

4. DISKUSSION

Diese Studie sollte den Wirkmechanismus von Diclofenac auf aktinisch geschädigter Haut hinsichtlich der antiinflammatorischen, antiproliferativen und antiangiogenetischen Effekte, sowie der immunologischen Tumorabwehr untersuchen.

In diesem Rahmen scheint COX-2 eine besondere Rolle einzunehmen. Denn während COX-2 in gesunder, junger Haut kaum oder nur in geringen Mengen zu finden ist, wird es durch UV-Strahlung induziert und gilt als wichtiger Kofaktor bei der epithelialen Karzinogenese. (75-77) In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Entzündungsreaktion nach UV-Bestrahlung einer erhöhten COX-2-Aktivität zuzuschreiben ist. (23) In epithelialen Hauttumoren wie aktinischen Keratosen, Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen konnte auch ein signifikanter Anstieg von COX-2 gezeigt werden. (67-68, 78)

In unserer Studie wurde eine Expression von COX-2 sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis immunhistologisch nachgewiesen. Vor der Behandlung zeigte sich dabei eine signifikant stärkere COX-2-Expression in der Epidermis des aktinisch geschädigten Hautareals im Vergleich mit dem Kontrollareal. Nach der Behandlung mit Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure kam es zu einem signifikanten Rückgang der COX-2-Expression in der Epidermis des aktinisch geschädigten Areals. Die Hälfte aller Biopsien der aktinisch geschädigten Hautbiopsien zeigte nach der Behandlung in der Epidermis sogar eine geringere COX-2-Expression als im unbehandelten Kontrollareal. In der Dermis hingegen kam es im Vergleich mit dem Kontrollareal weder vor der Behandlung noch nach der Behandlung zu signifikanten Unterschieden in der COX-2-Expression. In der Dermis konnte nach der Behandlung lediglich ein Abnahme-Trend der COX-2-Expression beobachtet werden.

Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure zeigte somit einen größeren Effekt in der Epidermis als in der Dermis. Dies kann zum einen daran liegen, dass COX-2 schon vor der Behandlung in der Epidermis stärker exprimiert war als in der Dermis, zum anderen ist es möglich, dass Diclofenac in topisch aufgetragener Form trotz Hyaluronsäure als Transportsystem nicht bis tief in die Dermis dringen kann. Dies scheint auch die Behandlungsoption von Diclofenac in topischer Form auf die aktinischen Keratosen zu limitieren. Der geringe Nachweis von COX-2 im Kontrollareal steht möglicherweise in Zusammenhang mit dem natürlichen Alterungsprozess in der Haut. Dies konnte bereits

in einigen Mausmodellen gezeigt werden. (79-80) Ebenso konnte in einigen Studien ein Zusammenhang der durch UV-Strahlung induzierten Hautalterung mit erhöhter COX-2-Expression bestätigt werden. (77-78). In der Annahme, dass COX-2 als Parameter für die Hautalterung genutzt werden kann, führt eine Behandlung mit Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure auf Grund unserer Ergebnisse möglicherweise zu einer Besserung der Hautstruktur auf immunhistologischer Ebene.

In aktinischen Keratosen lässt sich auch eine erhöhte Anzahl von Lymphozyten (T-Zellen) im Rahmen von Entzündungsreaktionen finden (8). In dieser Studie wurde ein Marker für CD3 genutzt, um die Beteiligung von T-Lymphozyten an der Entzündung vor und nach Behandlung zu beurteilen. Das gesamte Patientenkollektiv zeigte klinisch zu Beginn der Studie entzündliche Veränderungen in den aktinisch geschädigten Hautarealen, welche gut mit dem Nachweis eines lymphohistiozytären Infiltrates in der histologischen Analyse korrelierten. Vor der Behandlung zeigte sich eine signifikant erhöhte CD3-Expression in der aktinisch geschädigten Haut im Vergleich mit dem unbehandelten Kontrollareal. Nach der Behandlung mit Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure kam es zu einem signifikanten Rückgang der CD3-Expression in der aktinisch geschädigten Haut. Ein Drittel aller Biopsien aus aktinisch geschädigter Haut zeigte nach der Behandlung eine geringere bis fehlende CD3-Expression im Vergleich zum unbehandelten Kontrollareal, in welchem sich auch eine geringe Erhöhung des CD3-Markers nachweisen ließ. Dieser geringe Anstieg der T-Zell-Expression im unbehandelten gesunden Kontrollareal kann mit der Alterung der Haut in Zusammenhang gebracht werden. (81) In der normalen nicht durch UV-Strahlung ausgelösten Hautalterung sind es jedoch vor allem die CD3-positiven Gedächtnis-T-Zellen, welche eine erhöhte Expression zeigen. In dieser Studie wurde allerdings keine Differenzierung zwischen CD3-positiven T-Gedächtniszellen und T-Helferzellen gemacht.

Unsere Ergebnisse bestätigen frühere Studien, in denen der anti-entzündliche Effekt bislang vor allem auf die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Diclofenac zurückgeführt wurde. (23) Diese Studien wiesen nach, dass durch COX-2 mediiertes Prostaglandin E₂ induzierend auf Entzündungsreaktionen wirkt, indem es als Vasodilatator und Immunmodulator fungiert. (82-83) Auch in unserer Studie konnte man nach der Behandlung mit dem COX-Inhibitor Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure eine deutlich Abnahme der Entzündungsreaktion im Untersuchungsareal beobachten.

Die typisch klinischen Entzündungszeichen Rötung und Ödem zeigten einen signifikanten Rückgang nach der Behandlung.

T-Lymphozyten sind aber nicht nur an Entzündungsreaktionen, sondern auch an der immunologischen Tumorabwehr beteiligt. Hierbei wirkt insbesondere die TH-1-Immunantwort der CD4-positiven T-Lymphozyten, welche durch Prostaglandin E2 unterdrückt wird, begünstigend auf die Tumorzerstörung. Daher ist es wichtig, durch eine Hemmung der Prostaglandinaktivität durch COX-Inhibitoren wie Diclofenac die Immunantwort wieder in Richtung Th1-Antwort zu verschieben. (37)

Weitere an der Tumorabwehr beteiligte Zellen sind die CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten und die Natürlichen Killerzellen, welcheprozessierte intrazelluläre Antigene über MHC-1-Moleküle erkennen. Diese zytotoxischen Zellen können daraufhin ihre Zielzellen direkt durch Apoptose zerstören. Um diese zellgebundene Tumorabwehr in aktinisch geschädigter Haut zu prüfen, erfolgte eine Expressionsanalyse von CD8-positiven Zellen. In gesunder Haut sollten sich keine bzw. nur sehr wenig Lymphozyten und NK-Zellen nachweisen lassen. In unserer Studie zeigte sich jedoch bei über zwei Drittel der Biopsien aus dem gesunden unbehandelten Kontrollareal eine leichte Erhöhungen des CD8-Markers. Vor der Behandlung zeigte sich eine signifikant erhöhte CD8-Expression in der aktinisch geschädigten Haut im Vergleich mit dem unbehandelten Kontrollareal. Nach der Behandlung mit Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure kam es zu einem signifikanten Rückgang der CD8-Expression in der aktinisch geschädigten Haut. Ein Drittel aller aktinisch geschädigten Biopsien zeigte nach der Behandlung sogar eine geringere Expression als in den unbehandelten Kontrollarealen. An Hand der vorliegenden Ergebnisse kann man also indirekt auf eine Reduktion der Entzündungsaktivität schließen. Gleichzeitig kommt es möglicherweise durch eine Induktion von Apoptose zu einer zytomorphologischen Normalisierung des Hautbildes, da die Hauptfunktion von CD8-Zellen bei der immunologischen zytotoxischen Tumorabwehr die Auslösung von Apoptosevorgängen beinhaltet. Die leichte Erhöhung der CD8-Expression im gesunden Kontrollareal könnte man auf die natürliche Hautalterung zurückführen. Diesbezügliche Studien beobachteten jedoch widersprüchliche Ergebnisse für die CD8-Expression in gealterter Haut, sodass die Rolle von CD8 bei der Hautalterung noch nicht eindeutig zu bewerten ist. (81)

Um indirekt Apoptosevorgänge bei der zytotoxischen Tumorabwehr nachzuweisen, haben wir in unserer Studie zusätzlich einen Marker für den Nachweis der Granzyme B-Expression verwendet. Granzyme B ist in den lytischen Granula zytotoxischer CD8-

positiver Zellen enthalten. Nach Antigenkontakt werden die Granula in den als fremd erkannten Zielzellen freigesetzt, wodurch es zu einer Aktivierung einer Caspasen-Kaskade mit dem Endziel der Apoptose dieser Zelle kommt. (84-87)

Auf Grund unserer Ergebnisse aus der Untersuchung der CD8-positiven Zellen nahmen wir vor der Behandlung mit dem Studiengel eine erhöhte zytotoxische Aktivität in den untersuchten Biopsien an, die durch den Expressionsnachweis von Granzyme B evaluiert wurde. Vor Behandlung zeigte sich jedoch, dass sich lediglich drei der zwölf Biopsien aus aktinisch geschädigter Haut positiv für Granzyme B anfärben ließen. Im gesunden unbehandelten Kontrollareal konnte in keinem Biopsiepräparat Granzyme B nachgewiesen werden. Nach der Behandlung zeigte keine Biopsie aus erkrankter Haut eine positive Anfärbung für Granzyme B. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Granzyme B unabhängige zytotoxische Tumorabwehr durch CD8-positive Zellen existiert. Zum einen enthalten die lytischen Granula der zytotoxischen Zellen zusätzlich Perforin, welches unabhängig von Granzyme B fähig ist, Zielzellen durch Zytolyse zu töten, zum anderen können T-Zellen und auch Keratinozyten nach UV-Exposition $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und Interleukine synthetisieren und dadurch die Toxizität gegen Tumorzellen verstärken. (88-90) Da auch zytotoxische T-Zellen Todesrezeptoren exprimieren, können sie durch Binden an den entsprechenden Todesliganden der Zielzellen deren Apoptose auslösen. (91) Es bleibt aber zu untersuchen, ob der anti-tumoröse Effekt von Diclofenac durch eine Hemmung der Granzyme- und Perforinfreisetzung oder durch eine Hemmung der Bindung von Todesliganden an Todesrezeptoren zu Stande kommt. Der Rückgang der Granzyme-B-Expression in den drei Biopsien sollte dennoch als Hinweis dafür gewertet werden, dass Diclofenac eine Wirkung auf dieses Protein hat.

Im Rahmen von Apoptosevorgängen ist auch p53 ein wichtiges Schlüssel-Gen und diente in dieser Studie dem direkten Apoptosenachweis. Es ist das in Studien am häufigsten untersuchte Gen in der Tumorentstehung. (92-94) Als Tumorsuppressorgen wirkt p53 über zwei Mechanismen in der Tumorabwehr: zum einen über ein Anhalten des Zellzyklus und zum anderen über eine Induktion der Apoptose. In aktinischen Keratosen ist das p53-Protein jedoch durch chronische UV-Strahlung meist genetisch verändert und verliert somit seine Funktion in der Tumorabwehr. (29)

p53 ist in gesunder, sonnengeschützter Haut kaum zu finden, da es eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt. Kommt es jedoch durch akute oder chronische UV-Exposition zu einem direkten oder indirekten Schaden in der DNS, führt dies zu einer erhöhten Expression und Stabilisierung von p53, dessen Halbwertszeit dadurch von 6-20 Minuten

auf mehrere Stunden verlängert wird. (95) Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg der Fähigkeit vom Protein p53 an spezifische DNS-Sequenzen zu binden und somit die Transkription von Protein p21 zu fördern. (96-97) p53 führt somit indirekt zu einem Anhalten des Zell-Zyklus, um so der geschädigten Zelle genug Zeit zu gewährleisten, den Schaden zu beheben. Bei irreversiblen Defekten in der DNS kommt es durch Aktivierung von Todesrezeptoren und Todesliganden zur Apoptose. (98) Bei Veränderungen oder Mutationen des p53-Gens ist dieser Mechanismus gestört. (96) Mehrere Studien zeigten eine Korrelation von p53-Überexpression mit der Präsenz von p53-Mutationen (93, 99-100). In unserer Studie zeigten sich vor der Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der p53-Expression zwischen aktinisch geschädigter Haut und dem unbehandelten Kontrollareal. Nach der Behandlung kam es zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Abnahme der p53-Expression in der aktinisch geschädigten Haut. Es konnte jedoch auch demonstriert werden, dass die p53-Expression nach der Behandlung signifikant geringer war als im unbehandelten Kontrollareal. Diese, wenn auch nur geringe Abnahme der p53-Expression nach der Behandlung, könnte indirekt ein Hinweis für die Abnahme des Zellzyklusarrest und direkt für die Abnahme der Apoptosevorgänge darstellen. Jedoch muss dieser Effekt kritisch betrachtet werden, da beide Mechanismen verhindern, dass stark DNS-geschädigte Zellen überleben und maligne entarten oder einen nicht-apoptotischen Zelltod sterben, der die umgebenden Zellen durch zelltoxische Substanzen schädigen kann. In anderen Tumormodellen (107-110), wie auch bei epithelialen Tumoren (111), konnte ein Ansteigen der Apoptose nach systemischer und topischer Behandlung mit NSARs nachgewiesen werden. Jedoch blieben auch in diesen Studien die apoptoseinduzierenden Mechanismen noch unklar. Eine mögliche Erklärung für das Ansteigen der Apoptose nach der Behandlung mit NSARs wurde durch eine Blockade von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 durch COX-2 vermutet. (38).

Andererseits wurde in dieser Studie keine Differenzierung der p53-Expression zwischen p53-Wildtyp und p53-Mutation gemacht. Folglich lässt sich an Hand unserer Ergebnisse keine definitive Aussage treffen, ob es vorwiegend zu einer Reduktion von funktionsfähigen p53 und somit auch der Apoptose oder zu einer Reduktion von mutiertem p53 kam. Dennoch lässt der Rückgang der p53-Expression eine Abnahme der aktinischen Schädigung und einen Einfluss von Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure auf die Apoptose vermuten.

Die erhöhte p53-Expression im Kontrollareal ist möglicherweise auf den natürlichen Alterungsprozess in der Haut zurückzuführen. (95) Eine Verkürzung der Chromosomenenden, welche bei der natürlichen Zellteilung über Jahre hinweg entsteht, triggert die Aktivierung von p53, wodurch es zur weiteren Aktivierung des zellulären Alterungsprogramms kommt. (95, 101-102)

Wie oben bereits erwähnt ist p21 ein weiterer wichtiger Faktor in der Regulierung des Zellzyklus. (103) Durch eine erhöhte Konzentration von aktiviertem p53 kommt es zu einer Transaktivierung von p21. Dieses bindet Cyclin-abhängige Kinasen und hemmt somit die Phosphorylierung von am Zellzyklus beteiligten Proteinen. Diese Proteine sind dadurch nicht mehr in der Lage an Transkriptionsfaktoren zu binden, die für den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus benötigt werden. Bei erhöhter p21-Expression kann die Zelle von der G1-Phase nicht in die S-Phase übertreten, sondern unterliegt den Reparaturmechanismen der Zelle. (104) In diesem Zusammenhang wurde p21 als Marker zur Untersuchung der Reparaturmechanismen in der aktinisch geschädigten Haut verwendet.

In unserer Studie zeigte sich p21 vor der Behandlung, im Gegensatz zu p53, in allen aktinisch geschädigten Hautbiopsien im Vergleich mit dem Kontrollareal signifikant erhöht. Nach der Behandlung kam es zu einem signifikanten Abfall der p21-Konzentration in den aktinisch geschädigten Hautbiopsien, welcher positiv mit dem Abfall der p53-Expression nach der Behandlung korrelierte.

Wie bereits weiter oben erläutert, ist die p21-Aktivierung abhängig von funktionell intaktem und aktivem p53. Man könnte auf Grund dieser Annahme und an Hand unserer Ergebnisse vermuten, dass in unseren Biopsien sehr wenig bis kein mutiertes oder funktionell inaktives Protein p53 vorhanden war, da es sonst nicht zu einer so deutlichen Aktivierung von p21 durch p53 gekommen wäre. Jedoch lässt sich dazu keine eindeutige Aussage treffen, da wir nicht zwischen funktionell intakten p53-Wildtyp und mutiertem inaktivem p53 differenziert haben. Es stellt sich hier die Frage, ob p21 unabhängig von p53 fungieren kann. Miyazaki et al. und Ohta et al. konnten bereits in Studien eine p53-unabhängige Wirkung von p21 zeigen. (105-106)

Der deutliche Abfall der p21-Expression nach der Behandlung zeigt jedoch, dass Diclofenac einen Einfluss auf dieses Protein und somit auch auf den Zellzyklus hat.

Nicht nur Zellzyklusvorgänge und die Unterdrückung von Apoptosevorgängen in geschädigten epithelialen Zellen, sondern auch die Proliferation dieser Zellen ist notwendig für das Wachstum von epithelialen Tumoren. Als Zellantigen wird Ki67 nur

von proliferierenden Zellen exprimiert. Gerdes et al. (1984) konnten nachweisen, dass Ki67 in allen Phasen des Zellzyklus, außer in der G0-Phase, nachweisbar ist. (112) Der Ki67-Antikörper fungiert somit als guter Marker zum Nachweis der Wachstumsfraktion und der Bereitschaft zur Proliferation normaler und neoplastischer Zellen. (113-120) In unseren Biopsien war sowohl im Kontrollareal als auch in der aktinisch geschädigten, unbehandelten Haut Ki67 nachweisbar. Da auch gesunde Haut einer ständigen Regeneration unterliegt, wurde im Kontrollareal sowie auch in der Hautbiopsie nach der Behandlung der Nachweis von Ki67 erwartet. Vor der Behandlung zeigte sich im Vergleich mit dem Kontrollareal eine nicht signifikante, aber teilweise zwei- bis fünffach erhöhte Ki67-Expression in der aktinisch geschädigten Hautbiopsie. Nach der Behandlung kam es zu einem nicht signifikanten Rückgang der Ki67-Expression. Bis auf vier Biopsien zeigten alle aktinisch geschädigten Hautbiopsien nach der Behandlung aber eine Rückbildungstendenz der Ki67-Expression. Fast die Hälfte der Biopsien zeigte nach der Behandlung eine geringere Ki67-Expression als das Kontrollareal. Die Ergebnisse lassen auf eine erhöhte Proliferationsrate in der aktinisch geschädigten Haut und auf einen hemmenden Einfluss von Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure auf die Proliferation von Zellen schließen.

Qiao et al. demonstrierte in einer Studie mit Kolonkarzinomzellen, dass es nach der systemischen Behandlung mit dem NSAR Suldinac Sulfid zu einer Abnahme der Ki67-Expression in diesen Zell-Linien und zu einem Rückgang der Zellzahl von über 50% kam. (121) Auch andere Studien schrieben diesen antiproliferativen Effekt von NSARs vor allem auf eine Hemmung von COX-2 zu, welches in nicht gehemmter Form über die Prostaglandinsynthese positiv auf das Tumorwachstum wirkt. (38, 70, 111) Denn COX-2 mediertes Prostaglandin E2 aktiviert über das Protoonkogen Ras den MAP-Kinase-Weg, wodurch die Transformation und Proliferation von Zellen, sowie das Gesamtüberleben dieser Zellen induziert wird. (38) Durch die Hemmung der COX-Synthese durch NSARs wird auch der Ras-Zielweg unterdrückt und es kommt zu einem Sinken der Proliferations- und Transformationsrate der Zelle.

Für die Entwicklung und das Wachstum von epithelialen Tumoren ist ebenfalls die Bildung neuer Blutgefäße (Neoangiogenese) essentiell. Um die Entwicklung der Neoangiogenese der aktinisch geschädigten Haut zu untersuchen, nutzten wir einen Marker für CD31, welches von Endothelzellen exprimiert wird. Vor der Behandlung zeigte sich in unserer Studie im Vergleich zum Kontrollareal die CD31-Expression in der aktinisch geschädigten Haut signifikant vier- bis sechsfach erhöht. Nach der

Behandlung kam es zu einem signifikanten Rückgang der CD31-Expression in der aktinisch geschädigten Hautbiopsie. Bei fast der Hälfte der untersuchten aktinisch geschädigten Biopsien war die CD31-Expression nach der Behandlung sogar geringer als im Kontrollareal, in welchem sich auch eine CD31-Expression nachweisen ließ. Die Ergebnisse zeigen, dass die Gefäßdichte in der aktinisch geschädigten Haut signifikant höher war als im Kontrollareal. Die erhöhte Gefäßdichte korreliert positiv mit der zu Beginn der Behandlung bei allen Patienten klinisch sichtbaren Rötung im Untersuchungsareal. Auch der Rückgang der CD31-Expression nach der Behandlung korreliert positiv mit den Ergebnissen aus der klinischen Untersuchung. Denn zwei Drittel der Patienten zeigte klinisch nach der Behandlung eine komplette Remission der Rötung, bei einem Drittel der Patienten war lediglich noch eine milde Rötung zu sehen. Die Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass es zu einer Abnahme der Gefäßdichte nach der Behandlung mit Diclofenac 3% in 2,5 % Hyaluronsäure kam. Hierdurch lässt sich möglicherweise die antiangiogenetische Wirkung von Diclofenac 3% in 2,5% Hyaluronsäure in der Tumorbabwehr erklären. In der Neoangiogenese scheint eine erhöhte Expression der Cyclooxygenase eine wichtige Rolle zu spielen. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass diese erhöhte Expression von COX-2 die Produktion von angiogenetischen Faktoren induziert und eine Erhöhung von COX-2 auf den Endothelzellen die Migration von Leukozyten und die Gefäßneubildung stimuliert. (122) Durch die Anwendung nichtselektiver NSARs könnte also die Bildung von angiogenetischen Faktoren, die Migration von Leukozyten und die Gefäßneubildung unterbunden werden. Dem Tumorgewebe würde dadurch ein essentieller Faktor in seinem Wachstum, die Blutversorgung, fehlen. (123)