

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Anatomie und
Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher)
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

In vitro Untersuchungen zur Beeinflussung der Zellproliferation beim kleinzelligen Bronchialkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Marlien Christin Hinz

aus Hamburg

Hamburg, 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Herr Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Frau Prof. Dr. Susanne Klutmann

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. Rainer Thomasius

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Arbeitshypothese und Fragestellung	7
2 Einleitung	8
2.1 Das Bronchialkarzinom	8
2.2 Ätiologie des Bronchialkarzinoms	9
2.2.1 Rauchen	9
2.2.2 Gering potente Ursachen	10
2.3 Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC)	11
2.3.1 Tumorausdehnung und Stadieneinteilung	11
2.3.2 Diagnostik	14
2.3.3 Therapie	15
2.3.3.1 Stadium I-III (limited disease, LD)	16
2.3.3.2 Stadium IV (extensive disease, ED)	17
2.3.3.3 Second Line Therapie	18
2.3.3.4 Therapieergebnisse	19
2.4 Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil als Anti-Tumor-Therapeutika	20
2.4.1 Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)	20
2.4.1.1 Indometacin	22
2.4.1.2 Meloxicam	23
2.4.2 IBMX	24
2.4.3 Phosphodiesterase-5-Hemmer	25
2.4.3.1 Sildenafil	26
2.4.3.2 Vardenafil	27
2.4.4 Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil in der Tumorforschung	27
3 Material und Methoden	30
3.1 Material	30
3.1.1 Chemikalien	30
3.1.2 Lösungen	30

3.1.3	Verbrauchsmaterialien	30
3.1.4	Geräte	31
3.1.5	Software	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Zellkultur	32
3.2.1.1	Zelllinien	32
3.2.1.2	Kultivierung der Zellen	33
3.2.2	Zellzahlbestimmung	33
3.2.3	Eichkurven	34
3.2.4	Inkubation von kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien mit Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil	34
3.2.5	Statistik	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Zelllinie H69	36
4.1.1	Der Einfluss von Indometacin, IBMX, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil auf H69-Zellen	36
4.1.2	Der Einfluss von Sildenafil und Indometacin in Kombination auf H69-Zellen	39
4.1.3	Der Einfluss von Sildenafil und Meloxicam in Kombination auf H69-Zellen	40
4.1.4	Der Einfluss von IBMX und Meloxicam in Kombination auf H69-Zellen	42
4.2	Zelllinie H82	44
4.2.1	Der Einfluss von Indometacin, IBMX, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil auf H82-Zellen	44
4.2.2	Der Einfluss von Sildenafil und Indometacin in Kombination auf H82-Zellen	47
4.2.3	Der Einfluss von Sildenafil und Meloxicam in Kombination auf H82-Zellen	48
4.2.4	Der Einfluss von IBMX und Meloxicam in Kombination auf H82-Zellen	50

5	Diskussion	52
5.1	Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)	52
5.2	IBMX	58
5.3	Phosphodiesterase-5-Hemmer	59
5.4	Kombinationseffekte	62
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Anhang	80
9	Danksagung	90
10	Lebenslauf	91
11	Eidesstattliche Versicherung	92

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette
ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1
ABCC	multidrug resistance associated proteins
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
ACE	Adriamycin + Cyclophosphamid + Etoposid
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
aqua dest.	aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
B-CLL	B-Zell chronisch lymphatische Leukämiezellen
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAV	Cyclophosphamid + Adriamycin + Vincristin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm ²	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
COX 1	Cyclooxygenase 1
COX 2	Cyclooxygenase 2
COX 3	Cyclooxygenase 3
CT	Computertomographie
CYFRA 21-1	Cytokeratinfragment 21-1

ED	extensive disease
et al.	et alii
ETS	environmental tobacco smoke (Passivrauch)
FDA	Food and Drug Administration
GMP	Guanosinmonophosphat
HPETE	Hydroxyperoxysäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
Inc.	Incorporated
kD	Kilodalton
LD	limited disease
M	Metastase
MDR	multidrug Resistance
MDR1	multidrug Resistance Protein 1
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
ml	Milliliter
MRP	multidrug resistant associated protein
MRP1	multidrug resistant protein 1
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Nodule (Lymphknoten)
n	Anzahl
nm	Nanometer
NSAID	non steroidal anti-inflammatory drugs
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer, nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
NSE	neuronenspezifische Enolase
O ₂	Sauerstoff
p	Wahrscheinlichkeit

PDE	Phosphodiesterase
PE	Etoposid + Cisplatin bzw. Carboplatin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostacyclin
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
pos.	positive
RT	Raumtemperatur
SCLC	Small Cell Lung Cancer, Kleinzelliges Bronchialkarzinom
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
T	Tumor
Tab.	Tabelle
TNM	T=Tumor, N=Nodes=Lymphknoten, M=Metastasen
U/min	Umdrehungen pro Minute
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XTT	Tetrazoliumsalz
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μM	Mikromol

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Bronchialkarzinom ist ein bösartiger Tumor, der von den Bronchien ausgeht. Im Jahre 2004 erkrankten 33.000 Männer am Bronchialkarzinom (15% der Krebsneuerkrankungen). Bei den Frauen lag die Zahl der Neuerkrankungen bei 13.200 (6,1% der bösartigen Neoplasien). Die 5-Jahres-Überlebensrate ist mit 13-17% bei Männern und 13-19% bei Frauen sehr gering [Husmann *et al.*, 2010]. Damit stellt das Bronchialkarzinom eine prognostisch ungünstige Krebsform dar. Histopathologisch unterscheidet man zwei Gruppen des Bronchialkarzinoms. Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC), das besonders schnell wächst und ca. 15-25% der Fälle ausmacht, und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC), das am häufigsten vorkommt. Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist durch ein rasches aggressives Wachstum mit frühzeitiger Metastasierung gekennzeichnet. Die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt ohne Behandlung bei ca. drei Monaten und verlängert sich unter Behandlung auf etwa 9-12 Monate. Die Standardtherapie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom besteht in einer kombinierten Chemotherapie. Häufig sind Rezidive des kleinzelligen Bronchialkarzinoms gegenüber einer erneuten Chemotherapie resistent, so dass neue Therapieansätze entwickelt werden müssen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es neue Therapieoptionen für das kleinzellige Bronchialkarzinom zu entwickeln. Hierzu wird die Wirkung verschiedener Pharmaka auf die kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 mithilfe eines Zellproliferationsassays untersucht. Die Fragestellungen dieser Arbeit sind:

- Welche Wirkung haben die Medikamente Indometacin, IBMX, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil einzeln auf das kleinzellige Bronchialkarzinom?
- Welche Wirkung haben die Kombinationen IBMX/Meloxicam, Indometacin/Sildenafil und Sildenafil/Meloxicam auf das kleinzellige Bronchialkarzinom?

2 Einleitung

2.1 Das Bronchialkarzinom

Beim Bronchialkarzinom handelt es sich um einen malignen Tumor der Lunge, der in zwei Haupttypen unterteilt wird: das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC, Small Cell Lung Cancer) und das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC, Non Small Cell Lung Cancer).

Sowohl für Männer als auch für Frauen ist Lungenkrebs gegenwärtig die am dritthäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung in Deutschland. Die Inzidenz liegt nach aktuellen Angaben bei 35 pro 100 000 Einwohnern für Frauen und bei 81 pro 100 000 Einwohnern für Männer [Kaiser *et al.*, 2011]. Während die Erkrankungshäufigkeit bei Frauen kontinuierlich zunimmt, ist sie bei Männern langsam rückläufig, so dass man davon ausgeht, dass es in den nächsten Jahren, durch den steigenden Tabakkonsum der Frauen, zu einer Angleichung kommen wird [Kaiser *et al.*, 2011]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren [Husmann *et al.*, 2010]. Die Anzahl der Neuerkrankungen liegt bei zirka 50000 pro Jahr mit steigender Tendenz. Während in Deutschland das Bronchialkarzinom unter den Tumorerkrankungen die dritthäufigste Todesursache der Frauen darstellt, ist es unter den Männern nicht nur in Deutschland sondern auch weltweit die häufigste Todesursache bezogen auf Krebserkrankungen [Batzler *et al.*, 2008].

Rauchen wird als Hauptrisikofaktor des Bronchialkarzinoms angesehen. Bei Frauen sind wahrscheinlich 60% und bei Männern 90% der Erkrankungen auf den aktiven Konsum von Tabak zurückzuführen [Husmann *et al.*, 2010].

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert das Bronchialkarzinom histologisch in das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC), das etwa 20% der Lungentumore ausmacht, und das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC). Mit etwa 80% macht das NSCLC den größeren Anteil der Bronchialkarzinome aus. Das NSCLC unterteilt man weiterhin in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige Karzinome und weitere seltene Unterformen.

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist durch eine hohe Mitoserate gekennzeichnet. Dies resultiert in einem sehr schnellen Tumorwachstum und einer frühzeitigen Metastasierung. Aufgrund dessen wird das kleinzellige Bronchialkarzinom häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert [Kaiser *et al.*, 2011]. Die Lebenserwartung der Patienten ist

abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und vom Stadium der Tumorerkrankung (TNM-Klassifikation).

2.2 Ätiologie des Bronchialkarzinoms

Man vermutet, dass die Entstehung des Bronchialkarzinoms ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren ist, wobei einige Faktoren das persönliche Erkrankungsrisiko stärker erhöhen als andere.

2.2.1 Rauchen

In Abhängigkeit vom Alter, in dem die erste Zigarette geraucht wurde, von der Anzahl der konsumierten Zigaretten pro Tag und vom Inhalationsgrad ist Rauchen mit Abstand der wichtigste Risikofaktor an Lungenkrebs zu erkranken [Peto, 1986; Agudo *et al.*, 2000]. Durchschnittlich steigt das Risiko eines lebenslangen Rauchers am Bronchialkarzinom zu erkranken auf 20% gegenüber dem eines Nichtraucher an [Alberg und Samet, 2003]. Die Einstellung des Rauchens reduziert das Risiko ein Bronchialkarzinom zu entwickeln [Khuder und Mutgi, 2001]. Trotzdem ist das Risiko nach 15 Jahren Abstinenz noch doppelt so hoch wie das eines Nichtrauchers. Erst nach 30 Jahren Abstinenz ist das Risiko wieder mit dem eines Nichtrauchers vergleichbar (Tabelle 2.1).

Ob die Einstellung des Nikotinkonsums die Lebenserwartung steigert, nachdem der Lungentumor diagnostiziert wurde, ist noch nicht vollständig geklärt [Yoshino und Maehara, 2007].

Jahre seit Nikotinabstinenz	Relatives Risiko	
	Männer	Frauen
Aktive Raucher	1,0	1,0
2-9 Jahre	0,66*	0,41*
10-19 Jahre	0,27*	0,19*
20-29 Jahre	0,17*	0,08*
>30 Jahre	0,08*	0,13*
Nichtraucher	0,04*	0,11*

Tabelle 2.1 Einfluss der Abstinenz vom Rauchen auf das Lungenkrebsrisiko. Verändert nach Simonato *et al.* [2001], * $p < 0,05$.

Auch die Passivrauchbelastung in Innenräumen erhöht das Risiko am Bronchialkarzinom zu erkranken, da im sogenannten Nebenstromrauch eine Vielzahl von Schadstoffen vorhanden ist. Passivrauch bezeichnet man auch als ETS (environmental tobacco smoke). Zhong *et al.* [2000] bewiesen den Zusammenhang zwischen Lungenkrebs und Passivrauchen. Bei Frauen, die ihr Leben lang nicht rauchen, aber dem Rauch ihrer Ehemänner ausgesetzt sind, steigt das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken um 20% an. Für nichtrauchende Männer, die dem Rauch ihrer Ehefrauen ausgesetzt sind, steigt das Risiko sogar um 47%. Für Nichtraucher, die am Arbeitsplatz ETS ausgesetzt sind, erhöht sich das Risiko am bronchogenen Karzinom zu erkranken für Frauen um 15% und für Männer um 29%. Die ETS-Belastung während der Kindheit resultiert nicht in einem erhöhtem Lungenkrebsrisiko [Zhong *et al.*, 2000].

Tabakkonsum steigert das Risiko für alle Subtypen des Bronchialkarzinoms, wobei das relative Risiko am Adenokarzinom zu erkranken geringer ist als am Plattenepithelkarzinom und am kleinzelligen Bronchialkarzinom zu erkranken (Tabelle 2.2).

	Männer		Frauen	
	Plattenepithel-/kleinzelliges Bronchialkarzinom	Adeno-karzinom	Plattenepithel-/kleinzelliges Bronchialkarzinom	Adeno-karzinom
Nichtraucher	1,0	1,0	1,0	1,0
Ex-Raucher	16,2*	3,5*	3,8*	1,1
Raucher	57,9*	8,0*	18,2*	4,1*

Tabelle 2.2 Relatives Risiko für die Subtypen des Bronchialkarzinoms für Männer und Frauen in Europa. Verändert nach Simonato *et al.* [2001], $p^* > 0,05$.

2.2.2 Gering potente Ursachen

Der Kontakt oder das Einatmen verschiedener chemischer Stoffe am Arbeitsplatz kann zu Lungenkrebs führen. Hierzu zählen insbesondere die Stoffe Asbest, Metalle wie Nickel, Cadmium und Arsen, das Gas Radon wie auch die Exposition mit ionisierender Strahlung [Saracci und Boffetta, 1994]. Besonders die Kombination Asbestbelastung und Rauchen potenziert das Risiko an einem Lungentumor zu erkranken [Erren *et al.*, 1999]. In geringem Umfang kann auch eine hohe Schadstoffbelastung der Außenluft das Risiko auf etwa das Eineinhalbfache erhöhen. Als bedeutsam in diesem Bereich sind Feinstaub und Dieselruß einzustufen [DKFZ, 2012].

2.3 Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC)

Das kleinzellige Bronchialkarzinom macht etwa 20% der Bronchialkarzinome aus. Histologisch unterscheidet man einen intermediären Typ von Kombinationstumoren (combined oat-cell-Karzinom), zu denen Karzinome mit plattenepithelialen und/oder adenoiden Anteilen zählen.

2.3.1 Tumorausdehnung und Stadieneinteilung

Das Stadium eines Tumors wird nach dem TNM-System festgelegt, wobei T für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors steht, N eine Aussage zum Befall der regionären Lymphknoten und M zum Vorhandensein von Fernmetastasen macht (Tabelle 2.3).

Aufgrund unterschiedlicher Therapieansätze unterteilt man das kleinzellige Bronchialkarzinom heute in eine limited disease (LD) und eine extensive disease (ED) [Simon und Turrisi, 2007] (Tabelle 2.4).

Beim lokalen kleinzelligen Bronchialkarzinom (limited disease) ist der Tumor auf einen Hemithorax und die regionären Lymphknoten begrenzt, während bei der ausgeprägten Form (extensive disease) diese Strukturen überschritten werden [Bradley *et al.*, 2004]. Ein Unterschied zwischen der limited disease und der extensive disease ergibt sich im Therapieansatz. Während ein Tumor des lokalen kleinzelligen Bronchialkarzinoms noch im zulässigen Bestrahlungsfeld liegt, kann ein Tumor im extensive disease-Stadium hingegen nur mit einer kombinierten Strahlen- und Chemotherapie behandelt werden [Bradley *et al.*, 2004]. Bei ca. 60-70% der Patienten ergibt sich bei Erstdiagnose die ausgeprägte Form des Bronchialkarzinoms (extensive disease) und bei 30-40% eine limited disease. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 10-20% für Patienten im Stadium der limited disease und 3-5% für Patienten im Stadium der extensive disease [Hanna und Einhorn, 2002; Jemal *et al.*, 2005]. Fernmetastasen findet man zu 19-38% im Knochen, zu 17-34% in der Leber, zu 10-17% in den Nebennieren und bis zu 14% im Gehirn [Abrams *et al.*, 1988].

Primärtumor (T)	TX	Primärtumor nicht beurteilbar oder pos. Zytologie, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
	T0	kein Anhalt für Primärtumor
	Tis	Carcinoma in Situ
	T1	Tumor $\leq 3\text{cm}$, umgeben von Lungengewebe oder visceraler Pleura, kein Befall des Hauptbronchus
	<i>T1a</i>	<i>Tumor $\leq 2\text{cm}$</i>
	<i>T1b</i>	<i>Tumor $> 2\text{cm}$ aber $\leq 3\text{cm}$</i>
	T2	Tumor $> 3\text{cm}$ aber $\leq 7\text{cm}$ oder Tumor mit Befall des Hauptbronchus (2cm oder weiter distal der Bifurkation) oder Tumor infiltriert viscerale Pleura oder partielle Atelektase
	<i>T2a</i>	<i>Tumor $> 3\text{cm}$ aber $\geq 5\text{cm}$</i>
	<i>T2b</i>	<i>Tumor $> 5\text{cm}$ aber $\leq 7\text{cm}$</i>
	T3	Tumor $> 7\text{cm}$ oder Tumor mit Befall von Brustwand, Zwerchfell, Nervus phrenicus, mediastinaler Pleura oder parietalem Perikard, oder Tumor im Hauptbronchus $< 2\text{cm}$ distal der Carina oder totale Atelektase oder separate Tumorknoten in einem Lungenlappen
	T4	Tumor beliebiger Größe mit Infiltration von Mediastinum, Herz, großer Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper oder Hauptcarina, Tumor mit malignem Pleura- oder Perikarderguss oder mit Sattelitenherden im gleichen Lungenlappen
Regionäre Lymphknoten (N)	NX	keine Aussage über die regionären Lymphknoten möglich
	N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen nachweisbar
	N1	ipsilaterale peribronchiale und/oder hiläre Lymphknotenmetastasen
	N2	ipsilaterale mediastinale und/oder subcarinale Lymphknotenmetastasen
	N3	kontralaterale mediastinale / hiläre oder ipsi-/ kontralaterale Salenus- oder supraklavikuläre Lymphknotenmetastasen
Fernmetastasen (M)	MX	keine Aussage über Fernmetastasen möglich
	M0	kein Nachweis von Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2.3 Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation. Verändert nach CHEST, The New Lung Cancer Staging System Detterbeck *et al.* [2010].

Okkultes Karzinom	TX	N0	M0	Tumor optisch nicht nachweisbar, Lymphknoten tumorfrei, keine Fernmetastasen	limited disease
Stadium 0	Tis	N0	M0	Tumor auf die Schleimhaut begrenzt, Lymphknoten tumorfrei, keine Fernmetastasen	
Stadium Ia Stadium Ib	T1 T2	N0 N0	M0 M0	peripherer Lungentumor ohne Lymphknotenbefall und ohne Fernmetastasen	
Stadium IIa Stadium IIb	T1 T2 T3	N1 N1 N0	M0 M0 M0	Lungentumor mit begrenztem Lymphknotenbefall (N1) ohne Fernmetastasen	
Stadium IIIa Stadium IIIb	T1 T2 T3 Jedes T T4	N2 N2 N1,N2 N3 jedes N	M0 M0 M0 M0 M0	Lungentumor mit fortgeschrittenem Lymphknotenbefall (N2, N3) ohne Fernmetastasen	
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1	Lungentumor, der Metastasen (M1) in anderen Organen gebildet hat	extensive disease

Tabelle 2.4 Stadien des Lungenkrebs unter Berücksichtigung der TNM-Klassifikation. Verändert nach Goeckenjan *et al.* [2010]

2.3.2 Diagnostik

Nach einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung des Patienten liefert ein Röntgenthorax in zwei Ebenen einen ersten Aufschluss über das Vorhandensein eines Bronchialkarzinoms, welcher sich als pulmonaler Rundherd darstellt. Hierbei handelt es sich um eine mehr oder weniger runde, von Lungengewebe umgebene Verschattung im Röntgenbild. Solange nicht das Gegenteil bewiesen werden kann, gilt ein solcher Befund immer als malignitätsverdächtig [Hoffmann *et al.*, 2000]. Zur Abklärung des pulmonalen Rundherdes wird zunächst immer eine standardisierte Primärdiagnostik durchgeführt, die eine Computertomographie (CT) des Thorax und eine Lungenfunktionsdiagnostik umfasst [Hoffmann *et al.*, 2000]. Um das kleinzellige Bronchialkarzinom vom nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom abzugrenzen, ist eine histologische Diagnosesicherung unumgänglich. Wichtig ist diese Differenzierung aufgrund der unterschiedlichen therapeutischen Ansätze und der Prognose beider Subtypen. Gewebe für die histologische Untersuchung kann im Rahmen einer Bronchoskopie oder Mediastinoskopie gewonnen werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer perkutanen Biopsie eines vergrößerten Lymphknotens, eines verdächtigen Weichteilbefundes, einer Osteolyse des Knochenmarks oder pleuraler Veränderungen.

Hat sich der Verdacht auf ein Bronchialkarzinom bestätigt und wurde der Subtypus bestimmt, muss geklärt werden, ob sich der Tumor schon über den Entstehungsort ausgebreitet hat und Metastasen entstanden sind (TNM-Klassifikation). Zur Bestimmung der Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T) eignet sich ein Kontrast-CT. In manchen Fällen liefert ein MRT detailliertere Informationen über die Invasion des Tumors in thorakale Strukturen [Silvestri *et al.*, 2007]. Um eine Aussage zum Befall regionärer Lymphknoten (N) zu machen, eignet sich ebenfalls ein Kontrast-CT. Eine höhere Spezifität und Sensibilität liefern allerdings eine PET oder PET-CT [Gould *et al.*, 2003]. Soll eine kurative Therapie eingeschlagen werden, wird eine Lymphknotenbiopsie zur endgültigen Analyse angeschlossen. Fernmetastasen (M) sprechen in der Regel gegen eine Therapie mit kurativem Ansatz. Am häufigsten sind Fernmetastasen in Gehirn, Leber, Knochen, Lungen und Nebennieren zu finden. Sie lassen sich optisch mittels einem kranialen CT oder MRT, einer Knochenszintigraphie, einer Abdomensonographie, einem CT oder MRT der Leber und Nebennieren sowie einer PET oder PET-CT darstellen [Hammerschmidt und Wirtz, 2009].

Eine weitere diagnostische Maßnahme ist die Laboruntersuchung des Blutes zum Nachweis der Tumormarker NSE und CYFRA 21-1 [Gruber *et al.*, 2003].

2.3.3 Therapie

Ohne Behandlung zeigt das kleinzellige Bronchialkarzinom ein aggressives Wachstum und führt innerhalb kurzer Zeit zum Tode. Die lokale Therapie umfasst die Operation und die Strahlentherapie, die systemische Behandlung die Chemotherapie. Bei der Therapie des Bronchialkarzinoms handelt es sich meist um eine Kombinationstherapie, wobei man eine Kombination aus Chemotherapie und Strahlentherapie als Radiochemotherapie bezeichnet. Finden Chemo-, Strahlen- oder Radiochemotherapie vor der Operation statt, spricht man von einer neoadjuvanten Therapie, finden sie nach der Operation statt, von einer adjuvanten Therapie. Green *et al.* [1969] zeigten, dass die durchschnittliche Überlebensrate nach Diagnosestellung ohne Behandlung bei nur 1,4 Monaten liegt. Eine Monotherapie erhöht die Lebenserwartung um 3 Monate [Bunn *et al.*, 1977], während eine Kombinationstherapie die mittlere Überlebensrate um das 4- bis 5-fache steigert. Trotz seines aggressiven Wachstums spricht das SCLC gut auf die Chemotherapie an und ist im Stadium limited disease heilbar (15-25% 5-Jahres-Überlebensrate). Hingegen versterben fast alle Patienten im Stadium extensive disease innerhalb von zwei Jahren [Spira und Ettinger, 2004].

Das kleinzellige Bronchialkarzinom neigt schon in frühen Wachstumsphasen zu Absiedelungen in die Umgebung oder andere Organe, so dass bei Diagnosestellung in ca. 60–70% der Fälle eine extensive disease (ED) vorliegt [Simon und Turrisi, 2007]. Im Stadium der limited disease (LD) steht ein kurativ orientierter Therapieansatz mit dem Ziel der kompletten Tumorremission im Vordergrund. Im Stadium der extensive disease sind die Linderung von Beschwerden, die Vorbeugung von Komplikationen und der Erhalt der Lebensqualität vorrangig.

2.3.3.1 Stadium I-III (limited disease, LD)

In sehr frühen Stadien (very limited disease, ca. 3% aller SCLC), bei sehr kleinen peripheren Tumoren ohne Lymphknotenbefall im Mediastinum (Stadium I, T1N0, T2N0) kann eine primäre Operation in Erwägung gezogen werden. Zur Ausschaltung möglicher noch nicht nachweisbarer Metastasen wird, meist in Anschluss an die Operation, eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Im besten Fall erhalten die Patienten 4 Zyklen Cisplatin/Etoposid in dreiwöchigen Intervallen. Bei R0-Resektion und Cisplatinhaltiger Kombinationschemotherapie konnte ein 5-Jahres-Überleben von 86% erzielt werden [Brock *et al.*, 2005]. Anschließend sollte eine prophylaktische Schädel-Hirn-Bestrahlung stattfinden (Abbildung 2.1). Da das SCLC nur selten in diesem frühen Stadium diagnostiziert wird spielt die kurative Operation allerdings nur eine untergeordnete Rolle [Hanagiri *et al.*, 2009].

In den meisten Fällen ist das SCLC selbst im Stadium der limited disease nicht mehr operabel. Bei gutem Allgemeinzustand ist eine Radiochemotherapie mit 4-6 Zyklen Etoposid/Cisplatin und simultaner konsolidierender Primärtumorbestrahlung die Therapie der Wahl. Ist der Allgemeinzustand reduziert, wird eine sequentielle Radiochemotherapie empfohlen (Abbildung 2.1). Um möglichst gute Therapieergebnisse zu erzielen, sollte die Bestrahlung frühzeitig erfolgen, am besten parallel zum zweiten Zyklus der Chemotherapie [de Ruyscher *et al.*, 2006; Sorensen *et al.*, 2010]. Zwei Metaanalysen konnten zeigen, dass die zusätzliche thorakale Bestrahlung die 2- und 3-Jahres-Überlebensrate um 5,4% erhöht [Pignon *et al.*, 1992; Warde und Payne, 1992]. Ziel der Behandlung ist eine Vollremission, da nur so eine Langzeitremission bzw. Heilung erreicht werden kann. Wird durch die primäre Chemotherapie keine Vollremission erzielt, ist von einer schlechten Langzeitprognose auszugehen. Spricht die Therapie gut an, wird im Anschluss eine Schädel-Hirn-Bestrahlung durchgeführt.

Als Chemotherapeutika werden in der Regel eine Kombination aus Etoposid und Cisplatin bzw. Carboplatin (PE) in einer möglichst hohen, aber noch verträglichen Dosierung verwendet [Chua *et al.*, 2004]. Auch weit verbreitet ist z.B. die Kombination der Chemotherapeutika Adriamycin (Doxorubicin), Cyclophosphamid und Etoposid (ACE) oder Cyclophosphamid, Adriamycin und Vincristin (CAV) [Sambrook und Girling, 2001]. Dieses Vorgehen stellt seit den 1980er Jahren die Standardtherapie dar.

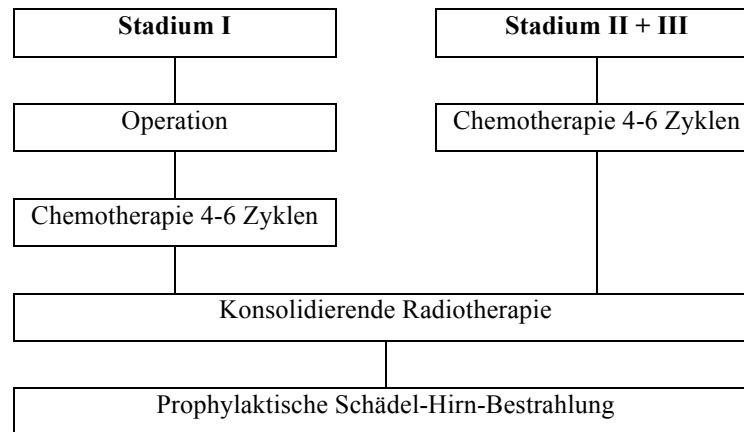


Abbildung 2.1 Eigene Darstellung der Therapiestrategie im Stadium der limited disease des SCLC.

Die prophylaktische Schädel-Hirn-Bestrahlung nach kompletter Remission wird kontrovers diskutiert. Meert *et al.* [2001] und Auperin *et al.* [1999] konnten in ihren Studien nach der Bestrahlung eine Verbesserung des Überlebens nachweisen. Arriagada *et al.* [2002] konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Empfohlen wird die prophylaktische Schädel-Hirn-Bestrahlung soweit sie für den Patienten zumutbar scheint.

2.3.3.2 Stadium IV (extensive disease, ED)

Im Stadium der extensive disease ist eine komplette Tumorremission oder gar eine Heilung nicht mehr möglich. Die Standardtherapie besteht in einer palliativen systemischen Chemotherapie mit dem Ziel die Symptome der Erkrankung (zum Beispiel Schmerzen, Husten) zu lindern und die Überlebenszeit zu verbessern (Abbildung 2.2). Die Therapie der ersten Wahl besteht in einer Chemotherapie aus einem Platinderivat (Cisplatin oder Carboplatin) und Etoposid, die über 4-6 Zyklen verabreicht wird. In einer japanischen Phase III Studie wurde ein neues Medikament namens Irinotecan im extensive disease Stadium getestet. Verglichen wurden die Kombinationen der Chemotherapeutika Irinotecan/Cisplatin und Etoposid/Cisplatin. Für Patienten, die mit Irinotecan/Cisplatin behandelt wurden, lag die mittlere Überlebenszeit bei 21,8 Monaten, während sie bei der Behandlung mit Etoposid/ Cisplatin bei 9,4 Monaten lag. Die 2-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Irinotecan/ Cisplatin 19,5%. Im Vergleich dazu bei Etoposid/Cisplatin bei 5,2% [Noda *et al.*, 2002]. Allerdings konnte dieses Ergebnis in einer US-Studie nicht repliziert werden, so dass ethnische Unterschiede diskutiert werden müssen [Hanna *et al.*, 2006]. Simon *et al.* [2007] befürworten die Bestrahlung des Primärtumors, wenn durch die

Chemotherapie intrathorakal eine Teilremission und extrathorakal eine Vollremission erreicht wurde. Die Bestrahlung nimmt einen hohen Stellenwert in der palliativen Therapie ein. Zum Beispiel werden schmerzende Knochenmetastasen prinzipiell bestrahlt [Kaiser *et al.*, 2011].

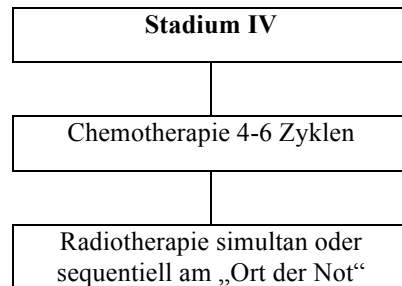


Abbildung 2.2 Eigene Darstellung der Therapiestrategie im Stadium der extensive disease des SCLC.

Essentiell ist auch eine geeignete Begleittherapie, um tumorbedingte Symptome zu mindern. Es eignen sich zum Beispiel die Gabe von Sauerstoff (O₂), Analgetika und endoskopische Interventionen bei tumorbedingtem Bronchusverschluss oder die Gabe von Bisphosphonaten bei Skelettmetastasen oder Hyperkalziämie [Kaiser *et al.*, 2011].

2.3.3.3 Second Line Therapie

Nach den ersten 4-6 Therapiezyklen muss ein erneutes Staging erfolgen, um festzustellen, ob eine komplette, eine partielle oder gar keine Remission stattgefunden hat. Liegt eine komplette Remission vor, kann die Chemotherapie beendet werden. Ist die Remission partiell, sollte die Chemotherapie fortgeführt werden. Spricht die Chemotherapie nicht an, sollte auf eine Second Line Therapie umgestellt werden. Ursache für den Mißerfolg der First Line Therapie sind chemotherapieresistente Tumorzellen [Arriagada *et al.*, 1993]. Für viele dieser Patienten ist eine Second Line Therapie empfehlenswert [Einhorn und Loehrer, 1995].

Obwohl das SCLC initial sehr sensibel auf die Chemotherapie reagiert, treten in vielen Fällen Rezidive auf. Im Stadium der limited disease treten Rezidive in etwa 80 % der Fälle auf, im Stadium der extensive disease in fast allen Fällen [Hurwitza *et al.*, 2009]. Tritt die Remission innerhalb von 3 Monaten nach der Chemotherapie ein, bezeichnet man die Patienten als chemoresistent. Die Chance auf das Ansprechen einer weiteren

Chemotherapie (Second Line Therapie) beträgt weniger als 10% mit schlechter Überlebensrate. Bei Eintreten der Remission nach 3 Monaten verbessert sich das Ansprechen auf 30-40% und die mediane Überlebenszeit erhöht sich auf etwa 6 Monate [von Pawel *et al.*, 1999, 2001].

Bei Progredienz unter First Line Therapie bzw. bei einem Rezidiv ist bei geeigneten Patienten eine Second Line Therapie indiziert. Die Lebensqualität und der Überlebensvorteil können durch sie verbessert werden [Sorensen *et al.*, 2010]. Als Second Line Therapie kommen Kombinationstherapien oder eine Monotherapie mit dem Topoisomerase-I-Hemmer Topotecan in Frage [von Pawel *et al.*, 1999; Eckardt *et al.*, 2007]. Topotecan, ein neueres Monotherapeutikum, zeigt gegenüber dem CAV-Schema keine signifikanten Unterschiede in der Ansprechrage oder der Zeit bis zur Progression und der Überlebensdauer. Hingegen zeigt es geringere Nebenwirkungen und verbessert damit die Symptome Atemnot, Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit und Heiserkeit [von Pawel *et al.*, 1999]. Spricht eine initiale Therapie mit Etoposid/Cisplatin (PE) nicht an, wird in der Second Line Chemotherapie oft die Kombination Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin (CAV) gewählt [Sheperd *et al.*, 1987; Sculier *et al.*, 1987].

2.3.3.4 Therapieergebnisse

Obwohl Chemotherapie und Bestrahlung initial gut ansprechen, kommt es doch in fast allen Fällen zu Rezidiven. Deshalb ist die Therapie des SCLCs nach wie vor unbefriedigend. Umso wichtiger erscheint es, die molekularen Eigenschaften des kleinzelligen Bronchialkarzinoms zu erforschen, um neue Therapieansätze schaffen zu können. In diesem Sinne wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung verschiedener Pharmaka auf das Proliferationsverhalten des kleinzelligen Bronchialkarzinoms *in vitro* untersucht.

2.4 Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil als Anti-Tumor-Therapeutika

2.4.1 Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)

Indometacin und Meloxicam gehören zu den nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR [= NSAID: non steroidal anti-inflammatory drugs]). NSAR vermindern durch Inhibition der Cyclooxygenase (COX) die Prostaglandinsynthese, jedoch nicht die Leukotriensynthese (Abbildung 2.3). Indiziert sind NSAR zur Behandlung von Schmerzen, Fieber, akuten und chronischen Entzündungen, da sie analgetische (schmerzstillende), antipyretische (fiebersenkende) und antiphlogistische (entzündungshemmende) Wirkqualitäten bei unterschiedlicher Ausprägung aufweisen.

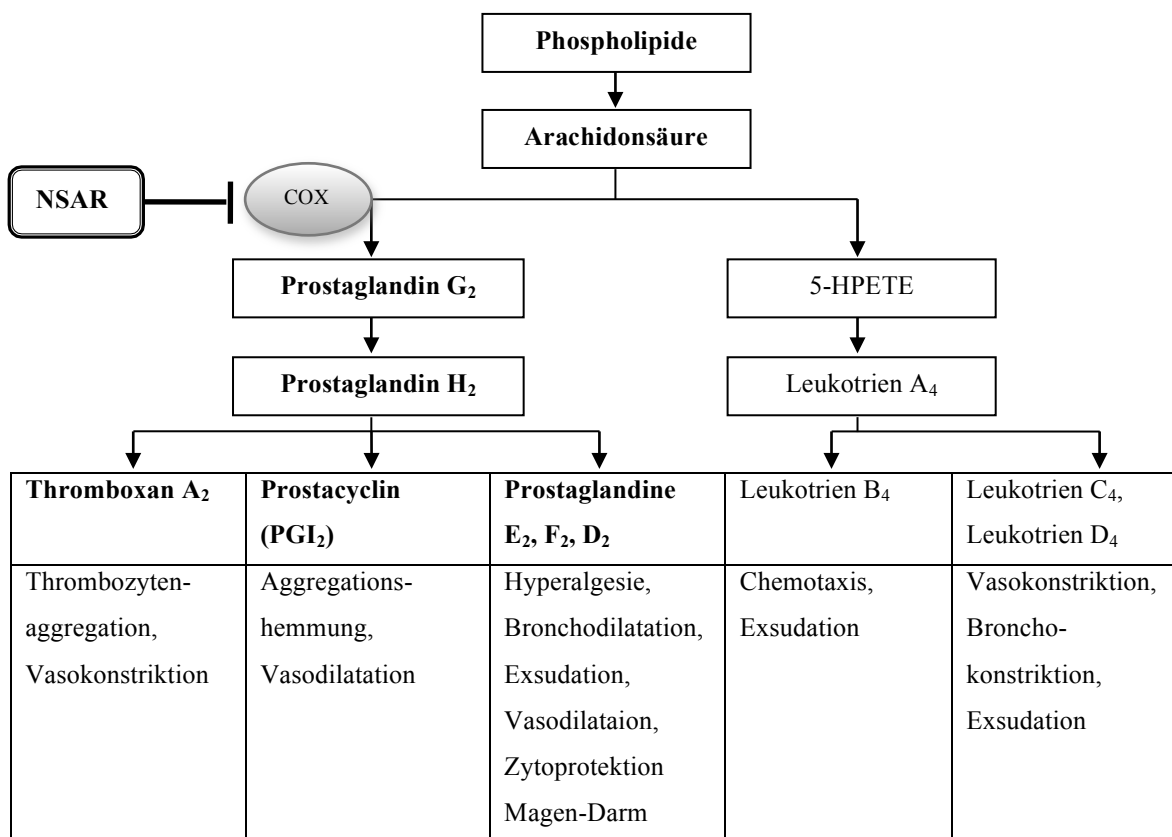


Abbildung 2.3 Grundzüge der Biosynthese und die wichtigsten biologischen Funktionen von Prostaglandinen und Leukotrienen. Verändert nach Karow und Lang-Roth [2011]

Die Cyclooxygenase (COX) ist ein ubiquitär im Körper vorkommendes membranständiges Enzym, welches Arachidonsäure, die aus Membranphospholipiden freigesetzt wird, in Prostaglandin (PG) G_2 und H_2 umwandelt. Aus PGH_2 entstehen dann durch zwei weitere Enzyme (Thromboxansynthetase und Prostacyclinsynthetase) Thromboxan A_2 , Prostacyclin (PGI_2) und die funktionellen Prostaglandine E_2 , F_2 und D_2 . Man unterscheidet zwei Isoenzyme der COX, die COX-1 und die COX-2 (Abbildung 2.4). Sie unterscheiden sich durch ihren Genlocus, ihre Struktur und ihr Vorkommen, werden unterschiedlich reguliert und können pharmakologisch unabhängig voneinander beeinflusst werden. Derzeit wird von einer dritten Cyclooxygenase-Isoform gesprochen. Die Cyclooxygenase 3 (COX-3) soll primär im ZNS vorkommen [Chandrasekharan *et al.*, 2002]. Allerdings handelt es sich bei COX-3 wohl nur um eine splice-Variante von COX-1 [Herdegen, 2008]. Die seit 1976 bekannte COX-1 [Miyamoto *et al.*, 1976] ist vor allem in Thrombozyten, Gefäßendothelien, Nieren, Milz, Lunge, Magen und ZNS zu finden [Crofford, 1997; Tegeder *et al.*, 2000]. COX-2 wurde Anfang der 1990er Jahre isoliert und hat eine weitaus komplexere Funktion als COX-1. Während COX-1 konstitutiv exprimiert wird und physiologische Effekte im gesunden Gewebe induziert, wird die Synthese von COX-2 erst bei Verletzungen, Entzündungen oder Teilung von Zellen durch Zytokine (z.B. Interleukin 1) und Mitogene induziert und ist bei Schmerzen, Fieber und entzündlichen Reaktionen bedeutsam [Xie *et al.*, 1991]. Physiologische Funktionen der COX-2 bestehen bei der Wundheilung, der Ovulation, der Weheninduktion, der Nierendurchblutung und der endothelialen Prostacyclinproduktion [Karow und Lang-Roth, 2011]. COX-1 und COX-2 ähneln sich in ihrer Struktur und ihrer enzymatischen Aktivität sehr, weisen aber unterschiedliche Molekulargewichte auf: COX-1 85 Kilodalton (kD), COX-2 72 kD [Taketo, 1998]. Das COX-1-Gen ist auf dem Chromosom 9, das um ein Exon kleinere COX-2-Gen auf dem Chromosom 1 kodiert. Die Transkription des COX-1-Gens ist ubiquitär und wohl wenig geregelt, die Transkription des COX-2-Gens ist vielfach induzierbar (Abbildung 2.4). Weiterhin unterscheiden sich COX-1 und COX-2 dadurch, dass an Position 523 Isoleucin gegen Valin ausgetauscht wird. Hierdurch ist das aktive Zentrum von COX-2 größer und kann neben Arachidonsäure auch größere Substrate oxidieren.

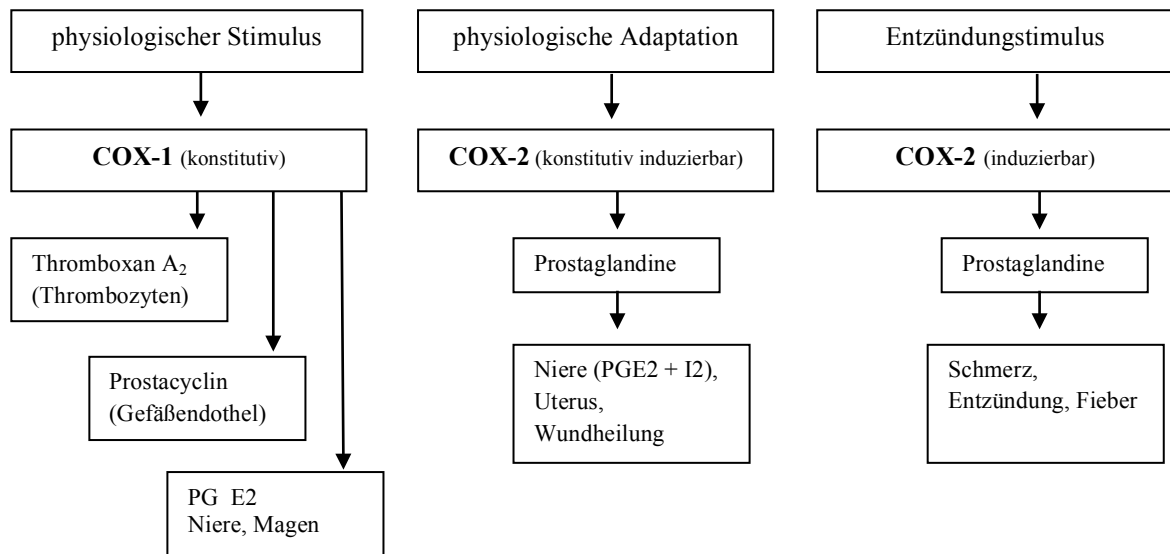


Abbildung 2.4 Isoformen der Cyclooxygenase (COX). Verändert nach Karow und Lang-Roth [2011]

COX-2 wird von verschiedenen Tumoren vermehrt gebildet. Daraus resultiert eine erhöhte Ausschüttung von Prostaglandin-E₂, so dass es durch eine vermehrte Anregung der endothelialen vaskulären Wachstumsfaktoren zu einer gesteigerten Angiogenese kommt. Folglich könnte COX-2 ein wichtiger Faktor im Tumorwachstum sein [Simmons *et al.*, 2004].

2.4.1.1 Indometacin

Indometacin ist ein Analgetikum und gehört zur Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). Indometacin wird vor allem zur Therapie von rheumatischen Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, Morbus Bechterew, aktivierte Arthrosen) eingesetzt und ist das Mittel der Wahl beim akuten Gichtanfall. Ferner weist es eine eingeschränkte Indikation bei postoperativen Schmerzen und Tumorschmerzen auf und zeigt positive Effekte bei therapieresistentem Fieber (Morbus Hodgkin). Indometacin ist ein unselektiver Inhibitor von COX-1 und COX-2. Es wirkt kompetitiv und konkurriert im Cyclooxygenasezentrum mit der Arachidonsäure um die Bindungsstelle.

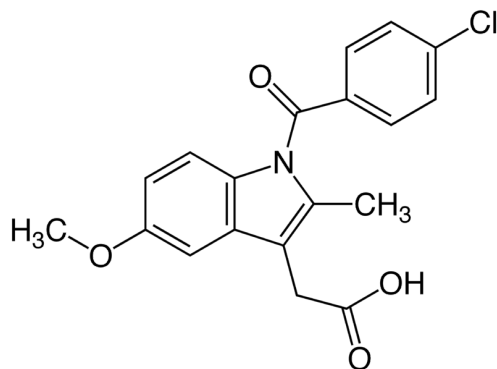


Abbildung 2.5 Strukturformel Indometacin (2-[1-(4-Chlorbenzoyl)- 5-methoxy-2-methyl-1*H*-indol-3-yl] essigsäure). Verändert nach Sigma-Aldrich [2012].

2.4.1.2 Meloxicam

Meloxicam, ein Analgetikum aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) gehört zu den Oxicamen. Meloxicam wird mit einer 300x größeren Affinität zu COX-2 gegenüber COX-1 als selektiver COX-2-Inhibitor gelistet. Dadurch weist es weitaus weniger starke Nebenwirkungen auf als COX-1 wirksame Pharmaka. Meloxicam hemmt die Einwanderung von Leukozyten in Entzündungsgebiete, die Thrombozytenaggregation aber nur in geringem Maße. Allerdings kommt es bei höheren Dosen zu einer Abnahme der COX-2-Selektivität. Meloxicam kommt insbesondere bei akuten Arthroseschüben und rheumatoider Arthritis zur Anwendung, da es sich in der Gelenkflüssigkeit ansammelt, kann aber auch zur Therapie anderer schmerzhafter Prozesse (Morbus Bechterew, Gicht) und zur prä- und postoperativen Schmerztherapie eingesetzt werden.

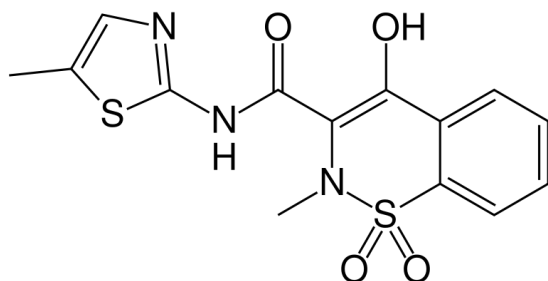


Abbildung 2.6 Strukturformel Meloxicam (4-Hydroxy-2-methyl-*N*-(5-methyl-2-thiazolyl)- 2*H*-1,2-benzothiazin-3-carboxamid-1,1-dioxid). Verändert nach Sigma-Aldrich [2012].

2.4.2 IBMX

IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) ist eine heterocyclische Verbindung aus der Gruppe der Methylxanthine mit einer starken Ähnlichkeit zu Coffein. Methylxanthine hemmen die Phosphodiesterase, die zyklisches AMP (cAMP) in Adenosinmonophosphat (AMP) abbaut. Dadurch erhöht sich der cAMP-Spiegel in der Zelle [Firmino *et al.*, 2002]. Außerdem blockiert IBMX das inhibitorische G-Protein, wodurch die Adenylatcyclase stimuliert wird und sich wiederum die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht [Parson *et al.*, 1988].

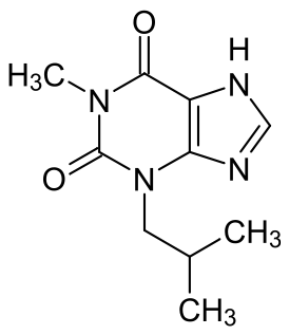


Abbildung 2.7 Strukturformel IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin). Verändert nach Sigma-Aldrich [2012].

Die Adenylatcyclase ist ein membranständiges Enzym, das die Biosynthese von cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. cAMP vermittelt als zweiter Botenstoff (Second Messenger) die intrazellulären Effekte vieler Hormone. Die Adenylatcyclase wird durch die Anlagerung eines stimulierenden G-Proteins aktiviert, welches wiederum einen Rezeptor für z.B. Hormone besitzt. Die Adenylatcyclase produziert dann aus ATP zyklisches AMP (cAMP). cAMP übt seinen Einfluss auf die Zelle nicht selbst aus, sondern aktiviert die Proteinkinase A (PK A). Diese phosphoryliert verschiedene Proteine und hat somit direkte Effekte auf die Zelle. Zum Beispiel kommt es durch Phosphorylierung von Ca^{2+} -Kanälen zur Öffnung derselben. Durch Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase kommt es zur Kontraktion der glatten Muskulatur. Außerdem werden auf diesem Wege zahlreiche Stoffwechselwege reguliert. Der Abbau des cAMP erfolgt durch die cAMP-spezifische Phosphodiesterase (PDE), die es hydrolytisch zu AMP spaltet. IBMX ist ein Inhibitor der PDE. Abbildung 2.8 zeigt, dass IBMX einen wichtigen Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration von cAMP hat. Die pharmakologische Verabreichung von IBMX könnte in all jenen Prozessen erfolgversprechend sein, in denen die cAMP-Konzentration von funktioneller Bedeutung ist.

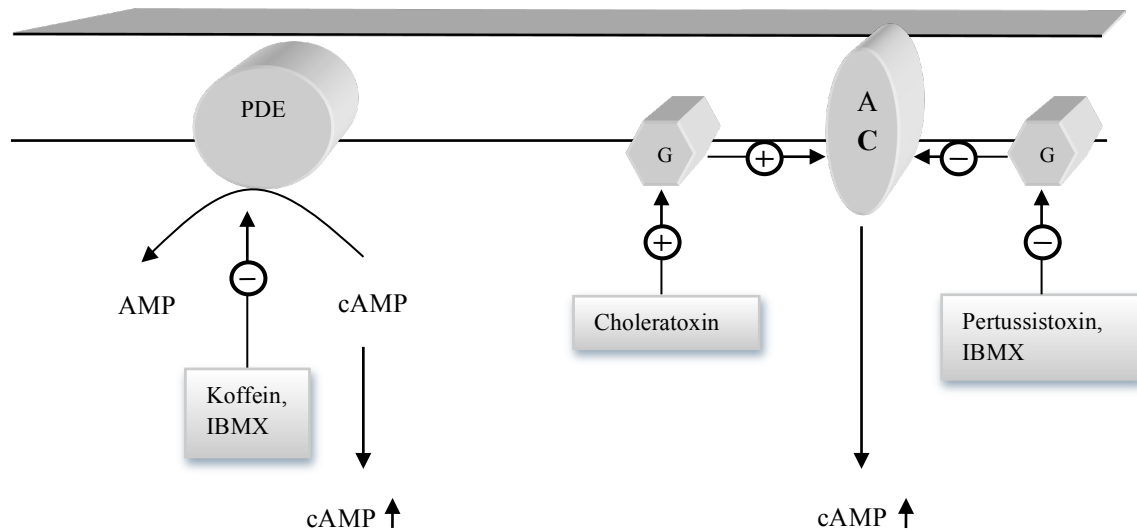


Abbildung 2.8 Einfluss von IBMX auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Modifiziert nach Firmino *et al.* [2002].

2.4.3 Phosphodiesterase-5-Hemmer

Die enzymatische Wirkung der Phosphodiesterase-5 (PDE5) verursacht eine Spaltung der Phosphorsäureesterbindung im zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP), wobei Guanosinmonophosphat (5-GMP) entsteht [Juilfs *et al.*, 1999]. Als zellulärer Botenstoff ist cGMP (Second Messenger) für die Signalübermittlung in der Zelle zuständig. Übergeordnet reguliert cGMP den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität [Michel, 1998]. Welches Signal es genau vermittelt, ist vom Gewebe abhängig. In Nieren und Darm vermittelt es den Ionentransport, in der glatten Muskulatur bewirkt es die Relaxation und in den Stäbchen und Zapfen steigert es den Einstrom von Natriumionen. Beim Menschen lässt sich die PDE5 in der glatten Muskulatur des Corpus cavernosum des Penis und in der glatten Muskulatur der Lungenarterien nachweisen. Wird die Wirkung von PDE5 blockiert, kommt es zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration, infolge dessen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sinkt und es zur Relaxation der glatten Muskelzellen kommt. Im Corpus cavernosum bewirkt dies einen erhöhten Bluteinstrom und damit eine verbesserte Erektion. In der Lunge kommt es zu einer Vasodilatation im pulmonalen Gefäßsystem und in Folge zu einer Senkung des mittleren Pulmonalarteriendrucks. Im systemischen Kreislauf haben PDE5-Hemmer nur einen geringen vasodilatatorischen Effekt. Trotzdem kann es zu Kopfschmerzen oder zur Errötung der Haut kommen. Bisher werden PDE5-Hemmer zur Behandlung erektiler Dysfunktionen und pulmonaler

Hypertonie eingesetzt. Zwei weit verbreitete FDA-zugelassene Arzneistoffe dieser Gruppe sind Sildenafil und Vardenafil [Boolell *et al.*, 1996; Stark *et al.*, 2001]. Abbildung 2.9 zeigt, dass Sildenafil und Vardenafil einen starken Einfluss auf die cGMP-Konzentration haben und somit cGMP-abhängige zelluläre Vorgänge beeinflussen können.

Sugita *et al.* [1998] bewiesen, dass PDE5-Hemmer zu einer intrazellulären Anhäufung von cGMP führen, wodurch möglicherweise die Gefäßpermeabilität gesteigert wird. In einem Tierversuch konnten Black *et al.* [2008] am Gliosarcom demonstrieren, dass durch die Einnahme von Vardenafil und Sildenafil die Permeabilität der Blut-Gehirn-Tumor-Schranke erhöht und die Anti-Tumor-Wirksamkeit des Chemotherapeutikums Doxorubicin gesteigert wurde.

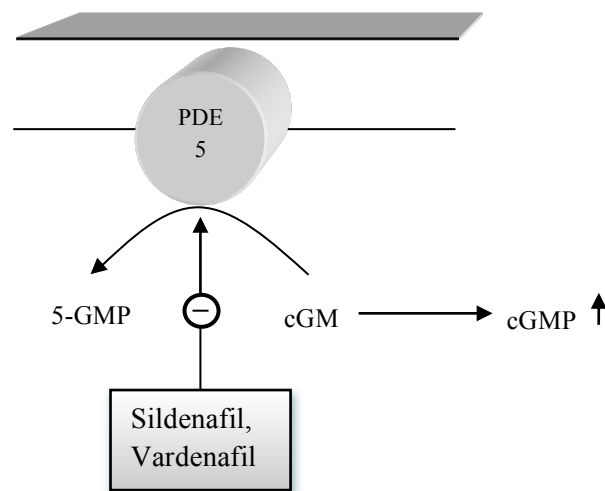


Abbildung 2.9 Eigene Darstellung des Einflusses von Sildenafil und Vardenafil auf die intrazelluläre cGMP-Konzentration.

2.4.3.1 Sildenafil

Sildenafil, auch bekannt unter dem Namen Viagra®, wird zur Behandlung erektiler Dysfunktionen eingesetzt [Boolell *et al.*, 1996; Montorsi *et al.*, 2004]. Vor einigen Jahren konnten außerdem die positiven Effekte in der Behandlung der idiopathischen pulmonalen Hypertonie nachgewiesen werden [Wilkins, *et al.*, 2001; Ghofrani und Grimminger, 2006]. Seitdem wird Sildenafil auch unter dem Namen Revatio® zur Behandlung der idiopathischen pulmonalen Hypertonie verwendet.

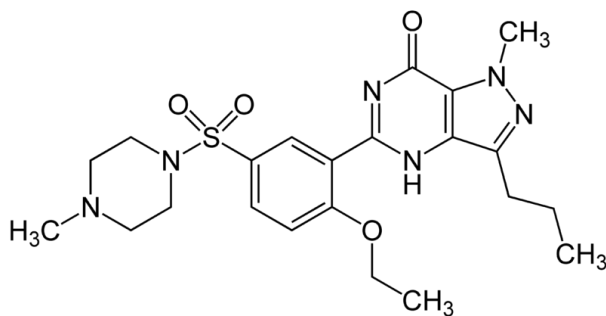


Abbildung 2.10 Strukturformel Sildenafil (1-{{3-(1-Methyl-7-oxo-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl}sulfonyl}-4methylpiperazin. Verändert nach Sigma-Aldrich [2012].

2.4.3.2 Vardenafil

Unter dem Handelsnamen Levitra® oder Vivanza® auf dem Markt wird Vardenafil zur Behandlung von Erektionsstörungen beim Mann eingesetzt. Vardenafil ist ein selektiver PDE5-Hemmer, der durch eine rasch einsetzende Wirkung, eine gesteigerte Erektionsdauer, eine hohe Erfolgsrate bei erstmaliger Einnahme und eine zuverlässige Wirkung auch nach wiederholter Verwendung gekennzeichnet ist [Montorsi *et al.*, 2004].

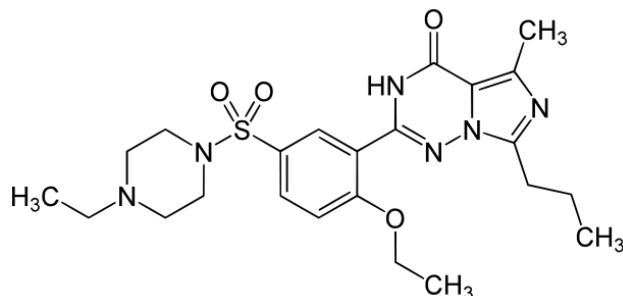


Abbildung 2.11 Strukturformel Vardenafil (1-{{3-(5-Methyl- 4-oxo-7-propyl-3,4- dihydroimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-2-yl)-4-ethoxyphenyl}sulfonyl}-4ethylpiperazin). Verändert nach Wikipedia [2012].

2.4.4 Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil in der Tumorforschung

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) sind für ihre antiproliferativen Effekte auf Kolonkarzinome [Arber *et al.*, 2006], Mammakarzinome [Basu *et al.*, 2004], Bronchialkarzinome [Brown und DuBois, 2004], Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich [Lee *et al.*, 2002] und Prostatakarzinome [Patel *et al.*, 2005] bekannt.

In zahlreichen Studien konnte bewiesen werden, dass Indometacin das Wachstum von Tumorzellen hemmt. Es reduziert die proliferative Aktivität von medullären Schilddrüsenkarzinomzellen [Tomoda *et al.*, 2008] und von kolorektalen Tumorzellen [Hull *et al.*, 2003]. Der antiproliferative Effekt auf das Mammakarzinom konnte unter anderem von Noguchi *et al.* [1995] nachgewiesen werden. Für das kleinzellige Bronchialkarzinom konnte festgestellt werden, dass Indometacin die Apoptose einleitet [de Groot *et al.*, 2005; de Groot *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2011].

Auch für Meloxicam konnte wiederholt ein hemmender Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen beobachtet werden. In einer Studie konnte demonstriert werden, dass eine Versuchsgruppe von Mäusen mit Ovarialkarzinom, die mit Meloxicam therapiert wurden, ein signifikant geringeres Tumorstadium und eine deutlich größere Überlebensrate zeigten als die Kontrollgruppe. Für Meloxicam (selektiver COX-2-Inhibitor) wurde ein größerer Anti-Tumor-Effekt sichtbar als für nichtselektive COX-Inhibitoren [Xin *et al.*, 2007]. Meloxicam hat einen antiproliferativen Effekt auf Zellen des Kolonkarzinoms [Goldman *et al.*, 1998], des Osteosarkoms [Naruse *et al.*, 2006] und auf die Zelllinien A549 und PC14 des kleinzelligen Bronchialkarzinoms [Tsubouchi *et al.*, 2000].

Chen *et al.* [1998] konnten nachweisen, dass IBMX in Wechselwirkung mit anderen Stoffen, die auch zu einer erhöhten cAMP-Konzentration in der Zelle führen, die Proliferation des malignen Glioblastoms *in vitro* hemmt und die Apoptose der Tumorzellen einleitet. Für das kleinzellige Bronchialkarzinom konnte nach der Behandlung mit IBMX und Forskolin ebenfalls eine Proliferationsinhibition beobachtet werden [Maruno *et al.*, 1998]. In einer neueren Studie konnte festgestellt werden, dass IBMX den intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegel aufrecht erhält und dadurch eine Serum-induzierte Migration von embryonalen Fibroblasten in der Maus verhindert [Chen *et al.*, 2008]. Für die Therapie des Mammakarzinoms ist eine gesteigerte Bildung von O₂-Radikalen nach einer IBMX-Gabe bemerkenswert [Crumpton *et al.*, 2001].

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass PDE5-Inhibitoren (unter anderem Sildenafil und Vardenafil) die Apoptose von Zellen des Kolonkarzinoms [Liu *et al.*, 2001] und der chronisch lymphatischen Leukämie induzieren [Sarfati *et al.*, 2003]. *In vivo* konnten Serafini *et al.* [2006] zeigen, dass PDE5-Hemmer zu einem immunvermittelten antineoplastischen Effekt durch Inhibition der MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) führen und dadurch das Tumorstadium gehemmt wird. Es liegen allerdings noch keine

Forschungsergebnisse vor in denen beschrieben wird, wie sich Sildenafil und Vardenafil auf das kleinzellige Bronchialkarzinom auswirken. Da auf andere Tumorentitäten aber vielversprechende antineoplastische Effekte beschrieben wurden, soll im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von Sildenafil und Vardenafil auf das Proliferationsverhalten des kleinzelligen Bronchialkarzinoms allein und in Kombination mit weiteren Medikamenten, für die bereits Erfolge in der Antitumorthérapie des Bronchialkarzinoms dokumentiert wurden, getestet werden. Stellvertretend für das kleinzellige Bronchialkarzinom werden im folgenden die Medikamente Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil allein und in Kombination auf die Zelllinien H69 und H82 untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Casyton	Schärfe Systems
Ethanol <i>pro Analysis</i>	Merck
Fetal Bovine Serum	Gibco
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine)	Sigma
Indometacin	Sigma
Meloxicam	Sigma
RPMI-1640 Medium (+ L-Glutamin)	Gibco
Sildenafil	TRC
Vardenafil	TRC
XTT- Cell Proliferation Kit II	Roche

3.1.2 Lösungen

Zell-Kulturmedium	10% <i>Fetal Bovine Serum</i> und 10% Penicillin/ Streptomycin in 500 ml RPMI-1640
-------------------	--

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf
2,5 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf
10 ml Einmalpipetten	Falcon
7 ml Röhrchen	Dunn Labortechnik
30 ml Röhrchen	Greiner Bio-One
50 ml Röhrchen	Sarstedt
96-well-Mikrotiterplatte	Sarstedt
Casycup	Schärfe Systems
Glaspipetten 10 ml	Brand
Pipettenspitzen, farblos, 10 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen, gelb, 200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen, blau, 1000 µl	Sarstedt

Zellkulturflaschen 250 ml (75cm ²)	Sarstedt
Zellkulturflaschen 650 ml (175cm ²)	Sarstedt

3.1.4. Geräte

Absaugpumpe	HLC
Analysewaage ALS 120-4	Kern
Autoclav Varioklav	H+P Labortechnik
Casy-Zellzählgerät	Schärfe Systems
Dynatech MR 3.13 Mikroelisa Reader	Dynex Technologies
Heracell Wärmeschrank	Heraeus
Mehrfachpipette Research	Eppendorf
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss
Sterilbank SterilGARD	The Baker Company
Finnpipette 0,5 - 10µl	Labsystems
Finnpipette 5 - 40µl	Labsystems
Finnpipette 40 - 200µl	Labsystems
Finnpipette 200 - 1000µl	Labsystems
Laborfuge A	Heraeus Sepatech
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte

3.1.5 Software

GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, Inc.
MS Excel	Microsoft
MS Word	Microsoft

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Zelllinien

Bei den für die Untersuchungen verwendeten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 handelt es sich um nichtadhärente Zellen, sog. Suspensionszellen. Die Zellen wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. Uwe Zangenmeister-Wittke von der Universität Bern zur Verfügung gestellt.

Die Eigenschaften der verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Zelllinie	Eigenschaften	Literatur
H69 klassisch	- gewonnen aus weißem männlichen Patienten, 56 Jahre, vorher therapiert	Gazdar <i>et al.</i> , 1980
	- wachsen als schwebende Zellaggregate	ATCC
	- aneuploid	Gazdar <i>et al.</i> , 1980
	- exprimiert epitheliales Glykoprotein 2	Jožović <i>et al.</i> , 1998
	- erhöhte c-myc, raf, ras Expression	Gazdar & Minna, 1996
	- hohe Bcl-2-Expression	Zangenmeister-Wittke <i>et al.</i> , 1998
	- erhöhte Recoverin-Expression in Anwesenheit von Butyrat	Bazhin <i>et al.</i> , 2004
H82 variant	- nichtadhärentes Wachstum	Carney <i>et al.</i> , 1985 Gazdar <i>et al.</i> , 1985 ATCC
	- wachsen in sehr großen Aggregaten	ATCC
	- gesteigerte Wachstumsrate	Carney <i>et al.</i> , 1985
	- erhöhte Expression von c-myc, raf, ras	Gazdar & Minna, 1996
	- niedrige Bcl-2-Expression	Zangenmeister-Wittke <i>et al.</i> , 1998
	- erhöhte Recoverin-Expression in Anwesenheit von Butyrat	Bazhin <i>et al.</i> , 2004
	- TNF- α induziert neuroendokrine Zelldifferenzierung, welche durch das Notch-1 Gen reguliert wird	Shan <i>et al.</i> , 2007

Tabelle 3.1 Eigenschaften der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82

3.2.1.2 Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms wurden bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 100% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Hierzu wurden Zellkulturflaschen in der Größe von 75 cm² verwendet.

Die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien wurden dreimal wöchentlich passagiert. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte durch Resuspension bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden 2 ml der Zellsuspension abgenommen und zusammen mit 15 ml frischem Zell-Kulturmedium in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Stagnierte das Wachstum der Zellen zeitweise, wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Weißkappenröhrchen gegeben. Der Inhalt wurde dann bei 1.500 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 20 ml frischem Zell-Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche gegeben und unter den oben genannten Standardbedingungen kultiviert.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit musste die Anzahl der in der Suspension enthaltenen vitalen Zellen bestimmt werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Zellanalysegerätes CASY.

Vor der Messung wurden die kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen bei Raumtemperatur (RT) durch Resuspension vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurden 15 ml der Zellsuspension in ein 30 ml Weißkappenröhrchen gegeben und für 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem Zell-Kulturmedium resuspendiert. Für die Messung der Zellpopulation mit dem Zellanalysegerät CASY wurde die Zellpopulation im Verhältnis 1:100 verdünnt. Dafür wurden 100 µl Zellsuspension und 10 ml CASYton in ein Casycup pipettiert. Anschließend konnte die Zahl der vitalen Zellen mithilfe des Zellanalysegerätes CASY bestimmt werden.

3.2.3 Eichkurven

Um den Einfluss von Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil auf das Wachstum der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 zu untersuchen, war es notwendig diejenige Zellzahl zu bestimmen, die über eine Versuchsdauer von 3 Tagen ein optimales Wachstum aufweist. Unter optimalem Wachstumsverhalten versteht man, dass sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befinden. Die Zellzahl darf also nicht zu groß sein, da sonst eine gegenseitige Wachstumshemmung der Zellen eintritt.

Die Eichkurven für die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 wurden der Dissertation „*Die Wirkung von Statinen und Ionenkanalblockern auf kleinzellige Bronchialkarzinomzellen in vitro*“ [Nagel, 2008] entnommen: Für die Untersuchungen wurde für die Zelllinien H69 und H82 eine Zellzahl von 150.000 gewählt, so dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und ein Wachstum uneingeschränkt möglich war. H69-Zellen zeigten bei einer Extinktion von 250.000/ml die höchste Extinktion. Bei H82-Zellen lag das Extinktionsmaximum bei einer Zellzahl von 1.000.000/ml [Nagel, 2008].

3.2.4 Inkubation von kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien mit Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil

Um den Einfluss von Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil auf das Proliferationsverhalten der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 zu untersuchen, wurden die Zellen für drei Tage in 96-well-Mikrotiterplatten sowohl mit den Medikamenten allein, als auch mit Kombinationen der Substanzen inkubiert.

Dafür wurden Sildenafil-, Vardenafil- und IBMX-Lösungen in den End-Konzentrationen 125 μ M, 250 μ M und 500 μ M hergestellt. Indometacin-Lösungen sowie Meloxicam-Lösungen wurden in den Konzentrationen 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M angesetzt.

Für beide Zelllinien H69 und H82 wurden 150.000 Zellen/ml ausgesät. Wurde der Einfluss eines Medikamentes allein untersucht, wurde in jede Vertiefung der 96-well-Mikrotiterplatte 10 μ l Medikament vorgegeben, so dass die oben genannten Konzentrationen bei einem Gesamtvolumen von 100 μ l um den Faktor 10 verdünnt wurden. Anschließend wurde das Gesamtvolumen von 100 μ l durch Zugabe von 90 μ l Zellsuspension mit der definierten Zellzahl (150.000/ml) aufgefüllt. Bei der Untersuchung von zwei Medikamenten in Kombination wurden 10 μ l von dem einen Medikament und 10

µl von dem anderen Medikament vorgelegt und anschließend 80 µl der Zellsuspension in angepasster Zellzahl hinzugegeben.

Zur Lösung von Sildenafil, Vardenafil und Meloxicam wurde Aqua dest. verwendet, zum Lösen von Indometacin 20% Ethanol, für IBMX 10% Ethanol. Somit bestand jede Kontrolle aus 90 µl Zellsuspension der genannten Zellzahl und 10 µl des jeweiligen Lösungsmittels, um den wachstumshemmenden Effekt des Lösungsmittels auf die Zellen zu erkennen. Der Leerwert bestand aus 90 µl Zell-Kulturmedium und 10 µl des Lösungsmittels.

Nach 72 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 50 µl XTT-Reagenz pro well hinzugegeben und für weitere 4 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Dynatech MR 3.13 Mikroelisa Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

Auf den 96-well-Mikrotiterplatten wurde jeder Versuch in einem sechsfach Ansatz durchgeführt (n = 18 von drei unabhängigen Versuchen).

3.2.5 Statistik

Die in den Versuchen gewonnenen Daten wurden mit den Programmen GraphPad Prism 4.0 und MS Excel ausgewertet und als Histogramm dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Zelllinie H69

4.1.1 Der Einfluss von Indometacin, IBMX, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil, auf H69-Zellen

Um den Einfluss von Sildenafil, Vardenafil, Indometacin, IBMX und Meloxicam auf das Wachstum von H69-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen behandelt.

Die Zugabe von unterschiedlichen Indometacin-Konzentrationen (50 μ M, 100 μ M und 200 μ M) zu den H69-Zellen bewirkte eine Reduktion der Zellproliferation der H69-Zellen, wobei sich der signifikanteste proliferationshemmende Effekt bei der Einzelbehandlung mit einer Indometacin-Konzentration von 200 μ M verzeichnen ließ (Abbildung 4.1 a). Das Wachstum der Zellen stagnierte bei:

- 50 μ M Indometacin um 6%
- 100 μ M Indometacin um 14%
- 200 μ M Indometacin um 46%

IBMX wurde in den Konzentrationen 125 μ M, 250 μ M und 500 μ M zu den H69-Zellen gegeben. Ein signifikanter proliferationshemmender Effekt konnte bei den Konzentrationen 250 μ M und 500 μ M beobachtet werden (Abbildung 4.1b):

- 250 μ M IBMX um 21%
- 500 μ M IBMX um 43%

Bei einer IBMX-Konzentration von 125 μ M konnte das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe nur um 6% gehemmt werden.

Die Inkubation mit Meloxicam erfolgte mit den Konzentrationen 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M. Während bei einer Konzentration von 50 μ M keine ausschlaggebende Veränderung in der Proliferation festgestellt werden konnte, verringerten Meloxicam-Konzentrationen von 100 μ M und 200 μ M das Wachstum der H69-Zellen (Abbildung 4.1c):

- 50 μ M Meloxicam um 3%
- 100 μ M Meloxicam um 13%
- 200 μ M Meloxicam um 33%

Verschiedene Sildenafil-Konzentrationen (125 μ M, 250 μ M und 500 μ M) wurden getestet. Keine der Sildenafil-Konzentrationen zeigte eine signifikante Proliferationsänderung gegenüber der Kontrolle (Abbildung 4.1d):

- 125 μ M Sildenafil um 6%
- 250 μ M Sildenafil um 2%
- 500 μ M Sildenafil um 8%

Auch für Vardenafil wurde das Proliferationsverhalten von H69-Zellen in den Konzentrationen 125 μ M, 250 μ M und 500 μ M untersucht. Für alle drei Konzentrationen konnte ein proliferationshemmender Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 4.1e):

- 125 μ M Vardenafil um 24%
- 250 μ M Vardenafil um 20%
- 500 μ M Vardenafil um 40%

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass die Einzelbehandlung der H69-Zellen mit Sildenafil keinen signifikanten proliferationshemmenden Effekt erbringt, während sich bei der Einzelbehandlung mit Indometacin, IBMX, Meloxicam oder Vardenafil hochsignifikante Hemmungen der Proliferation erzielen lassen. Am effektivsten erweist sich die Einzelbehandlung der H69-Zellen mit einer Indometacin-Konzentration von 200 μ M. Hierbei kann die Proliferation um 46% reduziert werden.

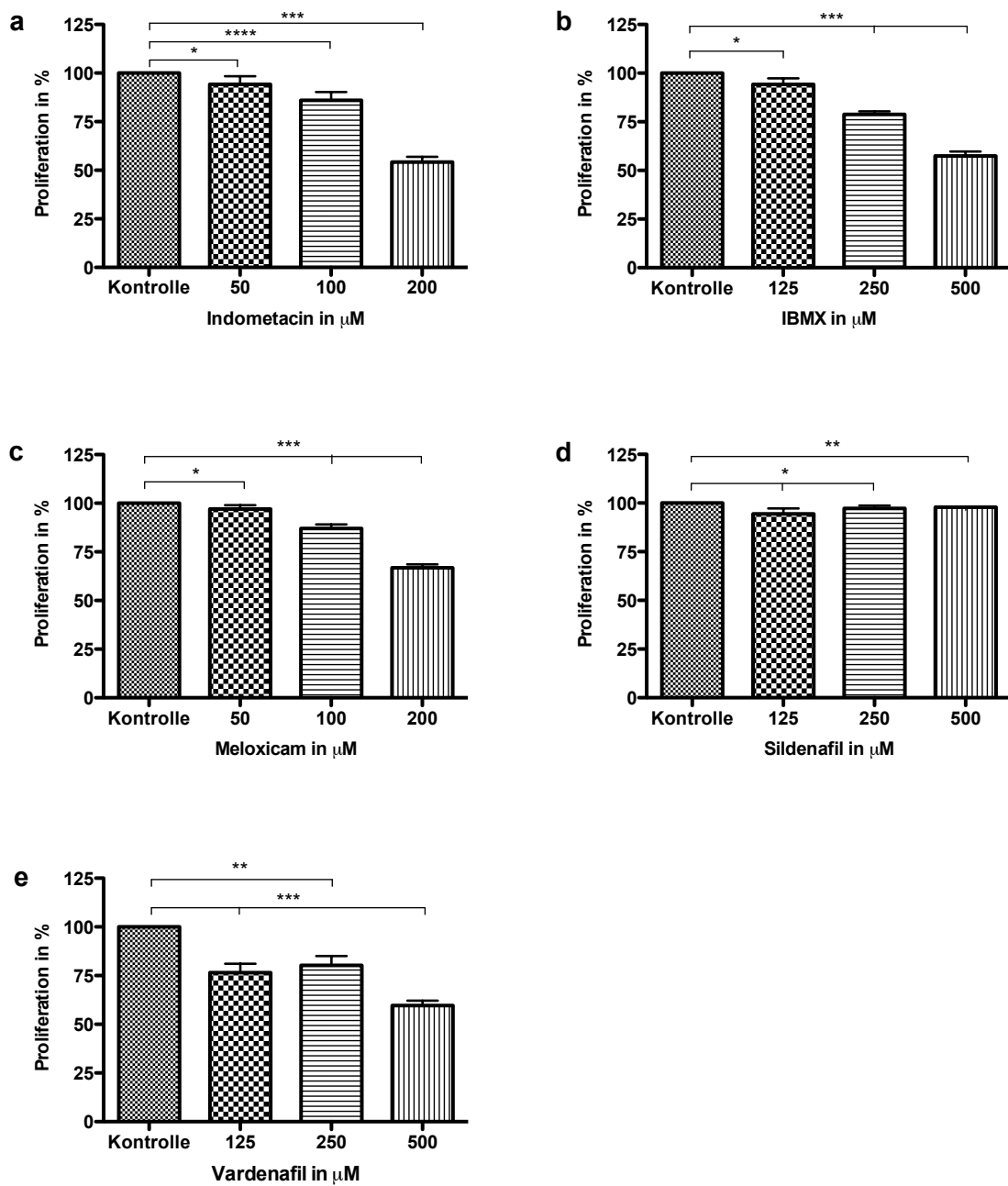


Abbildung 4.1 Wirkung von Indometacin, IBMX, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil auf H69-Zellen. Abgebildet ist die Behandlung von H69-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Indometacin (50 μM , 100 μM , 200 μM) (a), IBMX (125 μM , 250 μM , 500 μM) (b), Meloxicam (50 μM , 100 μM , 200 μM) (c), Sildenafil (125 μM , 250 μM , 500 μM) (d) und Vardenafil (125 μM , 250 μM , 500 μM) (e). Dargestellt ist die Proliferation der Zelllinie H69 in %. Sildenafil zeigt gegenüber der Kontrolle keine Veränderung der Proliferation (d), Indometacin, IBMX, Meloxicam und Vardenafil zeigen dosisabhängige Resultate in der Proliferationshemmung (a-c,e). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 18$, One-Way-ANOVA (Post-Test:Bonferroni's Multiple Comparison Test). * $p > 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,05$

4.1.2 Der Einfluss von Sildenafil und Indometacin in Kombination auf H69-Zellen

Um die gemeinsame Wirkung von Indometacin und Sildenafil auf H69-Zellen zu testen, wurden die Zellen mit Sildenafil in den Konzentrationen 125 μM , 250 μM und 500 μM in Kombination mit Indometacin in den Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 200 μM behandelt. In allen Kombinationen konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant reduziert wurde, aber auch dosisabhängige Unterschiede zu verzeichnen waren (Abbildung 4.2a,b,c):

- 125 μM Sildenafil / 50 μM Indometacin um 37%
- 125 μM Sildenafil / 100 μM Indometacin um 52%
- 125 μM Sildenafil / 200 μM Indometacin um 79%

- 250 μM Sildenafil / 50 μM Indometacin um 31%
- 250 μM Sildenafil / 100 μM Indometacin um 49%
- 250 μM Sildenafil / 200 μM Indometacin um 68%

- 500 μM Sildenafil / 50 μM Indometacin um 35%
- 500 μM Sildenafil / 100 μM Indometacin um 56%
- 500 μM Sildenafil / 200 μM Indometacin um 74%

Der größte wachstumshemmende Effekt konnte bei einer Kombination von Sildenafil in einer Konzentration von 125 μM , 250 μM oder 500 μM und Indometacin in einer Konzentration von 200 μM festgestellt werden. Während die Indometacin-Konzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferationsinhibition zu haben scheint, spielt die Sildenafilkonzentration nur eine untergeordnete Rolle. Hervorzuheben ist, dass die Zellproliferation der H69-Zellen durch die Kombination von Indometacin mit Sildenafil um etwa 30% stärker gehemmt wurden als bei der Einzelbehandlung mit Indometacin.

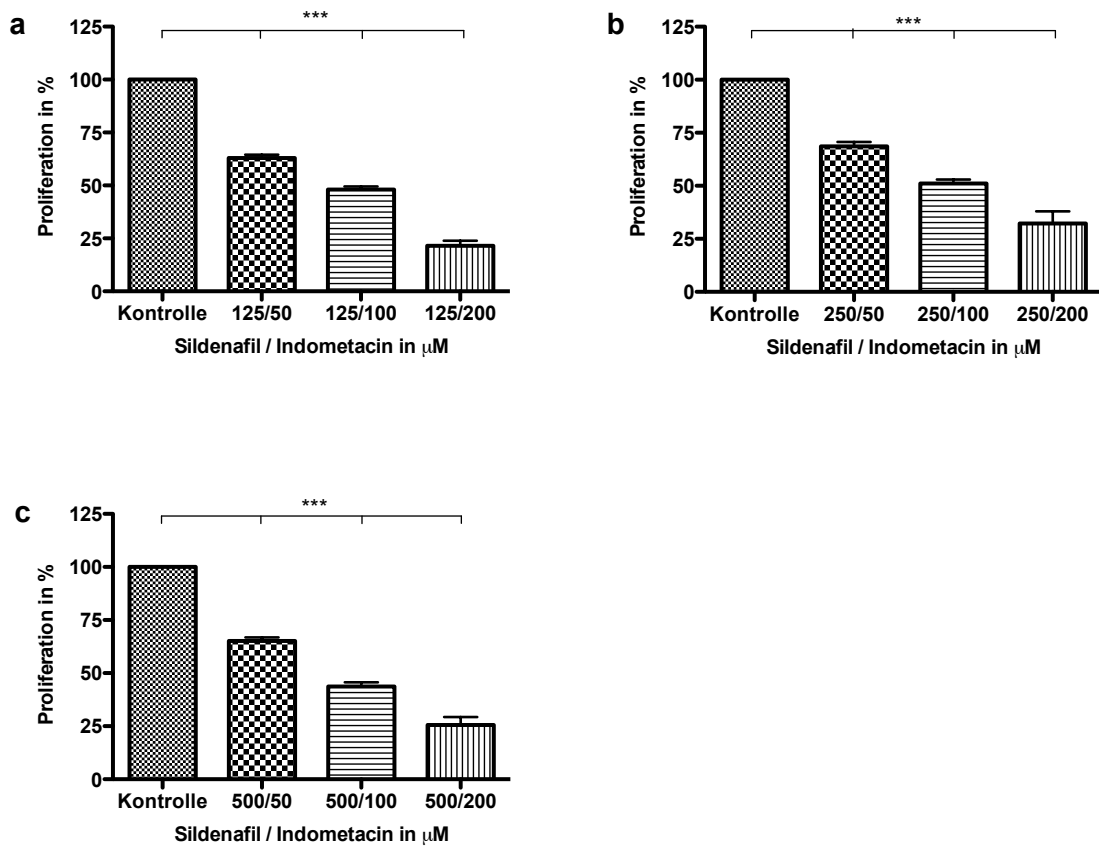


Abbildung 4.2 Wirkung von Sildenafil und Indometacin in Kombination auf H69-Zellen. Abgebildet ist die Behandlung von H69-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Sildenafil (125 μM , 250 μM , 500 μM) in Kombination mit Indometacin in folgenden Konzentrationen (50 μM , 100 μM , 200 μM). Dargestellt ist die Proliferation der Zelllinie H69 in %. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 18$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test). *** $p < 0,001$

4.1.3 Der Einfluss von Sildenafil und Meloxicam in Kombination auf H69-Zellen

Die gemeinsame Wirkung von Sildenafil und Meloxicam auf H69-Zellen sollte geprüft werden. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Sildenafil-Konzentrationen (125 μM , 250 μM und 500 μM) in Kombination mit unterschiedlichen Meloxicam-Konzentrationen (50 μM , 100 μM und 200 μM) behandelt. Schon bei der geringsten Sildenafil-Konzentration (125 μM) reichte eine Zugabe von 50 μM Meloxicam aus, um die Proliferation um signifikante 29% zu hemmen. Durch weitere Erhöhung der Meloxicamkonzentration konnte die Proliferationsinhibition weiter gesteigert werden (Abbildung 4.3a):

- 125 μ M Sildenafil / 50 μ M Meloxicam um 29%
- 125 μ M Sildenafil / 100 μ M Meloxicam um 51%
- 125 μ M Sildenafil / 200 μ M Meloxicam um 64%

Ähnliche Veränderungen in der Proliferation ließen sich bei einer Zugabe von 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M Meloxicam zu Sildenafil in der Konzentration 250 μ M erzielen (Abbildung 4.3b):

- 250 μ M Sildenafil / 50 μ M Meloxicam um 24%
- 250 μ M Sildenafil / 100 μ M Meloxicam um 40%
- 250 μ M Sildenafil / 250 μ M Meloxicam um 61%

Auch bei der Zugabe von von 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M Meloxicam zu Sildenafil in der Konzentration 500 μ M konnten vergleichbare Ergebnisse in der Proliferationsinhibition beobachtet werden (Abbildung 4.3c):

- 500 μ M Sildenafil / 50 μ M Meloxicam um 34%
- 500 μ M Sildenafil / 100 μ M Meloxicam um 46%
- 500 μ M Sildenafil / 200 μ M Meloxicam um 67%

Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Meloxicam ähneln der Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Indometacin, wobei der proliferationshemmende Effekt insgesamt etwas geringer ausfällt, aber immer noch als signifikant bis hochsignifikant einzustufen ist. Je höher die Meloxicamkonzentration desto stärker die Proliferationshemmung der H69-Zellen. Während die Meloxicamkonzentration einen ausschlaggebenden Effekt auf das Proliferationsverhalten der H69-Zellen zeigt, sind die Abweichungen zwischen den einzelnen Sildenafilkonzentrationen als nicht signifikant einzustufen. Gegenüber der Einzelbehandlung der H69-Zellen mit Meloxicam erhöht die Zugabe von Sildenafil die Proliferationshemmung um etwa 30%.

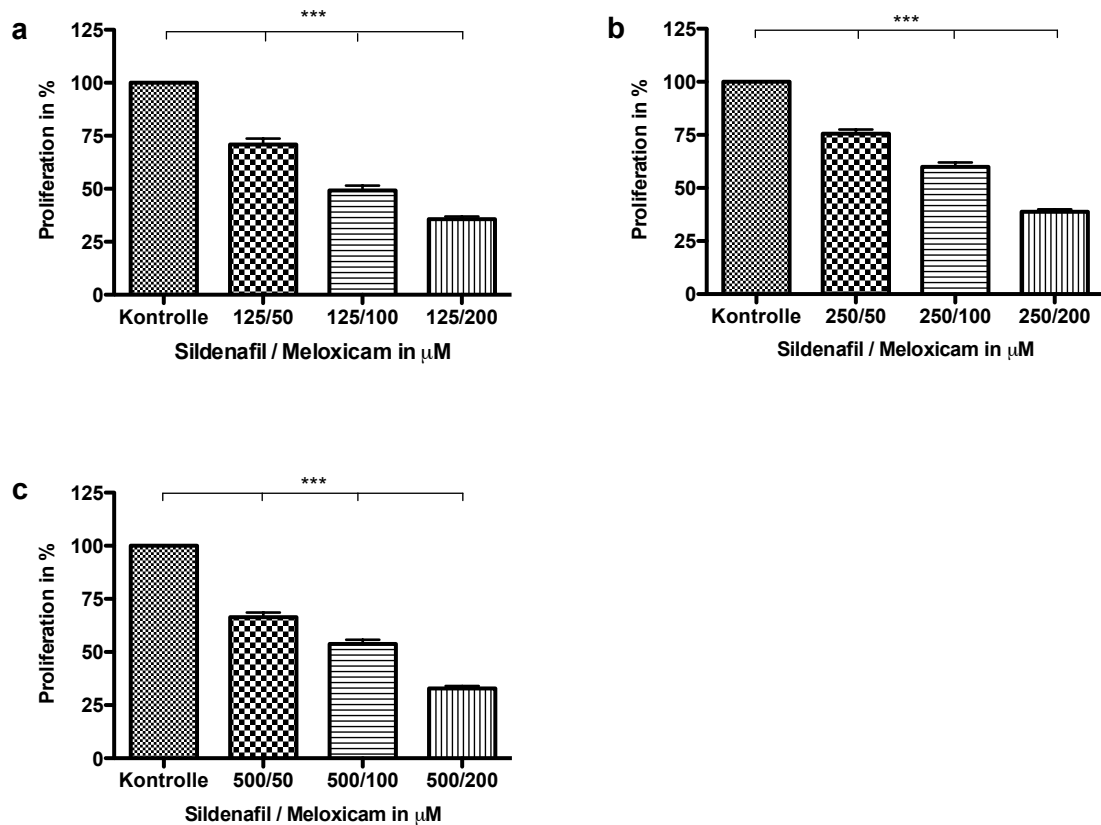


Abbildung 4.3 Wirkung von Sildenafil und Meloxicam in Kombination auf H69-Zellen. Abgebildet ist die Behandlung von H69-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Sildenafil (125 μM , 250 μM , 500 μM) in Kombination mit Meloxicam in folgenden Konzentrationen (50 μM , 100 μM , 200 μM). Dargestellt ist die Proliferation der Zelllinie H69 in %. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 18$, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test). *** $p < 0,001$

4.1.4 Der Einfluss von IBMX und Meloxicam in Kombination auf H69-Zellen

Um die gemeinsame Wirkung von IBMX und Meloxicam auf H69-Zellen zu testen, wurden die Zellen mit IBMX in den Konzentrationen 125 μM , 250 μM und 500 μM kombiniert mit Meloxicam in den Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 200 μM inkubiert. Es ergab sich eine dosisabhängige Inhibition des Proliferationsverhaltens der H69-Zellen (Abbildung 4.4 a,b,c):

- 125 μM IBMX / 50 μM Meloxicam um 33%
- 125 μM IBMX / 100 μM Meloxicam um 43%
- 125 μM IBMX / 200 μM Meloxicam um 63%

- 250 μ M IBMX / 50 μ M Meloxicam um 45%
- 250 μ M IBMX / 100 μ M Meloxicam um 55%
- 250 μ M IBMX / 200 μ M Meloxicam um 70%
- 500 μ M IBMX / 50 μ M Meloxicam um 59%
- 500 μ M IBMX / 100 μ M Meloxicam um 67%
- 500 μ M IBMX / 200 μ M Meloxicam um 78%

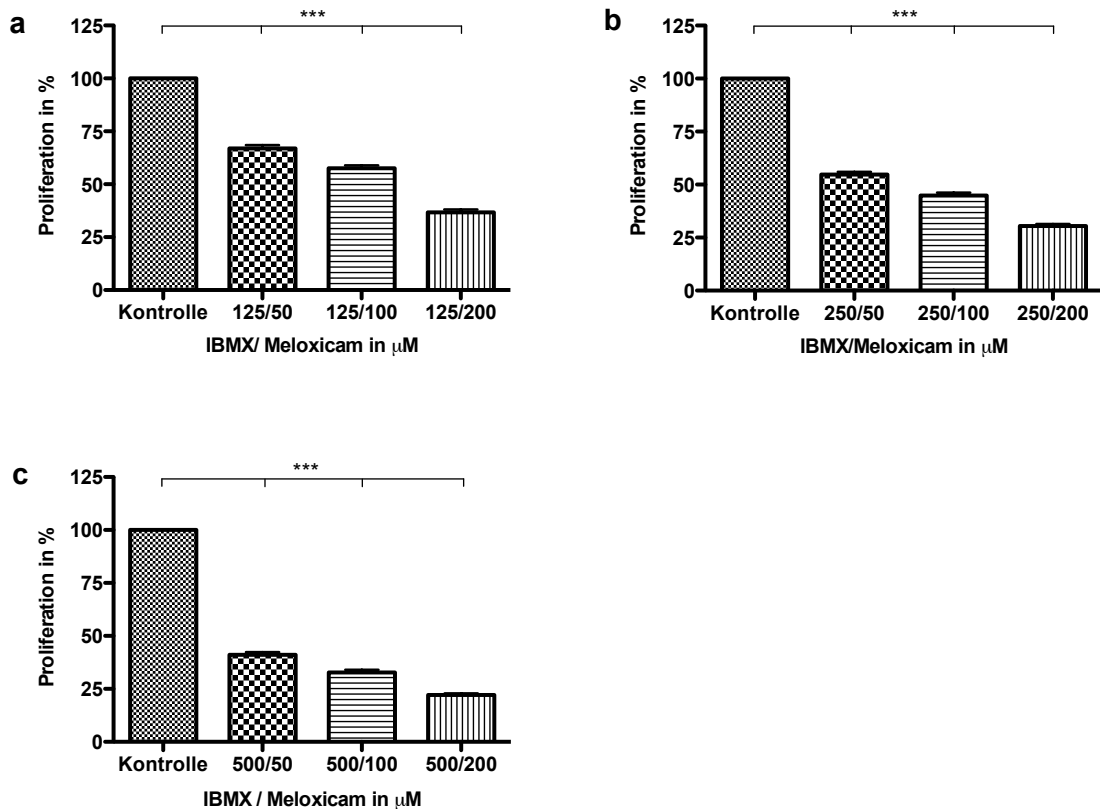


Abbildung 4.4 Wirkung von IBMX und Meloxicam in Kombination auf H69-Zellen. Abgebildet ist die Behandlung von H69-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von IBMX (125 μ M, 250 μ M, 500 μ M) in Kombination mit Meloxicam in folgenden Konzentrationen (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M). Dargestellt ist die Proliferation der Zelllinie H69 in %. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 18, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test). *** p < 0,001

Im Unterschied zu den zuvor behandelten Substanzkonzentrationen zeigen sowohl die unterschiedlichen IBMX- als auch die Meloxicamkonzentrationen einen ausschlaggebenden Effekt auf die Reduktion der Proliferation der H69-Zellen. Je höher die Konzentrationen der beiden Substanzen, desto höher fällt die Zellwachstumshemmung der H69-Zellen aus. Desweiteren ist durch die Kombinationsbehandlung der H69-Zellen mit

IBMX und Meloxicam eine signifikante Erhöhung der Proliferationsreduktion gegenüber der Einzelbehandlung mit IBMX oder Meloxicam zu verzeichnen. IBMX und Meloxicam verstärken gegenseitig ihren Effekt auf die Reduktion des Proliferationsverhaltens der H69-Zellen.

4.2 Zelllinie H82

4.2.1 Der Einfluss von Indometacin, IBMX, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil, auf H82-Zellen

Es wurde die Wirkung von Indometacin, IBMX, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil auf das Proliferationsverhalten von H82-Zellen untersucht. Hierfür wurden die H82-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der fünf Substanzen inkubiert.

Indometacin wurde in Konzentrationen von 50 μM , 100 μM und 200 μM zu den H82-Zellen gegeben. Die H82-Zellen reagierten sehr viel sensibler auf die Behandlung mit Indometacin als die H69-Zellen. Schon bei einer Indometacinkonzentration von 50 μM zeigte sich eine hochsignifikante Proliferationshemmung gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 4.5a):

- 50 μM Indometacin um 74%

Mit einer Indometacinkonzentration von 100 μM konnte die Zellproliferation der H82-Zellen um weitere 17,27% gegenüber der Konzentration von 50 μM reduziert werden. Durch eine Verdoppelung der Menge auf 200 μM konnte diese Reduktion nicht signifikant gesteigert werden (2% gegenüber einer Indometacinkonzentration von 100 μM) (Abbildung 4.5a):

- 100 μM Indometacin um 91%
- 200 μM Indometacin um 93%

Die Inkubation der H82-Zellen mit IBMX erfolgte in Konzentrationen von 125 μM , 250 μM und 500 μM . Es konnte beobachtet werden, dass alle getesteten IBMX-Konzentrationen eine proliferationshemmende Wirkung auf H82-Zellen zeigten. Bei der Einzelbehandlung mit einer Indometacinkonzentration von 500 μM konnte sogar eine signifikante Proliferationshemmung verzeichnet werden (Abbildung 4.5b):

- 125 μ M IBMX um 14%
- 250 μ M IBMX um 21%
- 500 μ M IBMX um 39%

Die Einzelgabe von Meloxicam in den Konzentrationen 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M auf die Zelllinie H82 zeigte in allen Konzentrationen einen proliferationshemmenden Effekt. Durch eine Verdoppelung der Meloxicamkonzentration konnte eine erwähnenswerte Steigerung der Proliferationshemmung verzeichnet werden (Abbildung 4.5c):

- 50 μ M Meloxicam um 18%
- 100 μ M Meloxicam um 33%
- 200 μ M Meloxicam um 54%

Sildenafil wurde in den Konzentrationen 125 μ M, 250 μ M und 500 μ M zu der Zelllinie H82 gegeben und das Proliferationsverhalten untersucht. In allen Konzentrationen konnte eine signifikante Reduktion der Proliferation verzeichnet werden. Entgegen der Sensitivität der H82-Zellen gegenüber anderen Substanzen zeigte sich bei der Behandlung mit Sildenafil die stärkste Proliferationshemmung bei der niedrigsten Konzentration (125 μ M), die durch eine Erhöhung der Sildenafilkonzentration nicht weiter gesteigert werden konnte (Abbildung 4.5d):

- 125 μ M Sildenafil um 53%
- 250 μ M Sildenafil um 46%
- 500 μ M Sildenafil um 38%

Die Proliferationshemmung der H82-Zellen reduzierte sich bei einer Erhöhung von 125 μ M auf 250 μ M um 7% und bei einer Erhöhung von 125 μ M auf 500 μ M um 15%.

Ein ähnliches Verhalten zeigte die Zelllinie H82 bei der Einzelinkubation mit Vardenafil in den Konzentrationen 125 μ M, 250 μ M und 500 μ M. Schon bei einer Konzentration von 125 μ M wurde eine hochsignifikante Reduktion im Zellwachstum beobachtet, die durch eine weitere Erhöhung der Vardenafilkonzentration abnahm (Abbildung 4.5e):

- 125 μM Vardenafil um 63%
- 250 μM Vardenafil um 56%
- 500 μM Vardenafil um 47%

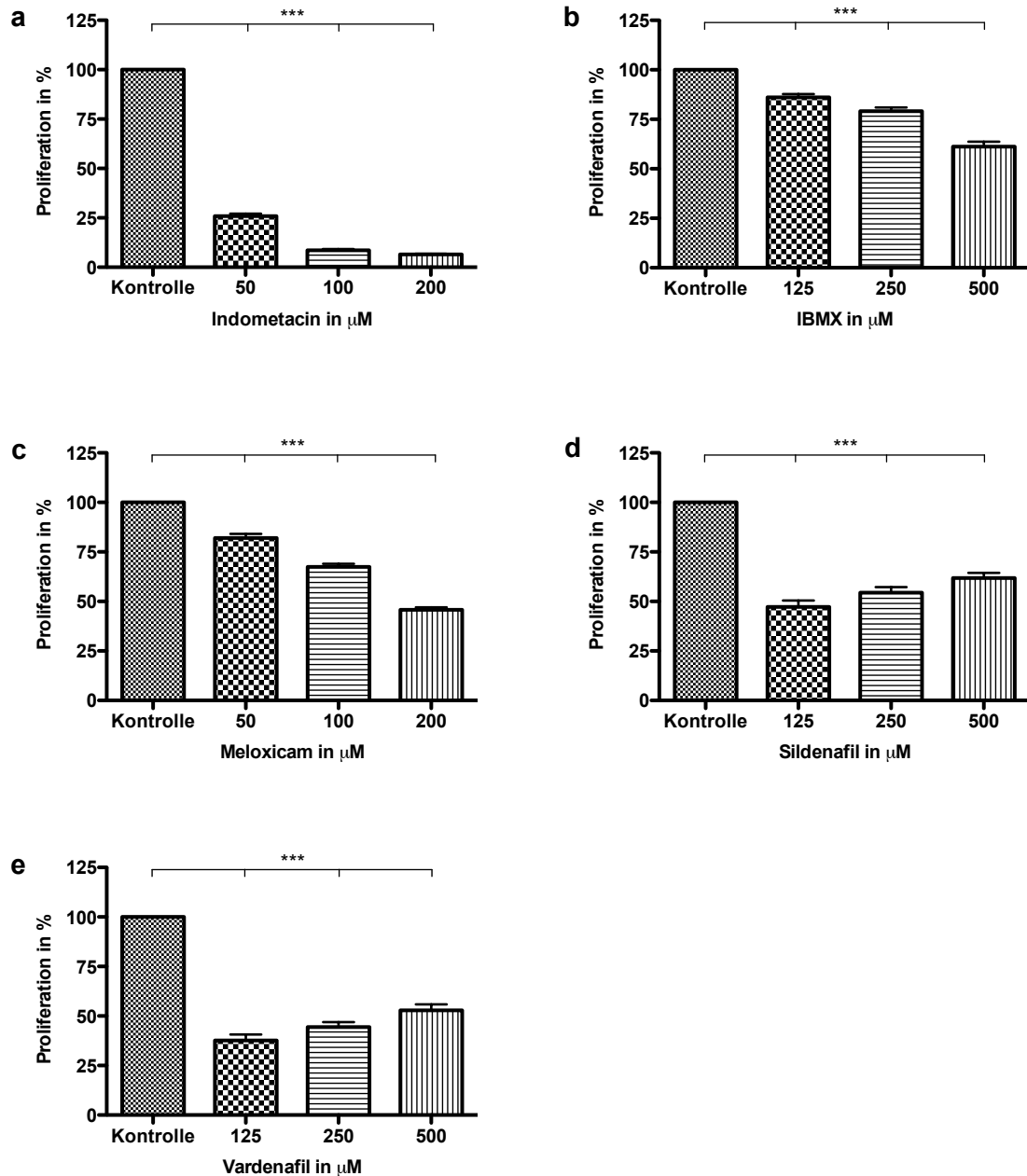


Abbildung 4.5 Wirkung von Indometacin, IBMX, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil auf H82-Zellen. Abgebildet ist die Behandlung von H82-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Indometacin (50 μM , 100 μM , 200 μM) (a), IBMX (125 μM , 250 μM , 500 μM) (b), Meloxicam (50 μM , 100 μM , 200 μM) (c), Sildenafil (125 μM , 250 μM , 500 μM) (d) und Vardenafil (125 μM , 250 μM , 500 μM) (e). Dargestellt ist die Proliferation der Zelllinie H82 in %. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 18, One-Way-ANOVA (Post-Test:Bonferroni's Multiple Comparison Test). *** p < 0,001

Insgesamt ist zu verzeichnen, dass die Zelllinie H82 sensitiver auf die Inkubation mit Indometacin, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil reagiert als H69-Zellen und somit insgesamt höhere Reduktionsraten im Proliferationsverhalten für H82-Zellen zu beobachten sind. In der Einzelbehandlung mit IBMX zeigen H82-Zellen und H69-Zellen ein ähnliches Proliferationsverhalten. Den effektivsten Effekt auf die Proliferationshemmung der H82-Zellen zeigt Indometacin in einer Konzentration von 200 μM ; die Zellproliferation wird um 93% gehemmt.

4.2.2 Der Einfluss von Sildenafil und Indometacin in Kombination auf H82-Zellen

Um den Effekt von Sildenafil und Indometacin auf die Proliferation von H82-Zellen zu testen wurden die Zellen mit Sildenafil in den Konzentrationen 125 μM , 250 μM und 500 μM in Kombination mit Indometacin in den Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 200 μM inkubiert. Die höchste Proliferationshemmung wurde bei einer Sildenafilkonzentration von 125 μM in Kombination mit Indometacinkonzentrationen von 50 μM , 100 μM und 200 μM beobachtet (Abbildung 4.6a):

- 125 μM Sildenafil / 50 μM Indometacin um 93%
- 125 μM Sildenafil / 100 μM Indometacin um 97%
- 125 μM Sildenafil / 200 μM Indometacin um 96%

Mit der Erhöhung der Sildenafilkonzentration auf 250 μM und 500 μM kam es zu einer Abnahme in der Zellwachstumshemmung (Abbildung 4.6b,c):

- 250 μM Sildenafil / 50 μM Indometacin um 90%
- 250 μM Sildenafil / 100 μM Indometacin um 95%
- 250 μM Sildenafil / 200 μM Indometacin um 88%

- 500 μM Sildenafil / 50 μM Indometacin um 84%
- 500 μM Sildenafil / 100 μM Indometacin um 89%
- 500 μM Sildenafil / 200 μM Indometacin um 88%

In allen Kombinationen von Sildenafil mit Indometacin sind hochsignifikante Reduktionen im Proliferationsverhalten festzustellen. Während Unterschiede in der Indometacinkonzentration fast keinen Einfluss auf die Proliferationshemmung zu haben

scheinen, verringert sich das Proliferationsverhalten mit einer Erhöhung der Sildenafilkonzentration leicht. Eine Einzelinkubation der H82-Zellen mit Indometacin erzielte ähnliche Resultate

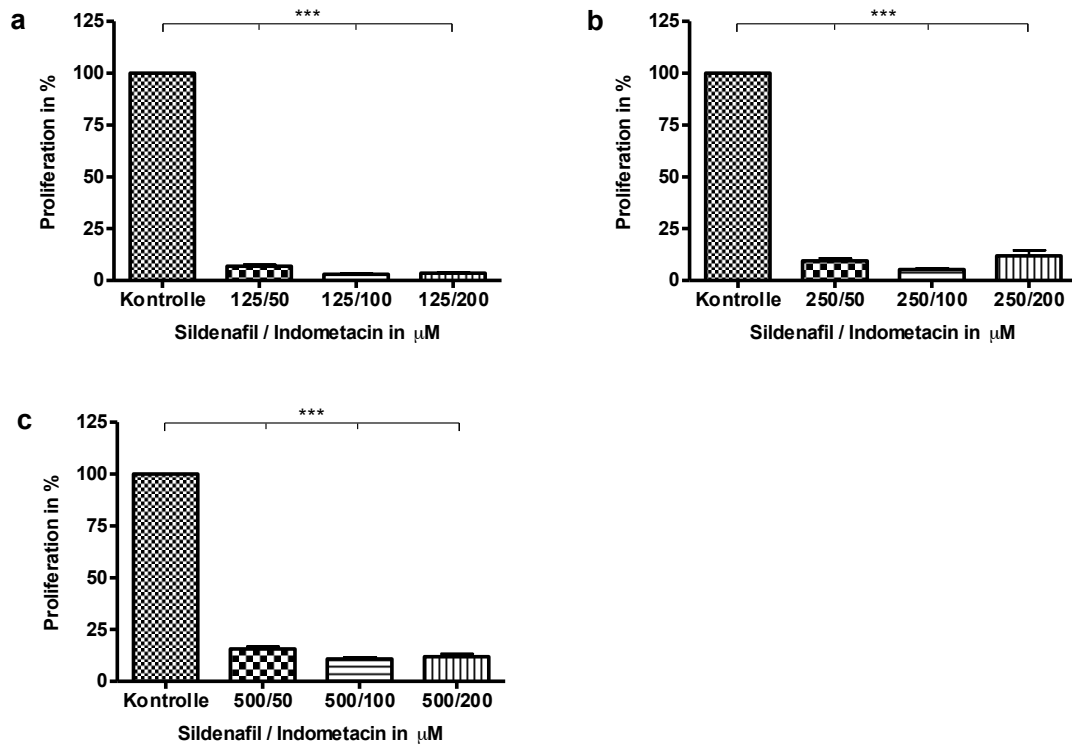


Abbildung 4.6 Wirkung von Sildenafil und Indometacin in Kombination auf H82-Zellen. Abgebildet ist die Behandlung von H82-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Sildenafil (125 µM, 250 µM, 500 µM) in Kombination mit Indometacin in folgenden Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 200 µM). Dargestellt ist die Proliferation der Zelllinie H82 in %. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 18, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test). *** p < 0,001

4.2.3 Der Einfluss von Sildenafil und Meloxicam in Kombination auf H82-Zellen

Die gemeinsame Wirkung von Sildenafil und Meloxicam auf die Zelllinie H82 sollte untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Sildenafil (125 µM, 250 µM und 500 µM) in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen Meloxicam (50 µM, 100 µM und 200 µM) inkubiert. Es zeigten sich bei allen Kombinationsmöglichkeiten hochsignifikante Veränderungen in der Proliferation gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 4.7a,b,c):

- 125 μ M Sildenafil / 50 μ M Meloxicam um 70%
- 125 μ M Sildenafil / 100 μ M Meloxicam um 74%
- 125 μ M Sildenafil / 200 μ M Meloxicam um 80%

- 250 μ M Sildenafil / 50 μ M Meloxicam um 66%
- 250 μ M Sildenafil / 100 μ M Meloxicam um 75%
- 250 μ M Sildenafil / 200 μ M Meloxicam um 90%

- 500 μ M Sildenafil / 50 μ M Meloxicam um 55%
- 500 μ M Sildenafil / 100 μ M Meloxicam um 68%
- 500 μ M Sildenafil / 200 μ M Meloxicam um 80%

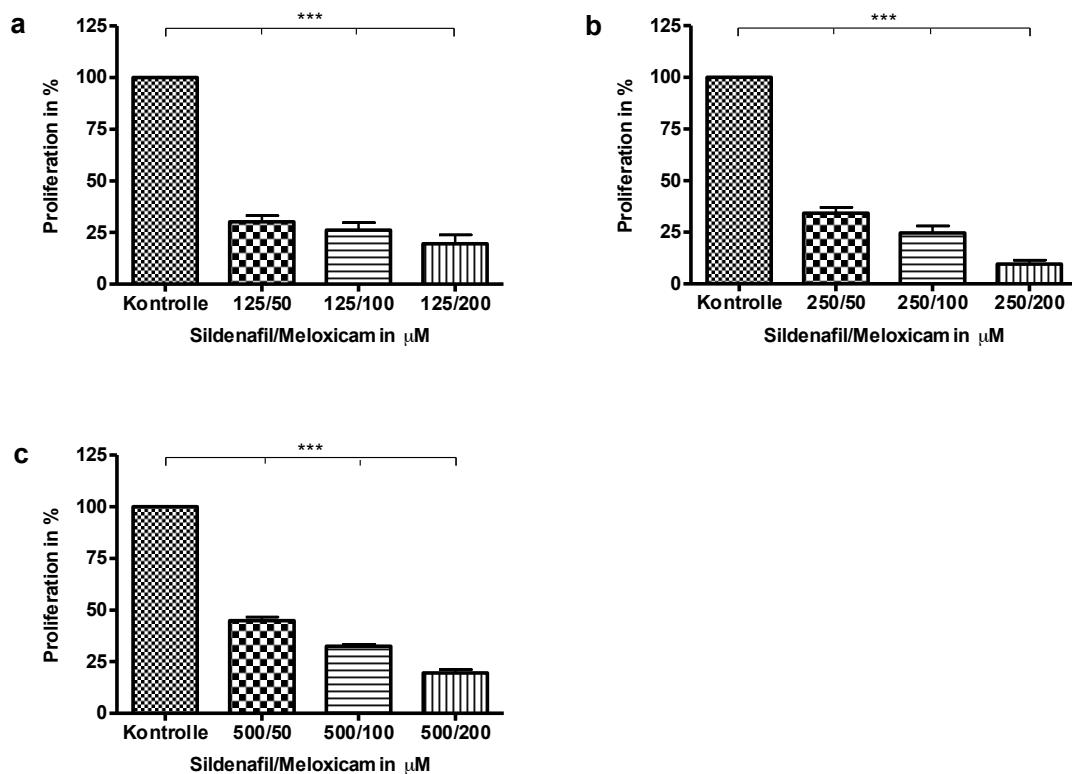


Abbildung 4.7 Wirkung von Sildenafil und Meloxicam in Kombination auf H82-Zellen. Abgebildet ist die Behandlung von H82-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Sildenafil (125 μ M, 250 μ M, 500 μ M) in Kombination mit Meloxicam in folgenden Konzentrationen (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M). Dargestellt ist die Proliferation der Zelllinie H82 in %. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, n=18, One-Way-ANOVA (Post-Test:Bonferroni's Multiple Comparison Test). *** p < 0,001

Die stärkste Reduktion des Zellwachstums von 90% wurde in der Kombination 250 μ M Sildenafil mit 200 μ M Meloxicam erzielt. Insgesamt ist zu beobachten, dass bei gleichbleibender Sildenafilkonzentration mit einer Erhöhung der Meloxicamkonzentration die Proliferationshemmung gesteigert wird. Bei Sildenafilkonzentrationen von 125 μ M und 250 μ M und gleichen Meloxicamkonzentrationen wurden ähnliche Resultate in der Proliferationshemmung beobachtet, während der proliferationshemmende Effekt bei einer Konzentration von 500 μ M leicht abnahm.

4.2.4 Der Einfluss von IBMX und Meloxicam in Kombination auf H82-Zellen

Bei der Behandlung der H82-Zellen mit IBMX in der Konzentration 125 μ M in Kombination mit Meloxicam in den Konzentrationen 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M zeigten sich signifikante Auswirkungen auf die Proliferation. Mit jeder Verdoppelung der Meloxicamkonzentration erhöhte sich die Proliferationshemmung der H82-Zellen um weitere 18% (Abbildung 4.8a):

- 125 μ M IBMX / 50 μ M Meloxicam um 36%
- 125 μ M IBMX / 100 μ M Meloxicam um 55%
- 125 μ M IBMX / 200 μ M Meloxicam um 73%

Die Kombinationen von 250 μ M IBMX mit 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M Meloxicam hemmten die Zellproliferation der H82-Zellen noch signifikanter (Abbildung 4.8b):

- 250 μ M IBMX / 50 μ M Meloxicam um 53%
- 250 μ M IBMX / 100 μ M Meloxicam um 62%
- 250 μ M IBMX / 200 μ M Meloxicam um 76%

Mit einer weiteren Verdoppelung der IBMX-Konzentration auf 500 μ M in Kombination mit 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M Meloxicam konnte die Reduktion der Zellproliferation in geringem Umfang noch weiter gesteigert werden. Die stärkste Inhibition der Zellproliferation wurde durch die Inkubation der H82-Zellen mit 500 μ M IBMX plus 200 μ M Meloxicam im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht (Abbildung 4.8c):

- 500 μ M IBMX / 50 μ M Meloxicam um 60%
- 500 μ M IBMX / 100 μ M Meloxicam um 68%
- 500 μ M IBMX / 200 μ M Meloxicam um 81%

Durch eine Erhöhung der Meloxicamkonzentration konnte die Proliferationshemmung der H82-Zellen gesteigert werden. Ähnliche Resultate ließen sich durch eine Erhöhung der IBMX-Konzentration erzielen, wenn auch in geringerem Umfang.

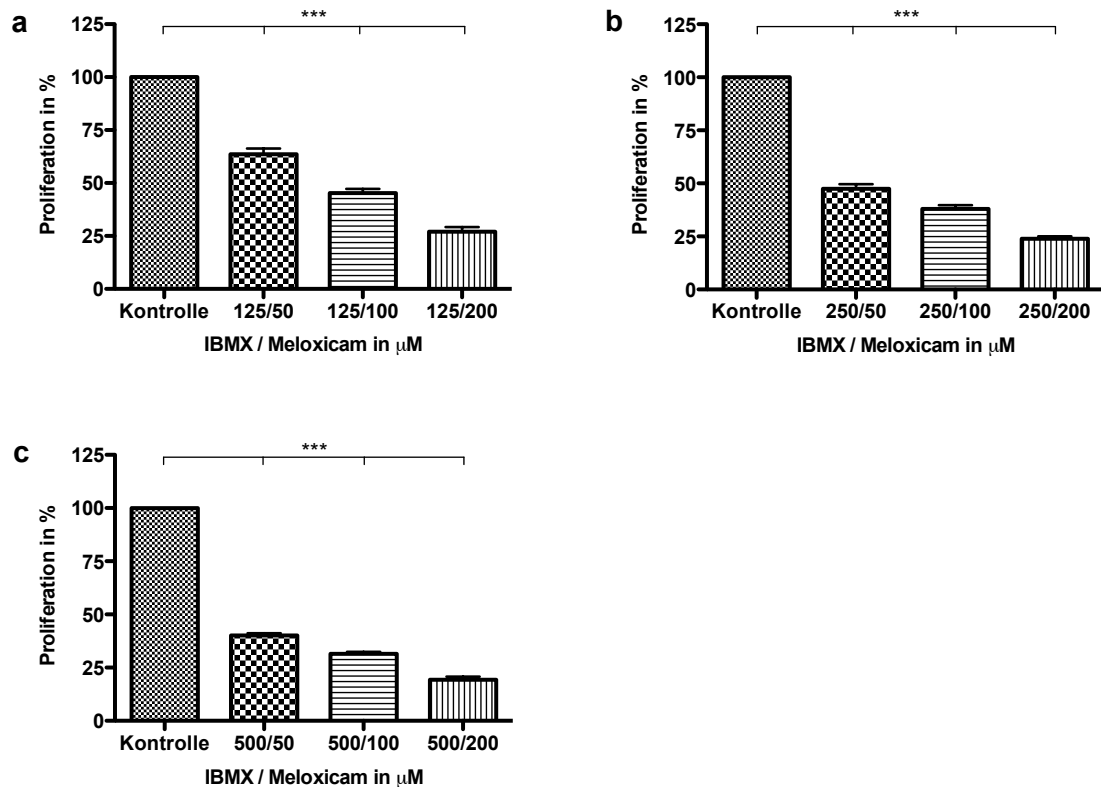


Abbildung 4.8 Wirkung von IBMX und Meloxicam in Kombination auf H82-Zellen. Abgebildet ist die Behandlung von H82-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von IBMX (125 μ M, 250 μ M, 500 μ M) in Kombination mit Meloxicam in folgenden Konzentrationen (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M). Dargestellt ist die Proliferation der Zelllinie H82 in %. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 18, One-Way-ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test). *** p < 0,001

5 Diskussion

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) macht zur Zeit etwa 15-25% aller primären Lungentumore aus [Glisson 2003; Kimura *et al.*, 2011]. Man unterscheidet beim kleinzelligen Bronchialkarzinom das Stadium der limited disease (LD) und das Stadium der extensive disease (ED). Bei Diagnosestellung befinden sich etwa 30-40% der Patienten im Stadium der limited disease (LD) und bereits 60-70% im Stadium der extensive disease [Murray und Turrisi, 2006]. Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist durch ein schnelles und aggressives Wachstum mit sehr früher Metastasierung gekennzeichnet. Dies resultiert in einer kurzen medianen Überlebenszeit der Patienten, die unbehandelt bei zirka 2-4 Monaten liegt [National Cancer Institute, NCI] und sich durch Behandlung auf 6-12 Monate (ED) [National Cancer Institute, NCI] bzw. 15-20 Monate (LD) verlängern lässt [Lally *et al.*, 2007].

Aufgrund dieser kurzen medianen Überlebenszeit und der Resistenzentwicklung der kleinzelligen Bronchialkarzinome ist es zwingend notwendig, neue Therapieansätze zu entwickeln. Um die Nebenwirkungen der herkömmlichen Therapien zu umgehen sollten bei der Suche auch ungewöhnliche Therapieansätze gewählt werden.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) Indometacin und Meloxicam, des Methylxantins IBMX und der PDE5-Inhibitoren Sildenafil und Vardenafil einzeln und in Kombination auf das Proliferationsverhalten der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 getestet.

5.1 Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)

NSAR sind Inhibitoren der Cyclooxygenasen, so dass sie bei Überexpression dieser Enzyme als Therapeutikum in Frage kämen. Für verschiedene Tumorentitäten konnte eine Überexpression von COX-2 nachgewiesen werden. Hierzu zählen das Pankreaskarzinom [Molina *et al.*, 1999], das Bronchialkarzinom [Wolff *et al.*, 1998], das Mammakarzinom [Hwang *et al.*, 1998], das Kolonkarzinom [DuBois *et al.*, 1996] und das Prostatakarzinom [Gupta *et al.*, 2000]. Als Inhibitoren der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und -2) könnten NSAR antineoplastische Effekte auf diese Tumorarten aufweisen. Ob die NSAR Indometacin und Meloxicam Einfluss auf das Proliferationsverhalten der kleinzelligen

Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 haben, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Wirkung von Indometacin auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 dargestellt werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liegt mit der Tabelle 5.1 vor.

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass Indometacin die Zellproliferation der H69-Zellen ab einer Konzentration von 100 μM hemmt (Abbildung 4.1a). Die Zelllinie H82 reagiert weitaus sensibler auf die Behandlung mit Indometacin als die Zelllinie H69. Eine Indometacin-konzentration von 50 μM hemmt die Zellproliferation hochsignifikant, Konzentrationen von 100 μM und 200 μM sogar um ca. 90% (Abbildung 4.5a).

Einen zu vergleichenden Befund demonstrierten Lange *et al.* [2011] an den kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien OH1, OH3, H69, SW2 und H82. Indometacin inhibierte bereits ab einer Konzentration von 25 μM die Zellproliferation der H82-Zellen und ab einer Konzentration von 50 μM das Zellwachstum der SW2-Zellen. Die Autoren erklären die Sensitivität der H82-Zellen gegenüber Indometacin im Vergleich zu den SW2-Zellen mit einer erhöhten COX-2-Expression. Die COX-1-Expression zeigte keine Unterschiede.

De Groot *et al.*, [2005, 2007] zeigten für die doxorubicinresistente kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie GLC₄-ADdr eine durch Indometacin induzierte Apoptose. Vermutlich spielt das MRP1 (multidrug resistant protein 1) eine zentrale Rolle bei diesem Vorgang, dessen Funktion durch Indometacin gehemmt wird [Draper *et al.*, 1997; Roller *et al.*, 1999], so dass sich damit die Chemosensitivität der GLC₄-ADdr-Zelllinie erhöht.

Schon Konzentrationen von 10-20 μM Indometacin waren ausreichend um die Zellproliferation des Lewis Lungenkrebs *in vitro* zu hemmen. *In vivo* wurden Mäusen 2mg/kg Körpergewicht Indometacin verabreicht, um Tumorwachstum und Metastasierung zu inhibieren [Eli *et al.*, 2001].

Die Behandlung der nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien A549, H1299, H460 und H226 mit Indometacinkonzentrationen von 20 μM , 40 μM und 60 μM resultierte in einer konzentrationsabhängigen Inhibition des Zellwachstums und der Zellviabilität. Da in erster Linie die Überexpression von COX-2 für die schnelle Zellproliferation und das schnelle Tumorwachstum angesehen wird, vermuten Sharma *et al.* [2010], dass die Inhibition der COX, vornehmlich der COX-2, durch Indometacin beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) in einer Hemmung der NSCLC-Zellproliferation und einer Induktion des NSCLC-Zelltodes resultiert.

In mehreren Studien konnte der Effekt von Indometacin auf Kolonkarzinomzellen demonstriert werden. So belegten Hull *et al.* [2003], dass eine Proliferationshemmung bei kolorektalen Karzinomzellen erst ab einer Indometacinkonzentration $> 100 \mu\text{M}$ erreicht wurde. Es wurden ein G1-Zellzyklus-Arrest und die Apoptose der Zellen beobachtet. Vermutlich stimuliert Indometacin das proapoptotische Gen Bax in den HTC116-Kolonkarzinomzellen. Als Botenstoff des Protoonkogens c-myc führt Bax zu einer c-myc-Expressionsänderung, die in einer Apoptose-Aktivität mündet [Hull *et al.*, 2003].

Auch für die Kolonkarzinomzelllinie SW480 konnten proliferationshemmende Effekte demonstriert werden [Soh *et al.*, 2008]. Neben der Wachstumsinhibition hat die Arbeitsgruppe in gleichem Umfang eine Hemmung der subzellulären Phosphodiesterase nachgewiesen, die zu einer doppelten bis dreifachen Zunahme der cGMP-Konzentration in der Zelle führte. Als Ursache wurden COX-2 unabhängige Mechanismen vermutet.

In *in vivo*-Experimenten ist es Wang und Zhang [2003] gelungen, die Hemmung der Tumor-Angiogenese durch Inhibition der VEGF-Expression (vascular endothelial growth factor) für HCT116-Kolonkarzinomzellen nach Behandlung mit Indometacin zu belegen.

Gestützt wird diese Annahme durch Chiu *et al.* [2005], die für die Wirkung einer Behandlung der Melanomzelllinie A375 mit Indometacin neben der COX-Inhibition auch noch andere Mechanismen als Ursache für die Wachstumsinhibition vermuten. Schon Konzentrationen von 240 pM und 480 pM waren ausreichend, um eine Proliferationshemmung von 40% zu erzielen. Auch für die Proliferationsinhibition der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 genügten Indometacinkonzentrationen von $3\text{--}30 \mu\text{M}$ [Noguchi *et al.*, 1995].

Quidville *et al.* [2004] konnten eine Inhibition der TT-Zellproliferation des medullären Schilddrüsenkarzinoms sowie eine Abnahme der COX-1-Expression nachweisen. Indometacinkonzentrationen von $200 \mu\text{M}$ inhibierten das Zellwachstum um 40-49% *in vitro*. Als Ursache nehmen die Autoren eine Caspase 3 vermittelte Apoptose an. *In vivo* wurde das Tumorwachstum des medullären Schilddrüsenkarzinoms in Mäusen durch die Gabe von 2mg/kg/Tag signifikant gehemmt [Quidville *et al.*, 2004].

Die Resultate der eigenen Untersuchungen für die H69-Zellen sind mit den Ergebnissen der beschriebenen *in vitro*-Untersuchungen vergleichbar. Eine Hemmung der Zellproliferation der H69-Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms wird mit Indometacinkonzentrationen von $100\text{--}200 \mu\text{M}$ erreicht. Ebenso verhält es sich für das Kolonkarzinom, dessen Zellproliferation ab einer Indometacinkonzentration von $100 \mu\text{M}$

gehemmt wird [Hull *et al.*, 2003] und für das Schilddrüsenkarzinom, dessen Zellproliferation bei einer Indometacinkonzentration von 200 μM inhibiert wird. Weitaus geringere Indometacinkonzentrationen sind für die Inhibition der Zellproliferation des Lewis Lungenkrebs (10-20 μM Indometacin) [Eli *et al.*, 2001], und der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (3-30 μM Indometacin) [Noguchi *et al.*, 1995] ausreichend. Empfindlicher reagiert auch die Zelllinie H82 des kleinzelligen Bronchialkarzinoms auf die Behandlung mit Indometacin. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die Zellproliferation schon mit der geringsten getesteten Indometacinkonzentration hochsignifikant um 74% gehemmt wird.

	H69	H82
Indometacin	– 50 μM *	↓ 50 μM ***
	↓ 100 μM ****	↓ 100 μM ***
	↓ 200 μM ***	↓ 200 μM ***
Meloxicam	– 50 μM *	↓ 50 μM ***
	↓ 100 μM ***	↓ 100 μM ***
	↓ 200 μM ***	↓ 200 μM ***
IBMX	↓ 125 μM *	↓ 125 μM ***
	↓ 250 μM ***	↓ 250 μM ***
	↓ 500 μM ***	↓ 500 μM ***
Sildenafil	– 125 μM *	↓ 125 μM ***
	– 250 μM *	↓ 250 μM ***
	– 500 μM **	↓ 500 μM ***
Vardenafil	↓ 125 μM ****	↓ 125 μM ***
	↓ 250 μM **	↓ 250 μM ***
	↓ 500 μM ***	↓ 500 μM ***

Tabelle 5.1 Zusammenfassende Darstellung über die Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien mit Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil. Aufgeführt sind die Konzentrationen mit keinem (–), einem proliferationshemmenden (↓) oder einem proliferationssteigernden (↑) Effekt auf die Zelllinien H69 und H82. (* = $p > 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,05$)

Da Indometacin sowohl auf COX-1 als auch auf COX-2 wirkt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit der Untersuchung eines selektiven COX-2-Inhibitors (Meloxicam) differenziert werden, ob unselektive COX-Inhibitoren oder selektive COX-2-Inhibitoren einen größeren proliferationshemmenden Effekt auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 haben. Für das Ovarialkarzinom konnte nämlich bereits nachgewiesen werden, dass selektive COX-2-Inhibitoren einen größeren antitumorösen Effekt aufweisen als unselektive COX-Inhibitoren [Xin *et al.*, 2007].

Meloxicam wird insbesondere bei akuten Arthroseschüben und rheumatoider Arthritis verwendet, da es sich in der Gelenkflüssigkeit ansammelt, kommt aber auch in der prä- und postoperativen Schmerztherapie sowie bei Morbus Bechterew oder Gicht zum Einsatz.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Meloxicam auf das Wachstumsverhalten der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 untersucht (Tabelle 5.1). Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die Behandlung mit 50 μM Meloxicam auf die Zelllinie H69 keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation hatte. Konzentrationen von 100 μM und 200 μM riefen eine Wachstumshemmung der H69-Zellen hervor (Abbildung 4.1c). Auf die Zelllinie H82 dagegen hatte die Behandlung mit 50 μM Meloxicam einen signifikanten wachstumsinhibierenden Effekt, dessen Maximum mit einer Meloxicamkonzentration von 200 μM erreicht wurde (Abbildung 4.5c).

Der Einfluss von Meloxicam auf die Proliferation von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen wurde bisher noch nicht getestet. Allerdings konnte ein antiproliferativer Effekt von Meloxicam auf Zellen des Kolonkarzinoms [Goldman *et al.*, 1998], des Osteosarkoms [Naruse *et al.*, 2006] und auf die Zelllinien A549 und PC14 des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms [Tsubouchi *et al.*, 2000] *in vitro* nachgewiesen werden.

Naruse *et al.* [2006] konnten für Meloxicam einen Antitumor-Effekt für die Osteosarcomzelllinie MG63 *in vitro* und für die Osteosarkomzelllinie LM8 *in vivo* feststellen. Meloxicam inhibierte das Zellwachstum und die Invasivität der MG63-Zellen mit einem maximalen inhibitorischen Effekt von 28,2% bei einer Meloxicamexposition von 100 μM . Die Arbeitsgruppe vermutet, dass diese Effekte COX-2 abhängig sind, da die Zelllinien HOS und U2OS, die COX-2 in weitaus geringerem Maße als MG63-Zellen

exprimieren und daher weniger sensibel auf die Behandlung mit Meloxicam reagieren. Für hohe Meloxicamkonzentrationen von 100 μM konnte zusätzlich eine über das proapoptotische Gen Bax eingeleitete Apoptose der MG63-Zellen nachgewiesen werden. Die antineoplastischen Effekte *in vivo* von Meloxicam beruhen hingegen auf einer reduzierten Angiogenese via einer Hemmung der VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-Produktion [Naruse *et al.*, 2006].

Xin *et al.* [2007] konnten für das Ovarialkarzinom *in vivo* nachweisen, dass eine Versuchsgruppe von Mäusen, die mit Meloxicam therapiert wurden, ein signifikant geringeres Tumorwachstum und eine deutlich größere Überlebensrate hatten als die Kontrollgruppe. Zudem zeigten Mäuse die mit Meloxicam (selektiver COX-2-Inhibitor) therapiert wurden, einen größeren Anti-Tumor-Effekt als Mäuse, die mit nichtselektiven COX-Inhibitoren therapiert wurden [Xin *et al.*, 2007].

Die eigenen Untersuchungen belegen nun, dass die Wachstumsinhibition der H69 und H82-Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms für Meloxicam insgesamt geringer ausfällt als für Indometacin und dass die H82-Zellen auf beide Medikamente sensibler reagieren als die H69-Zellen. Meloxicam, als selektiver COX-2-Inhibitor, hat entgegen der angestellten Vermutung offensichtlich keine stärkere Wirkung als unselektive COX-Inhibitoren.

COX-1, das in fast allen menschlichen Zellen vorkommt [Ermert *et al.*, 2003], konnte in H82-Zellen nicht nachgewiesen werden [Lange *et al.*, 2011]. COX-2 hingegen wurde exprimiert. Analoges belegten Ermert *et al.* [2003] für nicht kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien. Gegenüber dem gesundem Lungengewebe exprimierten die nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen COX-1 nur in geringem Maße, COX-2 hingegen überdurchschnittlich hoch. Zu vermuten ist, dass COX-2 für die tumorinduzierte Angiogenese und Neovaskularisation des NSCLC relevant ist.

Da in der Zelllinie H82 COX-1 nicht auftrat, wirkte der unselektive COX-Inhibitor Indometacin unseres Erachtens nach wie auch der selektive COX-2-Inhibitor Meloxicam hauptsächlich auf die Cyclooxygenase 2, so dass nicht differenziert werden konnte, ob selektive COX-2-Inhibitoren oder unselektive COX-Inhibitoren das Proliferationsverhalten der SCLC-Zellen stärker hemmen.

De Groot *et al.* [2007] wiesen außerdem darauf hin, dass der antitumoröse Effekt der NSAID erst bei Konzentrationen zu beobachten ist, welche die COX-2-inhibitorischen Konzentrationen weit überschreiten.

5.2 IBMX

IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) ist eine heterocyclische Verbindung aus der Gruppe der Methylxantine. IBMX hemmt die Phosphodiesterase (PDE), die cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) abbaut. Wird die PDE gehemmt, steigt die cAMP-Konzentration in der Zelle an [Firmino *et al.*, 2002]. Desweiteren blockiert IBMX das inhibitorische G-Protein, wodurch die Adenylatzyklase aktiviert wird und sich wiederum die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht [Parson *et al.*, 1988]. Durch den pharmakologischen Einsatz von IBMX könnte dieses Substrat ein hoffnungsvolles Medikament in all jenen Prozessen sein, in denen die intrazelluläre cAMP-Konzentration eine Rolle spielt.

Chen *et al.* [1998] konnten nachweisen, dass IBMX in Wechselwirkung mit anderen Stoffen, die auch zu einer erhöhten cAMP-Konzentration in der Zelle führen, die Proliferation des malignen Glioblastoms *in vitro* hemmt und die Apoptose der Tumorzellen einleitet.

Janik *et al.*, [1980] haben *in vivo* den Nachweis geliefert, dass sich das Wachstum von Lewis Lungenkrebszellen durch die Behandlung mit IBMX reduzieren lässt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun der Einfluss von IBMX auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 dargestellt werden. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die Zelllinien H69 und H82 ab einer IBMX-Konzentration von 250 μM signifikant in ihrer Proliferation gehemmt werden. Die Behandlung mit IBMX rief in beiden Zelllinien vergleichbare Effekte hervor (Abbildung 4.1b, Abbildung 4.5c).

Die eigenen Ergebnisse bestätigen die Resultate einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe Lange *et al.* [2011]. Diese erreichte es, durch die Behandlung mit IBMX und Indometacin eine Proliferationshemmung der kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen der Linien OH1, OH3, H69, SW2 und H82 *in vitro* darzustellen, wobei die Zelllinien H82 und SW2 am sensibelsten reagierten. Für die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H345 konnte ebenfalls eine durch cAMP verursachte Proliferationshemmung *in vitro* und *in vivo* in Mäusen gezeigt werden. Hierzu wurden die H69 und H345 Zellen mit vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP), IBMX und Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase, behandelt. Die Zugabe von IBMX zu VIP steigerte zudem den wachstumsinhibierenden Effekt von VIP in der Behandlung der Zelllinien H69 und H345. Die Proliferationshemmung korrelierte mit dem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, so dass vermutet wird, dass die durch VIP, IBMX und Forskolin induzierte

Proliferationshemmung über die intrazelluläre cAMP-Konzentration moduliert wird [Maruno *et al.*, 1998].

Die Behandlung mit IBMX ruft bei Bronchialkarzinomzellen unterschiedliche Effekte hervor. Während Lange *et al.* [2011] und Maruno *et al.* [1998] durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration proliferationshemmende Effekte auf Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms nachweisen konnten, wurde das Wachstum des Lungenadenokarzinoms durch cAMP-steigernde Substanzen stimuliert [Schuller, 2009]. Es kann vermutlich davon ausgegangen werden, dass der inhibitorische Effekt von IBMX wahrscheinlich zelltypspezifisch für das kleinzellige Bronchialkarzinom ist.

Eine weitere Korrelation scheint es zwischen dem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und der Proliferationshemmung für das maligne Glioblastom zu geben [Chen *et al.*, 1998].

Martinez-Velazquez [2007] bestätigte die Rolle von cAMP als Modulator der Apoptose in Tumorzellen. *In vivo*-Experimente am Lewis Lungenkrebs konnten eine Wachstums- hemmung durch die Gabe von IBMX (2,5-20mg/kg Körpergewicht) belegen. Ab einer Dosis von 5mg/kg konnte die Anzahl der Tumore in der Lunge der Kontrollgruppe gegenüber reduziert werden. Erhöhte sich die Medikamentierung auf 20 mg/kg zweimal täglich lag bei 60% der Tiere nach 21 Tagen eine Tumorremission vor, ohne dass toxische Anzeichen vorlagen [Janik *et al.*, 1980].

5.3 Phosphodiesterase-5-Hemmer

Die multidrug Resistance (MDR) wird als Hauptursache für das Versagen einer Chemotherapie angesehen. Einer der wichtigsten Faktoren der MDR ist die vermehrte Expression von ABC-Transportern (ATP binding cassette-Transporter). Hierzu zählen ABCB1 (P-glycoprotein / MDR1), ABCCs [multidrug resistance associated proteins (MRP)] und ABCG2 (BCRP / MXR / ABCP) [Scakács *et al.*, 2006]. Membranproteine dieser Familie sind in der Lage, Substrate durch die Zellmembran zu transportieren. Werden diese Proteine in Tumorzellen vermehrt exprimiert, pumpen sie die Chemotherapeutika aus der Zelle heraus, so dass die intrazelluläre Chemotherapeutika-Konzentration abnimmt und der chemotherapeutische Effekt reduziert wird [Ambudkar *et al.*, 2003]. Idealerweise führt die Inhibition dieser Transporter zu einer Resensibilisierung der MDR-Krebszellen gegenüber den Chemotherapeutika.

Sildenafil und Vardenafil, Inhibitoren der cyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) spezifischen Phosphodiesterase Typ 5 (PDE5), werden klinisch zur Therapie der erektilen Dysfunktion und zur Behandlung der arteriellen Hypertonie verwendet. Sildenafil und Vardenafil binden an die PDE5 und unterdrücken damit die Umwandlung der second messenger 3',5'-cGMP zu 5-GMP, so dass die intrazelluläre cGMP-Konzentration ansteigt.

Sildenafil erhöht den therapeutischen Effekt der Chemotherapeutika zum einen durch Blockade der MDR-Transporter, wie ABCC4/MRP4 [Chen *et al.*, 2001], ABBC5/MRP5 [Jedlitschky *et al.*, 2000] ABCB1/P-gp und ABCG2/BCRP [Shi *et al.*, 2011], und zum anderen durch die Inhibition der PDE5 und dem ABBC4- und ABCC5 vermittelten Ausstrom von cGMP [Ambudkar *et al.*, 2003]. Es wird vermutet, dass die Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration die Proteinkinase G (PKG) aktiviert, die das Tumorzellwachstum unterdrückt oder die Apoptose induziert [Das *et al.*, 2010, Tinsley *et al.*, 2009].

Für verschiedene Tumorentitäten wie das Mammakarzinom [Pusztai *et al.*, 2003], das Harnblasenkarzinom [Piazza *et al.*, 2001], das Kolonkarzinom und für das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom [Whitehead *et al.*, 2003] wurde bereits eine vermehrte PDE5-Expression nachgewiesen. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die PDE5-Inhibition zu antineoplastischen Effekten führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals der Einfluss von Sildenafil und Vardenafil auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 dargestellt werden. Die Behandlung der H69-Zellen mit Sildenafil hatte keine signifikanten Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten. Mit einer Sildenafilkonzentration von 500 µM konnte das Zellwachstum nur um 8,41% reduziert werden (Abbildung 4.1d). Die H82-Zellen reagierten gegenüber Sildenafil viel sensibler als die Zelllinie H69. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die Zelllinie H82 ab einer Sildenafilkonzentration von 125 µM signifikant in ihrer Proliferation gehemmt wird. Bei Sildenafilkonzentrationen von 250 µM und 500 µM wurde allerdings keine weitere Steigerung der Proliferationshemmung erreicht (Abbildung 4.5d).

Für die Behandlung mit Vardenafil zeigten die eigenen Untersuchungen einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die untersuchten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien. Allerdings gab es Unterschiede in der Sensitivität der einzelnen Zelllinien gegenüber Vardenafil. Während die Zelllinie H82 hochsignifikant auf die Behandlung mit Vardenafil reagierte, war die Zelllinie H69 weniger sensibel. Die

Proliferation der H82-Zellen wird bei einer Vardenafilkonzentration von 125 μM um 63,31% gehemmt. Weitere Konzentrationssteigerungen resultieren in einer Reduktion der Proliferationshemmung (Abbildung 4.5e). Während das Wachstum der H69-Zellen mit Vardenafilkonzentrationen von 125 μM und 250 μM um etwa 20% gehemmt wird, kann diese Wachstumsinhibition mit einer Konzentration von 500 μM auf ca. 40% gesteigert werden (Abbildung 4.1e).

Der Einfluss von Sildenafil und Vardenafil auf die Proliferation des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist bisher nicht untersucht worden.

Allerdings konnten Sarfati *et al.* [2003] das Tumorwachstum von B-Zell chronisch lymphatischen Leukämie-Zellen (B-CLL) durch die Behandlung mit Sildenafil und Vardenafil unterdrücken und eine Apoptose *in vitro* induzieren. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Caspase 3 verantwortlich für diese durch PDE5-Hemmer induzierte Apoptose ist. Auffällig war, dass Vardenafil annähernd drei mal wirksamer war die Apoptose der B-CLL Zellen einzuleiten als Sildenafil.

In einer weiteren Studie konnten die PDE5-Inhibitoren Sildenafil und Vardenafil den Transport von Doxorubicin durch die Blut-Hirn-Schranke bei einem Gehirntumormodell der Ratte verbessern und damit die Effektivität der Chemotherapie erhöhen. Auch in dieser Studie wies Vardenafil stärkere Effekte auf das Tumorwachstum auf als Sildenafil [Black *et al.*, 2008]. Sie reflektiert die stärkere Wirksamkeit von Vardenafil, wie sie auch in einer vorangegangenen Studie beschrieben wurde [Corbin *et al.*, 2004].

Auch für Brustkrebszellen konnte die Sensitivität gegenüber Doxorubicin durch Sildenafil gesteigert werden, ohne dass deren Toxizität auf Knochenmarkszellen oder Makrophagen verschärft wurde [Di *et al.*, 2010]. *In vivo* konnte dieser Effekt auch für das Prostatakarzinom nachgewiesen werden [Das *et al.*, 2010]. Weiterhin haben Serafini *et al.* [2006] nachgewiesen, dass Sildenafil die tumorinduzierte Immunsuppression rückgängig macht und somit zu einer Verzögerung des Tumorwachstums führt.

Li *et al.* [2002] konnten für Exisulind, ein PDE5-Inhibitor, eine Aktivierung der Proteinkinase K und eine Phosphorylierung von β -Catenin nachweisen, die zu einer Apoptose und zur Inhibierung der Zellproliferation für Zellen des Kolonkarzinoms führten. In Kombination mit Celecoxib, einem Inhibitor der Cyclooxygenase 2 (COX-2), verhindert Exisulind die Karzinogenese des Prostatakarzinoms [Narayanan *et al.*, 2007].

Zwischenfazit I:

Insgesamt ist zu verzeichnen, dass die Zelllinie H82 sensitiver auf die Behandlung mit Indometacin, Meloxicam, Sildenafil und Vardenafil reagiert als die Zelllinie H69. Möglicherweise kann dies mit einer gesteigerten Wachstumsrate der H82-Zellen im Vergleich mit klassischen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien erklärt werden [Luk *et al.*, 1982; Mabry *et al.*, 1988]. Als Ursache vermuten Gazdar *et al.* [1985] eine vermehrte Expression des Protoonkogens c-myc, das bei der Gruppe von morphologisch varianten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien wie H82 zu finden ist. Die Zelllinie H69 gehört zu den klassischen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien, in denen keine vermehrte c-myc-Expression nachgewiesen werden konnte [Mabry *et al.*, 1988].

Um die molekularen und physiologischen Mechanismen, die zur beobachteten Wachstumsinhibition führen, aufzuklären, bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen.

5.4 Kombinationseffekte

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der kombinierte Effekt von Sildenafil und Indometacin auf das kleinzellige Bronchialkarzinom demonstriert werden (Tabelle 5.2), weshalb die Daten nicht mit aktueller Literatur verglichen werden können. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit Sildenafil und Indometacin auf die untersuchten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien einen signifikant inhibitorischen Effekt hatte, wobei die Zelllinien Unterschiede in der Sensitivität aufwiesen.

Die Zelllinie H69 reagiert tendenziell etwas weniger sensibel als die Zelllinie H82 auf die Behandlung mit Sildenafil und Indometacin. Bei der kleinsten Sildenafil / Indometacin-Konzentration [125 μ M / 50 μ M] wurde die H69-Zellen signifikant um etwa 35% gehemmt (Abbildung 4.2), während die H82-Zellen um etwa 90% in ihre Proliferation inhibiert wurde (Abbildung 4.6). Durch die simultane Behandlung der H69-Zellen mit Sildenafil und Indometacin wird das Zellwachstum um etwa 30% stärker gehemmt als bei der Einzelbehandlung mit Indometacin, wobei die Sildenafilkonzentration keinen entscheidenden Einfluss auf das Proliferationsverhalten zeigt.

Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals der kombinatorische Effekt von Sildenafil und Meloxicam auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 belegt werden (Tabelle 5.2). Hierbei zeigte sich, dass die H82-Zellen etwas empfindlicher auf die Kombination der beiden Wirkstoffe reagieren als die H69-Zellen. Der größte inhibitorische Effekt wurde für die Behandlung der H82-Zellen mit der Sildenafil /

Meloxicam-Konzentration [250 μ M / 200 μ M] erzielt. Die Zellproliferation konnte auf etwa 10% gegenüber der Kontrolle reduziert werden (Abbildung 4.7). Zu erwähnen ist, dass in allen verwendeten Sildenafil / Meloxicam-Konzentrationen signifikante bis hochsignifikante wachstumshemmende Effekte der H82-Zellen erreicht wurden. Das Proliferationsverhalten der H69-Zellen verhielt sich in Abhängigkeit zur Meloxicam-Konzentration. Je höher die Konzentration, desto höher die Wachstumsinhibition. Der maximale inhibitorische Effekt konnte mit der höchsten Meloxicam-Konzentration von 200 μ M nachgewiesen werden. Das Zellwachstum wurde in Kombination mit allen Sildenafilkonzentrationen [125 μ M, 250 μ M, 500 μ M] um knapp 70% gehemmt (Abbildung 4.3). Gegenüber der Einzelbehandlung mit Meloxicam konnte die Proliferation der H69-Zellen durch die Zugabe von Sildenafil um weitere 30% reduziert werden.

	H69	H82
Sildenafil / Indometacin	↓125 μ M / 50 μ M *** ↓125 μ M / 100 μ M *** ↓125 μ M / 200 μ M *** ↓250 μ M / 50 μ M *** ↓250 μ M / 100 μ M *** ↓250 μ M / 200 μ M *** ↓500 μ M / 50 μ M *** ↓500 μ M / 100 μ M *** ↓500 μ M / 200 μ M ***	↓125 μ M / 50 μ M *** ↓125 μ M / 100 μ M *** ↓125 μ M / 200 μ M *** ↓250 μ M / 50 μ M *** ↓250 μ M / 100 μ M *** ↓250 μ M / 200 μ M *** ↓500 μ M / 50 μ M *** ↓500 μ M / 100 μ M *** ↓500 μ M / 200 μ M ***
Sildenafil / Meloxicam	↓125 μ M / 50 μ M *** ↓125 μ M / 100 μ M *** ↓125 μ M / 200 μ M *** ↓250 μ M / 50 μ M *** ↓250 μ M / 100 μ M *** ↓250 μ M / 200 μ M ***	↓125 μ M / 50 μ M *** ↓125 μ M / 100 μ M *** ↓125 μ M / 200 μ M *** ↓250 μ M / 50 μ M *** ↓250 μ M / 100 μ M *** ↓250 μ M / 200 μ M ***

↓500µM / 50µM ***	↓500µM / 50µM ***
↓500µM / 100µM ***	↓500µM / 100µM ***
↓500µM / 200µM ***	↓500µM / 200µM ***

Tabelle 5.2 Zusammenfassende Darstellung über die Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien mit Sildenafil und Indometacin sowie Sildenafil und Meloxicam in Kombination. Gezeigt sind die Konzentrationen von Sildenafil [125 µM – 500 µM], Indometacin [50 µM – 200 µM] und Meloxicam [50 µM – 200 µM], die einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt (↓) auf die Zelllinien H69 und H82 hatten. (***) = $p < 0,001$

Diese Resultate können nicht mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen werden, da die Kombination von Sildenafil und Meloxicam bisher auch noch nicht auf das kleinzellige Bronchialkarzinom getestet wurde. Allerdings konnten Narayanan *et al.* [2007] in *in vivo* Experimenten nachweisen, dass die Kombination aus Exisulind, ein PDE5-Inhibitor, und Celecoxib, ein COX 2-Inhibitor, die Karzinogenese des Prostatakarzinoms hemmt.

Da die Proliferation der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 bei der Behandlung mit Sildenafil und Indometacin bzw. Sildenafil und Meloxicam in stärkerem Ausmaß gehemmt wird als bei der Einzelbehandlung mit Sildenafil, Indometacin oder Meloxicam, kann angenommen werden dass sich die antiproliferativen Effekte der Medikamente addieren. Außerdem kann die Vermutung angestellt werden, dass Sildenafil durch die Blockade der MDR-Transporter den Ausstrom der NSAR Indometacin und Meloxicam aus den Tumorzellen verhindert und die Medikamente dadurch eine bessere Wirkung entfalten können. Um diese Vermutungen zu festigen, müssen weitere molekulare Untersuchungen angeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch erstmals der kombinierte Effekt von IBMX und Meloxicam auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 demonstriert werden (Tabelle 5.3). Da noch keine Tumorentität mit dieser Kombination von Medikamenten behandelt wurde, können die Daten nicht mit aktueller Literatur verglichen werden. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass die Zellproliferation der Zelllinien H69 und H82 durch die Behandlung mit IBMX und Meloxicam weitgehend im gleichen Ausmaß gehemmt wird und die Hemmung des Zellwachstums als signifikant bis hochsignifikant einzustufen ist. Gegenüber der Einzelbehandlung mit IBMX oder Meloxicam ist die Proliferationsinhibition gesteigert. Die proliferationsinhibierenden

Effekte von IBMX und Meloxicam verstärken sich, wobei das Ausmaß der Zellwachstumsinhibition von den IBMX- und Meloxicamkonzentrationen abhängig ist. Je höher die Konzentrationen, desto höher die Proliferationshemmung. Die stärkste Inhibition von etwa 80% liegt bei einer IBMX / Meloxicam-Konzentration von 500 μM / 200 μM vor (Abbildung 4.4, Abbildung 4.8). Diese Ergebnisse sind vielversprechend, reichen aber nicht an die von Lange *et al.* [2011] gezeigte Proliferationshemmung der mit IBMX und Indometacin behandelten H82-Zellen heran. Die Arbeitsgruppe konnte die Proliferation der H82-Zellen mit einer IBMX / Indometacin-Konzentration von 500 μM / 200 μM auf etwa 5% reduzieren.

	H69	H82
IBMX/Meloxicam	↓ 125 μM / 50 μM ***	↓ 125 μM / 50 μM ***
	↓ 125 μM / 100 μM ***	↓ 125 μM / 100 μM ***
	↓ 125 μM / 200 μM ***	↓ 125 μM / 200 μM ***
	↓ 250 μM / 50 μM ***	↓ 250 μM / 50 μM ***
	↓ 250 μM / 100 μM ***	↓ 250 μM / 100 μM ***
	↓ 250 μM / 200 μM ***	↓ 250 μM / 200 μM ***
	↓ 500 μM / 50 μM ***	↓ 500 μM / 50 μM ***
	↓ 500 μM / 100 μM ***	↓ 500 μM / 100 μM ***
	↓ 500 μM / 200 μM ***	↓ 500 μM / 200 μM ***

Tabelle 5.3 Zusammenfassende Darstellung über die Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien mit IBMX und Meloxicam in Kombination. Gezeigt sind die Konzentrationen von IBMX [125 μM – 500 μM] und Meloxicam [50 μM – 200 μM], die einen signifikanten proliferationshemmenden Effekt (↓) auf die Zelllinien H69 und H82 hatten. (***) = $p < 0,001$

Zwischenfazit II:

Zusammengefasst haben die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergeben, dass die Einzelbehandlung der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 mit Indometacin, Meloxicam, IBMX und Vardenafil eine ausgezeichnete proliferationshemmende Wirkung *in vitro* hatte. Auf die Zelllinie H82 hatte auch der PDE5-Inhibitor Sildenafil hervorragende proliferationsinhibitorische Effekte *in vitro*. Die *in vitro* Behandlung der Zelllinien H69 und H82 mit einer Kombination aus Sildenafil und Indometacin, Sildenafil und Meloxicam oder IBMX und Meloxicam lassen noch vielversprechendere Ergebnisse für neue Ansätze in der Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) erwarten. Aufgrund der guten Resultate sollten *in vivo*-Experimente folgen, um das toxische Verhalten und eventuelle Nebenwirkungen der Medikamente zu analysieren und die Wirkung auf das Primärtumorgewicht und das Metastasierungsverhalten des kleinzelligen Bronchialkarzinoms festzustellen.

6 Zusammenfassung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist ein Malignom der Lunge, das durch ein schnelles Wachstum gekennzeichnet ist und zu einer frühen Metastasierung neigt. Initial spricht es gut auf konventionelle Chemotherapeutika an, bildet bei Rezidivbildung aber meist eine Chemoresistenz aus, so dass die Überlebensdauer der Betroffenen im fortgeschrittenen Stadium (extensive disease, ED) im Mittel nur 8-13 Monate beträgt. Daher ist es dringend erforderlich nach neuen Therapieansätzen zu suchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Indometacin, Meloxicam, IBMX, Sildenafil und Vardenafil allein und in Kombination auf die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69 und H82 *in vitro* zu testen und das Proliferationsverhalten der Zellen zu untersuchen. Die Proliferationsuntersuchungen zeigten, dass Indometacin, Meloxicam, IBMX und Vardenafil wachstumsinhibierend auf die Zelllinien H69 und H82 wirkten. Sildenafil zeigte nur auf die H82-Zellen einen proliferationshemmenden Effekt. Insgesamt war zu verzeichnen, dass die Zelllinie H82 sensibler auf die Untersuchungen reagierte als die Zelllinie H69. Durch Kombination der Medikamente konnten die antiproliferativen Effekte auf beide Zelllinien gesteigert werden. Für die Kombination aus einem PDE5-Inhibitor und einem NSAID konnten signifikante antiproliferative Effekte nachgewiesen werden. Dabei war die Kombination aus Sildenafil und Indometacin effektiver als die Kombination aus Sildenafil und Meloxicam.

Auch die Kombination von IBMX und Meloxicam zeigte eine vielversprechende Proliferationsinhibition auf kleinzellige Bronchialkarzinomzellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass das Proliferationsverhalten von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen durch die Behandlung mit Sildenafil und Vardenafil sowie durch die Kombination von Sildenafil / Indometacin, Sildenafil / Meloxicam und IBMX / Meloxicam *in vitro* inhibiert werden kann. Daher stellen die Behandlung mit PDE5-Inhibitoren, die Kombinationsbehandlung eines PDE5-Inhibitors (Sildenafil) mit einem NSAID (Indometacin, Meloxicam) sowie die Kombinationsbehandlung mit IBMX und Meloxicam möglicherweise die Grundlage eines vielversprechenden neuen Therapieansatzes dar.

7 Literaturverzeichnis

- Abrams J, Doyle LA, Aisner J (1988). Staging, prognostic factors and special considerations in small cell lung cancer. *Semin Oncol*; 15:261-277.
- Agudo A, Ahrens W, Benhamou E *et al.* (2000). Lung cancer and cigarette smoking in women: a multicenter case-control study in Europe. *Int J Cancer*; 88:820-827.
- Alberg AJ, Samet JM (2003). Epidemiology of lung cancer. *Chest*; 123:21S.
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*; 22:7468-7485.
- Arber N, Eagle CJ, Spicak J *et al.* (2006). Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med*; 355:885-895.
- Arriagada R, Le Chavilier T, Pignon JP *et al.* (1993). Initial Chemotherapeutic doses and survival in patients with limited small cell lung cancer. *N Engl J Med*; 329:1848-1852.
- Arriagada R, Le Chevalier T, Riviere A *et al.* (2002). Patterns of failure after prophylactic cranial irradiation in small-cell lung cancer: analysis of 505 randomized patients. *Ann Oncol*; 13:748-754.
- Auperin A, Arriagada R, Pignon JP *et al.* (1999). Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation overview Collaborative Group. *N-Engl-J-Med*; 341(7): 476-487.
- Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ, Mukherjee P (2004). Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res*; 2:632-642.
- Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S *et al.* (2008). Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. Überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2008.
- Bazhin AV, Savchenko MS, Shifrina ON, Demoura SA, Chikina SY, Jaques G, Kogan EA, Chuchalin AG, Philippov PP (2004). Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer: the occurrence of anti-recoverin autoantibodies in sera and recoverin in tumors. *Lung Cancer*; 44:193-198.
- Black KL, Yin D, Ong JM, Konda BM, Wang X *et al.* (2008). PDE5 inhibitors enhance tumor permeability and efficacy of chemotherapy in a brain tumor model. *Brain Res*; 1230:290-302.
- Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ *et al.* (1996). Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res*; 8:47-52.
- Bradley JD, Dehdashti F, Mintun MA, Govindan R, Trinkaus K, Siegel BA (2004). Positron Emission Tomography in Limited Stage Small-Cell Lung Cancer: A prospective Study. *Journal of Clinical Oncology*; 22:3248-3254.

- Brock MV, Kooker CM, Syphard JE *et al.* (2005). Surgical resection of limited disease small cell lung cancer in the new era of platinum chemotherapy: Its time has come. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 129:64-72.
- Brown JR, DuBois RN (2004). Cyclooxygenase as a target in lung cancer. *Clin Cancer Res*; 10:4266s-4269s.
- Bunn P, Cohen M, Ihde DC *et al.* (1977). Advances in small cell bronchogenic carcinoma. *Cancer Treat Rep*; 61:333-42.
- Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD (1985). Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res*; 45:2913-23.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic / antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99:13926-13931.
- Chen L, Zhang JJ, Huang X (2008). cAMP Inhibits Cell Migration by Interfering with Rac-induced Lamellipodium Formation. *J Biol Chem*; 283(20): 13799-13805.
- Chen TC, Hinton DR, Zidovetzki R, Hofman FM (1998). Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest*; 78:165-74.
- Chen ZS, Lee K, Kruh GD (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem*; 276:33747-33754.
- Chiu LC, Tong KF, Ooi VE (2005). Cytostatic and cytotoxic effects of cyclooxygenase inhibitors and their synergy with docosahexaenoic acid on the growth of human skin melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother*; 59 Suppl 2:293-297.
- Chua YJ, Steer C, Yip D (2004). Recent advances in management of small cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*; 30:521-543.
- Corbin JD, Basely A, Blount MA, Francis SH (2004). Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). *Neurochem Int*; 45:859-863.
- Croffod LJ (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl*; 19:15-19.
- Crumpton TL, Seidler FJ, Slotkin TA (2001). Generation of reactive oxygen species by xanthine derivatives in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*; 66:143-146.
- Das A, Durrant D, Mitchell C, Mayton E, Hoke NN, Salloum FN *et al.* (2010). Sildenafil increases chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in prostate cancer and ameliorates cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*; 107:18202-18207.

- De Groot DJ, Timmer T, Spierings DC, Le TK, de Jong S, de Vries EG (2005). Indomethacin-induced activation of the death receptor-mediated apoptosis pathway circumvents acquired doxorubicin resistance in SCLC cells. *Br J Cancer*; 92:1459-1466.
- De Groot DJ, van der Deen M, Le TK, Regeling A, de Jong S, de Vries EG (2007). Indomethacin induces apoptosis via a MRP1-dependent mechanism in doxorubicin-resistant small-cell lung cancer cells overexpressing MRP1. *Br J Cancer* ;97:1077-1083.
- De Groot DJA, de Vries EGE, Groen HJM, de Jong S (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: From lab to clinic. *Oncology / Hematology*; 61:52-69.
- De Ruyscher D, Pijls-Johannesma M, Vansteenkiste J, Kester A, Rutten I, Lambin P (2006). Systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials of the timing of chest radiotherapy in patients with limited-stage, small cell lung cancer. *Ann Oncol*; 17:543-552.
- De Ruyscher D, Pijls-Johannesma M, Bentzen SM *et al.* (2006). Time between the first day of chemotherapy and the last day of chest radiation in the most important predictor of survival in limited-disease small cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 24:1057-1063.
- Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT (2010). The new lung cancer staging system. *Chest*; 136(1):260-271.
- Di X, Gennings C, Bear HD, Grahame LJ, Sheth CM, White KL Jr *et al.* (2010). Influence of the phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil, on sensitivity to chemotherapy in breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat*; 124:349-360.
- Draper MP, Martell RL, Levy SB (1997). Indomethacin-mediated reversal of multidrug resistance and drug efflux in human and murine cell lines overexpressing MRP, but not P-glycoprotein. *BR J Cancer*; 75:810-815.
- DuBois RN, Radhika A, Reddy RS, Entigh AJ (1996). Increased Cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology*; 110:1259-1262.
- Eckardt JR, von Pawel J, Pujol JL *et al.* (2007). Phase III study of oral compared with intravenous topotecan as second-line therapy in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25:2086-2092.
- Einhorn LH, Loehrer PJ (1995): Hoosier Oncology Group studies in extensive and recurrent small cell lung cancer. *Semin Oncol*; 22 (suppl 2):28-31.
- Eli Y, Przedecki F, Levin G, Kariv N, Raz A (2001). Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*; 61:565-571.
- Ermert L, Dierkes C, Ermert M (2003). Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors. *Clin Cancer Res*. 9:1604-1610.
- Erren TC, Jacobsen M, Piekarski C (1999). Synergy between asbestos and smoking on lung cancer risk. *Epidemiology*; 10:405-411.

- Firmino AAP, Ulhoa CJ, Sousa MV, Filho EXF, Ricart CAO (2002). Involvement of G Proteins and cAMP in the Production of Chitinolytic Enzymes by *Trichoderma harzianum*. *Braz J Microbiol*; 33:169-173.
- Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, Minna JD (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res*; 45:2924-2930.
- Gazdar AF, Minna JD (1996). NCI series of cell lines: an historical Perspective. *J Cell Biochem Suppl*; 24:1-11.
- Gazdar AF, Carney DN, Russel EK, Sims HL, Baylin SB, Bunn PA, Guccion JG, Minna JD (1980). Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Research*; 40:3502-3507.
- Ghofrani HA, Grimminger F (2006). Treatment of pulmonary arterial hypertension: phosphodiesterase-5 inhibitors. *Dtsch Med Wochenschr*; 131:S311-S314.
- Glisson (2003). Recurrent small cell lung cancer: update. *Semin Oncol*; 30:72-78.
- Goeckenjan G *et al.* (2010). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie*; 64(Suppl 2):e1-e164.
- Goldman AP, Williams CS, Sheng H, Lamps LW, Williams VP, Pariet M, Morrow JD, Du Bois RN (1998). Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*; 19:2195-2199.
- Gould MK, Kuschner WG, Rydzak CE *et al.* (2003). Test performance of positron emission tomography and computed tomography for mediastinal staging in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann Intern Med*; 139:879-89.
- Green R, Humphrey E, Close H, Patno ME (1969). Alkylating agents in bronchogenic carcinoma. *American Journal of Medicine*; 46:516-525.
- Gruber C, Stieber P, Reinmiedl J, Hatz R, Nagel D, Seidel D (2003). The combined determination of CEA, CYFRA 21-1, NSE and ProGRP enables diagnosis of lung cancer. *Tum Biol*; 24 (S1):93.
- Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H (2000). Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *The Prostate*; 42:73-78.
- Hanagiri T, Sugio K, Kaba T *et al.* (2009). Results of surgical treatment for patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*; 4:964-968.
- Hammerschmidt S, Wirtz H (2009). Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*; 106(49):809-20.
- Hanna N, Bunn PA Jr, Langer C *et al.* (2006). Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 24:2038-2043.

- Hanna NH, Einhorn LH (2002). Small-cell lung cancer: state of the art. *Clin Lung Cancer* 4(2):87-94.
- Herdegen T (2008). Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie. 1. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 297
- Hoffmann H, Dienemann H (2000). Der pulmonale Rundherd- Prinzipien der Diagnostik. *Deutsches Ärzteblatt*; 16:907-912.
- Hull A, Gardner SH, Hawcroft G (2003). Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*; 29:309-320.
- Hurwitza JLB, McCoya F, Scullin P *et al.* (2009). New advances in the second-line treatment of small cell lung cancer. *The Oncologist*; 14(10):986-994.
- Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A *et al.* (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006.Häufigkeiten und Trends. 7. Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2010.
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine F (1998). Expression of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*; 90:455-460.
- Janik P, Assaf A, Bertram JS (1980). Inhibition of growth of primary and metastatic Lewis lung carcinoma cells by the phosphodiesterase inhibitor isobutylmethylxanthine. *Cancer Res*; 40:1950-1954.
- Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D (2000). The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem*; 275:30069-30074.
- Jemal A, Murray T, Ward E *et al.* (2005). Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55(1):10-30.
- Jojović M, Adam E, Zangenmeister-Wittke U, Schumacher U (1998). Epithelial glycoprotein-2 expression is subject to regulatory process in epithelial-mesenchymal transitions during metastases: an investigation of human cancers transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Histochem J*; 30:723-729.
- Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Beavo JA (1999). Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; 135:67-104.
- Kaiser F, Engelhardt M, Rawluk J, Mertelsmann R, Passlick B, Wäsch R (2011). Aktuelle Therapiekonzepte des Lungenkarzinoms. *Dtsch Med Wochenschriften*; 136:1901-1906
- Karow T, Lang-Roth R (2011): Allgemeine und spezielle Pharmakologie. Thomas Karow-Verlag, Pulheim. 19. Auflage. 534-535.
- Khuder SA, Mutgi AB (2001). Effect of smoking cessation on major histologic types of lung cancer. *Chest*; 120:1577-1583.
- Kimura T, Shinzoh K, Kazuto H (2011). Review of the Management of Relapsed Small-Cell Lung Cancer with Amrubicin Hydrochloride. *Clinical Medicine Insights: Oncology*; 5:23-34.

- Lala PK, Al-Mutter N, Orucevic A (1997). Effects of chronic indomethacin therapy on the development and progression of spontaneous mammary tumors in C3H/HEJ mice. *Int J Cancer*; 73:371-380.
- Lally BE, Urbanic JJ, Blackstock AW, Miller AA, Perry MC (2007). Small cell lung cancer: have we made any progress over the last 25 years? *Oncologist*; 12:1096- 1104.
- Lange A, Gustke H, Glassmeier G, Heine M, Zangemeister-Wittke U, Schwarz JR, Schumacher U, Lange T (2011). Neuronal differentiation by indomethacin and IBMX inhibits proliferation of small cell lung cancer cell in vitro. *Lung Cancer*; 74:178-187.
- Lee DW, Sung MW, Park SW, Seong WJ, Roh JL, Park B, Heo DS, Kim KH (2002). Increased cyclooxygenase-2 expression in human squamous cell carcinomas of the head and neck and inhibition of proliferation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Anticancer Res*; 22:2089-2096.
- Levy GN (1997). Prostaglandin H synthases non-steroidal anti-inflammatory drugs and colon cancer. *FASEB J.*; 11:234-247.
- Li H, Liu L, David ML, Whitehead CM, Chen M, Fetter JR, Sperl GJ, Pamukcu R, Thompson WJ (2002). Pro-apoptotic actions of exisulind and CP461 in SW480 colon tumor cells involve beta-catenin and cyclin D1 down-regulation. *Biochem Pharmacol*; 64:1325-1336.
- Liu L, Li L, Underwood T, Lloyd M, David M, Sperl G, Pamukcu R, Thompson WJ (2001). Cyclic GMP-dependent protein kinase activation and induction by exisulind and CP461 in colon tumor cells. *J Pharmacol.Exp.Ther.*; 299:583-592.
- Luk GD, Goodwin G, Gazdar AF, Baylin SB (1982). Growth-inhibitory effects of DL-alpha-difluoromethylornithine in the spectrum of human lung carcinoma cells in culture. *Cancer Res.* 42:3070-3073.
- Mabry M, Nakagawa T, Nelkin BD, McDowell E, Gesell M, Eggleston JC, Casero RA Jr, Baylin SB (1988). v-Ha-ras oncogene insertion: a model for tumor progression of human small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6523-6527.
- Maruno K, Absood A, Said SI (1998). Vasoactive intestinal peptide inhibits human small-cell lung cancer proliferation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:14373-14378.
- Martinez-Velazquez M, Melendez-Zajgla J, and Maldonado V (2007). Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional upregulation. *Cell Signal*; 19:1212-1220.
- Meert AP, Paesmans M, Berghmans T, Martin B, Mascaux C, Vallot F, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP (2001). Prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *BMC Cancer*; 1:5.
- Michel CC (1998). Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at mikrovascular permeability. *J Moll Cell Cardiol*; 30:2541-2546.
- Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayashi O (1976). Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *Biol Chem*; 251:2629-2636.

- Molina MA, Sitia-Arnau M, Lemoine MG, Frazier MI, Sinicrone FA (1999). Increase Cyclooxygenase-2 expression is upregulated in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res*; 59:4356-4362.
- Montorsi F, Briganti A, Saloni A, Montorsi P, Rigatti P (2004). The use of phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *Curr Opin Urol*; 14:357-359.
- Montorsi F, Padma-Nathan H, Buvat J, Schwaibold H, Beneke M, Ulbrich E, Bandel TJ, Porst H (2004). Earliest Time to Onset of Action Leading To Successful Sexual Intercourse with Vardenafil Determined in an At-Home Setting: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J. Sex Med*; 1:168-178.
- Murray N, Turrisi AT (2006). A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*; 1:270-278.
- Nagel E (2008). Die Wirkung von Statinen und Ionenkanalblockern auf kleinzellige Bronchialkarzinomzellen in vitro. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.
- Narayanan BA *et al.* (2007). Exisulind in combination with celecoxib modulates epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase-2, and cyclin D1 against prostate carcinogenesis: in vivo evidence. *Clin Cancer Res*; 13:5965-5973.
- Naruse T, Nishida Y, Hosono K, Ishiguro N (2006). Meloxicam inhibits osteosarcoma growth, invasiveness and metastasis by COX-2-dependent and independent routes. *Carcinogenesis*; 27(3):584-592.
- Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M *et al.* (2002). Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small cell lung cancer. *N Engl J Med*; 346:85-91.
- Noguchi M, Rose DP, Earashi M, Miyazaki I (1995). The role of fatty acids and eicosanoid synthesis inhibitors in breast carcinoma. *Oncology*; 52:265-271.
- Parson WJ, Ramkumar V, Stiles GL (1988). Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, G_i. *Molecular Pharmacology*; 34:37-41.
- Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, Cordon-Cardo C, Thaler HAT, Dannenberg AJ (2005). Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res*; 11:1999-2007.
- Peto R (1986). Influence of dose and duration of smoking on lung cancer rates. *IARC Sci Publ* 1; 47:23-33.
- Piazza GA *et al.* (2001). Exisulind, a novel proapoptotic drug, inhibits drug urinary bladder tumorigenesis. *Cancer Res*; 61:3961-3968.
- Pignon Jp, Arrigada R, Ihde DC *et al.* (1992). A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small cell lung cancer. *N Engl J Med*; 327:1618-1624.
- Pusztai L *et al.* (2003). Phase I and II study of exisulind in combination with capecitabine in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*; 21:3454-3461.
- Quidville V, Segond N, Pidoux E, Cohen R, Jullienne A, Lausson S (2004). Tumor growth inhibition by indomethacin in a mouse model of human medullary thyroid cancer:

implication of cyclooxygenase and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Endocrinology* 145:2561-2571.

Quidville V, Segond N, Pidoux E, Cohen R, Lausson AJ, Lausson S (2004). Tumor Growth Inhibition by Indomethacin in a Mouse Model of Human Medullary Thyroid Cancer: Implication of Cyclooxygenases and 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase. *Cancer*; 145(5):2561-2571.

Robert Koch-Institut (Hrsg.) (2010). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin.

Roller A, Bahr OR, Streffer J, Winter S, Heneka M, Deininger M, Meyermann R, Naumann U, Gulbins E, Weller M (1999). Selective potentiation of drug cytotoxicity by NSAID in human glioma cells: the role of COX-1 and MRP. *Biochem Biophys Res Commun*; 259:600-605.

Sambrook RJ, Girling DJ (2001). A national survey of the chemotherapy regimens used to treat small cell lung cancer (SCLC) in the United Kingdom. *Br J Cancer*; 84:1447-1452.

Saracci R, Boffetta P (1994). Interaction of tobacco smoking with other causes of lung cancer. In: Samet J (Ed). Epidemiology of lung cancer. *New York: Marcel Dekler Inc*; 465-493.

Sarfati M, Mateo V, Baudet S, Rubio M, Fernandez C, Davi F, Binet JL, Delic J, Merle-Beral H (2003). Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*; 101:265-269.

Scakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*; 5:219-234.

Schuller HM (2009). Is cancer triggered by altered signaling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer*; 9:195-205.

Sculier J, Klastersky J, Libert P *et al.* (1987). Cyclophosphamide, adriamycin, and vincristine (CAVi): an effective second-line chemotherapy regimen for small cell lung cancer (SCLC). *Proc Am Soc Clon Oncol*; 6:184.

Serafini P, Meckel K, Kelso M, Noonan K, Califano J, Koch W, Dolcetti L, Bronte V, Borello I (2006). Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of Experimental Medicine*; 203:2691-2702.

Shan L, Aster JC, Sklar J, Sunday ME (2007). Notch-1 regulates pulmonary neuroendocrine cell differentiation in cell lines and in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 292:L500-509.

Sharma SD, Meeran SM, Katiyar SK (2010). Proanthocyanidins Inhibit *in vitro* and *in vivo* Growth of human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting the Prostaglands E₂ and Prostaglandin E₂ Receptors. *Mol Cancer Ther*; 9:569-580.

- Sheperd FA, Evans WK, MacCormick R *et al.* (1987). Cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine in etoposide- and cisplatin resistant small cell lung cancer. *Cancer Treat Rep*; 71:941-944.
- Shi Z, Tiwari AK, Shukla S, Robey RW, Singh S, Kim IW *et al.* (2011). Sildenafil reverses ABCB1- and ABCG2-mediated chemotherapeutic drug resistance. *Cancer Res*; 71:3029-3041.
- Silvestri GA, Gould MK, Margolis ML *et al.* (2007). Noninvasive Staging of non-small cell lung cancer: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*; 132:178-201.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*; 56(3):387-437.
- Simon GR, Turrisi A (2007). Management of small cell lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*; 132: 324-339.
- Simon GR, Wagner H (2003). Small Cell Lung Cancer*. *Chest*; 123:259S-271S.
- Simonato L, Agudo A, Ahrens W *et al.* (2001). Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and assessment of inter-country heterogeneity. *Int J Cancer*; 91:876-887.
- Soh JW, Kazi JU, Li H, Thompson WJ, Weinstein IB (2008). Celecoxib-induced growth inhibition in SW480 colon cancer cells is associated with activation of protein kinase G. *Mol Carcinog*; 47:519-525.
- Sorensen M, Pijls-Johannesma M, Felip (2010). Small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*; 21 Suppl5:v120-125.
- Spira A, Ettinger DS (2004). Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med*; 350:379-392.
- Stark S, Sachse R, Liedl T, Hensen J, Rohde G *et al.* (2001). Vardenafil increases penile rigidity and tumescence in men with erectile dysfunction after a single oral dose. *Eur Urol*; 40:181-188; discussion 189-190.
- Sugita M, Black KL (1998). Cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibition and intracarotid bradykinin infusion enhances permeability into brain tumors. *Cancer Res*; 58:914-920.
- Taketo MM (1998). Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (partI). *J Natl Cancer Inst*; 90:1529-1536.
- Tegeder I, Neupert W, Gühring H, Geisslinger G (2000): Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoïd release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther*; 292:1161-1168.
- Tinsley HN, Gary BD, Keeton AB, Zhang W, Abadi AH, Reynolds RC *et al.* (2009). Sulindac sulfide selectively inhibits growth and induces apoptosis of human breast tumor cells by phosphodiesterase 5 inhibition, elevation of cyclic GMP, and activation of protein kinase G. *Mol Cancer Ther*; 8:3331-3340.

- Tomoda C, Moatamed F, Naeim F, Hershman JM, Sugawara M (2008). Indometacin inhibits Cell Growth of Medullary Thyroid Carcinoma by Reducing Cell Cycle Progression into S Phase. *Experimental Biology and Medicine*; 233:1433-1440.
- Tsubouchi Y, Mukai S, Kawahito Y, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Sano H (2000). Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.*; 20, 2867-2872.
- von Pawel J, Gatzemeier U, Pujol J *et al.* (2001). Phase II comparator study of oral versus intravenous topotecan in patients with chemosensitive small cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 19:1743-1749.
- von Pawel J, Schiller JH, Shepherd FA *et al.* (1999). Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 17:658-667.
- Wang HM, Zhang GY (2005). Indomethacin suppresses growth of colon cancer via inhibition of angiogenesis in vivo. *World J Gastroenterol*; 11:340-343.
- Warde P, Payne D (1992). Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage lung cancer carcinoma of the lungs? A meta-analysis. *J Clin Oncol*; 10:890-895.
- Whitehead CM *et al.* (2003). Exisulind-induced apoptosis in non small cell lung cancer orthotopic lung tumor model augments docetaxel treatment and contributes to increased survival. *Mol Cancer Ther*; 2:479-488.
- Wilkens H, Guth A, König J, Forestier N, Cremers B, Hennen B *et al.* (2001). Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*; 104:1218-1222.
- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Kariäläinen A, Vainio H, Ristimäki A (1998). Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res*; 58:4997-5001.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88:2692-2696.
- Xin B, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H (2007). Inhibitory effect of meloxicam, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, on the growth of human ovarian cancers. *Cancer*; 110(4):791-800.
- Xin B, Yokoyama Y, Shigeto T, Mizunuma H (2007). Anti-Tumor Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Human Ovarian Cancers. *Pathology Oncology Research*; 13(4):365-369.
- Yoshino I, Maehara Y (2007). Impact of smoking status on the biological behavior of lung cancer. *Surgery Today*; 37:725-734.
- Zangenmeister-Wittke U, Schenker T, Luedke GH, Stahel RA (1998). Synergistic cytotoxicity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer*; 78:1035-1042.

Zhong L, Goldberg MS, Parent M-E, Hanley JA (2000). Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*; 27:3-18.

Internetquellen:

ATTC

URL:

<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-119&Template=cellBiology> [Stand: 04.02.2012; 17:47 Uhr]

URL:

<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-175&Template=cellBiology>; [Stand: 04.02.2010; 17:48 Uhr]

DKFZ Deutsches Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst

URL:

<http://www.krebsinformation.de/tumorarten/lungenkrebs/risikofaktoren.php> [Stand: 30.01.2012; 11:27 Uhr]

National Cancer Institute, NCI

URL:

<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/small-cell-lung/healthprofessional/page1> [Stand: 03.01.2011; 17:40 Uhr]

Sigma Aldrich

URL:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i7378?lang=de®ion=DE> [Stand: 25.11.2012; 22:30 Uhr]

URL:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i5879?lang=de®ion=DE> [Stand: 25.11.2012; 22:39 Uhr]

URL:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/pz0003?lang=de®ion=DE>
[Stand: 25.11.2012; 22.58 Uhr]

Wikipedia

URL:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6e/Vardenafil.svg> [Stand:
25.11.2012; 22.42 Uhr]

8 Anhang

A H69-Zellen

A1 H69-Zellen mit Indometacin

Tab.8.1: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von Indometacin auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	22560	3	7519	38,78	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	13190	68	193,9		
gesamt	35740	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125/50	5,764		1,242	>0,050	
Kontrolle vs. 125/100	14,050		3,027	<0,050	
Kontrolle vs. 125/200	45,820		9,872	<0,001	
125/50 vs. 125/100	8,286		1,785	>0,050	
125/50 vs. 125/200	40,060		8,630	<0,001	
125/100 vs. 125/200	31,770		6,845	<0,001	

A2 H69-Zellen mit IBMX

Tab.8.2: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von IBMX auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	19510	3	6504	81,67	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	5416	68	79,64		
gesamt	24930	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125	5,828		1,959	>0,05	
Kontrolle vs. 250	21,150		7,109	<0,001	
Kontrolle vs. 500	42,570		14,310	<0,001	
125 vs. 250	15,320		5,150	<0,001	
125 vs. 500	36,740		12,350	<0,001	
250 vs. 500	21,420		7,200	<0,001	

A3 H69-Zellen mit Meloxicam

Tab.8.3: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von Meloxicam auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	12080	3	4027	81,41	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	3314	67	49,47		
gesamt	15400	70			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 50	2,948		1,239	>0,05	
Kontrolle vs. 100	12,960		5,530	<0,001	
Kontrolle vs. 200	33,200		14,160	<0,001	
50 vs. 100	10,020		4,211	<0,001	
50 vs. 200	30,250		12,720	<0,001	
100 vs. 200	20,240		8,632	<0,001	

A4 H69-Zellen mit Sildenafil

Tab.8.4: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von Sildenafil auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	777,6	3	259,2	4,94	0,0036
Innerhalb der Gruppen	3565	68	52,43		
gesamt	4343	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125	6,028		2,498	>0,05	
Kontrolle vs. 250	2,078		0.861	>0,05	
Kontrolle vs. 500	8,411		3,485	<0,01	
125 vs. 250	-3,951		1,637	>0,05	
125 vs. 500	2,383		0,987	>0,05	
250 vs. 500	6.333		2.624	>0.05	

A5 H69-Zellen mit Vardenafil

Tab.8.5: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von Vardenafil auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	14860	3	4955	21,61	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	15590	68	229,3		
gesamt	30450	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125	23,510		4,657	<0,001	
Kontrolle vs. 250	19,710		3,904	<0,01	
Kontrolle vs. 500	40,410		8,007	<0,001	
125 vs. 250	-3,801		0,753	>0,05	
125 vs. 500	16,910		3,350	<0,01	
250 vs. 500	20,710		4,103	<0,001	

A6 H69-Zellen mit Sildenafil und Indometacin

Tab.8.6: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 125 µM Sildenafil mit verschiedenen Indometacin-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	57970	3	19320	429,5	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	3059	68	44.99		
gesamt	61030	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125/50	36,990		16,540	<0,001	
Kontrolle vs. 125/100	51,930		23,230	<0,001	
Kontrolle vs. 125/200	78,510		35,110	<0,001	
125/50 vs. 125/100	14,940		6,683	<0,001	
125/50 vs. 125/200	41,520		18,570	<0,001	
125/100 vs. 125/200	16,580		11,890	<0,001	

Tab.8.7: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 250 µM Sildenafil mit verschiedenen Indometacin-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	44810	3	14940	80,69	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	12590	68	185,1		
gesamt	57400	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
			Mittlere Differenz	t	p-Wert
Kontrolle vs. 250/50			31,380	6,918	<0,001
Kontrolle vs. 250/100			48,900	10,780	<0,001
Kontrolle vs. 250/200			67,780	14,940	<0,001
250/50 vs. 250/100			17,520	3,863	<0,01
250/50 vs. 250/200			36,400	8,026	<0,001
250/100 vs. 250/200			18,880	4,164	<0,001

Tab.8.8: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 500 µM Sildenafil mit verschiedenen Indometacin-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	55330	3	18440	188,4	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	6657	68	97,97		
gesamt	61990	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 500/50	34,840		10,560	<0,001	
Kontrolle vs. 500/100	56,330		17,080	<0,001	
Kontrolle vs. 500/200	74,470		22,580	<0,001	
500/50 vs. 500/100	21,490		6,5170	<0,001	
500/50 vs. 500/200	39,640		12,020	<0,001	
500/100 vs. 500/200	18,140		5,5010	<0,001	

A7 H69-Zellen mit Sildenafil und Meloxicam

Tab.8.9: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 125µM Sildenafil mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	42570	3	14190	217,1	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	4445	68	65,37		
gesamt	47020	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125/50	29,060		10,780	<0,001	
Kontrolle vs. 125/100	50,780		18,840	<0,001	
Kontrolle vs. 125/200	64,330		23,870	<0,001	
125/50 vs. 125/100	21,720		8,059	<0,001	
125/50 vs. 125/200	35,260		18.080	<0,001	
125/100 vs. 125/200	13.540		5.026	<0,001	

Tab.8.9: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 250µM Sildenafil mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	35920	3	11970	273,0	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	2982	68	43,86		
gesamt	38910	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 250/50	24,420		11,060	<0,001	
Kontrolle vs. 250/100	40,090		18,160	<0,001	
Kontrolle vs. 250/200	61,160		27,700	<0,001	
250/50 vs. 250/100	15,680		7,102	<0,01	
250/50 vs. 250/200	36,740		16,640	<0,001	
250/100 vs. 250/200	21,060		9,541	<0,001	

Tab.8.10 Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 500 µM Sildenafil mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	42740	3	14250	333,4	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	2906	68	42,73		
gesamt	45640	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 500/50	33,540		15,390	<0,001	
Kontrolle vs. 500/100	46,180		21,190	<0,001	
Kontrolle vs. 500/200	67,160		30,820	<0,001	
500/50 vs. 500/100	12,640		5,800	<0,001	
500/50 vs. 500/200	33,610		15,430	<0,001	
500/100 vs. 500/200	20,980		9,627	<0,001	

A8 H69-Zellen mit IBMX und Meloxicam

Abb.8.11: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 125 µM IBMX mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	37530	3	12510	439,5	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	1936	68	28,46		
gesamt	39470	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125/50	33,060		18,590	<0,001	
Kontrolle vs. 125/100	42,490		23,890	<0,001	
Kontrolle vs. 125/200	63.300		35,590	<0,001	
125/50 vs. 125/100	9,430		5,302	<0,001	
125/50 vs. 125/200	30.230		17,000	<0,001	
125/100 vs. 125/200	20.800		11.700	<0,001	

Tab.8.12: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 250 µM IBMX mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	48700	3	16320	864,3	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	1277	68	18,78		
gesamt	49970	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 250/50	45,260		31,330	<0,001	
Kontrolle vs. 250/100	55,160		38,180	<0,001	
Kontrolle vs. 250/200	69,540		48,140	<0,001	
250/50 vs. 250/100	9,900		6,853	<0,001	
250/50 vs. 250/200	24,290		16,810	<0,001	
250/100 vs. 250/200	14,390		9,960	<0,001	

Tab.8.13: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 500 µM IBMX mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H69-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	65670	3	21890	1314	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	1132	68	16,65		
gesamt	66800	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 500/50	58,920		43,310	<0,001	
Kontrolle vs. 500/100	67,250		49,440	<0,001	
Kontrolle vs. 500/200	77,850		57,230	<0,001	
500/50 vs. 500/100	8,331		6,125	<0,001	
500/50 vs. 500/200	18,930		13,920	<0,001	
500/100 vs. 500/200	10,600		7,791	<0,001	

B H82-Zellen

B1 H82-Zellen mit Indometacin

Tab.8.14: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von Indometacin auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	104600	3	34870	4008	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	591,6	68	8,699		
gesamt	105200	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
		Mittlere Differenz	t	p-Wert	
Kontrolle vs. 50		74,090	75,360	<0,001	
Kontrolle vs. 100		91,360	92,930	<0,001	
Kontrolle vs. 200		93,440	95,050	<0,001	
50 vs. 100		17,270	17,560	<0,001	
50 vs. 200		19,350	19,690	<0,001	
100 vs. 200		2,087	2,123	>0,05	

B2 H82-Zellen mit IBMX

Tab.8.15: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von IBMX auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	14070	3	4691	84,65	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	3768	68	55,42		
gesamt	17840	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125	13,940		5,617	<0,001	
Kontrolle vs. 250	20,860		8,408	<0,001	
Kontrolle vs. 500	38,830		15,650	<0,001	
125 vs. 250	6,925		2,791	<0,05	
125 vs. 500	24,890		10,030	<0,001	
250 vs. 500	17,960		7,239	<0,001	

B3 H82-Zellen mit Meloxicam

Tab.8.16: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von Meloxicam auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	28480	3	9492	257,9	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	2503	68	36,81		
gesamt	30980	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
			Mittlere Differenz	t	p-Wert
Kontrolle vs. 50			17,940	8,870	<0,001
Kontrolle vs. 100			32,550	16,100	<0,001
Kontrolle vs. 200			54,250	26,830	<0,001
50 vs. 100			14,610	7,226	<0,001
50 vs. 200			36,310	17,960	<0,001
100 vs. 200			21,700	10,730	<0,001

B4 H82-Zellen mit Sildenafil

Tab.8.17: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von Sildenafil auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	29860	3	9955	87,44	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	7742	68	113,8		
gesamt	37610	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125	52,750		14,830	<0,001	
Kontrolle vs. 250	45,580		12,810	<0,001	
Kontrolle vs. 500	38,190		10,740	<0,001	
125 vs. 250	-7,176		2,018	>0,05	
125 vs. 500	-14,560		4,094	<0,001	
250 vs. 500	-7,384		2,076	>0,05	

B5 H82-Zellen mit Vardenafil

Tab.8.18: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von Vardenafil auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	42920	3	14310	130,9	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	7431	68	109,3		
gesamt	50350	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125	62,310		17,880	<0,001	
Kontrolle vs. 250	55,540		15,940	<0,001	
Kontrolle vs. 500	47,180		13,540	<0,001	
125 vs. 250	-6,769		1,943	>0,05	
125 vs. 500	-15,130		4,342	<0,001	
250 vs. 500	-8,362		2,400	>0,05	

B6 H82-Zellen mit Sildenafil und Indometacin

Tab.8.19: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 125 µM Sildenafil mit verschiedenen Indometacin-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	123300	3	41110	11670	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	239,6	68	3,523		
gesamt	123600	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125/50	93,120		148,800	<0,001	
Kontrolle vs. 125/100	97,070		155,100	<0,001	
Kontrolle vs. 125/200	96,370		154,000	<0,001	
125/50 vs. 125/100	3,952		6,317	<0,001	
125/50 vs. 125/200	3,249		5,193	<0,001	
125/100 vs. 125/200	-0,703		1,124	>0,05	

Tab.8.20: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 250 µM Sildenafil mit verschiedenen Indometacin-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	112300	3	37440	1014	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	2512	38	36,94		
gesamt	114800	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 250/50	90,470		44,660	<0,001	
Kontrolle vs. 250/100	94,620		46,700	<0,001	
Kontrolle vs. 250/200	88,090		43,480	<0,001	
250/50 vs. 250/100	4,145		2,046	>0,05	
250/50 vs. 250/200	-2,382		1,176	>0,05	
250/100 vs. 250/200	-6,527		3,222	<0,05	

Tab.8.21 Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 500 µM Sildenafil mit verschiedenen Indometacin-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	102900	3	34310	2227	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	1048	68	15,41		
gesamt	104000	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 500/50	84,360		64,470	<0,001	
Kontrolle vs. 500/100	89,230		68,200	<0,001	
Kontrolle vs. 500/200	88,060		67,300	<0,001	
500/50 vs. 500/100	4,871		3,723	<0,01	
500/50 vs. 500/200	3,699		2,827	<0,05	
500/100 vs. 500/200	-1,172		0,896	>0,05	

B8 H82-Zellen mit Sildenafil und Meloxicam

Tab.8.22: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 125 µM Sildenafil mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	76270	3	25420	143,0	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	12090	68	177,7		
gesamt	88350	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125/50	69,840		15,720	<0,001	
Kontrolle vs. 125/100	73,810		16,610	<0,001	
Kontrolle vs. 125/200	80,340		18,080	<0,001	
125/50 vs. 125/100	3,964		0,892	>0,05	
125/50 vs. 125/200	10,500		2,363	>0,05	
125/100 vs. 125/200	6,535		1,471	>0,05	

Tab.8.23: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 250 µM Sildenafil mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	85620	3	28540	287,3	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	6655	67	99,33		
gesamt	92280	70			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 250/50	65,800		19,810	<0,001	
Kontrolle vs. 250/100	75,330		22,350	<0,001	
Kontrolle vs. 250/200	90,390		27,210	<0,001	
250/50 vs. 250/100	9,532		2,828	<0,05	
250/50 vs. 250/200	24,590		7,401	<0,001	
250/100 vs. 250/200	25,060		4,466	<0,001	

Tab.8.24: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 500 µM Sildenafil mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	67620	3	22540	783,6	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	1956	68	28,76		
gesamt	69570	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 500/50	55,140		30,840	<0,001	
Kontrolle vs. 500/100	67,580		37,800	<0,001	
Kontrolle vs. 500/200	80,390		44,970	<0,001	
500/50 vs. 500/100	12,440		6,960	<0,001	
500/50 vs. 500/200	25,250		14,130	<0,001	
500/100 vs. 500/200	12,810		7,166	<0,001	

B9 H82-Zellen mit IBMX und Meloxicam

Abb.8.25: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 125 µM IBMX mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	52370	3	17460	246,6	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	4813	68	70,78		
gesamt	57180	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 125/50	36,380		12,970	<0,001	
Kontrolle vs. 125/100	54,700		19,500	<0,001	
Kontrolle vs. 125/200	72,930		26,010	<0,001	
125/50 vs. 125/100	18,320		6,532	<0,001	
125/50 vs. 125/200	36,550		13,030	<0,001	
125/100 vs. 125/200	18,230		6,502	<0,001	

Tab.8.26: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 250 μ M IBMX mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	59490	3	19860	503,4	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	2683	68	39,46		
gesamt	62270	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 250/50	52,510		25,080	<0,001	
Kontrolle vs. 250/100	61,980		29,600	<0,001	
Kontrolle vs. 250/200	76,130		36,360	<0,001	
250/50 vs. 250/100	9,469		4,523	<0,001	
250/50 vs. 250/200	23,620		11,280	<0,001	
250/100 vs. 250/200	14,150		6,757	<0,001	

Tab.8.27: Daten der One-Way-ANOVA und des Bonferroni's Multiple Comparison Tests für die Wirkung von 500 μ M IBMX mit verschiedenen Meloxicam-Konzentrationen auf H82-Zellen

One-way ANOVA					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	69520	3	23170	1285	P<0,0001
Innerhalb der Gruppen	1227	68	18,04		
gesamt	70750	71			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mittlere Differenz		t	p-Wert	
Kontrolle vs. 500/50	59,910		42,320	<0,001	
Kontrolle vs. 500/100	68,480		48,380	<0,001	
Kontrolle vs. 500/200	80,710		57,010	<0,001	
500/50 vs. 500/100	8,577		6,059	<0,001	
500/50 vs. 500/200	20,800		14,700	<0,001	
500/100 vs. 500/200	12,230		8,637	<0,001	

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie durchführen zu dürfen. Seine theoriegeleiteten Anregungen haben mir wertvolle Hinweise für die inhaltliche Auseinandersetzung mit der Thematik sowie der Konzeptionierung der Experimentalphase gegeben.

Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Müller möchte ich ganz herzlich für die Betreuung meines Promotionsvorhabens sowie für seine methodischen Anregungen bei der Durchführung der Experimente danken.

Die MTAs sowie die wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Anatomie II haben mich in kompetenter Weise mit Ratschlägen zur Einarbeitung in die Zellkultur unterstützt.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Kommilitonin und Mitdotorandin Jessica Allendorf für die schöne gemeinsame Zeit, die gute Zusammenarbeit im Studium, die gegenseitige Motivation sowie ihre stets ermutigende Haltung bedanken.

Meinem Bruder Jandrik Hinz danke ich für die aufmunternden Gespräche und seine Unterstützung in mathematischen Fragestellungen.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, die mir das Zahnmedizinstudium ermöglicht haben und mir stets eine wichtige Stütze waren. Mit ihrer Liebe, ihrer Kraft, ihrem Interesse und ihrem Vertrauen haben sie mich durchs Leben begleitet.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marlien Christin Hinz

Geburtsdatum: 28.07.1985

Geburtsort: Hamburg

Schul Ausbildung

08/1992 – 07/1995 Heinrich-Helbing-Schule, Hamburg

08/1995 - 07/2004 Margaretha-Rothe-Gymnasium, Hamburg

Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/2004 – 01/2010 Studium der Zahnmedizin, Universität Hamburg

03/2007 Physikum

01/2010 Staatexamen

Berufliche Tätigkeit

06/2010 – 07/20120 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dres. Peters, Hamburg

09/2010 - 08/2012 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Fink & Partner, Bremen

seit 10/2012 Zahnarztpraxis Förner-Ulrich, Bremen

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Marlien Christin Hinz