

Daniel Lubs  
Dr. med.

## **Einsatz von Diclofenac und Ibuprofen zur medikamentösen Adhäsionsblockade von Mammakarzinomzellen am human umbilical vein endothelial (HUVEC) Monolayer-Modell**

Promotionsfach: Frauenheilkunde  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Eichbaum

Das Mammakarzinom ist derzeit in allen Teilen der Erde die häufigste Krebserkrankung der Frau. In Deutschland wird jede achte bis zehnte Frau im Laufe ihres Lebens mit dieser Diagnose konfrontiert. Vor allem das metastasierte Stadium von Brustkrebs ist mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert und gilt bislang als unheilbar.

Es wird vermutet, dass die hämatogene Besiedelung sekundärer Organe durch zirkulierende Tumorzellen auf vergleichbarem Wege erfolgt, wie die Extravasation von Leukozyten im Rahmen von Entzündungsprozessen. Verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und Vertreter der Selectine scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Vor allem endotheliales E-Selectin steht unter Verdacht, den initialen Zellkontakt zwischen Tumor- und Endothelzellen vermitteln zu können.

Nicht-steroidale Antiphlogistika repräsentieren eine der am häufigsten eingesetzten Medikamente der heutigen Medizin. Verschiedene Studien geben Anlass zu der Vermutung, dass diese Substanzgruppe in der Lage ist, die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Selectin zu vermindern.

In der vorliegenden Arbeit wurden Diclofenac und Ibuprofen am statischen HUVEC<sup>1</sup> Monolayer-Modell auf ihr Potenzial hin untersucht, die endotheliale Adhäsion invasiver Mammakarzinomzellen zu blockieren. Eine mögliche Verminderung der E-Selectin Expression sollte die Anhaftung von Tumorzellen der Linie KM22 am Endothel dabei inhibieren.

Für die richtige Dosierung wurde die Verträglichkeit beider Wirkstoffe mittels einer Trypanblaufärbung behandelter Endothelzellen sichergestellt. Durch Ansiedelung von HUVECs in LabTek II Chamber Slide Systemen wurde ein subkonfluenten Endothelrasen gezüchtet. Die acht Kammern der Objektträger wurden in behandelte und unbehandelte Gruppen unterteilt.

Nach medikamentöser Vorbehandlung wurde das Endothel durch Inkubation mit TNF- $\alpha$  stimuliert, um die Nachstellung eines tumor-assoziierten, pro-inflammatorischen Milieus zu erreichen. Anschließend erfolgte die Zugabe fluoreszenzmarkierter Mammakarzinomzellen, die für eine Dauer von 20 Minuten mit dem Endothel versetzt wurden. Die Gesamtzahl adhärenter Tumorzellen wurde durch standardisierte Auswertung am computergesteuerten Fluoreszenzmikroskop erfasst. Nach getrennter Ermittlung einer optimalen Konzentration  $c$  und Einwirkzeit  $t$  erfolgten  $n=24$  Versuche mit Diclofenac ( $t=4h$ ;  $c=125\mu g/ml$ ) im Vergleich zu  $n=24$

---

<sup>1</sup> human umbilical vein endothelial cell

Kontrollen. Analog wurden für Ibuprofen zunächst optimale Versuchsbedingungen ermittelt und dann jeweils n=24 Versuche mit behandelten (t=8h; c=1mM) und unbehandelten Endothelzellen durchgeführt.

In einem zweiten Schritt erfolgte ein indirektes Immuno-Staining mit Anti-E-Selectin-Antikörpern, um im semi-quantitativen Nachweis zu ermitteln, wie sich die E-Selectin Expression von HUVECs nach Inkubation mit Diclofenac und Ibuprofen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen verhielt.

Die Ergebnisse zeigen für die mit Diclofenac behandelte Gruppe und deren korrespondierende Kontrollen eine annähernd gleiche Verteilung der Werte Median, Mittelwert und der 25%- und 75%-Quantile. Ein signifikanter Unterschied ließ sich hierbei nicht demonstrieren. Vergleicht man die Gesamtzahl adhätierender Tumorzellen der mit Ibuprofen behandelten Gruppe mit den entsprechenden Kontrollansätzen, ist ein signifikanter Unterschied durch die Vorbehandlung mit dem Medikament ebenfalls nicht erkennbar. Median, Mittelwert sowie die 25%- und 75%-Quantile unterscheiden sich in beiden Versuchsgruppen nur geringfügig voneinander. Im indirekten Immuno-Staining zeigte sich dagegen sowohl für die Ansätze mit Diclofenac als auch für Ansätze mit Ibuprofen eine Verminderung der endothelialen E-Selectin Oberflächenexpression im Vergleich zu unbehandelten Gruppen. Die Bewertung der erzielten Resultate sollte unter dem Gesichtspunkt erfolgen, dass ein statisches in-vitro Studiendesign eingesetzt wurde. Der verwendete Aufbau erlaubt daher nur bedingt Rückschlüsse auf die Komplexität ablaufender in-vivo Vorgänge. Die Ergebnisse stehen sowohl für Diclofenac als auch für Ibuprofen klar hinter den Erwartungen zurück. Im Zusammenhang mit der demonstrierten Verminderung der endothelialen E-Selectin Expression bleibt fraglich, weshalb keines der beiden Medikamente die Adhäsion der Mammakarzinomzellen inhibieren konnte. Über die genaue Begründung dafür kann derzeit nur spekuliert werden, da vergleichbare Untersuchungen zu den ausgewählten Substanzen fehlen. Im Einklang mit verschiedenen anderen Studien kann jedoch angenommen werden, dass nicht ein, sondern ein ganzer Komplex von Adhäsionsmolekülen für die endotheliale Bindung von Tumorzellen verantwortlich ist. Möglicherweise traten in den durchgeführten Untersuchungen sekundäre Interaktionen gegenüber einer E-Selectin vermittelten Bindung in den Vordergrund. Auch aktuelle Literaturreviews kommen zu dem Schluss, dass die genaue Rolle einzelner Adhäsionsmoleküle im Zusammenhang mit dem Karzinomzellarrest im Gefäßbett bis heute nicht vollständig und umfassend erforscht ist.

Die vorliegende Arbeit lässt den Schluss zu, dass Diclofenac und Ibuprofen zu einer wirksamen Verminderung der Mammakarzinomzelladhäsion am statischen Endothelmodell trotz einer vermittelten Blockade endothelialer E-Selectinexpression nicht geeignet scheinen. Hinweise auf vielseitige anti-metastatische Effekte von NSAIDs in klinischen Studien lassen eine abschließende Aussage bezüglich des Einsatzes von Diclofenac und Ibuprofen bei metastasierten Brustkrebskrankungen allerdings nicht allein auf Basis von in-vitro Untersuchungen zu.

Vielmehr wird es die Aufgabe zukünftiger Studien sein, das Verständnis um die Rolle der einzelnen Adhäsionsmoleküle bei Prozessen hämatogener Metastasierung in-vivo und in-vitro weiter zu verfeinern und eine darauf ausgerichtete wirkstoff-spezifische Analyse durchzuführen.