

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Medizinische Klinik II
(Leiter: Prof. Dr. W. F. Caspary)

**Über den Einfluss einer Omega-3-
fettsäurereichen Lipidemulsion auf das
Wachstum und die Chemosensibilität humaner
Pankreas- und Kolonkarzinomzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Theoretischen Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt am Main**

**vorgelegt von
Diplom-Oecotrophologin Angela Jordan
aus Grebenstein**

Frankfurt am Main, im Oktober 2001

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Dr. J. Stein

Koreferent: Prof. Dr. B. Markus

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2003

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1997-2001 in der Medizinischen Klinik II, Abteilung für Gastroenterologie (Leiter: Professor Dr. med. W. F. Caspary) des Universitätsklinikums Frankfurt am Main.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die diese Arbeit ermöglicht haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter der Abteilung, Herrn Professor Dr. W. F. Caspary, für die großzügige Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Jürgen Stein danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die fortwährende Unterstützung und Betreuung. Herr Professor Dr. Dr. J. Stein schaffte die Voraussetzungen und ließ mir die nötigen Freiräume, meine wissenschaftlichen Interessen zu entwickeln, gestalten und verfolgen zu können.

Gleichrangig mit den bereits genannten Personen gilt mein besonderer Dank meinen Mitdotorandinnen Ruth Bauske, Astrid Wächtershäuser und Freya Wolter. Sie haben mich in die Zellkulturtechnik eingeführt und mir wichtige Hilfestellungen beim Erlernen der verschiedenen Methoden gegeben. Außerdem standen sie mir jederzeit mit Rat und Tat sowie als kritische Diskussionspartner zur Seite.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Bora Akoglu für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Durchflußzytometrie.

Allen Kolleginnen und Kollegen des gastroenterologischen Labors danke ich für die freundliche Aufnahme, die stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Bei Frau Dr. Heide Rosenow möchte ich mich für das „kritische“ Lesen der Arbeit und für die hilfreichen Anregungen für die Überarbeitung des ersten Manuskriptes bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Ernährungsambulanz, die mich stets unterstützt haben und mir Freiräume für die Forschungstätigkeit geschaffen haben. Ein besonderer Dank geht an Frau Michaela Brandstätter für die vielen „aufmunternden“ Worte.

Frankfurt am Main, im November 2001

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AA	Arachidonsäure
ALA	α -Linolensäure
AOM	Azoxymethan
APC	Adenomatosis polyposis coli
BAX	Bcl-2 assoziiertes X Protein
BCL-2	B-Zell Lymphom 2 / B-Zell Leukämie 2
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Caco-2	Kolonkarzinomzellen
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
COX	Zyklooxygenase
DAG	Diacylglycerol
DAPI	Diaminophenylindol
dFdC	2',2'-Difluorodeoxycytidin (Gemcitabin)
dFDCDP	Gemcitabin-Diphosphat
dFdCTP	Gemcitabin-Triphosphat
DHA	Dokosahexaensäure
DMEM	Dulbeccos's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-bis-(β -aminoethoxyethan)-N,N,N',N',-tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
EPA	Eikosapentaensäure
FACS	Durchflußzytometrie
FAP	familiäre Polyposis coli
FCS	Fötales Kälberserum
FdUMP	5-Fluoro-2'Deoxyuridinmonophosphat
FO	Fischölemulsion
5-FU	5-Fluorouracil

GLA	γ -Linolensäure
HETE	Hydroxyeikosapentaensäure
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
LA	Linolsäure
LDH	Lactatdehydrogenase
LOX	Lipoxygenase
LPO	Lipidperoxidation
LT	Leukotrien
LysoPC	Lysophosphatidylcholin
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
NF κ B	nukleärer Faktor kappa B
NSAR	nicht-steroidale antiinflammatorische Rheumatika
PA	Phosphatidylsäure
PBS	Phosphat-gepufferte isotonische NaCl-Lösung
PC	Phosphatidylcholin
PG	Prostaglandin
PI	Propidiumjodid
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkinase
PL	Phospholipase
PPAR	Peroxisomen-Proliferatoren aktivierter Rezeptor
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure
RE	responsives Element
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SO	Sojabohnenölemulsion
TNF	Tumornekrosefaktor
TX	Thromboxan
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1.1	Strukturformeln für ω -3- (α -Linolensäure) und ω -6- (Linolsäure) -Fettsäuren	3
Abb. 1.2	Systematik und Synthesewege der wichtigsten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.....	6
Abb. 1.3	Einfluß von Eikosapentaensäure (EPA) auf die Enzymsysteme des Arachidonsäurestoffwechsels	8
Abb. 1.4	Mögliche Wirkmechanismen der Omega-3-Fettsäuren auf die Zellphysiologie	12
Abb. 1.5	Herleitung der Eikosanoide aus Arachidonsäure und Eikosapentaensäure	
Abb. 1.6	Mögliche Wege der intrazellulären Signalvermittlung - Stellung der Proteinkinase C (PKC)	18
Abb. 2.1	Mia-Paca-2 Zellen	30
Abb. 2.2	Caco-2 Zellen	31
Abb. 2.3	Chemische Struktur von Gemcitabin (dFdC)	33
Abb. 2.4	Chemische Struktur von 5-Fluorouracil (5-FU)	34
Abb. 2.5	Schematische Darstellung des Meßprinzips bei der Durchflußzytometrie	40
Abb. 2.6	Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen und des dazugehörigen 1-Parameter-Histogramms	41
Abb. 3.1	Zellzahl von Mia-Paca-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit steigenden Konzentrationen von FO und SO	47
Abb. 3.2	Zellzahl von Mia-Paca-2 Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit FO und SO	48
Abb. 3.3	Zellzahl von Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit steigenden Konzentrationen von FO und SO	49
Abb. 3.4	Zellzahl von Caco-2 Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit FO und SO	50
Abb. 3.5	Effekt einer EGF-Stimulation (20 ng ml^{-1}) auf die Zellproliferation von Mia-Paca-2 Zellen nach Präinkubation mit FO und SO	52
Abb. 3.6	Caspase-3 Aktivität bei Mia-Paca-2 Zellen nach 12, 24, und 48 Stunden Inkubation mit FO und SO	54

Abb. 3.7	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Mia-Paca-2 Zellen nach Anfärbung mit DAPI; (A) unbehandelt und (B) nach Inkubation mit FO55
Abb. 3.8	Zellzyklusanalyse von Mia-Paca-2 Zellen nach Inkubation mit FO56
Abb. 3.9	DNA-Histogramme von Mia-Paca-2 Zellen (A) unbehandelt und (B) nach Inkubation mit FO57
Abb. 3.10	Zellzyklusanalyse von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit FO58
Abb. 3.11	Wachstumskinetik von Mia-Paca-2 Zellen nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen des Zytostatikums Gemcitabin (dFdC)60
Abb. 3.12	Effekt von Gemcitabin (dFdC) in Kombination mit FO auf die Zellproliferation von Mia-Paca-2 Zellen.....61
Abb. 3.13	Effekt von dFdC in Kombination mit auf den Zellzyklus von Mia-Paca-2 Zellen.....62
Abb. 3.14	DNA-Histogramme von Mia-Paca-2 Zellen; (A) Kontrolle, (B) nach Behandlung mit FO, (C) Gemcitabin (dFdC) und (D) einer Kombination beider Substanzen63
Abb. 3.15	Wachstumskinetik von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen des Zytostatikums 5-Fluorouracil (5-FU)64
Abb. 3.16	Effekt von 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit FO auf die Zellproliferation von Caco-2 Zellen65
Abb. 3.17	Effekt von 5-FU in Kombination mit FO auf den Zellzyklus von Caco-2 Zellen66
Abb. 4.1	Hypothetische Darstellung des Netzwerkes EGF- und MUF-vermittelter intrazellulärer Signalwege76

VERZEICHNIS DER TABELLEN

<i>Tab. 1.1</i>	Die für die menschliche Ernährung wichtigsten Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren und deren Vorkommen	4
<i>Tab. 2.1</i>	Fettsäurezusammensetzung der Lipidemulsionen	32

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	II
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	IV
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	VI
VERZEICHNIS DER TABELLEN	VIII
INHALTSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 HISTORIE	1
1.2 OMEGA-3-FETTSÄUREN	2
1.2.1 <i>Struktur</i>	2
1.2.2 <i>Vorkommen</i>	3
1.2.3 <i>Metabolismus</i>	5
1.3 OMEGA-3-FETTSÄUREN UND TUMORERKRANKUNGEN	8
1.3.1 <i>Kolorektales Karzinom</i>	8
1.3.2 <i>Pankreaskarzinom</i>	10
1.3.3 <i>Biologische Wirkmechanismen</i>	11
1.4 EFFEKT AUF DIE WIRKSAMKEIT VON ZYTOSTATIKA	22
1.5 DER EINSATZ OMEGA-3-FETTSÄUREREICHER LIPID-EMULSIONEN	24
1.6 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	26
2 MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 CHEMIKALIEN	28
2.2 KIT-SYSTEME	29
2.3 GERÄTE	29
2.4 VERSUCHSAUFBAU	30
2.4.1 <i>Zelllinien</i>	30
2.4.2 <i>Testsubstanzen</i>	31
2.4.3 <i>Versuchsdesign</i>	34

2.5 METHODEN	35
2.5.1 Zellkultur	35
2.5.2 Bestimmung der Zellproliferation	37
2.5.3 Zytotoxizitätstest	38
2.5.4 Durchflußzytometrie	39
2.5.5 Apoptosebestimmung	42
2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG	45
3 ERGEBNISSE	46
3.1 EINFLUSS DER LIPIDEMULSIONEN AUF DAS ZELLWACHSTUM VON MIA-PACA-2 UND CACO-2 ZELLEN	46
3.1.1 Einfluss auf das Wachstum von Mia-Paca-2 Zellen	46
3.1.2 Einfluss auf das Wachstum von Caco-2 Zellen	49
3.2 MODULATION DES EGF-INDUZIERTEN ZELLWACHSTUMS	51
3.2.1 Einfluss von EGF in Kombination mit FO auf das Wachstum von Mia-Paca-2 Zellen	51
3.3 INDUKTION DER APOPTOSE	53
3.3.1 Caspase-3 Aktivierung	53
3.3.2 Zellmorphologie	54
3.4 EINFLUSS AUF DEN ZELLYKLUS	56
3.4.1 Einfluss auf den Zellzyklus von Mia-Paca-2 Zellen	56
3.4.2 Einfluss auf den Zellzyklus von Caco-2 Zellen	58
3.5 EINFLUSS VON FO AUF DIE CHEMOSENSITIVITÄT VON TUMORZELLEN	59
3.5.1 Einfluss von FO auf die Wirksamkeit von Gemcitabin (dFdC) bei Mia-Paca-2 Zellen	59
3.5.2 Einfluss von FO auf die Wirksamkeit von 5-Fluorouracil (5-FU) bei Caco-2 Zellen	64
4 DISKUSSION	68
4.1 AUFNAHME KOMPLEXER TRIGLYZERIDE DURCH CACO-2 UND MIA-PACA-2 ZELLEN	68
4.2 EINFLUSS DER FISCHÖLEMULSION AUF DAS ZELLWACHSTUM VON MIA-PACA-2 UND CACO-2 ZELLEN	69
4.3 MODULATION DES EGF-INDUZIERTEN ZELLWACHSTUMS DURCH DIE FISCHÖLEMULSION	74

4.4 INDUKTION DER APOPTOSE	77
4.5 EINFLUSS AUF DEN ZELLZYKLUS	79
4.6 EINFLUSS DER FISCHÖLEMULSION AUF DIE CHEMOSENSIBILITÄT VON TUMORZELLEN	81
5 ZUSAMMENFASSUNG	86
6 LITERATUR	88
LEBENS LAUF	103
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	104

1 EINLEITUNG

1.1 Historie

Die Erforschung der Omega-3-Fettsäuren läßt auf eine lange Geschichte zurückblicken. Fast 150 Jahre liegen die ersten Beschreibungen der besonderen Ernährungsgewohnheiten der Grönlandeskimos, die überwiegend aus Fisch, Robben- und Walfett bestand, und deren robuste Gesundheit durch den deutschen Arzt Dr. Prosch zurück. Mehr als 100 Jahre später zeigten epidemiologische Studien, dass Populationen wie Grönlandeskimos, in denen große Mengen an Fisch Bestandteil der ursprünglichen Verzehrsgewohnheiten sind, eine geringere Inzidenz an Myokardinfarkten, Asthma, Psoriasis und Diabetes als eine vergleichbare dänische Kontrollgruppe aufwiesen [Kromann und Green 1980].

In den Siebzigerjahren untersuchten die dänischen Ärzte Dyerberg und Bang erstmals die Ursachen der Seltenheit von Herzinfarkten bei Eskimos in Grönland. Anhand sorgfältiger Ernährungsprotokolle und Untersuchungen der Einwohner eines Distrikts an der Nordwestküste Grönlands, in dem die ursprünglichen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten der Eskimos erhalten waren, kamen sie zu dem Ergebnis, dass der hohe Gehalt an langkettigen und hochungesättigten Fettsäuren, den sogenannten Omega-3-Fettsäuren, in der Kost von großer gesundheitlicher Bedeutung ist [Bang et al. 1976].

Dies widersprach allerdings der allgemein gültigen Lehrmeinung, dass eine fettreiche Kost die Arterienverkalkung begünstigt und andererseits eine fettarme Ernährung zur Vorbeugung von vielen Stoffwechsel- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen von großer Bedeutung ist. Das nicht nur die Menge sondern vielmehr die Art des zugeführten Fettes ausschlaggebend ist, wurde spätestens mit der bisher umfangreichsten Herzinfarktpräventionsstudie (GISSI-Präventionsstudie) an über 11.000 Patienten belegt [Anonymous 1999].

Basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen der siebziger und achtziger Jahre in den klassischen Indikationsgebieten Herzinfarkt, Fettstoffwechselstörungen,

Hypertonie, Rheuma und Psoriasis, befaßt sich die Forschung in den letzten Jahren zunehmend mit neuen Bereichen, allen voran im Fachgebiet der Immunologie und der Krebsforschung.

Obwohl es auch für die Genese verschiedener Tumorerkrankungen, insbesondere Brustkrebs und Kolonkarzinom, als gesichert scheint, dass eine hohe Fettzufuhr einen potentiellen Risikofaktor darstellt [Howe et al. 1991], ist die Inzidenz einiger häufig vorkommender Tumorarten bei Eskimos trotz ihres hohen Fettverzehr relativ gering [Berg 1975].

In Japan verdoppelte sich die Rate der jährlichen Todesfälle durch Brustkrebs zwischen 1955 und 1975. In diesem Zeitraum gab es einen Wandel von der traditionellen japanischen Kost, die reich an Fisch und See gras ist, hin zu einer Kost nach dem Vorbild der westlichen Länder [Hirayama 1978].

Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass auch hinsichtlich der Karzinogenese die Art des zugeführten Fettes von größerer Bedeutung ist als die Gesamtfettzufuhr.

1.2 Omega-3-Fettsäuren

1.2.1 Struktur

Die Omega-3-Fettsäuren gehören wie die Omega-6-Fettsäuren zur Gruppe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Der entscheidende Unterschied zwischen den Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren besteht in der Position der für sie typischen Doppelbindungen im Molekül (Abb. 1.1). Bei den Omega-3-Fettsäuren ist die erste von mehreren Doppelbindungen am 3. Kohlenstoffatom ausgehend vom Methylende des Fettsäuremoleküls lokalisiert, bei den Omega-6-Fettsäuren erst am 6. Kohlenstoffatom. Die Omega-3-Fettsäuren enthalten bei gleicher Kettenlänge jeweils eine Doppelbindung mehr als die Omega-6-Fettsäuren.

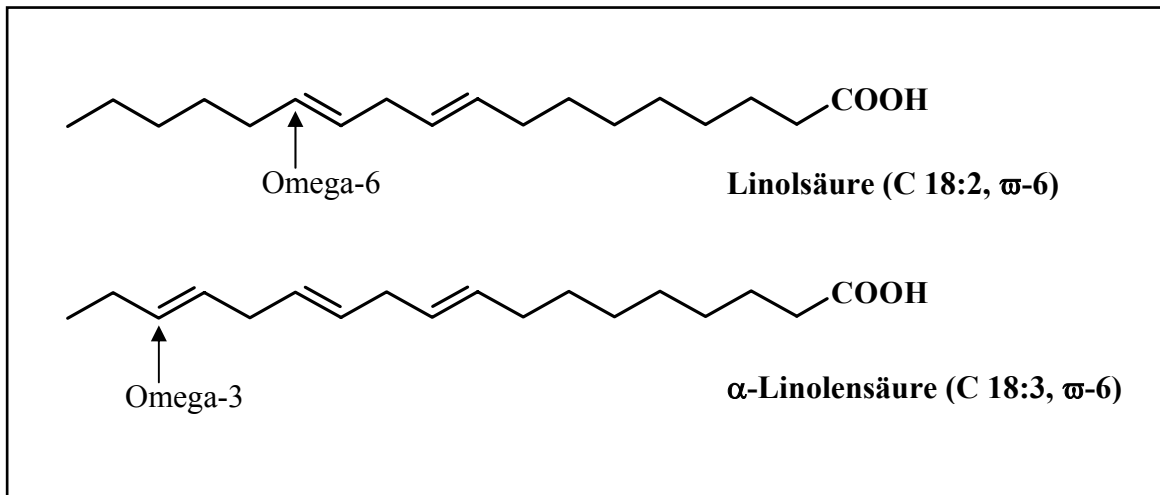


Abb. 1.1 Strukturformeln für ω -3- (α -Linolensäure) und ω -6- (Linolensäure) -Fettsäuren

Weiterhin kommt es zur Ausbildung isomerer Formen, der *cis*- und *trans*- Form. Man spricht von der *cis*-Isomerie, wenn gleichartige Substituenten auf derselben Seite der Doppelbindungen liegen, andernfalls von der *trans*-Isomerie. Fast alle in der Natur vorkommenden ungesättigten Fettsäuren liegen in der *cis*-Form vor.

1.2.2 Vorkommen

1.2.2.1 Omega-3-Fettsäuren

Die Gruppe der Omega-3-Fettsäuren umfaßt die α -Linolensäure (ALA; 18:3), die Eikosapentaensäure (EPA; 18:5) und die Dokosahexaensäure (DHA; 22:6). Die α -Linolensäure kommt in bedeutenden Mengen nur in Leinöl (50-65%) und in Sojaöl (10%) vor [Rose und Connolly 1999]. Sie macht in der Ernährung des Menschen einen Anteil von weniger als 2% der zugeführten Energie aus [Wolfram 1995]. Die im menschlichen Organismus vorkommenden langkettigen Omega-3-Fettsäuren Eikosapentaensäure (EPA) und Dokosahexaensäure (DHA), die sich von der α -Linolensäure ableiten, kommen in größeren Mengen nur in Kaltwasserfischen wie Hering, Lachs, Makrele und Thunfisch vor, die wiederum die entsprechenden Vorstufen aus marinen Algen beziehen (Tab. 1.1). Während Eskimos in Grönland mehr als 10 g dieser beiden Fettsäuren pro Tag zu sich nehmen, verzehren die Bewohner westlicher Industrieländer weniger als 2 g pro Tag [Wolfram 1989].

Tab. 1.1 Die für die menschliche Ernährung wichtigsten Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren und deren Vorkommen

Bezeichnung	Kettenlänge und Zahl der Doppelbindungen	Wichtigste Nahrungsquellen
<i>Omega-3-Fettsäuren</i>		
α -Linolensäure	C 18:3	Leinöl, Sojaöl, Rapsöl
Eikosapentaensäure	C 20:5	Seefische (Makrele, Lachs, Hering, Sardine, Thunfisch)
Dokosahexaensäure	C 22:6	Seefische
<i>Omega-6-Fettsäuren</i>		
Linolsäure	C 18:2	Pflanzenöle (Sonnenblumen-, Mais-, Saflor-, Distelöl)
Arachidonsäure	C 20:4	Fleisch (nur in geringen Mengen)

1.2.2.2 Omega-6-Fettsäuren

Hauptvertreter der Omega-6-Fettsäuren ist die Linolsäure (LA; 18:2). Sie ist reichlich in vielen Pflanzenölen und daraus hergestellten Margarinesorten enthalten [Groom 1993] (Tab. 1.1). Die Linolsäure und die aus der gleichen Lipidgruppe stammende γ -Linolensäure (GLA; 18:3) dienen als Präkursoren der Arachidonsäure (AA; 20:4). Die AA kommt als Nahrungsbestandteil vorwiegend in Fleisch vor. Der Gehalt ist stark abhängig vom Anteil der Linolsäure und der γ -Linolensäure in dem für die Tierernährung eingesetzten Futtermittel.

Unter den gegenwärtigen Ernährungsbedingungen in Mitteleuropa und Nordamerika überwiegen im Nahrungsangebot derzeit stark die Omega-6-Fettsäuren, insbesondere die Linolsäure. Das Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren liegt in den Vereinigten Staaten bei 10:1, während vor Beginn des Industriezeitalters Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren ungefähr zu gleichen Teilen aufgenommen wurden [Raper et al. 1992]. Zahlreiche Hinweise belegen, dass eine erhöhte Zufuhr an Linolsäure und ein gesteigertes Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren, Risikofaktoren hinsichtlich in westlichen Ländern häufig vorkommender Tumorerkrankungen, Herz-

Kreislauf-Erkrankungen und chronisch entzündlicher Erkrankungen, darstellen [Horrocks und Yeo 1999].

1.2.3 Metabolismus

Sowohl die bekannteren Omega-6-Fettsäuren als auch die Omega-3-Fettsäuren gehören zu den essentiellen Nahrungsbestandteilen, das heißt der menschliche Organismus ist nicht in der Lage, diese Fettsäuren in ausreichendem Maße zu synthetisieren und ist somit auf eine nutritive Zufuhr angewiesen [Rose und Connolly 1999]. Jedoch ist eine Umwandlung der verschiedenen Fettsäuren ineinander innerhalb der „Familien“ möglich. So kann Linolsäure durch eine Reihe von Desaturierungs- und Elongierungsschritten zu Arachidonsäure und α -Linolensäure zu Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure metabolisiert werden (Abb. 1.2) [Sprecher 2000].

Eine Interkonversion von Omega-6 in Omega-3-Fettsäuren oder umgekehrt, ist im menschlichen Organismus nicht möglich. Der Desaturierungsschritt von den Omega-6-Fettsäuren zu den Omega-3-Fettsäuren findet nur in Algen und grünen Blättern auf der Stufe der Linolsäure statt [Von Schacky und Weber 1985].

Allerdings sind auch die Kettenverlängerungs- und Desaturierungsvorgänge innerhalb der Omega-3- und Omega-6-Fettsäurefamilien durch Aktivitätsunterschiede der beteiligten Enzyme begrenzt. Dem ersten Enzym dieser Stoffwechselkette, der Δ -6-Desaturase, kommt dabei eine Schlüsselfunktion zu. Zum einen bevorzugt die Δ -6-Desaturase die Omega-3-Fettsäuren als Substrat, so daß bei erhöhter Zufuhr von α -Linolensäure kompetitiv die Desaturierung von Linolsäure gehemmt wird. Zum anderen besitzt die Δ -6-Desaturase im menschlichen Organismus nur eine geringe Aktivität, so dass die Umwandlung von C18- in C20-Fettsäuren beim Menschen nur in begrenztem Umfang stattfindet [Rose und Connolly 1999]. Auch konnte gezeigt werden, dass die α -Linolensäure als Vorstufe der längerkettigen Omega-3-Fettsäuren Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure im Organismus überwiegend zu CO₂ und Wasser katabolisiert wird [Zöllner 1986], das heißt insgesamt ist die Menge an endogen gebildeten längerkettigen Omega-3-Fettsäuren gering.

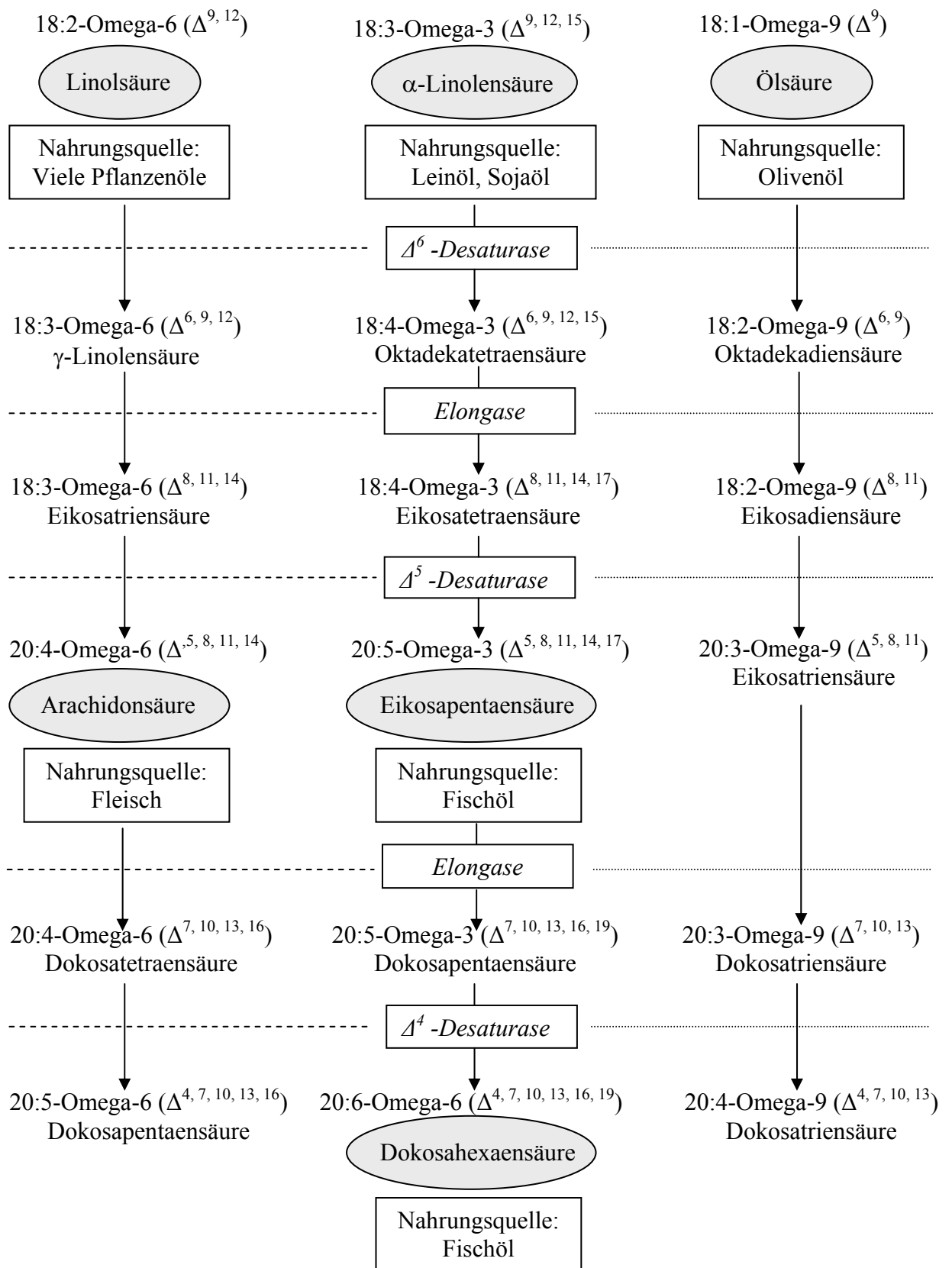


Abb. 1.2 Systematik und Synthesewege der wichtigsten mehrfach ungesättigten Fettsäuren

Eine Konversion von EPA zu DHA scheint im menschlichen Organismus nicht möglich zu sein. Durch Kettenverlängerung kann EPA zwar zu Dokosapentaensäure metabolisiert werden, eine Desaturierung zu DHA findet jedoch nicht statt [Von Schacky und Weber 1985]. Allerdings scheint eine Retrokonversion von DHA zu EPA möglich zu sein [Von Schacky und Weber 1985]. Dieser Effekt erschwert die Differenzierung zwischen den Effekten der EPA und DHA im menschlichen Organismus.

Die Fettsäurefamilien unterliegen an mehreren Stellen des Stoffwechsels einer kompetitiven Beeinflussung. So besteht eine Konkurrenz bei der Resorption im Darm, beim Transport, beim Einbau in die Zellmembranen und bei der Synthese höhermolekularer Metaboliten (Eikosanoide) [Wolfram 1995].

Entsprechend dem Vorherrschen der Omega-6-Fettsäuren in unserer gegenwärtigen Kost, wird das Fettsäuremuster der Zellmembranen überwiegend durch den Gehalt an Arachidonsäure bestimmt. Nimmt jedoch der Anteil von EPA und DHA mit der Kost zu, konkurrieren diese mit den Enzymsystemen des Arachidonsäurestoffwechsels (Abb. 1.3).

EPA und DHA hemmen die Bildung von AA aus Linolsäure. Daraus folgend, kommt es zu einer Akkumulierung von Linolsäure, einer verminderten Konzentration von AA und einem vermehrten Einbau von EPA bzw. DHA in die Membranphospholipide [Rose und Conolly 1999].

Die Freisetzung der Fettsäuren wird durch die Phospholipase A₂ initiiert. In den Membranphospholipiden veresterte DHA hemmt die Phospholipase A₂ und verlangsamt so die Fettsäurefreisetzung.

Nach Freisetzung der Fettsäuren aus den Phospholipiden der Zellmembranen erfolgt die weitere Umsetzung durch die Zyklooxygenase (COX) zu Prostaglandinen und Thromboxanen und durch die Lipoxygenase (LOX) zu den Leukotrienen.

Freigesetzte DHA wird nicht durch die Zyklooxygenase umgesetzt, sondern hat eine hemmende Wirkung auf das Enzym. Durch die Lipoxygenase ist zwar eine Metabolisierung möglich, jedoch kann das Lipoxygenaseprodukt der DHA nicht weiter metabolisiert werden [Croset et al. 1988].

Freigesetzte EPA konkurriert mit der AA um das Enzymsystem der Zyklooxygenase (COX) und der Lipoxygenase (LOX). Da EPA ein wesentlich schlechteres Substrat für

die Zyklooxygenase darstellt als AA kommt es zu einer kompetitiven Hemmung des Enzyms mit nachfolgend herabgesetzter Eikosanoidsynthese [Rose und Conolly 1999].

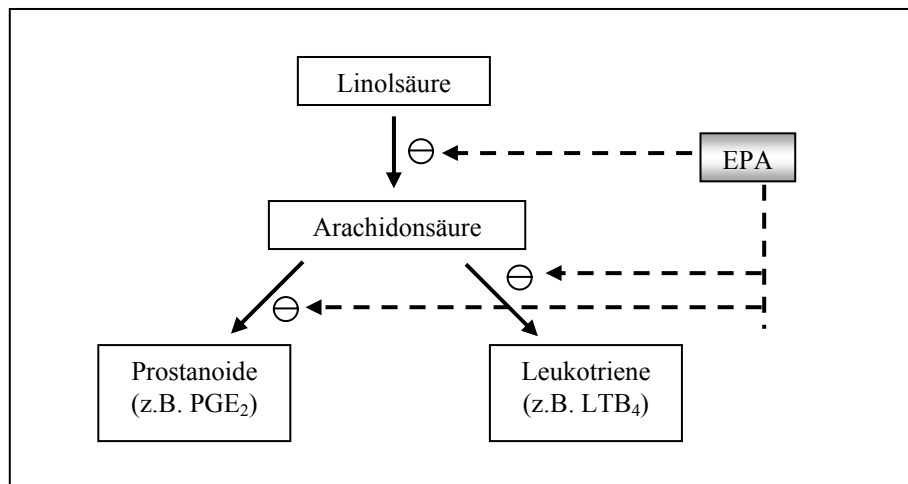


Abb. 1.3 Einfluß von Eikosapentaensäure (EPA) auf die Enzymsysteme des Arachidonsäurestoffwechsels

1.3 Omega-3-Fettsäuren und Tumorerkrankungen

1.3.1 Kolorektales Karzinom

1.3.1.1 Epidemiologie

Das Kolonkarzinom ist eines der häufigsten Tumorarten in den westlichen Industrieländern einschließlich Nordamerika. Im Vergleich zu ländlichen Bevölkerungsgruppen Asiens, Afrikas und einigen Teilen Südamerikas tritt die Erkrankung in diesen sogenannten Hochrisikoregionen mehr als zehn mal so häufig auf [Reddy 1992].

Kolorektale Karzinome können als Interaktionsprodukt einer individuellen genetischen Prädisposition und Umweltfaktoren aufgefaßt werden. Epidemiologische Studien weisen auf einen engen Zusammenhang zwischen der Kolonkarzinogenese und verschiedenen Ernährungsfaktoren hin. Eine besondere Bedeutung scheint dem Verzehr

von Ballaststoffen und dem Fettkonsum zuzukommen [Carroll und Khor 1975, Willett et al. 1990].

So wird die Zunahme des Kolonkarzinoms in Japan, einem Land mit geringerer Inzidenz als in den westlichen Ländern, der Änderung der traditionellen Ernährungsgewohnheiten, insbesondere der Steigerung des Verzehrs gesättigter Fettsäuren und des Gesamtfettkonsums, zugeschrieben [Wynder et al. 1969].

Neben der Menge scheint die Art des verzehrten Fettes eine herausragende Rolle in der Kolonkarzinogenese zu spielen. Hierfür spricht die geringe Kolonkarzinominzidenz bei Alaska- und Grönland-Eskimos, deren Kost große Mengen an Fett, allerdings überwiegend in Form von Omega-3-fettsäurereichem Fischöl, beinhaltet [Bang et al. 1976, Kromann und Green 1980]. Auch in dieser Bevölkerungsgruppe ist eine Zunahme des Karzinomrisikos mit zunehmender Urbanisierung und Einzug westlicher Ernährungsgewohnheiten zu verzeichnen [Lanier et al. 1976, Nielsen und Hansen 1980].

Willett und Mitarbeiter (1990) fanden in einer prospektiven Studie zum Einfluß von Ernährungsfaktoren auf die Kolonkarzinogenese eine negative Korrelation zwischen dem Fischkonsum und der Inzidenz des Kolonkarzinoms. Populationsstudien der Arbeitsgruppe um Caygill scheinen diese Ergebnisse zu bestätigen. Sie konnten nach einer Auswertung der Mortalitätsdaten von 24 europäischen Ländern eine inverse Korrelation mit dem Fisch- und Fischölkonsum in diesen Ländern belegen [Caygill und Hill 1995, Caygill et al. 1996].

1.3.1.2 Ergebnisse experimenteller Studien

Tierexperimentelle Studien konnten die Erkenntnisse epidemiologischer Untersuchungen untermauern und den Nachweis erbringen, daß der wachstumsmodulierende Effekt diätetischer Fette überwiegend durch die Art der zugeführten Fettsäuren bestimmt wird. So konnten am Rattenmodell zur kolorektalen Karzinogenese gesättigte Fettsäuren als starke Tumorpromotoren identifiziert werden [Nigro et al. 1975, Bull et al. 1979, Nicholson et al. 1990].

Der Effekt von Omega-6-Fettsäuren mit Linolsäure als Vorläufer scheint weniger klar zu sein. Einige Studien zeigten einen kokarzinogenen Effekt [Broitman et al. 1977, Locniskar 1985], während andere keinen Effekt sahen [Wilson et al. 1977, Nicholson et al. 1990].

Omega-3-Fettsäuren hingegen scheinen einen protektiven Effekt auszuüben. Im Tierversuch konnte eine Inhibierung sowohl der Initiierungs- als auch der Promotionsphase experimentell induzierter Kolonkarzinome durch Gabe der Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA erzielt werden [Reddy und Maruyama 1986, Minoura et al. 1988, Nelson et al. 1988, Reddy und Sugie 1988, Deschner et al. 1990, Reddy et al. 1991]. Bei Ratten wurde eine Reduktion der gesteigerten Proliferation mukosaler Kryptzellen im Bereich kolorektaler Anastomosen nach Verabreichung einer Omega-3-fettsäurereichen Diät gefunden [Hendrickse et al. 1995]. Darüber hinaus zeigte die Arbeitsgruppe um Calder am Modell der Nacktmaus nach subkutaner Inokulation humaner Kolonkarzinomzellen, daß unter Gabe einer Omega-3-fettsäurereichen Fischöldiät das Wachstum etablierter Tumore gehemmt wird [Calder et al. 1998].

Untersuchungen zum Effekt diätetischer Fette auf die rektale Zellproliferation an gesunden Personen zeigten eine Abnahme der proliferativen Aktivität der Mukosa unter Fischölsupplementation [Bartram et al. 1993]. Auch konnte die, bei Patienten mit hohem Kolonkarzinomrisiko erhöhte, rektale Zellproliferation durch Gabe von Fischöl normalisiert werden [Anti et al. 1992, Anti et al. 1994].

1.3.2 Pankreaskarzinom

1.3.2.1 Epidemiologie

In der westlichen Welt stellt das Pankreaskarzinom die fünfthäufigste Ursache der tumorbedingten Todesfälle dar [Gold 1995]. Das Adenokarzinom des Pankreas ist eines der aggressivsten malignen Erkrankungen des Menschen. Typischerweise erfolgt die Diagnose in einem späten, fortgeschrittenen Stadium, was mit einer ausgesprochen schlechten Prognose und einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5 % einhergeht [Williamson 1988]. Die Häufigkeit des Pankreaskarzinoms steigt stetig mit dem Alter, nahezu 80 % der Erkrankungen treten in der 7. und 8. Lebensdekade auf. Die Inzidenz ist in Industriestaaten höher als in Drittweltländern [Gold 1995].

Eine Reihe von Umweltfaktoren wurden hinsichtlich ihrer etiologischen Bedeutung in der Pankreaskarzinogenese untersucht. Die größte Assoziation scheint dem Rauchen von Zigaretten zuzukommen [Gold 1995]. Aber auch diätetische Faktoren wie ein hoher Fleisch- und Fettkonsum und eine ballaststoffarme Ernährung scheinen prädisponierend in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms zu sein [Gold 1995].

1.3.2.2 Ergebnisse experimenteller Studien

In zahlreichen Zellkulturexperimenten wurde der Effekt verschiedener Fettsäuren auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen untersucht. Falconer et al. (1994a) fanden einen wachstumshemmenden Effekt sowohl durch verschiedene Omega-6- als auch Omega-3-Fettsäuren, wobei der ausgeprägteste Effekt nach Inkubation der Zellen mit EPA zu beobachten war. Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden durch die Studien von Hawkins et al. (1998).

Tierexperimentelle Studien zeigten eine Reduktion präneoplastischer Läsionen nach Fischölgabe [O'Connor et al. 1985].

Humanstudien konzentrieren sich derzeit vornehmlich auf den Effekt von Omega-3-Fettsäuren auf die, insbesondere bei Pankreaskarzinom stark ausgeprägte, Tumorkachexie. Die Arbeitsgruppe um Fearon konnte in einer Reihe von Untersuchungen belegen, dass die Supplementation von Fischöl zu einer Reduktion der als Mediatoren der Tumorkachexie fungierenden Zytokine, wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor (TNF), führt [Barber et al. 1999 a und b, Wigmore et al. 1996 und 1997]. Bei Tumorpatienten konnten erhöhte Serumspiegel der Zytokine IL-6 und TNF nachgewiesen werden. Die vermehrte Zytokinproduktion steht in enger Korrelation mit der Ausprägung der Akutphasereaktion, der hypermetabolen Stoffwechsellage und folglich der Gewichtsabnahme [Falconer et al. 1994b]. In einer Untersuchung von Wigmore et al. (1996) resultierte die Supplementation eines Fischölpräparates in einer Umkehr der katabolen Stoffwechsellage mit progredienter Gewichtsabnahme von 2,9 kg pro Monat hin zu einer Stabilisierung der Gewichtsverhältnisse mit einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von 0,2 kg pro Monat.

1.3.3 Biologische Wirkmechanismen

Lipide sind essentielle Komponenten jeder lebenden Zelle. Eine besondere Bedeutung spielen sie hinsichtlich der Erhaltung der Integrität der Lipiddoppelschicht der Zellmembranen, aber auch als Präkursoren zahlreicher biologisch aktiver Verbindungen [Alexander 1998].

Die Omega-3-Fettsäuren Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure werden wie die der Omega-6-Fettsäurefamilie zugehörigen Arachidonsäure in die Phospholipide von Zellmembranen sowie in die verschiedenen Lipidfraktionen eingebaut, und üben dort ihre biologisch wichtigsten Wirkungen aus (Abb. 1.4) [Rose und Conolly 1999].

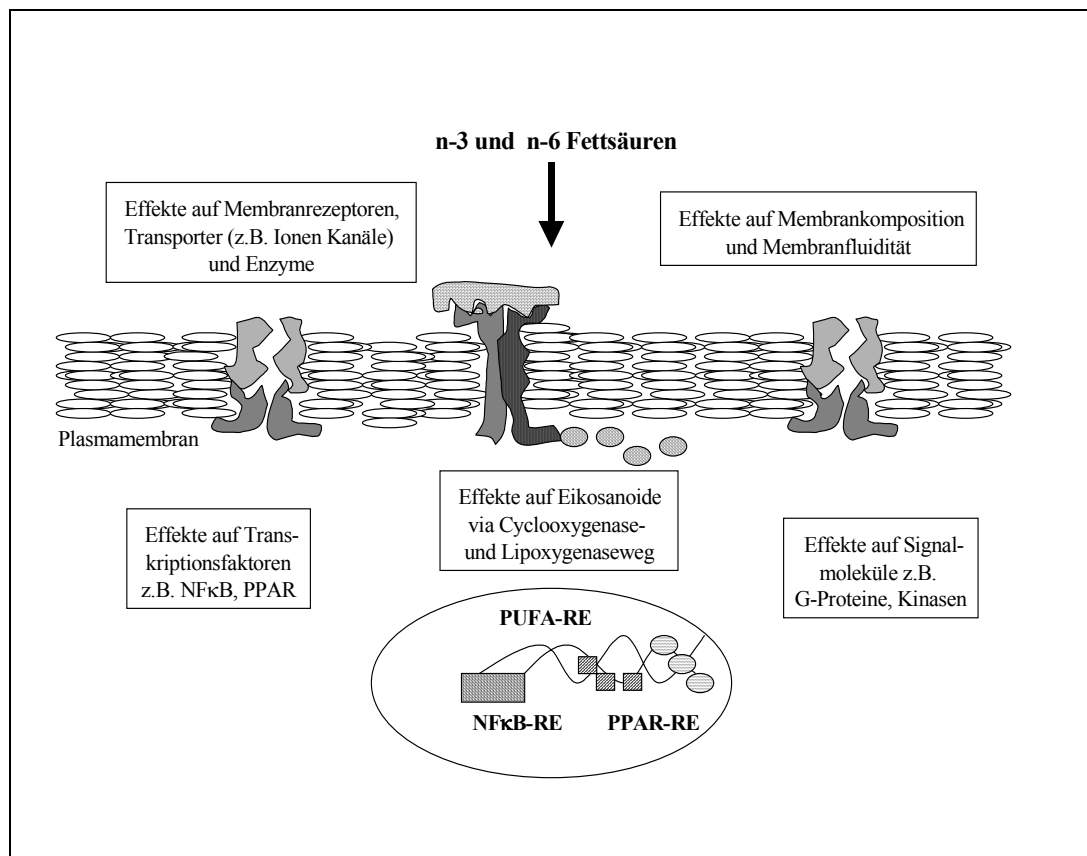


Abb. 1.4 Mögliche Wirkmechanismen der Omega-3-Fettsäuren auf die Zellphysiologie [modifiziert nach Ross et al. 1999]
 NFκB Nukleärer Faktor kappa B, PPAR Peroxisomen-Proliferatoren-aktivierter Rezeptor, PUFA mehrfach ungesättigte Fettsäuren, RE Responsives Element

Die Fettsäurezusammensetzung der Zellmembranen beeinflusst entscheidend die Membranfluidität, die Struktur und Anordnung von membranständigen Rezeptoren, die Bindung von Liganden an Rezeptoren, die Synthese von Lipidmediatoren, wie die Eikosanoide, und die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege (Abb. 1.3) [Alexander 1998].

1.3.3.1 Eikosanoidsynthese

Im Rahmen inflammatorischer Gewebereaktionen werden unter der Wirkung exogener Stimuli die Fettsäuren EPA und AA enzymatisch durch die Phospholipase A₂ aus den Zellmembranen freigesetzt. Anschließend erfolgt die Metabolisierung der Fettsäuren zu Eikosanoiden. Die Umwandlung in Eikosanoide erfolgt durch zwei Enzyme: durch die

Zyklooxygenase zu Prostaglandinen und Thromboxanen und durch die 5-Lipoxygenase zu Leukotrienen [Alexander 1998].

Eikosanoide sind kurzlebige Gewebshormone, die in minimalen Konzentrationen biologisch hoch aktiv sind und regulativ an zahlreichen Stoffwechselprozessen beteiligt sind, so z.B. an Thrombogenese und Atherogenese, Entzündungsreaktionen und Zellproliferation. Die verschiedenen Zelltypen sind je nach Funktion zur Synthese eines spezifischen Musters an Eikosanoiden befähigt [Wolfram 1995].

Die Art und Wirksamkeit der gebildeten Eikosanoide ist von den Fettsäuren, aus denen sie gebildet werden, abhängig. Sie unterscheiden sich in der Anzahl der Doppelbindungen im Molekül und daraus folgernd in ihrer biologischen Aktivität. Mit der AA als Ausgangssubstanz werden sogenannte proinflammatorische Eikosanoide der 2er- und 4er-Familie synthetisiert, während die EPA-Abkömmlinge der 3er- und 5er-Familie mit einer 10 bis 100 fach geringeren biologischen Potenz antiinflammatorisch bzw. antiproliferativ wirken [Fürst und Kuhn 2000] (Abb. 1.5).

Wie bereits erwähnt, wird die Eikosanoidsynthese durch komplexe Interaktionen auf der Stufe der Vorläufermoleküle AA, EPA und DHA reguliert [Samuelsson 1981] (Kapitel 1.2.3). Eine langfristige nutritive Zufuhr von Fischöl resultiert in einer Modifikation des zellulären Fettsäurepools zugunsten der Omega-3-Fettsäuren. Nachfolgend ist eine vermehrte Produktion an antiaggregatorisch wirkendem Prostazyklin I_3 , inaktivem Thromboxan A_3 und antiinflammatorischem Leukotrien B_5 zu beobachten [Weber et al. 1986, Leaf und Weber 1988, Endres et al. 1989]. Gleichzeitig ist die Bildung der AA-Abkömmlinge, so z. B. des proaggregatorischen A_2 , des proinflammatorischen Leukotrien B_4 und des proliferativ wirkenden Prostaglandin E_2 , vermindert. Resultierende zellphysiologische Effekte sind eine Hemmung der Chemotaxis, Aggregation und Endotheladhäsion von Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten [Rose und Conolly 1999].

Seit bekannt wurde, dass den Eikosanoiden neben ihrer Rolle als interzelluläre Botenstoffe möglicherweise auch eine Funktion als intrazelluläre und/oder autokrine Signaltransduktoren zukommt, ist diese Klasse von Mediatoren Gegenstand intensiver Forschung. Insbesondere ihre Rolle hinsichtlich der Regulation von Proliferation und Differenzierung verschiedener epithelialer Zellpopulationen wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht.

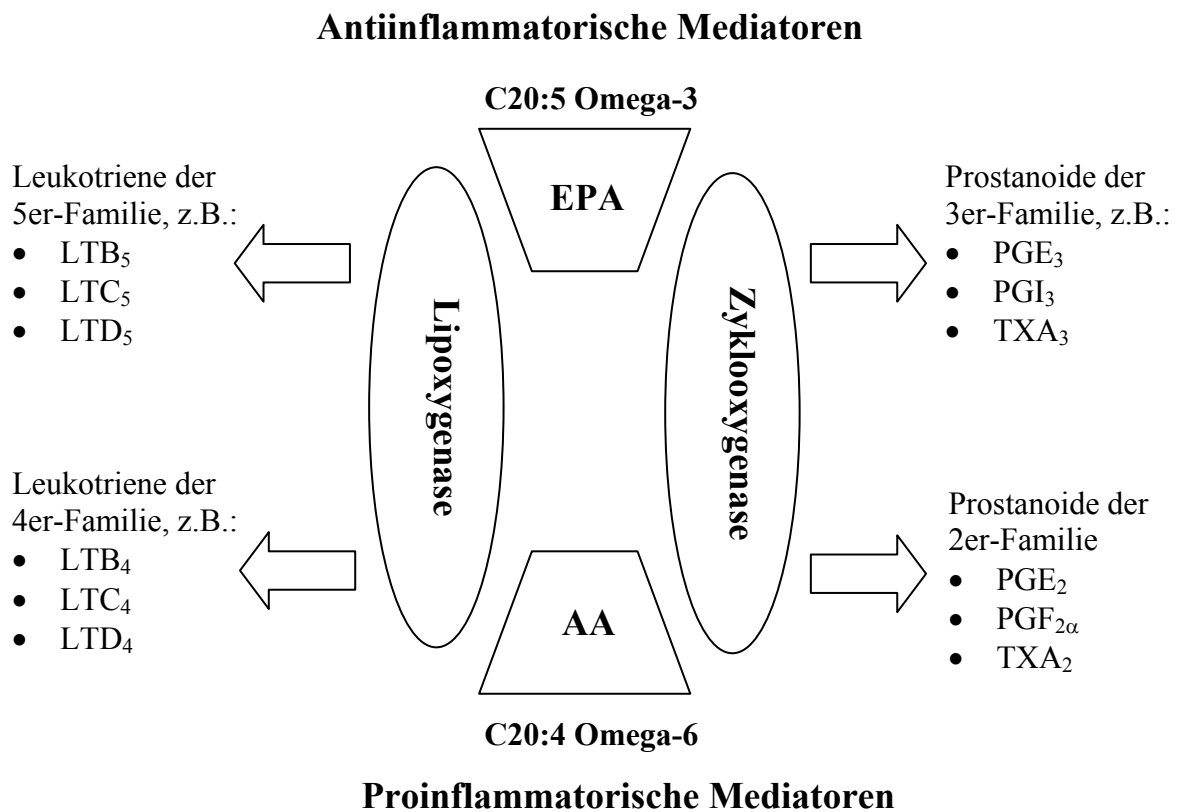


Abb. 1.5 Herleitung der Eikosanoide aus Arachidonsäure und Eikosapentaensäure [nach Fürst und Kuhn 2000]
 AA Arachidonsäure, EPA Eikosapentaensäure, PG Prostaglandin, LT Leukotrien, TX Thromboxan

Den derzeit verfügbaren Erkenntnissen zufolge ist es wahrscheinlich, dass die Eikosanoide neben ihren physiologischen Funktionen maßgeblich an pathophysiologischen Prozessen, so auch der Tumorgenese verschiedener Zelltypen, beteiligt sind [Eberhart und Dubois 1995].

1.3.3.2 Membranfluidität

Zelluläre Membranen sind komplexe Strukturen, die aus unregelmäßigen Anordnungen verschiedener Membrandomänen, bestehend aus Lipiden und Proteinen, zusammengesetzt sind. Fettlösliche Substanzen wie Fettsäuren, können die Plasmamembran penetrieren und somit die Zusammensetzung und Fluidität verändern. Dies ist jedoch nur in eingeschränktem Maße möglich, da die Zelle bestrebt ist, eine relativ konstante Zusammensetzung der Membranphospholipide zu erhalten [Jolly et al.

1997]. Dennoch konnten Studien zur Untersuchung des Effektes verschiedener diätetisch verabreichter Fettsäuren, Veränderungen in der Zusammensetzung und Morphologie von Erythrozytenmembranen nachweisen [Escudero et al. 1998].

Als Bestandteile der Membranphospholipide bestimmen die eingelagerten Fettsäuren wesentlich den Zustand der Zellmembranen, so die Membranfluidität und der davon abhängigen Zellfunktionen.

1.3.3.2.1 Effekte auf Membranproteine

Die Zusammensetzung der Phospholipide in Plasmamembranen beeinflusst maßgeblich die Aktivität membranständiger Rezeptoren und Enzyme, die eine fundamentale Rolle in der zellulären Signalvermittlung spielen [Ross et al. 1999] (Kap. 1.3.3.3).

Weiterhin ist die Membranzusammensetzung von großer Bedeutung für die Funktion von Transportproteinen. Änderungen der Lipiddoppelschicht von Tumorzellen können dementsprechend bedeutende Konsequenzen hinsichtlich der Aufnahme von Nährstoffen und Chemotherapeutika haben [Spector und Burns 1987].

Die Ursachen für diesen Effekt sind derzeit noch Gegenstand der Diskussionen. Möglicherweise führen strukturelle Änderungen in der umgebenden Lipiddoppelschicht zu Konformationsänderungen der Transporterproteine, wodurch es zu Modifikationen der Bindung von Liganden, der Transmembrangängigkeit oder auch der Ausprägung elektrochemischer Interaktionen kommen kann [Spector und Burns 1987].

1.3.3.2.2 Membranfluidität und Lipidperoxidation (LPO)

Mit Zunahme des Anteils mehrfach ungesättigter Fettsäuren (MUFs) und daraus resultierender Erhöhung der Fluidität der Membranen, steigt die Anfälligkeit gegenüber oxidativen Prozessen [Spector und Burns 1987]. Unter der Lipidperoxidation wird der oxidative Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren verstanden. Es handelt sich hierbei um eine autokatalytische Kettenreaktion, die initiiert wird, indem von der Methylgruppe zwischen zwei Doppelbindungen ein Wasserstoffatom durch ein freies Radikal abstrahiert wird. Die Mehrzahl der primären Peroxidationsprodukte ist instabil, wohingegen verschiedene Aldehyde (z.B. Malondialdehyd), die sekundäre Produkte der Lipidperoxidation darstellen, stabil sind und einen potenten inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation ausüben [Baronzio et al. 1995]. Die Lipidperoxidation stellt einen

wichtigen Prozess in der Kontrolle der Zellproliferation und möglicherweise auch der Apoptose dar [Masotti et al. 1988].

Zahlreiche Tierexperimente konnten belegen, daß Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen eine wesentlich geringere Empfindlichkeit gegenüber einer Lipidperoxidation aufweisen [Masotti et al. 1988, Diplock et al. 1994]. Diese verminderte peroxidative Aktivität ist invers mit der Tumorstadiumsrate korreliert [Baronzio et al. 1994]. Als Ursache werden drei Faktoren diskutiert. Zum einen eine verringerte Konzentration mehrfach ungesättigter Fettsäuren zugunsten einfach ungesättigter und gesättigter Fettsäuren, insbesondere Öl- und Stearinsäure [Baronzio et al. 1995], was möglicherweise auf eine konstitutionelle Beeinträchtigung der Δ -6-Desaturase zurückzuführen ist [Dippenaar et al. 1982]. Des weiteren scheinen erniedrigte Cytochrom P450-Spiegel und erhöhte Konzentrationen des antioxidativ wirksamen α -Tocopherol von Bedeutung zu sein [Baronzio 1994].

1.3.3.3 Intrazelluläre Signalvermittlung

Wie bereits erwähnt, beeinflussen mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Aktivität zahlreicher Moleküle, die eine fundamentale Rolle in der intrazellulären Signalvermittlung spielen. Es wird vermutet, dass die Modifikation der Membranzusammensetzung mit einer Änderung der Aktivität von Membranrezeptoren, membranständigen Transportmolekülen und Enzymen, die eine wichtige Rolle in der zellulären Signalvermittlung spielen, einhergeht [Ross et al. 1999]. Die Beweglichkeit und Aktivität von Rezeptorproteinen innerhalb der Membran wird maßgeblich durch deren Fluidität bestimmt. Eine Stimulierung spezifischer Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind, führt zu einer Degradation der Membranphospholipide.

Viele der nachfolgend synthetisierten Metaboliten wie beispielsweise die Eikosanoide (Kapitel 1.1.4.1), Phosphatidylsäure und die sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Ceramide spielen eine herausragende Rolle in der Regulation des Zellmetabolismus.

Die Modulation sekundärer Botenstoffe und die Deregulation zellulärer Signaltransduktionswege spielen eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese. Zahlreiche Studien konnten beispielsweise zeigen, daß die Transformation von Zellen

durch aktivierte Onkogene mit einer Erhöhung der intrazellulären DAG-Konzentration einhergeht. DAG wiederum ist ein intrazellulärer Aktivator der Proteinkinase C [Jiang et al. 1996].

Initialer Schritt nach Stimulation membranständiger Rezeptoren ist in der Regel die Aktivierung von G-Proteinen, Ionenkanälen, Enzymen oder Tyrosinkinase. G-Proteine wirken häufig als Vermittler spezifischer Signale vom Rezeptor an membranständige oder intrazelluläre Enzyme, wie die Adenylatcyclase und die Phospholipase C. Die Adenylatcyclase ihrerseits fördert die Synthese von cAMP und aktiviert die Proteinkinase A (PKA). Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol 4-5 biphosphat (PIP₂) in Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ vermittelt im Endoplasmatischen Retikulum eine Ausschüttung von Ca²⁺. DAG und Ca²⁺ aktivieren die Proteinkinase C (PKC) [Nishizuka 1995].

Signalmoleküle, deren Aktivität durch das Fettsäuremuster der Zellmembranen moduliert werden, können im wesentlichen in drei Gruppen unterteilt werden [Hwang und Rhee 1999]:

- Signalmoleküle, die zur funktionellen Aktivierung und Membrantranslokation einer Fettsäureazylierung bedürfen (z.B. G-Protein, Ras, Src-Kinase)
- Lipidmediatoren, die freie Fettsäuren beinhalten (z.B. PIP₃, Ceramide, DAG)
- Signalmoleküle, deren Aktivität durch verschiedene Fettsäuren beeinflusst werden (z.B. PLC, PKC, PPARs)

Die Funktion einiger dieser Signalmoleküle wird im folgenden ausführlicher beschrieben.

1.3.3.3.1 Proteinkinase C

Die PKC ist ein bedeutender intrazellulärer Botenstoff mit regulativer Wirkung auf Zellzyklus und Genexpression [Alexander 1998]. Die Ebene der PKC stellt einen zentralen Punkt verschiedener Stoffwechselwege dar, die maßgeblich an der Signaltransduktion zur Regulierung zahlreicher zellulärer Funktionen einschließlich Proliferation, Differenzierung, Zellzyklusregulation und Apoptose beteiligt sind [Nishizuka 1995].

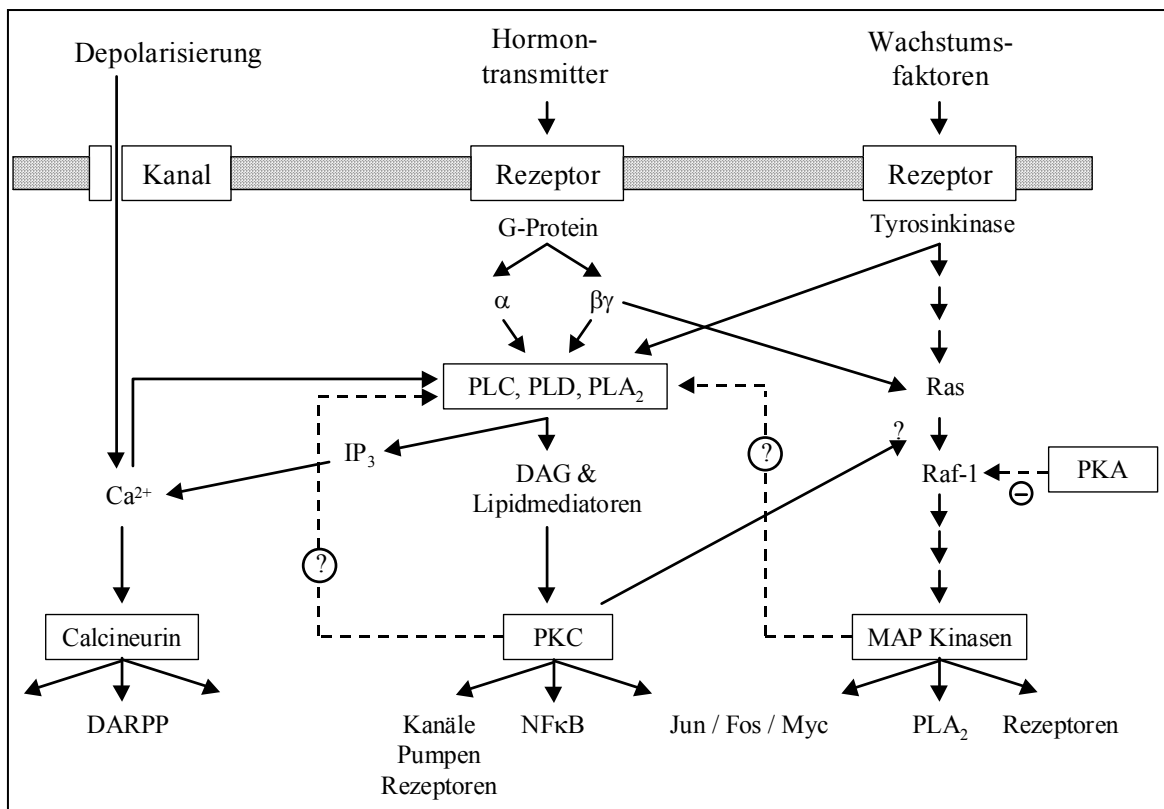


Abb. 1.6 Mögliche Wege der intrazellulären Signalvermittlung - Stellung der Proteinkinase C (PKC) [modifiziert nach Nishizuka 1995]
 PLC Phospholipase C, PLD Phospholipase D, PLA₂ Phospholipase A₂,
 DAG Diacylglycerol, IP₃ Inositoltriphosphat, PKA Proteinkinase A,
 NFκB Nuclear factor kappa B

Die PKC nimmt sowohl direkt als auch vermittelt über die Aktivierung von MAP-Kinasen Einfluß auf Faktoren, die die Gentranskription steuern, wie den nukleären Faktor kappa B (NFκB) (Abb. 1.6) [Nishizuka 1995].

Die Vielfalt der physiologischen Funktionen innerhalb der unterschiedlichen Zellsysteme läßt sich durch das Vorliegen der zahlreichen Isoformen des Enzyms, bisher wurden mindestens 12 identifiziert, erklären [Goldberg und Zidovetzki 1997]. Die unterschiedlichen Zelltypen exprimieren verschiedene PKC-Isoformen, so beispielsweise die PKCs α, β, β_{II} und γ, die sich hinsichtlich der Anforderungen an Aktivatoren und Cofaktoren unterscheiden und so maßgeblich die spezifische Zellantwort bestimmen [Black 2000].

Eine Aktivierung der PKC erfolgt unter anderem durch Ca^{2+} -Mobilisierung, Inositolphospholipide, Prostaglandine, Arachidonsäure, cyclische Nukleotide und Tumorpromotoren [Nishizuka 1984].

Die Rolle der PKC wurde intensiv erforscht, nachdem sie als entscheidender zellulärer Rezeptor karzinogen wirkender Phorbolster identifiziert wurde [Castagna et al. 1982]. Zunehmend wird davon ausgegangen, dass die PKC eine zentrale Bedeutung in der Mitogenese und Tumorpromotion hat [Black 2000]. So wurde in tierexperimentellen Studien eine Überexpression des PKC-Isozyms β_{II} in Adenomen und Karzinomen des Kolon gefunden [Craven und DeRubertis 1992]. Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Transformation von Zellen durch aktivierte Onkogene mit einer Erhöhung der Konzentration an Diacylglycerol (DAG), einem physiologischen intrazellulären Aktivator der PKC, einhergeht [Lacal et al. 1987, Wolfman et al. 1987]. Dies scheint von großer Bedeutung zu sein, da DAG durch Aktivierung der PKC als Mediator der Zellproliferation [Chapkin et al. 1993, Craven und DeRubertis 1992] und maligner Zelltransformation im Kolon [Guillem et al. 1987] identifiziert werden konnte und als Gegenspieler einer Apoptoseinduktion fungiert [Hannun und Obeid 1995].

Die Aktivierung der PKC-Isoformen scheint in hohem Maße durch die Phospholipidkomposition der Zellmembranen gesteuert zu werden. Es wird davon ausgegangen, dass die PKC als inaktive Form im Zytosol gebunden an Phosphoglyceride, primär an Phosphatidylserin vorliegt. In der Gegenwart von DAG, das als Folge eines extrazellulären Stimulus auf die Phospholipase C oder D produziert wird, erfolgt eine Konformationsänderung der PKC, die zu deren Aktivierung führt [Goldberg und Zidovetzki 1997]. Die Aktivierung der PKC durch DAG wird bestimmt durch die Komposition des spezifischen Acylrestes im DAG-Molekül [Goldberg und Zidovetzki 1997].

Ferner konnte gezeigt werden, dass auch die physikochemischen Eigenschaften der Lipiddoppelmembran, wie der Sättigungsgrad und die Membranfluidität, modulierend auf die PKC-Aktivierung einwirken [Goldberg und Zidovetzki 1997]. So greifen sowohl die AA-Abkömmlinge PGE_2 als auch PGE_1 modulierend in die Aktivierung der Proteinkinase C ein [Alexander 1998].

1.3.3.3.2 Nukleärer Faktor kappa B (NF κ B)

Ein typisches Beispiel für die Beeinflussung von Faktoren, die die Transkription von Genen steuern, ist die Aktivierung des nukleären Faktors kappa B (NF κ B). NF κ B ist einer der Transkriptionsfaktoren mit Schlüsselfunktion in der Regulation der Expression

von Genen, die an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Im wesentlichen handelt es sich hierbei um Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle, Akutphaseproteine und Moleküle, die an der Kontrolle von Zellwachstum und Zellteilung beteiligt sind [Ross et al. 1999].

NF κ B liegt im Zytoplasma als inaktive Vorstufe gebunden an das inhibitorische kappa B (I κ B) vor. Eine Stimulation der Zellen beispielsweise durch proinflammatorische Zytokine führt zu einer Degradation des I κ B, wodurch die DNA-bindenden Subeinheiten des NF κ B-Komplexes freigelegt werden und ein Transport des NF κ B in den Zellkern ermöglicht wird. Dort bindet NF κ B an die entsprechende DNA-Sequenz und induziert somit die Transkription [Ross et al. 1999].

NF κ B wird eine antiapoptotische Wirkung zugesprochen. So konnte nachgewiesen werden, dass Embryonen von Mäusen mit fehlender Expressierung des NF κ Bp65/RelA-Gens, aufgrund extensiver Apoptose in der Leber sterben [Beg et al. 1995]. Weiterhin zeigten Zellen nach Behandlung mit TNF, einem starken Aktivator von NF κ B, eine ausgeprägte Resistenz gegenüber apoptotischem Zelltod [Holtmann et al. 1988].

Der Effekt mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf NF κ B wurde in einigen Studien untersucht. So zeigten Untersuchungen an Endothelzellen, dass Linolsäure NF κ B aktiviert und die NF κ B-abhängige Transkription induziert [Henning et al. 1996]. In Studien an der myelo-monozytischen Zelllinie U937 bewirkte AA eine Aktivierung von NF κ B, wohingegen EPA keinen Effekt hatte [Camandola et al. 1996]. Ein möglicher Mechanismus des Effektes von EPA ist eine Stabilisierung des NF κ B/I κ B-Komplexes im Zytoplasma [Ross et al. 1999].

1.3.3.3 Peroxisomen-Proliferatoren aktivierte Rezeptoren (PPAR)

Ein weiterer regulativer Mechanismus auf Transkriptionsebene, der wahrscheinlich durch das vorherrschende Fettsäuremuster beeinflusst wird, wird durch die Familie der PPARs (engl. peroxisome proliferator-activated receptor) vermittelt. PPARs gehören zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren, die regulativ in die Adipogenese und den Fettstoffwechsel eingreifen. Sie kontrollieren die Expression von Genen zur Synthese von Enzymen des Fettstoffwechsels [Schoonjans et al. 1996]. Bisher wurden drei Isoformen der PPARs (α , δ und γ) im Säugetierorganismus identifiziert.

PPAR α wird überwiegend in Geweben mit hohem Fettsäureumsatz und in der Leber exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Genen, die am Fettsäureabbau und an der Entgiftung von Xenobiotika beteiligt sind [Auboeuf et al. 1997, Devchand et al. 1996]. PPAR α induziert den Abbau von Leukotrienen und beeinflusst so maßgeblich die Dauer und Ausprägung von inflammatorischen Prozessen [Devchand et al. 1996]. PPAR δ kommt ubiquitär vor. Seine Funktion ist noch unklar [Auboeuf et al. 1997]. PPAR γ hat eine bedeutende regulative Funktion bei der Differenzierung von Adipozyten. Es wurden bereits zahlreiche Liganden identifiziert, die die Aktivität von PPAR γ modulieren. Hierzu gehören verschiedene Eikosanoide wie das Prostaglandin D₂, das Prostaglandinderivat 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) und bestimmte mehrfach ungesättigte Fettsäuren einschließlich Linolsäure, EPA und DHA [Forman et al. 1995, Kliewer et al. 1997].

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Expression von PPAR γ nicht auf Adipozyten beschränkt ist, sondern auch in anderen Geweben, einschließlich Kolon, nachweisbar ist. So wiesen Saez et al. (1998) mittels RT-PCR nach, daß PPAR γ in hohen Konzentrationen sowohl in neoplastischem als auch normalem Gewebe des Kolons exprimiert wird.

Studien derselben und anderer Arbeitsgruppen zufolge scheint die Aktivierung von PPAR γ eine Rolle in der Kolonkarzinogenese zu spielen. Jedoch zeigen die bisher vorliegenden Ergebnisse keine einheitliche Aussage hinsichtlich des Effektes einer Aktivierung von PPAR γ . So wurde von Sarraf et al. (1998) demonstriert, daß verschiedene humane Kolonkarzinomzelllinien, sowohl in Kultur als auch im Nacktmausmodell, auf die Behandlung mit dem PPAR γ -Agonisten Troglitazon, einem Antidiabetikum aus der Gruppe der Thiazolidin-Derivate, mit einer Reduktion der Tumorstadiumsrate und einer Steigerung der Zelldifferenzierung reagieren.

Die Behandlung von *Min*-Mäusen, die aufgrund des Verlustes des Tumorsuppressorgenes APC für die Entwicklung intestinaler Polypen prädisponiert sind, mit Troglitazon und einem weiteren PPAR γ -Liganden BRL 49653 hingegen führte zu einer Zunahme der Polypenbildung im Kolon [Saez et al. 1998].

Des Weiteren belegen Studien an verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien, dass diese PPAR γ exprimieren, welches durch synthetische Peroxisomen Proliferatoren

aktiviert werden kann [Kilgore et al. 1997]. Dies konnte auch in Humanstudien bestätigt werden [Elstner et al. 1998, Mueller et al. 1998].

1.4 Effekt auf die Wirksamkeit von Zytostatika

Die Phospholipidzusammensetzung der Plasmamembranen von Tumorzellen scheint von großer Bedeutung hinsichtlich einer Modulation der Wirksamkeit zytostatischer Substanzen zu sein. So konnte beispielsweise an Leukämiezellen eine erhöhte Sensibilität gegenüber dem Zytostatikum Doxorubicin nach Anreicherung der Zellmembranen mit hochungesättigten Omega-3-Fettsäuren nachgewiesen werden [Burns und North 1986].

Die zugrundeliegenden Mechanismen für dieses Phänomen sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Zum einen könnten Änderungen der physikalischen Eigenschaften der Plasmamembran nach Supplementation von Omega-3-Fettsäuren für den potenzierenden Effekt verantwortlich sein. Die Membranfluidität und der Transport von Chemotherapeutika werden maßgeblich bestimmt durch das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren in der Plasmamembran [Tsai et al. 1997]. Omega-3-Fettsäuren gehören zu den hochungesättigten Fettsäuren und können somit das Verhältnis der Membranfettsäuren zugunsten der ungesättigten Fettsäuren verändern, was mit einer Steigerung der zellulären Akkumulation von Zytostatika korreliert [Burns und North 1986, Tsai et al. 1997].

Es ist wahrscheinlich, dass neben dem genannten Mechanismus noch andere für die Modulation der Wirksamkeit zytostatischer Substanzen verantwortlich sind. Neben einer erhöhten Akkumulation des Chemotherapeutikums, kann eine vermehrte Lipidperoxidation eine Rolle spielen. Der Einsatz von Chemotherapeutika, die über eine verstärkte Radikalbildung wirken, resultiert in einer peroxidativen Schädigung ungesättigter Fettsäuren. Dies kann durch eine Zunahme der Lipidperoxidation zu einer Steigerung der zytostatischen Aktivität führen, wie im vorherigen Abschnitt ausführlich dargestellt wurde [Germain et al. 1998].

Ein weiterer bedeutender Faktor hinsichtlich der Effektivität chemo- und radiotherapeutischer Maßnahmen ist, dass mit zunehmendem Gehalt an ungesättigten

Fettsäuren die „Flexibilität“ von Erythrozyten steigt. Infolgedessen ist die Durchströmung auch der kleinsten Gefäße und die Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff verbessert [Alexander 1998].

Eine chronische Mangeldurchblutung von Tumorgewebe führt zur Entstehung einer chronischen bzw. akuten Hypoxie. Es wird davon ausgegangen, daß eine chronische Hypoxie aufgrund der schnellen Tumorzellproliferation mit nicht ausreichender Vaskularisierung des Gewebes entsteht. Hypoxische Zellen gewinnen ihre Energie durch anaerobe Glykolyse und sind für einen beträchtlichen Zeitraum lebens- und teilungsfähig. Die Proliferation hypoxischer Zellen stoppt in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus, ein Zustand in dem die Zellen resistent gegenüber Radiotherapie und der überwiegenden Zahl an Chemotherapeutika sind [Baronzio et al. 1994].

Eine entscheidende Determinante in der Entwicklung und dem Wachstum von Tumoren, ist deren Sensitivität gegenüber chemotherapeutischer Behandlung. Das Auftreten von chemotherapieresistenten Tumorzellen ist häufig der limitierende Faktor für eine erfolgreiche zytostatische Therapie. Dementsprechend stellt die Erforschung von Substanzen, die die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika erhöhen einen bedeutenden Beitrag in der Antikrebstherapie.

1.5 Der Einsatz Omega-3-fettsäurereicher Lipid-emulsionen

Fettemulsionen finden Einsatz im Rahmen einer totalen parenteralen Ernährung. Der Anteil von Fettemulsionen in einem parenteralen Ernährungsregime sollte bei 30 bis 40% der aufgenommenen Energie liegen. Bisher wurde davon ausgegangen, dass die Hauptfunktion einer parenteralen Fettapplikation in der Zufuhr von Energie und der Versorgung der Patienten mit essentiellen Fettsäuren lag. Nach den neueren Erkenntnissen scheint den Lipiden darüberhinaus eine wichtige Bedeutung in der Regulation wichtiger metabolischer Funktionen zuzukommen [Dupont und Carpentier 1999].

Handelsübliche Fettemulsionen werden auf der Basis von Sojabohnenöl hergestellt und enthalten als mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) überwiegend Omega-6-Fettsäuren. Die Erkenntnisse über die Bedeutung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei zahlreichen Erkrankungen führten zur Entwicklung neuer Fettemulsionen auf der Basis von Olivenöl und Fischöl.

Nachdem sich die medizinische Forschung schon seit geraumer Zeit mit den klinischen und biochemischen Effekten oral verabreichten Fischöls befasst, beschäftigen sich neuere Untersuchungen mit dem möglichen Nutzen einer Fischölsupplementierung im Rahmen einer parenteralen Ernährung [Fürst und Kuhn 2000].

Die parenterale Verabreichung von Fischölemulsionen kann einige Vorteile gegenüber einer oralen Verabreichung mit sich bringen. Zum einen werden intestinale Verluste umgangen und es ist die Verabreichung relativ großer Mengen an Omega-3-Fettsäuren möglich [Mayer et al. 1998]. Zum anderen scheint die Omega-3-Lipidinfusion gegenüber der oralen Omega-3-Lipidgabe den entscheidenden Vorteil eines raschen Anstiegs des Spiegels an freien Fettsäuren zu haben [Grimminger et al. 1993].

Werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren oral verabreicht, liegen die Mediatorpräkursoren AA und EPA in veresterter Form vor. Nach Digestion und Resorption werden diese umgehend in die Membranphospholipide eingebaut, ohne als freie Fettsäuren in Plasma oder Gewebe in Erscheinung zu treten. Die Liberation der Fettsäuren in den freien Fettsäurenpool und die enzymatische Umsetzung zu den

biologisch aktiven Lipidmediatoren erfolgt erst im Rahmen einer inflammatorischen Gewebereaktion [Grimminger et al. 1993].

Eine EPA-Anreicherung der Zellmembranen und ein Anstieg der EPA-abgeleiteten bzw. Abnahme der AA-abgeleiteten Prostaganoide und Leukotriene ist bei oraler Omega-3-Lipidgabe erst nach mehrwöchiger Behandlung mit den üblichen Dosierungen zu erreichen [Grimminger et al. 1993]. So fanden Purasiri et al. (1994) bei Patienten mit kolorektalem Karzinom einen Anstieg der Serumkonzentrationen an Omega-3-Fettsäuren erst nach 15 Tagen Supplementation von Fischölkapseln. Eine Abnahme der Serumzytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α , etc.), deren Produktion maßgeblich durch die Arachidonsäure und davon abstammender Metaboliten gesteuert wird, war frühestens nach zwei Monaten nachweisbar.

Dahingegen war eine Anreicherung der Zellmembranen mit EPA und eine Zunahme der Eikosanoide mit EPA als Präkursor, bereits nach 3-5 Tagen einer Infusionstherapie mit Omega-3-Lipiden zu verzeichnen. Von besonderer Bedeutung ist darüber hinaus der rasche Anstieg der Serumspiegel freier EPA nach Beginn einer Lipidinfusionsbehandlung mit einem Omega-3-fettsäurereichen Präparat [Grimminger et al. 1993].

Scheinbar birgt die intravenöse Verabreichung von EPA den Vorteil, dass diese ohne den verlustreichen Umweg über die Anreicherung in den zellulären Phospholipiden direkt in die interzellulären Synthesewege der Lipidmediatoren eingeschleust werden [Grimminger et al. 1993].

Die Omega-3-Lipidinfusion eröffnet somit durch die Einschleusung AA-antagonistischer Strukturanaloga (EPA) die Möglichkeit einer relativ raschen Intervention in die Synthesewege der Lipidmediatoren.

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In den bisher vorliegenden Studien wurde überwiegend der Effekt freier Fettsäuren auf das Wachstum von Tumorzellen untersucht. Aus vielen Untersuchungen ist bekannt, dass die klinische und biochemische Wirkung mehrfach ungesättigter Fettsäuren von zahlreichen Faktoren, wie beispielsweise dem Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren und dem Gehalt an Antioxidantien, abhängt.

Ziel dieser Studie war es deshalb, den Effekt einer Fettemulsion mit komplexer Triglyzeridstruktur, die als solche auch am Patienten, im Rahmen einer parenteralen Ernährung, Anwendung findet, zu untersuchen. Diese Fettemulsionen werden auf der Basis natürlicher Öle (z.B. Sojaöl, Fischöl) hergestellt und enthalten dementsprechend das natürliche Fettsäuremuster der nativen Quelle, aber auch die natürlicherweise in diesen Ölen vorkommenden Begleitsubstanzen, wie beispielweise das Antioxidanz α -Tocopherol (Vitamin E). Es sollte geprüft werden, ob diese komplexen Fettemulsionen *in vitro* ähnliche Effekte auf das Wachstum humaner Tumorzellen ausüben wie die in freier Form vorliegenden Fettsäuren.

Es wurden drei Untersuchungsansätze verfolgt:

- Im Vordergrund stand die Untersuchung des Effektes der Omega-3-fettsäurereichen Fischölemulsion auf das Wachstum der Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 und der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2. Zum Einsatz kamen Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation. Dabei sollte sowohl eine Konzentrationskinetik als auch eine Zeitkinetik aufgestellt werden. Zur Evaluierung der möglichen zugrundeliegenden Mechanismen wurden Untersuchungsmethoden zur Apoptosedetektion und zur Analyse des Zellzyklus durchgeführt.
- Wie bereits eingangs erwähnt, wird vermutet, dass die Modifikation der Lipidkomposition zellulärer Membranen durch ein verändertes Angebot an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einer Änderung der Aktivität von Membranrezeptoren einhergeht. Ein potenter Wachstumsfaktor epithelialer Zellsysteme ist der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, engl. epidermal growth factor). Zahlreiche epitheliale Tumoren weisen eine Überexprimierung des EGF-Rezeptors auf. In weiterführenden Experimenten wurde deshalb der Einfluß von

EGF auf das Wachstum der, mit der Omega-3-fettsäurereichen Fischölemulsion vorbehandelten, Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 untersucht.

- Die Phospholipidzusammensetzung der Plasmamembran von Tumorzellen scheint von großer Bedeutung hinsichtlich einer Modulation der Wirksamkeit zytostatischer Substanzen zu sein. In dem dritten Versuchsansatz sollte deshalb der Fragestellung nachgegangen werden, ob eine Verbesserung der Wirksamkeit gängiger Chemotherapeutika in der Antitumorthherapie, nach kombinierter Behandlung mit der Fischölmulsion zu erwarten ist.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Bovines Serumalbumin, BSA	Boehringer, Mannheim
Camptothecin	Sigma, Deisenhofen
Diaminophenylindol, DAPI	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck, Darmstadt
Dulbecco's MEM, DMEM	Gibco, Eggenstein
EGF	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure, 33%ig	Aldrich, Steinheim
FACS Lysis Solution	Becton-Dickinson, Heidelberg
5-Fluorouracil (5-FU)	Medac, Hamburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gemcitabin (dFdC)	Lilly, Giessen
Kälberserum, fötal	Gibco, Eggenstein
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Lipovenös 10% PLR	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Omegaven 10%	Fresenius Kabi, Bad Homburg
PBS-Lösung	Gibco, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Propidiumjodid, PI	Molecular Probes, Leiden, NL
Protease-Inhibitor-Cocktail	Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Triton [®] X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Serva, Heidelberg
Trypsin / EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Zell-Lysispuffer	Biolabs, New Enland, USA

2.2 Kit-Systeme

Apoptose Detektions-Kit (EnzChek Caspase-3-Assay Kit 2)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DNA-Anfärbungskit (Cycle TEST PLUS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Mykoplasmen Detektions-Kit	Roche, Heidelberg
Zellproliferation ELISA (BrdU)	Roche Diagnostics, Mannheim
Zellzyklus-Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Zytotoxizität Detektionskit (LDH)	Boehringer, Mannheim

2.3 Geräte

Photometer	ELISA-Reader Spectra Rainbow (Tecan, Crailsheim) ELISA-Reader Spectra Fluor Plus (Tecan, Crailsheim) Spektrophotometer U-2000 (Hitachi, Japan)
Zellkultur	CO ₂ -Brutschrank BB 6220 (Heraeus, Hanau) Neubauerzählkammer Sterilbank Laminair flow HB 2448 (Heraeus, Hanau)
Zentrifugen	Zentrifuge Biofuge 15R (Heraeus, Hanau) Zentrifuge Rotanta TRC (Hettich, Tuttlingen)
Mikroskop	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena)
Ultraschall	Sonoplus UW 70 (Bandelin, Berlin)
Durchflußzytometer	FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
Präzisionswaage	Analysenwaage R 160P-D1 (Sartorius, Göttingen) Basic MCBB100 (Sartorius, Göttingen)

2.4 Versuchsaufbau

Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellen aus den Vorratsflaschen wurden gepoolt und nach einer Zellzahlbestimmung aufgeteilt. Die Zellen wurden dann in Konzentrationen entsprechend den Anforderungen an die Untersuchungsmethode ausgesät. Eine Behandlung mit den Testsubstanzen erfolgte jeweils 24 Stunden nach Aussaat.

2.4.1 Zelllinien

2.4.1.1 Mia Paca-2

Die Tumorzelllinie Mia Paca-2 hat den Ursprung in einem undifferenzierten duktalem Pankreaskarzinom. Die Zelllinie wurde von Yunis et al. (1977) aus dem Pankreastumorgewebe eines 65-jährigen männlichen Kaukasiers isoliert. Mia Paca-2 Zellen wachsen in Kolonien. Die Verdoppelungszeit der Mia-Paca-2 Zellen beträgt 40 Stunden [Yunis et al. 1977]. Morphologisch handelt es sich um epithel-ähnliche Zellen, die sich zu einem gut etablierten *in-vitro* Modell des Pankreaskarzinoms entwickelt haben.

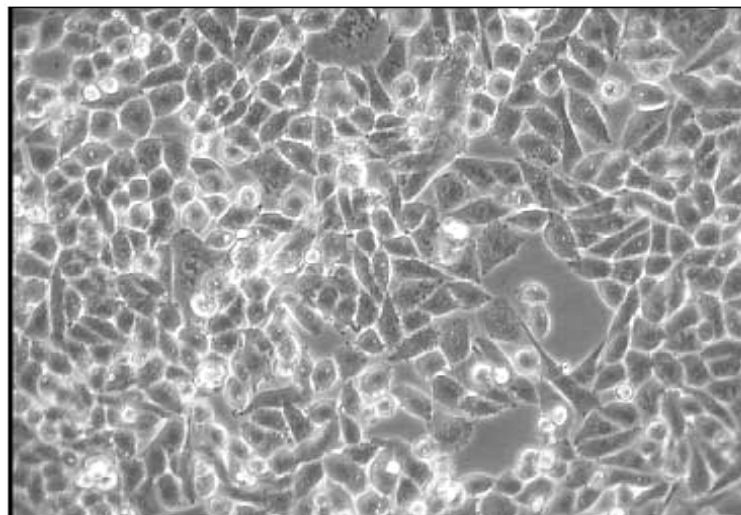


Abb. 2.1 Mia-Paca-2 Zellen

2.4.1.2 Caco-2

Die Zelllinie Caco-2 entstammt einem humanen Kolonadenokarzinom und wurde bisher vielfach verwendet, um die enterozyten-ähnliche Differenzierung unter standardisierten Kulturbedingungen zu untersuchen (Zweibaum et al. 1983). Die Zelllinie wurde 1974 von J.Fogh (1977) aus dem Kolonkarzinom eines 72jährigen Mannes isoliert. Die Verdoppelungszeit beträgt ca. 80 Stunden. Caco-2 Zellen differenzieren spontan, nachdem sie konfluent geworden sind (Hidalgo et al. 1989).

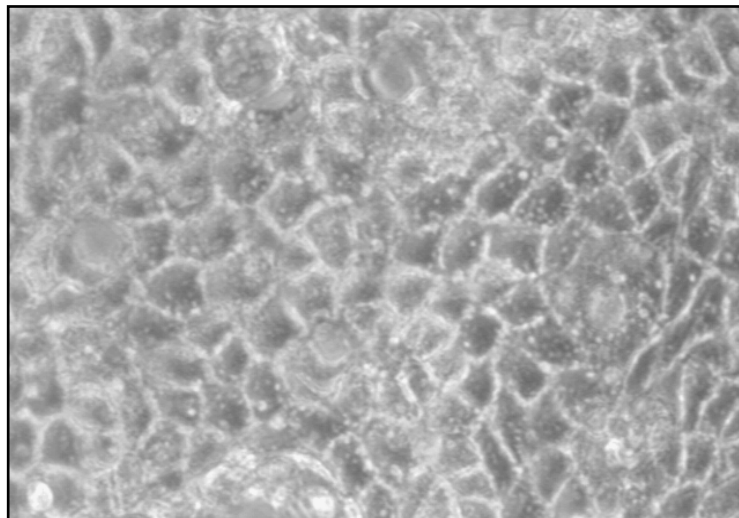


Abb. 2.2 Caco-2 Zellen

2.4.2 Testsubstanzen

2.4.2.1 Lipidemulsionen

Die Omega-3-fettsäurereiche Lipidemulsion (Omegaven 10%), im weiteren als FO bezeichnet, wird auf der Basis von Fischöl hergestellt (10 g Fischöl/100 ml). Das Muster der mehrfach ungesättigten Fettsäuren wird größtenteils durch die Omega-3-Fettsäuren Eikosapentaensäure (EPA) und Dokosahexaensäure (DHA) bestimmt. EPA ist in einer Konzentration von 2,1 g/100 ml und DHA in einer Konzentration von 1,7 g/100ml enthalten.

Tab. 2.1 Fettsäurezusammensetzung der Lipidemulsionen
FO Fischölemulsion, SO Sojaölemulsion

Fettsäuren (%)	FO	SO
Gesättigte Fettsäuren	17	15
Einfach ungesättigte Fettsäuren	23	23
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren	49	62
- Omega-3-Fettsäuren	88	9
- Omega-6-Fettsäuren	12	91
Andere	11	-

Die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen der Fettemulsionen wurden entsprechend des Gehaltes an EPA in der Fischölemulsion festgelegt. In Anlehnung an die Untersuchungen von Falconer et al. (1994a) zum Effekt verschiedener Fettsäuren auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen wurden Zielkonzentrationen von 10 – 100 μ M EPA ausgewählt. Dies entsprach einem Volumen der Fettemulsionen von 0,14 bis 1,44 μ l pro ml Medium.

Kontrollversuche wurden mit einer Omega-6-fettsäurereichen Lipidemulsion (Lipovenös 10% PLR), hergestellt aus Sojabohnenöl (10 g Sojabohnenöl/100 ml), in gleicher Dosierung (0,14 bis 1,44 μ l pro ml Medium) durchgeführt. Die zu Kontrollzwecken eingesetzte Lipidemulsion wird im folgenden als SO bezeichnet. Die Sojaemulsion enthält weder EPA noch DHA. Die vorherrschenden Fettsäuren sind Linolsäure und Ölsäure.

Beide Lipidemulsionen enthalten Vitamin E (FO: 196 mg/L, SO: 97 mg/L).

Die Fettemulsionen wurden freundlicherweise in zertifizierter Form von der Firma Fresenius Kabi, Bad Homburg, zur Verfügung gestellt. Die Zusammensetzung beider Fettemulsionen ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

2.4.2.2 Zytostatika

2.4.2.2.1 Gemcitabin (dFdC)

Gemcitabin (2',2'-Difluorodeoxycytidin, dFdC) findet Einsatz in der Therapie des Pankreaskarzinoms. Es handelt sich hierbei um einen Pyrimidin-Antimetaboliten. Gemcitabin wird intrazellulär durch Phosphorylierung in aktive Metaboliten (Gemcitabin-Diphosphat, dFdCDP und Gemcitabin-Triphosphat, dFdCTP) umgewandelt. Der entscheidende Wirkungsmechanismus besteht in dem Einbau von dFdCTP in die DNA. Die Triphosphate des Nucleosidanalogs konkurrieren mit den zellulären Deoxyribonucleotiden um den Einbau in die DNA in der Replikationsphase. Der Einbau der Nucleosidanalogs bewirkt eine Terminierung der DNA-Synthese und somit eine Akkumulation der Zellen in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus. Des Weiteren wird die RNA-Synthese durch Gemcitabintriphosphat inhibiert. [Shi et al. 2001].

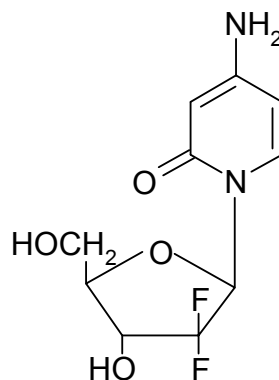


Abb. 2.3 Chemische Struktur von Gemcitabin (dFdC)

2.4.2.2.2 5-Fluorouracil (5-FU)

5-Fluorouracil ist ein Uracil- bzw. Thymin-Antagonist. Fluorouracil blockiert nach Umwandlung in 5-Fluordesoxyuridin-Monophosphat die Thymidilatsynthetase und damit die Methylierung von Desoxyuridylsäure zu Thymidilsäure. Die Folge ist eine Hemmung der DNA-Synthese. Daneben wird 5-Fluordesoxyuridin-Monophosphat als falscher Baustein in die RNA eingebaut.

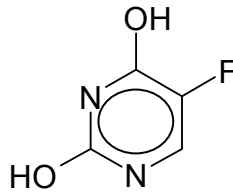


Abb. 2.4 Chemische Struktur von 5-Fluorouracil (5-FU)

2.4.3 Versuchsdesign

- Die Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen erfolgte bei der alleinigen Behandlung der Zellen (Mia-Paca-2 und Caco-2) mit den Lipidemulsionen in aufsteigenden Konzentrationen von 0 bis 1,44 μl pro ml Medium (entsprechend einer Konzentration von 0 – 100 μM EPA in der Fischölemulsion) für 24, 48 und 72 h bei 37°C im Brutschrank. Ein zytotoxischer Effekt der eingesetzten Konzentrationen wurde in Vorversuchen mittels eines Zytotoxizitätstestes (siehe 2.6.3) ausgeschlossen.
- Zur Untersuchung des Effektes von EGF auf vorbehandelte Mia-Paca-2 Zellen wurden die Zellen für 36 Stunden mit den Lipidemulsionen (0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ entsprechend 50 μM EPA in FO) präinkubiert und anschließend für weitere 12 Stunden mit oder ohne EGF (20 ng ml^{-1}) inkubiert. 24 Stunden vor Zugabe von EGF wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgesetzt.
- Für die Kombinationsversuche mit den Chemotherapeutika wurden die Zellen nach einem festgelegten Schema mit aufsteigenden Konzentrationen der Fischölemulsion und der Zytostatika behandelt.

für Mia-Paca-2 Zellen:

- (1) 1 nM dFdc mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)
- (2) 5 nM dFdc mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)
- (3) 10 nM dFdc mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)

für Caco-2 Zellen:

- (1) 0,25 μM 5-FU mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)
- (2) 0,5 μM 5-FU mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)
- (3) 1,0 μM 5-FU mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)

Die Experimente wurden für jeden Testansatz mindestens dreimal an aufeinanderfolgenden Passagen durchgeführt.

2.5 Methoden

2.5.1 Zellkultur

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Bovines Serumalbumin, BSA
- Dimethylsulfoxid, DMSO
- Dulbecco's MEM, DMEM
- Kälberserum, fötal
- PBS-Lösung
- Penicillin-Streptomycin
- Rinderserumalbumin
- Trypanblau
- Trypsin
- Trypsin / EDTA-Lösung
- Mykoplasmen Detektions-Kit
- CO₂-Brutschrank BB 6220
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135
- Neubauerzählkammer
- Sterilbank Laminair flow HB 2448
- Zentrifuge Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)

Durchführung:

Die Zellen wurden jeden zweiten Tag mit einem Phasenkontrastmikroskop auf ihre Entwicklung und etwaige bakterielle und/oder mykologische Kontamination überprüft. Zur Feststellung der Mykoplasmenfreiheit wurde einmal im Monat ein Detektions-Kit herangezogen. Das Testprinzip basiert auf einer ELISA-Technik und beinhaltet polyklonale Antikörper zum Nachweis der am meisten verbreiteten Mycoplasmen/Acholeplasmen-Spezies in der Zellkultur (M.arginin, M.hyorhinis, M.laidlawii, M. orale).

Das Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagles Medium mit 10% [v/v] Serum von fötalen Kälbern, 100 µg/ml Streptomycin, 100 E/ml Penicillin) wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 95% Luft, 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit im CO₂-Brutschrank kultiviert. Wenn die Zellen zu etwa 80% konfluent waren wurden sie wie folgt passagiert:

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (PBS) gespült. Die PBS-Lösung wurde wiederum abgesaugt. Zur Ablösung der Zellen wurde 5 ml Trypsin-Lösung (PBS mit 0,25% [w/v] Trypsin, 1% [w/v] EDTA) in die Kulturflaschen gegeben und für 15-30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Der Trypsinierungsvorgang wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Nach Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden wurde das Trypsinieren durch Zugabe von 10 ml Nährmedium gestoppt. Zum gleichmäßigen Suspendieren der Zellen wurde die Lösung einige Male mit einer Pipette aufgesogen und anschließend in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 750 x g wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen (Sediment) wurden in 30 ml Nährmedium resuspendiert und auf drei Kulturflaschen verteilt. Nach ca. zwei Wochen erreichten die Zellen erneut 80% Konfluenz. Alle Arbeiten erfolgten unter den keimfreien Bedingungen der Sterilbank.

2.5.2 Bestimmung der Zellproliferation

Das Zellwachstum lässt sich mit Hilfe zweier Parameter erfassen. Zum einen durch die Bestimmung neu synthetisierter DNA und zum anderen durch den Nachweis einer veränderten Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle.

2.5.2.1 Zellproliferation mittels 5-Bromo-2‘deoxy-Uridin Test

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Zellproliferationskit (BrdU-ELISA)
- ELISA-Reader Spectra Rainbow

Prinzip:

Bei diesem nicht-radioaktiven Test wird das Pyrimidinanalogon 5-Bromo-2‘deoxy-Uridin (BrdU) an Stelle von Thymidin in die DNA der wachsenden Zelle eingebaut.

Durchführung:

Die Zellen wurden auf 96-Loch Platten in einer Dichte von 5×10^3 Zellen in 100 μ l Medium ausgesät und mit Medium plus BrdU unter normalen Wachstumsbedingungen für 2 bis 24 Stunden inkubiert (n=8). Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert, die DNA denaturiert und mit Anti-BrdU-POD behandelt, welches an das BrdU in der neu synthetisierten DNS bindet. Die Immunkomplexe wurden durch eine Substratreaktion detektiert und im ELISA-Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) quantifiziert.

2.5.2.2 Zellzahlbestimmung mit Kristallviolett

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Aqua ad injectabilia
- Essigsäure, 33%ig
- Formaldehyd
- Kristallviolett
- PBS-Lösung
- ELISA-Reader Spectra Rainbow

Durchführung:

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach der Methode von Matsubara et al. (1991).

Die Zellen wurden in 96-Loch Platten in einer Dichte von 5×10^3 Zellen in 100 μ l Medium ausgesät (n=8). Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 5% Formaldehyd (in PBS) für 5 min fixiert, mit PBS gewaschen und mit 50 μ l einer 0,5%igen Kristallviolettlösung (in Aqua dest.) für 10 min angefärbt. Anschließend wurde drei mal mit PBS gewaschen. Die Farbe wurde mit 33%iger Essigsäure (in Aqua dest.) aus den Zellen gelöst und die Absorption im ELISA-Reader (ohne Referenzfilter) bei 620 nm gemessen. Je höher die Absorption, desto größer war die Anzahl der Zellen auf der Platte.

2.5.3 Zytotoxizitätstest

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Triton[®]X-100
- Aqua ad injectabilia
- Zytotoxizität Detektionskit (LDH)
- ELISA-Reader Spectra Rainbow

Prinzip:

Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in allen Zellen vorhanden ist. Wird die Plasmamembran beschädigt, erfolgt eine rasche Abgabe von LDH in das Zellkulturmedium. Das Testprinzip beruht auf der Reduzierung von NAD^+ zu NADH/H^+ durch die LDH vermittelte Konversion von Laktat zu Pyruvat. In einem zweiten Schritt transferiert ein Katalysator H/H^+ vom NADH/H^+ zum Tetrazoliumsalz INT, das zu Formazan reduziert wird. Ein Anstieg der LDH-Aktivität im Zellüberstand korreliert direkt mit der gebildeten Formazanmenge.

Durchführung:

Die Zellen wurden in 96-Loch-Platten in einer Dichte von 5×10^3 Zellen in 100 μ l Medium ausgesät (n=8). Nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen wurden 100 μ l Überstand abpipettiert und in eine neue 96-Loch-Platte überführt. Nach Zugabe von 100 μ l der Reaktionssubstanz wurde bei Raumtemperatur unter Ausschluß von Licht für 30

min inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgt bei 500 nm. Die Farbintensität (rot) ist so proportional zur Anzahl der geschädigten Zellen. Als positive Kontrolle wurde eine 1%ige Triton[®]X-100-Lösung eingesetzt, bei der 100% der Zellen geschädigt werden.

2.5.4 Durchflußzytometrie

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- FACS Lysis Solution
- Propidiumjodid, PI
- DNA-Anfärbungskit (CycleTest[™] Plus DNA Reagent Kit)
- RNase
- Zellzyklus-Kit
- Durchflußzytometer (FACScalibur)
- Computerprogramm ModFit LT2.0
- Multi-Cycle-Programm CellQuest

Prinzip:

Die Durchflußzytometrie stellt ein optisches Meßsystem für einzelne, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte, Partikel dar. Sie basiert auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, d.h. der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluorochromen. Die mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Partikel werden kontinuierlich hintereinander an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge, welches in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Die Durchflußrate (Partikel/Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert (Abb.2.4).

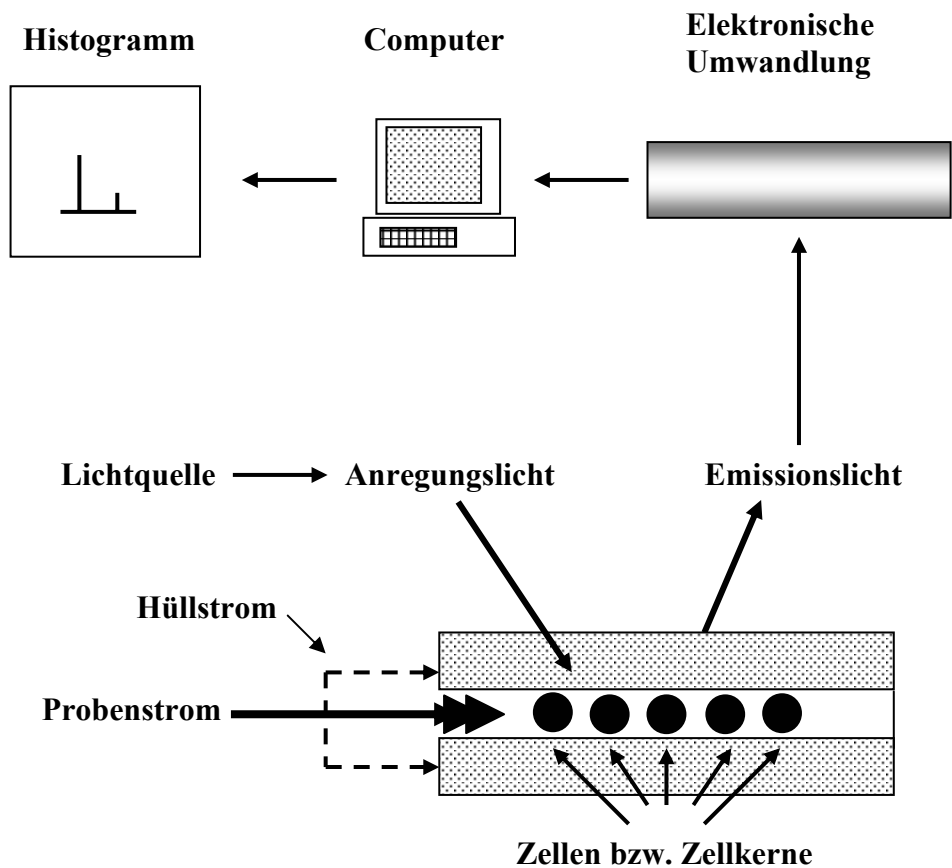


Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Meßprinzips bei der Durchflußzytometrie

2.5.4.1 Zellzyklusanalyse

Bei der DNA-Gehaltsmessung einer proliferierenden Zellpopulation ergibt sich ein dem Zellzyklus entsprechendes Verteilungsmuster. In der Zellzyklusanalyse können verschiedene Phasen erfaßt werden (Abb. 2.6).

- **G₀/G₁-Phase:** Zeitraum zwischen der letzten mitotischen Teilung und dem Beginn der DNA-Synthese einer Zelle. Die Zelle hat in diesem Intervall den einfachen diploiden DNA-Gehalt.
- **S-Phase (Synthese-Phase):** DNA-Replikation, kontinuierlicher Anstieg bis zum Erreichen des doppelten diploiden DNA-Gehaltes.
- **G₂/M-Phase:** In der G₂-Phase synthetisiert die Zelle mitotisch aktive Enzyme und es laufen postrepiklative Reparaturmechanismen ab. Der DNA-Gehalt verändert

sich nicht mehr. In der sich anschließenden M-Phase (Mitose-Phase) teilt sich die Zelle in zwei diploide Tochterzellen, die daraufhin in die G_1 -Phase eines neuen Zellzyklus, respektive in die Ruhe-Phase G_0 , eintreten.

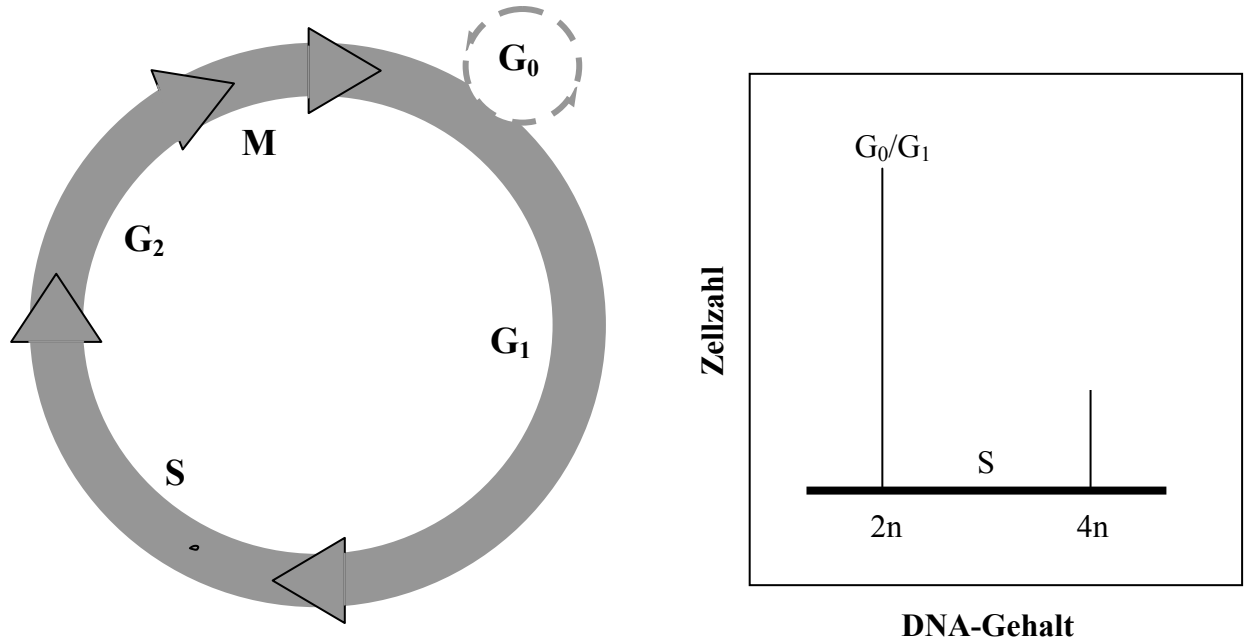


Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen und des dazugehörigen 1-Parameter-Histogramms. G_0/G_1 -Zellen haben einen einfachen diploiden DNA-Gehalt, welcher in der S-Phase kontinuierlich ansteigt bis zum doppelten diploiden DNA-Gehalt in der G_2/M -Phase.

Durchführung:

Die Zellen wurden in 6-Loch Platten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen in 2 ml Medium ausgesät ($n=3$). Nach Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen für 72 Stunden erfolgte die Anfärbung der Zellen mit dem CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit. Nach dieser Methode erfolgt zunächst eine Auflösung der Zellmembranlipide durch Tetrahydrochlorid und eine Eliminierung des Zellzytoskeletts und der nukleären Proteine mittels Trypsin. Vorab ist zusätzlich eine Inkubation der Proben mit RNase A zur Verdauung der RNS erforderlich, da der Farbstoff Propidiumjodid (PI) zur Färbung der DNS auch an RNS bindet. Propidiumjodid wird stöchiometrisch an die isolierten Nuklei gebunden. Die DNS-Durchflußzytometrie wurde mittels FACScalibur durchgeführt. Im Anschluß an die durchflußzytometrische Messung wurden die

gespeicherten Daten transformiert und mittels der Computerprogramme CellQuest und ModFit LT2.0 ausgewertet. Das Multi-Cycle-Programm CellQuest basiert auf dem Prinzip der Kurvenanpassung, welche das DNA-Histogramm als Summe dreier analytischer Funktionen darstellt, die die G_0/G_1 -, die S- und die G_2/M -Phasenverteilung beschreiben. Bei ModFit LT2.0 werden Regionen/Gates definiert und der Prozentsatz an Ereignissen in diesen berechnet.

2.5.5 Apoptosebestimmung

Apoptose ist eine aktive Form des Zelltodes mit spezifisch ablaufenden morphologischen und biochemischen Prozessen, bei der die Zelle selbst ein genetisch kontrolliertes Programm startet, das zu ihrem eigenen Untergang führt [Que und Gores 1996]. Es wird daher auch vom programmierten Zelltod (*engl.* programmed cell death oder PCD) gesprochen.

Der Prozeß der Apoptose läßt sich in drei verschiedene Stadien einteilen: die Initiationsphase, die Effektorphase und die Degradationsphase. Während die Initiationsphase abhängig vom jeweiligen Stimulus ist, sind die steuerbare Effektorphase und die regulationsunabhängige Degradationsphase bei allen apoptotischen Prozessen ähnlich [Kroemer et al. 1995]. Die Initiationsphase der Apoptose ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Zellgröße, das Verschwinden von Mikrovilli und die Formation von Vesikeln an der Zelloberfläche, die Zellorganellen enthalten können. Elektronenmikroskopisch läßt sich zeigen, daß das Chromatingerüst kompakte Aggregate an der inneren Kernmembran bildet. Das Schrumpfen des Zytoplasmas führt zu einer dichten Ansammlung von Organellen und einem allmählichen Kontaktverlust zu den Nachbarzellen. Das endoplasmatische Retikulum dilatiert und bildet Vesikel, die mit der Zelloberfläche verschmelzen und ihr ein blasenartiges Aussehen geben. Der Zellkern verteilt sich in Form vieler Bruchstücke im Zytoplasma. Letztendlich teilt sich die Zelle in intakte, von Zellmembran umhüllte Vesikel sog. „apoptotic bodies“ [Wyllie 1987].

2.5.5.1 Caspase-3-Aktivitäts-Assay

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Camptothecin
- Protease-Inhibitor-Cocktail
- Trypsin / EDTA-Lösung
- Zell-Lysispuffer
- Apoptose Detektions-Kit (EnzChek Caspase-3-Assay Kit 2)
- ELISA-Reader Spectra Fluor Plus
- Neubauerzählkammer
- Zentrifuge Biofuge 15R
- Zentrifuge Rotanta TRC

Prinzip:

Die Aktivierung intrazellulärer Cystein (ICE)-Proteasen wie die Caspase-3 (auch CPP32 bzw. Apopain genannt) wird als frühes Ereignis in der Induktion der Apoptose betrachtet [Nicholson et al. 1995]. Normalerweise liegen Caspasen als Zymogene in inaktiver Form vor, und werden erst durch Proteolyse aktiviert. Die Aktivierung löst eine Kaskade aus, bei der Caspasen andere Caspasen proteolytisch aktivieren und eine Reihe von Zellbestandteilen auflösen. Jede Caspase erkennt eine spezifische Aminosäuresequenz als Substrat [Nicholson et al. 1995].

Die Caspase-3 besitzt eine Substratspezifität für die Aminosäuresequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD). Zur Detektion der Apoptose wurde der EnzChekTM Caspase-3 Assay Kit #2 eingesetzt, der zur Aktivitätsbestimmung der Caspase-3 und anderer DEVD-spezifischer Proteasen (z.B. Caspase-7) dient. Nach Inkubation der Zellen mit den Effektoren wird die cytosolische Fraktion isoliert. Dieser cytosolischen Fraktion wird dann das spezifische CPP32-Substrat Rhodamin 110 (Z-DEVD-R110) angeboten, welches nach hydrolytischer Spaltung durch die Caspase-3 fluoreszenzoptisch gemessen werden kann. Die Hydrolyseprodukte zeigen spektrale Eigenschaften ähnlich dem Fluorescein.

Durchführung:

Die Zellen wurden in 80 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und für 12, 24 bzw. 48 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert (n=3). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die abgelösten Zellen mit dem Medium entnommen und die noch anheftenden Zellen mittels Trypsinierung gelöst. Beide Fraktionen wurden für den weiteren Versuchsablauf zusammen behandelt. Pro Probe wurden 1 x 10⁶ Zellen in PBS aufgenommen und bei 2000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellpellets bei -80°C gefroren, bis alle Proben gewonnen wurden. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und mit Lysispuffer resuspendiert. Nach der kompletten Lyse der Zellen, wurden die Proben bei 2000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 30 Minuten mit dem Substrat Z-DEVD-R110 inkubiert. Die fluoreszenzoptische Messung erfolgte im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 496 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Die Caspase-3-Aktivität wurde in Relation zur Zellzahl angegeben (Caspase-3-Aktivität/10⁶ Zellen).

2.5.5.2 Charakterisierung der Zellmorphologie mittels Fluoreszenzmikroskopie

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Diaminophenylindol, DAPI
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135

Prinzip:

Die Apoptose ist, wie bereits erwähnt, durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen definiert. Zu Beginn der Apoptose kann eine Verringerung des Zellvolumens beobachtet werden. Die Organellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft über einen langen Zeitraum normal weiter. Der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich. An der Cytoplasmamembran ist die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen, ein sogenanntes „membrane blebbing“, zu beobachten. Schließlich beginnen sich membranumschlossene Vesikel, auch apoptotischen Körperchen (engl. „apoptotic bodies“) genannt, von der Zelle abzuschneiden [Wyllie 1987]. Diese

apoptoseassoziierten morphologischen Veränderungen der Zelle sind nach Anfärbung fluoreszenzmikroskopisch sichtbar.

Durchführung:

Für die mikroskopische Auswertung der zellmorphologischen Veränderungen der Zellen nach Behandlung mit den Testsubstanzen, wurden die Proben mit Diaminophenylindol (DAPI) angefärbt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen der Färbelösung gemischt und auf einen Objektträger gebracht. Die Proben wurden dann an einem Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.6 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse sind als Mittelwerte (MV, mean value) ± Standardabweichung des Mittelwertes (standard deviation of the mean, SD) einer bestimmten Anzahl von Experimenten (n) angegeben. Die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede (* $P < 0,05$: schwach signifikant; ** $P < 0,01$: signifikant; *** $P < 0,001$: hoch signifikant) wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test (Berechnung in Winstat für Excel) zum Vergleich zweier Gruppen durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss der Lipidemulsionen auf das Zellwachstum von Mia-Paca-2 und Caco-2 Zellen

In zahlreichen Studien konnte ein tumorwachstumshemmender Effekt von Omega-3-Fettsäuren, insbesondere von Eikosapentaensäure (EPA), belegt werden. In der vorliegenden Studie wurde der Effekt einer Omega-3-fettsäurereichen Lipidemulsion (FO), hergestellt auf der Basis von Fischöl, auf das Wachstum der humanen Pankreaskarzinomzelllinie und der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 untersucht. Zum Ausschluss eines nicht-spezifischen Effektes der Lipidemulsion auf die Zellen wurden parallel Untersuchungen mit einer isoenergetischen Lipidemulsion (SO), gewonnen aus Sojabohnenöl, durchgeführt. Weiterhin wurden bei allen Experimenten nichtbehandelte Zellen (nur Nährmedium) als Kontrollen geführt.

Die Wachstumsrate wurde mittels Erfassung der Zellzahl durch Anfärben der Zellen mit Kristallviolett erfaßt. Die Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der Lipidemulsionen ($0-1.44 \mu\text{l ml}^{-1}$ entsprechend einer Konzentration von $0-100 \mu\text{M}$ EPA in der Fischölemulsion) für 24, 48 und 72 h inkubiert.

3.1.1 Einfluss auf das Wachstum von Mia-Paca-2 Zellen

Die Behandlung von Mia Paca-2-Zellen mit FO verminderte das Zellwachstum zeit- und dosisabhängig (Abb. 3.1).

Die Wachstumskurve nach einer 72-stündigen Inkubation mit FO zeigte, dass bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ EPA ($0,14 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) keine Beeinflussung des Zellwachstums erfolgte, wohingegen zunehmende Konzentrationen ($\geq 25 \mu\text{M}$ EPA entsprechend $\geq 0,36 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) zu einer hochsignifikanten Inhibierung des Zellwachstums führten.

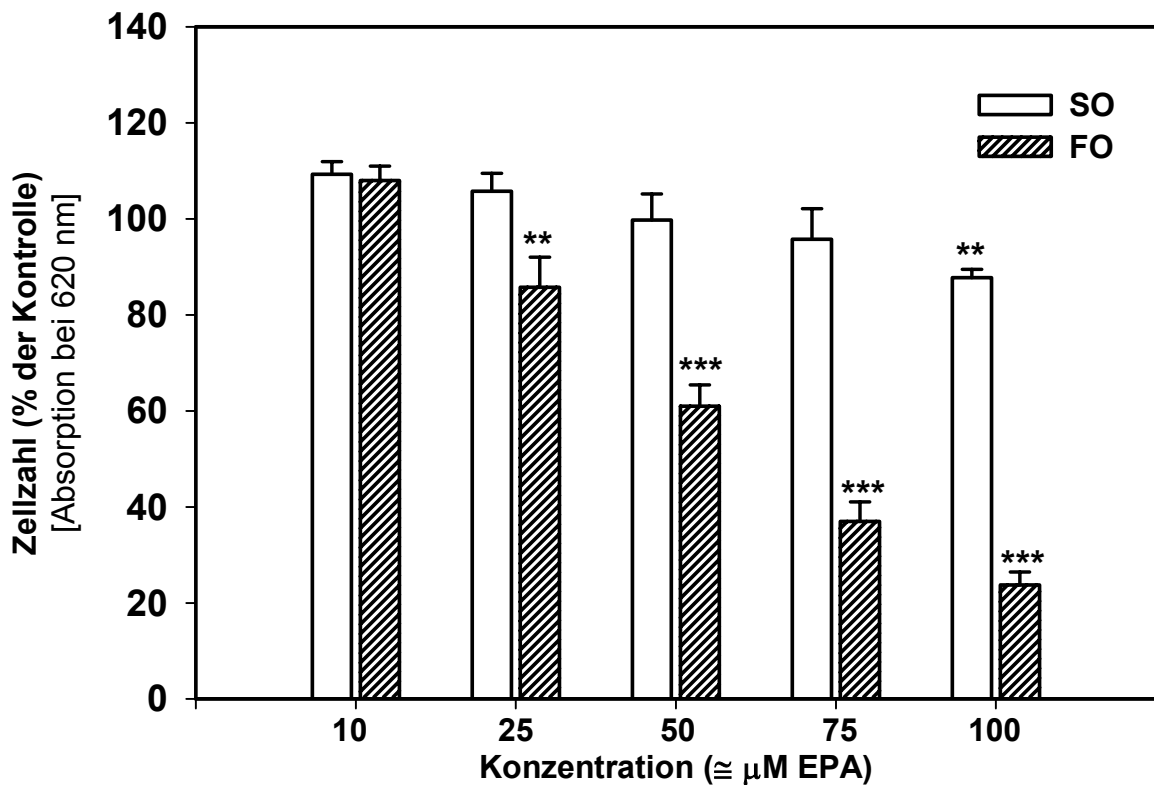


Abb. 3.1 Zellzahl von Mia-Paca-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit steigenden Konzentrationen von FO und SO.
 ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Bei einer Konzentration von 100 μM EPA (1,44 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO) wurde im Vergleich zu nicht behandelten Zellen eine Reduktion der Zellzahl um fast 80% gefunden ($-76\% \pm 5\%$ der Kontrolle, $P < 0,001$).

Die Konzentration der Omega-3-Fettsäuren, bei der eine 50%ige Verminderung der Zellzahl vorlag (IC_{50}), betrug 60 μM EPA und 47 μM DHA (entsprechend 0,9 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO).

Die Behandlung mit SO zeigte nur einen wachstumshemmenden Effekt in der höchsten getesteten Konzentration ($-13\% \pm 3\%$ der Kontrolle nach Behandlung mit 1,44 $\mu\text{l ml}^{-1}$ SO; $P < 0,01$) (Abb. 3.1).

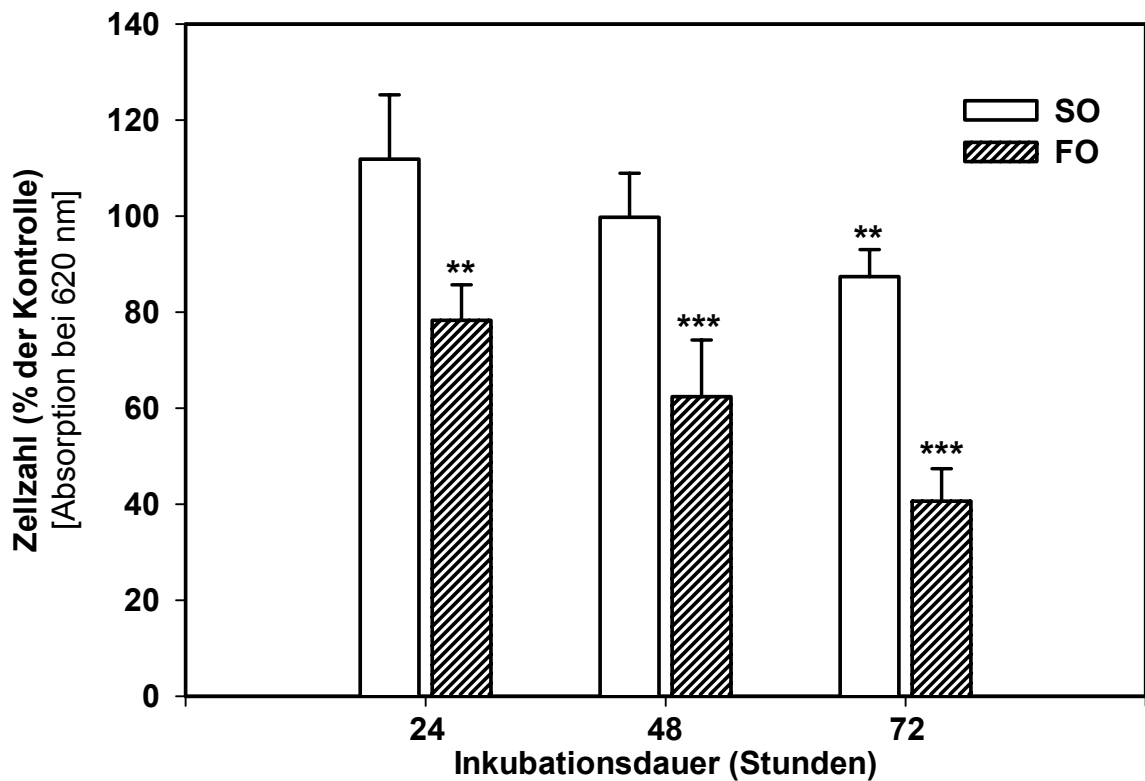


Abb. 3.2 Zellzahl von Mia-Paca-2 Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit FO und SO ($0,72 \mu\text{l ml}^{-1}$ entsprechend $50 \mu\text{M}$ EPA in FO).
 ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Eine Zeitverlaufskurve von Mia-Paca-2 Zellen nach Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ EPA ($0,72 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) für 24, 48 und 72 Stunden ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Nach 24 Stunden zeigte sich eine Verminderung der Wachstumsrate um $-22\% \pm 7\%$ der Kontrolle ($P < 0,001$). Diese Wachstumsinhibierung verstärkte sich auf $-38\% \pm 11\%$ der Kontrolle ($P < 0,001$) nach 48 Stunden und $-59\% \pm 6\%$ der Kontrolle ($P < 0,001$) nach 72 Stunden.

Der Wachstumsverlauf nach Behandlung mit SO ist vergleichend in Abbildung 3.3 aufgeführt (nach 24 h: $112\% \pm 13\%$ der Kontrolle; nach 48 h: $100 \pm 9\%$ der Kontrolle; nach 72 h: $88 \pm 5\%$ der Kontrolle, $P < 0,01$).

3.1.2 Einfluss auf das Wachstum von Caco-2 Zellen

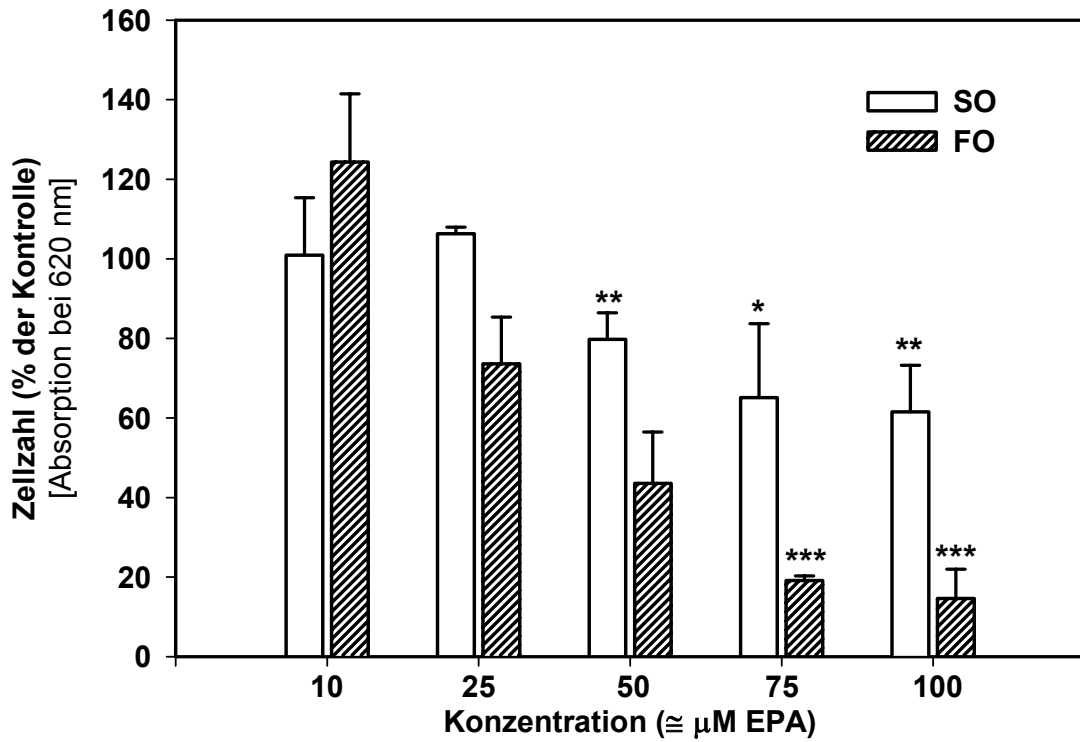


Abb. 3.3 Zellzahl von Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit steigenden Konzentrationen von FO und SO.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Das Wachstum von Caco-2 Zellen wurde durch Inkubation mit Konzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ EPA (entsprechend $0,14 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) gehemmt (Abb. 3.3).

Nach 72-stündiger Inkubation mit FO zeigte sich bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ EPA (entsprechend $0,14 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) eine Proliferationssteigerung ($124\% \pm 19\%$ der Kontrolle), die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Konzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ EPA (entsprechend $0,14 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) bewirkten eine dosisabhängige Wachstumshemmung der Caco-2 Zellen. Ab einer Konzentration von $75 \mu\text{M}$ EPA (entsprechend $1,08 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) waren die Ergebnisse hochsignifikant. Eine Konzentration von $100 \mu\text{M}$ EPA ($1,44 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) resultierte in einer Abnahme der Zellzahl um $85\% \pm 7\%$ der Kontrolle ($P < 0,001$).

SO zeigte einen leicht wachstumshemmenden Effekt, der ab einer Konzentration von $0,72 \mu\text{l ml}^{-1}$ (entsprechend $50 \mu\text{M}$ EPA in FO) statistisch signifikant war (Abb. 3.3).

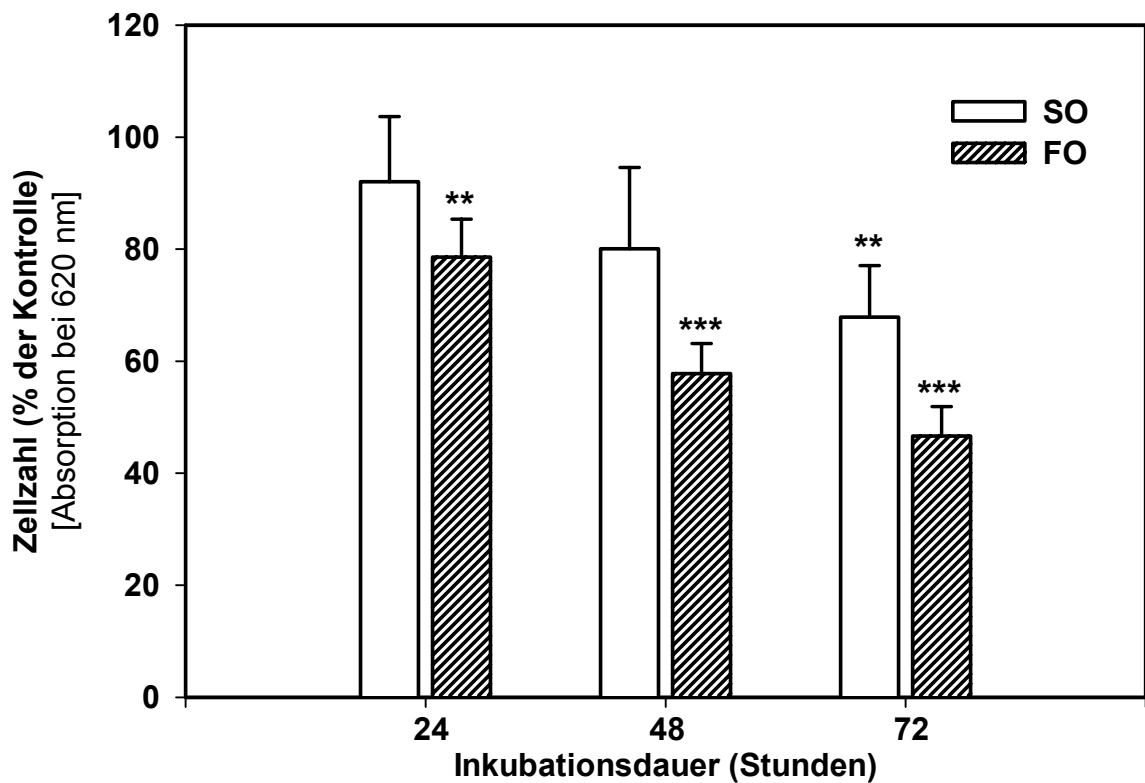


Abb. 3.4 Zellzahl von Caco-2 Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit FO und SO ($0,72 \mu\text{l ml}^{-1}$ entsprechend $50 \mu\text{M}$ EPA in FO).
 ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Der zeitabhängige Verlauf des Wachstums von Caco-2 Zellen nach Behandlung mit $50 \mu\text{M}$ EPA ($0,72 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Nach 24 Stunden Inkubationsdauer war im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen eine Abnahme der Zellzahl auf $79\% \pm 6\%$ ($P < 0,01$), nach 48 Stunden auf $58\% \pm 4\%$ ($P < 0,001$) und nach 72 Stunden auf $47\% \pm 5\%$ der Kontrolle ($P < 0,001$) zu verzeichnen (Abb. 3.4).

SO hatte keinen signifikanten Einfluß nach einer Inkubationsdauer von 24 ($92\% \pm 12\%$ der Kontrolle) und 48 Stunden ($81 \pm 14\%$ der Kontrolle). Nach 72 Stunden war eine Abnahme der Zellzahl auf $70\% \pm 8\%$ der Kontrolle ($P < 0,01$) zu verzeichnen (Abb. 3.4).

3.2 Modulation des EGF-induzierten Zellwachstums

Der epidermale Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF) ist ein potenter Stimulator der Proliferation einer Vielzahl gastrointestinaler Zelllinien *in vitro* und wirkt als potentes Mitogen in zahlreichen epithelialen Zellsystemen. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors bewirkt die Initiierung einer Signalkaskade, an deren Ende die Regulierung der Expression von spezifischen, am Wachstum beteiligten, Genen steht [Steel 1989, Milovic et al. 1995].

Kürzlich erschienene Studien geben Hinweise darauf, dass durch EGF vermittelte Signaltransduktionswege durch die Zusammensetzung der Membranphospholipide, insbesondere den Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFs), beeinflusst werden [Mollerup und Haugen 1996]. Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors kann unter anderem zu einer Aktivierung membranständiger Lipidmediatoren führen [Ullrich und Schlessinger 1990].

3.2.1 Einfluss von EGF in Kombination mit FO auf das Wachstum von Mia-Paca-2 Zellen

Die Konzentration von 20 ng ml^{-1} EGF wurde entsprechend den Angaben von Liehr und Mitarbeitern (1990) gewählt.

Mia-Paca-2 Zellen wurden für 36 Stunden mit den Lipidemulsionen ($0,72 \text{ } \mu\text{l ml}^{-1}$ entsprechend $50 \text{ } \mu\text{M}$ EPA in FO) präinkubiert und anschließend für weitere 12 Stunden mit oder ohne EGF inkubiert. 24 Stunden vor Zugabe von EGF wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgesetzt.

In einer Konzentration von 20 ng ml^{-1} führte EGF zu einer signifikanten Proliferationssteigerung der Mia-Paca-2 Zellen ($112\% \pm 6\%$ der Kontrolle, $P < 0,01$) (Abb. 3.5).

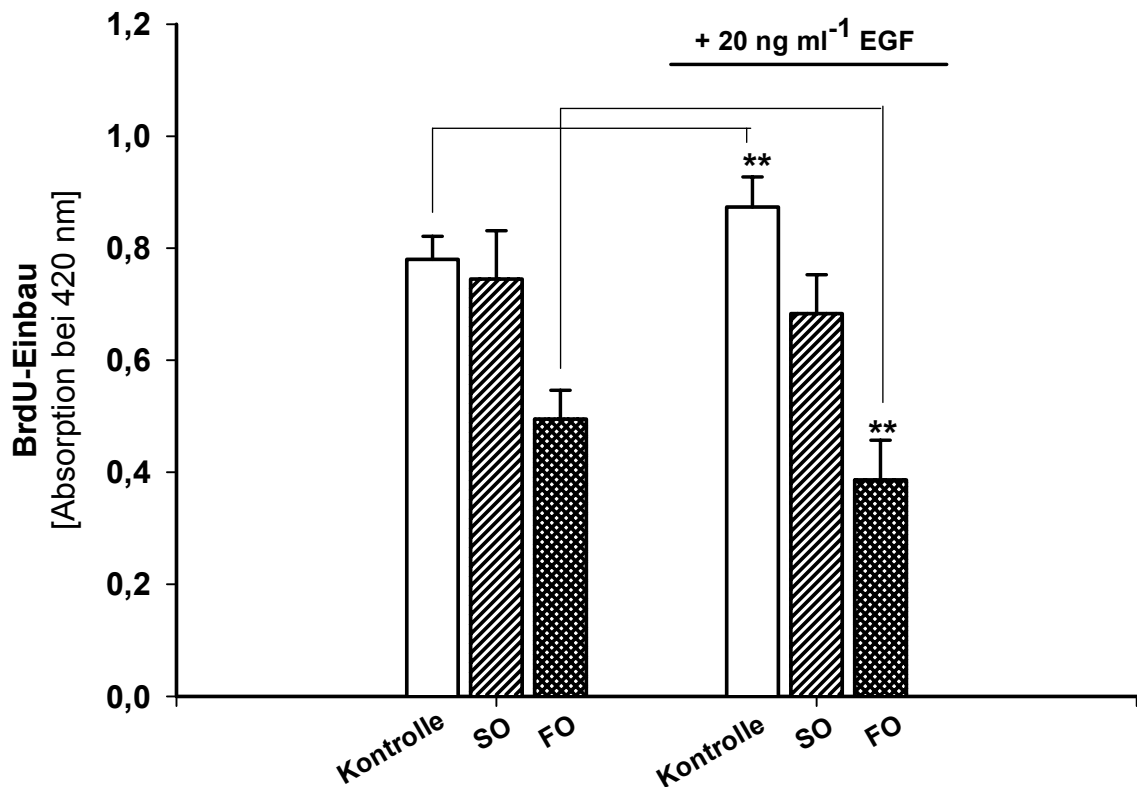


Abb. 3.5 Effekt einer EGF-Stimulation (20 ng ml⁻¹) auf die Zellproliferation von Mia-Paca-2 Zellen nach Präinkubation mit FO und SO (0,72 µl ml⁻¹ entsprechend 50 µM EPA in FO).
** $P < 0,01$

Wurden die Zellen vor EGF-Stimulation mit FO präinkubiert, zeigte sich eine Umkehr des proliferationssteigernden Effektes von EGF und eine signifikante Verstärkung des wachstumshemmenden Effektes gegenüber der alleinigen Behandlung der Zellen mit FO (-14% ± 4 %, $P < 0,01$) (Abb. 3.5).

Die Präinkubation der Zellen mit SO zeigte keinen Effekt der kombinierten Behandlung mit EGF im Vergleich zur alleinigen Behandlung (Abb. 3.5)

3.3 Induktion der Apoptose

Zur Klärung der Mechanismen, durch die die Wachstumsinhibierung nach Behandlung mit der Omega-3 fettsäurereichen Fischölemulsion (FO) vermittelt wird, erfolgte in einem ersten Schritt die Untersuchung der Testsubstanzen hinsichtlich einer Induktion der Apoptose. Apoptose ist die häufigste Form von Zelltod im Organismus und ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl morphologischer Veränderungen der Zelle [Krammer 2000]. Eine bedeutende Rolle in der Signalkette der Apoptose spielen Proteasen, sogenannte Caspasen. Die Aktivierung von Caspasen wurde für zahlreiche apoptotische Stimuli beschrieben [Krammer 2000]. Die Aktivierung der Protease Caspase-3 (CPP-32, Apopain) wird als valider Marker einer Apoptoseinduktion angesehen.

3.3.1 Caspase-3 Aktivierung

Die Caspase-3 Aktivität wurde nach 12, 24 und 48 Stunden Behandlung von Mia-Paca-2 Zellen mit 100 μM EPA (1,44 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO) bestimmt. Als Positivkontrolle diente der Topoisomeraseinhibitor Camptothecin (50 μM).

Camptothecin bewirkte eine Verdoppelung der Caspase-3 Aktivität nach 12 Stunden Inkubation ($211 \pm 48\%$, $P < 0,05$). Nach 24 Stunden wurde eine Aktivitätssteigerung um das 8-fache ($816 \pm 11\%$, $P < 0,05$) und nach 48 Stunden um das 10-fache ($953 \pm 60\%$, $P < 0,01$) gefunden (Abb. 3.6).

FO hatte keinen Effekt auf die Caspase-3 Aktivität nach 12 Stunden Inkubation. Nach 24 Stunden zeigte sich eine Steigerung der Caspase-3 Aktivität um das 4-fache ($444 \pm 75\%$, $P < 0,05$). Nach 48 Stunden lag die Aktivität beim 2-fachen des Kontrollwertes ($201 \pm 25\%$, $P < 0,01$) (Abb. 3.6).

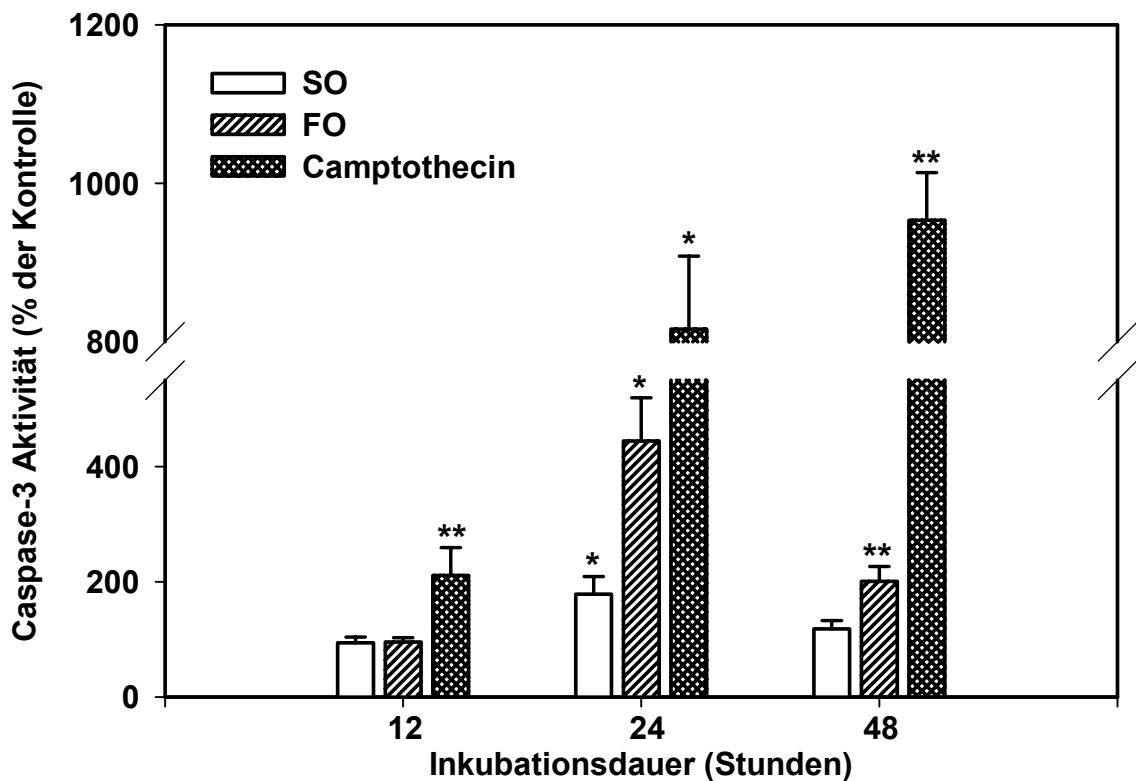


Abb. 3.6 Caspase-3 Aktivität in Mia-Paca-2 Zellen nach 12, 24, und 48 Stunden Inkubation mit FO und SO ($1,44 \mu\text{l ml}^{-1}$ entsprechend $100 \mu\text{M}$ EPA in FO); Positivkontrolle Camptothecin ($50 \mu\text{M}$).
* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

SO führte zu einer leichten Steigerung der Caspase-3 Aktivität nach 24 Stunden Behandlung ($178 \pm 30\%$, $P < 0,05$). Weder nach 12 noch nach 48 Stunden Inkubationsdauer mit SO wurde eine Aktivitätssteigerung gefunden (Abb. 3.7).

3.3.2 Zellmorphologie

Abbildung 3.7 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Mia-Paca-2 Zellen nach Anfärbung mit Diaminophenylindol (DAPI). Dargestellt sind unbehandelte Zellen (Abb. 3.7A) und Zellen nach Behandlung mit $100 \mu\text{M}$ EPA ($1,44 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) (Abb. 3.7B) für 72 Stunden.

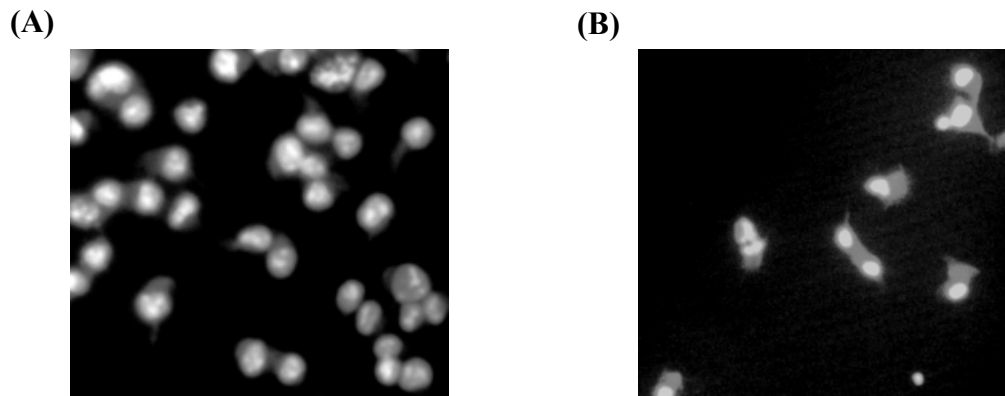


Abb. 3.7 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Mia-Paca-2 Zellen nach Anfärbung mit DAPI; (A) unbehandelt und (B) nach 72 Stunden Inkubation mit 100 μM EPA (1,44 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO).

Die behandelten Zellen zeigen typische morphologische Veränderungen apoptotischer Zellen: Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins und Bildung apoptotischer Körperchen (Abschnürung membranumschlossener Säckchen; Blebbing) (Abb. 3.7B).

3.4 Einfluss auf den Zellzyklus

3.4.1 Einfluss auf den Zellzyklus von Mia-Paca-2 Zellen

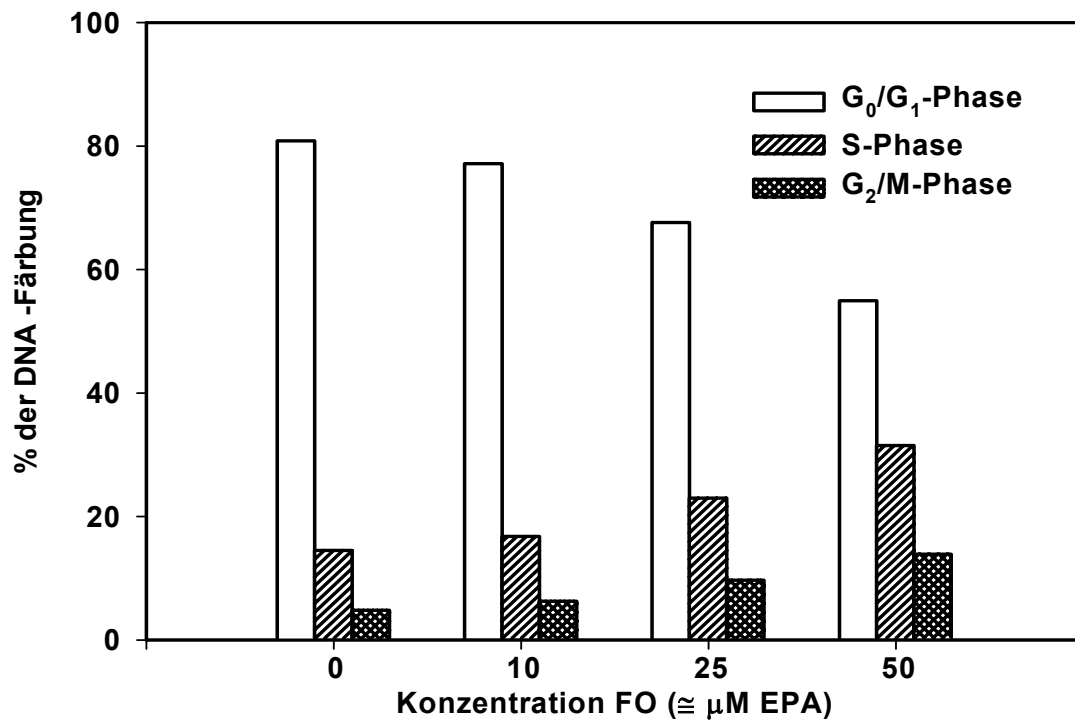


Abb. 3.8 Zellzyklusanalyse von Mia-Paca-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit EPA (0-50 µM EPA entsprechend 0-0,72 µl ml⁻¹ FO).

Die Zellzyklusanalyse unbehandelter Mia-Paca-2 Zellen zeigte eine Aufteilung der Zellen von 81% in der G₀/G₁-Phase, 15% in der S-Phase und 5% in der G₂/M-Phase (Abb. 3.8). Die Behandlung mit FO resultierte in einer Akkumulation der Zellen in der S- und G₂/M-Phase. Mit zunehmender Konzentration von EPA (0-50 µM entsprechend 0-0,72 µl ml⁻¹ FO) wurde eine Zunahme des prozentualen DNA-Gehaltes in der S-Phase bis zum 2-fachen (29% im Vergleich zu 15% in der Kontrolle) und in der G₂/M-Phase bis zum 2,7-fachen (12% im Vergleich zu 5% in der Kontrolle) gefunden. Der Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase sank von 81 auf 59%.

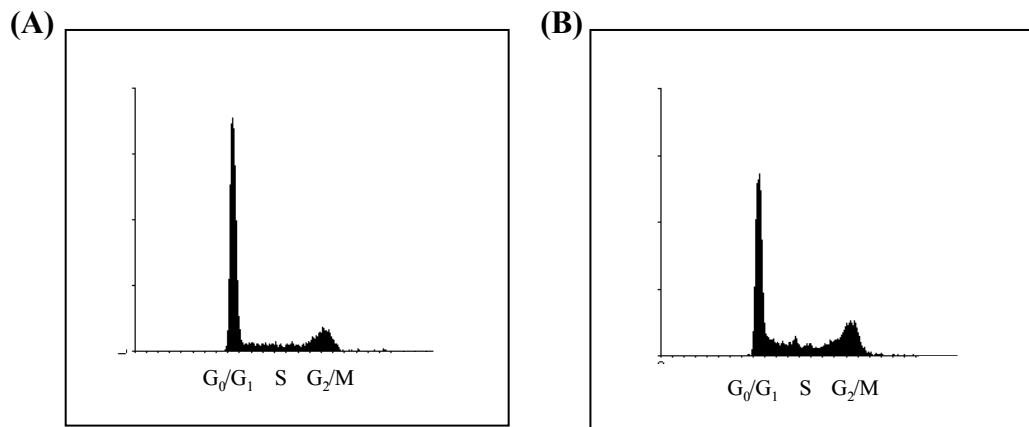


Abb. 3.9 DNA-Histogramme von Mia-Paca-2 Zellen (A) unbehandelt und (B) nach 72-stündiger Inkubation mit 50 μM EPA (entsprechend 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO).

In Abbildung 3.9 sind die zugehörigen DNA-Histogramme für unbehandelte Zellen (Abb. 3.9A) und für Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 50 μM EPA (entsprechend 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO) (Abb. 3.9B) dargestellt. Deutlich ist die Abnahme des G₀/G₁-Phase-Peaks und die Zunahme der S- und G₂/M-Phase-Peaks bei den EPA-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu erkennen.

3.4.2 Einfluss auf den Zellzyklus von Caco-2 Zellen

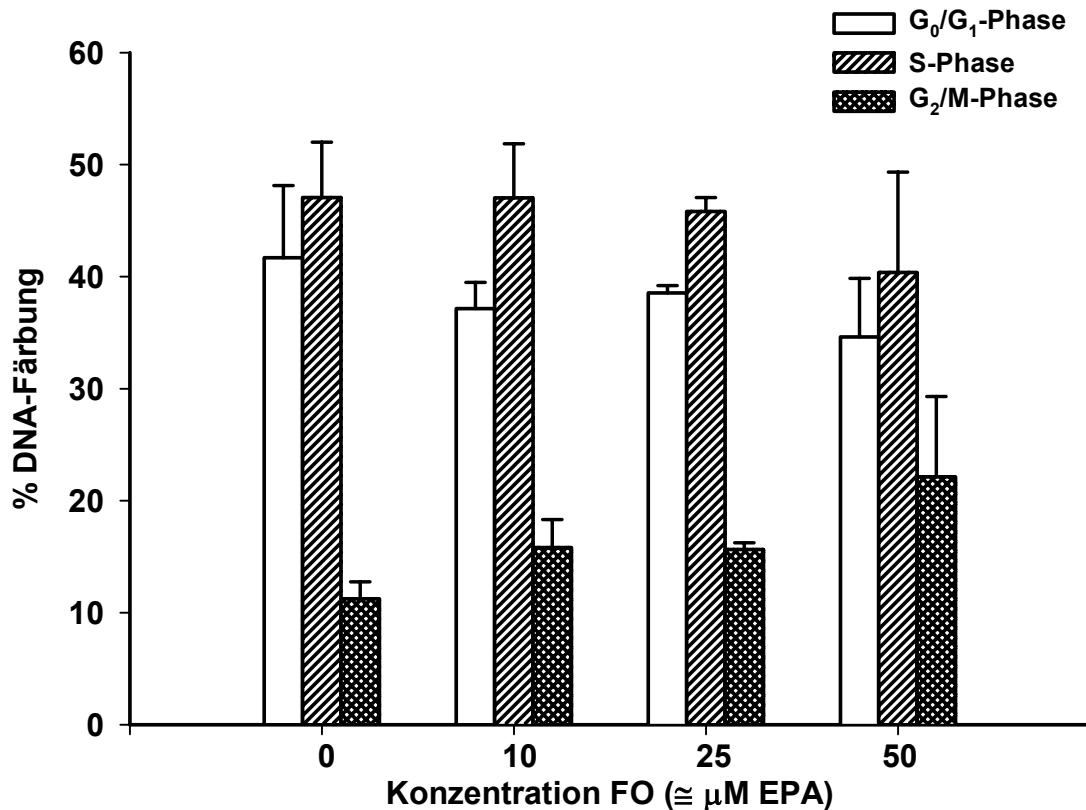


Abb. 3.10 Zellzyklusanalyse von Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit EPA (0-50 μM EPA entsprechend 0-0,72 μl ml⁻¹ FO).

Unbehandelte Caco-2 Zellen zeigten eine nahezu gleiche Verteilung der Zellen im Zellzyklus auf die G₀/G₁-Phase (42%) und die S-Phase (47%). In der G₂/M-Phase befanden sich 11% der Zellen (Abb. 3.10). Nach Inkubation der Zellen mit EPA (0-50 μM entsprechend 0-0,72 μl ml⁻¹ FO) zeigte sich eine Zunahme der Zellen in der G₂/M-Phase um das 2,2-fache (25% versus 11%). Der Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase und der S-Phase sank auf 35% bzw. 40% (Abb. 3.10).

3.5 Einfluss von FO auf die Chemosensitivität von Tumorzellen

Neueren Studien zufolge, scheinen Omega-3-Fettsäuren die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber verschiedenen zytostatisch wirksamen Substanzen zu erhöhen [Burns und North 1986, Shao et al. 1997, Germain et al. 1998].

Zur Untersuchung des Einflusses der Omega-3-fettsäurereichen Lipidemulsion auf die Chemosensitivität der Tumorzelllinien Mia-Paca-2 und Caco-2 wurden Kombinationsversuche mit den Zytostatika Gemcitabin (2', 2'-Difluorodeoxycytidin, dFdC) und 5-Fluorouracil (5-FU) durchgeführt.

Zunächst wurden Untersuchungen zur Bestimmung der optimalen Konzentration der Zytostatika im Zellkulturversuch durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen der Zytostatika inkubiert.

Für die Kombinationsversuche wurden alle Testsubstanzen in suboptimaler Dosierung ($< IC_{50}$) eingesetzt.

3.5.1 Einfluss von FO auf die Wirksamkeit von Gemcitabin (dFdC) bei Mia-Paca-2 Zellen

3.5.1.1 Wachstumskinetik von dFdC

In Zellkulturversuchen zur Untersuchung der Wirksamkeit von Gemcitabin auf Leukämiezellen wurde eine zytotoxische Aktivität im Bereich von 0,25 nM bis 2,0 nM gefunden [Hertel et al. 1990, Lech-Maraña et al. 2000]. Entsprechend wurden zur Bestimmung des suboptimalen Wirksamkeitsbereiches von Gemcitabin auf Mia-Paca-2 Zellen Konzentrationen von 0,1 bis 100 nM eingesetzt. In Abbildung 3.11 ist die Wachstumskurve nach Behandlung der Zellen mit Gemcitabin in den angegebenen Konzentrationen für 48 Stunden dargestellt. Eine 50%ige Inhibierung (IC_{50}) des Zellwachstums war bei einer Konzentration von 20 nM Gemcitabin zu verzeichnen.

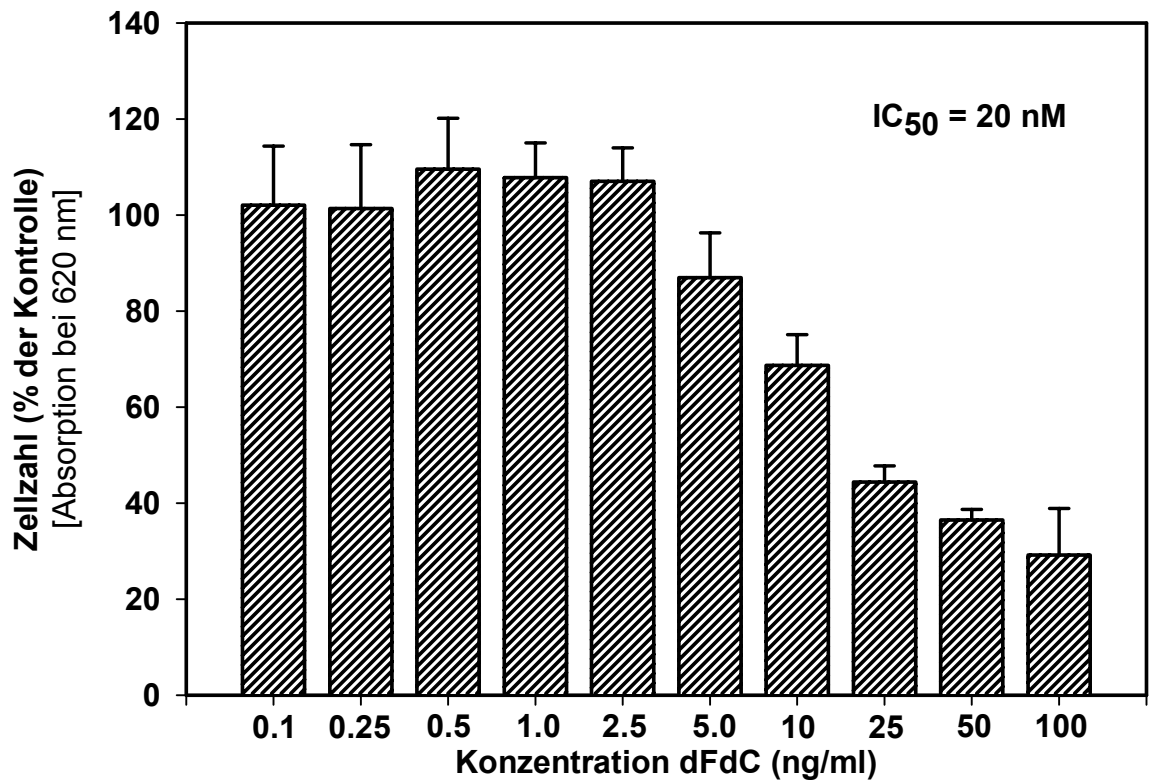


Abb. 3.11 Wachstumskinetik von Mia-Paca-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit steigenden Konzentrationen des Zytostatikums Gemcitabin (dFdC).

Die weiterführenden Kombinationsexperimente wurden mit Konzentrationen des Zytostatikums im Bereich unterhalb des IC_{50} -Wertes durchgeführt (1-10 nM).

3.5.1.2 Effekt einer Kombination von FO und dFdC auf das Zellwachstum von Mia-Paca-2 Zellen

Die Kombinationsexperimente wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

- (1) 1 nM dFdC mit 10, 25 und 50 μ M EPA (0,14, 0,36 und 0,72 μ l ml⁻¹ FO)
- (2) 5 nM dFdC mit 10, 25 und 50 μ M EPA (0,14, 0,36 und 0,72 μ l ml⁻¹ FO)
- (3) 10 nM dFdC mit 10, 25 und 50 μ M EPA (0,14, 0,36 und 0,72 μ l ml⁻¹ FO)

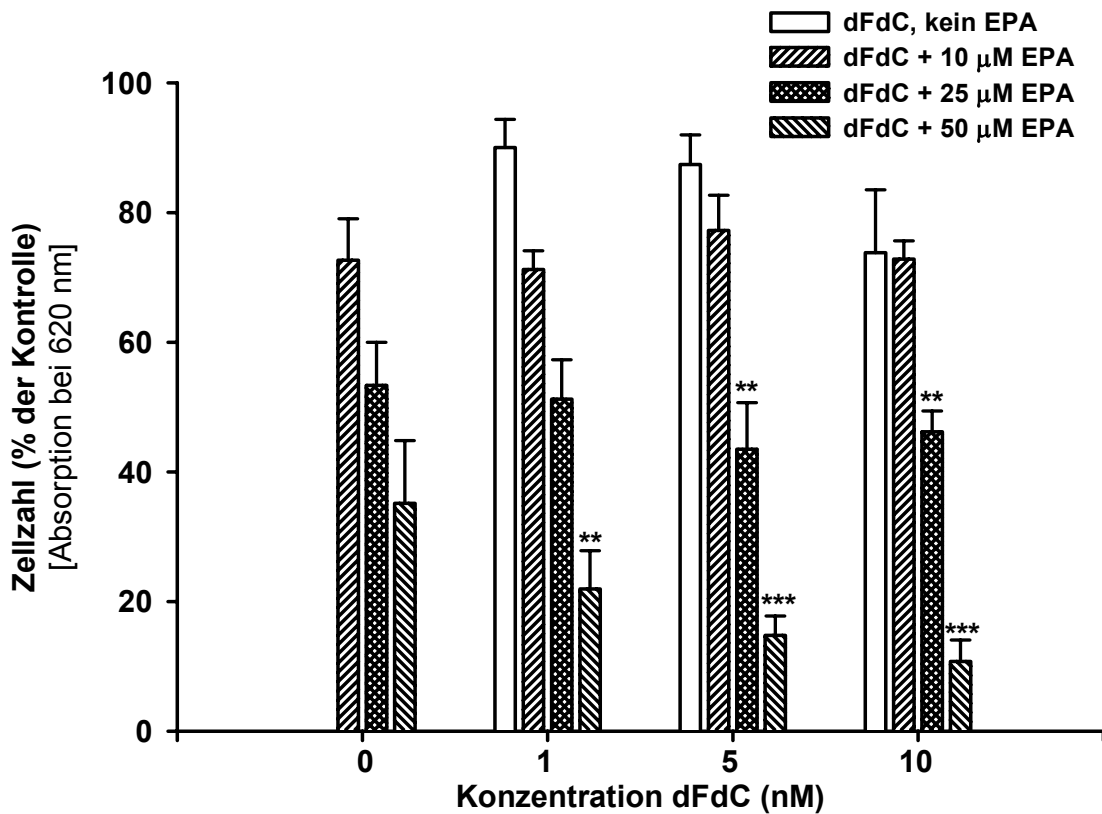


Abb. 3.12 Effekt von Gemcitabin (dFdC) in Kombination mit FO auf die Zellproliferation von Mia-Paca-2 Zellen.
 * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Signifikanzen der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Behandlung mit den Einzelsubstanzen)

Die kombinierte Behandlung der Mia-Paca-2 Zellen mit dFdC und FO resultierte in einer signifikanten Steigerung der dFdC-Aktivität (Abb. 3.12).

Die Zunahme der Wachstumsinhibierung erfolgte in Abhängigkeit von der FO-Konzentration. Bei einer Inkubation der Zellen mit 5 nM dFdC und 10 µM EPA (0,14, µl ml⁻¹ FO) war eine Inhibierung des Zellwachstums um $-14\% \pm 5\%$ ($P < 0,001$) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dFdC zu verzeichnen. Die Kombination mit 25 und 50 µM EPA (0,36 und 0,72 µl ml⁻¹ FO) erzielte eine weitere Wachstumsinhibierung um $-48\% \pm 7\%$ ($P < 0,001$) bzw. $-77\% \pm 3\%$ ($P < 0,001$) (Abb. 3.12).

3.5.1.3 Effekt einer Kombination von FO und dFdC auf den Zellzyklus von Mia-Paca-2 Zellen

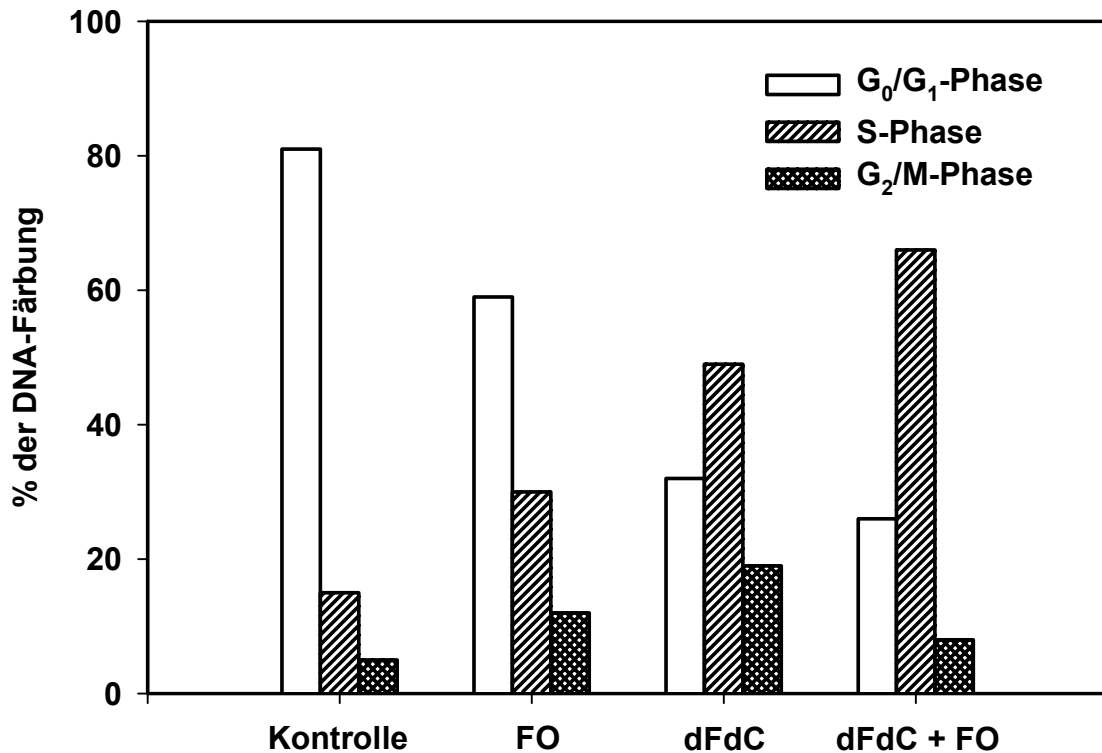


Abb. 3.13 Effekt von dFdC (10 nM) in Kombination mit FO (0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ entsprechend 50 μM EPA) auf den Zellzyklus von Mia-Paca-2 Zellen.

Gemcitabin (dFdC) ist ein Nukleosidanalogen, das eine Terminierung der DNA-Synthese und somit eine Akkumulation der Zellen in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus bewirkt [Shi et al. 2001]. Einer kürzlich erschienenen Studie zufolge wurde eine maximale Akkumulation der Zellen in der S-Phase nach Behandlung mit 6-15 nM Gemcitabin gesehen [Shi et al. 2001].

Für unsere Zellzyklusexperimente wählten wir eine Konzentration von 10 nM Gemcitabin aus. In dieser Konzentration kam es zu einer Zunahme der Zellen in der S-Phase auf 49% im Vergleich zu 15% bei Kontrollzellen. Der Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase sank von 81% auf 32%. Die G₂/M-Phase machte 19% im Vergleich zu 5% bei Kontrollzellen aus (Abb. 3.13).

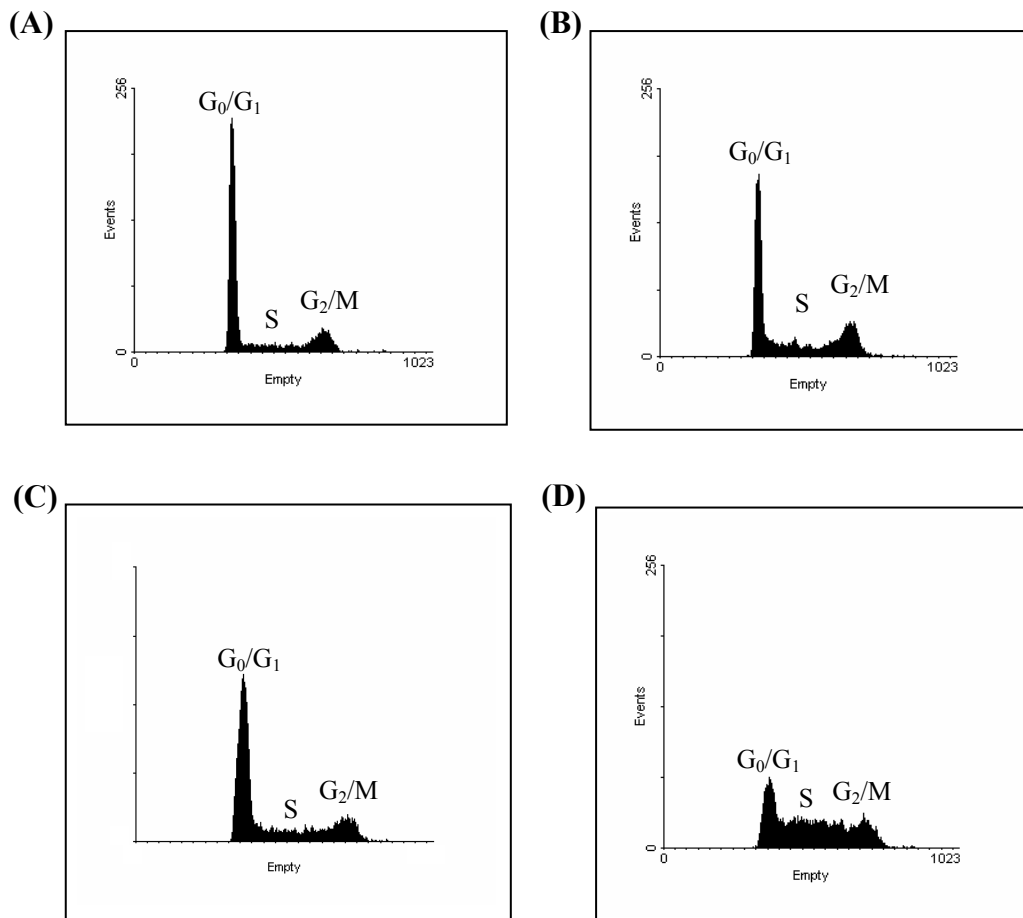


Abb. 3.14 DNA-Histogramme von Mia-Paca-2 Zellen; (A) Kontrolle, (B) nach Behandlung mit 50 μM EPA ($0,72 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO), (C) 10 nM Gemcitabin (dFdc) und (D) einer Kombination beider Substanzen.

Die kombinierte Behandlung der Zellen mit 10 nM Gemcitabin und 50 μM EPA ($0,72 \mu\text{l ml}^{-1}$ FO) resultierte in einer weiteren Zunahme der Zellen in der S-Phase auf 66%. Entsprechend nahm die Anzahl der Zellen in der G_0/G_1 -Phase und der G_2/M -Phase auf 26% bzw. 8% ab (Abb. 3.13).

Die in Abbildung 3.14 dargestellten DNA-Histogramme verdeutlichen die ausgeprägte Zunahme der S-Phase-Fraktion nach kombinierter Behandlung der Mia-Paca-2 Zellen mit Gemcitabin und FO gegenüber der Behandlung mit den Einzelsubstanzen.

3.5.2 Einfluss von FO auf die Wirksamkeit von 5-Fluorouracil (5-FU) bei Caco-2 Zellen

3.5.2.1 Wachstumskinetik von 5-FU

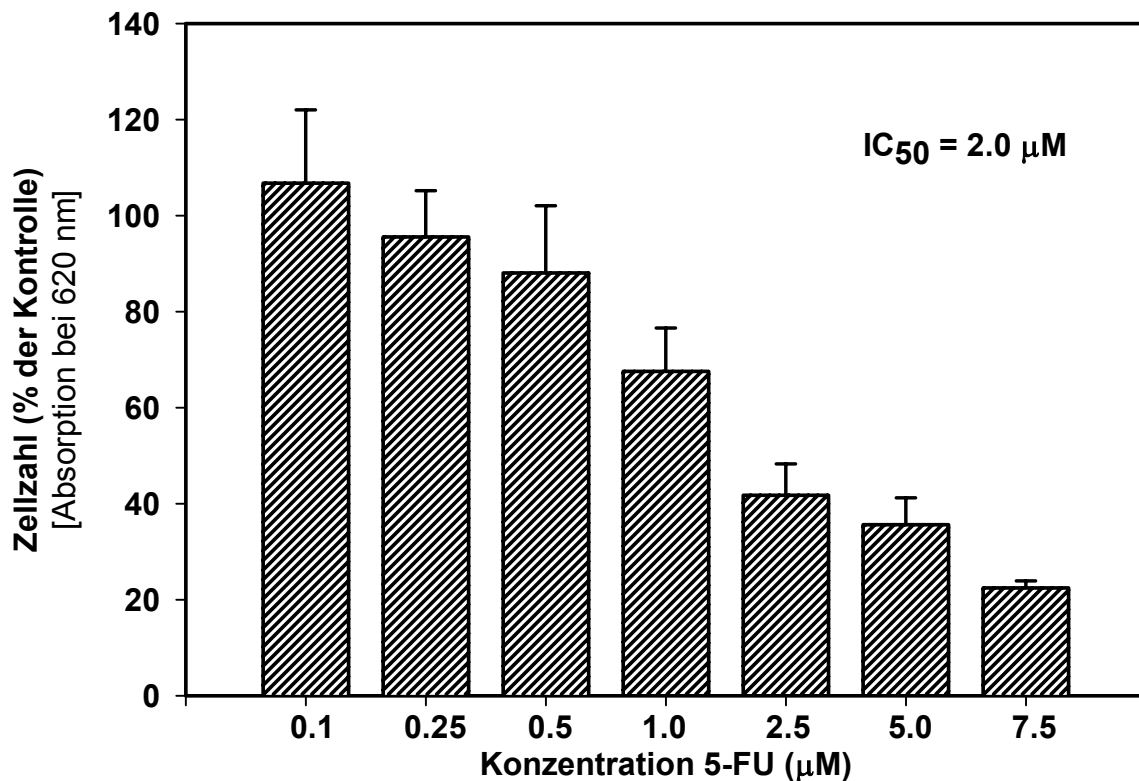


Abb. 3.15 Wachstumskinetik von Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit steigenden Konzentrationen des Zytostatikums 5-Fluorouracil (5-FU).

An verschiedenen humanen Kolonkarzinomzelllinien konnte eine effektive Wirksamkeit (Hemmung des Tumorzellwachstums um 50%) von 5-Fluorouracil (5-FU) im Bereich von 1-20 µM nachgewiesen werden (Huang et al. 2000). In Vorversuchen zur Bestimmung des suboptimalen Wirksamkeitsbereiches von 5-FU auf Caco-2 Zellen wurde eine Wachstumsinhibierung um 50% nach Behandlung mit 2 µM 5-FU gefunden (Abb. 3.15). Die weiterführenden Kombinationsexperimente wurden mit Konzentrationen von 0,25-1,0 µM 5-FU durchgeführt.

3.5.2.2 Effekt einer Kombination von FO und 5-FU auf das Zellwachstum von Caco-2 Zellen

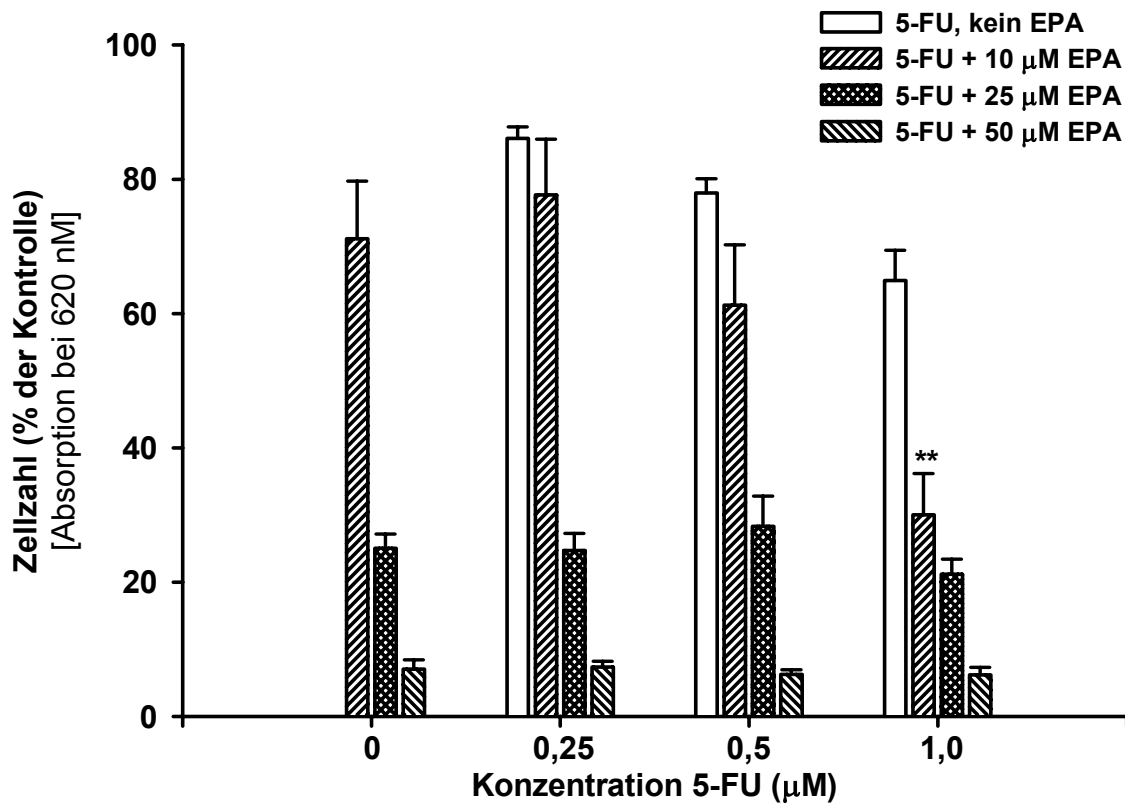


Abb. 3.16 Effekt von 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit FO auf die Zellproliferation von Caco-2 Zellen.

** $P < 0,01$

Die Kombinationsexperimente wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

- (1) 0,25 μM 5-FU mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)
- (2) 0,5 μM 5-FU mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)
- (3) 1,0 μM 5-FU mit 10, 25 und 50 μM EPA (0,14, 0,36 und 0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO)

Die Ergebnisse der Kombinationsexperimente an Caco-2 Zellen sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Die Inkubation der Zellen mit 5-FU und FO nach dem vorgegebenen Schema resultierte zwar in einer signifikanten Verminderung der Zellproliferation gegenüber der alleinigen Behandlung mit 5-FU, nicht jedoch gegenüber der alleinigen Behandlung mit FO (Ausnahme: Kombination von 1 μM 5-FU mit 10 μM EPA; $P < 0,01$).

3.5.2.3 Effekt einer Kombination von FO und 5-FU auf den Zellzyklus von Caco-2 Zellen

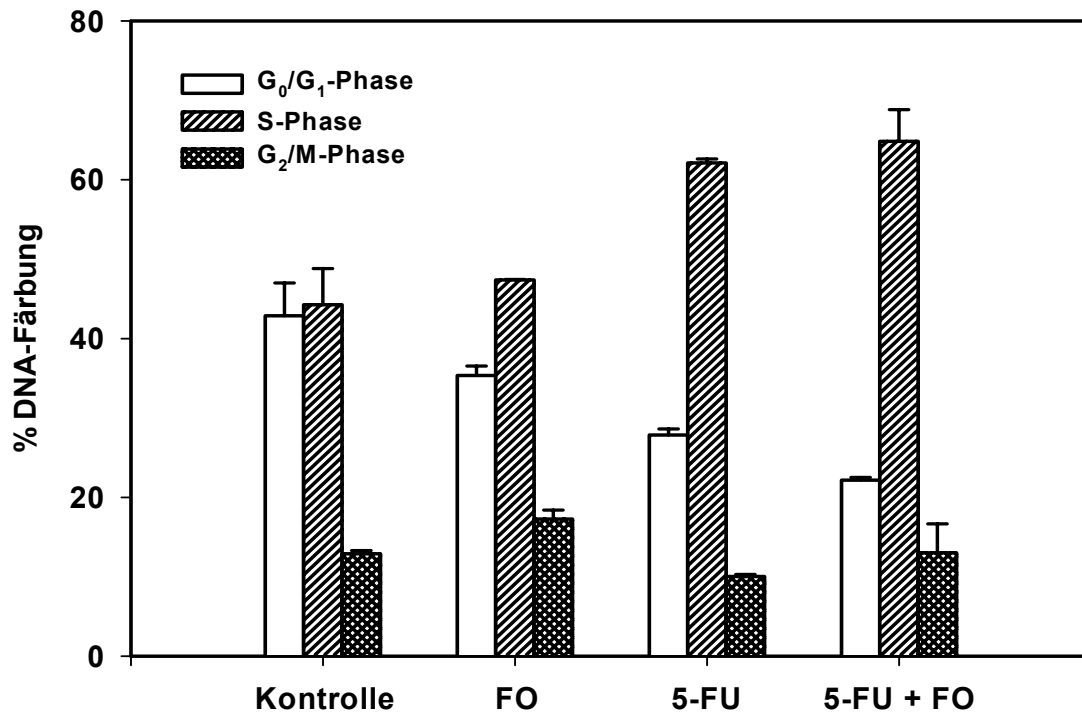


Abb. 3.17 Effekt von 5-FU (1 μ M) in Kombination mit FO (0,72 μ l ml⁻¹ entsprechend 50 μ M EPA) auf den Zellzyklus von Caco-2 Zellen.

5-Fluorouracil ist ein Pyrimidinantagonist, dessen Wirksamkeit in erster Linie durch Hemmung der Thymidilatsynthese vermittelt wird. 5-FU wird durch die Thymidinphosphorylase und Thymidinkinase in die aktiv wirksame Form 5-Fluoro-2'-Deoxyuridinmonophosphat (FdUMP) umgewandelt. FdUMP ist ein potenter Inhibitor der Thymidilatsynthese. 5-FU wirkt während der S-Phase des Zellzyklus.

Eine 72-stündige Behandlung der Caco-2 Zellen mit 1 μ M 5-FU bewirkte eine Zunahme der S-Phase-Fraktion von 44% auf 62%. Der Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase sank von 43% auf 28%. Der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase blieb nahezu gleich (10% versus 12% bei der Kontrolle) (Abb. 3.17). Die kombinierte Behandlung

mit 5-FU (1 μM) und 50 μM EPA (0,72 $\mu\text{l ml}^{-1}$ FO) zeigte keine wesentlichen Änderungen in der Zellzyklusverteilung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 5-FU (G_0/G_1 -Phase: 22%, S-Phase: 65%, G_2/M -Phase: 13%) (Abb. 3.17).

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war es, den Einfluss einer Omega-3-fettsäurereichen Lipidemulsion auf das Wachstum und die Chemosensibilität humaner Pankreas- (Mia-Paca-2) und Kolonkarzinomzellen (Caco-2) zu untersuchen.

4.1 Aufnahme komplexer Triglyzeride durch Caco-2 und Mia-Paca-2 Zellen

Der Einsatz komplexer Triglyzeride im Zellkulturversuch setzt voraus, dass eine adäquate Aufnahme und Metabolisierung der angebotenen Triglyzeride gewährleistet ist. Hierzu ist zunächst die Hydrolyse der Triglyzeride durch Lipase erforderlich.

Spalinger und Mitarbeiter (1998a) fanden in ihren Untersuchungen an Caco-2 Zellen, dass diese über eine endogene Lipaseaktivität verfügen. Es konnte sowohl eine Lipaseaktivität in der zytosolischen Fraktion als auch in der apikalen Membran nachgewiesen werden. Es wird davon ausgegangen, dass eine Sekretion der endogen gebildeten Lipase erfolgt, da eine enzymatische Aktivität auch im Inkubationsmedium nachweisbar war [Spalinger et al. 1998a]. Experimente der gleichen Arbeitsgruppe zur Aufnahme und Metabolisierung eines strukturierten Lipids konnten mittels Gaschromatographie zeigen, dass eine Änderung des intrazellulären Fettsäurespektrums entsprechend dem Angebot an die Zelle stattfand [Spalinger et al. 1998b].

Auch die Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 scheint eine Form der Lipase zu exprimieren. Es konnte sowohl eine enzymatische Aktivität als auch eine Sekretion, wenn auch in geringem Maß, nachgewiesen werden [Pasqualini et al. 2000]. Ähnliche Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe um Petit-Thévenin (1998) gefunden. Sie bestätigen die Fähigkeit der in Pankreaskarzinomzellen exprimierten Lipase zur Hydrolyse von Cholesterinestern, Triglyzeriden und Phospholipiden [Petit-Thévenin et al. 1998].

4.2 Einfluss der Fischölemulsion auf das Zellwachstum von Mia-Paca-2 und Caco-2 Zellen

Zahlreiche Studien belegen, dass die Omega-3-Fettsäuren Eikosapentaensäure (EPA) und Dokosahexaensäure (DHA), die in hohen Konzentrationen im Fischöl vorkommen, sowohl die Initiation und Promotion, als auch die Progression experimenteller Tumore inhibieren [O'Connor et al. 1985, Reddy et al. 1986, Abou-el-Ela et al. 1989, Takahashi et al. 1993].

Die in der vorliegenden Studie eingesetzte Fischölemulsion hemmte die Proliferation sowohl der Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 als auch der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 dosis- und zeitabhängig. Die erhobenen Wachstums- und Zeitkinetiken der beiden Zelllinien nach Inkubation mit der Fischölemulsion sind vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen zum Effekt von EPA und DHA auf das Wachstum verschiedener neoplastischer Zellen *in vitro* [Falconer et al. 1994a, Grammatikos et al. 1994, Maehle et al. 1995, Iigo et al. 1997, Hawkins et al. 1998].

Diese Studie unterscheidet sich von anderen vergleichbaren Untersuchungen durch die Art des verwendeten Fettsäurepräparates. Bei den von uns eingesetzten Präparaten handelte es sich nicht um isolierte, in freier Form vorliegende Fettsäuren, sondern um Fettemulsionen mit komplexer Triglyzeridstruktur.

Diese Fettemulsionen werden auf der Basis natürlicher Öle (z.B. Sojaöl, Fischöl) hergestellt und enthalten dementsprechend das natürliche Fettsäuremuster der nativen Quelle aber auch die natürlicherweise in diesen Ölen vorkommenden Begleitsubstanzen, wie beispielsweise α -Tocopherol (Vitamin E). Das Fettsäuremuster setzt sich aus mehrfach ungesättigten (PUFAs), einfach ungesättigten und gesättigten Fettsäuren zusammen.

Falconer und Mitarbeiter (1994a) konnten zeigen, dass gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren keinen Effekt auf das Wachstum verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien haben, wohingegen alle PUFAs einen wachstumshemmenden Effekt ausübten. Die potenteste Wirkung zeigte die Omega-3-Fettsäure EPA.

Im Zellkulturversuch wirken sowohl Omega-3- als auch Omega-6-Fettsäuren als Tumorsuppressoren [Begin et al. 1986, Siegel et al. 1987, Falconer et al. 1994]. Dieser Effekt könnte auf eine vermehrte Lipidperoxidation zurückzuführen sein, da die Zugabe von antioxidativ wirksamen Substanzen, wie die Vitamine A und E oder Superoxiddismutase, den antiproliferativen Effekt, zumindest der Omega-6-Fettsäuren, aufhebt [Begin et al. 1986, Ells et al. 1996].

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Lipidemulsionen enthielten beide Vitamin E, wobei der Gehalt an Vitamin E in der Fischölemulsion höher war als in der Sojabohnenölemulsion. Dies begründet sich aus dem höheren Anteil hochungesättigter Fettsäuren in der Fischölemulsion. Trotz des Gehaltes an Vitamin E in den Fettemulsionen, kann eine Beteiligung oxidativer Prozesse an der antiproliferativen Wirkung der Fettemulsionen im Zellkulturversuch nicht ausgeschlossen werden.

Epidemiologische Studien und in vivo-Experimente konnten zwar die tumorsuppressive Wirkung der Omega-3-Fettsäuren, nicht aber der Omega-6-Fettsäuren bestätigen [Li et al. 1994, Petrik et al. 2000a]. Dies lässt darauf schließen, dass andere Mechanismen als die Lipidperoxidation an der Vermittlung des antitumorösen Effektes der Omega-3-Fettsäuren beteiligt sind.

Der „klassische“ Stoffwechselweg, der durch die Omega-3-Fettsäuren beeinflusst wird, ist der Eikosanoidstoffwechsel (Kap. 1.3.3.1).

Den Ergebnissen experimenteller Arbeiten am Tiermodell zufolge, spielen die dem Arachidonsäurestoffwechsel entstammenden Eikosanoide eine entscheidende Rolle in der initialen Phase der Kolonkarzinogenese. Der wichtigste Metabolit scheint in diesem Zusammenhang das Prostaglandin E₂ (PGE₂) zu sein. So stimuliert exogenes Prostaglandin E₂ die Proliferation normaler Kolonmukosa [Tutton und Barkla 1980, Watanabe et al. 1999]. Außerdem werden bei bestimmten Kolontumoren erhöhte Prostaglandin E₂-Konzentrationen gefunden [Rigas et al. 1993, Rose und Hatala 1994]. Des weiteren spricht für diese Hypothese die Tatsache, daß Inhibitoren der Eikosanoidsynthese, wie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), eine präventive Wirkung hinsichtlich der Kolonkarzinogenese haben. So belegen epidemiologische Studien, daß eine Dauereinnahme von Aspirin und anderen NSAR mit einem verminderten Kolonkarzinomrisiko einhergeht [Thun et al. 1991, Marnett 1992].

Im Tierexperiment ist eine Inhibierung der Tumorinduktion im Kolon durch Gabe von Indomethacin zu beobachten [Metzger et al. 1984]. Andere NSAR wie Aspirin und Piroxicam hatten ähnliche antitumoröse Effekte im experimentellen Tiermodell [Reddy et al. 1990, Reddy et al. 1993, Reddy et al. 2000,].

Bei Patienten mit familiärer Polyposis coli (FAP) war unter Gabe von Sulindac und Celecoxib eine signifikante Reduktion der Anzahl kolorektaler Polypen zu verzeichnen [Giardiello et al. 1993, Steinbach et al. 2000].

Der chemopräventive Effekt der NSAR wird unter anderem auf die Hemmung des Schlüsselenzyms im Arachidonsäurestoffwechsel, der Zykllooxygenase (COX) und der daraus resultierenden Inhibierung der Prostaglandinsynthese zurückgeführt. Es wurden zwei Isoformen der Zykllooxygenase charakterisiert, COX-1 und COX-2. Während die COX-1 in den meisten Geweben regelmäßig exprimiert wird, ist die COX-2 unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar. Die Expression der COX-2 wird unter anderem durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren induziert [Eberhart et al. 1994].

Es wird davon ausgegangen, daß die Metaboliten des COX-1-Stoffwechselweges der Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen dienen, wohingegen die der COX-2 an inflammatorischen und/oder mitotischen Prozessen beteiligt sind [Meade 1993]. Zahlreiche Studien konnten zeigen, daß in kolorektalen Karzinomen sowohl die COX-2 überexprimiert ist [Eberhart et al. 1994, Sano et al. 1995], als auch deren Produkt, das PGE₂ [Rigas et al. 1993, Rose und Hatala 1994].

Der Stoffwechselweg der COX scheint auch bei der Genese des Pankreaskarzinoms eine entscheidende Rolle zu spielen. Kürzlich konnte eine COX-2-Überexprimierung in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien belegt werden. Die Behandlung mit COX-Inhibitoren führte zu einer dosisabhängigen Wachstumsinhibierung der untersuchten Zelllinien [Kokawa et al. 2001] und einer Apoptoseinduktion [Ding et al. 2000]. Auch die Untersuchung humaner Adenokarzinome des Pankreas zeigte eine signifikant höhere COX-2-Exprimierung im Vergleich zu gesundem Gewebe [Yip-Schneider et al. 2000].

Neben der COX-2 könnte auch die ebenfalls am Arachidonsäurestoffwechsel beteiligte Lipoxygenase (LOX) eine Rolle im Wachstum des Pankreaskarzinoms spielen. In einigen Pankreaskarzinomzelllinien wurde die Expression der Isoformen 5-LOX und 12-LOX nachgewiesen, wohingegen diese in humanen duktalem Pankreaszellen

gesunden Gewebes nicht detektierbar sind [Ding et al. 1999]. Für eine Beteiligung der LOX an der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen spricht, daß spezifische LOX-Inhibitoren die Zellproliferation hemmen, die LOX-Metaboliten 5-HETE und 12-HETE jedoch zu einer Stimulation der Zellproliferation führen. Auch deren Vorläufermoleküle Arachidonsäure und Linolsäure stimulierten das Zellwachstum [Ding et al. 1999].

Der Ansatz der Omega-3-Lipidtherapie steht in engem Zusammenhang mit den Erkenntnissen, die man in Bezug auf den Wirkungsmechanismus der NSAR gewinnen konnte, da die Eikosapentaensäure (EPA) als kompetitiver Hemmstoff der Zyklooxygenase in ähnlicher Weise die Eikosanoidsynthese aus Arachidonsäure (AA) inhibiert [Bartram et al. 1993] (Kapitel 1.3.3.1).

Eine vermehrte Zufuhr von Omega-3-Fettsäuren führt zu einer Hemmung der COX zu einer Reduktion der AA-Abkömmlinge, allen voran des Prostaglandin E₂ (PGE₂) und zum anderen zur Bildung von Eikosanoidmediatoren mit signifikant geringerer biologischer Aktivität [Li et al. 1994, Petrik et al. 2000a, b].

So konnte beim Menschen unter Supplementierung von Fischölpräparaten über 4 Wochen die Rate der rektalen Epithelzellproliferation reduziert werden, begleitet von einer verminderten Prostaglandin E₂- und Thromboxan A₂-Syntheserate [Rao et al. 1996].

Des Weiteren scheinen Omega-3-Fettsäuren intrazelluläre Signaltransduktionswege, einschließlich der über diese Mechanismen regulierten Genexpression, zu modulieren (Kap. 1.3.1.3). Hierzu gehören unter anderem die Proteinkinase C (PKC)-Signalwege.

Die PKC ist ein bedeutender intrazellulärer Botenstoff mit regulativer Wirkung auf den Zellzyklus und die Genexpression [Alexander 1998] (Kap. 1.3.3.3.1).

Veränderungen des PKC-Signalübertragungsweges scheinen unter anderem bei der Kolonkarzinogenese eine bedeutende Rolle zu spielen [Craven und DeRubertis 1992]. Beim kolorektalen Karzinom wurde eine Überexpression der PKC-Isoform PKC β II gefunden [Sakanoue et al. 1991, Craven und DeRubertis 1992]. Davidson und Mitarbeiter (2000) konnten am Rattenmodell unter einer Fischöldiät eine Hemmung der karzinogen-induzierten PKC β II-Expression nachweisen. Diese war verbunden mit einer Abnahme der Zellproliferation und einer Zunahme der Apoptose [Davidson et al. 2000].

Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Interaktion mit dem Peroxisomen-Proliferatoren-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR γ) (Kap. 1.3.3.3.3).

Einige kürzlich erschienene Studien konnten zeigen, dass PPAR γ -Liganden das Wachstum von Tumorzellen der Brust, Prostata, Lunge und des Kolon hemmen [Brockman et al. 1998, Elstner et al. 1998, Kubota et al. 1998, Tsubouchi et al. 2000]. In zwei dieser Studien gelang der Nachweis einer vermehrten Apoptoseinduktion durch die getesteten PPAR γ -Liganden [Elstner et al. 1998, Tsubouchi et al. 2000].

Da Fettsäuren als PPAR-Liganden identifiziert werden konnten [Isseman und Green 1990, Gottlicher et al. 1992], scheint ein möglicher Mechanismus für die tumorsuppressive Wirkung der Omega-3-Fettsäuren, die Vermittlung durch PPAR-abhängige Signalwege zu sein.

Die derzeitig vorliegenden Ergebnisse zum Effekt von Omega-3-Fettsäuren auf PPAR-vermittelte Signalwege sind jedoch widersprüchlich und bedürfen weiterer Klärung. So konnten Murata et al. (2001) in ihren Untersuchungen EPA als PPAR γ -Liganden identifizieren und nachweisen, daß EPA einen wachstumshemmenden Effekt auf Leberzellen (HepG2-Zellen) ausübt. In dieser Studie wurde jedoch kein Nachweis erbracht, daß es sich um eine PPAR-vermittelte Wachstumshemmung handelte.

Eine Inkubation der Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 mit verschiedenen Fettsäuren zeigte, dass Omega-3-Fettsäuren die Aktivierung von PPAR γ inhibierten, was mit einer Wachstumshemmung der Zellen verbunden war. Dahingegen stimulierten sowohl Omega-6-Fettsäuren als auch einfach ungesättigte und gesättigte Fettsäuren die PPAR γ -Aktivierung, was zu einer Zunahme der Zellproliferationsrate führte [Thoennes et al. 2000].

Einige Hinweise deuten darauf hin, dass die einer Aktivierung von PPAR γ folgenden Signalwege, die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NF- κ B, antagonisieren [Jiang et al. 1998, Ricote et al. 1998].

NF κ B ist einer der Transkriptionsfaktoren mit Schlüsselfunktion in der Regulation der Expression von Genen, die an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Im wesentlichen handelt es sich hierbei um Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle, Akutphaseproteine und Moleküle, die an der Kontrolle von Zellwachstum und Zellteilung beteiligt sind [Ross et al. 1999] (Kap. 1.3.3.3.2).

Camandola et al. (1996) konnten an der humanen promonozytischen Zelllinie U937 nachweisen, dass NFκB durch Arachidonsäure (AA) aktiviert wird, nicht aber durch EPA. Ebenso konnten sie den AA-Abkömmling Prostaglandin E₂ (PGE₂) als Aktivator von NFκB indentifizieren [Camandola et al. 1996].

4.3 Modulation des EGF-induzierten Zellwachstums durch die Fischölemulsion

Das Zellwachstum wird durch eine große Zahl von Wachstumsfaktoren reguliert. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein potenter Wachstumsfaktor im Gastrointestinaltrakt. Die Stimulation des membranständigen EGF-Rezeptors führt zu einer Initiierung intrazellulärer Signalübertragungswege mit nachfolgender Expression von Genen, die für das Zellwachstum verantwortlich sind [Aaronson 1991].

Tumorzellen sind in der Lage, durch Expression von Wachstumsfaktoren ihr Zellwachstum selbständig zu stimulieren [Aaronson 1991]. Zusätzlich weisen zahlreiche epitheliale Tumoren eine Überexprimierung des EGF-Rezeptors auf, so auch Tumoren des exokrinen Pankreas [Barton et al. 1991]. Der EGF-Rezeptor spielt somit eine bedeutende Rolle in der Progression von Tumoren [Mendelsohn 2001].

Zahlreiche Studien geben Hinweis darauf, dass EGF-vermittelte Signaltransduktionswege durch PUFAs beeinflusst werden [Casabiell et al. 1991, Bandyopadhyay et al. 1993, Mollerup und Haugen 1996].

Bandyopadhyay und Mitarbeiter (1987) fanden eine Verstärkung des EGF-induzierten Wachstums von MEC-Zellen durch die Omega-6-Fettsäure Linolsäure und deren Eikosanoidabkömmlinge. Dahingegen konnten German und Johanning (1997) eine Reduktion der Tumorzelladhäsion der schnell metastasierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 nach kombinierter Behandlung mit EGF und der Omega-3-Fettsäure EPA belegen.

In der vorliegenden Studie konnte in einem ersten Schritt der wachstumsstimulierende Effekt von EGF auf die humane Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 bestätigt werden. Weiterführende Experimente sollten den Effekt einer Interaktion von Omega-3-Fettsäuren mit EGF auf Mia-Paca-2 Zellen klären. Die Ergebnisse zeigen, dass eine

Präinkubation der Mia-Paca-2 Zellen mit der Omega-3-fettsäurereichen Fischölemulsion zu einer Umkehrung des wachstumsfördernden Effektes von EGF führt. Diesen Resultaten zufolge scheint eine Modulation der EGF-induzierten Signalwege durch PUFAs als sehr wahrscheinlich.

Es wird vermutet, dass die Modifikation der Lipidkomposition zellulärer Membranen mit einer Änderung der Aktivität von Membranrezeptoren, membranständigen Transportmolekülen und Enzymen, die eine wichtige Rolle in der zellulären Signalvermittlung spielen, einhergeht [Ross et al. 1999]. Abbildung 4.1 zeigt eine hypothetische Vorstellung, wie eine Modulation EGF-induzierter Signalwege stattfinden könnte.

Der EGF-Rezeptor liegt gebunden an die Membran vor. Membrangebundene Rezeptoren verfügen über eine Membrandomäne, die in Verbindung mit den Fettsäureketten der Lipiddoppelschicht steht [Spector und Burns 1987]. Außerdem unterlaufen Rezeptoren im Rahmen der lateralen Mobilität innerhalb der Ebene der Membran häufig assoziativen Reaktionen [Biswas et al. 1985]. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Veränderung der Lipidkomposition der Membran durch die Inkorporation von EPA die Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor oder die EGF-induzierten Signalwege beeinflusst.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Interaktion der EGF-induzierten Signalwege mit intrazellulären Vorgängen, die der enzymatischen Freisetzung von EPA aus der Membran folgen. Wie bereits ausführlich diskutiert, spielen viele der nachfolgend synthetisierten Metaboliten, wie beispielsweise die Eikosanoide, Phosphatidylsäure und die sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Ceramide eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellmetabolismus [Nishizuka 1995] (Kap. 1.3.3.3).

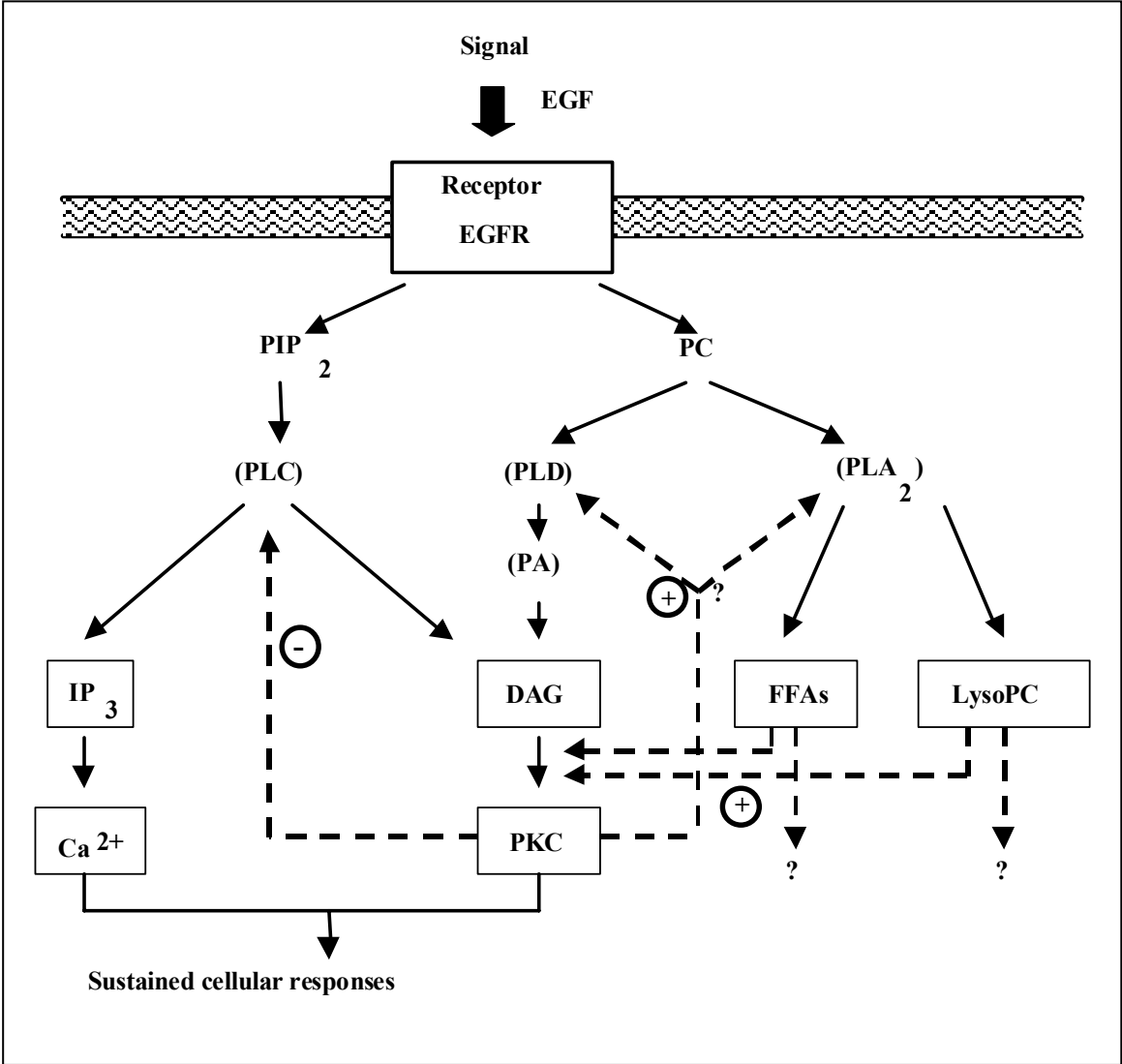


Abb. 4.1 Hypothetische Darstellung des Netzwerkes EGF- und MUF-vermittelter intrazellulärer Signalwege [Nishizuka 1995].
DAG Diacylglycerol, IP₃ Inositoltriphosphat, PA Phosphatidylsäure; PC Phosphatidylcholin; PIP₂ Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PKC Proteinkinase C, PLA₂ Phospholipase A₂, PLC Phospholipase C, PLD Phospholipase D, LysoPC Lysophosphatidylcholin.

4.4 Induktion der Apoptose

In allen Geweben ist die Kontrolle der Zellzahl das Resultat eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Zelltod. Die häufigste Form von Zelltod im Organismus ist die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt. Die Apoptose spielt eine fundamentale Rolle im Organismus. Sie ist verantwortlich für die Homöostase von Geweben und für die Beseitigung von alten, verletzten und mutierten Zellen. Die Apoptose ist daher nicht nur für die Entwicklung von Geweben wichtig, sondern auch für das Aufspüren von Tumorzellen [Kerr et al. 1994].

Seit einiger Zeit konzentriert sich das Interesse auf die Bedeutung der Apoptose hinsichtlich Tumorentwicklung und Behandlung von Neoplasien [Kerr et al. 1994]. Es wird davon ausgegangen, dass die Inhibierung der Apoptose wesentlich an der Entwicklung und Progression von Tumoren beteiligt ist [Kerr et al. 1994]. Die Bedeutung der Apoptose in der Behandlung bereits etablierter Tumore basiert auf der Beobachtung, dass γ -Strahlung und viele in der Krebschemotherapie eingesetzte Zytostatika durch eine Induktion der Apoptose wirksam sind [Kerr et al. 1994].

Die Apoptose ist ein aktiver physiologischer Prozess, der durch eine spezifische Genexpression eng reguliert wird. Bei der Induktion der Apoptose wird ein Mechanismus aktiviert, der in charakteristischer Weise zum Selbstmord der Zelle führt und mit einer Vielzahl morphologischer und biochemischer Veränderungen einhergeht. Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle, die Kondensation des Chromatins, Zerfall der DNA (DNA-Fragmentierung) und die Bildung apoptotischer Körperchen („blebbing“). Die Apoptose wird durch eine Signalkaskade vermittelt, in der proteinspaltende Caspasen eine bedeutende Rolle spielen. Die Aktivierung der Caspase-3 wird als entscheidender Schritt zur Einleitung des Zelluntergangs angesehen [Nicholson et al. 1995].

In experimentellen Studien an verschiedenen humanen Karzinomzelllinien konnte belegt werden, dass Omega-3-Fettsäuren Apoptose induzieren [Finstad et al. 1994, Lai et al. 1996, Chiu und Wan 1999, Clarke 1999].

Lai et al. (1996) konnten mittels DNA-Fragmentierung die Induktion von Apoptose nach Behandlung von Mia-Paca-2 Zellen mit 50 μ M EPA nachweisen. Diese Ergebnisse konnten durch Hawkins et al. (1998) bestätigt werden. Allerdings setzten

diese in ihren Versuchen zur Apoptoseinduktion etwas höhere Konzentrationen von EPA (100 µM) ein.

In vivo-Studien zum Effekt diätetischer Faktoren auf die Kolonkarzinogenese konnten ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate nach Fütterung von Fischöl nachweisen [Chang et al. 1998]. Bei AOM-induzierten Kolontumoren im Rattenmodell konnte nach Fütterung einer fischöltreichen Diät eine größere Zahl apoptotischer Zellen in allen Segmenten des proximalen Kolons nachgewiesen werden als nach Fütterung einer Diät mit Maiskeimöl [Chang et al. 1998].

In der vorliegenden Studie konnte die Fähigkeit der Fischölkomponenten zur Induktion von Apoptose bestätigt werden. Der Effekt der Fischölemulsion hinsichtlich einer Auslösung von Apoptose wurde an der Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 untersucht. Die Induktion einer Apoptose konnte sowohl morphologisch als auch durch eine Zunahme der Caspase-3-Aktivität nachgewiesen werden. Fluoreszenzmikroskopisch waren nach Anfärbung der Zellen mit DAPI typische Merkmale apoptotischer Zellveränderungen sichtbar. Eine Steigerung der Caspase-3-Aktivität war bereits nach 24 Stunden Inkubation mit der Fischölemulsion zu belegen.

Bisher ist noch unklar über welchen Mechanismus die Apoptoseinduktion durch Omega-3-Fettsäuren vermittelt wird. Wie bereits weiter vorne angemerkt wurde, handelt es sich bei der Apoptose um einen Prozess, der durch eine spezifische Genexpression eng reguliert wird. Regulativ wirksame Gene sind unter anderem Bax und Bcl-2. Bax begünstigt die Apoptose, wohingegen Bcl-2 ein zellulärer Inhibitor der Apoptose ist [Jacobson et al. 1993]. Chiu und Wan (1999) fanden in Untersuchungen an den humanen Leukämiezellen HL-60 eine Herabregulierung der Bcl-2-Expression als möglichen Wirkmechanismus für die EPA-induzierte Apoptoseinduktion.

Neben den bereits genannten, greifen in den Prozess der Apoptose eine Vielzahl anderer Faktoren modulierend ein. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz scheint die Modulation des Eikosanoidstoffwechsels durch Omega-3-Fettsäuren zu sein.

Kokawa et al. (2001) konnten kürzlich nachweisen, dass das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese, die Cyclooxygenase-2 (COX-2), in Pankreaskarzinomen überexprimiert wird (Kap. 1.3.1.1.2). Die Blockierung der COX durch spezifische

COX-Inhibitoren führte zu einer Hemmung der Proliferation und einer Apoptoseinduktion bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien [Ding et al. 2000].

Hiermit übereinstimmend sind die Ergebnisse der Untersuchungen von Schiff et al. (1996). Diese konnten an Kolonkarzinomzellen eine Apoptoseinduktion nach Behandlung mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSARs), die durch eine Inhibierung der COX wirken, nachweisen [Schiff et al. 1996].

In einigen neueren Studien wurde eine positive Korrelation zwischen der Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂), einem COX-Produkt, und der Aktivierung des antiapoptotisch wirksamen Transkriptionsfaktors NFκB gefunden [Camandola et al. 1996, Kojima et al. 2000, Lim et al. 2001].

Ein möglicher Mechanismus für die Apoptoseinduktion durch Omega-3-Fettsäuren könnte somit die Aktivitätsminderung von NFκB, vermittelt durch eine Abnahme von PGE₂, sein. So konnten Camandola et al. (1996) den Nachweis erbringen, dass zwar Arachidonsäure (AA) und dessen Abkömmling PGE₂ zu einer Aktivierung von NFκB führen, nicht aber EPA.

4.5 Einfluss auf den Zellzyklus

Substanzen, die modulierend auf das Zellwachstum wirken, üben ihren Effekt in der Regel in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus aus. Dies konnte auch für die Omega-3-Fettsäure EPA bestätigt werden.

An promyelozytischen Leukämiezellen wurde eine Hemmung des Zellzyklus in den G₁- und S-Phase gefunden [Finstad et al. 1994]. Die Untersuchung des Effektes von EPA auf die Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 zeigte eine Akkumulation der Zellen in der S- und G₂-Phase [Lai et al. 1996]. Experimente mit HT29, einer Kolonkarzinomzelllinie, ergaben eine spezifische S-Phase-Blockierung nach Behandlung mit EPA [Clarke et al. 1999].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten durchflußzytometrischen Bestimmungen zur Zellzyklusverteilung zeigten nach einer 72-stündigen Inkubation mit der Fischölemulsion eine Zunahme der S- und G₂/M-Phase-Fraktion bei Mia-Paca-2 Zellen und der G₂/M-Phase bei Caco-2 Zellen.

Der Zellzyklus umfasst einige Stadien, die die Zelle durchlaufen muß, bevor sie sich in zwei Tochterzellen teilen kann. Die Zellproliferationsrate ist dementsprechend abhängig von der Geschwindigkeit, mit der die Zellen die einzelnen Stadien des Zellzyklus durchlaufen. Das Voranschreiten des Zellzyklus wird an speziellen Kontrollpunkten entschieden. Diese Kontrollen finden am Übergang von der G₁- in die S-Phase und am Ende der G₂-Phase statt. An der Regulation dieser Kontrollpunkte sind insbesondere Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (cyclin-dependent kinases; CDK) beteiligt.

Die Zykline A und B werden überwiegend während der S- und G₂-Phase gebildet, wohingegen die Zykline D und E die größte Aktivität während der G₁-Phase aufweisen. Die Zykline bilden mit den CDKs spezifische Komplexe, die den Übergang der Zellen in die folgende Zellzyklusphase fördern.

Weitere regulative Prozesse erfolgen durch sogenannte CDK-Inhibitoren (z.B. p21^{waf1/cip1} und p27^{kip1}), die durch Bindung an den Zyklin-CDK-Komplex dessen Aktivierung verhindern.

Als Mechanismus für die Zellzyklusblockierung durch Omega-3-Fettsäuren wäre die Beeinflussung einer der genannten Faktoren, die regulierend in den Zellzyklus eingreifen möglich. Ein Hinweis hierauf konnte in Versuchen an vaskulären Zellen der glatten Muskulatur erbracht werden. Die Inkubation der Zellen mit EPA und DHA führte zu einer Inhibierung der Progression der Zellen von der G₁- in die S-Phase. Dieser Effekt wurde begleitet von einer Hemmung der CDK₂-Kinase Aktivität, was mit einer verminderten Verfügbarkeit des CDK₂-Zyklin E-Komplexes einhergeht. Keine Veränderung wurden hinsichtlich der Konzentration des Zyklin E und des CDK-Inhibitors p27^{kip1} gefunden [Terano et al. 1999].

Zur Klärung des genauen Mechanismus von Omega-3-Fettsäuren auf den Zellzyklus von Tumorzellen bedarf es weiterführender Untersuchungen.

4.6 Einfluss der Fischölemulsion auf die Chemosensibilität von Tumorzellen

Die klinische Wirksamkeit von Monochemotherapien in der Behandlung von Krebserkrankungen ist nach wie vor unbefriedigend. So erzielt beispielweise das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) bei gastrointestinalen Tumoren hinsichtlich der Rate der kompletten Remissionen kaum die 20%-Grenze.

Gemcitabin, ein gängiges Chemotherapeutikum in der Therapie des Pankreaskarzinoms, erreicht einen klinischen Nutzen und eine Symptombesserung bei 20-30% der Patienten und eine 1-jahres Überlebensdauer von 18% [Rothenberg et al. 1996, Burris et al. 1997].

Der Einsatz mehrerer Verbindungen mit antitumöröser Wirksamkeit dagegen, verspricht wesentlich höhere Effektivitätsraten. Limitierend im Einsatz von Kombinationschemotherapien sind mögliche Substanzinteraktionen und das Nebenwirkungsprofil. Neue therapeutische Strategien konzentrieren sich auf Kombinationsschemata mit „natürlichen“ Substanzen, die den Effekt gängiger Zytostatika mit bekannter Wirksamkeit in der Monochemotherapie potenzieren und dabei ein geringes Nebenwirkungsprofil aufweisen.

Sowohl im Zellkulturversuch als auch in tierexperimentellen Studien mehrten sich die Hinweise darauf, dass exogen zugeführte Fettsäuren die zytotoxische Aktivität verschiedener Chemotherapeutika beeinflussen können [Shao et al. 1997, Germain et al. 1998].

In vitro-Studien zeigten eine Zunahme der zytostatischen Aktivität von Doxorubicin auf L1210 Leukämiezellen, auf kleinzellige Lungenkarzinomzellen und auf die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 bei kombinierter Gabe mit PUFAs, insbesondere solchen der Omega-3-Fettsäurefamilie [Guffy et al. 1984, Zijlstra et al. 1987, Germain et al. 1998].

Timmer-Boscha et al. (1989) konnten eine Steigerung der Wirksamkeit von Cisplatin durch DHA an der cisplatinresistenten Lungenkarzinomzelllinie GLC₄-CP nachweisen. Yamamoto et al. (1999) belegen eine synergistische Wirkung von EPA und TNP-470, einem Angiogeneseinhibitor, auf verschiedene humane Brustkrebszelllinien.

Diese Ergebnisse konnten in tierexperimentellen Studien bestätigt werden. Bei experimentell induziertem Mammakarzinom im Mausmodell wurde ein besseres Ansprechen der Tumore auf Mitomycin C und Cyclophosphamid nach Fütterung einer fischölsreichen Diät erzielt [Borgeson et al. 1989, Shao et al. 1997].

Erste Studien an Patienten wurden von Bougnoux und Mitarbeitern (1999) durchgeführt. Sie untersuchten an 56 Patientinnen mit Mammakarzinom die Fettsäurezusammensetzung des Brustfettgewebes vor Beginn einer Kombinationschemotherapie mit Mitoxantrone, Vindesine, Cyclophosphamid und 5-Fluorouracil. Nach drei Zyklen der Chemotherapie wurde die Ansprechrate der Tumoren nach den gültigen WHO-Kriterien überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass in der Gruppe der Patientinnen mit kompletter oder teilweiser Remission, die Konzentration an Omega-3-Fettsäuren im Fettgewebe signifikant höher war als in der Gruppe der Patientinnen, die nicht auf die Chemotherapie ansprachen [Bougnoux et al. 1999].

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten konnten die Ergebnisse vorheriger Studien bestätigen. Der Einsatz der Fischölemulsion in Kombination mit Gemcitabin und 5-FU bei Mia-Paca-2 Zellen bzw. Caco-2 Zellen induzierte eine signifikant höhere Zytotoxizität als jede der Substanzen alleine.

In den Kombinationsexperimenten wurden alle Substanzen in suboptimaler Dosierung, das heißt in einer Konzentration unterhalb des IC_{50} -Wertes, eingesetzt. Die Mehrzahl der Zytostatika weist eine steile Dosis-Wirkungs-Beziehung auf, das heißt, dass mit Erhöhung der gegebenen Dosis der erwünschte Effekt deutlich gesteigert wird. Zum Ziele der Heilung ist es sinnvoll, die höchste mögliche Dosis einzusetzen, die jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden sein kann. Eine Dosisreduktion durch Kombination mit nebenwirkungsarmen Substanzen, die additive bzw. synergistische Effekte auf die Wirksamkeit von Zytostatika ausüben, kann somit von großem klinischem Nutzen sein. In Studien konnte gezeigt werden, dass Omega-3-Fettsäuren eine selektive zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen haben und keine oder nur geringe Effekte auf nicht-maligne Zellen ausüben [Begin et al. 1986, Mollerup und Haugen 1996]. Des weiteren konnten auch in Langzeituntersuchungen an Patienten unter dauerhafter hochdosierter Fischölsupplementation keine nachteiligen Effekte gesehen werden [Saynor und Gillott 1992]. Somit haben Omega-3-Fettsäuren im Vergleich zu antineoplastischen Substanzen mit geringerer Selektivität, möglicherweise das Potential

Nebenwirkungen einer antineoplastischen Therapie zu reduzieren. Erste Hinweise hierauf gaben einige kürzlich erschienene Studien [Hardman et al. 1999, Ogilvie et al. 2000].

Bisher ist noch unklar, durch welche Mechanismen Omega-3-Fettsäuren zu einer Modulation der Sensibilität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika führen. Verschiedene Möglichkeiten werden derzeit diskutiert.

Eine mögliche Erklärung ist eine gesteigerte Aufnahme des Zytostatikums in die Zelle. Hinweise hierauf geben die Untersuchungen von Burns und North (1986), die eine erhöhte Akkumulation von radioaktiv markiertem Doxorubicin nach Behandlung der Zellen mit Omega-3-Fettsäuren fanden.

Der Transport von Chemotherapeutika in das Zellinnere scheint genauso wie die Membranfluidität in hohem Maße von dem Verhältnis gesättigter zu ungesättigter Fettsäuren in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran abhängig zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass mit Zunahme des Anteils mehrfach ungesättigter Fettsäuren sowohl die Membranfluidität als auch die Aufnahme chemotherapeutisch wirksamer Substanzen zunimmt [Tsai et al. 1997].

Dieser Effekt scheint jedoch nicht spezifisch für Omega-3-Fettsäuren zu sein. Eine Erhöhung der Membranfluidität wird von allen mehrfach ungesättigten Fettsäuren gleichermaßen bewirkt, jedoch besteht eine Korrelation mit der Anzahl der Doppelbindungen. Somit stellen die hochungesättigten Omega-3-Fettsäuren in dieser Hinsicht eine optimale verfügbare Quelle dar [Burns und North 1986].

Weiterhin führen Modifikationen der Plasmamembran hinsichtlich des Sättigungsindex zu Veränderungen in der Anfälligkeit gegenüber oxidativen Prozessen. Dies ist ein möglicher Mechanismus für die Wirksamkeit von Zytostatika mit großem Potential zur Bildung von Peroxiden. Mit Zunahme des Anteils ungesättigter Fettsäuren in den Membranen steigt die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber peroxidativen Prozessen, die durch Zytostatika induziert werden [Germain et al. 1998].

Auch dieser Effekt ist nicht spezifisch für Omega-3-Fettsäuren. Germain et al. (1998) fanden in ihren Untersuchungen eine Zunahme der zytotoxischen Aktivität von Doxorubicin durch alle mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die mit der Anzahl der Doppelbindungen der jeweiligen Fettsäure korrelierte. Die potenteste Wirkung zeigte

DHA. Bei Zugabe eines Antioxidanz war der Effekt der MUFs auf die Doxorubicinaktivität nicht nachweisbar [Germain et al. 1998].

Dies konnte durch tierexperimentelle Studien von Yam et al. (2001) nicht bestätigt werden. Sie untersuchten an Mäusen mit Lewis Lungenkarzinomen (3LL) den Effekt von Diäten mit unterschiedlicher Fett- und Antioxidanzzusammensetzung in Kombination mit einer Cisplatin-Chemotherapie. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination Cisplatin mit Fischöl plus Vitamine E und C das Tumorwachstum signifikant stärker hemmte als die Kombination Cisplatin mit Fischöl alleine [Yam et al. 2001]. Dies deutet daraufhin, dass andere Mechanismen als eine erhöhte Lipidperoxidation an dem Effekt von Omega-3-Fettsäuren auf die Aktivität von Zytostatika beteiligt sein könnten.

In einer kürzlich erschienen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B und der Sensibilität der Zellen gegenüber Zytostatika aufgedeckt werden. Die Autoren konnten an den chemoresistenten humanen Pankreaskarzinomzelllinien Capan-1 und A 818-4 belegen, dass eine Inhibierung von NF κ B zu einer Reduktion der Chemoresistenz gegenüber Doxorubicin und Etoposid (VP16) führt [Arlt et al. 2001].

Bei den Antimetaboliten Gemcitabin und 5-FU handelt es sich um phasenspezifische Zytostatika, d.h. sie entfalten ihre Wirkung nur in einer speziellen Zellzyklusphase. Beide Substanzen sind Hemmstoffe der Nukleotid- und DNA-Synthese und hemmen somit die Zellen in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus.

Von den insgesamt vorhandenen Zellen eines Gewebes befindet sich jeweils immer nur ein Teil im Teilungszyklus. Dieser Teil wird als Wachstumsfraktion bezeichnet. Die anderen Zellen gehören zu dem nichtproliferierenden Kompartiment. Sie sind überwiegend in der Ruhephase, der G₀-Phase. Bei soliden Tumoren liegen oftmals bis zu 90% aller Tumorzellen in der Ruhephase vor.

Die Wachstumsgeschwindigkeit eines Gewebes hängt vor allem von der Größe der Wachstumsfraktion ab. Unter den verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterscheidet sich bei den Tumoren vor allem die Länge der G₁-Phase. Die Dauer der S-Phase, der G₂-Phase und der M-Phase ist vergleichsweise konstant.

Da Zellen in der G₀- und G₁-Phase besonders unempfindlich gegenüber der Einwirkung vieler Zytostatika sind, kommt es für den Erfolg der Therapie darauf an, wie groß der Anteil der Zellen in den übrigen Phasen ist.

In den Untersuchungen zum Effekt der Fischölemulsion auf den Zellzyklus der untersuchten Zelllinien konnte eine Akkumulation der Zellen in der S- und G₂/M-Phase bei den Mia-Paca-2 Zellen und in der S-Phase bei den Caco-2 Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase nahm ab. Möglicherweise ist die Potenzierung des Effektes der eingesetzten Zytostatika bei gleichzeitiger Behandlung mit der Fischölemulsion bedingt durch die Zunahme der Zellen in der chemosensitiven S- und G₂-Phase.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In zahlreichen Studien konnte ein tumorwachstumshemmender Effekt der überwiegend in Fischöl vorkommenden Omega-3-Fettsäuren, insbesondere der Eikosapentaensäure (EPA), belegt werden. In den bisher vorliegenden Studien wurde überwiegend der Effekt freier Fettsäuren auf das Wachstum von Tumorzellen untersucht. Ziel dieser Studie war es deshalb, den Effekt einer Fettemulsion mit komplexer Triglyzeridstruktur, die als solche auch am Patienten im Rahmen einer parenteralen Ernährung Anwendung findet, auf das Wachstum der Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 und der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 zu untersuchen, und die zugrundeliegenden Mechanismen für die erhobenen Effekte zu evaluieren.

- *Die in der vorliegenden Studie eingesetzte Fischölemulsion hemmte die Proliferation sowohl der Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 als auch der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 dosis- und zeitabhängig. Dieser Effekt war auf eine Zunahme der Apoptoseinduktion und eine Blockierung der Zellen in der S- und G₂/M-Phase des Zellzyklus zurückzuführen.*

Tumorzellen sind in der Lage, durch Expression von Wachstumsfaktoren ihr Zellwachstum selbständig zu stimulieren. Eine bedeutende Rolle scheint in diesem Zusammenhang der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) zu spielen. Bei zahlreichen Tumoren kann eine Überexpression des membranständigen EGF-Rezeptors nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise, dass die Modifikation der Lipidkomposition zellulärer Membranen durch ein verändertes Angebot an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einer Änderung der Aktivität von Membranrezeptoren einhergeht. In weiterführenden Experimenten wurde deshalb der Einfluß von EGF auf das Wachstum der mit der Omega-3-fettsäurereichen Fischölemulsion vorbehandelten Pankreaskarzinomzelllinie Mia-Paca-2 untersucht.

- *Eine Präinkubation der Mia-Paca-2 Zellen mit der Omega-3-fettsäurereichen Fischölemulsion führte zu einer Umkehrung des wachstumsfördernden Effektes von EGF.*

Eine entscheidende Determinante in der Entwicklung und dem Wachstum von Tumoren ist deren Sensitivität gegenüber chemotherapeutischer Behandlung. Das Auftreten von chemotherapieresistenten Tumorzellen ist häufig limitierender Faktor für eine erfolgreiche zytostatische Therapie. In einem weiteren Versuchsansatz sollte deshalb der Fragestellung nachgegangen werden, ob eine Verbesserung der Wirksamkeit gängiger Chemotherapeutika in der Antitumorthherapie von Pankreas- und Kolonkarzinomen nach kombinierter Behandlung mit der Fischölmulsion zu erwarten ist.

- *Der Einsatz der Fischölemulsion in Kombination mit Gemcitabin und 5-FU bei Mia-Paca-2 Zellen bzw. Caco-2 Zellen führte zu einem additiven wachstumshemmenden Effekt.*

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass Omega-3-fettsäurereiche Lipidemulsionen eine sinnvolle adjuvante therapeutische Maßnahme in der Behandlung des Pankreas- und Kolonkarzinoms darstellen können.

6 LITERATUR

Aaronson,S.A. (1991) Growth factors and cancer. *Science*, **254**, 1146-1153.

Abou-el-Ela,S.H., Prasse,K.W., Farrell,R.L., Carroll,R.W., Wade,A.E., Bunce,O.R. (1989) Effects of D,L-2-difluoromethylornithine and indomethacin on mammary tumor promotion in rats fed high n-3 and/or n-6 fat diets. *Cancer Res.*, **49**, 1434-1440.

Alexander,J.W. (1998) Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. *Nutrition*, **14**, 627-633.

Anonymous (1999) Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*, **354**, 447-455.

Anti,M., Marra,G., Armelao,F., Bartoli,G.M., Ficarelli,R., Percesepe,A., De,V., I, Maria,G., Sofo,L., Rapaccini,G.L. (1992) Effect of omega-3 fatty acids on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer. *Gastroenterology*, **103**, 883-891.

Anti,M., Armelao,F., Marra,G., Percesepe,A., Bartoli,G.M., Palozza,P., Parrella,P., Canetta,C., Gentiloni,N., De,V., I, (1994) Effects of different doses of fish oil on rectal cell proliferation in patients with sporadic colonic adenomas. *Gastroenterology*, **107**, 1709-1718.

Arlt,A., Vorndamm,J., Breitenbroich,M., Folsch,U.R., Kalthoff,H., Schmidt,W.E., Schafer,H. (2001) Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene*, **20**, 859-868.

Auboeuf,D., Rieusset,J., Fajas,L., Vallier,P., Frering,V., Riou,J.P., Staels,B., Auwerx,J., Laville,M., Vidal,H. (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*, **46**, 1319-1327.

Bandyopadhyay,G.K., Imagawa,W., Wallace,D., Nandi,S. (1987) Linoleate metabolites enhance the in vitro proliferative response of mouse mammary epithelial cells to epidermal growth factor. *J.Biol.Chem.*, **262**, 2750-2756.

Bandyopadhyay,G.K., Hwang,S., Imagawa,W., Nandi,S. (1993) Role of polyunsaturated fatty acids as signal transducers: amplification of signals from growth factor receptors by fatty acids in mammary epithelial cells. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, **48**, 71-78.

Bang,H.O., Dyerberg,J., Hjoorne,N. (1976) The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med.Scand.*, **200**, 69-73.

- Barber, M.D., Ross, J.A., Voss, A.C., Tisdale, M.J., Fearon, K.C. (1999) The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. *Br.J.Cancer*, **81**, 80-86.
- Barber, M.D., Ross, J.A., Preston, T., Shenkin, A., Fearon, K.C. (1999) Fish oil-enriched nutritional supplement attenuates progression of the acute-phase response in weight-losing patients with advanced pancreatic cancer. *J.Nutr.*, **129**, 1120-1125.
- Baronzio, G., Freitas, I., Griffini, P., Bertone, V., Pacini, F., Mascaro, G., Razzini, E., Gramaglia, A. (1994) Omega-3 fatty acids can improve radioresponse modifying tumor interstitial pressure, blood rheology and membrane peroxidability. *Anticancer Res.*, **14**, 1145-1154.
- Baronzio, G.F., Solbiati, L., Ierace, T., Barzaghi, F., Suter, F., Airolidi, M., Belloni, G., Ravagnani, F., Notti, P., Gramaglia, A. (1995) Adjuvant therapy with essential fatty acids (EFAs) for primary liver tumors: some hypotheses. *Med.Hypotheses*, **44**, 149-154.
- Barton, C.M., Hall, P.A., Hughes, C.M., Gullick, W.J., Lemoine, N.R. (1991) Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J.Pathol.*, **163**, 111-116.
- Bartram, H.P., Gostner, A., Scheppach, W., Reddy, B.S., Rao, C.V., Dusel, G., Richter, F., Richter, A., Kasper, H. (1993) Effects of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids, and prostaglandin E2 release in healthy subjects. *Gastroenterology*, **105**, 1317-1322.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., Baltimore, D. (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*, **376**, 167-170.
- Begin, M.E., Ells, G., Das, U.N., Horrobin, D.F. (1986) Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J.Natl.Cancer Inst.*, **77**, 1053-1062.
- Berg, J.W. (1975) Can nutrition explain the pattern of international epidemiology of hormone-dependent cancers? *Cancer Res.*, **35**, 3345-3350.
- Biswas, R., Basu, M., Sen-Majumdar, A., Das, M. (1985) Intrapeptide autophosphorylation of the epidermal growth factor receptor: regulation of kinase catalytic function by receptor dimerization. *Biochemistry*, **24**, 3795-3802.
- Black, J.D. (2000) Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci.*, **5**, D406-D423.
- Borgeson, C.E., Pardini, L., Pardini, R.S., Reitz, R.C. (1989) Effects of dietary fish oil on human mammary carcinoma and on lipid- metabolizing enzymes. *Lipids*, **24**, 290-295.
- Bougnoux, P., Germain, E., Chajes, V., Hubert, B., Lhuillery, C., Le Floch, O., Body, G., Calais, G. (1999) Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *Br.J.Cancer*, **79**, 1765-1769.

- Brockman, J.A., Gupta, R.A., DuBois, R.N. (1998) Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, **115**, 1049-1055.
- Broitman, S.A., Vitale, J.J., Vavrousek-Jakuba, E., Gottlieb, L.S. (1977) Polyunsaturated fat, cholesterol and large bowel tumorigenesis. *Cancer*, **40**, 2455-2463.
- Bull, A.W., Soullier, B.K., Wilson, P.S., Hayden, M.T., Nigro, N.D. (1979) Promotion of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res.*, **39**, 4956-4959.
- Burns, C.P., North, J.A. (1986) Adriamycin transport and sensitivity in fatty acid-modified leukemia cells. *Biochim.Biophys.Acta*, **888**, 10-17.
- Burris, H.A., III, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D., Von Hoff, D.D. (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J.Clin.Oncol.*, **15**, 2403-2413.
- Calder, P.C., Davis, J., Yaqoob, P., Pala, H., Thies, F., Newsholme, E.A. (1998) Dietary fish oil suppresses human colon tumour growth in athymic mice. *Clin.Sci.*, **94**, 303-311.
- Camandola, S., Leonarduzzi, G., Musso, T., Varesio, L., Carini, R., Scavazza, A., Chiarpotto, E., Baeuerle, P.A., Poli, G. (1996) Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **229**, 643-647.
- Carroll, K.K., Khor, H.T. (1975) Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog.Biochem.Pharmacol.*, **10**, 308-353.
- Casabiell, X., Pandiella, A., Casanueva, F.F. (1991) Regulation of epidermal-growth-factor-receptor signal transduction by cis-unsaturated fatty acids. Evidence for a protein kinase C- independent mechanism. *Biochem.J.*, **278 (Pt 3)**, 679-687.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.*, **257**, 7847-7851.
- Caygill, C.P., Hill, M.J. (1995) Fish, n-3 fatty acids and human colorectal and breast cancer mortality. *Eur.J.Cancer Prev.*, **4**, 329-332.
- Caygill, C.P., Charlett, A., Hill, M.J. (1996) Fat, fish, fish oil and cancer. *Br.J.Cancer*, **74**, 159-164.
- Chang, W.L., Chapkin, R.S., Lupton, J.R. (1998) Fish oil blocks azoxymethane-induced rat colon tumorigenesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation. *J.Nutr.*, **128**, 491-497.
- Chapkin, R.S., Gao, J., Lee, D.Y., Lupton, J.R. (1993) Dietary fibers and fats alter rat colon protein kinase C activity: correlation to cell proliferation. *J.Nutr.*, **123**, 649-655.

- Chinetti,G., Griglio,S., Antonucci,M., Torra,I.P., Delerive,P., Majd,Z., Fruchart,J.C., Chapman,J., Najib,J., Staels,B. (1998) Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J.Biol.Chem.*, **273**, 25573-25580.
- Chiu,L.C., Wan,J.M. (1999) Induction of apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of bcl-2 expression. *Cancer Lett.*, **145**, 17-27.
- Clarke,R.G., Lund,E.K., Latham,P., Pinder,A.C., Johnson,I.T. (1999) Effect of eicosapentaenoic acid on the proliferation and incidence of apoptosis in the colorectal cell line HT29. *Lipids*, **34**, 1287-1295.
- Craven,P.A., DeRubertis,F.R. (1992) Alterations in protein kinase C in 1,2-dimethylhydrazine induced colonic carcinogenesis. *Cancer Res.*, **52**, 2216-2221.
- Croset,M., Guichardant,M., Lagarde,M. (1988) Different metabolic behavior of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human platelets. *Biochim.Biophys.Acta*, **961**, 262-269.
- Davidson,L.A., Brown,R.E., Chang,W.C., Morris,J.S., Wang,N., Carroll,R.J., Turner,N.D., Lupton,J.R., Chapkin,R.S. (2000) Morphodensitometric analysis of protein kinase C beta(II) expression in rat colon: modulation by diet and relation to in situ cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis*, **21**, 1513-1519.
- Deschner,E.E., Lytle,J.S., Wong,G., Ruperto,J.F., Newmark,H.L. (1990) The effect of dietary omega-3 fatty acids (fish oil) on azoxymethanol- induced focal areas of dysplasia and colon tumor incidence. *Cancer*, **66**, 2350-2356.
- Devchand,P.R., Keller,H., Peters,J.M., Vazquez,M., Gonzalez,F.J., Wahli,W. (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, **384**, 39-43.
- Ding,X.Z., Iversen,P., Cluck,M.W., Knezetic,J.A., Adrian,T.E. (1999) Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **261**, 218-223.
- Ding,X.Z., Kuszynski,C.A., El Metwally,T.H., Adrian,T.E. (1999) Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **266**, 392-399.
- Ding,X.Z., Tong,W.G., Adrian,T.E. (2000) Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.*, **20**, 2625-2631.
- Diplock,A.T., Rice-Evans,C.A., Burdon,R.H. (1994) Is there a significant role for lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention? *Cancer Res.*, **54**, 1952s-1956s.
- Dippenaar,N., Booyens,J., Fabbri,D., Engelbrecht,P., Katzeff,I.E. (1982) The reversibility of cancer: evidence that malignancy in human hepatoma cells is gamma-linolenic acid deficiency-dependent. *S.Afr.Med.J.*, **62**, 683-685.

- Dupont, I.E., Carpentier, Y.A. (1999) Clinical use of lipid emulsions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2**, 139-145.
- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., DuBois, R.N. (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, **107**, 1183-1188.
- Eberhart, C.E., DuBois, R.N. (1995) Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, **109**, 285-301.
- Ells, G.W., Chisholm, K.A., Simmons, V.A., Horrobin, D.F. (1996) Vitamin E blocks the cytotoxic effect of gamma-linolenic acid when administered as late as the time of onset of cell death--insight into the mechanism of fatty acid induced cytotoxicity. *Cancer Lett.*, **98**, 207-211.
- Elstner, E., Muller, C., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J.W., Heber, D., Koeffler, H.P. (1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXN mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8806-8811.
- Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V.E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J.W., Cannon, J.G., Rogers, T.S., Klempner, M.S., Weber, P.C. (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 265-271.
- Escudero, A., Montilla, J.C., Garcia, J.M., Sanchez-Quevedo, M.C., Periago, J.L., Hortelano, P., Suarez, M.D. (1998) Effect of dietary (n-9), (n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1394**, 65-73.
- Falconer, J.S., Ross, J.A., Fearon, K.C., Hawkins, R.A., O'Riordain, M.G., Carter, D.C. (1994a) Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, **69**, 826-832.
- Falconer, J.S., Fearon, K.C., Plester, C.E., Ross, J.A., Carter, D.C. (1994b) Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. *Ann. Surg.*, **219**, 325-331.
- Finstad, H.S., Kolset, S.O., Holme, J.A., Wiger, R., Farrants, A.K., Blomhoff, R., Drevon, C.A. (1994) Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Blood*, **84**, 3799-3809.
- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 221-226.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M. (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, **83**, 803-812.
- Furst, P., Kuhn, K.S. (2000) Fish oil emulsions: what benefits can they bring? *Clin. Nutr.*, **19**, 7-14.

- Germain,E., Chajes,V., Cognault,S., Lhuillery,C., Bougnoux,P. (1998) Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int.J.Cancer*, **75**, 578-583.
- German,N.S., Johanning,G.L. (1997) Eicosapentaenoic acid and epidermal growth factor modulation of human breast cancer cell adhesion. *Cancer Lett.*, **118**, 95-100.
- Giardiello,F.M., Hamilton,S.R., Krush,A.J., Piantadosi,S., Hyland,L.M., Celano,P., Booker,S.V., Robinson,C.R., Offerhaus,G.J. (1993) Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N.Engl.J.Med.*, **328**, 1313-1316.
- Gold,E.B. (1995) Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg.Clin.North Am.*, **75**, 819-843.
- Goldberg,E.M., Zidovetzki,R. (1997) Effects of dipalmitoylglycerol and fatty acids on membrane structure and protein kinase C activity. *Biophys.J.*, **73**, 2603-2614.
- Gottlicher,M., Widmark,E., Li,Q., Gustafsson,J.A. (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**, 4653-4657.
- Grammatikos,S.I., Subbaiah,P.V., Victor,T.A., Miller,W.M. (1994) n-3 and n-6 fatty acid processing and growth effects in neoplastic and non-cancerous human mammary epithelial cell lines. *Br.J.Cancer*, **70**, 219-227.
- Grimminger, F., Walmrath, D., Seeger, W., Lasch, H. G. (1993) Parenterale Omega-3-Lipidbehandlung bei inflammatorischen Systemerkrankungen. *Med.Welt* 44, 207-216.
- Groom,H. (1993) Oil-rich fish. *Nutrition & Food Science*, **93**, 4-8.
- Guffy,M.M., North,J.A., Burns,C.P. (1984) Effect of cellular fatty acid alteration on adriamycin sensitivity in cultured L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res.*, **44**, 1863-1866.
- Guillem,J.G., O'Brian,C.A., Fitzer,C.J., Forde,K.A., LoGerfo,P., Treat,M., Weinstein,I.B. (1987) Altered levels of protein kinase C and Ca²⁺-dependent protein kinases in human colon carcinomas. *Cancer Res.*, **47**, 2036-2039.
- Hannun,Y.A., Obeid,L.M. (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem.Sci.*, **20**, 73-77.
- Hardman,W.E., Moyer,M.P., Cameron,I.L. (1999) Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side- effects. *Br.J.Cancer*, **81**, 440-448.
- Hawkins,R.A., Sangster,K., Arends,M.J. (1998) Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J.Pathol.*, **185**, 61-70.
- Hendrickse,C.W., Keighley,M.R., Neoptolemos,J.P. (1995) Dietary omega-3 fats reduce proliferation and tumor yields at colorectal anastomosis in rats. *Gastroenterology*, **109**, 431-439.

- Hennig,B., Toborek,M., Joshi-Barve,S., Barger,S.W., Barve,S., Mattson,M.P., McClain,C.J. (1996) Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and induces NF-kappa B-dependent transcription in cultured endothelial cells. *Am.J.Clin.Nutr.*, **63**, 322-328.
- Hertel,L.W., Boder,G.B., Kroin,J.S., Rinzel,S.M., Poore,G.A., Todd,G.C., Grindey,G.B. (1990) Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res.*, **50**, 4417-4422.
- Hidalgo,I.J., Raub,T.J., Borchardt,R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, **96**, 736-749.
- Hirayama,T. (1978) Epidemiology of breast cancer with special reference to the role of diet. *Prev.Med.*, **7**, 173-195.
- Holtmann,H., Hahn,T., Wallach,D. (1988) Interrelated effects of tumor necrosis factor and interleukin 1 on cell viability. *Immunobiology*, **177**, 7-22.
- Horrocks,L.A., Yeo,Y.K. (1999) Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol.Res.*, **40**, 211-225.
- Howe,G.R., Friedenreich,C.M., Jain,M., Miller,A.B. (1991) A cohort study of fat intake and risk of breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.*, **83**, 336-340.
- Huang,P., Chubb,S., Hertel,L.W., Grindey,G.B., Plunkett,W. (1991) Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.*, **51**, 6110-6117.
- Hwang,D., Rhee,S.H. (1999) Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *Am.J.Clin.Nutr.*, **70**, 545-556.
- Iigo,M., Nakagawa,T., Ishikawa,C., Iwahori,Y., Asamoto,M., Yazawa,K., Araki,E., Tsuda,H. (1997) Inhibitory effects of docosahexaenoic acid on colon carcinoma 26 metastasis to the lung. *Br.J.Cancer*, **75**, 650-655.
- Issemann,I., Green,S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**, 645-650.
- Jacobson,M.D., Burne,J.F., King,M.P., Miyashita,T., Reed,J.C., Raff,M.C. (1993) Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, **361**, 365-369.
- Jiang,C., Ting,A.T., Seed,B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, **391**, 82-86.
- Jiang,Y.H., Lupton,J.R., Chang,W.C., Jolly,C.A., Aukema,H.M., Chapkin,R.S. (1996) Dietary fat and fiber differentially alter intracellular second messengers during tumor development in rat colon. *Carcinogenesis*, **17**, 1227-1233.
- Jolly,C.A., Jiang,Y.H., Chapkin,R.S., McMurray,D.N. (1997) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J.Nutr.*, **127**, 37-43.

- Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **73**, 2013-2026.
- Kilgore, M.W., Tate, P.L., Rai, S., Sengoku, E., Price, T.M. (1997) MCF-7 and T47D human breast cancer cells contain a functional peroxisomal response. *Mol. Cell Endocrinol.*, **129**, 229-235.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., Lehmann, J.M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 4318-4323.
- Kojima, M., Morisaki, T., Izuhara, K., Uchiyama, A., Matsunari, Y., Katano, M., Tanaka, M. (2000) Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation. *Oncogene*, **19**, 1225-1231.
- Kokawa, A., Kondo, H., Gotoda, T., Ono, H., Saito, D., Nakadaira, S., Kosuge, T., Yoshida, S. (2001) Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer*, **91**, 333-338.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789-795.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L., Mignotte, B. (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, **9**, 1277-1287.
- Kromann, N., Green, A. (1980) Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med. Scand.*, **208**, 401-406.
- Kubota, T., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Asou, H., Said, J.W., Holden, S., Miyoshi, I., Koeffler, H.P. (1998) Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, **58**, 3344-3352.
- Lacal, J.C., Fleming, T.P., Warren, B.S., Blumberg, P.M., Aaronson, S.A. (1987) Involvement of functional protein kinase C in the mitogenic response to the H-ras oncogene product. *Mol. Cell Biol.*, **7**, 4146-4149.
- Lai, P.B., Ross, J.A., Fearon, K.C., Anderson, J.D., Carter, D.C. (1996) Cell cycle arrest and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells exposed to eicosapentaenoic acid in vitro. *Br. J. Cancer*, **74**, 1375-1383.
- Lanier, A.P., Bender, T.R., Blot, W.J., Fraumeni, J.F., Hurlburt, W.B. (1976) Cancer incidence in Alaska natives. *Int. J. Cancer*, **18**, 409-412.
- Leaf, A., Weber, P.C. (1988) Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 549-557.

- Lech-Maranda,E., Korycka,A., Robak,T. (2000) Influence of gemcitabine (2',2'-difluoro-deoxycytidine) and 2- chlorodeoxyadenosine on growth of normal and leukemic cells in vitro. *Eur.J.Haematol.*, **65**, 317-321.
- Li,B., Birdwell,C., Whelan,J. (1994) Antithetic relationship of dietary arachidonic acid and eicosapentaenoic acid on eicosanoid production in vivo. *J.Lipid Res.*, **35**, 1869-1877.
- Liehr,R.M., Melnykovych,G., Solomon,T.E. (1990) Growth effects of regulatory peptides on human pancreatic cancer lines PANC-1 and MIA PaCa-2. *Gastroenterology*, **98**, 1666-1674.
- Lim,J.W., Kim,H., Kim,K.H. (2001) Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab Invest*, **81**, 349-360.
- Locniskar,M., Nauss,K.M., Kaufmann,P., Newberne,P.M. (1985) Interaction of dietary fat and route of carcinogen administration on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, **6**, 349-354.
- Maehle,L., Eilertsen,E., Mollerup,S., Schonberg,S., Krokan,H.E., Haugen,A. (1995) Effects of n-3 fatty acids during neoplastic progression and comparison of in vitro and in vivo sensitivity of two human tumour cell lines. *Br.J.Cancer*, **71**, 691-696.
- Marnett,L.J. (1992) Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res.*, **52**, 5575-5589.
- Masotti,L., Casali,E., Galeotti,T. (1988) Lipid peroxidation in tumour cells. *Free Radic.Biol.Med.*, **4**, 377-386.
- Matsubara,N., Fuchimoto,S., Orita,K. (1991) Antiproliferative effects of natural human tumor necrosis factor-alpha, interferon-alpha, and interferon-gamma on human pancreatic carcinoma cell lines. *Int.J.Pancreatol.*, **8**, 235-243.
- Mayer,K., Seeger,W., Grimminger,F. (1998) Clinical use of lipids to control inflammatory disease. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care*, **1**, 179-184.
- Meade,E.A., Smith,W.L., DeWitt,D.L. (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti- inflammatory drugs. *J.Biol.Chem.*, **268**, 6610-6614.
- Mendelsohn,J. (2001) The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr.-Relat. Cancer*, **8**, 3-9.
- Metzger,U., Meier,J., Uhlschmid,G., Weihe,H. (1984) Influence of various prostaglandin synthesis inhibitors on DMH-induced rat colon cancer. *Dis.Colon Rectum*, **27**, 366-369.
- Milovic,V., Deubner,C., Zeuzem,S., Piiper,A., Caspary,W.F., Stein,J. (1995) EGF stimulates polyamine uptake in Caco-2 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **206**, 962-968.

- Minoura,T., Takata,T., Sakaguchi,M., Takada,H., Yamamura,M., Hioki,K., Yamamoto,M. (1988) Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res.*, **48**, 4790-4794.
- Mollerup,S., Haugen,A. (1996) Differential effect of polyunsaturated fatty acids on cell proliferation during human epithelial in vitro carcinogenesis: involvement of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Br.J.Cancer*, **74**, 613-618.
- Mueller,E., Sarraf,P., Tontonoz,P., Evans,R.M., Martin,K.J., Zhang,M., Fletcher,C., Singer,S., Spiegelman,B.M. (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol.Cell*, **1**, 465-470.
- Murata,M., Kaji,H., Iida,K., Okimura,Y., Chihara,K. (2001) Dual action of eicosapentaenoic acid in hepatoma cells: up-regulation of metabolic action of insulin and inhibition of cell proliferation. *J.Biol.Chem.*, **276**, 31422-31428.
- Nelson,R.L., Tanure,J.C., Andrianopoulos,G., Souza,G., Lands,W.E. (1988) A comparison of dietary fish oil and corn oil in experimental colorectal carcinogenesis. *Nutr.Cancer*, **11**, 215-220.
- Nicholson,D.W., Ali,A., Thornberry,N.A., Vaillancourt,J.P., Ding,C.K., Gallant,M., Gareau,Y., Griffin,P.R., Labelle,M., Lazebnik,Y.A. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **376**, 37-43.
- Nicholson,M.L., Neoptolemos,J.P., Clayton,H.A., Talbot,I.C., Bell,P.R. (1990) Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary N-6 polyunsaturated fats. *Carcinogenesis*, **11**, 2191-2197.
- Nielsen,N.H., Hansen,J.P. (1980) Breast cancer in Greenland--selected epidemiological, clinical, and histological features. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **98**, 287-299.
- Nigro,N.D., Singh,D.V., Campbell,R.L., Sook,M. (1975) Effect of dietary beef fat on intestinal tumor formation by azoxymethane in rats. *J.Natl.Cancer Inst.*, **54**, 439-442.
- Nishizuka,Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**, 693-698.
- Nishizuka,Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, **9**, 484-496.
- O'Connor,T.P., Roebuck,B.D., Peterson,F., Campbell,T.C. (1985) Effect of dietary intake of fish oil and fish protein on the development of L-azaserine-induced preneoplastic lesions in the rat pancreas. *J.Natl.Cancer Inst.*, **75**, 959-962.
- Ogilvie,G.K., Fettman,M.J., Mallinckrodt,C.H., Walton,J.A., Hansen,R.A., Davenport,D.J., Gross,K.L., Richardson,K.L., Rogers,Q., Hand,M.S. (2000) Effect of fish oil, arginine, and doxorubicin chemotherapy on remission and survival time for dogs with lymphoma: a double-blind, randomized placebo-controlled study. *Cancer*, **88**, 1916-1928.
- Pasqualini,E., Caillol,N., Panicot,L., Valette,A., Lombardo,D. (2000) Expression of a 70-kDa immunoreactive form of bile salt-dependent lipase by human pancreatic tumoral PaCa-2 cells. *Arch.Biochem.Biophys.*, **375**, 90-100.

- Petit-Thevenin,J., Bruneau,N., Nobili,O., Lombardo,D., Verine,A. (1998) An intracellular role for pancreatic bile salt-dependent lipase: evidence for modification of lipid turnover in transfected CHO cells. *Biochim.Biophys.Acta*, **1393**, 307-316.
- Petrik,M.B., McEntee,M.F., Johnson,B.T., Obukowicz,M.G., Whelan,J. (2000) Highly unsaturated (n-3) fatty acids, but not alpha-linolenic, conjugated linoleic or gamma-linolenic acids, reduce tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *J.Nutr.*, **130**, 2434-2443.
- Petrik,M.B., McEntee,M.F., Chiu,C.H., Whelan,J. (2000) Antagonism of arachidonic acid is linked to the antitumorigenic effect of dietary eicosapentaenoic acid in Apc(Min/+) mice. *J.Nutr.*, **130**, 1153-1158.
- Purasiri,P., Murray,A., Richardson,S., Heys,S.D., Horrobin,D., Eremin,O. (1994) Modulation of cytokine production in vivo by dietary essential fatty acids in patients with colorectal cancer. *Clin.Sci.*, **87**, 711-717.
- Que,F.G., Gores,G.J. (1996) Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology*, **110**, 1238-1243.
- Rao,C.V., Simi,B., Wynn,T.T., Garr,K., Reddy,B.S. (1996) Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A2, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities, and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor promotion in male F344 rats. *Cancer Res.*, **56**, 532-537.
- Raper,N.R., Cronin,F.J., Exler,J. (1992) Omega-3 fatty acid content of the US food supply. *J.Am.Coll.Nutr.*, **11**, 304-308.
- Reddy,B.S., Maruyama,H. (1986) Effect of dietary fish oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res.*, **46**, 3367-3370.
- Reddy,B.S., Sugie,S. (1988) Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res.*, **48**, 6642-6647.
- Reddy,B.S., Nayini,J., Tokumo,K., Rigotty,J., Zang,E., Kelloff,G. (1990) Chemoprevention of colon carcinogenesis by concurrent administration of piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug with D,L-alpha- difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor, in diet. *Cancer Res.*, **50**, 2562-2568.
- Reddy,B.S., Burill,C., Rigotty,J. (1991) Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **51**, 487-491.
- Reddy,B.S. (1992) Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids*, **27**, 807-813.
- Reddy,B.S., Rao,C.V., Rivenson,A., Kelloff,G. (1993) Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis*, **14**, 1493-1497.
- Reddy,B.S., Hirose,Y., Lubet,R., Steele,V., Kelloff,G., Paulson,S., Seibert,K., Rao,C.V. (2000) Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor,

- celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res.*, **60**, 293-297.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**, 79-82.
- Rigas, B., Goldman, I.S., Levine, L. (1993) Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J. Lab. Clin. Med.*, **122**, 518-523.
- Rose, D.P., Hatala, M.A. (1994) Dietary fatty acids and breast cancer invasion and metastasis. *Nutr. Cancer*, **21**, 103-111.
- Rose, D.P., Connolly, J.M. (1999) Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol. Ther.*, **83**, 217-244.
- Ross, J.A., Moses, A.G., Fearon, K.C. (1999) The anti-catabolic effects of n-3 fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2**, 219-226.
- Rothenberg, M.L., Moore, M.J., Cripps, M.C., Andersen, J.S., Portenoy, R.K., Burris, H.A., III, Green, M.R., Tarassoff, P.G., Brown, T.D., Casper, E.S., Storniolo, A.M., Von Hoff, D.D. (1996) A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Ann. Oncol.*, **7**, 347-353.
- Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G., Ming, U.T., Baird, S.M., Thomazy, V.A., Evans, R.M. (1998) Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat. Med.*, **4**, 1058-1061.
- Sakanoue, Y., Hatada, T., Kusunoki, M., Yanagi, H., Yamamura, T., Utsunomiya, J. (1991) Protein kinase C activity as marker for colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, **48**, 803-806.
- Samuelsson, B. (1981) Leukotrienes: mediators of allergic reactions and inflammation. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **66 Suppl 1**, 98-106.
- Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., Hla, T. (1995) Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.*, **55**, 3785-3789.
- Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F.J., DeAngelo, D.J., Partridge, J.B., Holden, S.A., Chen, L.B., Singer, S., Fletcher, C., Spiegelman, B.M. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med.*, **4**, 1046-1052.
- Saynor, R., Gillott, T. (1992) Changes in blood lipids and fibrinogen with a note on safety in a long term study on the effects of n-3 fatty acids in subjects receiving fish oil supplements and followed for seven years. *Lipids*, **27**, 533-538.
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J. (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1302**, 93-109.
- Shao, Y., Pardini, L., Pardini, R.S. (1997) Intervention of transplantable human mammary carcinoma MX-1 chemotherapy with dietary menhaden oil in athymic mice: increased

therapeutic effects and decreased toxicity of cyclophosphamide. *Nutr.Cancer*, **28**, 63-73.

Shi,Z., Azuma,A., Sampath,D., Li,Y.X., Huang,P., Plunkett,W. (2001) S-Phase arrest by nucleoside analogues and abrogation of survival without cell cycle progression by 7-hydroxystaurosporine. *Cancer Res.*, **61**, 1065-1072.

Shiff,S.J., Koutsos,M.I., Qiao,L., Rigas,B. (1996) Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp.Cell Res.*, **222**, 179-188.

Siegel,I., Liu,T.L., Yaghoubzadeh,E., Keskey,T.S., Gleicher,N. (1987) Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells. *J.Natl.Cancer Inst.*, **78**, 271-277.

Spalinger,J.H., Seidman,E.G., Lepage,G., Menard,D., Gavino,V., Levy,E. (1998a) Uptake and metabolism of structured triglyceride by Caco-2 cells: reversal of essential fatty acid deficiency. *Am.J.Physiol.*, **275**, G652-G659.

Spalinger,J.H., Seidman,E.G., Menard,D., Levy,E. (1998b) Endogenous lipase activity in Caco-2 cells. *Biochim.Biophys.Acta*, **1393**, 119-127.

Spector,A.A., Burns,C.P. (1987) Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.*, **47**, 4529-4537.

Sprecher,H. (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim.Biophys.Acta*, **1486**, 219-231.

Steel,C.M. (1989) Peptide regulatory factors and malignancy. *Lancet*, **2**, 30-34.

Steinbach,G., Lynch,P.M., Phillips,R.K., Wallace,M.H., Hawk,E., Gordon,G.B., Wakabayashi,N., Saunders,B., Shen,Y., Fujimura,T., Su,L.K., Levin,B. (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N.Engl.J.Med.*, **342**, 1946-1952.

Takahashi,M., Minamoto,T., Yamashita,N., Yazawa,K., Sugimura,T., Esumi,H. (1993) Reduction in formation and growth of 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci in rat colon by docosahexaenoic acid. *Cancer Res.*, **53**, 2786-2789.

Terano,T., Tanaka,T., Tamura,Y., Kitagawa,M., Higashi,H., Saito,Y., Hirai,A. (1999) Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by inhibiting phosphorylation of Cdk2-cyclinE complex. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **254**, 502-506.

Thoennes,S.R., Tate,P.L., Price,T.M., Kilgore,M.W. (2000) Differential transcriptional activation of peroxisome proliferator- activated receptor gamma by omega-3 and omega-6 fatty acids in MCF-7 cells. *Mol.Cell Endocrinol.*, **160**, 67-73.

Thun,M.J., Namboodiri,M.M., Heath,C.W. (1991) Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N.Engl.J.Med.*, **325**, 1593-1596.

Timmer-Bosscha,H., Hospers,G.A., Meijer,C., Mulder,N.H., Muskiet,F.A., Martini,I.A., Uges,D.R., de Vries,E.G. (1989) Influence of docosahexaenoic acid on cisplatin

- resistance in a human small cell lung carcinoma cell line. *J.Natl.Cancer Inst.*, **81**, 1069-1075.
- Tsai,W.S., Nagawa,H., Muto,T. (1997) Differential effects of polyunsaturated fatty acids on chemosensitivity of NIH3T3 cells and its transformants. *Int.J.Cancer*, **70**, 357-361.
- Tsubouchi,Y., Sano,H., Kawahito,Y., Mukai,S., Yamada,R., Kohno,M., Inoue,K., Hla,T., Kondo,M. (2000) Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **270**, 400-405.
- Tutton,P.J., Barkla,D.H. (1980) Influence of prostaglandin analogues on epithelial cell proliferation and xenograft growth. *Br.J.Cancer*, **41**, 47-51.
- Ullrich,A., Schlessinger,J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- von Schacky,C., Weber,P.C. (1985) Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans. *J.Clin.Invest*, **76**, 2446-2450.
- Watanabe,K., Kawamori,T., Nakatsugi,S., Ohta,T., Ohuchida,S., Yamamoto,H., Maruyama,T., Kondo,K., Ushikubi,F., Narumiya,S., Sugimura,T., Wakabayashi,K. (1999) Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **59**, 5093-5096.
- Weber,P.C., Fischer,S., von Schacky,C., Lorenz,R., Strasser,T. (1986) The conversion of dietary eicosapentaenoic acid to prostanoids and leukotrienes in man. *Prog.Lipid Res.*, **25**, 273-276.
- Wigmore,S.J., Ross,J.A., Falconer,J.S., Plester,C.E., Tisdale,M.J., Carter,D.C., Fearon,K.C. (1996) The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. *Nutrition*, **12**, S27-S30.
- Wigmore,S.J., Fearon,K.C., Maingay,J.P., Ross,J.A. (1997) Down-regulation of the acute-phase response in patients with pancreatic cancer cachexia receiving oral eicosapentaenoic acid is mediated via suppression of interleukin-6. *Clin.Sci.*, **92**, 215-221.
- Willett,W.C., Stampfer,M.J., Colditz,G.A., Rosner,B.A., Speizer,F.E. (1990) Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N.Engl.J.Med.*, **323**, 1664-1672.
- Williamson,R.C. (1988) Pancreatic cancer: the greatest oncological challenge. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)*, **296**, 445-446.
- Wilson,R.B., Hutcheson,D.P., Wideman,L. (1977) Dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats fed diets containing beef fat or corn oil with and without wheat bran. *Am.J.Clin.Nutr.*, **30**, 176-181.
- Wolfman,A., Macara,I.G. (1987) Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in ras-transformed fibroblasts. *Nature*, **325**, 359-361.

- Wolfram,G. (1989) Bedeutung der Omega-3-Fettsäuren in der Ernährung des Menschen. *Ernähr.-Umschau*, **36**, 319-330.
- Wolfram,G. (1995) Omega-3-Fettsäuren - ihr Stoffwechsel und ihre Wirkungen auf vaskuläres System, Fettstoffwechsel und Immunsystem. *Akt.Ernähr.Med.*, **20**, 173-179.
- Wyllie,A.H. (1987) Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J.Pathol.*, **153**, 313-316.
- Wynder,E.L., Kajitani,T., Ishikawa,S., Dodo,H., Takano,A. (1969) Environmental factors of cancer of the colon and rectum. II. Japanese epidemiological data. *Cancer*, **23**, 1210-1220.
- Yam,D., Peled,A., Shinitzky,M. (2001) Suppression of tumor growth and metastasis by dietary fish oil combined with vitamins E and C and cisplatin. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, **47**, 34-40.
- Yamamoto,D., Kiyozuka,Y., Adachi,Y., Takada,H., Hioki,K., Tsubura,A. (1999) Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.*, **55**, 149-160.
- Yip-Schneider,M.T., Barnard,D.S., Billings,S.D., Cheng,L., Heilman,D.K., Lin,A., Marshall,S.J., Crowell,P.L., Marshall,M.S., Sweeney,C.J. (2000) Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, **21**, 139-146.
- Yunis,A.A., Arimura,G.K., Russin,D.J. (1977) Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int.J.Cancer*, **19**, 218-235.
- Zijlstra,J.G., de Vries,E.G., Muskiet,F.A., Martini,I.A., Timmer-Bosscha,H., Mulder,N.H. (1987) Influence of docosahexaenoic acid in vitro on intracellular adriamycin concentration in lymphocytes and human adriamycin-sensitive and -resistant small-cell lung cancer cell lines, and on cytotoxicity in the tumor cell lines. *Int.J.Cancer*, **40**, 850-856.
- Zöllner, M. (1986) Dietary linolenic acid in man - an overview. *Prog.Lipid .Res.* **25**, 177-180.
- Zweibaum,A., Triadou,N., Kedinger,M., Augeron,C., Robine-Leon,S., Pinto,M., Rousset,M., Haffen,K. (1983) Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int.J.Cancer*, **32**, 407-412.

LEBENS LAUF

Angela Jordan

Schmidtbornstraße 14

65934 Frankfurt

geboren am 28.04.1968 in Hofgeismar

SCHULBILDUNG : 1974 – 1984 Gesamtschule Freiherr-vom-Stein, Immenhausen
1984 – 1987 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hofgeismar

AUSBILDUNG : 1987 – 1988 Großküchenpraktikum in der Betriebskantine der
AEG, Kassel
: 1988 – 1990 Ausbildung zur Diätassistentin in der Lehranstalt für
Diätassistenten am Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld

STUDIUM : 1990 – 1995 Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften
1994 – 1995 externe Diplomarbeit in der II. Med. Klinik, Abt. für
Gastroenterologie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt
Thema: „Enterale Ernährung tumorkrankter Patienten“
Oktober 1995 Erlangung des Grades Diplom-Oecotrophologin;
Abschluß mit der Note 1,8

BERUFSTÄTIGKEIT : seit 1995 Tätigkeit als Diplom-Oecotrophologin in der Ambulanz
für enterale und parenterale Ernährung an der Uniklinik
Frankfurt
1997 Beginn der Dissertation in der Forschungsgruppe von
Prof. Dr. Dr. J. Stein

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann-Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Über den Einfluss einer Omega-3-fettsäurereichen Lipidemulsion auf das Wachstum und die Chemosensibilität von humanen Pankreas- und Kolonkarzinomzellen“

in der Medizinischen Klinik II, Schwerpunkte Gastroenterologie und Pneumologie/Allergologie (Direktor: Prof. Dr. W. F. Caspary) unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. J. Stein ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Nutrition 17:474-475, 2001

Frankfurt am Main, den 14. November 2001

Angela Jordan