

Fakultät für Medizin

Modifikation der Strahlensensibilität von humanen Pankreaskarzinomzelllinien durch die phytotherapeutische Begleitbehandlung mit Curcumin

Katharina Schwarz

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung

Fakultät für Medizin

der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Stephanie E. Combs
2. Prof. Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir

Die Dissertation wurde am 27.01.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.3 Einteilung des Pankreaskarzinoms	2
1.1.4 Klinisches Bild und Diagnostik	3
1.1.6 Therapie.....	5
1.2 Bestrahlung	7
1.2.1 Anwendung	7
1.2.2 molekulare Wirkung	8
1.2.3 molekularbiologische Darstellung des Bestrahlungseffektes	8
1.3 Curcumin.....	9
1.3.1 Herkunft und Botanik.....	9
1.3.2 Struktur und Eigenschaften	9
1.3.4 Wirkung.....	10
1.3.5 Molekulare Grundlagen	11
1.3.6 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung	12
1.3.7 Therapeutischer Einsatz und klinische Studien	13
2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Apparate	16
3.1.2 Allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	16
3.1.3 Reagenzien und Chemikalien	17
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	17
3.1.5 Antikörper, Proteine und Peptide.....	18
3.1.6 Zelllinien.....	18
3.1.7 Software.....	18
3.2 Methoden	19
3.2.1 Zellkultur	19
3.2.1.1 Verwendete Zelllinien	19
3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	19
3.2.1.3 Zellkultivierung und Passage von Zellen.....	20
3.2.1.4 Zellzahlbestimmung mit Lebendfärbung	20
3.2.2 Herstellung der Curcumin-Lösung.....	21
3.2.2.1 Zytotoxizität von Dimethylsulfoxid	22
3.2.3 Wachstumsverhalten.....	22

3.2.3.1	Wachstumskurven	22
3.2.3.2	Proliferationsassay mit Alamar Blue	22
3.2.4	Colony forming assay.....	23
3.2.4.1	Etablierung der Zellzahlen	25
3.2.4.2	Etablierung der verwendeten Curcumin-Konzentrationen	26
3.2.5	Apoptose.....	26
3.2.6	Zellzyklus-Verteilung	27
3.2.7	yH2AX-FACS und Zellzyklus (Doppelfärbung)	29
3.2.8	Statistische Auswertung	31
3.2.8.1	Signifikanztestung	31
3.2.8.2	Ausreißertest	31
4.	Ergebnisse.....	32
4.1	Wachstumsverhalten	32
4.1.1	Wachstumskurven ohne Curcumin.....	32
4.1.2	Alamar Blue Proliferations-Assay	32
4.1.2.1	Einfluss von DMSO	33
4.1.2.2	Relative Proliferation (konzentrationsabhängig).....	34
4.1.2.3	Relative Proliferation (zeitabhängig)	35
4.2	Koloniebildung	35
4.2.1	Klonogenes Überleben.....	35
4.2.1.1	Koloniebildung nach Kombinationsbehandlung bei Panc-1 Zellen	36
4.2.1.2	Koloniebildung nach Kombinationsbehandlung bei MiaPaCa-2 Zellen.....	38
4.2.2	Mittleres Kolonievolumen	39
4.3	Mikroskopische Darstellung	40
4.4.1	Induktion von Apoptose durch Bestrahlung	42
4.4.2	Curcumin	43
4.4.3	Kombinationsbehandlung.....	43
4.4.3.1	Panc-1	43
4.4.3.2	MiaPaCa-2	45
4.4.3	Vergleich der Zelllinien.....	46
4.5	yH2AX-Fluoreszenz und Zellzyklus (Doppelfärbung).....	47
4.5.1	Relative Fluoreszenz.....	47
4.5.1.1	Bestrahlung	47
4.5.1.2	Curcumin	47
4.5.1.3	Kombination	48
4.5.1.4	Relative yH2AX-MFI in den verschiedenen Zellzyklusphasen.....	49
4.5.2	yH2AX-positive Zellen.....	51
4.5.3	Zellzyklus	53

4.6 Zellzyklusphasen	54
4.6.1 Bestrahlungseffekt	54
4.6.2 Curcumin-Effekt	55
4.6.3 Kombinationseffekt.....	56
4.6.3.1 Panc-1	56
4.6.3.2 MiaPaCa-2	56
4.6.4 Vergleich der Zelllinien	57
4.6.4.1 Bestrahlung	57
4.6.4.2 Curcumin-Zugabe.....	57
4.6.4.3 Kombinationsbehandlung	57
5. Diskussion	59
5.1 Strahlentherapie beim Pankreaskarzinom	59
5.2 Curcumin.....	59
5.2.1 Anwendung und Lösungsverhalten	59
5.2.2 Curcumin-Konzentration und Dosisabhängigkeit der Behandlung	60
5.2.3 Einfluss von Curcumin auf Wachstum und Zellmorphologie	61
5.3 Humane Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2	62
5.3.1 Radiosensitivität der verwendeten Pankreaskarzinomzellen	62
5.3.2 Radiosensitivierung durch Curcumin	62
5.3.3 COX-2 Expression und Apoptose-Induktion	63
5.3.4 PI3-AKT-Signalweg und γ H2AX-MFI.....	64
5.4 Einflüsse der Bestrahlung und der Kombinationsbehandlung auf Apoptose, Zellzyklus und die Phosphorylierung von γ H2AX.....	64
5.4.1 Kolonievolumen und TumorgroÙe	65
5.4.2 DNA-Schäden	65
5.4.3 Apoptose-Induktion	66
5.5 Mögliche Konsequenzen und Zukunftsperspektiven	69
5.5.1 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung	69
6. Zusammenfassung	73
7. Literaturverzeichnis.....	74
8. Veröffentlichungen	82
9. Lebenslauf	83
10. Danksagung.....	84

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langform
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
AZ	Allgemeinzustand
BSA	Bovines Serum Albumin
BSC	Best supportive care
CA-19-9	Carbohydrate antigen 19-9
CDF	3-,4-difluorobenzyliden Curcumin
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CFA	Colony forming Assay
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGR-1	Early growth response-1
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie bzw. Durchflusszytometer
FOLFIRINOX	Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan, Oxaliplatin
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
IAPs	Inhibitors of apoptosis
IMP	Invalid metabolic panacea
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
K-Ras	Kirstein rat sarcoma viral oncogene
LHRH	Luteinizing hormone releasing hormone
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
MCV	Mean colony volume, mittleres Kolonievolumen
MFI	Mean fluorescence intensity, mittlere relative Fluoreszenz
MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 3
MRT	Magnetresonanztomografie
MRCP	Magnetresonanztomographie-Cholangiopankreatikographie
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor 2
OD	Optical density
PAINS	Pan-Assay-Interference compound
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Plating efficiency, Plattierungseffizienz
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PI	Propidiumiodid
RKI	Robert-Koch-Institut
SBRT	Stereotactic body radiation therapy
SER	Sensitizing enhancement rate
SF	Survival fraction
Shh	Sonic hedgehog
SMAD-4	Mothers Against Decapentaplegic homolog 4
TGFBR2	Transforming growth factor-beta 2
UICC	Union internationale contre le cancer

Verwendete Einheiten

SI-Einheit	Einheit	Maß für
Gy	Gray	Strahlendosis
°C	Grad Celsius	Temperatur
m ²	Quadratmeter	Fläche
g	Gramm	Gewicht
l	Liter	Volumen
M	Molar (mol/l)	Konzentration
g/mol	Gramm pro Mol	Molare Masse

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	UICC-Stadien des exokrinen Pankreas-karzinoms.....	4
Tabelle 2:	TNM-Klassifikation des Pankreas-karzinoms nach AJCC/UICC	4
Tabelle 3:	Therapiekonzepte nach Stadien beim PDAC	5
Tabelle 4:	Chemische Eigenschaften von Curcumin.....	10
Tabelle 5:	Verwendete Apparate.....	16
Tabelle 6:	Allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 7:	Reagenzien und Chemikalien.....	17
Tabelle 8:	Puffer und Lösungen.....	17
Tabelle 9:	Antikörper, Proteine und Peptide.....	18
Tabelle 10:	Verwendete Zelllinien	18
Tabelle 11:	Software.....	18
Tabelle 12:	Eigenschaften der verwendeten humanen Pankreaskarzinomzelllinien.....	19
Tabelle 13:	Verdünnungsreihe zur Herstellung der Curcuminlösung für den CFA.....	21
Tabelle 14:	Verdünnungsreihe zur Herstellung der Curcuminlösung für die Messungen am FACS	22
Tabelle 15:	Bestrahlungsgerät und -parameter	24
Tabelle 16:	Verwendete Zellzahlen für den CFA.....	25
Tabelle 17:	Zellzahlen für die Bestimmung apoptotischer Zellen am FACS	26
Tabelle 18:	Zellzahlen zur Messung der Verteilung der Zellen über die Zellzyklus-Phasen	28
Tabelle 19:	Graphische Darstellung der Signifikanzniveaus.....	31
Tabelle 20:	Signifikanzen der unterschiedlichen OD zwischen den Behandlungsgruppen mit Curcumin.....	33
Tabelle 21:	Signifikanzen zwischen den Behandlungsgruppen in der curcuminabhängigen relativen Proliferation.....	34
Tabelle 22:	Signifikanzen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen der zeitabhängigen relativen Proliferation bei Panc-1 Zellen	35
Tabelle 23:	Wachstumshemmung der PDAC-Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 durch Curcumin.....	36
Tabelle 24:	Signifikanzen der SF der verschiedenen Bestrahlungsdosen zur unbestrahlten Kontrollgruppe bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen.....	36
Tabelle 25:	Signifikanzen zwischen den Panc-1 und den MiaPaCa-2 Zellen bei den verschiedenen getesteten Strahlendosen.....	36
Tabelle 26:	Signifikanzen der Curcumin-korrigierten Berechnung der SF bei Panc-1 Zellen....	37
Tabelle 27:	Signifikanzen der unkorrigierten Berechnung der SF bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	38
Tabelle 28:	Radiobiologische Parameter der Bestrahlungswirkung aus dem linear-quadratischen Modell	39
Tabelle 29:	Signifikanzen der Reduktion des Kolonievolumens durch Curcuminzugabe bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 μ M)	40

Tabelle 30:	Signifikanzen der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen bei Behandlung mit 0, 6 oder 12 μ M Curcumin.....	44
Tabelle 31:	Signifikanzen zwischen den untersuchten Curcuminkonzentrationen bei der jeweiligen Strahlendosis.....	46
Tabelle 32:	Signifikanzen der Bestrahlung bei der jeweiligen Curcumin-Konzentration.....	46
Tabelle 33:	Signifikanzen zwischen den Anteilen lebender Zellen der verschiedenen Behandlungsgruppen	46
Tabelle 34:	Signifikanzen zwischen den Anteilen Caspase-3/7-positiver Zellen bei Panc-1 und MiaPaCa-2	47
Tabelle 35:	Signifikanzen der relativen γ H2AX-MFI nach Bestrahlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	47
Tabelle 36:	Signifikanzen der unkorrigierten relativen γ H2AX MFI bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	48
Tabelle 37:	Signifikanzen der kombinierten Behandlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen der G2/M-Phase.....	51
Tabelle 38:	Signifikanzen des Anstiegs der γ H2AX-positiven Zellen nach Bestrahlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	51
Tabelle 39:	Signifikanzen zwischen den verwendeten Bestrahlungsdosen bei den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2	55
Tabelle 40:	Signifikanzen im Vergleich der Zellzyklusphasenverteilung nach kombinierter Behandlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen.....	56
Tabelle 41:	Differenz bzw. des Verhältnis des G2/M-Arrests durch die Behandlung mit 12 μ M bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen.....	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnostik und Therapie des PDAC	7
Abbildung 2: Strukturformel von Curcumin	10
Abbildung 3: Schema einer Neubauer-Zählkammer	20
Abbildung 4: Pipettierschema des Alamar Blue Assay	23
Abbildung 5: Exemplarische Verteilung der Panc-1 Zellen in der Auswertung am FACS nach Färbung mit Caspase-Antikörpern bzw. SYTOX	27
Abbildung 6: Exemplarische Auswertung der Zellzyklus-Verteilung in der ModFit-Software	28
Abbildung 7: Exemplarische Auswertung im γ H2AX-FL2-Diagramm und Anpassung der R6-Fläche	30
Abbildung 8: Wachstumskurven von Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	32
Abbildung 9: OD im Zeitverlauf bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	33
Abbildung 10: Einfluss von DMSO auf die Proliferation bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	33
Abbildung 11: Relative Proliferation in Abhängigkeit von der verwendeten Curcumin-Konzentration bei den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2	34
Abbildung 12: Relative Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit bei Panc-1 Zellen	35
Abbildung 13: Wirkung von Curcumin auf Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	35
Abbildung 14: Einfluss der Bestrahlung auf die SF von Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	36
Abbildung 15: Wirkung der Kombinationsbehandlung bei Panc-1 Zellen	37
Abbildung 16: SF über die verschiedenen Bestrahlungsdosen bei 10 μ M und 12 μ M bei Panc-1 Zellen	37
Abbildung 17: Effekt der kombinierten Behandlung bei MiaPaCa-2 Zellen	38
Abbildung 18: Mittleres Kolonievolumen von Panc-1 Zellen	39
Abbildung 19: Mittleres Kolonievolumen von MiaPaCa-2 Zellen	40
Abbildung 20: Mikroskopische Darstellung der Panc-1 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Curcumin in 10- bzw. 20-facher Vergrößerung	41
Abbildung 21: Mikroskopische Darstellung der Panc-1 Zellen nach 48- bzw. 72-stündiger Behandlung mit Curcumin in 20-facher Vergrößerung	41
Abbildung 22: Mikroskopische Darstellung der MiaPaCa-2 Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit Curcumin in 10- bzw. 20-facher Vergrößerung	41
Abbildung 23: Mikroskopische Darstellung der MiaPaCa-2 Zellen nach 48- bzw. 72-stündiger Behandlung mit Curcumin in 20-facher Vergrößerung	42
Abbildung 24: Anteil lebensfähiger und Caspase-3/7-positiver Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen nach Bestrahlung	42
Abbildung 25: Anteil lebensfähiger und Caspase-3/7-positiver Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen nach Behandlung mit Curcumin	43
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der Zellverteilung der Panc-1 Zellen am FACS	44
Abbildung 27: Anteil lebender bzw. Caspase-3/7-positiver Panc-1 Zellen nach kombinierter Behandlung	44
Abbildung 28: Exemplarische Darstellung der Zellverteilung der MiaPaCa-2 Zellen am FACS	45

Abbildung 29: Caspase-3/7-positive Zellen nach Kombinationsbehandlung der MiaPaCa-2 Zelllinie	45
Abbildung 30: Anteil lebender MiaPaCa-2 Zellen nach kombinierter Behandlung	46
Abbildung 31: Vergleich Caspase-3/7-positiver Zellen zwischen Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	47
Abbildung 32: Unkorrigierte Berechnung der relativen γ H2AX-MFI bei den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2	48
Abbildung 33: Korrigierte Berechnung der relativen γ H2AX-MFI bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	49
Abbildung 34: Relative γ H2AX MFI bezogen auf Zellen in der G0/G1-Phase bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	49
Abbildung 35: Relative γ H2AX MFI der Zellen in der S-Phase bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	50
Abbildung 36: Relative γ H2AX MFI der Zellen in der G2/M-Phase bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	50
Abbildung 37: Exemplarische Darstellung der Auswertung der γ H2AX-positiven Zellen am FACS	51
Abbildung 38: Anteil γ H2AX-positiver Zellen nach Bestrahlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	52
Abbildung 39: Anteil der γ H2AX-positiven Zellen bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	52
Abbildung 40: Vergleich des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zwischen den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 nach kombinierter Behandlung	52
Abbildung 41: Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen zum Zeitpunkt der Bestrahlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	53
Abbildung 42: Auswertung der Zellzyklusphasen-Verteilung in der Software ModFit bei unbestrahlten Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	53
Abbildung 43: Exemplarische Darstellung der höheren G2/M-Fraktion nach 24 Stunden-Inkubation mit Curcumin bei Panc-1 Zellen in der ModFit Software	54
Abbildung 44: Exemplarische Darstellung der Zellzyklusphasen in der Auswertung bei Panc-1 Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung	54
Abbildung 45: Veränderung der Zellanteile in den jeweiligen Zellzyklusphasen 24 Stunden nach Bestrahlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	55
Abbildung 46: Verteilung der Zellzyklusphasen nach kombinierter Behandlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen	57
Abbildung 47: Vergleich der Zellzyklusverteilung nach kombinierter Behandlung zwischen den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2	58

Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer.....	21
Formel 2:	Berechnung der relativen Proliferation anhand der OD im Alamar Blue- Proliferationsassay	23
Formel 3:	Berechnung der PE	24
Formel 4:	Berechnung der SF	25
Formel 5:	Linear quadratisches Modell.....	25
Formel 6:	Quadratische Funktion	25
Formel 7:	Berechnung der relativen γ H2AX-Fluoreszenz.....	30

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit weltweit 458.918 Neuerkrankungen im Jahr 2018 macht das Pankreaskarzinom etwa 2,5% der Krebserkrankungen aus und liegt mit diesem Anteil an zwölfter Stelle der weltweiten Tumorneuerkrankungen (Bray et al. 2018). Die höchsten Inzidenzen finden sich in Europa und Nordamerika (7,7 bzw. 7,6 pro 100.000 pro Jahr), während auf dem afrikanischen Kontinent nur 2,2 von 100.000 Menschen pro Jahr erkranken (Rawla et al. 2019). Im europäischen Vergleich finden sich die höchsten Inzidenzen in Tschechien, der Slowakei und in Ungarn. Deutschland lag mit einer altersstandardisierten Erkrankungsrate von 10,4 pro 100.000 Frauen und 14,3 pro 100.000 Männer im Jahr 2012 im Mittel der europäischen Länder an achter Stelle. Im Jahr 2014 erkrankten etwa 17.100 Menschen in Deutschland an Bauchspeicheldrüsenkrebs. Die Prognose des Robert-Koch-Instituts für das Jahr 2018 geht von einer weiteren Zunahme der Inzidenz um 2% bei Frauen und um 0,8% bei Männern mit steigender Tendenz in den nächsten Jahren aus (Robert Koch-Institut (RKI) 2016).

Betroffen von Pankreaskarzinomen ist vor allem die ältere Bevölkerung. In Deutschland lag das mittlere Erkrankungsalter im Jahr 2013 bei Männern bei 72 und bei Frauen bei 75 Jahren. Während in der Altersgruppe von 30-34 Jahren nur 0,42 von 100.000 Männern bzw. 0,17 von 100.000 Frauen im Jahr 2013 am Pankreaskarzinom erkrankten, zeigte sich in der Altersgruppe der 80-84-jährigen eine Inzidenz von 108,49 bzw. 93 pro 100.000 pro Jahr (RKI 2017).

Das mittlere Sterbealter bei Patienten mit Pankreaskarzinom lag 2013 bei Männern bei 73 Jahren und die altersstandardisierte Sterberate bei 13,4 pro 100.000, bei Frauen bei 77 Jahren und 9,7 pro 100.000 pro Jahr. Trotz intensiver Forschungsarbeiten ist das 5-Jahres-Überleben mit 9% (Männer) bzw. 10% (Frauen) sehr niedrig. Insgesamt ist das Pankreaskarzinom bei beiden Geschlechtern die vierthäufigste Krebstodesursache (RKI 2017). Weiteren Prognosen zufolge könnte das Pankreaskarzinom noch vor 2030 nach dem Lungen- und Bronchialkarzinom die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache sein (Rahib et al. 2014).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms konnten in epidemiologischen Studien mehrere Faktoren identifiziert werden.

Als gesicherter Risikofaktor gilt sowohl das Aktiv- als auch das Passivrauchen. Nachteilige Auswirkungen haben starkes Übergewicht, Diabetes mellitus und sehr hoher Alkoholkonsum, wobei Hochkonsum bei Männern als >60 g und bei Frauen als >40 g Reinalkohol pro Tag definiert ist (Seitz et

al. 2019). Das Vorhandensein einer chronischen Pankreatitis geht mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung einher (RKI 2017). Hierbei sind insbesondere hereditär bedingte chronische Pankreatitiden (z.B. bei zystischer Fibrose) sowie die tropische Pankreatitis besonders häufig mit einem Pankreaskarzinom assoziiert (Birth et al. 2010).

Verwandte ersten Grades von Pankreaskarzinom-Patienten weisen ein 2- bis 3-fach erhöhtes Risiko auf, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Auch bestimmte Keimbahnmutationen erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens. Bekannte Gene sind hierbei BRCA2 (3,5-10-fach), BRCA1 (2-fach), p16 (20-34-fach) sowie die Gene des Peutz-Jeghers-Syndroms oder des hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinoms. Gewisse Mutationen gehen häufiger mit bestimmten histologischen Subtypen oder einem anderen Therapieansprechen einher. So zeigen Tumore mit Mutationen in DNA-Reparaturmechanismen (z.B. BRCA2) beispielsweise eine höhere Sensitivität für Mitomycin C oder Bestrahlung (Maitra und Hruban 2008).

Weiterhin stehen diätetische Faktoren in der wissenschaftlichen Diskussion. So könnte ein hoher Konsum von rotem, gegrilltem oder industriell verarbeitetem Fleisch das Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs erhöhen, während ein hoher Obst- und Gemüsekonsum die Erkrankungswahrscheinlichkeit verringern könnte. Außerdem stehen beispielsweise Metalle, insbesondere Cadmium sowie chronische Infektionen, hier insbesondere mit *Helicobacter pylori*, im Verdacht, das Risiko für ein Pankreaskarzinom zu erhöhen (Rawla et al. 2019).

Als protektiver Faktor für das Adenokarzinom des Pankreas wird eine Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) durch beispielsweise Acetylsalicylsäure diskutiert (Lev-Ari et al. 2007).

1.1.3 Einteilung des Pankreaskarzinoms

Pankreastumore können nach verschiedenen Parametern unterteilt werden. Grundsätzlich kann zwischen Tumoren des exokrinen oder des endokrinen Anteils der Bauchspeicheldrüse unterschieden werden. Endokrine Tumore werden häufig durch erhöhte Hormonproduktion auffällig und sind meist benigne.

Neoplasien des exokrinen Anteils hingegen sind in der Mehrzahl der Fälle bösartig und machen 95% der Malignome des Pankreas aus. Die häufigste Subgruppe stellt hier mit etwa 85% das duktales Adenokarzinom dar, welches gleichzeitig die schlechteste Prognose aufweist. Mit rund 70% ist diese Tumorentität am häufigsten im Pankreaskopf lokalisiert. Zu jeweils etwa 15% tritt die Erkrankung im Pankreaskörper bzw. -schwanz auf. Als Vorstufen des duktales Adenokarzinoms gelten neben den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) auch die zystischen Vorläuferläsionen wie intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) und muzinös-zystische Neoplasien (MCN) (Hans G. Beger et al 2013).

1.1.4 Klinisches Bild und Diagnostik

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch erst spät im Krankheitsverlauf auftretende, unspezifische Symptome aus. Häufige Krankheitszeichen können gürtelförmige Oberbauch- bzw. Rückenschmerzen sowie im Falle obstruierender Tumore im Pankreaskopf ein Ikterus sein. Aufgrund der meist fortgeschrittenen konsumierenden Erkrankung besteht bei vielen Patienten ein ausgeprägter Gewichtsverlust, der in circa 25% der Fälle die Kriterien einer Tumorkachexie erfüllt (Parsons et al. 2016). Weiterhin treten exo- oder endokrine Pankreasinsuffizienz oder paraneoplastische Syndrome, meist in Form von Thrombosen und Lungenarterienembolien, auf. Charakteristisch, aber selten sind die Thrombophlebitis migrans oder kutane paraneoplastische Erscheinungen (Hans G. Beger et al 2013). Im metastasierten Stadium sind Symptome abhängig von der Metastasenlokalisierung beispielsweise Ikterus und Leberinsuffizienz bei fortgeschrittener hepatischer, Husten oder Dyspnoe bei pulmonaler, Aszites bei peritonealer, Schmerzen bei ossärer oder neurologische Ausfälle bei cerebraler Metastasierung (Helmut Oettle et al 2018).

Zur Primärdiagnostik wird bei Verdacht zunächst ein bildgebendes Verfahren eingesetzt. Mittel der ersten Wahl ist hierbei die Oberbauchsonografie. Ergänzend stehen Endosonographie, die Multidetektor-Computertomografie (CT) mit Kontrastmittel bzw. das Magnetresonanztomogramm (MRT) in Kombination mit Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) zur Verfügung. Insbesondere bei zystischen Läsionen bietet sich eine MRT-Untersuchung an. Eine endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) ist nur in seltenen Fällen indiziert. Bei Nachweis einer Pankreasraumforderung sollten zur Differentialdiagnose zu gutartigen Pankreasveränderungen auch die Tumormarker CA 19-9 (Carbohydrate-Antigen 19-9) bzw. CEA (Carzinoembryonale-Antigen) im Blut des Patienten untersucht werden. Hohe Tumormarker korrelieren häufig mit einer hohen Tumorlast (Nazli et al. 2000).

Zur Abschätzung der Tumorausbreitung und einer möglichen Fernmetastasierung werden bildgebende Verfahren wie Sonografie, Endosonografie oder ein CT Abdomen bzw. Thorax eingesetzt. Anhand der gewonnenen Befunde wird im Anschluss das TNM- bzw. UICC-Stadium (siehe Tab. 1 und Tab. 2) festgelegt, an welchem sich die möglichen Therapiekonzepte orientieren.

Bei potentiell resektablen Raumforderungen sollte primär eine vollständige operative Entfernung erfolgen, eine Feinnadelbiopsie ist nach Leitlinie bei kurativer Intention dann nur in Ausnahmefällen anzustreben. Die endosonografisch, transgastrale Biopsie ist gegenüber der CT-gesteuerten Biopsie zu bevorzugen. Vor Beginn eines spezifischen palliativen Therapiekonzeptes muss die Diagnose histologisch gesichert werden (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)). Aufgrund einer starken Hypoperfusion pankreatischer Adenokarzinome sind diffusionsgewichtete bildgebende Verfahren in der Erprobung (Paul E. Oberstein and Kenneth P. Olive et al. 2013).

UICC-Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-3	N1	M0
III	T4	Alle N	M0
IV	Alle T	Alle N	M1

Tabelle 1: UICC-Stadien des exokrinen Pankreas-karzinoms; Quelle: S3-Leitlinien Pankreaskarzinom

T1	maximaler Tumordurchmesser ≤ 2 cm
T2	maximaler Tumordurchmesser ≤ 4 cm
T3	maximaler Tumordurchmesser > 4 cm
T4	Infiltration des Truncus coeliacus, der A. hepatica communis o. der A. mesenterica superior
N1	1-3 regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	≥ 4 regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Pankreas-karzinoms nach AJCC/UICC

1.1.5 Pathologie und Tumorgenetik

Im pathologischen Präparat zeigt sich das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) meist derb-weißlich mit zentralen Nekrosen. Charakteristisch ist die intensive desmoplastische Stromareaktion, die dem Tumor seine feste Konsistenz verleiht. Weiterhin zeigen sich proximal des Tumors häufig Gangaufweitungen sowie in der Nähe des Tumors Nervenscheideninvasionen (Birth et al. 2010). Die ausgeprägte Umgebungsreaktion wird als Komponente der hohen Resistenz des Pankreaskarzinoms gegenüber Chemotherapeutika gesehen (Fokas et al. 2015). Die meisten duktales Adenokarzinome exprimieren Muzine (MUC 1, 3 bzw. 5/6) sowie CA-19-9 und CA-125. Insbesondere das CA-19-9, aber auch das CEA werden in der Diagnostik und im Therapieverlauf als Tumormarker verwendet (Hans G. Beger et al 2013). Die lymphogene und hämatogene Metastasierung erfolgt frühzeitig, insbesondere finden sich Fernmetastasen in Leber, Lunge, Gehirn und Knochen. Das PDAC zeichnet sich durch starke Hypovaskularisierung und ein stark hypoxisches Umgebungsmilieu aus, was zusammen mit immunsuppressiven Einflüssen im desmoplastischen Stroma die Tumorzellen für konventionelle Chemotherapeutika nur schwer zugänglich macht (Paul E. Oberstein and Kenneth P. Olive et al. 2013).

Bei über 90% der duktales Adenokarzinome tritt im Gegensatz zu azinären und endokrinen Karzinomen eine frühe Mutation im Kirstein rat sarcoma viral (K-Ras)-Onkogen, zumeist im Codon 12, auf (Witkiewicz et al. 2015; Hans G. Beger et al 2013). Weiterhin finden sich in 50-80% der Karzinome inaktivierende Mutationen im TP53-, CDKN2A- und SMAD4-Gen sowie in 10% der Fälle Mutationen im ARID1A-, MLL3- bzw. TGFBR2-Gen (Pramanik et al. 2018). Die Mutation im SMAD4-Gen ist relativ spezifisch für das duktales Adenokarzinom, assoziiert mit einer frühzeitigen Metastasierung und wird für die immunhistochemische Diagnostik verwendet (Hans G. Beger et al 2013; Paul E. Oberstein and Kenneth P. Olive et al. 2013). Die frühzeitige Mutation im K-Ras-Onkogen wird über Aktivierung von Wachstumssignalen (insbesondere im sonic hedgehog (shh)-Signalweg) als Ursache der ausgeprägten desmoplastischen Stromareaktion diskutiert. Die häufige Mutation im

p53-Tumorsuppressorgen führt in den Tumorzellen zu genetischer Instabilität. Patienten, die drei der vier häufigen Mutationen aufweisen, haben eine deutlich schlechtere Prognose als Patienten mit nur einer oder maximal zwei der aufgeführten Mutationen (Paul E. Oberstein and Kenneth P. Olive et al. 2013).

1.1.6 Therapie

Nach dem Staging sollte der Patient in einer interdisziplinären Tumorkonferenz zur Therapieplanung vorgestellt werden. Es werden vier Patientengruppen unterschieden: Patienten in einem lokal begrenztem, primär resektablen, Patienten in einem lokal fortgeschrittenen, borderline resektablen oder nicht primär resektablen und Patienten in einem fernmetastasierten Stadium. Borderline-resektable PDAC weisen bereits Kontakt zu den umliegenden Gefäßstrukturen auf, was die vollständige chirurgische Resektion der Tumore deutlich erschwert. Im Gegensatz zu nicht primär resektablen PDAC ist bei Borderline-Tumoren aber eine Rekonstruktion der Gefäßstrukturen operativ möglich, weswegen in solchen Fällen auch eine primäre Operation erfolgen kann. Die Einteilung und die Therapieoptionen sind in Tabelle 3 und Abbildung 1 dargestellt.

Stadium	Therapie
Lokal begrenzt, primär resektabel	Kein Kontakt zu Truncus coeliacus, A. mesenterica superior oder A. hepatica communis bzw. V. mesenterica superior oder V. portae Resektion (R0/R1) → adjuvante Chemotherapie <ul style="list-style-type: none"> • Sehr guter Allgemeinzustand (AZ): modifiziert FOLFIRINOX • Schlechterer AZ, Kontraindikationen: Gemcitabin, alternativ ggf. 5-FU/Folsäure oder Gemcitabin und Capecitabin Resektion (R2) → palliative medikamentöse Tumorthherapie (s.u.)
Lokal fortgeschritten, borderline resektabel	Gefäßkontakt vorhanden, aber operativ rekonstruierbare Strukturen Individuelle Therapiekonzepte, meist primär Operation
Lokal fortgeschritten, nicht resektabel	Neoadjuvante Chemotherapie, ggf. Radiochemotherapie, wenn möglich im Anschluss Resektion
Metastasiert	<ul style="list-style-type: none"> • Chemotherapie-fähige Patienten: palliative medikamentöse Tumorthherapie <ul style="list-style-type: none"> • Guter AZ: Gemcitabin und nab-Paclitaxel oder FOLFIRINOX • Schlechterer AZ: Gemcitabin, ggf. mit Erlotinib • Nicht-chemotherapie-fähige Patienten: Best supportive care (BSC) • Strahlentherapeutische Konzepte zur Symptomkontrolle oder Prävention von Komplikationen

Tabelle 3: Therapiekonzepte nach Stadien beim PDAC

Aufgrund der späten Symptomatik und unspezifischen Klinik werden 60-70% der Patienten erst in metastasiertem Stadium entdeckt, nur 15-20% der Patienten werden in einem lokal begrenztem, resektablen Stadium diagnostiziert (Hans G. Beger et al 2013). Aufgrund der hohen Strahlen- und

Chemoresistenz dieser Tumorentität ist eine vollständige chirurgische Resektion des Tumors die einzig kurative Option. Je nach Lokalisation des Tumors wird hierbei eine partielle Duodenopankreatektomie (Pankreaskopfkarzinome) oder eine Pankreaslinksresektion (Karzinom im Pankreaschwanz) durchgeführt. Die Auswahl der Chemotherapeutika für die sich anschließende adjuvante Therapie hängt zumeist vom AZ und den Komorbiditäten des Patienten ab.

Anhand der Nähe bzw. der Infiltration des Tumors an die umliegenden Gefäße werden die primär resektablen PDAC ohne Gefäßkontakt von den borderline resektablen PDAC unterschieden, bei welchen bereits Kontakt zu Truncus coeliacus, A. mesenterica superior oder A. hepatica communis bzw. V. mesenterica superior oder V. portae besteht. Im Gegensatz zu lokal fortgeschrittenen, nicht-resektablen Tumoren sind diese Strukturen aber operativ rekonstruierbar, weswegen häufig eine primäre Operation angestrebt wird.

In der chemotherapeutischen Behandlung wird meist eine Kombinationstherapie aus Fluoruracil, Folinsäure (Leucovorin), Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) eingesetzt. Bei Nebenwirkungen, häufig sind z.B. Neutropenien, Erbrechen, Fatigue und Diarrhö, oder einem schlechten AZ wird dieses Schema modifiziert angewandt (ohne Fluoruracil-Bolus) oder durch Monotherapien ersetzt (siehe Tabelle 3). Unter kombinierter Chemotherapie konnte sowohl das progressionsfreie als auch das Gesamtüberleben verglichen mit der Monotherapie mit Gemcitabin gesteigert werden (Conroy et al. 2018).

Eine Radiochemotherapie der Bauchspeicheldrüse wird in lokal fortgeschrittenem, nicht primär resektablem Stadium empfohlen, wobei der Einsatz neoadjuvant als sogenanntes Downstaging mit dem Ziel der Ermöglichung einer chirurgischen Resektion erfolgt. Der neoadjuvante Einsatz einer Radiochemotherapie zeigt bei nicht-metastasierten Patienten verglichen mit alleiniger Chemotherapie höhere Raten an R0-Resektionen (Jiang et al. 2019). Combs et al. erreichten nach Radiochemotherapie und sekundärer Operation ein vergleichbares Überleben wie nach primärer Operation.

Im palliativen Therapiekonzept, insbesondere bei Vorliegen von cerebralen oder ossären Metastasen, ist die Radiotherapie zur lokalen Symptomkontrolle häufig Mittel der Wahl. Im Rahmen BSC kommen je nach Symptomatik neben medikamentöser Schmerztherapie und ausreichender Ernährung auch invasive Verfahren wie die Blockade des Ganglion coeliacum, eine Aszitespunktion, ein Gallengangsstenting oder bei Magenausgangsstenose eine Gastrostomie zum Einsatz (Helmut Oettle et al 2018).

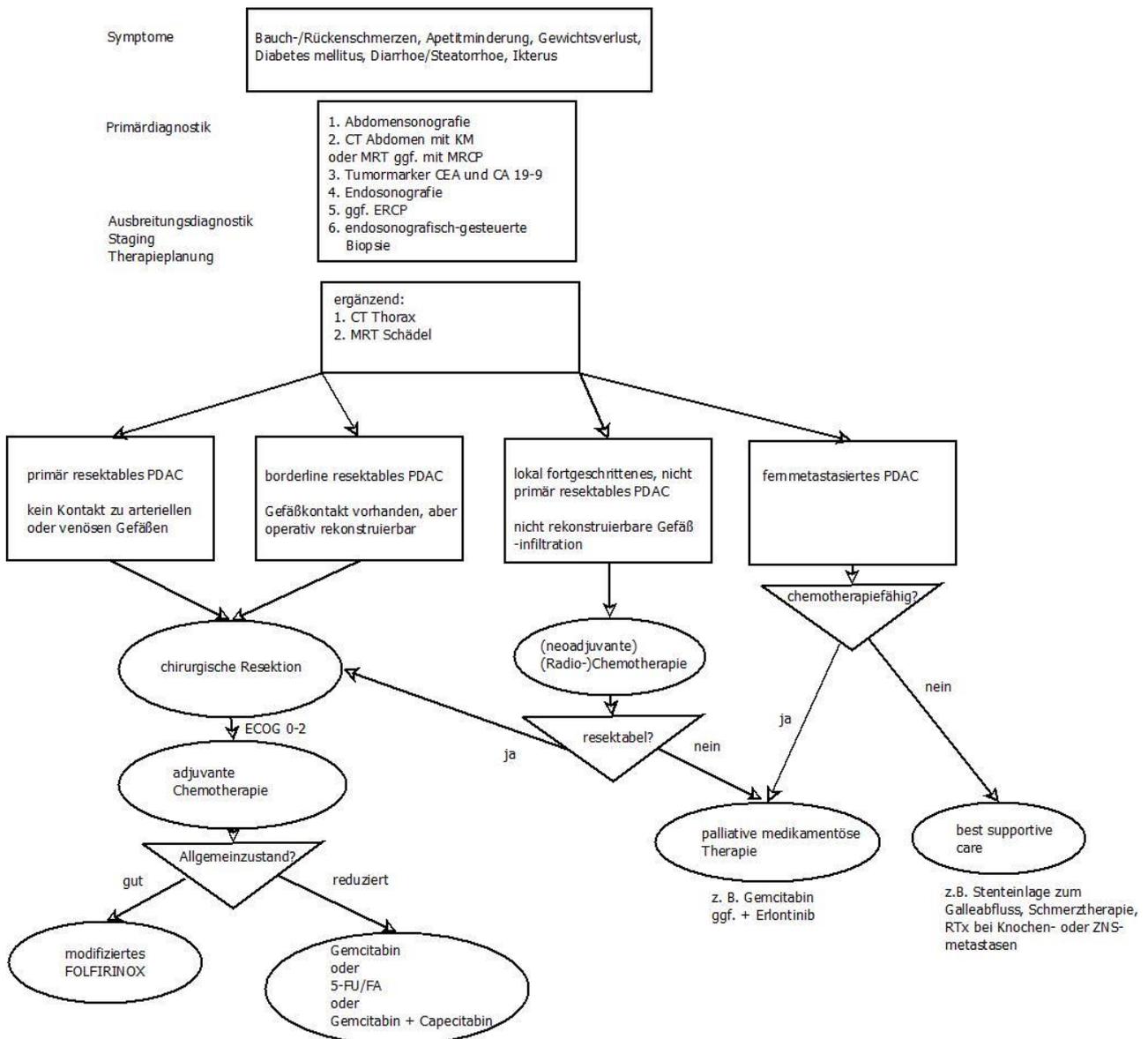


Abbildung 1: Diagnostik und Therapie des PDAC. Modifiziert nach Helmut Oettle et al 2018 (S3-Leitlinie Pankreaskarzinom)

1.2 Bestrahlung

1.2.1 Anwendung

Die Energie ionisierender Strahlung wird in der Medizin in verschiedenen Fachgebieten eingesetzt, wobei die Anwendung in der Behandlung maligner Tumore den größten Anteil darstellt. Die biologische Effektivität der Bestrahlung, also die Erzeugung von relevanten, zum Zelltod führenden DNA-Schäden in den Tumorzellen, ist dabei abhängig vom linearen Energietransfer (LET), der Gesamtdosis, der Anzahl der Fraktionen und der Radiosensitivität der behandelten Zellen oder Gewebe (Baskar et al. 2014).

Am häufigsten werden zur Bestrahlung hoch-energetische Photonen, also Röntgen- bzw. Gammastrahlen verwendet. Auch Protonen oder Wasserstoff-Ionen kommen in der Strahlentherapie zum Einsatz.

1.2.2 Molekulare Wirkung

Die Hauptwirkung der Bestrahlung beruht dabei auf der Bildung von DNA-Schäden im Genom der Tumorzelle. Hierbei werden direkte Effekte der Strahlung von indirekten Effekten unterschieden (Baskar et al. 2014).

Etwa 40% der DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche entstehen durch den direkten Effekt der ionisierenden Strahlung auf das Erbgut. Die restlichen 60% der Schäden werden durch freie Radikale herbeigeführt, die durch das Zusammentreffen der Strahlung mit Wassermolekülen gebildet werden. Die Reaktion der Radikale mit der DNA führt zu weiterer Schädigung des Genoms, was als indirekte Strahlenwirkung bezeichnet wird.

Die durch die DNA-Schädigung ausgelösten zellulären Mechanismen führen im weiteren Verlauf zum Arrest der Zelle an den Checkpoints des Zellzyklus sowie bei irreparabler Schädigung der DNA zur Einleitung der Apoptose und damit des Zelltods (Maier et al. 2016).

1.2.3 Molekularbiologische Darstellung des Bestrahlungseffektes

Durch verschiedene molekularbiologische Methoden lassen sich die Folgen einer Zellbestrahlung in vitro darstellen. Eingesetzt werden hierfür insbesondere Wachstumsparameter (z.B. die Fähigkeit zur Koloniebildung), Farbstoffe (z.B. Färbung von Nukleinsäuren abgestorbener Zellen mit Sytox oder zur Darstellung der Zellzyklusphase) und fluoreszenz-markierte Antikörper (z.B. Färbung von Histon-Modifikationen nach DNA-Doppelstrangbrüchen).

1.2.4 Einsatz der Strahlentherapie beim Pankreaskarzinom

Der Einsatz der Strahlentherapie beim PDAC ist in aktuellen Leitlinien insbesondere für ein nicht-resektables Tumorstadium empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)). Zum einen ist die Höhe der Bestrahlungsdosis durch die intraabdominelle Lage der Bauchspeicheldrüse mit empfindlichen, umliegenden Risikoorganen wie dem Duodenum oder anderen Dünndarmabschnitten limitiert, zum anderen ist die Wirksamkeit durch die besondere Tumorbilologie der Adenokarzinomzellen eingeschränkt. So weisen PDAC oft hypoxische, schlecht durchblutete Areale auf, in denen die Effektivität einer Bestrahlung durch verringerte Bildung von Sauerstoffradikalen reduziert ist. Zudem zeichnet sich das Pankreaskarzinom durch eine genetische Instabilität und eine Vielzahl von Mutationen aus, die zu Radioresistenz, auch im

Verlauf einer begonnenen Therapie führen können (Paul E. Oberstein and Kenneth P. Olive et al. 2013; Brach et al. 1991).

Technische Verbesserungen und neue Strahlentherapiekonzepte wie die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT), die stereotaktische Bestrahlung oder auch intraoperative Bestrahlungen ermöglichen eine bessere Schonung der Risikoorgane und damit eine niedrigere Toxizität der Behandlung sowie eine optimierte Dosisverteilung, wodurch die Bauchspeicheldrüse einer Strahlentherapie immer zugänglicher wird (Dobiasch et al. 2018). Neuere Studien konnten sogar einen Überlebensvorteil einer neoadjuvanten Radiochemotherapie mit SBRT verglichen mit alleiniger Chemo- oder konventioneller Radiochemotherapie zeigen (Jiang et al. 2019). Solche Regime sind aktuell aber noch Studien vorbehalten und nicht in der leitliniengerechten Therapie vorgesehen.

1.3 Curcumin

1.3.1 Herkunft und Botanik

Curcumin ist ein gelbes Pigment, das aus dem Wurzelstock von *Curcuma longa* (Synonym: *Curcuma domestica*, deutsch: Gelbwurzel) gewonnen werden kann. Die Pflanze wird bis zu einen Meter groß und ähnelt mit ihren großen länglich-elliptischen Blättern der Ingwerpflanze (Wu und Raven 2000). Sie gehört zur Familie der Zingiberaceae und ist beheimatet in Indien, Sri Lanka und Südostasien, wobei Indien der Hauptproduzent für den weltweiten Handel ist. Der Wurzelstock wird gekocht, die Rinde entfernt und der verbleibende Zentralzylinder gemahlen. Das entstehende Pulver schmeckt würzig-scharf und wird weit verbreitet als Gewürz, insbesondere in Curry-Mischungen, verwendet. Weiterhin findet die Nutzpflanze als Farbstoff, unter anderem in der Lebensmittel- und Textilindustrie, und als Nahrungsergänzungsmittel sowie in der Medizin Anwendung. Neben dem häufig verwendeten Farbstoff Curcumin enthält die Wurzel auch 1,3-5,5% ätherische Öle, im Hauptbestandteil Tumeron (Lieberer et al. 2012).

1.3.2 Struktur und Eigenschaften

Curcumin, auch 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion, ist ein Polyphenol und gehört zu den Curcuminoiden (Abbildung 2). Diese sind eine Gruppe von intensiv gelb-orangen Farbstoffen, die in den Rhizomen von *Curcuma*-Arten, z.B. *Curcuma longa* gewonnen werden. Neben Curcumin mit der Summenformel $C_{21}H_{20}O_6$, fallen in diese Gruppe auch Desmethoxy-Curcumin ($C_{20}H_{18}O_5$) und Bidesmethoxy-Curcumin ($C_{19}H_{16}O_4$).

Durch seine chemische Struktur ist Curcumin hitze- und säurestabil und als lipophile Substanz nahezu unlöslich in Wasser. Möglich ist eine Lösung in Ethanol, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder pflanzlichen Ölen. Im Gegensatz zur orange-gelben Farbe bei Lösung in DMSO löst sich Curcumin in

alkalischem Milieu (pH 8-9) bräunlich. Das Curcumin-Molekül unterliegt einer Keto-Enol-Tautomerie. Im sauren Milieu liegt vorwiegend die Keto-Form vor, während im Alkalischen die Enol-Form nachgewiesen werden kann.

Die chemischen Eigenschaften von Curcumin sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

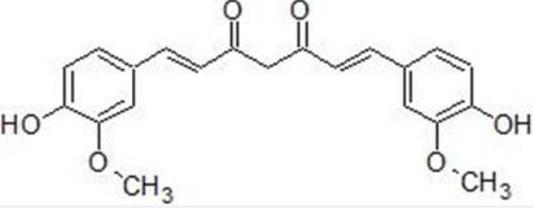
 Chemische Eigenschaften von Curcumin	
Summenformel	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
Relative Molmasse [g/mol]	368,39
Schmelzpunkt [°C]	183
Chemische Struktur	Polyphenol
Löslichkeit	Gelb-orange in Ethanol, DMSO oder pflanzlichen Ölen Braun in alkalischer Lösung (pH 8-9)
Farbstoffkennung	E100

Tabelle 4: Chemische Eigenschaften von Curcumin

1.3.4 Wirkung

In der traditionellen chinesischen sowie indischen Medizin wird Curcuma schon seit Jahrtausenden verwendet. Hier wird es insbesondere für akute und chronische entzündliche Erkrankungen sowie Leber- und Gallenwegserkrankungen eingesetzt (Ammon und Wahl 1991). Häufig wird das vollständige Extrakt des Wurzelstocks verwendet, da eine höhere Wirksamkeit des Gesamtextraktes im Vergleich zum isolierten Farbstoff Curcumin diskutiert wird.

Curcumin zeigt *in vitro* und *in vivo* anti-inflammatorische, anti-oxidative, anti-fungale und anti-karzinogene Wirkung und wird im Rahmen von Studien für eine Vielzahl von Erkrankungen sowie bei Vergiftung mit Schwermetallionen oder Alkohol erprobt (Mohajeri et al. 2017).

Die anti-karzinogene Wirkung ist vielfältig und beinhaltet unter anderem die Hemmung des Wachstums und des Zellüberlebens, inhibierende Einflüsse auf das umgebende Tumormilieu, Hemmung der Angiogenese und Metastasierung sowie Sensibilisierung für konventionelle Therapien (Kunnumakkara et al. 2017). Die Kombination aus Bestrahlung und Curcumin zeigte in der Zellkultur einen additiven Effekt auf die Reduktion des Zellüberlebens von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereiches (HNSCC) und im weiterführenden Mausmodell eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens (Khafif et al. 2009). Lev-Ari et al. zeigten *in vitro* einen überadditiven Effekt auf die Reduktion des Zellüberlebens durch Kombination von Gemcitabin und Curcumin in einer Pankreas-karzinomzelllinie (Lev-Ari et al. 2007).

In vitro Studien zum Pankreaskarzinom konnten eine Proliferationshemmung, eine Zellzyklusinhibition und die Induktion von Apoptose demonstrieren (Sahu et al. 2009; Zhang et al. 2017). Auch eine mögliche Radiosensitivierung wird bei einzelnen Pankreaskarzinomzelllinien angenommen (Veeraraghavan et al. 2011). Eine mit MiaPaCa-2 Zellen durchgeführte *in vivo* Studie mit Mäusen zeigte parallel zu den Ergebnissen für das HNSCC eine signifikant geringere Tumorgröße unter Curcumin-Behandlung (Bimonte et al. 2016).

1.3.5 Molekulare Grundlagen

Die molekulare Wirkung von Curcumin ist bis heute nicht vollständig geklärt. In diversen Studien konnte eine Wirkung auf verschiedene zelluläre Signalwege gezeigt werden. Diese Signalwege sind hierbei beispielsweise der Transkriptionsfaktor NFκB, die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade, der EGF-Rezeptor sowie der β-Catenin/Wnt-Signalweg (Kunnumakkara et al. 2017). Weiterhin konnten Einflüsse auf Histon-Modifikation, DNA-Methylierung, mi-RNA-Expression und die Zellmembran-Zusammensetzung sowie auf die Mitochondrien-Funktion festgestellt werden. Zudem wird Curcumin eine Inhibierung des 26-S-Proteasoms zugeschrieben, was zu einem verminderten Proteinabbau führt.

Die antioxidative Wirkung von Curcumin beruht neben der Modulation der Signaltransduktion auch auf der direkten Bindung von Sauerstoffradikalen (Hassan et al. 2019), wobei gegenteilig auch eine verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen beschrieben ist (Wang et al. 2017).

In Rahmen präklinischer Studien konnte eine Radiosensitivierung durch Curcumin bei Lymphomen, Sarkomen, Gliomen sowie Karzinomen der Pankreas, des Kolorektums, der Prostata, der Brust, der Lunge sowie des Kopf-Hals-Bereichs gezeigt werden. Der zugrundeliegende Mechanismus ist weiterhin unklar, was die Untersuchung einer Vielzahl verschiedener Signalwege in diesem Zusammenhang zur Folge hat. Eine besondere Rolle wird neben einem G2/M-Arrest und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies insbesondere der Inhibition der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB zugeschrieben (Verma 2016).

Der Transkriptionsfaktor NFκB reguliert Gene der Entzündungsreaktion und Immunantwort, des Wachstums und der Differenzierung sowie der Apoptose (Weizmann Institute of Science, LifeMap Sciences). Physiologisch spielt NFκB insbesondere in B-Zellen eine Rolle und wird unter anderem durch TNFα oder Interleukin-1 aktiviert und führt neben Proliferationsreizen zu einer verminderten Sensibilität gegenüber apoptotischen Reizen. Die erhöhte Karzinominzidenz in chronisch entzündetem Gewebe wird mit der NFκB-Aktivierung in Verbindung gebracht (Pramanik et al. 2018). Es besteht ein Zusammenhang zwischen einer aktivierenden Mutation im K-Ras-Onkogen und einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors in Tumorzellen (Mizumoto et al. 2011).

Durch Sauerstoffradikale und Entzündungsreize führen Chemo- oder Radiotherapie im Tumorge- webe zusätzlich zur Aktivierung von NFkB, was im Verlauf zu zunehmender Resistenz führen kann (Pramanik et al. 2018; Brach et al. 1991). Therapiebegleitende NFkB-Blockade kann das Anspre- chen auf Chemotherapeutika und Bestrahlung verbessern (Lev-Ari et al. 2007).

Wang et al. zeigten die konstitutive Aktivierung des NFkB-Signalweges in einer Vielzahl von huma- nen Adenokarzinom-Geweben der Pankreas. In weiteren Versuchen wiesen sie die Überaktivierung unter anderem auch bei Panc-1- und MiaPaCa-2 Zellen nach (Wang et al. 1999).

Curcumin zeigte in mehreren *in vitro* Studien hemmende Effekte auf den NFkB-Signalweg (Divya und Pillai 2006), (Li et al. 2004). So konnten Chendil et al. bei p53-mutierten Prostatazellen (PC-3) neben einer Radiosensitivierung im klonogenen Assay eine Reduktion der bestrahlungsinduzierten, TNF-alpha-regulierten NFkB-Aktivierung nachweisen (Chendil et al. 2004). In Lymphom-Zellen zeig- ten Qiao et al. neben der Hemmung des NFkB-Weges auch eine verminderte Aktivierung von mTOR sowie einen G2/M-Arrest als mögliche Ursache für eine nachgewiesene Radiosensitivierung in den verwendeten Zelllinien (Qiao et al. 2013). In humanen Pankreaskarzinomzellen zeigten Veerarag- havan et al. einen additiven Effekt von Curcumin in Kombination mit Bestrahlung und postulierten eine Radiosensitivierung durch die von ihnen nachgewiesenen Einflüsse auf die NFkB-Aktivität (Veeraraghavan et al. 2011).

1.3.6 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung

Curcumin ist schlecht wasserlöslich und zeigt *in vivo* eine sehr niedrige Bioverfügbarkeit, eine hohe Metabolisierungsrate sowie eine komplizierte Pharmakokinetik, was die klinische Anwendung von Curcumin erschwert und limitiert (Yallapu et al. 2013). Die gemessenen Curcumin-Spiegel in einzel- nen, kleinen Phase-I-Studien differieren stark. Während Cheng et al. nach oraler Einnahme von 4 g Curcumin eine Serum-Konzentration von 0,5 µM nachweisen konnten, fanden Sharma et al. eine Stunde nach oraler Einnahme von 3,6 g Curcumin lediglich Plasmakonzentration von durchschnitt- lich 11,1 nM (Cheng et al. 2001, Sharma et al. 2004.) Nach oraler Aufnahme findet vorwiegend eine Reduktion oder Glucuronidierung sowie zu kleineren Teilen auch eine Sulfatierung des Curcumin- Moleküls statt. Durch Lichteinfluss oder Oxidation kann das Curcumin-Molekül beispielsweise in Produkte wie Vanillin oder Vanillin-Säure gespalten werden (Kotha und Luthria 2019). Inwieweit die im Stoffwechsel entstehenden Curcumin-Derivate selbst biologisch aktiv sind, wird derzeit kontro- vers diskutiert. Die Exkretion von Curcumin erfolgt nach aktivem Transport in die Galleflüssigkeit vorwiegend über die Faeces. *In vivo* Studien zeigen zudem nach oraler Einnahme eine schlechte Gewebeverteilung. Oral zugeführtes Curcumin konnte in den untersuchten Ratten lediglich im Darm, in der Leber und zu geringen Teilen in der Niere nachgewiesen werden (Anand et al. 2007). Nach intraperitonealer Gabe von Curcumin konnten im *in vivo*-Modell mit Ratten auch geringe Konzentra- tionen in anderen Organen wie z.B. dem Gehirn gefunden werden (Anand et al. 2007). Auch nach

intravenöser Applikation zeigte sich ein schnelles Absinken der Plasmakonzentration (Ammon und Wahl 1991).

Eine Erhöhung des Blutspiegels von Curcumin gestaltet sich schwierig. Zum einen sinkt die Konzentration von Curcumin durch die schnelle Metabolisierung rasch ab, zum anderen führten hohe orale Dosen von Curcumin bei den Patienten teilweise zu Völlegefühlen oder Durchfällen (Cheng et al. 2001; Sharma et al. 2004). Um die biochemischen Limitationen bei oraler Einnahme zu umgehen und den therapeutischen Einsatz von Curcumin zu ermöglichen, werden derzeit verschiedene Darreichungsformen erprobt. Beispiele sind Kombinationen mit Hemmstoffen der Glucuronidierung (z.B. Piperin), strukturelle Modifikationen am Curcumin-Molekül zur Verbesserung der Löslichkeit, die Verwendung von stabileren Curcumin-Analoga zur Verhinderung der schnellen Metabolisierung, die Anwendung in Nanopartikeln oder Liposomen oder die Koppelung an Trägermoleküle (z.B. Peptide oder Vanadium). Kombinationen mit Piperin oder Lecithin sowie liposomale Formulierungen befinden sich derzeit schon in Phase-I-Studien und zeigen positive Ergebnisse (Anand et al. 2007; Belcaro et al. 2014).

Aufgrund der chemischen Eigenschaften, der niedrigen Bioverfügbarkeit und der großen Unterschiede in den Ergebnissen aus *in vitro* und *in vivo* Studien wird Curcumin zum einen als sogenannter pan-assay interference compound (PAINS) zum anderen als invalid metabolic panacea (IMP), also einem ineffizienten „Allheilmittel“, diskutiert (Nelson et al. 2017). PAINS sind Substanzen, die durch Interaktion verschiedener Strukturelemente des Moleküls mit Testverfahren zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnten. Curcumin zeigt beispielsweise die Fähigkeit zur Chelation von Metallionen, zur Reduktion anderer Substanzen oder zur kovalenten Proteinbindung. Auch eine Interaktion mit Fluoreszenzmessungen wird diskutiert (Priyadarsini 2009).

1.3.7 Therapeutischer Einsatz und klinische Studien

Neben vielen präklinischen Studien findet sich in den letzten 25 Jahren auch eine zunehmende Anzahl an klinischen Studien zur Wirkung von Curcumin oder Curcumin-Formulierungen bei verschiedensten Erkrankungen. Insbesondere bei entzündlich bedingten Erkrankungen sowie malignen Neoplasien werden Studien durchgeführt (Gupta et al. 2013). Eine Studie konnte auch bei gesunden Probanden mittleren Alters einen gesundheitsförderlichen Effekt durch die Gabe von 80 mg Curcumin täglich über 4 Wochen zeigen, beispielsweise sanken der Triglycerid-Spiegel im Blut sowie die β -Amyloid-Serumwerte (DiSilvestro et al. 2012).

In der klinischen Erprobung bestätigte sich in einer Vielzahl der Studien die geringe orale Bioverfügbarkeit. Eine 2008 mit 25 Patienten durchgeführte Studie zum fortgeschrittenen Adenokarzinom der Pankreas zeigte eine hohe interindividuelle Streuung der Blutspiegel von Curcumin und unterschiedlich starkes Ansprechen der gemessenen Marker (Interleukinspiegel sowie NF κ B-, COX-2- bzw. pSTAT3-Expression in peripheren Blutmonozyten) bei täglicher oraler Einnahme von 8 g Curcumin

(Dhillon et al. 2008). Die maximal erreichte Serumkonzentration von Curcumin lag hier bei in etwa 40 ng/ml, was einer Konzentration von rund 0,11 μ M entspricht und weit von in *in vitro* Studien verwendeten Konzentrationen abweicht. Bei keiner in den bisherigen Studien verwendeten Konzentrationen konnten toxische Nebenwirkungen festgestellt werden (Gupta et al. 2013). In einer weiteren Studie mit Pankreaskarzinompatienten im fortgeschrittenen Stadium konnten positive Effekte auf Gewichtsverlust bzw. auf den Anteil von Muskel- bzw. Fettgewebe der Patienten im Krankheitsverlauf nicht nachgewiesen werden (Parsons et al. 2016). Aktuelle Studien befassen sich auch mit der Kombination aus Gemcitabin und Curcumin beim Pankreaskarzinom (Kanai 2014).

In der Strahlenforschung wird Curcumin zumeist im Rahmen von in *in vitro* Studien oder im Mausmodell zum einen als radio- bzw. chemosensibilisierendes Agens untersucht. Andererseits wird aber auch eine Radioprotektion des gesunden Gewebes durch die beschriebene entzündungshemmende und anti-fibrosierende Wirkung von Curcumin postuliert. Mögliche Effekte sind hierbei die Verringerung der Strahlendermatitis bzw. -mukositis, geringere Raten an Lungenfibrose nach Lungenbestrahlung oder niedrigere Katarakt-Raten nach Strahlentherapie im Kopfbereich (Verma 2016). Eine randomisierte Studie an Brustkrebspatientinnen untersuchte einen strahlentherapie-begleitenden Einsatz von 6 g Curcumin pro Tag. Während weder ein Einfluss auf Schmerzen, das Auftreten einer Hautrötung oder andere Symptome gezeigt werden konnte, wiesen die Curcumin-behandelten Patientinnen signifikant niedrigere Schweregrade der Radiodermatitis auf (Ryan et al. 2013).

Der Einsatz von Curcumin in der traditionellen chinesischen Medizin und in der Homöopathie ist vielfältig und erfolgt bei verschiedensten Erkrankungen. Häufig ist hier auch die parenterale Gabe von Curcumin. Als Lösungsmittel kommt hier insbesondere Ethanol zur Anwendung, als Emulgatoren werden Kolliphor oder DMSO eingesetzt. Bei onkologischen Krankheitsbildern erfolgt die Gabe in der Regel auch in Zyklen von z.B. 18 Einzeldosen je 450 mg Curcumin (Thorsten Dinse 2018).

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das PDAC zeichnet sich durch genetische Instabilität, eine hohe Therapieresistenz und einen zunächst meist symptomarmen Verlauf aus, welcher häufig zu einer Diagnose in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium führt. Aufgrund der Kombination dieser Eigenschaften weist das Pankreaskarzinom eine sehr schlechte Prognose mit 5-Jahres-Überlebensraten von maximal 10% auf. Weiterhin steigen die Inzidenzen dieser Tumorentität stetig an, weswegen neue Ansätze in der Therapie des PDAC dringend notwendig sind. Eine Möglichkeit ist die Verbesserung der Effektivität der Behandlung durch Einflüsse auf die Biologie der Krebszellen, welcher aktuell Forschungsgegenstand in einer Vielzahl von klinischen und präklinischen Studien ist. Die Ansatzpunkte hierbei sind vielfältig, untersucht werden neben zielgerichteten Inhibitoren bestimmter Signalwege auch Medikamente wie Cyclooxygenase-Hemmer oder Phytotherapeutika wie Curcumin als Kombinationspartner zu Chemo- oder Strahlentherapie (Pramanik et al. 2018). Die Behandlung mit Curcumin konnte bei verschiedenen Tumorentitäten in *in vitro* Studien eine Vielzahl von Effekten nachgewiesen werden, die das Wachstum von Tumoren beeinflussen und eine konventionelle Therapie verbessern können. Neben einer Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber der Anwendung einer Chemotherapie, konnte durch begleitenden Einsatz von Curcumin zur Bestrahlung in einigen Karzinomzelllinien auch eine Sensitivierung gegenüber der eingesetzten Strahlung erreicht werden (Qiao et al. 2013).

Der Hauptfokus der vorliegenden Arbeit liegt in der Untersuchung des alleinigen Effektes von Curcumin in verschiedenen Konzentrationen sowie der Kombination von Curcumin mit Bestrahlung auf zwei humane, etablierte Pankreaskarzinomzelllinien, Panc-1 und MiaPaCa-2. Hierfür wurde zum einen im Koloniebildungs-Assay der Einfluss auf die Strahlensensibilität der Pankreaskarzinomzelllinien evaluiert, zum anderen werden weitere, durch Bestrahlung bedingte zelluläre Veränderungen wie die Induktion von Apoptose, Veränderungen der Verteilung der Zellen auf die Zellzyklus-Phasen oder die Induktion von DNA-Schäden in den Tumorzellen nach Curcumin-Zugabe und Bestrahlung ermittelt. Ziel dieser Arbeit ist es, eine potentielle Radiosensitivierung durch Curcumin in den verwendeten Pankreaskarzinomzellen zu erfassen, mögliche zugrundeliegende radiobiologische und molekulare Mechanismen darzustellen und aus diesen Ergebnissen mögliche Rückschlüsse auf eine die Strahlentherapie begleitende phytotherapeutische Behandlung mit Curcumin bei Patienten mit Pankreaskarzinom zu ziehen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Apparate

Gerät	Hersteller
Bestrahlungseinheit RS225A	Gulmay Medical Ltd/Xstrahl, Camberley, UK
BioTek™ EL808™ Absorbance Microplate Reader	BIO-TEK Instruments, Inc., Winooski, USA
Corning Stripettor™ Ultra	Corning Incorporated, Corning, NY 14831, USA
Eppendorf Multipette M4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus Pipetten 0,5-10 µl 10-100 µl 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACSCalibur™ flow cytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
Gefrierschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Inkubator	BBD 6220 CO2-Inkubator, ThermoFisher Scientific, Waltham USA
Kühlschrank	ThermoFisher Scientific, Waltham USA
Mikroskop	ZEISS Primovert, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe™ KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserbad	TB1 Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Mega Star 3.0 R, VWR, Lutterworth, UK Heraeus™ Fresco™ Microcentrifuge, Thermo Fisher scientific, Waltham, USA

Tabelle 5: Verwendete Apparate

3.1.2 Allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien

Labor-/Verbrauchsmaterial	Hersteller
6- bzw. 12-well-Platten	CellStar®, Greiner Bio-One™ GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einweg-Zählkammer C-Chip Neubauer Improved	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon® 12x75mm, 5 mL polystyrene Rundboden Röhrchen mit Deckel	Corning Incorporated, Corning, NY 14831, USA
Falcon®-Tubes (15 ml, 50 ml, 250ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 0,5ml/1ml/2ml/5ml/10ml/25ml/50ml	CellStar®, Greiner Bio-One™ GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zählkammer (Einweg)	C-Chip, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Zählkammer (Mehrweg)	Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Zellkulturflaschen (25, 75, 150 ml)	CellStar®, Greiner Bio-One™ GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml konisch	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 6: Allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
alamarBlue Cell Viability Reagent	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Curcumin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA ≥94% Curcuminoid, ≥80% Curcumin, Product Number: C7727 CAS Number:458-37-7
DMSO	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA
Kristallviolett 0,1%	Krankenhausapotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid >99%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Para-Formaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Propidium Iodid	Thermofisher scientific
Salzsäure 32%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Tabelle 7: Reagenzien und Chemikalien

3.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Hersteller
DMEM high glucose	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Dulbeccos Phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

3.1.5 Antikörper, Proteine und Peptide

Antikörper/Protein/Peptid	Hersteller	Bestellnummer
Alexa 488 goat anti-mouse F(ab)2 conjugate	Invitrogen	ab150113-500ug
CellEvent™ Caspase 3/7 Green Detection Reagent	Thermofisher Scientific	
Mouse monoclonal anti-phospho-Histone H2AX Ser139 primary antibody clone JBW301 Millipore	Invitrogen	
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza Group, Basel, Switzerland	LT07-418
RNAse A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
RNAse free DNase Set	Qiagen, Düsseldorf, Deutschland	79254
SYTOX® AADvanced dead cell stain	Thermofisher Scientific	

Tabelle 9: Antikörper, Proteine und Peptide

3.1.6 Zelllinien

Zelllinie	Bezogen über
MiaPaCa-2	Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Germany
Panc-1	Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Germany

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

3.1.7 Software

Methode/Auswertung	Software	Hersteller
Koloniebildungs-Assay	GelCount	Oxford Optronix, Abingdon, UK
FACS-Analysen	BD CellQuestPro	BD Biosciences, San Jose, USA
Zellzyklus-Auswertung	ModFit LT	Verity Software House, Topsham, USA
Datensammlung und -aufbereitung	Excel	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Statistik	GraphPad Prism 8	GraphPad Software, 2365 Northside Dr. Suite 560, San Diego, USA, CA 92108
Mikroskopie-Bilder	AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany

Tabelle 11: Software

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Zur Kultivierung der Zellen für die unten beschriebenen *in vitro* Experimente wurden die Zellkulturarbeiten nach etablierten Laborstandards durchgeführt. Um einer Kontamination der Zellen vorzubeugen wurden die Zellen ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom bearbeitet und in abgeschlossenen Gefäßen gelagert bzw. transportiert. Verwendete Lösungen und Chemikalien wurden nur unter sterilen Bedingungen geöffnet und gekühlt gelagert. Alle Materialien wurden vor Verwendung mit 70%igen Ethanol desinfiziert. Lösungen, die zur Kultivierung der Zellen verwendet wurden, wurden vor Gebrauch im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Durch regelmäßig durchgeführte Kontrollen mittels MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit wurde bei den verwendeten Zelllinien eine Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen. Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5% CO₂ in einem Inkubator kultiviert.

3.2.1.1 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene adhärente, etablierte, humane Pankreaskarzinomzelllinien, Panc-1 und MiaPaCa-2, verwendet und untersucht. Die Panc-1-Zelllinie entstammt einem duktalem Pankreaskarzinom eines 56 Jahre alten kaukasischen Mannes. Die Zellen der MiaPaCa-2-Zelllinie wurde aus einem undifferenzierten Pankreaskarzinom eines 65-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen. Die Zellen besitzen ein breites Zytoplasma und haben die Tendenz übereinander zu wachsen. Mutationsstatus und Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie können der Tabelle 12 entnommen werden. Beide Zelllinien weisen im Vergleich zu anderen PDAC-Zelllinien wie z.B. BxPC-3 eine niedrigere basale COX-2-Expression auf (Lev-Ari et al. 2006). Für MiaPaCa-2 Zellen wurde zudem verglichen mit Panc-1 eine höhere basale Aktivität des PI3-AKT-Signalweges beschrieben (Fahy et al. 2003).

Zelllinie	Verdopplungszeit [h]	k-ras	p16	p53	SMAD-4	Nrf2
Panc-1	24-26	Mutiert	Mutiert	Mutiert	Wildtyp	Wildtyp
MiaPaCa-2	20-24	Mutiert	Mutiert	Mutiert	Wildtyp	Wildtyp

Tabelle 12: Eigenschaften der verwendeten humanen Pankreaskarzinomzelllinien

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden nach Trypsinierung, Zählung und Zentrifugation 1 x 10⁶ Zellen/ml in 1ml Einfriermedium (70% Medium, 20% FCS, 10% DMSO) pro Kryoröhrchen gegeben und im Flüssigstickstofftank gelagert.

Um die Zellen aufzutauen wurde das Kryoröhrchen im 37°C vorgeheizten Wasserbad unter leichtem Hin-und-Her-Bewegen aufgetaut. Anschließend wurde 1 ml kalt bereitgestelltes Medium zugegeben und das Kryoröhrchen zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sämtliches DMSO des Einfriermediums ausgewaschen wurde. Das sich bei der Zentrifugation (1000 rpm, 5 Min, 4°C) bildende Zellpellet wurde im Anschluss in 7 ml Medium resuspendiert und in einer T25-Zellkulturflasche im CO₂-Inkubator inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um den erhöhten Bedarf der Zellen nach dem Auftauen zu decken.

3.2.1.3 Zellkultivierung und Passage von Zellen

Zur Kultivierung beider Zelllinien wurde Dulbeccos Modified Eagles Medium (high glucose), versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Penicillin/Streptomycin, verwendet. In einem CO₂-Inkubator wurden die Zellen in T75-Flaschen in einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Der Konfluenzgrad der Zellen wurde täglich mittels Lichtmikroskop überprüft. Bei Erreichen einer Konfluenz von über 80% wurden die Zellen passagiert.

Zur Passage der Zellen wurde zunächst das alte Medium entfernt, danach die Reste des FCS-haltigen Mediums durch Spülen mit 10 ml PBS beseitigt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin und die Inkubation bei 37°C für etwa 4 Minuten, um eine vollständige Ablösung des Zellrausens zu erreichen. Nach Überprüfung der freien Suspension der Zellen unter dem Lichtmikroskop wurde die Trypsin-Aktivität durch die Zugabe der dreifachen Menge FCS-haltigen Mediums (6 ml) gestoppt. Nach mehrfacher Resuspendierung wurde die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer ermittelt und je nach Bedarf die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:11 in eine vorbereitete neue Zellkulturflasche mit warmem Medium eingesät und nach mehrmaligem Schwenken weiterkultiviert.

3.2.1.4 Zellzahlbestimmung mit Lebendfärbung

Nach Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche durch Trypsin, Abstoppen der Enzymaktivität durch Zugabe von FCS-haltigem Medium und mehrfacher Resuspendierung wurden zu 50 µl der Zellsuspension 50 µl Trypanblaulösung zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die dadurch entstandene Verdünnung geht in der Berechnung als Verdünnungsfaktor f ein. Im Anschluss wurde eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer mit der entstandenen Farbstoff-Zellsuspension befüllt und unter dem Lichtmikroskop händisch ausgezählt.

Die Zählung mit Trypanblau beruht darauf, dass tote Zellen durch Änderung der Zellpermeabilität durchlässig für Trypanblau werden und somit durch die Färbung blau angefärbt erscheinen. Vitale Zellkerne dagegen erscheinen unter dem Mikroskop durchscheinend und farblos. Um eine valide Zählung zu erhalten wurden in einem Eckquadrat (siehe Abbildung 3, gelb markiert,

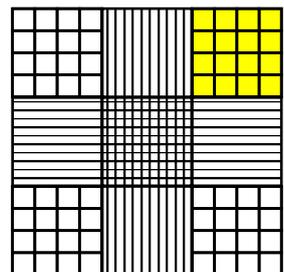


Abbildung 3: Schema einer Neubauer-Zählkammer

bestehend aus 4x4 Zählquadranten) mindestens 50 Zellen ausgezählt. Bei der Zählung werden die auf den Grenzen der Zählquadranten liegenden Zellen nur an zwei benachbarten Grenzlinien mitgezählt. Ein Eckquadrat entspricht 0,1 µl Zellsuspension.

Nach Auszählung von 4 Eckquadraten wurde der Mittelwert der Zählungen berechnet und die Zellzahl der gesamten Zellsuspension über folgende Formel berechnet:

$$Z = \left[\frac{a \cdot f}{q} \right] \cdot 10000 \cdot M$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer; Z = Zellzahl gesamt, a=Summe aus der in den Zählquadranten gezählten Zellen, q=Anzahl ausgezählter Zählquadranten, M=Menge des Mediums (in ml), f=Verdünnungsfaktor

3.2.2 Herstellung der Curcumin-Lösung

Das Curcumin-Pulver wurde zunächst unter sterilen Bedingungen in DMSO gelöst und daraus jeweils frisch eine Stammlösung von 50 mM Curcumin erzeugt. In Vorversuchen wurden als optimale Endkonzentrationen für die weiteren Experimente 12 µM, 10 µM und 6 µM Curcumin ermittelt, die durch Verdünnungsreihen aus der Stammlösung mit 50 mM Curcumin hergestellt wurden.

Anhand der steril abgewogenen Curcumin-Menge (meistens circa 2,0 mg) wurde das benötigte Volumen von DMSO aus dem Molekulargewicht von 368,38 g/mol und der benötigten Konzentration von 50 mM über die Stoffmenge n berechnet ($M = \frac{m}{n}$ und $c = \frac{n}{V}$).

Die weiteren Verdünnungsschritte erfolgten mit vorgewärmtem Zellkultur-Medium (37°C). Eine initiale 1:50 Verdünnung auf 1 mM hat sich in den Vorversuchen als am günstigsten erwiesen, da dadurch die initial häufig aufgetretene Fällungsreaktion vermieden werden konnte. Die einzelnen Verdünnungsschritte für die Anwendung des Curcumins im CFA bzw. am FACS sind in Tabelle 13 und 14 dargestellt.

c (Curcumin)		V (Curcumin) [ml]	V (Medium) [ml]	c (DMSO) [%]
50 mM		0,1		100
1 mM	1:50	0,1	4,9	2,00
132 µM	1:7,6	3,5	23,1	0,26
110 µM	1:1,2	14,0	2,8	0,22
66 µM	1:1,65	6,0	3,9	0,13
Zugabe	1:11	0,1	1	Maximal: 0,0239 (bei 12 µM)

Tabelle 13: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Curcuminlösung für den CFA. Durch Zugabe von 100 µl Lösung zu 1 ml Medium ergibt sich die weitere Verdünnung um 1 zu 11.

c(Curcumin)		V (Curcumin) [ml]	V (Medium) [ml]	c(DMSO) [%]
50 mM		0,1		100
1 mM	1:50	0,1	4,9	2,00
120 µM	1:8,3	2	14,6	0,24
60 µM	1:2	4	4	0,12
Zugabe	1:10	0,5	4,5	Maximal: 0,024 (bei 12 µM)

Tabelle 14: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Curcuminlösung für die Messungen am FACS

3.2.2.1 Zytotoxizität von Dimethylsulfoxid

Die höchste Endkonzentration von DMSO lag in den Versuchen bei 0,024%. In Vorversuchen des Koloniebildungsassays (colony forming assay, CFA) sowie im Alamar Blue Proliferationsassay konnte gezeigt werden, dass diese Konzentration von DMSO das Zellüberleben nicht beeinflusst, weswegen in den weiteren Versuchen keine reine DMSO-Kontrollgruppe berücksichtigt wurde.

3.2.3 Wachstumsverhalten

3.2.3.1 Wachstumskurven

Zur Abschätzung des Wachstumsverhaltens der beiden verwendeten Zelllinien wurden Wachstumskurven erstellt. Nach Zellzählung wurde eine Verdünnung zu 34.000 Zellen pro Milliliter hergestellt und je 3 ml in ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Nach 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden wurden jeweils Triplikate durch Ermittlung der Zellzahl ausgewertet.

3.2.3.2 Proliferationsassay mit Alamar Blue

Um den Effekt von Curcumin auf das Wachstum der humanen Pankreaskarzinomzellen zu quantifizieren wurde der Proliferationsassay mit Alamar Blue durchgeführt. Bei dieser Methode wurden am ersten Tag je 3.000 Zellen in 100 µl Zellsuspension pro well einer 96-well-Platte ausgesät. Neben je drei technischen Replikaten pro Behandlung wurden sowohl eine Positivkontrolle (Zugabe von 1% SDS) als auch eine Negativkontrolle (100 µl reines Medium) ausgewertet. Insgesamt wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Der Alamar Blue Proliferationsassay mit Curcumin erfolgte nach folgendem Ablauf:

- Tag 1: Aussaat von 3.000 Zellen pro Well (100 µl)
- Tag 2: Zugabe von 10 µl Curcumin-Lösung (132 µM, 110 µM, 66 µM) bzw. in den jeweiligen Kontrollgruppen 10 µl PBS, 1%iges SDS oder 0,26%iges DMSO (diese Konzentration entspricht der DMSO-Konzentration in den 10 µl der 12 µM Curcumin-Lösung)
- Tag 3: Messung 24-Stunden-Wert
- Tag 4: Messung 48-Stunden-Wert
- Tag 5: Messung 72-Stunden-Wert

Zur Herstellung der DMSO-Kontrolllösung wurde die gleiche Verdünnungsreihe wie zur Herstellung der Curcumin-Lösung verwendet. In diesem Versuchsaufbau wurde Curcumin über die ganze Versuchszeit belassen und nicht durch einen Wechsel des Mediums entfernt.

Vier Stunden vor Messung der Proliferation erfolgte die Zugabe des blauen Alamar Blue Farbstoffs (Resazurin). Dieser Farbstoff ist nicht giftig, nicht-fluoreszierend und wird durch lebende Zellen aufgenommen und reduziert. Dadurch entsteht der rötliche, fluoreszierende Farbstoff Resorufin. Nach der Inkubationszeit von vier Stunden wurde die Absorption (optical density, OD) jedes Wells bei 570 bzw. 630 nm im Microplate-Reader gemessen. Um mögliche Einflüsse des orange-gelben Farbstoffs Curcumin auf die Absorption des Reagenzes auszuschließen, wurde zu jeder Curcumin-Konzentration eine Kontrolllösung (Blank, BLK) gemessen und in der Auswertung als Referenzwert berücksichtigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	PBS												PBS	A
B	BLK 6µM	BLK 6µM	BLK 6µM	BLK 10µM	BLK 10µM	BLK 10µM	BLK 12µM	BLK 12µM	BLK 12µM	BLK 12µM			PBS	B
C	Panc-1 K	K	K	DMSO	DMSO	DMSO	SDS	SDS	SDS					C
D	6µM	6µM	6µM	10µM	10µM	10µM	12µM	12µM	12µM					D
E	MiaPaCa-2 K	K	K	DMSO	DMSO	DMSO	SDS	SDS	SDS					E
F	6µM	6µM	6µM	10µM	10µM	10µM	12µM	12µM	12µM					F
G	BLK	BLK	BLK	PBS									PBS	G
H	PBS												PBS	H

Abbildung 4: Pipettierschema des Alamar Blue Assay
K: Kontrollgruppe mit Zugabe von 10 µl PBS

Anhand der gemessenen Farbstoffintensität wurde die Proliferation unter verschiedenen Curcumin-Konzentrationen sowie der DMSO-Kontrolle ermittelt und grafisch aufgetragen. Zudem wurde die relative Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Referenz: 0 µM, 24/48/72h) sowie die relative Proliferation im zeitlichen Verlauf (Referenz: 24h, 0/6/10/12 µM) berechnet. Hierbei wurde immer auf die Mittelwerte innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe (24h, 48h, 72h) Bezug genommen. Zur Erkennung möglicher ausreißender Werte wurden zwei statistische Testverfahren kombiniert (siehe 3.2.8.2).

$$relative\ Proliferation = \frac{OD(Treatment) - OD(Blank)}{OD(Referenz)}$$

Formel 2: Berechnung der relativen Proliferation anhand der OD im Alamar Blue-Proliferationsassay

3.2.4 Colony forming assay

Die Beurteilung des klonalen Zellüberlebens erfolgte mit Hilfe des CFA. Hierfür wurde eine bestimmte Zellzahl in 12-well Platten ausgesät und die unterschiedlichen Behandlungskombinationen evaluiert. Nach mehreren Tagen bilden die Zellen durch Teilung Kolonien (>50 Zellen). Es wurde bei beiden Zelllinien je getestete Kombination aus Curcumin-Behandlung mit Bestrahlung eine 12-well-Platte untersucht und der Versuch sowohl mit Panc-1 als auch mit MiaPaCa-2 Zellen je vier Mal unabhängig durchgeführt.

RS225A irradiation device
<ul style="list-style-type: none"> • Gulmay Medical Ltd. / XStrahl
<ul style="list-style-type: none"> • 200 kV, 15 mA
<ul style="list-style-type: none"> • Table 500
<ul style="list-style-type: none"> • Filter 5
<ul style="list-style-type: none"> • Dosisrate: 0,90 Gy/min
<ul style="list-style-type: none"> • Verwendete Bestrahlungsdosen: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 Gy: 2 min 14 sek ▪ 4 Gy: 4 min 28 sek ▪ 6 Gy: 6 min 42 sek ▪ 8 Gy: 8 min 56 sek

Tabelle 15: Bestrahlungsgerät und -parameter

Für die Versuche zum Effekt von Curcumin in Kombination mit Bestrahlung auf das klonale Zellüberleben ergab sich folgender zeitlicher Ablauf:

- Tag 1: Aussaat der Zellen in die 12-well-Platten
- Tag 2: Zugabe der Curcumin-Lösungen in der entsprechenden Konzentration
- Tag 3: Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlung in verschiedenen Dosen (Tabelle 15) und Wechsel des Mediums im Anschluss
- Tag 11 (MiaPaCa-2) bzw. Tag 12 (Panc-1): Fixierung, Färbung und Auswertung der gewachsenen Kolonien

Durch einen Milliliter eiskaltes Methanol für fünf Minuten wurden die Kolonien fixiert. Nach Entfernung des Methanols wurden die fixierten Kolonien mit 0,1% Kristallviolett für zwei Minuten angefärbt, die gefärbten Platten mit Wasser abgespült und einige Stunden zum Trocknen gestellt.

Die Zählung und Auswertung der gefärbten Kolonien erfolgte durch manuelle Markierung in der Software GelCount. Die Markierung einzelner Kolonien wurde manuell durch genaue Umrandung der jeweiligen Kolonie durchgeführt, um die genaue Koloniegröße zu erfassen. Zellverbände aus mindestens 50 Zellen wurden als Kolonie gewertet. Untersucht wurden im Anschluss insbesondere die Koloniezahl, die Überlebensfraktion (survival fraction, SF) sowie das mittlere Kolonievolumen (Optische Dichte pro μm^2).

Die SF wurde aus dem Verhältnis der gezählten Koloniezahl zur ausgesäten Zellzahl korrigiert durch die Plating efficiency (Plattierungseffizienz, PE) berechnet. Die PE spiegelt wider, welcher Anteil der ausgesäten Zellen in der Lage ist eine Kolonie zu bilden.

$$PE = \frac{\text{Gezählte Koloniezahl}}{\text{Zellzahl ausgesät}}$$

Formel 3: Berechnung der PE

$$SF = \frac{\text{gezählte Anzahl Kolonien}}{\text{erwartete Anzahl Kolonien}} = \frac{\text{gezählte Anzahl Kolonien}}{(\text{Ausgesäte Zellzahl} \times PE)}$$

Formel 4: Berechnung der SF

Die Berechnung der SF erfolgte auf zwei verschiedene Arten:

- Curcumin-Korrigiert: Berechnung und Anwendung der PE für jede Curcumin-Konzentration (0, 6, 10, 12 µM) bei 0 Gy
- Unkorrigiert: Berechnung und Anwendung der PE für 0 Gy und 0 µM Curcumin

Zur Auswertung radiosensitivierender Eigenschaften von Curcumin auf das Zellüberleben wurde die Curcumin-korrigierte Rechenweise verwendet. Für die grafische Darstellung der Daten mit Bestrahlung wurde das linear quadratische Modell angewandt.

$$\ln SF = -\alpha * D - \beta * D^2$$

Formel 5: Linear quadratisches Modell; α und β sind gewebespezifische Parameter, D = Dosis

Die alleinige Wirkung von Curcumin wurde unkorrigiert berechnet und durch eine quadratische Funktion dargestellt.

$$Y = B0 + B1 * x + B2 * x^2$$

Formel 6: Quadratische Funktion

3.2.4.1 Etablierung der Zellzahlen

Die Vorversuche wurden mit für die Zelllinien etablierten Zellzahlen begonnen. Durch den Einfluss von Curcumin auf das Wachstum der Zellen erfolgte eine Anpassung der Zellzahlen bzw. der Wachstumsdauer.

Zelllinie	Panc-1		MiaPaCa-2	
Dosis	Etablierte Zellzahl pro ml	Angepasst	Etablierte Zellzahl pro ml	Angepasst
0 Gy	50	100	200	100
2 Gy	100	200	400	200
4 Gy	200	400	800	600
6 Gy	400	1600	6400	4200
8 Gy	1600	6400	12800	8400
Fixierung:	12 Tage	12 Tage	9 Tage	11 Tage

Tabelle 16: Verwendete Zellzahlen für den CFA

3.2.4.2 Etablierung der verwendeten Curcumin-Konzentrationen

Nach Literaturrecherche erfolgte zunächst eine Testung von Konzentrationen zwischen 1 μM und 1 mM. Bei Konzentrationen über 13 μM (getestet wurden 13, 15, 20, 40, 80, 100 μM sowie 1 mM) konnte kein Wachstum beobachtet werden. Bei Konzentrationen unter 5 μM zeigte sich kein Unterschied zur unbehandelten Gruppe (getestet wurden 8, 7, 6, 5, 2 bzw. 1 μM).

Nach Auswertung des Vorversuches wurden die Konzentrationen 6, 10 und 12 μM für die weiteren Versuche ausgewählt, da sich bei 6 μM ein sehr schwacher, bei 10 μM ein mittlerer und bei 12 μM ein deutlicher Effekt auf das Zellwachstum zeigte.

3.2.5 Apoptose

Mittels durchflusszytometrischer Zellfärbung (FACS, fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie) erfolgte die Messung apoptotischer Zellen. Dafür wurde ein Kit verwendet, welches aus Antikörpern gegen Caspase 3 bzw. 7 als Marker für apoptotische Zellen und Antikörpern zur Markierung toter Zellen (SYTOX) besteht. Der Nachweis aktivierter Caspasen beruht auf der Bindung eines Farbstoff-markierten Peptides an kurze DNA-Sequenzen, die bei Aktivierung der Caspasen freigesetzt werden.

Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen wurden in 4,5 ml Medium in T25-Flaschen ausgesät. Die Versuche zur Messung apoptotischer Zellen wurde mit folgendem zeitlichen Ablauf durchgeführt:

- Tag 1: Aussaat der Zellen in T25-Flaschen (in 4,5 ml Medium)
- Tag 2: Zugabe von je 500 μl Curcumin-Lösung auf Endkonzentrationen von 6 μM oder 12 μM bzw. 500 μl Medium (0 μM)
- Tag 3:
 - Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 8 Gy, Kontrollgruppe mit 0 Gy
 - Im Anschluss: Mediumwechsel zu Curcumin-freiem Nährmedium
- Tag 5: Antikörperfärbung mit CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent und SYTOX AADvanced dead cell stain solution; Messung am Durchflusszytometer (FACS)

Folgende Zellzahlen (Zellen/ml) wurden an Tag 1 in 4,5 ml Medium ausgesät:

MiaPaCa-2	0 Gy	4 Gy	8 Gy
0 μM	300.000	400.000	400.000
6 μM	400.000	400.000	500.000
12 μM	500.000	500.000	540.000
Panc-1	0 Gy	4 Gy	8 Gy
0 μM	300.000	400.000	450.000
6 μM	300.000	400.000	450.000
12 μM	400.000	450.000	450.000

Tabelle 17: Zellzahlen für die Bestimmung apoptotischer Zellen am FACS

Analog zu den Angaben des Herstellers wurden die notwendigen Lösungen hergestellt. Zur Messung wurden Zellzahlen zwischen 1×10^5 und 1×10^7 Zellen pro Milliliter verwendet, um ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Zellen und Antikörpern zu gewährleisten. Geeignete Volumina wurden in FACS-Tubes überführt und zentrifugiert, das gewonnene Zellpellet wurde im Anschluss in 500 μ l FACS-Puffer (10% FCS in PBS) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 μ l CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent erfolgte die Inkubation im Dunkeln für 30 Minuten bei 37 °C. Nach 25 Minuten Inkubationszeit wurden 0,5 μ l SYTOX AADvanced dead stain solution zugegeben und 5 Minuten später die Messung am FACS durchgeführt. Die Analyse der gewonnenen FACS-Daten erfolgte mit der Software CellQuest Pro.

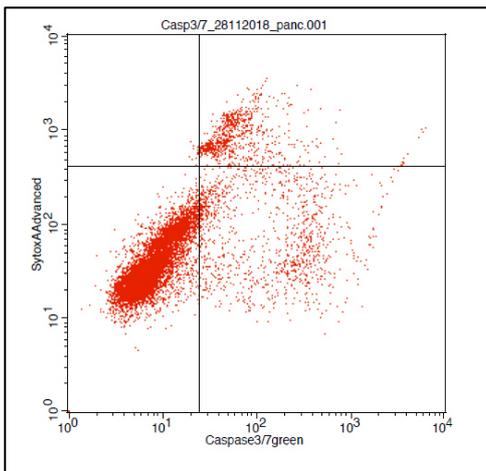


Abbildung 5: Exemplarische Verteilung der Panc-1 Zellen in der Auswertung am FACS nach Färbung mit Caspase-Antikörpern bzw. SYTOX; dargestellt ist eine Referenz (0 Gy, 0 μ M Curcumin)

Caspase positive Zellen werden bei einem Emissionsmaximum von ca. 533 nm (grün) registriert. Die Detektion nekrotischer Zellen erfolgt durch Messung der Lichtemission bei 647 nm (rot). Daraus ergeben sich in der Auswertung verschiedene Zellpopulationen: Lebende Zellen (Caspase und Sytox negativ), apoptotische Zellen (Caspase positiv, Sytox negativ) und nekrotische Zellen (Caspase und Sytox positiv). Durch Auftragung der Fluoreszenz-Intensität bei 533 nm auf der X- und bei 657 nm auf der Y-Achse können diese Zellpopulationen als Punktwolken dargestellt und ausgewertet werden. Hierfür erfolgte die Anpassung der Quadranten an die Wolken bei 0 Gy und 0 μ M Curcumin (siehe Abbildung 5). Die Grenzen wurden für die Auswertung der unterschiedlich behandelten Zellpopulationen innerhalb eines Versuches beibehalten, um additive Effekte der Kombination aus Bestrahlung und Curcuminzugabe darzustellen.

In Vorversuchen konnte eine Interaktion von Curcumin mit der Farbstoffregistrierung ausgeschlossen werden.

In Vorversuchen konnte eine Interaktion von Curcumin mit der Farbstoffregistrierung ausgeschlossen werden.

Ausgewertet wurden im Anschluss insbesondere der Anteil apoptotischer Zellen (rechter unterer Quadrant) sowie der Anteil lebender Zellen. Lebende Zellen umfassen neben den Zellen im unteren linken Quadranten (Caspase negativ) auch die apoptotischen Zellen (Caspase positiv).

3.2.6 Zellzyklus-Verteilung

Die Bestimmung der Zellzyklus-Phasen erfolgte mittels FACS. Zur Analyse wurden zunächst die Zellen in T25-Flaschen ausgesät. Um nach der Behandlung noch genug Zellen für eine FACS Auswertung zu haben, wurden auf die Bestrahlungsdosen angepasste Zellzahlen (siehe Tabelle 18) verwendet.

	0 Gy	4 Gy	8 Gy
Panc-1 / MiaPaCa-2	360.000	405.000	495.000

Tabelle 18: Zellzahlen zur Messung der Verteilung der Zellen über die Zellzyklus-Phasen

Für die durchgeführten Versuche wurde folgender Ablauf angewandt:

- Tag 1: Aussaat der Zellen in T25 Kulturflaschen mit 4,5 ml Medium
- Tag 2: Zugabe von je 500 µl Curcumin-Lösung auf Endkonzentrationen von 6 µM oder 12 µM bzw. 500 µl Medium (0 µM)
- Tag 3:
 - Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 8 Gy, Kontrollgruppe mit 0 Gy
 - Im Anschluss: Mediumwechsel zu Curcumin-freiem Nährmedium
- Tag 4: Fixierung der Zellen

24 Stunden nach Bestrahlung wurde die jeweilige Zellsuspension abtrypsiniert und für 5 Minuten bei 4 °C und 500g zentrifugiert, im Anschluss der Überstand komplett abgenommen und das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet in 250 µl kaltem PBS resuspendiert. Unter Vortexen wurde die Zellsuspension langsam in 2,25 ml eiskaltes 70%iges Ethanol getropft. Die Zelllösung wurde für mindestens 2 Stunden bei -20° C inkubiert, bevor die Färbung und die FACS-Auswertung erfolgten.

Vor Beginn der Färbung wurde die Propidiumiodid-Färbelösung (PI) nach Bedarf hergestellt. Diese besteht aus PBS mit 0,1% Triton X-100, DNase-free RNase A (gewonnen aus Rinder-Pankreas; Endkonzentration von 0,2 mg/ml) und PI (in einer Endkonzentration von 0,02 mg/ml).

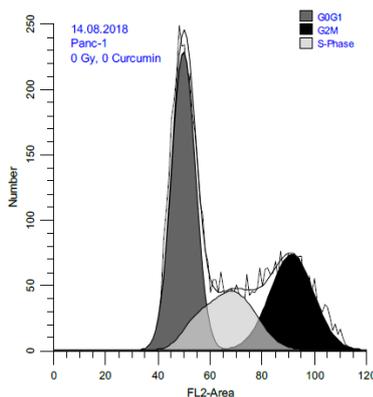


Abbildung 6: Exemplarische Auswertung der Zellzyklus-Verteilung in der ModFit-Software; dargestellt ist eine Kontrollgruppe (0 Gy, 0 µM Curcumin) der Panc-1 Zelllinie

Zur Färbung wurden die in Ethanol fixierten Zellen erneut bei 4°C mit 500g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet im Anschluss in 500 µl PI-Lösung überführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des PIs erfolgte die Inkubation im Dunkeln.

Zur Differenzierung der verschiedenen Zellzyklus-Phasen wurden behandelte Zellen und Kontrollgruppen mit PI-Färbelösung gefärbt, fixiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die gewonnenen Daten wurden im Anschluss mit der Software Modfit ausgewertet. Abbildung 6 zeigte eine exemplarische Darstellung dieser Auswertung.

Bei beiden Zelllinien wurden neben unbehandelten Kontrollgruppen die Kombinationen aus 0, 4 bzw. 8 Gy Bestrahlung und 0, 6 bzw. 12 µM Curcumin untersucht.

3.2.7 γ H2AX-FACS und Zellzyklus (Doppelfärbung)

Zur Darstellung von DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüchen wurde eine Messung der γ H2AX-Fluoreszenz nach Antikörper-Färbung am FACS mit folgender zeitlicher Abfolge der Versuche durchgeführt:

- Tag 1: Aussaat der Zellen in T25-Fläschchen
- Tag 2: Zugabe von 500 μ l Curcumin-Lösung für Konzentrationen von 0 (Medium), 6 oder 12 μ M
- Tag 3:
 - Bestrahlung mit 0, 4 oder 8 Gy
 - Nach 30-minütiger Inkubation Fixierung der Zellen

Behandelte Zellen wurden 30 Minuten nach Bestrahlung durch Trypsinierung für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 500g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 μ l PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml einer frisch hergestellten 1%-igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung wurde die Zellsuspension für 15 Minuten auf Eis (4°C) inkubiert. Schließlich wurden die behandelten Zellen nach erneuter Zentrifugation (200g, 5 Minuten) in 1 ml 70%igem Ethanol (-20°C bei Zugabe) fixiert und bei -20°C für mindestens 2 Stunden bis zu mehreren Tagen gelagert.

Zur Auswertung wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt. Zur genaueren Analyse wurde dabei eine Doppelfärbung verwendet, die neben Doppelstrangbrüchen (γ H2AX) auch die jeweilige Zellzyklusphase der Zelle anfärbt.

Zur Entfernung des Ethanol wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (200g, 5 Minuten) und in 500 μ l PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Wasch-Schritt mit 500 μ l 1%iger Bovinen-Serum-Albumin (BSA)-Lösung und erneuter Zentrifugation erfolgte die Färbung mit der primären Antikörper-Lösung. Vor Verwendung wurde der monoklonale Maus-Antikörper (Anti-Phospho-Histone H2A.X Ser139) im Verhältnis 1:501 mit 1%iger BSA-Lösung verdünnt. Behandelte Zellen wurden in 100 μ l der Lösung resuspendiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden 500 μ l 1%ige BSA-Lösung zugefügt und erneut zentrifugiert (200g, 5 Minuten). Im Anschluss erfolgte die Färbung mit dem sekundären Antikörper (Alexa 488 goat anti-mouse F(ab)₂, verdünnt im Verhältnis 1:401 mit 1%iger BSA-Lösung). 100 μ l der Antikörper-Lösung wurden dem Zellpellet zugegeben. Nach Resuspendierung wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Zur zusätzlichen Darstellung der Zellzyklusphasen erfolgte im Anschluss die Färbung mit der PI-Lösung. Die hierfür benötigte Lösung wurde vor der Färbung frisch hergestellt (siehe auch 3.2.5).

Nach erneuter Waschung mit 500 µl 1%iger BSA-Lösung und Zentrifugation (200g 5 Minuten) wurden die Zellen in 500 µl Lösung aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach erneuter Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die Analyse am FACS.

Zur Auswertung der Doppelstrangbrüche wurde die mittlere Fluoreszenz des sekundären Antikörpers gemessen, anschließend die Messwerte sowie die verschiedenen Zellzyklusphasen mit der Software CellQuestPro evaluiert.

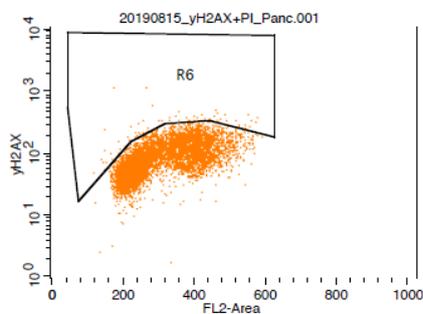
Um die einzelnen, unabhängigen Experimente vergleichen zu können wurde die relative Fluoreszenz wie folgt berechnet:

$$\text{relative Fluoreszenz} = \frac{\text{mittlere Fluoreszenz (Behandlungsgruppe)}}{\text{mittlere Fluoreszenz (Kontrollgruppe)}}$$

Formel 7: Berechnung der relativen γH2AX-Fluoreszenz

Die Berechnung erfolgte auf zwei Arten: Zum einen wurde eine unkorrigierte relative Fluoreszenz mit der unbehandelten Kontrollgruppe berechnet, zum anderen eine korrigierte relative Fluoreszenz bei welcher als Referenz die jeweilige unbestrahlte, aber Curcumin-behandelte Population verwendet wurde. Zweitere diente zur Evaluierung möglicher überadditiver Effekte.

Zur Darstellung einer Zunahme des γH2AX-positiven Zellanteils nach Behandlung wurde bei der Auswertung der Daten im γH2AX-FL2-Diagramm ein Bereich an die unbehandelte Kontrollpopulation angepasst, welcher für die weiteren Auswertungen beibehalten wurde. Der prozentuale Anteil



File: 20190815_γH2AX+PI_Panc.001 Sample ID: Panc_1_00
 Tube: PI +γH2AX Gate: G5
 Gated Events: 7465 Total Events: 10468

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean
R1	7461	99.95	71.27	299.87
R2	3941	52.79	37.65	223.09
R3	1057	14.16	10.10	313.34
R4	2493	33.40	23.82	415.76
R5	7465	100.00	71.31	299.77
R6	84	1.13	0.80	339.29
R7	7426	99.48	70.94	300.12

aller gemessenen Zellen, der in diesen Bereich fiel, wurde im Anschluss weiter ausgewertet. Die Markierung des Bereichs ist in Abbildung 7 beispielhaft dargestellt.

Die in der FACS-Analyse parallel zur γH2AX-Messung gewonnenen Zellzyklus-Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit den vorhergehenden Versuchen zum Zellzyklus neben der Darstellung in CellQuest Pro zusätzlich mit der ModFit-Software bearbeitet und analysiert.

Durch den verglichen mit den Experimenten zum Zellzyklus früheren Zeitpunkt der Messung (30 Minuten nach Bestrahlung statt 24 Stunden) konnten hier frühzeitige Veränderungen in der Zellzyklusverteilung dargestellt werden.

Abbildung 7: Exemplarische Auswertung im γH2AX-FL2-Diagramm und Anpassung der R6-Fläche; dargestellt ist eine Kontrollgruppe (0 Gy, 0 µM) von Panc-1 Zellen

3.2.8 Statistische Auswertung

Die Datensammlung und Aufbereitung wurde in Microsoft Excel durchgeführt, die anschließende grafische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism.

3.2.8.1 Signifikanztestung

Die Signifikanztestung erfolgte über einen ungepaarten t-Test in der GraphPad Prism-Software mit einem Signifikanz-Niveau von $p < 0,05$ und einem 95%-Konfidenzintervall. In den Grafiken wurde die Signifikanz mittels Sternen nach folgendem Schema (Tabelle 19) dargestellt.

*	**	***	****
$p \leq 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,0001$

Tabelle 19: Graphische Darstellung der Signifikanzniveaus

3.2.8.2 Ausreißertest

Zur Auswertung des Alamar Blue-Proliferations-Assay wurden zwei Ausreißertests angewandt. Zum einen der Grubbs-Ausreißertest, zum anderen wurden die Werte mittels 95%-Konfidenzintervall überprüft. Messwerte, die sich in beiden Methoden als auffällig erwiesen, wurden in der weiteren statistischen Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt (Messwerte und Ausreißer siehe Anhang).

4. Ergebnisse

4.1 Wachstumsverhalten

4.1.1 Wachstumskurven ohne Curcumin

Um die basalen Eigenschaften der humanen Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 für die sich anschließenden Versuche zu charakterisieren, wurden zunächst Wachstumskurven erstellt (Abbildung 8). Dabei zeigten MiaPaCa-2 eine schnellere Proliferation mit einer Verdopplungszeit von 16,4 Stunden, während sich für Panc-1 Zellen eine Verdopplungszeit von 21,8 Stunden ergab. Da MiaPaCa-2 Zellen nach der 96 Stunden Messung einen Wachstumsstopp zeigten, wurde hier nur das exponentielle Wachstum bis zu diesem Zeitpunkt dargestellt.

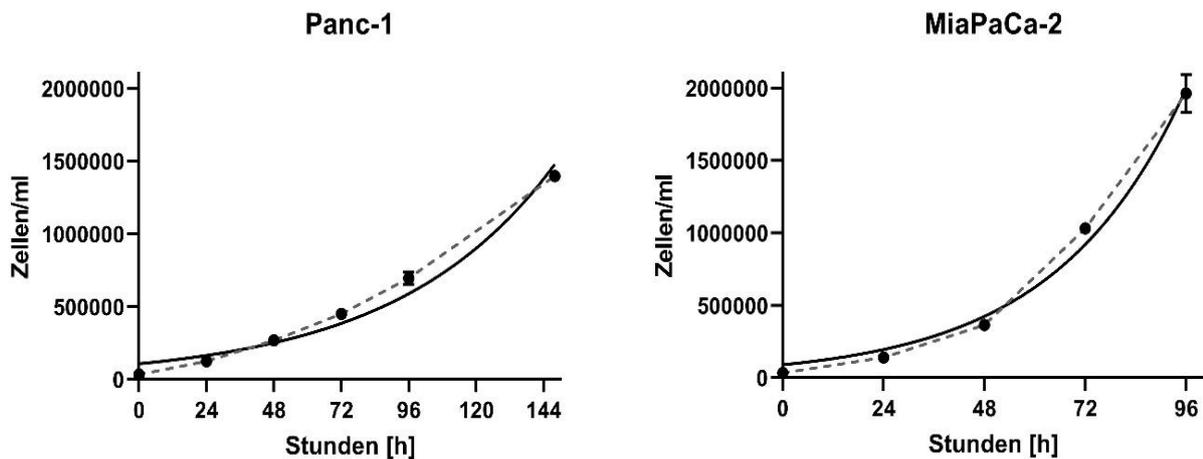


Abbildung 8: Wachstumskurven von Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

4.1.2 Alamar Blue Proliferations-Assay

Zur Ermittlung des Wachstumsverhaltens nach Zugabe von Curcumin in den Konzentrationen von 6, 10 oder 12 μM wurde der Alamar Blue-Proliferations-Assay durchgeführt. Weiterhin wurde eine zusätzliche Kontrollgruppe mit DMSO in einer Konzentration entsprechend der 12 μM -Lösung untersucht, um mögliche Einflüsse des Lösungsmittels auf die Proliferation der Zellen auszuschließen.

Sowohl bei den Panc-1 als auch bei MiaPaCa-2 Zellen zeigte sich über den Zeitverlauf ein Anstieg der optischen Dichte nach Abzug des Leerwertes, welcher die Vermehrung der Zellen widerspiegelt. Unbehandelte MiaPaCa-2 Zellen sowie die Kontrollgruppe mit DMSO und die Behandlungsgruppe mit 6 μM Curcumin erreichten nach 48 Stunden bereits den Wachstumsstopp, weswegen der Messwert bei 72 Stunden in die weiteren Auswertungen nicht einging.

Der Anstieg der OD im zeitlichen Verlauf ist in Abbildung 9 grafisch dargestellt. Die Zugabe von Curcumin in Konzentrationen von 10 und 12 μM führte zu allen Zeitpunkten zur signifikanten Reduktion der OD in beiden getesteten Zelllinien. Die Signifikanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sind in Tabelle 20 angegeben.

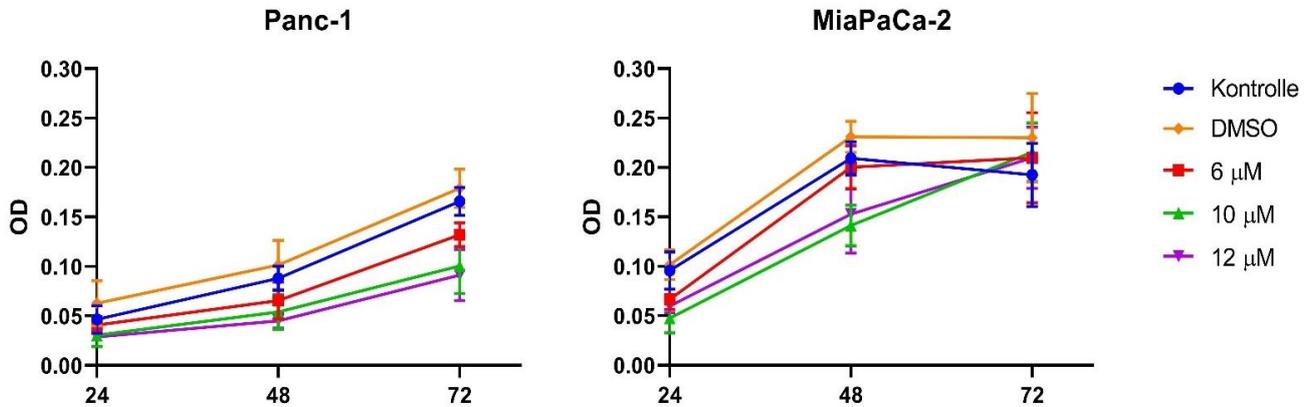


Abbildung 9: OD im Zeitverlauf bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

Signifikanzen	24 Stunden			48 Stunden			72 Stunden		
[μM]	6	10	12	6	10	12	6	10	12
Panc-1	ns	0,0051	0,0016	0,0026	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MiaPaCa-2	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,2543	<0,0001	0,0002			

Tabelle 20: Signifikanzen der unterschiedlichen OD zwischen den Behandlungsgruppen mit Curcumin. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels t-Test im Vergleich zur mit 0 μM behandelten Kontrollgruppe.

4.1.2.1 Einfluss von DMSO

Sowohl bei den Panc-1 als auch bei den MiaPaCa-2 Zellen zeigte sich im Alamar Blue-Assay kein signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und einer Konzentration von 0,024% DMSO (entspricht 12 μM Curcumin), sodass in den folgenden Versuchen auf eine reine DMSO-Kontrolle verzichtet werden konnte. Der Einfluss von DMSO auf die relative Proliferation von Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen ist in Abbildung 10 dargestellt.

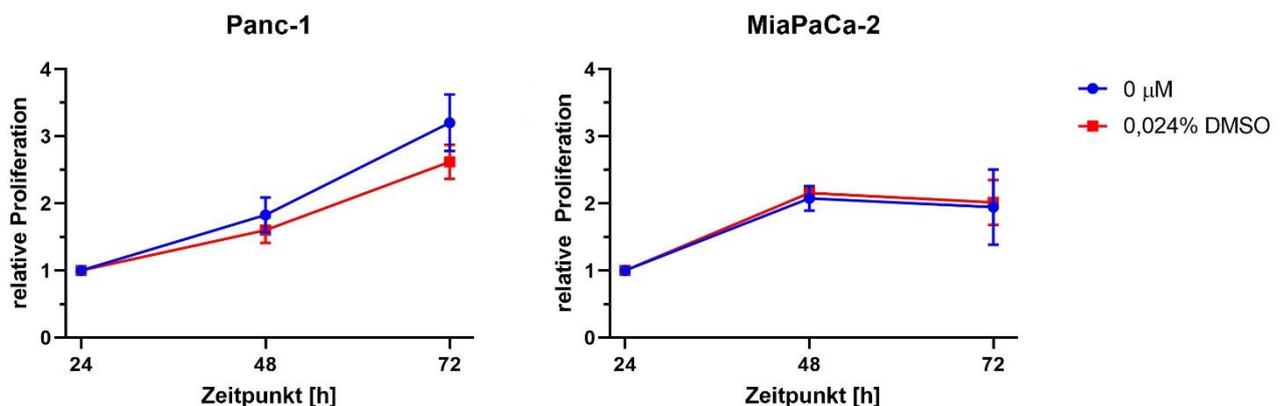


Abbildung 10: Einfluss von DMSO auf die Proliferation bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

4.1.2.2 Relative Proliferation (konzentrationsabhängig)

Durch eine Behandlung mit 6, 10 oder 12 μM Curcumin zeigte sich zu jedem Messzeitpunkt bei der Panc-1 Zelllinie eine signifikant niedrigere relative Proliferation im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle. Zwischen den Messzeitpunkten konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Auch bei der Zelllinie MiaPaCa-2 zeigte sich zu jedem Messzeitpunkt eine signifikant niedrigere relative Proliferation nach Behandlung mit 10 und 12 μM . Eine Konzentration von 6 μM Curcumin führte nur nach 24 Stunden zu einer signifikant niedrigeren relativen Proliferation. Zudem zeigte sich bei MiaPaCa-2 Zellen verglichen mit dem 24-Stunden-Wert eine signifikant höhere relative Proliferation nach 48 Stunden. Die Ergebnisse der relativen Proliferation in Abhängigkeit der Curcumin Konzentration zu den drei unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt durch den Alamar Blue Proliferationsassay sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Die entsprechenden Signifikanzniveaus zwischen den relativen Proliferationen der Curcumin-behandelten Zellen und Kontrollgruppen können Tabelle 21 entnommen werden.

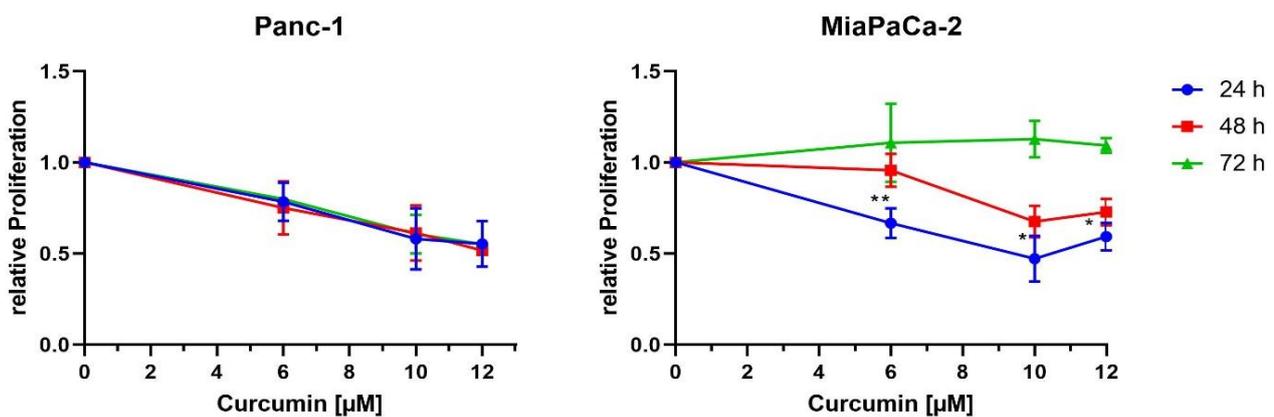


Abbildung 11: Relative Proliferation in Abhängigkeit von der verwendeten Curcumin-Konzentration bei den Zelllinien Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 (rechts)

Signifikanzen	24 Stunden			48 Stunden			72 Stunden		
	6 μM	10 μM	12 μM	6 μM	10 μM	12 μM	6 μM	10 μM	12 μM
Panc-1	0,0065	0,0024	0,0004	0,0142	0,0022	<0,0001	<0,0001	0,0003	<0,0001
MiaPaCa-2	0,0002	0,0002	<0,0001	ns	0,0003	0,0003			

Tabelle 21: Signifikanzen zwischen den Behandlungsgruppen in der curcuminabhängigen relativen Proliferation. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels t-Test im Vergleich zur mit 0 μM behandelten Kontrollgruppe

4.1.2.3 Relative Proliferation (zeitabhängig)

Im Verhältnis zum 24-Stunden-Wert stieg die Proliferation in jeder Behandlungsgruppe im Zeitverlauf signifikant an. Zwischen den Curcumin-Konzentrationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Abbildung 12 zeigt den Verlauf der relativen Proliferation in Abhängigkeit der Zeit, die p-Werte zwischen den Behandlungsgruppen sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

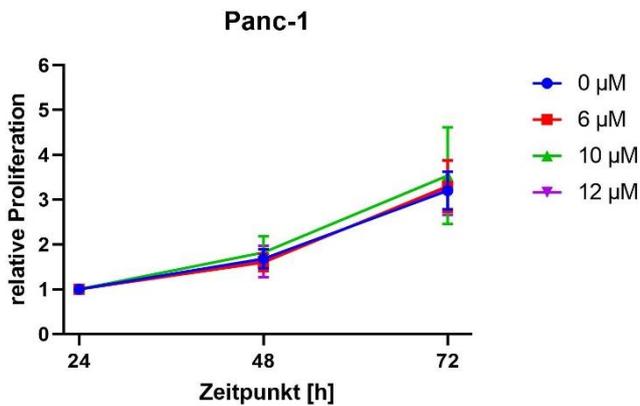


Abbildung 12: Relative Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit bei Panc-1 Zellen

Panc-1	24-48 h	24-72 h	48-72 h
0 μM	0,0006	<0,0001	0,0007
6 μM	0,0008	0,0002	0,0013
10 μM	0,004	0,0033	0,0236
12 μM	0,0118	0,0003	0,0033

Tabelle 22: Signifikanzen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (Auswertung nach 24, 48 oder 72 Stunden) der zeitabhängigen relativen Proliferation bei Panc-1 Zellen

Die MiaPaCa-2 Zellen erreichten bereits zum Zeitpunkt von 48 Stunden einen Proliferationsstopp, weswegen eine Auswertung der Zeitabhängigkeit bei dieser Zelllinie nicht sinnvoll war und im Weiteren nicht gesondert dargestellt wurde.

4.2 Koloniebildung

4.2.1 Klonogenes Überleben

Durch Zugabe von Curcumin nahm die SF in beiden Zelllinien für alle untersuchten Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 μM) signifikant ab. Zwischen den verwendeten Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 13). Für die zur Darstellung verwendete quadratische Funktion ergaben sich die in Tabelle 23 gezeigten Parameter. Zur Reduktion des überlebenden Zellanteils auf 50% (mittlere inhibitorische Konzentration, IC₅₀) der ausgesäten Zellen war bei Panc-1 Zellen eine Curcumin-Konzentration von 9,49 μM, bei den MiaPaCa-2 Zellen 9,02 μM erforderlich. Zur Reduktion auf 10% (IC₉₀) eine Konzentration von 12,84 μM bei den Panc-1 und 12,61 μM bei den MiaPaCa-2 Zellen (siehe Tabelle 23).

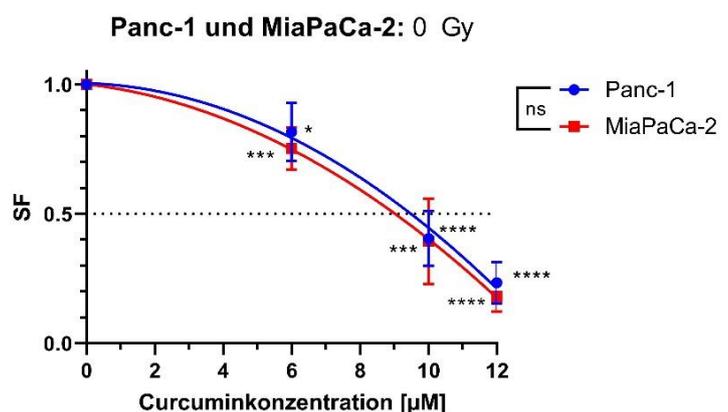


Abbildung 13: Wirkung von Curcumin auf Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen

Zelllinie	B0	B1	B2	IC50 [μM]	IC90 [μM]
Panc-1	1,005	-0,004280	-0,005155	9,49	12,84
MiaPaCa-2	1,001	-0,01535	-0,004450	9,02	12,61

Tabelle 23: Wachstumshemmung der PDAC-Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 durch Curcumin; B0, B1, B2: Parameter der quadratischen Funktion, siehe 3.2.4

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der SF nach Bestrahlung mit 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy in beiden Zelllinien verglichen mit der jeweiligen nicht bestrahlten Kontrollgruppe (Abbildung 14, Tabelle 24).

Die Strahlendosis, die zum Absterben von 50% der Zellen führte (D_{50}), lag bei Panc-1 Zellen bei 3,31 Gy und bei MiaPaCa-2 Zellen bei 1,7 Gy. Eine Reduktion auf eine Überlebensfraktion von 10% (D_{10}) wurde bei Panc-1 Zellen nach Bestrahlung mit 6,44 Gy und bei MiaPaCa-2 Zellen nach 4,75 Gy erreicht (siehe Tabelle 28).

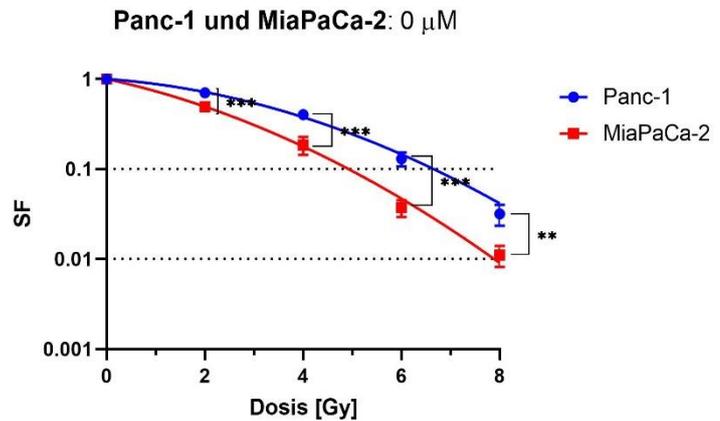


Abbildung 14: Einfluss der Bestrahlung auf die SF von Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen

Zelllinie	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
Panc-1	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MiaPaCa-2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabelle 24: Signifikanzen der SF der verschiedenen Bestrahlungsdosen zur unbestrahlten Kontrollgruppe bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels t-Test im Vergleich zur mit 0 Gy behandelten Kontrollgruppe.

Im direkten Vergleich der beiden Zelllinien erwies sich Panc-1 bei jeder getesteten Strahlendosis als signifikant radioresistenter (Tabelle 25).

2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
0,0009	0,0003	0,0003	0,0033

Tabelle 25: Signifikanzen zwischen den Panc-1 und den MiaPaCa-2 Zellen bei den verschiedenen getesteten Strahlendosen. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels t-Test im Vergleich zur mit 0 Gy behandelten Kontrollgruppe.

4.2.1.1 Koloniebildung nach Kombinationsbehandlung bei Panc-1 Zellen

Durch Curcumin-Zugabe reduzierte sich im Vergleich zur unbehandelten Referenz (0 Gy, 0 μM , unkorrigierte Berechnung) die SF bei Panc-1 signifikant über alle Bestrahlungsdosen (Abbildung 15 A). Dies lässt auf einen additiven Effekt der Behandlung mit Curcumin auf die Fähigkeit der Koloniebildung der Panc-1 Zellen schließen.

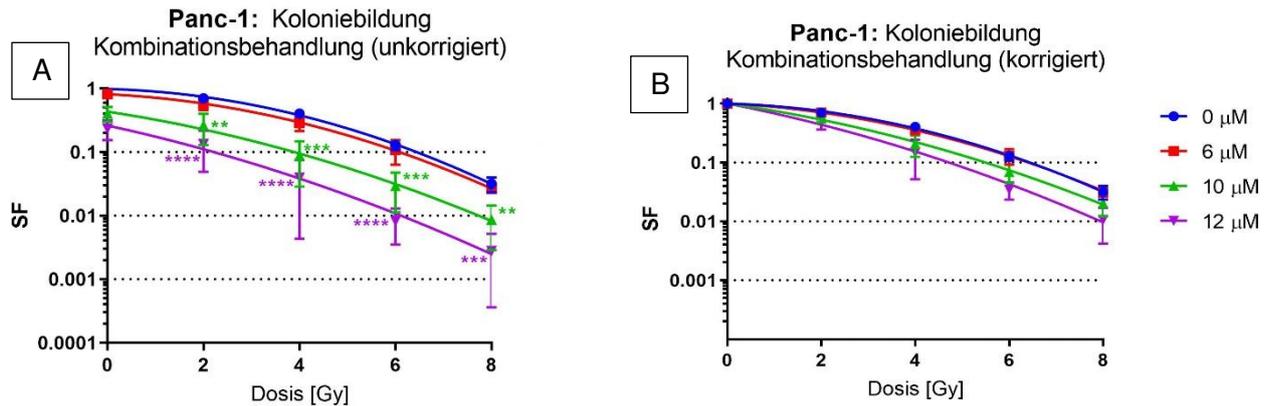


Abbildung 15: Wirkung der Kombinationsbehandlung bei Panc-1 Zellen in unkorrigierter (A) und korrigierter (B) Berechnung der SF

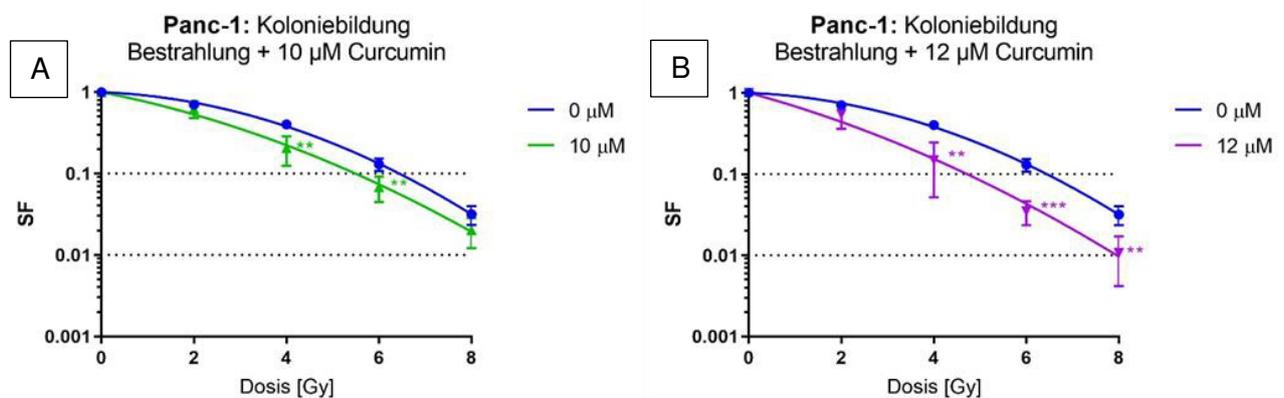


Abbildung 16: SF über die verschiedenen Bestrahlungsdosen bei 10 µM (A) und 12 µM (B) bei Panc-1 Zellen

Auch in der Curcumin-korrigierten Berechnung (Referenz 0 Gy, jeweilige Curcumin Konzentration) zeigte sich ein signifikanter Effekt nach Kombination von 10 µM Curcumin mit 4 Gy und 6 Gy sowie von 12 µM mit 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy (Abbildung 15 B). Der signifikante Unterschied in dieser Rechenweise weist neben einem additiven Effekt sogar auf einen überadditiven Effekt, also auf eine radiosensitivierende Wirkung von Curcumin hin. Dieser scheint auch abhängig von der Konzentration zu sein und bei höherer Curcuminkonzentration zuzunehmen (Tabelle 26). Die Ergebnisse des klonogenen Überlebens der Zelllinie Panc-1 nach der Kombination aus Behandlung mit 10 µM und 12 µM Curcumin und Bestrahlung sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

	6 µM	10 µM	12 µM
Panc-1			
0 Gy	ns	ns	ns
2 Gy	ns	ns	ns
4 Gy	ns	0,0048	0,0028
6 Gy	ns	0,0096	0,0003
8 Gy	ns	ns	0,0070

Tabelle 26: Signifikanzen der Curcumin-korrigierten Berechnung der SF bei Panc-1 Zellen

4.2.1.2 Koloniebildung nach Kombinationsbehandlung bei MiaPaCa-2 Zellen

Die Zugabe von 10 bzw. 12 μM Curcumin zu MiaPaCa-2 Zellen führte im Vergleich zur unbehandelten Referenz in allen Kombinationen zu einer signifikant niedrigeren Überlebensfraktion (Abbildung 17 A).

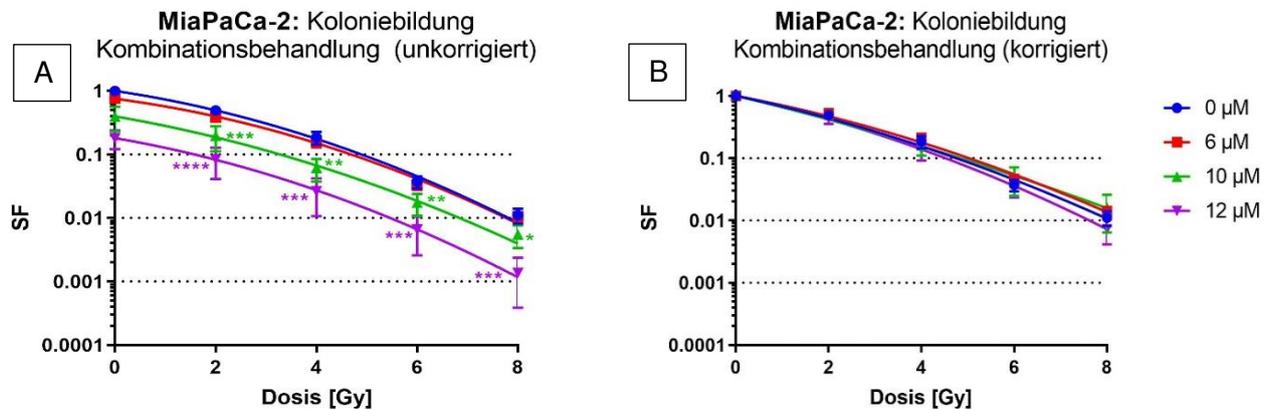


Abbildung 17: Effekt der kombinierten Behandlung bei MiaPaCa-2 Zellen in der unkorrigierten (A) und korrigierten (B) Berechnung der SF

Verglichen mit der unbestrahlten, aber mit Curcumin behandelten Kontrollgruppe zeigte sich im Gegensatz zur radioresistenteren Panc-1 Zelllinie bei den MiaPaCa-2 Zellen kein signifikanter Unterschied (Abbildung 17 B). Es ist bei MiaPaCa-2 Zellen also zwar ein additiver Effekt einer Curcumin-Behandlung mit 10 oder 12 μM Curcumin anzunehmen, ein radiosensitivierender Effekt wie bei den Panc-1 Zellen zeigte sich jedoch nicht. Die Signifikanzen zwischen der unbehandelten Kontrolle und der jeweiligen Behandlungsgruppe in der unkorrigierten Berechnung der SF sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Signifikanzen (unkorrigierte Berechnung)					
	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
Panc-1					
6 μM	0,0467	ns	0,0320	ns	ns
10 μM	<0,0001	0,0012	0,0001	0,0005	0,0038
12 μM	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0005
MiaPaCa-2					
6 μM	0,0009	0,0269	ns	ns	ns
10 μM	0,0003	0,0004	0,0021	0,0086	0,0213
12 μM	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0005	0,0007

Tabelle 27: Signifikanzen der unkorrigierten Berechnung der SF bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen

Der radiosensitivierende Effekt einer Behandlung kann im Koloniebildungsassay rechnerisch durch die sogenannte sensitization enhancement ratio (SER) dargestellt werden. Während sie bei den MiaPaCa-2 Zellen auch nach einer Behandlung mit 12 μM Curcumin bei lediglich 1,05 liegt, errechnete sich bei gleicher Curcumin-Konzentration bei den Panc-1 Zellen eine SER von 1,37.

Durch die Curcuminbehandlung konnte auch die notwendige Strahlendosis zum Abtöten von 50% (entspricht D50) oder 90% (entspricht D10) der Tumorzellen gesenkt werden. Bei einer Konzentration von 12 μM Curcumin war so bei Panc-1 Zellen nur noch eine Dosis von 1,72 Gy statt 3,31 Gy zur Reduktion der Tumorzellen um 50% notwendig (vergleiche Tabelle 28).

	D50[Gy]	SER(50%)	D10[Gy]	SER(10%)	α [Gy^{-1}]	β [Gy^{-1}]
Panc-1						
0 μM	3,31	1	6,44	1	0,05295	0,0473
6 μM	3,12	1,06	6,4	1,01	0,0924	0,04171
10 μM	2,16	1,53	5,49	1,17	0,2566	0,02961
12 μM	1,72	1,93	4,72	1,37	0,3558	0,02804
MiaPaCa-2						
0 μM	1,7	1	4,75	1	0,3636	0,02546
6 μM	1,85	0,92	5,02	0,95	0,3254	0,02645
10 μM	1,6	1,06	4,84	0,98	0,4105	0,0135
12 μM	1,64	1,04	4,52	1,05	0,3714	0,03055

Tabelle 28: Radiobiologische Parameter der Bestrahlungswirkung aus dem linear-quadratischen Modell

4.2.2 Mittleres Kolonievolumen

Neben dem Zellüberleben wurde auch das mittlere Kolonievolumen (Mean colony volume, MCV) der verschiedenen Behandlungsgruppen untersucht. Die Zugabe von Curcumin in Konzentrationen von 10 oder 12 μM reduzierte ohne Bestrahlung das MCV in beiden Zelllinien signifikant.

Bei Panc-1 Zellen führte die Curcumin-Zugabe (10 bzw. 12 μM) in jeder Kombination mit Bestrahlung zu einem signifikant niedrigerem MCV (Abbildung 18).

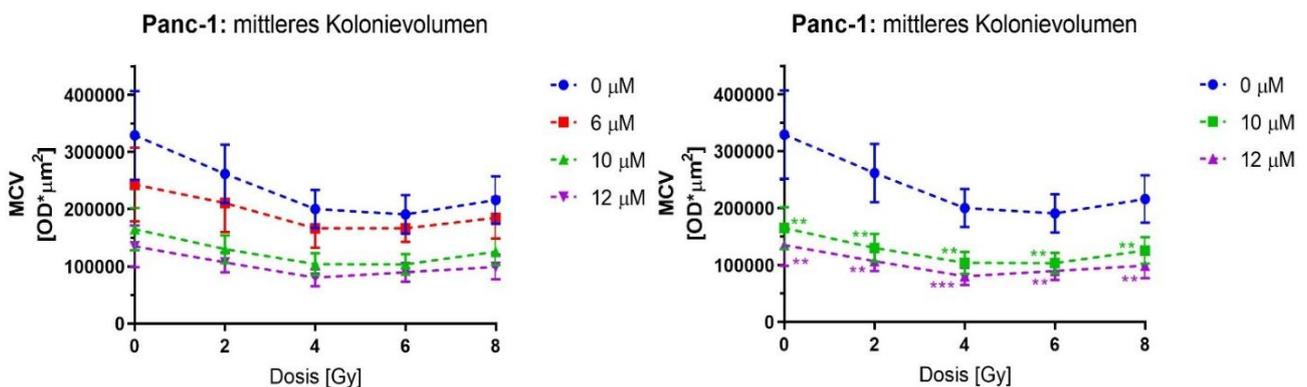


Abbildung 18: Mittleres Kolonievolumen von Panc-1 Zellen

MiaPaCa-2-Zellkolonien zeigten lediglich bei Kombination mit 2 Gy, 4 Gy bzw. 8 Gy mit 10 μM oder 12 μM ein signifikant niedrigeres MCV (siehe Tabelle 29). Die Behandlung mit 6 μM führte bei keinem Behandlungsregime zu einer signifikanten Reduktion des MCV.

Der flachere Kurvenverlauf bei Panc-1 Zellen könnte auf die höhere Strahlenresistenz dieser Zelllinie hindeuten, da die Erhöhung der Strahlendosis das MCV nicht weiter verringert. Der im Vergleich zur

nicht-Curcumin-behandelten Kontrollgruppe parallele Verlauf der Kurve der mit 10 bzw. 12 μM behandelten Kolonien bietet Anhalt für den additiven Effekt der Curcumin-Behandlung bei Panc-1 Zellen bei allen Bestrahlungsdosen.

In den Kolonien der Zelllinie MiaPaCa-2 nähern sich die Kurven der verschiedenen Curcumin-Konzentrationen bei zunehmender Bestrahlung immer weiter an und es zeigt sich ab 6 Gy kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 19). Diese Beobachtung könnte durch die höhere Empfindlichkeit der MiaPaCa-2 Zellen gegenüber der Bestrahlung erklärt werden.

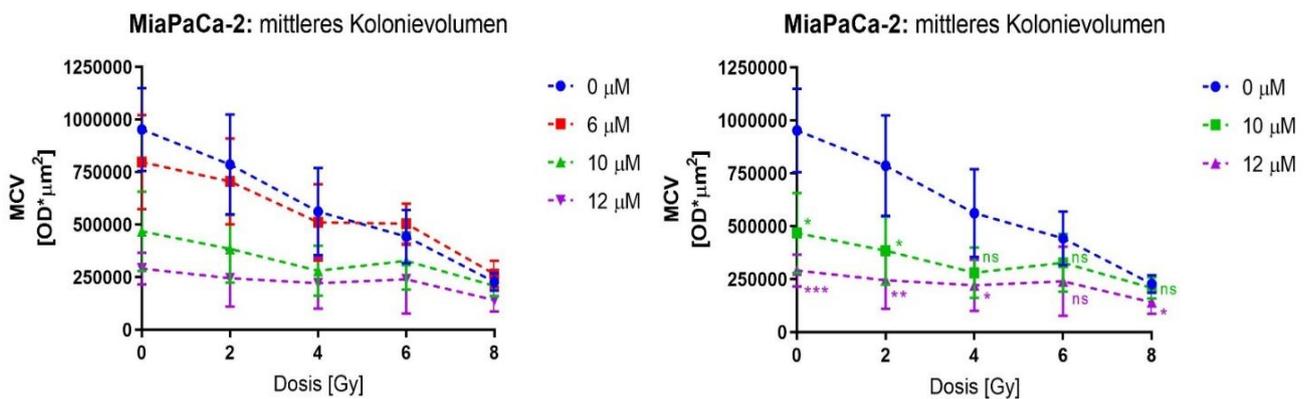


Abbildung 19: Mittleres Kolonievolumen von MiaPaCa-2 Zellen

Panc-1					
	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
6 μM	ns	ns	ns	ns	ns
10 μM	0,0087	0,0035	0,0025	0,0039	0,0093
12 μM	0,0040	0,0012	0,0006	0,0017	0,0025
MiaPaCa-2					
6 μM	ns	ns	ns	ns	ns
10 μM	0,0120	0,0316	ns	ns	ns
12 μM	0,0008	0,0075	0,0297	ns	0,0453

Tabelle 29: Signifikanzen der Reduktion des Kolonievolumens durch Curcuminzugabe bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 μM)

4.3 Mikroskopische Darstellung

Da sich im CFA neben der Reduktion in der SF auch eine Abnahme des MCVs zeigte, wurden Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen zu den Zeitpunkten 24, 48 bzw. 72 Stunden nach Behandlung mit Curcumin unter dem Mikroskop analysiert.

Nach Inkubation mit höheren Curcuminkonzentrationen insbesondere bei der maximalen getesteten Konzentration von 12 μM zeigte sich zu allen betrachteten Zeitpunkten eine geringere Zelldichte (Abbildungen 20 bis 23).

Besondere Auffälligkeiten in Zellgröße, -morphologie oder Veränderungen des Zellkerns konnten bei subjektiver Betrachtung nicht festgestellt werden (Abbildungen 20 bis 23).

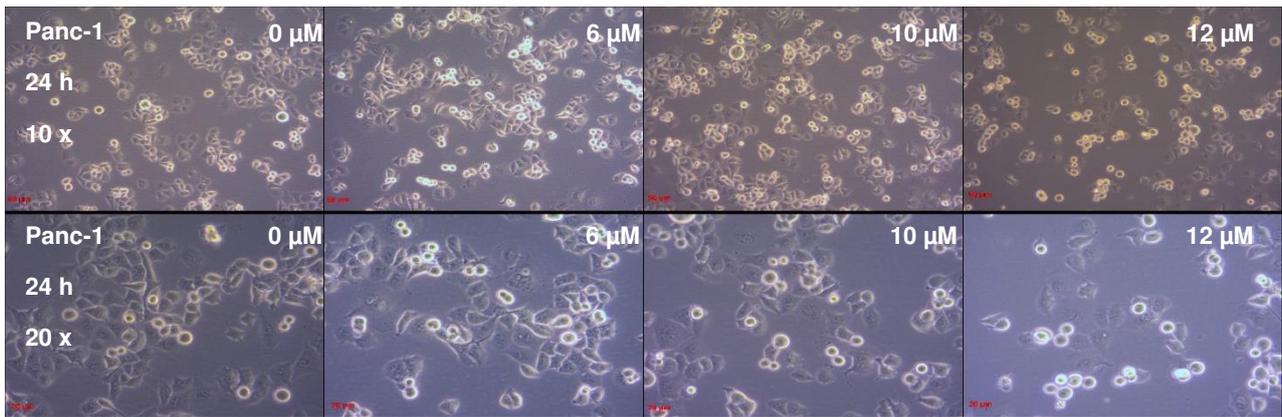


Abbildung 20: Mikroskopische Darstellung der Panc-1 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Curcumin in 10- bzw. 20-facher Vergrößerung

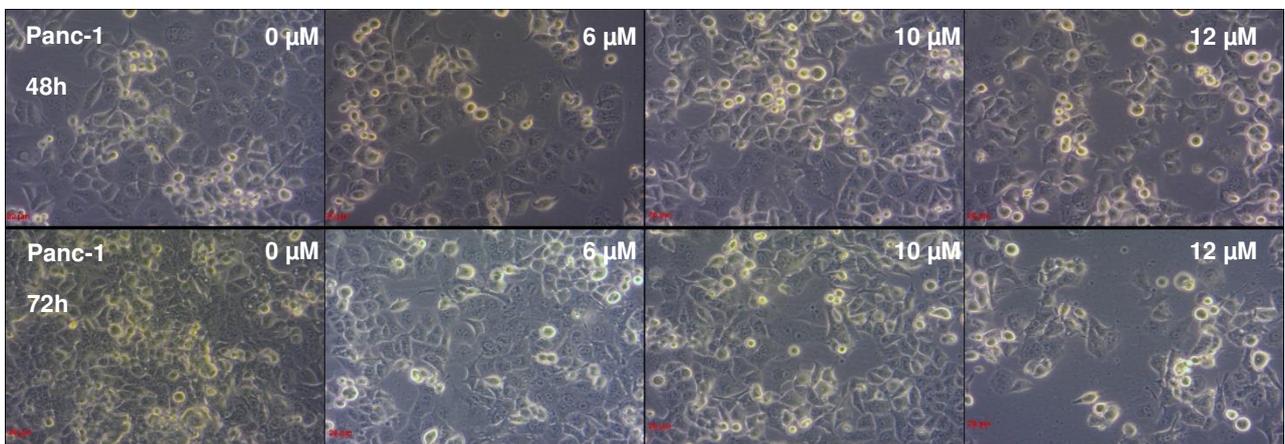


Abbildung 21: Mikroskopische Darstellung der Panc-1 Zellen nach 48- bzw. 72-stündiger Behandlung mit Curcumin in 20-facher Vergrößerung

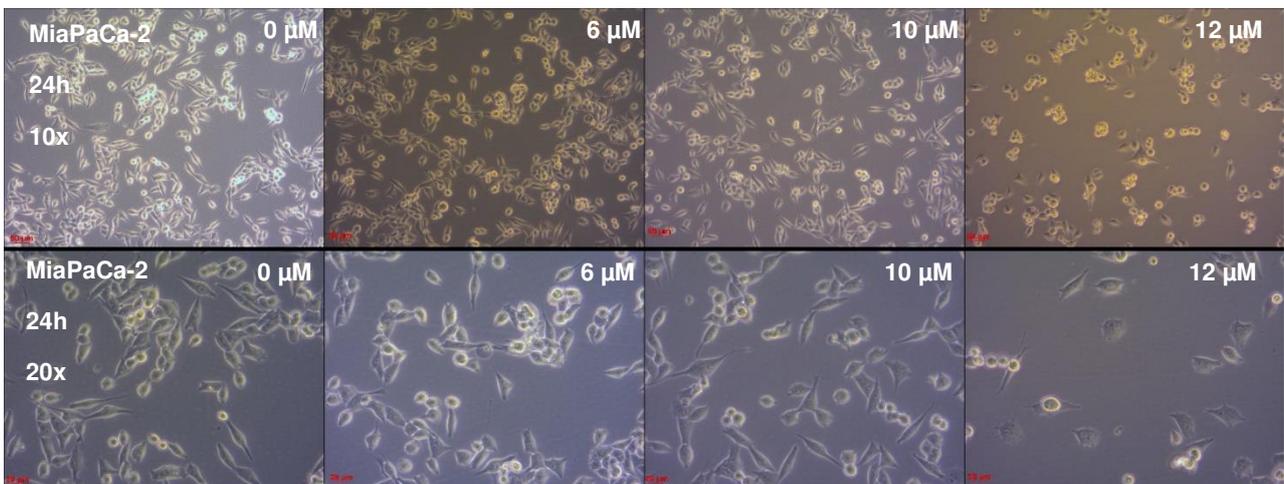


Abbildung 22: Mikroskopische Darstellung der MiaPaCa-2 Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit Curcumin in 10- bzw. 20-facher Vergrößerung

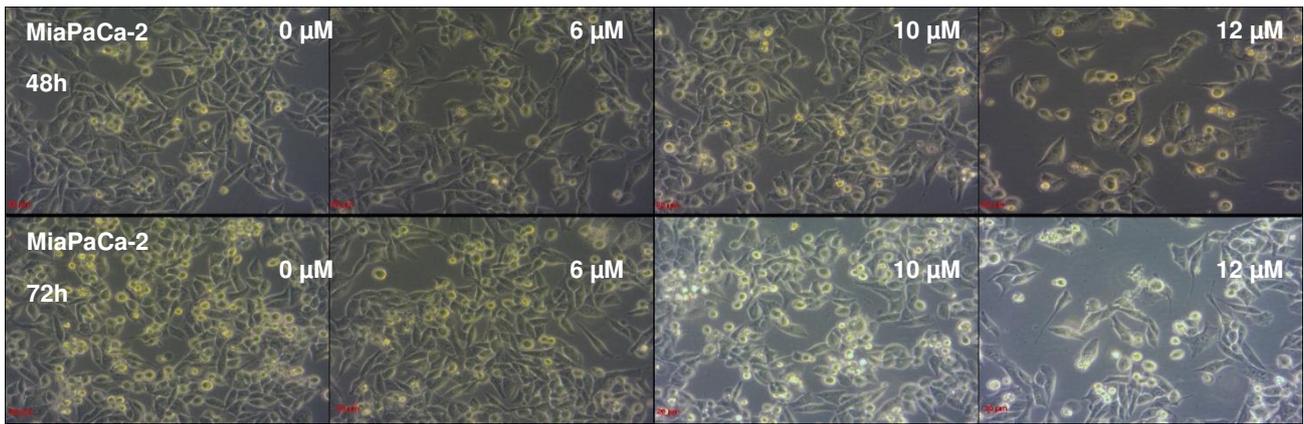


Abbildung 23: Mikroskopische Darstellung der MiaPaCa-2 Zellen nach 48- bzw. 72-stündiger Behandlung mit Curcumin in 20-facher Vergrößerung

4.4 Apoptose

Zur Bestimmung des Einflusses von Bestrahlung und Curcumin auf die Induktion von Apoptose in den humanen Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 wurde eine Analyse am FACS durchgeführt.

4.4.1 Induktion von Apoptose durch Bestrahlung

Durch eine Bestrahlung mit 8 Gy Strahlendosis stieg der Anteil Caspase 3/7-positiver Zellen in beiden Zelllinien verglichen zur unbestrahlten Kontrolle signifikant an (Panc-1: $p=0,0174$; MiaPaCa-2: $p=0,0043$).

Eine Dosis von 4 Gy hingegen führte weder bei den Panc-1, noch bei den MiaPaCa-2 Zellen zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Im Anteil lebender Zellen zeigte sich 48 Stunden nach Bestrahlung bei beiden Zelllinien kein signifikanter Unterschied zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe.

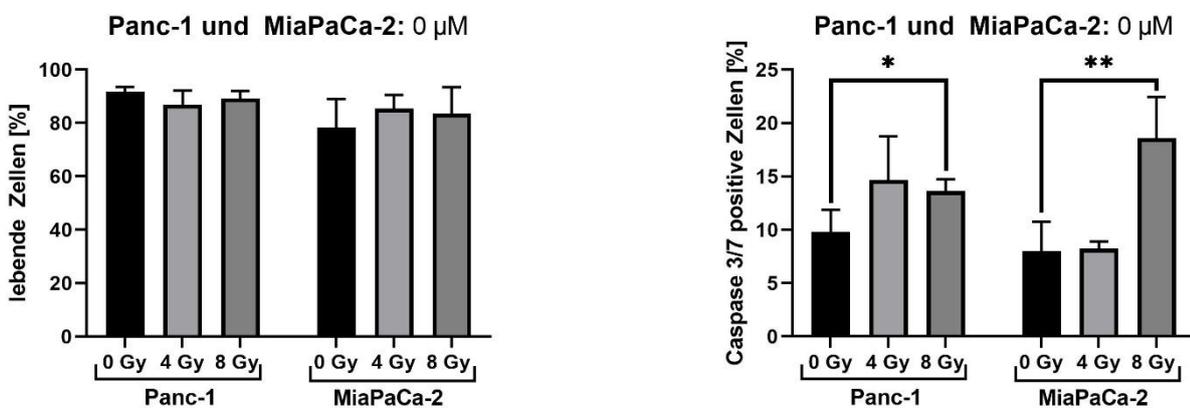


Abbildung 24: Anteil lebensfähiger (viable cells, links) und Caspase-3/7-positiver (rechts) Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen nach Bestrahlung

4.4.2 Curcumin

Der Anstieg Caspase-3/7-positiver Zellen nach Behandlung mit Curcumin in einer Konzentration von 12 μM erwies sich weder bei der Zelllinie Panc-1 noch bei MiaPaCa-2 Zellen als statistisch signifikant. Eine Behandlung mit 6 μM führte bei Panc-1 Zellen zu einer signifikant niedrigeren Apoptoserate ($p=0,0449$). Bei der Zelllinie MiaPaCa-2 zeigte sich keine signifikante Reduktion im Vergleich mit der Kontrollgruppe (0 μM).

Neben der niedrigeren Apoptoserate erwies sich auch der Anteil lebender, also sytox-negativer Zellen nach Behandlung mit 6 μM Curcumin bei Panc-1 Zellen als signifikant erhöht ($p=0,0434$). Bei MiaPaCa-2 Zellen stellte sich kein signifikanter Unterschied dar.

Der Anstieg lebender Zellen in Kombination mit der niedrigeren Apoptoserate lässt auf einen höheren Anteil lebensfähiger, nicht-apoptotischer Zellen in dieser Behandlungsgruppe schließen. Dies könnte auf einen protektiven Effekt der niedrigen Curcumin-Dosis gegenüber der Induktion von Apoptose und Zelltod hinweisen.

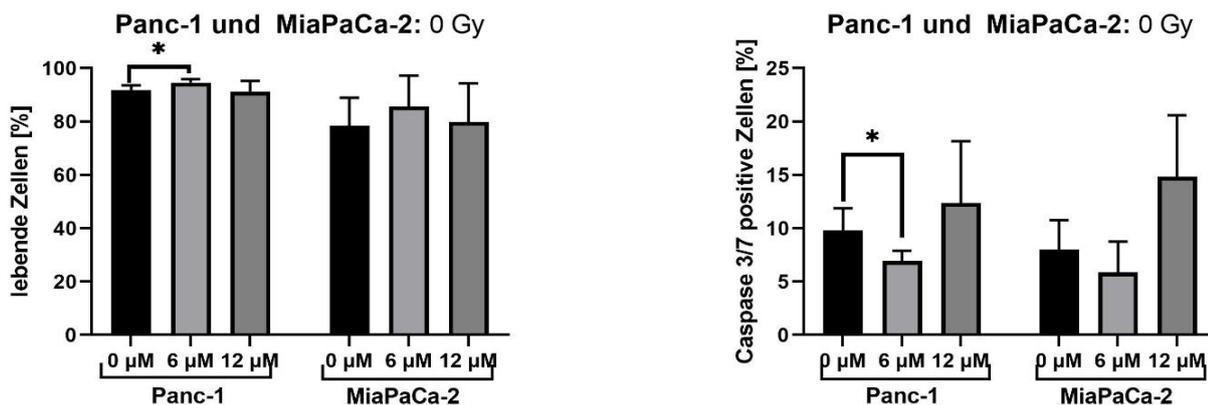


Abbildung 25: Anteil lebensfähiger (links) und Caspase-3/7-positiver (rechts) Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen nach Behandlung mit Curcumin

4.4.3 Kombinationsbehandlung

4.4.3.1 Panc-1

Bei einer Strahlendosis von 4 Gy führte die Zugabe von Curcumin weder mit 6 μM noch mit 12 μM zu einem signifikanten Unterschied im Anteil apoptotischer Zellen gegenüber der nicht-Curcumin-behandelten Gruppe. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung mit 12 μM Curcumin in Kombination mit 8 Gy zu einem signifikant höheren Anteil an apoptotischen Zellen ($p=0,0048$), während die Zugabe von 6 μM Curcumin den Anteil Caspase-positiver Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht veränderte (siehe Abbildung 27 rechts). Der Anstieg des apoptotischen Zellanteils nach Inkubation mit 12 μM erwies sich auch gegenüber der mit 6 μM behandelten Gruppe als statistisch signifikant ($p=0,0045$). FACS-Auswertungen, die die Zunahme Caspase-positiver Zellen

nach Kombinationsbehandlung mit 8 Gy und 12 μM Curcumin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigen, sind in Abbildung 26 exemplarisch dargestellt.

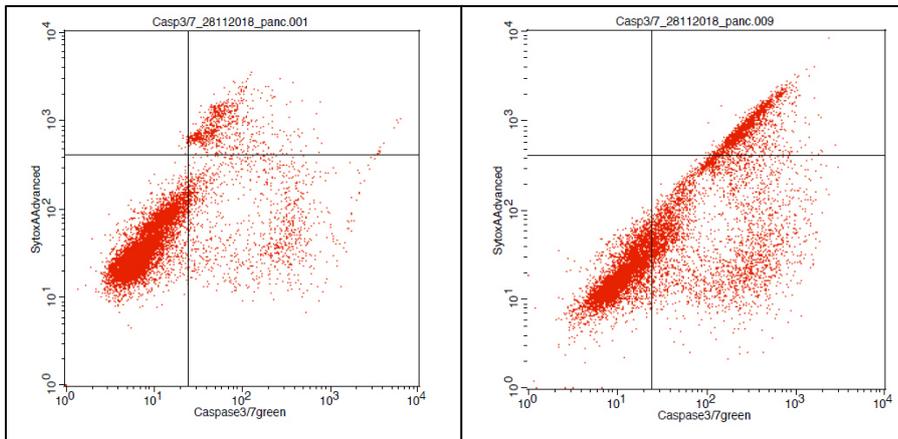


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der Zellverteilung der Panc-1 Zellen am FACS, links: Leerkontrolle (0 Gy, 0 μM), rechts: Behandlungsgruppe mit 8 Gy und 12 μM Curcumin

Die Zugabe von 12 μM Curcumin führte in keiner Behandlungskombination zu signifikanten Unterschieden im Anteil lebender Zellen, weswegen bei den verwendeten Konzentrationen nicht von einer Zytotoxizität durch Curcumin auszugehen ist. Es zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen einer Behandlung mit 6 μM und 12 μM Curcumin (Abbildung 27 links).

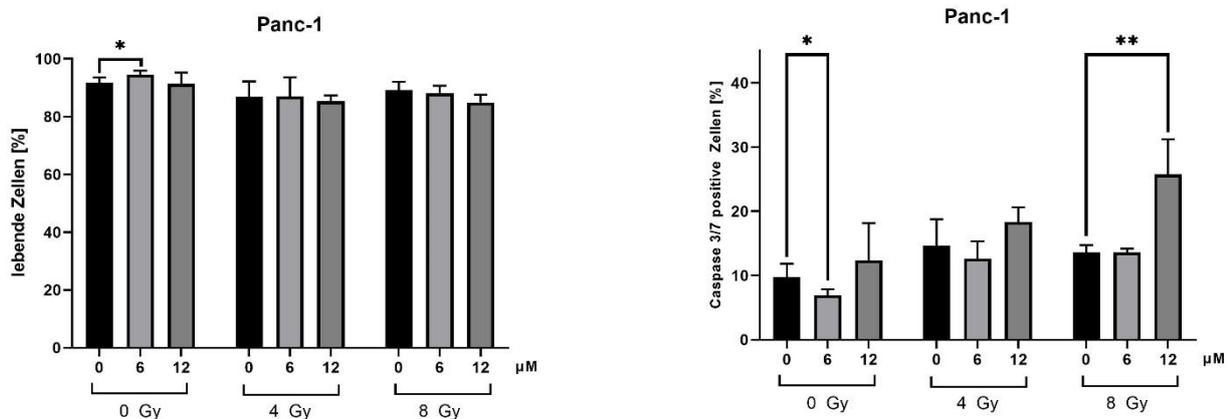


Abbildung 27: Anteil lebender (links) bzw. Caspase-3/7-positiver (rechts) Panc-1 Zellen nach kombinierter Behandlung

Bei einer Konzentration von 6 μM Curcumin zeigte die Applikation von 4 oder 8 Gy einen signifikant höheren Anteil an Caspase-3/7-positiven Zellen als die nicht bestrahlte Gruppe. Bei 12 μM führte lediglich die Bestrahlung mit 8 Gy zur signifikanten Erhöhung des apoptotischen Zellanteils (siehe Tabelle 30).

Panc-1	0 – 4 Gy	0 – 8 Gy	4 – 8 Gy
0 μM	ns	0,0174	ns
6 μM	0,0069	<0,0001	ns
12 μM	0,1019	0,0270	0,0466

Tabelle 30: Signifikanzen der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen bei Behandlung mit 0, 6 oder 12 μM Curcumin

4.4.3.2 MiaPaCa-2

Die Auswertung der Zellverteilung der MiaPaCa-2 Zellen im FACS ist in Abbildung 28 exemplarisch dargestellt.

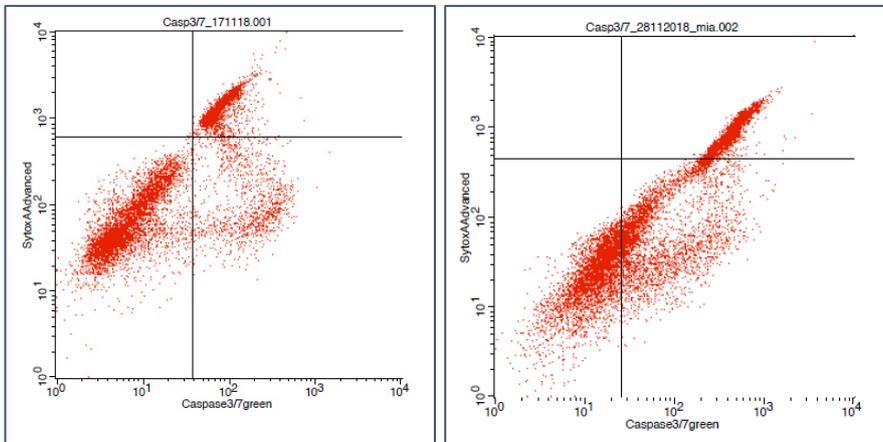


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung der Zellverteilung der MiaPaCa-2 Zellen am FACS, links: Leerkontrolle (0 Gy, 0 μM), rechts: Behandlungsgruppe mit 8 Gy und 12 μM

Eine Bestrahlung mit 8 Gy Strahlendosis führte bei MiaPaCa-2 Zellen in allen Gruppen (0, 6, 12 μM) zu einer signifikanten Erhöhung apoptotischer Zellen nach 48 Stunden (Abbildung 29 weiße Signifikanzsterne).

Eine Erhöhung der Strahlendosis von 4 auf 8 Gy steigerte bei Curcumin-Konzentrationen von 0 bzw. 6 μM den Anteil Caspase-positiver Zellen signifikant.

Eine Zugabe von 12 μM Curcumin führte sowohl bei einer Bestrahlung mit 4 Gy als auch mit 8 Gy zu signifikant höheren Apoptoseraten im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle. Zwischen den Behandlungsgruppen 6 μM und 12 μM Curcumin zeigte sich neben Signifikanzen bei 4 und 8 Gy sogar in der unbestrahlten Gruppe ein signifikanter Unterschied. Gegenüber den nicht-Curcumin-behandelten Zellen konnte durch Zugabe von 12 μM Curcumin in der nicht bestrahlten Kohorte (0 Gy) keine Signifikanz gezeigt werden.

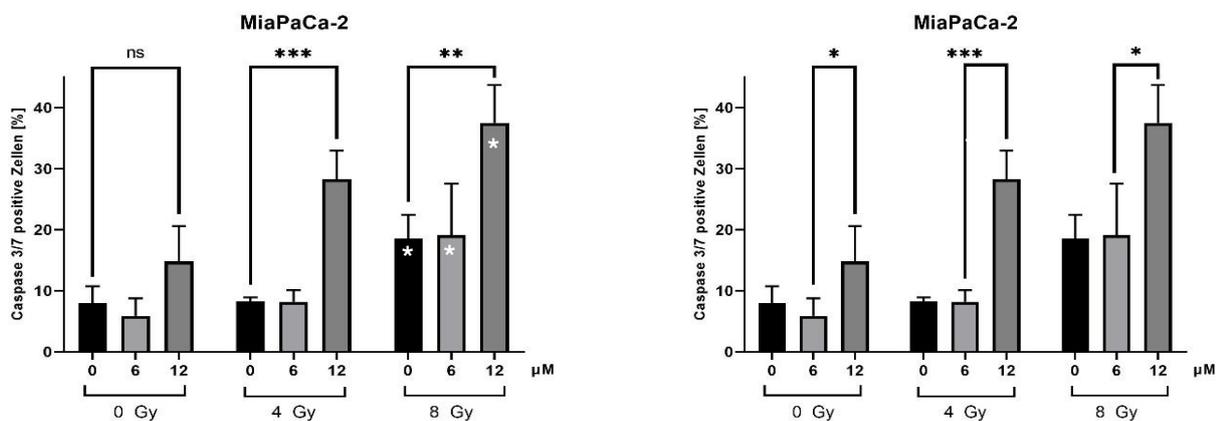


Abbildung 29: Caspase-3/7-positive Zellen nach Kombinationsbehandlung der MiaPaCa-2 Zelllinie, links: Signifikanzen zwischen 0 und 12 μM ; rechts: zwischen 6 und 12 μM (Tabelle 30), weiße Sterne: Signifikanzen der Bestrahlung (siehe auch Tabelle 31)

Zwischen der Kontrollgruppe (0 μM) und der mit 6 μM Curcumin behandelten Gruppe zeigte sich bei keiner Strahlendosis ein signifikanter Unterschied.

MiaPaCa-2	0 - 6 μM	0 - 12 μM	6 - 12 μM
0 Gy	ns	ns	0,0323
4 Gy	ns	0,0001	0,0002
8 Gy	ns	0,0021	0,0126

Tabelle 31: Signifikanzen zwischen den untersuchten Curcuminkonzentrationen bei der jeweiligen Strahlendosis

MiaPaCa-2	0 - 4 Gy	0 - 8 Gy	4 - 8 Gy
0 μM	ns	0,0043	0,0019
6 μM	ns	0,0247	0,0445
12 μM	0,0112	0,0017	ns

Tabelle 32: Signifikanzen der Bestrahlung bei der jeweiligen Curcumin-Konzentration

Weder eine Bestrahlung mit 4 noch mit 8 Gy Strahlendosis führte zu einer signifikanten Reduktion der lebenden Zellen verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle (siehe auch Abbildung 24 im Kapitel 4.4.1). Durch Kombination mit 12 μM Curcumin hingegen zeigte sich bei einer Strahlendosis von 8 Gy sowohl im Vergleich zur unbestrahlten als auch zur mit 6 μM behandelten Gruppe eine signifikante Reduktion der Sytox-negativen Zellfraktion (Abbildung 30 und Tabelle 33).

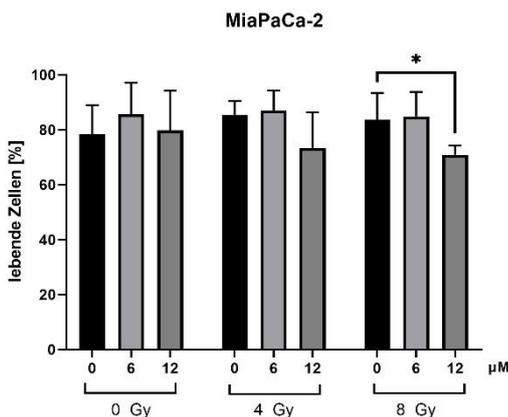


Abbildung 30: Anteil lebender MiaPaCa-2 Zellen nach kombinierter Behandlung

MiaPaCa-2	0 - 6 μM	0 - 12 μM	6 - 12 μM
0 Gy	ns	ns	ns
4 Gy	ns	ns	ns
8 Gy	ns	0,0494	0,0261

Tabelle 33: Signifikanzen zwischen den Anteilen lebender Zellen der verschiedenen Behandlungsgruppen

4.4.3 Vergleich der Zelllinien

Ohne Bestrahlung zeigte sich nach alleiniger Curcumin-Behandlung kein signifikanter Unterschied in den Apoptoseraten der untersuchten Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2.

Bei einer Strahlendosis von 4 Gy zeigten Panc-1 Zellen in den Behandlungsgruppen mit 0 μM und 6 μM Curcumin einen signifikant höheren Anteil Caspase-positiver Zellen, während nach Zugabe von 12 μM Curcumin der Anteil apoptotischer Zellen bei MiaPaCa-2 Zellen verglichen mit Panc-1 Zellen signifikant erhöht war.

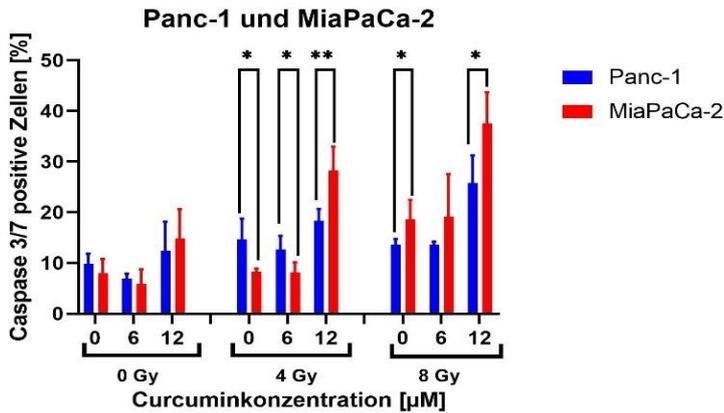


Abbildung 31: Vergleich Caspase-3/7-positiver Zellen zwischen Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen

	0 µM	6 µM	12 µM
0 Gy	ns	ns	ns
4 Gy	0,0219	0,0348	0,0090
8 Gy	0,0490	ns	0,0296

Tabelle 34: Signifikanzen zwischen den Anteilen Caspase-3/7-positiver Zellen bei Panc-1 und MiaPaCa-2

Nach Bestrahlung mit 8 Gy zeichneten sich MiaPaCa-2 Zellen gegenüber Panc-1 Zellen durch höhere Apoptoseraten aus. Für die Kombinationen mit 0 µM bzw. 12 µM Curcumin erwies sich dieser Unterschied als statistisch signifikant.

4.5 yH2AX-Fluoreszenz und Zellzyklus (Doppelfärbung)

4.5.1 Relative Fluoreszenz

4.5.1.1 Bestrahlung

Eine Bestrahlung mit 4 bzw. 8 Gy führte bei beiden Zelllinien im Vergleich zur unbestrahlten Kohorte zu einem signifikanten Anstieg der relativen yH2AX-Fluoreszenz. Zwischen den Bestrahlungsgruppen 4 oder 8 Gy zeigte sich weder bei den Panc-1 noch bei den MiaPaCa-2 Zellen der Unterschied in der mittleren relativen Fluoreszenz (mean fluorescence intensity, MFI) signifikant (siehe Tabelle 35).

	0 - 4 Gy	0 - 8 Gy	4 - 8 Gy
Panc-1	0,0118	0,0073	ns
MiaPaCa-2	<0,0001	<0,0001	ns

Tabelle 35: Signifikanzen der relativen yH2AX-MFI nach Bestrahlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen

4.5.1.2 Curcumin

Durch Inkubation mit 12 µM Curcumin zeigte sich sowohl bei den Panc-1 als auch den MiaPaCa-2 Zellen ohne Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der relativen yH2AX-MFI. Eine Behandlung mit 6 µM führte in beiden Zelllinien zu keiner signifikanten Fluoreszenzerhöhung.

4.5.1.3 Kombination

Eine Kombination von 4 Gy Strahlendosis mit 12 μM Curcumin führte bei Panc-1 Zellen sowohl gegenüber der nicht-Curcumin-behandelten als auch der mit 6 μM Curcumin behandelten Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung der MFI. Innerhalb der mit 8 Gy bestrahlten Gruppen erwies sich der Unterschied zwischen den verschiedenen Curcumin-Konzentrationen nicht als signifikant.

MiaPaCa-2 Zellen zeigten nach Inkubation mit 12 μM in jeder Bestrahlungsgruppe eine signifikant erhöhte γH2AX -MFI. Die Behandlung mit 6 μM führte auch hier im Vergleich zur nicht Curcumin-behandelten Gruppe zu keiner signifikanten Veränderung.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 32 sowie der Tabelle 36 dargestellt.

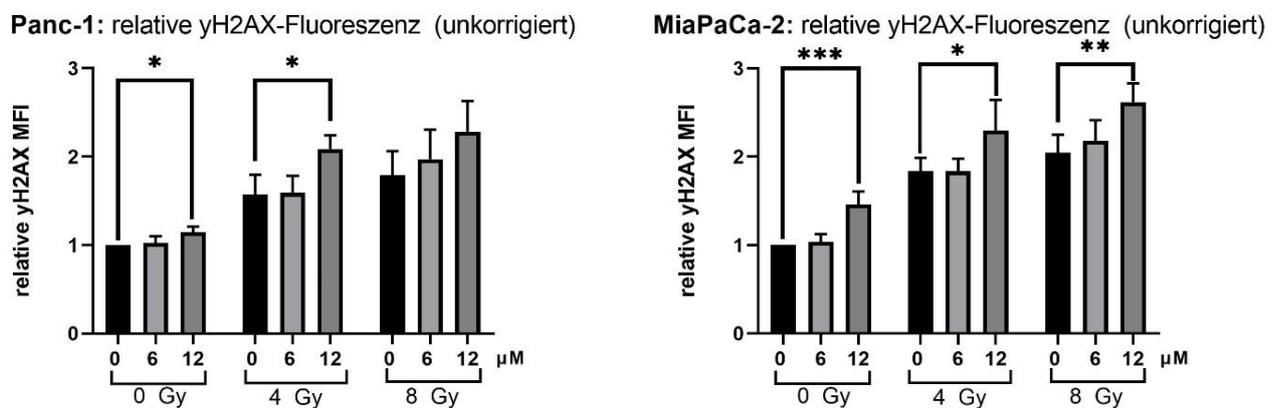


Abbildung 32: Unkorrigierte Berechnung der relativen γH2AX -MFI bei den Zelllinien Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 (rechts)

Panc-1	0 - 6 μM	0 - 12 μM	6 - 12 μM
0 Gy	ns	0,0202	ns
4 Gy	ns	0,0308	0,0252
8 Gy	ns	ns	ns

MiaPaCa-2	0 - 6 μM	0 - 12 μM	6 - 12 μM
0 Gy	ns	0,0009	0,0028
4 Gy	ns	0,0500	0,0487
8 Gy	ns	0,0080	0,0320

Tabelle 36: Signifikanzen der unkorrigierten relativen γH2AX MFI bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

Nach der korrigierten Berechnung zeigte sich bei Panc-1 Zellen weiterhin ein Anstieg der relativen γH2AX -Fluoreszenz nach Behandlung mit 12 μM Curcumin. Dieser erwies sich lediglich bei 4 Gy gegenüber der mit 6 μM behandelten Gruppe als statistisch signifikant ($p=0,0122$).

Im Gegensatz zu den Panc-1 Zellen führte die korrigierte Berechnung bei MiaPaCa-2 Zellen zu einem Absinken der relativen γH2AX -MFI nach Behandlung mit 12 μM Curcumin, wobei der Unterschied sich in keiner Behandlungskombination als signifikant erwies (Abbildung 33).

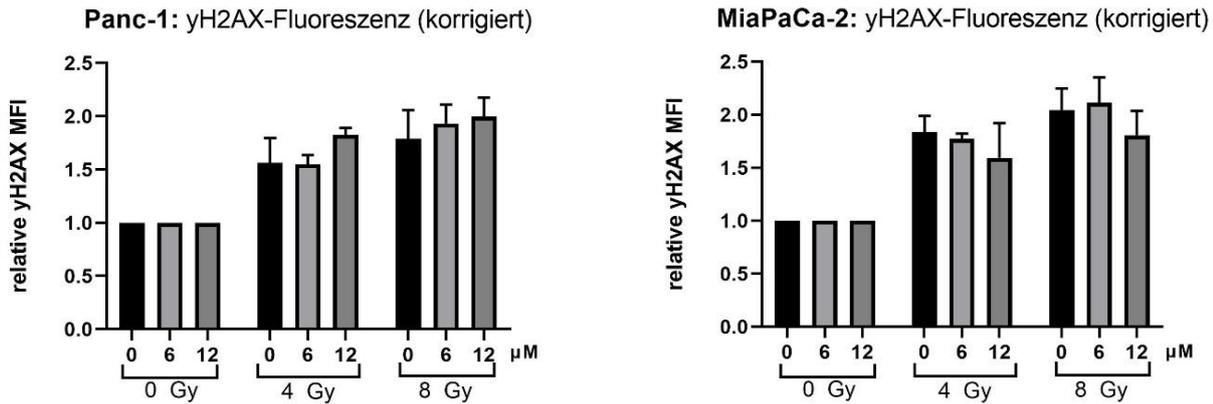


Abbildung 33: Korrigierte Berechnung der relativen yH2AX-MFI bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

Diese Berechnung legt bei MiaPaCa-2 einen rein additiven Effekt durch gleichzeitige Behandlung mit Curcumin in den verwendeten Konzentrationen nahe, während sich bei Panc-1 Tendenzen hin zu einem überadditiven Effekt, also einer Sensitivierung der Zellen gegenüber DNA-Schäden durch Bestrahlung zeigen.

4.5.1.4 Relative yH2AX-MFI in den verschiedenen Zellzyklusphasen

Um etwaige Veränderungen im Zellzyklus durch Curcumin zu berücksichtigen, wurde zusätzlich die MFI in den Zellen der einzelnen Zellzyklusphasen gesondert ausgewertet.

Für die Zellpopulation in der G0/G1-Phase zeigte sich bei der Zelllinie Panc-1 ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Zellen (0 Gy, 0 µM) und unbestrahlten, aber mit 12 µM Curcumin behandelten Zellen ($p = 0,0309$). Weitere signifikante Unterschiede konnten in dieser Gruppe nicht beobachtet werden. MiaPaCa-2 Zellen zeigten im Gegensatz dazu in der G0/G1-Phase nach 12 µM Curcumin sowohl in der unbestrahlten ($p = 0,0004$) als auch in der mit 8 Gy Strahlendosis exponierten Gruppe ($p = 0,0204$) eine signifikante Erhöhung der relativen yH2AX-MFI (Abbildung 34).

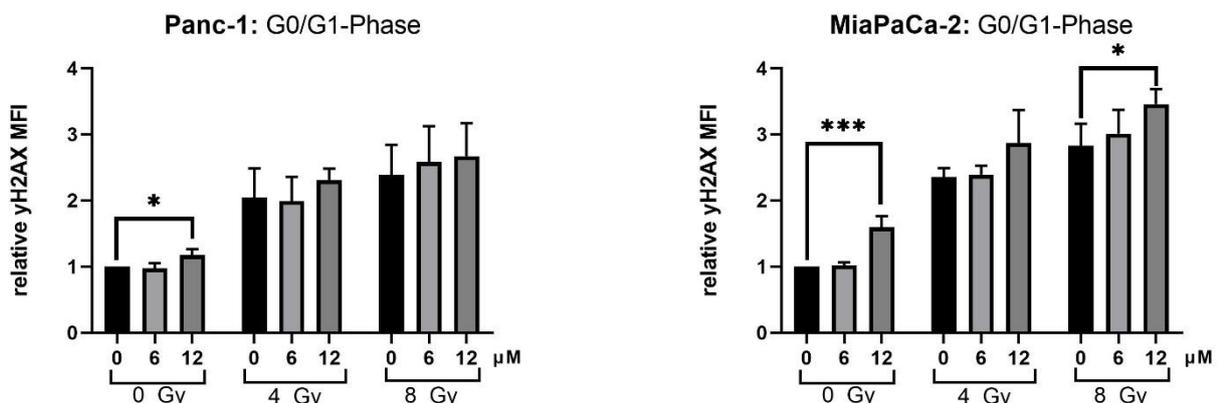


Abbildung 34: Relative yH2AX MFI bezogen auf Zellen in der G0/G1-Phase bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

Panc-1 Zellen in der S-Phase wiesen nach einer 24-stündigen Inkubation mit 12 μM Curcumin sowohl in der unbestrahlten ($p= 0,0454$) als auch in der mit 4 Gy ($p= 0,0257$) exponierten Versuchsgruppe eine signifikant höhere relative Fluoreszenzintensität auf.

Nach Inkubation mit 12 μM zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der S-Phase ($p< 0,0001$) in der nicht bestrahlten Gruppe bei MiaPaCa-2 Zellen sowie gegenüber der mit 6 μM behandelten Gruppe ($p= 0,0004$). In den weiteren getesteten Kombinationen zeigte lediglich bei 4 Gy eine Behandlung mit 12 μM gegenüber der Behandlung mit 6 μM einen signifikanten Unterschied ($p= 0,0268$).

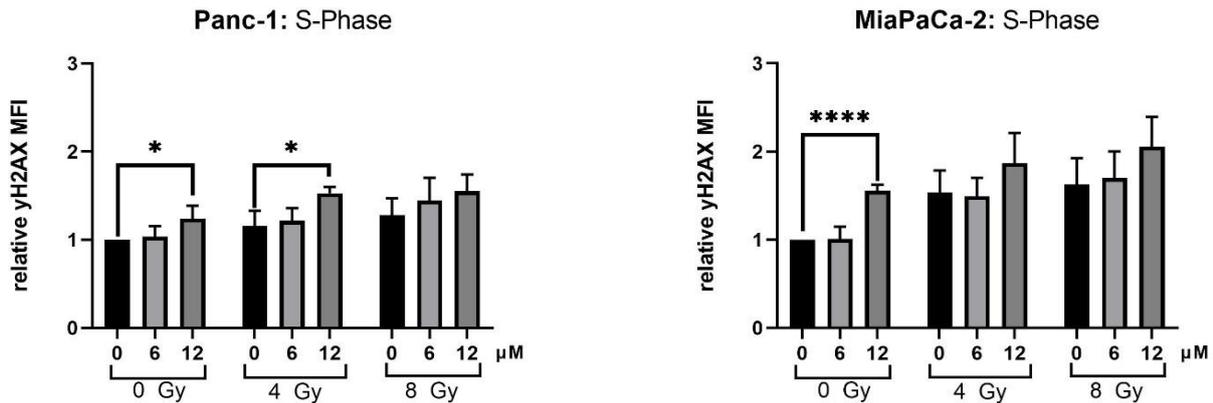


Abbildung 35: Relative yH2AX MFI der Zellen in der S-Phase bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

In der Gruppe der Panc-1 Zellen in der G2/M-Phase zeigte sich eine Kombination von 4 Gy mit 12 μM Curcumin auch hier sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch zur 6 μM behandelten Gruppe statistisch signifikant unterschiedlich. Zudem stellte sich ein signifikanter Unterschied nach Bestrahlung mit 8 Gy Strahlendosis zwischen der unbehandelten und der mit 12 μM Curcumin-behandelten Gruppe dar.

Bei MiaPaCa-2 Zellen in der G2/M-Phase erwies sich die relative MFI jeder Kombination mit 12 μM gegenüber der nicht-Curcumin-behandelten Kontrolle sowie der mit 6 μM Curcumin behandelten Gruppe als statistisch signifikant höher.

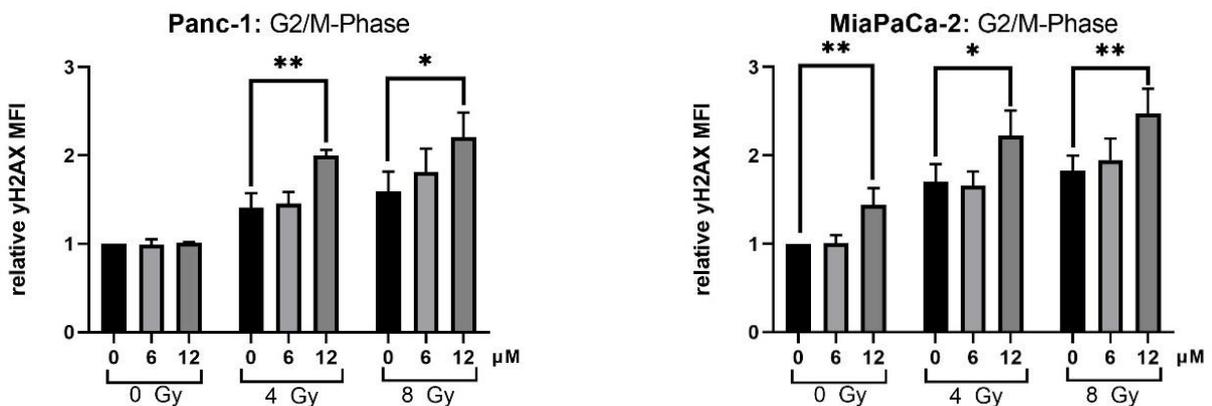


Abbildung 36: Relative yH2AX MFI der Zellen in der G2/M-Phase bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

Die Behandlung mit 12 μM Curcumin führte in beiden Zelllinien in Zellen der G0/G1- bzw. der S-Phase auch ohne Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg der relativen γH2AX -MFI. Zellen dieser Zellzyklusphasen zeigten auch nach kombinierter Behandlung tendenziell einen Anstieg der MFI, dieser ist aber nur in zwei Behandlungsgruppen signifikant.

Dagegen bewirkte die Kombination aus Bestrahlung mit 12 μM Curcumin in Zellen beider Zelllinien der G2/M-Phase, der bekanntlich strahlensensibelsten Zellzyklus-Phase, eine signifikante Erhöhung der MFI, was auf eine zusätzliche Sensitivierung der Zellen auf die Bestrahlung und vermehrte DNA-Schäden hindeutet.

Auch in diesen Versuchen führte eine Behandlung mit 6 μM zu keinem signifikanten Effekt.

Panc-1	0- 6 μM	0 - 12 μM	6 - 12 μM
0 Gy	ns	ns	ns
4 Gy	ns	0,0044	0,0028
8 Gy	ns	0,0401	ns

MiaPaCa-2	0 - 6 μM	0 - 12 μM	6 - 12 μM
0 Gy	ns	0,0037	0,0064
4 Gy	ns	0,0229	0,0129
8 Gy	ns	0,0073	0,0289

Tabelle 37: Signifikanzen der kombinierten Behandlung bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts) der G2/M-Phase

4.5.2 γH2AX -positive Zellen

Zur weiteren Analyse wurde nicht nur die MFI als Parameter für die DNA-Schädigung, sondern auch der Anteil der γH2AX -positiven Zellen ausgewertet.

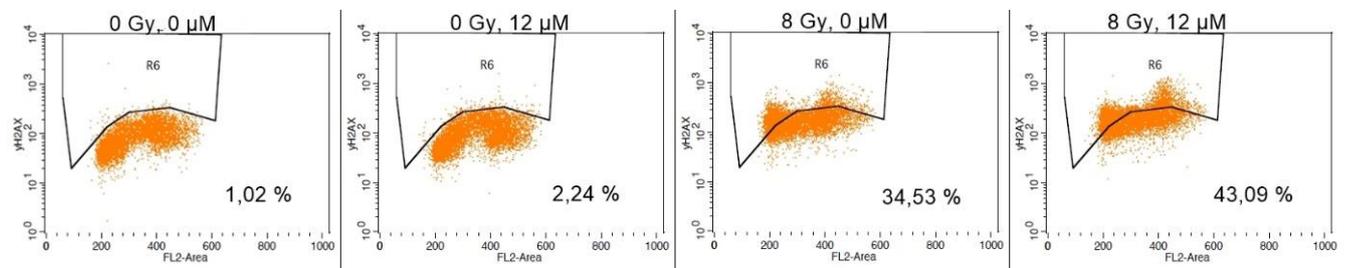


Abbildung 37: Exemplarische Darstellung der Auswertung der γH2AX -positiven Zellen am FACS, hier bei Panc-1 Anpassung der Fläche R6 anhand der Referenz (0 Gy, 0 μM) in jeweiligen Versuch

Eine Bestrahlung von Panc-1 Zellen mit 4 bzw. 8 Gy zeigte im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle eine signifikante Erhöhung der γH2AX -positiven Zellen. Eine Strahlendosis von 8 Gy wies auch verglichen mit der mit 4 Gy bestrahlten Gruppe eine höhere Anzahl an Zellen mit γH2AX -Fluoreszenz auf. Auch bei MiaPaCa-2 Zellen stieg der Anteil γH2AX -positiver Zellen signifikant an. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 und Tabelle 38 zusammengefasst.

	0-4 Gy	0-8 Gy	4-8 Gy
Panc-1	$p < 0,0001$	$p = 0,0005$	$p = 0,0054$
MiaPaCa-2	$p = 0,0002$	$p < 0,0001$	$p = 0,0160$

Tabelle 38: Signifikanzen des Anstiegs der γH2AX -positiven Zellen nach Bestrahlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen

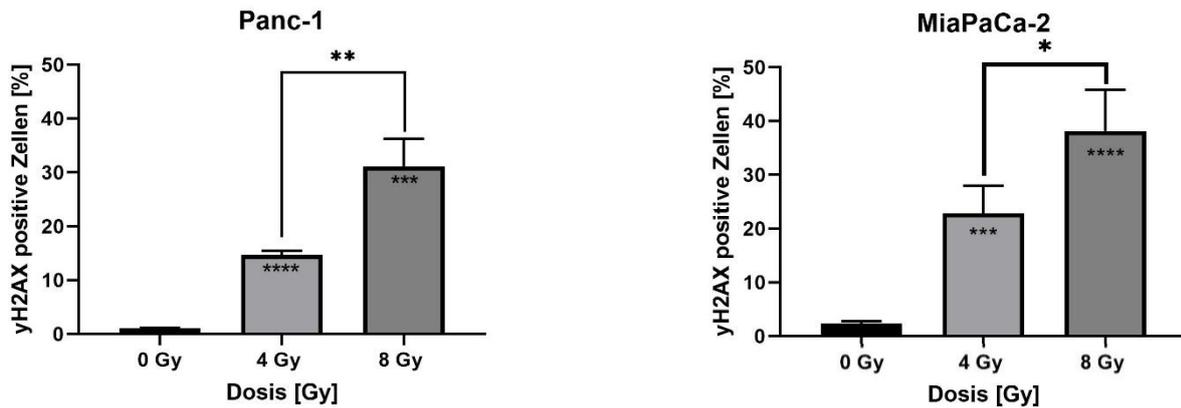


Abbildung 38: Anteil yH2AX-positiver Zellen nach Bestrahlung bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

Die Zugabe von Curcumin ohne zusätzliche Bestrahlung führte zu keiner signifikanten Erhöhung der yH2AX-positiven Zellpopulation. Innerhalb der mit 8 Gy bestrahlten Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Curcumin-Konzentrationen gezeigt werden.

Die Kombinationsbehandlungen mit 4 Gy und den verschiedenen Curcumin-Konzentrationen zeigten im Gegensatz dazu einen signifikanten Unterschied zwischen der mit 12 μM behandelten Population sowohl gegenüber der unbehandelten (0 μM , $p=0,019$), als auch gegenüber der mit 6 μM ($p=0,0194$) behandelten Gruppe.

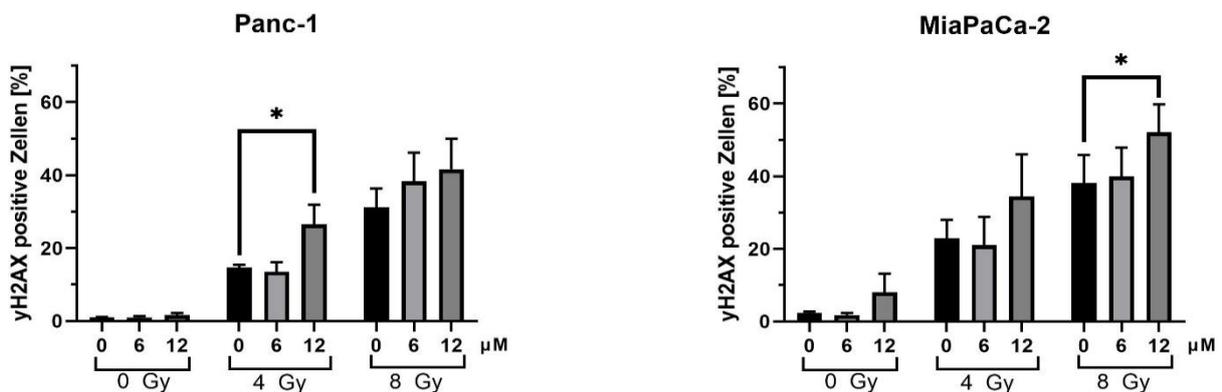


Abbildung 39: Anteil der yH2AX-positiven Zellen bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

Im direkten Vergleich der Zelllinien wiesen MiaPaCa-2 Zellen nach Behandlung insgesamt einen höheren Anteil yH2AX-positiver Zellen auf. Diese Erhöhung erwies sich aber nur nach Bestrahlung mit 4 Gy ohne Curcumin-Behandlung als statistisch signifikant ($p=0,0447$).

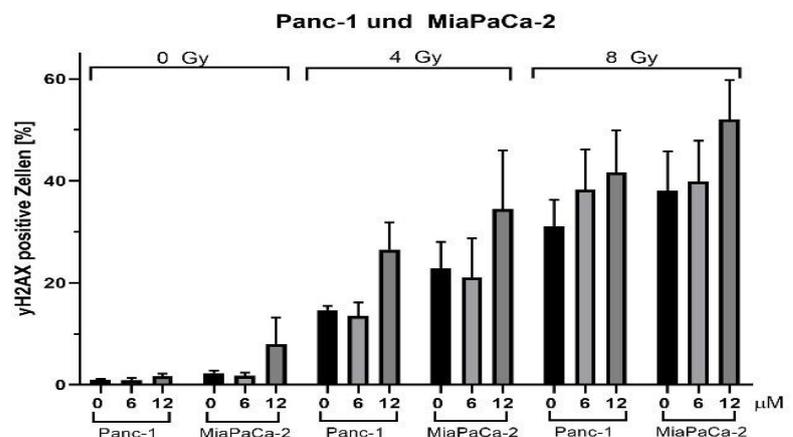


Abbildung 40: Vergleich des Anteils yH2AX-positiver Zellen zwischen den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 nach kombinierter Behandlung

4.5.3 Zellzyklus

Durch Anwendung der Doppelfärbung bestehend aus Antikörpern gegen γ H2AX in Kombination mit der Färbung der Zellzyklusphasen durch PI konnten neben der Auswertung der Doppelstrangbrüche (γ H2AX) auch Veränderungen der Verteilung im Zellzyklus betrachtet werden.

Nach 24-stündiger Inkubation mit Curcumin zeigte sich ohne Bestrahlung bei Panc-1 Zellen eine signifikante Erhöhung der Zellen in der G2-M-Phase ($p = 0,0337$) sowie eine signifikante Erniedrigung der Zellen in der G1-Phase ($p = 0,0272$).

Nach Bestrahlung mit 4 bzw. 8 Gy Strahlendosis zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Zellzyklusphasen zum gewählten Messzeitpunkt.

Bei MiaPaCa-2 Zellen konnte zu diesem Messzeitpunkt keine signifikante Veränderung in der der Verteilung der Zellzyklusphasen festgestellt werden.

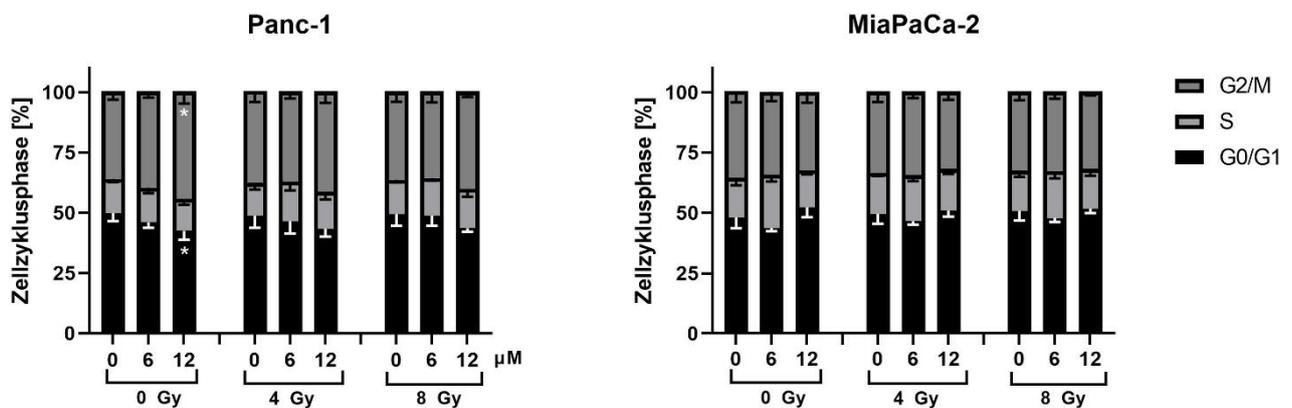


Abbildung 41: Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen zum Zeitpunkt der Bestrahlung bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts); Signifikanzen sind mittels Sternchen dargestellt

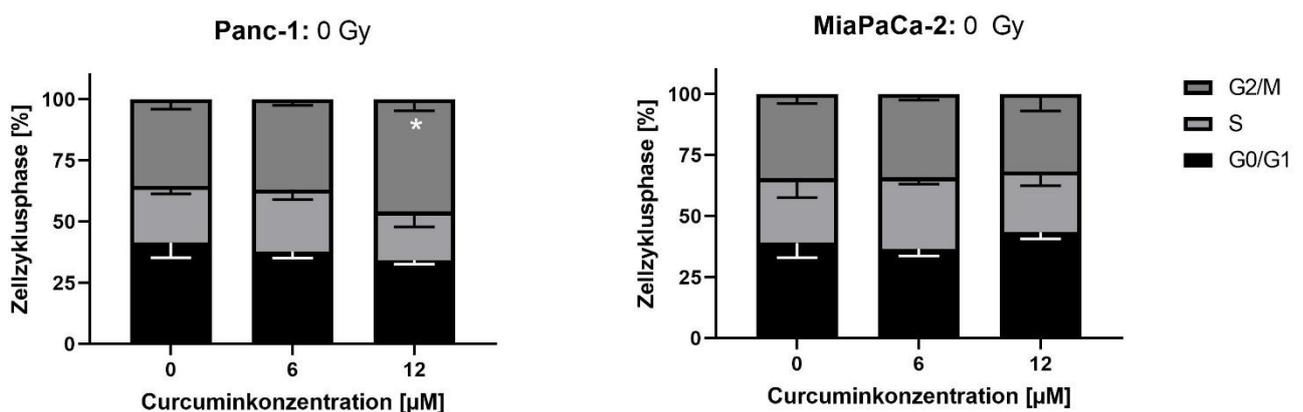


Abbildung 42: Auswertung der Zellzyklusphasen-Verteilung in der Software ModFit bei unbestrahlten Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)

Zur Bestätigung des signifikanten G2-M-Arrests in der Zellzyklus-Auswertung mit der Software CellQuest Pro wurden die Rohdaten der unbestrahlten Kontrollen zusätzlich mit der Software ModFit analog der Zellzyklus-Analyse 24 Stunden nach Bestrahlung (siehe 4.5) ausgewertet. Die Auswertung ist in Abbildung 43 exemplarisch dargestellt. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der

Zellen in der G2/M-Phase nach 24-stündiger Inkubation mit Curcumin ($p=0,0149$) in den Panc-1 Zellen, während die MiaPaCa-2 Zellen keinen signifikanten Unterschied aufwiesen.

Diese Erhöhung der G2/M-Fraktion nach Curcumin-Behandlung von Panc-1 Zellen könnte eine mögliche Ursache für die im CFA nachgewiesene Radiosensitivierung der Zellen sein, da Zellen in der G2/M-Phase am empfindlichsten auf Bestrahlung reagieren.

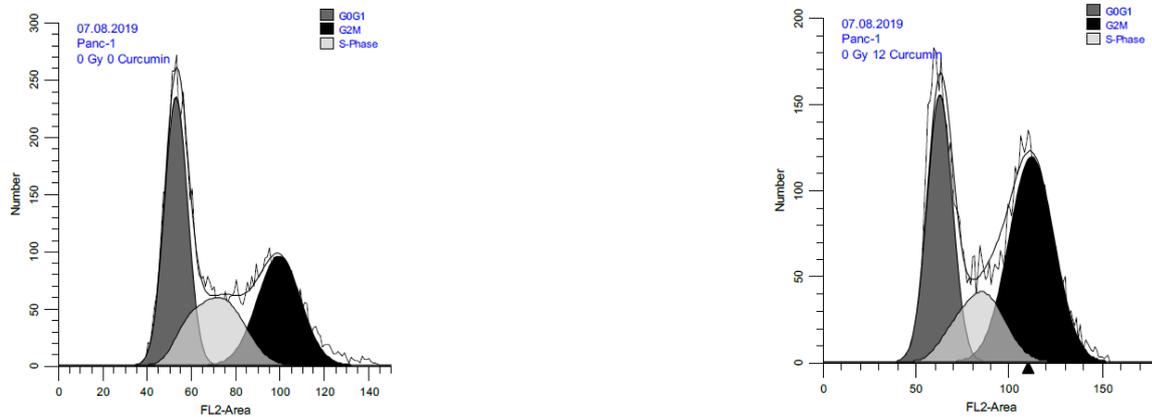


Abbildung 43: Exemplarische Darstellung der höheren G2/M-Fraktion nach 24 Stunden-Inkubation mit Curcumin bei Panc-1 Zellen in der ModFit Software

4.6 Zellzyklusphasen

4.6.1 Bestrahlungseffekt

Die Auswertung der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen in der ModFit-Software ist in Abbildung 44 exemplarisch dargestellt.



Abbildung 44: Exemplarische Darstellung der Zellzyklusphasen in der Auswertung bei Panc-1 Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung

Nach Bestrahlung mit 4 bzw. 8 Gy zeigten sowohl Panc-1 als auch MiaPaCa-2 Zellen eine signifikante Steigerung des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase verglichen mit der nicht bestrahlten Kontrolle. Auch zwischen einer Bestrahlung mit 4 Gy und einer Dosis von 8 Gy erwies sich die weitere Steigerung des G2/M-Anteils als signifikant.

Parallel zur erhöhten G2/M-Fraktion nahm bei Panc-1 Zellen der Zellanteil in der S-Phase durch Bestrahlung mit 4 bzw. 8 Gy signifikant ab. Bei MiaPaCa-2 Zellen war der Unterschied des Zellanteils in der S-Phase nicht signifikant.

Eine signifikante Reduktion der Zellen in der G0/G1-Phase zeigte sich bei Panc-1 Zellen erst nach einer Strahlendosis von 8 Gy, wohingegen sich bei MiaPaCa-2 Zellen sowohl nach 4 Gy als auch nach 8 Gy eine signifikante Abnahme der prozentualen Anteile zeigte (Abbildung 45, Tabelle 39).

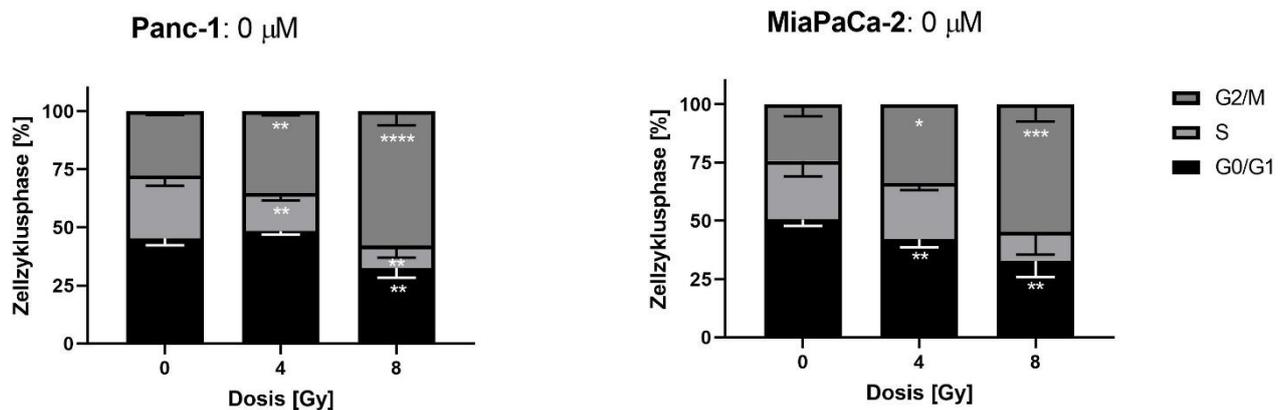


Abbildung 45: Veränderung der Zellanteile in den jeweiligen Zellzyklusphasen 24 Stunden nach Bestrahlung bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts).

Panc-1									
	G0/G1-Phase			S-Phase			G2/M-Phase		
[Gy]	0- 4	0-8	4-8	0-4	0-8	4-8	0-4	0-8	4-8
0 µM	ns	0,0023	0,0003	0,0085	0,0023	ns	0,0010	<0,0001	0,0004
MiaPaCa-2									
[Gy]	0- 4	0-8	4-8	0-4	0-8	4-8	0-4	0-8	4-8
	0,0090	0,0031	ns	ns	ns	ns	0,0113	0,0005	0,0013

Tabelle 39: Signifikanzen zwischen den verwendeten Bestrahlungsdosen bei den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2

4.6.2 Curcumin-Effekt

Weiterhin wurde die Veränderung der Anteile der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen durch die Behandlung mit Curcumin in den Konzentrationen 0, 6 oder 12 µM ohne zusätzliche Bestrahlung untersucht. Hierbei zeigte sich in beiden Zelllinien nach 48 Stunden (24 Stunden Inkubation mit Curcumin, danach 24 Stunden Curcumin-freies Medium) ein signifikanter Anstieg der G2/M-Fraktion ($p=0,0021$ bei Panc-1 bzw. $p=0,0045$ bei MiaPaCa-2) sowie eine signifikante Reduktion der G0/G1-Fraktion ($p=0,0092$ bei Panc-1 bzw. $p=0,0020$ bei MiaPaCa-2).

Eine alleinige Behandlung mit Curcumin in der Konzentration von 6 µM führte zu keiner signifikanten Veränderung in der Verteilung der Zellzyklusphasen.

4.6.3 Kombinationseffekt

4.6.3.1 Panc-1

Die gleichzeitige Behandlung mit Bestrahlung und Curcumin führte bei Panc-1 Zellen in der Kombination aus 4 Gy und einer Curcumin-Konzentration von 12 μM zu einer signifikanten Steigerung der G2/M-Fraktion ($p= 0,0034$) sowie zur Reduktion der G0/G1-Fraktion ($p= 0,0013$). Nach Inkubation mit 6 μM Curcumin zeigte sich bei 4 Gy keine signifikante Änderung der Verteilung der Zellzyklusphasen.

Eine Kombinationsbehandlung mit einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy resultierte weder bei Zugabe von 6 μM noch bei 12 μM in einem signifikanten Unterschied zur Vergleichsgruppe mit 8 Gy und 0 μM Curcumin.

4.6.3.2 MiaPaCa-2

Durch die Kombination von 4 Gy mit 12 μM Curcumin stieg der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase bei der Zelllinie MiaPaCa-2 signifikant an. Parallel dazu wurde eine signifikante Reduktion des Anteils der Zellen in der S-Phase beobachtet. Im Gegensatz zu den Panc-1 Zellen zeigte sich auch bei Behandlung mit 8 Gy und 12 μM Curcumin eine signifikante Steigerung der G2/M-Fraktion verglichen mit der nicht-Curcumin-behandelten Kontrolle. Zudem konnte in der Kombination aus 8 Gy mit 12 μM Curcumin ein signifikant niedriger G0/G1-Anteil festgestellt werden (Tabelle 40).

Panc-1										
	G0/G1-Phase			S-Phase			G2/M-Phase			
[Gy]	0- 6	0-12	6-12	0-6	0-12	6-12	0-6	0-12	6-12	[μM]
0	ns	0,0092	0,0133	ns	ns	ns	ns	0,0021	0,0070	
4	0,0051	0,0059	ns	0,0399	ns	0,0099	ns	0,0034	0,0051	
8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
MiaPaCa-2										
[Gy]	0- 6	0-12	6-12	0-6	0-12	6-12	0-6	0-12	6-12	[μM]
0	ns	0,0020	0,0026	ns	ns	ns	ns	0,0045	0,0020	
4	ns	ns	0,0379	ns	0,0475	ns	ns	0,0065	ns	
8	ns	0,0028	0,0030	ns	ns	ns	ns	0,0019	0,0029	

Tabelle 40: Signifikanzen im Vergleich der Zellzyklusphasenverteilung nach kombinierter Behandlung bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen

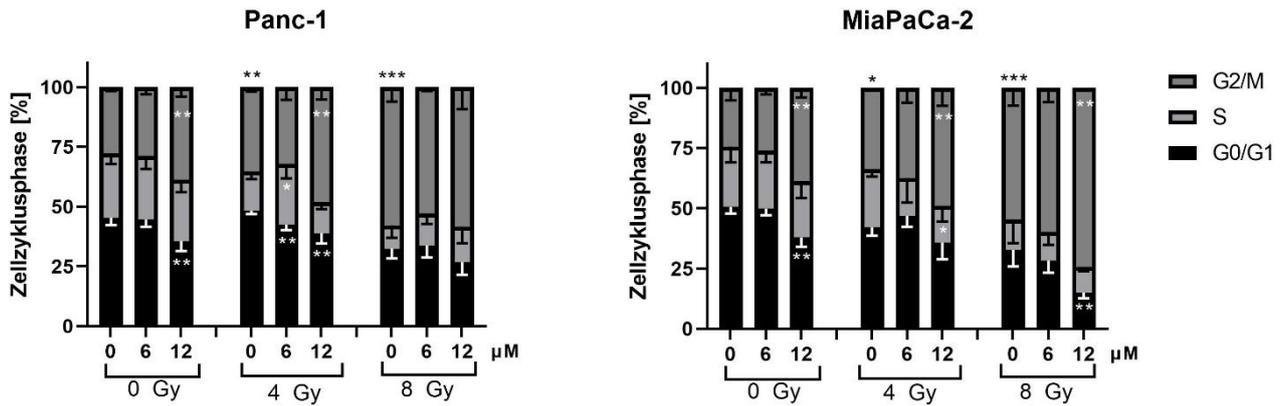


Abbildung 46: Verteilung der Zellzyklusphasen nach kombinierter Behandlung bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts); Sterne innerhalb der Balken stellen Signifikanzen zur jeweils nicht Curcumin-behandelten Gruppe dar, Sterne oberhalb der Balken stellen Signifikanzen G2/M-Arrest nach Bestrahlung dar.

4.6.4 Vergleich der Zelllinien

4.6.4.1 Bestrahlung

Im Vergleich ist zwischen den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 bei Bestrahlung mit 4 oder 8 Gy kein signifikanter Unterschied im Anstieg der G2/M- Fraktion feststellbar. Bei Bestrahlung mit 4 Gy weist die Zelllinie MiaPaCa-2 im Gegensatz zu Panc-1 einen signifikant höheren Anteil an Zellen in der S-Phase ($p= 0,0136$) sowie einen signifikant niedrigeren Anteil in der G0/G1-Phase ($p= 0,0164$) auf.

4.6.4.2 Curcumin-Zugabe

Nach Behandlung mit 12 µM Curcumin ist ohne Bestrahlung kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien zu beobachten. Die MiaPaCa-2 Zelllinie weist in der unbestrahlten, mit 6 µM Curcumin behandelten Gruppe im Vergleich zu Panc-1 Zellen einen signifikant höheren Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase auf. Dieser signifikante Unterschied zeigt sich jedoch auch in der komplett unbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy, 0 µM).

4.6.4.3 Kombinationsbehandlung

Die Behandlung mit 8 Gy und 12 µM Curcumin führte bei MiaPaCa-2 Zellen zu einem signifikant höheren Anteil an Zellen in der G2/M-Phase ($p= 0,0134$) sowie zu einer signifikant niedrigeren G0/G1-Fraktion ($p= 0,0072$) als bei Panc-1 Zellen (Abbildung 47).

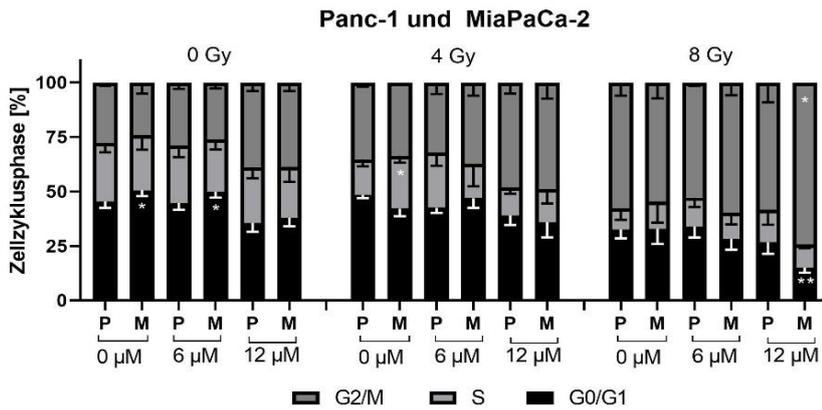


Abbildung 47: Vergleich der Zellzyklusverteilung nach kombinierter Behandlung zwischen den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2

In beiden Zelllinien, ausgenommen der mit 8 Gy bestrahlten Panc-1 Zellen, stieg die G2/M-Fraktion nach Behandlung mit 12 μM zusätzlich zum bestrahlungsinduzierten G2/M-Arrest an. Zur Abschätzung, ob dieser Anstieg aus einem additiven Curcumin-Effekt oder aus einer überadditiven Wirkung resultiert, wurden für beide Zelllinien sowohl die Differenz als auch das Verhältnis zwischen der Curcumin-behandelten und der unbehandelten Kontrolle bei der jeweiligen Bestrahlungsdosis betrachtet. Der für einen durch die Kombination bedingten überadditiven Effekt erwartete Anstieg der Differenz bzw. des Verhältnisses konnte nicht gezeigt werden. Dadurch ist der durch 12 μM Curcumin bedingte G2/M-Arrest eher als additiv zu betrachten und beruht in diesem Fall eher nicht auf einer Verstärkung der Strahlenwirkung (Tabelle 41).

G2/M-Fraktion	Panc-1		MiaPaCa-2	
	Differenz	Ratio	Differenz	Ratio
0 vs. 12 μM				
0 Gy	11,12	1,40	14,38	1,59
4 Gy	12,94	1,37	15,29	1,45
8 Gy	0,50	1,00	19,60	1,35

Tabelle 41: Differenz bzw. das Verhältnis des G2/M-Arrests durch die Behandlung mit 12 μM bei Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen

5. Diskussion

5.1 Strahlentherapie beim Pankreaskarzinom

Der Einsatz der Strahlentherapie beim PDAC wird in aktuellen Leitlinien nur für bestimmte Erkrankungsstadien in individuellen Konzepten sowie in Rahmen von klinischen Studien empfohlen. Hohe Toxizität durch die intraabdominelle Lage der Bauchspeicheldrüse limitieren die applizierbare Bestrahlungsdosis und die charakteristisch hohe Strahlenresistenz dieser Tumorentität vermindert die Wirksamkeit der Therapie. Neuere Bestrahlungskonzepte wie die SBRT ermöglichen durch genauere Dosisapplikation höhere Strahlendosen ohne zusätzlichen Anstieg der Toxizität (Chung et al. 2017). Die Kombination von SBRT mit Chemotherapie im neoadjuvanten Setting bei primär nicht resektablem Pankreaskarzinom führte in einer Studie neben einer höheren Rate an R0-Resektionen auch zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens verglichen mit alleiniger Chemotherapie (Jiang et al. 2019). Auch weitere, neue Verfahren wie intensitätsmodulierte Strahlentherapie oder intraoperative Bestrahlungen werden in laufenden Studien evaluiert und liefern vielversprechende Ergebnisse (Dobiasch et al. 2018). Neben der neoadjuvanten Anwendung wird die Strahlentherapie im Rahmen von Studien auch zunehmend in verschiedenen Konzepten zum Beispiel zur lokalen Tumorkontrolle und Symptombekämpfung eingesetzt. Um parallel zu diesen technischen Entwicklungen auch die biologische Wirksamkeit der Strahlentherapie beim Pankreaskarzinom zu erhöhen, werden verschiedene Substanzen als Kombinationspartner in Studien untersucht. Beispiele sind hier zum einen Medikamente wie COX-Inhibitoren (Rich und Shepard 2003), Metformin (Fasih et al. 2014) oder PD-L1-Inhibitoren (Azad et al. 2017), zum anderen aber auch Nahrungsergänzungsmittel wie Vitamin C (Du et al. 2015), Moringa Extrakt (Hagoel et al. 2019) oder Curcumin (Veeraraghavan et al. 2011). Für Letztgenanntes wird neben der Sensitivierung von Tumorzellen auch eine Protektion gesunden Gewebes gegenüber der Bestrahlung vermutet (Verma 2016).

5.2 Curcumin

5.2.1 Anwendung und Lösungsverhalten

Das in dieser Arbeit verwendete Curcumin wurde als aufgereinigtes Pulver für die Versuche stets frisch gelöst. Zur Lösung des stark hydrophoben Polyphenols eignet sich neben lipophilen Substanzen oder einer stark alkalischen Lösung insbesondere das zytotoxisch wirksame DMSO. Nachdem es in vielen Vorversuchen nach initialer Lösung des Farbstoffs zur erneuten Ausfällung nach Verdünnung kam, konnte die im Methoden-Teil beschriebene Verdünnungsreihe etabliert werden. Wie auch in anderen *in vitro* Studien mit Curcumin wurde zunächst eine höher konzentrierte Curcumin-Lösung in reinem DMSO als sogenannte „stock solution“ angesetzt. Diese hatte in der oben dargestellten Verdünnungsreihe 50 mM, bei Veeraraghavan et al. betrug sie beispielsweise sogar 500 mM, wodurch in deren Untersuchungen die Endkonzentration von DMSO nach Zugabe der

stock solution in das Zellkulturmedium bei weniger als 0,00004% lag (Veeraraghavan et al. 2011). Diverse andere Studien an Pankreaskarzinomzellen verwendeten ähnliche Verdünnungsreihen mit teilweise aber höheren Endkonzentrationen von DMSO, in welchen bei Konzentrationen von weniger als 0,1 % DMSO kein Einfluss durch das Lösungsmittel beobachtet werden konnte (Sahu et al. 2009; Zhang et al. 2017). Die in dieser Arbeit verwendete Verdünnungsreihe führte zu einer maximalen DMSO-Konzentration von 0,024% und zeigte im Alamar Blue Assay und in Vorversuchen des Koloniebildungs-Assays keine Wachstumshemmung. Diaz Osterman et al. konnten eine Aufnahme des Curcumins aus dem Nährmedium in die Zellen durch Fluoreszenzmessungen bestätigen (Díaz Osterman et al. 2016).

Durch die schlechte Löslichkeit von Curcumin in Wasser gibt es aktuell keine klinischen Studien zur intravenösen Anwendung. In der Homöopathie werden zur Lösung von Curcumin insbesondere Alkohol und Kolliphor, ein synthetischer Emulgator, eingesetzt. Auch DMSO wird hier zur Lösung verwendet.

Auch wenn die Konzentrationen von DMSO in den dargestellten *in vitro* Studien sehr niedrig waren und keinen Einfluss zeigten, steht die Notwendigkeit einer Verwendung von zytotoxischen Lösungsmitteln einer Translation zur breiten klinischen Anwendung im Weg.

5.2.2 Curcumin-Konzentration und Dosisabhängigkeit der Behandlung

Die gewählten Curcumin-Konzentrationen wurden nach Literaturrecherche und in Vorversuchen etabliert. Die Streubreite der verwendeten Curcumin-Konzentrationen in verschiedenen *in vitro* Studien differiert stark. So zeigten Chendil et al. bei Prostatakarzinomzellen bereits bei 2 bzw. 4 μM Curcumin wachstumshemmende und sogar radiosensitivierende Effekte, während sich bei Lymphom-Zellen signifikante Curcumin-Wirkungen erst ab einer Konzentration von 10 μM zeigten (Chendil et al. 2004, Qiao et al. 2013). Mit Pankreaskarzinomzellen durchgeführte *in vitro* Studien zeigten bei ähnlich hohen Konzentrationen (10-30 μM) Effekte auf Wachstum, Zellzyklus und Apoptose (Jingna Su et al. 2016; Zhang et al. 2017). Jutooru et al. verwendeten sogar Konzentrationen bis zu 50 μM (Jutooru et al. 2010). Zur Untersuchung einer Radiosensitivierung bei Pankreaskarzinomzellen durch Curcumin verwendeten Veeraraghavan et al. eine Konzentration von lediglich 100 nM (Veeraraghavan et al. 2011). Zhao et al. stellten bei einer Konzentration von 20 μM den größten Effekt auf die Wachstumshemmung von Panc-1 Zellen fest (Zhao et al. 2015). Da in der vorliegenden Arbeit der CFA als Goldstandard zur Auswertung von Radiosensitivierung zur Untersuchung des Wachstums und des Zellüberlebens angewandt wurde, war die Anwendung höherer Konzentrationen von Curcumin durch die Definition einer Kolonie mit mehr als 50 Zellen limitiert. Da bei Konzentrationen im nM-Bereich in ersten CFAs kein sichtbarer Effekt beobachtet werden konnte und sich über einer Konzentration von 12 μM die Fähigkeit zur Koloniebildung deutlich reduzierte,

wurden in dieser Arbeit Konzentrationen von 6, 10 bzw. 12 μM für die Koloniebildung und den Proliferations-Assay sowie für die weiteren Methoden lediglich 6 bzw. 12 μM verwendet.

5.2.3 Einfluss von Curcumin auf Wachstum und Zellmorphologie

Curcumin zeigte hemmende Einflüsse auf die Proliferation und auf das Zellüberleben der verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 mit negativer Korrelation zwischen Zellüberleben und Curcumin-Konzentration.

Youns und Fathy stellten in Versuchen zu Curcumin behandelten MiaPaCa-2 Zellen neben einer Dosis- auch eine Zeitabhängigkeit im Sulforhodamine B (SRB) Assay, einem farbstoffbasierten Assay zur Bestimmung von Zytotoxizität, fest. Nach 24 Stunden zeigte sich nur eine geringe Reduktion der lebenden Zellpopulation, während sie nach 48 Stunden stark absank. Eine weitere Inkubation bis auf 72 Stunden führte zu keiner weiteren Abnahme. Gegensätzlich zur bestehenden Literatur konnte keine Zeitabhängigkeit der Proliferationshemmung bei der Zelllinie Panc-1 festgestellt werden.

Da die insgesamt schneller proliferierenden MiaPaCa-2 Zellen mit einer Verdopplungszeit von 16,4 Stunden (Panc-1 Zellen: 21,8 Stunden) in den Kontrollgruppen bereits nach 48 Stunden einen Wachstumsstopp erreichten, sind die erhobenen Ergebnisse zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden nicht verwertbar. Auch die gezeigte, signifikant höhere relative Proliferation nach 48 Stunden verglichen mit dem 24 Stunden-Wert könnte auf den erreichten Wachstumsstopp in der Kontrollgruppe zurückgeführt werden. Eine Darstellung und Auswertung der Zeitabhängigkeit war deshalb bei der Zelllinie MiaPaCa-2 nicht sinnvoll. Aufgrund der Ähnlichkeiten zum Wachstumsverhalten zu den Panc-1 Zellen in der 24 Stunden-Messung sowie dem sich den Versuchen anschließenden Koloniebildungs-Assay als Goldstandard zur Untersuchung des Zellüberlebens wurde von der Wiederholung des Versuches abgesehen.

Im CFA führte Curcumin auch ohne Bestrahlung in allen gemessenen Konzentrationen (6, 10, 12 μM) zu einer signifikanten Reduktion der Überlebensfraktion, wobei sich ebenfalls die bereits beschriebene Dosisabhängigkeit nachweisen ließ. Während bei 9,41 μM die Überlebensfraktion von Panc-1 Zellen auf 50% abnahm (IC_{50}), konnte durch die Zugabe von 12 μM das Überleben auf 21,1% gesenkt werden. Damit lag die im CFA errechnete IC_{50} nach 24-stündiger Inkubation in unseren Versuchen deutlich niedriger als die im XTT-Assay von Lev-Ari et al. erhobene IC_{50} von 25 μM für die Zelllinie Panc-1 nach 72-stündiger Inkubation (Lev-Ari et al. 2006). Da der Anteil lebender Zellen im XTT-Assay auf der Messung eines orange-gelben Formazan-Farbstoffs beruht und Lev-Ari et al. die Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm durchführten, könnte sich die höhere IC_{50} durch Interaktion des Curcumins mit der Messung erklären lassen. Das Absorptionsmaximum von in DMSO gelöstem Curcumin bei 435 nm könnte zu einer falsch hohen Absorption und somit zu einem falsch hohen Anteil lebender Zellen geführt haben (Subhan et al. 2014). Vergleichbarer sind die

Ergebnisse von Liu et al. die im MTT-Assay, hier wurde ein violetter Farbstoff bei 570 nm gemessen, eine IC₅₀ von 9,87 µM für Panc-1 und 13,49 µM für MiaPaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation errechneten (Liu et al. 2020). Im Gegensatz zu Liu et al. zeigte sich im CFA die Zelllinie MiaPaCa-2 durch Curcumin geringfügig stärker im Wachstum gehemmt (IC₅₀=9,02 µM). Auch Bimonte et al. zeigten eine stärkere Wachstumshemmung von MiaPaCa-2 Zellen ebenfalls nach 48 Stunden im MTT-Assay verglichen mit Panc-1 Zellen (Bimonte et al. 2016).

Als bisher in der Literatur noch unberücksichtigter Parameter für die Curcumin-Wirkung wurde zusätzlich das MCV, bestehend aus Durchmesser und Dichte einer gewerteten Kolonie mit mehr als 50 Zellen, durch genaue Markierung der Kolonien erfasst. Eine Behandlung mit 10 oder 12 µM Curcumin führte bei beiden Zelllinien im CFA zu niedrigeren MCV. In der Lichtmikroskopie konnte nach Inkubation mit Curcumin eine dosisabhängige, niedrigere Konfluenz in der Zellkultur festgestellt werden, jedoch waren subjektiv keine Veränderungen in der Zell- bzw. Kernmorphologie bei den verwendeten Curcumin-Konzentrationen erkennbar. Bei Konzentrationen von 50 µM und höher konnten in Studien eine Schrumpfung der Zellen und eine schlechtere Zelladhäsion in der inversen Mikroskopie dargestellt werden, während der Effekt bei niedrigeren Konzentrationen (0-20 µM) nicht ersichtlich war (Liu et al. 2020, Díaz Osterman et al. 2016).

5.3 Humane Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2

5.3.1 Radiosensitivität der verwendeten Pankreaskarzinomzellen

Während das Ansprechen auf eine alleinige Curcumin-Behandlung bei beiden Zelllinien vergleichbar war, zeigten sich Panc-1 Zellen nach alleiniger Bestrahlung bei jeder verwendeten Strahlendosis als signifikant radioresistenter verglichen mit MiaPaCa-2 Zellen. Für eine Reduktion der SF auf 50% waren bei Panc-1 Zellen eine Strahlendosis von 3,31 Gy, während in der Zelllinie MiaPaCa-2 dazu nur 1,7 Gy notwendig. Die höhere Strahlenresistenz von Panc-1 Zellen wurde auch bereits in anderen Studien nachgewiesen (Morak et al. 2011).

5.3.2 Radiosensitivierung durch Curcumin

Eine Behandlung mit Curcumin zeigt Einflüsse auf eine Vielzahl von Signalwegen sowie auf zelluläre Funktionen wie z.B. die DNA-Reparatur, die mitochondriale Funktion oder die Integrität der Zellmembran (Kunnumakkara et al. 2017). Da die basale, aber auch die therapie-induzierte Überaktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB mit einer hohen Chemo- bzw. Strahlentherapie-Resistenz assoziiert ist, wird die Regulierung dieses Signalweges durch Curcumin als einer der Hauptmechanismen der Curcumin-Wirkung diskutiert (Brach et al. 1991, Li et al. 2004, Pramanik et al. 2018; Liu et al. 2018).

In vitro Experimente mit Lungen-, Prostata- und Speiseröhrenkrebszellen sowie Plattenepithel-Karzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches zeigten eine Radiosensitivierung und den Einfluss auf den EGFR- und NFκB-AKT-Signalweg durch Curcumin, verbunden mit einer niedrigeren Proliferationsrate und der Induktion von Apoptose (Jin et al. 2015; Cai et al. 2019; Chendil et al. 2004; Khafif et al. 2009; Liu et al. 2018).

Veeraraghavan et al. untersuchten sowohl die Curcumin-Wirkung als auch mögliche radiosensitivierende Effekte bei den Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, MiaPaCa-2 und BxPC-3. Hierbei wurde zum einen die Kombination von einer dreistündigen Inkubation mit 100 nM Curcumin mit einer Einzeldosis von 10 Gy, zum anderen 100 nM Curcumin in Kombination mit einer fraktionierten Bestrahlung mit fünf Dosen à 2 Gy durchgeführt. Die alleinige Bestrahlung, insbesondere im fraktionierten Regime, führte zur Erhöhung der Aktivität von NFκB in allen Zelllinien. Vor Bestrahlung mit Curcumin behandelte Zellen wiesen eine Suppression der basalen und der bestrahlungsinduzierten NFκB-Aktivierung auf, was zu einer Reduktion im Zellüberleben und einer im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten Apoptose-Aktivität führte. Anhand dieser Ergebnisse postulierten sie einen radiosensitivierenden Effekt, wobei in ihrer Studie kein CFA als Goldstandard zum Nachweis einer möglichen Radiosensitivierung, durchgeführt wurde (Veeraraghavan et al. 2011).

Im in der vorliegenden Arbeit angewandten CFA führte eine Kombination von Curcumin in den Konzentrationen von 10 bzw. 12 µM mit Bestrahlung bei beiden Zelllinien in der unkorrigierten Berechnung (Bezug zur nicht mit Curcumin behandelten Kontrolle bei 0 Gy) zu einer signifikant niedrigeren SF (Abbildung 15: Wirkung der Kombinationsbehandlung bei Panc-1 Zellen in unkorrigierter (A) und korrigierter (B) Berechnung der SF und Abbildung 17: Effekt der kombinierten Behandlung bei MiaPaCa-2 Zellen in der unkorrigierten (A) und korrigierten (B) Berechnung der SF). Bei 6 µM konnte kein nachweisbarer Effekt gezeigt werden. In der korrigierten Berechnung, in der sich ein radiosensitivierender Effekt darstellen lässt, fand sich interessanterweise bei den radioresistenteren Panc-1 Zellen eine signifikante Reduktion der SF, wohingegen sich die Reduktion der SF bei MiaPaCa-2 Zellen als rein additiv erwies. Die von Veeraraghavan et al. anhand der von ihnen generierten MTT-Assay-Daten vermutete radiosensitivierende Wirkung von Curcumin konnte nur für Panc-1 Zellen und auch nur bei 100-fach höherer Curcumin-Konzentration (10 µM im Gegensatz zu 100 nM) im CFA bestätigt werden.

5.3.3 COX-2 Expression und Apoptose-Induktion

Die Behandlung mit Curcumin wurde in *in vitro* Studien bei verschiedenen humanen PDAC-Zelllinien untersucht. Im Ansprechen auf eine Behandlung mit Curcumin wurden dabei zum Teil große Unterschiede gefunden. Beispielsweise war die Apoptose-Rate nach Behandlung mit 25 µM Curcumin in p34 Zellen fast fünffach höher als bei Panc-1 Zellen (23,4 % bzw. 5,1%) (Lev-Ari et al. 2006). Auch

BxPC-3 Zellen zeigten durch die Curcumin-Behandlung neben einer stärkeren Wachstumshemmung auch eine erhöhte Apoptose-Induktion als MiaPaCa-2 Zellen (Youns und Fathy 2013). Für das höhere Ansprechen von p34 bzw. BxPC-3 Zellen wird insbesondere eine höhere Expression von COX-2 in diesen Zelllinien angesehen. Der Zusammenhang zwischen der Wirkung von Curcumin und der Expression von COX-2 ist auch für andere Tumorentitäten beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei PDAC-Zelllinien untersucht, die beide eine ähnlich niedrige COX-2-Expression aufweisen. Durch alleinige Behandlung mit Curcumin zeigte sich bei keiner der verwendeten Zelllinien eine signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellen. Auch zwischen den Zelllinien konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

5.3.4 PI3-AKT-Signalweg und γ H2AX-MFI

Für Curcumin konnte eine hemmende Wirkung auf den PI3K-AKT-Signalweg für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen werden (Kunnumakkara et al. 2017). Jin et al. konnten beispielsweise beim kleinzelligen Lungenkarzinom *in vitro* eine signifikante Reduktion der PI3K-AKT-Proteinexpression durch Zugabe von 20 μ M Curcumin in Western Blot-Analysen darstellen (Jin et al. 2015). In Panc-1 Zellen präsentierte sich nach Inkubation mit 20 μ M Curcumin eine niedrigere Rate an phosphorylierten PI3- und AKT-Kinasen und eine niedrigere Aktivität dieses Signalweges, auch wenn die Expression der Kinasen insgesamt nicht reduziert war (Zhao et al. 2015). Fahy et al. konnten in Versuchen mit Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen eine höhere basale Aktivität des PI3K-AKT-Signalweges in MiaPaCa-2 Zellen zeigen und in weiteren Versuchen mit dieser Zelllinie durch gezielte Inhibition der PI3-Kinase bei der Zelllinie MiaPaCa-2 eine signifikante Reduktion der NF κ B-Aktivität und der BCL-2-Expression nachweisen (Fahy et al. 2003).

Da für die Phosphorylierung von Histon 2AX Kinasen (insbesondere der ATM-Kinase) verantwortlich sind, die hauptsächlich über den PI3-Signalweg aktiviert werden (Kuo und Yang 2008), könnte die höhere basale Aktivierung dieses Signalweges in MiaPaCa-2 Zellen ursächlich für die höhere relative mittlere Fluoreszenz-Intensität im Vergleich zu Panc-1 Zellen sein (Abbildung 32: Unkorrigierte Berechnung der relativen γ H2AX-MFI bei den Zelllinien Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 (rechts)).

5.4 Einflüsse der Bestrahlung und der Kombinationsbehandlung auf Apoptose, Zellzyklus und die Phosphorylierung von γ H2AX

In den weiteren Methoden war ebenfalls die Dosisabhängigkeit einer Curcumin-Behandlung zu beobachten. Alleinige Zugabe von 6 μ M Curcumin führte weder im CFA zu einer signifikant niedrigeren SF, noch konnte im Anschluss eine signifikante Apoptose-Induktion, ein G2/M-Arrest oder eine Erhöhung der γ H2AX-Fluoreszenzintensität gezeigt werden.

5.4.1 Kolonievolumen und Tumorgröße

Während unbestrahlte MiaPaCa-2 Zellen nach Curcumin-Therapie signifikant kleinere und weniger dichte Kolonien bildeten, näherten sich die Kolonievolumina der verschiedenen Curcumin-Konzentrationen mit Zunahme der Strahlendosis an und erreichten bei 8 Gy in allen Behandlungsgruppen ein sehr ähnliches Kolonievolumen. Dieser Endpunkt ist am ehesten durch die Definition einer Kolonie mit mehr als 50 Zellen bedingt und lässt sich durch die höhere Strahlenempfindlichkeit von MiaPaCa-2 erklären, da bei 8 Gy die Koloniegröße bereits durch die Bestrahlung auf ein Minimum reduziert wurde (Abbildung 19: Mittleres Kolonievolumen von MiaPaCa-2 Zellen). Die radioresistenteren Panc-1 Zellen zeigten ohne Bestrahlung auch niedrigere Kolonievolumina, die Kolonievolumina der verschiedenen Konzentrationen blieben jedoch auch mit steigender Bestrahlungsdosis weitgehend parallel und sogar bei einer Dosis von 8 Gy führte eine begleitende Curcuminbehandlung noch zu signifikant niedrigeren MCV (Abbildung 18: Mittleres Kolonievolumen von Panc-1 Zellen). Daher ist neben einer signifikanten Reduktion der Überlebensfraktion auch von einem additiven Effekt auf Koloniedurchmesser und -dichte durch eine begleitende Curcumin-Therapie auszugehen. Die reduzierte Fähigkeit zur Koloniebildung *in vitro* könnte übertragen auf eine *in vivo* Situation für eine geringere Tumorgröße und Metastasierung durch eine Behandlung mit Curcumin sprechen. Auch wenn für reines Curcumin eine derartige Wirkung bisher nur bei MiaPaCa-2 Zellen im Mausmodell gezeigt werden konnte (Bimonte et al. 2016), sprechen die vorliegenden Ergebnisse auch für einen nennenswerten Effekt bei den radioresistenteren Panc-1 Zellen.

5.4.2 DNA-Schäden

Die Hauptwirkung ionisierender Strahlen auf Tumorzellen ist bedingt durch die Erzeugung von DNA-Schäden in den bestrahlten Zellen. Zum einen werden durch die Energie der Strahlung direkt Schäden im Erbgut erzeugt, bei der Strahlentherapie sind dies insbesondere DNA-Doppelstrangbrüche, zum anderen entstehen durch die Bildung von Sauerstoff-Radikalen sekundär DNA-Schäden. Durch zelluläre Signalkaskaden, z.B. den PI3-AKT-Signalweg werden die DNA-Reparatur oder auch die Apoptose der Zelle eingeleitet. Da Tumorzellen durch wachstumsfördernde Mutationen häufig an Reparations-Fähigkeit verlieren, sind diese oft empfindlicher gegenüber der Strahlung als gesunde Zellen (Baskar et al. 2014). Curcumin zeigte in *in vitro* Studien einen hemmenden Einfluss auf die DNA-Reparatur (Sahu et al. 2009; Ogiwara et al. 2013).

Die Phosphorylierung von γ H2AX gilt als guter Marker für die durch Bestrahlung entstandenen Doppelstrangbrüche, weswegen diese als Marker für DNA-Schäden in den verwendeten PDAC-Zelllinien untersucht wurde (Morgan und Lawrence 2015).

Wie erwartet stieg die γ H2AX-MFI in beiden Zelllinien durch Bestrahlung mit 4 bzw. 8 Gy an. Eine Erhöhung der γ H2AX-MFI wurde in einigen Studien auch durch die alleinige Anwendung von Curcumin beschrieben. Beispielsweise zeigten Sahu et al. bei BxPC-3 Zellen einen Anstieg von phosphoryliertem γ H2AX nach Behandlung mit 2,5 μ M Curcumin (Sahu et al. 2009). Durch Zugabe von 6 μ M Curcumin konnte in der vorliegenden Arbeit bei den niedrig COX-2-exprimierenden Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 noch kein signifikanter Anstieg der γ H2AX-MFI beobachtet werden. Hingegen bei einer Konzentration von 12 μ M Curcumin zeigte sich in beiden Zelllinien eine signifikante Erhöhung der γ H2AX-Phosphorylierung (Abbildung 32: Unkorrigierte Berechnung der relativen γ H2AX-MFI bei den Zelllinien Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 (rechts)).

Zusätzliche Effekte einer Kombination aus Curcumin mit einer DNA-schädigenden Therapie, beispielsweise einer Strahlentherapie oder der Gabe bestimmter Chemotherapeutika wie Etoposid, konnten bei Leukämie-Zellen erreicht werden (Papież et al. 2016). In den PDAC-Zellen stieg die relative γ H2AX-MFI nach kombinierter Behandlung mit 12 μ M Curcumin und 4 bzw. 8 Gy. Passend zur Radiosensitivierung von Panc-1 Zellen im CFA zeigte sich in der korrigierten Rechenweise in dieser Zelllinie die Tendenz zu überadditiven Effekten auf die DNA-Schäden, während sich der Effekt bei MiaPaCa-2 Zellen als rein additiv darstellte (Abbildung 33: Korrigierte Berechnung der relativen γ H2AX-MFI bei Panc-1 (links) und MiaPaCa-2 Zellen (rechts)).

Wie auch in anderen Studien vermutet, sprechen die Ergebnisse für eine Verbesserung der Wirksamkeit der Strahlentherapie durch Curcumin in Konzentrationen von mindestens 12 μ M auf die verwendeten PDAC-Zellen durch eine Erhöhung der DNA-Schädigung bzw. eine Verringerung der DNA-Reparatur. Da sich der Unterschied zwischen Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen aber auch hier nicht signifikant zeigte, stellt auch dieser Mechanismus keine ausreichende Erklärung für die Unterschiede in der Radiosensitivierung im CFA dar.

5.4.3 Apoptose-Induktion

Durch zelluläre Signalwege erfolgt in den DNA-geschädigten Zellen die Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose. Durch Bestrahlung der Zellen wird insbesondere der intrinsische Weg (Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium) angestoßen, je nach Zelltyp und Strahlendosis wird die Apoptose aber auch über den extrinsischen (Todes-Rezeptor-vermittelte Caspase-Aktivierung) oder die Ceramid-Produktion in der Zellmembran (Membran-Stress-Signalweg) eingeleitet. Am Ende der jeweiligen Signalwege steht die Aktivierung der Procaspasen 3 und 7, welche als Proteinasen den Abbau verschiedener Zellbestandteile vermitteln (Maier et al. 2016). Zur Messung des Anteils der apoptotischen Zellen wurde deshalb eine Fluoreszenz-Färbung der Caspase-3/7-positiven Zellen durchgeführt. Weiterhin wurde die Menge nekrotischer Zellen durch Anfärbung mit einem weiteren Antikörper überprüft.

Es zeigte sich bei beiden Zelllinien 48 Stunden nach einer Bestrahlung mit 8 Gy ein signifikanter Anstieg der Caspase-3/7-positiven Zellen, während sich der Anteil lebender Zellen nicht signifikant veränderte. Alleinige Bestrahlung mit 4 Gy führte zu keinem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen (Abbildung 24: Anteil lebensfähiger (viable cells, links) und Caspase-3/7-positiver (rechts) Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen nach Bestrahlung).

Studien mit verschiedensten Tumorentitäten beschrieben eine gesteigerte Apoptose-Induktion durch die Anwendung von Curcumin. Auch bei Pankreaskarzinomzellen wurden Veränderungen in den verschiedenen Signalkaskaden der Apoptose durch Curcumin festgestellt. Youns und Fathy zeigten beispielsweise die Hochregulation des extrinsischen Weges der Apoptose, während Díaz Osterman et al. die Reduktion der Inhibitors of apoptosis (IAPs) beschrieben (Youns und Fathy 2013; Díaz Osterman et al. 2016).

Über den durchflusszytometrischen Nachweis von sub-G1-Zellen stellten Youns und Fathy einen Anstieg apoptotischer MiaPaCa-2 Zellen nach Behandlung mit 25 μM Curcumin fest, während sich eine Konzentration von 15 μM nach 24 Stunden noch nicht signifikant zeigte (Youns und Fathy 2013). In weiterführenden Genanalysen konnten sie eine Induktion pro-apoptotischer Gene, zum Beispiel Caspase-3 sowie eine Hemmung anti-apoptotischer Gene wie BCL-2 nachweisen. Insbesondere Gene des extrinsischen Apoptose-Weges zeigten sich nach Curcumin-Behandlung erhöht. Su et al. zeigten ähnliche Resultate für die Zelllinie Panc-1 nach 20 μM Curcumin (Su et al. 2016). Da in unseren Versuchen niedrigere Konzentrationen von Curcumin gewählt wurden, zeigte sich unter alleiniger Curcumin-Therapie sowohl mit 6 als auch mit 12 μM noch keine signifikante Apoptose-Induktion.

Entgegen der Erwartungen führte eine Inkubation von Panc-1 Zellen mit 6 μM Curcumin in unseren Experimenten zu einer Erhöhung der Fraktion lebender Zellen und zu einer niedrigeren Apoptose-Rate. Auch bei MiaPaCa-2 Zellen zeigten sich bei dieser Konzentration eine ähnliche Tendenz, welche sich aber aufgrund einer größeren Streuung der Messergebnisse als nicht signifikant erwies. Bei Youns und Fathy bedingte eine 24-stündige Behandlung mit 5 μM Curcumin ebenfalls eine Erhöhung der Fraktion lebender Zellen (Youns und Fathy 2013). Erklärbar wären diese Tendenzen durch einen wachstumsmodulierenden Einfluss ohne Apoptose-Induktion, beispielsweise einen Zellzyklus-Arrest, durch Curcumin, welcher durch einen Proliferationsstopp auch zu niedrigeren Apoptose-Raten zum Messzeitpunkt führt.

Alleinige Behandlung mit Curcumin in einer Konzentration von 12 μM führte in der vorliegenden Arbeit zwar zu einem erhöhten Anteil an Caspase 3/7-positiven Zellen, dieser zeigte sich aber erst nach Kombination mit 4 Gy (nur MiaPaCa-2 Zellen) bzw. 8 Gy (beide Zelllinien) als signifikant. Da der PI3-AKT-Signalweg auch in der Einleitung der Apoptose eine Rolle spielt, könnte die weiter oben beschriebene höhere basale Aktivierung dieses Signalweges bei der Zelllinie MiaPaCa-2 auch ursächlich für den Unterschied der Zelllinien bei einer Strahlendosis von 4 Gy sein (Zhao et al. 2015).

Entgegen der Hypothese von Veeraraghavan et al., dass eine gesteigerte Aktivierung der Apoptose Grund für die Radiosensitivierung der Pankreaskarzinomzellen sei, lieferten die vorliegenden Ergebnisse keine hinreichende Erklärung für die im CFA nachgewiesene Radiosensitivierung der Panc-1 Zellen.

5.4.4 Zellzyklus-Verteilung

Im Rahmen der Zellteilung durchläuft eine Zelle die verschiedenen Zellzyklusphasen: die G0/G1-Phase, die S-Phase (in dieser die Verdopplung des Erbgutes stattfindet) sowie die G2/M-Phase, nach welcher die eigentliche Teilung der Zelle erfolgt. Zwischen den Zellzyklus-Phasen liegen sogenannte „Checkpoints“, an welchen die Eignung der Zelle zum Übergang in die nächste Zellzyklusphase überprüft wird. Bestehen beispielsweise DNA-Schäden, so kommt es zu einem Arrest im Zellzyklus, um die Reparatur der DNA zu ermöglichen. Sind die Schäden irreparabel, wird der Zelltod eingeleitet. Da die Wirkung der Strahlentherapie auf der Erzeugung von DNA-Schäden beruht, führt eine Bestrahlung in einigen Zellen zum Zellzyklus-Arrest und der Aktivierung des Zelltodes über die sogenannte „mitotic catastrophe“. Besonders sensibel gegenüber einer Bestrahlung sind Zellen in der G2/M-Phase, da hier die Verdopplung der DNA bereits abgeschlossen ist (Pawlik und Keyomarsi 2004). Als „Wächter des Genoms“ spielt der Transkriptionsfaktor p53 eine wichtige Rolle in der Zellzyklus-Regulation. Tumorzellen mit p53-Wildtyp sind beispielsweise radiosensitiver als Zellen mit mutiertem p53 (McIlwrath et al. 1994). Beide hier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien weisen Mutationen im p53-Gen auf.

Wie auch in anderen Studien mit Panc-1 und MiaPaCa-2 Zellen erhöhte sich die Fraktion der Zellen in der G2/M-Phase nach Bestrahlung mit 4 und 8 Gy (Abbildung 45) (Naumann et al. 2017).

Für die Behandlung von PDAC-Zellen mit Curcumin sind sowohl ein Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase als auch verstärkende Einflüsse auf die Einleitung der „mitotic catastrophe“ beschrieben (Subramaniam et al. 2011; Su et al. 2016).

Während Lev-Ari et al. bei Panc-1 Zellen nach 72 Stunden Inkubation weder bei 10 μM noch bei 25 μM einen signifikanten G2/M-Arrest nachweisen konnten und Zhu und Bu erst mit wesentlich höheren Konzentrationen (40 $\mu\text{g/ml} \approx 109 \mu\text{M}$) bei Panc-1 Zellen einen signifikanten G2/M-Arrest erreichten, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die G2/M-Fraktion in beiden Zelllinien 24 Stunden nach 24-stündiger Inkubation mit 12 μM Curcumin signifikant erhöht (Abbildung 46, Abbildung 47) (Zhu und Bu 2017; Lev-Ari et al. 2007). Passend dazu konnten Su et al. bei ähnlichen Konzentrationen einen signifikanten G2/M-Arrest nachweisen (Su et al. 2016). Da bei Zhu und Bu auch bei niedrigeren Konzentrationen ein Anstieg der G2/M-Fraktion erkennbar war, sich jedoch statistisch nicht signifikant zeigte, könnte eine mögliche Erklärung in einer größeren Streuung der Messergebnisse liegen (Zhu und Bu 2017). Da Lev-Ari et al. als einzige Studie einen späteren Messzeitpunkt und eine

längere Inkubationszeit mit Curcumin gewählt hatten, ist die Vergleichbarkeit mit deren Ergebnissen limitiert (Lev-Ari et al. 2007).

Nach kombinierter Behandlung von Panc-1 Zellen ließ sich nur bei 4 Gy mit 12 μM Curcumin ein signifikanter G2/M-Arrest 24 Stunden nach Bestrahlung nachweisen. Dagegen konnte bei MiaPaCa-2 Zellen in allen Kombinationen eine signifikante Erhöhung der G2/M-Fraktion durch Behandlung mit 12 μM beobachtet werden.

Nachdem die Untersuchung der Zellzyklus-Verteilung weiterhin keinen Anhaltspunkt für die im CFA nachgewiesene Radiosensitivierung der Panc-1 Zellen lieferte, wurde parallel zur Messung der $\gamma\text{H2AX-MFI}$ eine weitere Zellzyklus-Analyse durchgeführt. In der Messung etwa 30 Minuten nach Bestrahlung zeigten Panc-1 Zellen im Gegensatz zu MiaPaCa-2 Zellen einen signifikant größeren Anteil an Zellen in der G2/M-Fraktion verglichen mit der nicht-Curcumin-behandelten Kontrolle (Abbildung 41). Dieser G2/M-Arrest in Panc-1 Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung könnte aufgrund der höheren Sensibilität der Zellen in dieser Zellzyklusphase ursächlich für die Radiosensitivierung im CFA sein.

5.5 Mögliche Konsequenzen und Zukunftsperspektiven

Die phytotherapeutische Behandlung von Krebszellen verschiedenster Tumorentitäten mit Curcumin zeigt *in vitro* regulierende bzw. hemmende Einflüsse auf eine Vielzahl von Signalwegen, die unter anderem für Tumorwachstum, Apoptose-Hemmung und DNA-Reparatur verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu scheint Curcumin auf normale duktale Epithelzellen des Pankreas keinen Einfluss zu nehmen (Sahu et al. 2009). *In vivo* Studien mit Mausmodellen konnten auch eine Verringerung des Tumorumfanges von Pankreaskarzinomen durch Curcumin-Behandlung bzw. eine Reduktion der Tumormasse von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs nach kombinierter Behandlung mit Curcumin und Bestrahlung zeigen (Bimonte et al. 2016; Khafif et al. 2009). Kleine Phase-I- bzw. Phase-II-Studien mit oralem Curcumin bei malignen Erkrankungen konnten bisher keine signifikanten Einflüsse auf das Tumorwachstum oder die Krankheitsprogression feststellen, auch wenn eine biologische Aktivität in einzelnen Patienten postuliert wird (Dhillon et al. 2008).

5.5.1 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung

Als Ursache für die geringe orale Wirksamkeit von Curcumin wird insbesondere die schlechte Bioverfügbarkeit und die schnelle Metabolisierung von Curcumin gesehen, da trotz hoher oraler Dosis nur sehr geringe Blutspiegel von Curcumin erreicht werden können. Bei 8 g Curcumin pro Tag wurden im Durchschnitt nur etwa 0,11 μM im Blut festgestellt (Anand et al. 2007).

Verglichen mit den effektiven Dosierungen aus den *in vitro* Studien liegt die bisher erreichte Blutkonzentration von Curcumin 100-fach niedriger. Durch die schnelle Metabolisierung ist selbst die niedrige Konzentration nur für eine sehr kurze Zeitspanne im Blut nachweisbar.

Erfahrungen aus der Homöopathie-Praxis mit intravenös angewendetem, reinem Curcumin berichten von guten Erfolgen bei Tumorpatienten nach wiederholten Gaben von 450 mg pro Tag, verteilt auf zwei Einzeldosen. Randomisierte, klinische Studien dazu liegen aktuell aber nicht vor.

Trotz der niedrigen Blutspiegel, zeigt reines Curcumin lokal Effekte auf das Tumorstadium *in vivo*. Bei Mäusen konnte durch die Gabe von reinem und handelsüblichem Curcumin die Entstehung von Tumoren des GI-Traktes sowie die Tumorstadiumgröße reduziert werden (Huang et al. 1994). Auch in Resektionspräparaten von Darmkrebspatienten, die sieben Tage präoperativ Curcumin erhalten haben, fanden sich jedoch trotz nicht nachweisbarer Blutspiegel molekularbiologische Veränderungen im Tumorgewebe wie beispielsweise reduzierte M1G-Nukleotidspiegel, welche im Zusammenhang zur Proliferationsrate und Mutagenität von Tumorgeweben gesehen werden (Garcea et al. 2005).

5.5.2 Alternative Darreichungsformen von Curcumin

Hoffnung auf eine mögliche Translation der guten Ergebnisse *in vitro* in die Klinik bieten jedoch neue Formulierungen mit Curcumin, die den Blutspiegel deutlich erhöhen sollen. So konnte beispielsweise durch die Kombination mit Piperin, einem Hemmstoff der Glucuronidierung, hergestellt aus schwarzem Pfeffer, der Blutspiegel von 2 g oral aufgenommenem Curcumin in einer Untersuchung mit acht gesunden Probanden um das 2000-fache angehoben werden (Shoba et al. 1998). Auch die Bindung von Curcumin an Polyethylenglykol (PEG) führte *in vitro* zu einer Verbesserung der Wirksamkeit von Curcumin (Li et al. 2009).

Um Tumorzellen möglichst direkt zu adressieren, verknüpften Aggarwal et al. das Curcumin-Molekül mit dem Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), da der LHRH-Rezeptor beispielsweise auf PDAC-Zellen überexprimiert wird. Zum einen wurde durch diese Verbindung eine Lösung in Wasser und somit eine intravenöse Gabe ohne weitere Lösungsmittel ermöglicht, zum anderen konnte eine Reduktion des Wachstums *in vitro* und eine Abnahme der Tumorstadiumgröße *in vivo* gezeigt werden (Aggarwal et al. 2011).

Auch strukturelle Veränderungen am Curcumin-Molekül, sogenannte Curcumin-Analoga werden erprobt und zeigen gute Ergebnisse (Yang et al. 2016; Hutzen et al. 2009). Besonders hervorzuheben ist für die Therapie des PDAC ein fluoriertes-Curcumin-Molekül (3, 4-difluorobenzyliden Curcumin, CDF) das sich im Pankreasgewebe anreichert und neben einer verbesserten Bioverfügbarkeit auch eine höhere Toxizität gegenüber Tumorzellen aufweist als natürliches Curcumin (Momtazi und Sahebkar 2016).

Der Einsatz von Nanopartikeln oder Liposomen wird in einer Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht (Minafra et al. 2019; Huang et al. 1994; Halevas et al. 2019). Mit Theracumin®, einer der ersten Nanoformulierungen von Curcumin in der klinischen Erprobung, konnte die Bioverfügbarkeit um das in etwa 27-fache gesteigert werden (Sasaki et al. 2011). Theracumin® wird neben onkologischen Patienten auch bei rheumatischen und degenerativen Erkrankungen in klinischen Studien eingesetzt.

Weitere, neuere Formulierungen wie Curcumin-Mizellen (NovaSol®) und hydrophile Carrier-Verbindungen (CurcuWin®) konnten die Bioverfügbarkeit noch weiter steigern und eine 100-fache Erhöhung des Blutspiegels im Vergleich zu reinem Curcumin erreichen (Schiborr et al. 2014; Jäger et al. 2014; Jamwal 2018).

5.5.3 Mögliche Anwendung in der Strahlentherapie

Durch Behandlung mit Curcumin konnten *in vitro* Zellen für eine begleitende Tumorthherapie mit Chemo- oder Strahlentherapie sensitiviert werden. Insbesondere bei radioresistenteren Zellen zeichnete sich ein über-additiver Effekt der Curcumin-Behandlung ab.

Durch die Entwicklung von neuen Formulierungen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit und zur direkten Adressierung von Tumorzellen könnten in Zukunft möglicherweise *in vitro* wirksame Konzentrationen von Curcumin im Tumorgewebe erreicht werden. Eine begleitende Behandlung mit Curcumin könnte dann auch bei PDAC-Patienten zur Chemo- und Strahlentherapie gegeben werden. Kritisch zu überwachen sind aber gewisse Tendenzen bei niedrigen Curcumin-Konzentrationen, die *in vitro* beispielsweise zu erniedrigten Apoptose-Raten führten.

Neben der Wirkung auf Tumorzellen zeigten die anti-inflammatorischen Effekte von Curcumin aber auch in Studien gute Ergebnisse im Hinblick auf die Toxizität der Bestrahlung auf gesundes Gewebe. Die orale Gabe von Curcumin führte zu einer signifikant niedrigeren Darm-Toxizität nach Bestrahlung des Abdomens und verringerte das Auftreten einer Strahlen-Pneumonitis nach Lungenbestrahlung in Ratten (Akpolat et al. 2009). Auch die Wundheilung nach Operation und fraktionierter Bestrahlung konnte bei Mäusen durch eine Vorbehandlung mit Curcumin signifikant verbessert werden (Jagetia und Rajanikant 2012).

Eine orale Einnahme von bis zu 12 g Curcumin pro Tag wurde von Patienten gut vertragen und zeigte keine toxischen Nebenwirkungen (Gupta et al. 2013). Bei größeren Mengen Curcumin pro Tag entwickelten die Patienten teilweise Übelkeit und Völlegefühle. Die Einnahme von 6 g Curcumin pro Tag begleitend zur Strahlentherapie von Brustkrebs-Patientinnen zeigte in einer randomisierten Studie eine signifikante Reduktion der Schwere der Strahlendermatitis und der Epitheliolyse. Der Einfluss auf Schmerzen, Rötung oder Begleitsymptome wie Übelkeit oder Abgeschlagenheit war nicht signifikant (Ryan et al. 2013). Auf den Gewichtsverlust und die tumorbedingte Kachexie, einer

weiteren relevanten Nebenwirkung bei Patienten mit fortgeschrittenen PDAC, konnte durch eine Behandlung mit 8 g Curcumin pro Tag kein relevanter Einfluss nachgewiesen werden (Parsons et al. 2016).

Der begleitende Einsatz von Curcumin in der Strahlentherapie ist also durchaus denkbar, insbesondere wenn höhere Konzentrationen im Tumorgewebe erreicht werden können. Aber auch zur Behandlung von Nebenwirkungen der Strahlentherapie könnte der Einsatz sinnvoll sein. Eine topische Anwendung auf der Haut oder auch eine CT-gesteuerte Injektion in gut zugängliche Tumore wären ebenfalls mögliche Einsatzbereiche. Hierfür werden aber noch weitere insbesondere klinische Studien notwendig sein, um die Translation in die Klinik zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des phytotherapeutisch häufig eingesetzten Farbstoffs Curcumin auf zwei etablierte humane Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1 und MiaPaCa-2) im Zusammenhang mit einer einmaligen Bestrahlung untersucht. In einer Vielzahl von *in vitro* Studien an verschiedenen Tumorzellen wurde eine Radiosensibilisierung durch Curcumin nachgewiesen. Die Regulierung des EGFR- und NFκB-AKT-Signalweges durch Curcumin wurde damit häufig in Verbindung gebracht. Auch ein Zusammenhang mit der COX-2 Expression von Tumorzellen und dem Effekt der begleitenden Behandlung mit Curcumin wird diskutiert.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien weisen beide eine niedrige COX-2 Expression auf. Beide Zelllinien zeigten eine signifikante Wachstumshemmung durch Curcumin auch ohne Bestrahlung, jedoch präsentierte sich nur bei den radioresistenteren Panc-1 Zellen eine signifikante Radiosensibilisierung. Vergleichbar mit Veeraghavan et al. zeigte sich nach Behandlung mit Curcumin (12 µM) ein erhöhter Anteil an Caspase-3/7-positiven Zellen. Bei einer Kombination mit einer Strahlendosis von 8 Gy war dieser Anteil bei MiaPaCa-2 sogar signifikant höher als in Panc-1 Zellen, weswegen eine erhöhte Apoptose-Induktion keine erklärbare Ursache für die Radiosensitivierung der Panc-1 Zellen darstellt.

Da der Effekt der Strahlentherapie in erster Linie auf der Erzeugung von DNA-Schäden durch die Bestrahlung besteht, wurde die γH2AX-Phosphorylierung als Indikator für DNA-Doppelstrangbrüche analysiert. Es zeigte sich in beiden Zelllinien ein Anstieg der γH2AX-MFI durch die Behandlung mit 12 µM Curcumin, in einer korrigierten Rechenweise stellte sich der Anstieg aber trotz über-additiver Tendenzen in Panc-1 Zellen als additiv dar.

Als weitere Möglichkeit wurde die Verteilung der Zellen über die verschiedenen Zellzyklusphasen untersucht. Hierbei zeigte sich nach Inkubation mit 12 µM Curcumin ein signifikanter G2/M-Arrest in Panc-1 Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung, während sich die Zellzyklus-Verteilung bei MiaPaCa-2 Zellen unverändert darstellte. 24 Stunden später konnte in beiden Zelllinien ein G2/M-Arrest durch die Behandlung mit 12 µM festgestellt werden. Der Arrest der Panc-1 Zellen in der G2/M-Phase, welche als am sensibelsten auf eine Bestrahlung gilt, ist eine mögliche Erklärung für die Sensibilisierung der radioresistenteren Panc-1 Zellen im CFA.

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit und der hohen Metabolisierung des Curcumins ist eine breite klinische Anwendung derzeit noch nicht denkbar. Neue Formulierungen mit höheren Blutspiegeln und teilweise erhöhter Wirksamkeit stellen vielversprechende Ergänzungen für die zukünftige Krebstherapie dar. Bis dahin sind aber noch weitere *in vitro* und *in vivo* Studien notwendig.

7. Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S.; Ndinguri, M. W.; Solipuram, R.; Wakamatsu, N.; Hammer, R. P.; Ingram, D.; Hansel, W. (2011): DLys(6)-luteinizing hormone releasing hormone-curcumin conjugate inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. In: *International journal of cancer* 129 (7), S. 1611–1623. DOI: 10.1002/ijc.26132.
- Akpolat, Meryem; Kanter, Mehmet; Uzal, Mustafa Cem (2009): Protective effects of curcumin against gamma radiation-induced ileal mucosal damage. In: *Archives of toxicology* 83 (6), S. 609–617. DOI: 10.1007/s00204-008-0352-4.
- Ammon, Hermann P.T.; Wahl, Martin A. (1991): Pharmacology of *Curcuma longa*. In: *Planta Medica* (57 (1)), S. 1–7. DOI: 10.1055/s-2006-960004.
- Anand, Preetha; Kunnumakkara, Ajaikumar B.; Newman, Robert A.; Aggarwal, Bharat B. (2007): Bioavailability of curcumin: problems and promises. In: *Molecular pharmaceutics* 4 (6), S. 807–818. DOI: 10.1021/mp700113r.
- Azad, Abul; Yin Lim, Su; D'Costa, Zenobia; Jones, Keaton; Diana, Angela; Sansom, Owen J. et al. (2017): PD-L1 blockade enhances response of pancreatic ductal adenocarcinoma to radiotherapy. In: *EMBO molecular medicine* 9 (2), S. 167–180. DOI: 10.15252/emmm.201606674.
- Baskar, Rajamanickam; Dai, Jiawen; Wenlong, Nei; Yeo, Richard; Yeoh, Kheng-Wei (2014): Biological response of cancer cells to radiation treatment. In: *Frontiers in molecular biosciences* 1, S. 24. DOI: 10.3389/fmolb.2014.00024.
- Belcaro, Gianni; Hosoi, Morio; Pellegrini, Luciano; Appendino, Giovanni; Ippolito, Edmondo; Ricci, Andrea et al. (2014): A controlled study of a lecithinized delivery system of curcumin (Meriva®) to alleviate the adverse effects of cancer treatment. In: *Phytotherapy research : PTR* 28 (3), S. 444–450. DOI: 10.1002/ptr.5014.
- Bimonte, Sabrina; Barbieri, Antonio; Leongito, Maddalena; Piccirillo, Mauro; Giudice, Aldo; Pivonello, Claudia et al. (2016): Curcumin AntiCancer Studies in Pancreatic Cancer. In: *Nutrients* 8 (7). DOI: 10.3390/nu8070433.
- Birth, Matthias; Pereira, Phillipe L.; Ittel, Thomas H. (Hg.) (2010): Hepatobiliäre und Pankreastumoren. Interdisziplinäres Vorgehen. Berlin: Springer-Verlag.
- Brach, M. A.; Hass, R.; Sherman, M. L.; Gunji, H.; Weichselbaum, R.; Kufe, D. (1991): Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. In: *The Journal of clinical investigation* 88 (2), S. 691–695. DOI: 10.1172/JCI115354.
- Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- Cai, Yong; Sheng, Zhaoying; Liang, Shixiong (2019): Radiosensitization effects of curcumin plus cisplatin on non-small cell lung cancer A549 cells. In: *Oncology letters* 18 (1), S. 529–534. DOI: 10.3892/ol.2019.10364.
- Chendil, Damodaran; Ranga, Rama S.; Meigooni, David; Sathishkumar, Sabapathi; Ahmed, Mansoor M. (2004): Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. In: *Oncogene* 23 (8), S. 1599–1607. DOI: 10.1038/sj.onc.1207284.
- Cheng, A. L.; Hsu, C. H.; Lin, J. K.; Hsu, M. M.; Ho, Y. F.; Shen, T. S. et al. (2001): Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. In: *Anticancer Research* 21 (4B), S. 2895–2900.

- Chung, Seung Yeun; Chang, Jee Suk; Lee, Byung Min; Kim, Kyung Hwan; Lee, Kyong Joo; Seong, Jinsil (2017): Dose escalation in locally advanced pancreatic cancer patients receiving chemoradiotherapy. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 123 (3), S. 438–445. DOI: 10.1016/j.radonc.2017.04.010.
- Combs, Stephanie E.; Habermehl, Daniel; Kessel, Kerstin A.; Bergmann, Frank; Werner, Jens; Naumann, Patrick et al. (2014): Prognostic impact of CA 19-9 on outcome after neoadjuvant chemoradiation in patients with locally advanced pancreatic cancer. In: *Annals of surgical oncology* 21 (8), S. 2801–2807. DOI: 10.1245/s10434-014-3607-8.
- Conroy, Thierry; Hammel, Pascal; Hebbar, Mohamed; Ben Abdelghani, Meher; Wei, Alice C.; Raoul, Jean-Luc et al. (2018): FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. In: *The New England journal of medicine* 379 (25), S. 2395–2406. DOI: 10.1056/NEJMoa1809775.
- Dhillon, Navneet; Aggarwal, Bharat B.; Newman, Robert A.; Wolff, Robert A.; Kunnumakkara, Ajaikumar B.; Abbruzzese, James L. et al. (2008): Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (14), S. 4491–4499. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0024.
- Díaz Osterman, Carlos J.; Gonda, Amber; Stiff, TessaRae; Sigaran, Ulysses; Valenzuela, Malyn May Asuncion; Ferguson Bennit, Heather R. et al. (2016): Curcumin Induces Pancreatic Adenocarcinoma Cell Death Via Reduction of the Inhibitors of Apoptosis. In: *Pancreas* 45 (1), S. 101–109. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000411.
- DiSilvestro, Robert A.; Joseph, Elizabeth; Zhao, Shi; Bomser, Joshua (2012): Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle aged people. In: *American Journal of Cancer Research*. DOI: 10.1186/1475-2891-11-79.
- Divya, Chandrasekhar S.; Pillai, M. Radhakrishna (2006): Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFκB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. In: *Molecular carcinogenesis* 45 (5), S. 320–332. DOI: 10.1002/mc.20170.
- Dobiasch, Sophie; Goerig, Nicole L.; Fietkau, Rainer; Combs, Stephanie E. (2018): Essenzielle Rolle der Strahlentherapie in der Behandlung des Pankreaskarzinoms : Neuartige Studienmodelle und etablierte Therapieempfehlungen. In: *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 194 (3), S. 185–195. DOI: 10.1007/s00066-017-1227-5.
- Du, Juan; Cieslak, John A.; Welsh, Jessemae L.; Sibenaller, Zita A.; Allen, Bryan G.; Wagner, Brett A. et al. (2015): Pharmacological Ascorbate Radiosensitizes Pancreatic Cancer. In: *Cancer research* 75 (16), S. 3314–3326. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1707.
- Fahy, B. N.; Schlieman, M.; Virudachalam, S.; Bold, R. J. (2003): AKT inhibition is associated with chemosensitisation in the pancreatic cancer cell line MIA-PaCa-2. In: *British journal of cancer* 89 (2), S. 391–397. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601037.
- Fasih, Aisha; Elbaz, Hosam A.; Hüttemann, Maik; Konski, Andre A.; Zielske, Steven P. (2014): Radiosensitization of pancreatic cancer cells by metformin through the AMPK pathway. In: *Radiation research* 182 (1), S. 50–59. DOI: 10.1667/RR13568.1.
- Fokas, Emmanouil; O'Neill, Eric; Gordon-Weeks, Alex; Mukherjee, Somnath; McKenna, W. Gillies; Muschel, Ruth J. (2015): Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. In: *Biochimica et biophysica acta* 1855 (1), S. 61–82. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.12.001.

- Garcea, Giuseppe; Berry, David P.; Jones, Donald J. L.; Singh, Raj; Dennison, Ashley R.; Farmer, Peter B. et al. (2005): Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14 (1), S. 120–125.
- Gupta, Subash C.; Patchva, Sridevi; Aggarwal, Bharat B. (2013): Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. In: *The AAPS journal* 15 (1), S. 195–218. DOI: 10.1208/s12248-012-9432-8.
- Hagoel, Lior; Vexler, Akiva; Kalich-Philosoph, Lital; Earon, Gideon; Ron, Ilan; Shtabsky, Alex et al. (2019): Combined Effect of *Moringa oleifera* and Ionizing Radiation on Survival and Metastatic Activity of Pancreatic Cancer Cells. In: *Integrative cancer therapies* 18, 1534735419828829. DOI: 10.1177/1534735419828829.
- Halevas, Eleftherios; Mavroidi, Barbara; Swanson, Claudia H.; Smith, Graham C.; Moschona, Alexandra; Hadjispyrou, Spyros et al. (2019): Magnetic cationic liposomal nanocarriers for the efficient drug delivery of a curcumin-based vanadium complex with anticancer potential. In: *Journal of inorganic biochemistry* 199, S. 110778. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110778.
- Hans G. Beger et al (Hg.) (2013): Erkrankungen des Pankreas. Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf. Unter Mitarbeit von Markus W. Buechler, Henning Dralle, Markus M. Lerch, Peter Malfertheiner, Joachim Mössner, Jürgen F. Riemann. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Hassan, Faiz-Ul; Rehman, Muhammad Saif-Ur; Khan, Muhammad Sajjad; Ali, Muhammad Amjad; Javed, Aroosa; Nawaz, Ayesha; Yang, Chengjian (2019): Curcumin as an Alternative Epigenetic Modulator: Mechanism of Action and Potential Effects. In: *Frontiers in genetics* 10, S. 514. DOI: 10.3389/fgene.2019.00514.
- Helmut Oettle et al (2018): Onkopedia Leitlinie Pankreaskarzinom. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. Unter Mitarbeit von Thomas Bauernhofer, Markus Borner, Gerhard Faber, Rainer Fietkau, Volker Heinemann, Ulf Peter Neumann, Ron Pritzkeleit, Marianne Sinn, Dirk Thomas Waldschmidt, Bernhard Wörmann. Hg. v. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. Online verfügbar unter <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@@guideline/html/index.html>, zuletzt geprüft am 03.07.19.
- Huang, M. T.; Lou, Y. R.; Ma, W.; Newmark, H. L.; Reuhl, K. R.; Conney, A. H. (1994): Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. In: *Cancer research* 54 (22), S. 5841–5847.
- Hutzen, Brian; Friedman, Lauren; Sobo, Matthew; Li Lin; Cen, Ling; Angelis, Stephanie de et al. (2009): Curcumin analogue GO-Y030 inhibits STAT3 activity and cell growth in breast and pancreatic carcinomas. In: *International journal of oncology* 35 (4), S. 867–872. DOI: 10.3892/ijo_00000401.
- Jäger, Ralf; Lowery, Ryan P.; Calvanese, Allison V.; Joy, Jordan M.; Purpura, Martin; Wilson, Jacob M. (2014): Comparative absorption of curcumin formulations. In: *Nutrition journal* 13, S. 11. DOI: 10.1186/1475-2891-13-11.
- Jagetia, Ganesh Chandra; Rajanikant, Golgod Krishnamurthy (2012): Acceleration of wound repair by curcumin in the excision wound of mice exposed to different doses of fractionated γ radiation. In: *International wound journal* 9 (1), S. 76–92. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2011.00848.x.
- Jamwal, Rohitash (2018): Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers. In: *Journal of integrative medicine* 16 (6), S. 367–374. DOI: 10.1016/j.joim.2018.07.001.

- Jiang, Wei; Haque, Waqar; Verma, Vivek; Butler, E. Brian; Teh, Bin S. (2019): Neoadjuvant stereotactic body radiation therapy for nonmetastatic pancreatic adenocarcinoma. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 58 (9), S. 1259–1266. DOI: 10.1080/0284186X.2019.1631472.
- Jin, Hai; Qiao, Fan; Wang, Yan; Xu, Yongdong; Shang, Yan (2015): Curcumin inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human non-small cell lung cancer cells through the upregulation of miR-192-5p and suppression of PI3K/Akt signaling pathway. In: *Oncology reports* 34 (5), S. 2782–2789. DOI: 10.3892/or.2015.4258.
- Jingna Su, Xiuxia Zhou; Lixia Wang; Xuyuan Yin; Zhiwei Wang (2016): Curcumin inhibits cell growth and invasion and induces apoptosis through down-regulation of Skp2 in pancreatic cancer cells. In: *American Journal of Cancer Research* (6 (9)), S. 1949–1962. Online verfügbar unter www.ajcr.us /ISSN:2156-6976/ajcr0036965.
- Jutooru, Indira; Chadalapaka, Gayathri; Lei, Ping; Safe, Stephen (2010): Inhibition of NFkappaB and pancreatic cancer cell and tumor growth by curcumin is dependent on specificity protein down-regulation. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (33), S. 25332–25344. DOI: 10.1074/jbc.M109.095240.
- Kanai, Masashi (2014): Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer. In: *World journal of gastroenterology* 20 (28), S. 9384–9391. DOI: 10.3748/wjg.v20.i28.9384.
- Khafif, Avi; Lev-Ari, Shahar; Vexler, Akiva; Barnea, Itai; Starr, Alex; Karaush, Vicki et al. (2009): Curcumin: a potential radio-enhancer in head and neck cancer. In: *The Laryngoscope* 119 (10), S. 2019–2026. DOI: 10.1002/lary.20582.
- Kotha, Raghavendhar R.; Luthria, Devanand L. (2019): Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (16). DOI: 10.3390/molecules24162930.
- Kunnumakkara, Ajaikumar B.; Bordoloi, Devivasha; Harsha, Choudhary; Banik, Kishore; Gupta, Subash C.; Aggarwal, Bharat B. (2017): Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 131 (15), S. 1781–1799. DOI: 10.1042/CS20160935.
- Kuo, Linda J.; Yang, Li-Xi (2008): Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In: *In vivo (Athens, Greece)* 22 (3), S. 305–309.
- Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Kurzversion S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom.
- Lev-Ari, S.; Starr, A.; Vexler, A.; Karaush, V.; Loew, V.; Greif, J. et al. (2006): Inhibition of Pancreatic and Lung Adenocarcinoma cell survival by Curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and Inhibition of Erk1/2 activity. In: *Anticancer Research* (26), S. 4423–4430.
- Lev-Ari, Shahar; Vexler, Akiva; Starr, Alex; Ashkenazy-Voghera, Maia; Greif, Joel; Aderka, Dan; Ben-Yosef, Rami (2007): Curcumin augments gemcitabine cytotoxic effect on pancreatic adenocarcinoma cell lines. In: *Cancer investigation* 25 (6), S. 411–418. DOI: 10.1080/07357900701359577.
- Li, Jun; Wang, Yun; Yang, Chaozhe; Wang, Pengfei; Oelschlager, Denise K.; Zheng, Yong et al. (2009): Polyethylene glycosylated curcumin conjugate inhibits pancreatic cancer cell growth through inactivation of Jab1. In: *Molecular pharmacology* 76 (1), S. 81–90. DOI: 10.1124/mol.109.054551.
- Li, Lan; Aggarwal, Bharat B.; Shishodia, Shishir; Abbruzzese, James; Kurzrock, Razelle (2004): Nuclear factor-kappaB and IkappaB kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and

- their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. In: *Cancer* 101 (10), S. 2351–2362. DOI: 10.1002/cncr.20605.
- Lieberei, Reinhard; Reisdorff, Christoph; Franke, Wolfgang (2012): Nutzpflanzen. 4.9 Gewürzpflanzen. 8., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Liu, Guiping; Wang, Yufang; Li, Mingjun (2018): Curcumin sensitized the antitumour effects of irradiation in promoting apoptosis of oesophageal squamous-cell carcinoma through NF- κ B signalling pathway. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 70 (10), S. 1340–1348. DOI: 10.1111/jphp.12981.
- Liu, Pan; Ying, Qian; Liu, Huan; Yu, Si-Qi; Bu, Lu-Ping; Shao, Liang; Li, Xin-Yi (2020): Curcumin enhances anti-cancer efficacy of either gemcitabine or docetaxel on pancreatic cancer cells. In: *Oncology reports* 44 (4), S. 1393–1402. DOI: 10.3892/or.2020.7713.
- Maier, Patrick; Hartmann, Linda; Wenz, Frederik; Herskind, Carsten (2016): Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. In: *International journal of molecular sciences* 17 (1). DOI: 10.3390/ijms17010102.
- Maitra, Anirban; Hruban, Ralph H. (2008): Pancreatic cancer. In: *Annual review of pathology* 3, S. 157–188. DOI: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305.
- McIlwrath, A. J.; Vasey, P. A.; Ross, G. M.; Brown, R. (1994): Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. In: *Cancer research* 54 (14), S. 3718–3722.
- Minafra, Luigi; Porcino, Nunziatina; Bravatà, Valentina; Gaglio, Daniela; Bonanomi, Marcella; Amore, Erika et al. (2019): Radiosensitizing effect of curcumin-loaded lipid nanoparticles in breast cancer cells. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 11134. DOI: 10.1038/s41598-019-47553-2.
- Mizumoto, Yasunari; Kyo, Satoru; Kiyono, Tohru; Takakura, Masahiro; Nakamura, Mitsuhiro; Maida, Yoshiko et al. (2011): Activation of NF-kappaB is a novel target of KRAS-induced endometrial carcinogenesis. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (6), S. 1341–1350. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2291.
- Mohajeri, Mohammad; Rezaee, Mehdi; Sahebkar, Amirhossein (2017): Cadmium-induced toxicity is rescued by curcumin: A review. In: *BioFactors (Oxford, England)* 43 (5), S. 645–661. DOI: 10.1002/biof.1376.
- Momtazi, Amir Abbas; Sahebkar, Amirhossein (2016): Difluorinated Curcumin: A Promising Curcumin Analogue with Improved Anti-Tumor Activity and Pharmacokinetic Profile. In: *Current pharmaceutical design* 22 (28), S. 4386–4397. DOI: 10.2174/1381612822666160527113501.
- Morak, Marjolein J. M.; van Koetsveld, Peter M.; Kanaar, Roland; Hofland, Leo J.; van Eijck, Casper H. J. (2011): Type I interferons as radiosensitisers for pancreatic cancer. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 47 (13), S. 1938–1945. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.03.009.
- Morgan, Meredith A.; Lawrence, Theodore S. (2015): Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (13), S. 2898–2904. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3229.
- Naumann, Patrick; Liermann, Jakob; Fortunato, Franco; Schmid, Thomas E.; Weber, Klaus-Josef; Debus, Jürgen; Combs, Stephanie E. (2017): Sulforaphane enhances irradiation effects in terms of perturbed cell cycle progression and increased DNA damage in pancreatic cancer cells. In: *PLoS one* 12 (7), e0180940. DOI: 10.1371/journal.pone.0180940.

- Nazli, O.; Bozdog, A. D.; Tansug, T.; Kir, R.; Kaymak, E. (2000): The diagnostic importance of CEA and CA 19-9 for the early diagnosis of pancreatic carcinoma. In: *Hepato-gastroenterology* 47 (36), S. 1750–1752.
- Nelson, Kathryn M.; Dahlin, Jayme L.; Bisson, Jonathan; Graham, James; Pauli, Guido F.; Walters, Michael A. (2017): The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. In: *Journal of medicinal chemistry* 60 (5), S. 1620–1637. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975.
- Ogiwara, Hideaki; Ui, Ayako; Shiotani, Bunsyo; Zou, Lee; Yasui, Akira; Kohno, Takashi (2013): Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. In: *Carcinogenesis* 34 (11), S. 2486–2497. DOI: 10.1093/carcin/bgt240.
- Papież, Monika A.; Krzyściak, Wirginia; Szade, Krzysztof; Bukowska-Straková, Karolina; Kozakowska, Magdalena; Hajduk, Karolina et al. (2016): Curcumin enhances the cytogenotoxic effect of etoposide in leukemia cells through induction of reactive oxygen species. In: *Drug design, development and therapy* 10, S. 557–570. DOI: 10.2147/DDDT.S92687.
- Parsons, Henrique A.; Baracos, Vickie E.; Hong, David S.; Abbruzzese, James; Bruera, Eduardo; Kurzrock, Razelle (2016): The effects of curcumin (diferuloylmethane) on body composition of patients with advanced pancreatic cancer. In: *Oncotarget* 7 (15), S. 20293–20304. DOI: 10.18632/oncotarget.7773.
- Paul E. Oberstein and Kenneth P. Olive; Oberstein, Paul E.; Olive, Kenneth P. (2013): Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? In: *Therapeutic advances in gastroenterology* 6 (4), S. 321–337. DOI: 10.1177/1756283X13478680.
- Pawlik, Timothy M.; Keyomarsi, Khandan (2004): Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 59 (4), S. 928–942. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2004.03.005.
- Pramanik, Kartick C.; Makena, Monish Ram; Bhowmick, Kuntal; Pandey, Manoj K. (2018): Advancement of NF- κ B Signaling Pathway: A Novel Target in Pancreatic Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 19 (12). DOI: 10.3390/ijms19123890.
- Priyadarsini, K. Indira (2009): Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 10 (2), S. 81–95. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001.
- Qiao, Qiao; Jiang, Yuanjun; Li, Guang (2013): Curcumin enhances the response of non-Hodgkin's lymphoma cells to ionizing radiation through further induction of cell cycle arrest at the G2/M phase and inhibition of mTOR phosphorylation. In: *Oncology reports* 29 (1), S. 380–386. DOI: 10.3892/or.2012.2091.
- Rahib, Lola; Smith, Benjamin D.; Aizenberg, Rhonda; Rosenzweig, Allison B.; Fleshman, Julie M.; Matrisian, Lynn M. (2014): Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. In: *Cancer research* 74 (11), S. 2913–2921. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.
- Rawla, Prashanth; Sunkara, Tagore; Gaduputi, Vinaya (2019): Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. In: *World journal of oncology* 10 (1), S. 10–27. DOI: 10.14740/wjon1166.
- Rich, Tyvin A.; Shepard, Robert (2003): COX-2 inhibitors as radiation sensitizers for upper GI tract cancers: esophagus, stomach, and pancreas. In: *American journal of clinical oncology* 26 (4), S110-3. DOI: 10.1097/01.COC.0000074148.37768.3E.
- RKI (2017): Krebs in Deutschland | 2013/2014. 11. Aufl. Hg. v. Robert Koch-Institut (RKI) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin (978-3-89606-288-8).

- Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2016): Epidemiologie von Krebserkrankungen – Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Hg. v. Robert Koch-Institut (RKI). Berlin (978-3-89606-279-6). Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Kapitel2_Epidemiologie.pdf?__blob=publicationFile.
- Ryan, Julie L.; Heckler, Charles E.; Ling, Marilyn; Katz, Alan; Williams, Jacqueline P.; Pentland, Alice P.; Morrow, Gary R. (2013): Curcumin for radiation dermatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of thirty breast cancer patients. In: *Radiation research* 180 (1), S. 34–43. DOI: 10.1667/RR3255.1.
- Sahu, R. P.; Batra, S.; Srivastava, S. K. (2009): Activation of ATM/Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. In: *British journal of cancer* 100 (9), S. 1425–1433. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605039.
- Sasaki, Hiroki; Sunagawa, Yoichi; Takahashi, Kenji; Imaizumi, Atsushi; Fukuda, Hiroyuki; Hashimoto, Tadashi et al. (2011): Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 34 (5), S. 660–665. DOI: 10.1248/bpb.34.660.
- Schiborr, Christina; Kocher, Alexa; Behnam, Dariush; Jandasek, Josef; Toelstede, Simone; Frank, Jan (2014): The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. In: *Molecular nutrition & food research* 58 (3), S. 516–527. DOI: 10.1002/mnfr.201300724.
- Seitz, N.-N.; John, L.; Atzendorf, J.; Rauschert, C.; Kraus, L. (2019): Kurzbericht Epidemiologischer Suchtsurvey 2018. Tabellenband: Alkoholkonsum, episodisches Rauschtrinken und Hinweise auf Konsumabhängigkeit und -missbrauch nach Geschlecht und Alter im Jahr 2018. Online verfügbar unter https://www.esa-survey.de/fileadmin/user_upload/Literatur/Berichte/ESA_2018_Tabellen_Alkohol.pdf.
- Sharma, Ricky A.; Euden, Stephanie A.; Platton, Sharon L.; Cooke, Darren N.; Shafayat, Aisha; Hewitt, Heather R. et al. (2004): Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (20), S. 6847–6854. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0744.
- Shoba, G.; Joy, D.; Joseph, T.; Majeed, M.; Rajendran, R.; Srinivas, P. S. (1998): Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. In: *Planta Medica* 64 (4), S. 353–356. DOI: 10.1055/s-2006-957450.
- Su, Jingna; Zhou, Xiuxia; Wang, Lixia; Yin, Xuyuan; Wang, Zhi-Wei (2016): Curcumin inhibits cell growth and invasion and induces apoptosis through down-regulation of Skp2 in pancreatic cancer cells. In: *American Journal of Cancer Research* 6 (9), S. 1949–1962.
- Subhan, M. A.; Alam, K.; Rahaman, M. S.; Rahman, M. A.; Awal, R. (2014): Synthesis and Characterization of Metal Complexes Containing Curcumin (C₂₁H₂₀O₆) and Study of their Anti-microbial Activities and DNA-binding Properties. In: *J. Sci. Res.* 6 (1), S. 97–109. DOI: 10.3329/jsr.v6i1.15381.
- Subramaniam, Dharmalingam; Ramalingam, Satish; Linehan, David C.; Dieckgraefe, Brian K.; Postier, Russell G.; Houchen, Courtney W. et al. (2011): RNA binding protein CUGBP2/CELF2 mediates curcumin-induced mitotic catastrophe of pancreatic cancer cells. In: *PloS one* 6 (2), e16958. DOI: 10.1371/journal.pone.0016958.
- Thorsten Dinse (2018): Curcumin-Therapie. Online verfügbar unter <https://curcumintherapie.de/index.html>.

- Veeraraghavan, J.; Natarajan, M., Lagisetty, P.; Awasthi, V.; Herman, T. S.; Aravindan, N. (2011): Impact of Curcumin, Raspberry Extract and Neem Leaf Extract on Rel Protein-Regulated Cell Death/Radiosensitization in Pancreatic Cancer Cells. In: *Pancreas* Volume 40 (7), S. 1107–1119.
- Verma, Vivek (2016): Relationship and interactions of curcumin with radiation therapy. In: *World journal of clinical oncology* 7 (3), S. 275–283. DOI: 10.5306/wjco.v7.i3.275.
- Wang, Lihua; Chen, Xiwen; Du, Zhuanyun; Li, Gefei; Chen, Mayun; Chen, Xi et al. (2017): Curcumin suppresses gastric tumor cell growth via ROS-mediated DNA polymerase γ depletion disrupting cellular bioenergetics. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 36 (1), S. 47. DOI: 10.1186/s13046-017-0513-5.
- Wang, W.; Abbruzzese JL; Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ (1999): The Nuclear Factor-kB RelA Transcription Factor is Constitutively Activated in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. In: *Clinical Cancer Research* (Volume 5), S. 119–127.
- Weizmann Institute of Science, LifeMap Sciences (Hg.): GeneCards. Human Gene Database. Online verfügbar unter <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFKB1>, zuletzt geprüft am 28.06.19.
- Witkiewicz, Agnieszka K.; McMillan, Elizabeth A.; Balaji, Uthra; Baek, GuemHee; Lin, Wan-Chi; Mansour, John et al. (2015): Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. In: *Nature communications* 6, S. 6744. DOI: 10.1038/ncomms7744.
- Wu, Zhengyi; Raven, Peter (Hg.) (2000): Flora of China. Zingiberaceae. 25 Bände: MISSOURI BOTANICAL GARDEN PR (Flora of China, 24). Online verfügbar unter <http://flora.huh.harvard.edu/china/>, zuletzt geprüft am 15.07.19.
- Yallapu, Murali M.; Jaggi, Meena; Chauhan, Subhash C. (2013): Curcumin Nanomedicine: A Road to Cancer Therapeutics // Curcumin nanomedicine: a road to cancer therapeutics. In: *Current pharmaceutical design* 19 (11), S. 1994–2010. DOI: 10.2174/138161213805289219.
- Yang, H.; Fan, S.; An, Y.; Wang, X.; Pan, Y.; Xiaokaiti, Y. et al. (2016): Bisdemethoxycurcumin exerts pro-apoptotic effects in human pancreatic adenocarcinoma cells through mitochondrial dysfunction and a GRP78-dependent pathway. In: *Oncotarget*. DOI: 10.18632/oncotarget.13272.
- Youns, Mahmoud; Fathy, Gihan Mahmoud (2013): Upregulation of extrinsic apoptotic pathway in curcumin-mediated antiproliferative effect on human pancreatic carcinogenesis. In: *Journal of cellular biochemistry* 114 (12), S. 2654–2665. DOI: 10.1002/jcb.24612.
- Zhang, Yu; Xue, Ying-Bo; Li, Hang; Qiu, Dong; Wang, Zhi-Wei; Tan, Shi-Sheng (2017): Inhibition of Cell Survival by Curcumin Is Associated with Downregulation of Cell Division Cycle 20 (Cdc20) in Pancreatic Cancer Cells. In: *Nutrients* 9 (2). DOI: 10.3390/nu9020109.
- Zhao, Zhiming; Li, Chenggang; Xi, Hao; Gao, Yuanxing; Xu, Dabin (2015): Curcumin induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the induction of forkhead box O1 and inhibition of the PI3K/Akt pathway. In: *Molecular medicine reports* 12 (4), S. 5415–5422. DOI: 10.3892/mmr.2015.4060.
- Zhu, Yaping; Bu, Shurui (2017): Curcumin Induces Autophagy, Apoptosis, and Cell Cycle Arrest in Human Pancreatic Cancer Cells. In: *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2017, S. 5787218. DOI: 10.1155/2017/5787218.

8. Veröffentlichungen

Schwarz, K., Dobiasch, S., Nguyen, L., Schilling D., Combs S.E. "Modification of radiosensitivity by curcumin in human pancreatic cancer cell lines"

Abstract-Nummer P20-13-jD als Poster in der "Posterbegehung II - Young Professionals Present"
DEGRO Jahrestagung 2018

Schwarz, K., Dobiasch, S., Nguyen, L., Schilling D., Combs S.E. Modification of radiosensitivity by Curcumin in human pancreatic cancer cell lines. Sci Rep 10, 3815 (2020).

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-60765-1>

10. Danksagung

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Stephanie Combs danke ich für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit und für die Bereitstellung der Ressourcen für meine Experimente und Veröffentlichungen.

Der Forschungsreferentin Frau Daniela Schilling danke ich für die Hilfe bei der Auswahl der Methoden, der Versuchsplanung, der Interpretation der Daten und der Erstellung von Vorträgen, Postern und Publikationen. Danke für die ausführlichen Korrekturen und Hilfestellungen und die Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Mein Dank gilt auch meiner Mitdoktorandin Frau Lily Nguyen, die für mich im Labor immer eine erfahrene und hilfreiche Ansprechpartnerin war und mich auch in allen anderen Belangen unterstützt hat. Bei Problemen jeder Art warst du immer sofort zur Stelle und hast mir wann immer du konntest ausgeholfen. Danke für die gemeinsamen Stunden im Labor und deine hilfreichen Worte im wissenschaftlichen, aber auch im privaten Kontext.

Allen technischen Assistenten der Abteilung, insbesondere Herrn Marlon Stein und Frau Andrea Mair möchte ich danken für die gute Einarbeitung in die grundlegenden Methoden der Zellkultur und die hilfsbereite Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente. Danke Marlon für deine Ruhe und deinen unermüdlichen Optimismus bei der Etablierung der Curcumin-Lösung.

Meinem Kommilitonen Herrn Alexander Nieto möchte ich für den anregenden fachlichen und freundschaftlichen Austausch auf Seminaren, Kongressen und im Privaten danken. Danke für die schöne gemeinsame Zeit auf der School of oncology und auf der DEGRO in Leipzig.

Für die Begleitung meines ganzen Lebens danke ich meinen Taufpatinnen Maria und Sieglinde.

Meinen Eltern, Frau Dr. rer. nat. Ingrid Neudorfer-Schwarz und Herrn Dr. rer. nat. Christian Schwarz möchte ich ganz besonders herzlich danken. Bei euch konnte ich immer ein offenes Ohr finden und mir neben wissenschaftlicher Unterstützung auch stets ein paar aufmunternde Worte abholen. Egal ob beim Korrekturlesen oder beim Nachvollziehen von logischen Gedankengängen – ihr wart immer sofort mit ganzem Herzen dabei.

Zu guter Letzt möchte ich noch meiner Betreuerin Frau Sophie Dobiasch danken. Danke, dass du mir immer, wirklich immer, mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast und dich stets meinen vielen Fragen gestellt hast. Danke auch für deine Zuverlässigkeit und deine Hilfsbereitschaft in allen Belangen und deine Begleitung bei der Vorbereitung von Vorträgen, Postern, unserem Paper oder auch der Doktorarbeit. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Anhang II:

Exkludierte Messwerte Alamar Blue:

Referenz Panc-1		
0,283	0,267	0,279
0,263	0,268	0,282
0,269	0,336	0,262
0,256	0,258	0,265

MiaPaCa-2: 6 μ M 24h			
	0,439	0,36	0,391
	0,363	0,375	0,347
	0,37	0,36	0,357
	0,359	0,352	0,352
Panc-1: 0 μ M 48h			
	0,376	0,363	0,401
	0,454	0,361	0,371
	0,357	0,352	0,359
	0,35	0,34	0,352
Panc-1: 0 μ M 72h			
	0,441	0,437	0,432
	0,403*	0,647	0,441
	0,443	0,446	0,44
	0,437	0,439	0,438

*auffällig im Grubbs-Test, aber innerhalb 95% Konfidenzintervall