunkt oder frühere Erkrankungen der Haut wie Pilonidalsinus oder rezidivierende Furunkel)
- h) Weitere systemische Erkrankungen

### **2.2.2 Verteilung der Lokalisationen der Erkrankung**

Im folgenden Schritt galt es, das Verteilungsmuster der Acne inversa zu beschreiben. Hierbei wurden folgende Punkte untersucht:

- a) Prädilektionsstellen der Acne inversa
- b) Mehrfachlokalisationen (Veränderungen im Sinne einer Acne inversa an mehreren Körperstellen. Ein beidseitiger Befall der Axillae gilt in dieser Arbeit als Mehrfachlokalisation)
- c) Kombinationen bei Mehrfachlokalisationen (häufigste Kombinationen gleichzeitig betroffener, unterschiedlicher Areale)
- d) Weiteres Verteilungsmuster (geschlechtsspezifische Lokalisation der weniger häufig betroffenen Arealen)
- e) Verteilung der Einfachlokalisationen
- f) Vergleich der Erkrankungsdauern zwischen Einfach- und Mehrfachlokalisation (Median und Mittelwert insgesamt und isoliert bei Mann und Frau betrachtet)

### **2.2.3 Präparateauswahl und histologische Beurteilung**

Im genannten Zeitraum wurde den Patienten das betroffene Areal weiträumig und tiefreichend exzidiert. Von dem entnommenen Gewebe wurden postoperativ HE-Präparate angefertigt. Hieraus ergab sich eine vorliegende **Präparategesamtzahl von 262**. Dies bedeutet ein Präparateaufkommen zwischen einem und 19 pro Patient. Das Vorhandensein mehrerer Präparate bei einem Patienten erklärt sich zum einen durch operative Gewebeentnahme an unterschiedlichen Lokalisationen, zum anderen durch verschiedene Schnittebenen innerhalb des operativ gewonnenen Materials an einer Prädilektionsstelle. Die vorliegenden 262 Präparate wurden in zwei Mikroskopiedurchgängen betrachtet. Mikroskopiert wurde bei 12,5-facher, 25-facher und 40-facher Vergrößerung. In zwei weiteren Durchgängen wurde besonderes Augenmerk auf bestimmte histopathologische Kriterien gelegt. Von den 262 Präparaten wurden **pro Patient ein bis vier Präparate ausgewählt**. Dies erfolgte nach den weiter unten beschriebenen, definierten histologischen Gesichtspunkten, wobei solche Präparate ausgewählt wurden, die sowohl qualitativ, als auch quantitativ die meisten dieser histologischen Gesichtspunkte erfüllten. Der Auswahl mehrerer Präparate für einen Patienten liegt eine Mehrfachlokalisation der Erkrankung zu Grunde (d.h. für einen Patienten konnten maximal vier unterschiedliche Erkrankungsstellen histologisch beschrieben werden). Hieraus ergibt sich eine verbleibende **Präparategesamtzahl von 97 (entspricht 97 Lokalisationen)**. Laut Patientenakten entnommen lagen bei den 60 Patienten insgesamt 121 von Acne inversa befallene Lokalisationen vor. Der Sachverhalt, dass wir in der vorliegenden Arbeit nur 97 Lokalisationen beschreiben

können ist auf vier wesentliche Punkte zurückzuführen: Entweder wurden weitere Operationen an anderen Kliniken durchgeführt, oder aber die Behandlung der entsprechenden Areale hatte vor 1996 stattgefunden, beziehungsweise sollte erst nach 2005 erfolgen. Ebenso erschienen einige Patienten nicht zu den vorgesehenen Op-Terminen.

Die Präparate wurden in drei Gruppen morphologisch vergleichend gegenübergestellt. Die Hauptmanifestationsorte sind die axilläre und die inguinale Region, diese stellen die ersten beiden Gruppen dar (axillär: n=43, inguinal: n=37). Die restlichen 17 Lokalisationen bestehen in 14 Fällen aus anogenitalen Präparaten, in zwei Fällen liegen submammäre Präparate und einmal ein abdominales Präparat vor. Die 14 Präparate perinealer, skrotaler, glutealer, perianaler und am Penischaft befindlichen Läsionen sind in der anogenital-Gruppe zusammengefasst. Folglich stellen 94 Präparate die Grundlage der vergleichenden Tab. 8, 97 Präparate die der Kontingenztafeln 13,14 dar. Im Vordergrund stehen die histomorphologische Beschreibung der Erkrankung (Tabelle 4), die chronologische Einordnung dieser Charakteristika in den Gesamtprozess, die Erfassung möglichst früher morphologischer Veränderungen, sowie die Herausarbeitung etwaiger Unterschiede der Morphologie in Abhängigkeit von Dauer und Lokalisation. Es wurden histologische Charakteristika herangezogen, die auch schon in früheren Arbeiten der morphologischen Beschreibung der Acne inversa dienten [5,51,77,81,82,94]. Die bis dato in der Literatur offenbar noch nicht beschriebene Beurteilung der Epidermis ergab sich während der einzelnen Mikroskopierdurchgänge. Die Identifikation der frühen Morphologie stand im Vordergrund der Bearbeitung. Auf eine Beurteilung der Häufigkeit von Fistelgangstrukturen wurde aus diesem Grund verzichtet. Eine Beschreibung der Talgdrüsen findet keinen Eingang in die Analyse, da in der Endauswahl der Präparate nicht immer ein Anschnitt von Talgdrüsen registrierbar war. Folgende histologische Merkmale wurden untersucht und bewertet:

Histologisches Kriterium	Beschreibung
<b>infundibuläre Follikelhyperkeratose</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• HK nein (0)</li> <li>• HK gering (1)</li> <li>• HK ausgeprägt (1)</li> </ul>	
<b>Perifollikulitis</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PF nein/gering</li> <li>• PF ausgeprägt</li> </ul>	≤ 150 Entzündungszellen perifollikulär, infrainfundibulär > 150 Entzündungszellen perifollikulär, infrainfundibulär
<b>Ruptur</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• R nein</li> <li>• R ja</li> </ul>	
<b>eitrige Entzündung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• EE nein/gering</li> <li>• EE mittel</li> <li>• EE ausgeprägt</li> </ul>	keine bis einzelne Foci ≤ 40% der dermalen Fläche betroffen > 40% der dermalen Fläche betroffen
<b>chronisch-vernarbende Entzündung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CE nein</li> <li>• CE gering</li> <li>• CE ausgeprägt</li> </ul>	≤ 40% der dermalen Fläche betroffen > 40% der dermalen Fläche betroffen
<b>Subkutisbeteiligung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SKB nein</li> <li>• SKB ja</li> </ul>	
<b>Beteiligung der apokrinen Schweißdrüsen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• BaSD nein</li> <li>• BaSD ja</li> </ul>	Hyperplasie, periazinäre Entzündungszellen, Dilatation der Azini und Sekretrohre, Sekretstau  ≥ 1 Merkmal
<b>epidermale/dermale Veränderungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• EDV 0-1</li> <li>• EDV 2-3</li> <li>• EDV 4-5</li> </ul>	psoriasiforme Epidermishyperplasie nicht-psoriasiforme Epidermishyperplasie subepidermalen Entzündung Kombination aus psoriasiformer Epidermishyperplasie und subepidermaler Entzündung zelluläre entzündliche Infiltration der Epidermis  0-1 Merkmal 2-3 Merkmale 4-5 Merkmale

Tab. 4: Histologische Kriterien der Arbeit

### 2.2.4 Immunhistochemische Charakterisierung der Entzündungszellen

Von den 94 untersuchten und bewerteten Präparaten wurden 6 (6 Patienten entsprechend) nach histologischer Begutachtung (nach dem 4. Mikroskopierdurchgang) für eine immunhistochemische Typisierung ausgewählt. Ziel war die zelluläre Klassifizierung und relative Quantifizierung in entzündlichen Arealen. Die

ausgewählten Präparate wurden zunächst nachgeschnitten, dann immunhistochemisch mit dem entsprechenden Marker [Anti-CD-3 (pan T-cells), Anti-CD-4 (T-Helfer-Zellen), Anti-CD-8 (zytotoxische T-Zellen, Suppressorzellen), Anti-CD-56 (natürliche Killerzellen), Anti-CD-68 (Makrophagen), Anti-CD-79 (B-Lymphozyten), Anti-UCHL-1 (naive T-Zellen)] angefärbt und die prozentuale Anzahl der positiv gefärbten Zellen von der Gesamtzellzahl abgeschätzt. Die untersuchten Areale waren:

1. der *perifollikuläre, infundibuläre Bereich* (bis zu 6 Gesichtsfelder)
2. der *periphere (subepidermale, interfollikuläre) Bereich* (bis zu 6 Gesichtsfelder)

Mikroskopiert wurde bei 12,5-facher und 25-facher, abgeschätzt bei 40-facher Vergrößerung. Für die Gesamtheit der Fälle wurde dann der Mittelwert der Zellen, sowie Minimum, Maximum und Standardabweichung angegeben. Nicht aufgeführt sind die Auswertungen für CD-56 und UCHL-1. Einerseits aufgrund einer zu geringen Anfärbung der Zellfraktion für CD-56 (perifollikulärer Mittelwert: 0,03%, peripherer Mittelwert: 0,28%) andererseits aufgrund ausbleibender Anfärbung für UCHL-1. Voraussetzung für die Auswahl der Präparate war das Vorhandensein einer geringen oder ausgeprägten Hyperkeratose und das Vorkommen einer ausgeprägten Perifollikulitis.

### **2.2.5 Immunhistochemische Nachweismethoden**

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit einem Microtom zunächst 4 µm Dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten Exzisate angefertigt. Die histologischen Schnitte wurden auf Adhäsivobjektträger (Super Frost Plus) aufgebracht und in einem Brutschrank bei 60 °C für mindestens eine Stunde aufbewahrt. Diese Art von industriell vorbeschichtetem Objektträger eignet sich bei fettigem Gewebe wie Haut besonders gut.

Die Färbung erfolgte nach der ABC-Methode:

#### 1) Entparaffinierung

- 2 x Einlegen der Adhäsivobjektträger in Xylol für 10 Minuten
- 2 x Einlegen der Adhäsivobjektträger in Rotisol für 5 Minuten

#### 2) Vorbehandlung

##### 2.1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Blockierung

- Einlegen in Methanol-Gemisch (200 ml Methanol + 6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 Minuten)
- Spülung mit Aqua dest.

- Vorsichtiges Entfernen des Aqua dest. durch Tupfen mit Zellstoff

## 2.2) Dampfgarkochtopfbehandlung

- Einlegen der Schnitte in 10 Mm Citratpuffer pH 6 und Dampfgarkochtopfbehandlung bei 600 Watt für 20 Minuten
- Abkühlen für 20 Minuten
- Spülung mit TBS
- Vorsichtiges Entfernen des TBS durch Tupfen mit Zellstoff
- Einspannen der Objektträger in Coverplaces und Sequenzerkammern

## 3) Primär-Antikörper

- Zugabe von 100 µl anti-CD-3 (1:25 verdünnt in PBS), anti-CD-4 (1:10 verdünnt in PBS), anti-CD-8 (1:50 verdünnt in PBS), anti-CD-45 (1:50 verdünnt in PBS), anti-CD-56 (1:50 verdünnt in PBS), anti-CD-68 (1:50 verdünnt in PBS) und anti-CD-79 (1:25 verdünnt in PBS)
- Inkubation für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank
- Spülung mit PBS

## 4) Sekundär-Antikörper

- Zugabe von 100 µl - 200 µl biotinylierten Antikörper 1:100 in PBS verdünnt
- Zugabe von Anti-mouse-Antikörper (monoklonal) zu CD-4, CD-8, CD-45, CD-56, CD-68 und CD-79 Objektträgern
- Zugabe von Anti-rabbit-Antikörper (polyklonal) zu CD-3 Objektträgern
- Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Spülung mit PBS

## 5) ABC-Komplex

- Zugabe von 100 µl - 200 µl des Elite-ABC (von Vector Elite ABC Kit)
- Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Spülung mit PBS
- Objektträger aus den Sequenzerkammern nehmen und in Küvette mit TBS einstellen

## 6) AEC-Färbung (Amino-Ethyl-Carbazol)

- Auftropfen des AEC-Farbstoffes (AEC-Substrat-System von DAKO) auf Objektträger
- Inkubation für maximal 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Spülung mit Aqua dest.



## 7) Gegenfärbung

- Einstellen für circa 10 Sekunden in Mayer's Hämalaun (1:4 in Aqua dest. verdünnt)
- Bläuen unter Leitungswasser
- Eindeckelung der Objektträger in Glyceringelatine (Mounting Medium von DAKO)

## 2.2.6 Statistische Methoden

### *Mann-Whitney-U-Test:*

- Beurteilung der statistischen Signifikanz zwischen Einfach- und Mehrfachbefall der Acne inversa in Abhängigkeit von der Dauer der Erkrankung.
- Beurteilung der statistischen Signifikanz der Beteiligung der apokrinen Schweißdrüsen in Abhängigkeit von der Lokalisation.

### *Kontingenztafel:*

- Beurteilung der statistischen Signifikanz zwischen infundibulärer Hyperkeratose des Terminalhaarfollikels, Perifollikulitis und Ruptur.