

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

DISSERTATION

Einfluss von
Celebrex (Cyclooxygenase-2-Inhibitor) und
Zyflo (5-Lipoxygenase-Inhibitor)
auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation
beim BOP-induzierten Pankreaskarzinom
des Syrischen Goldhamsters

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Magdalena Kuhn
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. A. Wenger
 2. Priv.-Doz. Dr. med J. W. Mall
 3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Ablaßmaier

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.	Das Pankreaskarzinom	6
1.1.1.	Das humane Pankreaskarzinom	6
1.1.1.1.	Epidemiologie des Pankreaskarzinoms	6
1.1.1.2.	Diagnostik des Pankreaskarzinoms	7
1.1.1.3.	Therapie und Prognose des Pankreaskarzinoms	9
1.1.1.4.	Epidemiologie der Lebermetastasen	11
1.1.1.5.	Diagnostik von Lebermetastasen	11
1.1.1.6.	Therapie und Prognose bei Lebermetastasierung	12
1.1.2.	Tiermodelle	13
1.1.2.1.	Das Hamstermodell	14
1.1.2.2.	Variationen im Modell des BOP-induzierten Pankreaskarzinoms	15
1.2.	Das Konzept der Cox-2- und 5-Lox- Hemmung	16
1.2.1.	Der Stoffwechsel der Eikosanoide	16
1.2.1.1.	Arachidonsäure und andere essentielle Fettsäuren	16
1.2.1.2.	Die Rolle der Cyclooxygenase und Lipoxygenase in der Biosynthese der Eikosanoide	17
1.2.1.2.1.	Cyclooxygenase (Prostaglandin-H ₂ -Synthase)	17
1.2.1.2.2.	Lipoxygenase	19
1.2.2.	Cox-2- und 5-Lox-Hemmer: Celebrex und Zyflo	21
1.2.2.1.	Celebrex	21
1.2.2.1.1.	Gesicherte Indikationen von Celebrex	21
1.2.2.1.2.	Celebrex und andere nichtsteroidale Antiphlogistika beim Pankreaskarzinom	21
1.2.2.1.3.	Celebrex und der Einfluss auf die Metastasierung	23
1.2.2.2.	Zyflo	24
1.2.2.2.1	Gesicherte Indikationen von Zyflo	24
1.2.2.2.2.	Zyflo beim Pankreaskarzinom	24
1.2.2.2.3.	Zyflo und der Einfluss auf die Metastasierung	25

1.3.	Oxidativer Stress und Lipidperoxidation	26
1.3.1.	Biochemische Grundlagen	26
1.3.2.	Oxidative Schutzmechanismen	28
1.3.3.	Bedeutung der Hochfetternahrung, der Lipidperoxidation und des Eikosanoidstoffwechsels in der Karzinogenese und Metastasierung	31
1.4.	Begründung und Erläuterung des Versuchsvorhabens	35
2.	Material und Methoden	37
2.1.	Tiermodell	37
2.1.1.	Tierhaltung und Versuchsgruppeneinteilung	37
2.1.2.	Ernährung der Versuchstiere	38
2.1.3.	Phase der Tumorinduktion	40
2.1.4.	Therapiephase	40
2.2.	Histologische Aufarbeitung	40
2.2.1.	Studienbeendigung / Obduktion	40
2.2.2.	Histologische Untersuchungen	42
2.3.	Biochemische Untersuchungen	43
2.3.1.	Chemikalien und Geräte	43
2.3.2.	Herstellung des Homogenats	44
2.3.3.	Bestimmung der GSHPX-Aktivität	45
2.3.3.1.	Prinzip der GSHPX-Aktivitätsbestimmung	45
2.3.3.2.	Durchführung und Berechnung der Ergebnisse	45
2.3.4.	Bestimmung der SOD-Aktivität	46
2.3.4.1.	Prinzip der SOD-Aktivitätsbestimmung	46
2.3.4.2.	Durchführung und Berechnung der Ergebnisse	46
2.3.5.	Proteinbestimmung nach Lowry	47
2.3.5.1.	Prinzip der Proteinbestimmung	47
2.3.5.2.	Durchführung und Auswertung	47
2.3.6.	Bestimmung der Lipidperoxidations-Produkte	48
2.3.6.1.	Prinzip der Lipidperoxidations-Produktbestimmung	48
2.3.6.2.	Durchführung und Auswertung	48

2.4.	Statistische Berechnungen	49
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Letalität	50
3.2.	Makroskopie und Auflichtmikroskopie	51
3.2.1.	Makroskopie und Auflichtmikroskopie des Pankreas	51
3.2.1.1.	Inzidenz pankreatischer Raumforderungen	51
3.2.2.	Makroskopie und Auflichtmikroskopie der Leber	52
3.2.2.1.	Inzidenz und Anzahl metastasenverdächtiger Raumforderungen	52
3.2.2.2.	Größe metastasenverdächtiger hepatischer Raumforderungen	54
3.3.	Histologische Ergebnisse	55
3.3.1.	Klassifikation der pankreatischen Raumforderungen	55
3.3.2.	Klassifikation der hepatischen Raumforderungen	56
3.4.	Biochemische Ergebnisse	58
3.4.1.	Eiweißgehalt	58
3.4.2.	GSHPX-Aktivität	59
3.4.3.	SOD-Aktivität	61
3.4.4.	Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten	63
4.	Diskussion	66
4.1.	Die Auswirkungen von BOP und einer Hochfetterernährung mit Linol- und Linolensäure auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas	66
4.2.	Die Auswirkungen von Celebrex und Zylflo auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas	72
4.3	Schlussfolgerungen	82
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literaturverzeichnis	89
7.	Schriftliche Erklärung	106
8.	Lebenslauf	107
9.	Publikationen	108
10.	Danksagung	109

1. Einleitung

1.1. Das Pankreaskarzinom

1.1.1. Das humane Pankreaskarzinom

1.1.1.1. Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom ist in den westlichen Industrienationen bei einer Inzidenz von 2,9-10/100.000/Jahr die viert- bis fünfhäufigste krebserkrankende Todesursache und eine der aggressivsten Tumorerkrankungen überhaupt. Jährlich erkranken weltweit ca. 170.000 Patienten an einem Pankreaskarzinom, ca. 12.800 neu erkrankte Patienten sind pro Jahr in Deutschland zu verzeichnen, allein 40.000 Patienten versterben in Europa an der Krankheit. Ursächlich für die geringe 5-Jahresüberlebensrate von unter 5% sind die späte Diagnosefindung, die daraus folgende geringe kurativ intendierte Resektionsrate und eine gleichzeitig frühe und aggressive Metastasierung des Tumors (3,21,30,39,40,45,51,53,61,63,67,82,112,113,126,152,181,185,193). Mehr als 80% der Pankreaskarzinome gehen vom duktalem Epithel aus, seltener sind azinäre Tumoren, die sich aus den sekretbildenden Parenchymzellen ableiten bzw. endokrine Tumoren, die von den endokrinen Tumoren der Langerhans-Inseln ausgehen (3,55,63,191,193). Durch epidemiologische Studien stehen folgende Risikofaktoren in Verdacht, für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms verantwortlich zu sein. Nikotinkonsum verdoppelt als einziger sicher nachgewiesener Faktor in Kohorten- und Fallkontrollstudien das relative Erkrankungsrisiko (55,61,63,113,152,172,191). Epidemiologische und tierexperimentelle Studien deuten darauf hin, dass nutritive Faktoren wie die verstärkte Einnahme von tierischen Fetten bzw. Cholesterin assoziiert sind mit einer erhöhten Inzidenz von Tumoren z.B. des Pankreas, Kolon, Mamma und Prostata. Ebenso scheint eine Korrelation zwischen Pankreaskarzinom und Koffein, Alkoholkonsum, Adipositas, Diabetes mellitus, chronischer Pankreatitis und familiärer Disposition zu bestehen (3,21,39,53,55,63,67,113,191). Desgleichen steht die Ursachenfindung über die nachgewiesene höhere Karzinominzidenz bei Männern

gegenüber Frauen in einem Verhältnis von 1,3-1,5:1,0 sowie von Farbigen gegenüber Weißen noch aus (61,63,113,191,193,200). 80% aller Betroffenen befinden sich zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr (3,21,53,63,82,113,191,193). Schlussfolgernd muss für die Entstehung des Pankreaskarzinoms eine multifaktorielle Ätiologie angenommen werden.

1.1.1.2. Diagnostik des Pankreaskarzinoms

Ein gezieltes Screening ist aufgrund des Fehlens von Risikogruppen nicht möglich (3,106). Das Karzinom manifestiert sich anfänglich mit unspezifischen Symptomen wie Appetitverlust, Verdauungsstörungen und Anämie. Seltener klagten die Patienten über Diarrhoe oder Steatorrhoe, bzw. manifestiert sich die Erkrankung mit einer akuten Pankreatitis oder als Diabetes mellitus (3,21,63,113,193). Die Symptomentrias Verschlussikterus, Oberbauchschmerz, unklarer Gewichtsverlust, die bei 75% der Patienten auftritt und zum Aufsuchen des Arztes führt, sind in der Regel Spätsymptome. Das Courvoisiersche Zeichen kann bei 25% der Erkrankten als positiv verzeichnet werden (63,165,191). Neoplasien im Bereich des Pankreaskopfes, etwa 60% der diagnostizierten Tumoren, haben hier eine relativ bessere Prognose als Raumforderungen im Korpus- oder Kaudabereich, da ein Verschlussikterus schon bei kleinen Tumoren auftreten und somit als Frühsymptom alarmierend wirken kann (63,165,191,193). Meist muss jedoch von einem fortgeschrittenen Leiden mit einer möglichen Fernmetastasierung ausgegangen werden, auf welches Symptome wie ein palpabler Tumor im Epigastrium oder periumbilikal, Thrombophlebitis migrans, Hepatosplenomegalie, Aszites oder Schwellungen der Virchowschen Drüse in der Fossa supraclavicularis sinistra hinweisen (44,165,191). In der Diagnostik des Pankreaskarzinoms wurden in den letzten Jahren deutliche Fortschritte erzielt, weiterhin bleiben jedoch die Früherkennung und das präoperative Staging von Pankreastumoren eines der Hauptprobleme in Management und Therapie (3,55,63). Besteht infolge des Vorliegens o.g. Kardinalsymptome der klinische Verdacht auf ein Pankreaskarzinom ist der erste diagnostische Schritt aufgrund der breiten Verfügbarkeit, der einfachen Handhabung und der fehlenden Strahlenbelastung die abdominelle Sonographie (3). Pankreastumore lassen sich in Abhängigkeit von Größe und Lokalisation mit einer Sensitivität von 50-95% sonographisch nachweisen. Die Spezifität ist in der

gleichen Größenordnung zu betrachten (21). Nachteile der konventionellen Sonographie sind die zu berücksichtigende starke Untersucherabhängigkeit und die durch evtl. Luftüberlagerungen erschwerte bzw. unmögliche Beurteilung der Pankreasloge (44,54,165,191). Daher wird zur weiteren Diagnostik die Spiral-Computertomographie (CT) eingesetzt. Mit einer Sensitivität und Spezifität von ca. 90% führt die CT in den Fällen größerer Tumoren zur definitiven Diagnose und macht umfassende Aussagen über das Ausmaß der Ausbreitung des Tumors bzw. seiner Metastasierung (3,21,44,54,55,106,161). Zur Detektion von Tumoren <1,5cm ist die Endosonographie mit einer Sensitivität von über 90% mindestens gleichwertig im Vergleich mit den o.g. Methoden. Allerdings sind die Verfügbarkeit und die notwendige Erfahrung zur Befundinterpretation ebenfalls limitierende Faktoren wie das aus technischen Gründen fast unmögliche Erkennen von Fernmetastasen (153,161,179). Ein weiteres bildgebendes Verfahren mit einer Sensitivität von ca. 80% und einer Spezifität von ca. 95% vergleichbar mit den Werten der CT ist die Endoskopisch-Retrograde-Cholangiopankreatikographie (21,106,161,165). Günstig bei diesem invasiven Verfahren erscheint die Biopsie aus dem Ductus pancreaticus, die jedoch bei bestehender Symptomatik und positivem CT-Befund keine weiteren Hinweise über die Resektabilität des Tumors macht (21,44,54,161,165,193). Jedoch ist im Vergleich zu den anderen diagnostischen Methoden gleichzeitig eine Therapie möglich, z.B. die Implantation eines Stents bei Verschlussikterus. Dieses Vorgehen ist sowohl bei geplanter R0-Resektion als auch im Rahmen einer palliativen Situation möglich. Bleibt die Resektabilität durch o.g. Bildgebung nicht beurteilbar erfolgt eine explorative Laparotomie, an die sich die kurative Resektion oder Palliation anschließt. Anstelle der explorativen Laparotomie wird in einigen Kliniken infolge erhöhter CA19-9 Werte ohne Nachweis einer Tumorausbreitung in der Bildgebung die Laparoskopie zur Beurteilung der Resektabilität durchgeführt (63,80). Die Sensitivität und Spezifität der Magnetresonanztomographie (MRT) ist vergleichbar mit denen der CT (63,106,161). Der potentielle Vorteil der MRT liegt im hohen Gewebekontrast sowie der Darstellung ohne obligate Kontrastmittelgabe und natürlich der fehlenden Strahlenbelastung (106). Bisher konnten keine überzeugenden Daten vorgelegt werden, die einen diagnostischen Vorteil für die MRT belegen (106,187). Nach nicht gelungener invasiver Gangdarstellung mittels Endoskopisch-Retrograder-Cholangiopankreatikographie ist die Magnetresonanztomographie eine

wertvolle Alternative (2,161,187). Noch unklar ist der Stellenwert der Positronen-Emissions-Tomographie und der Angiographie in der Pankreasdiagnostik. In der Literatur sind die Diskussionen über diese Verfahren noch konträr (3,54,101,118,161).

1.1.1.3. Therapie und Prognose des Pankreaskarzinoms

Die R0-Resektion, die nur bei 10-20% aller Patienten durchführbar ist, bietet als einzige Therapieoption eine Chance auf Heilung. Auch bei Ausbreitung des Tumors auf Nachbarorgane ist das Ziel die Resektion in nicht befallenen Gewebe. Die Prognose des Pankreaskarzinoms ist häufig infaust, da die Erkrankung bei Diagnosestellung meist fortgeschritten ist und Fernmetastasen bzw. Infiltrationen des Truncus coeliacus bzw. der Arteria mesenterica superior fast nie eine Resektion im Gesunden erlauben (3,21,40,44,45,80,126,193). Als chirurgische Therapie der Wahl gelten die partielle Pankreatoduodenektomie nach Kausch/Whipple, die pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion nach Longmire/Traverso bei Pankreaskopfkarzinomen sowie die Pankreaslinksresektion bei Tumoren im Bereich des Pankreasschwanzes (3,21,55,80,100,187,190). Dahingegen führt die totale Pankreatektomie, regionale Pankreatektomie nach Fortner, OP nach Appleby bei deutlich schlechterer Lebensqualität im Vergleich zu o.g. Resektionsverfahren zu keiner signifikanten Verbesserung der Prognose (30,80,191,193). Die mediane Überlebenszeit aller am Pankreaskarzinom Erkrankten beträgt nach Diagnosestellung 3-6 Monate (3,38,55,67,185,190,193). Nach 1 Jahr sind ca. 90% der Patienten verstorben bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von maximal 2-5% (15,21,30,55,82,124,185). Selbst bei R0-Resektion ist nur mit einer mittleren Überlebenszeit (MÜZ) von 12-20 Monaten zu rechnen, bei einer 5-Jahres-Überlebenszeitrate zwischen 15-20% (3,21,30,63,161,100,165,181,190). Mit einer Verschlechterung der Prognose muss gerechnet werden, wenn zum Zeitpunkt der Operation bereits Lymphknotenmetastasen peripankreatisch, paraaortal bzw. im Hilusbereich der Leber vorliegen (30,161). Die hämatogene Metastasierung erfolgt am häufigsten in die Leber, weiterhin können Metastasen in Lunge, Pleura, Skelett und Nebennieren vorliegen. Die statistische 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt für dieses Patientenkollektiv 1-2,8% (161). In diesem Zusammenhang erscheinen neo- bzw.

adjuvante Therapiestrategien bedeutungsvoll. Die vorliegenden Daten zur neoadjuvanten Radio- und/oder Chemotherapie erlauben keine definitive Schlussfolgerung, ob eine Verbesserung der Überlebenszeit bzw. der Resektionsquote erreicht wird. Eine Therapie erscheint aktuell nur im Rahmen von Studien sinnvoll (3,21,55,63,80).

Für die Wirksamkeit einer Radiochemotherapie finden sich widersprüchliche Resultate. Eine Verlängerung des Überlebens konnte zwar durch eine Studie der Gastrointestinal Tumor Study Group nachgewiesen werden, zeigte sich jedoch nicht in den Ergebnissen einer EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)-Studie bzw. im ESPAC-(European Study Group for Pancreatic Cancer)1-Trial (21,55). Eine Metaanalyse konnte einen Vorteil der Radiochemotherapie im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie nur bei Patienten ohne tumorfreien Resektionsrand aufzeigen. Der Nutzen einer Radiochemotherapie nach operativer Resektion ist somit als nicht gesichert anzusehen und muss in weiteren Studien evaluiert werden (21,55,174).

Eine Behandlung mit Gemcitabine, einem Nukleosidanalogen, nach R0/R1-Resektion konnte in der größten randomisiert kontrollierten Studie im Vergleich mit Patienten ohne Chemotherapie eine signifikante Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens aufzeigen, wobei sich Einschränkungen im Gesamtüberleben ergaben (132). Aktuell besteht die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie nach R0-Resektion bei gleichzeitigem Fehlen von Fernmetastasen (3,21,55,132,174).

Beim metastasierten Pankreaskarzinom besteht die Indikation zur palliativen Chemotherapie. Eine alleinige Chemo- oder Strahlentherapie zeigte in bisherigen Studien einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber keiner Therapie (21,55,80,191,193,203). Wobei die Kombination mit einer Chemotherapie der isolierten Radiatio überlegen ist (21,193,203). Es wird zwar eine Verlängerung der Überlebenszeit beschrieben, jedoch bei gleichzeitig starken Nebenwirkungen. Gemcitabine zeigt als Monotherapie eine signifikante Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 5,6 versus 4,4 Monaten und eine Verbesserung der Lebensqualität im Vergleich zu 5-Fluorouracil behandelten Patientengruppen. Das 1-Jahres-Überleben unter Gemcitabine beträgt 18-20% (3,21,51,63,203). In aktuellen Studien wird eine mögliche Wirkungsverbesserung durch Dosiserhöhung und in Kombination mit anderen Chemotherapeutika wie Cisplatin, Oxaliplatin und Capecitabin untersucht (3).

1.1.1.4. Epidemiologie der Lebermetastasen

Die Leber ist der häufigste Ort einer hämatogenen Metastasierung (49,93). Nach statistischer Häufigkeit steht der Befall der Leber nach lokalem Lymphknotenbefall an zweiter Stelle als Metastasierungsort (44). Je nach Art des Primärtumors treten in 25-50% Lebermetastasen auf. Im Falle des Pankreaskarzinoms können bei 50-75% der Patienten bei Diagnosestellung Lebermetastasen nachgewiesen werden (55,63,82). Tumoren des Gastrointestinaltrakts, der Lunge, der Mammæ und das maligne Melanom stellen dabei die häufigsten Primärtumoren, weniger häufig sind Prostatakarzinome und Schilddrüsenkarzinome verantwortlich. Kolorektale Karzinome stellen bei einer Lebermetastasierungswahrscheinlichkeit von 60-80% die am besten untersuchte Gruppe dar (27,49).

1.1.1.5. Diagnostik von Lebermetastasen

Metastasen sind mit Abstand die häufigsten malignen Lebertumoren. In Studien konnte gezeigt werden, dass in 30-70% der an einem Karzinom verstorbenen Patienten bei der Autopsie Lebermetastasen gefunden werden konnten. Bei Patienten mit extrahepatischen Malignomen, wie z.B. dem Pankreaskarzinom, bedeutet das Vorliegen von Lebermetastasen im Hinblick auf eine Heilung fast immer Nonresektabilität (21,80,161). Da es bei der Mehrzahl von Patienten mit Pankreaskarzinom zuerst zu einer Metastasierung in die Leber kommt, muss das präoperative Staging immer die Leber mit einschließen. Erfolgreich ist der Nachweis von Lebermetastasen in der Sonographie, der bei geübten Untersuchern eine Sensitivität von 35-100% bei einer Spezifität von 90% erreicht (1,99,163). Die Sensitivität der CT kann durch Gabe von Kontrastmittel und durch technische Verbesserung auf etwa 94% gesteigert werden, bei einer Spezifität von 93% (99,161). Höchste Sensitivität von bis zu 100% weist die CT- Arterioporthographie auf (21,163). Jedoch trägt sie infolge der geringen Spezifität von 36-68% und der Invasivität der Methode weniger zum Nachweis als zum Ausschluss von Lebermetastasen bei (21,163). Die MRT der Leber zeigt bessere Werte für Sensitivität (52-96%) und Spezifität im Vergleich zur CT, es mangelt jedoch an der ubiquitären Verfügbarkeit (60,66,99,161).

Zunehmend wird die Laparoskopie mit direkter Ultraschalluntersuchung eingesetzt. In einer prospektiven Vergleichsuntersuchung zwischen Doppelspiral-CT und Laparoskopie mit Sonographie wurden hierdurch 9,5% zusätzliche Tumoren bei 20% der Patienten nachgewiesen (76). Selbst in diesem nach klinischen und bildgebenden Verfahren hochselektierten Patientenkollektiv können bei einer explorativen Laparotomie bzw. Laparoskopie in 35-70% der Fälle Lebermetastasen gefunden werden (47,60,76). Ungewiss erscheint in diesem Zusammenhang der Einfluss einer Laparoskopie auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten des Pankreaskarzinoms.

Die bislang vorliegenden Daten zur Diagnostik von Lebermetastasen mittels Positronenemissionstomographie (PET) stützen sich auf relativ kleine Patientengruppen. Hier wurden Sensitivitäten von bis zu 99% für die Detektion von Lebermetastasen beschrieben (99,136,161). Die Wertigkeit der PET muss daher weiter evaluiert werden.

1.1.1.6. Therapie und Prognose bei Lebermetastasierung

Lebermetastasen sind bei über 30-70% aller Patienten mit einem Malignom zu erwarten. Retrospektive Untersuchungen zeigen, dass ohne Behandlung die mittlere Überlebenszeit weniger als 24 Monate beträgt (7,49,80,183). Die mediane Überlebenszeit liegt bei 3-12 Monaten (21,44,49). Für Patienten mit Lebermetastasen stellt heute die chirurgische Therapie mit 5-Jahres-Überlebensraten von 25-37% die einzige Chance auf eine Kuration dar (49,98). Ein Rezidiv von Lebermetastasen nach einem potentiell kurativen Eingriff tritt bei mehr als 40-60% der Patienten auf. Die Resektion des Rezidivs ist nur bei 20-30% der Patienten möglich. Im Vergleich zur Erstresektion ergeben sich in Bezug auf Morbidität und Mortalität keine signifikanten Unterschiede. Kontraindikationen zur Leberresektion ergeben sich, wenn eine vollständige Metastasenentfernung nicht möglich ist, wie im Falle einer extrahepatischen bzw. diffusen intrahepatischen Metastasierung. Beim überwiegenden Teil der Patienten ist daher eine kurative Resektion infolge des vorangeschrittenen Tumorstadiums nicht mehr möglich, so dass ein palliatives Vorgehen zu erwägen ist. Als chirurgische Ansätze wären die Anlage einer biliodigestiven Anastomose, eine Gastroenterostomie oder eine Stentimplantation in den Ductus choledochus denkbar (21,44,54,80).

Eine adjuvante Chemotherapie bei Lebermetastasierung ist am häufigsten im Rahmen eines kolorektalen Karzinoms untersucht worden. Die mediane Überlebenszeit liegt hierbei zwischen 12 und 20 Monaten (24,74). Dabei stellt die Leber in 40% aller Patienten den Ort des primären Auftretens eines Rezidivs da. Daher ist die regionale Gabe von Chemotherapeutika die am häufigsten untersuchte Therapieform mit dem Nachweis einer Verlängerung der Überlebenszeit (98). Jedoch verhindert die Komplexität Ihrer Anwendung eine Weiterverbreitung und ist somit nur in spezialisierten Zentren durchführbar. Die Mehrheit der Patienten erhält daher primär oder nach kurativer Metastasenresektion eine systemische Chemotherapie. In einer Multizenterstudie konnte nach Resektion kolorektaler Lebermetastasen ein signifikantes Überleben nach systemischer Chemotherapie im Vergleich zum nicht therapierten Patientenkollektiv nachgewiesen werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate in der 5-FU (Fluorouracil) therapierten Gruppe betrug 33,5% vs. 26,7% in der Kontrollgruppe (140). Gemcitabine beim metastasierten Pankreaskarzinom erreicht 1-Jahres-Überlebensraten von 18-20% und ist nach Empfehlung der deutschen S3-Leitlinien von 2007 Standardtherapie der palliativen Behandlung eines metastasierten Pankreaskarzinoms (3). Weiterhin besteht beim metastasierten Pankreaskarzinom im Rahmen von Studien die Möglichkeit der Therapie mit Gemcitabine und dem EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib. Hier konnte eine Verlängerung des medianen Überlebens um 25% nachgewiesen werden (3). Trotz zunehmender Weiterentwicklung der Chemotherapeutika in den letzten Jahren scheint das Problem der differenzierten Ansprechbarkeit der Lebermetastasen in den verschiedenen Tumorstadien der unterschiedlichsten Primärtumoren nicht geklärt zu sein (74). Berücksichtigung muss bei vorliegender Leberteilresektion neben der Effektivität unter anderem die Toxizität der Therapeutika finden. Angesichts der ungünstigen Prognose sollte bei der Beurteilung des therapeutischen Nutzens die Linderung krankheitsassoziierter Symptome als Maßstab besonders hoch gewertet werden (24,55,80).

1.1.2. Tiermodelle

Um die Auswirkungen einer Therapie mit Celebrex und Zylflo auf das Metastasierungsverhalten des Pankreaskarzinoms und die hierbei auftretenden

morphologischen und biochemischen Veränderungen im Pankreas und der Leber unter einheitlichen Bedingungen untersuchen zu können, bedurfte es einer reproduzierbaren standardisierten Versuchsanordnung. Dazu benötigten wir ein Tiermodell, welches mit dem humanen duktalem Pankreaskarzinom sowohl morphologisch und biologisch als auch klinisch vergleichbar ist.

1.1.2.1. Das Hamstermodell

Pour et al. gelang 1974 die erfolgreiche Tumorinduktion im Syrischen Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) mit 2,2'-Dihydroxy-di-n-propylnitrosamin (DHPN). Durch Verwendung ähnlicher Nitrosaminderivate konnten die Nachteile von DHPN wie die Tumormanifestationen in der Lunge, Leber, Nieren, Nasenebenhöhlen, Kehlkopf und Trachea deutlich verringert werden (141,142,143,172). Gängig ist heute die Verwendung von N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP). Die einzigartigen Vorteile dieses Hamstermodells bestehen in der einfachen subkutanen Applikation der Karzinogene, der kurzen Tumoralenzeit bis zum Auftreten der Pankreastumoren von 15 Wochen, der hohen Rate von Adenokarzinomen des Pankreas, die in 80% der Fälle beim Menschen vorliegen und letztlich einer ca. 100%igen Pankreasspezifität (142,143,172).

Vergleiche mit anderen Tiermodellen spiegeln die erstaunlichen Ähnlichkeiten des Hamstermodells mit dem humanen duktalem Adenokarzinom des Pankreas wieder (10,61,112,142,143). Histologisch beobachtet man bei den multizentrisch entstehenden, meist schon makroskopisch sichtbaren Tumoren eine gute Differenzierung, Bildung duktaler und papillärer Strukturen, Begleitdesmoplasien, neurale und lymphatische Infiltrationen (61,142,143,172). Ebenso wie beim Menschen findet man bei den Hamstern Gewichtsverlust, Diarrhoe, Thrombosen, Ikterus und Diabetes mellitus (61,112,142,143,172). Dagegen handelt es sich z.B. bei den Azaserin-induzierten Karzinomen der Ratte um fast ausschließlich azinäre Adenokarzinome, die Rückschlüsse auf den Menschen nur begrenzt möglich machen (61,112,172). Der Versuch, Schweine, Hasen, Hunde oder Mäuse als Tiermodell des induzierten Pankreaskarzinoms zu nutzen, war ebenfalls nicht erfolgreich (143,172). Aufgrund der hohen Übereinstimmung hinsichtlich der klinischen, morphologischen, biochemischen und molekulargenetischen

Eigenschaften des BOP-induzierten Pankreaskarzinoms im Syrischen Goldhamster mit dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas im Menschen hielten wir dieses Tiermodell für unsere Studie am geeignetsten.

1.1.2.2. Variationen im Modell des BOP-induzierten Pankreaskarzinoms

Bedeutsam für unsere Studie erschien uns die Zusammensetzung des Nahrungsfetts und die Höhe der enteralen Fettzufuhr. In der gängigen Literatur können Klärungsansätze der Pathomechanismen des prokarzinogenen Effekts und der Steigerung des Metastasierungsverhaltens für gesättigte und ungesättigte Fettsäuren aufgezeigt werden. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gelang der Nachweis einer Steigerung sowohl der Inzidenz von Pankreaskarzinomen als auch der Lebermetastasierung im Hamstermodell unter Erhöhung des Anteils an Linol- und Linolensäure (20,39,61,97,112,139,143,172,194-197). Daher erhielten die Hamster aller Gruppen eine Hochfettdiät in Form eines Spezialfutters (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), dessen Gehalt an α -Linolensäure (ALS) 2% und der an Linolensäure (LS) 11% betrug.

1.2. Das Konzept der Cox-2- und 5-Lox-Hemmung

1.2.1. Der Stoffwechsel der Eikosanoide

Eikosanoide scheinen eine entscheidende Rolle beim Tumorwachstum und der Metastasierung zu spielen (42,78,107,115,139,149,158,159,167,171,176,184,194,197).

1.2.1.1. Arachidonsäure und andere essentielle Fettsäuren

Von den für den Stoffwechsel wichtigen ungesättigten Fettsäuren können vom menschlichen Organismus wegen der spezifischen Eigenschaften der Fettsäuredesaturasen lediglich Palmitolein- und Ölsäure synthetisiert werden (158,159). Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure sind für den tierischen Organismus essentiell, müssen also mit der Nahrung aufgenommen werden (86,158,159). Jedoch kann Arachidonsäure durch Kettenverlängerung und Desaturierung aus Linolsäure synthetisiert werden (11,86,135,158,159,170,200). Der enzymatische Prozess der Desaturierung und Elongation der Fettsäuren ist in den Mikrosomen der Leber lokalisiert. Aus diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere der Arachidonsäure, freigesetzt durch membranständige Phospholipasen, entstehen Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene und Epoxyde (39,42,78,86,107,110,135,146,158). Hierfür erfolgt die enzymatische Metabolisierung der Arachidonsäure hauptsächlich durch Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen und Cytochrom P-450 Oxygenasen (78). Diese o.g. Derivate mehrfach ungesättigter Fettsäuren entstehen in den meisten tierischen Geweben, wo sie hormonelle und andersartige Stimuli modulieren. Desweiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktionen (11,42,78,86,107,115,139,170,184, 200). Zusammenfassend werden sie unter der Bezeichnung Eikosanoide geführt.

1.2.1.2. Die Rolle der Cyclooxygenase und Lipoxygenase in der Biosynthese der Eikosanoide

1.2.1.2.1. Cyclooxygenase

Die von Needleman et al. aufgestellte Hypothese über das Bestehen zweier Cyclooxygenaseformen - Cyclooxygenase 1 (Cox-1) und Cyclooxygenase 2 (Cox-2) - konnte 1991 durch Klonierung des Cox-2 Gens bestätigt werden (189). Tatsächlich liegen drei Isoenzyme vor, die von getrennten Genen codiert werden, wobei die Cox-3 aus Cox-1 transkribiert wird und ihre Funktion aktuell nicht ausreichend geklärt ist. Das größte Vorkommen an Cox-3 im Menschen findet sich im cerebralen Cortex und im Herzen (27,42,78,130,131,144,158,171,184,189). Die Expressierung von Cox-1 erfolgt in allen gesunden Geweben im Rahmen der normalen Zellfunktion (12,27,40,104,108,119,124,136,158,171,185,188,189). So unterliegt z.B. die Bildung von Prostaglandinen im Gastrointestinaltrakt, welche die Mukosa des Magens vor der erodierenden Wirkung der sauren Verdauungssäfte schützt, der Kontrolle der Cox-1 (42,78,94,134,171,188,192). Trotz einer geringgradigen Cox-2 Expression in den Nieren, überwiegt in den Sammelröhrchen, Interstitiumzellen der Papillae renales und dem renalen Gefäßsystem die Cox-1 (94,134,171,188,189,192). Die Regulierung der Thrombozytenaggregation und der Blutungszeit erfolgt ebenfalls durch die Cox-1 (22,134,136,171,183,188,192). Die Cox-2 dagegen findet man konstitutiv in geringen Konzentrationen im Gehirn, Prostata, Testes, Lungen, Nieren, den Insellzellen des Pankreas und induzierbar in allen entzündeten Geweben (38,136,177). Zu den Induktoren der Cox-2 zählen unter anderem Wachstumsfaktoren, Tumorpromoter und Zytokine (12,27,40,42,104,108,119,124,130,131,134,136,158,171,182,185,186,188,192). Experimentelle Untersuchungen an der Ratte ergaben nach Induktion einer Entzündungsreaktion, dass die Mengen an gebildeter Cox-2-Messenger-RNA und Cox-2-Protein erhöht waren, während die Cox-1-Messenger-RNA-Transkriptionsrate unverändert blieb (136). Weiterhin korrelierten die Menge des inflammatorisch wirkenden Prostaglandins E_2 und die Entwicklung von Ödemen mit der erhöhten Expression von Cox-2 (32). Bei der Cyclooxygenase handelt es sich um ein perinukleär gefundenes bzw. im endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes

Transmembranenzym, welches die für die katalysierten Reaktionen verantwortlichen Domänen auf der zytoplasmatischen Seite trägt (40,128,136). Nach Freisetzung von Arachidonsäure (Eikosatetraensäure) aus Zellmembranen durch die Phospholipase A₂ wird in einem zweistufigen Vorgang durch die Cyclooxygenase-Aktivität von Cox zunächst Prostaglandin G₂ (PGG₂) umgesetzt. Im Anschluss daran wird durch die Peroxidase-Aktivität von Cox die 15-Hydroperoxylgruppe des Prostaglandins G₂ zur 15-Hydroxylgruppe des Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert (42,107,119,128,135,136,158). Schließlich wird PGH₂ durch verschiedene gewebsspezifische Enzyme in weitere Prostaglandine oder Thromboxane umgewandelt, die dann ihre biologischen Wirkungen in den entsprechenden Geweben ausüben (22,119,135,136). Der Unterschied zwischen den einzelnen Abkömmlingen des Prostaglandin H besteht in der Position der einzelnen Hydroxyl- bzw. Ketogruppen. Aus Eikosatriensäure entstehen die Prostaglandine der Serie 1, aus Arachidonsäure diejenigen der Serie 2 und aus Eikosapentaensäure die der Serie 3 (51,78). Dabei scheinen z.B. Prostaglandine der Serie 2 proinflammatorisch zu sein während Prostaglandine der Serie 3 eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen wird (51). Die Abbildungen 1 und 2 zeigen in schematischer Form die Biosynthese von Eikosanoiden aus Arachidonsäure.

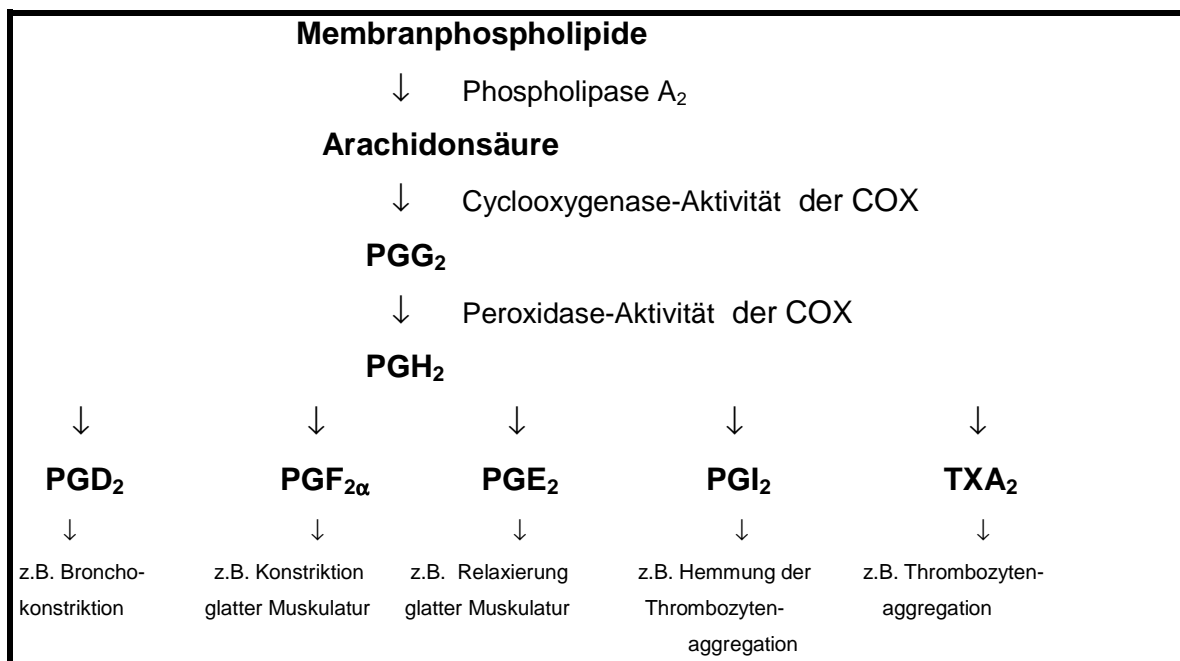


Abb. 1 Entstehung von Prostaglandinen und Thromboxanen aus Arachidonsäure

1.2.1.2.2. Lipoxygenase

Außer Prostaglandinen und Thromboxanen können aus ungesättigten Fettsäuren noch zahlreiche weitere, sauerstoffhaltige Reaktionsprodukte entstehen. Hierzu gehören neben freien Radikalen auch Hydroxy- und Hydroperoxysäuren sowie Leukotriene. Diese alternativen Modifikationen der Arachidonsäure werden durch Lipoxygenasen erzeugt. Der initiale enzymatische Schritt erfolgt durch die Calcium- und ATP-abhängige Präsentation der Arachidonsäure an die 5-Lipoxygenase durch FLAP, das 5-Lipoxygenase Activating Protein (78). Die 5-Lipoxygenase lässt eine Hydroperoxydstruktur am C-Atom 5 der Arachidonsäure entstehen, die 5-Hydroperoxyeikosatetraensäure (5-HPETE) (38,39,78, 107,128,135,168,173). Aus dieser wiederum entsteht über die Zwischenstufe 5-Hydroxyeikosatetraensäure (5-HETE) durch Umlagerung der Doppelbindungen eine Verbindung mit drei konjugierten Doppelbindungen, das Leukotrien A₄, welches Ausgangssubstanz für die Biosynthese der anderen Leukotriene ist (40,78,128,168, 173).

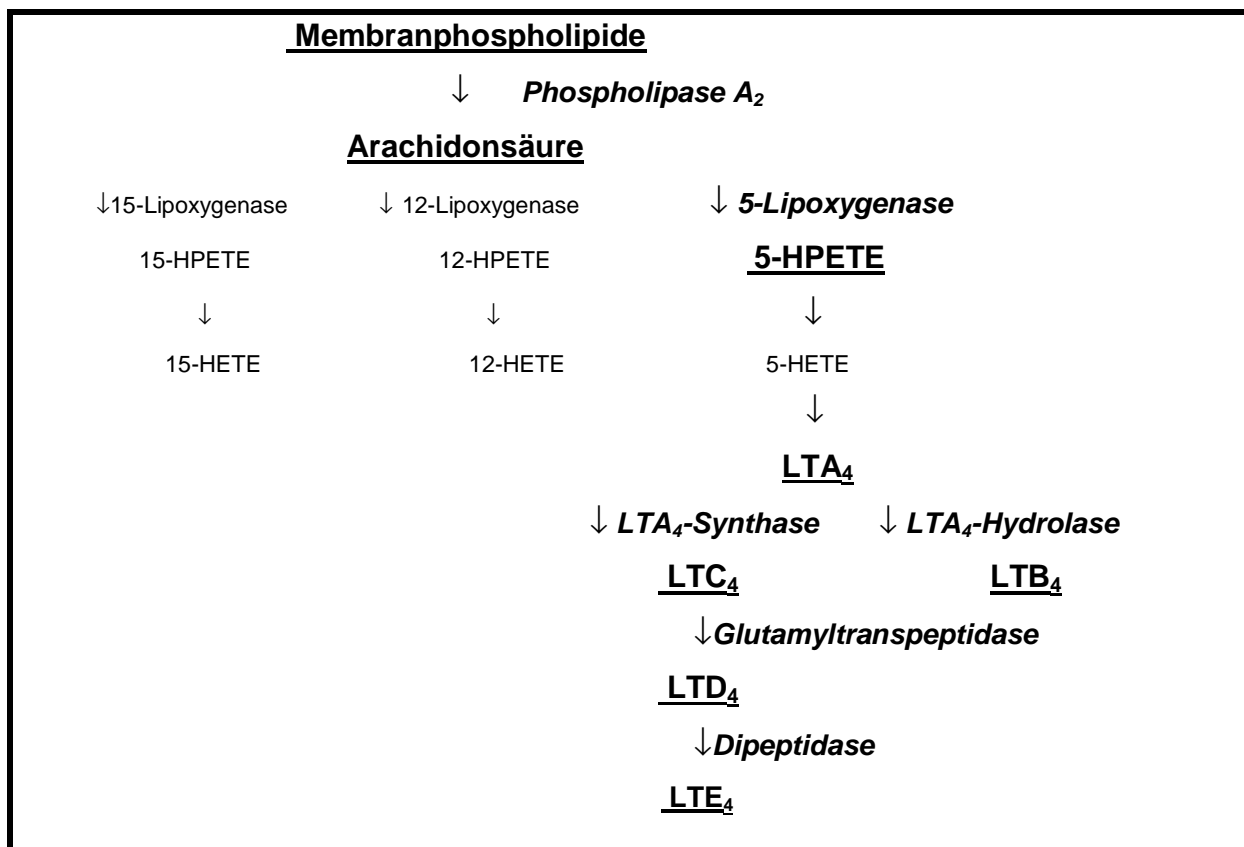


Abb.2 Entstehung von Leukotrienen aus Arachidonsäure

Durch die Wirkung der Epoxydhydrolase wird das Leukotrien B₄ (LTB₄) gebildet. Durch Anheftung von Glutathion über eine Thioetherbrücke entsteht das Leukotrien C₄ (LTC₄) (128). Schrittweises Abtrennen von Glutamat und Glycin führt zur Bildung von Leukotrien D₄ (LTD₄) und E₄ (LTE₄) aus Leukotrien C₄ (128). Zu den Sulfidpeptid-Leukotrienen, auch als anaphylaktische slow-reacting Substanzen bekannt, zählen LTC₄, LTD₄, LTE₄ (173). LTB₄ wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und Eosinophile (128). In vitro zeigen LTB₄ und LTC₄ eine Zunahme des Wachstums arterieller glatter Muskelzellen, Epithelzellen im Respirationstrakt und Lymphozyten (29,173). Die biologischen Effekte der Leukotriene sind vielfältig und beeinflussen Zellinteraktion, -struktur und -metabolismus (158,168). Sie führen unter anderem zu einer Zunahme der Migration von Neutrophilen und Eosinophilen, zur Aggregation von Neutrophilen und Monozyten, zur Leukozytenadhäsion, zu einem Anstieg der Kapillarpermeabilität und zu Kontraktionen der glatten Muskulatur, z.B. beim humanen Asthma bronchiale (29,128). Die 5-Lipoxygenase wird nicht in normalem epithelialelem Gewebe exprimiert, kann jedoch durch inflammatorische Stimuli induziert werden. Es zeigt sich auch eine konstitutive Expression in diversen Tumoren wie Kolon, Ösophagus, Lunge, Prostata und Mamma (78,138). Weiterhin wurden eine 12- bzw. 15-Lipoxygenase nachgewiesen, die für die Bildung von 12- bzw. 15-Hydroperoxyeikosatetraensäure (12-, 15-HPETE) verantwortlich sind. Über die biologische Bedeutung dieser Arachidonsäurederivate ist noch relativ wenig bekannt (38). 12-Lox scheint u.a. regulatorische Funktionen im Bereich von Invasivität und Tumorwachstum beim Lungen, Prostata- und Brustkrebs zu übernehmen (149,176,138). 15-Lox scheint u.a. eine inhibierende Wirkung auf die Angiogenese von Tumoren zu haben (138).

1.2.2. Cox-2- und 5-Lox-Hemmer: Celebrex und Zyflo

1.2.2.1. Celebrex

1.2.2.1.1. Gesicherte Indikationen von Celebrex

Celebrex enthält als pharmakologisch wirksamen Bestandteil den Wirkstoff Celecoxib, ein Diaryl-substituiertes Pyrazolderivat mit der chemischen Bezeichnung 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluormethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzolsulfonamid. Die Summenformel für Celecoxib lautet $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$, das Molekulargewicht beträgt 381,38 g/mol. Eine gesicherte Indikation für die Anwendung von Celebrex stellt die Symptombehandlung aktivierter Arthrosen und chronischer Polyarthritiden dar (104). Die medikamentöse Therapie zielt darauf ab, vor allem die Schmerzen zu lindern und die Entzündung einzudämmen, bei gleichzeitig vermindertem Auftreten unerwünschter Begleiterscheinungen, besonders im Bereich des oberen Gastrointestinaltraktes (104,192). Gewährleistet wird letzteres durch die Inhibierung des Cox-2 Isoenzym bei 300fach höherer Selektivität für Cox-2, während selbst in maximalen therapeutischen Dosen Cox-1 nicht beeinflusst wird (119). Celecoxib erhielt 1999 die Genehmigung zur Prophylaxe kolorektaler polypöser Neubildungen bei familiärer adenomatöser Polyposis (FAP). Berücksichtigung muss jedoch die Tatsache finden, dass sich bei langfristiger und hochdosierter Einnahme von Coxiben in den letzten Jahren inakzeptable kardiovaskuläre Nebenwirkungen zeigten (26,78).

1.2.2.1.2. Celebrex und andere nichtsteroidale Antiphlogistika beim Pankreaskarzinom

Zahlreiche Hinweise deuten darauf, dass eine Downregulation der Cyclooxygenase eine entscheidende Rolle in der Prävention von Karzinomen einnimmt. Erhöhte Cox-2 Konzentrationen konnten in zahlreichen Tumorgeweben nachgewiesen werden (37,40,43,68,78,92,93,104,134,138,150,170,181,186,188,199). Epidemiologische Studien vermochten zu zeigen, dass eine dauerhafte Einnahme nichtsteroidaler Antiphlogistika

assoziiert wird mit einer verminderten Inzidenz kolorektaler Karzinome (12,37,40,42,59,77,78,108,115,116,118,119,124,135,144,177,178,182,183,186,188,189). Gleichmaßen konnten erhöhte Cox-2 Werte in humanen Pankreaskarzinomzellen durch immunhistochemische Analysen und PCR abgeleitet werden (12,37,40,134,181,185,188). Die durch die Cyclooxygenase bewirkte Prostaglandinsynthesesteigerung zeigte in Karzinomgeweben wie Kolon-, Lungen-, Brust-, Prostata-, Ösophagus- und Magenkarzinom deutlich höhere Konzentrationen als in gesundem Gewebe (27,34,42,43,77,93,96,118,119,124,135,150,181,184,188,189). Die Auswirkungen erhöhter Cox-2 Expression und der damit verbundene Anstieg des Prostaglandinspiegels scheint verantwortlich zu sein für die gesteigerte Invasivität von Tumorzellen unter anderem in Bezug auf die Beeinflussung der Zelladhäsion, des immunologischen Überlebens und der Apoptose (34,93,104,108,115,119,124,167,170,183,185,186). Eine exakte Klärung der Pathomechanismen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht erfolgt (4,21,40,55,61,112,113,134,172,185,191). Der Beitrag der Prostaglandine zur Karzinogenese wird weiterhin erhärtet durch den im Tiermodell und beim Menschen nachgewiesenen Schutz vor Kolon-, Mamma-, Ösophagus- und Bronchialkarzinomen durch Inhibition der Cox-2 und die damit verbundene Hemmung des Tumorwachstums und der Apoptose (42,52,95,108,115,116,118,121,135,144,164,177,183). Diese Beobachtungen konnten sowohl am BOP-induzierten Pankreaskarzinom im Syrischen Goldhamster als auch an Zelllinien des Pankreaskarzinoms und immunhistochemisch an operativ gewonnenen duktalem Zellen eines Pankreaskarzinoms gemacht werden (12,37,175,194,197). Auch beim Pankreaskarzinom im BOP-induzierten Hamstermodell weist die Gabe der nichtsteroidalen Antiphlogistika Indomethazin und Phenylbutazon auf einen Rückgang der Entwicklung des Pankreaskarzinoms hin (40,124,134,175). Ebenfalls konnte bei Zelllinien eines humanen duktalem Adenokarzinoms des Pankreas (Capan-1, MDAPanc-3) eine erhöhte Rate an Cox-2 mRNA nachgewiesen werden. Desgleichen ließ sich das Wachstum der Zelllinien durch Zusatz von Cox-2 Inhibitoren hemmen (124,134).

1.2.2.1.3. Celebrex und der Einfluss auf die Metastasierung

Erhöhte Cox-2 Konzentrationen konnten nicht nur in Kolonkarzinomzellen sondern auch in metastatischen Lebertumoren gemessen werden, so dass eine Einflussnahme auf die Metastasierung wahrscheinlich erscheint (27,68,78,93,171,202). Zelllinienversuche deuten auf eine starke Beteiligung von Cox-2 an der Angiogenese und somit Metastasierung hin (42,78,104,108,171,177). Der genaue Mechanismus, den Cox-2 in diesem Prozess einnimmt, ist bis heute unbekannt. Erhöhte Cox-2 Expression scheint über die vermehrte Produktion von PGE₂ zu einem vermehrten Anstieg von angiogenetischen Faktoren zu führen (93,119,202). Ebenso konnte die Inhibition von angiogenetischen Wachstumsfaktoren durch Coxibe beim Pankreaskarzinom nachgewiesen werden (104,181). Weiterhin wird über eine Beeinflussung der Zelladhäsion metastatischer Zellen an Endothelzellen diskutiert (93). Ursächlich scheint hier die Reduktion des E-Cadherin-Spiegels bzw. eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen zu sein (27,31,93,108,146,183,186,202). Die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen zeigt einen weiteren wichtigen Mechanismus der Metastasierung auf (93). Andere Studien weisen auf die proteolytische Funktion von Prostaglandinen und die damit verbundene Metastasierungsbereitschaft hin (11,107,146). Entsprechend zeigten Untersuchungen am Kolon- und Bronchialkarzinom im Mäusemodell eine dosisabhängige Reduktion der Größe von Lebermetastasen durch Gabe von Celebrex bzw. Rofecoxib (93,119,170,202). Über die Auswirkungen von Celebrex auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation beim Pankreaskarzinom, sind in der Literatur nur die Angaben aus den von uns durchgeführten Studien zu finden.

1.2.2.2. Zyflo

1.2.2.2.1. Gesicherte Indikationen für Zyflo

Zyflo enthält den pharmakologisch wirksamen Bestandteil Zileuton, einen oralen 5-Lipoxygenasehemmer, der die Bildung der Leukotriene LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄ inhibiert. Der chemische Name lautet 1-(1-Benzo[b]thien-2-ylethyl)-1-hydroxyurea. Die Molekülformel ist C₁₁H₁₂N₂O₂S, das Molekulargewicht beträgt 236,29 g/mol.

Indiziert ist die Gabe von Zyflo zur Prophylaxe und Behandlung von Asthma bronchiale bei Erwachsenen und Kindern ab zwölf Jahren. Zyflo inhibiert die leukotrienabhängige Bronchokonstriktion der glatten Bronchialmuskulatur und mindert somit die Hyperreaktivität der Luftwege (78,173).

1.2.2.2.2. Zyflo beim Pankreaskarzinom

Leukotriene bzw. Produkte des 5-Lox abhängigen Metabolisierungsweges der Arachidonsäure scheinen eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung, -progression und Metastasierung einzunehmen (29,34,165,173,197). In Studien am Prostatakarzinom konnte für die Metabolite der 5-Lox eine tumorfördernde Entwicklung beobachtet werden (38,168,173). Dementsprechend zeigte sich nach Gabe von 5-Lox-Hemmern bei Prostata-, Bronchial-, Ösophagus-, Mamma-, Kolon- und Hauttumoren eine Inhibition der Karzinogenese (29,39,40,167,173).

In humanen Pankreaskarzinomzellen konnte eine erhöhte 5-Lox Konzentration nachgewiesen werden, während in normalen duktalem Pankreaszellen kein Nachweis erfolgen konnte (38-40,168). Die Metaboliten des 5-Lox Stoffwechsels stimulieren nachweislich die Proliferation der Zellen des Pankreaskarzinoms (38-40). Zahlreiche Studien waren in der Lage den wachstumsinhibierenden Effekt von 5-Lox Hemmern in Zelllinien und am Tiermodell nachzuweisen (6,29,38,40,168). Assoziiert war dieser mit einer gesteigerten Apoptoserate und Differenzierung des Phänotyps durch Abnahme der Zelldichte und Elongation (38). Zusätzlich war eine verminderte Produktion von Stoffwechselprodukten der Eikosanoïdsynthese nachweisbar (29).

1.2.2.2.3. Zyflo und der Einfluss auf die Metastasierung

Die Ergebnisse von in-vitro-Untersuchungen deuten auf eine Beeinflussung von proteolytischen Enzymen durch Stoffwechselprodukte der Lipoxygenase und auf eine damit verbundene Metastasierungsbereitschaft hin (11,29,146). Ebenfalls scheinen Lipoxygenasestoffwechselprodukte zu verstärkter Adhäsionsbereitschaft von Tumorzellen an Endothelzellen zu führen (34). Während für 12-Lox neben dem Nachweis der Tumorpheriferation und Apoptose die Beteiligung an der Metastasierung beim humanen Prostatakarzinom gezeigt werden konnte, ist dieser Nachweis bei den Produkten der 5-Lox Gegenstand aktueller Untersuchungen (40,173).

1.3. Oxidativer Stress und Lipidperoxidation

1.3.1. Biochemische Grundlagen

Die Fähigkeit Sauerstoff zur vollständigen und somit maximal effektiven Oxidation von Nährstoffen zu verwenden, hat nicht nur die biologische Energieversorgung verbessert, sondern stellt auch eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Entstehung höherer Lebensformen dar. Der Umgang mit dem Sauerstoff bringt allerdings beträchtliche Gefahren mit sich. Sauerstoff und seine besonders reaktionsfähigen Radikale mit einem ungepaarten Elektron im Außenorbital sind in der Lage, in nahezu allen lebenden Strukturen vorkommende Verbindungen oxidativ zu verändern und damit funktionell schwer zu beeinträchtigen. Reaktive Sauerstoffspezies beinhalten definitionsgemäß sowohl freie O₂-Radikale als auch die in Tabelle 1 aufgeführten Radikale (5,169).

Formel	Name	Entstehung
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidradikal	Leukozytenaktivierung, Autooxidationsreaktionen, Elektronentransport
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff	Bildung aus Wasserstoffperoxid
$\text{HO}\cdot$	Hydroxylradikal	Drei-Elektronen-Reduktionszustand, metallkatalysiert; Entstehung aus dem Superoxidradikal
$\text{HO}_2\cdot$	Perhydroxylradikal	Protonierte Form von $\text{O}_2\cdot^-$
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	Zwei-Elektronen-Reduktionszustand; nicht-enzymatische Bildung aus $\cdot\text{O}_2^-$, direkte Bildung aus O_2
$\text{RO}\cdot$	Alkoxyradikal	Lipidperoxidationsprodukt
$\text{ROO}\cdot$	Peroxyradikal	Lipidperoxidationsprodukt
ROOH	Lipidhydroperoxid	Lipidperoxidationsprodukt; protonierte Form von $\text{ROO}\cdot$
$\text{R}\cdot$	Lipidradikal	Lipidperoxidationsprodukt
$\cdot\text{Ocl}$	Hypochlorit	Reaktionsprodukt der Myeloperoxidase

Tab. 1: Sauerstoffradikale und ihre Entstehung (169)

Eine wesentliche Quelle von Sauerstoffradikalen sind Ein-Elektronenreduktionen, die unter anderem durch Autooxidation zellulärer Verbindungen entstehen und zur Bildung des Superoxidradikals führen. Zwei-Elektronenreduktionen führen zum Wasserstoffsuperoxid. Das besonders reaktive Hydroxylradikal entsteht durch Drei-Elektronenreduktionen, meist metallkatalysiert. Darüberhinaus gibt es organische Sauerstoffradikale, die meist in Sekundärreaktionen entstehen. Unter physiologischen Bedingungen wird eine Schädigung der Biomoleküle durch die unten beschriebene Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies mit Hilfe von Antioxidantien gewährleistet (169). Störungen dieser protektiven Mechanismen in Form vermehrter Produktion bzw. mangelnder Elimination führen zu Schädigungsreaktionen im Bereich der Proteine, Kohlenhydrate und Lipide (129).

Eine besondere Rolle kommt im Sinne der Studie der Lipidperoxidation zu, die als unspezifische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFA) in den Phospholipiden unterschiedlicher Membransysteme erklärt wird. Die Modifizierung speziell der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Membranlipiden führt ohne Schutzmechanismen zur oxidativen Schädigung mit der Folge der Peroxidbildung (86,109,110). Zur Radikalentstehung kommt es nach erfolgreicher Abstraktion eines Wasserstoffs an der zwischen zwei Doppelbindungen gelegenen CH_2 -Gruppe. Aus diesem entstehen in einer sauerstoffabhängigen Reaktion als Zwischenprodukt Alkyldioxyradikale, deren intramolekulare Stabilisierung durch Dienkonjugation erfolgt. Die sich daraus ergebende sterische Konfigurationsänderung mit dem Ergebnis der Streckung der Moleküle führt zur ersten Störung des intermolekularen Aufbaus der Membran. Im weiteren Verlauf kommt es autokatalytisch zur Bildung von Lipidperoxiden, indem die Alkyldioxyradikale die Wasserstoffabstraktion eines weiteren Fettsäuremoleküls katalysieren, wobei ein Lipidperoxid und das nächste Lipidradikal entstehen (86). Weitere Sekundärreaktionen mit dem Ergebnis der Entstehung von u.a. Aldehyden, Dialdehyden, Dicarbonylverbindungen, Hydroxy- und Ketosäuren, sogenannte diffusible Moleküle der Lipidperoxidation, die auch fern vom Ort ihrer Entstehung Toxizität vermitteln können und weiteren für die Lipidperoxidation analytisch bedeutenden Umlagerungs- und Folgeprodukten erscheinen unumgänglich (69). Die erheblich großen Mengen an Fettsäureperoxiden, die durch diesen zyklischen und autokatalytischen Prozess entstehen,

führen zu Modifikationen der ursprünglichen Lipide, die tiefgreifende Änderungen zellulärer Funktionen nach sich ziehen (86). Die Folgen können z.B. eine veränderte Membranfluidität und -permeabilität, einhergehend mit einer gestörten Zellverformbarkeit oder sogar die Zerstörung der Zellintegrität sein (129). Dabei kommt es durch den Funktionsverlust, der in der Zellmembran vorkommenden Transportproteine und die fehlende Regulation der Enzymaktivitäten durch die Membranlipide zu drastischen Auswirkungen auf die Zellhomöostase. Durch freie Radikale kommt es weiterhin zu einer Up-Regulation der Genexpression bzw. Aktivierung verschiedenster Moleküle wie Adhäsionsmoleküle, Matrixmetalloproteinasen, Vascular endothelial growth factor u.a. (78,129). Angegeben werden vollständige Zerstörung der Membran und Aufhebung des Zusammenschlusses der Gesamtzelle durch Akkumulation der extrem reaktiven Moleküle (86,169). An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass spezifisch durch Enzyme katalysierte Oxidationsreaktionen von Lipiden der Erzeugung von Eikosanoiden zugrunde liegen. D.h., die Aktivierung der Eikosanoidsynthese führt ebenfalls zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (5,107).

1.3.2. Oxidative Schutzmechanismen

Zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies mit dem Ziel der Terminierung oben beschriebener Prozesse, werden Antioxidantien verwendet. Unter diesem Begriff versteht man Substanzen, die die Oxidation eines Substrates verzögern oder hemmen. Zugrundeliegende Mechanismen zur Vermeidung der Zellschädigung können sowohl auf enzymatischer wie auch nicht-enzymatischer Grundlage basieren (Tabelle 2).

Mechanismus	Verbindung	Bemerkungen
nicht-enzymatisch	α -Tocopherol β -Carotin Ascorbat Glutathion Harnsäure	Unterbricht Radikalketten Reagiert mit reakt. O ₂ , unterbricht Radikalketten diverse antioxi. Funktionen diverse antioxi. Funktionen Radikalfänger
enzymatisch	Superoxiddismutase (SOD) Glutathionperoxidase (GSHPX) Katalase	verschiedene Isoformen, Bildung von H ₂ O ₂ verschiedene Isoformen, Abbau von Peroxiden Abbau von H ₂ O ₂
enzymatische Hilfsmechanismen	Konjugationsenzyme Glutathionregenerierung Reparatursysteme	Glutathion-S-Transferase Glucuronyltransferasen Glutathionreduktase DNA-Reparatur Abbau oxidierter Proteine und Lipide

Tab. 2: Verhinderung und Beseitigung oxidativer Schäden (5)

Ein wichtiger Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems ist die Glutathionperoxidase (Abbildung 3). Diese katalysiert die Glutathion-abhängige Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid. Die GSHPX-Aktivität wird zu 70% im Zytosol und zu 30% in den Mitochondrien gefunden (5). Die verschiedenen Isoformen reagieren sowohl mit durch Peroxidation geschädigten Membranphospholipiden, als auch mit oxidierten Lipiden in Lipoproteinen. Bedeutungsvoll ist die Eliminierung von Lipidperoxiden, nach Protonierung organischer Dioxyradikale entstehend, durch Reduktion in Hydroxyfettsäuren, die dann der β -Oxidation zugeführt werden können.

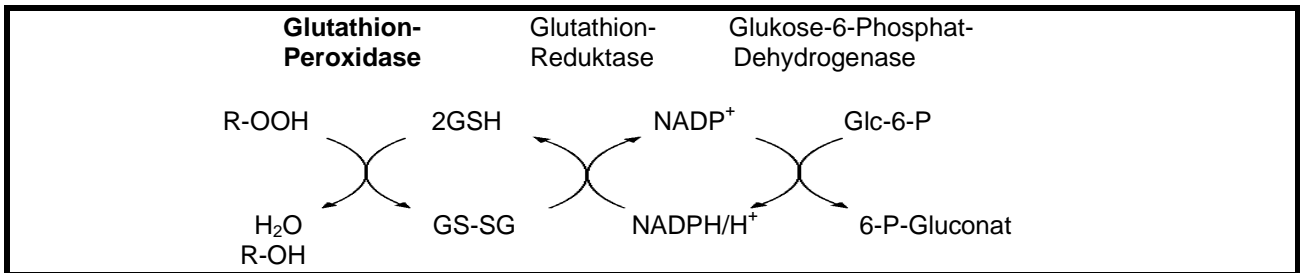


Abb. 3: Funktion der GSHPX bei der Eliminierung von Lipidperoxiden

Ein weiteres effektives enzymatisches Schutzsystem ist die Superoxiddismutase mit einem Vorliegen in allen aeroben Zellen in Form einer zytosolischen und einer mitochondrialen Isoform (Abbildung 4). Die Differenzierung erfolgt anhand des Metallions im aktiven Zentrum (5,151,180). Zytosolische SOD enthält je ein Molekül Cu^{2+} und Zn^{2+} , während sich bei der mitochondrialen SOD ein Molekül Mn^{3+} im aktiven Zentrum befindet (151). Die SOD katalysiert die Dismutation des Superoxidradikals zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff um den Faktor 10^9 (50,151,180). Wasserstoffperoxid kann dann wieder durch GSHPX in u.a. H_2O umgewandelt werden.

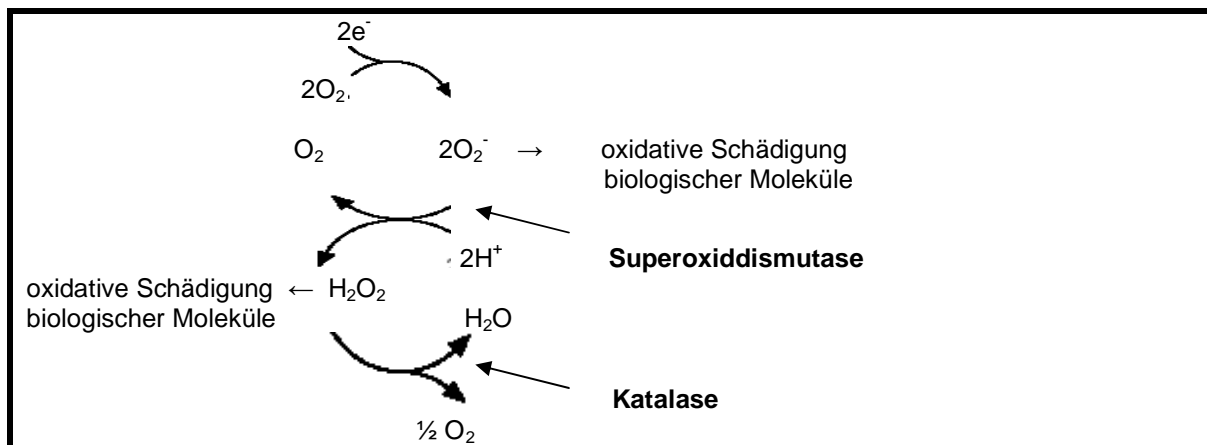


Abb. 4: Entstehung und Abbau oxidativer Sauerstoffspezies

Einen protektiven Effekt bieten Enzymsysteme, die die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies gering halten wie beispielsweise die Gruppe der Glutathion-S-Transferasen. Sie katalysieren die Entstehung von Thioethern aus Glutathion und reaktiven elektrophilen Verbindungen. Auch die Katalasen bieten Schutz vor oxidativem

Stress durch Katalysierung der Dismutation von Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularem Sauerstoff (Abbildung 4).

Unter den nicht-enzymatischen Oxidantien spielt das α -Tocopherol eine besondere Rolle, da es durch seine gute Lipidlöslichkeit eine Unterbrechung der Lipidperoxidationskette ermöglichen kann. Dabei wandelt es Peroxyradikale in entsprechende Lipidperoxyde um, wobei Tocopherolradikale entstehen. Durch die Bildung stabiler polymerer Komplexe wird die oxidative Schädigung terminiert. Das Tocopherolradikal zeichnet sich dadurch aus, dass es mit Hilfe von Ascorbat zum Tocochinon reoxidiert wird. Das dadurch entstehende Ascorbatradikal ist stabil und ruft keine weiteren Schädigungen hervor. Vitamin E in Membranen führt somit zu einem effektiven Schutz vor Lipidperoxidation (69).

1.3.3. Bedeutung der Hochfetternährung, der Lipidperoxidation und des Eikosanoidstoffwechsels in der Karzinogenese und Metastasierung

Bei der Entstehung von Malignomen und deren Metastasierung vorzugsweise im Bereich des Gastrointestinaltraktes, kommt der Ernährung eine wichtige Rolle zu. Besonders die Zusammensetzung der unterschiedlichen Fettsäuren, scheint Einfluss auf die Karzinogenese und Metastasierung von Tumoren zu nehmen (10,23,25,39,73,86, 91,135,145,148,155,162,194,196,197,200). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) stellen hierbei das Substrat für die Lipidperoxidation dar. Eine Veränderung der Zusammensetzung unterschiedlichster Fettsäuren, scheint in diesem Zusammenhang zu einer Veränderung des Radikalenstoffwechsels zu führen. Die durch Lipidperoxidation entstandenen Radikale führen neben einer Schädigung der Zellmembran zu einer Störung intrazellulärer Proteine, mit der langfristigen Folge der zellulären Entdifferenzierung (23,25). Daher lässt sich vermuten, dass eine Erhöhung des PUFA-Anteils zu einer Förderung des Tumorwachstums und ggf. der Metastasierung führt. In dieser Studie erreichten wir durch Erhöhung des Anteils von Linolsäure (ω -6-PUFA) auf 11% und Linolensäure (ω -3-PUFA) auf 2% des Rohfettanteils, die Rate von Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen auf 100% zu erhöhen. In einer vorangegangenen Studie gelang unserer Arbeitsgruppe durch alleinige Gabe von Linolensäure eine signifikante Steigerung

der Lebermetastasierungsrate im Hamstermodell des Pankreaskarzinoms (196). In einer prospektiven Studie über 14 Jahre zeigt Linolensäure ein möglicherweise erhöhtes Risiko für die Erkrankung am Prostatakarzinom auf (105). Fischöl, ebenfalls eine ω -3-Fettsäure konnte ein tumorfördernder Effekt nachgewiesen werden (8,10). Im Hinblick auf andere ω -3-Fettsäuren wie beispielsweise Eikosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) zeigen sich jedoch in diversen Studienmodellen bei verschiedensten Tumorentitäten auch antiproliferative Effekte sowohl beim Primarius als auch in Bezug auf eine mögliche Metastasierung (45,86,103,105,145,155,158). Anderen Arbeitsgruppen gelang es ebenfalls, unseren Ergebnissen entsprechend, eine proliferationsfördernde Wirkung von Linolsäure auf Tumorzellen nachzuweisen (9,38,75,86,152,155,195,200). Allerdings konnte in vitro ebenfalls eine antiproliferative Wirkung von Linolsäure und γ -Linolensäure (GLA) dargestellt werden (9,17,45,47,83,84,86). Sogar eine Verlängerung der Überlebenszeit war unter hochdosierter i.v.-Gabe von GLA bei Patienten mit inoperablem Pankreaskarzinom nachweisbar (46). Eine grundsätzliche Einteilung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren der ω -3-Reihe zur Gruppe der Wachstumsinhibitoren respektiv die der ω -6-Reihe zur Gruppe mit wachstumsfördernden Effekten kann somit daraus nicht resultieren. Auch die Annahme, das Ausmaß der apoptotischen Wirkung der PUFA nehme mit der Anzahl der Doppelbindungen zu, kann nicht aufrechterhalten werden (64). Andere Studien legen die bessere wachstumsinhibierende Wirksamkeit der GLA (drei Doppelbindungen) im Vergleich zur DHA (sechs Doppelbindungen) dar. Allgemeine Gültigkeit in Bezug auf die anti-/proliferative Wirkung einzelner Fettsäuren scheint daher nicht zu bestehen. Kritisch erscheint hier die Tatsache, dass die alltägliche Ernährung sowohl des Menschen als auch der Versuchstiere der einzelnen Tiermodelle immer Gemische aller PUFA in unterschiedlicher Konzentration enthält. Die Diskrepanz der einzelnen Studienergebnisse könnte daher in einer unterschiedlich zusammengesetzten Nahrungsfettkonzentration begründet sein, die sich in diversen Omega-3 zu Omega-6- Verhältnissen widerspiegelt (105,148,155,200). Die Relevanz hierfür scheint in der mangelnden Syntheseleistung des Körpers, essentielle Fettsäuren wie LA und LnA herstellen zu können, zu liegen (86,135,158). Die nachfolgende Bildung von Metaboliten wie EPA, DHA und Arachidonsäure (AA) sind an das Vorhandensein von Desaturasen und Elongasen, die zur Einfügung von Doppelbindungen und zur Kettenverlängerung dienen, gebunden

(86,158,200). Aufschlussreich erscheint dieser Ansatz bei der Klärung der antiproliferativen Wirkung einiger PUFA auf Tumorzellen. Infolge ungenügender Exprimierung von Desaturasen durch die Tumorzellen scheint es zu keiner weiteren Entsättigung der PUFA zu kommen, mit der Folge der fehlenden Substratbereitstellung zur Lipidperoxidation (70). Daher kommt es nach Überbrückung dieses Stoffwechselweges durch Zugabe von hochungesättigten Fettsäuren wie EPA oder DHA zur übermäßigen Herstellung von Lipid-superoxiden und folglich zum Zelltod (64,70). Ungewiss ist jedoch die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses, da das Ausmaß der Schädigung der Tumorzellen durch gesteigerte Lipidperoxidation in bisherigen Studien gering war (85). Demgegenüber stünde die reduzierte antiproliferative Wirkung von geringer ungesättigten Fettsäuren (Linolsäure, Linolensäure) in Zusammenhang mit der schlechteren Substratbereitstellung für die Lipidperoxidation und der mangelnden Verstoffwechslung zu besseren Substraten durch die Tumorzellen. Tumorzellen weisen neben einem geringeren PUFA-Gehalt niedrigere Cytochrom P450-Aktivitäten auf, die die Lipidoxidation fördern bzw. unterhalten (23). Übergreifend zeigt sich jedoch in der Literatur, dass in Tumorzellen trotz verminderter Ansprechbarkeit gegenüber Lipidperoxiden Membranschäden und daraus folgend der Zelltod zu erwarten sind (86,129). Kontroverse Einstellungen werden auch bei der Frage nach Invasivität und Metastasierung der Tumorzellen aufgeworfen. Invasives Verhalten und Metastasierung beruhen auf einem kaskadenartigen Ablauf vieler miteinander verbundener Schritte. Zu den bedeutsamsten Vorgängen zählt hierbei der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion im Primärtumor, die Proteolyse der Basalmembran mit nachfolgender Adhäsion und Invasion, die Fähigkeit, in das Zielorgan zu extravadiieren, Anschluss an die Zirkulation und das Überleben dortiger Immunmechanismen, sowie die Proliferation sekundärer Kolonien mit Neovaskularisation und Angiogenese (27,31,55,71,86,146). Zahlreiche Studien weisen auf die Einflussnahme von PUFA auf das Tumorgeschehen, die Invasion und das metastatische Verhalten im Hinblick auf Mechanismus und Regulation von Zell-Adhäsion und weiteren einflussnehmenden Faktoren hin (71,86,88,90,156). Vermutungen, die Zell-Zell-Adhäsion im Tumor werde durch bestimmte PUFA in wachsendem Maße verbessert, was wiederum zur Senkung des Invasionspotentials führt, kann zwar durch einige Studien nachgewiesen werden, jedoch zeigen sich auch widersprüchliche Ergebnisse (86-88,91). Das metastatische Verhalten

der Tumorzelle Gewebekompartimentgrenzen zu überwinden, kann andererseits durch PUFA erniedrigt werden, indem die Adhäsion von Tumorzellen an der extrazellulären Matrix vermindert wird (83,87,90,91,123,154,157). Dementsprechend berichten einige tierexperimentelle Studien über eine herabgesetzte Anzahl von Tumorzellen in peritumoralen Blutgefäßen (72,73). Andererseits wurde diese Auswirkung bisher nur für einen Teil der Fettsäuren spezieller untersucht (35,36,83,86,123). Tierexperimentell oder in-vitro nachgewiesen werden konnte weiterhin die Förderung der Metastasierung bzw. der Kompartimentüberschreitung durch bestimmte PUFA (8,9,10,72,154,155,196). Nachweislich wurde eine erhöhte Lebermetastasierung nach Sublimierung von Linolensäure bei BOP-induziertem Pankreaskarzinom im Syrischen Goldhamster erbracht (195,196). Eine gesteigerte Metastasierung konnte auch beim humanen Mammakarzinom im Mäusemodell unter Hochfettdiät mit ω -6-Fettsäuren beobachtet werden (159). ω -3-Fettsäuren zeigen einerseits einen supprimierenden Effekt auf die Progression metastatischer Foci bzw. das Tumorstadium, während sie in anderen Studien proliferationsfördernd auf den Primärtumor wirken (8,10,152,158,162). EPA konnte der inhibierende Effekt auf die Kollagenase IV Produktion von Fibrosarkom- und Melanomzellen nachgewiesen werden und deutet somit auf eine relevante Einflussnahme in Bezug auf die Metastasierung hin (145). Aktuell häufen sich Beobachtungen, die vermehrt auf einen antikarzinogenen Effekt von ω -3-PUFA hindeuten, bedürfen jedoch zur Sicherung dieser Aussage weitere klinische Versuche (148).

Der Einfluss der Lipidperoxidation im Zusammenhang mit PUFA und Metastasierung konnte zum heutigen Zeitpunkt, trotz wachsender Aufmerksamkeit gegenüber dem Stoffwechsel der Eikosanoide in Tumorgeweben, noch nicht ausreichend geklärt werden (86,117,120,135,145,155,162,195,200). Die Gewebshormone scheinen nicht nur proliferationsstimulierende und immunsuppressive Eigenschaften aufzuweisen, sondern auch indirekt Einfluss auf den Radikalenstoffwechsel bzw. die Lipidperoxidation zu nehmen (92,115,135,136,139,184,200). Insbesondere die Syntheseprodukte der Cox-2 scheinen hierfür verantwortlich zu sein (9,89,115,139,184,189,198). Einzelne Tumorarten zeigen einen Zusammenhang zwischen intensivierter Prostaglandinsynthese und höherer lokaler Aggressivität und Invasivität (9,29,51,89,107,115,116,146,155,156,184,200). Trotz unzureichender Untersuchung der Mechanismen der prostaglandinbedingten

Invasivitätssteigerung gibt es wachsenden Anhalt für eine immunmodulatorische und prostaglandingesteuerte Apoptose und Angiogenese (11,92,107,115,135,139,146,155,167,182,184,189,198). Die gesteigerte Expression von 5-Lox konnte in humanen Ösophagus-, Prostata-, Blase-, Kolon- und Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden (29). Indes scheinen Leukotriene und Hydroxieikosatetraensäuren (HETE) auch eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Metastasierungsbereitschaft der Tumoren zu spielen (6,11,34,71,83,92,111,146). Leukotrien B₄ und 5-HETE konnte der gesteigerte Einfluss auf die Gefäßpermeabilität nachgewiesen werden (29). Weiterhin wurde belegt, dass die gesteigerte Produktion von Leukotrien B₄ und 5-HETE einige Tumoren in die Lage versetzt, Kollagenase Typ 4 zu synthetisieren (11,146). Dieses Enzym ist unter anderem unerlässlich für die Auflösung von in Basalmembranen enthaltenem Typ 4 Kollagen. Proteinasen besitzen daher eine Schlüsselfunktion beim Abbau der extrazellulären Matrix (11,111,146,154,183). Obwohl bereits nachhaltige Untersuchungen über die Bedeutung der Eikosanoide für das Wachstum beim Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Ösophaguskarzinom, Bronchialkarzinom und Pankreaskarzinom vorliegen, ist über ihren Einfluss auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation beim Pankreaskarzinom bisher wenig bekannt (9,11,29,71,73,83,93,107,111,115,135,146,158,173,175,182,183,184,189).

1.4. Begründung und Erläuterung des Versuchsvorhabens

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms wird maßgeblich bestimmt durch die meist späte Diagnosestellung und der sich daraus ergebenden geringen Resektionsrate bei gleichzeitig früher und aggressiver Metastasierung des Tumors. Die Inzidenz liegt somit nahe der jährlichen Mortalitätsrate und macht ein längerfristiges Überleben fast nicht möglich. Daher scheint es dringend erforderlich, zu den bisherigen Therapien weitere Entwicklungen von unter anderem palliativen Behandlungsmöglichkeiten voranzutreiben, um die Überlebenszeit und die Lebensqualität der Patienten mit nicht mehr kurativ resektablem Tumor zu verbessern. Dabei stellt die Haupttodesursache der am Pankreaskarzinom Erkrankten neben dem Lokalrezidiv eines resezierten Tumors, die Lebermetastasierung dar. Neben den bereits etablierten adjuvanten Therapiemaßnahmen sollte eine effektive Therapieform entwickelt werden, die zur Verlangsamung bzw.

Inhibierung der Lebermetastasierung führt. Demzufolge erscheint ein tierexperimentelles Modell, mit standardisierter Versuchsanordnung und Reproduzierbarkeit notwendig. Als sehr gut geeignet erschien uns das Tiermodell des BOP-induzierten Pankreaskarzinoms des Syrischen Goldhamsters: nicht nur wegen seiner guten Durchführbarkeit der Tumorinduktion bei gleichzeitig hohen Tumorinzidenzen, sondern auch wegen der histologischen, biochemischen und klinischen Ähnlichkeit des induzierten Pankreaskarzinoms mit dem zu 80% auftretenden duktalem Adenokarzinom des Pankreas beim Menschen. Zur Optimierung der Studienbedingungen war es zunächst notwendig, durch diätetische Modifikation die in diesem Tiermodell betragende Lebermetastasierungsrate von ca. 30% auf bis zu 100% zu erhöhen. Um dieses zu bewirken, wurde demnach eine Hochfettdiät in Form eines Spezialfutters (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) mit einem ausgewählten Rohfettanteil von 21,4% (im Vergleich zu 3,5% im Standardfutter) verwendet, deren Gehalt an α -Linolensäure 2% und der an Linolsäure 11% betrug. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren scheinen nach aktueller Studienlage einen Einfluss auf Entstehung und Wachstum verschiedener Tumorarten zu haben. In vorangegangenen Studien ist unserer Ansicht nach die gesteigerte Lebermetastasierung ebenfalls durch die erhöhten Anteile von Linolsäure und α -Linolensäure begründbar. Die offenkundigen Zusammenhänge zwischen Lebermetastasierung, Hochfetterernährung, Eikosanoidstoffwechsel und Lipidperoxidation veranlassten uns, eine genauere Untersuchung der unterschiedlichen Faktoren bei diesem Tiermodell vorzunehmen. Zur Evaluierung erfolgte sowohl die Analyse der Inzidenz, Anzahl pro Tier und Größe der Lebermetastasen, wie auch die Inzidenz der Pankreasproben. Das Ausmaß der Lipidperoxidation bestimmten wir durch Aktivitätsmessung der antioxidativen Schutzenzyme Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase sowie der Konzentration der Thiobarbitursäure in metastatischen und metastasenfremen Leberproben. Der standardisierte Versuchsaufbau dieses Tiermodells zielte darauf ab, unter Hochfettdiät und BOP-Induktion den Einfluss der Eikosanoide auf die Lipidperoxidation und Lebermetastasierung unter einzelner und kombinierter Hemmung der Cyclooxygenase-2 und 5-Lipoxygenase zu evaluieren. Unsere Hypothese stützt sich dabei auf die Annahme, dass die Therapie mit COX-2-Hemmern und LOX-5-Hemmern einzeln und/oder in Kombination zu einer Erniedrigung der intrahepatischen

Lipidperoxidation und/oder Steigerung der intrametastatischen Lipidperoxidation führen und somit zu einer Erniedrigung der Metastasierung führen könnten.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermodell

2.1.1. Tierhaltung und Versuchsgruppeneinteilung

Die behördliche Genehmigung dieses Tierversuchs erfolgte am 24.09.1999 durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der Registriernummer 0115/99.

120 männliche, 8 Wochen alte Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*, Fa. Harlan-Winkelmann, Paderborn, Deutschland) wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $21 \pm 5^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $70 \pm 10\%$, 10 Luftwechsel / Stunde, 12:12-Stunden Tag-/ Nachtzyklus) in Einzelkäfigen gehalten und nach einwöchiger Akklimatisierungszeit, wie in Tabelle 3 dargestellt, randomisiert.

Gruppe	Tier-Anzahl	Ernährung	Tumorinduktion	Celebrex	Zyflo
1	15	Hochfettdiät (HF)	nein	nein	nein
2	15	HF	nein	ja	nein
3	15	HF	nein	nein	ja
4	15	HF	nein	ja	ja
5	15	HF	ja	nein	nein
6	15	HF	ja	ja	nein
7	15	HF	ja	nein	ja
8	15	HF	ja	ja	ja

Tab. 3 : Einteilung der Tiere in Versuchsgruppen

2.1.2. Ernährung der Versuchstiere

In vorangegangenen Studien führte die Gabe der unten aufgeführten Spezialdiät zu einer signifikanten Steigerung der Lebermetastasierung auf ca. 90 % im Vergleich zu 30% der mit Standardfutter ernährten Kontrollgruppe (196).

Die Hamster aller Gruppen erhielten eine Hochfettdiät in Form eines Spezialfutters (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) mit einem ausgewählten Rohfettanteil von 21,4% (im Vergleich zu 3,5% im Standardfutter), dessen Gehalt an α -Linolensäure (ALS) 2% und der an Linolsäure (LS) 11% betrug. Weiterhin enthalten waren Fettsäuren, deren gaschromatographisch ermittelter Gehalt in Tabelle 4 dargestellt ist. Die restlichen Futterinhaltsstoffe sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Alle Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Trinkwasser und Futter.

Trivialname der Fettsäure	Kurzformel	Prozentualer Anteil in der Hochfettdiät	Prozentualer Anteil im Standardfutter
Palmitinsäure	C 16:0	2,0	0,3
Stearinsäure	C 18:0	1,0	0,2
Ölsäure	C 18:1	4,4	0,7
Linolsäure	C 18:2	11,0	1,8
Linolensäure	C 18:3	2,0	0,3
Arachidonsäure	C 20:4	0,4	0,07
Eikosapentaensäure	C 22:5	0,3	0,05
sonstige Fettsäuren	C8:0 bis C22:6	jeweils < 0,3	jeweils < 0,05

Tab. 4: Fettsäuregehalt im Futter

Inhaltsstoff	Anteil in der Hochfettdiät	Anteil im Standardfutter
Rohprotein	16,5%	20,0%
Rohfett	21,4%	3,5%
Rohfaser	4,9%	8,0%
Rohasche	5,7%	6,5%
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%
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

Tab. 5: Futterinhaltsstoffe

2.1.3. Phase der Tumorinduktion

Über einen Zeitraum von 16 Wochen erhielten die Tiere der Versuchsgruppen 5-8 eine wöchentliche subkutane interskapuläre Injektion von 10mg/kg Körpergewicht N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (Ash Stevens Chemicals Ltd., Detroit, USA) zur Induktion eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas. Jeweils unmittelbar vor jeder Anwendung wurde BOP in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Melsungen, Deutschland) im Verhältnis von 3mg/1ml gelöst. Zeitgleich erhielten die Versuchsgruppen 1-4 ebenfalls wöchentlich subkutan und interskapulär 0,5ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Melsungen, Deutschland) injiziert. Im Vorfeld jeder Injektion erfolgte die kurzzeitige Betäubung der Tiere mittels einer Äthernarkose (Hoechst / Marion-Roussel GmbH, Frankfurt, Deutschland).

2.1.4. Therapiephase

Die Therapie vollzog sich in unmittelbarem Anschluss an die viermonatige Induktionsphase und nahm ebenfalls einen Zeitraum von 16 Wochen in Anspruch.

Im Zuge der Therapiephase erhielten die Versuchsgruppen 2 und 6 jeweils 7mg Celebrex (Pfizer, Zürich, Schweiz), die Versuchsgruppen 3 und 7 jeweils 28mg Zylflo (Abbott, Chicago, USA) und die Versuchsgruppen 4 und 8 Celebrex und Zylflo zusammen in oben genannter Dosierung täglich oral verabreicht.

Den Tieren der Versuchsgruppe 1 und 5 wurden in der Therapiephase keine Medikamente zugeteilt.

2.2. Histologische Aufarbeitung

2.2.1. Studienbeendigung / Obduktion

32 Wochen nach Beginn der Studie erfolgte die Tötung der Tiere mittels einer Ursotaminnarkose (Serumwerk Bernburg GmbH, Bernburg, Deutschland). Zur Obduktion

wurde eine mediane Laparotomie vom Processus xiphoideus bis zum Penisansatz durchgeführt. Die Leber- und Pankreasentnahme erfolgte nach Inspektion aller Bauchorgane. Protokollmäßig festgehalten wurden das Körpergewicht, das Lebergewicht und das Pankreasgewicht jedes einzelnen Tieres.

In den Versuchsgruppen 1-4 war nicht mit dem Auftreten von Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen zu rechnen, da diese Tiere protokollgemäß kein BOP erhalten hatten. Von den Tieren dieser Versuchsgruppen wurden standardisiert aus dem Pankreas (26 ± 9 mg) und dem Lobus sinister lateralis Proben exzidiert (34 ± 11 mg) und in direktem Anschluss für die biochemischen Untersuchungen bei -80°C eingefroren.

Ferner erfolgte bei den mit BOP behandelten Tieren der Versuchsgruppen 5-8 nach Entnahme von Leber und Pankreas eine standardisierte Probenentnahme sowohl unter makroskopischer als auch auflichtmikroskopischer (neoLab Stereomikroskop, Eschenbach GmbH, Deutschland) Kontrolle aus den Bereichen der soliden Raumforderungen des Pankreas. Die tumorverdächtigen Läsionen wurden für die histologische Untersuchung in 10%iges gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Dorset, Großbritannien) gegeben. Die Leber wurde sofort nach Entnahme in 2mm Abständen lammeliert. Makroskopisch und auflichtmikroskopisch wurde auch hier auf solide Raumforderungen untersucht. Die Anzahl und die Größe der unter dem Auflichtmikroskop zweidimensional vermessenen und als metastasenverdächtig angesehenen Herde in der Leber wurden festgehalten, so dass für jedes betroffene Tier die Metastasenzahl und deren durchschnittliche Größe angegeben werden konnte. Bei Raumforderungen, die sich über mehr als eine Lamelle erstreckten, wurde nach Messung der zweidimensionalen Ausdehnung an jeder einzelnen Lamelle anschließend der Mittelwert bestimmt. Eine Probenentnahme für die Histologie, die in 10%iges Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Dorset, Großbritannien) gegeben wurde, erfolgte aus jedem metastasenverdächtigen Herd. Nach anschließender Exzision der verdächtigen Herde aus der Leber wurden diese gesammelt (26 ± 11 mg) und unverzüglich für die biochemischen Untersuchungen bei -80°C eingefroren.

2.2.2. Histologische Untersuchungen

Die nach der Obduktion in Metallkassetten (Shandon Ltd., Runcorn, Großbritannien) gelagerten und in Formaldehyd gegebenen Proben wurden im Entwässerungsautomaten Histokinette 2000 (Reichert-Jung GmbH, Wien, Österreich) entwässert und danach auf der Gießstation TBS 88 (Medita AG, Jena, Deutschland) mit Paraffin (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) überschichtet. Eingebettet in Gewebekapseln (Shandon Ltd., Runcorn, Großbritannien) wurden die Paraffinblöcke mit dem Rotationsmikrotom HM 350 (Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) mit einer gewählten Schnittdicke von 2-3 µm geschnitten. Nach Behandlung im Paraffin-Streckbad TFB 35 (Medita AG, Jena, Deutschland) erfolgte das Aufziehen auf Objektträger (Menzel Gläser KG, Braunschweig, Deutschland). Die anschließende Trocknung der Objektträger wurde bei 75°C für 45min im Brutschrank Modell 200 (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland) durchgeführt. Nach Abkühlung der Objektträger wurden die Schnitte unter dem Abzug Hyperclean (Shandon Ltd., Runcorn, Großbritannien) durch zweimaliges jeweils fünfminütiges Xylolbad (Baker, Deventer, Niederlande) entparaffiniert. Im weiteren Arbeitsablauf wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Dorset, Großbritannien) dehydriert und in Aqua bidest gewaschen, bevor sie mit Hämatoxylin und Eosin (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) standardisiert gefärbt wurden. Nach nochmaliger Waschung in Aqua bidest wurde abschließend in aufsteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Dorset, Großbritannien) entparaffiniert. Die letztendliche Platzierung der Deckgläser (Menzel Gläser GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurde nach abschließendem Xylolbad (Baker, Deventer, Niederlande) durchgeführt. Das Lichtmikroskop Kolleg SHB 45 (Eschenbach GmbH, Nürnberg, Deutschland) diente zur histologischen Beurteilung.

Die Klassifizierung der entnommenen Proben aus tumorverdächtigen Pankreasläsionen folgte den Kriterien nach Meijers et al. (122). In die Berechnung der Induktionsrate wurden nur Tiere eingeschlossen, die ein invasives duktales Adenokarzinom des Pankreas aufwiesen. In die Berechnung der Inzidenz von Lebermetastasen, der Anzahl von Lebermetastasen pro Tier und der durchschnittlichen Größe der Lebermetastasen wurde die Klassifizierung der während der Obduktion aus hepatischen Raumforderungen

entnommenen Proben, den Metastasen eines duktales Adenokarzinoms entsprechend, mit einbezogen.

2.3. Biochemische Untersuchungen

2.3.1. Chemikalien und Geräte

Die Bestimmung der GSHPX-Aktivität folgte nach dem Prinzip von Paglia und Valentine (137). Es wurde der Testkit RANSEL (Randox Ltd., Großbritannien) verwendet, in welchem das Reagenz, bestehend aus Glutathion + Glutathionreduktase + NADPH, ein 50mM Phosphat-EDTA-Puffer, 0,18mM Cumenhydroperoxid und Verdünnungsmittel enthalten waren.

Basierend auf der Methode nach Beauchamp und Fridovich (16) wurde die SOD-Aktivität bestimmt. Verwendung fand der Testkit RANSOD (Randox Ltd., Großbritannien) mit dem Mischsubstrat Xanthin und I.N.T. [(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchlorid] sowie 50mM CAPS-EDTA-Puffer und Xanthinoxidase (80U/l). Die optimale Gewebekonzentration belief sich auf 0,05-0,1 mg/ml Testvolumen.

Für die Proteinbestimmung nach Lowry wurden folgende Chemikalien benötigt (114):

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

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

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

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

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

Weiterhin Verwendung fanden:

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

2.3.2. Herstellung des Homogenats

Für die biochemischen Untersuchungen der bei der Obduktion gewonnenen und unverzüglich eingefrorenen Proben von metastatischem und metastasefreiem Lebergewebe aller Versuchsgruppen, mussten diese homogenisiert werden. Die GSHPX- und SOD-Bestimmung setzte eine viermalige 15 Sekunden anhaltende Homogenisierung des Probenmaterials mit eiskaltem 0,1mol/l-Phosphatpuffer (ph=7,4) unter Kühlung voraus. Für die TBARS-Bestimmung wurde das Probenmaterial ebenfalls unter Kühlung 4mal je 15 Sekunden mit 0,01% Butylhydroxyanisol (ph=7,4) enthaltender eiskalter 140mmol/l-Natriumchlorid-Lösung homogenisiert. Die Lagerung der so gewonnenen Homogenate erfolgte bei -80°C . Diese wurden vor den Messungen jeweils 15 Sekunden rehomogenisiert.

2.3.3. Bestimmung der GSHPX-Aktivität

2.3.3.1. Prinzip der GSHPX-Aktivitätsbestimmung

Das Vorgehen orientiert sich an dem Prinzip von Paglia und Valentine (137). Die Oxidation von Glutathion durch Cumenhydroperoxid wird durch GSHPX katalysiert, so dass durch Disulfidbrückenbildung das oxidierte Glutathion (GSSG) entsteht. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von reduziertem Glutathion und NADPH kommt es zur sofortigen Reduktion von GSSG bei gleichzeitiger NADPH-Oxidation. Die dadurch entstehende Abnahme der NADPH-Extinktion ist Messziel der hier verwendeten Methode.

2.3.3.2. Durchführung und Berechnung der Ergebnisse

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

Tab. 6: Pipettierschema für die GSHPX-Aktivitätsmessung

Nach guter Durchmischung der Proben und direktem Pipettieren in die Meßküvette wurde die Messung bei folgenden Parametern durchgeführt: 340nm Wellenlänge, 37°C Temperatur, 3 Minuten Reaktionszeit, 0,5cm Küvettenschichtdicke, Luft als Vergleichsprobe.

Die Berechnung der Ergebnisse liegt dem Lambert-Beerschen Gesetz zugrunde: $\Delta E = c \cdot d \cdot \epsilon$ (ΔE = Extinktionsänderung, c = Konzentration, d = Küvettenschichtdicke, ϵ = konstanter Extinktionskoeffizient $6,22 \cdot 10^3 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$). Daraus folgt die Umstellung des Lambert-Beerschen Gesetzes nach c und somit die Konzentrationsberechnung der Probe. Eingefügt wurde der Verdünnungsfaktor. Die Ergebnisse wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

2.3.4. Bestimmung der SOD-Aktivität

2.3.4.1. Prinzip der SOD-Aktivitätsbestimmung

Auf der Methode von Beauchamp und Fridovich (16) beruht der hier angewandte Testkit, der mittels Xanthin und Xanthinoxidase zur Bildung von Superoxidradikalen führt, die wiederum mit I.N.T. zu einem roten Farbstoff reagieren. Da die SOD ihrerseits die Dismutation von Superoxidradikalen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert, kann ihre Aktivität über den Grad der Hemmung der o.g. Reaktion bestimmt werden.

2.3.4.2. Durchführung und Berechnung der Ergebnisse

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

Tab. 7: Pipettierschema für die SOD-Aktivitätsmessung

Vor der Messung der Proben wurden diese soweit mit Aqua bidest verdünnt, dass die Messwerte zwischen 30% und 60% Hemmung lagen. Nach direktem Pipettieren in die Küvette und guter Durchmischung der Proben konnte unter folgenden Bedingungen die Messung erfolgen: 505nm Wellenlänge, 37°C Temperatur, 3 Minuten Reaktionszeit, 0.5cm Küvettschichtdicke, Luft als Vergleichsprobe.

Die Angabe der Messwerte erfolgte als Extinktionsänderung* $10^3/\text{min}$. Zur Umrechnung in die prozentuale Hemmung der Formazanreaktion wurde folgende Gleichung angewandt: %Hemmung = $100 - [(\Delta E \cdot \text{min}^{-1}_{\text{Probe}} \cdot 100) / \Delta E \cdot \text{min}^{-1}_{\text{Leerwert}}]$. Der Aktivitätsangabe in units liegt die Definition 1U SOD-Aktivität entspricht 50% Hemmung zugrunde. Die so erhaltenen Werte wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

2.3.5. Proteinbestimmung nach Lowry

2.3.5.1. Prinzip der Proteinbestimmung

Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung ergeben mit einer Verbindung, die mindestens zwei Peptidbindungen aufweist, einen violetten Komplex. Nachteil dieser sogenannten Biuret-Methode ist die geringe Sensitivität und der umfangreiche Bedarf an Probenmaterial, der zur Bestimmung benötigt wird. Zur Anwendung kam daher nach Lowry eine Kombination der Biuret-Methode mit einer Reduktion von Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure (Folins Reagenz) zu Wolfram- bzw. Molybdänblau durch die aromatischen Seitenketten des im Kupferkomplex gebundenen Tyrosins und Tryptophans (114).

2.3.5.2. Durchführung und Auswertung

Zur Herstellung von 50 ml Gebrauchslösung wurden 0,5ml Kupfersulfat-Lösung, 0,5ml Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung und 49ml Natriumkarbonat-Lösung zusammengegeben. 1,5ml Gebrauchslösung wurden anschließend mit 25 μl des vorher 1:100 verdünnten und mit 225 μl Aqua bidest versetzten Gewebehomogenates inkubiert. Daraufhin wurden unter starkem Schütteln 150 μl Folins Reagenz dazugegeben. Die Messung der Proben erfolgte nach einstündiger Inkubation bei 750nm Wellenlänge, 25°C Temperatur, 0,5cm Küvettschichtdicke, Leerwert als Vergleichsprobe. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierfunktion.

2.3.6. Bestimmung der Lipidperoxidations-Produkte

2.3.6.1. Prinzip der Lipidperoxidations-Produktbestimmung

Die Methode basiert auf dem Prinzip von Ohkawa (133). Beschrieben wird die fluorimetrische Bestimmung der Konzentration des roten Polymethinfarbstoffes, der sich durch Reaktion von Lipidperoxidationsprodukten mit Thiobarbitursäure (TBA) bildet. Daher werden diese Reaktion eingehenden Lipidperoxidationsprodukte als Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBARS) bezeichnet. Bei Studienbeginn war der teilweise kritische Aspekt der Meßmethode im Hinblick auf Art der Probengewinnung bzw. –aufbewahrung und weiterhin die nicht unproblematische Spezifität des Tests bekannt (81). Nach Erfahrungen mit vorangehenden Untersuchungen können wir jedoch davon ausgehen, dass artefizielle Veränderungen des TBARS-Levels durch strenge Standardisierung aller Arbeitsschritte verhindert werden können. Die Standardisierung sieht ein sehr schnelles Einfrieren der Gewebe nach Entnahme, Aufbewahrung der Proben in Flüssigstickstoff, Homogenisierung und Analyse in Gegenwart von Antioxidantien vor.

2.3.6.2. Durchführung und Auswertung

Zu 20µl des Homogenates wurden 0,8 ml der Reaktionslösung bestehend aus 1,35mol/l Azetatpuffer, 0,15mol/l SDS und 20mol/l TBA hinzugefügt, bevor die Mischung mit NaOH auf einen ph von 3,5 eingestellt und für 60 Minuten im Wasserbad (90°C) erwärmt werden konnte. Darauf folgte eine 5minütige Abkühlung im Eiswasser mit der nachfolgenden Hinzugabe von 200µl Aqua bidest und 1ml n-Butanol/Pyridingemisch (Verhältnis 15/1). Im Anschluss daran wurde die Mischung für 20 Minuten geschüttelt, um anschließend 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert zu werden.

Hinterher wurde die Messung in der überstehenden organischen Phase bei 515nm Wellenlänge für Exzitation, 553nm Wellenlänge für Emission, 25°C Temperatur, 0,5cm Küvettenschichtdicke, 1.1.3.3-Tetraethoxypropan als Standard durchgeführt. 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 wurden bei Normalverteilung als T-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Parametern fanden diese Vergleiche als Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Test statt. Die kategoriellen Daten wurden angesichts der kleinen Umfänge mit dem Fisher-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde grundsätzlich mit 95% ($p < 0,05$) definiert. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.0[®] für Windows98[®] durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Letalität während des Versuchszeitraums

Die Letalität im Versuchszeitraum ist in Tabelle 8 dargestellt.

Versuchsgruppe	Anzahl (n) verstorbener Tiere	Letalität in %
1 (HF, Ø BOP, Ø Celebrex, Ø Zyflo)	0	0
2 (HF, Ø BOP, Celebrex, Ø Zyflo)	2	13,3
3 (HF, Ø BOP, Ø Celebrex, Zyflo)	1	6,7
4 (HF, Ø BOP, Celebrex, Zyflo)	0	0
5 (HF, BOP, Ø Celebrex, Ø Zyflo)	7	46,7 <small>[p<0,05 vs alle anderen Gruppen]</small>
6 (HF, BOP, Celebrex, Ø Zyflo)	4	26,7 <small>[p<0,05 vs Gruppe 1,3,4,7]</small>
7 (HF, BOP, Ø Celebrex, Zyflo)	0	0
8 (HF, BOP, Celebrex, Zyflo)	4	26,7 <small>[p<0,05 vs Gruppe 1,3,4,7]</small>

Tab. 8: Letalität der Versuchsgruppen 1-8

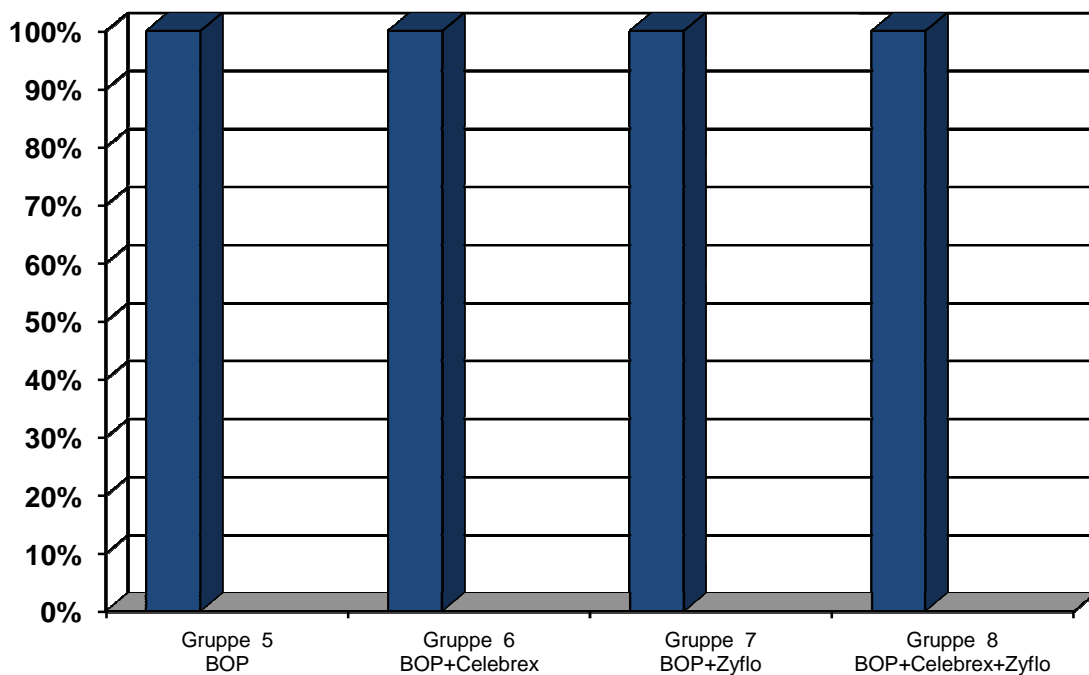
3.2. Makroskopie und Auflichtmikroskopie

3.2.1. Makroskopie und Auflichtmikroskopie des Pankreas

3.2.1.1. Inzidenz pankreatischer Raumforderungen

Im Pankreas der Gruppen 1-4 waren erwartungsgemäß nach der Obduktion der Tiere keine Raumforderungen nachweisbar. Die Inzidenz pankreatischer Raumforderungen betrug in den Gruppen 5-8 100%.

Inzidenzen (%)



Versuchsgruppen 5-8

Abb. 5: Inzidenz pankreatischer Raumforderungen der BOP-induzierten Gruppen 5-8

Die Pankreastumoren lagen im splenischen und gastrischen Pankreasanteil.

3.2.2. Makroskopie und Auflichtmikroskopie der Leber

3.2.2.1 Inzidenz und Anzahl metastasenverdächtiger Raumforderungen

Wie erwartet, zeigten sich in den Gruppen 1-4 keine Lebermetastasen. Die Auflichtmikroskopie der Lebern ergab für die Gruppen 5-8 die in Abbildung 6 dargestellten Inzidenzen von metastasenverdächtigen Herden.

Inzidenzen (%)

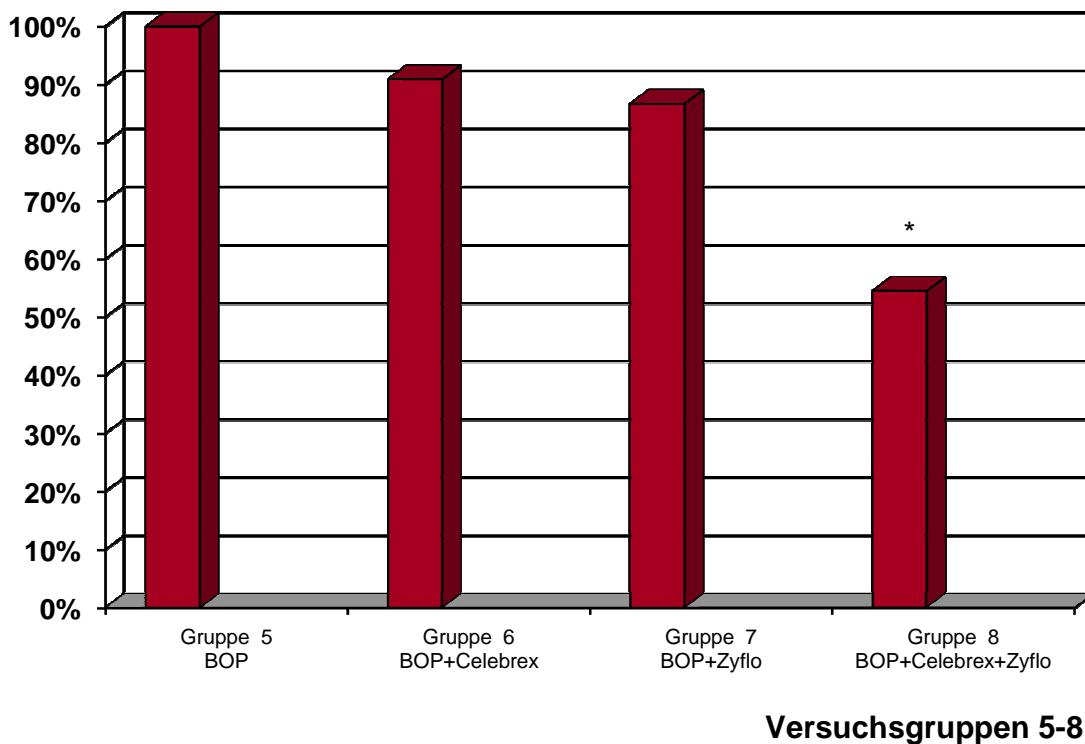
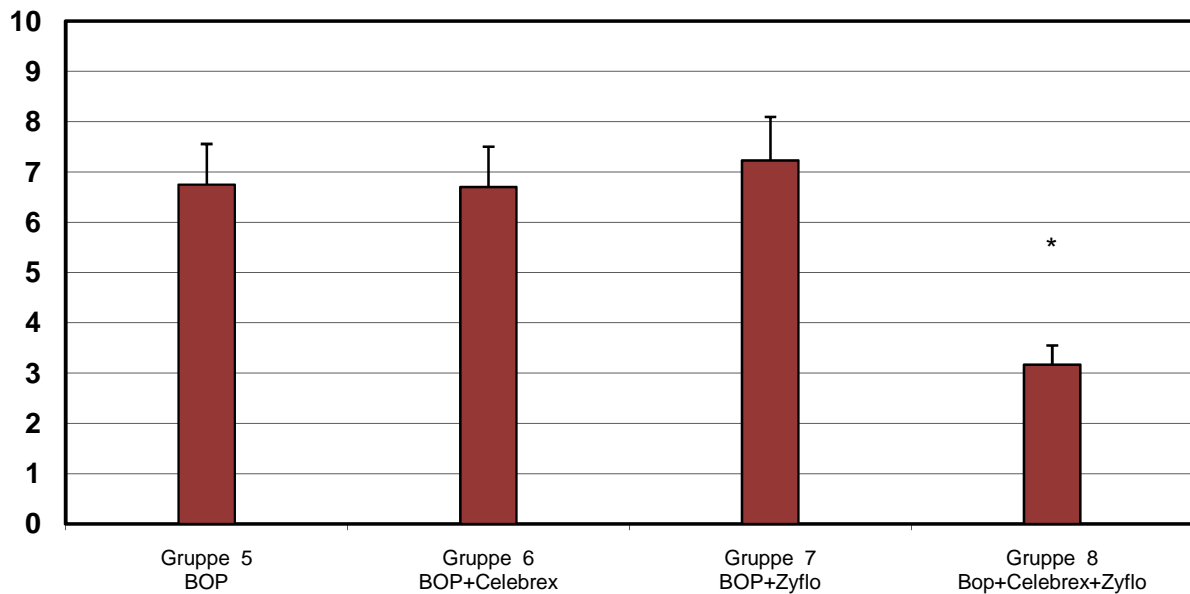


Abb. 6: Inzidenz metastasenverdächtiger Leberherde der BOP-induzierten Gruppen 5-8,
* ($p < 0,05$ vs Gruppe 5-7)

Zwischen der Gruppe 8 einerseits und den Gruppen 5-7 andererseits bestanden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Die Anzahl der metastasenverdächtigen Leberherde bei den Tieren der Gruppen 5 -8 ist in Abbildung 7 dargestellt.

Metastasenverdächtige Herde (n)



Versuchsgruppen 5-8

Abb. 7: Anzahl (n) metastasenverdächtiger Herde in der Leber der BOP-induzierten Gruppen 5-8 (Mittelwerte \pm Standardabweichung), *($p < 0,05$ vs Gruppe 5-7)

Der Unterschied zwischen der Gruppe 8 und den Gruppen 5-7 war signifikant ($p < 0,05$).

3.2.2.2 Größe metastasenverdächtiger hepatischer Raumforderungen

In Abbildung 8 ist die durchschnittliche Größe der metastasenverdächtigen hepatischen Raumforderungen bei den Tieren der Versuchsgruppen 5–8 dargestellt.

Größe (mm²)

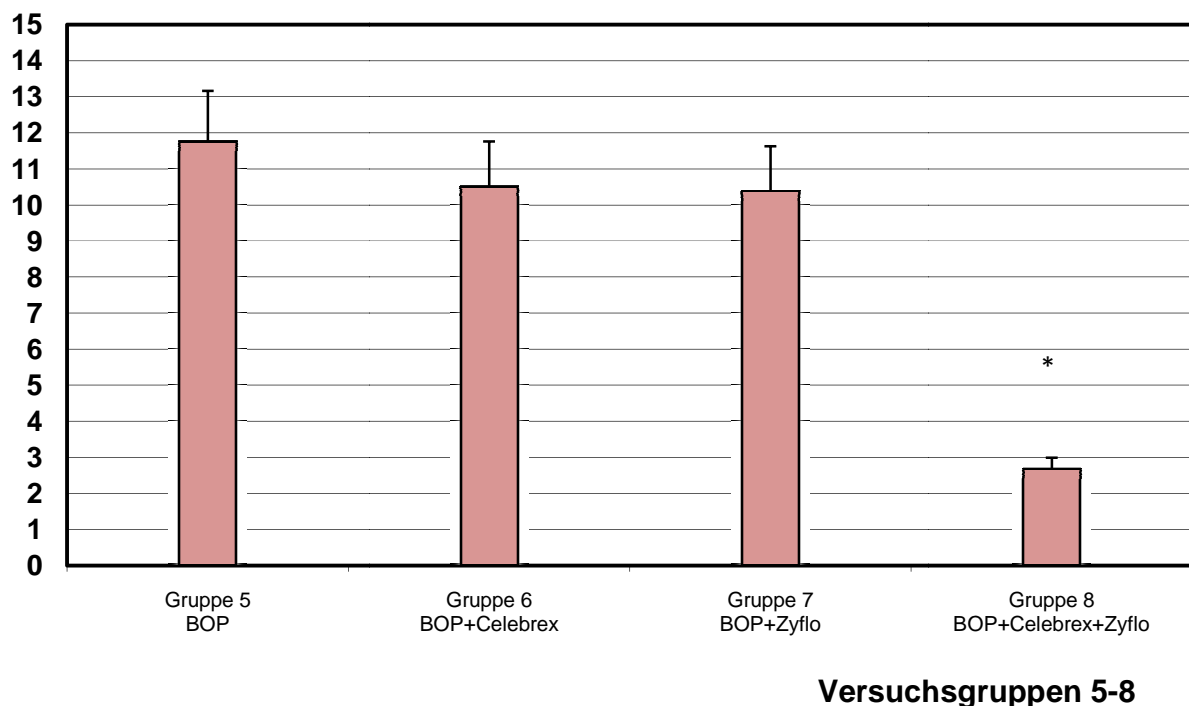


Abb.8 : Größe (mm²) metastasenverdächtiger Herde in der Leber, (Mittelwerte \pm Standardabweichung), * ($p < 0,05$ vs Gruppe 5-7)

Bei den Gruppen 5-7 zeigten sich hinsichtlich der Größe der metastasenverdächtigen Herde in der Leber keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

Jedoch weist die Kombinationstherapie von Celebrex und Zyflo in Gruppe 8 auf eine signifikante ($p < 0,05$) Verkleinerung der Lebermetastasen hin.

3.3. Histologische Ergebnisse

3.3.1. Klassifikation der pankreatischen Raumforderungen

Die Klassifizierung der Raumforderungen folgte den Kriterien nach Meijers et al. (122). In allen Fällen konnten invasiv wachsende Anteile duktaler Adenokarzinome dokumentiert werden. Ferner ließen sich in annähernd jedem Präparat Vorstufen wie papilläre und/oder duktale Hyperplasien, atypische Hyperplasien und in-situ-Karzinome nachweisen. Begleit-Desmoplasien sowie in unterschiedlicher Ausprägung bestehende inflammatorische Komponenten wurden ebenfalls beobachtet. Ein charakteristisches mikroskopisches Bild in unterschiedlichen Vergrößerungen zeigen die Abbildungen 9 und 10.

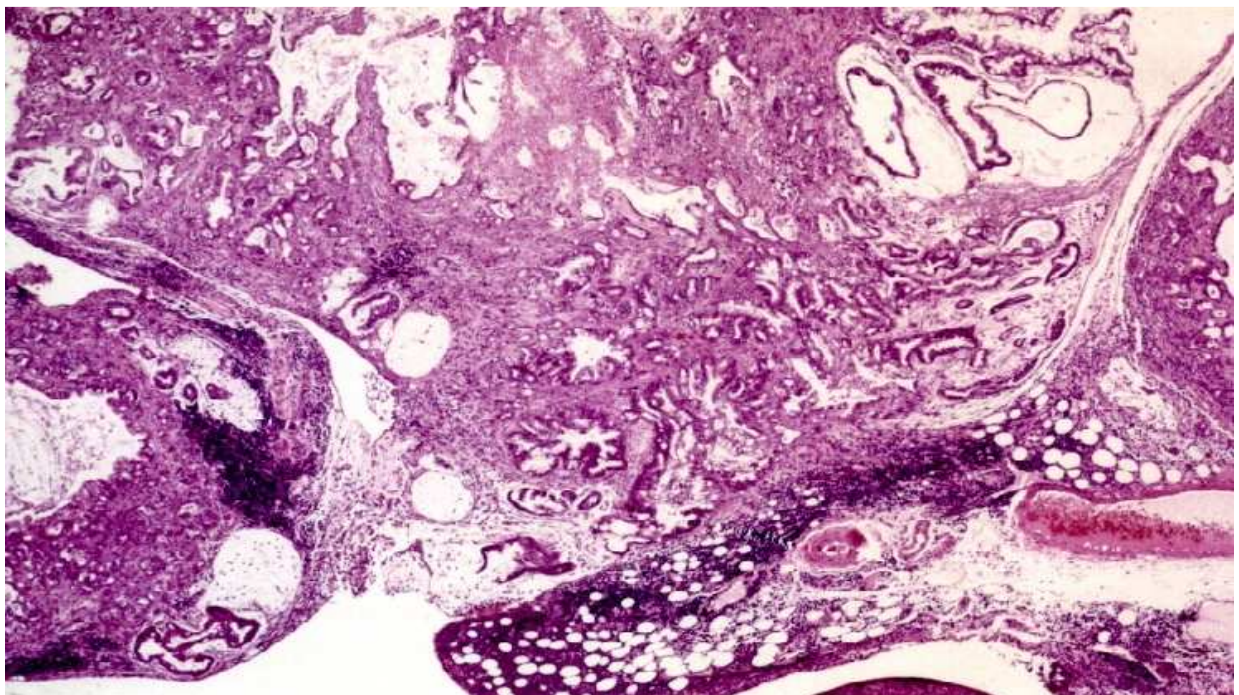


Abb.9: Pankreaskarzinom, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung

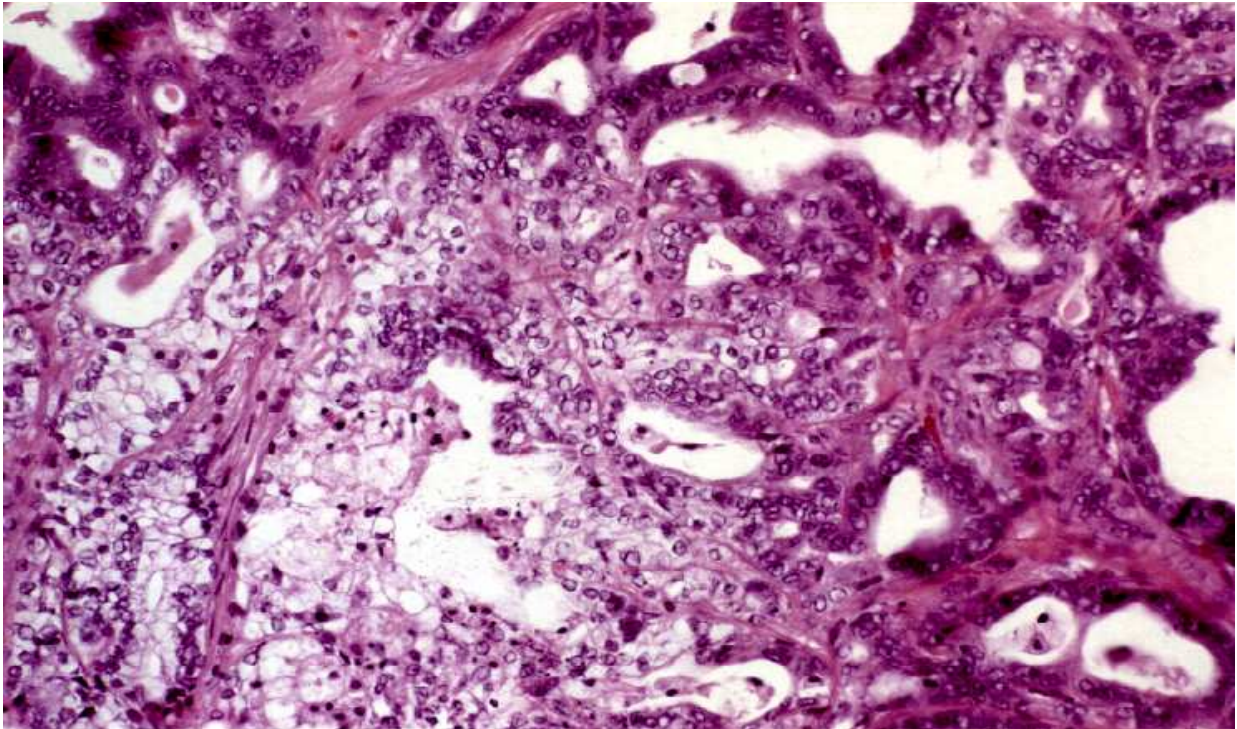


Abb.10: Pankreaskarzinom, HE-Färbung, 40fache Vergrößerung

3.3.2. Klassifikation der hepatischen Raumforderungen

Histopathologisch konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Raumforderungen in der Leber um Metastasen eines duktales Adenokarzinoms handelte. Primäre neoplastische Veränderungen wurden nicht gefunden. Ein charakteristisches mikroskopisches Bild in unterschiedlichen Vergrößerungen zeigen die Abbildungen 11 und 12.

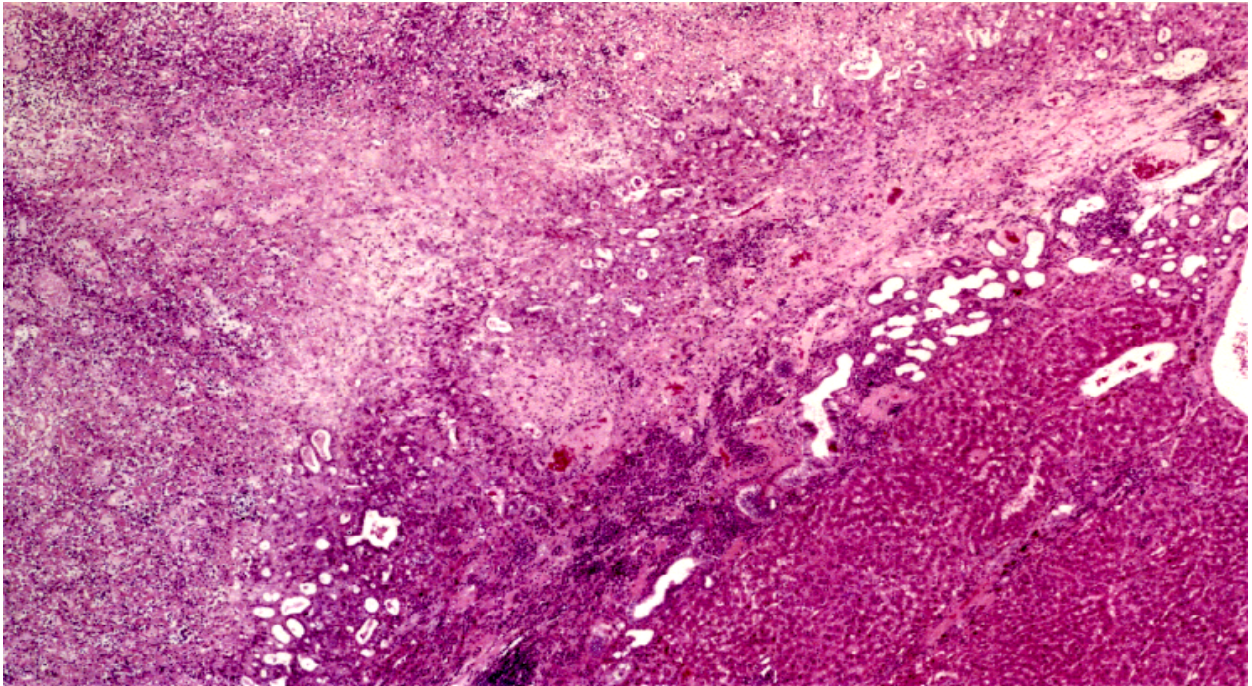


Abb.11 Lebermetastasen, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung

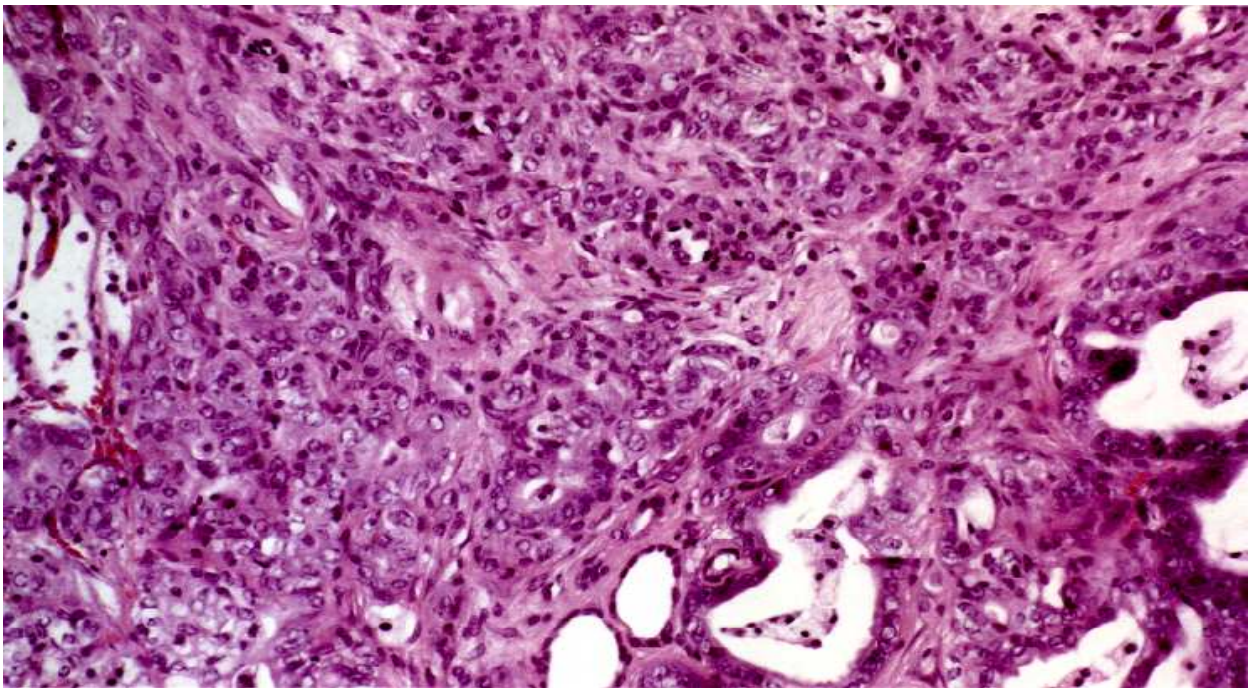


Abb.12 Lebermetastasen, HE-Färbung, 40fache Vergrößerung

3.4. Biochemische Ergebnisse

3.4.1. Eiweißgehalt

Eine Darstellung über den gemessenen Proteingehalt in metastasenfremen Leberanteilen (MFLA) und im metastatischen Lebergewebe gibt Tabelle 9 wieder.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) konnten in Bezug auf MFLA zwischen den Gruppen 1-4 und 5,7,8 gemessen werden. Auch der Vergleich des intrametastatischen mit dem Proteingehalt in MFLA innerhalb der betreffenden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

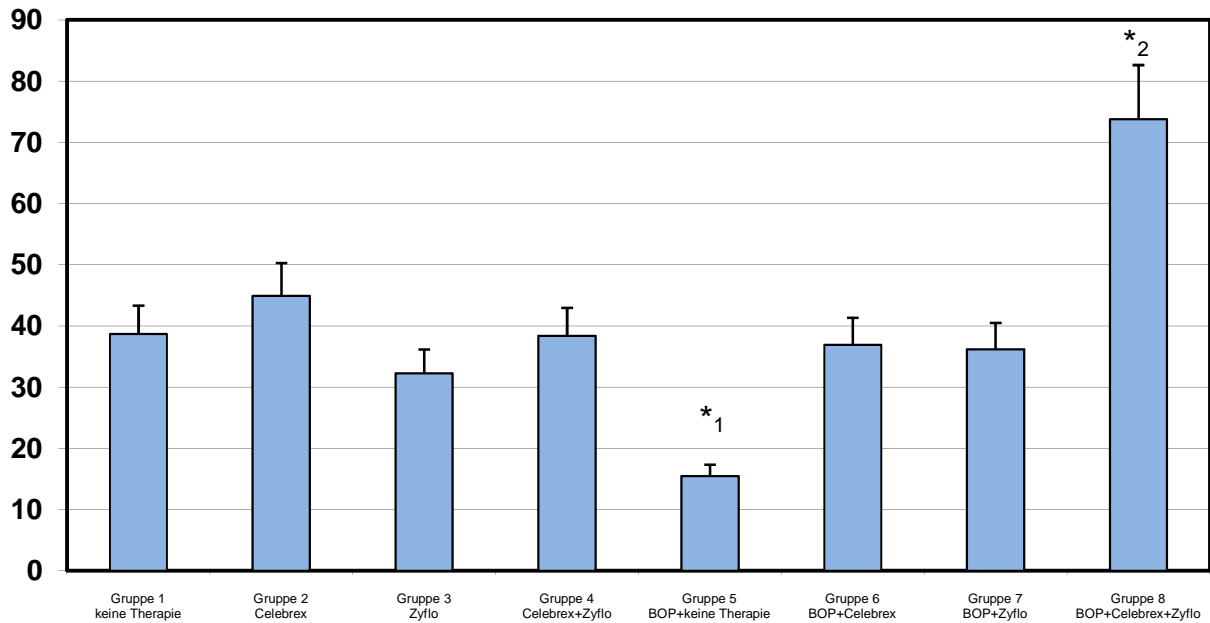
Versuchsgruppe	Proteingehalt in metastasenfremen (MFLA) Leberanteilen [mg/ml]	Proteingehalt in Lebermetastasen [mg/ml]
1 (HF, Ø BOP, Ø Celebrex, Ø Zyflo)	27,01 ± 2,00 [$p < 0,05$ bei 1,2,3,4 vs 5,7,8]	-
2 (HF, Ø BOP, Celebrex, Ø Zyflo)	28,23 ± 6,95	-
3 (HF, Ø BOP, Ø Celebrex, Zyflo)	35,54 ± 13,66	-
4 (HF, Ø BOP, Celebrex, Zyflo)	26,35 ± 3,16	-
5 (HF, BOP, Ø Celebrex, Ø Zyflo)	20,00 ± 2,36	15,50 ± 1,04
6 (HF, BOP, Celebrex, Ø Zyflo)	24,70 ± 19,55	15,84 ± 2,84
7 (HF, BOP, Ø Celebrex, Zyflo)	21,28 ± 2,79	16,40 ± 1,72
8 (HF, BOP, Celebrex, Zyflo)	22,13 ± 2,87	22,13 ± 2,87

Tab. 9: Proteingehalt in metastasenfremen Leberanteilen und in Lebermetastasen, (Mittelwerte ± Standardabweichung)

3.4.2. GSHPX-Aktivität

Die GSHPX-Aktivität in MFLA ist in Abbildung 13 dargestellt.

Aktivität [$\cdot 10^5$ U/mg Eiweiß]



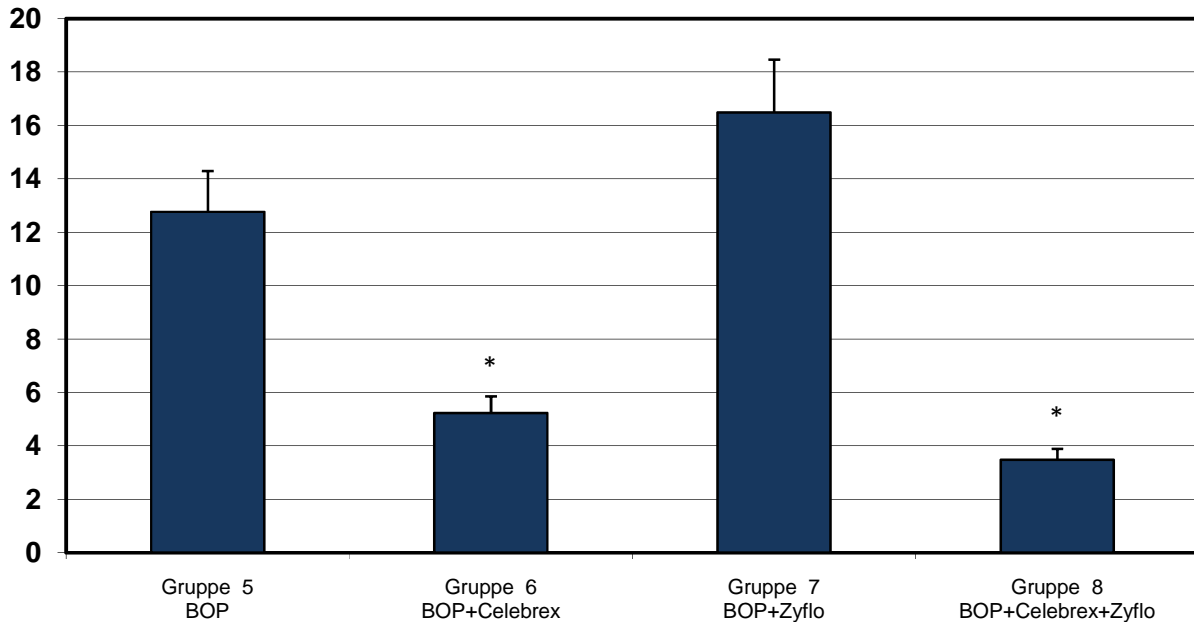
Versuchsgruppen 1-8

Abb. 13: GSHPX-Aktivität in MFLA [$\cdot 10^5$ U/mg Eiweiß] in Gruppe 1-8, (Mittelwerte \pm Standardabweichung), *₁($p < 0,05$ vs Gruppe 1-4, 6-8), *₂($p < 0,05$ vs. Gruppe 1-7)

Die GSHPX-Aktivität in MFLA wies in Gruppe 5, die mit BOP induziert jedoch nicht therapiert wurde, eine signifikante Erniedrigung auf (Gr.5: $[15,49 \pm 4,02] \cdot 10^5$ vs Gr.1: $[38,67 \pm 8,02] \cdot 10^5$; Gr.2: $[44,91 \pm 8,18] \cdot 10^5$; Gr.3: $[32,27 \pm 10,51] \cdot 10^5$; Gr.4: $[38,36 \pm 4,44] \cdot 10^5$; Gr.6: $[36,9 \pm 8,33] \cdot 10^5$; Gr.7: $[36,18 \pm 9,73] \cdot 10^5$; Gr.8: $[73,77 \pm 5,67] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Eine signifikante Steigerung der GSHPX-Aktivität konnte dagegen durch eine Kombinationstherapie mit Celebrex und Zyflo nachgewiesen werden (Gr.8: $[73,77 \pm 5,67] \cdot 10^5$ vs Gr.1: $[38,67 \pm 8,02] \cdot 10^5$; Gr.2: $[44,91 \pm 8,18] \cdot 10^5$; Gr.3: $[32,27 \pm 10,51] \cdot 10^5$; Gr.4: $[38,36 \pm 4,44] \cdot 10^5$; Gr.5: $[15,49 \pm 4,02] \cdot 10^5$; Gr.6: $[36,9 \pm 8,33] \cdot 10^5$; Gr.7: $[36,18 \pm 9,73] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$).

Die GSHPX-Aktivität in Lebermetastasen ist in Abbildung 14 dargestellt.

Aktivität [$\cdot 10^5$ U/mg Eiweiß]



Versuchsgruppen 5-8

Abb. 14: GSHPX-Aktivität in Lebermetastasen [$\cdot 10^5$ U/mg Eiweiß] in Gruppe 5-8, (Mittelwerte \pm Standardabweichung), * ($p < 0,05$ vs Gruppe 5, 7)

Durch eine Therapie mit Celebrex oder einer Kombinationstherapie mit Celebrex und Zyflo konnte nachweislich die GSHPX-Aktivität in Lebermetastasen signifikant gesenkt werden (Gr.6: $[5,23 \pm 3,3] \cdot 10^5$; Gr.8: $[3,48 \pm 4,55] \cdot 10^5$ vs Gr.5: $[12,77 \pm 2,63] \cdot 10^5$, Gr.7: $[16,49 \pm 2,95] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$).

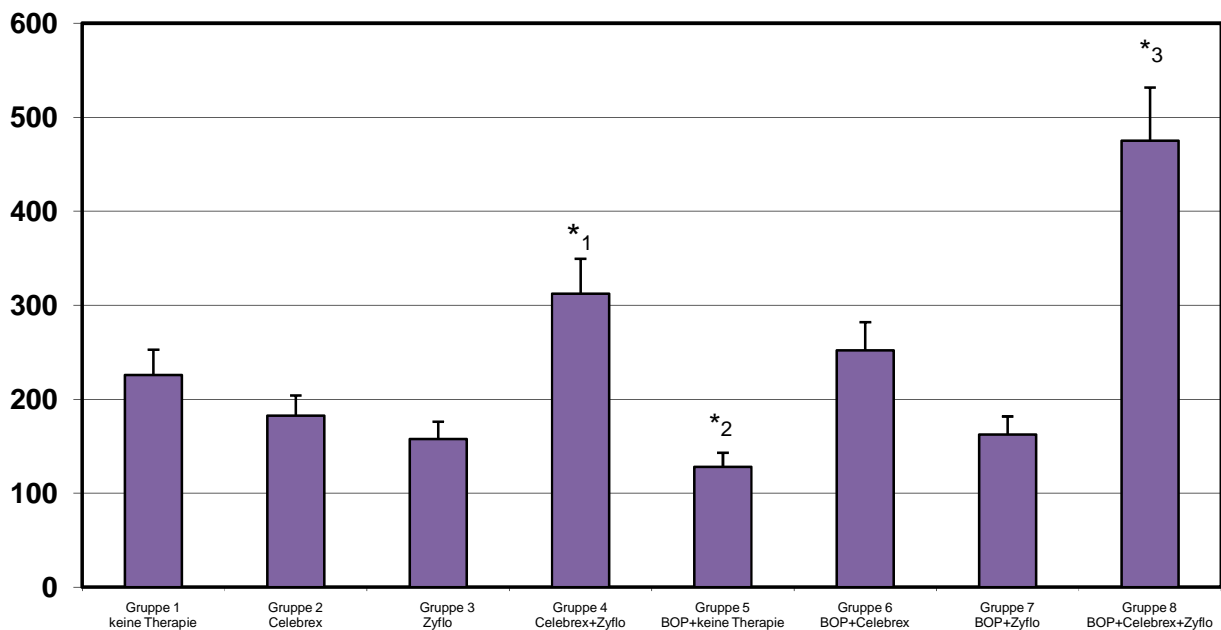
Der innerhalb der Versuchsgruppen durchgeführte Vergleich der GSHPX-Aktivität in MFLA und Lebermetastasen zeigte, dass die GSHPX-Aktivität in den Lebermetastasen signifikant niedriger war als in den MFLA. Dabei wurde die signifikant niedrigste Aktivität in der Versuchsgruppe der kombinierten Medikation von Celebrex und Zyflo gefunden (Gr.8: $[3,48 \pm 4,55] \cdot 10^5$ vs $[73,77 \pm 5,67] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Auch die alleinige Gabe von Celebrex führte zu signifikanter Aktivitätsminderung in den Lebermetastasen im Vergleich zu MFLA (Gr.6: $[5,23 \pm 3,3] \cdot 10^5$ vs $[36,9 \pm 8,33] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Innerhalb der betreffenden Gruppen ergab die Therapie mit Zyflo ebenfalls eine signifikante

Erniedrigungen der GSHPX-Aktivität in Lebermetastasen (Gr.7: $[16,49 \pm 2,95] \cdot 10^5$ vs $[36,18 \pm 9,73] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Keine Signifikanz wurde in der Versuchsgruppe ohne Therapie festgestellt (Gr.5: $[12,77 \pm 2,63] \cdot 10^5$ vs $[15,49 \pm 4,02] \cdot 10^5$ U/mg Eiweiß, $p > 0,05$).

3.4.3. SOD-Aktivität

Die SOD-Aktivität in metastasenfreien Leberanteilen ist in Abbildung 15 dargestellt.

Aktivität [U/mg Eiweiß]



Versuchsgruppen 1-8

Abb. 15: SOD-Aktivität in MFLA [U/mg Eiweiß] in Gruppe 1-8, (Mittelwerte \pm Standardabweichung), *1 ($p < 0,05$ vs Gruppe 1-3, 5, 7), *2 ($p < 0,05$ vs Gruppe 1), *3 ($p < 0,05$ vs Gruppe 1-7)

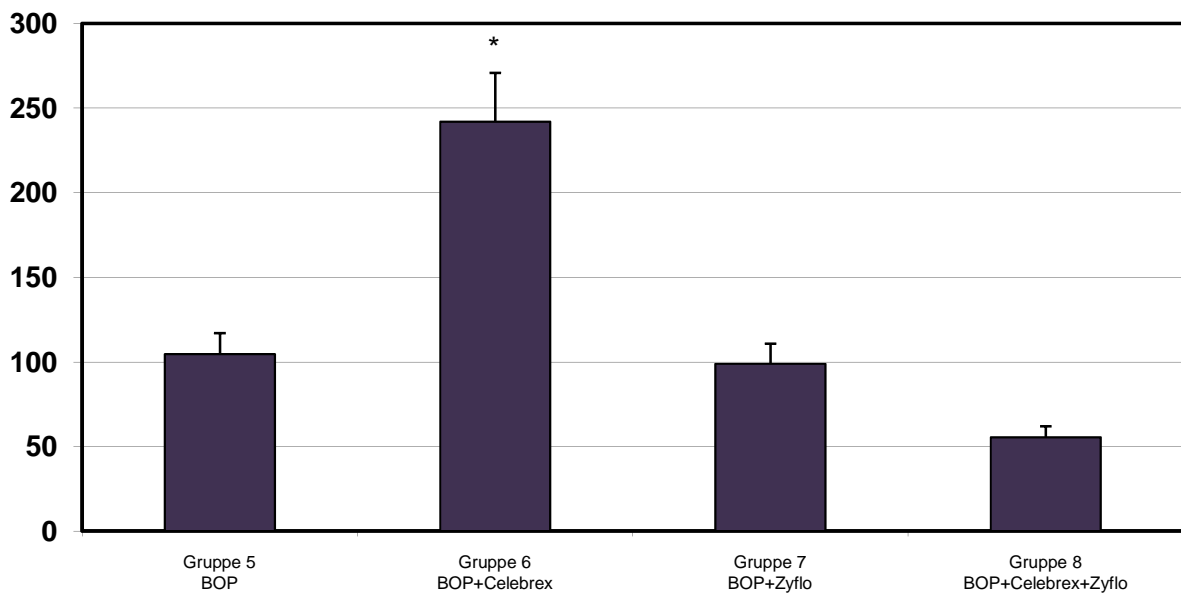
In der nicht induzierten Gruppe 4 führte die Kombinationstherapie von Celebrex und Zyflo zu einer signifikanten Steigerung der SOD in MFLA (Gr.4: $(312,29 \pm 42,58)$ vs

Gr.1:[225,83±49,09]; Gr.2:[182,44±49,98]; Gr.3:[157,47±34,51]; Gr.5:[127,89±38,75]; Gr.7:[162,44±59,21] U/mg Eiweiß, p<0,05).

Bei gleichzeitiger BOP-Induktion lag die SOD-Aktivität in MFLA nochmals signifikant über den Werten bei allen übrigen Gruppen (Gr.8:[474,92±108,8) vs Gr.1:[225,83±49,09]; Gr.2:[182,4±4]; Gr.3:[157,4±7]; Gr.4: [312,2±9]; Gr.5:[127,89±38,75]; Gr.6:[251,97±66,14] Gr.7:[162,44±59,21] U/mg Eiweiß, p<0,05). Eine signifikante Erniedrigung der SOD-Aktivität in MFLA ergab sich bei induzierten Tieren, die keine Therapie erhalten haben (Gr.5:[127,89±38,75] vs Gr.1:[225,83±49,09] U/mg Eiweiß, p<0,05).

Die SOD-Aktivität in Lebermetastasen ist in Abbildung 16 dargestellt.

Aktivität [U/mg Eiweiß]



Versuchsgruppen 5-8

Abb. 16: SOD-Aktivität in Lebermetastasen [U/mg Eiweiß] in Gruppe 5-8, (Mittelwerte ± Standardabweichung), * (p<0,05 vs Gruppe 5, 7-8)

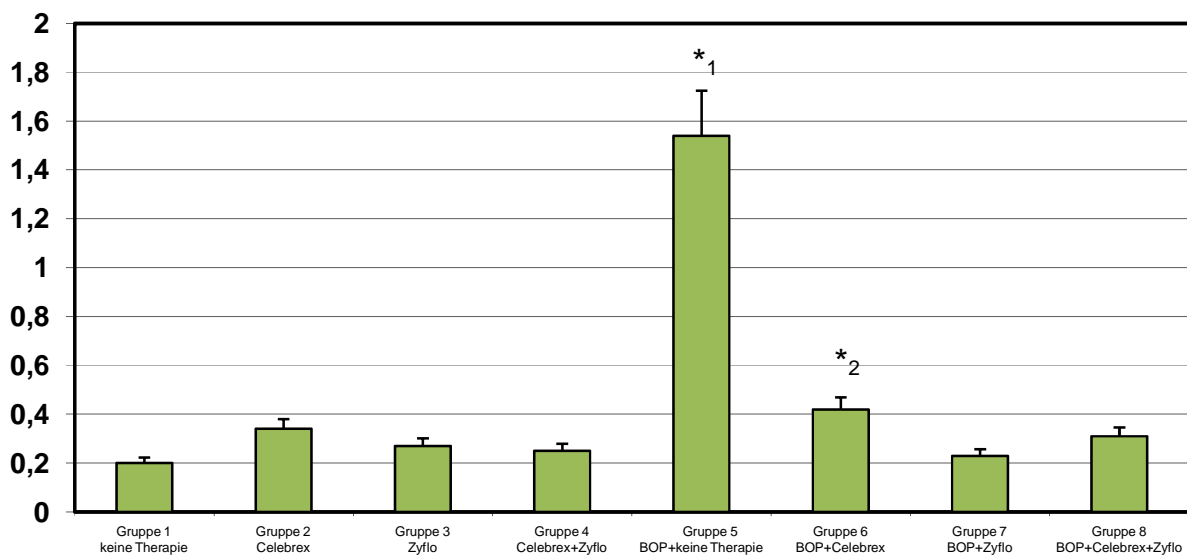
Die alleinige Gabe von Celebrex bewirkte einen signifikanten Anstieg der SOD-Aktivität in Lebermetastasen (Gr.6:[241,99±42,72] vs Gr.5: [104,58±33,31]; Gr.7: [98,96±23,59]; Gr.8:[55,48±13,63] U/mg Eiweiß, p<0,05).

Die Kombinationstherapie von Celebrex und Zylfo führte als einzige Therapie zu einer signifikanten Erhöhung der SOD-Aktivität in MFLA (Gr.8:[474,92±108,8] vs [55,48±13,63] U/mg Eiweiß, p<0,05).

3.4.4. Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten

Die Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, TBARS) in metastasenfremen Leberanteilen ist in Abbildung 17 dargestellt.

Konzentration [nmol/mg Eiweiß]



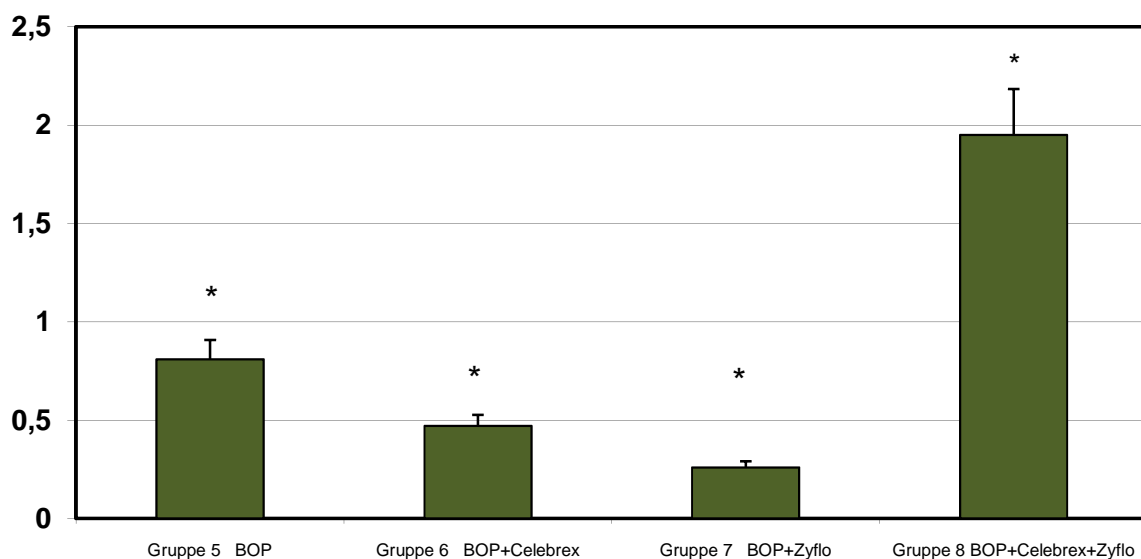
Versuchsgruppen 1-8

Abb. 17: TBARS-Aktivität in MFLA [nmol/mg Eiweiß] in Gruppe 1-8, (Mittelwerte ± Standardabweichung), *1 (p<0,05 vs Gruppe 1-4, 6-8), *2 (p<0,05 vs Gruppe 1, 4, 7)

Die höchste TBARS-Konzentration in MFLA wurde bei BOP induzierten Tieren ohne Medikation gefunden (Gr.5: $1,54 \pm 0,55$ vs Gr.1: $0,2 \pm 0,08$; Gr.2: $0,34 \pm 0,27$; Gr.3: $0,27 \pm 0,17$; Gr.4: $0,25 \pm 0,06$; Gr.6: $0,42 \pm 0,11$; Gr.7: $0,23 \pm 0,05$; Gr.8: $0,31 \pm 0,08$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Die mit BOP induzierten Tiere zeigten unter Celebrex (Gr.6: $0,42 \pm 0,11$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) immer noch eine signifikante Erhöhung der TBARS-Konzentration im Vergleich mit den Gruppen 1,4,7 (Gr.1: $0,2 \pm 0,08$; Gr.4: $0,25 \pm 0,06$; Gr.7: $0,23 \pm 0,05$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$).

Die Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, TBARS) in Lebermetastasen ist in Abbildung 18 dargestellt.

Konzentration [nmol/mg Eiweiß]



Versuchsgruppen 5-8

Abb. 18: TBARS-Aktivität in Lebermetastasen [nmol/mg Eiweiß] in Gruppe 5-8, (Mittelwerte \pm Standardabweichung), * ($p < 0,05$ vs alle Gruppen)

Unter der Kombinationstherapie mit Celebrex und Zyflo wurden signifikant höchste TBARS-Konzentrationen in Lebermetastasen gemessen (Gr.8: $1,95 \pm 0,12$ vs alle Gruppen nmol/mg Eiweiß, gefolgt von BOP induzierten Tieren ohne Therapie (Gr.5: $0,81 \pm 0,04$ vs

alle Gruppen nmol/mg Eiweiß jeweils $p < 0,05$). Geringere, jedoch ebenfalls signifikant höhere TBARS-Konzentrationen zeigten sowohl die Celebrex- (Gr.6: $0,47 \pm 0,09$ vs alle Gruppen nmol/mg Eiweiß $p < 0,05$) als auch die Zylflo-Versuchsgruppen (Gr.7: $0,26 \pm 0,09$ vs alle Gruppen nmol/mg Eiweiß $p < 0,05$).

Der Vergleich innerhalb der Versuchsgruppen zeigt eine signifikante Steigerung der TBARS-Konzentration bei Tieren ohne Therapie in MFLA (Gr.5: $1,54 \pm 0,55$ vs $0,81 \pm 0,04$ nmol/mg Eiweiß $p < 0,05$). Die signifikant höchste TBARS-Konzentration fand sich jedoch in Lebermetastasen bei Tieren unter Kombinationstherapie von Celebrex und Zylflo (Gr.8: $1,95 \pm 0,12$ vs $0,31 \pm 0,08$ nmol/mg Eiweiß $p < 0,05$).

4. Diskussion

4.1. Auswirkungen von BOP und einer Hochfetterernährung mit Linol- und Linolensäure auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Zur experimentellen Untersuchung des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas hat sich weltweit das N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP)-induzierte Hamstermodell etabliert (61,112,142,143,172,175,195). Die Wirkungsweise dieses hochpotenten Karzinogens, welches nach einer Latenz von ca. 7 Monaten zu einer fast 100%igen Induktion duktalem Adenokarzinome des Pankreas führt, ist bis heute nicht ausreichend geklärt. Zugrunde liegend für die Entstehung des Primärtumors scheinen intrapankreatische Metabolisierungsprozesse zu sein, unbedeutend hingegen erscheint die hepatische Verstoffwechslung nach oraler Applikation (143). Die Metabolisierung der Nitrosaminderivate erfolgt unter anderem durch das Cytochrom P-450-System, wobei es im Verlauf der Metabolisierung von BOP im Rahmen oxidativer und reduktiver Stoffwechselprozesse zur Bildung freier Radikale in der Zelle kommt (7,15,18,195). Weiterhin konnten unter BOP signifikant erhöhte Konzentrationen an Prostaglandinen im nicht befallenen Pankreasgewebe nachgewiesen werden (10). In unserer Arbeitsgruppe konnte ein wachstumsfördernder Einfluss auf das Pankreaskarzinom durch den Einsatz des erhöhten Verhältnisses von ω -6- und ω -3-Fettsäuren beobachtet werden. PUFA scheinen hierbei einen entscheidenden additiven Effekt, auf die Ausprägung o.g. Stoffwechselvorgänge zu haben. Die Wirkungen der Fettsäuren entstehen direkt bzw. indirekt. PUFA stellen die Ausgangssubstanz für die Eikosanoidsynthese dar, die wiederum hormonelle und andersartige Stimuli modulieren (86). Durch strukturelle und funktionelle Veränderungen der Zellmembranen nehmen PUFA weiterhin Einfluss auf membrangebundene Enzyme, wie z.B. Cytochrom P-450 und können so zu einer Umwandlung von Hormonen, Cytokinen oder Wachstumsfaktoren führen bzw. auf Signaltransduktionen einwirken und zu veränderter Genexpression führen (14,19). Gleichzeitig führt die Peroxidation konjugierter Doppelbindungen in den PUFA zu persistierendem oxidativen Stress und zur Generierung weiterer reaktiver Lipidperoxidationsprodukte (7,195). Bartsch et al. berichten von einer Bildung reaktiver

Sauerstoffspezies, die zu einer Schädigung der Zellmembranen und der DNA durch Lipidperoxidation führen (14). Konkret scheint u.a. die Hochfettdiät in unserer Studie zu erhöhtem oxidativen Stress bei den Pankreaszellen und Hepatozyten und somit zur Schädigung der Biomembranen geführt zu haben. In unserer Studie zeigte sich im Tumorgewebe des Pankreas eine erhöhte Konzentration an TBARS als Ausdruck vermehrter Lipidperoxidation. Dieser Anstieg des oxidativen Stresses, gemessen durch die TBARS-Konzentration, reflektiert den Grad einer möglichen Schädigung von Zellmembranen, zellulären Enzymen und der DNA (26,197). Die nitrosaminbedingten Schäden durch Radikale und eine begleitend erhöhte Lipidperoxidation mit Aktivitätsveränderungen antioxidativer Schutzenzyme im Verlauf der Karzinogenese konnten in der Literatur für verschiedene Organe gezeigt werden (18,129,147). U.a. scheint in diesem Zusammenhang eine durch Radikale bedingte DNA-Veränderung zu einer Hemmung von Tumor-Suppressor-Genen, wie z.B. p53 bei gleichzeitiger Aktivierung von Onkogenen möglich zu sein (117). Während Roebuck et al einen wachstumshemmenden Einfluss durch ω -3-Fettsäuren und einen proliferationsfördernden Einfluss von ω -6-Fettsäuren auf Tumorzellen des Pankreaskarzinoms feststellte, konnte in unserer Arbeitsgruppe eine wachstumsfördernde Wirkung durch den Einsatz des erhöhten Verhältnisses von ω -6- und ω -3-Fettsäuren beobachtet werden (152,197). Bei o.g. Untersuchungen handelt es sich jedoch um primär von der Karzinogenese betroffene Organe, nicht aber um Filiae dieser Tumoren.

Unter oben genannten Standardbedingungen findet sich eine entsprechende Lebermetastasierungsrate von 35,7% (195). Die in dieser und vorangegangenen Studien vorgenommene Erhöhung des Rohfettanteils auf 21,4%, wobei die ω -6-Fettsäure Linolsäure 11% und die ω -3-Fettsäure Linolensäure 2% des Futters ausmachten, führte zu einer Steigerung der Lebermetastasierungsrate bis auf 100% (194-196). Beachtung muss bei der Beurteilung unserer Studienergebnisse die Tatsache finden, dass in thematisch entsprechenden Studien die Auswirkungen der Fettsäuren in unterschiedlichem Verhältnis zueinander bzw. in verschiedensten Studienmodellen untersucht wurden. Ein Vergleich aller Studien untereinander ist somit nur eingeschränkt möglich und bietet einen Erklärungsansatz für die große Diskrepanz der Resultate. Der in unserer Studie festgestellte stimulierende Effekt bei Gabe von ω -3- und ω -6-Fettsäuren auf die

Metastasierung und das Wachstum des Pankreaskarzinoms konnte in anderen Studien durch ähnliche Ergebnisse bestätigt werden. Hierbei konnte sowohl im Hamstermodell als auch im Rattenmodell des Pankreaskarzinoms dem erhöhten Verhältnis von Fischöl, ebenfalls eine ω -3-Fettsäure, die wachstumsfördernde Komponente zugeschrieben werden (8,10). Weiterhin konnte Griffin et al unter einer ω -3-Hochfettdiät eine gesteigerte Lebermetastasierung beim Kolonkarzinom zeigen (58). Dieser Effekt ist möglicherweise auf den gesteigerten Linolensäureanteil zurück zu führen. Linolensäure scheint u.a. zu Veränderungen der Zellmembranstruktur von Hepatozyten mit Verlust von Interzellularkontakten zu führen, welche ausschlaggebend für die Invasion der Tumorzellen zu sein scheinen (62). Ferner konnte in einer in vitro Studie an humanen Kolonkarzinomzellen sowohl eine ω -3 als auch verstärkt ω -6 bedingte Inhibition der Kupfferschen Sternzellen und somit der hepatischen Phagozytose gezeigt werden. Ursächlich scheint hier die Änderung der Zusammensetzung der membranösen Fettsäuren zu sein, die das metastatische Potential durch Verminderung der Bindung und somit des zytotoxischen Effekts durch die Kupfferschen Sternzellen erhöhen (123). Dennoch kann nicht von einer Allgemeingültigkeit ausgegangen werden. ω -3-Fettsäuren zeigen zwar einen proliferationsfördernden Effekt auf die Progression metastatischer Foci bzw. das Tumorstadium, jedoch wirken sie in anderen Studien supprimierend auf den Primärtumor und die Metastasierung (8,10,123,152,158,162). Rose et al vermuten die inhibierende Wirkung von ω -3-Fettsäuren auf das Mammakarzinom und die Metastasierung liege in der supprimierenden Wirkung von Fischöl auf die Eikosanoidsynthese der Tumorzellen (156). Sakaguchi et al konnten einen wachstumshemmenden Effekt in Kolonkarzinomzellen bei gleichzeitig erhöhter Aufnahme von ω -3-Fettsäuren in Tumorzellen nachweisen (162). Für die Omega-6-Fettsäure Linolsäure wurde in zahlreichen Studien eine signifikante Steigerung der Inzidenz, Anzahl und Grösse der Pankreaskarzinome im Hamstermodell beobachtet. Desweiteren zeigt Linolsäure auch in anderen in vivo und in vitro Modellen eine proliferationsstimulierende Wirkung auf Tumorzellen (9,20,51,75,86,154,200). Beeharry et al konnten jedoch auch einen protektiven Effekt der Linolsäure in einer in vitro Untersuchung an humanen Fibroblasten aufzeigen. Bei ungeklärtem Mechanismus wirkte Linolsäure hierbei präventiv auf eine Palmitinsäure induzierte oxidative DNA-Schädigung (17).

Auch der Einfluss von Linolsäure auf die Metastasierung diverser Tumorarten wurde in zahlreichen Studien untersucht. Rose et al konnte am Tiermodell der Maus unter einer Hochfettdiät mit einem Gehalt von bis zu 12% Linolsäure konzentrationsabhängig einen Anstieg der Lungenmetastasierung beim Mammakarzinom verzeichnen (157,159). Erläuternde Ursachen für die Wirkungsweise von Linolsäure auf die Metastasierung stehen auch hier noch aus, jedoch scheint eine Einflussnahme u.a. auf die Angiogenese ausschlaggebend zu sein. Erklärungsansätze in Zelllinienversuchen gehen von einer verbesserten Tumorzelladhäsion an der extrazellulären Matrix durch Stimulation des Lipoxygenasestoffwechsels aus (91). In vitro konnte für Linolsäure eine Stimulation der Tumorzellinvasion durch gesteigerte Produktion von Typ-IV-Kollagenase nachgewiesen werden, die zu einer Proteolyse der Basalmembran führen kann (86). In vivo scheint es zusätzlich zu einer weiteren Verstoffwechslung zu Eikosanoiden zu kommen, der die Verstoffwechslung von Lipiden zugrunde liegt. Durch enzymatische und nicht-enzymatische Reaktionen mit zellulären Membranen kommt es im Rahmen der Lipidperoxidation zur Bildung freier Radikale mit potentieller DNA-Schädigung (109,110,129). D.h. durch die Substratbereitstellung in Form von Linolsäure zur Bildung von Arachidonsäuren kommt es im Rahmen der Oxidierung dieser durch Lipoxygenasen zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (95,110). Im Primärtumor wird daher von einer peroxidationsbedingten DNA- und Proteinschädigung ausgegangen (15,17,25,86,110,117). Im Vergleich mit nicht befallenem Gewebe scheinen Tumorzellen über eine geringere Aktivität antioxidativer Mechanismen wie Kupfer, Superoxiddismutasen, Glutathionperoxidasen und Katalasen zu verfügen. Gleichzeitig konnte für Tumorzellen ein erhöhter Gehalt an freien Radikalen nachgewiesen werden (129). In Zusammenhang mit der beschränkten Kapazität des antioxidativen Schutzsystems entstehen bei vermehrtem oxidativen Stress Endothelschäden, die zur Freisetzung von Proteasen führen und somit zur Degradation der Basalmembran und Invasion der Tumorzellen beitragen (5,117,129). Untersuchungen von Malins et al deuten ebenso auf einen Zusammenhang zwischen Radikalenstoffwechsel und Metastasierung von Mamma-Tumorzellen hin. Förderlich für die Metastasierung seien ferner die durch Radikale bedingten Veränderungen zellulärer Proteine und die daraus ebenfalls resultierenden Störungen im Bereich der Zelladhäsion (117). In den verschiedenen Stadien der Tumormetastasierung wirken freie Radikale

aktivierend auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen, Endothelial-Growth-Faktor bzw. Vascular-Endothelial-Growth-Faktor und Adhäsionsmolekülen (129). In unserer Untersuchung muss davon ausgegangen werden, dass sich der unter Standardernährung beobachtete BOP-induzierte oxidative Stress bei gleichzeitiger Hochfetterernährung nochmals steigert. Die Lipidperoxidation führt hierbei zu einer Abnahme der Membranfluidität und Schädigung von Membranproteinen mit gleichzeitigem Anstieg der Membranpermeabilität (129). Ergebnisse unserer Studie, in der durch Hochfetterernährung mit Linol- und Linolensäure ein signifikanter Anstieg der Lebermetastasierung mit einem signifikanten Anstieg der Lipidperoxidation in der Leber verbunden ist, bestätigen diese Annahme. Die höchste TBARS-Konzentration in metastasenfremen Leberanteilen bei gleichzeitig erniedrigter SOD-Aktivität und erniedrigter GSHPX-Aktivität wurde von allen Versuchsgruppen in der mit Hochfett diät ernährten und BOP behandelten Gruppe, festgestellt. Der Anstieg der TBARS-Konzentration scheint gleichzeitig für ein offensichtliches Aufbrauchen der antioxidativen Schutzmechanismen bzw. einen ausgeprägten Verlauf der Lipidperoxidation zu sprechen. Vergleichend konnte unter Hochfett diät in den Lebermetastasen eine Erniedrigung der antioxidativen Schutzenzyme GSHPX und SOD gemessen werden. Die Konzentrationen von TBARS in metastatisch befallenen und freien Anteilen differierten dabei signifikant. Die unter Hochfetterernährung vermindert gemessenen Lipidperoxidationsprodukte in den Lebermetastasen im Vergleich zu metastasenfremen Leberanteilen, könnten ursächlich in der fehlenden Bereitstellung von Desaturasen und Elongasen in Tumorzellen begründet sein (86). Bevorzugtes Substrat für die Lipidperoxidation stellen vor allem Fettsäuren mit höherer Kettenlänge bzw. mit mehr als drei Doppelbindungen dar. Linolsäure, eine zweifach ungesättigte Fettsäure und Linolensäure, eine dreifach ungesättigte Fettsäure sind primär nicht bevorzugtes Substrat für die Lipidperoxidation. Körperzellen, wie z.B. Hepatozyten, verfügen jedoch über die Möglichkeit der Kettenverlängerung bzw. der weiteren Entsättigung der angebotenen Fettsäuren mit nachfolgendem Einbau in ihre Membranen (200). Dabei konkurrieren im Rahmen der Konversion ω -3- und ω -6-Fettsäuren um die in dieser Kaskade involvierten Desaturasen und Elongasen (86,200). In unserer Studie scheint daher ein relevanter Einfluss durch das erhöhte Verhältnis von ω -6- zu ω -3-Fettsäuren in Relation zum absoluten Fettgehalt möglich zu sein. Folglich ist bei einer Zugabe von 11% Linolsäure und

2% Linolensäure, mit einer vermehrten Anhäufung der bevorzugten Substrate der Lipidperoxidation in den Zellmembranen von Hepatozyten im Vergleich zu Tumorzellen zu erklären. Daher erscheinen die Hepatozyten weit anfälliger für den BOP-induzierten oxidativen Stress zu sein, als Tumorzellen, denen die Fähigkeit zur Kettenverlängerung bzw. Entsättigung nicht möglich zu sein scheint (86). Dieses entspricht der Beobachtung von Funktionsstörungen von Hepatozyten bzw. intrahepatischen Makrophagen in Zusammenhang mit Membranschäden bei hoher Lipidperoxidation (123). Weiterhin wird in der Literatur eine geringere Empfindlichkeit diverser Tumorarten gegenüber der Lipidperoxidation beschrieben, so dass die Annahme besteht, Lebermetastasen könnten eine geringere Schädigung durch oxidativen Stress in der Leber erleiden (25,86).

Den in der Literatur kontrovers diskutierten Auswirkungen von Fettsäuren wird die folgende Beobachtung gerecht. Die zusammenfassende Betrachtung zur Beurteilung sollte grundsätzlich die Art der Fettsäure, den Sättigungsgrad der Fettsäure, das Verhältnis der einzelnen Fettsäuren zueinander und den zu untersuchenden Tumorzelltyp beinhalten. Relevant scheint in diesem Zusammenhang auch die Auswahl des Studienmodells in Bezug auf eine naturgegebene Komplexität und Beeinflussbarkeit eines in vivo Modells im Vergleich zu einer in vitro Untersuchung zu sein. Die in unserer Studie festgestellte Steigerung der Lebermetastasierungsrate unter Hochfettdiät im Vergleich zur Standardernährung ebenso wie die Zunahme der Anzahl und Größe der Lebermetastasen könnte mittels o.g. Hypothesen erklärt werden. Desweiteren bieten sie einen Ansatz zur Klärung der festgestellten signifikanten Steigerung der Lipidperoxidation in metastasenfremen Leberanteilen im Vergleich zu dem geringen Ausmaß in den Leberfiliae. Trotz aller in der Literatur beschriebenen Veränderungen konnte aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge bisher noch kein Beweis der Funktionsstörungen an Membranen bzw. immunmodulatorischen Erklärungsansätzen erlangt werden. Durch die Teilnahme unzähliger Gene an einer direkten und indirekten Beeinflussung einer großen Anzahl biologischer Prozesse durch ω -3- und ω -6-Fettsäuren bleibt die Entschlüsselung exakter molekularer Mechanismen bisher ungeklärt. Aktuell lässt sich daher kein generell gültiger biochemischer Mechanismus für alle modulatorischen Effekte von Fetten bzw. des Radikalenstoffwechsels auf die Karzinogenese bzw. Metastasierung etablieren. Dieses

zeigt sich u.a. in den diskrepananten Angaben diverser Studien zum Einfluss von Fettsäuren auf die Karzinogenese und Metastasierung.

4.2. Auswirkungen einer Therapie mit Celebrex und Zylflo auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Die bereits Jahre zuvor nach Behandlung mit 5-LOX-Inhibitoren nachgewiesene Induktion der Apoptose bei Pankreaskarzinomzellen bzw. Reduktion von PANC-1-Karzinomzellen beobachtete unsere Arbeitsgruppe am stärksten ebenfalls unter Monotherapie mit Zylflo in Form einer Abnahme der Inzidenz und Größe von Pankreaskarzinomzellen (6,38,197). Die Therapie durch alleinigen Einsatz des 5-Lox-Hemmers Zylflo bzw. auch die kombinierte Therapie mit Zylflo und dem Cox-2-Hemmer Celebrex führte in unserer Studie zu einer signifikanten Abnahme der Inzidenz pankreatischer Raumforderungen (194,197). Chen et al konnte am Rattenmodell des Ösophaguskarzinoms unter alleiniger Therapie mit Celebrex oder Zylflo allerdings nur eine geringere Reduktion der Tumorinzidenz als durch Kombinationstherapie beider Medikamente erreichen (29). Dabei war die Reduktion der Tumorinzidenz unter Einzeltherapie dosisabhängig bzw. zeigten sich additive Effekte unter Kombinationstherapie. Unter dem Aspekt des Nachweises einer gesteigerten Synthese von Eikosanoiden bei verschiedenen Tumoren, gelang es Takahashi et al. durch isolierte Gabe diverser Cox-Inhibitoren das Wachstum BOP-induzierter Pankreaskarzinome des Syrischen Goldhamsters zu inhibieren und unterscheidet sich somit von unseren Ergebnissen (175). Diese Abweichungen lassen sich womöglich durch das unterschiedliche Studiendesign erklären. Sowohl die Dauer der BOP-Induktion, der zeitliche Therapiebeginn mit Cox-Inhibitoren als auch die begleitende Ernährung der Versuchstiere unterscheiden sich auffällig von unserem Studienmodell und lassen einen Vergleich nur bedingt zu. Auch Forschungen zur Metastasierung weichen von unseren Ergebnissen ab. Während Yao et al. bei Untersuchungen implantierter Kolonkarzinomzellen in BALB/c Mäusen eine Verminderung des Tumorwachstums und der hepatischen Metastasierung unter Rofecoxib feststellte, konnten wir nur unter

Kombinationstherapie mit Celebrex und Zyflo eine signifikante Reduktion der Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen feststellen (202). Möglicherweise war neben den anderen Unterschieden im Studienmodell die höhere Dosierung von 20mg/kg/d Rofecoxib im Vergleich zu unserer Gabe von 7mg/kg/d Celecoxib ausschlaggebend für die Diskrepanz der Ergebnisse. In einer Untersuchung mit 23.283 Teilnehmern zeigte sich unter Einnahme nichtsteroidaler Antiphlogistika, u.a. Aspirin eine ebenfalls dosisabhängige Reduktion des Risikos von 60% bis 43% um an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (41). Epidemiologische Studien zum Einfluss von Lipoxygenaseinhibitoren stehen aufgrund der geringeren Verbreitung bei Verschreibungspflichtigkeit der Substanzen aus. Zahlreiche Studien sprechen den Veränderungen im Stoffwechsel der Eikosanoide wichtige Funktionen in der Karzinogenese und Metastasierung zu (6,11,13,28,29,34,57,73,78,111, 118,127,135,145,146,148,160,173,177,182,202). Erhöhte Cox-2 Konzentrationen in Tumorgewebe humaner Kolon-, Mamma-, Bronchial-, Magen-, Ösophagus- und Pankreastumore konnten ebenso nachgewiesen werden wie die vermehrte Expression von 5-Lox in Karzinomen von Pankreas, Prostata, Kolon, Ösophagus, Blase und Hoden (27,29,77,138,185,186). Daneben zeigte sich in der Literatur die alleinige Therapie mit Lipoxygenaseinhibitoren als ebenfalls erfolversprechend. 2002 konnte erstmalig an humanen duktalem Pankreaskarzinomzellen bzw. verschieden differenzierten Zelllinien (Pank1, MiaPaCa-2, AsPC-1, Capan-2) eine verstärkte Expression von 5-Lipoxygenase- und Leukotrien-B₄-Rezeptoren nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Untersuchung nicht befallener duktalem Pankreaszellen konnte keinen Rezeptornachweis erbringen (67). Zusätzlich konnte eine verstärkte Expression von LTB₄ in Pankreaskarzinomzellen präsentiert werden (41). Nachweislich zeigten sich rezeptor- bzw. mitochondrial-vermittelte Stoffwechselwege, die für die Apoptose ursächlich zu sein scheinen (41,127). Die Inhibierung der 5-Lipoxygenase führte auch zur Apoptose anderer Tumore wie Mamma-, Kolon-, Magen-, Prostata- und Lungenkarzinom (138). Auch die metabolische Vorstufe 5-HETE beeinflusste durch Aktivierung verschiedenster Signalwege eine Förderung der DNA-Synthese im Pankreaskarzinom mit dem Ergebnis einer Tumorprogression (41). Die Tumormetastasierung ist ein komplexer, multifaktorieller und mehrphasiger Prozess. Diverse Faktoren, wie z.B. das invasive Potential der Tumorzellen, die Immunitätslage des Organismus oder die Fähigkeit zur Angiogenese am Ort der Metastasierung, entscheiden

über die Entwicklung der metastatischen Läsionen. Die Basalmembran mit ihrem Aufbau aus u.a. Kollagen IV, Laminin und Proteoglykanen repräsentiert hierbei eine entscheidende Barriere für metastatische Tumorzellen (71,83,86,117,123,145,146). Konzentrationssteigerungen von Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Stoffwechselprodukten in Mammakarzinom-Zelllinien nach Gabe von Linolsäure offenbaren hierbei die enge Interaktion zwischen PUFA und Eikosanoidstoffwechsel (111). Das Wachstum von Kolonkarzinom-Zelllinien nach Gabe von Linolsäure und Arachidonsäure konnte nach Therapie mit Cox- und Lox-Inhibitoren gestoppt werden (75). Bereits seit 1989 wird eine einflussnehmende Wirkung von Stoffwechselprodukten der Cyclooxygenase und Lipoxygenase auf die Metastasierung von Tumorzellen postuliert (11,34,73,78,145,146,160,194,197). Eine retrospektive kanadische Untersuchung weist laut Autoren auf einen Zusammenhang zwischen der Einnahme nichtsteroidaler Antiphlogistika und reduzierter Metastasierung beim Mammakarzinom hin (166). Der Einfluss der Lipoxygenasen auf die Metastasierung spiegelt sich im Nachweis eines höheren Gehaltes an 5-Lox in hepatischen Metastasen eines Pankreaskarzinoms im Vergleich zum Primärtumor wieder (67). Die in unserer Studie durchgeführte Hochfetterernährung mit Zugabe von Linolsäure und Linolensäure beim duktalem Pankreaskarzinom im Hamstermodell führte zu einer gesteigerten Lebermetastasierung, deren Ursache unter anderem in einer Veränderung des Lipidperoxidationsstoffwechsels zu vermuten ist (194,195). Im Rahmen der Metabolisierung der Linolsäure durch diverse Desaturasen und Elongasen kommt es zur Bildung höher ungesättigter Fettsäuren wie Gammalinolensäure und Arachidonsäure, die nicht nur die Ausgangssubstanzen der Eikosanoidsynthese, sondern auch bevorzugtes Substrat der Lipidperoxidation darstellen (23,25). Dabei sind ω -3-Fettsäuren in der Lage Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Zellmembranen zu verdrängen und so durch eine reduzierte Verfügbarkeit der Ausgangssubstanz für die Eikosanoidsynthese auch zu einer Abnahme des oxidativen Stresses zu führen (148,200). Wahrscheinlich war die im Verhältnis zu ω -6-Fettsäuren geringere Konzentration von ω -3-Fettsäuren in unserer Studie ursächlich für eine vermehrte Bildung proinflammatorischer Substanzen der Eikosanoidsynthese wie z.B. Prostaglandine der 2-Serie (51,155,200). In der Literatur finden sich sowohl in-vivo als auch in-vitro Studien, die Zusammenhänge zwischen dem Radikalenstoffwechsel und der Eikosanoidsynthese aufweisen, wobei zu berücksichtigen

ist, dass der Erzeugung von Eikosanoiden eine physiologische Lipidperoxidationsreaktion zugrunde liegt. Im Gegenzug scheint aber auch eine vermehrte Lipidperoxidation die Eikosanoidsynthese zu stimulieren. (18,28,78,110,135). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass während des Arachidonsäuremetabolismus Mutagene generiert werden, die zu einer DNA Schädigung führen können (110). Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Stoffwechselprodukte scheinen hierbei eine Quelle potentiell genotoxischer Zwischenprodukte, wie freie Radikale und Peroxide darzustellen (28,78,102,109,110,118, 135). Durch die Peroxidase-Aktivität der Cox und Lox im Pankreasgewebe können Mutagene generiert werden (102). Auch in unserer Untersuchung vermochten wir erhöhten oxidativen Stress nachzuweisen. Unter der Einzelbehandlung mit Celebrex oder Zylflo konnte in metastasenfremen Leberanteilen keine Beeinflussung der GSHPX- bzw. SOD-Aktivität im wechselseitigen Vergleich der nicht BOP-induzierten, therapierten Gruppen beobachtet werden. Allerdings zeigte sich eine signifikante Erhöhung der SOD-Aktivität unter simultaner Gabe von Celebrex und Zylflo ohne jedoch Einfluss auf die TBARS-Konzentration in allen nicht induzierten Gruppen bzw. in der BOP induzierten Gruppe mit Kombinationstherapie zu haben. Auch die GSHPX Aktivität dieser Gruppen unterschied sich nicht. Eine Erklärung für dieses Ergebnis liegt nicht vor. Zugleich fand sich eine signifikante Erniedrigung der oxidativen Schutzenzyme in metastasenfremen Leberanteilen bei der BOP-induzierten, nicht therapierten Gruppe bei gleichzeitig signifikant höchsten TBARS-Konzentrationen. Thiobarbitursäurereaktive Substanzen sind stark zytotoxisch und können die strukturelle Organisation und Funktion der Zelle durch Abnahme der Membranfluidität und einen Anstieg der Membranpermeabilität und zusätzlich durch Inaktivierung membrangebundener Enzyme und Verlust von essentiellen Fettsäuren stören (26). In den metastasenfremen Leberanteilen schien es unter Hochfetterernährung und BOP-induziertem Stress zu vermehrter Lipidperoxidation gekommen zu sein bei (noch) ausreichender bzw. stark abnehmender Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme. Vermutlich wäre in dieser nicht therapierten Gruppe, mit einer baldigen Membran- und Proteinschädigung durch freie Radikale zu rechnen. Celebrex und Zylflo scheinen hier entscheidend in den Stoffwechselprozess einzugreifen und zu einer verbesserten Aktivität der Schutzenzyme bzw. zu einer reduzierten Erzeugung von Radikalen und Eikosanoiden zu führen. Sulindac, ein Cox-1- und Cox-2-Inhibitor, konnte hierbei der antioxidative Effekt

bzw. die Inhibierung der Radikalenbildung im Gehirn von Ratten nachgewiesen werden (33). Die höchste Aktivität beider Schutzenzyme ließ sich daher unter Kombinationstherapie mit Celebrex und Zylflo nachweisen, so dass die Inzidenz, Anzahl und Größe metastasenverdächtiger Herde in der BOP-induzierten Gruppe signifikant am geringsten war. In einer Studie an Melanomzellen im Mäusemodell konnte die einmalige i.v. Gabe von SOD ebenfalls signifikant die Peroxidation bzw. das metastatische Tumorzellwachstum inhibieren (79). Relevant erscheint hierbei die enge Interaktion bzw. Beeinflussbarkeit der Eikosanoidstoffwechselwege durch Hemmung einzelner Stoffwechsellzyme zu sein. Die Unterdrückung eines Stoffwechselweges, scheint zu einer Aktivierung eines alternativen Arachidonsäuremetabolisierungsweges führen zu können (29,48,56,78,138). Die im Rahmen der Lipidperoxidation vermehrt anfallenden Stoffwechselprodukte der Eikosanoidsynthese zeigten in diversen Studien einen proliferationsfördernden Effekt auf die Tumorzellen (9,173,194,197). Die Konzentration von TBARS in Gewebeproben eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms korrelierte positiv mit der Konzentration von Thromboxan B₂, einem Metaboliten von Thromboxan A₂. Hierbei zeigten sich in den am weitesten fortgeschrittenen Tumorstadien auch die höchsten Konzentrationen an Thromboxan B₂ (26). Auch für andere Metabolite des Eikosanoidstoffwechsels konnte ein Einfluss auf die Karzinogenese und Metastasierung aufgezeigt werden. Bei Karzinomzellen mit hohem metastatischem Potential konnten erhöhte PGF_{2α}- und PGE-Konzentrationen gemessen werden (9,51,86,167,183,202). PGE₂ konnte der inhibitorische Effekt auf das Immunsystem durch Supprimierung der T-Helferzell-, zytotoxischen T-Zell-, natürlichen Killerzellen und Makrophagen-Aktivität in Tumorzellen nachgewiesen werden. Es scheint, dass dieses bioaktive Lipid eine vorherrschende Rolle in der Progression von Tumoren durch Bindung an Rezeptoren und somit Aktivierung von Zellproliferation, Invasion, Angiogenese und Immunsuppression einnimmt (34,104,192). In nachfolgenden Studien unserer Arbeitsgruppe gelang es durch kombinierte Gabe von Celebrex und Zylflo einen reduzierten intra- und extrametastatischen Gehalt von PGE₂ nachzuweisen bei gleichzeitig verminderter Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen (57). Andere Untersuchungen zeigten im Gegensatz zu unserer Studie erfolgreiche Ergebnisse unter Monotherapie. Masferrer et al demonstrierten im Bronchial- und Kolonkarzinom der Nacktmaus unter alleiniger Behandlung mit Celecoxib

eine dosisabhängige Reduktion der Tumorgröße bzw. der metastatischen Läsionen in der Lunge. Bei Nachweis von PGE₂ in peritumoralen Gefäßen scheint die antimetastatische Wirkung von Celebrex durch eine Reduktion der Angiogenese zu bestehen (119). Chen et al. gelang der Nachweis erhöhter Cox-2-Exprimierung und PGE₂ Konzentrationen in Lebermetastasen im Vergleich zur Konzentration in den primären Tumorzellen von Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom. Die Arbeitsgruppe postulierte eine stärkere Invasivität bzw. gesteigertes metastatisches Potential von Kolonkarzinomzellen mit erhöhtem Nachweis von Cox-katalysierten Syntheseprodukten wie PGE₂. Die therapeutische Behandlung mit Etodolac, einem Cox-2-Inhibitor, führte nicht nur zu einer Abnahme der Cox-2-Konzentration in den Kolonkarzinomzellen, sondern darüber auch zu einer Inhibierung basalmembrandegradierender Matrixmetalloproteinasen (27). Diese zink-abhängigen Endopeptidasen scheinen so entscheidend in Bezug auf Tumorinvasion, Metastasierung, Zellwanderung und Angiogenese zu sein, dass sie als prognostischer Faktor für das Überleben von Patienten mit Pankreaskarzinom gewertet werden können (125). Die Bedeutung einer erhöhten Cox-2 Expression in Zelllinien stellte ebenfalls Li et al. in dem gesteigerten Potential von Tumorzellen zur Metastasierung und Angiogenese dar. Hierbei führte eine Überexprimierung von Cox-2 zu einer Aktivierung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und Matrixmetalloproteinasen. Die Invasivität bzw. angiogenetische Fähigkeit war nach Gabe von selektivem Cox-2 bzw. dualem Cox-Inhibitor reversibel (108,138,182,201). Bei Cox-2 Überexprimierung erfolgte wahrscheinlich durch die vermehrte Stimulation von PGE₂-Rezeptoren mit nachfolgender intrazellulärer cAMP Erhöhung die Aktivierung von VEGF und daraus folglich das Tumorwachstum und die Angiogenese (41). Kakiuchi et al konnte an verschiedenen Cox-2 überexprimierenden Kolonkarzinomzelllinien im Tiermodell der Maus eine Lebermetastasierung in der Zelllinie mit der stärksten Cox-2-Exprimierung nachweisen. Gleichzeitig zeigte diese Arbeitsgruppe an derselben Zelllinie in vitro, dass die Exprimierung von Cox-2 mit einer erhöhten Adhäsionsbereitschaft von Tumorzellen an Endothelzellen und damit gesteigertem Metastasierungspotential einhergeht (93). Die vermehrte Mobilisierungsbereitschaft bzw. Invasivität scheint auf eine Prostaglandinüberproduktion zurückführbar zu sein (51,92,93). Weiterhin besteht eine positive Korrelation zwischen dem Einfluss von NF-κB (Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells), einem spezifischen

Transkriptionsfaktor, als regulierendem Faktor für die COX-2 Expression und dem Tumorwachstum (41,78). An dieser Stelle sei erwähnt, dass ω -6-PUFA an einer Aktivierung zellulärer Signalmediatoren wie Protein-Kinase-C, RAS (Rat sarcoma, Protoonkogen) als auch NF- κ B beteiligt zu sein scheinen (19). Auch in anderen Organsystemen wie z.B. Kolon, Magen oder Brust, konnte unter Einnahme von Cox-Hemmern nicht nur eine Inhibition des Tumorwachstums sondern auch der Metastasierung, verbunden mit einer verminderten Expression von VEGF, MMP-2, MMP-9 u.a., beobachtet werden (202).

Prostaglandine fördern eine Leukotrien-vermittelte Inflammation während LTB₄ das vornehmliche Arachidonsäure-Derivat nach Cox-2-Inhibierung ist (138). LTB₄ konnte ein stimulierender Effekt auf diverse Tumorzellen, eine Verstärkung des oxidativen Stresses und Begünstigung der Tumorzellausbreitung nachgewiesen werden (28). Insgesamt scheinen die Angaben in der aktuellen Literatur zur Auswirkung der 5-Lipoxygenase auf die Tumorentwicklung und v.a. Metastasierung im Vergleich zur Cyclooxygenase noch limitiert zu sein, jedoch zunehmend diskutiert zu werden (13,78,138). Während die Hemmung von 5-Lox erwiesenermaßen zur Wachstumsreduzierung von Tumorzellen führt, ist der Einfluss auf die Metastasierung bisher nur in Zelllinienversuchen beschrieben worden (11,34,146). Diese unterstützen bei Hemmung des Lipoxygenaseweges der Arachidonsäure unser Ergebnis einer verminderten Tumorinvasivität bzw. Metastasierung. Im Gegensatz zu unserer Untersuchung konnte die Wirksamkeit jedoch für die Einzelgabe von 5-Lox-Hemmern gezeigt werden. Dabei scheint der Einfluss dieses Stoffwechsellzyms des Arachidonsäuremetabolismus u.a. ebenfalls auf basalmembran-degradierende Matrixmetalloproteinasen zu bestehen (138,146). Eine weitere Möglichkeit in den mehrphasigen Prozess der Tumormetastasierung einzugreifen ergab die Untersuchung an metastatischen Mammakarzinom-Zelllinien. Diese zeigten nach Setzen eines inflammatorischen Stimulus eine erhöhte Adhäsion an Endothelzellen, die nach Gabe eines Lipoxygenasehemmstoffs partiell inhibiert wurde. Gleichzeitig konnte initial eine erhöhte Konzentration an Lipoxygenasestoffwechselprodukten (LTB₄, 5-HETE) gemessen werden (34).

In der Literatur finden sich also ähnliche Ergebnissen zum Einfluss bzw. zur Auswirkung von Cox-2 und 5-Lox auf den Primärtumor und die Metastasierung. Bei hypothetischer

Überlegung einer kombinierten Hemmung mit additiver Wirkung, scheint daher zunehmend die zeitgleiche Hemmung von Cox-2 und 5-Lox in den Mittelpunkt des Interesses zu rücken. Das Bestehen einer relevanten Interaktion beider Stoffwechselwege zeigt sich in einer 5-Lox-Inhibitor-bedingte Abnahme intrametastatischer Prostaglandinkonzentrationen bei einem Pankreaskarzinom (57). In Untersuchungen am Adenokarzinom des Kolons fand sich bei 72% der Proben eine Koexpression von Cox-2 und 5-Lox (13). Rioux et al bestätigte in seiner Studie am Modell des Bronchialkarzinoms der Maus eine synergistische Wirkung von Cox- und Lox-Inhibitoren auf die Tumorzinzidenz (138,149,173). Ebenso konnte durch Kombination von Celebrex und Zylflo eine Reduktion der Inzidenz des ösophagealen Adenokarzinoms am Tiermodell der Ratte nachgewiesen werden. Hierbei schien eine Hemmung der Leukotrien- bzw. Prostaglandinsynthese bedeutend zu sein (29,138). Bisher sind allerdings keine Studien zum Einfluss der kombinierten Therapie auf die Metastasierung von Tumoren im Tiermodell veröffentlicht worden. Auch gibt es bisher keine Studien im Zusammenhang mit der Auswirkung auf die Lipidperoxidation.

Unter BOP-Induktion und Hochfettdiät kam es in unserer Studie im Vergleich zur alleinigen Beeinflussung durch die Hochfettdiät zu signifikant erhöhter Lipidperoxidation und signifikanter Abnahme der Aktivitäten von GSHPX und SOD. Unter Hochfettdiät und Gabe des Nitrosamins BOP verbesserte in tumorfreiem Gewebe die Therapie mit Zylflo die GSHPX-Aktivität, die Therapie mit Celebrex die SOD-Aktivität im Vergleich zu den nicht induzierten Gruppen. Die Kombinationstherapie beider Medikamente erhöhte nochmals signifikant ca. 2 bis 3,5-fach die Aktivitäten der GSHPX und SOD in tumorfreien Leberanteilen in der BOP-induzierten Gruppe im Vergleich zur gesunden Gruppe. Ebenfalls in den kombiniert behandelten Gruppen in extrametastatischem Lebergewebe wurde kein signifikanter Unterschied in der Konzentrationsmessung der TBARS beobachtet bei leicht erhöhten Werten in der BOP-induzierten Gruppe. Dagegen fanden sich signifikant erhöhte TBARS-Konzentrationen in der BOP-induzierten Gruppe ohne Therapie bzw. mit Celebrex-Monotherapie. Es ist denkbar, dass es unter einer Kombinationstherapie mit Celebrex und Zylflo zu einer Verbesserung der oxidativen Schutzmechanismen in tumorfreien Leberanteilen gekommen ist, welche vermehrtem Radikaleneinfluss infolge gesteigerter Lipidperoxidation unter Hochfettdiät und BOP-Induktion ausgesetzt waren. Wahrscheinlich führte die Inhibition der Eikosanoidsynthese in

tumorfreen Leberanteilen zu einer Verminderung des oxidativen Stresses und folglich zu einer Hemmung der Metastasierung bzw. des Tumorwachstums.

Weiterhin konnten wir unter einer Kombinationstherapie auch signifikante Veränderungen der Lipidperoxidation in den Lebermetastasen feststellen. Unter Hochfetterernährung und BOP-Induktion zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Lipidperoxidationsprodukte in metastasenfreen Leberanteilen im Vergleich zu Metastasengewebe. Das tumorfreen Gewebe schien dadurch vermehrten Protein- und Membranveränderungen ausgesetzt zu sein, so dass wir auch in dieser Gruppe die höchsten Inzidenzen pankreatischer und metastatischer Raumforderungen fanden. Diese Messungen entsprechen der These einer verminderten Empfindlichkeit des Tumorgewebes für oxidativen Stress. Entgegengesetzt dazu waren in den mit Celebrex, Zyllo oder Celebrex und Zyllo therapierten intrametastatisch gemessenen Proben die TBARS-Konzentrationen höher als in entsprechenden Proben der metastasenfreen Leberanteile. Dabei fand sich die signifikante und absolut höchste Konzentration in Lebermetastasen in der BOP-induzierten mit Celebrex und Zyllo therapierten Gruppe. Es konnte nach Kombinationstherapie intrametastatisch eine ebenfalls signifikante und absolut stärkste Abnahme oxidativer Schutzenzyme beobachtet werden, welches schlussfolgernd für erhöhte intrametastatische Lipidperoxidation spricht. Ein dadurch verursachter Tumorzelluntergang zeigt sich in unserer Untersuchung in signifikant niedrigster Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen. Vermutlich führte die gesteigerte Lipidperoxidation intrametastatisch zu oben postulierten Membranveränderungen, die letztendlich u.a. für den Zelltod der Metastasen verantwortlich sind. Das tumorfreen Lebergewebe scheint gleichzeitig durch erhöhte Konzentrationen der antioxidativen Schutzenzyme vor Bop-induzierter Lipidperoxidation geschützt zu sein. Daraus folgernd scheint eine Kombinationstherapie mit Celebrex und Zyllo in metastasenfreen Leberanteilen eine entgegengesetzte Wirkung im Vergleich zur Wirkung in den Lebermetastasen gehabt zu haben. Hierbei zeigte sich in unserer Studie ein additiver Effekt in der Wirkung beider Enzyminhibitoren auf die Lebermetastasierung. Für die Förderung der Metastasierung scheint ebenfalls sowohl eine verstärkte Leukotriensynthese als auch Prostaglandinsynthese verantwortlich zu sein (111). Dieses lässt sich aus verschiedenen Studien mit überwiegender Blockade von entweder Cox-2 oder 5-Lox schließen. Im Stoffwechsel der Cox-2 und 5-Lox scheinen

offensichtlich Parallelen in der Regulation der Zellproliferation, Apoptose und Neo-Angiogenese zu bestehen (56). Beide Enzyme wirken proangiogenetisch durch Expression von VEGF (138). Es ist bekannt, dass die Inhibition eines Stoffwechselweges der Eikosanoidsynthese zu verstärkter Metabolisierung alternativer Wege führt (29,48,138). D.h. in unserer Studie gelingt es durch Inhibierung sowohl der Prostaglandin- als auch der Leukotriensynthese des Eikosanoidstoffwechsels, eine effektive Hemmung der Lebermetastasierung zu erreichen. In-vitro Studien wiesen den additiven Effekt der kombinierten Hemmung beider Stoffwechselwege auf die Tumorproliferation bzw. Induktion der Apoptose nach (138). Kombinationstherapien mit Cox-2- und 5-Lox-Hemmern konnten in der Literatur bisher für die Auswirkung der Lipidperoxidation auf die Metastasierung beim Pankreaskarzinom bei keinem Tiermodell aufgezeigt werden. Unter den in der Literatur und in unseren eigenen Studien gemachten Beobachtungen einer Einflussnahme auf das Tumorwachstum sowohl von Cox-2 als auch 5-Lox erschien uns die Kombinationstherapie von Celebrex und Zylflo zur Darstellung der inhibierten Lebermetastasierung sinnvoll. Die genaue Wirkungsweise der Downstream-Metaboliten des Eikosanoidmetabolismus auf die Lipidperoxidation und u.a. daraus folgende Membranschäden konnten bisher nicht geklärt werden. Eine Vergleichbarkeit der Stoffwechselkonstellation von in-vitro-Studienmodellen mit selektiver Inhibition eines Stoffwechselweges der Eikosanoidsynthese, ist bei prinzipiell zu erwartender alternativer Metabolisierung mit einem in-vivo- Modell eingeschränkt zu beurteilen. Die in unserer Studie gemachten Beobachtungen einer Abnahme der Inzidenz pankreatischer Raumforderungen bzw. einer geringeren Metastasierungsrate vermehrt unter einer Kombinationstherapie mit Celebrex und Zylflo kann deshalb aufgrund des Studienaufbaus nur zum Teil mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen werden (194,197). Weitere Untersuchungen sind zur Klärung dieses aussichtsreichen Ansatzes einer möglichen Therapie des metastasierten Pankreaskarzinoms mit Cox-2 und 5-Lox-Hemmern nötig.

4.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie gelang es uns, durch Modifizierung der Ernährung eine Steigerung der Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen im BOP-induzierten duktalem Adenokarzinom des Pankreas im Syrischen Goldhamster zu erreichen. Ursächlich für die gesteigerte Lebermetastasierung scheint neben der Erhöhung des Rohfettanteils, bei den zum Teil bekannten tumorwachstumsfördernden Effekten einiger Fettsäuren, auch die erhöhte Lipidperoxidation und weiterhin die Steigerung des oxidativen Stresses durch Nitrosamine wie BOP verantwortlich zu sein. Daher untersuchten wir neben dem Einfluss der Hochfettdiät und der medikamentösen Therapie mit Celebrex und Zylflo auf die Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen beim Pankreakarzinom auch die Auswirkungen dieser auf die Lipidperoxidation in metastatischem und metastasenfremem Lebergewebe.

Zur weiteren Klärung der klinischen Relevanz sollte daher in tierexperimentellen Studien sowohl der Einfluss der einzelnen Fettsäuren der Reihe der ω -3 bzw. ω -6 PUFA als auch die Effekte der jeweiligen Mischungsverhältnisse zueinander untersucht werden. Die Auswirkungen des Verhältnisses von ω -3 zu ω -6 PUFA scheinen ausschlaggebender zu sein, als der absolute Gehalt der einzelnen Fettsäuren. Aktuell ist ein Vergleich der diversen Studien infolge eines unterschiedlichen Studiendesigns nur begrenzt möglich. Ebenso sollte die Beobachtung der Wirkungen der einzelnen ω -3 und ω -6 Fettsäuren auf die verschiedensten Tumoren ausgeweitet werden. Hierbei sind ebenfalls verschiedene individuelle genetische Faktoren wie Polymorphismen der Gene zukünftig zu berücksichtigen. Festzuhalten sind die unter diesen Bedingungen entstandenen Veränderungen im Lipidperoxidationsstoffwechsel mit Auswirkung auf das Wachstums- bzw. Metastasierungsverhalten der Tumorzellen.

Die in unserer Studie beobachtete Erniedrigung der Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen unter Kombinationstherapie mit Celebrex und Zylflo lässt weitere Studien mit veränderter Dosierung als sinnvoll erscheinen. Dieses erklärt womöglich die positiven Ergebnisse von Studien unter Einzeltherapie mit Cox-2 und 5-Lox-Hemmern während uns eine signifikante Einflussnahme nur durch die Kombinationstherapie gelang. Wir konnten unter dieser Kombinationstherapie im nicht befallenen Lebergewebe eine Erhöhung der

Lipidperoxidationsschutzenzyme GSHPX und SOD nachweisen, während die intrametastatischen Anteile erniedrigte Werte gegenüber den Kontrollgruppen aufzeigten. Die Einzeltherapie mit einem der beiden Medikamente zeigte dagegen keine signifikante Veränderung der Metastasierung.

Weiterhin sollte in tierexperimentellen Studien die Klärung der genauen Wirkmechanismen der Inhibition der Prostaglandin- und Leukotriensynthese erfolgen, da die kombinierte Hemmung dieser beiden Synthesewege mit einer Hemmung der Lebermetastasierung und des Tumorwachstums in Zusammenhang zu stehen scheint. Insbesondere sollte hierbei auf die Effekte der einzelnen Stoffwechselprodukte der Eikosanoidsynthese geachtet werden, da diese diverse Wirkungen zu haben scheinen. Die Mechanismen der Einflussnahme von Eikosanoiden auf die Karzinogenese und Metastasierung erscheinen vielfältig und bedürfen einer Klärung der diversen Ausgangspunkte im Detail. Eine dadurch mögliche Kombination von Medikamenten verschiedenster Ansätze mit einer effektiven Dosierung in niederen Konzentrationen könnte das Nebenwirkungspotential einzelner Therapeutika zugunsten der Patienten deutlich minimieren. Durch unsere Untersuchung der Auswirkungen sowohl der Nahrungszusammensetzung als auch der Therapie mit Eikosanoidstoffwechsellinhibitoren auf die Lipidperoxidation ergeben sich diverse hypothetische Ansätze, wie z.B. der Einfluss auf die Basalmembranen in Bezug auf die Metastasierung von Tumorzellen, die in weiteren Analysen näher zu klären sind. Ebenso scheint eine Auswirkung von Hemmern der Eikosanoidsynthese und z.B. Chemotherapeutika und Antioxidantien relevant zu sein und sollte evaluiert werden. In unserer Arbeitsgruppe wird daher in zukünftigen Studien u.a. die Wechselbeziehung zwischen den Konzentrationen der Stoffwechselprodukte der Eikosanoidsynthese und des Lipidperoxidationsstoffwechsels direkt untersuchen, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu erörtern, da offensichtlich ein Einfluss auf die Lebermetastasierung besteht.

5. Zusammenfassung

Einleitung:

Steigende Inzidenzen und fehlende Screeningverfahren bei häufig bereits fortgeschrittenen Tumorstadien zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, mit einer mittleren Überlebenszeit von 3 Monaten machen eine Entwicklung neuer Therapiekonzepte beim Pankreaskarzinom dringend erforderlich. Die äußerst schlechte Prognose wird unter anderem durch die hepatische Metastasierung oder die Infiltration in Nachbarorgane bestimmt, so dass nur palliative Therapieverfahren möglich sind. Adjuvante Chemotherapien zeigten in bisherigen Studien nur ein geringes Ansprechen bei gleichzeitig starken Nebenwirkungen.

Eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation, scheint hier der Stoffwechsel der Eikosanoide zu übernehmen. Nachweislich konnte hier die hemmende Wirkung von Cyclooxygenase- und Lipoxygenaseinhibitoren auf das Tumorwachstum des Pankreaskarzinoms und andere Tumorentitäten gezeigt werden. Untersuchungen zum Einfluss der Cox- und/oder Lox-Hemmer auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation beim Pankreaskarzinom bestanden bisher nicht. Ebenso fehlte bislang die Beobachtung der kombinierten Hemmung des Eikosanoidstoffwechsels durch Cox-2 und 5-Lox-Inhibitoren. Zur Evaluierung unserer Behandlungskonzepte bedurfte es eines standardisierten Tiermodells, welches neben der kurzen Dauer bis zur Inzidenz duktaler Adenokarzinome des Pankreas von fast 100% auch eine ausreichende Lebermetastasierungsrate aufzuweisen hat. Daher schien uns das Modell des N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP)-induzierten Pankreaskarzinoms des Syrischen Goldhamsters als geeignet. Die unter Standardernährung erzielte Lebermetastasierungsrate von ca. 35,7% konnten wir durch Anheben des Rohfettanteils von 3,5% auf 21,4% auf bis zu 100% steigern. Durch diese diätetische Modifikation war es uns möglich, ohne Erhöhung der Fallzahl fortgeschrittene Stadien der Tumorerkrankung zu untersuchen. In dieser Studie beschäftigten wir uns neben der Einflussnahme von Celebrex und Zylflo auf Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen zusätzlich mit der Wirkung dieser Medikamente unter Hochfetterernährung auf die Lipidperoxidation in den Lebermetastasen und metastasenfremen Leberanteilen. Zugrunde legten wir die in zahlreichen Studien gemachten Beobachtungen tumorwachstumsfördernder Effekte

bestimmter Fettsäuren, unter anderem Linol- und Linolensäure, ebenso wie die Steigerung des oxidativen Stresses durch Nitrosamine wie BOP bzw. die dadurch bedingte Förderung der Metastasierungsbereitschaft unter radikalen-induzierter, gesteigerter Lipidperoxidation.

Material und Methoden:

120 männliche, 8 Wochen alte Syrische Goldhamster wurden unter standardisierten Bedingungen in 8 Gruppen zu je 15 Hamstern wie folgt randomisiert: Gr.1: keine Therapie; Gr.2: Celebrex; Gr. 3: Zyflo; Gr. 4: Celebrex und Zyflo; Gr. 5: BOP und keine Therapie; Gr. 6: BOP und Celebrex; Gr. 7: BOP und Zyflo; Gr. 8: BOP, Celebrex und Zyflo. Über den gesamten Versuchszeitraum hinweg wurden die Tiere mit einer Hochfettdiät ernährt. Die Gruppen 5-8 erhielten eine wöchentliche subkutane Injektion von 10mg/kg/Körpergewicht BOP über 16 Wochen zur Tumorinduktion, während die Gruppen 1-4 0,9%ige NaCl-Lösung injiziert bekamen. Daraufhin erfolgte für alle Gruppen eine 16- wöchige Therapie mit 7mg Celebrex und/oder 28mg Zyflo. Zur histologischen und biochemischen Untersuchung erfolgte in der 33.Woche nach Versuchsbeginn die Tötung der Tiere.

Ergebnisse:

Während in den Kontrollgruppen 1-4 erwartungsgemäß keine Pankreaskarzinome vorlagen, betrug die Inzidenz dieser in den Gruppen 5-8 jeweils 100%. Die Lebermetastasierungsrate lag in Gruppe 5 ebenfalls bei 100%. Im Vergleich zu den Inzidenzen von Lebermetastasen in den Gruppen 6 (90,9%) und 7 (86,7%), war diese unter der Kombinationstherapie in Gruppe 8 signifikant erniedrigt (54,5%). Ebenso konnten wir eine Erniedrigung hinsichtlich der Anzahl und Größe von Lebermetastasen in Gruppe 8 beobachten, während in den Gruppen 5-7 keine Unterschiede festzustellen waren.

Die extrametastatische GSHPX-Aktivität differierte nicht zwischen den Gruppen 1-4, 6 und 7. Niedrigste Aktivitätswerte fanden sich in Gruppe 5, die höchste Aktivität konnte unter der Kombinationstherapie in Gruppe 8 gemessen werden. Niedrigste GSHPX-Aktivitäten intrametastatisch lagen in den Gruppen 6 und 8 vor, während sich die Aktivität der Gruppen 5 und 7 nicht unterschied. Im Vergleich zwischen extrametastatischem und intrametastatischem Lebergewebe zeigten sich intrametastatisch erniedrigte Werte in den Gruppen 6-8, während sich in Gruppe 5 kein Unterschied zeigte.

Im extrametastatischen Lebergewebe fanden sich hinsichtlich der SOD-Aktivität erhöhte Werte in der Gruppe 4, höchste Werte in der Gruppe 8. Kein Unterschied bestand

zwischen den Gruppen 1-3 und 5-7. Die SOD-Aktivität intrametastatisch zeigte höchste Werte in der Gruppe 6, während niedrigste Werte in Gruppe 8 gemessen werden konnten. Kein Unterschied konnte in den Gruppen 5 und 7 beobachtet werden. Im intra- und extrametastatischen Vergleich der hepatischen SOD-Aktivität bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen 5-7. In Gruppe 8 konnten intrametastatisch erniedrigte Werte gemessen werden.

Extrametastatisch fanden sich erhöhte Werte für die TBARS-Konzentration in Gruppe 6 bei höchsten Werten in Gruppe 5. Kein Unterschied konnte in den Gruppen 1-4, 7 und 8 festgestellt werden. Intrametastatisch zeigten sich höchste Werte in Gruppe 8 bei erhöhter Konzentration in den Gruppen 5 und 6. Niedrigste Messergebnisse konnten in Gruppe 7 beobachtet werden. Im Vergleich der intrametastatischen und extrametastatischen TBARS-Konzentration beobachteten wir erhöhte Werte intrametastatisch in Gruppe 8. Zwischen den Gruppen 6 und 7 bestand kein Unterschied, in Gruppe 5 war die Konzentration intrametastatisch erniedrigt.

Diskussion:

Zur Untersuchung der medikamentösen Auswirkung auf die Lebermetastasierung und Lipidperoxidation beim Pankreaskarzinom erschien uns unter Berücksichtigung verschiedenster Verknüpfungen der Eikosanoidstoffwechselwege das Modell des BOP-induzierten duktales Adenokarzinoms im Syrischen Goldhamster am geeignetsten.

Die in unserer Studie unter Hochfetterernährung festgestellte Steigerung der Lebermetastasierungsrate ebenso wie Anzahl und Größe der Lebermetastasen, scheint ihre Ursache in der gesteigerten Lipidperoxidation der Leber zu haben. Die erhöhte Bereitschaft zur Metastasenbildung könnte mit der Beobachtung oxidationsbedingter Zellschäden mit Membranschädigung und dadurch erleichterter Invasion von Tumorzellen in Zusammenhang stehen. Die in metastatisch befallenen Leberanteilen geringere Lipidperoxidation im Vergleich mit nicht befallenen Hepatozyten lässt sich möglicherweise auf das Fehlen von Desaturasen und Elongasen zurückführen. Diese, für die weitere Entsättigung und Verlängerung von Linol- bzw. Linolensäure benötigten Enzyme stellen letztendlich die bevorzugten Substrate für die Lipidperoxidation her. Durch diesen verminderten Einbau der Metabolite in die Phospholipide der Membranen scheint eine geringere Lipidperoxidation in den Metastasen im Vergleich zur gesunden Leberzelle

stattzufinden. Es kann daher von einer geringeren Empfindlichkeit der metastatischen Zellen gegenüber einer Lipidperoxidation ausgegangen werden.

Die Einzeltherapie mit Celebrex oder Zylflo zeigte in unserer Studie keinen signifikanten Einfluss auf Inzidenz, Anzahl oder Größe von Lebermetastasen. Jedoch konnte in der Kombinationstherapie die Erniedrigung dieser Parameter beobachtet werden. Möglicherweise konnte durch die Hemmung des Eikosanoidstoffwechsels das Tumorstadium bzw. die Metastasierung im nicht befallenen Lebergewebe durch die Verstärkung der antioxidativen Abwehr inhibiert werden. Offensichtlich scheint dieser Mechanismus zu einem Schutz des Lebergewebes vor Radikalen, hervorgerufen durch die Hochfetterernährung und BOP-Induktion, geführt zu haben. Gleichzeitig zeigten die von uns gemessenen Aktivitäten der Lipidperoxidationsschutzenzyme nach der Kombinationstherapie keine Aktivitätssteigerung in intrametastatischem Lebergewebe. Es ist anzunehmen, dass unter anderem die erhöhte intrametastatische Lipidperoxidation über eine Membranschädigung zum Zelltod führte. Die Untersuchung einer kombinierten Hemmung der Prostaglandin- und Leukotriensynthese zur Hemmung des Tumorstadiums und der Lebermetastasierung erschien uns unter dem Aspekt einer Steigerung alternativer Metabolisierungswege bei Inhibition eines Eikosanoidsyntheseweges von Bedeutung. Vermutlich scheint die selektive Hemmung der Prostaglandinsynthese zu einer vermehrten Bildung von Leukotrienen zu führen, die im Zusammenhang mit erhöhter Metastasierung und/oder Tumorentwicklung zu stehen scheint. Gleichzeitig führt eine selektive Leukotriensynthese-Inhibition zu verstärkter Bildung von Prostaglandinen, die ebenfalls eine Steigerung der Karzinogenese und Metastasierung bewirken soll.

Schlussfolgerung:

Für die kombinierte Therapie mit dem COX-2-Hemmer Celebrex und dem 5-LOX-Hemmer Zylflo konnte eine inhibierende Wirkung auf die Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen des BOP-induzierten duktales Adenokarzinoms des Pankreas im Syrischen Goldhamster beobachtet werden. Die unter einer Hochfetterernährung gesteigerte Lebermetastasierung war mit einer Steigerung der Lipidperoxidation in der Leber verbunden. Die Kombinationstherapie führte u.a. zu einer Erniedrigung der Lipidperoxidation in metastasenfremem Gewebe, während sie zu einem Anstieg der

Lipidperoxidation in den Lebermetastasen führte. Es erscheint somit notwendig, zur Evaluierung neuer Therapieansätze bei der Lebermetastasierung des Pankreaskarzinoms, die Zusammenhänge des veränderten Lipidperoxidationsstoffwechsels und des Eikosanoidstoffwechsels mit ihren Folgeprodukten in weiteren Studien zu untersuchen. Eine dadurch mögliche Kombination von Medikamenten verschiedenster Ansatzpunkte mit einer effektiven Dosierung in niederen Konzentrationen könnte das Nebenwirkungspotential einzelner Therapeutika zugunsten der Patienten deutlich minimieren. Unter Umständen stellt die kombinierte Therapie mit Cox-2- und 5-Lox-Hemmern eine neue Therapieoption bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom dar.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abbitt PL**: Ultrasonography. Update on liver technique. Radiol Clin North Am 1998 ; 36 : 299-307
2. **Adamek HE**, Weitz M, Breer H, et al.: Value of magnetic-resonance cholangio-Pancreatography (MRCP) after unsuccessful endoscopic-retrograde Cholangio-Pancreatography (ERCP). Endoscopy 1997; 29: 741-744
3. **Adler G**, Seufferlein T, Bischoff SC, et al.: S3-Guidelines „Exocrine pancreatic cancer“ 2007. Z Gastroenterol 2007; 45: 487-523
4. **Almoguera C**, Shibata D, Forrester K, et al.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-k-ras genes. Cell 1988; 53: 549-554
5. **Anderson KM**, Seed T, Ou D, et al.: Free Radicals and Reactive oxygen Species in Programmed cell death. Medical Hypotheses 1999; 52(5): 451-463
6. **Anderson KM**, Seed T, Meng J, et al.: Five-lipoxygenase inhibitors reduce PANC-1 survival : the mode of cell death and synergism of MK886 with gamma linolenic acid. Anticancer-Res 1998; 18(2A): 791-800
7. **Appel KE**, Gorsdorf S, Scheper T, et al.: Metabolic denitrosation of N-nitrosamines: mechanism and biological consequences. IARC-Sci-Publ 1991; 105: 351-357
8. **Appel MJ**, Woutersen RA: Dietary fish oil (MaxEPA) enhances pancreatic carcinogenesis in azaserine-treated rats. Br-J-Cancer 1996; 73: 36-43
9. **Appel MJ**, van Garderen-Hoetmer A, Woutersen RA: Effects of dietary linoleic acid on pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters. Cancer-Res 1994; 54: 2113-2120
10. **Appel MJ**, Woutersen RA: Effects of dietary fish oil (MaxEPA) on BOP-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters. Cancer-Lett 1995; 94: 179-189
11. **Ara G**, Teicher BA: Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors in cancer therapy. Prostaglandins-Leukotriens-Essent-Fatty-Acids 1996; 54: 3-16
12. **Atsushi K**, Hitoshi K, Takuji G, et al.: Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitor. Cancer 2001; 91(2): 333-338

13. **Baressi V**, Grosso M, Vitarelli E, et al: 5-Lipoxygenase is coexpressed with Cox-2 in sporadic colorectal cancer: A correlation with advanced stage. *Dis Colon rectum* 2007; 50: 1576-1584
14. **Bartsch H**, Nair J, Owen RW: Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999; 20(12): 2209-2218
15. **Bartsch H**, Hietanen E, Malaveille C: Carcinogenic nitrosamines: free radical aspects of their action. *Free-Radic-Biol-Med* 1989; 7: 637-644
16. **Beauchamp C**, Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *J-Anal-Biochem* 1971; 44: 276-287
17. **Beeharry N**, Lowe JE, Hernandez AR et al: Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutation Research* 2003; 530: 27-33
18. **Benzie IF**: Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr* 1996; 47: 233-261
19. **Berquin IM**, Edwards IJ, Chen YQ: Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters* 2008; 269: 363-377
20. **Birt DF**, Julius AD, White LT, et al.: Enhancement of pancreatic carcinogenesis in hamsters fed a high fat diet ad libitum and at a controlled calorie intake. *Cancer-Res* 1989 ; 49(21): 5848-5851
21. **Böhmg M**, Rosewicz S: Pankreaskarzinom. *Z Gastroenterol* 2004; 42: 261-268
22. **Campbell WB**, Halushka PV: Lipid-Derived Autocoids: Eicosanoids and Platelet-Activating Factor. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A, Hrsg. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York; McGraw-Hill, 1996; 601-616
23. **Cerutti PA**: Oxy-radicals and cancer. *The Lancet* 1994; 344: 862-863
24. **Chang AE**, Schneider PD, Sugarbaker PH et al: A prospective randomized trial of regional vs systemic continuous 5-FU chemotherapy in the treatment of colorectal metastases, *Ann Surg* 1987; 206: 685-693
25. **Cheeseman KH**: Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec-Aspects-Med* 1993; 14: 191-197

26. **Chen GG**, Lee TW, Yip JH, et al.: Increased thromboxane B2 levels are associated with lipid peroxidation and Bcl-2 expression in human lung carcinoma. *Cancer letters* 2006; 234: 193-198
27. **Chen WS**, Wei SJ, Ming Liu J, et al.: Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (cox-2) expression and inhibited by a cox-2 selective inhibitor, Etodolac. *Int J Cancer* 2001; 91: 894-899
28. **Chen X**, Wang S, Wu N, et al.: Leukotrien A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 267-283
29. **Chen X**, Wang S, Wu N, et al.: Overexpression of 5-Lipoxygenase in Rat and Human Esophageal Adenocarcinoma and Inhibitory Effects of Zileuton and Celecoxib on Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6703-6709
30. **Cleary SP**, Gryfe R, Guindi M, et al.: Prognostic factors in resected pancreatic adenocarcinoma: Analysis of actual 5-Year survivors. *J Am Coll Surg* 2004; 198(5):722-731
31. **Cockett Mi**, Murphy G, Birch ML, et al.: Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem Soc Symp* 1998; 63: 295-313
32. **Crofford LJ**, Wilder RL, Ristimaki AP, et al.: Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 expression in Rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 1994; 93: 1095-1101
33. **Dairam A**, Chetty P, Daya S, et al.: Non-steroidal anti-inflammatory agents, tolmetin and sulindac, attenuate oxidative stress in rat brain homogenate and reduce quinolinic acid-induced neurodegeneration in rat hippocampal neurons. *Metab Brain Dis* 2006; 21(2-3):211-223
34. **Damtew B**, Spagnuolo PJ : Tumor cell-endothelial cell interactions : evidence for roles for lipoxygenase products of arachidonic acid metastasis. *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1997; 56: 295-300
35. **De Caterina R**, Cybulsky MI, Clinton SK, et al.: The omega-3 fatty acid DHA reduces cytokine induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Atheroscler-Thromb* 1994; 14: 1829-1836

36. **De Caterina R**, Cybulsky MI, Clinton SK, et al.: Omega-3 fatty acids and endothelial leucocyte adhesion molecules. *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1995 ; 52: 191-195
37. **Ding XZ**, Tong WG, Adrian TE: Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2000; 20(4): 2625-2631
38. **Ding XZ**, Kuszyński Ca, El-Metwally TH, et al.: Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 266: 392-399
39. **Ding XZ**, Iversen P, Cluck MW, et al.: Lipoxygenase Inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 261: 218-223
40. **Ding XZ**, Tong WG, Adrian TE: Cyclooxygenases and Lipoxygenases as potential targets for treatment of pancreatic cancer. *Pancreatology* 2001; 1: 291-299
41. **Ding XZ**, Henning R, Adrian TE: Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 10-22
42. **DuBois RN**, Abramson SB, Crofford L, et al: Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal* 1998; 12: 1063-1073
43. **Eberhart CE**, Coffey RJ, Radhika A, et al.: Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-1188
44. **Evans DB**, Abbruzzese JL, Rich TA: Cancer of the pancreas. Principles and practice of oncology. Lippincott-Raven 1997; 1054-1086
45. **Falconer JS**, Ross JA, Fearon KCH, et al.: Effect of Eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in-vitro of human pancreatic-cancer cell lines. *Br-J-Cancer* 1994; 69(5): 826-832
46. **Fearon KCH**, Falconer JS, Ross JA, et al.: An open label phase I/II dose-escalation study of the treatment of pancreatic cancer using lithium- γ -linolenate. *Anticancer-Res* 1996; 16: 867-874

47. **Fernandez-Del Castillo F**, Warshaw AL: Laparoscopy for staging in pancreatic carcinoma. *Surg Oncology* 1993; 2[Suppl.1]: 25-29
48. **Fiorucci S**, Meli R, Bucci M, et al.: Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1433-1438
49. **Fong Y**, Fortner J, Sun RL, et al.: Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 1998; 9: 309-321
50. **Fridovich I**: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J-Biol-Chem* 1970; 245: 4053-4057
51. **Funahashi H**, Satake M, Hasan S, et al.: Opposing effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on pancreatic cancer growth. *Pancreas* 2008; 36: 353-362
52. **Funkhouser EM**, Sharp GB: Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 1116-1119
53. **Ghadirian P**, Simard A, Baillargeon J: Tobacco, alcohol, and coffee and cancer of the pancreas. A population-based, case-control study in quebec, canada *Cancer* 1991; 67: 2664-2670
54. **Gloor B**, Todd KE, Reber HA: Diagnostic workup of patients with suspected pancreatic carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 1780-1786
55. **Goldstein D**, Carroll S, Apte M, et al.: Modern management of pancreatic carcinoma. *Int Med J* 2004; 34: 475-481
56. **Gonzalez-Periz A**, Claria J: New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Curr Top Med Chem* 2007; 7(3): 297-309
57. **Gregor JI**, Kilian M, Heukamp I, et al.: Effects of selective Cox-2 and 5-Lox inhibition on prostaglandin and leukotrien synthesis in ductal pancreatic cancer in Syrian hamster. *Prostadlandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 2005; 73: 89-97
58. **Griffin P**, Fehres O, Klieverik L, et al.: Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids promote colon carcinoma metastasis in rat liver. *Cancer Res* 1998; 58(15): 3312-3319

59. **Gupta RA**, DuBois RN: Aspirin, NSAIDs, and colon cancer prevention. Mechanism? *Gastroenterology* 1998; 114: 1095-1098
60. **Hagspiel KD**, Neidl KF, Eichenberger AC, et al.: Detection of liver metastases: comparison of superparamagnetic iron oxide-enhanced and unenhanced MR imaging at 1.5T with dynamic CT, intraoperativ US, and percutaneous US. *Radiology* 1995; 196: 471-478
61. **Hall PA**, Lemoine NR: Models of pancreatic cancer. *Cancer-Surv* 1993; 16: 135-154
62. **Hasler CM**, Bennink MR, Trosko JE: Inhibition of gap junction-mediated intercellular communication by α -linolenate. *Am-J-Physiol* 1991; 261: 161-168
63. **Hawes RH**, Xiong Q, Waxman I, et al.: A multispecialty Approach to the Diagnosis and Management of Pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1): 17-31
64. **Hawkins RA**, Sangster K, Arends MJ, et al.: 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
65. **Hayashi Y**, Fukushima S, Hirata T, et al.: Anticancer activity of free γ -linolenic acid on AH-109a rat hepatoma cells and the effects of serum-albumin on anticancer activity of γ -linolenic acid in vitro. *J-Pharmacobiodynam* 1990; 13: 705-711
66. **Heiken JP**, Weyman PhJ, Lee JK, et al.: Detection of focal hepatic masses: Prospectiv evaluation with CT, delayed CT, CT during arterial portography, and MR imaging. *Radiology* 1989; 171: 47-51
67. **Hennig R**, Ding XZ, Tong WG, et al.: 5-Lipoxygenase and Leukotriene B4 Receptor are expressed in Human Pancreatic Cancers but not in Pancreatic Ducts in Normal Tissue. *Am J Pathol* 2002; 161: 421-428
68. **Hida T**, Yatabe Y, Achiwa H, et al.: Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 3761-3764
69. **Holmes RS**, van de Berg LJ: Aldehyde dehydrogenases, aldehyde oxidase and xanthine oxidase from baboon tissue. *Alcohol* 1986; 3: 205-214
70. **Horrobin DF**: Essential fatty acids, lipid peroxidation, and cancer, In: Horrobin DF (ed.): ω -6 Essential fatty acids. New York, Wiley-Liss 1990: 351-378

71. **Hosono J**, Narita T, Kimura N, et al.: Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *J-Surg-Oncol* 1998; 67: 77-84
72. **Hubbard NE**, Erickson KL: Effect of dietary linoleic-acid level on lodgement, proliferation and survival of mammary tumor metastases. *Cancer-Lett* 1989; 44: 117
73. **Hubbard NE**, Erickson KL: Role of dietary oleic-acid in linoleic-acid – enhanced metastasis of a mouse mammary tumor. *Cancer-Lett* 1991; 56: 165-171
74. **Hurwitz H**, Fehrenbacher L, Novotny W, et al: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N Engl J med* 2004; 350: 2335-2342
75. **Hussey HJ**, Tisdale MJ: Effects of polyunsaturated fatty acids on the growth of murine colon adenocarcinomas in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 1994; 70: 6-10
76. **Hünerbein M**, Rau B, Schlag PM: Stellenwert der Staging-Laparoskopie. *Onkologe* 1999; 5: 203-207
77. **Hwang D**, Scollard D, Byrne J, et al.: Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 455-460
78. **Hyde CAC**, Missailidis S: Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *International Immunopharmacology* 2009; 9: 701-715
79. **Hyoudou K**, Nishikawa M, Kobayashi M, et al: SOD derivates prevent metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 531-536
80. **Ihse I**, Andersson R, Axelson J, et al.: Surgical treatment for patients with advanced pancreatic cancer. *J Hep Bil Pancr Surg* 1998; 5: 133-137
81. **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
82. **Jemal A**, Siegel R, Ward E, et al.: Cancer statistics 2009. *Ca Cancer J Clin* 2009; 59:225-249
83. **Jiang WG**, Bryce RP, Mansel RE: Gamma linolenic acid regulates gap junction communication in endothelial cells and their interaction with tumor cells. *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1997 ; 56: 307-316

84. **Jiang WG**, Hiscox S, et al.: Inhibition of membrane ruffling and ezrin translocation by γ -linolenic acid. *Int-J-Oncol* 1996; 9: 279-284
85. **Jiang WG**, Hiscox S, Bryce RP, et al.: The effects of n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of nm-23 in human cancer cells. *Br-J-Cancer* 1998; 77(5): 731-738
86. **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
87. **Jiang WG**, Hiscox S, Hallet MB, et al.: Inhibition of hepatocyte growth factor-induced motility and in vitro invasion of human colon cancer cells by gamma-linolenic acid. *Br-J-Cancer* 1995; 71(4): 744-752
88. **Jiang WG**, Hiscox S, Hallet MB, et al.: Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by γ -linolenic acid. *Cancer-Res* 1995; 55: 5043-5048
89. **Jimenez de Asua L**, Otto AM, Lindgren JA, et al.: The stimulation of the initiation of DNA synthesis and cell division in Swiss mouse 3T3 cells by prostaglandin $F_{2\alpha}$ requires specific functional groups in the molecule. *J-Biol-Chem* 1983; 258: 8774-8780
90. **Johanning GL**: Modulation of breast cancer cell adhesion by unsaturated fatty acids. *Nutrition* 1996; 12: 810-816
91. **Johanning GL**, Lin TY: Unsaturated fatty-acid effects on human breast-cancer cell-adhesion. *Nutr-Cancer* 1995; 24: 57-66
92. **Jones R**, Adel-Alvarez LA, Rascon-Alvarez O, et al.: Arachidonic acid and colorectal carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 141-149
93. **Kakiuchi Y**, Tsuji S, Tsuji M, et al.: Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* 2002; 62: 1567-1572
94. **Kargman S**, Charleson S, Cartwright M, et al.: Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastro-intestinal tracts. *Gastroenterol* 1996; 111: 445-454
95. **Katsuki H**, Okuda S: Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Prog Neurobiol* 1995; 46: 607-636

96. **Kawamori T**, Rao CV, Seibert K, et al.: Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 409-412
97. **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
98. **Kemeny MM**, Adak S, Gray B, et al: Combined-modality treatment for resectable metastatic colorectal carcinoma to the liver: surgical resection of hepatic metastases in combination with continuous infusion of chemotherapy- an intergroup study, *J Clin Oncol* 2002; 20: 1499-1505
99. **Kinkel K**, Lu Y, Both M, et al: Detection of Hepatic Metastases from Cancers of the Gastrointestinal Tract by Using Noninvasive Imaging Methods (US, CT, MR Imaging, PET): A Meta-Analysis, *Radiology* 2002; 224: 748-756
100. **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
101. **Knapp WH**: Nuklearmedizinische Diagnostik von Pankreastumoren mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET). *Chir Gastroenterol* 1997;13[Suppl. 1]: 10-11
102. **Kong G**, Kim EK, Kim WS, et al.: Role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 914-921
103. **Lai PBS**, Ross JA, Fearon KC, et al.: Cell-cycle arrest and induction of apoptosis in pancreatic-cancer cells exposed to EPA in-vitro. *Br-J-Cancer* 1996; 74: 1375-1383
104. **Leahy KM**, Ornberg RL, Wang Y, et al.: Cyclooxygenase-2 Inhibition by Celecoxib Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Angiogenic Endothelial Cells in vivo. *Cancer Res* 2002; 62: 625-631
105. **Leitzmann MF**, Stampfer MJ, Michaud DS, et al.: Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 204-216
106. **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

107. **Levy GN:** Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB-J* 1997; 11: 234-247
108. **Li G,** Yang T, Yan J: Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem-Biophys-Res-Comm* 2002; 299: 886-890
109. **Lim P,** Wuenschell GE, Holland V, et al: Peroxyl Radical Mediated Oxidative DNA Base Damage: Implications for Lipid Peroxidation Induced Mutagenesis. *Biochemistry* 2004; 43: 15339-15348
110. **Lim P,** Sadre-Bazzaz K, Shurter J, et al.: DNA Damage and Mutations Induced by Arachidonic Acid Peroxidation. *Biochemistry* 2003; 42: 15036-15044
111. **Liu XH,** Connolly JM, Rose DP: Eicosanoids as mediators of linoleic acid-stimulated invasion and type IV collagenase production by a metastatic human breast cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14(2): 145-152
112. **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
113. **Lowenfels AB,** Maisonneuve P: Epidemiology and Prevention of Pancreatic Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34(5): 238-244
114. **Lowry OH,** Rosebrough NJ, Farr L, et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J-Biol-Chem* 1951; 193: 265-275
115. **Lupulescu A:** Prostaglandins, their inhibitors and cancer. *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1996; 54: 83-94
116. **Lynch PM:** COX-2 inhibition in clinical cancer prevention. *Oncology* 2001; 15 (3 Suppl 5): 21-26
117. **Malins DC,** Polissar NL, Gunselman SJ: Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical- induced DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 2557-2563
118. **Marks F,** Fürstenberger G, Müller-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
119. **Masferrer JI,** Leahy Km, Koki AT, et al.: Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibition. *Cancer Res* 2000; 60: 1306-1311

120. **McCarthy MF**: Fish-oil impede tumor angiogenesis and invasiveness by down-regulating protein-kinase c and modulating eicosanoid production. *Med-Hypotheses* 1996; 46: 107-111
121. **McCormick DL**, Moon RC: Inhibition of mammary carcinogenesis by flurbiprofen, a non-steroidal anti-inflammatory agent. *Br J Cancer* 1983; 48: 859-861
122. **Meijers M**, Garderen-Hoetmer A, Lamers C, et al.: Role of cholecystikinin in the development of BOP-induced pancreatic lesions in hamsters. *Carcinogenesis* 1990; 11: 2223-2226
123. **Meterissian SH**, Forse RA, Steele GD, et al.: Effect of membrane free fatty-acid alterations on the adhesion of human colorectal-carcinoma cells to liver macrophages and extracellular-matrix proteins. *Cancer-Lett* 1995 ; 89: 145-152
124. **Molina MA**, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, et al.: Increased Cyclooxygenase-2 Expression in Human Pancreatic Carcinomas and Cell Lines: Growth Inhibition by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Cancer Res* 1999; 59: 4356-4362
125. **Mroczo B**, Lukaszewicz-Zajac M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, et al.: Clinical Significance of the Measurements of Serum Matrix Metalloproteinase-9 and its Inhibitor (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1) in Patients with Pancreatic Cancer. *Pancreas* 2009; 38: 613-618
126. **Nakao A**, Takagi H: Problems in pancreatic cancer surgery. *Semin-Surg-Oncol* 1998; 15: 52-56
127. **Nathoo N**, Barnett GH, Golubic M: The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. *J Clin Pathol* 2004; 57: 6-13
128. **Needleman P**, Turk J, Jakschik, et al.: Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 69-102
129. **Nishikawa M**: Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Letters* 2008; 266: 53-59
130. **O'Banion MK**, Winn VD, Young DA: cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 89: 4888-4892

131. **O'Banion MK**, Sadowski HB, Winn V, et al.: A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase- regulated protein. *J Biol Chem* 1991; 266: 23261-23267
132. **Oettle H**, Post S, Neuhaus P, et al.: Adjuvant chemotherapie with gemcitabine vs. Observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 297: 267-277
133. **Ohkawa H**, Ohishi N, Yaki K: Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal-Biochem* 1979; 95: 351-358
134. **Okami J**, Yamamoto H, Fujiwara, et al.: Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2018-2024
135. **Ondrey FG**: Arachidonic Acid Metabolism: A primer for Head and Neck Surgeons. *Head Neck* 1998; 20: 334-349
136. **Otto JC**, Smith WL: Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediators Cell Signalling* 1995; 12: 139-156
137. **Paglia DE**, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J-Lab-Clin-Med* 1967; 29: 143-148
138. **Pidgeon GP**, Lysaght J, Krishnamoorthy S, et al.: Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 503-524
139. **Plescia OJ**, Racis S : Prostaglandins as physiological immunoregulators. *Prog-Allergy* 1988; 44: 153-171
140. **Portier G**, Elias D, Bouche O, et al: Multicenter randomized trial of adjuvant fluorouracil and folinic acid compared with surgery alone after resection of colorectal liver metastases: FFCD ACHBTH AURC 9002 trial. *J clin Oncol* 2006; 24: 4976-4982
141. **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
142. **Pour PM**, Althoff J, Krüger FW, et al.: A potent pancreatic carcinogen in Syrian golden hamsters: N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amin. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977; 58: 1449-1451

143. **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
144. **Rao CV**, Rivenson A, Simi B, et al.: Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res* 1995; 55: 1464-1472
145. **Reich R**, Royce L, Martin GR: Eicosapentaenoic acid reduces the invasive and metastatic activity of malignant tumor cells. *Biochem-Biophys-Res-Commun* 1989; 160: 559-564
146. **Reich R**, Martin GR: Identification of arachidonic acid pathways required for the invasive and metastatic activity of malignant tumor cells. *Prostaglandins* 1996; 51: 01-17
147. **Rice-Evans C**, Burdon R: Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 1993; 32: 71-110
148. **Riediger ND**, Othman RA, et al: A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: 668-679
149. **Rioux N**, Castonguay A : Inhibitors of Lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1998 ; 19: 1393-1400
150. **Ristimaki A**, Honkanen N, Jankala H, et al.: Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *CancerRes* 1997; 57: 1276-1280
151. **Roberts VA**, Fisher CL, Redford SM, et al.: Mechanism and anatomic structure of superoxid dismutase. *Free Radical Res. Comm.1*; 1991: 269-278
152. **Roebuck BD**: Dietary fat and the development of pancreatic cancer. *Lipids* 1992; 27: 804-806
153. **Rösch T**, Braig C, Gain T, et al.: Staging of pancreatic and ampullary carcinoma by endoscopic ultrasonography: Comparison with conventional sonography, computed tomography and angiography: *Gastroenterology* 1992; 102: 188-199
154. **Rose DP**, Conolly JM, Liu XH: Effects of linoleic acid and γ -linolenic acid on the growth and metastasis of a human breast-cancer cell-line in nude-mice and on its growth and invasive capacity in-vitro. *Nutr-Cancer* 1995; 24: 33-45
155. **Rose DP**: Dietary fatty acids and cancer. *Am-J-Clin-Nutr* 1997; 66: 998-1003

156. **Rose DP**, Connolly JM, Rayburn J, et al.: Influence of diets containing EPA or DHA on growth and metastasis of breast-cancer cells in nude mice. *J-Natl-Cancer-Inst* 1995; 87: 587-592
157. **Rose DP**, Hatala MA: Dietary fatty acids and breast cancer invasion and metastasis. *Nutr-Cancer* 1994; 21: 103-111
158. **Rose DP**, Connolly JM: Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics* 1999; 83: 217-244
159. **Rose DP**, Connolly JM, Meschter CL: Effect of dietary fat on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83(20): 1491-1495
160. **Rose DP**, Connolly JM: Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr Cancer* 2000; 37(2): 119-127
161. **Saisho H**, Yamaguchi T: Diagnostic Imaging for Pancreatic Cancer. *Pancreas* 2004; 28: 273-278
162. **Sakagushi M**, Imray C, Davis A, et al.: Effects of dietary n-3 and saturated fats on growth-rates of the human colonic-cancer cell-lines SW-620 and LS-174T in vivo in relation to tissue and plasma lipids. *Anticancer-Res* 1990; 10: 1763-1768
163. **Schmidt J**, Strotzer M, Fraunhofer F, et al.: Intraoperative ultrasonography versus helical computed tomography and computed tomography with arteriography in diagnosing colorectal liver metastases: Lesion-by-lesion analysis. *World J Surg* 2000; 24: 43-48
164. **Schreinemachers DM**, Everson RB: Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology* 1994; 5: 138-146
165. **Schwartz SI**, Shires GT, Spencer FC (eds.): *Principles of surgery*, 6th ed., McGraw-Hill New York: 1994
166. **Sharpe CR**, Collet JP, McNutt M, et al.: Nested case-control study of the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. *Br J Canc* 2000; 83(1): 112-120
167. **Sheng H**, Shao J, Morrow JD, et al.: Modulation of apoptosis and BCL-2 expression by Prostaglandin E₂ in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58 : 362-366

168. **Shureiqi I**, Lippman SM: Lipoxygenase Modulation to reverse Carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 6307-6312
169. **Sies H**, Stahl W, Sevanian A, et al.: *Oxidative Stress : Oxidants and Antioxidants*, Academic Press 1991, London
170. **Sinicrope FA**, Gill S: Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer 2004. *Cancer and Metastasis Reviews* 2004; 23: 63-75
171. **Smith WL**, Dewitt DL, Garavito M: Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-182
172. **Standop J**, Schneider M, Ulrich A, et al.: Experimental animal models in pancreatic carcinogenesis: Lessons for human pancreatic cancer. *Dig Dis* 2001; 19: 24-31
173. **Steele VE**, Holmes CA, Hawk ET, et al.: Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1999; 8: 467-483
174. **Stocken DD**, Buchler MW, Dervenis C, et al.: Meta-analysis of randomized adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 1372-1381
175. **Takahashi M**, Furukawa F, Toyoda K, et al.: Effects of various prostaglandin synthesis inhibitors on pancreatic carcinogenesis in hamsters after initiation with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Carcinogenesis* 1990; 11: 393-395
176. **Tang DG**, Honn KV: Apoptosis of W256 Carcinosarkoma Cells of the monocytoid origin induced by NDGA involves lipid peroxidation and depletion of GSH: Role of 12-lipoxygenase in Regulating Tumor cell survival. *J Cell Physiol* 1997; 172: 155-170
177. **Thun MJ**, Henley SJ, Patrono C: Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 252-266
178. **Thun MJ**, Namboodiri MM, Heath CW: Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Eng J Med* 1991; 325: 1593-1596
179. **Tio TL**, Sie LH, Kallimanis G, et al.: Staging of ampullary and pancreatic carcinoma: comparison between endosonography and surgery. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 706-713

180. **Trainer JA**, Getzoff ED, Richardson JS, et al.: Structure and Mechanism of Cu, Zn, Superoxide Dismutase. *Nature* 1983; 306: 284-287
181. **Tseng WW**, Deganutti A, Chen MN, et al.: Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor Rofecoxib (Vioxx) Induces Expression of Cell Cycle Arrest Genes and Slows Tumor Growth in Human Pancreatic Cancer. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 838-844
182. **Tsuji M**, Kawano S, Tsuji S, et al.: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998 ; 93: 705-716
183. **Tsuji M**, Kawano S, DuBois RN: Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3336-3340
184. **Tsuji S**, Kawano S, Sawaoka H, et al.: Evidences for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines. *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1996; 55: 179-183
185. **Tucker ON**, Dannenberg AJ, Yang EK, et al.: Cyclooxygenase-2 Expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 987-990
186. **Uefuji K**, Ichikura T, Mochizuki H, et al.: Expression of Cyclooxygenase-2 Protein in Gastric Adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 1998; 69: 168-172
187. **Ueno E**, Takada Y, Yoshida I, et al: Pancreatic diseases: evaluation with MR cholangiopancreatography. *Pancreas* 1998; 16: 418-426
188. **van Rees BP**, Ristimaki A: Cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 2001; 9: 897-903
189. **Vane JR**, Botting RM: Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Int-J-Tiss-Reac* 1998; 20: 3-15
190. **Vezeridis MP**, Wanebo HJ: Surgical resection for carcinoma of the pancreas: a historical overview. *Semin-Surg-Oncol* 1995; 11: 108-113
191. **Wanebo HJ**, Vezeridis MP: Pancreatic cancer: an overview. *Semin-Surg-Oncol* 1995; 11: 168-180
192. **Wang D**, DuBois RN: Prostaglanins and Cancer. *Gut* 2006; 55: 115-122
193. **Warshaw AL**, Fernandez-del Castillo C: Pancreatic carcinoma. *N-Engl-J-Med* 1992; 326: 455-465

194. **Wenger FA**, Kilian M, Biševac M et al: Effects of Celebrex and Zylflo on liver metastasis and lipidperoxidation in pancreatic cancer in Syrian hamsters. Clin Exp Metas 2002; 19: 681-687
195. **Wenger FA**, Kilian M, Jacobi CA, et al: Does α -linolenic acid in combination with linoleic acid influence liver metastasis and hepatic lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamster? Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids 2000; 62 (6): 329-334
196. **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
197. **Wenger FA**, Kilian M, Achúcarro P et al: Effects of Celebrex and Zylflo on BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. Pancreatology 2002; 2; 54-60
198. **Williams CS**, DuBois RN: Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? Am-J-Physiol-Gastrointest-Liver-Physiol 1996; 270: 6393-6400
199. **Wilson KT**, Fu S, Ramanujam KS, et al.: Increased expression of inducible nitric oxide and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. Cancer Res 1998; 58: 2929-2934
200. **Woutersen RA**, Appel MJ, van Garderen-Hoetmer A et al: Dietary Fat and carcinogenesis. Mutation Research 1999; 443: 111-127
201. **Yamauchi T**, Watanabe M, Hasegawa H, et al.: The potential for a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in the prevention of liver metastasis in human colorectal cancer. Anticancer Res 2003; 23(1A): 245-249
202. **Yao M**, Kargman S, Lam EC, et al.: Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. Cancer Res 2003; 63(3): 586-592
203. **Yip D**, Karapetis C, Strickland A, et al.: Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer. Cochrane Database Syst Rev 3 CD002093 2006

7. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe, dass sie keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken als solche kenntlich gemacht und vollständig angegeben sind.

Berlin, den 15.09.2010

8. Lebenslauf

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

9. Publikationen

Wenger FA, Kilian M, Biševac M, et al.: Effects of Celebrex and Zyflo on liver metastasis and lipidperoxidation in pancreatic cancer in Syrian hamsters. Clin-Exp-Metastasis 2002; 19(8): 681-687.

10. Danksagung

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, D. und R. Biševac und danke ihnen zutiefst für ihr stetiges Interesse, ihren Rat und unermüdliche moralische Unterstützung sowie ihre Liebe. Weiterhin danke ich meinem Ehemann Herrn D. Kuhn, der mich während der Zeit des gesamten Studiums und der Erstellung der vorliegenden Arbeit durch sein unendliches Verständnis, seine anhaltende Motivation und Ermutigung bis zuletzt begleitet hat.

Ich danke Herrn PD Dr. Wenger für die freundliche Überlassung des Themas und ausgezeichnete Betreuung des experimentellen und theoretischen Teils dieser Arbeit. Sein beständiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine Diskussionsfreudigkeit haben diese Dissertation entscheidend geprägt.

Für die Möglichkeit der Nutzung des biochemischen und pathologischen Labors danke ich Herrn Prof. Dr. I. Schimke, Klinik für Innere Medizin, Charité und Herrn Prof. Dr. H. Guski, Institut für Pathologie, Charité.