

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Therapie mit
dem COX-2-Inhibitor Celebrex und dem 5-LOX-Inhibitor Zyflo
sowie deren Kombination
auf das Tumorwachstum und die Lipidperoxidation beim
BOP-induzierten Pankreaskarzinom des Syrischen Hamsters

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Patricia Warnick-Achúcarro
aus Berlin

Gutachter: 1. PD Dr. med. Frank Wenger

2. PD Dr. med. Robert Pfitzmann

3. Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Datum der Urkundenverleihung: 01.06.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Pankreaskarzinom.....	6
1.1.1	Das humane Pankreaskarzinom.....	6
1.1.1.1	Epidemiologie	6
1.1.1.2	Pathologie des Pankreaskarzinoms.....	7
1.1.1.3	Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms.....	8
1.1.1.4	Prognose des Pankreaskarzinoms	10
1.1.2	Tiermodelle des Pankreaskarzinoms.....	10
1.1.2.1	Das Rattenmodell	10
1.1.2.2	Das Hamstermodell	11
1.1.2.3	Modifikationen der Tiermodelle.....	12
1.2	Lipidperoxidation und oxidativer Stress	12
1.2.1	Definition und Vorkommen von Lipidperoxidation und oxidativem Stress.....	12
1.2.2	Enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen.....	15
1.2.3	Die Rolle der Lipidperoxidation in der Karzinogenese und Metastasierung unter Berücksichtigung der Nahrungszusammensetzung	16
1.3	Cyclooxygenase und Lipoxygenase	18
1.3.1	Arachidonsäuremetabolismus und Eikosanoide	18
1.3.2	Cyclooxygenase	19
1.3.3	Lipoxygenase.....	21
1.3.4	Cyclooxygenase- und Lipoxygenasehemmstoffe.....	22
1.3.4.1	Entwicklung und gesicherte Indikationen für COX- und LOX-Inhibitoren.....	22
1.3.4.2	COX- und LOX-Inhibitoren beim Pankreaskarzinom	23
1.4	Begründung und Erläuterung des Versuchsvorhabens	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Tiermodell.....	26
2.1.1	Haltung der Tiere und Versuchsgruppen	26
2.1.2	Ernährung der Versuchstiere	27

2.1.3	Tumorinduktionsphase	29
2.1.4	Therapiephase	29
2.2	Histologische Untersuchung	31
2.2.1	Obduktion	31
2.2.2	Histologische Untersuchung	31
2.3	Biochemische Untersuchungen	33
2.3.1	Chemikalien und Geräte	33
2.3.2	Homogenatherstellung.....	34
2.3.3	Proteinbestimmung nach Lowry.....	35
2.3.3.1	Prinzip.....	35
2.3.3.2	Durchführung und Auswertung	35
2.3.4	Bestimmung der Gluthathionperoxidase-Aktivität (GSHPX)	36
2.3.4.1	Prinzip.....	36
2.3.4.2	Durchführung und Berechnung der Ergebnisse.....	36
2.3.5	Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität (SOD)	37
2.3.5.1	Prinzip.....	37
2.3.5.2	Durchführung und Berechnung der Ergebnisse.....	38
2.3.6	Bestimmung der Lipidperoxidations-Produkte	39
2.3.6.1	Prinzip.....	39
2.3.6.2	Durchführung und Auswertung	39
2.4	Statistische Berechnungen	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Abschließende Körper- und Pankreasgewichte	41
3.2	Letalität während des Versuchszeitraums	41
3.3	Makroskopie und Auflichtmikroskopie des Pankreas	42
3.3.1.	Größe der pankreatischen Raumforderungen	43
3.4	Histologische Ergebnisse.....	45
3.4.1	Klassifikation der Raumforderungen im Pankreas	45
3.5	Biochemische Ergebnisse.....	47
3.5.1	Eiweißgehalt	47
3.5.2	Gluthathionperoxidase-Aktivität (GSHPX)	48

3.5.3	Superoxiddismutase-Aktivität (SOD)	51
3.5.4	Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten	54
4	Diskussion	57
4.1	Das Hamstermodell und die Effekte von BOP und einer Hochfetternahrung.....	57
4.2	Die Inhibition der Cyclooxygenase-2 und der Lipoxygenase-5	58
4.3	Schlussfolgerungen	64
5	Zusammenfassung	66
5.1	Einleitung	66
5.2	Material und Methoden	66
5.3	Ergebnisse.....	67
5.4	Diskussion und Schlussfolgerung	67
6	Literaturverzeichnis	70

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Das humane Pankreaskarzinom

1.1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom zählt mit 5-Jahres-Überlebensraten von 0,4-5% zu den Tumoren mit der schlechtesten Prognose [1-3]. In den vergangenen Jahrzehnten ist die Inzidenz des Pankreaskarzinoms in allen Ländern der westlichen Welt kontinuierlich gestiegen. Erst seit den 90-er Jahren beginnt sich dieser Trend in Europa zu ändern, die Inzidenz pegelt sich in den meisten Ländern der Europäischen Union bei Männern zwischen 7-9/100000 und bei Frauen zwischen 3-5/100000 ein [4]. In den letzten Jahren hat sich das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten von ursprünglich 2,5 : 1,0 auf 1,3-1,5 : 1,0 gewandelt [5-8]. Bei Diagnosestellung liegt das Durchschnittsalter der Patienten mit einem Pankreaskarzinom bei 60 - 80 Jahren [9-12]. Die höchste Inzidenz findet man in der schwarzen Bevölkerung der USA (15/100000) sowie in Hawaii, Maori, Polynesien, Neuseeland und in Schweden (12,5/100000). Die niedrigsten Raten finden sich in Indien (2,2/100000), Singapur und Kuwait [5,8,9,12].

Abgesehen von den demographischen Faktoren wie Alter, Geschlecht, ethnische und geographische Zugehörigkeit, sind die genauen Ursachen für die Entstehung des Pankreaskarzinoms noch nicht geklärt. Einzig nachgewiesener Risikofaktor ist der Nikotinkonsum, der zu einer Verdopplung des relativen Erkrankungsrisikos führt und dessen Mortalitätsraten eng mit der Quantität und Dauer des Nikotinkonsums korrelieren [5,8,11,13,14]. Diskutiert werden außerdem potentielle Risikofaktoren wie Ernährung, Koffein, Vitamine, Alkoholabusus, genetische und familiäre Disposition, Erkrankungen wie

Diabetes mellitus, Magenoperationen, Cholezystektomie oder chronische Pankreatitis [5,8,11,13-15].

1.1.1.2 Pathologie des Pankreaskarzinoms

Pankreaskarzinome sind in 60-70% der Fälle im Caput pancreatis, in 15-20% im Corpus pancreatis, in 5-10% in der Cauda pancreatis und seltener diffus oder multizentrisch lokalisiert. Sie infiltrieren vor allem durch perivaskuläres und perineurales Wachstum häufig ihre Nachbarorgane. Dabei tendieren Pankreaskopfkarzinome zur Penetration der Duodenalwand mit nachfolgendem Ileus und zur Umscheidung des Ductus pancreaticus oder Ductus choledochus mit nachfolgender Gangobstruktion und Ikterus. Pankreaskorpus- und Pankreasschwanzkarzinome infiltrieren eher Magenwand und Colon transversum. Oft sind auch benachbarte Gefäße wie A. mesenterica superior, V. mesenterica superior, V. lienalis, die Portalgefäße oder der Truncus coeliacus betroffen [2,7,16,17].

Nach der histomorphologischen Differenzierung unterscheidet man epitheliale Karzinome, darunter duktale (90%), azinäre (1-2%), endokrine Karzinome und Karzinome unklarer Histogenese von den extrem seltenen nicht epithelialen Tumoren, z.B. Sarkome oder Lymphome. Bei den dukталen Karzinomen können das tubuläre Adenokarzinom (82%), das adenosquamöse (4%), das pleomorph-großzellige Karzinom (4%), das muzinöse Adenokarzinom (1%) und das sehr seltene Plattenepithelkarzinom differenziert werden [2,6].

Im Bereich des Tumors besteht histopathologisch eine starke desmoplastische Umgebungsreaktion mit direkter topographischer Beziehung zwischen der Tumorausbreitung und einer fibrosierenden Pankreatitis.

Das Pankreaskarzinom metastasiert lymphogen in die parapankreatischen, paraaortalen und hilären Lymphknoten der Leber, hämatogen am häufigsten in die Leber, außerdem in die Lunge, Pleura, Nebennieren, in das Skelett und Peritoneum [2,7,9,15,16,18,19].

1.1.1.3 Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms

Pankreaskarzinome führen zu keinen charakteristischen Frühsymptomen, so dass die Vorstellung der Patienten und damit die Diagnosestellung häufig erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium erfolgen. Die Symptomtrias aus Oberbauch- oder Rückenschmerzen, Verschlussikterus und einem Gewichtsverlust von mehr als 10kg Körpergewicht führen 75% der Patienten zum Arzt [3,6,7,9,10,13,20].

Bei der klinischen Untersuchung sind die häufigsten, wenn auch unspezifischen Zeichen ein Ikterus, eine Hepatomegalie und in 25% der Fälle eine tastbar vergrößerte, indolente Gallenblase, auch als positives Courvoisiersches Zeichen bekannt. Hinweise auf ein bereits fortgeschrittenes Leiden mit Fernmetastasierung sind u. a. Aszites, periumbilikal oder epigastrisch palpable Tumormassen sowie ein palpabler Lymphknoten in der Fossa supraclavicularis sinistra, der Virchowsche Knoten [7,9,10,13,21].

Wichtigste diagnostische Verfahren bei Verdacht auf einen Pankreasprozess sind momentan die abdominelle Sonographie, die Computertomographie (CT) und die Endoskopische Retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) [13,20,22-24].

Die Sonographie ist zu 70-75% sensitiv und zu 90% spezifisch für das Pankreaskarzinom, jedoch sehr abhängig vom jeweiligen Untersucher. Die CT dagegen ist zuverlässig reproduzierbar und kaum untersucherabhängig. Sie ist zu 80-85% sensitiv und zu 90% spezifisch für das Pankreaskarzinom. Durch die 3-Phasen-Kontrastmittel-Spiral-CT ist eine richtige Voraussage der Resektabilität des Tumors in bis zu 90% der Fälle möglich. Während die Sensitivität und Spezifität der ERCP vergleichbar mit denjenigen der CT sind, besteht der Vorteil der ERCP in der Möglichkeit der gleichzeitigen Biopsie aus dem Ductus pancreaticus. Allerdings gewinnt man bei passender Symptomatik und positivem CT-Befund meist keine weiteren Informationen über den Tumor und seine Resektabilität [17,20-23,25-27].

Die Magnetresonanztomographie (MRT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Angiographie und die endoskopische Sonographie haben sich als diagnostische Routineverfahren beim Pankreaskarzinom bisher nicht durchgesetzt und werden in der Literatur kontrovers diskutiert [7,17,20,21,24,27-32]. Ebenfalls untersucht werden die

perkutane CT- oder Sonographie-gesteuerte Biopsie und die Bestimmung von Tumor-Markern wie z.B. CEA und CA-19-9 [21,33,34].

Bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom wird in vielen Kliniken nach Sonographie, CT und ggf. ERCP eine Beurteilung der Resektabilität vorgenommen. Ist eine Beurteilung der Resektabilität durch diese bildgebenden Verfahren nicht möglich, erfolgt meist eine explorative Laparotomie mit anschließender kurativer Resektion oder Palliation. In einigen Kliniken wird zuerst eine Laparoskopie zur Beurteilung der Resektabilität durchgeführt, jedoch ist der Einfluss einer Laparoskopie auf Wachstum und Metastasierung des Pankreaskarzinoms bisher ungeklärt. Bei Irresektabilität erfolgen gegebenenfalls als Palliation eine Stentimplantation in den Ductus choledochus, die Anlage einer biliodigestiven Anastomose, Blockade des Plexus coeliacus oder eine Gastroenterostomie [7,10,20,35,36].

Bei präoperativ diagnostizierter Resektabilität bedeutet die R0-Resektion des Tumors die einzige potentiell kurative Therapie des Pankreaskarzinoms. Überhaupt möglich ist dieser Ansatz jedoch nur bei 10-45% aller Patienten [6,37-40]. Die R0-Resektion wird dann als partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch/Whipple, als pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Longmire/Traverso bei Pankreaskopfkarzinomen oder als Pankreaslinksresektion bei Pankreasschwanzkarzinomen durchgeführt. Radikalere Resektionsverfahren wie z.B. die totale Pankreatektomie führen zu keiner signifikanten Prognoseverbesserung im Vergleich zu den oben genannten Verfahren bei gleichzeitig erhöhter Morbidität, weshalb sie zunehmend verlassen werden [3,7,10,41-45].

Für die meisten Patienten kommen nur palliative Therapien in Betracht, da ihr Pankreaskarzinom zu weit fortgeschritten und eine R0-Resektion nicht möglich ist. Verglichen mit der besten palliativ-unterstützenden Therapie mit Hauptschwerpunkt „*quality of life*“ [46,47] führen in den meisten bisherigen Studien sowohl die alleinige Chemo- als auch die alleinige Strahlentherapie nur zu einer geringen oder keiner Verlängerung der mittleren Überlebenszeit (MÜZ) bei meist erheblichen Nebenwirkungen [40,48,49]. Auch kombinierte Therapiekonzepte der Radio-Chemotherapie werden kontrovers diskutiert [50,51]. Die adjuvante Chemo- und Strahlentherapie konnte bei erheblichen Nebenwirkungen die Langzeitergebnisse nicht signifikant verbessern. Der Stellenwert der

neoadjuvanten Verfahren zur Erhöhung der Resektionsrate wird derzeit noch untersucht [35,38,52-57].

Aus diesen Gründen wird nach wirksameren Chemotherapeutika und neuen Therapiestrategien auch im Hinblick auf den „*clinical benefit*“, die klinisch erreichbare Verbesserungen der Lebensqualität des Patienten, noch intensiv gesucht [58-65].

1.1.1.4 Prognose des Pankreaskarzinoms

Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) beim Pankreaskarzinom beträgt lediglich 0,4-5% und weist damit von den 60 im *Annual Cancer Statistics Review* untersuchten Malignomen die schlechteste Prognose auf [3,6,7]. In den westlichen Ländern stellt das Pankreaskarzinom die viert- bis fünfhäufigste Todesursache bei bösartigen Neubildungen dar [5,7,9,10,39,66]. Nach Diagnosestellung beträgt die unkorrigierte mittlere Überlebenszeit (MÜZ) 3-5 Monate. Nach einem Jahr sind etwa 90% der Patienten verstorben [3,5,6,42,53]. Eine dauerhafte Heilung des Pankreaskarzinoms ist derzeit nur durch die R0-Resektion möglich. Die mittlere Überlebenszeit nach R0-Resektion beträgt jedoch nur 12-20 Monate und die 5-Jahres-Überlebensrate 10-38%. Hauptursachen für die ungünstige Prognose des Pankreaskarzinoms nach R0-Resektion sind das Auftreten eines Lokalrezidivs (70%) und/oder von Lebermetastasen (60%), welche meist innerhalb von 3-7 Monaten zum Tode führen [6,7,41,42,44,67-70].

1.1.2 Tiermodelle des Pankreaskarzinoms

1.1.2.1 Das Rattenmodell

Bei der Suche nach den Ursachen für das äußerst aggressive Wachstums- und Metastasierungsverhalten sowie nach möglichen Ansätzen für Therapien des Pankreaskarzinoms kommt Tiermodellen eine exponierte Rolle zu. Das Azaserin-induzierte Pankreaskarzinom der Ratte stellt hierbei das am längsten bekannte Tiermodell dar. Bei

Lewis- und Wistar-Ratten wird durch einmalige oder wiederholte intraperitoneale Injektion von Azaserin ein Pankreaskarzinom induziert [43,66,71,72]. Im Unterschied zum humanen Pankreaskarzinom treten im Rattenmodell nahezu ausschließlich azinäre Adenokarzinome auf. Beim Menschen liegen jedoch in 80% der Fälle duktale Adenokarzinome des Pankreas vor [43,71,72]. Aufgrund des unterschiedlichen biologischen Verhaltens beider Tumore sind Rückschlüsse auf das Geschehen im Menschen nur sehr begrenzt möglich und damit dieses Tumormodell für Studien wenig geeignet [71].

1.1.2.2 Das Hamstermodell

Beim Syrischen Hamster (*Mesocricetus auratus*) gelang es erstmalig 1974 der Arbeitsgruppe um Parviz Pour durch wiederholte subkutane Injektionen von 2,2'-Dihydroxy-di-N-propylnitrosamin (DIPN) duktale Adenokarzinome des Pankreas hervorzurufen [73]. Dabei war das simultane Auftreten von Malignomen in Respirationstrakt, Leber und Niere bei fast allen Tieren problematisch [73]. Durch Experimente mit anderen Nitrosaminderivaten gelangten sie zum N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP)-Modell [74]. BOP zeichnet sich durch eine fast 100%ige Pankreasspezifität. Die ersten Karzinome treten nach 15 Wochen auf, nach 30 Wochen erreicht man eine Inzidenz von 90-100% [74]. Die Tumoren sind bezüglich ihrer histologischen Eigenschaften (gute bis mäßige Differenzierung, Bildung duktaler und papillärer Strukturen, ausgeprägte Begleitdesmoplasie, neurale und lymphatische Infiltration) gut mit dem humanen dukталen Adenokarzinom des Pankreas vergleichbar. Sie entstehen multizentrisch. Etwa die Hälfte ist makroskopisch sichtbar [74,75]. Weitere Parallelen zum humanen Pankreaskarzinom stellen Gewichtsverlust, Ikterus, vaskuläre Thrombosen, Diarrhoe und Diabetes mellitus dar [43,71,72,74,75]. Durch die hohe Induktionsrate des Pankreaskarzinoms, die verhältnismäßig kurze Latenzzeit von etwa 15 Wochen und die gute Vergleichbarkeit des induzierten Karzinoms mit dem humanen Pankreaskarzinom wird das Hamstermodell des BOP-induzierten Pankreaskarzinoms derzeit als sinnvollstes Tumormodell für Studien am dukталen Adenokarzinom des Pankreas angesehen [72,74-76].

1.1.2.3 Modifikationen der Tiermodelle

Die bedeutendste Modifikation der Tiermodelle betrifft die Veränderung der Höhe der enteralen Fettzufuhr und der Zusammensetzung der Nahrungsfette [75,77]. Im Rattenmodell erhöhte sich mit dem Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Nahrung die Inzidenz von Pankreaskarzinomen. Diese Wirkung scheint vor allem auf Linolsäure (LA) zu beruhen, während z.B. Eicosapentaensäure (EPA) bei anderer Zusammensetzung der übrigen im Futter enthaltenen Fettsäuren diesen Effekt nicht zeigte [43,75,77].

Im Hamstermodell konnten für ungesättigte und gesättigte Fettsäuren auch in eigenen Studien prokarzinogene Effekte nachgewiesen werden, wobei sich Hinweise auf eine Erhöhung der Lipidperoxidation als Ursache ergaben. Der genaue Pathomechanismus wird derzeit untersucht [43,72,74,78-81].

Weitere Forschungsansätze wie z.B. Studien an Meerschweinchen, an transgenen Mäusen oder In-vitro-Modelle werden noch untersucht [82-85].

1.2 Lipidperoxidation und oxidativer Stress

1.2.1 Definition und Vorkommen von Lipidperoxidation und oxidativem Stress

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Entstehung höherer Lebensformen stellt die Fähigkeit dar, den durch die Photosynthese entstandenen Sauerstoff zur vollständigen und somit maximal effektiven Oxidation von Nahrungsstoffen zu verwenden. Aerob lebende Zellen sind dabei dem Sauerstoff selbst und den reaktionsfähigen Sauerstoffradikalen, Molekülen mit ungepaarten Außenelektronen, ausgesetzt. Die entscheidende Eigenschaft der Sauerstoffradikale ist ihre enorme Reaktivität und ihre Fähigkeit, Kettenreaktionen zu initiieren. Im weitesten Sinne bezeichnet man als Sauerstoffradikale die in Tabelle 1.1 aufgeführten Substanzen.

Formel	Name	Entstehung
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidradikal	Leukozytenaktivierung, Autooxidationsreaktionen, Elektronentransport
$\cdot\text{OH}$	Hydroxylradikal	Bildung aus dem Superoxidradikal
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff	Bildung aus Wasserstoffperoxid
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	nicht-enzymatische Bildung aus $\cdot\text{O}_2^-$, direkte Bildung aus O_2
$\text{RO}\cdot$	Lipidoxylradikal	Lipidperoxidationsprodukt
$\text{ROO}\cdot$	Lipidperoxyradikal	Lipidperoxidationsprodukt
ROOH	Lipidhydroperoxid	Lipidperoxidationsprodukt
$\text{R}\cdot$	Lipidradikal	Lipidperoxidationsprodukt

Tabelle 1.1: Sauerstoffradikale und ihre Entstehung [86,87]

Im Rahmen der Elektronentransportkette entstehen in den Mitochondrien nahezu jeder Körperzelle Wasserstoffperoxid, Superoxid- und Hydroxylradikale [88]. In hohem Maße entsteht Wasserstoffperoxid in Peroxisomen [89]. Bei der Aktivierung von Makrophagen während inflammatorischer Vorgänge steigt deren Sauerstoffverbrauch, wobei ca. 70% des aufgenommenen Sauerstoffs in Superoxidradikale umgewandelt werden [90,91]. Sowohl der Katecholaminmetabolismus als auch die Aktivierung der Arachidonsäurekaskade mit konsekutiver Eikosanoidsynthese führen zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies [92].

Sauerstoffradikale werden physiologisch durch die unten beschriebenen Mechanismen eliminiert und Schädigungen damit verhindert. Im Falle einer vermehrten Produktion und/oder einer gestörten Eliminierung kommt es durch Akkumulation der äußerst reaktiven Moleküle zu einer Vielzahl von Schädigungsprozessen. Der Lipidperoxidation (LPO) kommt dabei neben der Hydroxylierung von Nukleinsäuren und der Oxidation funktioneller Gruppen in Proteinen eine besondere Rolle zu. Die Lipidperoxidation findet als unspezifische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA) in den Phospholipiden verschiedener Membransysteme der betroffenen Zelle statt. Durch radikal-induzierte Wasserstoffabstraktion an α -Methylgruppen unkonjugierter Doppelbindungen entstehen Alkylradikale, die durch Umlagerungen unter Ausbildung konjugierter Doppelbindungen stabilisiert werden. Die dabei auftretende Änderung der Konstitution (Bindungsverhältnisse

im Molekül) und damit einhergehende sterische Veränderung des Moleküls führen zu einer ersten Störung des intermolekularen Gefüges der Membran. (Abbildung 1.1)

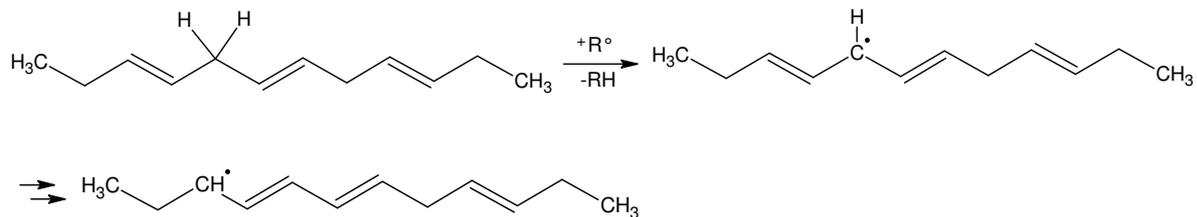


Abbildung 1.1: Peroxidation am Beispiel eines Alkens (Kettenstart)

Das Alkylradikal kann seinerseits Wasserstoff anderer Fettsäuren abstrahieren, wobei eine Fettsäure und ein anderes Alkylradikal, welches wiederum umlagert, entstehen oder es erfolgt eine Reaktion mit Sauerstoff, bei der ein Peroxyradikal entsteht. Bei Reaktion mit einer weiteren Fettsäure entstehen erneut ein Alkylradikal sowie ein Lipidhydroperoxid. (Abbildung 1.2)

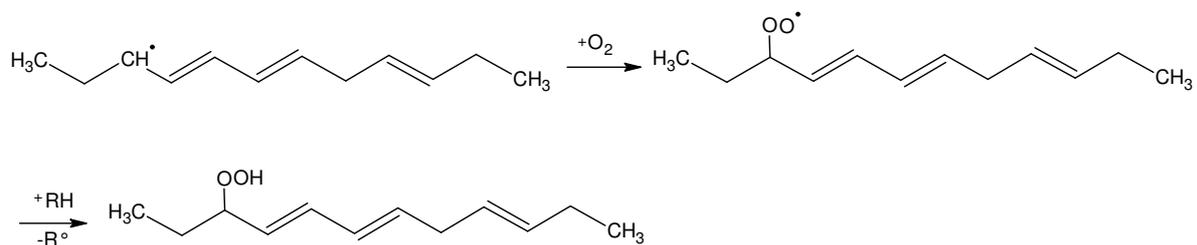


Abbildung 1.2: Peroxidation am Beispiel eines Alkens (Kettenende)

Dies kann wiederum zur Bildung von Peroxyradikalen, Endoperoxiden und Alkoxyradikalen führen. Wird diese radikalische Kettenreaktion nicht durch antioxidative Schutzmechanismen beendet, so führt sie zu Zersetzung der Lipide bis hin zu Kohlenwasserstoffen wie Ethan oder Pentan, welche ausgeschieden werden [93]. Die betroffene Membran wird zerstört und die Integrität der Organelle bzw. der Gesamtzelle aufgehoben. Währenddessen ebenfalls gebildete Endoperoxide können ihrerseits Kettenbrüche mit konsekutiver Entstehung von Aldehyden, wie z.B. Malondialdehyd oder 4-Hydroxynonenal, hervorrufen. Diese hochreaktiven Produkte besitzen analytische Bedeutung für die Beurteilung des Ausmaßes der Lipidperoxidation in einem Gewebe.

Durch Reaktionen mit Antioxidanzien und durch das Eingreifen enzymatischer Schutzmechanismen können die Kettenreaktionen unterbrochen werden [94].

1.2.2 Enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen

Neben der Kompartimentierung der meisten sauerstoffradikal-abhängigen Zellfunktionen verhindern enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen die oben beschriebenen Zellschädigungen.

Zum Beispiel ist als enzymatischer Schutzmechanismus in aeroben Zellen die Superoxiddismutase (SOD) aktiv. Die Isoenzyme der SOD liegen in einer zytosolischen und einer mitochondrialen Isoform vor und unterscheiden sich durch das Metall-Ion im aktiven Zentrum. Während die zytosolische SOD im aktiven Zentrum je ein Kupfer- und ein Zink-Ion enthält, befindet sich im aktiven Zentrum der mitochondrialen SOD ein Mangan-(III)-Ion. Die ansonsten spontan ablaufende Dismutation des Superoxidradikals zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff beschleunigt die SOD um den Faktor 10^9 [95].

Ein weiteres Beispiel enzymatischer Schutzmechanismen stellt in aeroben Zellen die Glutathionperoxidase (GSHPX) dar. Die GSHPX katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden.

Außerdem gehören zum enzymatischen Schutzsystem vor oxidativem Stress noch die Glutathion-S-Transferasen und die Katalase.

Den nicht-enzymatischen Schutz vor Schädigungen durch Sauerstoffradikale sichern unter anderem die Vitamine C und E. Vitamin C stellt ein Redoxsystem dar, welches die radikalische Kettenreaktion unterbricht, indem durch Oxidation ein inaktives Vitamin-C-Radikal gebildet wird, welches keine weiteren Schädigungen hervorruft. Über verschiedene Reduktionsmittel, wie reduzierendes Glutathion oder die NADH-abhängige Reduktase kann dann die Regeneration erfolgen. Vitamin E bildet mit Peroxyradikalen Tocopherolradikale, welche weiter zu Tocopherolchinonderivaten reagieren. Die daraus entstehenden stabilen polymeren Produkte sind nicht mehr schädigend. Der Einbau von Vitamin E in Membranen kann damit vor Lipidperoxidation schützen [96,97].

1.2.3 Die Rolle der Lipidperoxidation in der Karzinogenese und Metastasierung unter Berücksichtigung der Nahrungszusammensetzung

Die Ernährung spielt bei der Entstehung vieler maligner Tumore, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, eine bedeutende Rolle. Vor allem die Zusammensetzung der Fettsäuren scheint die Karzinogenese und Metastasierung vieler Malignome zu beeinflussen.

Unserer Arbeitsgruppe gelang im Hamstermodell des chemisch induzierten Pankreaskarzinoms der Nachweis einer durch Supplementierung von Linolsäure (LA) und Linolensäure (LnA) erhöhten Induktionsrate von Pankreaskarzinomen von 91% auf 100% und einer erhöhten Lebermetastasierung [80,81]. Sowohl in diesem als auch in anderen Tumormodellen und bei In-vitro-Experimenten konnten andere Arbeitsgruppen ebenso eine wachstumsfördernde Wirkung von LA auf die Tumorzellen nachweisen [98-101]. Für andere Fettsäuren wie z.B. γ -Linolensäure (GLnA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) dagegen konnten sowohl tierexperimentell als auch in vitro proliferationsinhibierende Effekte gezeigt werden [102]. In einigen Studien hatte auch LnA antiproliferative Effekte [102], während EPA in anderen Studien proliferationsfördernde Aktivität zeigte [99,101].

Die These, dass die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) der n-3-Serie vor allem antiproliferativ und die PUFA der n-6-Serie eher proliferationsfördernd wirken, wurde damit widerlegt; n-3-PUFA (EPA) haben wachstumsfördernde und n-6-PUFA (LnA) wachstumshemmende Eigenschaften gezeigt. Zwar beschrieben Hawkins et al., dass das Ausmaß der antiproliferativen Wirkung der PUFA mit der Anzahl der Doppelbindungen zunimmt [103], in anderen Studien war jedoch die nur 3-fach ungesättigte GLA wirksamer als die 6-fach ungesättigte DHA, so dass nicht von einem allgemeingültigen Phänomen ausgegangen werden kann bzw. eher das Verhältnis von Omega 3 zu Omega 6 Fettsäuren entscheidend zu sein scheint [66,77,99,100,104]. In eigenen Studien konnten wir mittlerweile durch die enterale Gabe von n-3 PUFA (Fischöl) makroskopisch eine Verminderung der Anzahl der Pankreaskarzinome und histologisch eine Verminderung der hepatischen Metastasierung nachweisen, wobei erhöhte Prostaglandinspiegel und

erniedrigte Leukotrienspiegel Hinweis für die Bedeutung der Lipidperoxidation als mögliche Ursache ergaben [153, 154].

Die Erforschung der genauen Ursache-Wirkungsprinzipien wird dadurch erschwert, dass bei normaler Ernährung des Menschen und der Versuchstiere in den Tiermodellen unterschiedliche Gemische aller PUFA vorliegen. Diese Gemische sind jedoch insofern notwendig, als dass LnA und LA essentielle Fettsäuren (EFA) sind, welche mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Aus diesen essentiellen Fettsäuren werden ihre Downstream-Metaboliten (EPA, DHA und Arachidonsäure [AA]) nur gebildet, wenn die Zelle zur Erzeugung von Doppelbindungen und zur Kettenverlängerung über Desaturasen und Elongasen verfügt. Hier liegt einer der derzeitigen Erklärungsansätze der antiproliferativen Wirkung bestimmter PUFA auf Tumorzellen. Tumorzellen exprimieren häufig keine Desaturasen und können somit die PUFA nicht weiter oxidieren [105,106]. Ihnen fehlt damit das Substrat zur Lipidperoxidation. Durch Zugabe von hoch ungesättigten Fettsäuren (HUFA) wie EPA oder DHA führt die Überbrückung dieses Stoffwechselweges zu einer exzessiven Produktion von Lipidsuperoxiden und nun sukzessive zum Zelltod [105,106]. Die Reproduzierbarkeit dieser Beobachtungen ist jedoch fraglich, da in bisherigen Studien Tumorzellen nur in geringem Ausmaß durch gesteigerte Lipidperoxidation geschädigt wurden [107]. Diese Ergebnisse könnten andererseits die oft fehlende antiproliferative Wirkung von weniger ungesättigten Fettsäuren (LA, LnA) erklären. Sie stellen schlechtere Substrate für die Lipidperoxidation dar und werden in den Tumorzellen nicht zu besseren Substraten umgebaut. Dennoch deuten viele Literaturergebnisse darauf hin, dass es bei einer Steigerung der Lipidperoxidation auch in Tumorzellen – selbst bei einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Lipidperoxiden – letztlich zu Membranschäden und zum Tumorzelltod kommt [105].

Der Einfluss von PUFA auf Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Invasion und die Etablierung von Metastasen (Metastasierungskaskade) bestehen aus einer Reihe gesonderter Schritte, von denen jeder einzelne durchlaufen werden muss. Dabei umfassen die wichtigsten Vorgänge unter anderem den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion im Primärtumor, die Invasion durch Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix, die Intravasation, die Verschleppung in der Zirkulation, das Überleben der dortigen Immunmechanismen, die

Adhäsion am Endothel mit darauf folgender Extravasation sowie der Etablierung sekundärer Foci mit Angiogenese und Neovaskularisation [105]. Einige Studien legen nahe, dass die Zell-Zell-Adhäsion im Tumor durch bestimmte PUFA stabilisiert und damit das Invasionspotential verringert wird, mit jedoch teilweise widersprüchlichen Ergebnissen [100,104,105]. Außerdem wird die Adhäsion der Tumorzellen an der extrazellulären Matrix durch PUFA erniedrigt, was zusätzlich die Invasivität senken könnte [100]. In einigen tierexperimentellen Studien wurde dementsprechend eine erniedrigte Anzahl von Tumorzellen in den peritumoralen Blutgefäßen gefunden [105]. Dieser Effekt ist bisher für EPA und DHA genauer untersucht worden [105]. Es sind jedoch Studien bekannt, die für bestimmte PUFA tierexperimentell oder in vitro eine Förderung des Invasionspotentials und der Metastasierung nachweisen konnten [80,98,99]. Die Relation zwischen PUFA, Invasivität und Metastasierung einerseits sowie Lipidperoxidation andererseits ist bislang nicht vollständig untersucht worden [105,108].

1.3 Cyclooxygenase und Lipoxygenase

1.3.1 Arachidonsäuremetabolismus und Eikosanoide

Auch für die Entstehung der Eikosanoide spielt die Zusammensetzung der Nahrungsfette eine Rolle. Eikosanoide sind Signalmoleküle, die in endokrinen Drüsen, im Immunsystem und bei der Onkogenese nachgewiesen werden können. Der In-vivo-Erzeugung der Eikosanoide liegt eine physiologisch enzymkatalysierte Lipidperoxidationsreaktion zugrunde.

Die Eikosanoide sind Derivate der mehrfach ungesättigten Arachidonsäure ($C_{20}H_{32}O_2$), welche aus einer Kette von 20 Kohlenstoffatomen mit 4 Doppelbindungen an jeweils der 5., 8., 11. und 14. Stelle besteht ($C_{20:4}$).

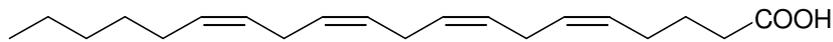


Abbildung 1.3: Arachidonsäure

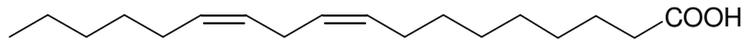


Abbildung 1.4: Linolsäure

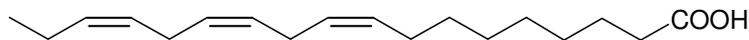


Abbildung 1.5: Linolensäure

Arachidonsäure wird im menschlichen und tierischen Organismus durch Desaturasen und Elongasen aus der essentiellen Linolsäure (C18:2) gebildet. Sie liegt vorwiegend als Membranphospholipid vor. Dieses Membranphospholipid besteht typischerweise aus einer gesättigten Fettsäure, der Arachidonsäure und Phosphatidylinositol, welche an Glycerin gebunden sind. Aus diesen Membranphospholipiden kann Arachidonat durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) abgespalten werden, was den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Arachidonsäurekaskade darstellt. Arachidonat kann nun entweder erneut in Membranphospholipide eingebaut oder über 2 Hauptwege weiter modifiziert werden. Ein Metabolisierungsweg führt über die Cyclooxygenasen zu den erstmals in der Prostata gefundenen Ringstrukturen, den Prostaglandinen, Thromboxanen und Prostacyclinen; der andere Hauptweg führt über die Lipoxygenasen zu den Leukotrienen [94,109-112].

1.3.2 Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase ist ein im endoplasmatischen Retikulum fast aller lebenden Zellen lokalisiertes Transmembranenzym und wird auch als Prostaglandin-H-Synthase oder COX bezeichnet. Sie katalysiert sowohl die Umwandlung von Arachidonsäure zum instabilen

Prostaglandin (PG) G_2 als auch die anschließende Reduktion des PGG_2 zum ebenfalls instabilen PGH_2 . Aus diesem PGH_2 können die Prostaglandine I_2 , E_2 und F_2 sowie das Thromboxan A_2 gebildet werden. Die Prostaglandine der Serie 1 (PG_1) entstehen aus der Eikosatriensäure, die der Serie 3 (PG_3) aus der Eikosapentaensäure. Die einzelnen Abkömmlinge des PGH_2 unterscheiden sich in der Position der einzelnen Hydroxyl- bzw. Ketogruppen und weisen die vielfältigsten, teilweise gegensätzlichen Wirkungen auf [94,109,111].

PGD_2 beispielsweise führt zu Bronchokonstriktion und wird daher mit der Entstehung von Asthma in Verbindung gebracht, wohingegen PGE_2 durch Erhöhung der cAMP-Konzentration eher eine Relaxierung der glatten Muskulatur hervorruft mit konsekutiver Erweiterung des Bronchialsystems, einer allgemeinen Vasodilatation und einer Relaxierung der Uterusmuskulatur. Außerdem hat PGE_2 im Magen durch Hemmung der HCl-Sekretion eine zytoprotektive Funktion und im Fettgewebe, diesmal durch Senkung des cAMP-Spiegels, nach Insulin die stärkste antilipolytische Wirkung. $PGF_{2\alpha}$ wiederum führt antagonistisch zu PGE_2 zu einer Bronchokonstriktion, einer Vasokonstriktion und einer auch klinisch genutzten Kontraktion der Uterusmuskulatur. PGI_2 , auch als Prostacyclin bezeichnet, entsteht vor allem in Gefäßendothelzellen aus $PGF_{2\alpha}$ und hemmt die Plättchenaggregation durch Aktivierung der Adenylatcyclase. Thromboxan dagegen entsteht bevorzugt in den Blutplättchen und induziert deren Aggregation über einen Abfall der cAMP-Konzentration in den Thrombozyten [94,109].

Letzteres ist nur ein Beispiel der möglichen pharmakologischen Ansatzpunkte. Für die Entdeckung, dass die Wirkung von Acetylsalicylsäure (ASS) auf der irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase beruht, erhielt J. A. Vane den Nobelpreis für Medizin. Eine wichtige Entdeckung war außerdem die Erkenntnis, dass es sich bei der in fast allen Zellen exprimierten Cyclooxygenase 1 (COX-1) nur um eine von 2 Isoformen handelt. Neben der COX-1 existiert eine zweite induzierbare Form. Diese Cyclooxygenase 2 (COX-2) spielt bei Entzündungen, Ovulation und Karzinogenese eine wichtige Rolle und wird unter anderem durch Hormone, Zytokine, Mitogene und Wachstumsfaktoren induziert. Eine gesteigerte COX-2-Aktivität wurde bei Patienten mit familiärer Polyposis coli gefunden, deren Polypen über die Jahre mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% maligne entarten. Bei diesen Patienten wurde unter Dauermedikation mit ASS eine deutlich verminderte Inzidenz von

Dysplasien in den Kolonpolypen gefunden. Nach weiteren Untersuchungen wurden erhöhte Werte der COX-2 außerdem in Tumoren von Kolon, Magen, Brust, Ösophagus, Lunge und schließlich auch beim Pankreaskarzinom gefunden.

Inwieweit nicht-steroidale Antiphlogistika durch Hemmung der Cyclooxygenase Tumorgenese und -verhalten beeinflussen können, wird derzeit intensiv untersucht [94,109,111-116].

1.3.3 Lipoxygenase

Der zweite Hauptweg des Arachidonsäuremetabolismus führt über Lipoxygenasen. Diese können in eukaryoten Zellen alle Doppelbindungen der Arachidonsäure hydroxylieren, greifen in der humanen Physiologie jedoch vor allem die Kohlenstoffatome der 5., 12. und 15. Bindungsstelle an und werden dementsprechend als Lipoxygenase 5 (LOX-5), 12 (LOX-12) oder 15 (LOX-15) bezeichnet. Die bisher am intensivsten studierte Lipoxygenase ist die für die Bildung der Leukotriene verantwortliche LOX-5. Ein zweites Helferprotein, das *5-lipoxygenase-activating protein* FLAP, präsentiert vermutlich der LOX-5 die Arachidonsäure, welche dann durch Hydroxylierung über die Hydroperoxyeikosatetraensäuren (5-HPETE) bzw. die Hydroeicosatetraen-Säuren (5-HETE) zur Bildung von Leukotrien A₄ als Ausgangssubstanz der weiteren Leukotriene führt. Durch eine Epoxydhydrolase entsteht dann Leukotrien B₄, durch Anlagerung von Glutathion das Leukotrien C₄ und daraus durch schrittweise Abspaltung von Glutamat und Glycin die Leukotriene D₄ und E₄ [94,109,111].

Leukotriene sind unter anderem Mediatoren von Entzündungsreaktionen. Bei dem als *slow reacting substance* (SRS) bekannten Agens, handelt es sich beispielsweise um ein Gemisch aus den Leukotrienen A₄, C₄, D₄ und E₄. Das Leukotrien B₄ hat einen chemotaktischen Effekt auf Leukozyten. Leukotrien C₄ ist 100- bis 1000-mal wirksamer als Histamin und spielt bei der Entstehung von Asthmaanfällen durch Bronchospasmus eine wichtige Rolle. Leukotriene führen außerdem zu erhöhter Kapillarpermeabilität und zu Ödemen. Die Metaboliten der Lipoxygenase 5, insbesondere 5-HETE, wirken auch als wachstumsstimulierende Faktoren für Tumoren, wie zum Beispiel von Prostata, Lunge und

Pankreas. Ihre physiologische Hauptfunktion und ihre Rolle in der Tumorprogression sind noch nicht endgültig geklärt [94,109,111,117-120].

1.3.4 Cyclooxygenase- und Lipoxygenasehemmstoffe

1.3.4.1 Entwicklung und gesicherte Indikationen für COX- und LOX-Inhibitoren

Entsprechend des oben beschriebenen Arachidonsäuremetabolismus besteht eine Möglichkeit der gleichzeitigen Inhibition der Cyclooxygenase und Lipoxygenase durch den Einsatz von Glucocorticoiden. Diese blockieren durch vermehrte Synthese eines Hemmpoteins der Phospholipase A₂, dem Lipocortin, die Freisetzung von Arachidonsäure und damit die Eikosanoidsynthese generell. Daraus leiten sich die verschiedenen Effekte, wie u. a. durch verminderte Synthese von Entzündungsmediatoren eine antiphlogistische und durch verminderte PG-Synthese eine ulzerogene Wirkung im Gastrointestinaltrakt, ab. Hemmstoffe der Cyclooxygenase wie zum Beispiel ASS (Acetylsalicylsäure), Metamizol (Pyrazolderivat) oder Paracetamol (p-Aminophenolderivat) haben sich in der Therapie von Entzündung, Schmerz und Fieber bewährt. Sie hemmen die COX entweder irreversibel wie ASS oder reversibel wie Metamizol und Paracetamol. Die nichtsteroidalen Antirheumatika NSAR (*non steroidal anti-inflammatory drugs* = NSAID) wirken mit unterschiedlicher Ausprägung antiphlogistisch, analgetisch und antipyretisch. Die irreversible Acetylierung vor allem der COX-1 durch ASS in niedriger Dosierung wird klinisch zur Prävention zerebraler Durchblutungsstörungen, bei koronarer Herzerkrankung, akutem Koronarsyndrom und zur Thrombose- und Embolieprophylaxe durch Thrombozytenaggregationshemmung genutzt. Auf der Inhibition der physiologisch wichtigen COX-1 beruhen ebenfalls einige unerwünschte Nebenwirkungen wie gastrointestinale Erosionen, Ulzera und Blutungen durch verminderte Zytprotektion und Störung der Magensaftsekretion, welche dann durch Gabe von Protonenpumpenhemmern oder Misoprostol, einem PGE₁ Analogon, verhindert bzw. therapiert werden sollten. Weiterhin können COX-Inhibitoren zu reduzierter renaler Durchblutung mit verminderter Na⁺-Ausscheidung, Wasserretention, Diureseverminderung bis hin zum akuten

Nierenversagen führen. Durch Reduzierung der bronchodilatatorisch wirkenden PG bei vermutlich vermehrter Arachidonsäureverstoffwechslung zu den bronchokonstriktorisch wirkenden Leukotrienen kann es zu Bronchokonstriktion oder zum so genannten, nicht nur bei ASS-Gabe möglichen, „Aspirin-Asthma“ kommen. Die bei der Dysmenorrhoe-Therapie erwünschte Kontraktionshemmung des Uterus ist während der Schwangerschaft und unter der Geburt unerwünscht. Die neuen selektiven COX-2-Hemmer wie Celebrex (Celecoxib) sind in der Therapie von chronischen Gelenkerkrankungen und Schmerzen ähnlich effektiv wie die herkömmlichen NSAR, weisen weniger gastrointestinale, jedoch erhöhte kardiovaskuläre Nebenwirkungen auf. Celebrex hat sich in der Therapie der chronischen Polyarthrit (rheumatoide Arthritis) und bei Reizzuständen degenerativer Gelenkerkrankungen (aktivierte Arthrosen) durchgesetzt. Neuere Studien weisen außerdem auf eine mögliche antitumorale Aktivität von Celebrex und anderen selektiven COX-2-Inhibitoren hin [112,113,116,121-123].

Erst spät wurde die Forschung auf die Lipoxygenase und deren mögliche Inhibition aufmerksam. Aus dem Wirkspektrum der Leukotriene ergeben sich die dementsprechenden klinischen Anwendungsmöglichkeiten. Zylflo (Zileuton) hemmt selektiv die LOX-5 und damit die Leukotriensynthese der Leukotriene B₄, C₄, D₄ und E₄. In den USA ist Zylflo zur Prophylaxe und Langzeittherapie des Asthma bronchiale zugelassen und anerkannt. Mit der Untersuchung der antiproliferativen Effekte von Zylflo und anderen LOX-Inhibitoren auf diverse Tumoren wurde erst kürzlich begonnen [111,117-120,124].

1.3.4.2 COX- und LOX-Inhibitoren beim Pankreaskarzinom

Im Jahre 1975 beobachteten Bennet und Tacca bei kolorektalen Tumoren eine höhere PGE₂ Produktion des malignen Gewebes gegenüber der umliegenden gesunden Schleimhaut. Sie stellten daraufhin die Hypothese auf, dass diese malignen Zellen durch die PGE₂ Überproduktion ihr eigenes Wachstum, die Invasivität und Metastasierung triggern. Dies führte zu einer Reihe von Experimenten, wobei die meisten NSAR (Aspirin, Indomethacin) die Entstehung chemisch induzierter kolorektaler Karzinome in Ratten und Mäusen verminderten. Epidemiologische Studien ergaben für den Menschen nach

regelmäßiger jahrelanger Einnahme von ASS eine 50%ige Reduktion der Wahrscheinlichkeit, an kolorektalen Tumoren zu erkranken. Die oben beschriebenen Nebenwirkungen lassen jedoch eine prophylaktische Einnahme von NSAR nicht sinnvoll erscheinen. Zusätzlich wurde seit Entdeckung der COX-2 beobachtet, dass diese vor allem in malignem Gewebe verstärkt exprimiert wird. Dies könnte ein Erfolg versprechender Forschungsansatz für COX-2 selektive Inhibitoren in der Tumorthherapie sein [112,113,116]. Auch die Lipoxigenase-5 wurde vermehrt in Tumorgewebe gefunden, ihr Metabolit 5-HETE konnte experimentell die Proliferation pankreatischer Tumorzellen stimulieren. Die Frage, ob selektive LOX-5-Inhibitoren die Tumorgenese und -verhalten beeinflussen können, wird derzeit intensiv untersucht [117-119,124,125].

1.4 Begründung und Erläuterung des Versuchsvorhabens

Sowohl das aggressive Wachstums- und Metastasierungsverhalten als auch die äußerst schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms lassen die Erforschung und Evaluierung alternativer Therapieverfahren dringlich erscheinen. Insbesondere Behandlungsformen, die die Überlebenszeit und die Lebensqualität der Patienten mit einem nicht mehr kurativ resektablen Tumor verbessern, müssen entwickelt werden.

Nur standardisierte Tumormodelle erscheinen für diesbezügliche tierexperimentelle Studien geeignet. Von den verfügbaren Tiermodellen eines soliden duktales Pankreaskarzinoms kommt die größte Bedeutung dem N-Nitrosobis-2-oxopropylamin-induzierten Pankreaskarzinom des Syrischen Goldhamsters zu. Dies liegt sowohl an der guten Durchführbarkeit der Tumorinduktion mit hohen Tumorinzidenzen als auch an der histologischen Ähnlichkeit der induzierten Pankreaskarzinome mit dem humanen duktales Adenokarzinom des Pankreas, welches 80-90% der exokrinen Pankreaskarzinome des Menschen ausmacht.

Um den Einfluss verschiedener Faktoren auf das Pankreaskarzinom besser untersuchen zu können, war es primär erforderlich, die Inzidenz von Pankreaskarzinomen in diesem Tumormodell von bis dato nur 91% zu erhöhen. Durch eine diätetische Modifikation, die Anhebung des Rohfettanteils der Nahrung auf 21,4% (versus 3,5% in

Hamsterstandardfutter) mit einem Linolsäureanteil im Futter von 11% und einem Linolensäureanteil im Futter von 2%, konnte die Inzidenz nun auf 100% gesteigert werden [80]. Diese, in den eigenen Vorstudien gegenüber dem nicht modifizierten Tiermodell signifikant gesteigerte Inzidenz, Invasivität und Metastasierung, ist höchstwahrscheinlich auf die gesteigerten Nahrungsanteile von Linolsäure und Linolensäure zurückzuführen. Da zwischen der Hochfetterernährung, der Lipidperoxidation und der Tumorgenese bzw. dem Tumorwachstum offensichtlich Zusammenhänge bestehen, erscheint die Untersuchung der Lipidperoxidation bei diesem Tiermodell sinnvoll. Neben der Inzidenz, der Anzahl pro Tier und der Größe der Pankreastumore soll das Ausmaß der Lipidperoxidation und die Aktivitäten der beiden wichtigsten antioxidativen Schutzenzyme sowohl in den tumorfreen Pankreasanteilen als auch in den Pankreastumoren selbst untersucht werden.

Darauf aufbauend kann somit unter standardisierten tierexperimentellen Bedingungen gezielt der Einfluss der Eikosanoide auf Tumorgenese und -verhalten durch selektive Inhibition der Cyclooxygenase 2, Lipoxygenase 5 und deren Kombination evaluiert werden. Die zugrunde liegende Hypothese ist dabei, dass die Therapie mit Inhibitoren der COX-2 und der LOX-5 einzeln und in Kombination zu einer Erniedrigung der intrapankreatischen Lipidperoxidation und/oder zu einer Steigerung der intratumoralen Lipidperoxidation führen und damit die Tumorgenese bzw. Invasivität vermindern könnte. Ziel ist es außerdem, den Einfluss der drei Therapiestrategien auf Tumorgenese und -verhalten quantitativ zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

2.1.1 Haltung der Tiere und Versuchsgruppen

120 männliche Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) im Alter von 8 Wochen (Harlan-Winkelmann, Deutschland) wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $[21\pm 5]^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $[70\pm 10]\%$, 10 Luftwechsel pro Stunde, 12h/12h Tag-/Nachtzyklus) 32 Wochen in Einzelkäfigen gehalten. Sie wurden nach einer Woche Akklimatisierungszeit randomisiert den in Tabelle 2.1 aufgeführten 8 Gruppen zugeordnet.

Gruppe	Tier-Anzahl	Tumorinduktion	Celebrex	Zyflo	Celebrex + Zyflo
1	15	nein	nein	nein	nein
2	15	nein	ja	nein	nein
3	15	nein	nein	ja	nein
4	15	nein	nein	nein	ja
5	15	ja	nein	nein	nein
6	15	ja	ja	nein	nein
7	15	ja	nein	ja	nein
8	15	ja	nein	nein	ja

Tabelle 2.1: Versuchsgruppen

2.1.2 Ernährung der Versuchstiere

Die Tiere der Versuchsgruppen 1-8 erhielten über den gesamten Versuchszeitraum Spezialfutter für Hamster, in dem der Rohfettanteil von standardmäßig 3% (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, Tabelle 2.2) auf 21,4% angehoben wurde (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, Tabelle 2.2).

Die verwendete Hochfetternährung hatte in eigenen Vorstudien zu einer signifikant höheren Inzidenz von Pankreastumoren sowie Lebermetastasierung im Vergleich zur mit Standardfutter ernährten Kontrollgruppe geführt [80]. Alle Tiere hatten Zugang zum Futter und zu Trinkwasser ad libitum.

Inhaltsstoff	Standardfutter	Hochfett-diät
Rohprotein	20,0%	16,5%
Rohfett	3,5%	21,4%
Rohfaser	8,0%	4,9%
Rohasche	6,5%	5,7%
Kalzium	1,0%	1,0%
Phosphor	0,7%	0,7%
Natrium	0,15%	0,15%
Magnesium	0,2%	0,2%
Kalium	1,0%	1,0%
Lysin	1,1%	1,1%
Glycin	1,0%	1,0%
Leucin	1,5%	1,5%
Arginin	1,4%	1,4%
Phenylalanin	1,0%	1,0%
Asparaginsäure	2,0%	2,0%
Glutaminsäure	3,9%	3,9%

Inhaltsstoff	Standardfutter	Hochfettdiät
Valin	1,0%	1,0%
Mangan	80mg/kg	80mg/kg
Kupfer	12mg/kg	12mg/kg
Zink	75mg/kg	75mg/kg
Jod	2mg/kg	2mg/kg
Eisen	220mg/kg	220mg/kg
Selen	0,2mg/kg	0,2mg/kg
Kobalt	2mg/kg	2mg/kg
Vitamin A	15.000IE/kg	15.000IE/kg
Vitamin D ₃	1.000IE/kg	1.000IE/kg
Vitamin E	100mg/kg	100mg/kg
Cholin	1.600mg/kg	1.600mg/kg
Nikotinsäure	60mg/kg	60mg/kg
Inosit	50mg/kg	50mg/kg

Tabelle 2.2: Inhaltsstoffe der Futtermischungen

Die gaschromatographisch ermittelten Anteile (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) derjenigen Fettsäuren mit den höchsten Anteilen in der Hochfettdiät und im Standardfutter sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Name (Trivialname)	Kurzformel	Anteil im Standardfutter [%]	Anteil in Hochfettdiät [%]
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
Eikosapentaensäure	C22:5	0,05	0,3
sonstige Fettsäuren	C8:0 bis C22:6	jeweils <0,05	jeweils <0,3

Tabelle 2.3: Anteil bedeutender Fettsäuren im Futter

2.1.3 Tumorinduktionsphase

Zur Induktion des duktales Adenokarzinoms des Pankreas wurden den Tieren der Versuchsgruppen 5-8 über einen Zeitraum von 16 Wochen 10mg/kg Körpergewicht N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP, Ash Stevens Chemicals Ltd., USA) wöchentlich subkutan interskapulär injiziert. BOP wurde dazu jeweils unmittelbar vor der Anwendung in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Deutschland) im Verhältnis von 3mg pro 1ml gelöst. Die Tiere der Versuchsgruppen 1-4 erhielten im Induktionszeitraum wöchentlich 0,5ml 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Deutschland) ebenfalls subkutan interskapulär injiziert. Alle Injektionen fanden unter einer kurzen Äthernarkose (Hoechst / Marion-Roussel GmbH, Deutschland) statt.

2.1.4 Therapiephase

An die 16-wöchige Tumorinduktionsphase schloss sich sofort die Therapiephase an, deren Dauer ebenfalls 16 Wochen betrug. Während dieser Phase wurden die Tiere der

Versuchsgruppen 1 und 5 nicht therapiert. Die Tiere der Versuchsgruppen 2 und 6 erhielten täglich 7mg Celebrex (Pfizer, Zürich, Schweiz) per os. Die Tiere der Versuchsgruppen 3 und 7 erhielten täglich 28mg Zyflo (Abbot, Chicago, USA) per os. Die Tiere der Versuchsgruppen 4 und 8 wurden mit der Kombination beider Präparate therapiert und erhielten somit täglich 7mg Celebrex und 28mg Zyflo per os.

Dabei wurden die Tiere der Gruppen 2, 4, 6 und 8 täglich per os mit 7mg Celebrex therapiert, was einer wöchentlichen Dosis von 49mg und einer Gesamtdosis von 784mg pro Hamster (bei einem durchschnittlichen Anfangskörpergewicht von ca. 120g) über 16 Wochen entspricht. Die Tiere der Gruppen 3, 4, 7 und 8 erhielten täglich per os 28mg Zyflo und damit 196mg je Woche und eine Gesamtdosis von 3136mg über 16 Wochen pro Hamster (bei einem durchschnittlichen Anfangskörpergewicht von ca. 120g).

2.2 Histologische Untersuchung

2.2.1 Obduktion

In der 33. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere unter einer Narkose mit Ursotamin (Serumwerk Bernburg GmbH, Deutschland) getötet und das jeweilige Körpergewicht ermittelt. Zur Obduktion wurde eine mediane Laparotomie vom Processus xiphoideus bis zum Penisansatz durchgeführt. Nach Inspektion aller Bauchorgane wurde die Bauchspeicheldrüse entnommen und gewogen.

Da die Versuchsgruppen 1-4 kein BOP erhalten hatten, war nicht mit dem Auftreten von Pankreaskarzinomen in diesen Gruppen zu rechnen. Von den Tieren dieser Versuchsgruppen wurde standardisiert eine Probe aus der Bauchspeicheldrüse ($[26\pm 9]$ mg) exzidiert und unverzüglich bei -80°C für die biochemischen Untersuchungen eingefroren.

Bei den mit BOP behandelten Tieren der Versuchsgruppen 5-8 wurden nach Entnahme der Bauchspeicheldrüse sowohl makroskopisch als auch auflichtmikroskopisch (neoLab Stereomikroskop, Eschenbach GmbH, Deutschland) die entnommenen Organe auf solide Raumforderungen kontrolliert. Aus tumorverdächtigen Läsionen der Bauchspeicheldrüse wurden Proben entnommen und für die histologische Untersuchung in 10%iges, gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) gegeben. Anschließend wurden die verdächtigen Herde aus der Bauchspeicheldrüse exzidiert, gesammelt ($[24\pm 13]$ mg) und für die biochemischen Untersuchungen unverzüglich bei -80°C eingefroren. Von makroskopisch und auflichtmikroskopisch unveränderten tumorfernen Pankreasanteilen wurden $[26\pm 9]$ mg pro Tier entnommen und ebenfalls unverzüglich bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Histologische Untersuchung

Die bei der Obduktion in Formaldehyd gegebenen Proben wurden nach Umbettung in Metallkassetten (Shandon Ltd., Großbritannien) im Entwässerungsautomaten Histokinette

2000 (Reichert-Jung GmbH, Deutschland) entwässert und anschließend auf der Gießstation TBS 88 (medite AG, Deutschland) mit Paraffin (Merck AG, Deutschland) überschichtet. Die nunmehr in Gewebekapseln (Shandon Ltd., Großbritannien) eingebetteten Paraffinblöcke wurden mit dem Rotationsmikrotom HM 350 (Microm GmbH, Deutschland) geschnitten, wobei Schnittdicken von 2-5µm gewählt wurden. Daraufhin erfolgte das Aufziehen auf Objektträger (Menzel Gläser KG, Deutschland) im Paraffin-Streckbad TFB 35 (medite AG, Deutschland). Die Objektträger wurden dann bei 75°C für 45 min im Brutschrank Modell 200 (Memmert GmbH, Deutschland) getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte unter dem Abzug Hyperclean (Shandon Ltd., Großbritannien) durch zweimaliges jeweils fünfminütiges Xylolbad (Baker, Niederlande) entparaffiniert. Nach Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) und Waschung in Aqua bidest erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (Merck AG, Deutschland) in typischer Technik. Nach nochmaliger Waschung in Aqua bidest wurde in aufsteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) die abschließende Entparaffinierung durchgeführt. Nach anschließendem Xylolbad (Baker, Niederlande) wurden die Schnitte mit Kanadabalsam (Merck AG, Deutschland) aufgehellt und die Deckgläser (Menzel Gläser GmbH, Deutschland) platziert. Die histologische Beurteilung fand mit dem Lichtmikroskop Kolleg SHB 45 (Eschenbach GmbH, Deutschland) statt.

Die Klassifizierung der aus den tumorverdächtigen Pankreasläsionen entnommenen Proben folgte den Kriterien nach Meijers et al. [126]. In die Berechnung der Induktionsrate wurden nur Tiere eingeschlossen, die ein invasives duktales Adenokarzinom des Pankreas aufwiesen.

2.3 Biochemische Untersuchungen

2.3.1 Chemikalien und Geräte

Die Bestimmung der GSHPX-Aktivität basierte auf der Methode nach Paglia und Valentine [127]. Dabei wurde der Testkit RANSEL (Randox Ltd., Großbritannien) verwendet, der als Mischsubstrat Xanthin und I.N.T. [(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchlorid] sowie einen 50mM CAPS-EDTA-Puffer und Xanthinoxidase (80U/l) enthielt.

Die Bestimmung der SOD-Aktivität folgte dem Prinzip von Beauchamp und Fridovich [128]. Hierbei wurde der Testkit RANSOD (Randox Ltd., Großbritannien) verwendet, in welchem das Reagenz (Glutathion + Glutathionreduktase + NADPH), ein 50mM Phosphat-EDTA-Puffer, 0,18mM Cumenhydroperoxid und Verdünnungsmittel enthalten waren.

Für die Proteinbestimmung nach Lowry [129] wurden die folgenden Chemikalien verwendet:

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

Für die Bestimmung der Lipidperoxidations-Produkte als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) wurden folgende Chemikalien verwendet:

- Acetatpuffer (pH=3,5) wurde aus 40%iger Essigsäure (aus analytisch reinem Eisessig; Merck AG, Deutschland) hergestellt, die mittels 5n Natronlauge (Merck AG, Deutschland) auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt und auf das doppelte Volumen aufgefüllt wurde,
- Malondialdehyd-Standard, hierfür wurde Malondialdehyd modifiziert nach Esterbauer und Haberland hergestellt, eine 10mM Lösung von Malondialdehydbisdiethylacetat

wurde in 1%iger Schwefelsäure eine Stunde inkubiert, um den Prozess der säurekatalysierten Hydrolyse weitgehend zu beenden,

- SDS (Natriumdodecylsulfat, 8,1%ige Lösung in Aqua dest; Serva GmbH, Deutschland),
- BHA (3-Tert-butyl-4-hydroxyanisol), 0,05mg/ml; Lösungsmittel: Ethanol-Wasser-Gemisch (1:1),
- n-Butanol (Merck AG, Deutschland).

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

Weiterhin wurden verwendet:

- Laborwaage Sartorius excellence (Sartorius AG, Deutschland),
- Schüttelmaschine (Labortechnik Ilmenau, Deutschland),
- Homogenisator Omni International 2000 (Digitana, Schweiz),
- Ultrahomogenisator Labsonic 1510 (B. Braun AG, Deutschland) und
- Zentrifuge T 23 (Janetzki, Polen).

2.3.2 Homogenatherstellung

Die bei der Obduktion unverzüglich nach der Entnahme eingefrorenen Proben von metastatischem und metastasenfreiem Pankreasgewebe aller Versuchsgruppen mussten vor den biochemischen Untersuchungen homogenisiert werden. Für die TBARS-Bestimmung wurde das Probenmaterial mit eiskalter 0,01% Butylhydroxyanisol enthaltender 140mmol/l Natriumchlorid-Lösung (Sigma Chemicals, Großbritannien) 4-mal je 15 Sekunden unter Kühlung homogenisiert. Für die GSHPX- und die SOD-Bestimmung wurde das Probenmaterial mit eiskaltem 0,1mol/l-Phosphatpuffer 4-mal je 15 Sekunden unter Kühlung homogenisiert. Die so erhaltenen Homogenate wurden bei -80°C gelagert und jeweils vor den Messungen 15 Sekunden rehomogenisiert.

2.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry

2.3.3.1 Prinzip

Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen violetten Komplex. Das darauf basierende Nachweisverfahren, die so genannte Biuret-Methode, weist jedoch nur eine mäßige Sensitivität auf. Außerdem benötigt man hierbei sehr umfangreiches Probenmaterial. Daher wurde nach Lowry eine Kombination der Biuret-Methode mit einer Reduktion von Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure (Folins Reagenz) zu Wolfram- respektive Molybdänblau durch die aromatischen Seitenketten des im Kupferkomplex gebundenen Tyrosins und Tryptophans angewendet [129].

2.3.3.2 Durchführung und Auswertung

Zunächst wurde die Gebrauchslösung hergestellt. Zuerst wurden 0,5ml Kupfersulfat-Lösung, 0,5ml Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung und 49ml Natriumkarbonat-Lösung zusammengegeben. Dann wurden 25 μl des vorher 1:100 verdünnten Gewebehomogenates mit 225 μl Aqua bidest versetzt und mit 1,5ml Gebrauchslösung 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden unter starkem Schütteln 150 μl Folins Reagenz dazugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurden die Proben bei folgenden Parametern spektrometrisch gemessen: 750nm Wellenlänge, 25°C, 0,5cm Küvettschichtdicke, Leerwert als Vergleichsprobe. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierfunktion.

2.3.4 Bestimmung der Gluthathionperoxidase-Aktivität (GSHPX)

2.3.4.1 Prinzip

Die Methode folgt dem Prinzip von Paglia und Valentine [127]. Die Gluthathionperoxidase (GSHPX) katalysiert dabei die Oxidation von Glutathion durch Cumenhydroperoxid, so dass durch Bildung einer Disulfidbrücke das oxidierte Glutathion (GSSG) entsteht. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von oxidiertem Glutathion und NADPH wird GSSG sofort reduziert, wobei NADPH oxidiert wird. Bei der hier verwendeten Methode wird diese Abnahme der NADPH-Extinktion gemessen.

2.3.4.2 Durchführung und Berechnung der Ergebnisse

Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.4 dargestellt.

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

Tabelle 2.4: Pipettierschema für die GSHPX-Aktivitätsmessung

Das Pipettieren erfolgte direkt in die Messküvette. Nach guter Durchmischung wurden die Proben bei folgenden Parametern gemessen: 340nm Wellenlänge, 37°C, 3 min Reaktionszeit, 0,5cm Küvettschichtdicke, Leerwert als Vergleichsprobe.

Der Berechnung der Ergebnisse liegt das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde:

$$\Delta E = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

mit ΔE - Extinktionsänderung,
 c - Konzentration
 d - Küvettschichtdicke.
 ε - Extinktionskoeffizienten,

wobei der Wert des Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 6,22 \cdot 10^3 \frac{l}{mol \cdot cm}$ konstant ist. Daraus lässt sich durch Umstellen die Konzentration c der Probe ermitteln:

$$c = \frac{\Delta E}{d \cdot \varepsilon}$$

Die Einführung eines Verdünnungsfaktors ermöglicht die Angabe des Proteingehalts der Proben in mg.

2.3.5 Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität (SOD)

2.3.5.1 Prinzip

Das auf der Methode von Beauchamp und Fridovich [128] basierende, hier angewandte Testkit beruht auf der Bildung von Superoxidradikalen durch Xanthin und Xanthinoxidase, welche mit I.N.T. zu einem roten Formazanfarbstoff reagieren. Die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) kann über den Grad der Inhibierung der oben genannten Reaktion bestimmt werden, da diese die Dismutation von Superoxidradikalen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert.

2.3.5.2 Durchführung und Berechnung der Ergebnisse

Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.5 dargestellt.

	Leerwertmessung	Probenmessung
Probe [μl]	0	95-5
Aqua bidest [μl]	100	5-95
Mischsubstrat [μl]	340	340
Xanthinoxidase [μl]	50	50

Tabelle 2.5: Pipettierschema für die SOD-Aktivitätsmessung

Die Proben wurden zunächst mit Aqua bidest soweit verdünnt, dass die Messwerte zwischen 30% und 60% Hemmung lagen. Das Pipettieren erfolgte direkt in die Küvette und nach gründlicher Durchmischung wurden die Messungen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 505nm Wellenlänge, 37°C, 3 min Reaktionszeit, 0,5cm Küvettschichtdicke, Leerwert als Vergleichsprobe.

Die Hemmung I wurde als:

$$I = \Delta E \cdot \frac{10^3}{\text{min}}$$

angegeben. Die Umrechnung in die prozentuale Hemmung I_P erfolgte gemäß:

$$I_P = 100 - \left(\frac{\left[\frac{\Delta E}{\text{min}} \cdot 100 \right]_{\text{PROBE}}}{\left[\frac{\Delta E}{\text{min}} \right]_{\text{LEERWERT}}} \right)$$

Die Aktivität a_{SOD} der SOD wurde als 50% der prozentualen Hemmung definiert:

$$a_{\text{SOD}} = \frac{1}{2} I_P$$

Ihre Angabe erfolgte in units U . Die so erhaltenen Werte wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

2.3.6 Bestimmung der Lipidperoxidations-Produkte

2.3.6.1 Prinzip

Das Prinzip dieser Messung wurde von Ohkawa beschrieben [130]. Lipidperoxidationsprodukte bilden hierbei mit Thiobarbitursäure (TBA) einen roten Polymethinfarbstoff, dessen Konzentration fluorimetrisch bestimmt wird. Die diese Reaktion eingehenden Lipidperoxidationsprodukte werden als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) bezeichnet. Die teilweise kritischen Aspekte dieser Meßmethode im Hinblick auf Art der Probengewinnung und -aufbewahrung sowie die nicht unproblematische Spezifität des Tests sind bekannt [131]. Allerdings wird nach Erfahrungen mit vorhergehenden Untersuchungen davon ausgegangen, dass artifizielle Veränderungen des TBARS-Levels durch strenge Standardisierung aller Arbeitsschritte (z.B. sehr schnelles Einfrieren der Gewebe nach Entnahme, Aufbewahrung der Proben in Flüssigstickstoff, Homogenisierung und Analyse in Gegenwart von Antioxidanzien) verhindert werden können.

2.3.6.2 Durchführung und Auswertung

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

2.4 Statistische Berechnungen

Alle Werte wurden als prozentuale Häufigkeiten oder als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Bei quantitativen Daten erfolgte ein Normalitätstest nach Shapiro und Francia. Bei normalverteilten Parametern wurden die Mittelwertvergleiche zwischen den Versuchsgruppen als Einfaktorielle Multivarianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Beim Vorliegen von vergleichbaren Varianzen in den Versuchsgruppen erfolgte die Post-Hoc-Korrektur nach dem Bonferroni-Modell. Lagen hingegen zwischen den Gruppen ungleiche Varianzen vor, wurde als Post-Hoc-Korrektur das Dunnett's-T3-Modell gewählt.

Bei nicht normalverteilten Parametern erfolgten die Mittelwertvergleiche zwischen den Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test. Bei Ablehnung der globalen Nullhypothese fanden die folgenden Einzelvergleiche zwischen den Gruppen als Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung der α -Fehlerkumulierung statt.

Die Vergleiche innerhalb einer Versuchsgruppe zwischen metastatischen und nicht-metastatischen Werten fanden bei Normalverteilung als T-Test für gepaarte Stichproben statt. Bei nicht normalverteilten Parametern wurden diese Vergleiche als Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Test durchgeführt.

Die kategoriellen Daten wurden aufgrund 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 9.2[®] für Windows98[®] statt.

3 Ergebnisse

3.1 Abschließende Körper- und Pankreasgewichte

Sowohl beim Körper- als auch beim Pankreasgewicht bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Gewichte sind in Tabelle 3.1 dargestellt [132].

Versuchsgruppe	Körpergewicht [g]	Pankreasgewicht [g]
1 [Hochfettdiät, ØBOP, ØTherapie]	110,20±10,24	0,95±0,21
2 [Hochfettdiät, ØBOP, Celebrex]	112,62±10,48	0,89±0,20
3 [Hochfettdiät, ØBOP, Zylflo]	117,71±11,49	1,02±0,28
4 [Hochfettdiät, ØBOP, Celebrex + Zylflo]	112,33±14,00	1,01±0,42
5 [Hochfettdiät, BOP, ØTherapie]	114,38±10,31	1,00±0,23
6 [Hochfettdiät, BOP, Celebrex]	117,09±11,55	1,57±1,41
7 [Hochfettdiät, BOP, Zylflo]	112,47±13,97	1,41±0,94
8 [Hochfettdiät, BOP, Celebrex + Zylflo]	111,36±8,38	1,06±0,49

Tabelle 3.1: Körper- und Pankreasgewichte (Mittelwert ± Standardabweichung)

3.2 Letalität während des Versuchszeitraums

Die Letalität in den Gruppen 1, 4 und 7 betrug 0%. In Gruppe 3 starb 1 Tier (6,7%), in Gruppe 2 starben 2 Tiere (13,3%). In den Gruppen 6 und 8 verstarben jeweils 4 Tiere (26,7%), wobei es sich, verglichen mit den Gruppen 1, 3, 4, und 7, um eine signifikant höhere Letalität handelt ($p < 0,05$ versus Gruppen 1, 3, 4, 7). In Gruppe 5 starben 7 Tiere

(46,7%, $p < 0,05$ versus alle anderen Gruppen), was eine signifikant höhere Letalität gegenüber allen anderen Gruppen bedeutet [132].

3.3 Makroskopie und Auflichtmikroskopie des Pankreas

Während der Obduktion konnten in den Gruppen 1-4 erwartungsgemäß keine Raumforderungen im Pankreas festgestellt werden. Die histologische Inzidenz von Pankreaskarzinomen in den Gruppen 5-8 betrug 100%. Dabei betrug die Inzidenz makroskopisch sichtbarer pankreatischer Raumforderungen 100% in Gruppe 5 (Kontrolle) und 81,8% in Gruppe 6 (Celebrex), wohingegen sie mit 53,3% in Gruppe 7 ($p < 0,05$ versus Gruppe 5) und mit 63,6% in Gruppe 8 ($p < 0,05$ versus Gruppe 5) erniedrigt waren. Die Häufigkeit makroskopisch sichtbarer pankreatischer Raumforderungen in den Gruppen 5-8 ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Histologisch wurden alle Tumoren als mäßig bis gering differenzierte duktale Adenokarzinome klassifiziert.

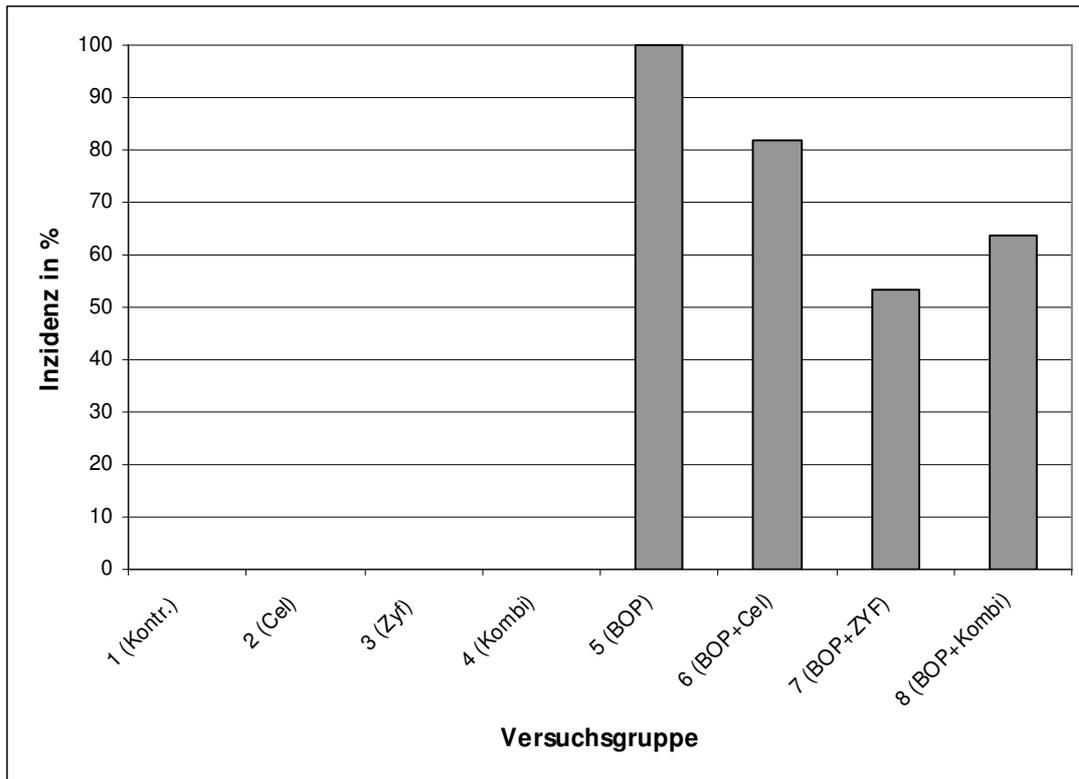


Abbildung 3.1: Inzidenz makroskopisch sichtbarer pankreatischer Raumforderungen (1-Kontrollgruppe; 2-Celebrex; 3-Zyflo; 4-Kombination aus Celebrex+Zyflo; 5-BOP; 6-BOP+Celebrex; 7-BOP+Zyflo; 8-BOP+Kombination aus Celebrex+Zyflo)

3.3.1. Größe der pankreatischen Raumforderungen

Versuchsgruppe	Größe der makroskopischen Pankreaskarzinome [mm ²]
5 [Hochfett-diät, BOP, ØTherapie]	59,25±12,6
6 [Hochfett-diät, BOP, Celebrex]	60,0±12,7
7 [Hochfett-diät, BOP, Zyflo]	13,25±7,46
8 [Hochfett-diät, BOP, Celebrex + Zyflo]	24,86±5,52

Tabelle 3.2: Größe der makroskopischen Pankreaskarzinome (Mittelwert ± Standardabweichung)

Die durchschnittliche Größe der makroskopischen Pankreaskarzinome bei den Tieren der Gruppen 5-8 ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Die Größe der makroskopischen Pankreskarzinome betrug $59,25 \pm 12,6 \text{ mm}^2$ in Gruppe 5 und $60,0 \pm 12,7 \text{ mm}^2$ in Gruppe 6. Nach Kombinationstherapie in Gruppe 8 ($24,86 \pm 5,52 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$) war die Größe erniedrigt. Die im Durchschnitt kleinsten makroskopischen Pankreskarzinome fanden sich nach alleiniger Therapie mit Zylflo in Gruppe 7 ($13,25 \pm 7,46 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$). (Tabelle 3.2)

Die Größe makroskopisch sichtbarer pankreatischer Raumforderungen in den Gruppen 5, 6, 7 und 8 ist in Abbildung 2 dargestellt [132].

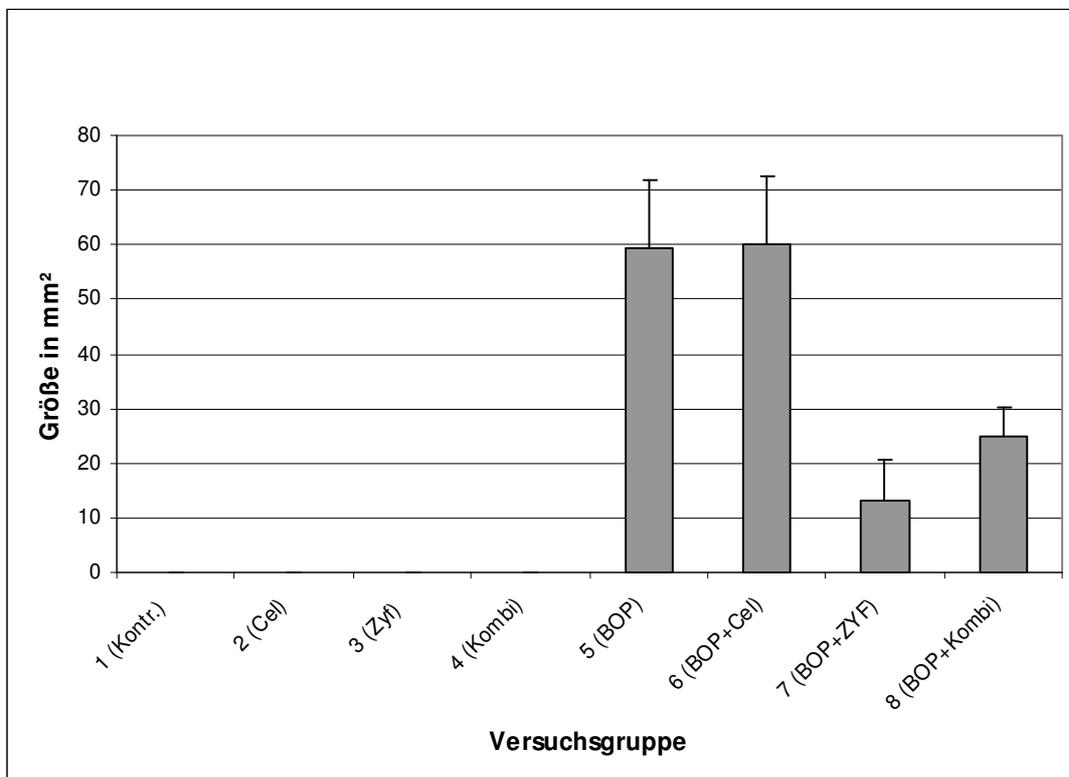


Abbildung 3.2: Größe makroskopisch sichtbarer pankreatischer Raumforderungen [mm²], (Mittelwert ± Standardabweichung)
(1-Kontrollgruppe; 2-Celebrex; 3-Zyflo; 4-Kombination aus Celebrex+Zyflo; 5-BOP; 6-BOP+Celebrex; 7-BOP+Zyflo; 8-BOP+Kombination aus Celebrex+Zyflo)

3.4 Histologische Ergebnisse

3.4.1 Klassifikation der Raumforderungen im Pankreas

Die Klassifikation erfolgte nach den Kriterien von Meijers et al. [126]. Innerhalb aller untersuchten Raumforderungen konnten invasiv wachsende Anteile duktaler Adenokarzinome nachgewiesen werden. Zusätzlich fanden sich in nahezu jedem Präparat Vorstufen wie papilläre und/oder duktale Hyperplasien, atypische Hyperplasien und In-situ-Karzinome. Weiterhin konnten häufig eine Begleitdesmoplasie sowie eine unterschiedlich stark ausgeprägte inflammatorische Komponente beobachtet werden. Ein typisches mikroskopisches Bild in verschiedenen Vergrößerungen zeigen die Abbildung 3.3 und die Abbildung 3.4 [132].

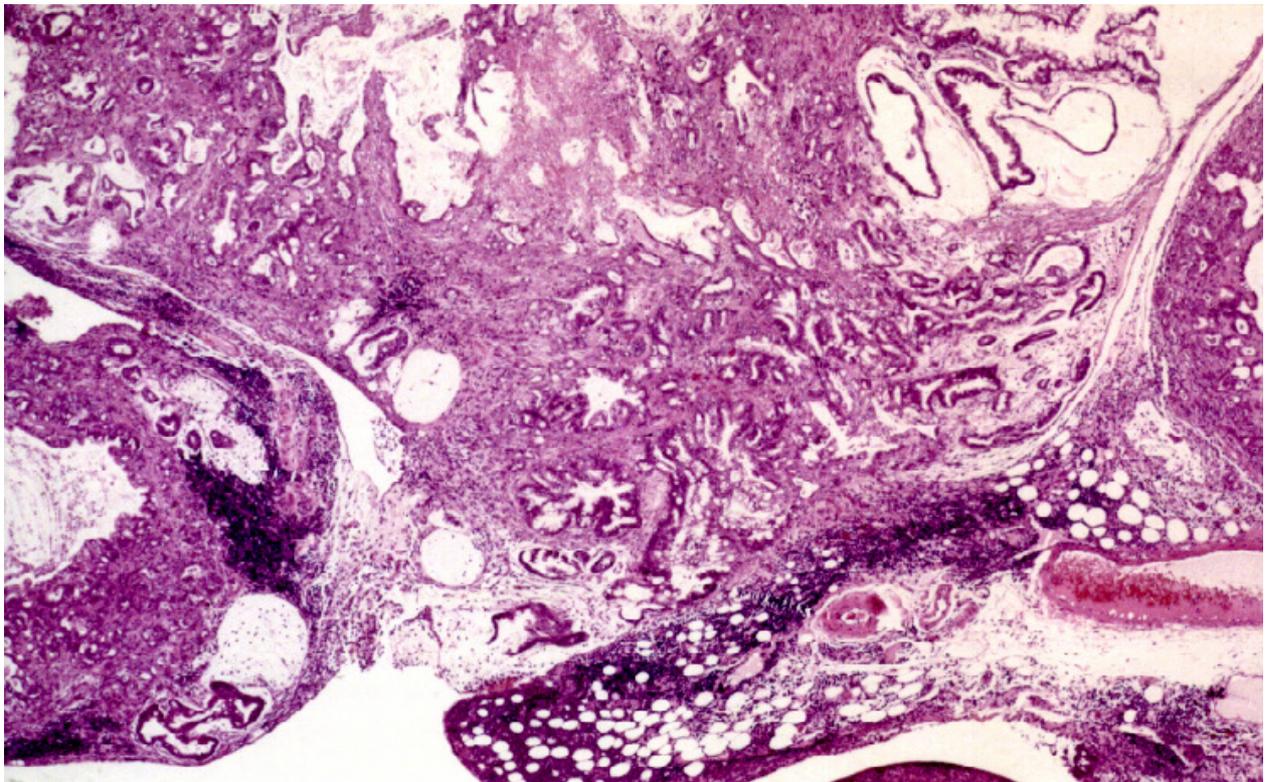


Abbildung 3.3: Pankreaskarzinom, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung

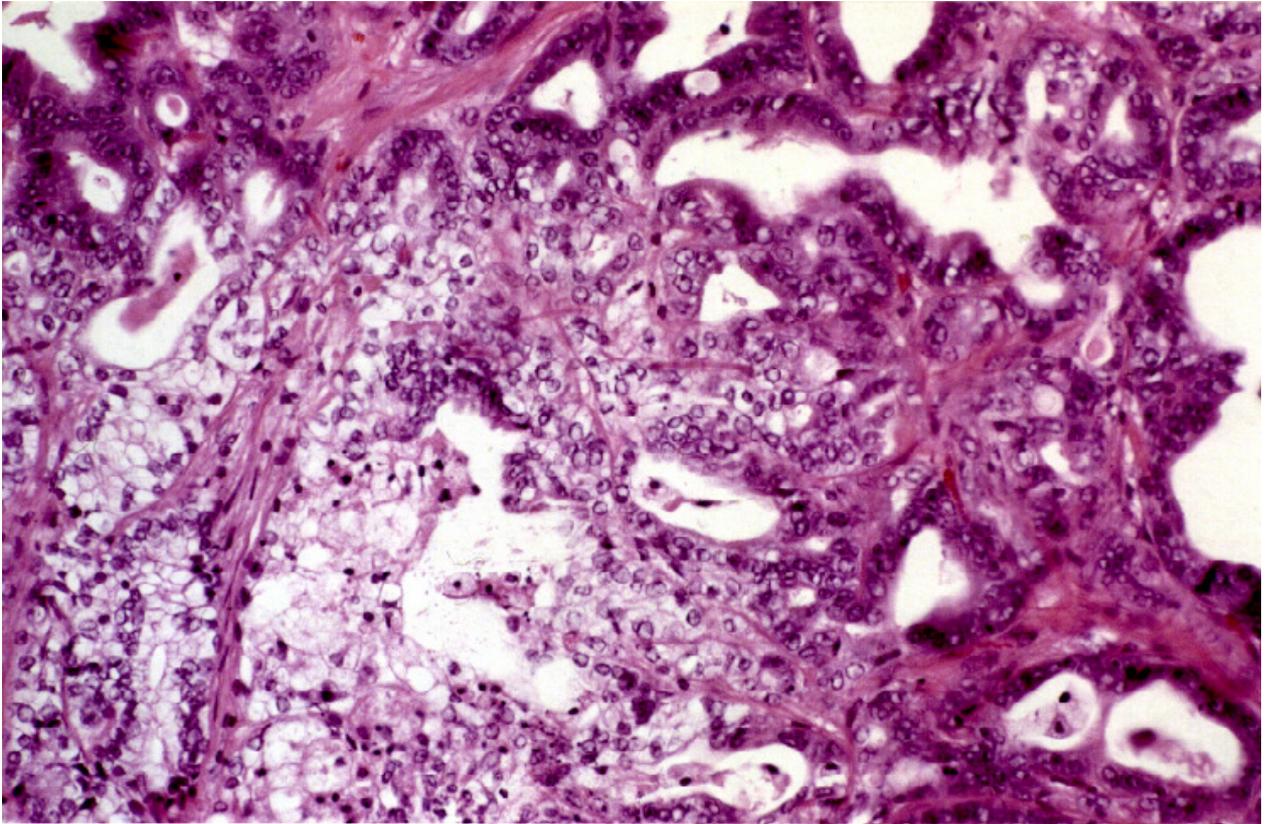


Abbildung 3.4: Pankreaskarzinom, HE-Färbung, 40fache Vergrößerung

3.5 Biochemische Ergebnisse

3.5.1 Eiweißgehalt

Der in den tumorfreien Pankreasanteilen gemessene Proteingehalt ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Der in den Pankreaskarzinomen gemessene Proteingehalt ist ebenfalls in Tabelle 3.3 dargestellt. Hier fanden sich gegenüber den Gruppen 6, 7 und 8 (Gruppe 6: $[8,35 \pm 6,23]$ mg/ml; Gruppe 7: $[9,97 \pm 4,25]$ mg/ml; Gruppe 8: $[9,49 \pm 3,5]$ mg/ml) geringere Proteinwerte in der Gruppe 5 ($[4,97 \pm 3,1]$ mg/ml; $p < 0,05$ versus Gr. 6-8). Beim Vergleich des intratumoralen mit dem Proteingehalt in den tumorfreien Pankreasanteilen innerhalb der betreffenden Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt ($p > 0,05$).

Versuchsgruppe	Proteingehalt in tumorfreien Pankreasanteilen [mg/ml]	Proteingehalt in Pankreaskarzinomen [mg/ml]
1 [Hochfettdiät, ØBOP, ØTherapie]	7,31±6,17	
2 [Hochfettdiät, ØBOP, Celebrex]	5,28±4,51	
3 [Hochfettdiät, ØBOP, Zylflo]	5,13±5,37	
4 [Hochfettdiät, ØBOP, Celebrex + Zylflo]	8,19±6,6	
5 [Hochfettdiät, BOP, ØTherapie]	6,38±4,53	4,97±3,1
6 [Hochfettdiät, BOP, Celebrex]	7,01±5,15	8,35±6,23
7 [Hochfettdiät, BOP, Zylflo]	2,99±2,35	9,97±4,25
8 [Hochfettdiät, BOP, Celebrex + Zylflo]	5,08±2,69	9,49±3,5

Tabelle 3.3: Proteingehalt in tumorfreien Pankreasanteilen und in Pankreaskarzinomen (Mittelwert ± Standardabweichung)

3.5.2 Gluthationperoxidase-Aktivität (GSHPX)

Versuchsgruppe	GSHPX-Aktivität in tumorfreien Pankreasanteilen [10 ⁵ U/mg Eiweiß]	GSHPX-Aktivität in Pankreaskarzinomen [10 ⁵ U/mg Eiweiß]
1 [Hochfett-diät, ØBOP, ØTherapie]	8,72±3,89	
2 [Hochfett-diät, ØBOP, Celebrex]	12,79±7,73	
3 [Hochfett-diät, ØBOP, Zyflo]	13,99±7,46	
4 [Hochfett-diät, ØBOP, Celebrex + Zyflo]	11,12±8,77	
5 [Hochfett-diät, BOP, ØTherapie]	2,76±1,24	0,54±0,19
6 [Hochfett-diät, BOP, Celebrex]	2,44±1,68	5,18±1,45
7 [Hochfett-diät, BOP, Zyflo]	33,2±6,59	7,16±1,18
8 [Hochfett-diät, BOP, Celebrex + Zyflo]	25,3±3,99	5,45±0,98

Tabelle 3.4: Gluthationperoxidase-Aktivität (GSHPX) in tumorfreien Pankreasanteilen und in Pankreaskarzinomen (Mittelwert ± Standardabweichung)

Die GSHPX-Aktivität in tumorfreien Pankreasanteilen der Gruppen 1-4 unterschied sich nicht signifikant voneinander (Gruppe 1: [8,72±3,89]*10⁵ U/mg; Gruppe 2: [12,79±7,73]*10⁵ U/mg; Gruppe 3: [13,99±7,46]*10⁵ U/mg; Gruppe 4: [11,12±8,77]*10⁵ U/mg Eiweiß). Die niedrigsten GSHPX-Aktivitäten in den tumorfreien Pankreasanteilen wurden in der Gruppe 5 ([2,76±1,24]*10⁵ U/mg Eiweiß) und Gruppe 6 ([2,44±1,68]*10⁵ U/mg Eiweiß) (jeweils p<0,05 versus alle anderen Gruppen) gefunden. Andererseits waren die GSHPX-Aktivitäten in den tumorfreien Pankreasanteilen der Gruppe 7 ([33,2±6,59]*10⁵ U/mg Eiweiß) und Gruppe 8 ([25,3±3,99]*10⁵ U/mg Eiweiß) (jeweils p<0,05 versus alle anderen Gruppen) erhöht.

Die GSHPX-Aktivität in tumorfreien Pankreasanteilen ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

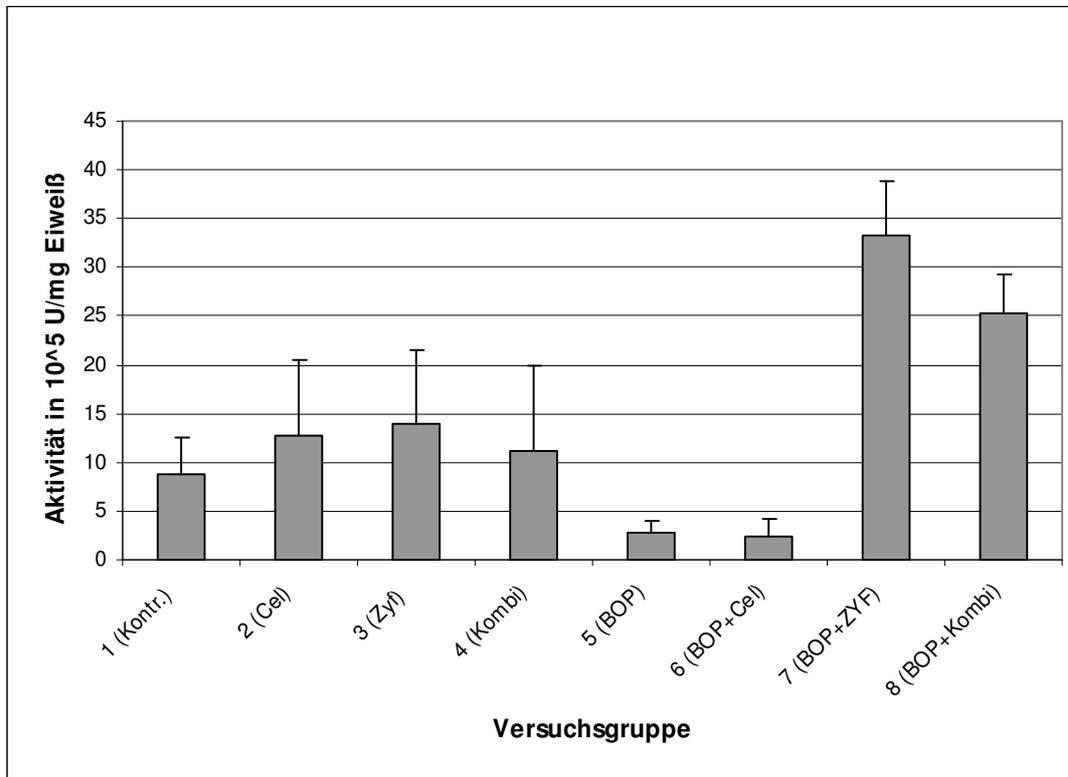


Abbildung 3.5: Glutathionperoxidase-Aktivität (GSHPX) in den tumorfreien Pankreasanteilen (Mittelwert \pm Standardabweichung)
 (1-Kontrollgruppe; 2-Celebrex; 3-Zyflo; 4-Kombination aus Celebrex+Zyflo; 5-BOP; 6-BOP+Celebrex; 7-BOP+Zyflo; 8-BOP+Kombination aus Celebrex+Zyflo)

In Pankreaskarzinomen wurde die niedrigste GSHPX-Aktivität in der Kontrollgruppe 5 ($[0,54 \pm 0,19] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß), verglichen mit den Gruppen 6 ($[5,18 \pm 1,45] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß), 7 ($[7,16 \pm 1,18] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß) und 8 ($[5,45 \pm 0,98] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß), gefunden ($p < 0,05$ versus Gruppen 6-8). In den Gruppen 5, 7 und 8 waren die GSHPX-Aktivitäten in den Pankreaskarzinomen signifikant geringer als die GSHPX-Aktivitäten in den tumorfreien Pankreasanteilen derselben Tiere. Eine Ausnahme bildeten die Tiere der Gruppe 6, deren GSHPX-Aktivitäten in den Pankreaskarzinomen gegenüber den GSHPX-Aktivitäten in den tumorfreien Pankreasanteilen derselben Tiere signifikant erhöht waren.

Die GSHPX-Aktivität in Pankreaskarzinomen ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

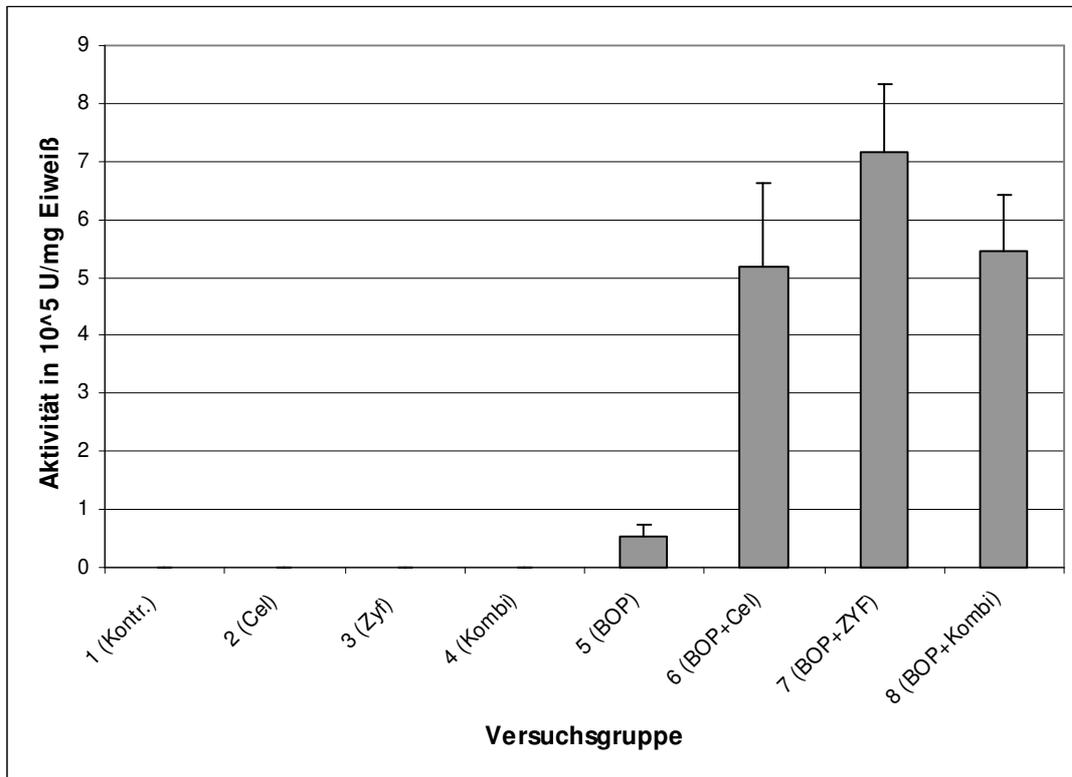


Abbildung 3.6: Glutathionperoxidase-Aktivität (GSHPX) in Pankreaskarzinomen (Mittelwert ± Standardabweichung)
 (1-Kontrollgruppe; 2-Celebrex; 3-Zyflo; 4-Kombination aus Celebrex+Zyflo; 5-BOP; 6-BOP+Celebrex; 7-BOP+Zyflo; 8-BOP+Kombination aus Celebrex+Zyflo)

3.5.3 Superoxiddismutase-Aktivität (SOD)

Versuchsgruppe	SOD-Aktivität in tumorfreien Pankreasanteilen [U/mg Eiweiß]	SOD-Aktivität in Pankreaskarzinomen [U/mg Eiweiß]
1 [Hochfettdiät, ØBOP, ØTherapie]	79,63±44,84	
2 [Hochfettdiät, ØBOP, Celebrex]	93,11±47,69	
3 [Hochfettdiät, ØBOP, Zylflo]	134,31±61,37	
4 [Hochfettdiät, ØBOP, Celebrex + Zylflo]	93,88±41,44	
5 [Hochfettdiät, BOP, ØTherapie]	68,69±38,59	53,28±25,82
6 [Hochfettdiät, BOP, Celebrex]	44,68±32,99	77,22±21,45
7 [Hochfettdiät, BOP, Zylflo]	333,77±68,79	25,03±10,65
8 [Hochfettdiät, BOP, Celebrex + Zylflo]	212,10±49,87	27,77±11,79

Tabelle 3.5: SOD-Aktivität in den tumorfreien Pankreasanteilen

Die Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) in den tumorfreien Pankreasanteilen unterschied sich in den Gruppen 1 bis 5 nicht signifikant voneinander (Gruppe 1: [79,63±44,84] U/mg Eiweiß; Gruppe 2: [93,11±47,69] U/mg Eiweiß; Gruppe 3: [134,31±61,37] U/mg Eiweiß; Gruppe 4: [93,88±41,44] U/mg Eiweiß; Gruppe 5: [68,69±38,59] U/mg Eiweiß). In den Gruppen 7 ([333,77±68,79] U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) und 8 ([212,10±49,87] U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) hingegen war die SOD-Aktivität in den tumorfreien Pankreasanteilen erhöht.

Die SOD-Aktivität in tumorfreien Pankreasanteilen ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

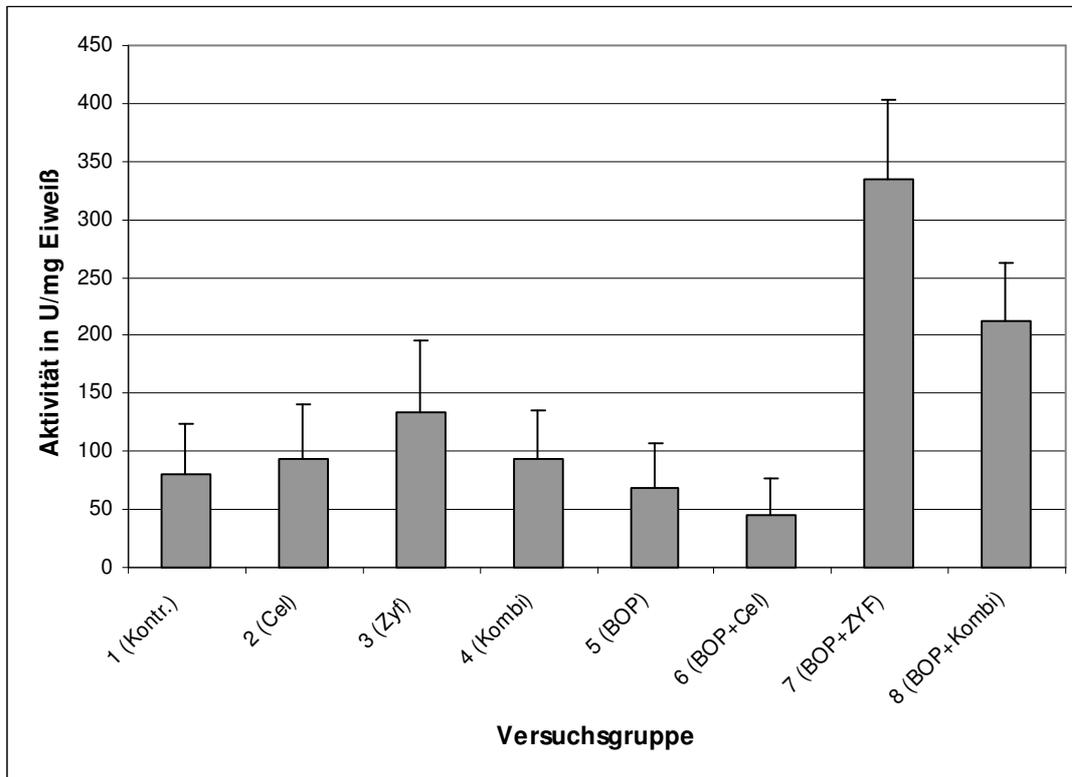


Abbildung 3.7: SOD-Aktivität in tumorfreien Pankreasanteilen (Mittelwert \pm Standardabweichung) (1-Kontrollgruppe; 2-Celebrex; 3-Zyflo; 4-Kombination aus Celebrex+Zyflo; 5-BOP; 6-BOP+Celebrex; 7-BOP+Zyflo; 8-BOP+Kombination aus Celebrex+Zyflo)

Die SOD-Aktivität in den Pankreaskarzinomen unterschied sich in den Gruppen 5, 7 und 8 nicht signifikant voneinander (Gr. 5: $[53,28 \pm 25,82]$ U/mg Eiweiß; Gr. 7: $[25,03 \pm 10,65]$ U/mg Eiweiß und Gr. 8: $[27,77 \pm 11,79]$ U/mg Eiweiß). Verglichen mit den Gruppen 7 und 8 war die SOD-Aktivität in den Pankreaskarzinomen nach Therapie mit Celebrex in der Gruppe 6 ($[77,22 \pm 21,45]$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) erhöht.

Die SOD-Aktivität in Pankreaskarzinomen ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

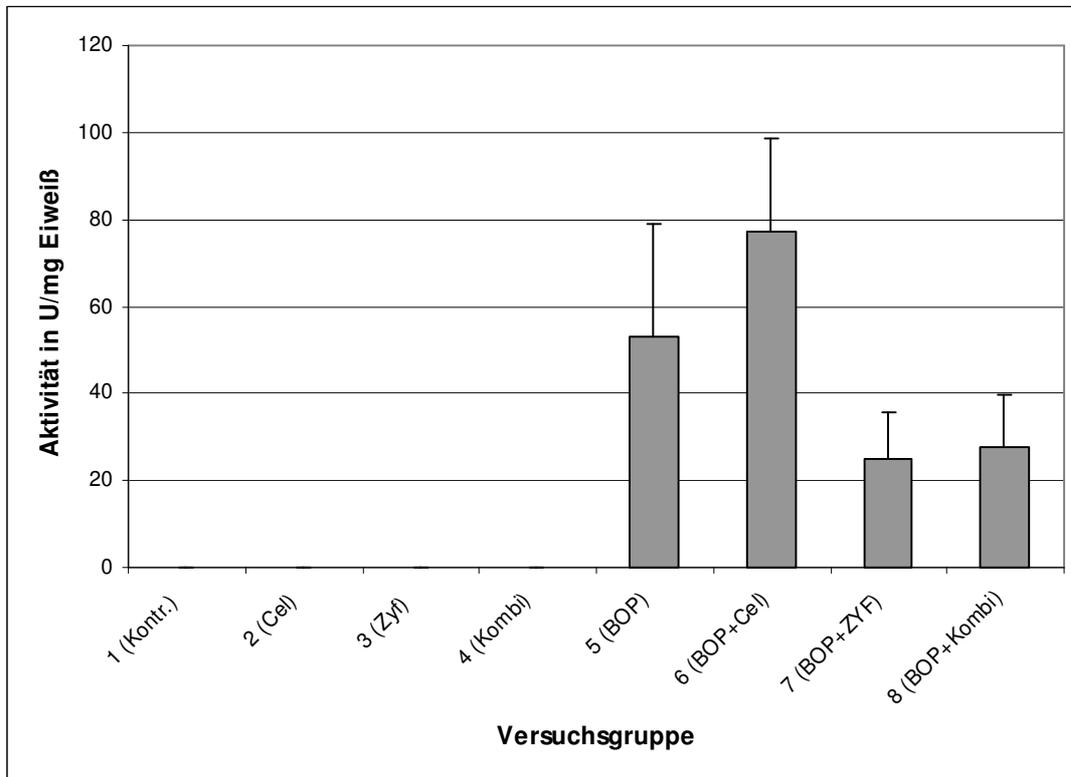


Abbildung 3.8: SOD-Aktivität in Pankreaskarzinomen (Mittelwert \pm Standardabweichung)
 (1-Kontrollgruppe; 2-Celebrex; 3-Zyflo; 4-Kombination aus Celebrex+Zyflo; 5-BOP;
 6-BOP+Celebrex; 7-BOP+Zyflo; 8-BOP+Kombination aus Celebrex+Zyflo)

Der Vergleich der SOD-Aktivitäten in den Pankreaskarzinomen und in den tumorfreien Pankreasanteilen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Gruppe 5. In Gruppe 6 jedoch war die SOD-Aktivität in den Pankreaskarzinomen höher als in den tumorfreien Pankreasanteilen, wohingegen in den Gruppen 7 und 8 die SOD-Aktivität in den Pankreaskarzinomen niedriger als in den tumorfreien Pankreasanteilen war.

3.5.4 Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten

Versuchsgruppe	TBARS-Konzentration in tumorfreien Pankreasanteilen [nmol/mg Eiweiß]	TBARS-Konzentration in Pankreaskarzinomen [nmol/mg Eiweiß]
1 [Hochfettdiät, ØBOP, ØTherapie]	35,37±27,45	
2 [Hochfettdiät, ØBOP, Celebrex]	39,64±29,22	
3 [Hochfettdiät, ØBOP, Zylflo]	52,35±31,88	
4 [Hochfettdiät, ØBOP, Celebrex + Zylflo]	33,04±27,17	
5 [Hochfettdiät, BOP, ØTherapie]	84,61±18,33	17,15±5,23
6 [Hochfettdiät, BOP, Celebrex]	32,69±7,72	14,22±4,91
7 [Hochfettdiät, BOP, Zylflo]	12,85±3,77	29,93±5,27
8 [Hochfettdiät, BOP, Celebrex + Zylflo]	23,57±6,96	22,96±4,94

Tabelle 3.6: TBARS-Konzentration in tumorfreien Pankreasanteilen

Die Konzentrationen von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS), einem Lipidperoxidationsprodukt, in den tumorfreien Pankreasanteilen der Gruppen 1-4, 6 und 8 (Gr. 1: [35,37±27,45] nmol/mg; Gr. 2: [39,64±29,22] nmol/mg; Gr. 3: [52,35±31,88] nmol/mg; Gr. 4: [33,04±27,17] nmol/mg; Gr. 6: [32,59±7,72] nmol/mg und Gr. 8: [23,57±6,96] nmol/mg Eiweiß) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Verglichen mit den Gruppen 1, 2, 4, 6, 7 und 8 war sie in Gruppe 5 ([84,61±18,33] nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) erhöht. Andererseits war die TBARS-Konzentration in den tumorfreien Pankreasanteilen in Gruppe 7 ([12,85±3,77] nmol/mg Eiweiß), verglichen mit den Gruppen 5, 6 und 8 ($p < 0,05$), erniedrigt.

Die TBARS-Konzentrationen in den tumorfreien Pankreasanteilen sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

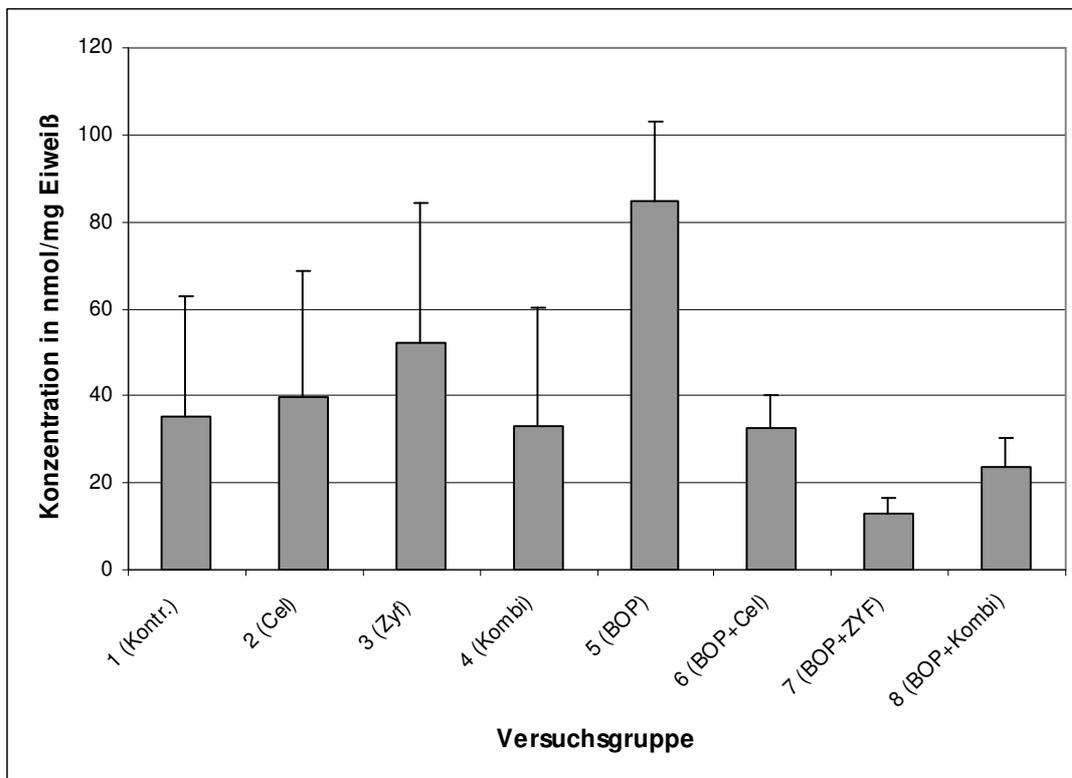


Abbildung 3.9: TBARS-Konzentration in tumorfreien Pankreasanteilen (Mittelwert ± Standardabweichung)
 (1-Kontrollgruppe; 2-Celebrex; 3-Zyflo; 4-Kombination aus Celebrex+Zyflo; 5-BOP; 6-BOP+Celebrex; 7-BOP+Zyflo; 8-BOP+Kombination aus Celebrex+Zyflo)

In Pankreaskarzinomen unterschieden sich die TBARS-Konzentrationen zwischen den Gruppen 5 und 6 (Gr. 5: [17,15±5,23] nmol/mg und Gr. 6: [14,22±4,91] nmol/mg Eiweiß) nicht signifikant voneinander. Verglichen mit Gruppe 6 war sie in Gruppe 8 ([22,96±4,94] nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) erhöht. Die höchste TBARS-Konzentration in allen vier Gruppen wurde in Gruppe 7 ([29,93±5,27] nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) gefunden.

Die TBARS-Konzentration in Pankreaskarzinomen ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

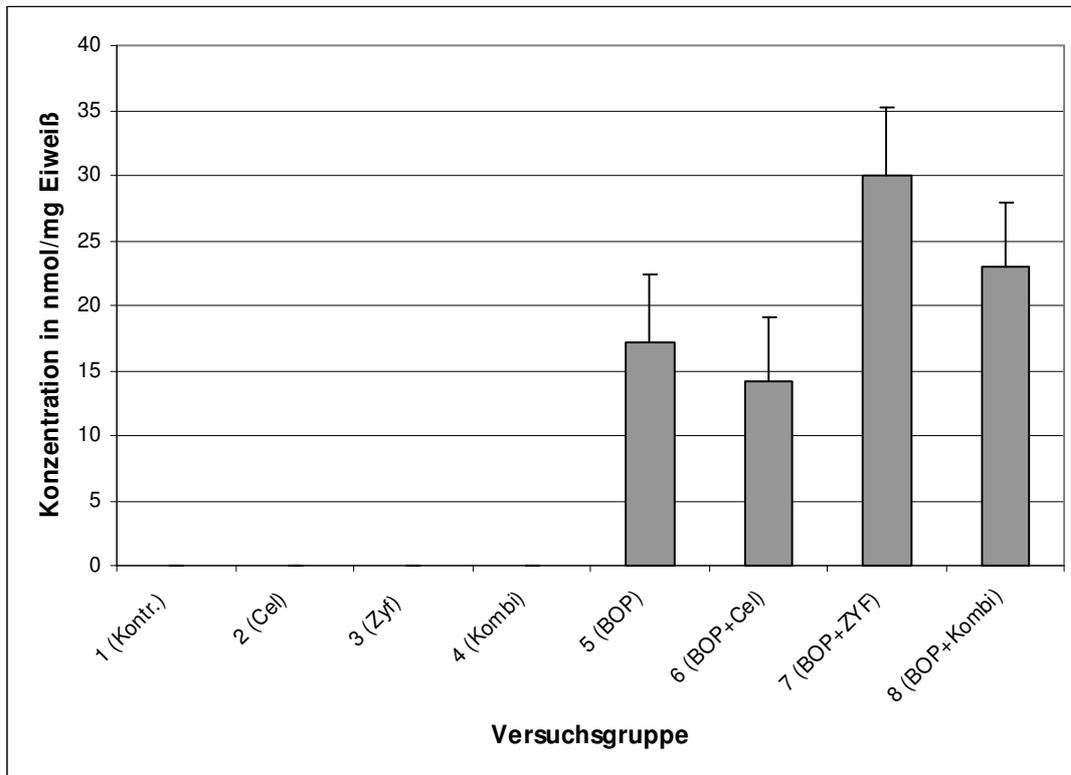


Abbildung 3.10: TBARS-Konzentration in Pankreaskarzinomen (Mittelwert \pm Standardabweichung) (1-Kontrollgruppe; 2-Celebrex; 3-Zyflo; 4-Kombination aus Celebrex+Zyflo; 5-BOP; 6-BOP+Celebrex; 7-BOP+Zyflo; 8-BOP+Kombination aus Celebrex+Zyflo)

Die TBARS-Aktivitäten in den Pankreaskarzinomen und in den tumorfreien Pankreasanteilen der Gruppe 8 unterschieden sich nicht signifikant. Andererseits war die TBARS-Konzentration in den Pankreaskarzinomen in Gruppe 7 ($p < 0,05$) höher und in den Gruppen 5 und 6 ($p < 0,05$) niedriger als die TBARS-Konzentration in den tumorfreien Pankreasanteilen (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10) [132].

4 Diskussion

4.1 Das Hamstermodell und die Effekte von BOP und einer Hochfetternahrung

Vor allem aufgrund der großen biologischen und histomorphologischen Vergleichbarkeit mit dem humanen Pankreaskarzinom ist das Tiermodell des N-Nitrosobis-2-oxopropylamin-induzierten Pankreaskarzinoms im Syrischen Goldhamster mittlerweile als das beste Tiermodell für Untersuchungen der Karzinogenese im Pankreas akzeptiert [43,71-75,78-80,98,99,126,133]. Dabei werden im Syrischen Goldhamster nach einer relativ kurzen Latenzzeit von ca. 7 Monaten in nahezu 100% duktale Adenokarzinome des Pankreas induziert. Der zugrunde liegende Pathomechanismus konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine besondere Rolle wird intrapankreatischen Metabolisierungsprozessen zugeschrieben. Hepatische Metabolisierungen scheinen für die Entstehung des Primärtumors keine große Bedeutung zu haben, da die orale Gabe von BOP nicht zur Induktion von Pankreaskarzinomen führt [73,74]. Die Metabolisierung von BOP führt vor allem zu N-Nitroso(2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl)amin (HPOP) und zu einem weit geringeren Teil zu N-Nitrosobis(2-hydroxypropyl)amin (BHP). Dabei scheint HPOP das weitaus selektivere Pankreaskarzinogen darzustellen, da BHP gleichzeitig in vielen anderen Organen Tumoren induziert. Da die Nitrosamine N-Nitroso(2-acetoxypopyl)amin (BAP) und N-Nitroso-2,6-dimethylmorpholin (NDMM) zu BHP metabolisiert werden, sind diese ebenso wenig selektiv [74]. Metabolisiert werden Nitrosamine wie BOP wahrscheinlich unter anderem durch das Cytochrom P-450-System, wobei es zur Bildung einer Reihe von radikalischen und nichtradikalischen Sauerstoffspezies kommt, welche oxidativen Stress bedeuten [74].

Durch die vorgenommene diätetische Modifikation mit der Erhöhung des Rohfettanteils auf 21,4%, wobei Linolsäure 11% und Linolensäure 2% des Futters ausmachen, lässt sich die Inzidenz pankreatischer Tumore auf 100% und die Lebermetastasierungsrate auf bis zu

90% steigern [80,81]. Dafür verantwortliche Pathomechanismen sind unter anderem die veränderten Metabolisierungen der Sauerstoffradikale [80]. Die Beeinflussung dieser Pathomechanismen zum Beispiel durch Gabe antioxidativer Vitamine führte zu verminderter Inzidenz von Primärtumoren und zu einer verminderten Lebermetastasierung [97]. Zwischen der Metabolisierung von Sauerstoffradikalen und der Eikosanoidsynthese werden starke Verbindungen vermutet, die teilweise nachgewiesen worden sind [134]. Eikosanoide scheinen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und in der Metastasierung zu spielen [120,135-138]. Protektive und therapeutische Effekte der Inhibition der Eikosanoidsynthese konnten sowohl in vitro als auch in vivo, in soliden Tiermodellen und auch in humanen Malignomen gezeigt werden [112,113,116,139]. Dementsprechend wurde die Wirkung der selektiven Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2), der Lipoxygenase-5 (LOX-5) und der kombinierten Inhibition beider Enzyme auf die Tumorprogression des chemisch induzierten soliden duktales Adenokarzinoms des Pankreas und die pankreatische Lipidperoxidation im Syrischen Goldhamster untersucht.

4.2 Die Inhibition der Cyclooxygenase-2 und der Lipoxygenase-5

Unter Standardbedingungen ohne Tumorinduktion konnte im Pankreas nach Applikation von Celebrex (COX-2-Hemmer) und/oder Zyflo (LOX-5-Hemmer) keine Veränderung der Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme GSHPX und SOD gefunden werden. Auch die Konzentration der TBARS als Parameter der Lipidperoxidation blieb unverändert. Diese Ergebnisse bestätigen Erkenntnisse aus früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe [80,81].

In den Tumorgruppen hatte die Therapie mit dem hoch selektiven COX-2-Hemmer Celebrex keinen Einfluss auf die Inzidenz oder die Größe makroskopisch sichtbarer Pankreaskarzinome. Im Gegensatz dazu führte sowohl die Therapie mit dem selektiven LOX-5-Hemmer Zyflo als auch die Kombinationstherapie aus Zyflo und Celebrex zu einer deutlichen Reduktion der Inzidenz makroskopischer Pankreaskarzinome und außerdem zu einer signifikanten Reduktion ihrer Größe. Beide Therapieschemata erhöhten die Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme GSHPX und SOD im tumorfreien Gewebe, die alleinige

Therapie mit Zylflo erniedrigte außerdem signifikant die Konzentration der TBARS im tumorfreien Gewebe. In den Pankreaskarzinomen erhöhten beide Therapieformen die GSHPX-Aktivität. Andererseits war eine Reduktion der Aktivität der SOD im Pankreaskarzinomgewebe zu finden, die allerdings statistisch nicht signifikant war. Die Konzentration der TBARS im Tumorgewebe war in beiden Therapieformen erhöht.

Es scheint, dass sowohl die alleinige Therapie mit Zylflo als auch die Kombinationstherapie aus Zylflo und Celebrex die Aktivität der antioxidativen Enzyme in tumorfreien Geweben verstärkt und damit diese Gewebe vor den gefährlichen Effekten der Hochfettdiät und der mit BOP verbundenen Lipidperoxidation geschützt haben. Dies könnte die tumorfreien Gewebe vor der Tumorgenese geschützt haben.

Außerdem war im pankreatischen Tumorgewebe nur die Aktivität der GSHPX erhöht, während die SOD tendenziell eine verminderte Aktivität zeigte. Die alleinige Erhöhung der GSHPX Aktivität kann das Tumorgewebe jedoch nicht vor der Lipidperoxidation schützen. Es würde eher eine Erhöhung der Lipidperoxidation erwartet werden, da ein ausgewogenes Gleichgewicht der verschiedenen Komponenten des antioxidativen Systems für den Schutz vor Lipidperoxidation weitaus wichtiger ist, als die alleinige Erhöhung der Aktivität eines einzelnen Schutzenzym [140,141]. Die SOD katalysiert in einem ersten Schritt die Umwandlung von O_2^- in H_2O_2 . Daraufhin kann die GSHPX die Umwandlung von H_2O_2 in H_2O katalysieren (Abbildung 4.1).

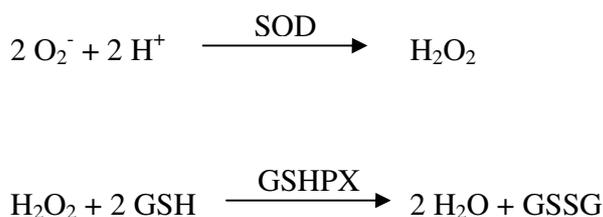


Abbildung 4.1: Die antioxidativen Schutzenzyme SOD und GSHPX
(GSH – reduziertes Glutathion, GSSG – oxidiertes Glutathion)

Wenn durch ein Ungleichgewicht der antioxidativen Schutzenzyme die GSHPX überwiegt, kommt es zur Ansammlung von toxischen Sauerstoffradikalen. Wenn andererseits die SOD/GSHPX-Ratio in Richtung SOD verschoben ist, sammelt sich H_2O_2 an, welches

wiederum reaktive Sauerstoffspezies wie OH \cdot generieren kann. Kleine Abweichungen von der physiologischen Ratio SOD/GSHPX können damit enorme Veränderungen der Widerstandsfähigkeit von Zellen gegenüber oxidativem Stress und daraus folgende DNA-Schäden bis hin zu Zelltod auslösen [140,141].

Außerdem führten sowohl die Therapie mit Zylfo als auch die Kombinationstherapie zu einer Erhöhung der Konzentration der TBARS in den Tumorgeweben. Diese Erhöhung der Lipidperoxidation in den Pankreaskarzinomen führt wahrscheinlich zu Membranschäden der Tumorzellen, welche wiederum zu Verlusten der Zellintegrität und zum konsekutiven Tod der Tumorzellen führen.

Cyclooxygenase und Lipoxygenase katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen mit freien Radikalen [134]. Einige Studien zeigen eine verminderte Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen nach Gabe antioxidativer Vitamine [142-144]. Ding et al. wiesen nach Inhibition der Lipoxygenase eine Induktion von Apoptose in den pankreatischen Tumorzelllinien nach [124]. Dieselbe Gruppe zeigte außerdem eine Proliferationshemmung der Pankreastumorzellen in-vitro nach Inhibition der Lipoxygenase [124]. Diese Ergebnisse konnten in dieser Studie in einem soliden Tiermodell bestätigt werden [132].

Im Gegensatz zu Ding et al. sowie Furukawa et al. wurde kein Effekt der COX-2-Inhibition auf das Tumorwachstum des Pankreaskarzinoms gefunden [124,145]. Dabei sind jedoch enorme methodische Unterschiede zu beachten. Furukawa et al. gaben nur 4 Wochen subkutane Injektionen von BOP, während in der vorliegenden Arbeit Pankreastumore über einen Zeitraum von 16 Wochen induziert wurden. Außerdem wurden weder in der aktuellen, noch in den vorangegangenen Studien [80,81] weitere Tumoren in Nieren oder Lungen gefunden, was möglicherweise durch den hohen Standard des verwendeten Induktors BOP erklärt werden kann. Es wurde während der Studie zudem eine Hochfettdiät gegeben, die zu einer weitaus höheren Inzidenz von Pankreastumoren, sowie in weiteren Studien zu humanen Pankreastumoren entsprechenden Lebermetastasierungsraten führte. Dementsprechend scheint das Modell von Furukawa et al. in mehreren wichtigen Punkten von unserem etablierten Modell duktaler Pankreaskarzinome im Syrischen Goldhamster abzuweichen [145].

Auch Schuller et al. berichteten von einem protektiven Effekt des Cyclooxygenaseinhibitors Ibuprofen und des FLAP-Inhibitors MK886, wobei Ibuprofen die COX-1 und COX-2, der

FLAP-Inhibitor MK886 die Leukotriensynthese über das LOX-5-aktivierende Protein hemmen [146]. Schuller et al. induzierten die Pankreastumore jedoch über eine transplazentare Gabe von NNK (Tabakkarzinogen) und Ethanol und sind damit mit unserem Modell kaum vergleichbar. Dennoch ist ihr Modell im Hinblick auf die ätiologischen Faktoren der humanen Pankreaskarzinome interessant. Schuller et al. postulierten aufgrund der deutlichen Überexpression von den Arachidonsäuremetabolisierenden Enzymen COX-2 und LOX-5 eine herausragende Rolle der Arachidonsäurekaskade im Hinblick auf die Karzinogenese. Sie vermuteten Modulationen in der Postinitiationsphase in Bezug auf Mitogenese und/oder Apoptose als mögliche Signalwege [146].

Tong, Ding und Adrian et al. untersuchten die Hemmung der Arachidonsäuremetabolisierung durch Inhibition der LOX-5 in vivo und in vitro und postulierten, dass die Apoptose eher über mitochondriale und nicht über *death receptor* (Todesrezeptor) vermittelte Signalwege induziert wird [147]. Dabei fanden sie in diversen Experimenten nach LOX-Inhibition eine verminderte Expression der antiapoptotisch wirkenden Proteine Bcl-2 und Mcl-1, eine erhöhte Expression des proapoptotisch wirkenden Proteins bax, außerdem als Hinweis auf apoptosevermittelte Permeabilitätsstörungen eine erhöhte Verschiebung des mitochondrialen Cytochrom C ins Zytosol sowie eine Aktivierung der Proteasen Caspase 9, 7 und 3 [147]. Die vor allem bei *death receptor* vermittelter Apoptose aktivierte Caspase 8 blieb unverändert, was ihre These einer mitochondrial vermittelten Apoptoseinduktion durch LOX-Inhibition weiter erhärtete [147].

Der genaue Pathomechanismus zwischen Eikosanoidsynthese und oxidativem Stress bzw. Lipidperoxidation ist noch nicht völlig aufgeklärt. Die fehlende Wirkung der selektiven COX-2-Inhibition lässt weitere Fragen offen. Zum besseren Verständnis der Metabolisierungswege und deren Inhibitionsmöglichkeiten ist die Arachidonsäurekaskade in Abbildung 4.2 dargestellt.

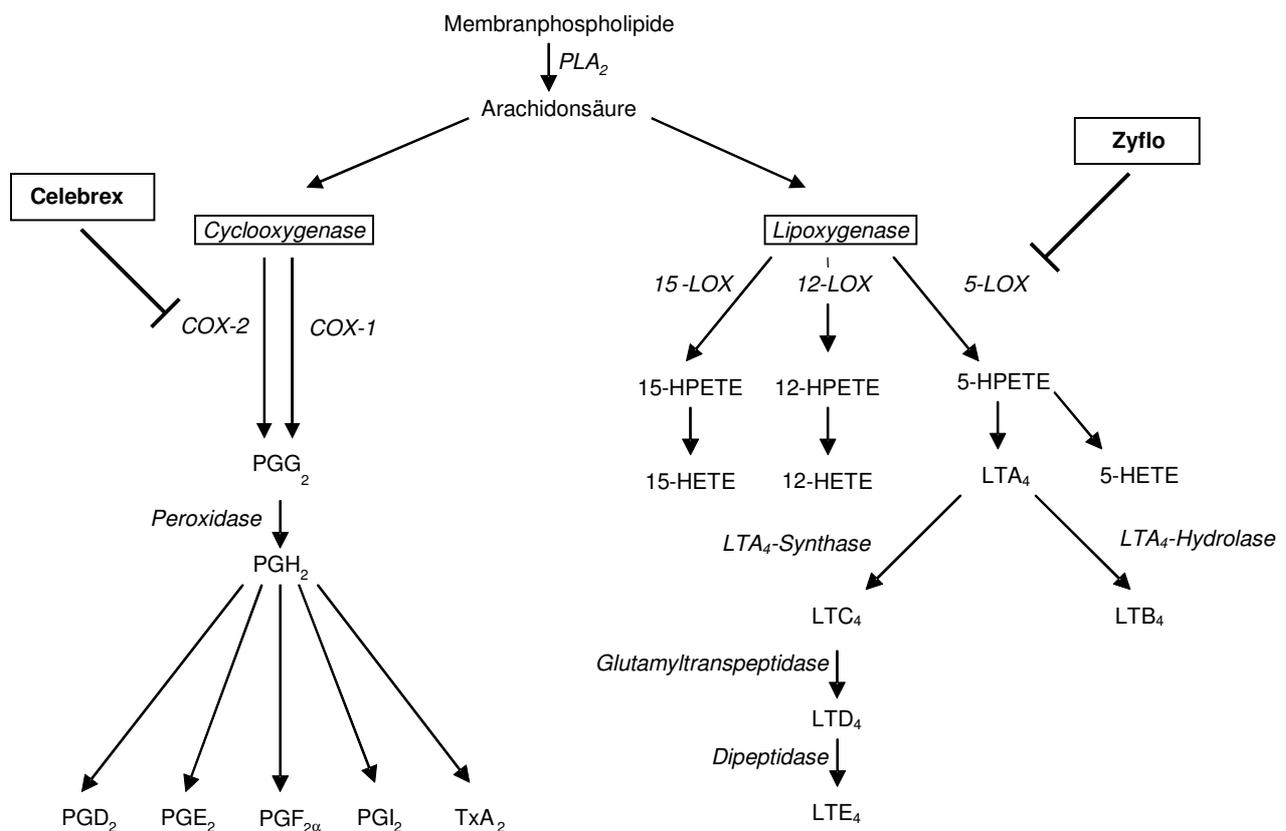


Abbildung 4.2: Die Arachidonsäurekaskade und deren Inhibitionsmöglichkeiten

Es ist wohl bekannt, dass die Hemmung eines Metabolisierungsweges der Eikosanoidsynthese zur vermehrten Umwandlung in den anderen Weg führen kann [108,112,148]. In Bezug auf die vorliegende Studie könnte dies bedeuten, dass die Therapie mit dem selektiven LOX-5-Hemmer Zylflo zu einer erhöhten COX-2-Aktivität mit vermehrter Produktion von PG führte und so das Tumorwachstum vermindert wurde. Die Kombination der beiden Metabolisierungswege zeigte in Bezug auf das Tumorwachstum die selbe Wirkung wie die alleinige LOX-5-Inhibition. Weder synergistische, additive oder antagonistische Effekte konnten festgestellt werden. Zurzeit können diese Phänomene nicht erklärt werden. Da die Tumorinduktion durch subkutane Injektion von BOP in den Wochen 1-16 und die Therapie mit Celebrex und/oder Zylflo in den Wochen 17-33 durchgeführt wurde, scheint die Inhibition der Tumorprogression nicht auf Veränderungen im BOP Metabolismus zu beruhen. Unseren Ergebnissen entsprechend, verminderte nach Gabe von BOP die Therapie mit Celebrex und/oder Zylflo die Lipidperoxidation im

tumorfreen Gewebe und erhöhte die Therapie mit Zylflo die Lipidperoxidation im pankreatischen Tumorgewebe. Außerdem war die Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme im tumorfreen Gewebe erhöht. Daraus folgend könnte der Schutz vor freien Radikalen die Tumorprogression unterdrückt bzw. vermindert haben.

Weitere Studien müssen zeigen, ob die fehlende Wirkung der selektiven COX-2-Inhibition auf der Dosierung beruht. Zur Zeit zählen zu den klinischen Indikationen von Celebrex (Celecoxib) die Behandlung von Symptomen bei Reizzuständen degenerativer Gelenkerkrankungen (aktivierte Arthrosen), chronischer Polyarthritits (rheumatoide Arthritits), ankylosierender Spondylitits, starke Schmerzen Erwachsener, primäre Dysmenorrhoe und noch in Forschung zusätzlich zur Basisversorgung von Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis coli (FAP). In Bezug auf Karzinogenese-Inhibition fehlen in der Literatur ausreichende Ergebnisse aus Dosisfindungsstudien. Außerdem muss man unter dem Gesichtspunkt der Nutzen-Risiko-Abwägung auf die erheblichen Nebenwirkungen hinweisen. Eine placebokontrollierte Langzeitstudie, welche den Einfluss von VIOXX (Rofecoxib) auf die Kolonkarzinomgenese bei Patienten mit sporadischen adenomatösen Polypen untersuchte, wurde aufgrund einer erhöhten Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse, insbesondere Herzinfarkte im Vergleich zu Placebo abgebrochen. Daher sollten Patienten mit erheblichen Risikofaktoren für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (z.B. Rauchen, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Hyperlipidämie) nur nach sorgfältiger Nutzen-Risiko-Abwägung mit Celebrex behandelt werden und wenn, dann nur in der niedrigsten wirksamen Dosis über den kürzest möglichen Zeitraum, da das kardiovaskuläre Risiko mit der Dosis und Behandlungsdauer (Informationen laut Herstellerangaben und FDA) ansteigen kann [149].

Ein weiterer Erklärungsansatz für die fehlende Wirkung der selektiven COX-2-Inhibition berücksichtigt, dass die Hemmung des einen Metabolisierungsweges der Eikosanoidsynthese zur vermehrten Umwandlung über die LOX-5 und damit zu einer erhöhten Leukotriensynthese führt [150]. In Anbetracht der anti-apoptischen, wachstums- und überlebensfördernden Wirkung von Leukotrienen und unter Berücksichtigung aktueller Studien zu fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen erscheint eine gleichzeitige Gabe von Zylflo und COX-Inhibitoren sinnvoll. Eine solche Kombination hat bei der Behandlung von

Lebermetastasen bemerkenswerte Erfolge erzielt [151]. In einer unserer Studien verminderte die kombinierte Therapie von Celebrex und Zylflo signifikant die Inzidenz, die Anzahl und die Größe der Lebermetastasen [151]. Dementsprechend ist die kombinierte Therapie mit COX-2- und LOX-5-Inhibitoren als adjuvante Therapie bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zu erwägen.

Weiterhin sollte außerdem die Verbindung zwischen oxidativem Stress, Lipidperoxidation und Eikosanoidsynthese untersucht werden. Die selektive Inhibition der Eikosanoidsynthese ist ein neuer viel versprechender Ansatz in der Therapie des Pankreaskarzinoms.

4.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie gelang im Tiermodell der Nachweis, dass sowohl eine Therapie mit LOX-5-Inhibitoren allein, als auch in Kombination mit COX-2-Inhibitoren zu einer signifikanten Verminderung der Inzidenz und der Größe des N-Nitrosobis-2-oxopropylamin-induzierten duktales Adenokarzinoms des Pankreas im Syrischen Hamster führten. Sowohl die Therapie mit dem selektiven LOX-5-Hemmer Zylflo als auch die Kombinationstherapie aus Zylflo und dem hoch selektiven COX-2-Hemmer Celebrex führten in den Tumorgruppen zu einer deutlichen Reduktion der Inzidenz makroskopischer Pankreaskarzinome und außerdem zu einer signifikanten Reduktion ihrer Größe. Im Gegensatz dazu hatte die Therapie mit Celebrex in den Tumorgruppen keinen Einfluss auf die Inzidenz oder Größe makroskopisch sichtbarer Pankreaskarzinome. Daher erscheinen weitere Studien, vor allem mit höheren als den bisher verwendeten Dosen sinnvoll. Hierbei sollten außerdem die Prognose des Pankreaskarzinoms bestimmende Faktoren, wie u. a. die Inzidenz, der Entstehungszeitpunkt, die Größe und das Verhalten von Metastasen, v. a. Lebermetastasen als Zielkriterien gewählt werden.

Da die gesteigerte Inzidenz und Größe der Pankreastumore im hier verwendeten Tiermodell unter der Hochfettdiät mit einer erhöhten Lipidperoxidation vergesellschaftet ist und für viele andere Tumorentitäten ebenfalls wachstums-, invasions- und metastasierungsfördernde Effekte einer Hochfetterernährung bekannt sind, sollte der

Einfluss der Lipidperoxidation auch bei diesen Tumorarten geprüft werden [66,77,98,99,105,152].

Der exakte Pathomechanismus zwischen Lipidperoxidation, oxidativem Stress und Eikosanoidsynthese ist noch nicht geklärt. In weiteren Studien wird unsere Arbeitsgruppe versuchen, die vorliegenden Ergebnisse mit Untersuchungen der Konzentrationen von Produkten der Eikosanoidsynthese zu verknüpfen und damit deren Zusammenhang und mögliche therapeutische Ansatzpunkte verständlicher zu machen.

5 Zusammenfassung

5.1 Einleitung

Zum Zeitpunkt der Diagnose eines Pankreaskarzinoms befindet sich ein Großteil der Patienten bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium. Damit ist die kurative Resektion nur in 20 - 30 % der Fälle möglich. Selbst nach radikaler Resektion ist ein lokales Rezidiv häufig. Dementsprechend werden dringend neue Therapiestrategien benötigt. Epidemiologische und experimentelle Studien heben die Bedeutung von freien Radikalen und der Eikosanoidsynthese für die Karzinogenese hervor. Die selektive Inhibition der Eikosanoidsynthese ist dabei ein viel versprechender Therapieansatz. Neben direkten Einflüssen auf die Tumorgenese durch die Senkung der Eikosanoidspiegel werden indirekte Einflüsse wie die Sauerstoffradikalbildung und die Lipidperoxidation diskutiert. Die vorliegende Studie wurde zur Untersuchung der Wirkung einer selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibition durch Celebrex (Celecoxib), einer selektiven Lipoxigenase-5-Inhibition durch Zyflo (Zileuton) und der gleichzeitigen Inhibition beider Enzyme durch die Kombination von Celebrex und Zyflo auf Tumorwachstum und Lipidperoxidation am Modell des chemisch induzierten duktales Pankreaskarzinoms des Syrischen Goldhamsters durchgeführt.

5.2 Material und Methoden

120 männliche 8 Wochen alte Syrische Goldhamster wurden in 8 Gruppen (Gr.) randomisiert (n=15): Gr. 1: Ø BOP, Ø Therapie; Gr. 2: Ø BOP, Celebrex; Gr. 3: Ø BOP, Zyflo; Gr. 4: Ø BOP, Celebrex und Zyflo; Gr. 5: BOP, Ø Therapie; Gr. 6: BOP, Celebrex; Gr. 7: BOP, Zyflo; Gr. 8: BOP, Celebrex und Zyflo. Über den gesamten Versuchszeitraum erhielten die Hamster eine Hochfett diät (Rohfettanteil 21,4%). Im 16-wöchigen Induktionszeitraum erhielten die Gr. 5, 6, 7 und 8 10mg/kg Körpergewicht/Woche N-

Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP) injiziert, während den Gr. 1, 2, 3 und 4 0,9%ige NaCl-Lösung injiziert wurde. In der sich anschließenden 12-wöchigen Therapiephase erhielten die Gr. 1 und 5 keine Therapie, die Gr. 2 und 6 p. o. 7mg Celebrex täglich, die Gr. 3 und 7 p. o. 28mg Zylflo täglich und die Gr. 4 und 8 p. o. 7mg Celebrex und 28mg Zylflo täglich. In der 33. Woche wurden die Tiere getötet und die Anzahl von Tumoren pro Tier sowie die Größe der Pankreaskarzinome festgestellt. In tumorfreien Pankreasanteilen und in Pankreaskarzinomen wurden die Aktivitäten der Superoxiddismutase (SOD) und der Glutathionperoxidase (GSHPX) sowie die Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten (TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen) bestimmt.

5.3 Ergebnisse

In den tumorfreien Kontrollgruppen fanden sich keine Unterschiede bezüglich der Aktivitäten der antioxidativen Enzyme oder der Konzentration der Lipidperoxidationsprodukte (TBARS) nach der Therapie mit Celebrex, Zylflo oder Celebrex und Zylflo.

Die alleinige Therapie mit Celebrex ergab keine signifikante Veränderung von Inzidenz oder Größe der makroskopisch sichtbaren Pankreaskarzinome.

Die Inzidenz und die Größe der makroskopischen Pankreaskarzinome waren sowohl durch die alleinige Therapie mit Zylflo, als auch durch die kombinierte Therapie mit Zylflo und Celebrex erniedrigt. Die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme waren erhöht und die Konzentration der Lipidperoxidationsprodukte in den tumorfreien Pankreasanteilen erniedrigt. Demgegenüber war die Lipidperoxidation in den Pankreastumoren erhöht.

5.4 Diskussion und Schlussfolgerung

Sowohl nach der selektiven Lipoxygenase-5-Inhibition durch Zylflo (Zileuton) als auch nach der kombinierten Cyclooxygenase-2-Inhibition und Lipoxygenase-5-Inhibition (durch Celebrex + Zylflo) wurde eine inhibierende Wirkung auf die Inzidenz und das Wachstum

des BOP-induzierten duktales Adenokarzinoms des Pankreas im Syrischen Hamster beobachtet. Zylflo allein und in Kombination mit Celebrex führte zu einer Erniedrigung der Lipidperoxidation in tumorfreien Pankreasanteilen und zu einem Anstieg der Lipidperoxidation in den Pankreastumoren. Über diese beiden Mechanismen führen die selektive Lipoxygenase-5-Inhibition sowie die kombinierte Cyclooxygenase-2- und Lipoxygenase-5-Inhibition möglicherweise durch den Schutz vor freien Radikalen zu einer Inhibition von Inzidenz und Wachstum der Pankreastumoren. Die antioxidativen Schutzmechanismen scheinen gestärkt und damit die tumorfreien Pankreasanteile effektiver gegen Radikale und die BOP-vermittelte Lipidperoxidation geschützt. In den tumorbefallenen Pankreasanteilen war die Aktivität der GSHPX zwar erhöht und die Aktivität der SOD eher erniedrigt, jedoch ist eine ausbalancierte Ratio der Schutzenzyme wichtiger als der isolierte Anstieg einer der Komponenten des antioxidativen Systems. Dementsprechend führten dort die Therapie mit Zylflo und die Kombinationstherapie zu erhöhten TBARS-Spiegeln. Die hohen Spiegel der Lipidperoxidationsprodukte können zu Membranschäden der Tumorzellen und damit zum Verlust der Zellintegrität mit daraus folgendem Tod der Tumorzellen geführt haben. Erstaunlicherweise wurden im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Zylflo bei der kombinierten Therapie weder synergistische noch antagonistische Effekte beobachtet. Derzeit fehlen plausible Erklärungen für dieses Phänomen.

Die Therapie mit Celebrex zeigte keinen Einfluss auf die Inzidenz oder Größe makroskopisch sichtbarer Pankreaskarzinome.

In weiteren Studien muss untersucht werden, ob die fehlende Wirkung der selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibition dosisabhängig ist, oder ob sie über Shunts in andere Metabolisierungswege verursacht wurde. Außerdem werden wir versuchen, die erhaltenen Ergebnisse mit Untersuchungen der Konzentrationen von Eikosanoidsyntheseprodukten zu verknüpfen und damit den Pathomechanismus zwischen oxidativem Stress, Lipidperoxidation und Eikosanoidsynthese sowie mögliche therapeutische Ansatzpunkte durch Inhibition dieser aufzuklären.

Weitere Experimente sollten die Prognose des Pankreaskarzinoms bestimmende Faktoren, wie z.B. die Inzidenz, den Entstehungszeitpunkt, die Größe und das Verhalten von Metastasen, v. a. von Lebermetastasen, untersuchen.

Da im verwendeten Tiermodell unter der Hochfettdiät die erhöhte Lipidperoxidation eine gesteigerte Inzidenz und Größe der Pankreastumore hervorrief und für viele andere Tumorentitäten ebenfalls wachstums-, invasions- und metastasierungsfördernde Effekte einer Hochfetterernährung bekannt sind, sollte der Einfluss der Lipidperoxidation auch bei diesen Tumorarten geprüft werden. Möglicherweise liegt in der selektiven Inhibition der Eikosanoidsynthese ein viel versprechender Ansatz der Tumorthherapie auch anderer Karzinome.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Wanebo HJ, Glicksman AS, Clark JW. Pancreatic Cancer Symposium: epidemiology, etiology, pathogenesis, and therapy. *Pancreas* 1995; 10: 217-221.
- 2 Eskelinen MJ, Haglund UH. Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: review of clinical and histopathological variables and possible uses of new molecular methods. *Eur J Surg* 1999; 165: 292-306.
- 3 Friess H, Isenmann R, Berberat P, et al. Die Prognose des Pankreaskarzinoms. *Ther-Umschau* 1996; 53: 401-407.
- 4 Levi F, Lucchini F, Negri E, et al. Pancreatic cancer mortality in Europe: the leveling of an epidemic. *Pancreas* 2003; 27 (2): 139-142.
- 5 Meryn S. Pankreaskarzinom – Epidemiologie und Risikofaktoren. *Wien-Klin-Wochenschr* 1994; 106: 694-697.
- 6 Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N-Engl-J-Med* 1992; 326: 455-465.
- 7 Kelly DM, Benjamin IS. Pancreatic carcinoma. *Ann-Oncol* 1995; 6: 19-28.
- 8 Gullo L, Lowenfels AB. Risk and genetic factors in pancreatic cancer. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 587-592.
- 9 Wanebo HJ, Vezeridis MP. Pancreatic cancer: an overview. *Semin-Surg-Oncol* 1995; 11: 168-180.
- 10 Murr MM, Sarr MG, Oishi AJ, et al. Pancreatic cancer. *CA-Cancer-J-Clin* 1994; 44: 304-318.
- 11 Li D, Jiao L. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *International J of Gastrointestinal Cancer* 2003; 33 (1): 3-13.
- 12 Tominaga S, Kuroishi T. Epidemiology of pancreatic cancer. *Semin Surg Oncol* 1998; 15: 3-7,
- 13 Li D, Xie K, Wolff R, et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363: 1049-1057.
- 14 Kim DJ, Rockhill B, Colditz GA. Validation of the Harvard cancer risk index: a prediction tool for individual cancer risk. *J of Clin Epidemiology* 2004; 57: 332-340.

- 15 Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, et al. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg* 2004; 239: 763-771.
- 16 Böhmig M, Wiedemann B. Therapie des Pankreasadenokarzinoms. *Med Klin* 1999; 94: 614-25.
- 17 Lentschig MG, Reimer P, Rummeny E, et al. Die Wertigkeit der 3-Phasen-Spiral-CT und der Magnetresonanztomographie in der präoperativen Diagnostik des Pankreaskarzinoms. *Radiologe* 1996; 36: 406-412.
- 18 Hilgers W, Kern SE. Molecular genetic basis of pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes & Cancer* 1999; 26: 1-12.
- 19 Dugan MC, Sarkar FH. Current concepts in pancreatic cancer: symposium summary. *Pancreas* 1998; 17: 325-333.
- 20 Gloor B, Todd KE, Reber HA. Diagnostic workup of patients with suspected pancreatic carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 1780-1786.
- 21 Roder JD, Rösch T, Bautz W, et al. Pankreascarcinom - präoperative Diagnostik und Indikationsstellung. *Chirurg* 1994; 65: 225-231.
- 22 Hunstad DA, Norton JA. Management of pancreatic carcinoma. *Surg Oncol* 1995; 4: 61-74.
- 23 Hawes RH, Xiong Q, Waxmann I, et al. A multispecialty approach to the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am J Gastro* 2000; 95: 17-31.
- 24 Ishiguchi T, Maruyama K, Fukatsu H, et al. Radiologic diagnosis of pancreatic carcinoma. *Sem Surg Oncol* 1998; 15: 23-32.
- 25 Löhr M, Andren-Sandberg A. Cancer of the pancreas: from concordant classification to standardized treatment. *Eur-J-Gastroenterol-Hepatol* 1997; 9: 993-1000.
- 26 Cameron JL. The current management of carcinoma of the head of the pancreas. *Annu Rev Med* 1995; 46: 361-370.
- 27 Baron PL, Kay C, Hoffman B. Pancreatic Imaging. *Surg Oncol Clin North America* 1999; 8: 35-58.
- 28 Sittek H, Heuck AF, Folsing C, et al. Statische und dynamische Kernspintomographie des Pankreas: Kontrastmittelkinetik des normalen Pankreasparenchyms bei Pankreaskarzinomen und chronischer Pankreatitis. *Fortschr-Röntgenstr* 1995; 162: 396-403.

- 29 Smedby O, Riesenfeld V, Karlson B, et al. Magnetic resonance angiography in the resectability assessment of suspected pancreatic tumours. *Eur-Radiol* 1997; 7: 649-653.
- 30 Sironi S, Cobelli F, Zerbi A, et al. Pancreatic carcinoma: MR assessment of tumor invasion of the peripancreatic vessels. *J Comput Assist Tomogr* 1995; 19: 739-744.
- 31 Paulus P, Hustinx R, Daenen F, et al. Usefulness of 18-FDG positron emission tomography in detection and follow-up of digestive cancers. *Acta Gastroenterol Belg* 1997; 60: 278-280.
- 32 Friess H, Langhans J. Diagnosis of pancreatic cancer by 2[18F]-flouro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *Gut* 1995; 36: 771-777.
- 33 Nakao A, Oshima K, Nomoto S, et al. Clinical usefulness of CA-19-9 in pancreatic carcinoma. *Semin-Surg-Oncol* 1998; 15: 15-22.
- 34 Beger HG, Birk D, Bodner E, et al. Ist die histologische Sicherung des Pankreaskarzinoms Voraussetzung für die Pankreasresektion? *Langenbecks-Arch-Chir* 1995; 380: 62-66.
- 35 Ihse I, Andersson R, Axelson J. Pancreatic pain: is there a medical alternative to surgery? *Digestion* 1993; 54 (Suppl 2): 30-34.
- 36 Zamboni WA, Fisher KS, Ross DS. Surgical palliation for pancreatic carcinoma. *Postgrad Med J* 1991; 67: 362-365.
- 37 Wagner M, Redaelli C, Lietz M, et al. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *British J of Surg* 2004; 91: 586-594.
- 38 Blackstock AW, Cox AD, Tepper JE. Treatment of pancreatic cancer: current limitations, future possibilities. *Oncology* 1996; 10: 301-307.
- 39 Nakao A, Takagi H. Problems in pancreatic cancer surgery. *Semin-Surg-Oncol* 1998; 15: 52-56.
- 40 Schnall SF, MacDonald JS. Chemotherapy of adenocarcinoma of the pancreas. *Semin-Oncol* 1996; 23: 220-228.
- 41 Klempnauer J, Ridder GJ, Bektas H, et al. Surgery for exocrine pancreatic cancer – who are the 5- and 10-year survivors? *Oncology* 1995; 52: 353-359.

- 42 Vezeridis MP, Wanebo HJ. Surgical resection for carcinoma of the pancreas: a historical overview. *Semin-Surg-Oncol* 1995; 11: 108-113.
- 43 Watanapa P, Williamson RC. Experimental pancreatic hyperplasia and neoplasia: effects of dietary and surgical manipulation. *Br-J-Cancer* 1993; 67: 877-884.
- 44 Ozaki H. Modern surgical treatment of pancreatic cancer. *Int-J-Pancreatol* 1994; 16: 121-129.
- 45 Watanapa P, Williamson RC. Resection of the pancreatic head with or without gastrectomy. *World J Surg* 1995; 19: 403-409.
- 46 Walsh D. Palliative Management of the patient with advanced pancreatic cancer. *Oncol* 1996; 10 (Suppl): 40-44.
- 47 Kokoska ER, Stapleton DR, Virgo KS, et al. Quality of life measurements do not support palliative pancreatic cancer treatments. *Int J oncol* 1998; 13: 1323-1329.
- 48 Kinsella TJ, Sindelar WF. Intraoperative radiotherapy for pancreatic carcinoma: experimental and clinical studies. *Cancer* 1996; 78: 598-604.
- 49 Popescu RA, Cunningham D. Chemotherapy for advanced pancreatic cancer – some light at the end of the tunnel? *Ann-Oncol* 1997; 8: 415-416.
- 50 Kellokumpu-Lehtinen P, Huovinen R, Tuominen J. Pancreatic cancer: evaluation of prognostic factors and treatment results. *Acta-Oncol* 1989; 28: 481-484.
- 51 Sener SF, Fremgen A, Menck HR, et al. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 1999; 189: 1-7.
- 52 Ishii H, Okada S, Nose H, et al. Prognostic factors in patients with advanced pancreatic cancer treated with systemic chemotherapy. *Pancreas* 1996; 12: 267-271.
- 53 Rosenberg L. Treatment of pancreatic cancer: promises and problems of tamoxifen, somatostatin analogs, and gemcitabine. *Int-J-Pancreatol* 1997; 22: 81-93.
- 54 Link KH, Formentini A, Leder G, et al. Resection and radiochemotherapy of pancreatic cancer - the future? *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383: 134-144.
- 55 Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, et al. Pancreaticoduodenectomy: does it have a role in the palliation of pancreatic cancer? *Ann Surg* 1996; 223: 718-728.

- 56 Farrell TJ, Barbot DJ, Rosato FE. Pancreatic resection combined with intraoperative radiation therapy for pancreatic cancer. *Ann Surg* 1997; 226: 66-69.
- 57 Gebauer T, Ridwelski K. Lokoregionäre und systemische Therapie beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom. *Langenbeck's Arch Chir Suppl II* (Kongressbericht) 1998; 1344-1347.
- 58 Shore S, Raraty MG, Ghaneh P, et al. Review article: chemoprevention for pancreatic cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 1049-1069.
- 59 Katz MH, Bouvet M. Novel gene therapy approaches to pancreatic cancer. *International J of Gastrointestinal Cancer* 2003; 33 (1): 89-97.
- 60 Slavin J, Ghaneh P, Jones L, et al. The future of surgery for pancreatic cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 (Suppl 4): 285-290.
- 61 Siu TO, Kwan WB. Hormones in chemotherapy for pancreatic cancer, chemoagents or carriers? *In Vivo* 1989; 3: 255-258.
- 62 Ohigashi H, Ishikawa O, Imaoka S, et al. A new method of intra-arterial regional chemotherapie with more selective drug delivery for locally advanced pancreatic cancer. *Hepato-Gastroenterology* 1996; 43: 338-345.
- 63 Taylor OM, Benson EA, McMahon MJ. Clinical trial of tamoxifen in patients with irresectable pancreatic adenocarcinoma. *Br-J-Surg* 1993; 80: 384-386.
- 64 Taylor I. Should further studies of chemotherapy be carried out in pancreatic cancer? *Eur-J-Cancer* 1993; 29: 1076-1078.
- 65 Gelber RD. Gemcitabine for pancreatic cancer: how hard to look for clinical benefit? An American perspective. *Ann Oncol* 1996; 7: 335-337.
- 66 Roebuck BD. Dietary fat and the development of pancreatic cancer. *Lipids* 1992; 27: 804-806.
- 67 Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, et al. Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World J Surg* 1997; 21: 195-200.
- 68 Takamori H, Hiraoka T, Kanemitsu K, et al. Treatment strategies for hepatic metastases from pancreatic cancer in patients previously treated with radical resection combined with intraoperative radiation therapy. *HPB Surgery* 1994; 107-110.

- 69 Tsuchiya R, Tsunoda T. Tumor size as a predictive factor. *Int J Pancreatol* 1990; 117-123.
- 70 Kayahara M, Nagakawa T, Ueno K, et al. An evaluation of radical resection for pancreatic cancer based on the mode of recurrence as determined by autopsy and diagnostic imaging. *Cancer* 1993; 72: 2118-23.
- 71 Hall PA, Lemoine NR. Models of pancreatic cancer. *Cancer-Surv* 1993; 16: 135-154.
- 72 Longnecker DS, Memoli V, Pettengill OS. Recent results in animal models of pancreatic carcinoma: histogenesis of tumors. *Yale-J-Biol-Med* 1992; 65: 457-464.
- 73 Pour PM, Krüger FW, Althoff J, et al. Cancer of the pancreas induced in the Syrian golden hamster. *Am-J-Pathol* 1974; 76: 349-358.
- 74 Pour PM, Runge RG, Birt D, et al. Current knowledge of pancreatic carcinogenesis in the hamster and its relevance to the human disease. *Cancer* 1981; 47: 1573-1587.
- 75 Wei D, Xiong HQ, Abbruzzese JL, et al. Experimental animal models of pancreatic carcinogenesis and metastasis. *International J of Gastrointestinal Cancer* 2003; 33 (1): 43-60.
- 76 Konishi Y, Tsutsumi M, Tsujiuchi T. Mechanistic analysis of pancreatic ductal carcinogenesis in hamsters. *Pancreas* 1998; 16: 300-306.
- 77 Rose DP. Dietary fatty acids and cancer. *Am-J-Clin-Nutr* 1997; 66 (Suppl): 998-1003.
- 78 Birt DF, Julius AD, Dwork E, et al. Comparison of the effects of dietary beef tallow and corn oil on pancreatic carcinogenesis in the hamster model. *Carcinogenesis* 1990; 11: 745-748.
- 79 Kazakoff K, Cardesa T, Liu J, et al. Effects of voluntary physical exercise on high-fat diet-promoted pancreatic carcinogenesis in the hamster model. *Nutr-Cancer* 1996; 26: 265-279.
- 80 Wenger FA, Jacobi CA, Kilian M, et al. Does dietary alpha-linolenic acid promote liver metastases in pancreatic carcinoma initiated by BOP in syrian hamster? *Ann-Nutr-Metab* 1999; 43: 121-126.

- 81 Wenger FA, Kilian M, Jacobi CA, et al. Does alpha-linolenic acid in combination with linolenic acid influence liver metastasis and hepatic lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters? *Prostaglandines Leucotrienes and Essential Fatty acids* 2000; 62: 329-334.
- 82 Lowy AM. Transgenic models of pancreatic cancer. *International J of Gastrointestinal Cancer* 2003; 33 (1): 71-78.
- 83 Schmied B, Ulrich A, Matsuzaki H, et al. In vitro pancreatic carcinogenesis. *Ann Oncol* 1999; 10 (Suppl 4): 41-45.
- 84 Schmied B, Liu G, Moyer MP, et al. Induction of adenocarcinoma from hamster pancreatic islet cells treated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in vitro. *Carcinogenesis* 1999; 20: 317-324.
- 85 Longnecker DS. Experimental cancer of the pancreas: role of species, sex and diet. *Bull Cancer* 1990; 77: 27-37.
- 86 Hollan S. Free radicals in health and disease. *Haematologia-Budap* 1995; 26: 177-189.
- 87 Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ-Res* 1992; 70: 593-599.
- 88 Hearse DJ, Manning AS, Downey JM, et al. Xanthin oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion? *Acta-Physiol-Scand* 1985; 126 (Suppl 548): 65-78.
- 89 Petkau A. Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury. *Br-J-Cancer* 1987; 55 (Suppl 8): 87-95.
- 90 Hamers MN, Ross D. Oxidative stress in human neutrophil granulocytes: host defence and self defense, in: Siess H, editor: *Oxidative stress*. New York Academic Press 1985; 351-381.
- 91 Roy RS, McCord JM. Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, in: *Proceedings of the 3rd international conference on superoxide and superoxide dismutase*, ed. by Greenwald R & Cohen G, New York. Elsevier 1983; 145-153.

- 92 Maker HS, Weiss C, Silides DJ, et al. Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J-Neurochem* 1981; 36: 589-593.
- 93 Kappus H. Lipidperoxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance, in: *Oxidative Stress*, Siess H (ed.). London Academic Press 1985; 273-310.
- 94 Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag 1997; 5. Auflage.
- 95 Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J-Biol-Chem* 1970; 245: 4053-4057.
- 96 Holmes RS, van de Berg LJ. Aldehyde dehydrogenases, aldehyde oxidase and xanthine oxidase from baboon tissue. *Alcohol* 1986; 3: 205-214.
- 97 Wenger FA, Kilian M, Ridders J, et al. Influence of antioxidative vitamins A, C and E on lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2001; 65 (3): 165-171.
- 98 Appel MJ, Garderen-Hoetmer A, Woutersen RA. Effects of dietary linoleic acid on pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters. *Cancer-Res* 1994; 54 (8): 2113-2120.
- 99 Appel MJ, Woutersen RA. Effects of dietary fish oil (MaxEPA) on BOP-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer-Lett* 1995; 94: 179-189.
- 100 Jiang WG, Hiscox S, Hallet MB, et al. Inhibition of invasion and motility of human colon cancer cells by gamma-linolenic acid. *Br-J-Cancer* 1995; 71: 744-752.
- 101 Pandalai PK, Pilat MJ, Yamazaki K, et al. The effects of w-3 and w-6 fatty acids on in-vitro prostate cancer growth. *Anti-Cancer-Res* 1996; 16: 815-820.
- 102 Falconer JS, Ross JA, Fearon KC, et al. Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in-vitro of human pancreatic-cancer cell lines. *Br-J-Cancer* 1995; 69: 826-832.
- 103 Hawkins RA, Sangster K, Arends MJ. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J-Pathol* 1998; 185: 61-70.

- 104 Das UN. Essential fatty acids and their metabolites and cancer. *Nutrition* 1999; 15: 239-241.
- 105 Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. *Crit-Rev-Oncol-Hematol* 1998; 27: 179-209.
- 106 Horrobin DF. Essential fatty acids, lipid peroxidation, and cancer: Horrobin DF (ed.): w-6 Essential fatty acids. New York. Wiley-Liss 1990; 351-378.
- 107 Jiang WG, Hiscox S, Bryce RP, et al. The effects of n-6-PUFA's on the expression of nm23 in human cancer cells. *Br-J-Cancer* 1997; 77: 731-738.
- 108 Reich R, Martin GR. Identification of arachidonic acid pathways required for the invasive and metastatic activity of malignant tumor cells. *Prostaglandins* 1996; 51: 1-17.
- 109 Ondrey FG. Arachidonic acid metabolism: a primer for head and neck surgeons. *Head Neck* 1998; 20: 334-349.
- 110 Kashiwagi M, Friess H, Uhl W, et al. Group II and IV phospholipase A2 are produced in human pancreatic cancer cells and influence prognosis. *Gut* 1999; 45: 605-612.
- 111 Ding XZ, Tong WG, Adrian TE. Cyclooxygenases and lipoxygenases as potential targets for treatment of pancreatic cancer. *Pancreatology* 2001; 1: 291-299.
- 112 Marks F, Fürstenberger G, Muller-Decker K. Metabolic targets of cancer chemoprevention: interruption of tumor development by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Rec Res Cancer Res* 1999; 151: 45-67.
- 113 Vainio H, Morgan G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the chemoprevention of gastrointestinal cancers. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 785-789.
- 114 Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2018-2024.
- 115 Rees BP, Ristimaki A. Cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 897-903.
- 116 Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, et al. Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216: 201-210.

- 117 Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, et al. Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 261: 218-223.
- 118 Seufferlein T, Seckl MJ, Schwartz E, et al. Mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced growth inhibition and apoptosis in human cancer cells. *British J Cancer* 2002; 86: 1188-1196.
- 119 Ferry DR, Deakin M, Baddeley J, et al. A phase II study of the 5-lipoxygenase inhibitor, CV 6504, in advanced pancreatic cancer: correlation of clinical data with pharmacokinetic and pharmacodynamic endpoints. *Ann Oncol* 2000; 11: 1165-1170.
- 120 Myers CE, Ghosh J. Lipoxygenase inhibition in prostate cancer. *Eur Urol* 1999; 35: 395-398.
- 121 Grover JK, Yadav S, Vats V, et al. Cyclooxygenase 2 inhibitors: emerging roles in the gut. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 279-291.
- 122 Wei D, Wang L, He Y, et al. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Res* 2004; 64: 2030-2038.
- 123 Williams CS, Watson AJ, Shen H, et al. Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. *Cancer Res* 2000; 60: 6045-6051.
- 124 Ding XZ, Kuszynski CA, El-Metwally TH, et al. Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 266: 392-399.
- 125 Ding XZ, Tong WG, Adrian TE. Multiple signal pathways are involved in the mitogenic effect of 5(S)-HETE in human pancreatic cancer. *Oncology* 2003; 65: 285-294.
- 126 Meijers M, Garderen-Hoetmer A, Lamers CB, et al. Role of cholecystinin in the development of BOP-induced pancreatic lesions in hamsters. *Carcinogenesis* 1990; 11: 2223-2226.
- 127 Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J-Lab-Clin-Med* 1967; 29: 143-148.

- 128 Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *J-Anal-Biochem* 1971; 44: 276-287.
- 129 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J-Biol-Chem* 1951; 193: 265-275.
- 130 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal-Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 131 Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free-Radic-Biol-Med* 1990; 9: 515-540.
- 132 Wenger FA, Kilian M, Achucarro P, et al. Effects of Celebrex and Zylflo on BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Pancreatology* 2002; 2 (1): 54-60.
- 133 Longnecker DS. Experimental cancer of the pancreas. *Curr Opin Gastroenterol* 1991; 7: 731-738.
- 134 Arntzen KJ, Brekke OL, Vatten L, et al. Reduced production of PGE 2 and PGF2alpha from decidual cell cultures supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Lipid Mediat* 1998; 56: 183-195.
- 135 Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000; 21: 139-146.
- 136 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 1998; 69: 168-172.
- 137 Wolff H, Saukkonen K, Antilla S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 4997-5001.
- 138 Shiota G, Okubo M, Noumi T, et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepato Gastroenterol* 1999; 46: 407-412.
- 139 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-716.
- 140 Haan JB de, Christiano F, Iannello R, et al. Elevation in the ratio of Cu/Zn superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induced features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Human Molec Genet* 1996; 5: 283-292.

- 141 Amstadt P, Moret R, Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu/Zn superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J Biol Chem* 1994; 269: 1606-1609.
- 142 Hamelin S, Chan AC. Modulation of platelet thromboxane and malondialdehyde by dietary vitamin E and linolenate. *Lipids* 1983; 18: 267-269.
- 143 Chan AC, Tran K, Pyke DD, et al. Effects of dietary vitamin E on the biosynthesis of 5-lipoxygenase products by rat polymorphonuclear leukocytes PMNL. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1005: 265-269.
- 144 Sakamoto W, Fujie K, Nishihira J, et al. Effect of vitamin E on arachidonic acid-release in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1170: 296-300.
- 145 Furukawa F, Nishikawa A, Lee IS, et al. A cyclooxygenase-2 inhibitor, Nimesulide, inhibits postinitiation phase of N-Nitrosobis(2-Oxopropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Int J Cancer* 2003; 104: 269-273.
- 146 Schuller HM, Zhang L, Weddle DL, et al. The cyclooxygenase inhibitor ibuprofen and the FLAP inhibitor MK886 inhibit pancreatic carcinogenesis induced in hamsters by transplacental exposure to ethanol and the tobacco carcinogen NNK. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 525-532.
- 147 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, et al. Lipoxygenase Inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002; 1: 929-935.
- 148 Karmali RA. Eicosanoids in neoplasia. *Prev-Med* 1987; 16: 493-502.
- 149 Luo C, He ML, Bohlin L. Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26 (8): 926-933.
- 150 Kast RE. Tenofovir, COX inhibitors and Zileuton during cancer immunotherapies: up-regulated TNF-alpha increases antigen driven lymphocyte proliferation. *Molecular Immunology* 2003; 40: 297-303.
- 151 Wenger FA, Kilian M, Bisevac M, et al. Effects of Celebrex and Zylflo on liver metastasis and lipidperoxidation in pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Clin-Exp-Metastasis* 2002; 19 (8): 681-687.
- 152 Clerc P, Bensaadi N, Pradel P, et al. Lipid-dependent proliferation of pancreatic cancer cell lines. *Cancer-Res* 1991; 51: 3633-3638.

- 153 Heukamp I, Kilian M, Gregor JI, et al. Impact of polyunsaturated fatty acids on hepato-pancreatic prostaglandin and leucotriene concentration in ductal pancreatic cancer – Is there a correlation to tumour growth and liver metastasis? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 Apr; 74 (4): 223-33.
- 154 Gregor JI, Heukamp I, Kilian M, et al. Does enteral nutrition of dietary polyunsaturated fatty acids promote oxidative stress and tumour growth in ductal pancreatic cancer? Experimental trial in Syrian Hamster. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 Jan; 74 (1): 67-74.

Danksagung

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, meinen Eltern und meinem Bruder, die mich lieben, an mich glauben und immer für mich da sind, meinem Mann, der mich mit unendlicher Geduld und Verständnis unterstützt und meinem Sohn, der allem einen Sinn gibt.

Bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift mit Rat und Tat unterstützt haben, möchte ich mich bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Frank Wenger, ohne den die zugrunde liegende experimentelle Arbeit niemals möglich gewesen wäre. Ebenso gilt mein Dank dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Dr. Maik Kilian, der einen großen Anteil an der Organisation und der Durchführung der experimentellen Arbeit geleistet hat. Ich danke allen, die mich zu diesem Projekt ermutigt, dabei begleitet und bis zuletzt unterstützt haben.

Erklärung

Ich, Patricia Warnick-Achúcarro, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Einfluss der Therapie mit dem COX-2-Inhibitor Celebrex und dem 5-LOX-Inhibitor Zylflo sowie deren Kombination auf das Tumorwachstum und die Lipidperoxidation beim BOP-induzierten Pankreaskarzinom des Syrischen Hamsters“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.