

## Studienprotokoll 150824 Tumoren Augenoberfläche Version 2.doc

### 1. Titel der Studie:

**„Untersuchung des Verlaufs und prognostischer Faktoren bei benignen und malignen Tumoren der Augenoberfläche“**

### 2. Verantwortlichkeiten:

Durchführende Personen: Prof. Dr. Claudia Auw-Hädrich, teilnehmende Mitglieder der Sektion Cornea der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Doktorand

### 3. Auftraggeber/Studienfinanzierung:

Klinik für Augenheilkunde/Haushaltsmittel

### 4. Hintergrund und aktueller Stand der Forschung:

Tumoren der Augenoberfläche sind im Vergleich zu Tumoren anderer Lokalisation eher selten. Dies erschwert die Ermittlung der tatsächlichen Inzidenz und des Verlaufs. Die Untersuchung prognostischer Faktoren wie z.B. der Tumordicke, verschiedener immunhistochemischer Marker wie z.B. MIB1, Progesteron, Östrogen gestaltet sich schwierig mit Ergebnissen die aufgrund der geringen Fallzahl ggf. nicht eindeutig sind oder erst nach Zusammenfassen verschiedener Entitäten beurteilt werden können (1,2). Im Gegensatz hierzu sind im Vergleich z.B. maligne Melanome der Haut eher häufig, so dass eindeutige Aussagen bezüglich der prognostischen Bedeutung z.B. von dem Stammzellmarker Nestin getroffen werden können (3). Um eine größere Fallzahl der oben und unten genannten Entitäten evaluieren zu können, soll multizentrisch über das Deutsche Register für Tumoren der Augenoberfläche, das von der Klinik für Augenheilkunde der Universität Freiburg organisiert wird, Patienten mit den entsprechenden Erkrankungen rekrutiert werden.

Bei den papillomatösen Bindehautveränderungen gibt es Hinweise darauf, dass eine Infektion mit einem sogenannten „Hochrisiko“-HPV zu einem Übergang in ein Karzinom führen kann (4,5). Hier möchten wir anhand einer größeren Patientenanzahl diesen Zusammenhang näher beleuchten.

Bindehautmyxome können mit systemischen Zeichen einhergehen wie z.B. Myxome in der Vorderkammer des Herzens, die zu relevanten klinischen Problemen führen. Neuerdings wurde eine neue Entität, der conjunctivale stromale Tumor beschrieben (6). Dieser kann leicht mit einem Bindehautmyxom verwechselt werden, weist allerdings eine ungewöhnliche Positivität für CD34 auf. Die Unterscheidung vom Bindehautmyxom ist insofern relevant als dass der COST nicht mit potenziell lebensbedrohlichen Problemen einhergehen soll und dies für den Patienten

sehr wichtig zu wissen ist. Es sind bislang maximal 10 Fälle mit COST beschrieben und nicht viele Bindehautmyxome mit dem differenzierenden Antikörper gefärbt worden, so dass es vonnöten ist mehr von diesen Fällen zu untersuchen um die Aussage die von Herwig et al. bezüglich der immunhistochemischen Charakterisierung und des klinischen Follow up bezüglich der systemischen Beteiligung anhand einer größeren Fallzahl zu verifizieren.

Weitere seltene Entitäten wie z.B. das fibröse Histiozytom sollten bezüglich ihres Verlaufs untersucht werden, nachdem sie aufgrund ihrer histologischen Charakteristik eindeutig in ihrer Diagnose bestätigt wurden. Auch hier ist es erstrebenswert trotz der histologischen Gutartigkeit prognostische Marker bezüglich des Verlaufs zu untersuchen wie z.B. den Proliferationsmarker MIB1, da der Tumor aufgrund seines aggressiven Verhaltens erhebliche Folgen haben kann (7).

5. Ziele der Studie, Fragestellung, Hypothesen:

- a. Erhebung der Inzidenz seltener Entitäten von Tumoren der Augenoberfläche (COST, Bindehautmyxom, fibröses Histiozytom u.a.),
- b. Untersuchung der Expression von MIB-1, Nestin, Östrogen- und Progesteronrezeptoren bei Bindehautmelanomen, von MIB-1 an fibrösem Histiozytom, von CD34 und MIB-1 an COST und Bindehautmyxomen,
- c. Untersuchung von HPV an Fällen mit Übergang von Papillom in ein Plattenepithelkarzinom der Bindehaut,
- d. Untersuchung der Eignung der o.g. Marker als prognostische Faktoren bei den verschiedenen Tumorentitäten bezüglich des lokalen Rezidivs (bei benignen und malignen Entitäten), Metastasierung und tumorassozierten Tod (bei malignen metastasierenden Entitäten).

6. Studiendesign:

Nicht kontrollierte analytische Fall-Kontroll-Studie.

7. Studienpopulation/Herkunft von humanem Probenmaterial oder von Datenmaterial:

Geplante Anzahl von Studienpatienten mindestens 100 (Patienten bei denen Tumoren der Augenoberfläche entfernt wurden und die in die Teilnahme an der Studie eingewilligt haben) mit verschiedenen unter Nr. 5 gelisteten Diagnosen aus Kliniken, die Mitglieder der Sektion Cornea der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft sind, davon

- a. Tumoren, die im Histologischen Labor der Klinik für Augenheilkunde bzw. Histologischen Labore bzw. Pathologischen Institute der Sektion Cornea angehörigen Augenkliniken archiviert sind,
- b. Fragebögen über das Vorkommen von Rezidiven, Metastasierung bez. tumorbedingten Tod, die nach der Kontaktaufnahme mit den Patienten von ihnen bzw. den Augenärzten und Hausärzten ausgefüllt wurden,
- c. Fotografien vom vorderen Augenabschnitt, die postoperativ angefertigt wurden, letztere im Rahmen der erneuten Einbestellung (nicht obligat).

Geplante Anzahl von Kontrollpatienten 20 (Patienten, bei denen im Rahmen einer Netzhautoperation überschüssiges Bindehautmaterial entfernt wurde und die zur Teilnahme an der Studie eingewilligt haben, davon Bindehautpräparate, die im Histologischen Labor der Klinik für Augenheilkunde archiviert sind.

8. Einschlusskriterien: Patienten mit unter Nr. 5 gelisteten Diagnosen, mit
- a. vorhandenem histologischem Präparat, das auf verschiedene immunhistochemische oder andere Marker untersucht werden kann,
  - b. Follow-up von mindestens 2 Jahren mit bekanntem Ausgang bezüglich Rezidiv, Metastasierung bzw. tumorbedingten Tod.

Ausschlusskriterien: Patienten ohne verfügbares Gewebepräparat und/oder ausreichend langem Follow-up, Patienten die mit dem Einbezug in die Studie nicht einverstanden sind.

9. Studienablauf/Arbeitsablauf:
- a. Auswahl der Patienten anhand der histologischen Diagnose (s. Nr. 5) und Verfügbarkeit des histologischen Präparates sowie einer ausreichend langen Follow up-Dauer.
  - b. Anschreiben der Patienten mit Patienteninformation und Einwilligungs-erklärung (separat für die „Freiburger“ Patienten evtl. mit Einschluss in die Biobank der Klinik für Augenheilkunde Freiburg, wobei die mündliche Aufklärung hierzu bei der persönlichen Vorstellung erfolgt).
  - c. Einbestellung der Patienten, die die Einwilligungserklärung zurück-gesandt haben und mit einer klinischen Untersuchung einverstanden sind, Anfertigung eines klinischen Fotos des operierten Auges an der Spaltlampe und Erfragung des Ganzkörper-tumorstatus bei Malignomen. Von den Patienten, die nicht kommen wollen, aber mit der Teilnahme an der Studie einverstanden sind, werden die

Hausärzte bzw. Augenärzte bezüglich des aktuellen Tumorstatus kontaktiert und befragt.

- d. Von den in c. gesehenen/kontaktierten mit der Teilnahme an der Studie einverstanden Patienten werden die histologischen Präparate immunhistochemisch mit Antikörper z.B. MIB-1, Nestin, Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor, HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  gefärbt und semiquantitativ ausgewertet.

Die Ergebnisse hiervon werden mit dem klinischen Verlauf korreliert.

#### *Auszüge aus der Methodik*

- a. Immunhistochemische Untersuchung:

Die Paraffinschnitte der entsprechenden in 4% gepufferten Formalin fixierten Präparate werden auf beschichtete Superfrost Plus-Objektträger aufgezogen (Menzel-Glaser), über eine Stunde bei 60°C getrocknet und in absteigender Alkoholreihe (99%-70%) entparaffiniert. Die Schnitte werden mit Primärantikörper z.B. gegen MIB-1, Nestin, Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor, HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  inkubiert und nach der Avidin-Biotin-Methode weiterbehandelt. AEC (3-Amino-9-ethyl Carbazol) wird verwendet, um die markierten Zellen rot anzufärben.

- b. Nachweis von HPV mittels Polymerasekettenreaktion (PCR):

Etwa 50  $\mu$ m der jeweiligen Paraffinblöcke werden mit einem sauberen Diamantmesser abgehobelt um Kontamination mit Virus-DNA zu vermeiden. Das Material wird mit Xylene entparaffiniert, mit Ethylalkohol gewaschen und vollständig mit Proteinase K bei 56°C aufgelöst. Die DNA wird mit QIAamp DNA mini kit (Qiagen Inc, USA) extrahiert, präzipitiert und durch eine Silikonmembransäule filtriert. Der HPV-DNA-Nachweis wird durch eine PCR-Amplifikation der HPV L1-Region mit den Primern MY09 und MY11 durchgeführt, gleichzeitig mit Primer für menschliches  $\beta$ -Globin GH20 and PC04, gefolgt durch Punkthybridisierung mit HPV Proben GP01, and GP02.

#### 10. Nutzen-Risiko-Abwägung:

Es besteht folgender Nutzen für den Patienten:

- Verlaufskontrolle, Ausschluss eines Tumorrezidivs.

Es besteht kein Risiko für den Patienten.

Es besteht folgender Nutzen für medizinische Wissenschaft:

- Ermitteln prognostischer immunhistochemischer Parameter bei verschiedenen malignen/benigen Tumoren der Augenoberfläche.

- Das Feststellen der Inzidenz von Tumoren der Augenoberfläche, die insgesamt selten sind.

Bei nicht vorhandenem Risiko ist sowohl ein positives als auch negatives Studienergebnis als klinischer Nutzen anzusehen.

#### 11. Biometrische Aspekte:

- a. Es handelt sich um eine explorative Pilotstudie ohne formale Fallzahlkalkulation.
- b. Die Fallzahl gründet sich auf die Verfügbarkeit der Präparate bzw. Patienten.
- c. Die Häufigkeit von Rezidiven bzw. des Auftretens von Metastasen und tumorbedingtem Tod werden mit der Kaplan-Meier-Methode geschätzt.
- d. Einflussfaktoren auf die Wahrscheinlichkeit von Rezidiven, der Metastasierung bzw. von tumorbedingtem Tod werden mittels Cox Proportional Hazards Modell statistisch exploriert.

#### 12. Datenmanagement/Datenschutz:

Die Daten werden personenbezogen in doppelt pseudonymisierter Form (d.h. alle unmittelbar den Patienten identifizierenden Daten wie Name, Geburtsdatum, Anschrift etc. werden durch ein Pseudonym ersetzt), elektronisch gespeichert und ausgewertet. Beispiel: PIZ 20808691, 1. Pseudonym P1. 2. Pseudonym Q24. Die Zuordnung dieser Daten zu dem jeweiligen Patienten ist lediglich den Mitarbeitern der Studie möglich. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes werden eingehalten. Die Daten sind vor fremdem Zugriff geschützt. Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Ergebnissen erfolgen ausschließlich anonymisiert, also in einer Form, die keine Rückschlüsse auf Patienten zulässt. Die personenbezogenen Daten werden nicht an Dritte weitergegeben.

Die personenbezogenen Daten werden nach Erreichen des Studienziels bzw. zum Ende des Forschungsvorhabens, spätestens jedoch nach 10 Jahren anonymisiert.

Das Material der klinikfremden Studienteilnehmer wird am Ende der Studie an die teilnehmenden Kliniken zurückgeschickt.

#### 13. Ethische und rechtliche Aspekte:

Die Vorgehensweise richtet sich nach den Inhalten der Deklaration von Helsinki.

Da für die Patienten keinerlei Risiken bestehen, wird keine Patientenversicherung abgeschlossen.

14. Umgang mit unerwünschten Ereignissen:

Entfällt (s. 10).

15. Publikation, Kommunikation der Ergebnisse:

Die Ergebnisse werden auf einem ophthalmologischen Kongress bzw. in einer ophthalmologischen begutachteten Zeitschrift veröffentlicht.

16. Datum/Unterschrift des Studienleiters:

## Literatur

1. Bredow L, Stützel L, Böhringer D, Gundlach E, Reinhard T, Auw-Haedrich C. Progesterone and estrogen receptors in conjunctival melanoma and nevi. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Für Klin Exp Ophthalmol*. Februar 2014;252(2):359–65.
2. Lange CA, Tisch-Rottensteiner J, Böhringer D, Martin G, Schwartzkopff J, Auw-Haedrich C. Enhanced TKTL1 expression in malignant tumors of the ocular adnexa predicts clinical outcome. *Ophthalmology*. September 2012;119(9):1924–9.
3. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Nestin expression is associated with aggressive cutaneous melanoma of the nodular type. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. März 2014;27(3):396–401.
4. Bredow L, Martin G, Reinhard T, Mittelviehhaus H, Auw-Haedrich C. Recurrent conjunctival papilloma progressing into squamous cell carcinoma with change of HPV-finding during the course. *Br J Ophthalmol*. November 2009;93(11):1437, 1451.
5. Hasenfus A. Ergänzende diagnostische Möglichkeiten bei papillomatösen Läsionen der Konjunktiva. *Consilium ophthalmopathologicum*; 2014 Sep 27; Jahrestagung DOG, Leipzig.
6. Herwig MC, Wells JR, Grossniklaus HE. Conjunctival stromal tumor: report of 4 cases. *Ophthalmology*. April 2012;119(4):682–7.
7. Maier PC, Auw-Hädrich C, Reinhard T. [Recurrent fibrous histiocytoma at the corneoscleral limbus]. *Klin Monatsblätter Für Augenheilkd*. Januar 2008;225(1):99–100.