

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tiermodell

#### 2.1.1. Tierhaltung und Versuchsgruppen

60 männliche, acht Wochen alte syrische Goldhamster (Harlan-Winkelmann, Paderborn, Deutschland) wurden unter standardisierten Bedingungen mit konstanter Raumtemperatur ( $21 \pm 5^\circ\text{C}$ ), Luftfeuchtigkeit ( $70 \pm 10\%$ ), zehn Luftwechsell pro Stunde und mit einem 12h/12h Tag- / Nachtzyklus, in Einzelkäfigen gehalten.

Die Tiere wurden mit einem Spezialfutter ernährt, in dem der Rohfettanteil von 3,5% (Anteil im Hamsterstandardfutter von ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) auf 21,4%, mit einem Anteil von 2% an Linolensäure und 11% an Linolsäure, angehoben wurde. In eigenen Vorstudien führte die verwendete Hochfetterernährung zu einer signifikant höheren Lebermetastasierung im Vergleich zu einer mit Standardfutter ernährten Kontrollgruppe (162-164). Alle Tiere hatten Zugang zum Futter und zum Trinkwasser ad libitum.

Die Fettsäurenanteile der Spezialdiäten (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) im Standardfutter und in der Hochfettddiät sind in Tab.5 dargestellt.

Fettsäuren	Kurzformel	Anteil in Standarddiät [%]	Anteil in Hochfettddiät [%]
Palmitinsäure	C16:0	0,3	2,0
Stearinsäure	C18:0	0,2	1,0
Ölsäure	C18:1	0,7	4,4
Linolsäure	C18:2	1,8	11,0
Linolensäure	C18:3	0,3	2,0
Arachidonsäure	C20:4	0,07	0,4
Eicosapentaensäure	C22:5	0,05	0,3
Sonstige Fettsäuren	C8:0 bis C22:6	Jeweils <0,05	Jeweils <0,3

Tab. 5: Anteil bedeutender Fettsäuren in Standarddiät und Hochfettddiät

### 2.1.2. Tumorinduktion

Zur Induktion des duktales Adenokarzinoms des Pankreas wurde allen Tieren über einen Zeitraum von 10 Wochen einmal wöchentlich 10mg/kg Körpergewicht N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP, Ash Stevens Chemicals Ltd., Detroit, USA) subkutan interskapulär injiziert. BOP wurde dazu jeweils unmittelbar vor der Anwendung in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Melsungen, Deutschland) im Verhältnis von 3mg pro 1ml gelöst. Die Injektionen wurden unter einer kurzen Äthernarkose (Hoechst / Marion-Russel GmbH, Frankfurt, Deutschland) appliziert.

### 2.1.3. Laparoskopie

Die Laparoskopie wurde in der 16. Woche durchgeführt. Unmittelbar präoperativ wurden die Tiere randomisiert und den in Tabelle 6 aufgeführten Gruppen 1–3 zugeordnet.

Gruppe	Tier-Anzahl (n)	Lavage-Substanz
1	20	AKE (isotone Kochsalzlösung)
2	20	Taurolidin
3	20	Octreotid

Tab.6: Versuchsgruppen

Die Narkose wurde mit einer intraperitonealen Pentobarbital-Injektion (8mg) und einer nachfolgenden intramuskulären Ketanestinjektion (4mg) eingeleitet.

Nach einer Stichinzision wurden drei Trokare (Miniport, AutoSuture, Norwalk, USA) eingebracht, wobei das optische System (K. Storz, Tuttlingen, Deutschland) in den unteren rechten Quadranten eingeführt wurde. Unter Verwendung von Kohlendioxid und einem Belüftungssystem (K. Storz, Tuttlingen, Deutschland) wurde daraufhin ein Pneumoperitoneum mit einem intraabdominalen Druck von 12 mmHg erzielt. Die Dauer des Pneumoperitoneums war auf 15 Minuten standardisiert. In den oberen linken Quadranten wurde eine endoskopische Schere (Duffner, Tuttlingen, Deutschland) und in den oberen rechten Quadranten eine endoskopische Pinzette

(Duffner, Tuttlingen, Deutschland) eingebracht. Mit diesen beiden Instrumenten wurde eine Pankreasbiopsie aus dem duodenalen Anteil entnommen. Die Gewebprobe wurde mit der Pinzette über den rechten oberen Trokar geborgen. Daraufhin erfolgte über den oberen linken Trokar eine Lavage mit 5ml einer isotonen Kochsalzlösung (Gruppe 1), mit 5ml Octreotid (Gruppe 2) oder mit 5ml Taurolidin (Gruppe 3) für jeweils fünf Minuten. Nach 15 Minuten wurden die Trokare entfernt und die Inzisionen mit einer Naht verschlossen.

## **2.2. Histologische Aufarbeitung**

### 2.2.1. Obduktion

Nach 24 Wochen wurden die Tiere unter einer Narkose mit Ursotamin (Serumwerk Bernburg GmbH, Bernburg, Deutschland) getötet. Nach Erhebung des endgültigen Körpergewichts wurde zur Obduktion eine mediane Laparotomie vom Processus xiphoideus bis zum Penisansatz durchgeführt. Nach Inspektion aller Bauchorgane und Erhebung des Pankreas- und Lebergewichts wurden diese beiden Organe entnommen und sowohl makroskopisch als auch auflichtmikroskopisch (neoLab Stereomikroskop, Eschenbach GmbH, Nürnberg, Deutschland) auf solide Raumforderungen untersucht. Makroskopisch sichtbare Pankreaskarzinome wurden exzidiert und zweidimensional vermessen.

Sowohl Proben aus karzinomverdächtigen Herden als auch das gesamte Pankreas von Tieren ohne makroskopisch sichtbare Karzinome wurden für die histologische Untersuchung in 10%iges gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Dorset, Großbritannien) gegeben.

Die Leber jedes Tieres wurde unmittelbar nach Entnahme mit einem Skalpell in 1 mm breite Lamellen geschnitten und gleichfalls makroskopisch und auflichtmikroskopisch auf solide Raumforderungen untersucht. Die Größe und Anzahl aller als metastasenverdächtig angesehener Herde einer Leber wurden bestimmt. Aus jeder verdächtigen Läsion der Leber wurde eine Probe für die histologische Untersuchung in 10%iges gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Dorset, Großbritannien) gegeben.

Sowohl unveränderte metastasenfremde Leberanteile als auch alle verdächtigen Herde der Leber wurden von jedem Tier exzidiert und unverzüglich bei -80°C eingefroren.

## 2.2.2. Histologische Untersuchung

Nachdem die in Formaldehyd gegebenen Proben in Metallkassetten (Shandon Ltd., Runcorn, Großbritannien) umgebettet wurden, folgte die Entwässerung im Entwässerungsautomaten Histokinette 2000 (Reichert-Jung GmbH, Wien, Österreich). Anschließend wurden die Proben auf der Gießstation TBS 88 (medite AG, Jena, Deutschland) mit Paraffin (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) überschichtet. Nach Bettung der Paraffinblöcke in Gewebekapseln (Shandon Ltd., Runcorn, Großbritannien), wurden diese mit dem Rotationsmikrotom HM 350 (Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) in einer Schnittdicke von 2-3µm geschnitten. Nach dem anschließenden Aufziehen auf Objektträger (Menzel Gläser KG, Braunschweig, Deutschland) im Paraffin-Streckbad TFB 35 (medite AG, Jena, Deutschland), wurden die Proben bei 75°C für 30min im Brutschrank Modell 200 (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland) getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte durch ein einmaliges, jeweils fünfminütiges Xylolbad (Baker, Deventer, Niederlande) unter dem Abzug Hyperclean (Shandon Ltd., Runcorn, Großbritannien) entparaffiniert. Danach erfolgte die Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Dorset, Großbritannien) und Waschung in Aqua bidest mit anschließender Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (Merck AG, Darmstadt, Deutschland). Nun schloß sich die zweite Waschung mit Aqua bidest und die abschließende Entparaffinierung in aufsteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Dorset, Großbritannien) an. Dann erfolgte das zweite Xylolbad (Baker, Deventer, Niederlande) mit anschließender Aufhellung der Schnitte durch Kanadabalsam (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) und Plazierung der Deckgläser (Menzel Gläser GmbH, Braunschweig, Deutschland).

Die histologischen Schnitte wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops Kolleg SHB 45 (Eschenbach GmbH, Nürnberg, Deutschland) pathohistologisch beurteilt.

Die Klassifizierung der aus den tumorverdächtigen Pankreasläsionen entnommenen Proben folgte den Kriterien nach Meijers *et al.* (86). Es wurden in die Berechnung der Induktionsrate ausschließlich jene Tiere mit eingeschlossen, die ein invasives duktales Adenokarzinom des Pankreas aufwiesen.

Die als Metastasen klassifizierten Raumforderungen der Leber wurden in die Berechnung der Anzahl, der Inzidenz und der durchschnittlichen Größe dieser miteinbezogen.

## **2.3. Biochemische Untersuchungen**

### 2.3.1. Chemikalien und Geräte

Bestimmt wurden die Aktivität der Glutathionperoxidase (GSHPX), der Superoxiddismutase (SOD) und die Konzentration der Lipidperoxidationsprodukte thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS).

Die Bestimmung der GSHPX-Aktivität erfolgte nach der Methode von Paglia und Valentine (104) mit Anwendung des Testkits RANSEL (Randox Ltd., Crumlin, Großbritannien). Dieser enthielt als Mischsubstrat Xanthin und I.N.T. ([2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchlorid-] sowie Xanthinoxidase (80U/l) und einen 50mM CAPS-EDTA-Puffer.

Die SOD-Aktivität wurde nach der Methode von Beauchamp und Fridovich (10) erhoben. Hier kam der Testkit RANSON (Randox Ltd., Crumlin, Großbritannien) zur Anwendung, der die reaktive Substanz aus Glutathion, Glutathionreduktase und NADPH, sowie 0,18mM Cumenhydroperoxid, 50mM Phosphat-EDTA-Puffer und Verdünnungsmittel enthielt.

Folgende Chemikalien wurden für die Proteinbestimmung nach Lowry (83) verwendet:

- Kupfersulfat-4-hydrat (1%ig in Aqua dest; Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland),
- Kalium-Natrium-Tartrat-4-hydrat (2%ig in Aqua dest; Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland),
- Natriumkarbonat wasserfrei (0,5m in 1n Natronlauge, Merck AG, Darmstadt, Deutschland),
- Folins Reagenz (Merck AG, Darmstadt, Deutschland).

Für die Bestimmung der TBARS wurden folgende Chemikalien verwendet:

- SDS (Natriumdodecylsulfat, 8,1%ige Lösung in Aqua dest; Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland),
- N-Butanol (Merck AG, Darmstadt, Deutschland),
- Azetatpuffer (pH=3,5); hergestellt aus 40%iger Essigsäure (aus analytisch reinem Eisessig; Merck AG, Darmstadt, Deutschland), die mittels 5n Natronlauge (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH von 3,5 pipettiert und dann auf das doppelte Volumen aufgefüllt wurde,

- BHA (3-Tert-butyl-4-hydroxyanisol), 0,05mg/ml; Lösungsmittel: Ethanol-Wasser-Gemisch (1:1),
- Malondialdehyd-Standard, modifiziert nach Esterbauer und Haberland: eine 10mM Lösung von Malondialdehydbisdiethylacetal wurde in 1%iger Schwefelsäure eine Stunde inkubiert, um den Prozeß der säurekatalysierten Hydrolyse weitgehend zu beenden.

Die photometrischen Aktivitätsbestimmungen wurden mit dem UV-VIS Scanning Spektrophotometer UV-2101 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) durchgeführt. Die Messung der TBARS-Konzentration fand am Spektrofluorophotometer RF-5001 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) statt.

Weiterhin kamen zur Verwendung:

- Zentrifuge T23 (Janetzki, Poznanska, Polen),
- Schüttelmaschine (Labortechnik Illmenau, Illmenau, Deutschland),
- Homogenisator Omni International 2000 (Digitana, Horgen/Zürich, Schweiz)
- Ultrahomogenisator Labsonic 1510 (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- Laborwaage Sartorius excellence (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)

### 2.3.2. Homogenatherstellung

Die eingefrorenen Proben von metastatischem und metastasenfreiem Lebergewebe wurden vor den biochemischen Untersuchungen homogenisiert. Die Proben für die TBARS-Bestimmung wurden mit einer 0,01% Butylhydroxyanisol enthaltenden, eiskalten 140mmol/l-Natriumchlorid-Lösung (Sigma Chemicals, Dorset, Großbritannien) unter Kühlung 4mal je 15 Sekunden homogenisiert. Für die GSHPX- und die SOD-Bestimmung wurde das Material mit eiskaltem 0,1mol/l- Phosphatpuffer gleichfalls unter Kühlung 4mal je 15 Sekunden homogenisiert. Die Homogenate wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und vor den Messungen jeweils 15 Sekunden rehomogenisiert.

### 2.3.3. Proteinbestimmung nach Lowry

#### 2.3.3.1. Prinzip

Die Biuret-Probe bildet den Hintergrund zu diesem Verfahren und basiert auf der Tatsache, daß Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen in alkalischer Lösung mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einen violetten Komplex bilden. Da dieses Verfahren jedoch nur eine mäßige Sensitivität aufweist und hierfür ein sehr umfangreiches Probenmaterial benötigt wird, kombinierte Lowry die Biuret-Methode mit einer Reduktion von Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure (Folins Reagenz). Dies führte durch die aromatischen Seitenketten des im Kupferkomplex gebundenen Tyrosins und Tryptophans zu Wolfram- bzw. Molybdänblau (83).

#### 2.3.3.2. Durchführung und Auswertung

Für 50ml Gebrauchslösung wurden 0,5ml Kupfersulfat-Lösung, 0,5ml Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung und 49ml Natriumkarbonat-Lösung gemischt. Nach Verdünnung des Gewebehomogenates zu 1:100, wurden davon 25µl mit 225µl Aqua bidest versetzt und mit 1,5ml Gebrauchslösung 10 Minuten inkubiert. Unter starkem Schütteln wurden dann 150µl Folins Reagenz dazugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurden die Proben bei folgenden Parametern gemessen: 750nm Wellenlänge, 25°C Temperatur, 0,5cm Küvettenschichtdicke, Leerwert als Vergleichsprobe. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierfunktion.

### 2.3.4. Bestimmung der GSHPX-Aktivität

#### 2.3.4.1. Prinzip

Die Bestimmung basiert auf der Methode von Paglia und Valentine (104). Die GSHPX katalysiert die Oxidation von Glutathion durch Cumenhydroperoxid, so daß durch Bildung einer Disulfidbrücke das oxidierte Glutathion (GSSG) entsteht. Dieses wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von reduziertem Glutathion und NADPH sofort reduziert, wobei NADPH oxidiert wird. Die Abnahme des reduzierten NADPH und somit die Abnahme der Extinktion wird bei der hier verwendeten Methode gemessen.

### 2.3.4.2. Durchführung und Auswertung

Das Pipettierschema ist in Tab.7 dargestellt.

	Leerwertmessung	Probenmessung
Probe [ $\mu$ l]	0	10
Aqua bidest [ $\mu$ l]	50	40
Reagenz [ $\mu$ l]	500	500
Cumenhydroperoxid [ $\mu$ l]	20	20

Tab. 7: Pipettierschema für die GSHPX- Aktivitätsmessung

Das Pipettieren erfolgte direkt in die Meßküvette. Nach guter Durchmischung wurden die Proben unter folgenden Bedingungen gemessen: 340nm Wellenlänge, 37°C Temperatur, 3 Minuten Reaktionszeit, 0,5cm Küvettschichtdicke, Luft als Vergleichsprobe.

Der Ergebnisberechnung liegt das Lambert- Beersche Gesetz zugrunde:  $\Delta E = c \cdot d \cdot \epsilon$ . Es besagt, daß die Extinktion (E) einer Lösung proportional ist zu der Konzentration (c) der darin gelösten lichtabsorbierenden Substanz, ihrem molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) und der Schichtdicke (d) der Lösung. In dieser Messung entspricht  $\Delta E$  der Extinktionsänderung, c der Konzentration der Lösung und d der Küvettschichtdicke. Der Wert des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  beträgt  $6,22 \cdot 10^3$  l/mol·cm und ist konstant. Nach Umstellung der Gleichung nach c kann die Konzentration der Lösung in der Probe berechnet werden. Eingefügt wurde ein Verdünnungsfaktor. Die Ergebnisse wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

### 2.3.5. Bestimmung der SOD-Aktivität

#### 2.3.5.1. Prinzip

Diese Methode nach Beauchamp und Fridovich (10) kombiniert die durch die SOD katalysierte Reaktion mit einer Farbreaktion. Einerseits werden durch Xanthin und Xanthinoxidase Superoxidradikale gebildet, welche mit I.N.T. zu einem roten Formazanfarbstoff reagieren. Andererseits katalysiert die SOD die Dismutation von Superoxidradikalen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. So kann

über den Grad der Hemmung der Xanthinoxidase die SOD-Aktivität bestimmt werden.

### 2.3.5.2. Durchführung und Auswertung

Das Pipettierschema ist in Tab.8 dargestellt.

	Leerwertmessung	Probenmessung
Probe[ $\mu\text{l}$ ]	0	95-5
Aqua bidest [ $\mu\text{l}$ ]	100	5-95
Mischsubstrat [ $\mu\text{l}$ ]	340	340
Xanthinoxidase [ $\mu\text{l}$ ]	50	50

Tab. 8: Pipettierschema für die SOD-Aktivitätsmessung

Um Messwerte einer Inhibition zwischen 30–60% zu erhalten, wurden die Proben mit Aqua bidest verdünnt. Das Pipettieren erfolgte direkt in die Küvette. Nachdem die Proben gut durchgemengt wurden, folgte die Messung bei folgenden Parametern: 505nm Wellenlänge, 37°C Temperatur, 3 Min. Reaktionszeit, 0,5cm Küvettschichtdicke, Luft als Vergleichsprobe.

Die Messwerte wurden als Extinktionsänderung  $\cdot 10^3/\text{min}$  angegeben. Um die prozentuale Hemmung der Formazanreaktion angeben zu können, wurde folgende Gleichung angewandt:  $\% \text{Hemmung} = 100 - [(\Delta E \cdot \text{min}^{-1}_{\text{Probe}} \cdot 100) / \Delta E \cdot \text{min}^{-1}_{\text{Leerwert}}]$ . Bei Angabe der Einheiten in Units entsprach 1U SOD- Aktivität 50% Hemmung. Die so erhaltenen Werte wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

### 2.3.6. Bestimmung der Lipidperoxidations-Produkte

#### 2.3.6.1. Prinzip

Die Methode wurde von Ohkawa beschrieben (100). Hierbei bilden die als thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) bezeichneten Lipidperoxidationsprodukte mit Thiobarbitursäure einen roten Polymethinfarbstoff, dessen Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden kann.

Trotz bekannter Kritik an der Spezifität des Tests und der Art der Probengewinnung und -aufbewahrung (67), gehen wir davon aus, dass artefizielle Veränderungen des

TBARS-Levels durch eine strenge Standardisierung aller Arbeitsschritte vermieden werden können.

#### 2.3.6.2. Durchführung und Auswertung

Die benötigte Menge Homogenat wurde mit Aqua bidest zu 150µl ergänzt, mit 300µl Azetatpuffer (pH=3,5), 40µl SDS und 300µl TBA versetzt und für 90 Minuten ins Wasserbad (90°) gestellt. Nach 5minütiger Abkühlung in Eiswasser wurden 200µl Aqua bidest und 1ml n-Butanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde 20 Minuten geschüttelt, danach 10 Minuten bei 2000U/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Messung in der überstehenden n-Butanolphase bei folgenden Parametern: 515nm Wellenlänge für die Exzitation, 553nm Wellenlänge für die Emission, 25°C Temperatur, 0,5cm Küvettenschichtdicke, Leerwert als Vergleichsprobe. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierfunktion.

### **2.4. Statistische Berechnung**

Die Angaben der ermittelten Werte erfolgten als prozentuale Häufigkeiten, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung oder als Median und Range. Bei quantitativen Daten erfolgte ein Normalitätstest nach Shapiro und Francia.

Bei normalverteilten Parametern wurden die Mittelwertvergleiche zwischen den Versuchsgruppen als einfaktorielle Multivarianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Lagen in den Versuchsgruppen vergleichbare Varianzen vor, erfolgte die Post-Hoc-Korrektur nach dem Bonferroni-Modell. Waren ungleiche Varianzen vorhanden, wurde als Post-Hoc-Korrektur das Dunnett's-T3- Modell angewandt.

Bei nicht normalverteilten Parametern erfolgte die Angabe in Median und Range. Die Mittelwertvergleiche zwischen den Gruppen wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Bei Ablehnung der globalen Nullhypothese fanden die folgenden Einzelvergleiche zwischen den Gruppen als Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung der  $\alpha$ - Fehlerkumulierung statt.

Bei Normalverteilung wurden die Vergleiche innerhalb einer Versuchsgruppe zwischen metastatischen und nicht-metastatischen Werten als T-Tests für gepaarte

Stichproben durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Parametern fanden diese Vergleiche als Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Test statt.

Die kategoriellen Daten wurden angesichts der kleinen Umfänge mit dem Fisher-Test verglichen.

Das Signifikanzniveau wurde grundsätzlich mit 95% ( $p < 0,05$ ) definiert. Alle Berechnungen fanden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.0<sup>®</sup> für Windows98<sup>®</sup> statt.