

**Thema: „Neue medikamentöse Therapiestrategien
beim Pankreaskarzinom - Einfluß von Octreotid und
Tamoxifen, Vitamin A, C und E sowie des Cox-2-
Inhibitors Celebrex und des 5-Lox-Inhibitors Zylflo auf
das Tumorstadium, die Lebermetastasierung und
die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem
Adenokarzinom des Syrischen Hamsters“**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Frank Axel Wenger

geboren am 26.04.1967 in Bonn

Präsident: Prof. Dr. rer. Nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Büchler (Chirurgische Universitätsklinik Heidelberg)
2. Prof. Dr. Saeger (Chirurgische Universitätsklinik Dresden)

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 03.12.2002

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Das humane Pankreaskarzinom	9
1.1.1	Epidemiologie	9
1.1.2	Pathologie des Pankreaskarzinoms	9
1.1.2.1	Makroskopie und Lokalisation	9
1.1.2.2	Histologische Differenzierung	10
1.1.2.2.1	Duktale Karzinome	10
1.1.2.2.2	Azinäre Karzinome	11
1.1.2.2.3	Karzinome unklarer Histogenese	12
1.1.3	Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms	12
1.1.4	Klinische Symptome	12
1.1.5	Prognose	13
1.1.6	Radio- und Chemotherapie	13
1.1.6.1	Adjuvante Therapiekonzepte	14
1.1.6.2	Therapie des lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms	15
1.1.6.3	Chemotherapie des metastasierenden Pankreaskarzinoms	15
1.2	Studienkonzept	16
1.2.1	Fragestellungen	17
1.2.1.1	Ist das von Pour beschriebene Tiermodell eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas im Syrischen Hamster reproduzierbar?	17
1.2.1.2	Modifikation des Modells zur Steigerung der Lebermetastasierung	17
1.2.1.3	Behandlungskonzepte zur Inhibition des Wachstums von Lebermetastasen	19
1.2.1.3.1	Octreotid und Tamoxifen	19
1.2.1.3.2	Vitamine A, C und E	20
1.2.1.3.3	Celebrex (COX-2-Inhibitor) und Zylflo (5-LOX-Inhibitor)	21
1.2.2	Zweck der Studie	22
1.3	Das Somatostatinkonzept	22
1.3.1	Gesicherte Indikationen	22
1.3.2	Somatostatin beim Pankreaskarzinom	23

1.3.3	Somatostatin-Rezeptoren	24
1.3.4	Synthetische Somatostatin-Analoga	26
1.3.4.1	Entwicklung	26
1.4	Einfluß der Vitamine A, C und E auf die Karzinogenese	26
1.4.1	Vitamin A	26
1.4.2	Vitamin C	27
1.4.3	Vitamin E	28
1.5	Lipidperoxidation und oxidativer Stress	29
1.5.1	Bedeutung der Hochfetterernährung und der Lipidperoxidation in der Karzinogenese und Metastasierung	29
1.5.2	Definition und Vorkommen der Lipidperoxidation	31
1.5.3	Enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen	33
2	MATERIAL UND METHODEN	34
2.1	Versuch der Induktion eines duktales Pankreaskarzinoms	34
2.1.1	Haltung der Tiere	34
2.1.2	Ernährung	34
2.1.3	Tumorinduktion	35
2.1.4	Obduktion	35
2.1.5	Histologische Untersuchung	36
2.1.6	Statistik	37
2.2	Versuch der Steigerung der Lebermetastasierung durch eine Modifikation der enteralen Fettsäurekombination aus α-Linolensäure und Linolsäure beim duktales Pankreaskarzinom	37
2.2.1	Haltung der Tiere und Versuchsgruppen	37
2.2.2	Ernährung	38
2.2.3	Tumorinduktion	39
2.2.4	Obduktion	39
2.2.5	Histologische Untersuchungen	39
2.2.6	Biochemische Untersuchungen	40
2.2.6.1	Chemikalien und Geräte	40
2.2.6.2	Homogenatherstellung	42

2.2.6.3	Proteinbestimmung nach Lowry	42
2.2.6.3.1	Prinzip	42
2.2.6.3.2	Durchführung und Auswertung	42
2.2.6.4	Bestimmung der GSHPX-Aktivität	43
2.2.6.4.1	Prinzip	43
2.2.6.4.2	Durchführung und Auswertung	43
2.2.6.5	Bestimmung der SOD-Aktivität	44
2.2.6.5.1	Prinzip	44
2.2.6.5.2	Durchführung und Auswertung	44
2.2.6.6	Bestimmung der Lipidperoxidations-Produkte	45
2.2.6.6.1	Prinzip	45
2.2.6.6.2	Durchführung und Auswertung	45
2.2.6.7	Statistik	46
2.3	Einfluß von Octreotid und Tamoxifen auf das Tumor-wachstum und die Lebermetastasierung beim Pankreaskarzinom	46
2.3.1	Haltung der Tiere und Versuchsgruppen	46
2.3.2	Ernährung	46
2.3.3	Tumorinduktion	48
2.3.4	Therapie	48
2.3.5	Obduktion	49
2.3.6	Histologische Untersuchungen	49
2.3.7	Nachweis von Rezeptoren	49
2.3.7.1	Somatostatinrezeptoren	49
2.3.7.2	Östrogenrezeptoren	49
2.4	Einfluß von Octreotid auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom	51
2.4.1	Haltung der Tiere und Versuchsgruppen	51
2.4.2	Ernährung	51
2.4.3	Tumorinduktion	54
2.4.4	Therapie	54
2.4.5	Obduktion	54
2.4.6	Histologische Untersuchung	55
2.4.7	Biochemische Untersuchungen	56

2.4.8	Statistik	56
2.5	Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C sowie E auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation in Lebermetastasen und metastasenfremen Leberanteilen beim duktafen Pankreaskarzinom	57
2.5.1	Haltung der Tiere und Versuchsgruppen	57
2.5.2	Ernährung	58
2.5.3	Tumorinduktion	59
2.5.4	Therapie	59
2.5.5	Obduktion	59
2.5.6	Histologische Untersuchungen	60
2.5.7	Biochemische Untersuchungen	60
2.5.8	Statistik	60
2.6	Einfluß von Celebrex (COX-2-Inhibitor) und Zyflo (5-LOX- Inhibitor) auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktafen Pankreaskarzinom	61
2.6.1	Haltung der Tiere und Versuchsgruppen	61
2.6.2	Ernährung	61
2.6.3	Tumorinduktion	61
2.6.4	Therapie	62
2.6.5	Obduktion	62
2.6.6	Histologische Untersuchungen	62
2.6.7	Biochemische Untersuchungen	62
2.6.8	Statistik	63
3	ERGEBNISSE	64
3.1	Versuch der Induktion eines duktafen Pankreaskarzinoms	64
3.1.1	Tumorinduktionsrate, Letalität, Körpergewicht	64
3.1.2	Histologische Klassifikation	64
3.2	Versuch der Steigerung der Lebermetastasierung durch eine Modifikation der enteralen Fettsäurekombination aus α-Linolensäure und Linolsäure beim duktafen Pankreaskarzinom	66

3.2.1	Organ- und Körpergewicht, Letalität	66
3.2.2	Inzidenz von Pankreaskarzinomen	67
3.2.3	Inzidenz von Lebermetastasen	67
3.2.4	Klassifikation hepatischer Raumforderungen	68
3.2.5	Anzahl und Größe von Lebermetastasen	69
3.2.6	Aktivität der hepatischen GSHPX	69
3.2.7	Aktivität der hepatischen SOD	70
3.2.8	Konzentration der hepatischen TBARS	70
3.3	Einfluß von Octreotid und Tamoxifen auf das Tumorwachstum und die Lebermetastasierung beim duktalem Pankreaskarzinom	71
3.3.1	Organ- und Körpergewicht, Letalität	71
3.3.2	Inzidenz und Anzahl von Pankreaskarzinomen	72
3.3.3	Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen	73
3.3.4	Östrogen- und Somatostatinrezeptoren	74
3.4	Einfluß von Octreotid auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom	74
3.4.1	Letalität, Körpergewicht	74
3.4.2	Makroskopie / Auflichtmikroskopie von Pankreas und Leber	75
3.4.2.1	Makroskopie / Auflichtmikroskopie des Pankreas	75
3.4.2.2	Makroskopie / Auflichtmikroskopie der Leber	76
3.4.2.2.1	Inzidenz / Anzahl von Metastasen	76
3.4.2.2.2	Größe von Metastasen	77
3.4.3	Histologische Ergebnisse	77
3.4.3.1	Pankreatische Raumforderungen	77
3.4.3.2	Hepatische Raumforderungen	77
3.4.4	Biochemische Ergebnisse	78
3.4.4.1	Eiweißgehalt	78
3.4.4.2	GSHPX – Aktivität	79
3.4.4.3	SOD – Aktivität	81
3.4.4.4	Konzentration von TBARS	82

3.5	Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C und E auf die Lebermetastasierung und die Lipidperoxidation in Lebermetastasen und metastasenfremen Leberanteilen beim duktafen Pankreaskarzinom	85
3.5.1	Letalität, Körper-, Pankreas- und Lebergewichte	85
3.5.2	Inzidenz von Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen	86
3.5.3	Histologische Untersuchung der Leberläsionen	87
3.5.4	Anzahl und Größe der Lebermetastasen	87
3.5.5	Biochemischen Untersuchungen	89
3.5.5.1	Extra- und intrametastatischer Proteingehalt	89
3.5.5.2	SOD-Aktivität	90
3.5.5.2.1	Extrametastatische Aktivität	90
3.5.5.2.2	Intrametastatische Aktivität	91
3.5.5.2.3	Vergleich extra- und intrametastatische Aktivität	91
3.5.5.3	GSHPX-Aktivität	91
3.5.5.3.1	Extrametastatische GSHPX-Aktivität	91
3.5.5.3.2	Intrametastatische Aktivität	92
3.5.5.3.3	Vergleich der extra- und intrametastatischen Aktivität	92
3.5.5.4	TBARS-Konzentration	93
3.5.5.4.1	Extrametastatische Konzentration	93
3.5.5.4.2	Intrametastatische Konzentration	94
3.5.5.4.3	Vergleich der extra- und intrametastatische Konzentration	94
3.6	Einfluß von Celebrex (COX-2-Inhibitor) und Zyflo (5-LOX-Inhibitor) auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktafen Pankreaskarzinom	95
3.6.1	Organ-, Körpergewicht und Letalität	95
3.6.2	Inzidenz von Pankreaskarzinomen	96
3.6.3	Inzidenz von Lebermetastasen	96
3.6.4	Anzahl und Größe von Lebermetastasen pro Tier	97
3.6.5	Aktivität der hepatischen GSHPX	98
3.6.6	Aktivität der hepatischen SOD	99
3.6.7	Konzentration der hepatischen Lipidperoxidation (TBARS)	100

4	DISKUSSION	101
4.1	Effekte von BOP und einer Hochfetternahrung	101
4.2	Octreotid und Tamoxifen beim duktalem Pankreaskarzinom	106
4.3	Einfluß von Octreotid auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation des duktalem Pankreaskarzinoms	110
4.3.1	Wirkungen von Octreotid	110
4.4	Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C sowie E auf die Lebermetastasierung und die Lipidperoxidation in Lebermetastasen und metastasenfremen Leberanteilen beim duktalem Pankreaskarzinom	114
4.4.1	Einfluß von Vitamin A auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation	114
4.4.2	Einfluß von Vitamin C auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation	120
4.4.3	Einfluß von Vitamin E auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation	123
4.5	Einfluß von Celebrex (COX-2-Inhibitor) und Zyflo (5-LOX-Inhibitor) auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom	127
5	SCHLUßFOLGERUNGEN	129
6	ZUSAMMENFASSUNG	132
	LITERATUR	144
	DANKSAGUNG	171
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	172

1 Einleitung

1.1 Das humane Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Innerhalb der vergangenen 20 Jahre wurde in allen Ländern der westlichen Welt ein Anstieg der Inzidenz des Pankreaskarzinoms beobachtet (24,123,167,168). In Europa und Nordamerika stellt das Pankreaskarzinom den acht- bis zehnthäufigsten soliden Tumor sowie den zweit- bis dritthäufigsten malignen Tumor des Gastrointestinaltraktes dar (74,214,255-256,264,273,283). Während sich die höchste Inzidenz für das Pankreaskarzinom bei der schwarzen Bevölkerung der USA, auf Hawaii, Maori, Polynesien und Neuseeland mit 12-16/100.000/Jahr (160,167,239) findet, liegt die Inzidenz in Europa bei 8-12/100.000/Jahr (24,160,167,256,283).

Das Pankreaskarzinom galt bis vor etwa 10 Jahren als typisches Malignom der männlichen Bevölkerung, innerhalb der letzten Jahre hat sich das Verhältnis der Inzidenz (Mann : Frau) jedoch auf 1,3-1,5:1,0 verschoben (123,167,256,283). Bei Diagnosestellung liegt das Durchschnittsalter der Patienten mit einem Pankreaskarzinom bei etwa 60 Jahren (123,167,256,283).

Die genauen Ursachen für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms sind bislang unbekannt, als einziger sicher nachgewiesener Risikofaktor gilt der Nikotinkonsum, welcher zu einer Verdopplung des relativen Erkrankungsrisikos führt (123,141,167,283). Ferner werden die Ernährung, ein Diabetes mellitus, Koffein, ein Alkoholabusus, eine familiäre Disposition, sowie eine chronische Pankreatitis als potentielle Risikofaktoren diskutiert (123,141,167,283).

1.1.2 Pathologie des Pankreaskarzinoms

1.1.2.1 Makroskopie und Lokalisation

Pankreaskarzinome sind in 70-80% der Fälle im Pankreaskopf lokalisiert, während sich 6-13% im Korpus- und 3-17% im Schwanzteil der Bauchspeicheldrüse entwickeln. Das Pankreaskopfkarzinom tendiert häufig zur Penetration der Duodenalwand beziehungsweise zur Umscheidung des Ductus pancreaticus, wodurch eine

Gangobstruktion und ein Ikterus verursacht wird (199). Hingegen können Pankreaskorpus- und –schwanzkarzinome die Magenwand oder das Colon transversum infiltrieren (89).

1.1.2.2 Histologische Differenzierung

Die histologische Einteilung der Pankreaskarzinome erfolgt nach histogenetischen Gesichtspunkten (129), bei der 3 Formen der histomorphologischen Differenzierung unterschieden werden:

- Duktale Karzinome (80-90%)
- Azinäre Karzinome (1%)
- Karzinome unklarer Histogenese

1.1.2.2.1 Duktale Karzinome

Diesbezüglich unterscheidet man verschiedene Differenzierungsformen, die in unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen (166):

Tubuläres Adenokarzinom

Mit einer Häufigkeit von 82% bilden sie die größte Untergruppe der dukталen Karzinome, wobei solide Abschnitte und drüsig-tubulär differenzierte Anteile nebeneinander gefunden werden können (129). Darüberhinaus können sowohl zystische als auch papilläre Formen beobachtet werden. Die Ausdehnung des Pankreaskarzinoms zeigt eine besondere Affinität zum perineuralen Bindegewebe.

Elektronenmikroskopisch sind an der Oberfläche der Tumorzellen Mikrovilli nachweisbar, im Zytoplasma der Tumorzellen sind als Zeichen der sekretorischen Aktivität Prosekrettropfen angeordnet. Hierbei wird das Sekret partiell in den Epithelzellen retiniert, verdrängt die übrigen Bestandteile des Zytoplasmas und verursacht Einbuchtungen des Zellkerns, oder es kann möglicherweise in die unterschiedlich weiten drüsigen Lichtungen abgegeben werden, in denen unterschiedlich dichte Sekretkomplexe vertreten sind.

Muzinöses Adenokarzinom

Dieser Karzinomtyp tritt nur bei 1% der exokrinen Pankreastumoren auf. Das muzinöse Adenokarzinom besteht aus tubulären und glandulären Formationen mit ausgeprägter Schleimbildung, hierbei können sich mit Schleim gefüllte Höhlräume bilden, in denen nur einzelne kleinere Tumorzellkomplexe angeordnet sind (129).

Adenosquamöses Karzinom

Charakteristisch für diesen Karzinomtyp ist eine Mischung aus drüsigen Tumoranteilen mit plattenepithelial differenzierten Epithelformationen. Das adenosquamöse Karzinom kommt in 4% der Fälle eines Pankreaskarzinoms vor (83)

Plattenepithelkarzinom

Dieser Pankreaskarzinomtyp ist sehr selten und ist primär im Caput pancreatis lokalisiert. Der Tumor besteht aus soliden, konfluierenden Epithelkomplexen, in denen eine plattenepitheliale Schichtung besteht (129).

Pleomorphes großzelliges Karzinom

Pankreaskarzinome diesen Typs kommen in etwa 4% vor und sind am häufigsten im Korpus- und Schwanzteil der Bauchspeicheldrüse lokalisiert. Histomorphologisch besteht der Tumor aus spindeligen Zellen und enthält in wechselnden Anteilen klarzellige Komponenten wie beim Nieren- oder Nebennierenkarzinom. Darüberhinaus werden glanduläre Formationen und mehrkernige Riesenzellen beobachtet (129).

1.1.2.2.2 Azinäre Karzinome

Azinuszellkarzinom

Dieser Pankreaskarzinomtyp tritt nur etwa in 1% der Fälle der Pankreaskarzinome auf (82). Das Karzinom besteht aus großen polyedrischen Zellen, die sich um mehr oder weniger weite Lichtungen rekrutieren und eine azinäre Grundstruktur bilden. Die Tumorzellen weisen ein granuläres Zytoplasma auf und enthalten ausgereifte oder rudimentär ausgebildete Zymogengranula.

Bei dieser Form des Pankreaskarzioms können aktivierte Pankreasenzyme in die Organumgebung und in das Blutgefäßsystem freigesetzt werden und außerhalb des Organs autodigestiv tryptische Nekrosen erzeugen. Die Prognose des

Azinuszellkarzinoms ist ähnlich schlecht, wie diejenige des duktales Adenokarzioms.

1.1.2.2.3 Karzinome unklarer Histogenese

Pleomorphes kleinzelliges Pankreaskarzinom

Diese Karzinome sind keiner präformierten Grundstruktur zuzuordnen, wobei sie einen ähnlichen Aufbau wie kleinzellige Bronchialkarzinome zeigen und differentialdiagnostisch gegen Tumormetastasen im Pankreas und gegen maligne Lymphome abzugrenzen sind (129).

1.1.3 Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms

Neben dem Pankreaskarzinom besteht zumeist im Pankreas eine chronische, fibrosierende Pankreatitis, so daß häufig eine direkte topographische Beziehung zwischen der Tumorausbreitung und der vernarbenden Entzündung vorliegt.

Pankreaskarzinome infiltrieren in das peripankreatische Fettgewebe, in die dorsale Bauchwand, in das Fettgewebe des Mesenteriums, in den Ductus choledochus, in die Gallenblase, in das Duodenum und seltener in die Magenwand oder das Colon transversum. Häufig, das heißt bei 36-95% der Patienten, besteht eine ausgeprägte perineurale Metastasierung (129). Die lymphatische Metastasierung betrifft die parapankreatischen, die paraaortalen und die hilären Lymphknoten der Leber, während die hämatogene Metastasierung am häufigsten zu Lebermetastasen führt. Darüberhinaus können Metastasen in Lunge, Pleura, Sklett und Nebennieren vorliegen.

1.1.4 Klinische Symptome

Bei 75% der Patienten führt die Symptomentrias aus einem Verschlussikterus, Oberbauchschmerzen und einem Gewichtsverlust von durchschnittlich 10kg zum Aufsuchen des Arztes (123,167,256). Da charakteristische Frühsymptome für das Pankreaskarzinom nicht bekannt sind erfolgt die Vorstellung der Patienten beziehungsweise die Diagnosestellung häufig erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium.

Bei der klinischen Untersuchung imponiert bei der Mehrzahl der Patienten ein Ikterus, das Courvoisiersche Zeichen ist in bis zu 25% der Fälle positiv (167,283), eine Hepatomegalie liegt bei etwa 65% der Patienten vor (283). Beim Auftreten von einem

Aszites, einem periumbilikalen oder epigastrisch palpablem Tumor beziehungsweise palpabler Lymphknoten in der Fossa supraclavicularis sinistra wird häufig ein fortgeschrittener Krankheitsverlauf mit einer bereits vorliegenden Fernmetastasierung beobachtet (167).

1.1.5 Prognose

Bei Vergleich von 60 unterschiedlichen malignen Tumorarten durch das Annual Cancer Statistics Review zeigte sich für das Pankreaskarzinom mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 2-5% die schlechteste Prognose (123,256,283). Das Pankreaskarzinom stellt in den westlichen Ländern die viert- bis fünfhäufigste Todesursache bei bösartigen Neubildungen dar (24,123,160,167,168,205,283), wobei die unkorrigierte MÜZ (mittlere Überlebenszeit) nach Diagnosestellung bei 3-5 Monaten liegt (43,160,214,250,256,283), nach 1 Jahr sind etwa 90% der Patienten verstorben (74,214). In der Literatur wird lediglich über 150 Patienten mit einem histologisch gesicherten Pankreaskarzinom und einer Überlebenszeit von mehr als 10 Jahren nach Diagnosestellung berichtet (32). Nur 12 dieser Patienten wurden nicht chirurgisch therapiert (32). Nach R0-Resektion liegt die MÜZ bei diesen Patienten bei 12-20 Monate (127). Im beschriebenen Patientenkollektiv liegt die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) bei 10-38% (24,123,250,283).

Nur durch die radikale Resektion kann eine dauerhafte Heilung beim duktalem Pankreaskarzinom erzielt werden. Trotz einer Steigerung der Resektionsraten von ursprünglich 10-15% auf nun etwa 40%, ist die 5-Jahres-Überlebensrate nach wie vor wenig befriedigend (25,72,77,215). Die Hauptursache für die ungünstige Prognose des Pankreaskarzinoms ist ein trotz R0-Resektion auftretendes Lokalrezidiv, das in der Regel innerhalb von 3 Monaten zum Tode führt.

1.1.6 Radio- und Chemotherapie

Infolge geringer Ansprechraten des Pankreaskarzinoms auf konventionelle Radio- und Chemotherapien und einer nur geringen Verlängerung der Überlebenszeit bei gleichzeitig starken Nebenwirkungen haben sich weder adjuvante noch neoadjuvante Therapiekonzepte bislang nicht durchsetzen können, so daß es zur Zeit keine allgemein anerkannte Chemotherapie beim postoperativen Tumorrezidiv gibt (25,59,176,215).

1.1.6.1 Adjuvante Therapiekonzepte

Mit dem Ziel der Reduktion der Lokalrezidivrate nach einer R0-Resektion des Pankreas werden in einigen Kliniken die Radiotherapie und die Chemotherapie zur Prognoseverbesserung beim Pankreaskarzinom eingesetzt. Allerdings führen diese infolge starker Nebenwirkungen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität.

Als adjuvante Verfahren werden die perkutane Bestrahlungstechnik (RT) und die intraoperative Radiotherapie (ioRT) eingesetzt. In einer vergleichenden Studie von Shipley et al (230) bezüglich ioRT versus perkutaner RT zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit, allerdings wurde eine bessere lokale Tumorkontrolle nach der ioRT beschrieben.

In einer randomisierten Studie von Dobelbower et al (59) wurden die Überlebenszeitraten beim kurativ resezierbaren Pankreaskarzinom nach einer alleinigen Resektion, nach einer Resektion + adjuvanten ioRT und nach einer Resektion + adjuvanten ioRT + perkutanen Radiotherapie miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich ein längeres medianes Überleben unter der letztgenannten Therapie (4 versus 3,5 versus 10,5 Monate). Allerdings wird unter einer ioRT über eine erhöhte Rate von Komplikationen berichtet (118).

Neben der Radiotherapie werden auch adjuvante Chemotherapiekonzepte beim Pankreaskarzinom eingesetzt. Diesbezüglich berichten Kalser et al (116) in einer randomisierten Studie über eine verlängerte mediane Überlebenszeit nach einer Radiotherapie (40 Gray) + 5-Fluorouracil (5-FU) im Vergleich zu einer nur kurativ resezierten Patientengruppe (20 versus 11 Monate). Dies zeigte sich ebenfalls in einer erhöhten 2-Jahres-Überlebenszeitrate (43 versus 18%).

In einer Studie von Yasui et al (282) wurde die adjuvante ioRT (33 Gray) mit einer adjuvanten ioRT + 5-FU, Methotrexat + Leukoverin verglichen. Hierbei war auch unter der Radiochemotherapie die Überlebenszeit verlängert, allerdings zeigten sich geringere mediane Überlebenszeiten (4,8 und 8,5 Monate) im Vergleich zur vorgenannten Studie.

1.1.6.2 Therapie des lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms

Beim Vergleich der Überlebenszeitraten nach einer kombinierten Radio-Chemotherapie mit den jeweiligen Einzeltherapien berichteten Moertel (163) und GTSG (75) über einen Überlebensvorteil unter der Kombinationstherapie. Die mediane Überlebenszeit hatte hier 9,6 versus 5,2 Monate (163) beziehungsweise 6,5 versus 5,1 Monate (9) betragen. Hingegen zeigte sich in der von Klaasen durchgeführten Studie diesbezüglich kein Unterschied (8,3 versus 8,2 Monate).

Auch unter Verwendung hochdosierter Chemotherapiekonzepte wurden bisher keine Vorteile bezüglich des Überlebens beobachtet (117,131,206,254).

1.1.6.3 Chemotherapie des metastasierenden Pankreaskarzinoms

Die mittlere Lebenserwartung bei einem metastasierenden Adenokarzinom des Pankreas liegt ohne Therapie bei 3,5 Monaten. Die Chemotherapieverfahren bewirken insgesamt nur eine Überlebensverlängerung von wenigen Monaten bei gleichzeitig starken Nebenwirkungen (103,132,223).

Die wirksamsten Monosubstanzen zur Therapie des metastasierenden Adenokarzinoms des Pankreas sind 5-FU (14,184,249).

Bei einer vergleichenden Studie von Cullinan (49) an 184 Patienten ergab sich für die Polychemotherapieverfahren kein besseres Überleben als für die Monotherapie.

In Studien zur Polychemotherapie beobachteten Gattani (76), Rothman (216) und Verhees (249) mediane Überlebenszeiten zwischen 2,5 und 14 Monaten. In randomisierten Studien wird eine die mediane Überlebenszeit zwischen 2 und 6,5 Monaten angegeben (256).

Auch die Applikation von 5-FU mit Leukovorin (48,54,217,260) oder Alpha-Interferon (164,223) führte zu keinen besseren Ergebnissen.

Die nur geringen Unterschiede hinsichtlich der medianen Überlebenszeit scheinen durch die teilweise nur geringen Fallzahlen der Therapiegruppen bedingt zu sein. Alternativ werden Patienten mit einem fortgeschrittenen Pankreaskarzinom mit Gemcitabinen behandelt. In einer klinischen Studie von Popescu (184) et al führte dies zwar nur bei 23,8% der Patienten zu einem klinischen Benefit, allerdings war dieser Anteil im Vergleich zu einer ausschließlich mit 5-FU behandelten Patientengruppe

erhöht (23,8% versus 4,8%). Ferner zeigte sich unter Gemcitabinen gegenüber 5-FU eine gering verbesserte Überlebenszeit (5,6 versus 4,4 Monate).

Diese Ergebnisse werden durch Gelber (165) bestätigt, der unter einer Gemcitabin-Therapie bei 27% der Patienten eine verbesserte Lebensqualität beobachtete. Ferner beschreiben Ulrich et al (245) eine Reponse-Rate von 21% bei einer medianen Überlebenszeit von 8,8 Monaten. Hierbei handelt es sich um eine Phase-II-Studie, die als Multicenter-Studie bei Patienten mit einem metastasierenden Pankreaskarzinom durchgeführt wurde.

Obwohl Gemcitabine im Vergleich zu 5-FU vom Patienten besser toleriert werden, wird auch hier über deutliche Nebenwirkungen berichtet. Diesbezüglich beschreibt Moore (165) sowohl hämatologische (Granulozytopenie, Anämie) als auch zahlreiche klinische Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen oder Myalgien.

1.2 Studienkonzept

Infolge des aggressiven Wachstums- und Metastasierungsverhaltens des Pankreaskarzinoms ist die Prognose bei bislang unzureichenden Therapiekonzepten infaust. Daher erscheint die Evaluierung alternativer Therapiekonzepte erforderlich, um eine Behandlungsmethode zu entwickeln, die mit einer verlängerten Überlebenszeit bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen und einer akzeptablen Lebensqualität verbunden ist.

Die Haupttodesursache bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom stellt – neben dem Lokalrezidiv eines resezierten Tumors – die Lebermetastasierung dar. Daher wäre die Entwicklung einer Therapie sinnvoll, die zu einer Verminderung beziehungsweise einer Inhibition der Lebermetastasierung führt.

Zur Überprüfung der Effektivität neuer Behandlungskonzepte für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom ist die Etablierung eines standardisierten experimentellen Modells sinnvoll. Als das hierfür geeignetste Tiermodell wird in der Literatur das chemisch induzierte duktales Adenokarzinom des Pankreas des Syrischen Hamsters beschrieben (186,187).

1.2.1 Fragestellungen

1.2.1.1 Ist das von Pour beschriebene Tiermodell eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas im Syrischen Hamster reproduzierbar?

Im Jahr 1974 gelang es erstmalig Pour et al. am Syrischen Hamster (*Mesocricetus auratus*) ein duktales Adenokarzinom des Pankreas durch wiederholte subkutane Injektion von 2,2'-dihydroxy-di-N-propylnitrosamin (DIPN) zu induzieren (186,187). Allerdings traten hierbei simultan Malignome in Respirationstrakt, Leber und Niere bei fast allen Tieren auf (186,187). Weitere Experimente mit anderen Nitrosaminderivaten führten schließlich zum N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP)-Modell (187) eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas.

Die Substanz BOP verfügt über eine fast 100%ige Pankreasspezifität mit einer extrem geringen Tumorinzidenz in andere Organsystemen (187), die ersten Karzinome treten laut Literaturangaben nach 15 Wochen auf, nach 30 Wochen erreicht ihre Inzidenz 90-100% (184). Die Pankreastumore entstehen multizentrisch, etwa die Hälfte ist makroskopisch sichtbar und ihre histologischen Eigenschaften (gute bis mäßige Differenzierung, Bildung duktales und papillärer Strukturen, Begleitdesmoplasie, neurale und lymphatische Infiltration) sind gut mit dem humanen Pankreaskarzinom vergleichbar (187). Weitere Parallelen zum humanen Pankreaskarzinom stellen neben einem Gewichtsverlust, einer Diarrhoe, vaskulären Thrombosen und einem Ikterus ein Diabetes mellitus dar (82,147,187,257). Die hohe Induktionsrate des Pankreaskarzinoms und eine relativ kurze Latenzzeit von etwa 7-8 Monaten sowie die gute Vergleichbarkeit des induzierten Karzinoms mit vielen Eigenschaften des humanen Pankreaskarzinoms lassen das Hamstermodell des BOP-induzierten Adenokarzinoms des Pankreas als sinnvollstes Modell für Therapieentwicklungen für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom erscheinen.

Allerdings war unklar, ob sich dieses Tiermodell standardisiert reproduzieren ließ. Anhand der Literaturangaben haben wir dieses Modell in unserer Klinik etabliert.

1.2.1.2 Modifikation des Modells zur Steigerung der Lebermetastasierung

Zur Evaluierung neuer Therapiekonzepte auf das Wachstumsverhalten von Lebermetastasen beim fortgeschrittenen duktales Pankreaskarzinom bedarf es eines standardisierten Tiermodells, das über eine hohe Inzidenz von Lebermetastasen

verfügt. Eine bislang für dieses Modell beobachtete Lebermetastaseninzidenz von 20-30% erschien uns zu niedrig, da wir in diesem Fall eine sehr große Gruppenstärke für die Tierversuche benötigt hätten. Aufgrund der restriktiven Handhabung der Genehmigungsverfahren durch die Tierschutzkommission erschien uns daher eine Steigerung der Lebermetastasierung in diesem Modell notwendig.

Unter einer Modifikation der enteralen Fettzufuhr und der Zusammensetzung des Nahrungsfetts wurde im Rattenmodell eine Erhöhung der Inzidenz von azinären Pankreaskarzinomen mit dem Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Nahrung beobachtet (5,8,9,11,27,29,205,257), wobei dies primär durch die Linolsäure (LA) bedingt zu sein scheint, während beispielsweise Eicosapentaensäure (EPA) bei anderer Zusammensetzung der übrigen, im Futter enthaltenen, Fettsäuren diese Wirkung nicht zeigte (8,257). Diesbezüglich beobachtete Hasler (84), daß α -Linolensäure (ALA) die durch Gap-Junctions vermittelte interzelluläre Kommunikation inhibierte und möglicherweise über diesen Mechanismus die Rate von Primärtumoren eines Pankreaskarzinoms erhöhte.

Im Modell des duktales Adenokarzinoms des Pankreas des Syrischen Hamsters wurden für gesättigte und ungesättigte Fettsäuren ebenfalls prokarzinogene Effekte bezüglich des Primärtumors beobachtet, der genaue Pathomechanismus ist allerdings ungeklärt (9,90,91,122,147,174,187,257,261). Ausgehend von einer Inzidenz der Lebermetastasen von 20-30% untersuchten wir daher, ob die Inzidenz, Größe oder Anzahl von Lebermetastasen im verwendeten Tiermodell durch eine erhöhte Konzentrationen von ALA und LA gesteigert werden kann.

In der Literatur wird vermutet, daß die nicht-enzymatische Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA=polyunsaturated fatty acids) an der Karzinogenese und Lebermetastasierung beteiligt ist (10,11,51,165,197). Infolgedessen untersuchten wir, ob eine durch α -Linolensäure in Kombination mit Linolsäure gesteigerte Lebermetastasierung mit einer gesteigerten Lipidperoxidation vergesellschaftet ist. Ferner analysierten wir, ob hierdurch auch die Aktivität der Lipidperoxidations-Schutzenzyme GSHPX und SOD beeinflusst wird.

1.2.1.3 Behandlungskonzepte zur Inhibition des Wachstums von Lebermetastasen

Nach der Etablierung eines Tumormodells mit einer hohen Inzidenz von Lebermetastasen evaluierten wir den Einfluß von 3 verschiedenen medikamentösen Behandlungskonzepten auf das Wachstumsverhalten von Lebermetastasen beim Pankreaskarzinom. Da wir als Folge der Verwendung einer fettreichen Experimentaldiät zur Förderung der Lebermetastasierung ebenfalls eine Steigerung des Lipidperoxidations-Stoffwechsels beobachtet hatten, untersuchten wir ferner den Einfluß verschiedener Therapiekonzepte auf den hepatischen Lipidperoxidationsstoffwechsel. Infolge der histologischen Ähnlichkeit dieses Tiermodells zum humanen duktalem Pankreaskarzinom und einem ähnlichen Metastasierungsverhalten erscheinen Rückschlüsse auf die Effizienz der untersuchten medikamentösen Therapieverfahren beim humanen Pankreaskarzinom möglich. Da die Überlebenszeit nach Diagnosestellung eines duktalem Pankreaskarzinoms nur wenige Monate beträgt, wählten wir zur Wahrung der Lebensqualität ausschließlich nebenwirkungsarme Behandlungskonzepte aus. Folgende Therapiekonzepte wurden evaluiert:

1.2.1.3.1 Octreotid und Tamoxifen

In der Literatur liegen Studien zur Behandlung des fortgeschrittenen duktalem Adenokarzinoms des Pankreas mit Octreotid und Tamoxifen vor (214,215). Hierbei zeigte sich unter einer medikamentösen Dauertherapie eine verlängerte Überlebenszeit gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (215). Allerdings handelte es sich bei diesen Studien um nur geringe Patientenzahlen, darüberhinaus bestand die Vergleichsgruppe aus einer historischen Kohorte.

Ferner war unbekannt, ob lediglich die Kombinationstherapie mit Octreotid und Tamoxifen oder auch die Einzeltherapie zu einer Verminderung des Tumorwachstums beim Pankreaskarzinom führt. Zudem war der mögliche Wirkungsmechanismus von Octreotid und Tamoxifen auf das Tumorwachstum beziehungsweise die Lebermetastasierung beim Pankreaskarzinom bislang ungeklärt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung erschien ein standardisiertes experimentelles Vorgehen an einem soliden Tumormodell sinnvoll. Hierbei untersuchten wir zunächst, ob die Kombinationstherapie einen stärkeren Einfluß als die Einzeltherapie auf die

Lebermetastasierung hat. Zur Klärung des Wirkungsmechanismus von Octreotid und

Tamoxifen analysierten wir das Gewebe von Lebermetastasen auf Somatostatin- und Östrogenrezeptoren.

Zur Klärung der Wirkung von Octreotid auf das Pankreaskarzinom untersuchten wir, ob eine unter der Hochfettdiät (zur Steigerung der Lebermetastasierung) erhöhte Lipidperoxidation durch die Therapie mit Octreotid reduziert wird, und ob gleichzeitig die Aktivität der Lipidperoxidations-Schutzenzyme Gluthationperoxidase (GSHPX) und Superoxiddismutase (SOD) erhöht werden kann.

Die zugrundeliegende Hypothese lautete, daß die Therapie mit Octreotid zu einer Erniedrigung der intrahepatischen Lipidperoxidation und/oder zu einer Steigerung der intrametastatischen Lipidperoxidation führen und somit die Metastasierung erniedrigen könnte.

1.2.1.3.2 Vitamine A, C und E

In den letzten Jahren wurde vor allem die Rolle antioxidativ wirkender Vitamine in der Karzinogenese von Tumorerkrankungen diskutiert. Definitive Aussagen über protektive Wirkungen sind bisher jedoch noch nicht möglich (63,188). Fast alle vorliegenden klinischen Studien sind epidemiologischer Art und stützen sich entweder auf Ernährungserhebungen oder gemessene Blutwerte. Es wurde weder der Einfluß von Vitaminen auf das Metastasierungsverhalten des Pankreaskarzinoms untersucht, noch wurden biochemische Quantifizierungen des Einflusses der einzelnen Vitamine auf die Lipidperoxidation insbesondere in den Lebermetastasen vorgenommen. Das Verständnis der zugrundeliegenden Wirkmechanismen ist aber für die Entwicklung neuer Behandlungskonzepte von grundlegender Bedeutung.

Vor allem reaktive Sauerstoffspezies schädigen Endothelzellen des Gefäßsystems und werden deshalb auch für ein Ansteigen der Metastasierungsrate verantwortlich gemacht (130,242).

Die Experimentaldiät mit einem erhöhten Fettsäureanteil führt in unserem Tiermodell zu einer Steigerung der Lebermetastasierung. Hierdurch wird die Lipidperoxidation erhöht und die Aktivität der Lipidperoxidations-Schutzenzyme GSHPX und SOD vermindert. Da Vitamine als Radikalfänger wirken untersuchten wir, ob die Vitamine A, C und E zu einer Verminderung der Lipidperoxidation und einer Steigerung der Aktivität der Lipidperoxidationsschutzenzyme führen. Darüberhinaus analysierten wir, ob eine

Korrelation zwischen dem Einfluß der Einzeltherapie mit Vitamin A, C und E auf die Lipidperoxidation einerseits und der Inzidenz, Größe und Anzahl von Lebermetastasen pro Tier andererseits besteht.

1.2.1.3.3 Celebrex (COX-2-Inhibitor) und Zyflo (5-LOX-Inhibitor)

Biochemisch können nach Phospholipase A₂-gesteuerter Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden zwei Hauptwege des Eicosanoidstoffwechsels unterschieden werden. Der erste Stoffwechselweg führt über das Enzym Cyclooxygenase (COX) zur Synthese von Prostaglandinen, der zweite Stoffwechselweg führt über verschiedene Lipoxygenasen (LOX) zur Bildung von Leukotrienen und Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE) (52,151,247,275,181).

In den letzten Jahren konnte für bestimmte Tumorarten ein Zusammenhang zwischen einer verstärkten Prostaglandinsynthese und einer erhöhten Invasivität und Aggressivität des Tumorwachstums nachgewiesen werden (112,137,151,238,243,265). Der genaue zugrundeliegende Pathomechanismus ist allerdings bislang ungeklärt. Primär scheinen für das gesteigerte Tumorwachstum Produkte der Cyclooxygenase-2 (COX-2) verantwortlich zu sein, bei der es sich um die induzierbare Isoform 2 der COX handelt (112,247,258). In der Literatur wird diskutiert, daß Prostaglandine möglicherweise in die Steuerung der Apoptose und Angiogenese involviert sind (13,137,151,185,247). Leukotriene und HETE scheinen hingegen maßgeblich für das Metastasierungsverhalten verantwortlich zu sein (1,107,128). So konnte nachgewiesen werden, daß eine gesteigerte Synthese des Leukotriens LTB₄ und von 5-HETE verschiedene Tumore zur Synthese von Kollagenase IV befähigt (13,186). Dieses Enzym wiederum ist Voraussetzung für die Degradation von Basalmembranen, welche hauptsächlich aus Kollagen Typ IV bestehen. Die Degradation von Basalmembranen stellt wiederum eine wichtige Voraussetzung für die Metastasierung dar (13,186).

Während der Einfluß der Eicosanoide auf das Wachstums- und das Metastasierungsverhalten des Kolon-, Mamma- und Bronchialkarzinoms bereits intensiv untersucht wurde (13,186,231), ist der Einfluß der Eicosanoide auf das Pankreaskarzinom bislang ungeklärt (5,90,225). Daher erscheint es sinnvoll den Einfluß der selektiven Hemmung der COX-2 und der 5-LOX sowie der dualen COX-2/5-LOX-Inhibition auf das Tumorwachstum und die Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen am Tiermodell des duktales Pankreaskarzinoms zu untersuchen.

Darüberhinaus ist bislang ungeklärt, ob die COX-2- beziehungsweise 5-LOX-Inhibition den intra- beziehungsweise perimetastatischen Lipidperoxidationsstoffwechsel und die Aktivität der Lipidperoxidationsschutzenzyme beeinflusst.

1.2.2 Zweck der Studie

Der Zweck der Studie besteht somit in der Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Ist das von Pour et al beschriebene Tiermodell eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas standardisiert reproduzierbar?
2. Ist eine Steigerung der Inzidenz der Lebermetastasen durch eine Modifikation der enteralen Ernährung an diesem Modell möglich?
3. Hat die medikamentöse Behandlung mit Octreotid/Tamoxifen, den Vitaminen A,C und E beziehungsweise die selektive Hemmung der COX-2 und der 5-LOX einen Einfluß auf die Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen beim duktales Pankreaskarzinom?
4. Beeinflussen die genannten Therapiekonzepte den intra- beziehungsweise perimetastatischen Lipidperoxidationsstoffwechsel und die Aktivität der Lipidperoxidationsschutzenzyme?

1.3 Das Somatostatinkonzept

1.3.1 Gesicherte Indikationen

Octreotid kam erstmals bei Patienten mit therapieresistenter Akromegalie infolge eines endokrin aktiven Hypophysenadenoms zum klinischen Einsatz (182), anschließend wurde Octreotid ebenfalls zur Symptomkontrolle bei Patienten mit endokrin aktiven Tumoren des Gastrointestinaltraktes verabreicht. Diesbezüglich gilt Octreotid heute als Mittel der 1. Wahl beim Karzinoid-Syndrom, Verner-Morrison-Syndrom und beim Glukagonom (16,17,100,156) während bei Gastrinomen und Insulinomen bislang keine Symptombesserung durch eine Octreotidbehandlung beobachtet wurde (16). Darüberhinaus stellen akute Blutungen im oberen Gastrointestinaltrakt, wenn diese durch Ösophagusvarizen bei Leberzirrhose bedingt sind, eine weitere Indikation für Octreotid dar (156), wobei die vasokonstriktorische Wirkung von Octreotid im Splanchnikusgebiet ausschlaggebend zu sein scheint (156). Ferner wird Octreotid auch

bei Pankreaspseudo- und enterokutanen Fisteln erfolgreich appliziert (156).

Auch in der Pankreaschirurgie wird Octreotid regelmäßig eingesetzt, unter der prä- und postoperativen Octreotid-Gabe konnte eine signifikante Reduktion postoperativer Komplikationen (Pankreasfistel, Abszess, Sepsis und pulmonale Insuffizienz) beobachtet werden, welche vermutlich durch die Inhibition der exokrinen Pankreassekretion bedingt ist (34).

1.3.2 Somatostatin beim Pankreaskarzinom

Der Einfluß von Somatostatin auf das Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms wurde sowohl durch in-vitro-Untersuchungen als auch an tierexperimentell etablierten Zelllinien sowie an Zellen humaner Karzinome evaluiert. Allerdings sind die vorliegenden Ergebnisse kontrovers. Diesbezüglich wird berichtet, daß einige aus azinären Pankreaskarzinomen der Ratte gewonnene Zelllinien (AR42J, CA20948) durch Octreotid und RC-160 in ihrem Wachstum inhibiert werden. Hingegen sind in diesem Zusammenhang keine Studien an Zelllinien aus duktalem Pankreaskarzinom des Hamsters bekannt (19,195,201,251,252). Allerdings wurde das Wachstum der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 in einigen Studien durch Octreotid und RC-160 gehemmt (53,68,190), in verschiedenen anderen Studien konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden (77,138,139). Von der Vielzahl der weiterhin untersuchten humanen Pankreaskarzinomzelllinien (CAPAN-1, CAPAN-2, CAV, PANC-1, AsPC-1, BxPC-3, CFPAC-1, Hs766T, SU.86.86, SOJ-6, SKI) konnten bisher SKI, CAV, CFPAC-1 und BxPC-3 in ihrem Wachstum durch Octreotid und/oder RC-160 gehemmt werden (190,240,246). In den in der Literatur vorliegenden Studien wurde hingegen das Wachstum aller anderen o.g. Zelllinien nicht durch Somatostatinanaloga inhibiert (68,77,239).

Redding et al. beobachteten 1984 eine Wachstumsinhibition durch verschiedene Somatostatinanaloga im Modell des Azaserin-induzierten Pankreaskarzinoms der Ratte (195). In den darauffolgenden Jahren wurde auch beim Tiermodell des BOP-induzierten duktalem Adenokarzinoms des Pankreas des Hamsters eine Wachstumsinhibition durch RC-160 und Octreotid nachgewiesen (179,222,236,237,285). Allerdings liegen bislang keine experimentellen Ergebnisse über den direkten Vergleich verschiedener Somatostatinanaloga in einem soliden Tiermodell vor.

In der Literatur wird der Einfluß von Octreotid auf das humane Pankreaskarzinom kontrovers diskutiert. In einigen Studien wurde eine Verlängerung der MÜZ unter einer Behandlung mit Octreotid beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom beziehungsweise beim Tumorrezidiv des Pankreaskarzinoms beobachtet, wobei Rosenberg et al. die Octreotidtherapie mit der Gabe des Antiöstrogens Tamoxifen kombinierten (42,73,215,262). Poston et al wiesen auch für die Therapie mit RC-160 eine verlängerte MÜZ nach (185), hingegen konnte in verschiedenen anderen Studien unter der Behandlung mit Somatostatinanaloga keine Verlängerung der MÜZ beim Pankreaskarzinom festgestellt werden (61,66,72,101,124). Neben der Art des Somatostatinanalogons scheint jedoch auch die Dosierung von Octreotid einen Einfluß auf das Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms zu haben. So zeigten Friess et al., daß für die beschriebenen sehr unterschiedlichen Ergebnisse die jeweils verwendete Dosis verantwortlich sein könnte, da Friess lediglich bei hohen Dosierungen von Octreotid eine Verlängerung der MÜZ beobachtete (73,74). Trotz der beschriebenen Verlängerung der MÜZ unter der Octreotid-Therapie wurde bislang keine Objektivierung der Ansprechraten im Sinne einer Tumorverkleinerung beschrieben. In klinischen Studien wurde jedoch durch verschiedene Autoren ein signifikante Verbesserung der globalen und/oder der gastrointestinalen Lebensqualität erhoben, allerdings sind die Ursachen für diesen Effekt bislang nicht erklärbar (42,66,184,215,262). Im Vergleich zu konventionellen Chemotherapien, zum Beispiel mit 5-Fluorouracil, wurden unter der Octreotid-Therapie nur geringe Nebenwirkungen bei einer gleichzeitig verlängerten Überlebenszeit und einer verbesserten Lebensqualität beobachtet (72,73,215,262).

1.3.3 Somatostatin-Rezeptoren

Zunächst erfolgte die Isolation von natürlichem Somatostatin aus Hypothalami von Schweinen, die Aufklärung der Struktur von Somatostatin gelang schließlich durch Bruzeau (32). Während als Wirkung von Somatostatin zunächst nur die Hemmung der hypophysären Sekretion von Wachstumshormon galt (187) entdeckte man, daß Somatostatin in vielen Organen des Menschen synthetisiert wird und vielfältige Wirkungen besitzt, die vor allem inhibitorischer Natur sind (181,183). Die antiproliferative Wirkung von Somatostatin auf viele Zelltypen höherer Organismen (52,183) scheint durch apoptoseinduzierende Effekte bedingt zu sein (228). Während

Somatostatin die Produktion oder Sekretion vieler regulatorischer Peptide, wie Insulin, Glukagon, Gastrin, Sekretin, Cholezystokinin, vasoaktivem intestinalem Polypeptid, Motilin und Peptid YY inhibiert (17,18,68,156,183,198,222,258) wird neben der biliären und gastrointestinalen Motilität auch die pankreatische Sekretion von Bikarbonat und Proteinen durch Somatostatin beeinflusst (16). Daneben hemmt Somatostatin die Produktion von IGF-1 (insulin-like growth factor), EGF (epithelial growth factor) und TGF- α (transforming growth factor) (26,183,202,258).

Die Wirkung von Somatostatin wird über spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren vermittelt, von denen bislang 5 Subtypen bekannt sind und die als SSTR1-5 (somatostatin receptor) bezeichnet werden (19,26,183). Bei den 5 Subtypen handelt es sich um membranständige integrale Proteinhormonrezeptoren mit 7 Transmembrandomänen (26,183), wobei zwischen den SSTR-2, -3, und -5 Sequenzhomologien bis zu 90% und zwischen den SSTR-1 und -4 Homologien bis zu 80% bestehen (26,97). Allerdings betragen die Sequenzhomologien zwischen diesen beiden Gruppen nur 50-60% (26,97). Während die Interspeziesidentität sehr hoch zu sein scheint, ist die Intraspeziesidentität mit anderen membranständigen Rezeptoren nur gering ausgeprägt (26,183). Der beim Menschen am häufigsten exprimierte Subtyp ist der SSTR-2, welcher am zahlreichsten im ZNS und in der Niere vorkommt (279). Während sich der SSTR-1 am häufigsten im Gastrointestinaltrakt findet, scheint das Vorkommen des SSTR3 auf das Großhirn beschränkt zu sein (26,97,183). Über die physiologische Verteilung der SSTR-4 und -5 ist bisher wenig bekannt (183,193,194). Nach der Bindung von Somatostatin an seinen Rezeptor wird die intrazelluläre Aktivität der Adenylatzyklase inhibiert, wobei noch nicht hinreichend geklärt ist, ob alle 5 Rezeptor-Subtypen diese Funktion über Pertussistoxin-sensitive Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) ausüben (183,202). Nach Aktivierung von SSTR-2 und eventuell auch von SSTR-1 wird die Phosphotyrosin-Phosphataseaktivität mit folgender Inaktivierung von Tyrosinkinase gesteigert (183). Darüberhinaus hat der SSTR-2 Verbindung zu K⁺- und Ca²⁺-Kanälen der Zellmembran und beeinflusst somit auch die Membranpolarisation (183). Darüberhinaus stimulieren die SSTR-2 und -5, möglicherweise aber auch alle anderen Subtypen, die intrazelluläre Aktivität der Phospholipase C (183,202). Bezüglich des SSTR-5 vermuten Buscail et al. zusätzlich eine Wirkung über den Phosphoinositol-Kalzium-Weg (35,36).

1.3.4 Synthetische Somatostatin-Analoga

1.3.4.1 Entwicklung

Aufgrund der vielfältigen physiologischen Wirkungen erschien Somatostatin schon kurz nach seiner Entdeckung als pharmakologisch interessante Substanz. Da die potentiell therapeutisch verwertbaren Funktionen von Somatostatin jedoch durch die mit 3 min extrem kurze Plasmahalbwertszeit und das fehlende Wissen über die SSTR stark limitiert war, wurde mit der Entwicklung synthetischer Analoga begonnen (16,22,97,183,190,279). Hiervon sind heute nur noch drei Präparate klinisch relevant: hierzu gehören das von Bauer et al. entwickelte SMS201-995 (Octreotid, neuerdings auch Octreotid-Monatsdepot LAR) sowie die von Veber et al. bzw. Cai et al. entwickelten Komponenten RC-160 und BIM23014 (Somatuline) (22,38). Diese drei Somatostatin-Analoga binden an den SSTR-2 mit annähernd gleicher, hoher Affinität. Ferner binden RC-160 und Octreotid mit moderater Affinität an den SSTR-3, darüber hinaus bindet RC-160 mit geringer Affinität an den SSTR-4, an welchen Octreotid nicht bindet. Darüberhinaus binden beide Analoga nicht an den SSTR-5. Somatuline bindet mit gleich hoher Affinität an die SSTR2, 3 und 5, an die SSTR-1 und -4 hingegen nicht (41,97,183,193,202). Für neuere Analoga wie CGP23996 oder MK678 ist binden vorrangig an die SSTR-2 und -3 mit den unter 1.2.1. beschriebenen biochemischen Auswirkungen.

1.4 Einfluß der Vitamine A, C und E auf die Karzinogenese

Aufgrund der zentralen Rolle des Radikalenstoffwechsels in der Karzinogenese sind insbesondere antioxidativ wirkende Vitamine für die Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen von großem Interesse (199). Allerdings ist bislang ungeklärt, inwieweit die Vitamine A, C und E das Wachstumsverhalten von Lebermetastasen beim duktalem Pankreaskarzinom beeinflussen.

1.4.1 Vitamin A

In einigen tierexperimentellen Studien konnte Vitamin A das Auftreten von induzierten Tumoren verhindern, doch inwieweit es wirklich Einfluß auf die Inzidenz von Tumorerkrankungen hat, wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert (199,275).

Teilweise inverse signifikante Zusammenhänge wurden in Bezug auf die Serumretinolkonzentration und die Inzidenz von Pankreas-, Mamma-, Cervix- und Prostatakarzinom gefunden (188). Keine oder nur mäßige Zusammenhänge wurden zwischen dem Vitamin A-Konsum und der Inzidenz des Bronchial- sowie Ovarialkarzinoms festgestellt (62). In Studien an Kolonkarzinom-Zelllinien von Ratten inhibierte Vitamin A die Zellproliferation und induzierte die Apoptose (154).

Vitamin A gehört chemisch zu den Isoprenoidlipiden. Der Organismus nimmt es teils direkt oder in Form der Provitamine, der Carotinoide, auf. Vitamin A hat keinen einheitlichen Wirkmechanismus, sondern Funktionen in diversen Bereichen. Es wirkt so z.B. auf Wachstum, Entwicklung und Differenzierung des gesamten epithelialen Gewebes (234). Hierbei sind Retinol und Retinsäure wirksam, die eine Zunahme der Rezeptordichte für den sog. epidermalen Wachstumsfaktor bewirken und die Bildung von „gap-junctions“ stimulieren (278). Es wird vermutet, daß Vitamin A durch Beeinflussung der Genexpression und der Glykoproteinsynthese auf verschiedene nukleäre und extranukleäre Ebenen regulierend eingreift. Eine bedeutende Rolle kommt Vitamin A weiterhin im Sehvorgang zu. Vermutlich beeinflusst es auch die Immunabwehr des Organismus positiv (278).

1.4.2 Vitamin C

Im Organismus stellt Vitamin C gemeinsam mit den Tocopherolen das wichtigste alimentäre Redoxsystem dar (63). Mit Vitamin E steht Vitamin C im engen Zusammenspiel bei der Abwehr reaktiver Sauerstoffradikale. Es übt eine Schutzwirkung auf Thiamin, Riboflavin, Panthotensäure, Biotin, Folsäure, Vitamin A und E aus. Andererseits schützen reduzierende Agentien wie Glutathion und Cystein die Ascorbinsäure vor Oxidation. Desweiteren hemmt Ascorbinsäure die Bildung von Nitrosaminen aus Nitrit und sekundären Aminen (240). Eine Reihe von weiteren Einflüssen auf das Immunsystem und auf endokrine Regelsysteme werden diskutiert. Als Teil des antioxidativ wirkenden Redoxsystems läßt sich auch bei Vitamin C ein antikanzerogener Effekt vermuten. Eine Vielzahl von Studien haben einen inversen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Ascorbinsäure und Tumorinzidenz postuliert (188). So konnte teilweise eine inverse Korrelation im Auftreten von Magen-, Ösophagus, Mamma- und Bronchialkarzinom festgestellt werden, jedoch sind die Ergebnisse über den protektiven Effekt uneinheitlich (275).

1.4.3 Vitamin E

Vitamin E umfaßt alle Tocopherol- und Tocotrienolderivate, wobei α -Tocopherol die bioaktivste Form darstellt. Die Wirkungen der Tocopherole sind vielfältig. Sicherlich spielt die antioxidative Wirkung und ihre Fähigkeit, aggressive Sauerstoffradikale unschädlich zu machen, eine besondere Rolle. Als fettlösliches Vitamin ist Tocopherol in der Lage, insbesondere die Membransysteme der Zelle vor der Lipidperoxidation zu schützen (88,104). Als kettenabbrechendes Antioxidanz beendet es Kettenreaktionen während der Lipidperoxidation, die durch freie Radikale ausgelöst wurden (46). Hierbei reduziert Vitamin E anfallende Lipidperoxyl-Radikale zu Lipidperoxiden, welche weiter mit Hilfe der GSHPX unschädlich gemacht werden.

In einer tierexperimentellen Studie beispielsweise berichteten Williams et al. nach einer Vitamin E-Mangelernährung über eine gesteigerte Empfindlichkeit der hepatischen Mikrosomen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies und erhöhter Lipidperoxidation (277). Über die antioxidative Wirkung hinaus werden auch eine direkte stabilisierende Wirkung auf biologische Membranen vermutet (104). Erhöhte Aktivitäten von Xanthinoxidase und Kreatinkinase im Serum von Tieren mit Vitamin E-Mangel wurden als Hinweis gewertet, daß Tocopherol ebenfalls regulierend auf die Synthese verschiedener Enzyme wirkt (150).

Die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Vitamin E-Aufnahme und der Inzidenz bestimmter Tumorerkrankungen besteht, wird kontrovers diskutiert (63,130). Zwar wurden bei Untersuchungen des Einflusses von Vitamin E auf das Bronchial-, Colon-, Pankreas- bzw. Schilddrüsenkarzinom teilweise deutliche Tumorstimmungs-inhibitionen beobachtet (62,69,188), die bisherigen Ergebnisse machen definitive Aussagen jedoch zum jetzigen Zeitpunkt unmöglich. Somit erscheinen weitere Untersuchungen zur Evaluierung der Effekte von Vitaminen auf die Karzinogenese erforderlich.

1.5 Lipidperoxidation und oxidativer Stress

1.5.1 Bedeutung der Hochfetterernährung und der Lipidperoxidation in der Karzinogenese und Metastasierung

Die Ernährung scheint die Entstehung vieler maligner Tumore, insbesondere im Gastrointestinaltrakt, zu beeinflussen. Insbesondere die Fettsäurenkomposition wird als wichtiger Faktor für die Karzinogenese und Metastasierung diskutiert (85,98,108,113,140,143,178). Diesbezüglich gelang uns im Tiermodell des chemisch induzierten Pankreaskarzinoms der Nachweis einer durch Supplementierung von Linolsäure (LA) und Linolensäure (LnA) erhöhten Lebermetastasierung (261). Auch durch andere Arbeitsgruppen wurde eine wachstumsfördernde Wirkung von LA auf die Tumorzellen im gleichen, aber auch in anderen Tumormodellen und in in-vitro-Untersuchungen, nachgewiesen (99,108,114,140). Demgegenüber wurden für andere Fettsäuren, beispielsweise γ -Linolensäure (GLA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) proliferationsinhibierende Effekte bei verschiedenen Karzinomen sowohl in vitro als auch tierexperimentell beobachtet (65,67,86,135,211,220,248). Auch LnA zeigte in einigen Studien antiproliferative Effekte (67,113), während unter der Ernährung mit EPA wachstumsfördernde Aktivitäten beobachtet wurden (8-11,178).

Die Vermutung, daß vor allem die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) der n-3-Serie eine wachstumshemmende Wirkung haben und die PUFA der n-6-Serie eher wachstumsfördernde Effekte aufweisen, ist nicht mehr aufrecht zu erhalten, da auch n-3-PUFA (EPA) proliferationsfördernde Effekte und n-6-PUFA (LnA) antiproliferative Eigenschaften gezeigt haben. Zwar beobachteten Hawkins et al., daß das Ausmaß der antiproliferativen Wirkung der PUFA mit der Anzahl der Doppelbindungen zunimmt (84), andererseits war in anderen Studien die nur 3-fach ungesättigte GLA wirksamer als die 6-fach ungesättigte DHA, so daß hier kein allgemeingültiges Phänomen vorzuliegen scheint (108,114).

Die Klärung dieser Frage wird allerdings dadurch erschwert, daß bei normaler Ernährung sowohl des Menschen als auch der Versuchstiere in Tiermodellen immer Gemische aller PUFA in unterschiedlichen Relationen vorliegen. Dies ist insofern unverzichtbar, da LnA und LA essentielle Fettsäuren (EFA) darstellen, deren Synthese

vom Körper nicht geleistet werden kann. Die Synthese ihrer Downstream-Metaboliten (EPA und DHA sowie Arachidonsäure [AA]) ist nur möglich, wenn die Zelle über Desaturasen und Elongasen zur Einfügung von Doppelbindungen und zur Kettenverlängerung verfügt. Hierdurch könnte die antiproliferative Wirkung bestimmter PUFA auf Tumorzellen bedingt sein. Diese exprimieren häufig keine Desaturasen, können also PUFA nicht weiter entsättigen (95), so daß ihnen das Substrat zur Lipidperoxidation fehlt. In einer Studie von Horrobin führte die Zugabe von hochungesättigten Fettsäuren (HUFA) wie EPA oder DHA zur Überbrückung dieses Stoffwechselweges zu einer exzessiven Produktion von Lipid-superoxiden und sukzessive zum Zelltod (95). Fraglich ist die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses, da Tumorzellen in bisherigen Studien nur in einem geringen Ausmaß durch eine gesteigerte Lipidperoxidation geschädigt wurden (115). Andererseits könnten die o.g. Ergebnisse die fehlende antiproliferative Wirkung von weniger ungesättigten Fettsäuren (LA, LnA) erklären, da diese ein schlechteres Substrat für die Lipidperoxidation darstellen und von den Tumorzellen nicht zu besseren Substraten uti-lisiert werden können. Dennoch deuten die Literaturergebnisse darauf hin, daß es bei einer Steigerung der Lipidperoxidation in Tumorzellen – auch bei einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Lipidperoxiden – letztendlich zu Membranschäden und zum Tumorzelltod kommt (106).

Auch der Einfluß der PUFA auf die Invasivität und Metastasierung der Tumorzellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Metastastierungskaskade, das heißt die Invasion und die Etablierung von Metastasen, verläuft über mehrere getrennte Schritte. Hierbei gelten als wichtigste Vorgänge die Zell-zu-Zell-Adhäsion im Primärtumor, die Adhäsion und Invasion durch Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix, die Intravasation, die Verschleppung in der Zirkulation und das Überleben der dortigen Immunmechanismen, die Adhäsion am Endothel und die folgende Extravasation sowie die Etablierung sekundärer Foci mit Neovaskularisation und Angiogenese. In experimentellen Studien beobachteten Jiang et al, daß beispielsweise die Zell-zu-Zell-Adhäsion im Tumor durch bestimmte PUFA begünstigt und somit das Invasionspotential gesenkt wird (108,109). Andererseits wird die Adhäsion der Tumorzellen an der extrazellulären Matrix durch PUFA erniedrigt, wodurch ebenfalls die Invasivität verringert sein könnte (108,114,161,212,213). In diesem Zusammenhang wurde in einigen tierexperimentellen Studien eine erniedrigte Anzahl von Tumorzellen in

den peritumoralen Blutgefäßen beschrieben (98,99), allerdings ist dieser Effekt bisher nur für EPA und DHA detaillierter untersucht worden (55,56,106,213). Weiterhin liegen in der Literatur experimentelle in-vivo beziehungsweise in-vitro-Studien vor, in denen eine Förderung der Metastasierung oder des Invasionspotentials durch PUFA nachgewiesen werden konnte (5,8-11,261). Allerdings ist der Zusammenhang zwischen PUFA und der Metastasierung einerseits sowie der Lipidperoxidation andererseits bisher nur unzureichend untersucht worden (106,155,197,259).

1.5.2 Definition und Vorkommen der Lipidperoxidation

Aerobe Organismen sind der Entstehung von Sauerstoffradikalen ausgesetzt, als Radikale werden Moleküle mit einem ungepaarten Elektron im Außenorbital bezeichnet. Der Begriff „Sauerstoffradikale“ erfaßt sowohl freie O_2 -Radikale wie auch nicht radikalische reaktive Sauerstoffspezies. Das entscheidende Merkmal der Sauerstoffradikale ist ihre enorme Reaktionsfähigkeit, als Sauerstoffradikale im weitesten Sinne bezeichnet man die in Tab. 1 aufgeführten Substanzen.

Tab. 1: Sauerstoffradikale und ihre Entstehung (93,192)

<u>Formel</u>	<u>Name</u>	<u>Entstehung</u>
$\cdot O_2^-$	Superoxidradikal	Leukozytenaktivierung, Autooxidationsreaktionen, Elektronentransport
$\cdot OH$	Hydroxylradikal	Bildung aus dem Superoxidradikal
1O_2	Singulett-Sauerstoff	Bildung aus Wasserstoffperoxid
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	nicht-enzymatische Bildung aus $\cdot O_2^-$, direkte Bildung aus O_2
$RO\cdot$	Alkoxyradikal	Lipidperoxidationsprodukt
$ROO\cdot$	Peroxyradikal	Lipidperoxidationsprodukt
$ROOH$	Lipidhydroperoxid	Lipidperoxidationsprodukt
$R\cdot$	Lipidradikal	Lipidperoxidationsprodukt
$\cdot OCl$	Hypochlorit	Reaktionsprodukt der Myeloperoxidase

Superoxidradikale, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale werden im Rahmen der Elektronentransportkette in den Mitochondrien nahezu jeder Körperzelle werden gebildet (49), in Peroxisomen entsteht in hohem Maße Wasserstoffperoxid (190). Infolge inflammatorischer Vorgänge erfolgt die Aktivierung von Makrophagen und führt zu einem starkem Anstieg ihres Sauerstoffverbrauchs, wobei ca. 70% des gebildeten Sauerstoffs in Superoxidradikale umgewandelt werden (83,219,270). Darüberhinaus bewirken der Katecholaminmetabolismus und die Aktivierung der Arachidonsäurekaskade mit konsekutiver Eicosanoidsynthese die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (152).

Sauerstoffradikale werden durch die im weiteren Verlauf der Arbeit beschriebenen Mechanismen physiologischerweise effektiv eliminiert, so daß schädigende Prozesse hierdurch inhibiert werden. Im Falle einer vermehrten Produktion und/oder einer gestörten Eliminierung, führt die Akkumulation der reaktiven Moleküle allerdings zu einer Vielzahl von Schädigungsprozessen; neben der Oxidation funktioneller Gruppen in Proteinen und der Hydroxylierung von Nukleinsäuren nimmt die Lipidperoxidation (LPO) hier eine exponierte Funktion ein. Die LPO wird als unspezifische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA) in den Phospholipiden verschiedener Membransysteme der betroffenen Zelle definiert. Sie beginnt durch radikal-induzierte Wasserstoffabstraktion an der α -Methylengruppe unkonjugierter Doppelbindungen, wobei Alkylradikale als Zwischenprodukt entstehen, die durch Dienkonjugation intramolekular stabilisiert werden. Die hieraus folgende sterische Konfigurationsänderung bedingt eine Streckung des Moleküls, hierdurch erfolgt die erste Störung des intermolekularen Membrangefüges der Membran. Ferner kommt es zur Bildung von Peroxidradikalen, Endoperoxiden, Alkoxy- und Peroxyradikalen. Wird dieser circulus vitiosus nicht durch die antioxidativen Schutzmechanismen unterbunden, so führt die weiterlaufende Propagation bis hin zu Kohlenwasserstoffen wie Ethan oder Penthan, welche dann ausgeschieden werden (123). Dies hat eine vollständige Zerstörung der Membran zur Folge. Die Integrität der Organelle bzw. der Gesamtzelle ist somit aufgehoben. Darüberhinaus können die während dieses Prozesses entstehenden Endoperoxide ihrerseits Kettenbrüche hervorrufen, bei denen Aldehyde, wie zum Beispiel Malondialdehyd oder 4-Hydroxynonenal, entstehen. Diese Substanzen sind ebenfalls hochreaktiv und besitzen analytische Bedeutung für die

Beurteilung des Ausmaßes der Lipidperoxidation in einem Gewebe, wie dies im Methodikteil später dargestellt wird.

1.5.3 Enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen

Zur Verhinderung der beschriebenen Zellschädigungen bestehen neben der Kompartimentierung der meisten sauerstoffradikal-abhängigen Zellfunktionen auch enzymatische sowie nicht-enzymatische Schutzmechanismen.

Zu diesen Schutzenzymen gehört die Superoxiddismutase (SOD), die in einer zytosolischen und einer mitochondrialen Isoform vorliegt. Die Isoenzyme unterscheiden sich durch das Metallion im aktiven Zentrum. Während die zytosolische SOD je 1 Molekül Cu^{2+} und Zn^{2+} enthält, liegt bei der mitochondrialen SOD 1 Molekül Mn^{3+} im aktiven Zentrum vor. Durch die SOD wird die ansonsten spontan ablaufende Dismutation des Superoxidradikals zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff um den Faktor 10^9 beschleunigt (71).

Ferner gehört die Glutathionperoxidase (GSHPX) zum enzymatischen Schutzsystem vor oxidativem Streß. Sie verhindert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden. Die GSHPX-Aktivität wird zu 70% im Zytosol und zu 30% in den Mitochondrien gefunden.

Darüberhinaus schützen die Katalase und die Glutathion-S-Transferasen vor oxidativem Streß.

Einen nicht-enzymatischen Schutz vor Schädigungen durch Sauerstoffradikale stellen vor allem die Vitamine E und C dar. Durch die Reaktion von Vitamin E mit einem Peroxyradikal wird das Tocopherolradikal gebildet, welches zu Tocopherolchinonderivaten oxidiert. Daraufhin entstehen stabile polymere Produkte und führen zu einer Beendigung der oxidativen Schädigungsprozesse, durch den Einbau von Vitamin E in Membranen erfolgt somit ein effektiver Schutz vor Lipidperoxidation (94). Im Vergleich hierzu stellt Vitamin C ein Redoxsystem dar, bei dessen Oxidation ein stabiles Radikal synthetisiert wird, welches keine weiteren Schädigungen hervorruft. Die Regeneration erfolgt über verschiedene Reduktionsmittel, wie reduziertes Glutathion oder die NADH-abhängige Reduktase.

2 Material und Methoden

2.1 Versuch der Induktion eines duktales Pankreaskarzinoms

In einer Pilot-Studie wurde zunächst untersucht, ob eine Reproduktion des von Pour (186,187) beschriebenen Tiermodells eines chemisch induzierten duktales Adenokarzinoms des Pankreas anhand der Angaben in der Literatur möglich ist. Hierbei war neben der Histologie auch die Induktionsrate sowie die Letalität nach erfolgter Tumorinduktion von Interesse.

Ferner sollte durch diese Studie evaluiert werden, ob neben den Primärtumoren auch Lebermetastasen eines duktales Pankreaskarzinoms auftreten, oder ob es sich bei den hepatischen Tumoren möglicherweise um primäre Lebertumore, wie cholangiozelluläre Karzinome, handelt.

2.1.1 Haltung der Tiere

12 acht Wochen alte männliche Syrische Goldhamster (Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $21\pm 5^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $70\pm 10\%$, 10 Luftwechsel pro Stunde, 12h/12h Tag- / Nachtzyklus) in Einzelkäfigen gehalten.

2.1.2 Ernährung

Alle Tiere erhielten eine Futtermischung, in der der Rohfettanteil (Soja-Öl) 3% betrug (ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland) (Tab.2). Die Tiere hatten Zugang zu Futter und Trinkwasser ad libitum.

Tab. 2: Zusammensetzung der Diät

<u>Bestandteile</u>	<u>Anteil in %</u>
N-freie Extrakte	44,0
Fett (Soja-Öl)	3,0
α -Linolensäure	0,0
Protein (Soja, Korn)	19,5
H ₂ O	14,0
Fasern	7,0
Asche	7,0
Kalzium	1,2
Kalium	1,1
Phosphor	0,8
Magnesium	0,3
Natrium	0,3
Lysin	1,3
Methionin	0,5

2.1.3 Tumorinduktion

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

2.1.4 Obduktion

In der 16. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere unter einer Narkose mit Ursotamin (Serumwerk Bernburg GmbH, Deutschland) getötet. Das Körpergewicht und die Gewichte von Pankreas und Leber wurden erhoben. Zur Obduktion wurde eine mediane Laparotomie vom Processus xiphoideus bis zum Penisansatz durchgeführt.

Nach Inspektion aller Bauchorgane wurden Leber und Pankreas entnommen. Die Organe wurden für die histologische Untersuchung in 10%iges gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) gegeben.

2.1.5 Histologische Untersuchung

Die bei der Obduktion in Formaldehyd gegebenen Proben wurden nach Umbettung in Metallkassetten (Shandon Ltd., Großbritannien) im Entwässerungsautomaten Histokinette 2000 (Reichert-Jung GmbH, Deutschland) entwässert und anschließend auf der Gießstation TBS 88 (medite AG, Deutschland) mit Paraffin (Merck AG, Deutschland) überschichtet. Die nunmehr in Gewebekapseln (Shandon Ltd., Großbritannien) eingebetteten Paraffinblöcke wurden mit dem Rotationsmikrotom HM 350 (Microm GmbH, Deutschland) geschnitten. Hierbei wurde für das Lebergewebe eine Schnittdicke von 50µm gewählt. Bei Nachweis von Metastasen wurde eine Schichtdicke von 10µm gewählt. Das Pankreasgewebe wurde mit einer Schichtdicke von 5µm geschnitten. Anschließend erfolgte das Aufziehen auf Objektträger (Menzel Gläser KG, Deutschland) im Paraffin-Streckbad TFB 35 (medite AG, Deutschland). Die Objektträger wurden dann bei 75°C für 30min im Brutschrank Modell 200 (Memmert GmbH, Deutschland) getrocknet. Daraufhin wurden die Schnitte unter dem Abzug Hyperclean (Shandon Ltd., Großbritannien) durch zweimaliges jeweils fünfminütiges Xylolbad (Baker, Niederlande) entparaffiniert. Nach Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) und Waschung in Aqua bidest erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (Merck AG, Deutschland) in typischer Technik. Nach nochmaliger Waschung in Aqua bidest wurde die abschließende Entparaffinierung in aufsteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) durchgeführt. Nach anschließendem Xylolbad (Baker, Niederlande) wurden die Schnitte mit Kanadabalsam (Merck AG, Deutschland) aufgehellt und die Deckgläser (Menzel Gläser GmbH, Deutschland) plaziert. Die histologische Beurteilung fand mit dem Lichtmikroskop Kolleg SHB 45 (Eschenbach GmbH, Deutschland) statt.

Die Klassifizierung der tumorverdächtigen Pankreasläsionen folgte den Kriterien nach Meijers et al. (158). In die Berechnung der Induktionsrate wurden nur Tiere eingeschlossen, die ein invasives duktales Adenokarzinom des Pankreas aufwiesen.

Bei Klassifizierung der bei der Obduktion entnommenen Proben aus hepatischen

Raumforderungen als Metastasen eines duktales Adenokarzinoms wurden diese in die Berechnung der Inzidenz von Lebermetastasen und der durchschnittlichen Größe der Lebermetastasen einbezogen. Die Durchführung der histologischen Untersuchungen erfolgte mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Guski am Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte.

2.1.6 Statistik

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Daten der unterschiedlichen Gruppen wurden mittels des Kruskal-Wallis-Test für kontinuierliche Daten und mit dem Fisher Test für kategoriale Daten verglichen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p > 0,05$ festgelegt.

2.2 Versuch der Steigerung der Lebermetastasierung durch eine Modifikation der enteralen Fettsäurekombination aus α -Linolensäure und Linolsäure beim duktales Pankreaskarzinom

2.2.1 Haltung der Tiere und Versuchsgruppen

60 acht Wochen alte männliche Syrische Goldhamster (Fa. Harlan-Winkelmann, Deutschland) wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $21 \pm 5^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $70 \pm 10\%$, 10 Luftwechsel pro Stunde, 12h/12h Tag- / Nachtzyklus) in Einzelkäfigen gehalten und in 4 Gruppen á 15 Hamster randomisiert:

Tab. 3: Tumorinduktion und Ernährung der Versuchsgruppen 1-4

<u>Gruppe</u>	<u>Tier-Anzahl</u>	<u>Tumorinduktion</u>	<u>Ernährung</u>
1	15	Nein	Standarddiät (SD)
2	15	Ja	Standarddiät (SD)
3	15	Nein	Hochfettdiät (HF)
4	15	Ja	Hochfettdiät (HF)

2.2.2 Ernährung

Die Tiere der Gr. 1 und 2 erhielten eine Standarddiät (SD), die 1,8% LA und 0,3% ALA (ssniff Soest, Deutschland) enthielt. Die Tiere der Gr. 3 und 4 wurden mit einer Hochfett-diät (HF) bestehend aus 11% LA und 2% ALA (ssniff Soest, Deutschland) ernährt (Tab.4).

Tab. 4: Bestandteile der Standarddiät und Hochfett-diät in %

<u>Bestandteile</u>	<u>Standarddiät [%]</u>	<u>Hochfett-diät [%]</u>
Fett (Soja-Öl)	3,5	21,4
Linolsäure	1,8	11,0
α -Linolensäure	0,3	2,0
Arachidonsäure	0,07	0,4
Palmitinsäure	0,3	2,0
Stearinsäure	0,2	1,0
Ölsäure	0,7	4,4
Protein (Soja, Korn)	20,0	16,5
H ₂ O	13,0	12,0
Fasern	8,0	4,9
Asche	6,5	5,7
Kalций	1,2	1,2
Kalium	1,1	1,1
Phosphor	0,8	0,8
Magnesium	0,3	0,3
Natrium	0,3	0,3
Lysin	1,3	1,3
Methionin	0,5	0,5

2.2.3 Tumorinduktion

Zur Induktion des duktales Adenokarzinoms des Pankreas wurden den Tieren der Versuchsgruppen 2 und 4 über einen Zeitraum von 13 Wochen 10mg/kg Körpergewicht N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP, Ash Stevens Chemicals Ltd., USA) wöchentlich subkutan interskapulär injiziert. BOP wurde dazu jeweils unmittelbar vor der Anwendung in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Deutschland) im Verhältnis von 3mg pro 1ml gelöst. Alle Injektionen fanden unter einer kurzen Äthernarkose (Hoechst / Marion-Roussel GmbH, Deutschland) statt. Die Tiere der Gr. 1 und 3 erhielten zu den gleichen Zeitpunkten eine subkutane Injektion 0,5ml 0,9% NaCl.

2.2.4 Obduktion

In der 25. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere unter einer Narkose mit Ursotamin (Serumwerk Bernburg GmbH, Deutschland) getötet. Das Körpergewicht und die Gewichte von Pankreas und Leber wurden erhoben. Zur Obduktion wurde eine mediane Laparotomie vom Processus xiphoideus bis zum Penisansatz durchgeführt. Nach Inspektion aller Bauchorgane wurden Leber und Pankreas entnommen. Die Organe wurden für die histologische Untersuchung in 10%iges gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) gegeben.

2.2.5 Histologische Untersuchungen

Die bei der Obduktion in Formaldehyd gegebenen Proben wurden nach Umbettung in Metallkassetten (Shandon Ltd., Großbritannien) im Entwässerungsautomaten Histokinette 2000 (Reichert-Jung GmbH, Deutschland) entwässert und anschließend auf der Gießstation TBS 88 (medite AG, Deutschland) mit Paraffin (Merck AG, Deutschland) überschichtet. Die nunmehr in Gewebekapseln (Shandon Ltd., Großbritannien) eingebetteten Paraffinblöcke wurden mit dem Rotationsmikrotom HM 350 (Microm GmbH, Deutschland) geschnitten. Hierbei wurde für das Lebergewebe eine Schnittdicke von 50µm gewählt. Bei Nachweis von Metastasen wurde eine Schichtdicke von 10µm gewählt. Das Pankreasgewebe wurde mit einer Schichtdicke von 5µm geschnitten. Anschließend erfolgte das Aufziehen auf Objektträger (Menzel Gläser KG, Deutschland) im Paraffin-Streckbad TFB 35 (medite AG, Deutschland). Die

Objektträger wurden dann bei 75°C für 30min im Brutschrank Modell 200 (Memmert GmbH, Deutschland) getrocknet. Daraufhin wurden die Schnitte unter dem Abzug Hyperclean (Shandon Ltd., Großbritannien) durch zweimaliges jeweils fünfminütiges Xylolbad (Baker, Niederlande) entparaffiniert. Nach Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) und Waschung in Aqua bidest erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (Merck AG, Deutschland) in typischer Technik. Nach nochmaliger Waschung in Aqua bidest wurde die abschließende Entparaffinierung in aufsteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) durchgeführt. Nach anschließendem Xylolbad (Baker, Niederlande) wurden die Schnitte mit Kanadabalsam (Merck AG, Deutschland) aufgehellt und die Deckgläser (Menzel Gläser GmbH, Deutschland) plaziert. Die histologische Beurteilung fand mit dem Lichtmikroskop Kolleg SHB 45 (Eschenbach GmbH, Deutschland) statt.

Die Klassifizierung der tumorverdächtigen Pankreasläsionen folgte den Kriterien nach Meijers et al. (158). In die Berechnung der Induktionsrate wurden nur Tiere eingeschlossen, die ein invasives duktales Adenokarzinom des Pankreas aufwiesen.

Bei Klassifizierung der bei der Obduktion entnommenen Proben aus hepatischen Raumforderungen als Metastasen eines duktales Adenokarzinoms wurden diese in die Berechnung der Inzidenz von Lebermetastasen und der durchschnittlichen Größe der Lebermetastasen einbezogen. Die Durchführung der histologischen Untersuchungen erfolgte mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Guski am Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte.

2.2.6 Biochemische Untersuchungen

2.2.6.1 Chemikalien und Geräte

Die Bestimmung der GSHPX-Aktivität folgte dem Prinzip von Paglia und Valentine (177). Es wurde der Testkit RANSEL (Randox Ltd., Großbritannien) verwendet, der als Mischsubstrat Xanthin und I.N.T. [(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchlorid] sowie einen 50mM CAPS-EDTA-Puffer und Xanthinoxidase (80U/l) enthielt.

Die Bestimmung der SOD-Aktivität basierte auf der Methode nach Beauchamp und Fridovich (23). Hier wurde der Testkit RANSOD (Randox Ltd., Großbritannien) verwendet, in welchem das Reagenz (Glutathion + Glutathionreduktase + NADPH), ein

enthalten waren. Für die Proteinbestimmung nach Lowry (147) wurden folgende Chemikalien verwendet:

- 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),
- Folin's Reagenz (Merck AG, Deutschland).

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

- Azetatpuffer (pH=3,5) wurde aus 40%iger Essigsäure (aus analytisch reinem Eisessig; Merck AG, Deutschland) hergestellt, die mittels 5n Natronlauge (Merck AG, Deutschland) auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt und auf das doppelte Volumen aufgefüllt wurde,
- 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, eine 10mM Lösung von Malondialdehydbisdiethylacetal wurde in 1%iger Schwefelsäure eine Stunde inkubiert, um den Prozeß der säurekatalysierten Hydrolyse weitgehend zu beenden.

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

Weiterhin wurden verwendet:

- 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).

2.2.6.2 Homogenatherstellung

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

2.2.6.3 Proteinbestimmung nach Lowry

2.2.6.3.1 Prinzip

Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen ergeben mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen violetten Komplex. Dieses Verfahren, die sogenannte Biuret-Methode, weist jedoch nur eine mäßige Sensitivität auf. Außerdem wird hierbei sehr umfangreiches Probenmaterial benötigt. Daher wurde nach Lowry eine Kombination der Biuret-Methode mit einer Reduktion von Phosphorwolfram- und Phosphormolybdän-säure (Folins Reagenz) zu Wolfram- respektive Molybdänblau durch die aromatischen Seitenketten des im Kupferkomplex gebundenen Tyrosins und Tryptophans angewendet (149).

2.2.6.3.2 Durchführung und Auswertung

Zunächst wurde die Gebrauchslösung hergestellt. Um 50ml zu erhalten, wurden 0,5ml Kupfersulfat-Lösung, 0,5ml Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung und 49ml Natriumkarbonat-

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

2.2.6.4 Bestimmung der GSHPX-Aktivität

2.2.6.4.1 Prinzip

Die Methode basiert auf dem Prinzip von Paglia und Valentine (1977). Die GSHPX katalysiert hierbei die Oxidation von Glutathion durch Cumenhydroperoxid, so daß durch Bildung einer Disulfidbrücke das oxidierte Glutathion (GSSG) entsteht. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von reduziertem Glutathion und NADPH wird GSSG sofort reduziert, dabei wird NADPH oxidiert. Diese Abnahme der NADPH-Extinktion wird bei der hier verwendeten Methode gemessen.

2.2.6.4.2 Durchführung und Auswertung

Das Pipettieren erfolgte direkt in die Meßküvette und nach guter Durchmischung wurden die Proben bei folgenden Parametern gemessen: 340nm Wellenlänge, 37°C Temperatur, 3 Minuten Reaktionszeit, 0,5cm Küvettenschichtdicke, Luft als Vergleichsprobe.

Tab. 5: Pipettierschema für die GSHPX-Aktivitätsmessung

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

Der Berechnung der Ergebnisse liegt das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde: $\Delta E = c \cdot d \cdot \epsilon$, wobei ΔE die Extinktionsänderung, c die Konzentration und d die Küvettenschichtdicke darstellt. Der Wert des Extinktionskoeffizienten ϵ beträgt

$6,22 \cdot 10^3 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ und ist konstant. Demzufolge wurde das Lambert-Beersche Gesetz nach c umgestellt und somit die Konzentration in der Probe berechnet. Eingefügt wurde der Verdünnungsfaktor. Die Ergebnisse wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

2.2.6.5 Bestimmung der SOD-Aktivität

2.2.6.5.1 Prinzip

Der auf der Methode von Beauchamp und Fridovich (23) beruhende hier angewandte Testkit verwendet Xanthin und Xanthinoxidase zur Bildung von Superoxidradikalen, welche mit I.N.T. zu einem roten Formazanfarbstoff reagieren. Da die SOD ihrerseits die Dismutation von Superoxidradikalen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert, kann ihre Aktivität über den Grad der Hemmung der oben genannten Reaktion bestimmt werden.

2.2.6.5.2 Durchführung und Auswertung

Die Proben wurden mit Aqua bidest soweit verdünnt, daß die Messwerte zwischen 30% und 60% Hemmung lagen. Das Pipettieren erfolgte direkt in die Küvette. Nach guter Durchmischung wurden die Messungen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 505nm Wellenlänge, 37°C Temperatur, 3 Minuten Reaktionszeit, 0,5cm Küvettschichtdicke, Luft als Vergleichsprobe.

Die Meßwerte wurden als Extinktionsänderung $\cdot 10^3/\text{min}$ angegeben. Zur Umrechnung in die prozentuale Hemmung der Formazanreaktion wurde folgende Gleichung angewandt: $\% \text{Hemmung} = 100 - [(\Delta E \cdot \text{min}^{-1}_{\text{Probe}} \cdot 100) / \Delta E \cdot \text{min}^{-1}_{\text{Leerwert}}]$. Zur Angabe der Aktivität in units wurde definiert, daß 1U SOD-Aktivität 50% Hemmung entsprechen soll. Die so erhaltenen Werte wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

Tab. 6: Pipettierschema für die SOD-Aktivitätsmessung

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

2.2.6.6 Bestimmung der Lipidperoxidations-Produkte

2.2.6.6.1 Prinzip

Das Prinzip dieser Messung wurde von Ohkawa beschrieben (175). Lipidperoxidationsprodukte bilden hierbei mit Thiobarbitursäure (TBA) einen roten Polymethinfarbstoff, dessen Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden kann. Die diese Reaktion eingehenden Lipidperoxidationsprodukte werden als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) bezeichnet. Die teilweise kritischen Aspekte dieser Meßmethode im Hinblick auf Art der Probengewinnung und –aufbewahrung sowie die nicht unproblematische Spezifität des Tests sind uns bekannt (111). Allerdings gehen wir nach Erfahrungen mit vorhergehenden Untersuchungen davon aus, daß artefizielle Veränderungen des TBARS-Levels durch strenge Standardisierung aller Arbeitsschritte (z.B. sehr schnelles Einfrieren der Gewebe nach Entnahme, Aufbewahrung der Proben in Flüssigstickstoff, Homogenisierung und Analyse in Gegenwart von Antioxidantien) verhindert werden können.

2.2.6.6.2 Durchführung und Auswertung

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

Die Durchführung der biochemischen Untersuchungen erfolgte mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Schimke (Medizinische Klinik für Kardiologie) in der Charité Campus Mitte.

2.2.6.7 Statistik

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Daten der unterschiedlichen Gruppen wurden mittels des Kruskal-Wallis-Test für kontinuierliche Daten und mit dem Fisher Test für kategoriale Daten verglichen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

2.3 Einfluß von Octreotid und Tamoxifen auf das Tumorstadium und die Lebermetastasierung beim Pankreaskarzinom

2.3.1 Haltung der Tiere und Versuchsgruppen

60 acht Wochen alte männliche Syrische Goldhamster (Fa. Harlan-Winkelmann, Deutschland) wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $21 \pm 5^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $70 \pm 10\%$, 10 Luftwechsel pro Stunde, 12h/12h Tag- / Nachtzyklus) in Einzelkäfigen gehalten und nach 1 Woche Akklimatisierungszeit randomisiert den in Tabelle 1 dargestellten Gruppen á 15 Hamster zugeordnet.

Tab. 7: Therapie der Versuchsgruppen 1-4

Gruppe	Tier-Anzahl	Tumorinduktion	Therapie
1	15	ja	Keine
2	15	ja	Octreotid
3	15	ja	Tamoxifen
4	15	ja	Octreotid und Tamoxifen

2.3.2 Ernährung

Alle Tiere erhielten ein Spezialfutter, in dem der Rohfettanteil auf 21,4% angehoben wurde (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, Tab.8). Die verwendete Hochfett diät hatte in eigenen Vorstudien zu einer höheren Lebermetastasierung im Vergleich zur mit Standardfutter ernährten Kontrollgruppe geführt (261). Alle Tiere hatten Zugang zu Futter und zu Trinkwasser ad libitum.

Tab. 8: Bestandteile der Hochfettdiät

<u>Bestandteil</u>	<u>Anteile</u>
Rohprotein	16,5%
Rohfett	21,4%
Rohfaser	4,9%
Rohasche	5,7%
Kalzium	1,0%
Phosphor	0,7%
Natrium	0,15%
Magnesium	0,2%
Kalium	1,0%
Lysin	1,1%
Glycin	1,0%
Leucin	1,5%
Arginin	1,4%
Phenylalanin	1,0%
Asparaginsäure	2,0%
Glutaminsäure	3,9%
Valin	1,0%
Mangan	80mg/kg
Kupfer	12mg/kg
Zink	75mg/kg
Jod	2mg/kg
Eisen	220mg/kg
Selen	0,2mg/kg
Kobalt	2mg/kg
Vitamin A	15.000IE/kg
Vitamin D ₃	1.000IE/kg
Vitamin E	100mg/kg
Cholin	1.600mg/kg
Nikotinsäure	60mg/kg
Inosit	50mg/kg

Die gaschromatographisch ermittelten Anteile (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) derjenigen Fettsäuren mit den höchsten Anteilen in der Hochfettdiät sind in Tab.9 dargestellt.

Tab. 9: Anteile bedeutender Fettsäuren in der Hochfettdiät in %

Name (Trivialname)	Kurzformel	Anteil in Hochfettdiät [%]
Palmitinsäure	C16:0	2,0
Stearinsäure	C18:0	1,0
Ölsäure	C18:1	4,4
Linolsäure	C18:2	11,0
Linolensäure	C18:3	2,0
Arachidonsäure	C20:4	0,4
Eicosapentaensäure	C22:5	0,3
Sonstige Fettsäuren	C8:0 bis C22:6	jeweils <0,3

2.3.3 Tumorinduktion

Zur Induktion des duktales Adenokarzinoms des Pankreas wurden den Tieren der Versuchsgruppen 1-4 über einen Zeitraum von 12 Wochen 10mg/kg Körpergewicht N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP, Ash Stevens Chemicals Ltd., USA) wöchentlich subkutan interskapulär injiziert. BOP wurde dazu jeweils unmittelbar vor der Anwendung in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Deutschland) im Verhältnis von 3mg pro 1ml gelöst. Alle Injektionen fanden unter einer kurzen Äthernarkose (Hoechst / Marion-Roussel GmbH, Deutschland) statt.

2.3.4 Therapie

Nach der Tumorinduktion erfolgte eine 12-wöchige Therapiephase. In diesem Zeitraum erhielten die Tiere der Gr. 1 (Kontrollgruppe) 0,5 ml 0,9% NaCl subkutan pro Woche, während den Tieren der Gr. 2 (Octreotid-Gruppe) 0,4 ml Octreotid 4-wöchentlich subkutan injiziert wurden (LAR 20mg-Octreotid-retard, Novartis, Switzerland). Darüberhinaus erhielten die Tiere der Gr. 3 (Tamoxifen-Gruppe) 10 mg Tamoxifen 3mal pro Woche oral als Beimengung zum Futter. Die Tiere der Gr. 4 (Kombinationsgruppe)

wurden mit der Kombinationstherapie aus Octreotid und Tamoxifen in o.g. Dosierung behandelt.

2.3.5 Obduktion

In der 25. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere unter einer Narkose mit Ursotamin (Serumwerk Bernburg GmbH, Deutschland) getötet. Das Körpergewicht und die Gewichte von Pankreas und Leber wurden erhoben. Zur Obduktion wurde eine mediane Laparotomie vom Processus xiphoideus bis zum Penisansatz durchgeführt. Nach Inspektion aller Bauchorgane wurden Leber und Pankreas entnommen. Die Organe wurden für die histologische Untersuchung in 10%iges gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) gegeben.

2.3.6 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen erfolgten analog der unter 2.2.5 aufgeführten Methodik mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Guski am Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte.

2.3.7 Nachweis von Rezeptoren

2.3.7.1 Somatostatinrezeptoren

Da bislang ungeklärt war, ob Octreotid über einen direkten rezeptorvermittelten Mechanismus das Lebermetastasenwachstum beeinflusst, wurden die Lebermetastasen eines chemisch induzierten Adenokarzinoms des Pankreas des Syrischen Goldhamsters im Institut für Pathologie der Universität Bern (Schweiz) durch Herrn Prof. Dr. C. Reubi auf Somatostatin-Rezeptoren mittels einer Autoradiographie hin untersucht (201-203,269).

2.3.7.2 Östrogenrezeptoren

Zudem haben wir untersucht, ob eine mögliche Inhibition des Tumorwachstums durch Tamoxifen rezeptorvermittelt ist. Hierfür erfolgte die Bestimmung der Östrogen-Rezeptoren (ER) im Zytosol des zu untersuchenden Tumorgewebes anhand eines Testkits (ABBOTT GmbH, Deutschland) durch die Universitätsklinik für Strahlentherapie (Prof. Dr. Possinger) der Charité Campus Mitte.

Der ER-EIA monoklonal ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der entsprechend des „Sandwich-Prinzips“ aufgebaut ist. Hierbei werden mit anti-ER (Ratte, monoklonal) beschichtete Kugeln mit Proben (Tumorgewebszytosole), Standards und Kontrollen inkubiert. Während dieser Inkubation werden in den Proben, Standards und Kontrollen die vorhandenen Östrogen-Rezeptoren an die Festphase (Kugeloberfläche) gebunden. Das ungebundene Material wird durch Waschen der Kugeln entfernt. Anschließend werden die Kugeln mit anti-ER (Ratte, monoklonal), das mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, inkubiert.

Falls ER in der Zytosolprobe vorhanden sind, wird das ER-Konjugat an den auf den Kugeln befindlichen ER gebunden. Das ungebundene Konjugat wird durch Waschen der Kugeln entfernt.

Danach werden die Kugeln mit einer Enzym-Substratlösung (Wasserstoffperoxid und Ortho-Phenylendiamin) inkubiert, dies führt zu einer gelb-orangen Verfärbung. Die Farbintensität ist innerhalb des Arbeitsbereiches des Tests proportional zur ER-Konzentration in der Probe. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 1N Schwefelsäure inhibiert, und die Intensität der entstandenen Färbung wird mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 492nm gemessen. Der Cut-off Wert für einen positiven Rezeptorbefund beträgt 15 fmol/mg Zytosol-Protein (3,20,119,169,102,268).

2.4 Einfluß von Octreotid auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

2.4.1 Haltung der Tiere und Versuchsgruppen

90 männliche Syrische Goldhamster im Alter von 8 Wochen (Fa. Harlan - Winkelmann, Deutschland) wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $21\pm 5^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $70\pm 10\%$, 10 Luftwechsel pro Stunde, 12h/12h Tag- / Nachtzyklus) in Einzelkäfigen gehalten und nach 1 Woche Akklimatisierungszeit randomisiert den in Tab. 2 aufgeführten Gruppen zugeordnet.

Tab. 10: Ernährung, Tumorinduktion und Therapie der Versuchsgruppen 1-6

Gruppe	Tier-Anzahl	Ernährung	Tumorinduktion	Octreotidtherapie
1	15	Standardfutter (SF)	Nein	Nein
2	15	SF	Ja	Nein
3	15	SF	Ja	Ja
4	15	Hochfettdiät (HF)	Nein	Nein
5	15	HF	Ja	Nein
6	15	HF	Ja	Ja

2.4.2 Ernährung

Die mit Standardfutter ernährten Tiere der Versuchsgruppen 1-3 erhielten über den gesamten Versuchszeitraum Hamsterstandardfutter mit einem Rohfettanteil von 3% (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Tiere der Versuchsgruppen 4–6 hingegen wurden mit einer Hochfettdiät ernährt, in dem der Rohfettanteil auf 21,4% angehoben wurde (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

Die verwendete Hochfetterernährung hatte in eigenen Vorstudien zu einer signifikant höheren Lebermetastasierung im Vergleich zur mit Standardfutter ernährten Kontrollgruppe geführt (261). Die mit Standardfutter ernährten Tiere dienten als Kontrollgruppen für die biochemischen Parameter. Alle Tiere hatten Zugang zum Futter und zu Trinkwasser ad libitum.

Die gaschromatographisch ermittelten Anteile (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) derjenigen Fettsäuren mit den höchsten Anteilen in der Hochfettdiät und im Standardfutter sind in Tab.11 dargestellt, weitere wichtige Bestandteile sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 11: Anteile bedeutender Fettsäuren in der Standard- und Hochfettdiät in %

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

Tab. 12: Inhaltsstoffe der Standarddiät und Hochfettdiät

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Standarddiät</u>	<u>Hochfettdiät</u>
Rohprotein	20,0%	16,5%
Rohfett	3,5%	21,4%
Rohfaser	8,0%	4,9%
Rohasche	6,5%	5,7%
Kalzium	1,0%	1,0%
Phosphor	0,7%	0,7%
Natrium	0,15%	0,15%
Magnesium	0,2%	0,2%
Kalium	1,0%	1,0%
Lysin	1,1%	1,1%
Glycin	1,0%	1,0%
Leucin	1,5%	1,5%
Arginin	1,4%	1,4%
Phenylalanin	1,0%	1,0%
Asparaginsäure	2,0%	2,0%
Glutaminsäure	3,9%	3,9%
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

2.4.3 Tumorinduktion

Zur Induktion des duktales Adenokarzinoms des Pankreas wurden den Tieren der Versuchsgruppen 2, 3, 5 und 6 über einen Zeitraum von 12 Wochen 10mg/kg Körpergewicht N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP, Ash Stevens Chemicals Ltd., USA) wöchentlich subkutan interskapulär injiziert. BOP wurde dazu jeweils unmittelbar vor der Anwendung in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Deutschland) im Verhältnis von 3mg pro 1ml gelöst.

Die Tiere der Versuchsgruppen 1 und 4 erhielten im Induktionszeitraum wöchentlich 0,5ml 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Deutschland) ebenfalls subkutan interskapulär injiziert.

Alle Injektionen fanden unter einer kurzen Äthernarkose (Hoechst / Marion-Roussel GmbH, Deutschland) statt.

2.4.4 Therapie

An die 12wöchige Tumorinduktionsphase schloß sich die Therapiephase an, deren Dauer ebenfalls 12 Wochen betrug. Während dieser Phase wurden die Tiere der Versuchsgruppen 3 und 6 mit 20mg LAR (Octreotid-Monatsdepot, Novartis AG, Schweiz) alle 4 Wochen subkutan therapiert.

Den Tieren der Versuchsgruppen 1, 2, 4 und 5 wurden im selben Zeitraum hingegen 0,5ml 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung (B. Braun GmbH, Deutschland) ebenfalls alle 4 Wochen subkutan injiziert. Auch diese Injektionen fanden unter einer Äthernarkose (Hoechst / Marion-Roussel GmbH, Deutschland) statt.

2.4.5 Obduktion

In der 25. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere unter einer Narkose mit Ursotamin (Serumwerk Bernburg GmbH, Deutschland) getötet. Zur Obduktion wurde eine mediane Laparotomie vom Processus xiphoideus bis zum Penisansatz durchgeführt. Nach Inspektion aller Bauchorgane wurde die Leber entnommen.

Da die Versuchsgruppen 1 und 4 kein BOP erhalten hatten, war nicht mit dem Auftreten von Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen in diesen Gruppen zu rechnen. Von

den Tieren dieser Versuchsgruppen wurde standardisiert eine Probe aus dem Lobus sinister lateralis hepatis exzidiert ($41,4 \pm 10,5$ mg) und unverzüglich bei -80°C für die biochemischen Untersuchungen eingefroren.

Bei den mit BOP behandelten Tieren wurde nach Entnahme der Leber auch das Pankreas entnommen und sowohl makroskopisch wie auch auflichtmikroskopisch (neoLab Stereomikroskop, Eschenbach GmbH, Deutschland) auf solide Raumforderungen kontrolliert. Aus tumorverdächtigen Läsionen wurden Proben entnommen und für die histologische Untersuchung in 10%iges gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) gegeben. Die Leber jedes Tieres der mit BOP behandelten Versuchsgruppen wurde sofort nach der Entnahme mit einem Skalpell lamelliert (18-24 Lamellen in ca. 2mm-Abständen) und sowohl makroskopisch wie auch auflichtmikroskopisch auf solide Raumforderungen untersucht. Die Anzahl aller in einer Leber als metastasenverdächtig angesehenen Herde wurde erhoben und die Größe wurde unter dem Auflichtmikroskop zweidimensional vermessen, so daß für jedes betroffene Tier die Metastasenanzahl und deren durchschnittliche Größe angegeben werden konnte. Erstreckten sich Raumforderungen über mehr als eine Lamelle, wurde die zweidimensionale Ausdehnung an jeder einzelnen Lamelle gemessen und anschließend der Mittelwert bestimmt. Aus jedem metastasenverdächtigen Herd wurde eine Probe entnommen und für die Histologie in 10%iges gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) gegeben. Anschließend wurden bei den unter 2.3 beschriebenen Versuchsgruppen die verdächtigen Herde aus der Leber exzidiert, gesammelt ($23,5 \pm 12,1$ mg) und für die biochemischen Untersuchungen unverzüglich bei -80°C eingefroren. Von makroskopisch und auflichtmikroskopisch unveränderten metastasenfernen Leberanteilen wurden $39,1 \pm 6,9$ mg pro Tier entnommen und ebenfalls unverzüglich bei -80°C eingefroren.

2.4.6 Histologische Untersuchung

Die bei der Obduktion in Formaldehyd gegebenen Proben wurden histologisch mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Guski am Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte entsprechend der unter 2.2.5 beschriebenen Methodik untersucht.

2.4.7 Biochemische Untersuchungen

Die Proteinbestimmung, die Bestimmung der Lipidperoxidation (TBARS), sowie der Aktivitäten der Lipidperoxidations-Schutzenzyme GSHPX und SDO erfolgte mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Schimke (Medizinische Klinik für Kardiologie) in der Charité Campus Mitte entsprechend der unter 2.2.6 beschriebenen Methodik.

2.4.8 Statistik

Alle Werte wurden als prozentuale Häufigkeiten oder als Mittelwert±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 fanden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.0[®] für Windows98[®] statt.

2.5 Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C sowie E auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation in Lebermetastasen und metastasenfremen Leberanteilen beim duktafen Pankreaskarzinom

2.5.1 Haltung der Tiere und Versuchsgruppen

120 männliche Syrische Goldhamster (Fa. Harlan–Winkelmann, Deutschland) im Alter von 8 Wochen wurden in Einzelkäfigen unter standardisierten Verhältnissen gehalten. Die Lufttemperatur betrug 21 ± 5 °C, weiterhin wurden eine Luftfeuchtigkeit von $70\pm 10\%$ sowie 12 Luftwechsel / Stunde und ein 12h / 12h Tag / Nachtzyklus gewährleistet. Die Tiere wurden in folgende 8 Gruppen mit je 15 Syrischen Goldhamstern randomisiert (Tab.13).

Tab. 13: Tumorinduktion und Therapie der Versuchsgruppen 1-8

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Tumorinduktion	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Therapie	Keine	Vit. A	Vit. C	Vit. E	Keine	Vit. A	Vit. C	Vit. E

2.5.2 Ernährung

Alle Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser. Ebenso erhielten alle Tiere eine spezielle Experimentaldiät, die sich vom Standardfutter durch eine abweichende Zusammensetzung unterschied (sniff GmbH, Soest, Deutschland, Tab.14).

Tab. 14: Zusammensetzung der Standard- und Hochfettdiät

<u>Bestandteile</u>	<u>Standarddiät (%)</u>	<u>Hochfettdiät (%)</u>
Sojaöl	3,5	21,4
α -Linolensäure	0,3	2,0
Linolsäure	1,8	11,0
Arachidonsäure	0,07	0,4
Palmitinsäure	0,3	2,0
Stearinsäure	0,2	1,0
Ölsäure	0,7	4,4
Proteine	20,0	16,5
Wasser	14,0	14,0
Rohfasern	8,0	4,9
Rohasche	6,5	5,7
Calcium	1,2	1,2
Kalium	1,1	1,1
Phosphor	0,8	0,8
Magnesium	0,3	0,3
Natrium	0,3	0,3
Lysin	1,3	1,3
Methionin	0,5	0,5

Im Gegensatz zur Standarddiät mit einem Rohfettanteil von 3,5% liegt in der Hochfettdiät der Anteil an Rohfett mit 21,4% wesentlich höher. Das Experiment wurde nach den UKCCCR Richtlinien ausgeführt (123).

2.5.3 Tumorinduktion

Den Tieren der Kontrollgruppen 1- 4 wurden über einen Zeitraum von 3 Monaten jeweils wöchentlich 0,5ml 0,9%ige NaCl-Lösung subkutan injiziert.

Zur Induktion eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas in den Gruppen 5-8 wurden den Tieren über einen Zeitraum von 3 Monaten 10mg/kg KG N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP, Ash Stevens Chemicals, USA) wöchentlich subkutan interskapulär injiziert. BOP wurde dazu kurz vor der Anwendung in 0,9%iger NaCl-Lösung (B.Braun, Deutschland) auf 3mg/ml gelöst. Alle Injektionen wurden unter kurzer Äthernarkose (Hoechst, Deutschland) durchgeführt.

2.5.4 Therapie

Direkt nach der 12wöchigen Tumorinduktionsphase wurde eine Therapie mit Vitamin A, C bzw. E (Sigma, Großbritannien) begonnen. Hierbei erhielten die Tiere der Gruppen 2 und 6 Vitamin A (0,25mg/kg KG/die), die Tiere der Gruppen 3 und 7 erhielten Vitamin C (9mg/kg KG/die) und die Gruppen 4 und 8 wurden mit Vitamin E (4mg/kg KG/die) per os behandelt. Die Verabreichung der Vitamine erfolgte über einen Zeitraum von 12 Wochen.

2.5.5 Obduktion

In der 24. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere mittels einer Narkose mit Ursotamin (Serumwerk Bernburg, Deutschland) getötet. Zuvor verstorbene Tiere wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Nach Tötung der Tiere wurde eine Obduktion durchgeführt. Hierbei wurden das Pankreas und die Leber entfernt und deren Gewicht festgestellt. Gewebstücke von makroskopisch freien Leberanteilen (67 ± 19 mg) wurden dem Lobus sinister lateralis der Leber entnommen und unverzüglich für die biochemische Analyse bei -80°C eingefroren. Die Leber der BOP-behandelten Tiere der Gruppen 5 bis 8 wurden in 1,0mm Schritten lamelliert. Danach wurde die Anzahl der makroskopisch sichtbaren Lebermetastasen pro Tier, sowie die zweidimensionale Ausdehnung der jeweils größten Leberläsion bestimmt. Für biochemische Analysen wurden Teile der Lebermetastasen ($26,3 \pm 14$ mg) umgehend bei -80°C eingefroren. Für die Kontrollhistologie wurden nun das gesamte Pankreas sowie Gewebestücke der Lebermetastasen in 10%iges Formaldehyd gegeben (Sigma, Großbritannien).

2.5.6 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen von Pankreas und Leber erfolgten analog der unter 2.2.5 beschriebenen Methodik mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Guski am Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte.

2.5.7 Biochemische Untersuchungen

Die biochemischen Untersuchungen erfolgten analog der unter 2.2.6 beschriebenen Methodik mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Schimke (Medizinische Klinik für Kardiologie) an der Charité Campus Mitte.

2.5.8 Statistik

Die zu messenden Parameter wurden als prozentuale Häufigkeiten oder Mittelwert \pm Standardabweichungen angegeben. Kontinuierliche Daten wurden mit Hilfe des Shapiro-Francia-Tests auf Normalverteilung überprüft. Bei Normalverteilungen wurden anschließend die Daten zwischen den Gruppen mit der Einfaktoriellen Multivarianzanalyse (ANOVA) verglichen. Post hoc-Tests wurden nach Bonferroni bei gleichen Varianzen oder mit Hilfe des Dunnett's T3-Tests bei ungleichen Varianzen durchgeführt.

Lag keine Normalverteilung vor, wurde zum Vergleich der Daten zwischen den Gruppen der Kruskal Wallis Test für die Globalhypothese angewandt. Der Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur wurde beim Vergleich der einzelnen Gruppen zur Vermeidung der Kummulierung des α -Fehlers herangezogen. Die Daten der tumorfreien Leberanteile vs. Lebermetastasen jeder Gruppe wurden mit Hilfe des Wilcoxon Rangsummentests verglichen. Kategorielle Daten wurden angesichts der kleinen Umfänge mit Hilfe des Fisher's-Exakt-Tests überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit 95% ($p < 0,05$) definiert. Alle Berechnungen fanden mit SPSS 9.2[®] für Windows97[®] statt.

2.6 Einfluß von Celebrex (COX-2-Inhibitor) und Zyflo (5-LOX-Inhibitor) auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

2.6.1 Haltung der Tiere und Versuchsgruppen

120 männliche Syrische Goldhamster (Fa. Harlan–Winkelmann, Deutschland) im Alter von 8 Wochen wurden in Einzelkäfigen unter standardisierten Verhältnissen gehalten. Die Lufttemperatur betrug 21 ± 5 °C, weiterhin wurden eine Luftfeuchtigkeit von $70\pm 10\%$ sowie 12 Luftwechsel / Stunde und ein 12h / 12h Tag / Nachtzyklus gewährleistet. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter ad libitum.

2.6.2 Ernährung

Alle Tiere erhielten eine Hochfettdiät (sniff GmbH, Soest, Deutschland), die in den Vorversuchen zu einer erhöhten Lebermetastasierung geführt hatte (263-265). In dieser Experimentaldiät war der Rohfett-Anteil von ursprünglich 3,5% (Standarddiät) auf 21,4% angehoben worden (2% ALA, 11% LA). Das Experiment wurde nach den UKCCCR Richtlinien ausgeführt (121).

2.6.3 Tumorinduktion

Die Tiere wurden in folgende 4 Kontrollgruppen (Gr.1-4) und 4 Tumorgruppen (Gr. 5-8) von jeweils 15 Hamstern randomisiert:

Tab. 15: Tumorinduktion und Therapie der Versuchsgruppen 1-8

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Tumorinduktion	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Therapie	Keine	COX-2	5-LOX	COX-2 5-LOX	Keine	COX-2	5-LOX	COX-2 5-LOX

Während bei den Kontrollgruppen 1-4 eine subkutane Injektion von 0,5ml 0,9% NaCl über 16 Wochen erfolgte, erhielten die Gr. 5-8 wöchentlich 10mg BOP (Ash Stevens Chem., USA) /kg Körpergewicht subkutan im gleichen Zeitraum zur Induktion eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas. BOP wurde dazu kurz vor der Anwendung in 0,9%iger NaCl-Lösung (B.Braun, Deutschland) auf 3mg/ml gelöst. Alle Injektionen wurden unter kurzer Äthernarkose (Hoechst, Deutschland) durchgeführt.

2.6.4 Therapie

Direkt nach der 16wöchigen Tumorinduktionsphase wurde eine 16-wöchige Therapie durchgeführt. Hierbei erhielten die Gr. 2 und 6 täglich 7mg Celebrex (Pfizer, Zürich, Schweiz) oral, während die Gr. 3 und 7 mit 28mg Zylflo (Abbott, Chicago, USA) oral behandelt wurden. Die Gr. 4 und 8 erhielten eine Kombinationstherapie aus Celebrex und Zylflo.

2.6.5 Obduktion

In der 33. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere mittels einer Narkose mit Ursotamin (Serumwerk Bernburg, Deutschland) getötet. Nach Tötung der Tiere wurde eine Obduktion durchgeführt. Die Organentnahme erfolgte analog der unter 2.4.5 beschriebenen Methodik.

2.6.6 Histologische Untersuchungen

Die histologische Aufarbeitung erfolgte analog der 2.2.5 beschriebenen Methodik mit der Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Guski am Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte.

2.6.7 Biochemische Untersuchungen

Analog zu der unter 2.2.6 beschriebenen Methodik erfolgten die Bestimmung der TBARS-Konzentration sowie der Aktivitäten der Lipidperoxidations-Schutzenzyme GSHPX und SOD im Lebergewebe mit der Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Schimke (Medizinische Klinik für Kardiologie) der Charité Campus Mitte.

2.6.8 Statistik

Die Daten wurden im Falle der Normalverteilung als Mittelwert \pm Standardabweichungen angegeben. Kontinuierliche Daten wurden mit Hilfe des Shapiro-Francia-Tests auf Normalverteilung überprüft. Alle Daten waren normalverteilt, dementsprechend wurden die Daten zwischen den Gruppen mit der Einfaktoriellen Multivarianzanalyse (ANOVA) verglichen. Post hoc-Tests wurden nach Bonferroni bei gleichen Varianzen oder mit Hilfe des Dunett's T3-Tests bei ungleichen Varianzen durchgeführt.

Der Vergleich zwischen extrametastatischen und intrametastatischen Werten jeder Gruppe wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests durchgeführt. Kategorielle Daten wurden mit Hilfe des Fisher's-Exakt-Tests überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit 95% ($p < 0,05$) definiert. Alle Berechnungen fanden mit SPSS 9.2[®] für Windows97[®] statt.

3 Ergebnisse

3.1 Versuch der Induktion eines duktales Pankreaskarzinoms

3.1.1 Tumorinduktionsrate, Letalität, Körpergewicht

Die Induktionsrate von gut-differenzierten Primärtumoren eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas betrug bei insgesamt 12 Tieren 91% (n=11) (Abb.1). Bei keinem Tier wurden Lebermetastasen oder cholangiozelluläre Karzinome nachgewiesen. Die Letalität während des Versuches lag bei n=1 (Todesursache: Pankreaskarzinom, Ikterus)

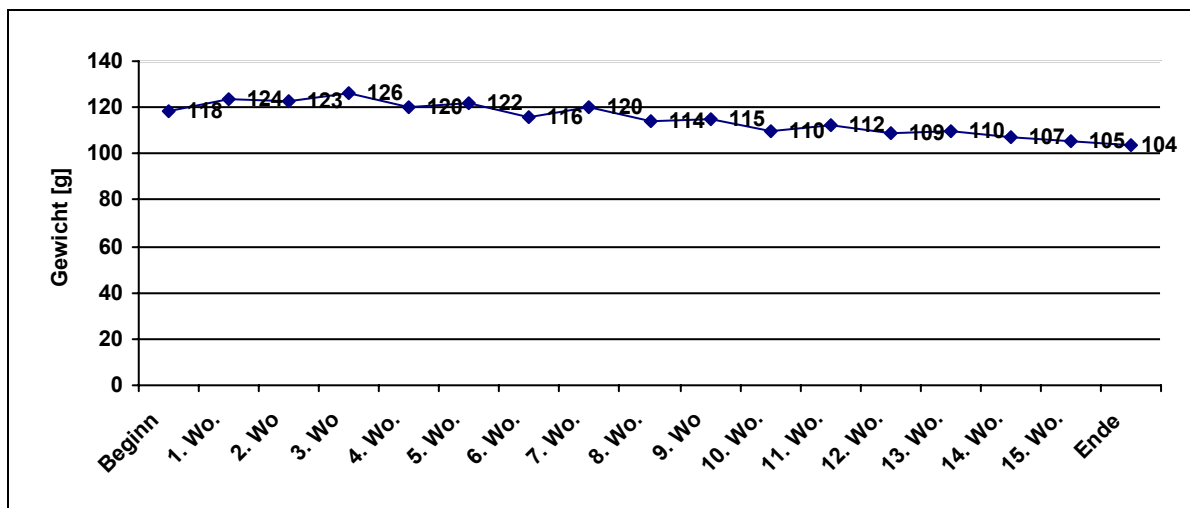
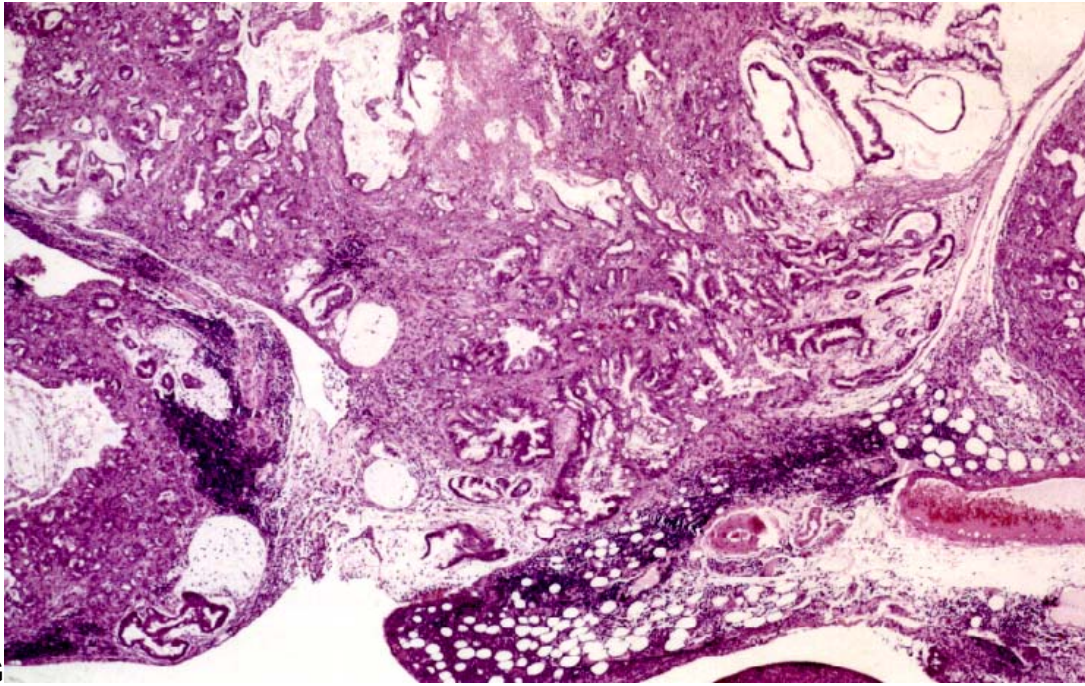


Abb. 1: Entwicklung des mittleren Körpergewichts der Versuchstiere

3.1.2 Histologische Klassifikation

Die Klassifikation erfolgte nach den Kriterien von Meijers et al. (158). Innerhalb aller untersuchten pankreatischen Raumforderungen konnten invasiv wachsende Anteile duktales Adenokarzinome nachgewiesen werden (Abb. 2, Abb. 3). Zusätzlich fanden sich in nahezu jedem Präparat Vorstufen wie papilläre und/oder duktales Hyperplasien, atypische Hyperplasien und in-situ-Karzinome. Weiterhin konnten häufig eine Begleit-Desmoplasie sowie eine unterschiedlich stark ausgeprägte inflammatorische Komponente beobachtet werden.



G

Abb. 2: Pankreaskarzinom, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung

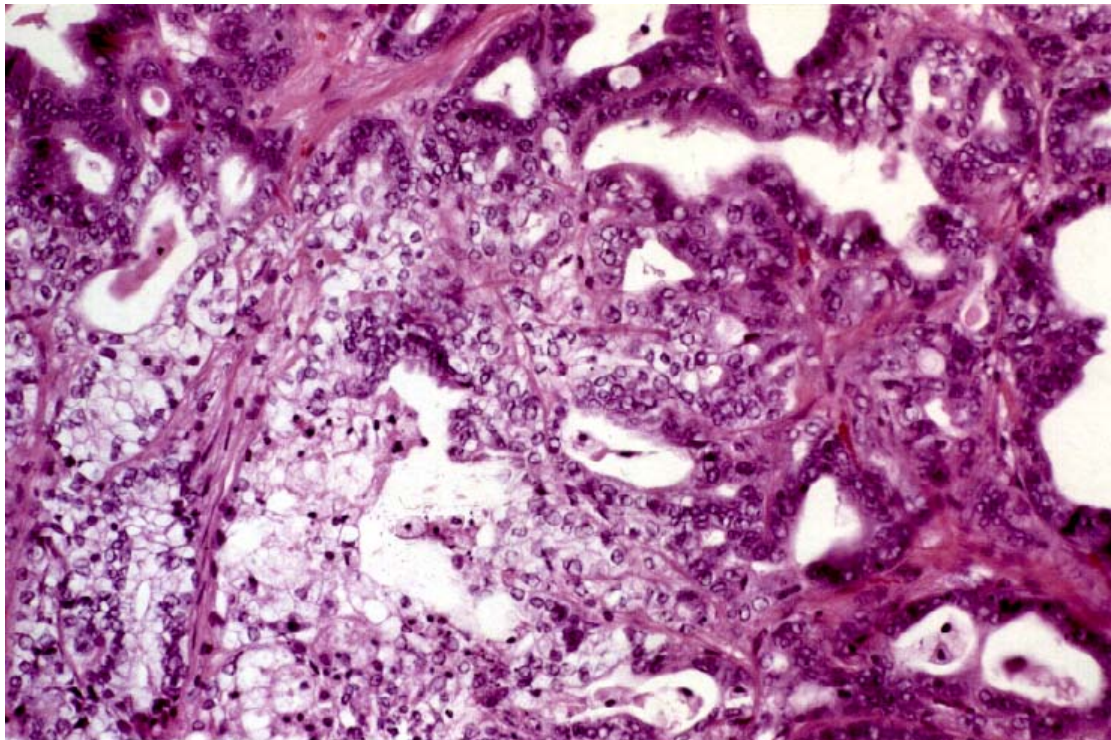


Abb. 3: Pankreaskarzinom, HE-Färbung, 40fache Vergrößerung

3.2 Versuch der Steigerung der Lebermetastasierung durch eine Modifikation der enteralen Fettsäurekombination aus α -Linolensäure und Linolsäure beim duktalem Pankreaskarzinom

3.2.1 Organ- und Körpergewicht, Letalität

Bezüglich des Körpergewichts und des Organgewichts von Pankreas und Leber bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen 1-4. Ferner unterschieden sich die einzelnen Gruppen nicht hinsichtlich der Proteinkonzentration.

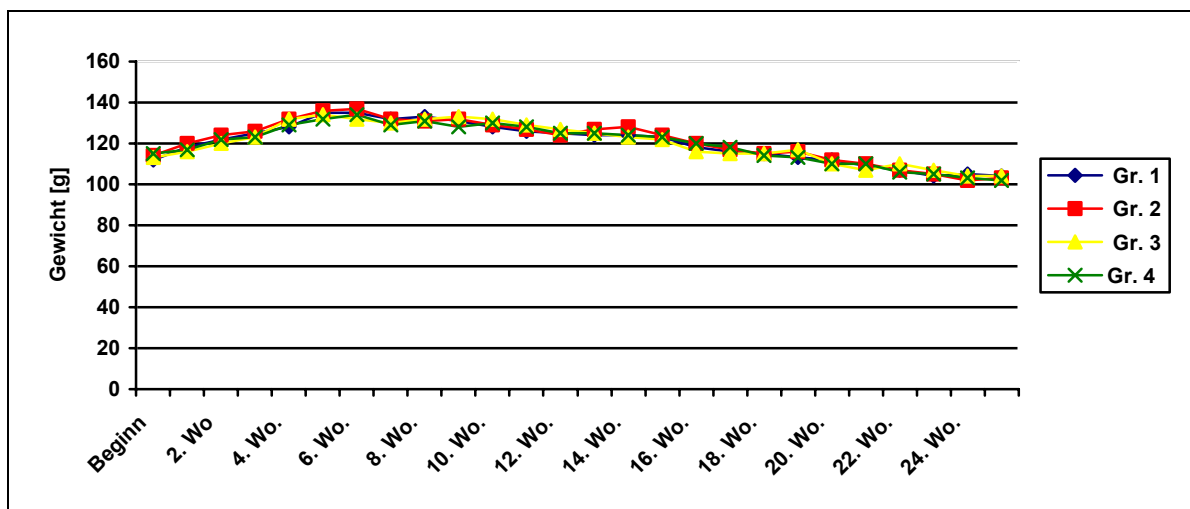


Abb. 4: Entwicklung des mittleren Körpergewichts der Gruppen 1-4

Während der Studie verstarb kein Tier in den Gruppen 1-4.

3.2.2 Inzidenz von Pankreaskarzinomen

Erwartungsgemäß waren weder Pankreaskarzinome noch Lebermetastasen in den Kontrollgruppen 1 und 3 nachweisbar. Die Inzidenz von Pankreaskarzinomen lag in Gr. 2 bei 93,3% und in Gr. 4 bei 100% ($p < 0,05$, Abb. 5). Bei allen Tumoren handelte es sich um gut bis mäßig differenzierte duktale Adenokarzinome.

3.2.3 Inzidenz von Lebermetastasen

Die Inzidenz von Lebermetastasen betrug in Gr. 2 35,7% ($n=5$), während sie in Gr. 4 mit 93,3% ($n=14$) signifikant erhöht war ($p < 0,05$, Abb. 5). Alle Lebermetastasen wurden als Metastasen eines duktales Adenokarzinoms klassifiziert.

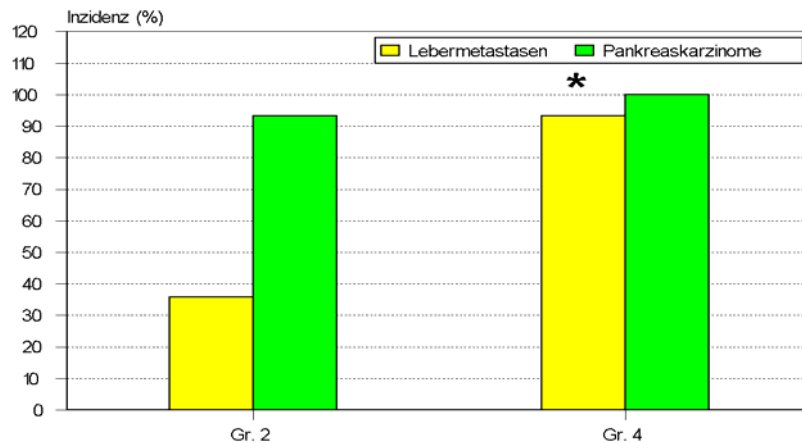


Abb. 5: Induktionsrate von Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen (%) in Gr. 2 (BOP, SD) und Gr. 4 (BOP, HF) (* $p < 0,05$ vs Gr.2)

3.2.4 Klassifikation hepatischer Raumforderungen

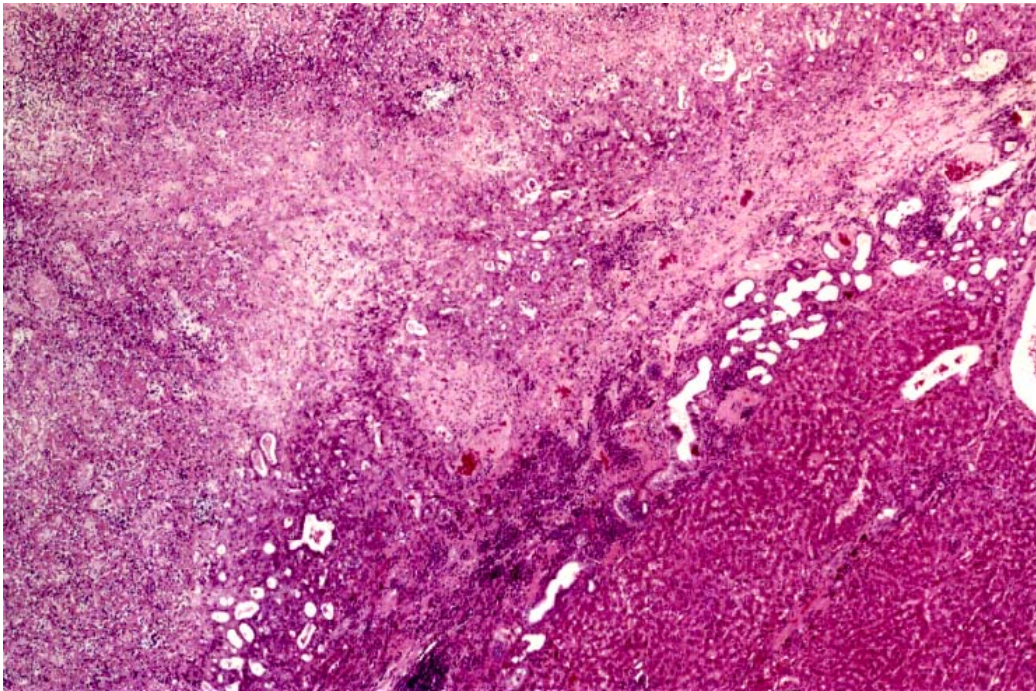


Abb. 6: Lebermetastase, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung

In allen Fällen konnten in den metastasenverdächtigen Raumforderungen in der Leber Metastasen eines duktales Adenokarzinoms nachgewiesen werden. Andere Neoplasien wurden nicht gefunden (Abb. 6, Abb. 7).

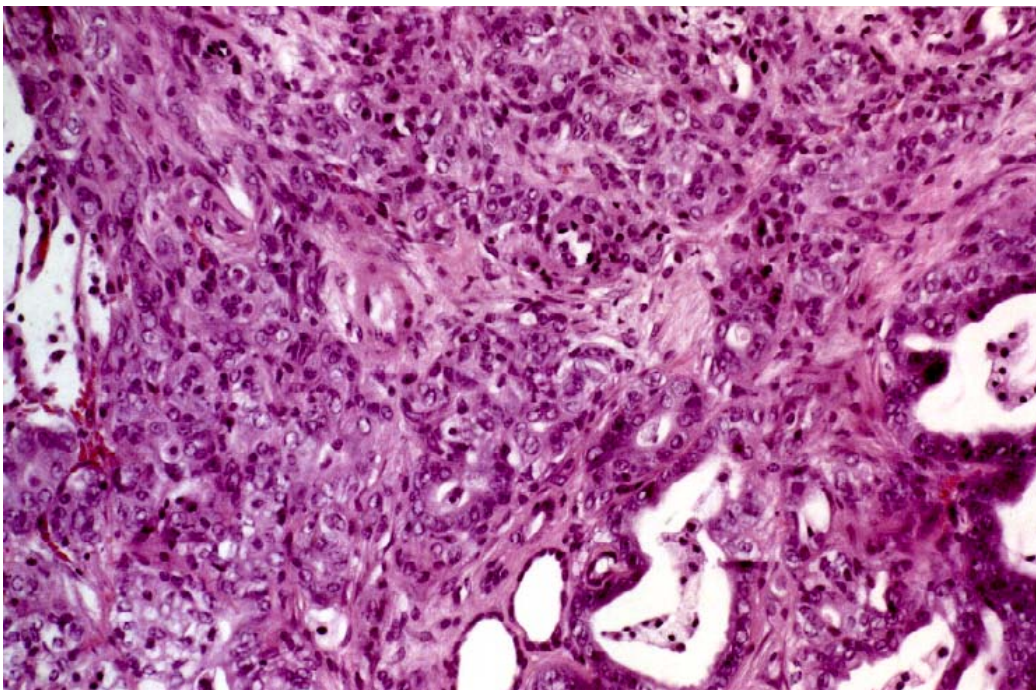


Abb. 7: Lebermetastase, HE-Färbung, 40fache Vergrößerung

3.2.5 Anzahl und Größe von Lebermetastasen

Die durchschnittliche Anzahl von Lebermetastasen pro Tier war in Gr. 4 gegenüber Gr. 2 erhöht ($3,45 \pm 0,45$ vs $1,75 \pm 0,34$; $p < 0,05$, Abb. 2). Der Mittelwert des 2-dimensionalen Durchmessers der Lebermetastasen war in Gr. 4 gegenüber Gr. 2 ebenfalls erhöht ($3,11 \pm 0,32$ vs $1,59 \pm 0,25 \text{ mm}^2$; Abb. 8).

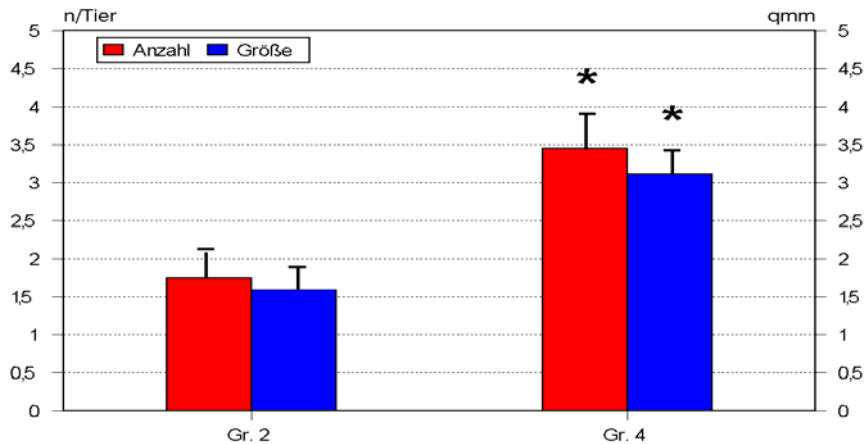


Abb. 8: Anzahl (n/Tier) und Größe (mm^2) von Lebermetastasen in Gr. 2 (BOP, SD) und Gr. 4 (BOP, HF). (Mittelwert \pm Standardabweichung, $p < 0,05$ vs Gr.2)

3.2.6 Aktivität der hepatischen GSHPX

Bezüglich der GSHPX-Aktivität war kein Unterschied zwischen Gr. 1 und 3 nachweisbar [$(2,05 \pm 0,14) \times 10^7$ vs $(1,99 \pm 0,14) \times 10^7$ U/mg Protein], während die Aktivität der GSHPX in Gr. 2 erniedrigt war [$(1,26 \pm 0,09) \times 10^7$ U/mg Protein]. In Gr. 4 zeigte sich die niedrigste GSHPX-Aktivität [$(1,26 \pm 0,09) \times 10^7$ U/mg Protein; $p < 0,05$, Abb. 9)].



Abb. 9: Anzahl (n/Tier) und Größe (mm^2) von Lebermetastasen in Gr. 2 (BOP, SD) und Gr. 4 (BOP, HF). (Mittelwert \pm Standardabweichung, $p < 0,05$ vs Gr.2)

3.2.7 Aktivität der hepatischen SOD

Im Vergleich zu den Gr. 1 und 3 (733±78 und 748±94 U/mg Protein) war die SOD-Aktivität in Gr. 2 und 4 erhöht (1226±135 und 1367±174 U/mg Protein) ($p < 0,05$; Abb. 10)

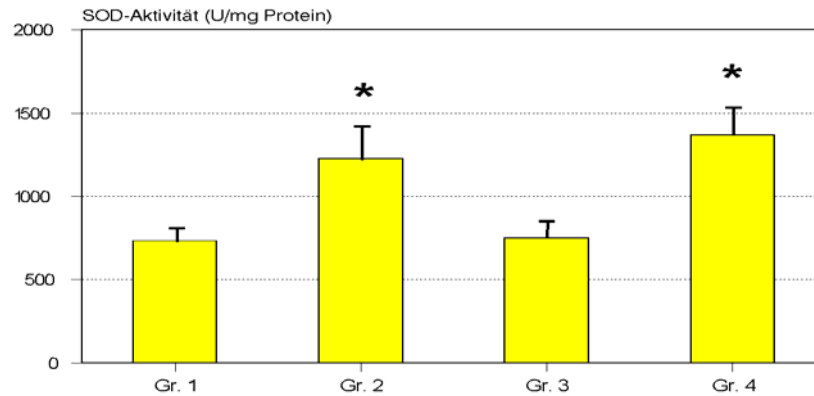


Abb. 10: Aktivität der hepatischen SOD (U/mg Protein) in Gr. 1 (SD), Gr. 2 (BOP,SD), Gr. 3 (HF) und Gr. 4 (BOP,HF) (Mittelwerte±Standardabweichung, * $p < 0,05$ vs Gr. 1+3;)

3.2.8 Konzentration der hepatischen TBARS

Die Lipidperoxidation (TBARS) der Gr. 2 (10,68±1,02nmol/mg Protein) und Gr. 4 (28,37±1,96nmol/mg Protein) waren im Vergleich zu Gr. 1 (7,15±0,92nmol/mg Protein) und Gr. 3 (8,11 0,79nmol/mg Protein) erhöht. In Gr. 4 war die Lipidperoxidation höher als in Gr. 2 ($p < 0,05$; Abb. 11).

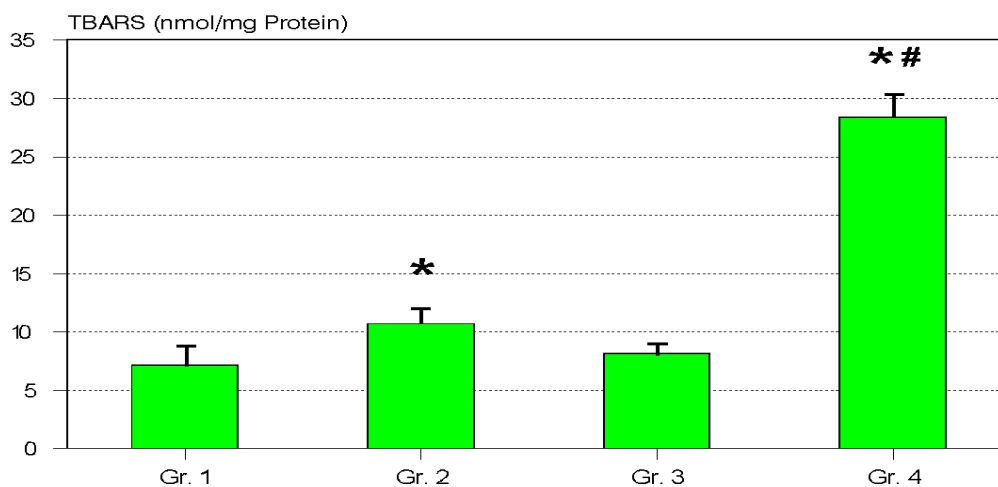


Abb. 11: Aktivität der hepatischen SOD (U/mg Protein) in Gr. 1 (SD), Gr. 2 (BOP,SD), Gr. 3 (HF) und Gr. 4 (BOP,HF) (Mittelwerte±Standardabweichung, * $p < 0,05$ vs Gr. 1+3;)

3.3 Einfluß von Octreotid und Tamoxifen auf das Tumorwachstum und die Lebermetastasierung beim duktalem Pankreaskarzinom

Bei der Evaluierung des Einflusses der Einzeltherapie im Vergleich zur Kombinationstherapie mit Octreotid und Tamoxifen auf das Tumorwachstum beim duktalem Pankreaskarzinom an einem standardisierten Tumormodell zeigten sich sowohl unter der Einzeltherapie mit Octreotid als auch unter der kombinierten Behandlung eine Verminderung des Wachstums der Primärtumore und der Lebermetastasen.

3.3.1 Organ- und Körpergewicht, Letalität

Bezüglich der Organgewichte von Pankreas und Leber sowie des Körpergewichtes zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den 4 Versuchsgruppen. (Abb. 12)während der Studie verstarb kein Tier.

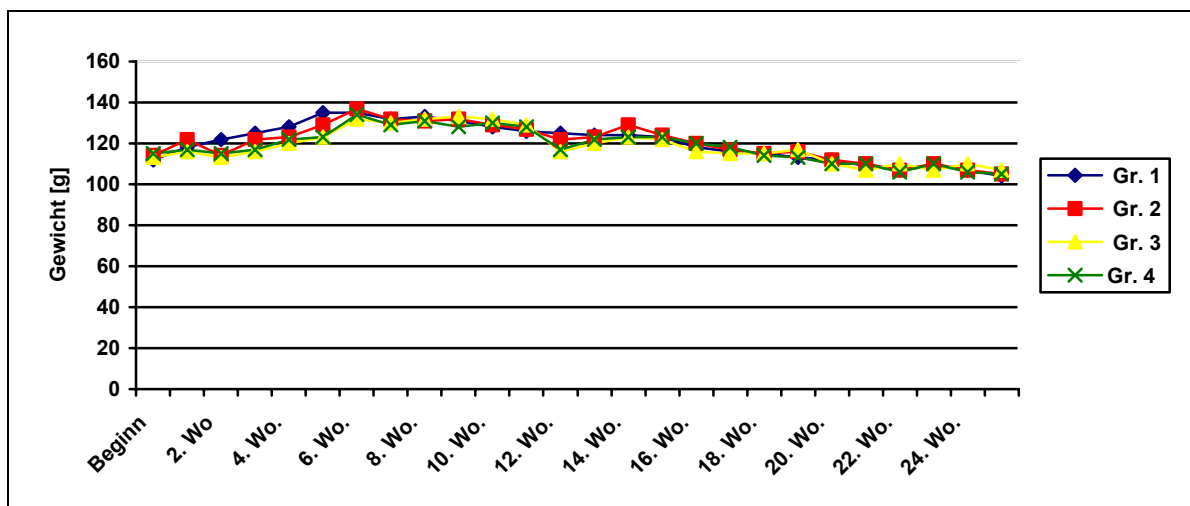


Abb. 12: Verlauf des mittleren Körpergewichts der Versuchsgruppen 1-4

3.3.2 Inzidenz und Anzahl von Pankreaskarzinomen

Die Versuchsgruppen 1-4 unterschieden sich nicht hinsichtlich der Inzidenz histologisch nachgewiesener duktaler Adenokarzinome des Pankreas (Gr. 1: 100%, Gr. 2: 93,3%, Gr. 3: 100%, Gr. 4: 100%). Makroskopisch sichtbare Pankreastumore wurden in Gr. 1 in 60% und Gr. 3 in 53,3% der Fälle nachgewiesen ($p > 0,05$). Die Inzidenz makroskopischer Tumore war in Gr. 2 (26,7%) und Gr. 4 (33,3%) erniedrigt ($p < 0,05$ vs Gr. 1 und 3, Abb. 13).

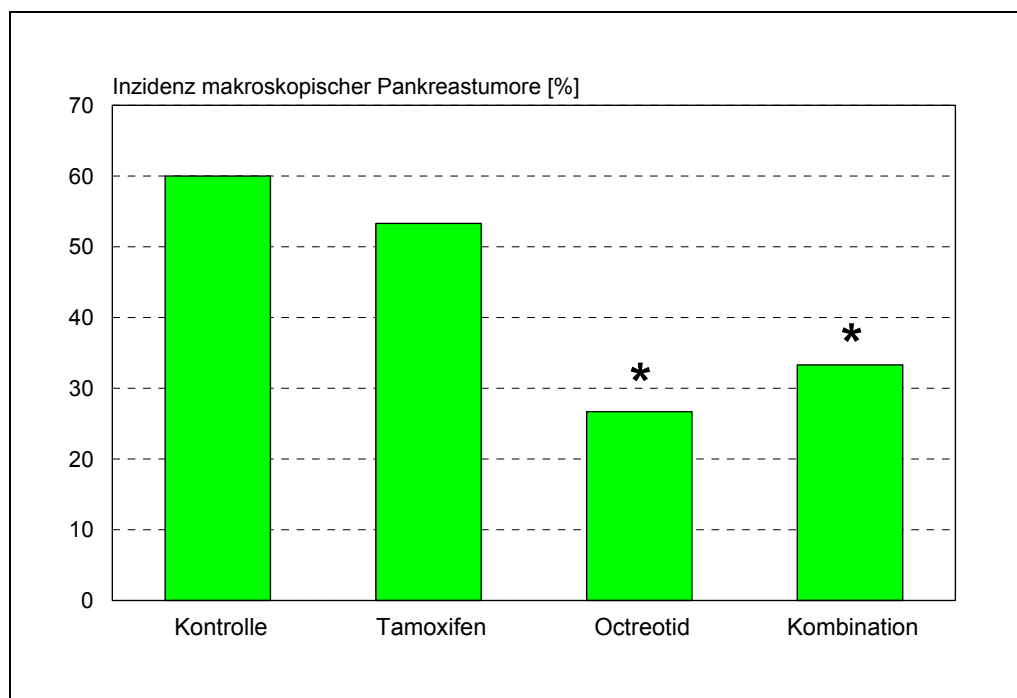


Abb. 13: Inzidenz makroskopischer Pankreastumore [%]; (* $p < 0,05$ vs Kontroll- und Tamoxifengruppe)

Alle Tumoren wurden als mittelgradig differenzierte duktale Adenokarzinome klassifiziert. Die Anzahl makroskopischer Pankreaskarzinome pro Tier unterschied sich nicht zwischen den 4 Versuchsgruppen (Gr. 1: $1,22 \pm 0,44$; Gr. 2: $1,0 \pm 0$; Gr. 3: $1,25 \pm 0,46$; Gr. 4: $1,2 \pm 0,45$).

3.3.3 Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen

Die 4 Versuchsgruppen unterschieden sich nicht bezüglich der Inzidenz der Lebermetastasen (Gr. 1: 93,3%; Gr. 2: 71,4%; Gr. 3: 80%; Gr. 4: 73,3%). Allerdings war die durchschnittliche Anzahl von Lebermetastasen pro Tier in der Octreotid-Gruppe (Gr. 2: $1,91 \pm 0,26$) und in der Gruppe der Kombinationstherapie (Octreotid / Tamoxifen) (Gr. 4: $1,33 \pm 0,52$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gr. 1: $3,45 \pm 0,45$) und zur Tamoxifen-Gruppe (Gr. 3: $3,23 \pm 0,39$) erniedrigt ($p < 0,05$, Abb. 14). Darüberhinaus war die Größe der Lebermetastasen in der Octreotid- und in der Octreotid-Tamoxifen-Gruppe (Gr. 2: $1,61 \pm 0,29$ und Gr. 4: $1,85 \pm 0,37 \text{ mm}^2$) im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Tamoxifen-Gruppe reduziert (Gr. 1: $3,11 \pm 0,32$ und Gr. 3: $2,96 \pm 0,45 \text{ mm}^2$) ($p < 0,05$, Abb. 14).

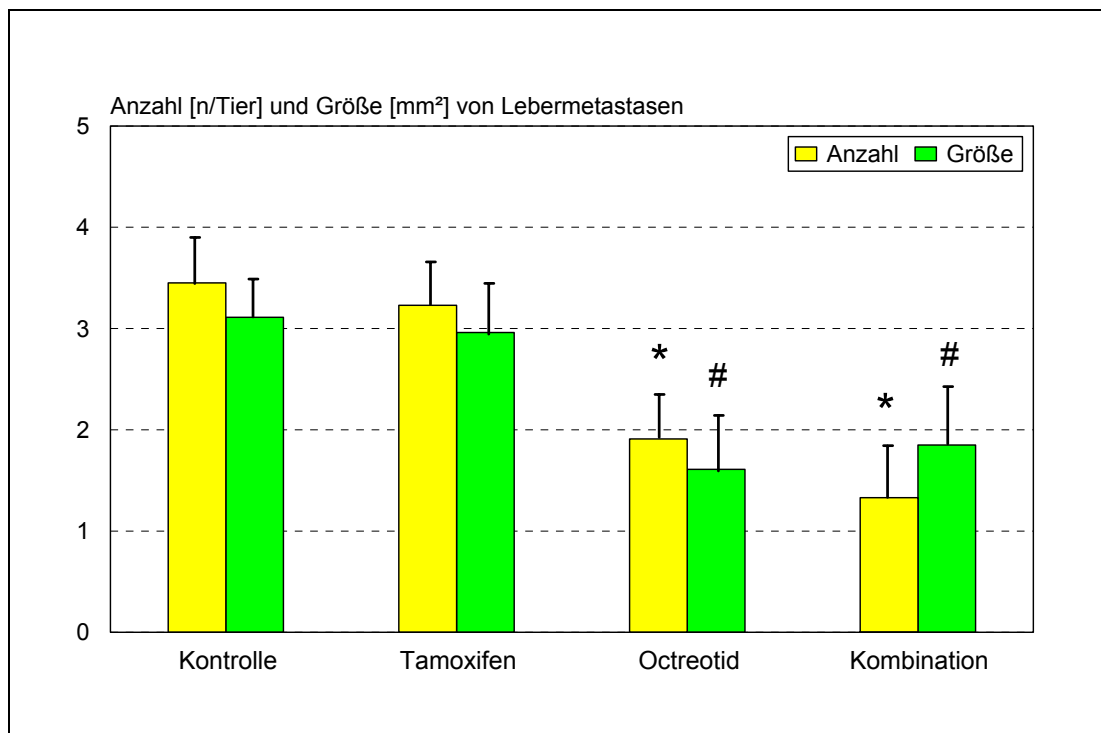


Abb. 14: Anzahl [n/Tier] und Größe [mm²] von Lebermetastasen (Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$ vs Anzahl in Kontroll- und Tamoxifengruppe / # $p < 0,05$ vs Größe in Kontroll- und Tamoxifengruppe)

3.3.4 Östrogen- und Somatostatinrezeptoren

Bei allen Tieren der Versuchsgruppen 1-4 wurden Östrogenrezeptoren in den Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen nachgewiesen. Bei 3 Tieren der Octreotid-Gruppe wurde eine Octreotid-Autoradiographie durchgeführt. Hierbei wurden bei allen Tieren Somatostatin-Rezeptoren in den Lebermetastasen nachgewiesen. (Prof. J.C. Reubi, Universität zu Bern, Inselspital).

3.4 Einfluß von Octreotid auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

Bei der Untersuchung des Wirkungsmechanismus von Octreotid zeigte sich in der vorliegenden tierexperimentellen Studie unter der Behandlung mit Octreotid histologisch ein vermindertes Wachstum der Lebermetastasen bei einer gleichzeitigen biochemisch nachgewiesenen Verminderung des Lipidperoxidationsstoffwechsels im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.4.1 Letalität, Körpergewicht

Während des gesamten Versuchszeitraums lag die Letalität in allen Gruppen bei 0%. Hinsichtlich der Entwicklung des mittleren Körpergewichts bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen 1-6 (Abb. 15).

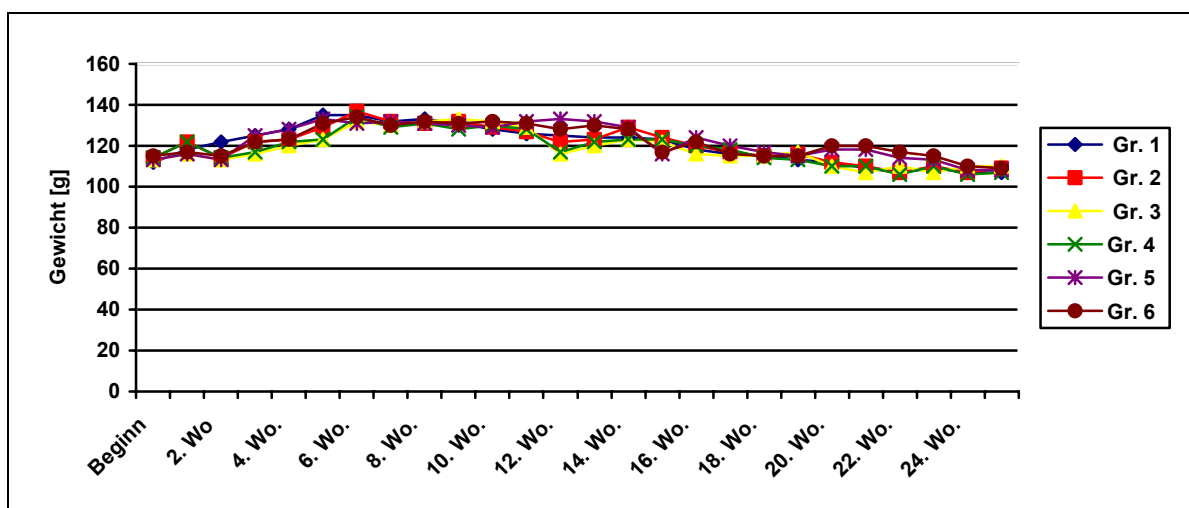


Abb. 15: Entwicklung des mittleren Körpergewichts der Gr. 1-6

3.4.2 Makroskopie / Auflichtmikroskopie von Pankreas und Leber

3.4.2.1 Makroskopie / Auflichtmikroskopie des Pankreas

Während der Obduktion konnten in Gr. 1 und 4 erwartungsgemäß keine Raumforderungen im Pankreas festgestellt werden. Die Häufigkeit pankreatischer Raumforderungen in den Gr. 2, 3, 5 und 6 ist in Tab.16 dargestellt.

Tab. 16: Inzidenz pankreatischer Raumforderungen

<u>Versuchsgruppe</u>	<u>Inzidenz pankreatischer Raumforderungen</u>
2 [Stand.diät, BOP, ØOctreotid]	93,3% (n=14)
3 [Stand.diät, BOP, Octreotid]	100% (n=15)
5 [Hochfettdiät, BOP, ØOctreotid]	100% (n=15)
6 [Hochfettdiät, BOP, Octreotid]	93,3% (n=14)

Alle Raumforderungen befanden sich im splenischen oder gastrischen Pankreasanteil und infiltrierte zum Teil ihre Umgebung. Zwischen den Gruppen 2, 3, 5 und 6 bestanden hinsichtlich der Häufigkeit pankreatischer Raumforderungen keine Unterschiede ($p > 0,05$).

3.4.2.2 Makroskopie / Auflichtmikroskopie der Leber

3.4.2.2.1 Inzidenz / Anzahl von Metastasen

Die bei der Untersuchung der lamellierten Lebern festgestellte Inzidenz von Metastasen bei den Tieren der Gr. 2, 3, 5 und 6 ist in Tab.17 dargestellt.

Tab. 17: Inzidenz pankreatischer Raumforderungen

<u>Versuchsgruppe</u>	<u>Inzidenz von Lebermetastasen</u>
2 [Stand.diät, BOP, ØOctreotid]	35,7% (n=5)
3 [Stand.diät, BOP, Octreotid]	26,7% (n=4)
5 [Hochfettdiät, BOP, ØOctreotid]	93,3% (n=14)
6 [Hochfettdiät, BOP, Octreotid]	71,4% (n=10)

Weder zwischen Gr. 2 und 3 noch zwischen Gr. 5 und 6 bestanden Unterschiede ($p < 0,05$). Jedoch bestanden zwischen Gr. 2 und 5 bzw. 3 und 6 als auch Gr. 3 und 5 signifikante Unterschiede. Die Anzahl der Lebermetastasen bei den Tieren der Gr. 2, 3, 5 und 6 ist in Tab.17 dargestellt.

Tab. 18: Anzahl von Lebermetastasen (Mittelwerte \pm Standardabweichungen)

<u>Versuchsgruppe</u>	<u>Anzahl von Lebermetastasen [n/Tier]</u>
2 [Stand.diät, BOP, ØOctreotid]	1,75 \pm 0,34
3 [Stand.diät, BOP, Octreotid]	1,00 \pm 0,0
5 [Hochfettdiät, BOP, ØOctreotid]	3,45 \pm 0,45
6 [Hochfettdiät, BOP, Octreotid]	1,91 \pm 0,26

Der Unterschied zwischen Gr. 2 und 6 war nicht signifikant, als signifikant erwiesen sich hingegen die Unterschiede zwischen Gr. 2 und 3 sowie 5 und 6 ($p < 0,05$). Auch zwischen Gr. 2 und 5 sowie 3 und 6 bestanden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

3.4.2.2.2 Größe von Metastasen

Die durchschnittliche Größe der Lebermetastasen bei den Tieren der Gr. 2, 3, 5 und 6 ist in Tab.19 dargestellt.

Tab. 19: Anzahl von Lebermetastasen (Mittelwerte \pm Standardabweichungen)

<u>Versuchsgruppe</u>	<u>Größe der Lebermetastasen [mm²]</u>
2 [Stand.diät, BOP, \emptyset Octreotid]	1,59 \pm 0,25
3 [Stand.diät, BOP, Octreotid]	0,84 \pm 0,15
5 [Hochfettdiät, BOP, \emptyset Octreotid]	3,11 \pm 0,32
6 [Hochfettdiät, BOP, Octreotid]	1,91 \pm 0,29

Gr. 2 und 6 unterschieden sich nicht hinsichtlich der Größe von Lebermetastasen voneinander ($p > 0,05$). Während die Hochfetterernährung zu signifikant größeren Lebermetastasen führte (Gr.5 vs Gr.2, $p < 0,05$), kam es durch die Octreotidtherapie bei beiden Ernährungsformen zu einer Verkleinerung der Lebermetastasen (Gr.3 vs Gr.2 und Gr.6 vs Gr.5, $p < 0,05$).

3.4.3 Histologische Ergebnisse

3.4.3.1 Pankreatische Raumforderungen

Die Klassifikation erfolgte nach den Kriterien von Meijers et al (193). Innerhalb aller untersuchten Raumforderungen beobachteten wir invasiv wachsende Anteile duktaler Adenokarzinome. Darüberhinaus konnten wir in nahezu jedem Präparat Vorstufen wie papilläre und/oder duktale Hyperplasien, atypische Hyperplasien und in-situ-Karzinome nachweisen. Weiterhin konnten häufig eine Begleit-Desmoplasie sowie eine unterschiedlich stark ausgeprägte inflammatorische Komponente beobachtet werden.

3.4.3.2 Hepatische Raumforderungen

In allen Fällen konnten in den metastasenverdächtigen Raumforderungen der Leber Metastasen eines dukteren Adenokarzinoms nachgewiesen werden. Andere Neoplasien wurden nicht gefunden.

3.4.4 Biochemische Ergebnisse

3.4.4.1 Eiweißgehalt

Der in den metastasenfremen Leberanteilen (MFLA) gemessene Proteingehalt ist in Tab. 20 dargestellt. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p>0,05$). Der in den Lebermetastasen gemessene Proteingehalt ist ebenfalls in Tab. 19 dargestellt. Auch hier fanden sich zwischen den betreffenden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p>0,05$). Auch beim Vergleich des intrametastastischen mit dem Proteingehalt in MFLA innerhalb der betreffenden Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt ($p>0,05$).

Tab. 20: Proteingehalt in metastasenfremen Leberanteilen und in Lebermetastasen (Mittelwerte±Standardabweichungen)

Gruppe	Therapie	Proteingehalt in metastasenfremen Leberanteilen [mg/ml]	Proteingehalt in Lebermetastase n [mg/ml]
1	Standarddiät, ØBOP, ØOctreotid	4,82±0,33	
2	Standarddiät, BOP, ØOctreotid	4,96±0,42	4,92±0,29
3	Standarddiät, BOP, Octreotid	4,84±0,39	4,94±0,16
4	Hochfettdiät, ØBOP, ØOctreotid	4,85±0,30	
5	Hochfettdiät, BOP, ØOctreotid	4,88±0,29	4,84±0,42
6	Hochfettdiät, BOP, Octreotid	4,79±0,30	4,74±0,55

3.4.4.2 GSHPX – Aktivität

Die GSHPX-Aktivität in metastasenfremen Leberanteilen (MFLA) ist in Abb.16 dargestellt.

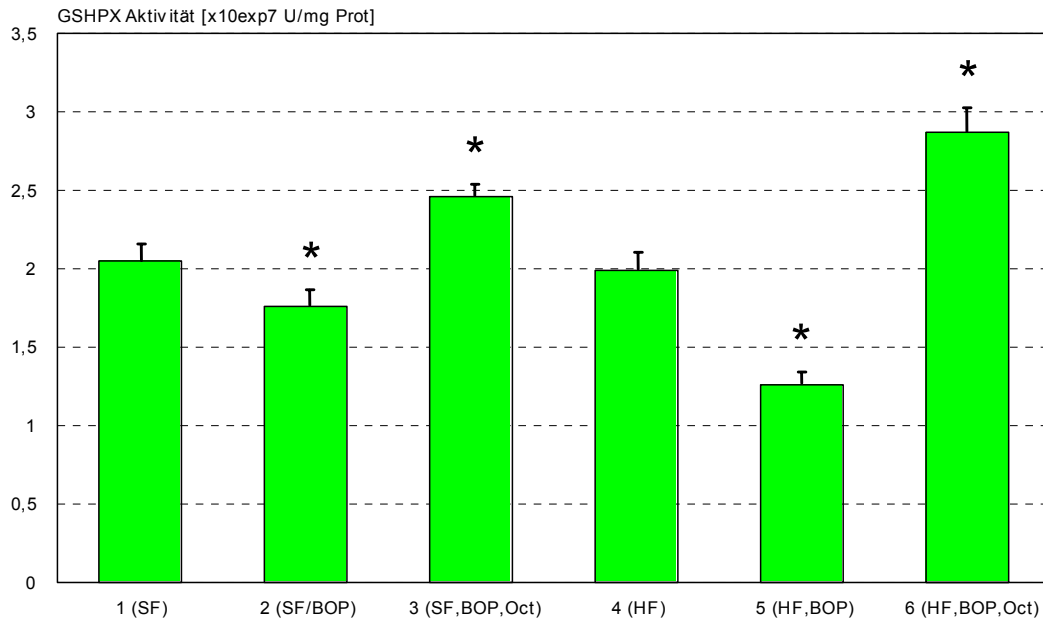


Abb. 16: GSHPX-Aktivität in MFLA [$\cdot 10^7$ U/mg Eiweiß]
(Mittelwerte \pm Standardabweichungen, * $p < 0,05$)

Die GSHPX-Aktivität in MFLA wurde durch BOP sowohl bei Standard- (Gr. 2: [$1,76 \pm 0,12$] $\cdot 10^7$ vs Gr. 1: [$2,05 \pm 0,14$] $\cdot 10^7$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) wie auch bei Hochfetterernährung (Gr. 5: [$1,26 \pm 0,09$] $\cdot 10^7$ vs Gr. 4: [$1,99 \pm 0,14$] $\cdot 10^7$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) signifikant erniedrigt.

Im Gegensatz hierzu wurde sie durch eine Octreotidtherapie signifikant gesteigert (Gr. 3: [$2,46 \pm 0,2$] $\cdot 10^7$ vs Gr. 1: [$2,05 \pm 0,14$] $\cdot 10^7$, $p < 0,05$ und Gr. 6: [$2,87 \pm 0,17$] $\cdot 10^7$ vs Gr. 4: [$1,99 \pm 0,14$] $\cdot 10^7$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Sowohl die Erniedrigung durch BOP wie auch die Erhöhung durch Octreotid fielen bei gleichzeitiger Hochfetterernährung signifikant stärker als bei Standardernährung (Gr. 5: [$1,26 \pm 0,09$] $\cdot 10^7$ vs Gr. 2: [$1,76 \pm 0,12$] $\cdot 10^7$, $p < 0,05$ und Gr. 6: [$2,87 \pm 0,17$] $\cdot 10^7$ vs Gr. 3: [$2,46 \pm 0,2$] $\cdot 10^7$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$).

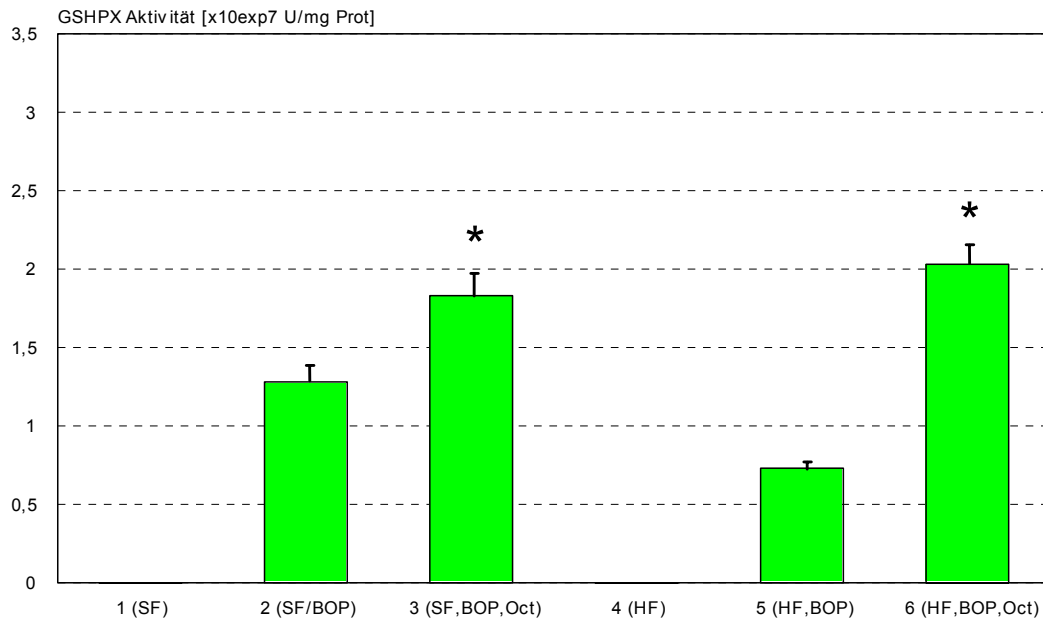


Abb. 17: GSHPX-Aktivität in Lebermetastasen [$\times 10^7$ U/mg Eiweiß], (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, * $p < 0,05$)

Bei einer Hochfetterernährung war die GSHPX-Aktivität in Lebermetastasen signifikant geringer als bei einer Standardernährung (Gr. 5: $[0,73 \pm 0,07] \times 10^7$ vs Gr. 2: $[1,28 \pm 0,11] \times 10^7$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Sowohl bei Standard- (Gr. 3: $[1,83 \pm 0,12] \times 10^7$ vs Gr. 2: $[1,28 \pm 0,11] \times 10^7$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) als auch bei Hochfetterernährung (Gr. 6: $[2,03 \pm 0,15] \times 10^7$ vs Gr. 5: $[0,73 \pm 0,07] \times 10^7$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) wurde die GSHPX-Aktivität in Lebermetastasen durch eine Octreotidtherapie jedoch signifikant gesteigert, wobei sie unter einer Hochfetterernährung nochmals signifikant größer als unter einer Standardernährung war (Gr. 6: $[2,03 \pm 0,15] \times 10^7$ vs Gr. 3: $[1,83 \pm 0,12] \times 10^7$ U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) (Abb. 17).

Der innerhalb der Versuchsgruppen durchgeführte Vergleich der GSHPX-Aktivität in MFLA und Lebermetastasen zeigte, daß die GSHPX-Aktivität in den Lebermetastasen jeweils signifikant niedriger war als in den MFLA (Gr. 2: $[1,28 \pm 0,11] \times 10^7$ vs $[1,76 \pm 0,12] \times 10^7$; Gr. 3: $[1,83 \pm 0,12] \times 10^7$ vs $[2,46 \pm 0,2] \times 10^7$; Gr. 5: $[0,73 \pm 0,07] \times 10^7$ vs $[1,26 \pm 0,09] \times 10^7$; Gr. 6: $[2,03 \pm 0,15] \times 10^7$ vs $[2,87 \pm 0,17] \times 10^7$ U/mg Eiweiß, jeweils $p < 0,05$).

3.4.4.3 SOD – Aktivität

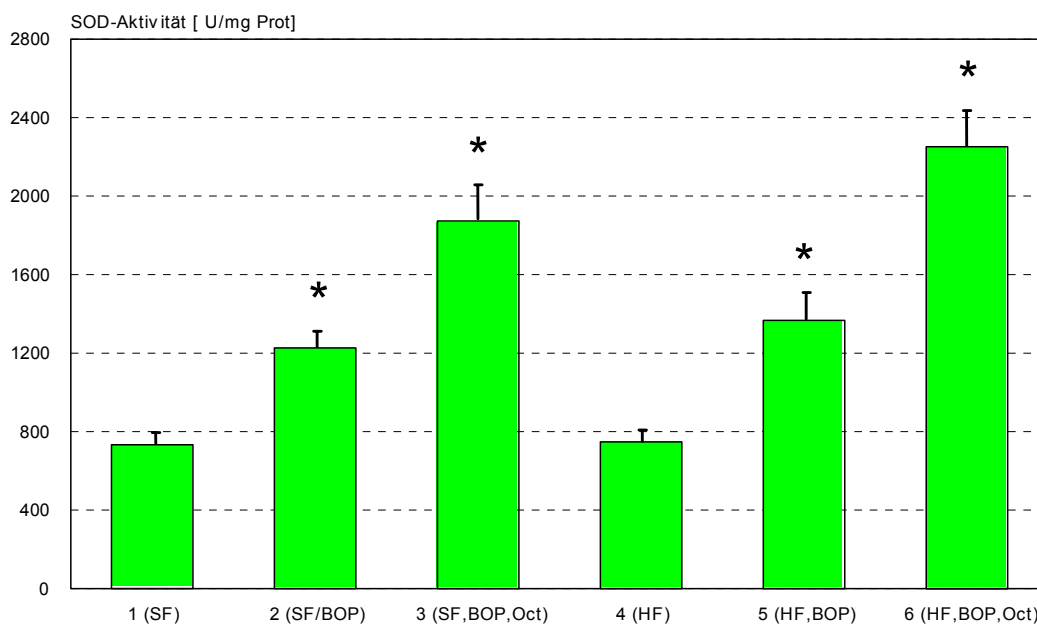


Abb. 18: SOD-Aktivität in MFLA [U/mg Eiweiß], (Mittelwerte±Standardabweichungen, * $p < 0,05$)

Sowohl unter einer Ernährung mit Standardfutter (Gr. 2: 1226 ± 135 vs Gr. 1: 733 ± 78 U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) als auch unter einer Hochfetterernährung (Gr. 5: 1367 ± 174 vs Gr. 4: 748 ± 94 U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) führte BOP zu einer signifikanten Steigerung der SOD-Aktivität in MFLA, wobei diesbezüglich zwischen den beiden Ernährungsformen keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden (Abb. 18).

Octreotid führte zu einer weiteren, signifikanten Steigerung der SOD-Aktivität in MFLA (Gr. 3: 1873 ± 215 vs Gr. 2: 1226 ± 135 , $p < 0,05$ und Gr. 6: 2252 ± 208 vs Gr. 5: 1367 ± 174 U/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Bei gleichzeitiger Hochfetterernährung lag die SOD-Aktivität in MFLA nochmals signifikant über dem Wert bei Standardernährung (Gr. 6: 2252 ± 208 vs Gr. 3: 1873 ± 215 U/mg Eiweiß, $p < 0,05$).

Die Octreotidtherapie führte sowohl bei Standard- (Gr. 3: 1897 ± 187 vs Gr. 2: 907 ± 97 U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) wie auch bei Hochfetterernährung (Gr. 6: 2230 ± 199 vs Gr. 5: 843 ± 101 U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) zu einer signifikanten Steigerung der SOD-Aktivität in Lebermetastasen, wobei diese Steigerung bei einer gleichzeitigen Hochfetttdiät nochmals signifikant stärker ausfiel (Gr. 6: 2230 ± 199 vs Gr. 3: 1897 ± 187 U/mg Eiweiß, $p < 0,05$) (Abb. 19).

Während ohne Octreotidtherapie die SOD-Aktivität in den Lebermetastasen signifikant niedriger als in MFLA war (Gr. 2: 907 ± 97 vs 1226 ± 135 , $p < 0,05$ und Gr. 5: 843 ± 101 vs 1367 ± 174 U/mg Eiweiß, $p < 0,05$), konnten bei Octreotidtherapie keine signifikanten Unterschiede zwischen der SOD-Aktivität in MFLA und der SOD-Aktivität in Lebermetastasen innerhalb der betreffenden Gruppen festgestellt werden (Gr. 3: 1897 ± 187 vs 1873 ± 215 ; Gr. 6: 2230 ± 199 vs 2252 ± 208 U/mg Eiweiß).

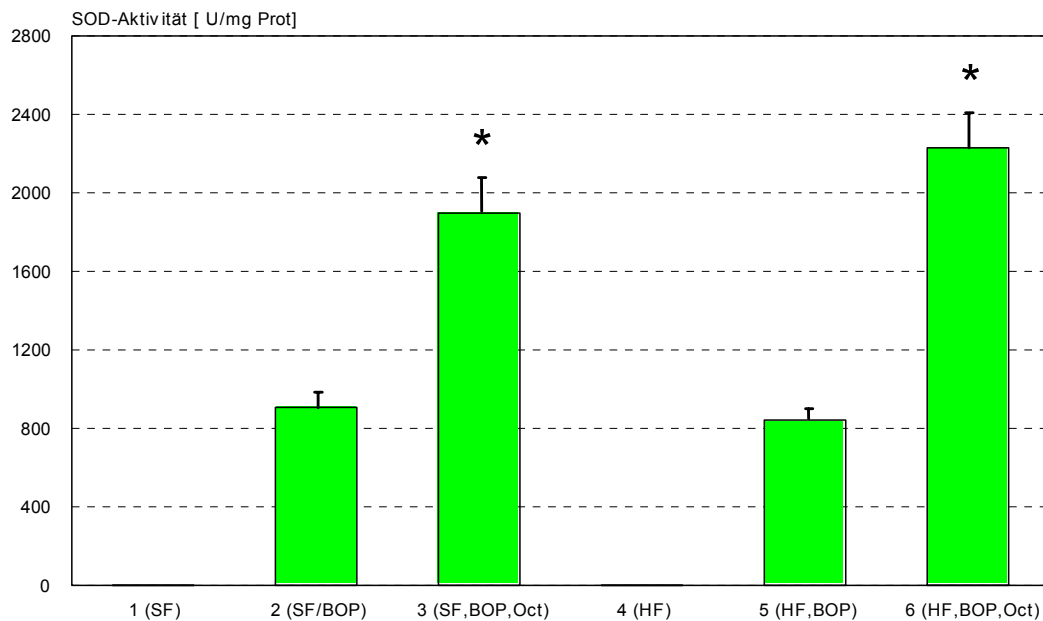


Abb. 19: SOD-Aktivität in Lebermetastasen [U/mg Eiweiß], (Mittelwerte±Standardabweichungen, * $p < 0,05$)

3.4.4.4 Konzentration von TBARS

Die Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen, TBARS) in metastasenfrenen Leberanteilen (MFLA) ist in Abb.20 dargestellt. Sowohl bei Standard- (Gr. 2: $10,68 \pm 1,02$ vs Gr. 1: $7,15 \pm 0,92$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) als auch bei Hochfetterernährung (Gr. 5: $28,37 \pm 1,96$ vs Gr. 4: $8,11 \pm 0,79$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) führte BOP zu einer signifikanten Steigerung der TBARS-Konzentration in MFLA. Die signifikant höchste TBARS-Konzentration in MFLA wurde bei gleichzeitiger Hochfetterernährung gefunden (Gr. 5: $28,37 \pm 1,96$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$ vs alle Gruppen). Bei Standardernährung führte Octreotid demgegenüber zu einer signifikanten Reduktion der TBARS-Konzentration in MFLA (Gr. 3: $7,44 \pm 0,85$ vs Gr. 2: $10,68 \pm 1,02$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$), so daß kein signifikanter Unterschied zu

nicht mit BOP behandelten Tieren der Gr. 1 ($7,15 \pm 0,92$ nmol/mg Eiweiß) bestand. Auch bei Hochfetterernährung erniedrigte Octreotid die TBARS-Konzentration in MFLA signifikant (Gr. 6: $16,53 \pm 1,43$ vs Gr. 5: $28,37 \pm 1,96$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$), allerdings war diese immer noch signifikant höher als bei den mit Standardfutter ernährten Gruppen 1-3 (Gr. 1: $7,15 \pm 0,92$; Gr. 2: $10,68 \pm 1,02$; Gr. 3: $7,44 \pm 0,85$ nmol/mg Eiweiß, jeweils $p < 0,05$ vs Gr. 6) und der nicht mit BOP behandelten Hochfettgruppe 4 ($8,11 \pm 0,79$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$ vs Gr. 6).

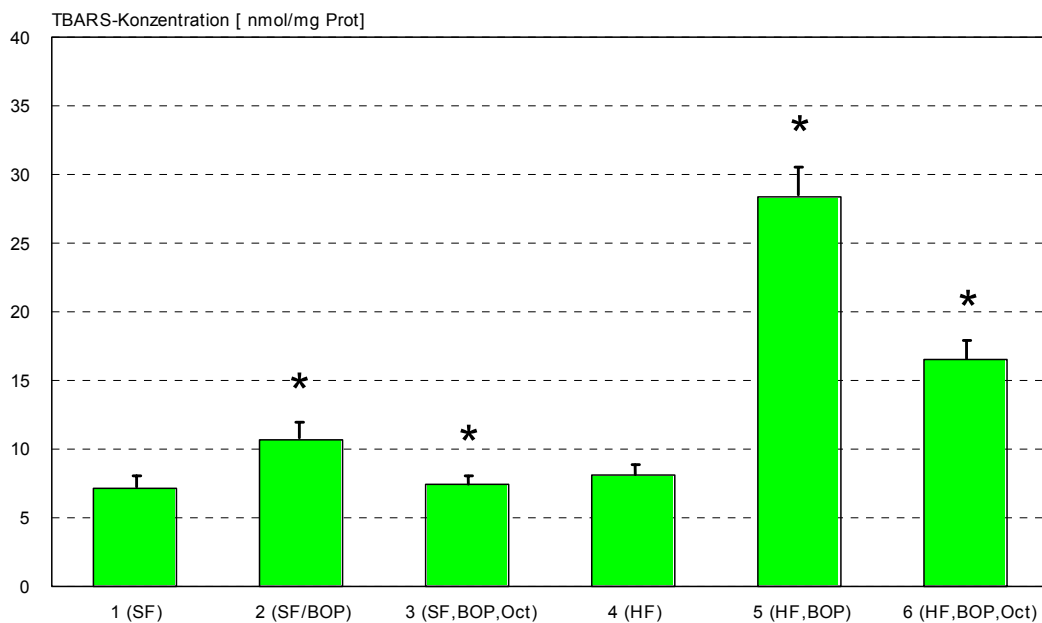


Abb. 20: TBARS-Konzentration in MFLA [nmol/mg Eiweiß], (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, * $p < 0,05$)

Innerhalb der Lebermetastasen kam es unter der Octreotidtherapie sowohl bei Standard- (Gr. 3: $21,01 \pm 1,74$ vs Gr. 2: $11,38 \pm 1,04$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) wie auch bei Hochfetterernährung (Gr. 6: $36,4 \pm 2,1$ vs Gr. 5: $9,54 \pm 0,83$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) zu einer signifikanten Steigerung der TBARS-Konzentration. Die signifikant höchste TBARS-Konzentration in Lebermetastasen wurde bei gleichzeitiger Hochfetterernährung festgestellt (Gr.6: $36,4 \pm 2,1$ nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$ vs alle Gruppen).

Bei Standardernährung unterschieden sich ohne Octreotidtherapie die TBARS-Konzentrationen in MFLA und Lebermetastasen nicht signifikant voneinander (Gr. 2: $10,68 \pm 1,02$ vs $11,38 \pm 1,04$ nmol/mg Eiweiß). Durch Octreotid war die TBARS-Konzentration in Lebermetastasen signifikant höher als in MFLA (Gr. 3: $21,01 \pm 1,74$ vs

7,44±0,85 nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$) (Abb.21). Demgegenüber war bei gleichzeitiger Hochfetternahrung die TBARS-Konzentration ohne Octreotidtherapie in den Lebermetastasen signifikant geringer als in MFLA (Gr. 5: 9,54±0,83 vs 28,37±1,96 nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$). Durch Octreotid wurde sie hingegen signifikant über den Wert in MFLA gesteigert (Gr. 6: 36,4±2,1 vs 16,53±1,43 nmol/mg Eiweiß, $p < 0,05$).

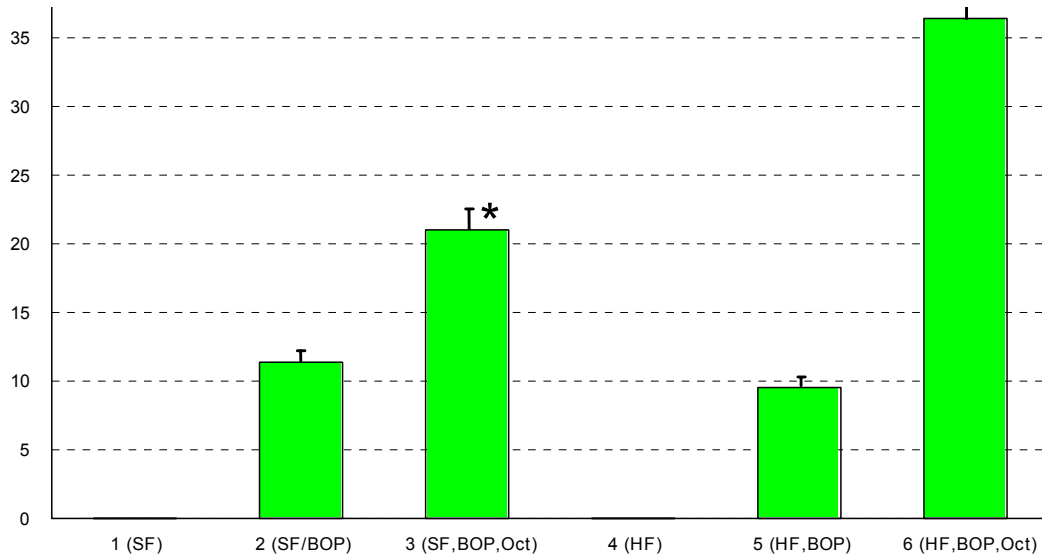


Abb. 21: TBARS-Konzentration in Lebermetastasen [nmol/mg Eiweiß], (Mittelwerte±Standardabweichungen, * $p < 0,05$)

3.5 Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C und E auf die Lebermetastasierung und die Lipidperoxidation in Lebermetastasen und metastasenfreien Leberanteilen beim duktalem Pankreaskarzinom

3.5.1 Letalität, Körper-, Pankreas- und Lebergewichte

In Gr. 1, 2, 4 und 5 betrug die Letalität der Hamster während des Versuchszeitraumes 0%. In Gr. 3, 6 und 7 verstarb je 1 Tier, so daß die Letalität bei 6,7% lag. Nach Vitamin E-Therapie der tumorinduzierten Tiere der Gr. 8 verstarben 3 Tiere. Im Vergleich zu den anderen Gruppen konnte hierbei eine signifikante Erhöhung der Letalität auf 20% festgestellt werden ($p < 0,05$) (Tab. 21).

Tab. 21: Letalität in den einzelnen Versuchsgruppen

Gruppe	Letalität (n)	Todesursache
3	1	8. Woche, Ursache unklar
6	1	19. Woche, Pankreaskarzinom, Ikterus
7	1	22. Woche, Pankreaskarzinom, Lebermetastasen, Kachexie
8	3	17., 20. und 22. Woche, jeweils Pankreaskarzinom

In Bezug auf Körper-, Pankreas- und Lebergewicht konnten zwischen den Tieren der verschiedenen Kontroll- bzw. Therapiegruppen 1 bis 8 keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. (Abb. 22)

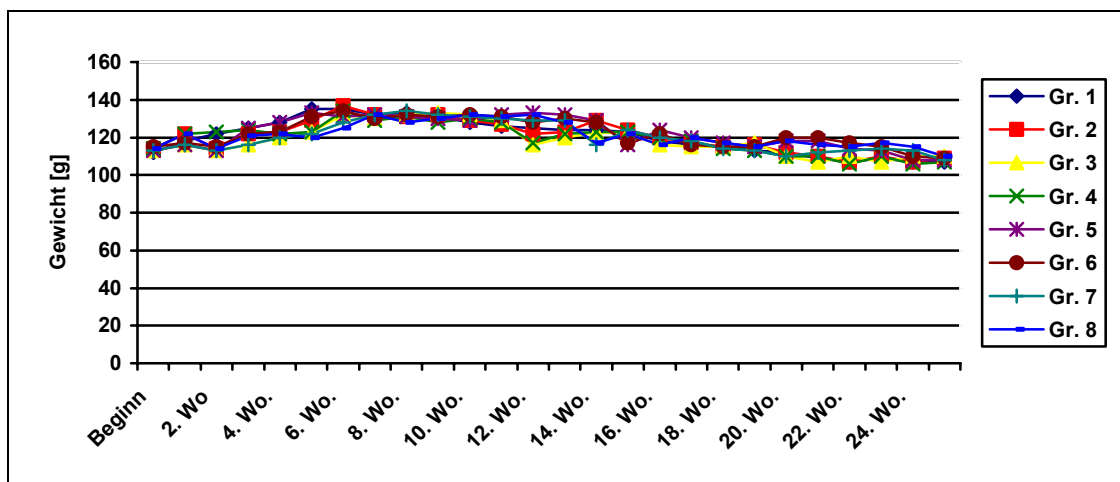


Abb. 22: Entwicklung des mittleren Körpergewichts der Versuchsgruppen 1-8

3.5.2 Inzidenz von Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen

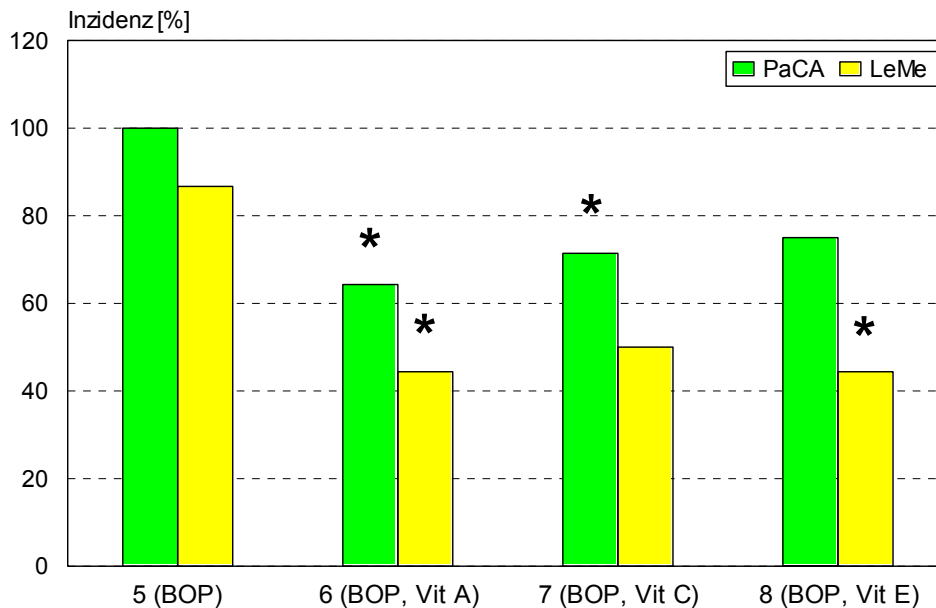


Abb. 23: Inzidenz von Pankreaskarzinomen (PaCa) und Lebermetastasen (LeMe) (* $p < 0,05$)

In den nicht induzierten Gruppen 1 bis 4 entwickelten sich wie erwartet keine Pankreaskarzinome. Demgegenüber wurde bei allen Tieren der BOP-behandelten Gruppe 5 das Auftreten eines Pankreaskarzinoms beobachtet. Die Inzidenz betrug 100% ($n=15/15$, Abb. 23). Desweiteren erkrankten 9 von 12 Tieren der BOP-induzierten Gruppe 8 nach Vitamin E an einem Karzinom des Pankreas. Die Inzidenz lag hier bei 75% und unterschied sich nicht signifikant von der BOP-induzierten Kontrollgruppe 5.

Im Gegensatz dazu unterschied sich die Karzinominzidenz der Gruppen 6 (BOP, Vitamin A) bzw. 7 (BOP, Vitamin C) signifikant von der BOP-induzierten Kontrollgruppe ($p < 0,05$). In Gruppe 6 (BOP, Vitamin A) lag die Inzidenz bei 64,3% ($n=9/14$). In Gruppe 7 (BOP, Vitamin C) betrug die Inzidenz des Pankreaskarzinoms 71,4% ($n=10/14$).

Bei allen tumorverdächtigen Pankreasanteilen konnte histologisch der Nachweis eines invasiv wachsenden, mäßig bis wenig differenzierten, duktales Adenokarzinoms des Pankreas erbracht werden.

Lebermetastasen eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas fanden sich in der BOP-behandelten Gruppe 5 bei 86,7% der Tiere. In der Vitamin C-therapierten Gruppe 7 fand sich eine Inzidenz von 50% ($n=5$), die sich jedoch nicht signifikant von der BOP-induzierten Kontrollgruppe 5 unterschied. Dagegen wurde in der Vitamin A-therapierten

Gruppe 6 bzw. Vitamin E-therapierten Gruppe 8 jeweils mit 44,4% eine signifikante Erniedrigung der Inzidenz von Lebermetastasen im Vergleich zur BOP-behandelten Gruppe 5 festgestellt ($p < 0,05$).

3.5.3 Histologische Untersuchung der Leberläsionen

Alle tumorverdächtigen Leberanteile wurden histologisch als Metastasen eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas klassifiziert. Innerhalb der vorhandenen Leberläsionen zeigten sich lockere Verbände von undifferenzierten Tumorzellen. Lichtmikroskopisch fielen Kernpolymorphien mit starker Verschiebung der Kern-Plasma-Relation und die großen Nukleolen auf. Das häufige Vorkommen von zentralen nekrotischen Anteilen und zum Teil lymphoplasmatischer zellulärer Infiltrationen perimetastatisch sprach für das Vorliegen von Lebermetastasen eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas.

Es wurden keine primären Neoplasien des Lebergewebes beobachtet.

3.5.4 Anzahl und Größe der Lebermetastasen

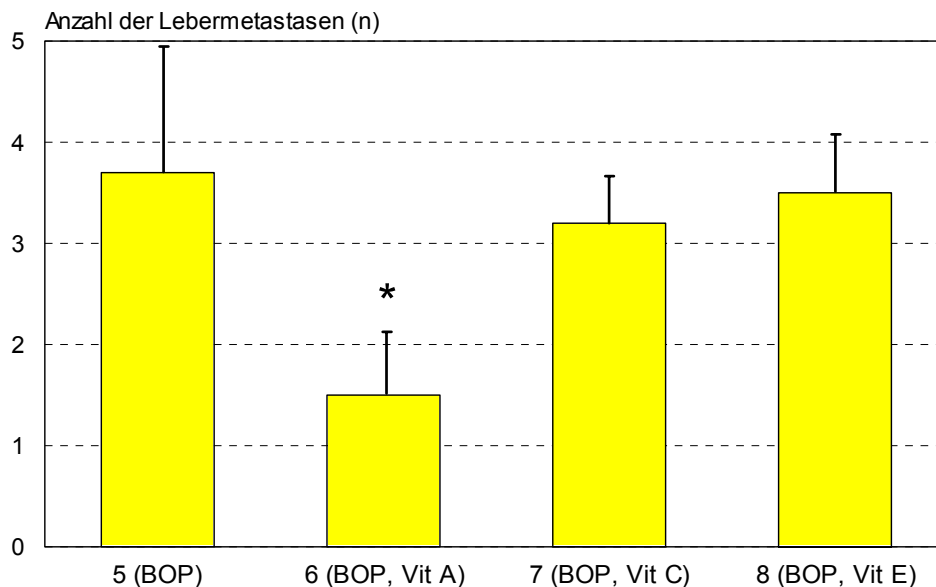


Abb. 24: Anzahl der Lebermetastasen pro Tier [Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0,05$]

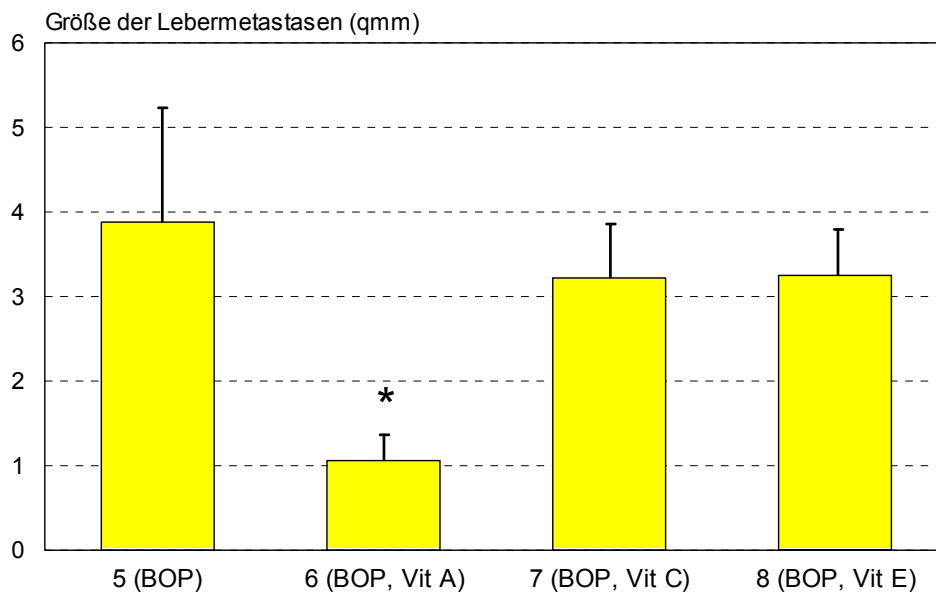


Abb. 25: Größe der Lebermetastasen [Mittelwert±Standardabweichung, *p<0,05]

Die Tiere der BOP-induzierten Kontrollgruppe 5 wiesen $3,77 \pm 1,3$ Lebermetastasen pro Tier auf (Abb.19). Demgegenüber wurde bei den Tieren der Vitamin C-therapierten Gruppe 7 $3,2 \pm 0,45$ und der Vitamin E-therapierten Gruppe 8 $3,5 \pm 0,58$ Lebermetastasen pro Tier verzeichnet.

Im Gegensatz zu diesen 3 Gruppen wurde in Gruppe 6 unter Vitamin A-Therapie eine signifikante Erniedrigung der Lebermetastasen pro Tier auf $1,5 \pm 0,58$ beobachtet ($p < 0,05$).

Die größte 2-dimensionale Ausdehnung der Lebermetastasen in der BOP-induzierten Kontrollgruppe 5 betrug $3,88 \pm 1,39 \text{ mm}^2$ (Abb.25). Bezüglich der Größe der Lebermetastasen in der Vitamin C-therapierten Gruppe 7 ($3,22 \pm 0,68 \text{ mm}^2$) bzw. in der Vitamin E-therapierten Gruppe 8 ($3,25 \pm 0,55 \text{ mm}^2$) ließen sich hierbei keine signifikanten Unterschiede feststellen. Verglichen mit diesen beiden Therapiegruppen führte die Vitamin A-Therapie in Gruppe 6 zu einer signifikanten Verkleinerung der Lebermetastasen auf $1,06 \pm 0,29 \text{ mm}^2$ ($p < 0,05$).

3.5.5 Biochemischen Untersuchungen

3.5.5.1 Extra- und intrametastatischer Proteingehalt

Tab. 22: Proteinkonzentrationen in metastasenfremen Leberanteilen (MFLA) und Lebermetastasen (LeMe)

	Gr.1 (ØBOP, Øvit)	Gr.2 (ØBOP, Vit A)	Gr.3 (ØBOP, Vit C)	Gr.4 (ØBOP, Vit E)	Gr.5 (BOP, Øvit)	Gr.6 (BOP, Vit A)	Gr.7 (BOP, Vit C)	Gr.8 (BOP, Vit E)
Prot.gehalt in MFLA [mg/ml]	4,99 ± 0,21	5,13 ± 0,22	5,08 ± 0,20	4,99 ± 0,25	4,80 ± 0,48	5,11 ± 0,28	5,03 ± 0,26	4,93 ± 0,23
Prot.gehalt in LeMe [mg/ml]					4,84 ± 0,42	5,20 ± 0,33	5,38 ± 0,25	4,91 ± 0,06

Hinsichtlich der gemessenen Proteinkonzentrationen konnten zwischen den einzelnen Gruppen 1 bis 8 keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden. Gleichmaßen traten im Vergleich der Proteinkonzentrationen zwischen metastasenfremem Lebergewebe und Lebermetastasen der Versuchsgruppen 5 bis 8 keine signifikanten Unterschiede auf.

3.5.5.2 SOD-Aktivität

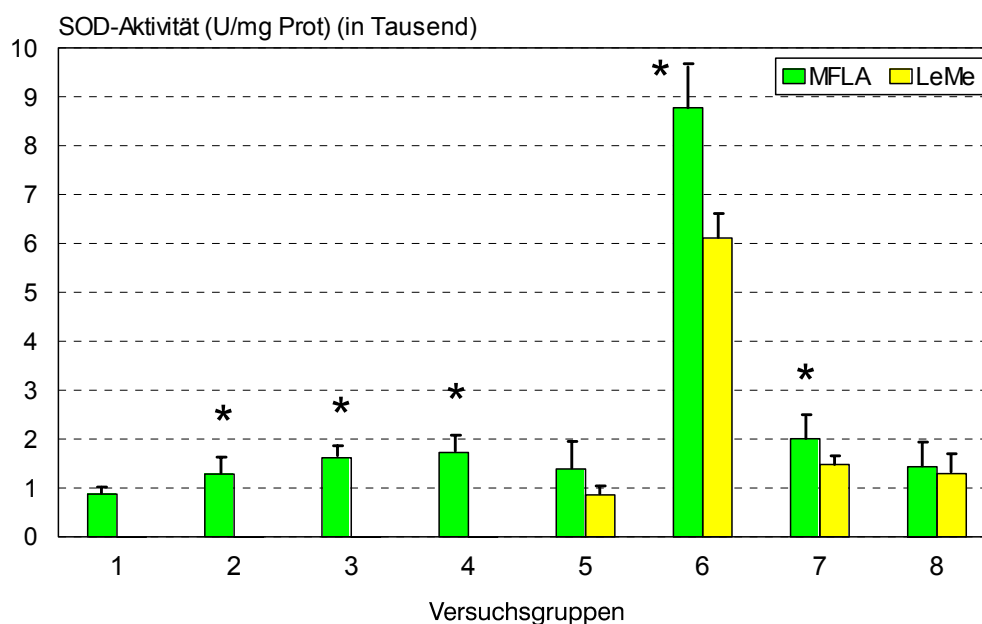


Abb. 26: SOD-Aktivität in metastasenfremen Leberanteilen (MFLA) sowie Lebermetastasen (LeMe) [Mittelwert±Standardabweichung, *p<0,05]

3.5.5.2.1 Extrametastatische Aktivität

In der nicht induzierten, nicht therapierten Versuchsgruppe 1 betrug die SOD-Aktivität $874,4 \pm 141,73$ U/mg Protein (Prot.). Im Vergleich dazu war in den Vitamin-supplementierten Kontrollgruppen 2, 3 und 4 ein signifikanter Anstieg der SOD-Aktivität zu verzeichnen ($p < 0,05$, Abb.26). Die Messwerte lagen in der Vitamin A-Kontrollgruppe 2 bei $1283 \pm 372,79$ U/mg Prot., in der Vitamin C-Kontrollgruppe 3 bei $1619,12 \pm 254,48$ U/mg Prot. und in der Vitamin E-Kontrollgruppe 4 bei $1724,37 \pm 323,46$ U/mg Prot. ($p < 0,05$).

Nach BOP-Induktion der Versuchsgruppe 5 wurde dagegen ein signifikanter Anstieg der Aktivität der SOD im Vergleich zur nicht induzierten, nicht therapierten Gruppe 1 auf $1388,47 \pm 165,61$ U/mg Prot. gemessen ($p < 0,05$).

Nach Vitamin E-Therapie der BOP-induzierten Tiere der Gruppe 8 betrug die SOD-Aktivität $1433,18 \pm 477,54$ U/mg Prot.. Im Gegensatz dazu stieg die SOD-Aktivität nach Vitamin C-Therapie der BOP-induzierten Tiere der Gruppe 7 auf $2006,06 \pm 435,14$ U/mg Prot. an, welche sich verglichen mit der BOP-induzierten Kontrollgruppe 5 signifikant

unterschied ($p < 0,05$). Die signifikant höchste SOD-Aktivität im extrametastatischen Lebergewebe wurde jedoch nach Vitamin A-Therapie der BOP-induzierten Tiere aus Gruppe 6 gemessen ($8776,98 \pm 911$ U/mg Prot., $p < 0,05$).

3.5.5.2.2 Intrametastatische Aktivität

In Lebermetastasen BOP-induzierter Tiere der Gruppe 5 wurde eine SOD-Aktivität von $859,38 \pm 147,2$ U/mg Prot. gemessen.

Im Vergleich dazu wurde ein signifikanter Aktivitätsanstieg der SOD auf $1481,9 \pm 216,06$ U/mg Prot. bzw. $1292,14 \pm 376,07$ U/mg Prot. nach Vitamin C-Therapie der Gruppen 7 bzw. Vitamin E-Therapie der Gruppe 8 festgestellt. Die signifikant höchsten intrametastatischen Messwerte von $6113,53 \pm 624,33$ U/mg Prot fanden sich nach Vitamin A-Therapie der BOP-induzierten Tiere der Gruppe 6 ($p < 0,05$).

3.5.5.2.3 Vergleich extra- und intrametastatische Aktivität

Beim Vergleich der gemessenen SOD-Aktivitäten zwischen metastasenfrier Leber und den Lebermetastasen der Vitamin C-therapierten Gruppe 7 und der Vitamin E-therapierten Gruppe 8 waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Im Vergleich zu den Lebermetastasen wurden signifikant höhere SOD-Aktivitäten im extrametastatischen Lebergewebe der BOP-induzierten Kontrollgruppe 5 sowie der Vitamin A-Therapiegruppe 6 verzeichnet ($p < 0,05$).

3.5.5.3 GSHPX-Aktivität

3.5.5.3.1 Extrametastatische GSHPX-Aktivität

In der nicht induzierten, nicht therapierten Kontrollgruppe 1 wurde eine GSHPX-Aktivität von $(1,91 \pm 0,34) \times 10^7$ U/mg Prot. gemessen (Abb.27). Nach Verabreichung von Vitamin C [Gr. 3: $(2,24 \pm 0,23) \times 10^7$ U/mg Prot.], Vitamin A [Gr.2: $(2,27 \pm 0,3) \times 10^7$ U/mg Prot.] und Vitamin E [Gr. 4: $(2,34 \pm 0,24) \times 10^7$ U/mg Prot.] zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Kontrollgruppe 1.

Die signifikant niedrigste GSHPX-Aktivität aller Gruppen von $(1,48 \pm 0,44) \times 10^7$ U/mg Prot. wurde nach BOP-Induktion in Kontrollgruppe 5 festgestellt ($p < 0,05$).

Eine Therapie der BOP-induzierten Tiere mit Vitamin C (Gruppe 7) bzw. Vitamin E

(Gruppe 8) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die GSHPX-Aktivität. Für Gruppe 7 wurden Werte von $(2,25 \pm 0,53) \times 10^7$ U/mg Prot. und für Gruppe 8 von $(2,16 \pm 0,52) \times 10^7$ U/mg Prot. gemessen.

Im Gegensatz dazu ließ sich unter Vitamin A-Therapie der BOP-induzierten Tiere (Gruppe 6) ein signifikanter Aktivitätsanstieg der GSHPX auf $(3,12 \pm 0,36) \times 10^7$ U/mg Prot. verzeichnen ($p < 0,05$).

3.5.5.3.2 Intrametastatische Aktivität

Im metastatischen Lebergewebe BOP-induzierten Tiere der Kontrollgruppe 5 wurde eine GSHPX-Aktivität von $(0,74 \pm 0,16) \times 10^7$ U/mg Prot. verzeichnet. Im Vergleich dazu stieg die Aktivität unter Vitamin C-Therapie der Gruppe 7 bzw. Vitamin E-Therapie der Gruppe 8 auf $(1,2 \pm 0,39) \times 10^7$ mg Prot. bzw. $(2,01 \pm 0,42) \times 10^7$ U/mg Prot.. Die signifikant höchsten Messwerte in den Lebermetastasen erhielt man unter Vitamin A-Therapie der Gruppe 6. Mit einer GSHPX-Aktivität von $(2,51 \pm 0,34) \times 10^7$ U/mg Prot. unterschied sie sich signifikant von den anderen Gruppen ($p < 0,05$).

3.5.5.3.3 Vergleich der extra- und intrametastatischen Aktivität

Der Vergleich der gemessenen GSHPX-Aktivitäten zwischen tumorfreien Leberanteilen und den Lebermetastasen der Vitamin C-therapierten Gruppe 7 sowie der Vitamin E-therapierten Gruppe 8 zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Demgegenüber wurden verglichen mit den Lebermetastasen signifikant höhere GSHPX-Aktivitäten im extrametastatischen Lebergewebe der BOP-behandelten Kontrollgruppe 5 sowie der Vitamin A-therapierten Gruppe 6 gemessen ($p < 0,05$).

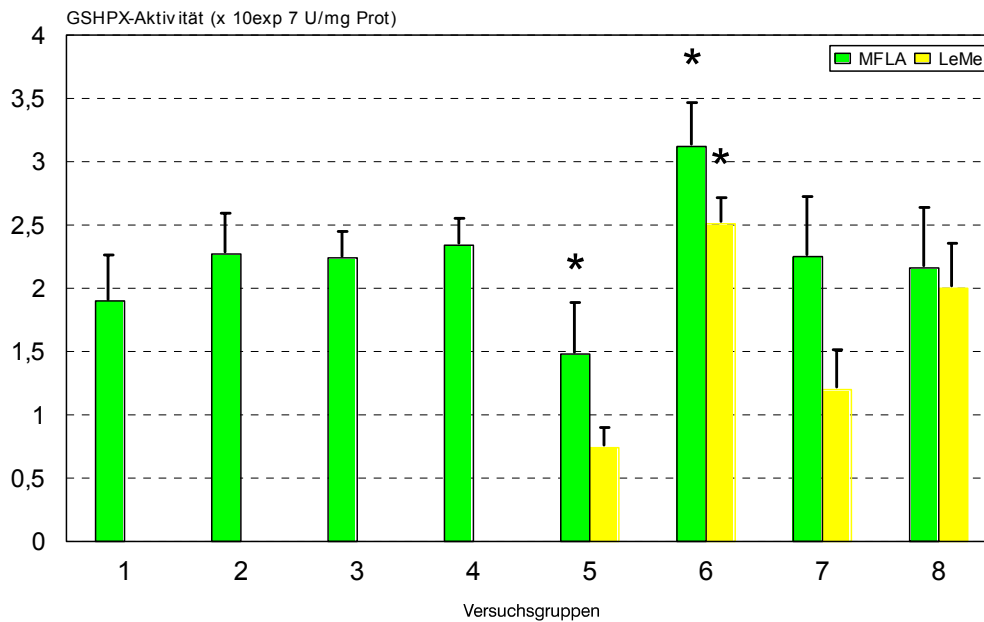


Abb. 27: GSHPX-Aktivität in metastasenfrenen Leberanteilen (MFLA) sowie Lebermetastasen (LeMe) [Mittelwert±Standardabweichung, *p<0,05]

3.5.5.4 TBARS-Konzentration

3.5.5.4.1 Extrametastatische Konzentration

In der nicht induzierten, nicht therapierten Kontrollgruppe 1 betrug die TBARS-Konzentration $1,57 \pm 0,45$ nmol/mg Prot. (Abb.28). Die Vitamin E- (Gr. 4: $1,1 \pm 0,33$ nmol/mg Prot.) sowie Vitamin C-Supplementierung (Gr. 3: $1,28 \pm 0,94$ nmol/mg Prot.) veränderte die TBARS-Konzentration nicht signifikant. Dagegen führte die Verabreichung von Vitamin A in der Gruppe 2 zu einer signifikanten Steigerung der TBARS-Konzentration auf $4,26 \pm 1,09$ nmol/mg Prot. ($p < 0,05$).

Bei den BOP-induzierten Tieren der Kontrollgruppe 5 wurden die höchsten TBARS-Konzentrationen von $36,4 \pm 1,21$ nmol/mg Prot. gemessen. Im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

Die Vitamin C- und E-Therapien der BOP-induzierten Tiere der Gruppen 7 und 8 ließen im Verhältnis zu den Vitaminkontrollgruppen 3 sowie 4 die TBARS-Werte unbeeinflusst.

Die Messwerte der Vitamintherapierten Gruppen 7 bzw. 8 lagen hierbei bei $1,65 \pm 1,64$ bzw. $1,45 \pm 0,84$ nmol/mg Prot..

Demgegenüber wurde die TBARS-Konzentration unter Vitamin A-Therapie der BOP-induzierten Tiere der Kontrollgruppe 6 im Vergleich zu den Gruppen 1, 3, 4, 7 und 8 auf $2,13 \pm 0,54$ nmol/mg Prot. erhöht, jedoch gemessen an den Werten der Vitamin A-supplementierten Gruppe 2 sowie der BOP-Kontrollgruppe 5 Gruppe erniedrigt.

3.5.5.4.2 Intrametastatische Konzentration

Die signifikant höchste TBARS-Konzentration in metastatischem Lebergewebe von $28,4 \pm 2,21$ nmol/mg Prot. wurde in der BOP-induzierten Kontrollgruppe 5 gemessen ($p < 0,05$). Unter Vitamin A-, C bzw. E-Therapie der Gruppe 6, 7 bzw. 8 wurde ein signifikantes Absinken der gemessenen TBARS-Werte auf $1,94 \pm 0,74$ nmol/mg Prot., $1,46 \pm 1,01$ nmol/mg Prot. bzw. $0,95 \pm 0,4$ nmol/mg Prot. verzeichnet ($p < 0,05$).

3.5.5.4.3 Vergleich der extra- und intrametastatische Konzentration

Unter Vitamin C- bzw. E-Therapie der Gruppe 7 bzw. 8 konnte kein signifikanter Unterschied der TBARS-Konzentrationen zwischen tumorfreien Leberanteilen und den Lebermetastasen festgestellt werden. Hingegen wurden in den Lebermetastasen im Vergleich zum extrametastatischen Lebergewebe der BOP-induzierten Gruppe 5 und der Vitamin A-therapierten Gruppe 6 signifikant niedrige TBARS-Konzentrationen festgestellt ($p < 0,05$).

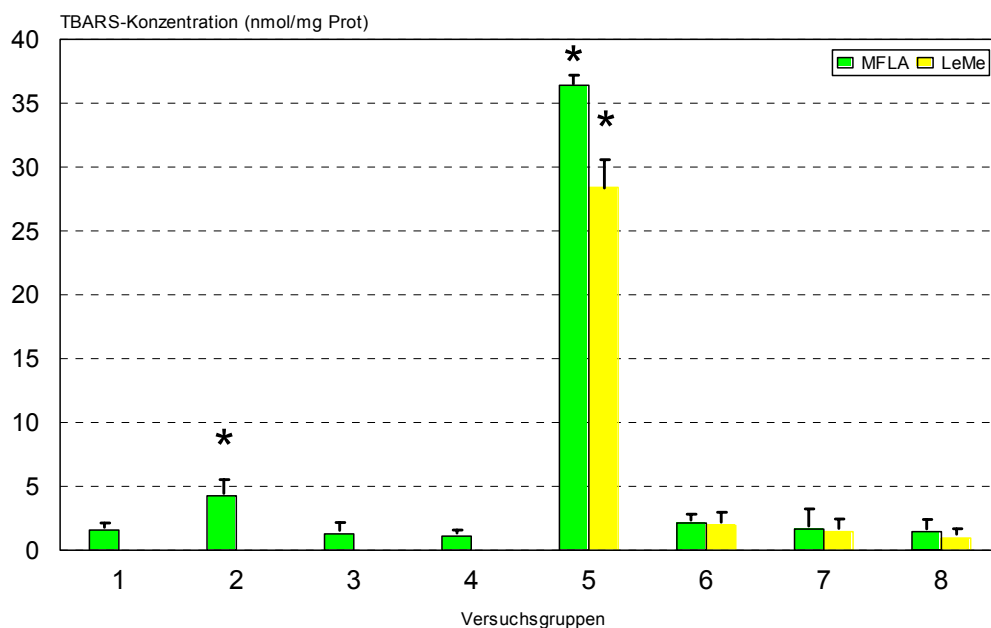


Abb. 28: TBARS-Konzentrationen in metastasenfreien Leberanteilen (MFLA) sowie Lebermetastasen (LeMe) [Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0,05$]

3.6 Einfluß von Celebrex (COX-2-Inhibitor) und Zyflo (5-LOX-Inhibitor) auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

3.6.1 Organ-, Körpergewicht und Letalität

Die Gr. 1-8 unterschieden sich nicht hinsichtlich des Körpergewichts oder des Gewichtes der Bauchspeicheldrüse.

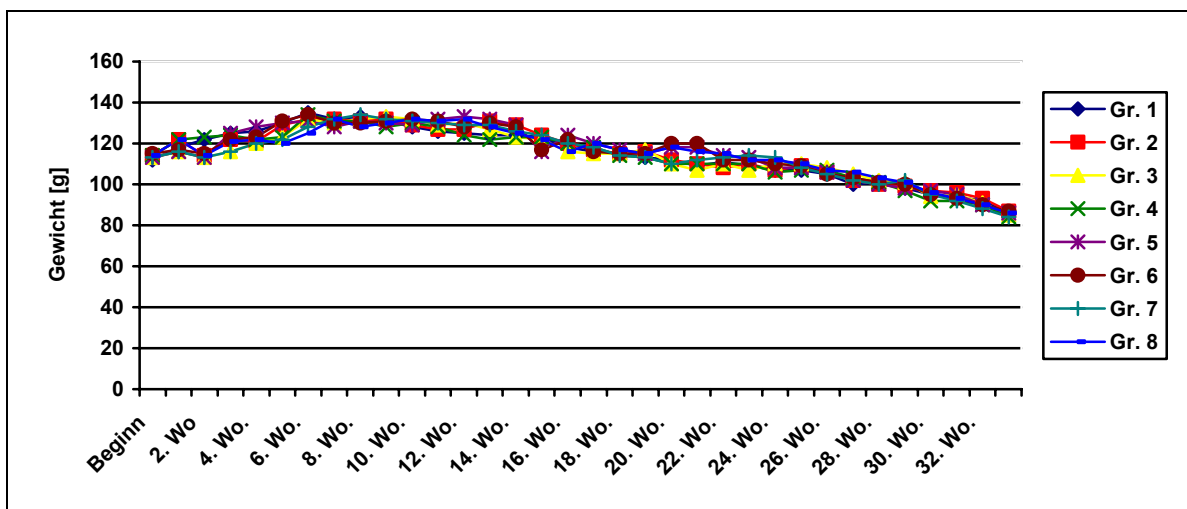


Abb. 29: Entwicklung des mittleren Körpergewichts der Gruppen 1-8

Während die Letalität in Gr. 1, 4 und 7 bei 0% lag, betrug sie in Gr. 3 6,7% (n=1), in Gr. 2 13,3% (n=2) und war in den Gr. 6 und 8 mit jeweils 26,7% (n=4) sowie in Gr. 5 mit 46,7% (n=7) signifikant erhöht ($p < 0,05$ vs alle Gr.) (Tab. 23).

Tab. 23: Letalität der einzelnen Versuchsgruppen

Gruppe	Letalität (n)	Todesursache
2	2	6. und 17. Woche, Ursachen unklar
3	1	14. Woche, Ursache unklar
5	7	16. Woche (Ileus), 19. Woche (Pankreasca, Ikterus), 21. Woche (Pankreasca, Lebermetastasen), 2x27. Woche (Pankreasca, Lebermetastasen, Kachexie), 29. Woche (Pankreasca, Lungenembolie) und 31. Woche (Pankreasca, Lebermetastasen, Ikterus, Kachexie)
6	4	27. Woche (Pankreasca. Ikterus), 2x29. Woche (Pankreasca, Lebermetastasen), 30. Woche (Pankreasca, Lebermetastasen, Ikterus)
8	4	2x26. Woche (Pankreaskarzinom, Lebermetast.) 22. Woche (Pankreasca, Lebermetastasen) 31. Woche (Pankreasca., Lebermetast., Ikterus, Kachexie)

3.6.2 Inzidenz von Pankreaskarzinomen

Erwartungsgemäß lagen in den Kontrollgruppen 1-4 keine Pankreaskarzinome vor. In den Tumorgruppen 5-8 betrug die Inzidenz eines Pankreaskarzinoms bei jeweils 100% (Abb.30). Alle Tumoren wurden als duktales Adenokarzinome der Bauchspeicheldrüse klassifiziert.

3.6.3 Inzidenz von Lebermetastasen

In Gr. 5 lagen bei allen Tieren Lebermetastasen vor. Während sich die Inzidenz von Lebermetastasen zwischen Gr. 6 (90,9%) und Gr. 7 (86,7%) nicht unterschied, war sie unter der Kombinationstherapie in Gr. 8 (54,5%, $p < 0,05$) erniedrigt (Abb. 30). Alle hepatischen Läsionen wurden als Metastasen eines duktales Adenokarzinoms klassifiziert, primäre Leberneoplasien wurden nicht beobachtet.

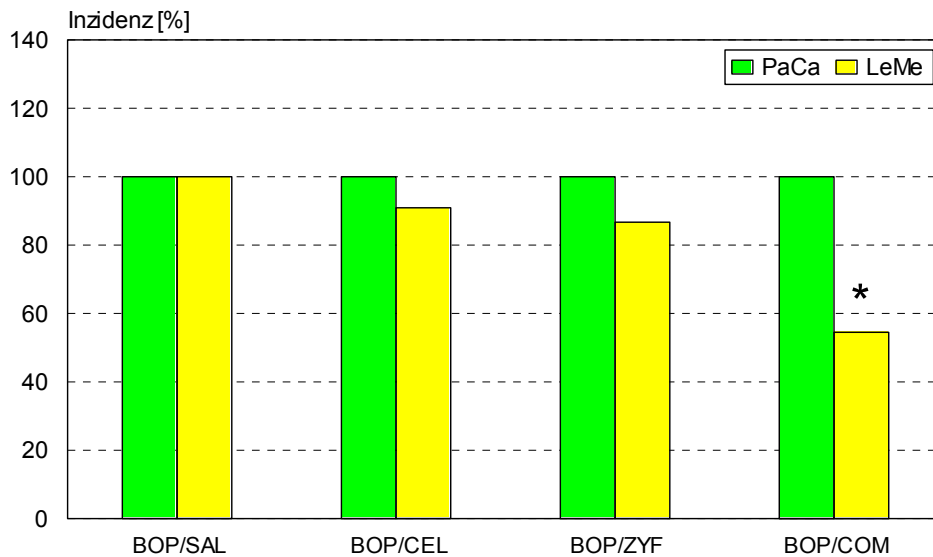


Abb. 30: Inzidenz von Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen der Gr. 5-8 in % (* $p < 0,05$)

3.6.4 Anzahl und Größe von Lebermetastasen pro Tier

Während sich die Gr. 5-7 nicht hinsichtlich der Anzahl ($6,75 \pm 0,71$ vs $6,7 \pm 2,41$ vs $7,23 \pm 2,09$) und Größe von Lebermetastasen ($11,75 \pm 1,98$ vs $10,5 \pm 4,14$ vs $10,38 \pm 5,32 \text{mm}^2$) unterschieden, waren beide Parameter unter der Kombinationstherapie (Gr. 8) erniedrigt (Anzahl: $3,17 \pm 0,98$; Größe: $2,67 \pm 1,97 \text{mm}^2$; $p < 0,05$) (Abb. 31).

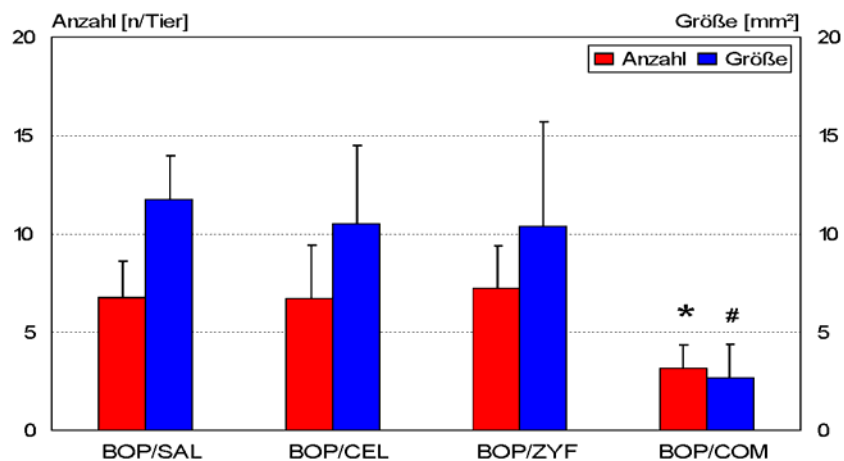


Abb. 31: Anzahl und Größe von Lebermetastasen pro Tier der Gr. 5-8 (Mittelwert \pm Standardabweichung) (* $p < 0,05$ vs Anzahl aller Gr.; # $p < 0,05$ vs Größe aller Gr.)

3.6.5 Aktivität der hepatischen GSHPX

Im extrametastatischen Lebergewebe bestand hinsichtlich der Aktivität der GSH-Px zwischen den Gr. 1-4, 6 und 7 kein Unterschied ([38,67±8,02] vs [44,91±8,18] vs [32,27±10,51] vs [38,36±4,44] vs [36,9±8,33] vs [36,18±9,73]*10⁵ U/mg Protein). Während wir die niedrigste GSH-Px-Aktivität in Gr.5 beobachtet wurde ([15,49±4,02]*10⁵ U/mg Prot.; p<0,05), lag die höchste Aktivität in Gr. 8 ([73,77±5,67]*10⁵ U/mg Prot.; p<0,05) (Abb. 32).

Innerhalb der Lebermetastasen unterschied sich die Aktivität der GSH-Px der Gr. 6 und 7 nicht ([12,77±2,63]; [16,49±2,95]*10⁵ U/mg prot.), hingegen war sie in Gr. 6 und 8 erniedrigt ([5,23±3,3]; [3,48±4,55]*10⁵ U/mg Prot.; p<0,05) (Abb. 32).

Bei Vergleich der intrametastatischen und der extrametastatischen GSH-Px-Aktivität der Gr. 5-8 zeigte sich kein Unterschied in Gr. 5, während die GSHPX-Aktivität in den Gr. 6-8 intrametastatisch erniedrigt war (p<0,05) (Abb. 32).

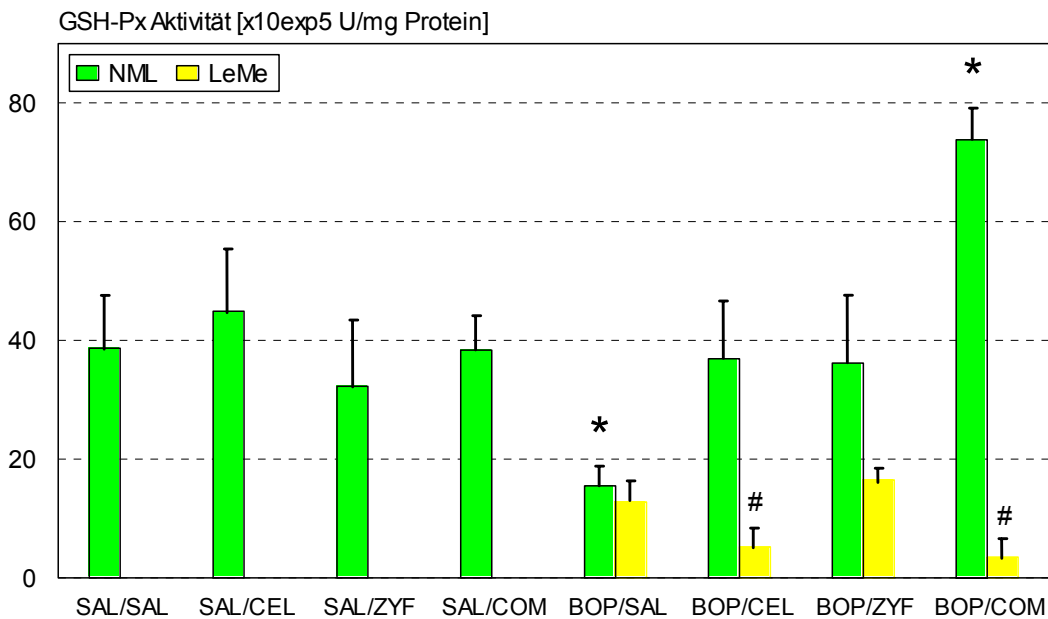


Abb. 32: GSHPX-Aktivität in intra- und extrametastatischem Lebergewebe (Mittelwert ± Standardabweichung) (*p<0,05 vs NML aller Gr.; #p<0,05 vs LeMe aller Gr.)

3.6.6 Aktivität der hepatischen SOD

In extrametastatischem Lebergewebe bestand hinsichtlich der SOD-Aktivität kein Unterschied zwischen den Gr. 1-3, 5-7 (225,83±45,09; 182,44±49,98; 157,47±34,51; 127,89±38,75; 251,97±66,14; 162,44±59,21 U/mg Prot.). Allerdings war die SOD-Aktivität in Gr. 4 (312,29±42,58 U/mg Prot.; $p < 0,05$) erhöht, während wir die höchste Aktivität in Gr. 8 (474,92±108,8 U/mg Prot.; $p < 0,05$) beobachteten (Abb. 33).

Intrametastatisch unterschied sich die SOD-Aktivität nicht zwischen Gr. 5 und 7 (104,58±33,31; 98,96±23,59 U/mg Prot.). Wir beobachteten die höchste Aktivität in Gr. 5 (241,99±42,72 U/mg Prot.; $p < 0,05$), während die niedrigste Aktivität in Gr. 8 (55,48±13,63 U/mg Prot.; $p < 0,05$) gemessen wurde (Abb. 33).

Bei Vergleich der SOD-Aktivität in Lebermetastasen und in nicht-metastatischem Lebergewebe bestand kein Unterschied zwischen Gr. 5-7. Allerdings war die Aktivität in Gr. 8 intrametastatisch erniedrigt ($p < 0,05$) (Abb. 33).

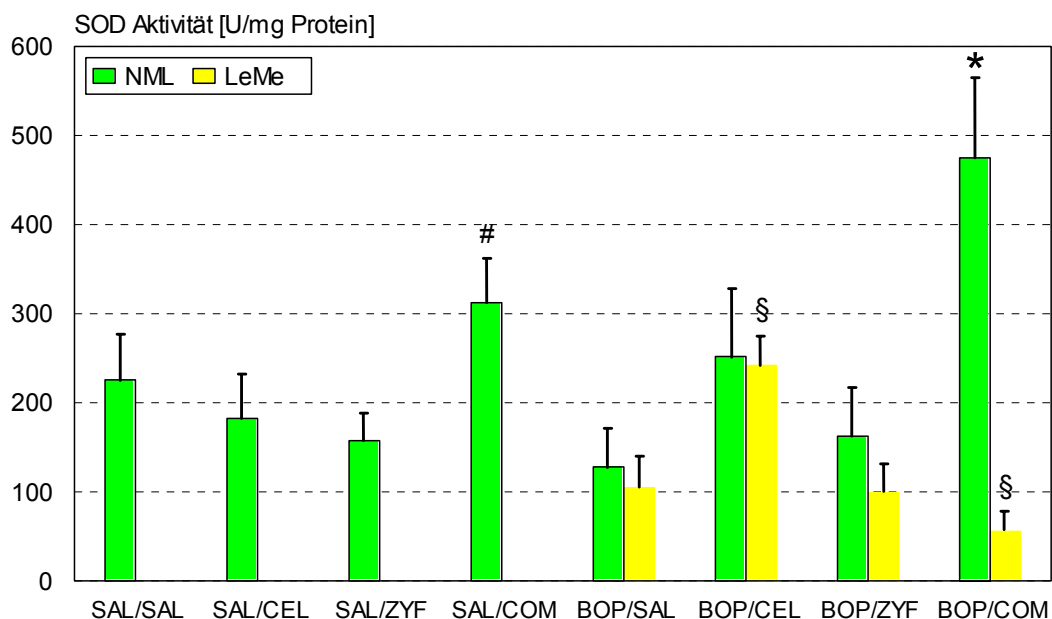


Abb. 33: Intra- und extrametastatische hepatische SOD-Aktivität (Mittelwert ± Standardabweichung) (* $p < 0,05$ vs NML aller Gr.; # $p < 0,05$ vs NML aller Gr. außer BOP/CEL; § $p < 0,05$ vs LeMe aller Gr.)

3.6.7 Konzentration der hepatischen Lipidperoxidation (TBARS)

Die TBARS-Konzentration in extrametastatischem Lebergewebe unterschied sich nicht zwischen Gr. 1-4, 7 und 8 ($0,2\pm 0,08$; $0,34\pm 0,27$; $0,27\pm 0,17$; $0,25\pm 0,06$; $0,23\pm 0,05$; $0,31\pm 0,08$ nmol/mg Prot.), während sie in Gr. 6 erhöht war ($0,42\pm 0,11$ nmol/mg Prot.; $p<0,05$). Die höchste TBARS-Konzentration in extrametastatischem Lebergewebe beobachteten wir in Gr. 5 ($1,54\pm 0,55$ nmol/mg Prot.; $p<0,05$) (Abb. 34).

Die intrametastatische TBARS-Konzentration war in Gr. 7 am Niedrigsten ($0,26\pm 0,09$ nmol/mg Prot.; $p<0,05$ vs alle Gr.). Demgegenüber war diese in Gr. 5, 6 und 8 erhöht ($0,47\pm 0,09$ vs $0,81\pm 0,04$ vs $1,95\pm 0,12$ nmol/mg Prot.; $p<0,05$ vs alle Gr.) (Abb. 34).

Bei Vergleich der intra- und extrametastatischen hepatischen TBARS-Konzentrationen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gr. 6 und 7. Allerdings war die intrametastatische TBARS-Konzentration in Gr. 5 erniedrigt ($p<0,05$). In Gr. 8 lag die intrametastatische TBARS-Konzentration höher als in nicht-metastatischem Lebergewebe ($p<0,05$) (Abb. 34).

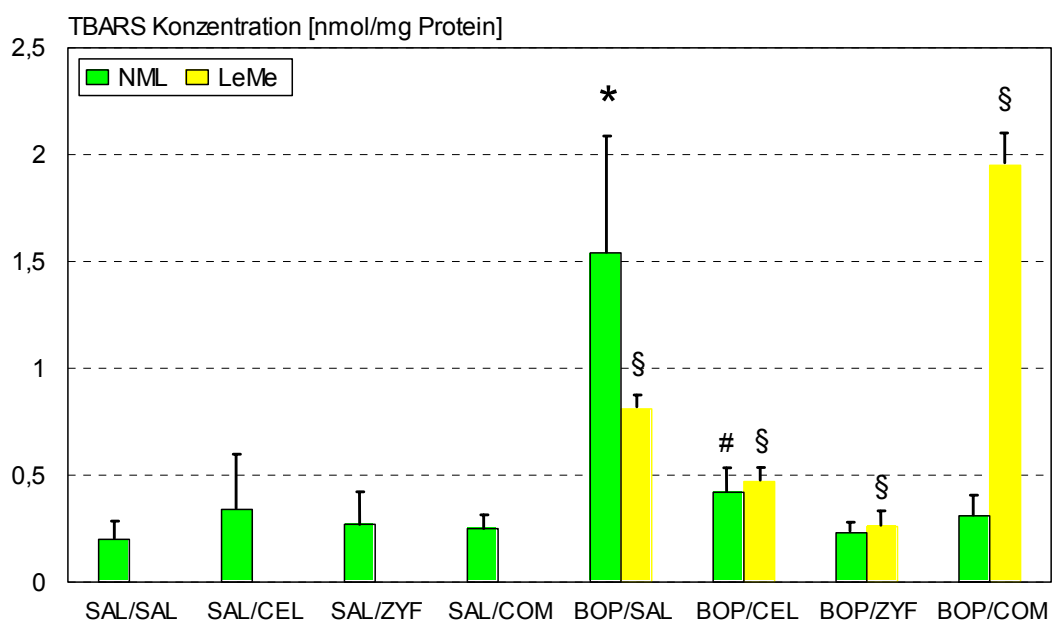


Abb. 34: Intrametastatische (Leme) und extrametastatische (NML) hepatische TBARS-Konzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) (* $p<0,05$ vs NML aller Gr.; # $p<0,05$ vs NML von SAL/SAL, SAL/COM, BOP/SAL, BOP/ZYF; § $p<0,05$ vs LeMe aller Gr.)

4 Diskussion

4.1 Effekte von BOP und einer Hochfetterernährung

Nitrosamine gehören zu den stärksten bekannten Kanzerogenen. Eine Besonderheit ist ihre oft ausgeprägte Organaffinität. N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amin (BOP), ein β -Metabolit von Di-n-Propylnitrosamin, wirkt im exokrinen Pankreas des Syrischen Goldhamsters als ein hoch potentes Karzinogen und induziert Adenokarzinome duktaler Genese.

Das Tiermodell des N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP)-induzierten Pankreaskarzinoms im Syrischen Hamster ist weithin als beste Möglichkeit für Studien über die Karzinogenese im Pankreas akzeptiert (5,122,147,158,238,257). Der Mechanismus, über welchen BOP nach einer relativ kurzen Zeit von ca. 7 Monaten zu einer nahezu 100%igen Induktion duktaler Adenokarzinome des Pankreas im Syrischen Hamster führt, ist weitgehend ungeklärt.

Die bedeutendste Rolle scheint intrapancreatischen Metabolisierungsprozessen zuzukommen, da zum Beispiel eine orale Administration von BOP nicht zur Induktion von Pankreaskarzinomen führt und hepatische Metabolisierungen für die Entstehung des Primärtumors daher keine große Bedeutung zu haben scheinen (187).

Die Metabolisierung von BOP erfolgt hauptsächlich in der Leber mittels verschiedener Oxidasen. Bei der Reduktion von BOP entsteht vor allem N-Nitroso(2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl)amin (HPOP), zu einem geringen Teil aber auch N-Nitrosobis(2-hydroxypropyl)amin (BHP). Im Vergleich zu BHP besitzt BOP einen selektiveren Wirkmechanismus im Organismus und induziert duktale Pankreaskarzinome mit einer geringeren Latenzzeit.

Infolge der Metabolisierung von BOP und der Formation mutagener Zwischenprodukte kommt es zu einem Anstieg der Alkylierung von Zellkompartimenten, vor allem jedoch zur Methylierung von DNA. Bereits nach einmaliger Applikation von BOP konnten in pankreatischer DNA promutagene Methylpurine, wie z.B. 7-Methylguanin oder O⁶-Methylguanin, nachgewiesen werden.

Die kanzerogene Wirkung von BOP wird jedoch vor allem auf eine exzessive Aktivierung der mikrosomalen Cytochrom-P₄₅₀-Oxygenase zurückgeführt. Das

Hämprotein Cytochrom-P-450 ist hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum des Hepatozyten lokalisiert. Im Laufe der Metabolisierung von BOP kommt es durch oxidative und reduktive Stoffwechselprozesse zur verstärkten Bildung von freien Radikalen in der Zelle. Aus der vermehrten Formation von reaktiven Sauerstoffspezies resultiert ein erhöhter oxidativer Stress für den Hepatozyten mit Schädigung der Biomembranen durch Lipidperoxidation. Diesbezüglich wurde in der Literatur die endogene Entstehung von Stickstoffdioxid während der mikrosomalen Verstoffwechslung von N-Nitrosoverbindungen beschrieben. Stickstoffdioxide sollen hierbei die Lipidperoxidation sowie DNA-Strangbrüche induzieren und die Denaturierung von Proteinen bewirken (4,18,28,142).

So berichteten Bartsch et al. über Nitrosamin-bedingte radikalische Membran- und DNA-Schäden im Verlauf der Karzinogenese und eine begleitend erhöhte Lipidperoxidation (20). Diese Untersuchungen wurden allerdings bisher nur in den primär von der Karzinogenese betroffenen Organen durchgeführt (18). Gleiches gilt für Studien über die Wirkung von Radikalfängern im Rahmen der Karzinogenese (6,12,64).

In den von uns vorgelegten Studien konnte demonstriert werden, daß BOP auch in der Leber zu oxidativem Stress führt (266,267,270,). Dies wird durch die Anstiege der SOD-Aktivität und der Konzentration der TBARS bei alleiniger Gabe von BOP belegt. Die Ursache der gleichzeitigen Erniedrigung der GSHPX-Aktivität ist unklar. Auch muß die nur moderate Erhöhung der TBARS-Konzentration als ein Zeichen von leichter oder beginnender Lipidperoxidation gewertet werden, bei der die Kapazitäten der antioxidativen Mechanismen offenbar zu einem sog. „balanced state“ der Lipidperoxidation führen. Unter diesen bei Standardernährung geltenden Bedingungen betrug die Lebermetastasierungsrate 35,7%. Dies entspricht den Angaben in der Literatur (147,187).

Mit der von uns vorgenommenen diätetischen Modifikation läßt sich die Lebermetastasierungsrate auf bis zu 90% steigern (261). Möglich wird dies durch eine Erhöhung des Rohfettanteils auf 21,4%, wobei Linolsäure 11% und Linolensäure 2% des Futters ausmachen.

Während für Linolsäure mehrfach gezeigt werden konnte, daß eine Steigerung ihres Anteils im Futter zu einer signifikanten Steigerung der Inzidenz, der Anzahl und der

Größe der Pankreaskarzinome im von uns verwendeten Tiermodell führt und sie auch in anderen Tumormodellen proliferationsstimulierende Wirkungen hat, ist ein Einfluß auf die Lebermetastasierung bisher nicht beschrieben worden (30,31,60,106,208,209). Möglicherweise ist die Steigerung der Lebermetastasierung auf den gestiegenen Linolensäureanteil zurückzuführen.

Während von verschiedenen Autoren für Omega-6-Fettsäuren ein fördernder Effekt auf das Tumorwachstum beschrieben wurde (5,30) und Omega-3-Fettsäuren bislang als wachstumshemmend galten, beobachteten wir eine Promotion des Tumorwachstums unter der Ernährung mit Omega-3-Fettsäuren beim Pankreaskarzinom. Diese Ergebnisse werden durch Appel et al. bestätigt, der über einen stimulierenden Effekt von Fischöl auf die Karzinogenese beim Pankreaskarzinom des Syrischen Hamsters berichtete (10). Möglicherweise hat die Art der verwendeten Omega-3-Fettsäure einen entscheidenden Einfluß auf die Karzinogenese, daher evaluieren wir zur Zeit in einer weiteren Studie die Effekte von ALA, Eicosapentaensäure und Fischöl auf das Lebermetastasenwachstum beim Pankreaskarzinom.

So konnten Moorby et al. demonstrieren, daß bestimmte Fettsäuren der n-3-Serie, wie Linolensäure, zu bedeutenden Veränderungen der Lipidstruktur der Zellmembranen von Hepatozyten führen (162). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß diese Veränderungen der Zellmembranstruktur zu einem signifikanten Verlust von Interzellularkontakten führten, welcher den Tumorzellen vermutlich die Invasion erleichtern könnte (162). Zu ähnlichen Resultaten kamen Hasler et al., die an mit Linolensäure inkubierten Hepatozyten einen signifikanten Verlust von gap junctions zeigen konnten (84). Meterissian et al. wiesen eine Linolensäure-bedingte Inhibition der hepatischen Phagozytose durch Veränderungen an den Kupfferschen Sternzellen nach (160). Obwohl in allen beschriebenen Studien Veränderungen an Membranen und dadurch bedingte Funktionsstörungen von Leberzellen respektive in der Leber residierenden Zellen des Immunsystems beobachtet wurden, fehlt es an Erklärungsansätzen für die Ursachen dieser Membranveränderungen.

Da die Anpassungsfähigkeit des antioxidativen Systems limitiert ist, könnte diese Steigerung zu einem durch eine ausgeprägte Lipidperoxidation und konsekutive Gewebsschäden gekennzeichneten Zustand führen, der die Metastasierung begünstigt (268). Verschiedene Studien unterstützen die Hypothese, daß hohe Dosen von Linolsäure und/oder Linolensäure zu einer Steigerung des oxidativen Stresses in

verschiedenen Geweben führen (133,225,233). Auch die eigenen Ergebnisse untermauern dies, da die durch eine Hochfetterernährung signifikant gesteigerte Lebermetastasierung mit einem signifikanten Anstieg der hepatischen Lipidperoxidation vergesellschaftet war. Von allen Versuchsgruppen wies die mit einer Hochfett-diät ernährte und mit BOP behandelte Gruppe die signifikant höchste TBARS-Konzentration in metastasenfrenen Leberanteilen auf. Gleichzeitig war die GSHPX-Aktivität erniedrigt und die SOD-Aktivität erhöht.

Es ist in der Literatur bekannt, daß der Lipidperoxidationsstoffwechsel ein empfindliches System darstellt (105). Weder für die pankreatische und hepatische Lipidperoxidation, noch für die Aktivität der Schutzenzyme SOD und GSHPX des Syrischen Hamsters liegen in der Literatur Normalwerte vor. Durch die Erhebung von Mehrfachmessungen konnten wir jedoch vormals bestehende hohe Standardabweichungen deutlich reduzieren. Die von uns angegebenen Ergebnisse beziehen sich jeweils auf Doppelbestimmungen, von denen der Mittelwert ermittelt wurde. Im Falle einer Differenz von mehr als 10% zwischen beiden Werten der Doppelbestimmung wurde eine dritte Messung durchgeführt und anschließend der Mittelwert bestimmt.

Zur Sicherung der Qualität der Messungen erfolgten diese im Labor von Herrn Prof. Dr. I. Schimke der Medizinischen Klinik der Charité Campus Mitte, der über eine langjährige Erfahrung auf dem Sektor der Untersuchung des Lipidperoxidationsstoffwechsels verfügt.

Weiterhin ist bekannt, daß der Angriff von reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen eines erhöhten oxidativen Stresses auf ungesättigte Fettsäuren Endothelschäden verursacht (28). Diese Schäden und die Freisetzung von Proteasen durch das geschädigte Endothel können zur Degradation von Basalmembranen führen, wodurch Tumorzellen die Implantation erleichtert werden könnte (92,134). Neben diesen direkten Effekten der Lipidperoxidation kommt es auch zu einer Stimulation der Eicosanoidsynthese. Für Produkte der Eicosanoidsynthese wiederum wurden wachstumsfördernde Effekte auf Tumorzellen nachgewiesen (27,51,88,121,125,224). Diese Ergebnisse werden durch Studien unterstützt, bei denen im Verlauf der Metastasierung verschiedener Tumorentitäten eine gesteigerte Synthese von Eicosanoiden nachgewiesen werden konnte (121,173,203-213). Diesbezüglich konnten Takashi et al. durch Therapie mit Eicosanoidsynthesehemmern das Wachstum BOP-induzierter Pankreaskarzinome des Syrischen Hamsters inhibieren (238).

Im Vergleich zu metastasenfremen Leberanteilen waren die Aktivitäten der antioxidativen Schutzenzyme GSHPX und SOD in den Lebermetastasen bei Standardernährung signifikant erniedrigt. Bei gleichzeitiger Hochfetterernährung fiel diese Erniedrigung stärker aus als bei Standardernährung. Demgegenüber unterschied sich die TBARS-Konzentration in Lebermetastasen und in metastasenfremen Leberanteilen bei Standardernährung nicht voneinander. Bei Hochfetterernährung fanden sich in den Lebermetastasen jedoch weniger Lipidperoxidationsprodukte als in metastasenfremen Leberanteilen. Die diätetische Supplementierung mit Linolsäure und Linolensäure führte also in metastasenfremen Leberanteilen zu einem Anstieg der Lipidperoxidation, verglichen mit Lebermetastasen. Dies könnte mit der Beobachtung in Zusammenhang stehen, daß Tumorzellen im allgemeinen nicht über Desaturasen und Elongasen verfügen (95).

Linolsäure und Linolensäure sind zweifach bzw. dreifach ungesättigte Fettsäuren und haben eine Kettenlänge von 20 Kohlenstoffatomen. Damit stellen sie kein bevorzugtes Substrat für die Lipidperoxidation dar, da diese vor allem an Fettsäuren angreift, die zum einen über eine größere Kettenlänge verfügen und zum anderen mehr als 3 Doppelbindungen aufweisen. Hepatozyten – wie nahezu alle Körperzellen – sind jedoch in der Lage, die diätetisch angebotenen Fettsäuren zu verlängern, weiter zu entsättigen und in ihre Membranen einzubauen (95). Tumorzellen scheint dies nicht möglich zu sein (95). Daher könnten die Hepatozyten anfälliger für den BOP-induzierten oxidativen Stress sein, da ihre Membranen bei diätetischer Supplementierung mit Linolsäure und Linolensäure in weit größerem Maße als die Membranen der Tumorzellen die bevorzugten Substrate der Lipidperoxidation enthalten können. Möglicherweise bestehen hier Zusammenhänge zu den bereits diskutierten Ergebnissen von Hasler et al., Meterissian et al. und Moorby et al., da die von ihnen beobachteten Funktionsstörungen von Hepatozyten bzw. intrahepatischen Makrophagen auf Membranschäden zurückführbar sind, wie sie beispielsweise bei einer hohen Lipidperoxidation entstehen (38,56,84,161,162). Die Tumorzellen der Leberfiliae hingegen enthalten einerseits möglicherweise weniger Substrat für die Lipidperoxidation in ihren Membranen und könnten andererseits – wie bei vielen Tumorarten bereits beschrieben – eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Lipidperoxidation besitzen und somit weniger Schäden durch den BOP-induzierten oxidativen Stress in der Leber davontragen als die nicht veränderten Leberzellen (106).

Diese Hypothesen könnten erklären, warum unter einer Hochfettdiät eine im Vergleich zur Standardernährung signifikante Steigerung der Lebermetastasierungsrates wie auch der Anzahl und der Größe der Lebermetastasen in diesem Tumormodell beobachtet wurde. Weiterhin stellen sie Erklärungsansätze für die beobachtete massive Steigerung der Lipidperoxidation in metastasenfremen Leberanteilen und das demgegenüber relativ geringe Ausmaß der Lipidperoxidation in den Lebermetastasen dar.

Neben der beobachteten Lebermetastasierung bei Hamstern mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas traten in unseren Studien nach der Induktion keine Tumoren in anderen Organen auf. Trotz intensiver histologischer Untersuchungen im Institut für Pathologie der Charité waren insbesondere in der Niere und Lunge keine Tumoren nachweisbar. Bei den beobachteten Lebermetastasen handelte es sich durchweg um Metastasen eines duktalem Adenokarzinoms. Die Tatsache, daß in der Niere bzw. Lunge unserer Versuchstiere keine Tumoren nachgewiesen wurden, könnte durch die hohe Reinheit unseres Induktors von nahezu 100% begründet sein. Die außerordentlich hohe Reinheit unseres Tumorinduktors wurde durch Analysen eines auswärtigen Instituts für Chemie einer deutschen Universität bestätigt.

4.2 Octreotid und Tamoxifen beim duktalem Pankreaskarzinom

In dieser Studie war unter der Therapie mit Octreotid sowohl die Anzahl makroskopischer Pankreaskarzinome als auch die Anzahl und Größe von Lebermetastasen pro Tier vermindert. Dies bedeutet, daß unter der Behandlung mit Octreotid das Wachstum des Primärtumors und der Lebermetastasen verringert war, allerdings war die Inzidenz von Pankreaskarzinomen und Lebermetastasen gegenüber der Kontrollgruppe unverändert.

Die Einzeltherapie mit Tamoxifen beeinflusste weder das Tumorstadium noch dasjenige der Lebermetastasen, obwohl Östrogenrezeptoren sowohl in den Pankreaskarzinomen als auch in den Lebermetastasen aller Tiere nachgewiesen wurden. Ferner unterschied sich das Ergebnis der Kombinationstherapie mit Octreotid und Tamoxifen nicht von demjenigen der Einzeltherapie.

Die von uns beobachtete Inhibition des Tumorstadiums durch Octreotid wird durch Meijers (159) bestätigt.

Meijers et al führten am chemisch induzierten Tumormodell des duktalem

Adenokarzinoms des Pankreas unmittelbar nach Beendigung der Tumordinduktion eine Behandlung mit dem Somatostatin-Analogon Sandostatin bzw. eine Orchiektomie in Einzel- und Kombinationsbehandlung durch. Entsprechend des Studiendesigns wurde diese Therapie als prophylaktische Behandlung eingestuft, da mit ihr bereits vor der vollständigen Etablierung eines duktales Pankreaskarzinoms begonnen wurde.

Im Gegensatz zu Meijers setzten wir das zu einem späteren Zeitpunkt entwickelte Sandostatin-Retard-Präparat LAR (20mg) ein, so daß wir auf die von Meijers beschriebene 4-wöchentliche Neu-Implantation von Minipumpen verzichten konnten. Nach einer Therapiedauer von 115 Tagen beendete Meijers die Studie. Die Hamster wurden getötet, obduziert und histologisch analysiert.

Meijers beobachtete unter der Sandostatin-Therapie eine Inhibition des Tumorwachstums des Pankreaskarzinoms – die Inzidenz präneoplastischer duktales Läsionen war vermindert. Die Kastration hatte hingegen in dieser Studie keinen Einfluß auf das Tumorwachstum. Die Studiendauer betrug insgesamt 19,5 Wochen gegenüber 24 Wochen der eigenen Studie.

Die Inhibition des Tumorwachstums durch Sandostatin wird von Meijers durch eine mögliche Wirkung über Somatostatinrezeptoren begründet. Diese waren bereits 1989 für dieses Tumormodell von Fekete et al beschrieben worden (159). In unseren Studien wiesen wir in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Reubi qualitativ ebenfalls die Präsenz von Somatostatinrezeptoren nach. Diese lagen in den Lebermetastasen duktales Adenokarzinome des Pankreas vor (Ergebnisse 3.3.4). Der Einfluß von Sandostatin auf die Lebermetastasierung wird in der Publikation von Meijers hingegen nicht beschrieben.

In einer Folgestudie zu der von Meijers publizierten Untersuchung (159) evaluierten Visser et al (253) den Einfluß einer dauerhaften Therapie mit dem Somatostatin-Analogon Sandostatin und einer Kastration in Kombinations- und Einzeltherapie auf das duktales Pankreaskarzinom des Syrischen Hamsters. Somit wurde entsprechend der häufig klinischen Situation beim humanen Pankreaskarzinom die Therapie erst nach der Etablierung des Pankreaskarzinoms durchgeführt – dies entspricht dem von uns verwendeten Studiendesign.

Im Gegensatz zu Visser et al setzten wir 4-wöchentlich das Octreotid- Retard-Präparat LAR mit einer Wirkungsdauer von 4 Wochen ein und evaluierten die Therapie ferner

auf die Lebermetastasierung.

Visser et al beobachteten unter der Sandostatin-Therapie eine signifikant geringere Anzahl von Mikrokarzinomen eines Pankreaskarzinoms im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die Kombinationstherapie (Sandostatin und Kastration) führte darüber hinaus zu einer geringeren Anzahl an Borderline-Läsionen. In unserer Studie wurde keine Kastration durchgeführt. Die von Visser beobachtete Inhibition des Tumorwachstums unter einer dauerhaften Sandostatin-Therapie bestätigt unsere Beobachtungen.

In einer weiteren Studie wurde von Haddock (80) der Einfluß des Somatostatin-Analogons SMS 201-995 in einer Niedrig- und einer Hochdosierung auf das Tumorwachstum des Primärtumors des duktales Pankreaskarzinoms des Syrischen Hamsters evaluiert. Unter der Niedrig-Dosierung zeigte sich eine Steigerung der Karzinogenese gegenüber der Kontrollgruppe. Unter der Hochdosierung wurde kein erhöhtes Tumorwachstum beobachtet, allerdings auch keine Inhibition des Tumorwachstums. Die fehlende inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum ist möglicherweise durch die insgesamt zu niedrige Dosierung bedingt, da das Somatostatin-Analogon lediglich 2mal täglich an den Tagen 2-4 einer Woche appliziert wurde (8 Uhr und 14 Uhr). Infolge einer Halbwertszeit von lediglich 8 Stunden erscheint somit keine dauerhafte Wirkung gewährleistet. Möglicherweise ist dies der Grund dafür, daß keine Inhibition des Tumorwachstums beobachtet wurde.

In der eigenen Studie verwendeten wir stattdessen 4-wöchentlich das Retardpräparat (Octreotid LAR 20mg) des Somatostatin-Analogons Octreotid. Hierdurch war eine gleichmäßige Wirkung über einen Zeitraum von jeweils 4 Wochen gewährleistet und möglicherweise die beobachtete Inhibition des Tumorwachstums bedingt.

Klinisch werden die eigenen experimentellen Ergebnisse durch Rosenberg bestätigt (215). Im Zeitraum zwischen 1990 und 1993 erhielten 12 Patienten mit einem histologisch gesicherten Pankreaskarzinom 3x100µg Sandostatin subkutan täglich und 2x10mg Tamoxifen oral täglich, wobei als Vergleich eine aus 68 Patienten bestehende historische Kohorte diente. Beide Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Alters- und Geschlechtsverteilung oder bezüglich des Tumorstadiums (III/IV). Als Hauptbewertungskriterium legte Rosenberg die mediane Überlebenszeit ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung fest. Diese betrug in der Patientengruppe, die mit der

Kombinationstherapie aus Octreotid und Tamoxifen behandelt worden war, 12 Monate und in der historischen Vergleichskohorte 3 Monate. Während die 1-Jahres-Überlebensrate in der Therapiegruppe 59% betrug, lag sie in der Kontrollgruppe bei 16%. Allerdings handelt es sich bei der Therapiegruppe (n=12) um 5 resezierte, 5 palliativ operierte und um 2 nicht operierte Patienten, so daß die einzelnen Untergruppen nur sehr geringe Fallzahlen aufwiesen.

In einer eigenen Studie handelte es sich demgegenüber um ein homogenes Patientengut (262). 14 Patienten mit einem Tumorrezidiv eines R0-resezierten duktales Pankreaskarzinoms wurden dauerhaft mit Octreotid und Tamoxifen in der o.g. Dosierung behandelt und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe (n=14), die unter gleichen Bedingungen in der eigenen Klinik im Vorjahr prospektiv erhoben worden war, verglichen. Die mediane Überlebenszeit nach der Diagnosestellung eines Tumorrezidivs war in der Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls verlängert. Diese betrug 7 Monate (3-12) gegenüber 3,5 Monaten (1-6) ($p < 0,05$). Ferner beobachteten wir unter der Therapie Vorteile hinsichtlich der Lebensqualität. So zeigten sich für die Parameter Appetitlosigkeit, Übelkeit, Schmerz und Fatigue signifikante Vorteile für die Therapiegruppe, darüberhinaus war der Analgetikaverbrauch in der Therapiegruppe erniedrigt.

Der genaue Wirkungsmechanismus von Octreotid beziehungsweise von Tamoxifen ist jedoch unbekannt, zudem war nicht geklärt, ob die additive Wirkung beider Medikamente größer ist als die Einzelwirkung.

In der vorliegenden Studie wurde das Wachstum der Lebermetastasen durch eine Hochfett-Diät mehrfach-ungesättigter Fettsäuren (PUFA) gefördert (261). Da vermutet wird, daß mehrfach-ungesättigte Fettsäuren die Lebermetastasierung über einen Anstieg des oxidativen Stresses und eine gesteigerte Eicosanoid-Synthese stimulieren (107,125,133,224) und Octreotid in dieser Studie die Lebermetastasierung inhibierte, evaluierten wir den Einfluß von Octreotid auf den oxidativen Streß in der nachfolgenden Studie..

4.3 Einfluß von Octreotid auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation des duktales Pankreaskarzinoms

4.3.1 Wirkungen von Octreotid

Für das Somatostatinanalogon Octreotid konnte in verschiedenen Studien eine inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum des N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP)-induzierten Pankreaskarzinoms im Syrischen Hamster beobachtet werden (49,216,259,276,267,269,285). In einigen klinischen Studien konnte eine durch die Octreotidtherapie verlängerte Überlebenszeit und/oder eine verbesserte Lebensqualität bei Patienten mit fortgeschrittenem oder rezidiertem Pankreaskarzinom gezeigt werden (42,74,252,262). Eine direkte Wirkung von Octreotid auf die Lebermetastasierung des Pankreaskarzinoms ist bisher jedoch weder tierexperimentell noch klinisch beschrieben worden. Auch sind bislang keine oder nur sehr geringe objektive Ansprechraten im Sinne einer Tumorverkleinerung beobachtet worden (42,74,215,262). In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob die Wirksamkeit von Octreotid beim Pankreaskarzinom davon abhängt, ob das Pankreaskarzinom Somatostatinrezeptoren exprimiert (61,68,78,201,202,222).

Allerdings könnten möglicherweise auch indirekte Effekte des Somatostatins bzw. seiner Analoga zu einer Wachstumsbeeinflussung des Tumors führen. In erster Linie werden hier Beeinflussungen des Stoffwechsels von Hormonen und Wachstumsfaktoren diskutiert. So inhibiert Somatostatin rezeptorunabhängig die Sekretion von GH (growth hormone) und IGF-1 und scheint auch einen hemmenden Einfluß auf das EGF/TGF- α -System auszuüben (183,202). Da das humane wie auch das chemisch induzierte tierexperimentelle Pankreaskarzinom in seinem Wachstum sowohl durch IGF-1 als auch durch EGF stimuliert wird, wäre hier ein Effekt von Octreotid möglich (182,202).

Weiterhin wurden in peritumoralen Venen verschiedener Neoplasien – auch des Pankreaskarzinoms – Somatostatinrezeptoren gefunden, und da Somatostatin über Somatostatinrezeptoren an Gefäßendothelien eine vasokonstriktorische Wirkung entfaltet, könnte die Octreotidtherapie zu lokaler Hypoxie und Tumornekrose führen und somit die Tumorausbreitung behindern (191,202). Andererseits könnte durch die lokale

Hypoxie auch die tumor-assoziierte Angiogenese provoziert oder unterstützt werden (183). Zur Klärung der genauen Pathomechanismen erscheinen daher weitere Untersuchungen notwendig.

Im von uns verwendeten Tiermodell gelang der Nachweis von Somatostatinrezeptoren im Pankreaskarzinom bis heute nicht zweifelsfrei (183,202). Die Lebermetastasen sind bisher nicht im Hinblick auf die Expression von Somatostatinrezeptoren untersucht worden. Im Rahmen der hier vorgelegten Studie haben wir einige Proben aus Lebermetastasen bei Herrn Prof. Dr. J.C. Reubi im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Bern untersuchen lassen. Hierbei konnten mittels einer Octreotid-Autoradiographie in den Lebermetastasen Somatostatinrezeptoren nachgewiesen werden, während in den peritumoralen, metastasenfreien Leberanteilen keine Somatostatinrezeptoren detektiert wurden (Prof. Reubi, persönliche Kommunikation). Daher kann man davon ausgehen, daß direkte, rezeptorvermittelte Wirkungen von Octreotid auf die Tumorzellen in der Leber zumindest in diesem Tiermodell möglich sind.

Die Octreotidtherapie führte in unserer Studie bei beiden Ernährungsformen zu einer signifikant niedrigeren Anzahl von Lebermetastasen pro Tier als ohne Therapie. Weiterhin waren die Lebermetastasen unter einer Octreotidtherapie signifikant kleiner, während die Inzidenz von Lebermetastasen hingegen durch Octreotid unbeeinflusst blieb.

Die ohne Therapie gegenüber einer Standardernährung signifikant erhöhte Lebermetastasierung ist unseres Erachtens auf die gesteigerte Fettaufnahme der Versuchstiere zurückzuführen, und zwar speziell auf die hohen Anteile von Linolsäure und Linolensäure. Die bereits diskutierten potentiellen Mechanismen dieser Metastasierungssteigerung scheinen in engem Zusammenhang mit einer gesteigerten Lipidperoxidation zu stehen. Einflüsse von Octreotid auf die Lipidperoxidation, den oxidativen Stress oder den Lipidmetabolismus im allgemeinen sind bisher nicht beschrieben worden. Wir beobachteten jedoch bei einer Therapie mit Octreotid neben den bereits geschilderten Effekten auf die Lebermetastasierung auch signifikante Veränderungen der Lipidperoxidation. So führte die Octreotidtherapie bei beiden Ernährungsformen zu einer signifikanten Steigerung der GSHPX- und der SOD-Aktivität in metastasenfreien Leberanteilen, verglichen mit den Kontrollgruppen. Gleichzeitig wurde die TBARS-Konzentration in metastasenfreien Leberanteilen durch Octreotid

unabhängig von der Art der Ernährung signifikant erniedrigt. Demzufolge scheint Octreotid die Lipidperoxidation in nicht metastatisch veränderten Leberanteilen zu senken. So beobachteten Ariaz-Dias et al., daß Somatostatin zu einer signifikanten Erniedrigung von Lipidperoxidationsprodukten (konjugierte Diene, Malondialdehyd) im Diaphragma septischer Ratten führt (15). Weiterhin beobachteten Niedermühlbichler und Wiedermann einen inhibitorischen Effekt von Octreotid auf den sog. „respiratory burst“ aktivierter neutrophiler Granulozyten, welche zu den bedeutendsten Quellen reaktiver Sauerstoffspezies zählen (170). In onkologischen Studien wurden die beschriebenen Wirkungen von Octreotid jedoch bislang nicht untersucht. Angesichts der zuvor diskutierten Lipidperoxidations-bedingten Schäden an Hepatozyten, intrahepatischen Makrophagen und am Endothel, sowie der potentiellen Folgen für die Metastasierung scheint die Octreotid-induzierte Verminderung der Lipidperoxidation in metastasenfremen Leberanteilen das Lebergewebe zumindest partiell protektiv gegenüber einer Invasion von Tumorzellen wirken zu können. Diese Fähigkeit zur Verringerung des oxidativen Stresses und somit der Lipidperoxidation scheint ferner nicht rezeptorvermittelt zu sein, da in metastasenfremen Leberanteilen keine Somatostatinrezeptoren nachgewiesen werden konnten (Prof. J.C. Reubi, persönliche Kommunikation). Jedoch ist bislang ungeklärt, wodurch dieser indirekte Effekt bedingt ist.

Um die Octreotid-bedingte Erniedrigung der Lipidperoxidation in metastasenfremen Leberanteilen erklären zu können, sind weitere Studien nötig, die bereits bekannte Effekte von Octreotid, wie beispielsweise die Beeinflussung der Wachstumsfaktoren, berücksichtigen, um potentielle wechselseitige Beeinflussungen zu erkennen.

In den Lebermetastasen führte die Octreotidtherapie zu einer signifikanten Erhöhung der TBARS-Konzentration, verglichen mit nicht therapierten Tieren. Gleichzeitig waren die Aktivitäten von GSHPX und SOD erhöht. Neben einer signifikanten Verringerung der Anzahl und Größe der Lebermetastasen hatte die Octreotidtherapie also eine signifikante Steigerung der Lipidperoxidation in den Lebermetastasen zur Folge, wobei die Erhöhung der antioxidativen Schutzenzyme am ehesten als reaktiv anzusehen sein dürfte. Diese Steigerung der Lipidperoxidation in den Lebermetastasen wiederum war bei gleichzeitiger Hochfetterernährung stärker ausgeprägt als bei Standardernährung. Ohne die Behandlung mit Octreotid war die Lipidperoxidation in den Lebermetastasen bei einer Hochfetterernährung niedriger als in metastasenfremen Leberanteilen. Durch die

Therapie mit Octreotid kehrte sich dieses Verhältnis nahezu um. Dies bedeutet, daß Octreotid in den Lebermetastasen die entgegengesetzte Wirkung wie in metastasenfremen Leberanteilen hat. Bedenkt man dabei, daß die Tumorzellen nicht über Desaturasen und Elongasen verfügen (95) und mit dieser Tatsache die in den Kontrollgruppen erniedrigte Lipidperoxidation in den Lebermetastasen erklärt wurde, so hat es den Anschein, daß Octreotid diesen Stoffwechselweg in den Tumorzellen zu überbrücken vermag. Es erscheint unwahrscheinlich, daß Octreotid als normalerweise über einen membranständigen Rezeptor wirkendes Proteohormon selbst desaturierend und/oder elongierend auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren wirken kann. Aber auch diese Möglichkeit sollte in weiteren Experimenten geprüft werden, wobei sich insbesondere In-vitro-Untersuchungen an Tumorzellen eignen dürften. Ein weiterer potentieller Mechanismus könnte über eine rezeptorgekoppelte Querverbindung zur Transkription/Translation/Synthese von Desaturasen und/oder Elongasen in den Tumorzellen möglich sein. Dieser Wirkungsmechanismus erscheint aus zwei Gründen wahrscheinlicher als eine eigene enzymatische Wirkung von Octreotid. Der erste Grund besteht darin, daß in den Lebermetastasen dieses Tiermodells im Gegensatz zu metastasenfremen Leberanteilen der Nachweis von Somatostatinrezeptoren positiv war (Prof. J.C. Reubi, persönliche Kommunikation) und somit eine rezeptorvermittelte Wirkung möglich wäre. Der zweite Grund besteht in der Tatsache, daß für die verschiedenen Somatostatinrezeptor-Subtypen nahezu alle bekannten second-messenger-Wege diskutiert werden oder nachgewiesen sind (136,182,202). Daher ist es durchaus vorstellbar, daß eine Kopplung zur Synthese bestimmter Genprodukte auf einem der verschiedenen Level vorhanden ist. Die direkte, rezeptorvermittelte Wirkung von Octreotid auf die Lebermetastasen vorausgesetzt, wird auch der beobachtete, entgegengesetzte Effekt auf die metastasenfremen Leberanteile erklärbar, da in diesen keine Somatostatinrezeptoren nachgewiesen werden konnten.

Hinsichtlich des Wirkungsmechanismus von Octreotid ist darüberhinaus ungeklärt, ob möglicherweise eine erhöhte Inhibition des Tumorwachstums des Pankreaskarzinoms, sowie eine weitere Verbesserung der Lebensqualität durch eine Steigerung der bislang applizierten Octreotid-Dosis von $3 \times 100 \mu\text{g}$ zu erzielen ist. In einer klinischen Studie evaluierten Friess et al. (72,73) ebenfalls den Einfluß von Octreotid auf das Tumorwachstum des Pankreaskarzinoms. Unter einer Dosierung von täglich $3 \times 100 \mu\text{g}$ subkutan beobachteten sie zwar keine Tumorregression, allerdings zeigte sich bei 3 Patienten die Inhibition einer weiteren Tumorprogression. Dementsprechend hält Friess

eine Applikation von Octreotid in Dosierungen von bis zu 20.000µg subkutan täglich für sinnvoll. Ob die Applikation derartig hoher Dosen von Somatostatin als unbedenklich eingestuft werden kann, ist allerdings bislang nicht hinreichend bekannt. Guliana et al. (79) therapierten Patienten mit einem medullären Schilddrüsenkarziom mit einer täglichen Dosis von 2000µg und beobachteten hierbei nur geringe Nebenwirkungen, so daß eine Steigerung der Dosis für Octreotid auch bei der Therapie des Pankreaskarzinoms möglich scheint.

4.4 Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C sowie E auf die Lebermetastasierung und die Lipidperoxidation in Lebermetastasen und metastasenfremen Leberanteilen beim duktafen Pankreaskarzinom

4.4.1 Einfluß von Vitamin A auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation

In zahlreichen tierexperimentellen, klinischen und epidemiologischen Studien konnte der Einfluß von Vitamin A auf die Prävention und Therapie neoplastischer Veränderungen demonstriert werden.

Viele Studien berichten über inverse Zusammenhänge zwischen Vitamin A-Aufnahme und Pankreaskarzinominzidenz (146,154). Überdies konnte auch in tierexperimentellen Studien unserer Arbeitsgruppe die Pankreaskarzinominzidenz durch Verabreichung von Vitamin A signifikant gesenkt werden (100% vs. 64%) (272).

In der vorgelegten Studie konnte die Lebermetastaseninzidenz eines duktafen Pankreasadenokarzinoms durch Supplementierung von Vitamin A gesenkt werden. Als einziges Vitamin konnte Vitamin A die Anzahl der Lebermetastasen pro Tier sowie die Größe der Metastasen signifikant reduzieren.

Unklar war bislang, ob Vitamin A, mittels Beeinflussung des oxidativen Status sowie der proliferativen Kapazität der Zellen, protektiv auf die Lebermetastasierung einwirken kann.

In den tumorfreien Leberanteilen der BOP-Kontrollgruppe konnte man, verglichen mit den nichtinduzierten Kontrollgruppen, einen Anstieg der SOD-Aktivität beobachten. Weiterhin stiegen die TBARS-Konzentrationen der verschiedenen Leberanteile, als Indikator der Lipidperoxidation, signifikant um das etwa 30-fache verglichen mit den

anderen Gruppen. In den Lebermetastasen der BOP-Kontrollgruppe wurde wiederum eine signifikant niedrigere TBARS-Konzentration als in den metastasenfreen Anteilen nachgewiesen.

Im Zusammenhang mit der exzessiv gesteigerten Lipidperoxidation im Lebergewebe der BOP-induzierten Tiere steht wahrscheinlich auch die SOD-Aktivitätserhöhung als ein reaktives Geschehen im tumorfreien Gewebe. Ursächlich für das Ansteigen des oxidativen Stresses ist die BOP-Behandlung sowie die Hochfetterernährung der Tiere, da hierbei die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen aktiviert wurde. Desweiteren würde auch die durch Szatrowski et al. beschriebene Wasserstoffperoxid-Produktion von Tumorzellen ein Ansteigen des oxidativen Stresses in den Lebermetastasen erklären (235). Die endogene Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies steigert die genetische Instabilität von Tumorzellen und scheint mit der Malignität eines Tumors zu korrelieren. Kondo et al. vermuteten darüberhinaus, daß persistierender oxidativer Streß in der Tumorzelle die Zellproliferation und das Tumorwachstum stimuliert, dagegen aber nicht in der Lage ist, eine Apoptose der Tumorzelle auszulösen (132).

Weiterhin konnte intrametastatisch ein signifikanter Aktivitätsabfall der SOD bzw. GSHPX im Vergleich zum freien Gewebe der BOP-Kontrollgruppe beobachtet werden. Schon 1979 wurde von Oberley et al. über geringere Mangan-SOD-Aktivitäten in Tumorzellen berichtet, die Aktivitäten der Cu/Zn-SOD und GSHPX schienen jedoch variabel zu sein (170). Diese Beobachtungen über unterschiedliche Enzymaktivitäten wurden ebenfalls durch andere Studien bestätigt (242). Sun et al. postulierten, daß die Tumorzelle über weniger mRNA zur Synthese von Proteinen verfügt und somit geringere SOD-Aktivitäten resultieren können (171). Allerdings wird die Frage in der Literatur kontrovers diskutiert, inwieweit diese abnormen Regulationsmechanismen der antioxidativen Systeme Ursache oder Folge der malignen Transformation der Zelle darstellen.

Verglichen mit dem tumorfreien Gewebe der BOP-Kontrollgruppe konnten trotz der geringeren antioxidativen Enzymaktivität erniedrigte Lipidperoxidationsparameter in den Lebermetastasen festgestellt werden. Es ist zu vermuten, daß Tumorzellen weitere alternative Mechanismen bei der Abwehr freier Radikale besitzen. Die Verminderung des oxidativen Stresses verglichen mit tumorfreien Gewebe läßt sich vermutlich auf weniger ungesättigte Fettsäuren in der Tumorzellmembran, erniedrigte Cytochrom-P450-Aktivität sowie erhöhte alternative antioxidative Mechanismen in den

Lebermetastasen zurückführen (44). Desweiteren berichten Cheeseman et al. über erhöhte α -Tocopherol-Konzentrationen in Membranen von Hepatomzellen und begründen dadurch das geringere Ausmaß von Lipidperoxidation in Tumorzellen (44).

Nach Supplementierung von Vitamin A bei den gesunden Tieren blieb die GSHPX-Aktivität gegenüber den nicht induzierten, nicht therapierten Tieren unverändert. Dagegen stieg die SOD-Aktivität signifikant an. Außerdem kam es unter Vitamin A-Therapie bei den BOP-induzierten Tieren zur exzessiven Aktivitätssteigerung der SOD auf das etwa 10-fache verglichen mit den Vitamin A-supplementierten, nicht induzierten Tieren. Die GSHPX-Aktivität der Vitamin A-therapierten, BOP-induzierten Tiere war sowohl im freien als auch im metastatischen Gewebe ebenfalls signifikant erhöht. Hierdurch unterschied sich diese Gruppe deutlich von der BOP-Kontrollgruppe.

Laut Oberley et al. korreliert die Invasivität eines Tumors mit der SOD-Aktivität in der Zelle (171). Diese Behauptung konnte jedoch, hinsichtlich auf die signifikant erhöhten SOD-Werte der Vitamin A-therapierten, induzierten Gruppe und erniedrigter Metastasierungsinzidenz, durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Überdies konnte in diversen Zellkulturen das Wachstum von Tumorzellen durch einen exzessiven Aktivitätsanstieg der Mangan-SOD gehemmt werden (171). Die genauen Wirkmechanismen der Wachstumsinhibition auf Zellen bei Überexpression der SOD, scheinen noch nicht geklärt. Vermutlich akkumuliert das Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid durch die gesteigerte Enzymaktivität (57). Dies führt wiederum zu einem prooxidativen / antioxidativen Mißverhältnis mit Beeinflussung diverser Stoffwechselprozesse.

Bezüglich Oberley et al. könnten die exzessiv erhöhten SOD-Aktivitäten der Vitamin A-therapierten, induzierten Gruppe in unserem Versuch ebenso zur Wachstumshemmung der Tumorzellen im Lebergewebe beigetragen haben (171). Möglicherweise kam es hierdurch auch zu der signifikanten Erniedrigung der Lebermetastasengröße sowie Metastasenanzahl pro Tier unter Vitamin A-Therapie. Infolge der SOD-Aktivitätserhöhung kommt es zur Akkumulation des Reaktionsprodukts Wasserstoffperoxid. Dies wiederum könnte den Anstieg der GSHPX-Aktivität in dieser Gruppe, als ein reaktives Geschehen auf ein gesteigertes Substratvorkommen, erklären.

Desweiteren kam es bei den Vitamin A-supplementierten, gesunden Tieren zu einem

signifikanten Konzentrationsanstieg der TBARS, so daß sogar die Werte der BOP-induzierten sowie Vitamin A-therapierten Gruppe unter ihnen lagen. Allerdings bleibt dieser Konzentrationsanstieg durch die alleinige Gabe von Vitamin A in der Vitamin A-supplementierten, gesunden Gruppe unverständlich und kann wahrscheinlich als ein Artefakt gewertet werden.

Vergleicht man die gemessenen Enzymaktivitäten sowie TBARS-Konzentrationen zwischen metastasenfremen Leberanteilen und Lebermetastasen, kann man auch in der Vitamin-A-therapierten, induzierten Gruppe bei jedem Parameter signifikant niedrigere Werte in den Lebermetastasen konstatieren. Diese Tendenz läßt sich auch in der BOP-induzierten Gruppe feststellen.

Vergleicht man wiederum die TBARS-Konzentrationen der BOP-Kontrollgruppe mit den induzierten, Vitamin A-therapierten Tieren, scheint es nach Vitamin A-Gabe zur Herabsetzung der Lipidperoxidation gekommen zu sein. Unsere Ergebnisse bestätigen den antioxidativen Wirkmechanismus von Vitamin A. Es ist also in der Lage, toxische Sauerstoffprodukte im Lebergewebe zu neutralisieren und somit die Hepatozyten vor oxidativen Schäden zu schützen. Beispielweise konnten Kensler et al in Versuchen an Leukozyten demonstrieren, daß Vitamin A die durch Phorbol-ester-induzierte Formation reaktiver Sauerstoffverbindungen herabsetzen kann (124).

Desweiteren wäre die Beeinflussung der Metastasierung auch durch direkte antioxidative Wirkmechanismen des Vitamin A auf die Tumorzellen denkbar.

Aus dem intrametastatischen TBARS-Konzentrationsabfall und den gesteigerten Enzymaktivitäten unter Vitamin A-Therapie ist ersichtlich, daß der oxidative Streß reduziert wurde. In-Vitro-Versuche an Walker Sarkomzellen (260) zeigten, daß Tumorzellen durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies Endothelzellen schädigen und somit den Metastasierungsprozeß begünstigen. Desweiteren behaupten Toyokuni et al., daß reaktive Sauerstoffspezies verschiedene Proteaseinhibitoren inaktivieren. Hierdurch soll die Aktivität von einigen Proteasen angeregt werden, welches wiederum die Invasivität von Tumorzellen erleichtert (260). Folglich könnte die eingeschränkte Formation reaktiver Sauerstoffspezies durch Vitamin A die Invasivität eines Tumors reduzieren.

Die Ergebnisse lassen weitergehend vermuten, daß die protektive Wirkung auf die Lebermetastasierung, von der Lipidperoxidation abgesehen, mittels alternativer

Mechanismen des Vitamin A zu begründen ist. Die folgenden Forschungsergebnisse weisen darauf hin, daß Vitamin A auf zellulärer Ebene in diverse Bereiche eingreift und hierdurch auch die Manifestation von Lebermetastasen beeinflussen könnte.

Neben seiner antioxidativen Fähigkeit zeigte Vitamin A beispielsweise eine protektive Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation von Hepatozyten. Die sog. gap-junctions sind für die Zellkommunikation und Adhäsion bedeutsam. Hierdurch kommt es zum Austausch von Faktoren, die das Wachstum und die Differenzierung der Zellgemeinschaft regulieren. Sowohl Retinol als auch Retinsäure steigerten in Zellsystemen die Produktion von gap-junctions durch Erhöhung der Connexin-Synthese (278). Desweiteren postulierten Madani et al. einen inversen Zusammenhang zwischen Ansteigen der interzellulären Kommunikation durch Vitamin A und Wachstum von transformierten Zellen.

Demzufolge könnte auch in unserem Versuch die durch Vitamin A verbesserte interzelluläre Kommunikation dem unkontrollierten Wachstum von Tumorzellen im Lebergewebe entgegenwirken.

Ein weiterer möglicher Angriffspunkt auf pathophysiologische Veränderungen der Zelle, der auch die Metastasierung beeinflussen könnte, ist die Modulation der Zelloberfläche durch Retinsäure. Bei in vitro Studien mit Melanom-Zellen konnten Lotan et al. zeigen, daß Retinsäure die Aktivität der Sialyltransferase steigert, somit eine erhöhte Glykosylierung von Zelloberflächen-Sialoglykoproteinen bewirken kann und wachstumshemmende Effekte aufweist (148). Die Zell-Zell-Erkennung ist weitestgehend in der Struktur von Proteinen sowie Glykoproteinen begründet. Durch Veränderungen bei Tumorzellen scheint die Kontaktinhibition zu entfallen, welches zur Stimulation des irregulären Wachstums führt.

Die bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse weisen überdies auf die bedeutende Rolle des Vitamins A in der Regulierung zellulärer Enzymaktivitäten, welche Proliferation und Differenzierung normaler und maligner Zellen kontrollieren, hin (234). Dieser Einfluß wird hauptsächlich auf nukleäre Effekte zurückgeführt. Im Cytosol existieren spezifische Bindungsproteine, die den Einfluß von Vitamin A auf die Genexpression steuern. Diese Beeinflussung wird über die Bindung an nukleäre Rezeptoren vermittelt, die zur Steroid / Thyroid-Hormonfamilie gehören.

Durch die Gabe eines Vitamin A-Analogons konnte beispielsweise in-vitro die Aktivität

der Proteinkinase C vermindert werden. In einer Studie von Anderson et al. an embryonalen Karzinomzellen wurde festgestellt, daß die durch Phorbol ester induzierte Aktivierung der Proteinkinase durch Retinsäure inhibiert wurde (2). Eine erhöhte Proteinkinase C-Aktivität stimuliert vor allem die Proliferation von Zellen und scheint somit die Promotion von Tumoren zu beeinflussen (281). Desweiteren vermag Retinol, ähnlich dem α -Tocopherol, kompetitiv die LOX zu hemmen (144). Insofern kann Vitamin A auch auf dieser Ebene die Eikosanoidsynthese modulieren und die Lipidperoxidation senken.

Überdies zeigte Vitamin A wachstumshemmende Einflüsse auf Tumorzelllinien mittels Induktion der Apoptose (162). In Studien von Zhang et al. konnten diese Beobachtungen gleichfalls bestätigt werden (286).

Manche Autoren diskutieren weiterhin stimulierende Einflüsse von Vitamin A auf das Immunsystem, welche vor allem die Ausbreitung von Tumorzellen im Lebergewebe verhindern könnten.

Offensichtlich ist Vitamin A für die regelrechte Funktion und die strukturelle Integrität des Lebergewebes von wesentlicher Bedeutung. Im Hinblick auf den komplexen Metastasierungsprozeß scheinen besonders die zellulären Abwehr- bzw. Regenerationsmechanismen der Hepatozyten bei verstärkter Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen auf eine ausreichende Verfügbarkeit von Vitamin A angewiesen.

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren, daß Vitamin A mittels seiner unterschiedlichen Einflußnahme auf nukleärer sowie extranukleärer Ebene der Zelle protektiv auf die Lebermetastasierung eines Pankreaskarzinoms gewirkt haben könnte.

Im Vergleich zu den anderen Vitaminen zeigte Vitamin A sowohl im Einfluß auf die Inzidenz von Pankreaskarzinomen als auch von Lebermetastasen die höchste Wirksamkeit.

Durch Appel (6) wurde ebenfalls der Einfluß von Vitamin A bzw. C, E und Selenium auf das Tumorwachstum des Primärtumors des duktales Pankreaskarzinoms des Syrischen Hamsters evaluiert. Entgegen den eigenen Studienergebnissen wurde hier keine Inhibition des Tumorwachstums des Primärtumors beobachtet.

Obwohl es sich bei der Studie von Appel um eine Langzeitstudie über eine Dauer von

386 Tagen handelt, wurde hier der Einfluß der Therapie auf die Lebermetastasierung nicht untersucht. In der Methodik wird lediglich beschrieben, daß nach der Autopsie das Pankreas eines jeden Tieres komplett histologisch analysiert wurde. Zwar wurde die Leber der Tiere ebenfalls entnommen, zur Inzidenz oder Größe etwaiger Lebermetastasen wird jedoch nicht Stellung genommen. Nach einer Studiendauer von 386 Tagen erscheint es jedoch unwahrscheinlich, daß in diesem chemisch induzierten Tumormodell eines duktales Pankreaskarzinoms keine Lebermetastasen aufgetreten sind.

4.4.2 Einfluß von Vitamin C auf die Lebermetasierung und die hepatische Lipidperoxidation

Vitamin C gehört zu den wichtigsten alimentären Redoxsystemen im menschlichen Organismus. Mit Vitamin E steht es in einem engen Zusammenspiel bei der Abwehr reaktiver Sauerstoffradikale. Als wasserlösliches Antioxidanz neutralisiert Vitamin C überwiegend in der hydrophilen Phase von extra- und intrazellulären Flüssigkeiten eine Reihe von reaktiven Sauerstoffspezies, wie z.B. Wasserstoffperoxid und das Superoxid-Anion (76). Zusätzlich dient Vitamin C der Regeneration von Tocopherol aus dem Tocopheryl-Radikal.

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien haben über einen direkten Zusammenhang zwischen Inzidenz eines Pankreaskarzinoms und Aufnahme von Ascorbinsäure berichtet (199). Am Tiermodell des Syrischen Goldhamsters konnte ebenfalls die Pankreaskarzinominzidenz durch Supplementierung von Vitamin C signifikant erniedrigt werden (272).

Über den Einfluß von Vitamin C auf die Lebermetastasierung eines Pankreaskarzinoms finden sich in der Literatur jedoch keine Angaben.

In diesem Versuch kam es durch Supplementierung von Vitamin C zu einer erniedrigten Inzidenz von Lebermetastasen. Verglichen mit Vitamin A bzw. E war sie jedoch nicht signifikant. Bezüglich der Anzahl an Lebermetastasen pro Tier sowie der Größe der Metastasen konnte im Vergleich zur BOP-induzierten Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Schon nach Vitamin C-Verabreichung bei den gesunden Tieren konnte man ein Ansteigen der SOD-Aktivität feststellen. Auffällig war, daß die SOD-Aktivität dieser

Gruppe auch gegenüber der BOP-Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Im Gegensatz dazu wurden bei der GSHPX-Aktivität sowie der TBARS-Konzentration keine Veränderungen festgestellt. Ähnlich dem Vitamin E konnte nach Vitamin C-Supplementierung der induzierten Tiere ein signifikantes Ansteigen der SOD bzw. GSHPX-Aktivität verglichen mit der BOP-Kontrollgruppe verzeichnet werden. Der Aktivitätsunterschied zwischen dem tumorfreien sowie metastatischen Gewebe war dabei jedoch nicht signifikant.

Überdies kam es durch Vitamin C zu einer signifikanten Erniedrigung der TBARS-Konzentration im Lebergewebe der induzierten Tiere.

Anscheinend konnte Vitamin C durch seine antioxidativen Fähigkeiten die durch BOP-Behandlung und Hochfetterernährung forcierte Lipidperoxidation sowohl im extra- als auch im intrametastatischen Gewebe reduzieren. Unsere Ergebnisse, bezogen auf die antioxidativen Eigenschaften des Vitamin C, finden sich in der Literatur bestätigt. Frei et al. bezeichnen beispielsweise Ascorbinsäure als effektivstes hydrophiles Antioxidanz, welches vor allem in der Initiationsphase die Membranlipide vor Peroxidation schützen kann (76). Insofern könnten vor allem die das metastatische Gewebe umgebenden Hepatozyten durch Vitamin C vor dem Angriff reaktiver Sauerstoffverbindungen geschützt werden und dem Metastasierungsprozeß protektiv entgegen wirken.

Neben der antioxidativen Wirkung von Vitamin C im tumorfreien Gewebe ist die Einflußnahme auf die Metastasierung auch durch direkte intrametastatische Effekte denkbar.

Aufgrund der signifikanten Erniedrigung der Lipidperoxidation und der Steigerung der Enzymaktivität in den Lebermetastasen durch Ascorbinsäure könnten hierbei die durch Shaughnessy et al. beschriebenen Folgereaktionen verhindert werden und die Invasivität des Tumors reduzieren (229).

Überdies haben manche Autoren, abgesehen von den antioxidativen Fähigkeiten des Vitamin C, auch direkte antiproliferatorische Wirkungen auf Tumorzellen beschrieben. Die dargelegten Mechanismen könnten vermutlich auch in diesem Versuch den Einfluß auf die hepatische Manifestation von Metastasen erklären.

Prasad et al. haben beispielsweise direkte zytotoxische Effekte der Ascorbinsäure auf Neuroblastomzelllinien dargestellt (189). In Tumorzellen stellten sie eine besonders hohe Ansammlung an Ascorbinsäure fest. Sie postulierten daraufhin, daß hohe

Konzentrationen an Vitamin C in vitro die Katalaseaktivität hemmen und durch die Akkumulation von Wasserstoffperoxid in der Tumorzelle der Zelltod ausgelöst wird. Aufgrund des homöostatischen Gleichgewichts waren normale Zellen dagegen nicht betroffen. Insofern wären auch direkte zytotoxische Effekte des Vitamin C in den Lebermetastasen denkbar.

Darüberhinaus postulierten Cameron et al., daß Vitamin C für die Synthese des sog. physiologischen Hyaluronidaseinhibitors (PHI) notwendig ist (40). Die Freisetzung von Hyaluronidase soll die Zellproliferation initiieren. Demzufolge kann Vitamin C auch auf dieser Ebene Einfluß auf die Proliferation von Tumorzellen nehmen.

Eine weitere bedeutende Rolle spielt Vitamin C in der Kollagenbiosynthese. Ein Mangel an Vitamin C reduziert die Bildung von Hydroxyprolin und Hydroxylysin und hat somit die Instabilität der Kollagenhelix zur Folge. In Untersuchungen an Fibroblasten konnten Dell'Orco et al. nachweisen, daß Ascorbinsäure stimulierend auf die Kollagensynthese wirkt (280). Die stabilisierenden Effekte des Vitamin C auf die extrazelluläre Matrix und damit auch der Integrität, könnten vermutlich auch in unserem Versuch die Invasivität des Tumors herabgesetzt haben.

Einige Studien haben desweiteren eine gesteigerte chemotaktische Aktivität sowie leukozytäre Phagozytoseaktivität nach Vitamin C-Supplementierung demonstrieren können (218,227). Bezogen auf unseren Versuch, könnte Vitamin C im Lebergewebe die Motilität und Phagozytoseaktivität der Kupfferschen Zellen erhöht und der Manifestation von Metastasen entgegen gewirkt haben.

Umstritten ist nach wie vor die klinische Relevanz der immunstimulierenden Wirkung der Ascorbinsäure. Nach Verabreichung von Ascorbinsäure konnte ein Anstieg in den Serumkonzentrationen von IgA, IgM, IgG sowie einiger Komplementfaktoren verzeichnet werden (227). Diese Beobachtungen lassen eine Schlüsselrolle des Vitamin C in der Immunglobulinsynthese vermuten. Desweiteren postulierten Cameron et al., daß ein hoher Ascorbinanteil in Lymphozyten mit einer gesteigerten Immunkompetenz korreliert (40). Bekanntlich agiert ein gestärktes Immunsystem gegen das Überleben sowie das Wachstum von neoplastischen Zellen und könnte auch in diesem Versuch in einer eingeschränkten Lebermetastasierung resultieren.

Die dargestellten Einflüsse des Vitamin C auf diverse zelluläre Ebenen könnten vermutlich auch in unserer Studie für die Erniedrigung der Metastasierungsinzidenz

verantwortlich sein.

Im Vergleich zu Vitamin A und E zeigte Vitamin C jedoch die geringste Wirkpotenz auf die Lebermetastasierung eines Pankreaskarzinoms. Die Beeinflussung der hepatischen Metastasenmanifestation unter Vitamin C-Therapie konnte nur tendenziell demonstriert werden, die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Denkbar wäre der Aufbau einer neuen Studie über den möglichen Einfluß verschiedener Vitamin C-Dosierungen auf den Metastasierungsprozeß des Pankreaskarzinoms.

4.4.3 Einfluß von Vitamin E auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation

Die Bedeutung von Vitamin E in der Karzinogenese sowie in der Prävention und bei der Therapie von Tumorerkrankungen ist in vielerlei Hinsicht noch unklar. Aufgrund der zentralen Rolle von Sauerstoffradikalen in der Karzinogenese gibt es auch für Vitamin E Hinweise auf eine protektive Wirkung (280). Als lipophiles Agens ist Vitamin E in der Lage, besonders die Membransysteme der Zelle mit ihrem hohen Gehalt an leicht oxidierbaren mehrfach ungesättigten Fettsäuren vor der Entstehung von Lipidperoxiden zu schützen.

In verschiedenen Studien wurde über einen möglichen Zusammenhang zwischen niedriger Vitamin E-Aufnahme und erhöhtem Pankreaskarzinomrisiko berichtet (130). Auch in tierexperimentellen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte die Pankreaskarzinominzidenz durch Supplementierung von Vitamin E erniedrigt werden (272). Inwiefern nun auch Vitamin E einen antiproliferativen Einfluß auf die Lebermetastasierung eines Pankreaskarzinoms hat, sollte in diesem Versuch geklärt werden.

Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Erniedrigung der Inzidenz von Lebermetastasen eines Pankreaskarzinoms nach Supplementierung von Vitamin E. In Bezug auf die Anzahl und Größe der Lebermetastasen konnte hingegen nur ein geringer Einfluß von Vitamin E festgestellt werden.

Unter Vitamin E-Therapie konnte das Ausmaß der Lipidperoxidation im Lebergewebe reduziert werden. Bereits nach Supplementierung von Vitamin E der nicht induzierten Gruppe konnte, im Gegensatz zur GSHPX-Aktivität, ein signifikanter Anstieg der SOD-Aktivität verzeichnet werden. Auffällig ist, daß die SOD-Aktivität dieser Gruppe auch

gegenüber der BOP-Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. Die TBARS-Konzentration blieb nach Vitamingabe in der nicht induzierten Gruppe dagegen unverändert.

Die Vitamin E-Therapie der BOP-induzierten Gruppe ließ die SOD-Aktivität im tumorfreien Lebergewebe weitestgehend unbeeinflusst, die GSHPX-Aktivität wurde jedoch gesteigert. In den Lebermetastasen konnte im Vergleich dazu unter Vitamin E-Therapie ein signifikanter Aktivitätsanstieg der SOD sowie der GSHPX festgestellt werden. Vergleicht man die Enzymkonzentrationen sowie die TBARS-Konzentration zwischen den tumorfreien und metastastischen Lebergewebe der Vitamin E-therapierten, induzierten Gruppe kann man keinen signifikanten Unterschied feststellen.

Sowohl intra- als auch extrametastatisch konnte die TBARS-Konzentration durch Vitamin E signifikant gesenkt werden.

Das Ausmaß der Lipidperoxidation nach Vitamin E-Supplementierung wurde demnach sowohl im metastasenfremem Gewebe als auch in den Lebermetastasen reduziert. Es ist ersichtlich, daß Vitamin E keine selektive Wirkungsweise besitzt. Die Einflußnahme von Vitamin E auf den Metastasierungsprozeß könnte entweder auf das extrametastatische Gewebe oder direkt auf die Lebermetastasen abzielen.

Vorstellbar wäre, daß Vitamin E besonders die Membransysteme der Hepatozyten vor Lipidperoxidation schützt, sowie die Aktivität der antioxidativ wirkenden Schutzenzyme anregt. Untersuchungen haben gezeigt, daß 1mol α -Tocopherol 220mol PUFA der Mikrosomenmembran vor der Lipidperoxidation schützt (47). Weiterhin werden direkt stabilisierende Einflüsse auf Membranen angenommen. Laut Isliker et al. konnten durch α -Tocopherol die Mitochondrienmembranen von Ratten stabilisiert und vor dem oxidativen Angriff polymorphkerniger Leukozyten geschützt werden (104). In einer Studie von Yano et al. hemmte Vitamin E zusätzlich die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aus aktivierten Makrophagen und reduzierte somit direkt den oxidativen Angriff auf Zellen (281). Folglich wäre auch eine inhibierende Wirkung auf die Radikalformation von Kupfferschen Zellen durch Vitamin E denkbar. Die hierdurch resultierende Verringerung des oxidativen Stresses für das umgebene Gewebe könnte ferner die signifikant erniedrigte TBARS-Konzentration im Lebergewebe der Vitamin E-therapierten, induzierten Gruppe erklären.

Überdies konnte auch für Vitamin E eine protektive Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation von Hepatozyten nachgewiesen werden (218). Die sog. gap-junctions

ermöglichen den interzellulären Stoffaustausch und spielen eine bedeutende Rolle bei der Homöostase sowie Wachstumskontrolle der Zelle. Als Antioxidanz schützt Vitamin E vor dem oxidativen Angriff reaktiver Sauerstoffradikale an gap-junction-Proteinen. Intakte hepatozelluläre Zell-Zell-Verbindungen verhindern wiederum das autonome Wachstum von Tumorzellen im Lebergewebe.

Weiterhin könnte die erhöhte extrametastatische Aktivität der GSHPX der Vitamintherapierten, induzierten Gruppe einen weiteren Schutzmechanismus der Hepatozyten darstellen. Manche Autoren vermuten eine regulierende Wirkung der GSHPX auf die Aktivierung des Nuclear Factor κ B (NF- κ B), sowie der Aktivität der COX und LOX, der Schlüsselenzyme der Eikosanoidsynthese (33). Hierdurch könnten weitere wachstumsfördernde Signale für die normale Zelle herunter geregelt werden.

Darüberhinaus wäre die Beeinflussung der Lebermetastasierung über die direkte Wirkung des Vitamin E auf die Tumorzellen denkbar.

Anhand des Aktivitätsanstiegs der antioxidativen Enzyme SOD bzw. GSHPX und der gesunkenen TBARS-Konzentration nach Vitamin E-Supplementierung ist zu vermuten, daß der oxidative Streß in den Lebermetastasen herabgesetzt wurde. Aufgrund der reduzierten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies könnten hierbei die durch Shaughnessy et al. beschriebenen Folgereaktionen verhindert werden und den inhibierenden Einfluß von Vitamin E auf die hepatische Manifestation von Metastasen erklären (229).

Manche Autoren vermuten über die antioxidative Wirkung hinaus weitere direkte antiproliferatorische Effekte des Vitamin E auf nukleärer sowie extranukleärer Ebene. Diese alternativen Wirkungsweisen können weitere protektive Effekte von Vitamin E in Bezug auf die Lebermetastasierung erklären.

So ist Vitamin E an der Regulierung bestimmter Enzyme bei Signaltransduktionsvorgängen über biologische Membranen beteiligt (157). Beispielweise soll es posttranskriptionale stabilisierende Effekte auf die mRNA des antioxidativen Enzyms GSHPX besitzen (211).

Die Reduzierung der Inzidenz von Lebermetastasen könnte ebenso in der direkten Hemmung der Proteinkinase C-Aktivität sowie der Expression von c-myc und dem H-ras-Onkogen durch Vitamin E begründet sein (188). Diese intrazellulären Signale spielen eine wichtige Rolle in der Wachstumskontrolle von Zellen. Sigounas et al.

konnten in Untersuchungen an Zelllinien durch Vitamin E Apoptose von Karzinomzellen induzieren und somit die Zellproliferation hemmen (231). Auch hierbei wird ein Zusammenhang zwischen der Hemmung der Proteinkinase C-Aktivität und der Apoptoseinduktion angenommen.

Ferner wird von Simmions-Menchaca et al. postuliert, daß Vitamin E Tumorzellen zur Sekretion von Transforming Growth Factor- β (TGF- β) stimuliert. TGF- β fungiert als wachstumshemmendes Signal in Zellen. Außerdem inhibiert es die Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors E₂F, der wiederum eine wichtige Komponente in der Regulation der Zellproliferation darstellt (232).

Neben seiner antioxidativen Eigenschaft verringerte Vitamin E auch die Bildung von Thromboxan, 5-Lipooxygenase-Produkten und Prostaglandin E₂ jeweils in stimulierten Thrombozyten, Neutrophilen sowie Makrophagen (43). Somit zeigte es auch inhibierende Einflüsse auf die Eikosanoidsynthese, welche weiterhin die Proliferation und das Wachstum von Tumorzellen modifizieren könnten.

Desweiteren diskutieren manche Autoren eine stimulierende Wirkung von Vitamin E auf das Immunsystem und somit möglicherweise inhibierende Effekte auf den Metastasierungsprozeß von Tumorzellen (172).

In vivo gibt es keine Hinweise auf wachstumshemmende Einflüsse von Vitamin E auf normale Zellen. Wahrscheinlich liegt dies am homöostatischen Gleichgewicht der Zelle, welches die Akkumulierung von antiproliferatorisch wirkenden Konzentrationen des Vitamin E im Gegensatz zur Tumorzelle verhindern kann (199).

Die dargelegten komplexen Einflüsse des Vitamin E auf die Karzinogenese werden in der Literatur unterschiedlich diskutiert und scheinen noch wenig überschaubar, um klare Aussagen über dessen klinische Bedeutung machen zu können. Jedoch demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Studie, daß Vitamin E durch seine diversen Wirkungsmechanismen auf nukleärer sowie extranukleärer Ebene protektiv auf die hepatische Manifestation von Metastasen eines duktales Pankreaskarzinoms wirken kann.

4.5 Einfluß von Celebrex (COX-2-Inhibitor) und Zylflo (5-LOX-Inhibitor) auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

Unter einer Hochfettdiät beobachteten wir eine erhöhte Lebermetastasierung beim Pankreaskarzinom, die durch Veränderungen des Radikalenstoffwechsels bedingt zu sein scheint (267,269). Da möglicherweise Co-Mechanismen zwischen dem Radikalenstoffwechsel und der Eicosanoidsynthese bestehen (50,51,204), wird Eicosanoiden eine wichtige Funktion in der Karzinogenese und der Metastasierung zugesprochen. Darüberhinaus sollen Lipoxygenase-Produkte an der Metastasierung beteiligt sein (50,196). Dementsprechend wurden tumorinhibierende Effekte bei der Karzinogenese durch Hemmung des Eicosanoid-Stoffwechsels in verschiedenen in-vivo und in-vitro-Untersuchungen beobachtet (153,244). Allerdings liegen bislang diesbezüglich keine publizierten Daten hinsichtlich des Pankreaskarzinoms vor.

Im tumorfreien Lebergewebe beobachteten wir keine Veränderungen hinsichtlich der GSHPX- beziehungsweise SOD-Aktivität unter der Behandlung mit Celebrex oder Zylflo. Sogar die TBARS-Konzentration, ein Parameter für den Grad der Lipidperoxidation, blieb unter dieser Therapie unbeeinflusst. Die Ergebnisse der genannten Parameter auch nach einer Tumorinduktion ohne weitere Therapie bestätigen die bereits publizierten Beobachtungen unter einer Hochfettdiät (261).

Die Einzeltherapie mit Celebrex oder Zylflo hatte keinen Einfluß auf die Inzidenz, Anzahl oder Größe von Lebermetastasen. Allerdings wurde eine Reduktion aller 3 Parameter durch die Kombinationstherapie mit Celebrex und Zylflo erzielt. Darüberhinaus war die Aktivität der GSHPX und der SOD in nicht-metastatischem Lebergewebe unter dieser Behandlung zweifach gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erhöht. Die Konzentration der TBARS im nicht-metastatischen Lebergewebe war in dieser Gruppe vergleichbar zu den Werten von „gesunden“ Tieren. Jedoch war die TBARS-Konzentration in den Tumorgruppen ohne Therapie beziehungsweise unter der Einzeltherapie mit Celebrex erhöht.

Möglicherweise stärkte die Kombinationstherapie aus Celebrex und Zylflo die antioxidative Abwehr in nicht-metastatischem Lebergewebe. Dieser Mechanismus könnte das Lebergewebe gegenüber freien Radikalen geschützt haben, die infolge der Applikation einer Hochfettdiät und des Nitrosamins BOP im Rahmen der Lipidperoxidation entstanden sind. Daher erscheint es möglich, daß im nicht-

metastasierten Lebergewebe die Metastasierung und das Tumorwachstum teilweise durch die Inhibition der Eicosanoid-Synthese verhindert wurde.

Darüberhinaus waren die Aktivitäten der Lipidperoxidations-Schutzenzyme intrametastatisch nach der Kombinationstherapie nicht erhöht. Dies führte zu einer Steigerung der intrametastatischen Lipidperoxidation (TBARS-Konzentration), die wahrscheinlich für Membranschäden von Metastasenzellen mitverantwortlich ist, und über einen Verlust von Zellintegrität zum Zelltod führt (1,58,204).

Bei durch COX- und LOX-vermittelten Stoffwechselwegen sind zahlreiche Reaktionen mit freien Radikalen involviert (53,204). Diesbezüglich wurde in mehreren Studien eine Verminderung der Prostaglandine und Leukotriene nach Applikation antioxidativer Vitamine beobachtet (221). Darüberhinaus wiesen Ding et al eine Induktion der Apoptose nach einer Inhibition der Lipoxygenase beim Pankreaskarzinom nach (58). Ferner berichtete Anderson (1) über eine Reduktion von PANC-1-Karzinomzellen nach Behandlung mit 5-LOX-Inhibitoren. Allerdings konnten wir in der eigenen Studie an Lebermetastasen diese Effekte unter der Behandlung mit 5-LOX-Inhibitoren nicht beobachten. Anhand der eigenen Daten lässt sich jedoch feststellen, daß an einem soliden Tumormodell eines Pankreaskarzinoms die Kombinationstherapie (COX-2/5-LOX-Inhibitor) zu einer Verminderung des Tumorwachstums führte. Da die Inhibition eines Stoffwechselweges der Eicosanoid-Synthese zu einer Verstärkung alternativer Metabolisierungswege führt (51,153), erscheint es schlüssig, daß die selektive Inhibition eines Eicosanoid-Stoffwechselweges bei in-vitro-Versuchen nicht vergleichbar mit der Stoffwechsel-Situation in einem in-vivo-Modell ist. Daher wird vermutet, daß die selektive Hemmung der Prostaglandinsynthese zu einer vermehrten Bildung von Leukotrienen führt, die für eine Förderung der Metastasierung verantwortlich sein sollen (50). Demgegenüber soll die selektive Inhibition der Leukotrien-Synthese zu einer verstärkten Prostaglandin-Synthese führen, die eine Steigerung der Karzinogenese und des Tumorwachstums bewirken soll (153). Daher erscheint lediglich die kombinierte Inhibition beider Stoffwechselwege eine sinnvolle Strategie zur Hemmung des Tumorwachstums und der Lebermetastasierung darzustellen. In weiteren Studien werden wir daher evaluieren, ob eine Korrelation zwischen den beobachteten Veränderungen des Lipidperoxidationsstoffwechsels und den Konzentrationen der Eicosanoid-Synthese-Produkte besteht. Möglicherweise stellt die kombinierte hochselektive Hemmung der Eicosanoidsynthese einen neuen Therapieansatz zur Verminderung der Lebermetastasierung beim Pankreaskarzinom dar.

5 **Schlußfolgerungen**

Als Grundlage der beschriebenen Studien gelang uns zunächst die Reproduktion des von Pour et al. (187) beschriebenen Tumormodells eines chemisch induzierten duktales Adenokarzinoms des Pankreas des Syrischen Goldhamsters.

Durch eine Modifikation der Ernährung erzielten wir eine Steigerung der Inzidenz, Größe und Anzahl von Lebermetastasen in diesem Tiermodell.

Da die gesteigerte Lebermetastasierung unter einer Hochfettdiät mit einer erhöhten Lipidperoxidation vergesellschaftet ist und für viele andere Tumorentitäten ebenfalls wachstums-, invasions- und metastasierungsfördernde Effekte einer Ernährung mit einer Hochfettdiät bekannt sind (11,18,31,45,106,113,114,205,208,209), erscheint die Überprüfung des Einflusses der Lipidperoxidation auch bei diesen Tumorarten sinnvoll.

Unter der medikamentösen Behandlung mit Octreotid und Tamoxifen beobachteten wir, daß Octreotid sowohl die Anzahl makroskopischer Pankreaskarzinome als auch die Anzahl und Größe von Lebermetastasen pro Tier vermindert. Die Einzeltherapie mit Tamoxifen beeinflusste weder das Tumorwachstum des Primärtumors noch dasjenige der Lebermetastasen, das Ergebnis der Kombinationstherapie mit Octreotid und Tamoxifen unterschied sich nicht von demjenigen der Einzeltherapie. Allerdings ist bislang ungeklärt, ob die Inhibition des Tumorwachstums rezeptorvermittelt oder indirekt verursacht wird.

Unter der Therapie mit Vitamin A und Vitamin E beobachteten wir ebenfalls eine erniedrigte Lebermetastasierung. Eine Behandlung mit Vitamin C hatte hingegen keinen Einfluß auf die Lebermetastasierung. Die biochemischen Ergebnisse zeigen, daß unter Vitamin A und E die Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme erhöht sowie die Lipidperoxidation (TBARS) sowohl intra- als auch extrametastatisch gesenkt wurde. Möglicherweise führte dieses Phänomen zu einer verminderten Lebermetastasierung. Die Wirkungen der verschiedenen Vitamine werden in der Literatur jedoch unterschiedlich diskutiert und scheinen noch wenig überschaubar, um klare Aussagen über deren klinische Bedeutung zu treffen.

Entsprechend der eigenen experimentellen Ergebnisse erscheint jedoch insbesondere bei Patienten nach erfolgreicher Resektion eines Pankreaskarzinoms die Supplementierung von Vitamin A und E zur Prävention von Lebermetastasen sinnvoll.

Unter der Kombinationstherapie aus Celebrex und Zylflo beobachteten wir ebenfalls eine Erniedrigung der Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen. Die Einzeltherapie mit Celebrex oder Zylflo hatte keinen Einfluß auf die Lebermetastasierung. Die biochemischen Ergebnisse zeigen, daß die Kombinationstherapie im extrametastatischen Lebergewebe zu einer Erhöhung der Lipidperoxidationsschutzenzyme GSHPX und SOD führte, während diese intrametastatisch gegenüber den Kontrollgruppen erhöht waren. Darüberhinaus war die Lipidperoxidation intrametastatisch erhöht. Der genaue Wirkungsmechanismus ist ungeklärt, allerdings erscheint die kombinierte selektive Inhibition der Leukotrien- und der Prostaglandinsynthese zur Hemmung der Lebermetastasierung geeignet. Zur Klärung des Wirkungsmechanismus erachten wir in weiteren Studien die biochemische quantitative Untersuchung der Synthesehemmung der Prostaglandine und Leukotriene für sinnvoll.

Zur Klärung der klinischen Relevanz der eigenen experimentellen Ergebnisse erscheinen klinische Studien, vor allem mit höheren als den bisher verwendeten Dosen sinnvoll. Hierbei sollte im Gegensatz zu den bisherigen Studien auch die Inzidenz und der Entstehungszeitpunkt von Lebermetastasen als Zielkriterium gewählt werden. Aus den von uns tierexperimentell beschriebenen Auswirkungen auf die Lipidperoxidation sollten drei Schlußfolgerungen gezogen werden:

Es sollte tierexperimentell evaluiert werden, ob klinisch eingesetzte Kompositionen der parenteralen Ernährung (z.B. Eicosapentaensäure, Fischöl) ebenfalls wie die von uns modifizierte Hochfettdiät die Lebermetastasierung beim duktalem Pankreaskarzinom stimulieren

Es ist zu prüfen, inwieweit oxidativer Stress und eine erhöhte Lipidperoxidation bereits bei der Entstehung der Lebermetastasen oder auch des Primärtumors von Bedeutung sind und daher eine Therapie mit Radikalfängern oder antioxidativen Vitaminen sinnvoll sein könnte.

Es sollte untersucht werden, ob Octreotid in den Zellen der Lebermetastasen selbst enzymatische Wirkungen im Sinne von Desaturasen/Elongasen entfaltet oder ob es sich um einen rezeptorgekoppelten Nebeneffekt durch Beeinflussung anderer Metabolismen handelt. Es ist zu prüfen, ob Octreotid in den metastasenfremden Leberanteilen selbst eine antioxidative Potenz entfaltet oder ob es die antioxidativen

Schutzmechanismen der Leberzellen aktiviert.

Es ist zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen den beobachteten Veränderungen des Lipidperoxidationsstoffwechsels und den Konzentrationen der Eicosanoid-Synthese-Produkte besteht.

6 Zusammenfassung

Hintergrund

Infolge des Fehlens geeigneter Screeningverfahren und klinischer Frühsymptome für das Pankreaskarzinom liegt bei Diagnosestellung häufig ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor. Da die Chemo- und die Strahlentherapie nur geringe Ansprechraten bei gleichzeitig starken Nebenwirkungen zeigen, beträgt die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung eines Pankreaskarzinoms nur 3-5 Monate. Daher ist die Entwicklung neuer Therapiekonzepte, die zu einer Verminderung des Tumorwachstums beziehungsweise der Lebermetastasierung bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen führen, dringend erforderlich.

Zur Evaluierung medikamentöser Behandlungskonzepte ist ein standardisiertes Tiermodell erforderlich. Diesbezüglich kommt dem N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP)-induzierten Pankreaskarzinom des Syrischen Hamsters aus zwei Gründen eine herausragende Bedeutung zu. Einerseits entstehen in verhältnismäßig kurzer Zeit (ca. 7 Monate) bei nahezu 100% der Versuchstiere Pankreaskarzinome, desweiteren handelt es sich bei den entstehenden Tumoren fast ausschließlich um duktale Adenokarzinome, welche beim Menschen in etwa 80% der Fälle auftreten. Daher sind die induzierten Karzinome mit dem humanen Pankreaskarzinom gut vergleichbar. Um in erster Linie fortgeschrittene Tumorstadien zu simulieren, war es notwendig, die in diesem Tiermodell auftretende Lebermetastasierungsrate von 30-35% anzuheben. Dies gelang durch eine diätetische Modifikation, indem der Rohfettanteil von 3,5% in Hamsterstandardfutter auf 21,4% angehoben wurde. Die führenden Komponenten waren dabei Linolsäure und Linolensäure. Durch diese Modifikation wird eine Lebermetastasierungsrate von bis zu 90% erreicht.

Da die gesteigerte Lebermetastasierung durch eine Anhebung des Rohfettanteils bedingt war und an den teilweise bekannten tumorwachstumsfördernden Effekten bestimmter Fettsäuren auch die radikal-induzierte Lipidperoxidation beteiligt zu sein scheint und weiterhin eine Steigerung des oxidativen Stresses durch Nitrosamine wie BOP bekannt ist, wurde in den hier vorgelegten Studien neben dem Einfluß der Hochfettdiät und der medikamentösen Therapiekonzepte auf die Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen auch der Einfluß auf die Lipidperoxidation in den Lebermetastasen und in metastasenfremen Leberanteilen untersucht.

Folgende medikamentöse Behandlungskonzepte wurden von uns experimentell evaluiert:

I. Octreotid und Tamoxifen

In verschiedenen Studien wurde unter der Therapie mit dem Somatostatinanalogon Octreotid und dem Östrogenantagonisten Tamoxifen sowohl eine Verbesserung der Lebensqualität als auch eine Verlängerung der Überlebenszeit beim fortgeschrittenen oder rezidierten Pankreaskarzinom beobachtet. Hingegen wurden in anderen Studien keine Auswirkungen einer Octreotidtherapie auf die Prognose oder die Lebensqualität beim Pankreaskarzinom nachgewiesen. Als mögliche Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse wird in erster Linie die jeweils verwendete Dosis diskutiert. Weiterhin ist der genaue Mechanismus der Octreotidwirkung beim Pankreaskarzinom bislang ungeklärt, da vor allem die Frage der Rezeptorexpression umstritten ist. Weiterführende klinische Studien mit Octreotid erscheinen daher ebenso notwendig wie eine Intensivierung der Grundlagenforschung zur Octreotidwirkung beim Pankreaskarzinom.

II. Vitamine A, C und E

Aufgrund der zentralen Rolle von Sauerstoffradikalen in der Karzinogenese gibt es auch für die antioxidativen Vitamine Hinweise auf eine protektive Wirkung. Insbesondere Vitamin A, C und E zählen zu den bedeutendsten nichtenzymatischen Abwehrmechanismen, die gegen radikalinduzierte Schädigung schützen. In zahlreichen Studien wurde bisher der Einfluß von antioxidativ wirkenden Vitaminen auf den oxidativen Status sowie die proliferative Kapazität von Zellen diskutiert. Allerdings ist ungeklärt, inwiefern das Wachstum von Lebermetastasen über eine Reduktion der Lipidperoxidation reduziert werden kann. Daher haben wir am Tiermodell eines soliden duktales Adenokarzinoms des Pankreas den Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C sowie E auf die Lipidperoxidation und die Lebermetastasierung untersucht.

III. Celebrex und Zyflo

Für das induzierte Pankreaskarzinom am Tiermodell konnten im Primärtumor höhere Konzentrationen der Prostaglandine 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} sowie des Thromboxans TXB₂ im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe des Hamsters nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde unter der Therapie mit den nicht-selektiven Prostaglandinsynthesehemmern Phenylbutazon und Indometacin eine signifikant geringere Inzidenz von Primärtumoren im Tiermodell des Syrischen Goldhamster

beschrieben. Der Wirkungsmechanismus der Prostaglandine auf die Karzinogenese beim Pankreaskarzinom ist allerdings bislang ungeklärt. Die Cyclooxygenase ist das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese und kommt in 2 Isoformen vor. Den durch die Cyclooxygenase II synthetisierten Prostaglandinen $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGE_2 soll eine bedeutende Rolle im Tumorstoffwechsel zukommen. Darüberhinaus werden auch karzinogene Effekte der Leukotriene diskutiert. Daher erschien es sinnvoll, im Tiermodell den Einfluß einer selektiven Hemmung der Cyclooxygenase-2 und des 5-Lipoxygenase sowohl auf die Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen und die hepatische Lipidperoxidation zu untersuchen.

Material und Methoden:

I. Das Hamstermodell des duktales Pankreaskarzinoms

12 acht Wochen alte männliche Syrische Goldhamster wurden mit einer Standarddiät mit einem Rohfettanteil von 3%(Soja-Öl) ernährt. Bei allen Tieren erfolgten über 16 Wochen wöchentliche subkutane interskapuläre Injektionen von 10mg/kg Körpergewicht N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP).

In der 16. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere unter einer Narkose mit Ursotamin getötet. Das Körpergewicht und die Gewichte von Pankreas und Leber wurden erhoben. Die Organe wurden histologisch untersucht.

II. Einfluß von α -Linolensäure in Kombination mit Linolsäure auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktales Pankreaskarzinom

60 acht Wochen alte männliche Syrische Goldhamster wurden in 4 Gruppen á 15 Hamster randomisiert. Bei Gr. 1 und 3 handelte es sich um Kontrollgruppen ohne Tumorinduktion, bei Gr. 2 und 4 wurden über 13 Wochen wöchentliche subkutane Injektionen von 10mg/kg Körpergewicht BOP durchgeführt.

Die Tiere der Gr. 1 und 2 erhielten eine Standarddiät (SD), die 1,8% LA und 0,3% ALA (ssniff Soest, Deutschland) enthielt. Die Tiere der Gr. 3 und 4 wurden mit einer Hochfettdiät (HF) bestehend aus 11% LA und 2% ALA ernährt.

In der 25. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere unter einer Narkose mit Ursotamin getötet. Das Körpergewicht und die Gewichte von Pankreas und Leber wurden erhoben, Pankreas und Leber wurden histologisch auf die Inzidenz von

Pankreas- und Lebermetastasen beziehungsweise die Anzahl und Größe von Lebermetastasen untersucht. Darüberhinaus wurde der Einfluß der Hochfettdiät auf den Lipidperoxidationsstoffwechsel untersucht.

III. Einfluß von Octreotid und Tamoxifen auf das Tumorwachstum und die Lebermetastasierung beim duktalem Pankreaskarzinom

60 männliche 8 Wochen alte Syrische Goldhamster wurden in 4 Gruppen (n=15) randomisiert: Gr.1: Kontrollgruppe; Gr.2: Therapie mit Octreotid; Gr.3: Therapie mit Tamoxifen; Gr.4: Therapie mit Octreotid und Tamoxifen.

Bei allen Gruppen erfolgte eine Tumorinduktion durch eine wöchentliche über 12 Wochen andauernde subkutane interskapuläre Injektion von BOP. An die Tumorinduktion schloß sich eine 12-wöchige Therapiephase an, alle Tiere wurden durch eine Hochfettdiät ernährt. In diesem Zeitraum erhielten die Tiere der Gr. 1 0,5 ml 0,9% NaCl subkutan pro Woche, während den Tieren der Gr. 2 0,4 ml Octreotid 4-wöchentlich injiziert wurden (LAR 20mg-Octreotid-retard, Novartis, Switzerland). Darüberhinaus erhielten die Tiere der Gr. 3 10 mg Tamoxifen 3mal pro Woche oral. Die Tiere der Gr. 4 wurden mit der Kombinationstherapie aus Octreotid und Tamoxifen in o.g. Dosierung behandelt.

IV. Einfluß von Octreotid auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

90 männliche 8 Wochen alte Syrische Goldhamster wurden in 6 Gruppen (Gr.) randomisiert (n=15): Gr. 1: Standardfutter (SF), Ø BOP, Ø Octreotid; Gr. 2: SF, BOP, Ø Octreotid; Gr. 3: SF, BOP, Octreotid; Gr. 4: Hochfetter Ernährung (HF), Ø BOP, Ø Octreotid; Gr. 5: HF, BOP, Ø Octreotid; Gr. 6: HF, BOP, Octreotid. Über den gesamten Versuchszeitraum erhielten die Gr. 1-3 Hamsterstandardfutter (Rohfettanteil 3,5%), während die Gr. 4-6 mit einer Hochfettdiät ernährt wurden (Rohfettanteil 21,4%). Im Induktionszeitraum erhielten die Gr. 2, 3, 5 und 6 10mg/kg Körpergewicht/Woche BOP über 12 Wochen injiziert, während den Gr. 1 und 4 0,9%ige NaCl-Lösung injiziert wurde. In der sich anschließenden 12wöchigen Therapiephase erhielten die Gr. 3 und 6 20mg LAR/4wöchentlich (Octreotid-Monatsdepot) injiziert, während den Gr. 1, 2, 4 und 5 0,9%ige NaCl-Lösung injiziert wurde. In der 25. Woche wurde der Versuch beendet. Die Lebermetastasierungsrate und die Anzahl pro Tier sowie die Größe der Lebermetastasen wurden festgestellt. In metastasenfremden Leberanteilen und in

Lebermetastasen wurden die Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten (TBARS, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen) und die Aktivitäten der Glutathionperoxidase (GSHPX) und der Superoxiddismutase (SOD) gemessen.

V. Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C und E auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation in Lebermetastasen und metastasenfreien Leberanteilen beim duktalem Pankreaskarzinom

Bei 60 männlichen Syrischen Goldhamstern erfolgte die Induktion eines duktalem Adenokarzinoms des Pankreas mittels wöchentlicher Injektion von 10mg BOP / kg Körpergewicht (KG) über einen Zeitraum von 12 Wochen. Danach wurden die Tiere in 4 Gruppen (n=15) randomisiert. Schließlich erfolgte die orale Supplementierung von Vitamin A (0,25 mg/kg KG/die, Gr.6, n=15), Vitamin C (9 mg/kg KG/die, Gr.7, n=15), Vitamin E (4 mg/kg KG/die, Gr.8, n=15), die tumorinduzierte Kontrollgruppe wurde nicht therapiert. Weiterhin wurden 12 Wochen nach Versuchsbeginn 60 gesunde, nicht BOP-induzierte Syrische Hamster in weitere 4 Gruppen randomisiert. Davon wurden 3 Gruppen (jeweils n=15) über 12 Wochen in oben genannten Dosierungen mit den Vitaminen A, C oder E therapiert. Die 4. Gruppe (Kontrollgruppe) blieb unbehandelt. In der 25. Versuchswoche wurden die Tiere getötet. Pankreas und Leber wurden histologisch beziehungsweise biochemisch wie unter IV. beschrieben untersucht.

VI. Einfluß von Celebrex und Zyflo auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

120 männliche Syrische Goldhamster wurden in 4 Kontrollgruppen (Gr.1-4) und 4 Tumorgruppen (Gr. 5-8) von jeweils 15 Hamstern randomisiert: Gr.1: keine Therapie; Gr.2: Celebrex; Gr.3: Zyflo; Gr.4: Celebrex +Zyflo; Gr.5: keine Therapie; Gr.6: Celebrex; Gr.7: Zyflo; Gr.8: Celebrex + Zyflo. Bei Gr. 5-8 erfolgte eine wöchentliche subkutane Injektion von 10mg/kg/Körpergewicht BOP über 16 Wochen zur Tumorinduktion. Ab der 17. Woche erfolgte eine 16-wöchige medikamentöse Therapie. Hierbei erhielten die o.g. Gruppen 7mg Celebrex (Pfizer, Zürich, Schweiz) und/oder 28mg Zyflo (Abbott, Chicago, USA) oral. In der 33. Woche nach Versuchsbeginn wurden die Tiere getötet. Es erfolgten histologische und biochemische Untersuchungen wie unter IV.

Ergebnisse

I. Das Hamstermodell des duktales Pankreaskarzinoms

Bei 91% der Tiere wurden gut-differenzierte Primärtumoren eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas nachgewiesen. Bei keinem Tier wurden Lebermetastasen oder cholangiozelluläre Karzinome beobachtet. Die Letalität während des Versuches lag bei n=1.

II. Einfluß von α -Linolensäure in Kombination mit Linolsäure auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktales Pankreaskarzinom

Während in Gr. 1 und 3 erwartungsgemäß keine Pankreaskarzinome vorlagen betrug die Inzidenz in Gr. 2 und 4 93,3% bzw. 100% ($p < 0,05$). Es handelte es sich ausschließlich um duktales Adenokarzinome.

Die Inzidenz von Lebermetastasen betrug in Gr. 2 35,7% (n=5), während sie in Gr. 4 mit 93,3% (n=14) erhöht war; alle Lebermetastasen waren Metastasen eines duktales Adenokarzinoms. Die durchschnittliche Anzahl und Größe von Lebermetastasen pro Tier war in Gr. 4 gegenüber Gr. 2 erhöht. Bezüglich der GSHPX-Aktivität war kein Unterschied zwischen Gr. 1 und 3 nachweisbar, während die Aktivität der GSHPX in Gr. 2 erniedrigt war. In Gr. 4 zeigte sich die niedrigste GSHPX-Aktivität. Im Vergleich zu den Gr. 1 und 3 war die SOD-Aktivität in Gr. 2 und 4 erhöht. Die Lipidperoxidation (TBARS) der Gr. 2 und 4 war im Vergleich zu Gr. 1 und 3 erhöht, in Gr. 4 war sie höher als in Gr. 2.

III. Einfluß von Octreotid und Tamoxifen auf das Tumorwachstum und die Lebermetastasierung beim duktales Pankreaskarzinom

Die Versuchsgruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Inzidenz histologisch nachgewiesener duktales Adenokarzinome des Pankreas. Makroskopisch sichtbare Pankreastumore wurden in Gr. 1 in 60% und in Gr. 3 in 53,3% der Fälle nachgewiesen. Die Inzidenz makroskopischer Tumore war in Gr. 2 (26,7%) und Gr. 4 (33,3%) erniedrigt. Die durchschnittliche Anzahl von Lebermetastasen pro Tier war in der Octreotid-Gruppe (Gr. 2: $1,91 \pm 0,26$) und in der Gruppe der Kombinationstherapie (Octreotid / Tamoxifen) im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Tamoxifen-Gruppe erniedrigt. Darüberhinaus war die Größe der Lebermetastasen in der Octreotid- und in

der Octreotid-Tamoxifen-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Tamoxifen-Gruppe reduziert.

IV. Einfluß von Octreotid auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

Die Hochfett ernährung führte gegenüber der Standardernährung zu einer signifikanten Steigerung der Lebermetastasierungsrate sowie der Anzahl und Größe der Lebermetastasen. Gleichzeitig war die Lipidperoxidation in metastasenfrem Leberanteilen erhöht. Die Octreotidtherapie führte bei beiden Ernährungsformen zu einer signifikanten Erniedrigung der Anzahl pro Tier und der Größe der Lebermetastasen, verglichen mit nicht therapierten Tieren. Gleichzeitig senkte Octreotid die Lipidperoxidation in metastasenfrem Leberanteilen und führte demgegenüber zu einer signifikanten Steigerung der Lipidperoxidation in den Lebermetastasen.

V. Einfluß der antioxidativen Vitamine A, C und E auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation in Lebermetastasen und metastasenfrem Leberanteilen beim duktalem Pankreaskarzinom

Während die Inzidenz von Lebermetastasen eines Pankreaskarzinoms unter der Therapie mit Vitamin A bzw. E verglichen mit der BOP-Kontrollgruppe signifikant erniedrigt war (jeweils 44,4% vs. 86,7%, $p < 0,05$), zeigte Vitamin C diesbezüglich einen geringeren Einfluß auf die Lebermetastasierung (50% vs. 86,7%). Die Größe und Anzahl der Lebermetastasen war unter der Therapie mit Vitamin A signifikant erniedrigt. Unter den diversen Vitamintherapien kam es sowohl in metastasenfrem Leberanteilen als auch in den Lebermetastasen zu Aktivitätserhöhungen der SOD und GSHPX. Überdies konnte extra- sowie intrametastatisch im Lebergewebe der induzierten, Vitamin-therapierten Tiere eine signifikante Erniedrigung der TBARS-Konzentrationen verzeichnet werden.

VI. Einfluß von Celebrex und Zyflo auf die Lebermetastasierung und die hepatische Lipidperoxidation beim duktalem Pankreaskarzinom

Während die Letalität in Gr. 1, 4 und 7 bei 0% lag, betrug sie in Gr. 3 6,7% (n=1), in Gr. 2 13,3% (n=2) und war in den Gr. 6 und 8 mit jeweils 26,7% (n=4) sowie in Gr. 5 mit 46,7% (n=7) erhöht. In den Kontrollgruppen 1-4 lagen erwartungsgemäß keine Pankreaskarzinome vor. In den Tumorgruppen 5-8 betrug die Inzidenz eines Pankreaskarzinoms jeweils 100%. In Gr. 5 lagen bei allen Tieren Lebermetastasen vor.

Während sich die Inzidenz von Lebermetastasen zwischen Gr. 6 (90,9%) und Gr. 7 (86,7%) nicht unterschied, war sie unter der Kombinationstherapie in Gr. 8 (54,5%) erniedrigt.

Während sich Gr. 5-7 nicht hinsichtlich der Anzahl und Größe von Lebermetastasen unterschieden, waren beide Parameter unter der Kombinationstherapie (Gr. 8) erniedrigt. Im extrametastatischen Lebergewebe bestand hinsichtlich der Aktivität der GSH-Px zwischen den Gr. 1-4, 6 und 7 kein Unterschied. Die niedrigste GSH-Px-Aktivität wurde in Gr.5 beobachtet, die höchste Aktivität lag unter der Kombinationstherapie (Gr.8) vor. Intrametastatisch unterschied sich die Aktivität der GSH-Px der Gr. 6 und 7 nicht, hingegen war sie in Gr. 6 und 8 erniedrigt. Bei Vergleich der intrametastatischen und der extrametastatischen GSH-Px-Aktivität der Gr. 5-8 zeigte sich kein Unterschied in Gr. 5, während sie in den Gr. 6-8 intrametastatisch erniedrigt war.

Extrametastatisch bestand hinsichtlich der SOD-Aktivität kein Unterschied zwischen den Gr. 1-3, 5-7. Allerdings war sie in Gr. 4 erhöht, während wir die höchste Aktivität in Gr. 8 beobachteten. Intrametastatisch unterschied sich die SOD-Aktivität nicht zwischen Gr. 5 und 7, die höchste Aktivität lag in Gr. 5 vor, während die niedrigste in Gr. 8 gemessen wurde. Bei Vergleich der intra- und extrametastatischen hepatischen SOD-Aktivität bestand kein Unterschied zwischen Gr. 5-7. Allerdings war die Aktivität in Gr. 8 intrametastatisch erniedrigt.

Extrametastatisch unterschied sich die TBARS-Konzentration nicht zwischen Gr. 1-4, 7 und 8, während sie in Gr. 6 erhöht war. Extrametastatisch lag die höchste Konzentration in Gr. 5 vor. Die intrametastatische TBARS-Konzentration war in Gr. 7 am Niedrigsten, in Gr. 5, 6 und 8 war sie erhöht.

Bei Vergleich der intra- und extrametastatischen hepatischen TBARS-Konzentrationen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gr. 6 und 7, jedoch war die intrametastatische Konzentration in Gr. 5 erniedrigt. In Gr. 8 lag die intrametastatische TBARS-Konzentration höher als in nicht-metastatischem Lebergewebe.

Diskussion

Das von Pour et al beschriebene Tiermodell eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas des Syrischen Goldhamsters hat sich als reproduzierbar erwiesen. Es ist weithin als das geeignetste Tiermodell für Studien über die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms angesehen. Durch die von uns eingebrachte Modifikation der Ernährung mittels einer Hochfettdiät wurde eine gesteigerte Lebermetastasierung erzielt. Hierdurch erscheint dieses Tumormodell für Studien zur Untersuchung des Pathomechanismus der Lebermetastasierung geeignet, insbesondere da in der Leber ausschließlich Metastasen eines duktales Adenokarzinoms nachgewiesen wurden, hepatische Primärtumoren wurden nicht beobachtet.

In der experimentellen Studie zur Evaluierung des Einflusses von Octreotid und Tamoxifen auf das Tumorwachstum des Pankreaskarzinoms zeigte sich, daß Tamoxifen keinen Einfluß auf das Wachstum und die Lebermetastasierung hat. Hingegen führte Octreotid in Einzel- und Kombinationstherapie gleichermaßen zu einer Reduktion des Lebermetastasenwachstums.

Die in unseren tierexperimentellen Studien durch eine Hochfetterernährung gesteigerte Lebermetastasierung scheint unter anderem durch eine Steigerung der Lipidperoxidation in der Leber bedingt zu sein. Hierdurch verursachte Membran- und sukzessive Integritätsschäden an den Zellen sowie oxidationsbedingte Schäden an der extrazellulären Matrix könnten Tumorzellen die Invasion und Metastasenbildung erleichtern. Die geringe Ausprägung der Lipidperoxidation in den Lebermetastasen unter diesen Bedingungen kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß Tumorzellen im Gegensatz zu Hepatozyten die Desaturasen und Elongasen fehlen, die für die Verlängerung und weitere Entsättigung der diätetisch angebotenen Linolsäure und Linolensäure notwendig sind. Nur durch die Desaturierung und Elongierung dieser Fettsäuren können jedoch die Metaboliten entstehen, die nach ihrem Einbau in Membranphospholipide das bevorzugte Substrat der Lipidperoxidation darstellen. Aus diesem Grund scheinen die intrahepatischen Tumorzellen einer geringeren Lipidperoxidation zu unterliegen als die normalen Leberzellen.

Die Therapie mit Octreotid führte bei gleichzeitiger Hochfetterernährung zu einer Erniedrigung der Lipidperoxidation in metastasenfreien Leberanteilen. Hierbei scheint es sich nicht um einen rezeptorvermittelten Effekt handeln, da an metastasenfreien

Leberanteilen keine Somatostatinrezeptoren nachweisbar waren. Daher muß von einem indirekten Wirkungsmechanismus ausgegangen werden, der mit dem bisherigen Wissen über Octreotid nicht erklärbar ist und daher genauer untersucht werden sollte. Demgegenüber könnte es sich bei der Octreotid-bedingten Steigerung der Lipidperoxidation in den Lebermetastasen um einen direkten, rezeptorvermittelten Effekt handeln, da an den Lebermetastasen Somatostatinrezeptoren nachgewiesen werden konnten. Allerdings muß auch hier in weiteren Studien geklärt werden, welcher Kopplungsmechanismus dieser Wirkung zugrunde liegt. Möglicherweise liegt eine Induktion der Expression von Elongasen und/oder Desaturasen in den Tumorzellen vor.

Unter der Therapie mit Vitamin A und Vitamin E konnte die Lebermetastasierung beim chemisch induzierten duktalem Adenokarzinom des Pankreas erniedrigt werden. Die biochemischen Untersuchungen demonstrierten, daß unter den Vitamintherapien die Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme erhöht sowie die Lipidperoxidation (TBARS) sowohl intra- als auch extrametastatisch gesenkt wurde. Möglicherweise führte dieses Phänomen zu einer verminderten Lebermetastasierung in unserem Modell. Offensichtlich sind vor allem Vitamin A und E für die regelrechte Funktion und die strukturelle Integrität des Lebergewebes von wesentlicher Bedeutung. Im Hinblick auf den komplexen Metastasierungsprozeß scheinen besonders die zellulären Abwehr- bzw. Regenerationsmechanismen der Hepatozyten bei verstärkter Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen auf eine ausreichende Verfügbarkeit von Vitaminen angewiesen. Über die antioxidativen Fähigkeiten hinaus sind vermutlich weitere Wirkmechanismen der Vitamine auf nukleärer sowie extranukleärer Ebene der Zelle beteiligt.

Während die Einzeltherapie mit Celebrex oder Zylflo keinen Einfluß auf die Inzidenz, Anzahl oder Größe von Lebermetastasen hatte, wurden alle 3 Parameter durch die Kombinationstherapie erniedrigt. Möglicherweise stärkte die Kombinationstherapie die antioxidative Abwehr in nicht-metastatischem Lebergewebe. Dieser Mechanismus könnte das Lebergewebe gegenüber freien Radikalen geschützt haben, die infolge der Applikation einer Hochfettdiät und des Nitrosamins BOP im Rahmen der Lipidperoxidation entstanden sind. Daher erscheint es möglich, daß im nicht-metastasierten Lebergewebe die Metastasierung und das Tumorwachstum teilweise durch die Inhibition der Eicosanoid-Synthese verhindert wurde.

Darüberhinaus waren die Aktivitäten der Lipidperoxidations-Schutzenzyme

intrametastatisch nach der Kombinationstherapie nicht erhöht. Dies führte zu einer Steigerung der intrametastatischen Lipidperoxidation, die wahrscheinlich für Membranschäden von Metastasenzellen mitverantwortlich ist, und über einen Verlust von Zellintegrität zum Zelltod führt.

Da die Inhibition eines Stoffwechselweges der Eicosanoid-Synthese zu einer Verstärkung alternativer Metabolisierungswege führt, scheint es schlüssig, daß die selektive Inhibition eines Eicosanoid-Stoffwechselweges bei in-vitro-Versuchen nicht vergleichbar mit der Stoffwechsel-Situation in einem in-vivo-Modell ist. Daher wird vermutet, daß die selektive Hemmung der Prostaglandinsynthese zu einer vermehrten Bildung von Leukotrienen führt, die für eine Förderung der Metastasierung verantwortlich sein sollen. Demgegenüber soll die selektive Inhibition der Leukotrien-Synthese zu einer verstärkten Prostaglandin-Synthese führen, die eine Steigerung der Karzinogenese und des Tumorwachstums bewirken soll. Daher erscheint lediglich die kombinierte Inhibition beider Stoffwechselwege eine sinnvolle Strategie zur Hemmung des Tumorwachstums und der Lebermetastasierung darzustellen.

Schlußfolgerung:

Für das Somatostatinanalogon Octreotid wurde eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum der Lebermetastasen des BOP-induzierten duktales Adenokarzinoms des Pankreas im Syrischen Hamster beobachtet. Unter einer Hochfetterernährung war die Lebermetastasierung in diesem Tiermodell gesteigert. Dies war mit einer Steigerung der Lipidperoxidation in der Leber verbunden. Octreotid führte zu einer Erniedrigung der Lipidperoxidation in metastasenfremen Leberanteilen und zu einem Anstieg der Lipidperoxidation in den Lebermetastasen. Über diese beiden Mechanismen führt Octreotid möglicherweise zu einer Inhibition des Wachstums der Lebermetastasen.

Vitamin A und E erniedrigten die Inzidenz der Lebermetastasen, Vitamin A reduzierte darüber hinaus die Anzahl und Größe der Metastasen. Daher erscheint eine Vitamin-A-Behandlung insbesondere bei Patienten nach erfolgreicher Resektion eines Pankreaskarzinoms zur Prävention gegenüber Lebermetastasen eines duktales Pankreaskarzinoms sinnvoll.

Unter der Kombinationstherapie aus Celebrex und Zylfo war die Inzidenz, Anzahl und Größe von Lebermetastasen erniedrigt. In weiteren Studien werden wir daher evaluieren, ob eine Korrelation zwischen den beobachteten Veränderungen des

Lipidperoxidationsstoffwechsels und den Konzentrationen der Eicosanoid-Syntheseprodukte besteht. Möglicherweise stellt die kombinierte hochselektive Hemmung der Eicosanoidsynthese einen neuen Therapieansatz zur Verminderung der Lebermetastasierung beim Pankreaskarzinom dar.

Literatur

1. Anderson KM, Seed T, Meng J, Ou D, Alrefai WA, Harris JE: Five-lipoxygenase inhibitors reduce PANC-1 survival: the mode of cell death and synergism of MK886 with gamma linolenic acid. *Anticancer-Res* 1998, *18*: 791-800
2. Anderson WB, Thomas TB, et al.: Retinoic acid modulation of c-AMP-dependent and calcium. *Dermatologica* 1984; *169*: 221
3. Andrén-Sandberg A, Borg S, Dawiskiba I, Ferno M Estrogen receptors and estrogen binding protein in pancreatic cancer. *Digestion* 1982: *25*: 12
4. Appel KE, Gorsdorf S, et al.: Metabolic denitrosation of N-nitrosamines: mechanisms and biological consequences, *IARC-Sci-Publ* 1991: *105*: 351-357
5. Appel MJ, Garderen-Hoetmer A, et al.: Effects of dietary linoleic acid on pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters, *Cancer-Res* 1994: *54*: 2113-2120
6. Appel MJ, Rovers G, et al.: Inhibitory effects of micronutrients on pancreatic carcinogenesis in azaserine treated rats, *Carcinogenesis* 1991: *12*: 2157-2161
7. Appel MJ, Woutersen RA: Effects of linoleic acid and fish oil on pancreatic carcinogenesis in rats, *Proc-Am-Assoc-Cancer-Res* 1994: *35*: 826
8. Appel MJ, Woutersen RA: Effects of linoleic acid and fish oil on pancreatic carcinogenesis, *Carcinogenesis* 1994: *138*: 826
9. Appel MJ, Woutersen RA: Effects of dietary fish oil (MaxEPA) on N-nitrosobis-2-oxopropyl-amin (BOP) induced pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett* 1995; *94(2)*: 179-189
10. Appel MJ, Woutersen RA: Dietary fish oil (MaxEPA) enhances pancreatic carcinogenesis in azaserine treated rats. *Br J Cancer* 1996, *73(1)*: 36-43
11. Appel MJ, Woutersen RA: Effects of dietary beta carotene and selenium on initiation and promotion of pancreatic carcinogenesis in azaserine treated rats, *Carcinogenesis* 1996: *17*: 1411
12. Ara G, Teicher BA: Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors in cancer therapy.

13. Arbuck SG: Overview of chemotherapy for pancreatic cancer . Int J Pancreatol 1990; 7: 209-32.
14. Arias Diaz J, Vara E, et al.: Local production of oxygen free radicals and nitric oxide in rat diaphragm during sepsis: effects of pentoxifylline and somatostatine, Eur-J-Surg 1997; 163: 619-625
15. Arnold R, Frank M, et al.: Management of gastroenteropancreatic endocrine tumors: the place of somatostatin analogues, Digestion 1994: 55(Suppl3): 107-113
16. Arnold R, Lankisch PG: Somatostatin and the gastrointestinal tract, Clin-Gastroenterol 1980; 9: 733-753
17. Asano N, Manabe T, et al.: Effect of synthetic protease inhibitor on the oncogenesis of pancreatic cancer in hamsters: study on pancreatic endocrine cells and free radicals, Nippon-Geka-Hokan 1991: 60: 424-434
18. Bakker WH, Krenning EP, et al.: In vivo application of [111IN-DTPA-D-PHE1]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. Life-Sci 1991: 49: 1593-1601
19. Bakkevold KE, Petterson A, Arnesjo B, Espehaug B Tamoxifen therapy in unresectable adenocarcinoma of the pancreas and the papilla of Vater. Br J Surg 1990: 77: 725-30
20. Bartsch H, Hietanen E, et al.: Carcinogenic nitrosamines: free radical aspects of their action, Free-Radic-Biol-Med 1989: 7: 637-644
21. Bauer W, Briner U, et al.: SMS201-995: A very potent and selective octapeptide analog of somatostatin with prolonged action, Life-Sci 1982: 31: 1133-1140
22. Beauchamp C, Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels, J-Anal-Bi-2ochem 1971: 44: 276-287:
23. Beger HG: Prognosefaktoren beim Pankreaskarzinom, Langenbecks-Arch-Chir 1995: 380: 131-132
24. Beger HG, Büchler MW, Friess H Chirurgische Ergebnisse und Indikation zu adjuvanten Maßnahmen beim Pankreaskarzinom. Chirurg 1994: 65: 246

25. Bell GI, Reisine T: Molecular biology of somatostatin receptors, *Trends-Neurosci* 1993: 16: 34-39
26. Ben-Efraim S, Bonta IL: Modulation of antitumour activity of macrophages by regulation of eicosanoids and cytokine production, *Int-J-Immunopharmacol* 1994: 16: 397-399
27. Benzie IF: Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences, *Int-J-Food-Sci-Nutr* 1996: 47: 233-261
28. Birt DF, Julius AD, et al.: Comparison of the effects of dietary beef tallow and corn oil on pancreatic carcinogenesis in the hamster model, *Carcinogenesis* 1990: 11: 745-748
29. Birt DF, Julius AD, et al.: Enhancement of BOP-induced pancreatic carcinogenesis in selenium-fed Syrian golden hamsters under specific dietary conditions, *Nutr-Cancer* 1988: 11: 21-33
30. Birt DF, Julius AD, et al.: Enhancement of pancreatic carcinogenesis in hamsters fed a high fat diet ad libitum and at a controlled calorie intake, *Cancer* 1989: 49: 5848-5851
31. Bruzeau P, Vale W, et al.: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone, *Science* 1973: 179: 77-79
32. Brigellius-Flohé, R: Tissue-specific functions of individual glutathion peroxidases. *Free-Rad-Biol-Med* 1999; 27: 951-965
33. Büchler MW, Friess H, et al.: Role of octreotide in the prevention of postoperative complications following pancreatic resection, *Am-J-Surg* 1992: 163: 124-131
34. Buscail L, Delesque N, et al.: Stimulation of tyrosin phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogs: mediation by human somatostatin receptor subtypes sstr1 and sstr2, *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* 1994: 91: 2315-2319
35. Buscail L, Esteve JP, et al.: Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analog RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes sstr2 and sstr5 through different mechanisms, *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* 1995: 92: 1580-1584
36. Buyn T, Dudeja P, Harris JE, Ou D, Seed T, Sawlani D, Meng J, Bonomi P, Anderson KM: A 5-Lipoxygenase inhibitor at micromolar concentration raises

- intracellular calcium in U937 cells prior to their physiologic cell death. *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1997; 56: 69-77
37. Cai J, Jiang WG, et al.: Inhibition of vascular endothelial cell motility and angiogenesis by g-linolenic acid, *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1997; 75: 247
 38. Cai RZ, Szoke B, et al.: Synthesis and biological activity of highly potent octapeptide analogs of somatostatin, *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* 1986; 83: 1896-1900
 39. Cameron E, Pauling L, et al.: Ascorbic acid and cancer: a review. *Cancer-Res* 1979; 39: 663-681
 40. Canobbio L, Boccardo F, et al.: Treatment of advanced pancreatic carcinoma with the somatostatin analogue BIM23014, *Gastroenterology* 1992; 69: 648-650
 41. Cascinu S, Del Ferro E, et al.: A randomized trial of octreotide vs best supportive care only in advanced cancer patients refractory to chemotherapy, *Br-J-Cancer* 1986; 46: 2954-2957
 42. Chan AC, Wagner M, et al.: Vitamin E erhöht die Expression von Phospholipase A2, die Freisetzung von Arachidonsäure und die Enzymmassen von Cyklooxygenase in Endothelzellen. *Akt-Ernähr-Med* 1998; 23: 152-159
 43. Cheeseman KH, Emery S, et al.: Studies on lipid peroxidation in normal and tumor tissues. *Biochem-J* 1988; 250: 247-252
 44. Clerk P, Bensaadi N, et al.: Lipid-dependent proliferation of pancreatic cancer cell lines, *Cancer-Res* 1991; 51: 3633-3638
 45. Cogrel P, Morel I, et al.: The relationship between fatty acid peroxidation and a-tocopherol consumption in isolated normal and transformed hepatocytes. *Lipids* 1993; 28: 115-119
 46. Comaru-Schally M, Schally AV (1988) LH-RH antagonists as adjuncts to somatostatin analogs in the treatment of pancreatic cancer. In: Lunefeld B, Vichery B, eds. *International symposium on GN-RH analogues in cancer and human reproduction*. Geneva: MTP Press
 47. Crown J, Casper ES, Botet J, Murray P, Kelsen DP: Lack of efficacy of high-dose leudovorin and fluorouracil in patients with advanced pancreatic

- adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1682-1686.
48. Cullinan S, Moertel CG, Wieand HS, Schutt AJ, Krook JE, Foley JF, Norris BD, Kardinal CG, Tschetter LK, Barlow JF: A phase III trial on the therapy of advanced pancreatic carcinoma Evaluation of the Mallinson regimen and combined 5-fluorouracil, doxorubicin, and cisplatin. *Cancer* 1990; 65: 2207-12
 49. Damtew B, Spagnuolo PJ: Tumor cell-endothelial cell interactions: evidence for roles for lipoxygenase products of arachidonic acid in metastasis. *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1997, 56: 295-300
 50. Davies GR, Rampton DS: Eicosanoids: role in gastrointestinal inflammation and cancer, *Eur-J-Gastroenterol-Hepatol* 1997: 9: 1033-1044
 51. Davies N, Kyaston H, et al.: Octreotide, the reticuloendothelial system and liver metastasis, *Gut* 1995: 36: 610-614
 52. Davies N, Kyaston H, et al.: Octreotide inhibits the growth and development of three types of experimental liver metastases, *Br-J-Surg* 1995: 82: 840-843
 53. De Caprio JA, Mayer RJ, Gonin R, Arbuck SG: Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously untreated patients with advanced adenocarcinoma of the pancreas: results of a phase II trial. *J Clin Oncol* 1991: 9: 2128-2133.
 54. De Caterina R, Cybulsky MI, et al.: DHA reduces cytokine induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells, *Atheroscler-Thromb* 1994: 14: 1829
 55. De Caterina R, Cybulsky MI, et al.: w-3 fatty acids and endothelial leucocyte adhesion molecules, *Prostaglandins-Leucotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1995: 52: 191-195
 56. De Haan JB, Cristiano F, et al.: Elevation in the ratio of Cu/Zn superoxide dismutase to glutathion peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Human-Molec-Genet* 1996; 5: 283-292
 57. Ding XZ, Kuszynski Ca, El-Metwally TH, Adrian TE: Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 266: 392-399
 58. Dobelbower RR Jr, Konski AA, Merrick HW, Bronn DG Intraoperative electron

- beam radiation therapy (IOEBRT) for carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 20: 113
59. Dutoit PJ, Vanaswegen CH, et al.: The effect of essential fatty-acids on growth and urokinase-type plasminogen-activator production in human prostate DU-145 cells, *Prostaglandins-Leucotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1996; 55: 173-177
 60. Ebert M, Friess H, et al.: Role of octreotide in the treatment of pancreatic cancer, *Digestion* 1994; 55(Suppl1): 48-51
 61. Eichholzer M, Stähelin HB: Antioxidative Vitamine und Krebs – eine Übersicht. *Akt-Ernähr-Med* 1994; 19: 2-11
 62. Elmadfa I, König JS: Vitamine in der Ernährung des Tumorkranken. *Akt-Ernähr-Med.* 1992; 17: 320-325
 63. Eskelson CD, Odeleye OE, et al.: Modulation of cancer growth by vitamin E and alcohol, *Alcohol-Alcohol* 1993; 28: 117-125
 64. Falconer JS, Ross JA, et al.: Effect of EPA and other fatty acids on the growth in-vitro of human pancreatic-cancer cell lines, *Br-J-Cancer* 1995; 69: 826-832
 65. Fazeny B, Baur M, et al.: Octreotide combined with goserelin in the therapy of advanced pancreatic cancer – results of a pilot study and review of the literature, *J-Cancer-Res-Clin-Oncol* 1997; 123: 45-52
 66. Fearon KCH, Falconer JS, et al.: An open label phase i/ii dose-escalation study of the treatment of pancreatic cancer using lithium-g-linolenate, *Anticancer-Res* 1996; 16: 867-874
 67. Fisher WE, Muscarella P, et al.: Expression of the somatostatin receptor subtype-2 predicts response of human pancreatic cancer to octreotide. *Surgery* 1996; 120: 234-241
 68. Flagg EW, Coates RJ et al.: Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. *J-Am-Coll-Nutr* 1995; 14: 419-427
 69. Frei B, England L, et al.: Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc-Natl-Acad-Sci* 1989; 86: 6377-6381
 70. Fridovich I: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by

milk xanthine oxidase, *J-Biol-Chem* 1970; 245: 4053-4057

71. Friess H, Büchler MW, et al.: Low dose octreotide treatment is not effective in patients with advanced pancreatic cancer, *Pancreas* 1993; 8: 540-545
72. Friess H, Büchler MW, et al.: Treatment of advanced pancreatic cancer with high dose octreotide, *Int-J-Pancreatol* 1993; 14: 290-291
73. Friess H, Isenmann R, et al.: Die Prognose des Pankreaskarzinoms, *Ther-Umschau* 1996; 53: 401-407
74. Gastrointestinal Tumor study Group. Treatment of locally unresectable carcinoma of the pancreas: Comparison of combined-modality therapy (chemotherapy plus radiotherapy) to chemotherapy alone. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 751-755.
75. Gattani A, Mandeli J, Chesser MR, Bruckner HW: An active biochemical modulation regimen for advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Proc Am Soc Clin* 1992; 11: 193.
76. Gillespie J, Poston GJ, et al.: Human pancreatic cancer cell lines do not express receptors for somatostatin, *Br-J-Cancer* 1992; 66: 483-487
77. Gudjonsson B Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer* 1987; 60: 2284
78. Guliana JM, Guillausseau PJ, Caron J, Siame-Mouroit C et al Effects of short term subcutaneous administration of SMS 201-995 on calcitonin plasma levels in patients suffering from medullary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res* 1989; 21: 584-6
79. Hahnel D, Beyer K et al.: Inhibition of peroxy radical-mediated lipid oxidation by plasmalogen phospholipids and α -tocopherol. *Free-Radic-Biolo-Med* 1999; 27: 1087-1094
80. Hall PA, Lemoine NR: Models of pancreatic cancer, *Cancer-Surv* 1993; 16: 135-155
81. Hamers MN, Ross D: Oxidative stress in human neutrophil granulocytes: host defence and self defence, in: Siess H, editor: *Oxidative stress*, New York Academic Press 1985: 351-381
82. Hasler CM, Bennink MR, et al.: Inhibition of gap junction-mediated intercellular

- communication by α -linolenate, *Am-J-Physiol* 1991: 261: 161-168
83. Hawkins RA, Sangster K, 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
84. Hayashi Y, Fukushima S, 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
85. Hierowski MT, Liebow C, du Sapin K, Schally AV Stimulation by somatostatin of dephosphorylation of membrane proteins in pancreatic cancer MIA PaCa-2 cell line. *FEBS-Lett* 1985: 179 (2): 252-6
86. Hennig B, Lipke D, et al.: Role of fatty-acids and eicosanoids in modulating proteoglycan metabolism in endothelial-cells, *Prostaglandins-Leucotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1995: 53: 315-324
87. Hermanek P, Scheibe O, Spiessl B, Wagner G: TNM Klassifikation maligner Tumoren. Springer, Berlin – Heidelberg – New York 1992
88. Herrington MK, Permert J, et al.: Effects of high fat diet and cholecystokinin receptor blockade on pancreatic growth and tumor initiation in the hamster, *Carcinogenesis* 1993: 14: 1021-1026
89. Herrington MK, Gasslander T, et al. Effects of high-fat diet and cholecystokinin receptor blockade on promotion of pancreatic ductal cell tumors in the hamster, *Nutr-Cancer* 1997: 28: 219-224
90. Hill GE, Whitten CW: The role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis, and the propagation of disease, *J-Cardiothorac-Vasc-Anesth* 1997: 11: 316-321
91. Hollan S: Free radicals in health and disease, *Haematologia-Budap* 1995: 26: 177-189
92. Holmes RS, van de Berg LJ: Aldehyde dehydrogenases, aldehyde oxidase and xanthine oxidase from baboon tissue, *Alcohol* 1986: 3: 205-214
93. Horrobin DF: Essential fatty acids, lipid peroxidation, and cancer, In: Horrobin DF (ed.): *w-6 Essential fatty acids*, New York, Wiley-Liss 1990: 351-378

94. Hosono J, Narita T, Kimura N, Sato M, Nakashio T, Kasai Y, Nonami T, Nakao A, Takagi H, Kannagi R: Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *J-Surg-Oncol* 1998, *67*: 77-84
95. Hoyer D, Bell GI, et al.: Classification and nomenclature of somatostatin receptors, *Trends-Pharmacol-Sci* 1995; *16*: 86-88
96. Hubbard NE, Erickson KL: Effect of dietary linoleic-acid level on lodgement, proliferation and survival of mammary tumor metastases, *Cancer-Lett* 1989; *44*: 117
97. 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
98. Hughes O, Sharman V, et al.: Somatostatin and the treatment of pancreatic cancer, *Ann-R- Coll-Surg-Engl* 1994; *76*: 354
99. Huguier M, Samama G, et al.: Treatment of adenocarcinoma of the pancreas with somatostatin and gonadoliberein (luteinizing hormone-releasing hormone), *Am-J-Surg* 1992; *164*: 348-352
100. Ihse I, Andersson R, et al.: Pancreatic pain: is there a medical alternative to surgery?, *Digestion* 1993; *54(Suppl2)*: 30-34
101. Ishii H, Okada S, et al.: Prognostic factors in patients with advanced pancreatic cancer treated with systemic chemotherapy, *Pancreas* 1996; *12*: 267-271
102. Isliker H, Weiser H, et al.: Stabilization of rat heart mitochondria by a-tocopherol in rats. *Int-J-Vit-Nutr-Res* 1996; *67*: 91-94
103. 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
104. Jiang WG, Bryce RP, et al.: Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications, *Crit-Rev-Oncol-Hematol* 1998; *27*: 179-209
105. 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

106. Jiang WG, Hiscox S, et al.: Inhibition of invasion and motility of human colon cancer cells by g-linolenic-acid, *Br-J-Cancer* 1995; 71: 744-752
107. Jiang WG, Hiscox S, et al.: Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by g-linolenic acid, *Cancer-Res* 1995; 55: 5043-5048
108. Jiang WG, Hiscox S, et al. Inhibition of membrane ruffling and ezrin translocation by g-linolenic acid, *Int-J-Oncol* 1996; 9: 279-284
109. Jiang WG, Hiscox S, et al. Regulation of nm23 expression by n-6-PUFA's, *Br-J-Cancer* 1997; 77: 731-738
110. Jimenez de Asua L, Otto AM, Lindgren JA, Hammarstrom S: The stimulation of the initiation of DNA synthesis and cell division in Swiss mouse 3T3 cells by prostaglandin F2a requires specific functional groups in the molecule. *J-Biol-Chem* 1983; 258: 8774-8780
111. Johanning GL: Modulation of breast cancer cell adhesion by unsaturated fatty acids, *Nutrition* 1996; 12: 810-816
112. Johanning GL, Lin TY: Unsaturated fatty-acid effects on human breast-cancer cell-adhesion, *Nutr-Cancer* 1995; 24: 57-66
113. Jones JL, Clemmons DR Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Reviews* 1995; 16: 3
114. Kalsner MH, Ellenberg SS: Pancreatic cancer: adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg* 1985; 120: 899-903.
115. Kamthan A, Morris JC, Chesser MR, Dalton J, Mandeli J, Bruckner HW: Combined modality therapy for effective local control in stage II and III pancreatic carcinoma. *Proc Am Soc Clin* 1992; 11: 160.
116. Kasperk R, Ammon J, Schumpelick V: Zum Einfluß der intraoperativen Radiotherapie (IORT) auf den postoperativen Verlauf beim Pankreaskarzinom. *Chirurg* 1993; 64: 170-3.
117. Keating JJ, Johnson PJ, Cochrane AMG, Gazzard BG et al A prospective randomized controlled trial of tamoxifen and dyproterone acetate in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 1989; 60: 789

118. Kappus H: Lipidperoxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance, in: Oxidative Stress, Siess H (ed.), London Academic Press 1985: 273-310
119. Karmali RA: Eicosanoids in neoplasia, *Prev-Med* 1987; 16: 493-502
120. Kazakoff K, Cardesa T, et al.: Effects of voluntary physical exercise on high-fat diet –promoted pancreatic carcinogenesis in the hamster model, *Nutr-Cancer* 1996: 26: 265-279
121. Kelly DM, Benjamin IS: Pancreatic carcinoma, *Ann-Oncol* 1995; 6: 19-28
122. Kensler TW, Trush MA: Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence in human polymorphonuclear leukocytes by retinoic acid and 5,6-epoxyretinoic acid. *Cancer-Res* 1981; 41: 216-222
123. Kent RS, Diedrich SL, et al.: Regulation of vascular prostaglandin synthesis by metabolites of arachidonic acid in perfused rabbit aorta, *J-Clin-Invest* 1983; 72: 455
124. Kern HF, Raus K, Mollenhauer J: Fine structure of human pancreatic adenocarcinomas. In: Go VLW, Arner JD, Brooks FP, Lebenthal E, Di Maguio EP, Scheele A (Eds.): *The exocrine pancreas* . Raven Press New York 1986; 621-636
125. Klempnauer J, Ridder GJ, et al.: Surgery for exocrine pancreatic cancer – who are the 5- and 10-year survivors?, *Oncology* 1995; 52: 353-359
126. Klijn JGH, Hoff AM, et al. Treatment of patients with metastatic pancreatic and gastrointestinal tumors with the somatostatin analogue Sandostatin: a phase II study including endocrine effects, *Br-J-Cancer* 1990; 62: 627-630
127. Klöppel G, Held G, Morhoshi T, Seifert G: Klassifikation exokriner Pankreastumoren. Histologische Untersuchung an 167 autoptischen und 97 bioptischen Fällen. *Pathologe* 1982; 2: 319-328
128. Knekt P, Aromaa A, et al.: Vitamin E and cancer prevention. *Am-J-Clin-Nutr* 1991; 53: 283S-285S.
129. Komaki R, Wadler S, Peters T, Byhardt RW, Order S, Gallagher MJ, Herskovic A, Pederson J: High-dose local irradiation plus prophylactic hepatic irradiation and

- chemotherapy for inoperable adenocarcinoma of the pancreas. A preliminary report of a multi-institutional trial. *Cancer* 1992; 69: 2807-2812.
130. Kondo S, Toyokuni S, et al.: Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma. *Free-Radic-Biol-Med* 1999; 27: 401-410
 131. Labbe MR, Trick KD, et al.: Dietary (n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation, *J-Nutr* 1991; 121: 1331-1340
 132. Lafrenie R, Shaughnessy SG, et al.: Cancer cell interactions with injured or activated endothelium, *Cancer-Metastasis-Rev* 1992; 11: 377-388
 133. Lai PBS, Ross JA, 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
 134. Lamberts SWJ, Reubi JC, et al.: The role of somatostatin analogs in the control of tumor growth, *Semin-Oncol* 1994; 21(Suppl13): 61-64
 135. Levy GN: Prostaglandin H synthases, nonsteroidal antiinflammatory drugs and colon cancer. *FASEB-J* 1997; 11: 234-247
 136. Liebow C, Reilly C, et al.: Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase, *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* 1989; 86: 2003-2007
 137. Liehr RM, Melnykovich G, et al.: Growth effects of regulatory peptides on human pancreatic cancer lines PANC-1 and MIA PaCa-2, *Gastroenterology* 1990; 98: 1666-1674
 138. Liu XH, Connolly JM, et al.: 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: 145-152
 139. Löhr M, Andren-Sandberg A: Cancer of the pancreas: from concordant classification to standardized treatment, *Eur-J-Gastroenterol-Hepatol* 1997; 9: 993-1000
 140. Loeppky RN, Li YE: Nitrosamine activation and detoxication through free radicals and their derived cations, *IARC-Sci-Publ* 1991
 141. Lok E, Jee P, et al.: The effect of different levels of dietary α -linolenic and other

- fatty acids on mammary-gland ductular cell-proliferation in female Swiss-Webster mice, *Cancer-Lett* 1995; 92: 229-234
142. Lomnitski L, bar-Natan R, et al.: The interaction between b-carotene and lipoxygenase in plant and animal systems. *Biochem-Biophys-Acta* 1993; 167: 331-338
 143. Longnecker DS: Experimental cancer of the pancreas. *Curr-Opin-Gastroenterol* 1991; 7: 731-738
 144. Longnecker DS, Curphey TJ: Inhibition of pancreatic carcinogenesis by retinoids in azaserine-treated rats. *Cancer-Res* 1982; 42: 19-24
 145. Longnecker DS, Memoli V, et al.: Recent results in animal models of pancreatic carcinoma: histogenesis of tumors, *Yale-J-Biol-Med* 1992; 65: 457-464
 146. Lotan R: Mechanism of inhibition of tumor cell proliferation by retinoids. *Dermatologica* 1984; 169: 223
 147. Lowry OH, Rosebrough NJ, et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J-Biol-Chem* 1951; 193: 265-275
 148. Lupulescu A: Prostaglandins, their inhibitors and cancer. *Prostaglandins-Leukotriens-Essent-Fatty-Acids* 1996; 54: 83-94
 149. Machlin LJ: Vitamin E. in: *Handbook of vitamins*. Marcel Dekker, New York, Basel 1991
 150. Maker HS, Weiss C, et al.: Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates, *J-Neurochem* 1981; 36: 589-593
 151. 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
 152. Maziere S, Cassand P, et al.: Vitamin A and apoptosis in colonic tumor cells. *Int-J-Vit-Nutr-Res* 1997; 67: 237-241
 153. 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

154. Meier R: Octreotid – ein Somatostatinanalogon in der Praxis, Schweiz-Rundsch-Med-Prax 1995: 84: 325-327
155. Meijers M, Bruijntjes JP, Hendriksen EJ, Woutersen RA: Histogenesis of early preneoplastic lesions induced by N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine in exocrine pancreas of hamster. Int-J-Panc 1989; 4: 127-137
156. Meijers M, Garderen-Hoetmer A, et al.: Role of cholecystokinin in the development of BOP-induced pancreatic lesions in hamsters, Carcinogenesis 1990: 11: 2223-2226
157. Meryn S: Pankreaskarzinom - Epidemiologie und Risikofaktoren, Wien-Klin-Wochenschr 1994: 106: 694-697
158. Meterissian SH, Forse RA, 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
159. Moorby CD, Stoker M, et al. HGF/SF inhibits junctional communication, Exp-Cell-Res 1995: 219: 657-663
160. Moertel CG, Frytak S, Hahn RG, MJ O'Connel, Reitemeier RJ, Rubin J, Schutt AJ, weiland LH, Childs DS, Holbrook MA, Lavin PT, Livstone E, Spiro H, Knowlton A, Kalsner M, Barkin J, Lessner H, Mann-Kaplan R, Ramming K, Douglas HO, Thomas P, Nava H, Bateman J, Lokich L, Brooks J, Chaffey J, Corson JM, Zamchek N, Novak JM: Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomised comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5 fluorouracil), and high dose radiation + 5 fluorouracil: the gastrointestinal tumor study group. Cancer 1981; 48: 1705-10.
161. Moertel CG, Lefkopoulo M, Lipsitz St, Hahn RG, Klaassen D: Streptozocin – doxorubicin, streptozocin-fluorouracil, or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. N Engl J Med 1992; 326: 519-523.
162. Moore M. Activity of gemcitabine in patients with advanced pancreatic carcinoma. A review. Cancer 1996: 78: 633-8
163. Morgenroth K, Philippou St: Pathologie der Pankreastumoren mit und ohne

- Hormonproduktion. In: Kozuschek W, Paquet KJ (Hrsg.): Pankreas, Diagnostik, Therapie. Karger, Basel-München-Paris 1992: 401-419
164. Murr MM, Sarr MG, et al.: Pancreatic cancer, *CA-Cancer-J-Clin* 1994; 44: 304-318
165. Nakao A, Takagi H: Problems in pancreatic cancer surgery, *Semin-Surg-Oncol* 1998; 15: 52-56
166. Naundorf H, Parczyk K, Zschesche W, Reinecke S, Büttner B, Saul GJ, Sinn B, Fichtner I: Relation of oestradiol-mediated growth stimulation with the expression of c-erb B-2 protein in xenotransplanted oestradiol-receptor-positive and negative breast carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 14-20
167. Niedermuhlbichler M, Wiedermann CJ: Suppression of superoxide release from human monocytes by somatostatin related peptides, *Regul-Pept* 1992; 41: 39-47
168. Oberley TD, Oberley LW: Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol-Histopathol* 1997; 12: 525-535
169. Odeleye OE, Eskelson CE, et al.: The potential role of vitamin E in the treatment of abnormalities of immune defects in AIDS. *Prog-Food-Nutr-Scie* 1991; 15: 1-19
170. Odeleye OE, Watson RR, et al.: Dietary polyunsaturated fatty acid promote peroxidation and its possible role in the promotion of cancer, *Adv-Exp-Med-Biol* 1991; 283: 789-91
171. Ogawa T, Makino T, et al.: Promoting effects of both dietary cholesterol and cholestyramine on pancreatic carcinogenesis initiated by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters, *Carcinogenesis* 1992; 13: 2047-2052
172. Ohkawa H, Ohishi N, et al.: Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, *Anal- Biochem* 1979; 95: 351-358
173. Oster MW, Gray R, Panasci L, Pery MC (1986) Chemotherapy for advanced pancreatic cancer. A comparison of 5-fluorouracil, adriamycin, and mitomycin (FAM) with 5-Fluorouracil, Streptozotocin, and Mitomycin-C (FSM). *Cancer* 1986; 57: 29
174. Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase, *J-Lab-Clin-Med* 1967:

175. Pandalai PK, Pilat MJ, et al.: The effects of w-3 and w-6 fatty acids on in-vitro prostate cancer growth, *Anti-Cancer-Res* 1996; *16*: 815-820
176. Paz-Bouza JI, Redding TW, et al.: Treatment of nitrosamine-induced pancreatic tumors in hamsters with analogs of somatostatin and luteinizing hormone-releasing hormone, *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* 1987; *84*: 1112-1116
177. Petkau A: Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury, *Br-J-Cancer* 1987; *55(Suppl8)*: 87-95
178. Plescia OJ, Racis S: Prostaglandins as physiological immunoregulators. *Prog-Allergy* 1988; *44*: 153-171
179. Plewe G, Beyer J, et al. Long-acting and selective suppression of growth hormone secretion by somatostatin analogue SMS201-995 in acromegaly, *Lancet* 1984; *ii*: 782-784
180. Pollak MN, Schally AV: Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs, *Proc-Soc-Exp-Biol-Med* 1998; *217*: 143-152
181. Popescu RA, Cunningham D: Chemotherapy for advanced pancreatic cancer – some light at the end of the tunnel?, *Ann-Oncol* 1997; *8*: 415-416
182. Poston GJ, Schally AV, et al.: Phase one study on therapeutic use, and tolerance of somatostatin analogue RC-160 in the treatment of patients with advanced pancreatic cancer, *Gut* 1991; *84*: 178-184
183. Pour PM, Egami H, Takiyama Y: Patterns of growth and metastases of induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications. *Gastroenterology* 1991; *100*: 529-536
184. Pour PM, Runge RG, et al.: Current knowledge of pancreatic carcinogenesis in the hamster and its relevance to the human disease, *Cancer* 1981; *47*: 1573-1587
185. Prasad KN, Edwards-Prasad J: Expressions of some molecular cancer risk factors and their modification by vitamins. *J-Am-Coll-Nutr* 1990; *9*: 28-34
186. Prasad KN, Sinha PK, et al.: Sodium ascorbate potentiates the growth inhibitory effect of certain agents on neuroblastoma cells in culture. *Proc-Nati-Acad-Sci-*

USA 1979; 76: 829-83

187. Qin Y, Ertl T, et al.: Somatostatin analog RC-160 inhibits growth of CFPAC-1 human pancreatic cancer cells in vitro and intracellular production of cyclic adenosine monophosphate, *Int-J-Cancer* 1995; 60: 694-700
188. Radulovic S, Comaru-Schally AM, et al.: Somatostatin analogue RC-160 and LH-RH antagonist SB-75 inhibit growth of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice, *Pancreas* 1993; 8: 88-97
189. Rao GN, Berk BC: Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression, *Circ-Res* 1992; 70: 593-599
190. Raynor K, Murphy WA, et al.: Cloned somatostatin receptors: identification of subtype-selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides, *Mol-Pharmacol* 1993; 43: 838-844
191. Raynor K, O'Carroll AM, et al.: Characterization of cloned somatostatin receptors SSTR4 and SSTR5, *Mol-Pharmacol* 1993; 44: 385-392
192. Redding TW, Schally AV: Inhibition of growth of pancreatic carcinomas in animal models by analogs of hypothalamic hormones, *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* 1984; 81: 248-252
193. 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
194. Reich R, Royce L, et al. EPA reduces the invasive and metastatic activity of malignant tumor cells, *Biochem-Biophys-Res-Commun* 1989; 160: 559-564
195. Reichlin S: Somatostatin, *N-Engl-J-Med* 1983; 309: 1495-1501
196. Remmele W: Exokrines Pankreas. In: Remmele W (Hrsg.): *Pathologie Bd. 2*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1984: 790-845
197. Ren-Ke L, Sole MJ, et al.: Vitamin E and oxidative stress in the heart of the cardiomyopathic syrian hamster. *Free-radical-Biol-Med* 1998; 24: 252-258
198. Reubi JC, Horisberger U, et al.: Absence of somatostatin receptors in human exocrine pancreatic adenocarcinomas, *Gastroenterology* 1988; 95: 760-763

199. Reubi JC, Laissue JA: Multiple actions of somatostatin in neoplastic disease, *Trends-Pharmacol-Sci* 1995; 16: 110-115
200. Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SWJ. Somatostatin Receptors in human cancer: Incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J. Steroid Biochem Molec Biol* 1992; 43: 27
201. Rice-Evans C, Burdon R: Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 1993; 32: 71-110
202. Roebuck BD: Dietary fat and the development of pancreatic cancer, *Lipids* 1992; 27: 804-806
203. Roebuck BD, Longnecker DS, et al.: Carcinogen-induced lesions in the rat pancreas: effects of varying levels of essential fatty acid, *Cancer Res* 1985; 45: 5252-5256
204. Roldan GE, Gunderson LL, Nagorney GM, Martin JK, Ilstrup DM, Holbrook MA, Kvols LK, McIlrath DC: External beam versus intraoperative and external beam irradiation for locally advanced pancreatic cancer. *Cancer* 1988; 61: 1110-1116.
205. Rose DP: Dietary fatty acids and cancer, *Am-J-Clin-Nutr* 1997; 66: 998-1003
206. Rose DP: Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies, *Am-J-Clin-Nutr* 1997; 66: 1513-1522
207. Rose DP, Connolly JM, et al.: Effects of linoleic-acid on the growth and metastasis of two human breast-cancer cell-lines in nude mice and the invasive capacity of these cell-lines in-vitro, *Cancer-Res* 1994; 54: 6557-6562
208. Rose DP, Conolly JM, et al.: Effects of linoleic acid and g-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
209. Rose DP, Connolly JM, 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
210. Rose DP, Hatala MA: Dietary fatty acids and breast cancer invasion and metastasis, *Nutr-Cancer* 1994; 21: 103-111

211. Rosenberg L: Treatment of pancreatic cancer: promises and problems of tamoxifen, somatostatin analogs, and gemcitabine, *Int-J-Pancreatol* 1997; 22: 81-93
212. Rosenberg L, Barkun AN, et al.: Low dose octreotide and tamoxifen in the treatment of adenocarcinoma of the pancreas, *Cancer* 1995; 75: 23-28
213. Rothman H, Cantrell JE Jr, Lokich J, Difino S, Harvey J, Ahlgren J, Fryer J: Continuous infusion 5-fluorouracil plus weekly cisplatin for pancreatic carcinoma. A mid-atlantic oncology program study. *Cancer* 1991; 68:
214. Rubin J, Gallagher J, Schutt A, Kuross S, Wieand H: Phase II trials of 5-fluorouracil (5FU) and leucovorin (LV) in patients with metastatic gastric or pancreatic carcinomas. *Proc Am Soc Clin* 1992; 11: 170
215. Ruch RJ, Klaunig JE: Antioxidant prevention of tumor promoter induced inhibition of mouse hepatocyte intercellular communication. *Cancer-Letter* 1986; 33: 137-150
216. Roy RS, McCord JM: Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, in: *Proceedings of the 3rd international conference on superoxide and superoxide dismutase*, ed. by Greenwald R & Cohen G, New York: Elsevier 1983: 145-153
217. Sakagushi M, Imray C, 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, *Anticancer-Res* 1990; 10: 1763-1768
218. Sakomoto W, Fujie K, Nishihira J, Handa H: Effect of vitamin E on arachidonic acid-release in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1170: 296-300
219. Schally AV: Oncological application for somatostatin analogues, *Cancer-Res* 1988; 48: 6977-6985
220. Scheithauer W, Pfeffel F, Kornek G, Marczell A, Wiltshcke C, Funovics J: A phase II trial of 5-fluorouracil, leucovorin and recombinant alpha-2b-interferon in advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer* 1992; 70: 1864-1866
221. Schimke I, Griesmacher A, et al.: Effects of reactive oxygen species on eicosanoid

- metabolism in human endothelial cells, *Prostaglandins* 1992; 43: 281-92
222. Schimke I, Haberland A, et al.: Influence of long-term supplementation with alpha-linolenic acid on myocardial lipid peroxidation and antioxidative capacity in spontaneously hypertensive rats, *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1997; 57: 545-550
223. Schnall SF, MacDonald JS: Chemotherapy of adenocarcinoma of the pancreas, *Semin-Oncol* 1996; 23: 220-228
224. Schwager J, Schulze J: Influence of ascorbic acid on the response to mitogens and interleukin production of porcine lymphocytes. *Internat-J. Vit-Nutr-Res* 1997; 67:
225. Sharma K, Patel YC, et al.: Subtype specific induction of wild type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3, *Mol-Endocrinol* 1996; 10: 1688-1696
226. Shaughnessy SG, Buchanan MR, et al.: Walker carcinosarcoma cells damage endothelial cells by the generation of reactive oxygen species. *Amer-J-Pathol* 1989; 134: 787-796
227. Shipley WU, Wood WC, Tepper JE: Intraoperative beam irradiation for patients with unresectable pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 1984; 200: 289-294.
228. Sigounas G, Anagnostou A, et al.: a-tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate and breast cancer cells. *Nutr-Cancer* 1997; 28: 30-35
229. Simmions-Menchaca M, Quian M: RRR-a-tocopheryl succinate inhibits DNA synthesis and enhances the production and secretion of biologically active transforming growth factor-b by avian retrovirus-transformed lymphoid cells. *Nutr-Cancer* 1995; 24: 171-185
230. Skuladottir GV, Shi Hua D, et al.: Effects of dietary oils and methyl ethyl ketone peroxide on in vivo lipid peroxidation and antioxidants in rat heart and liver, *Lipids* 1994; 29: 351-357
231. Sporn MB, Roberts AB: Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer-Res* 1983; 43: 3034-3040
232. Szatrowski TP, Nathan CF : Production of large amounts of hydrogen peroxide by

- human tumor cells. *Cancer-Res* 1991; *51*: 794-798
233. Szepeshazi K, Lapis K, et al.: Effect of combination treatment with analogs of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) or somatostatin and 5-fluorouracil on pancreatic cancer in hamsters, *Int-J-Cancer* 1991; *49*: 260-266
234. Szepeshazi K, Schally AV, et al.: Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and high dose of somatostatin analogue RC-160 on nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters, *Cancer-Res* 1991; *51*: 5980-5986
235. Takahashi M, Furukawa F, 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
236. Takeda Y, Escribano MJ: Effects of insulin and somatostatin on the growth and the colony formation of two human pancreatic cancer cell lines, *J-Cancer-Res-Clin-Oncol* 1991; *117*: 416-420
237. Tannenbaum SR, Wishnok JS, et al.: Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Am-J-Clin-Nutr* 1991; *53*: 247S-250S
238. Taragona EM, Pera M, Martinez J, Balague C, Trias M. Laparoscopic treatment of pancreatic disorders: diagnosis and staging, palliation of cancer and treatment of pancreatic pseudocysts. *Int Surg* 1996; *81(1)*: 1-5
239. Toyokuni S, Okamoto K, et al.: Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS-Letters* 1995; *358*: 1-3
240. Tsuji S, Kawano S, Sawaoka H, Takei Y, Kobayashi I, Nagano K, Fusamoto H, Kamada T: Evidences for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines. *Prostaglandins-Leukotrienes-Essent-Fatty-Acids* 1996, *55*: 179-183
241. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998, *93*: 705-716
242. Ulrich-Pur-H, Kornek GV, Raderer M, Haider K, Kwasny W, Depisch D, Greul R, Schneeweiss B, Krauss G, Funovics J, Scheithauer W. A phase II trial of adenocarcinoma. *Cancer* 2000; *88(11)*: 2505-11

243. Upp JR, Olson D, et al.: Inhibition of growth of two human pancreatic adenocarcinomas in vivo by somatostatin analog SMS201-995, *Am-J-Surg* 1988; 155: 29-35
244. Vane JR, Botting RM: Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int-J-Tiss-Reac* 1998; 20: 3-15
245. Vartak S, Robbins MEC, et al.: Polyunsaturated fatty acids increase the sensitivity of 36B10 rat astrocytoma cells to radiation-induced cell kill, *Lipids* 1997; 32: 283-292
246. Verhees S, Flechtner H, Queisser W, Heim ME, Fritz M, Trux F, Edler L: Treatment of advanced pancreatic cancer with 5-fluorouracil, 4-epidoxorubicin and mitomycin C (FEM II) From the chemotherapy of gastrointestinal tumor group. *Onkologie* 1990; 13: 50-52.
247. Vezeridis MP, Wanebo HJ: Surgical resection for carcinoma of the pancreas: a historical overview, *Semin-Surg-Oncol* 1995; 11: 108-113
248. Vidal K, Rauly I, et al.: Up-regulation of somatostatin receptors by epidermal growth factor and gastrin in pancreatic cancer cells, *Mol-Pharmacol* 1994; 46: 97-104
249. Viguerie N, Tahiri-Jouti N, et al.: Direct inhibitory effects of a somatostatin analog, SMS201-995, on AR42J cell proliferation via pertussis toxin-sensitive guanosine triphosphate-binding protein-independent mechanism, *Endocrinol* 1989; 124: 1017-1025
250. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chimmel J, Winchester D, Steele G: Survey of patterns of care for gastric cancer in the United States. *Proc Am Soc Clin* 1992; 11: 166.
251. Wanebo HJ, Vezeridis MP: Pancreatic cancer: an overview, *Semin-Surg-Oncol* 1995; 11: 168-180
252. Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C: Pancreatic carcinoma, *N-Engl-J-Med* 1992; 326: 455-465
253. Watanapa P, Williamson RC: Experimental pancreatic hyperplasia and neoplasia: effects of dietary and surgical manipulation, *Br-J-Cancer* 1993; 67: 877-884
254. Waters JS, Ross PJ, et al.: New approaches to the treatment of gastro-intestinal

- cancer, *Digestion* 1997; 58: 508-519
255. Weber C, Erl W, et al.: DHA selectively attenuates induction of VCAM-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by TNFa, *Arterioscler-Thromb-Vasc-Biol* 1995; 15: 622
256. Weiermann B, McCormick R: A phase II survival comparison of patients with pancreatic cancer (TPC), treated with 5-fluorouracil (F) and calcium leucovorin (L) compared to matched tumor registry. *Proc Am Soc Clin* 1992; 11: 191
257. Wenger FA, Kilian M, Jacobi CA, Schimke I, Guski H, Müller JM. 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 and Essential Fatty Acids* 2000; 62(8): 329-334.
258. Wenger FA, Jacobi CA, et al.: Hormontherapie des postoperativ rezidivierten Pankreascarcinoms mit Octreotid und Tamoxifen. *Chirurg* 1999; 70: 694-699
259. Wenger FA, Jacobi CA, Kilian M, Dressler H, Guski H, Müller JM. The impact of laparoscopic biopsy of pancreatic lymph nodes with helium and carbon dioxide on port site and liver metastasis in BOP-induced pancreatic cancer in hamster. *Clinical & Experimental Metastasis* 2000; 18: 11-14
260. Wenger FA, Jacobi CA, Zieren J, Döcke W, Volk HD, Müller JM. Tumor size and lymph node status in pancreatic carcinoma – is there a correlation to the preoperative immune function? *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384(5): 473-8
261. Wenger FA, Kilian M, Achucarro P, Heinicken D, Schimke I, Guski H, Jacobi CA, Müller JM. Effects of Celebrex and Zylflo on BOP-induced pancreatic cancer in Syrian Hamster. *Pancreatology* 2001 (angenommen zur Publikation)
262. Wenger FA, Kilian M, Bisevac M, Peter FJ, Schimke I, Guski H, Jacobi CA, Müller JM. Effects of Celebrex and Zylflo on liver metastasis and lipidperoxidation in pancreatic cancer in Syrian Hamsters. *Br J Cancer* 2001 (review)
263. Wenger FA, Kilian M, Jacobi CA, Schimke I, Guski H, Müller JM. Effects of octreotide on liver metastasis and intrametastatic lipidperoxidation in experimental pancreatic cancer. *Oncology* 2001, 60(3): 189-288.
264. Wenger FA, Kilian M, Mautsch I, Jacobi CA, Schimke I, Saul G, Guski H, Müller

- JM. Influence of octreotid and tamoxifen on tumor growth and liver metastasis in N-nitrosobis-2-oxopropylamine-induced pancreatic cancer in Syrian Hamster. *Hormone Res* 2001; 3: 14-18.
265. Wenger FA, Kilian M, Mautsch I, Jacobi CA, Steiert A, Peter FJ, Guski H, Schimke I, Müller JM. Influence of octreotide on liver metastasis and hepatic lipidperoxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian Hamsters. *Pancreas* 2001 (angenommen zur Publikation)
266. Wenger FA, Kilian M, Neumann J, Guski H, Schimke I, Müller JM. Effects of antioxidative vitamins A, C and E on liver metastasis and intrametastatic lipidperoxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian Hamster. *Carcinogenesis* (review)
267. Wenger FA, Kilian M, Proske JM, Guski H, Schimke I, Jacobi CA. The impact of laparoscopic biopsy of pancreatic lymph nodes on lipid peroxidation by use of helium and carbon dioxide in BOP-induced pancreatic cancer in hamster. *Surgical Endoscopy* 2001 (angenommen zur Publikation)
268. Wenger FA, Kilian M, Ridders J, Stahlknecht P, Schimke I, Guski H, Jacobi CA, Müller JM. Influence of antioxidative vitamins A, C and E on lipid- peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Prostaglandines, Leukotriens & Essential fatty acids* 2001 (angenommen zur Publikation)
269. Wenger FA, Peter F, Zieren J, Steiert A, Jacobi CA, Müller JM. Prognosis factors in carcinoma of the head of the pancreas. *Dig. Surg* 2000; 17(1): 29-35
270. Wenger FA, Zieren J, Peter FJ, Jacobi CA, Müller JM. K-ras mutations in tissue and stool samples from patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384(2): 181-6
271. Willett WC, Hunter DJ: Vitamin A and cancers of the breast, large bowel and prostate: epidemiologic evidence. *Nutr-Rev* 1994; 52: 53-59
272. Williams CS, DuBois RN: Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am-J-Physiol-Gastrointest-Liver-Physiol* 1996, 270: 6393-6400
273. Williams DE, Carpenter HM, et al.: Alterations in lipid peroxidation, antioxidant enzymes and carcinogen metabolism in liver microsomes of vitamin E deficient

- trout and rat. *Toxicol-Pharmacol* 1992; *116*: 78-84
274. Wolf G: Multiple functions of vitamin A. *Physiol-Rev* 1984; *64*: 873-937
275. Woltering EA, O'Dorisio MS, et al.: The role of radiolabeled somatostatin analogs in the management of cancer patients, in: *Principles and practice of oncology: update* 1995; *9*: 1-16
276. Yang M, Schaich K: Factors affecting DANN damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free-Radic-Biol-Med* 1996; *20*: 225-236
277. Yano T, Ishikawa G: Is vitamin E a useful agent to protect against oxy-radical-promoted lung carcinogenesis in ddY mice. *Carcinogenesis* 1993; *14*: 1133-1136
278. Yasui M, Sakamoto J, Yasui K, Morimoto T, Kurimoto K, Kuno N, Morita K: A randomized trial of intraoperative radiation therapy (IORT) vs IORT plus chemotherapy (Mtx-5-FU) for adenocarcinoma of the pancreas. *Proc Am Soc Clin* 1992; *11*: 161.
279. Yeo CJ, Cameron JL: Pancreatic cancer, *Curr-Probl-Surg* 1999; *36*: 67-152
280. Yip-Schneider MT, Barrand DS, Billings SD, Cheng L, Heilmann DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Sweeney CJ: Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000; *21*: 139-146
281. Zalutnai A, Schally AV: Treatment of N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic cancer in Syrian golden hamsters with D-Trp-6-LH-RH and somatostatin analogue RC-160 microcapsules, *Cancer-Res* 1989; *49*: 1810-1815
282. Zhang L, Mills KJ, et al.: Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J-Biolo-Chem* 1995; *11*: 6022-6029

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Habilitationsschrift mit Rat und Tat unterstützt haben.

Insbesondere danke ich meinen Eltern, die mein Medizinstudium ermöglicht haben und mich auch auf meinem weiteren beruflichen Weg stets mit Verständnis und Unterstützung begleitet haben. Ebenso gilt mein herzlicher Dank meiner Frau Birgitta, die meine klinische und wissenschaftliche Tätigkeit mit außerordentlichem Verständnis und Flexibilität begleitet.

Innerhalb der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité Campus Mitte gilt mein besonderer Dank dem Klinikdirektor, Herrn Prof. Dr. J.M. Müller, für die Möglichkeit der Durchführung der zugrundeliegenden klinischen und experimentellen Studien. Ebenso danke ich Herrn PD Dr. C.A. Jacobi, der für mich stets ein zuverlässiger Ansprechpartner war. Insbesondere danke ich den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der „Arbeitsgruppe Pankreas“ unserer Klinik für ihren kontinuierlichen persönlichen Einsatz bei der Umsetzung unserer wissenschaftlichen Projekte.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. H. Guski und Herrn Prof. Dr. I. Schimke für die begleitende Unterstützung und ihre Ratschläge bei der Erhebung und Beurteilung der histologischen und biochemischen Ergebnisse.

Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift