

Behandlung von Pankreaskarzinomen in der Forschung

Biologie Projektkurs

A K 4217 03. APRIL 2021, 21:17 UHR

Problemstellung und Ziel meines Experiments

Problemstellung

- Patienten, welche aufgrund einer Krebserkrankung chemotherapeutisch behandelt werden müssen, leiden häufig unter starken Nebenwirkungen und Spätfolgen
- dies kann unter anderem durch eine hohe Konzentration von zurzeit verwendeten Medikamenten der Chemotherapie erklärt werden
- zudem muss die Effizienz der Therapien gesteigert werden, da die Mortalitätsrate aufgrund der Tumorbiologie bei Pankreaskarzinomen sehr hoch ist

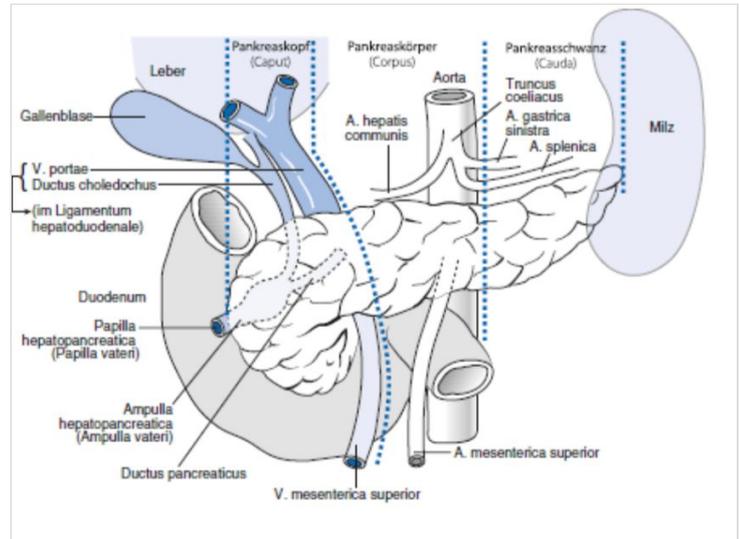
Ziel

- Ziel des Experiments ist es also, an dem neu entwickelten Medikament GP 2250, die minimale Konzentration zu ermitteln
- diese Konzentration muss effektiv gegen den Tumor sein, soll aber möglichst wenig Nebenwirkungen hervorrufen

Das Pankreas (die Bauchspeicheldrüse)

Anatomie

- Organ im Oberbauch, welches sich hinter dem Bauchfell und vor der Wirbelsäule befindet
- lässt sich anatomisch in drei Abschnitte einteilen: den Pankreaskopf, den Pankreaskörper und den Pankreasschwanz
- 15 cm lang, 3-4 cm breit und 0,5-1,5 cm dick
- bei Erwachsenen erreicht die Pankreas ein Gewicht von ca. 80 g
- angrenzende Organe sind Leber, Milz, Magen, Gallenblase und Zwölffingerdarm



Funktion

- das Pankreas kann in zwei wesentliche Drüsen unterteilt werden, welche die beiden Hauptfunktionen beschreiben;
- sie hat zum einen die exokrine Funktion bzw. die exokrine Drüse, welche essentiell für die Verdauung ist, da sie Verdauungsenzyme in Form von Pankreassaften in den Zwölffingerdarm abgibt
-> diese spalten dann Kohlenhydrate, Fette und Proteine in Magen und Darm
- zum anderen gibt es die endokrine Funktion bzw. die endokrine Drüse, welche für die Bildung der Hormone Insulin und Glucagon zuständig ist, welche dann direkt in den Blutstrom abgegeben werden
- die Hormone werden in den Langerhans-Inseln gebildet

Pankreaskarzinome

Krebsentstehung

- Krebs entsteht durch Mutationen des Erbguts in einzelnen Zellen, wodurch ein unkontrolliertes Zellwachstum entsteht
- zudem findet kein regulärer Zelltod mehr statt
-> es entsteht ein Tumor
- die Krebszellen können sich dann durch die Blut- und Lymphgefäße ausbreiten und somit in andere Organe eindringen, wo sie dann Metastasen bilden
- es wird von malignen Tumoren gesprochen, wenn die

Krebszellen in andere Organe übergehen und dort Metastasen bilden

Pankreaskarzinome

- als Pankreaskarzinom bezeichnet man eine bösartige Krebserkrankung des endokrinen oder exokrinen Pankreas
- sie betreffen in 60% der Fälle den Pankreaskopf, in 10% den Corpusbereich und in weiteren 10% den Pankreasschwanz
- 20% der Karzinome betreffen das gesamte Organ
- am häufigsten sind die duktales Adenokarzinome, welche aus den Epithelien des Pankreasganges hervorgehen
- Metastasen, hauptsächlich in Lunge, Leber oder Knochen, treten bei Pankreaskarzinomen frühzeitig auf

Symptome

- Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit
- Schmerzen in Oberbauch und Rücken
- Gelbsucht im Falle einer Störung des Gallenabflusses, welche sich durch dunkelsten Urin und hellen Stuhl äußert
- Blutzuckerkrankheit, zum Beispiel Diabetes mellitus
- Hautjucken

Bilder von Pankreaskarzinomen

Im Folgenden werden Bilder von Pankreaskarzinomen gezeigt, welche in einer Operation an einem Patienten im St. Josefs Hospital in Bochum aufgenommen.

⚠ Diese Bilder enthalten sowohl Blut, als auch offene Wunden und innere Organe. Wenn du so etwas nicht gut sehen kannst oder lieber nicht anschauen willst, überspringe diesen Teil bitte! :)

<https://docs.google.com/document/d/11zw9h9TGyWQ34kLzIqzTNgrKxf7e45GBJahmvC9Pt3k/edit>

Demiologie und Ätiologie (Inzidenz und Ursachen)

Inzidenz und Prognose

- sehr schlechte Prognose und hohe Mortalitätsrate
- das liegt daran, dass Bauchspeicheldrüsenkrebs häufig erst sehr spät erkannt wird, da es keine regelmäßigen und verlässlichen Vorsorgeuntersuchungen gibt und die Symptome unspezifisch sind
- zudem ist das Tumorwachstum sehr aggressiv und früh metastasierend, was die Behandlung erheblich erschwert, da zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nur 20% der Karzinome operable sind
- Inzidenz liegt in Deutschland bei ca. 5 - 10 Erkrankten pro 100.000 Einwohnern pro Jahr, wovon Männer etwas häufiger betroffen sind
- der Altersgipfel liegt zwischen dem 65. und dem 75. Lebensjahr
- die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für beide

Geschlechter bei 9% und die relative 10-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei 7%

- in 2016 erkrankten ca. 18.400 Menschen in Deutschland an Bauchspeicheldrüsenkrebs
- Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumor und Metastasen haben eine Überlebenszeit von nur 3-6 Monaten

Mögliche Ursachen

- häufiges Rauchen
- starker Alkoholkonsum
- Adipositas
- Diabetes mellitus
- langjährige chronische Pankreatitis (Entzündung der Bauchspeicheldrüse)
- Cholezystektomie (Gallenblasenentfernung) sowie Gastrektomie (Entfernung des Magens)
- genetische Dispositionen
- 20% aller Pankreaskarzinome haben einen erblichen Hintergrund, wobei die häufigsten Mutationen die Tumorsuppressorgene p16 und p53, sowie K-ras oder BRCA2 betreffen

Behandlungsmöglichkeiten

Verschiedene Therapien

- nach vielen Untersuchungen und bildgebender Diagnostik kann das Ausmaß des Tumors und die Operabilität festgestellt werden und daraufhin eine passende Behandlungsmöglichkeit gewählt werden
- die einzige kurative (mit Aussicht auf Heilung) Therapie beim Pankreaskarzinom ist eine chirurgische Resektion von Teilen der Bauchspeicheldrüsen durch eine Operation
- dies ist allerdings nur möglich, wenn keine Metastasen in Lunge und Leber vorliegen und der Tumor kein Kontakt mit umliegenden Gefäßen, wie zum Beispiel der Arteria Aorta, hat
- mögliche Operationen beim Pankreaskarzinom sind der Kausch-Whipple, die Pankreaslinksresektion oder der Doppelbypass
- Chemotherapie wird häufig in Kombination mit einer Operation als Behandlung verwendet

Chemotherapie

- wird in der Praxis eingesetzt, um bösartige Tumorerkrankungen zu behandeln
- dies wird durch sogenannte Zytostatika erreicht, welche in den Vermehrungszyklus eingreifen und somit das Zellwachstum verlangsamen
- die chemotherapeutische Behandlung kann sowohl stationär als auch ambulant stattfinden und wird individuell auf den Patienten abgestimmt
- kann entweder eine kurative oder eine palliative Absicht haben
- zudem kann die Chemotherapie in adjuvante und neoadjuvante Behandlungsmethode unterteilt werden
- die neoadjuvante Therapie wird vor einer möglichen Operation

- durchgeführt um den Tumor zu verkleinern und somit die chirurgische Resektion zu erleichtern
- bei der adjuvanten Therapie erfolgt die Chemotherapie im Anschluss an eine Operation

Folgen und Nebenwirkungen der Chemotherapie

- durch die Zytostatika wird allerdings nicht nur das Tumorwachstum, sondern auch die gesamte Zellteilung des Körpers gehemmt, weshalb es häufig zu vielen Nebenwirkungen und Spätfolgen kommt
- akut auftretende Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit, Durchfall, Haarausfall sowie eine erhöhte Infektionsanfälligkeit des Patienten
- langfristig auftretende Nebenwirkungen sind Osteoporose, eine kognitive Dysfunktion (Störung der Prozesse des Erkennen und Wahrnehmens), Sekundär malignome, Blutgerinnungsstörungen und Organschäden an Leber, Niere und Herz

Forschungsstufen von neuen Wirkstoffen

Vorklinische Studien

- als Erstes muss ein neuer Wirkstoff die vorklinische Phase durchlaufen, welche in theoretische Versuche im Labor und Versuchen an Säugetieren, wie z.B. Nacktmäusen, unterteilt werden kann
- sie liefern erste Hinweise zum Wirkmechanismus, zur Toxizität einer Substanz, zur Verstoffwechslung und zur möglichen Dosierung eines Medikaments
- anhand der Experimente an Kleinsäugetieren soll geprüft werden, ob der Wirkstoff von einem komplexen Organismus aufgenommen und abgebaut werden kann
- nach Vorlage dieser Daten kann er zu klinischen Studien zugelassen werden

Klinische Studien

- erfolgen in vier aufeinanderfolgenden Phasen, deren Ziel es ist die Verträglichkeit und Sicherheit eines Wirkstoffs im menschlichen Körper zu erforschen und zu optimieren
- dazu wird er zuerst an gesunden Probanden getestet um Nebenwirkungen oder Folgeerkrankungen festzustellen
- als Nächstes wird die Dosis anhand der Wirksamkeit im menschlichen Körper optimiert
- folgend wird der Wirkstoff mit bereits eingesetzten Medikamenten verglichen, bevor er im klinischen Alltag zugelassen wird
- schließlich wird er in der Praxis eingesetzt und dort mit anderen Medikamenten kombiniert um eventuelle Wechselwirkungen aufzudecken

Experiment zur Bestimmung der Konzentration und Wirkungsweise von GP 2250

Materialien

- Brutschrank 37° C und 5% Kohlenstoffdioxid
- Sixwell-Platte
- Elektrische Pipette
- 1 ml Pipette
- Sterile Werkbank
- Zentrifuge
- Zentrifugationsröhrchen
- Mikroskop mit Kamera und Bildschirm

Chemikalien

- Trypsin
- Phosphatgepufferte Salzlösung
- Nährmedium
- Ethanol 70%
- Wirkstoff GP 2250

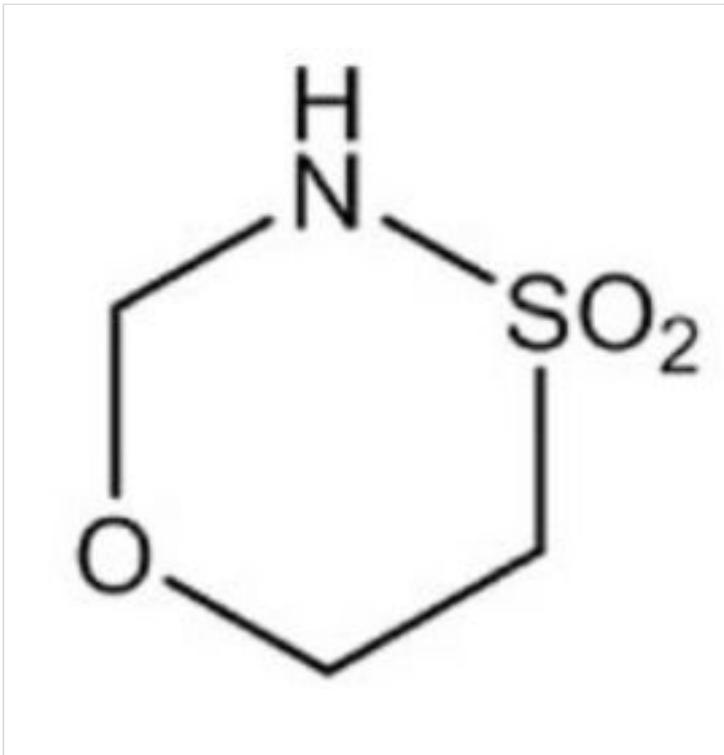
Anmerkungen

Das Experiment wurde im IFL (Institut für Forschung und Lehre) in Bochum am 18.02.2021 durchgeführt. GP 2250 ist aktuell noch nicht im klinischen Alltag angewandt worden, da es zurzeit noch in vorklinischen Forschungsstadien getestet wird. Die Beobachtungen wurden durch eine Kamera, welche im Mikroskop integriert ist, aufgenommen.

Wirkstoff GP 2250 und die Zelllinie Bo80

Substanz GP 2250

- chemische Substanz in Hexamerstruktur
- besteht aus Wasserstoff-, Kohlenstoff- und Stickstoffmolekülen
- wirkt antineoplastisch (gegen Neoplasien gerichtet), weshalb es vielversprechende Aussicht auf die zukünftige Anwendung bei Krebserkrankungen des Pankreas liefert
- gehört zur Gruppe der Oxalthiazin-Derivate



Zelllinie Bo80

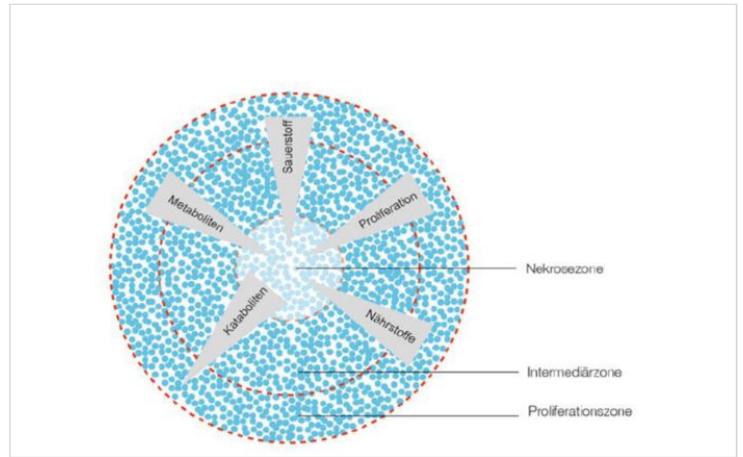
Die im folgenden Experiment verwendete Zelllinie Bo80 wurde aus einem Pankreaskarzinom eines Patienten des St. Josefs Hospitals entnommen und kultiviert.

Monolayer Zellen:

- Monolayer Zellen organisieren sich in der Zellkultur einschichtig
- sie siedelt sich an dem Boden der Sixwell-Platte an und vermehren sich dort
- unter dem Mikroskop sind sie flach im Hintergrund zu erkennen

Sphäroide:

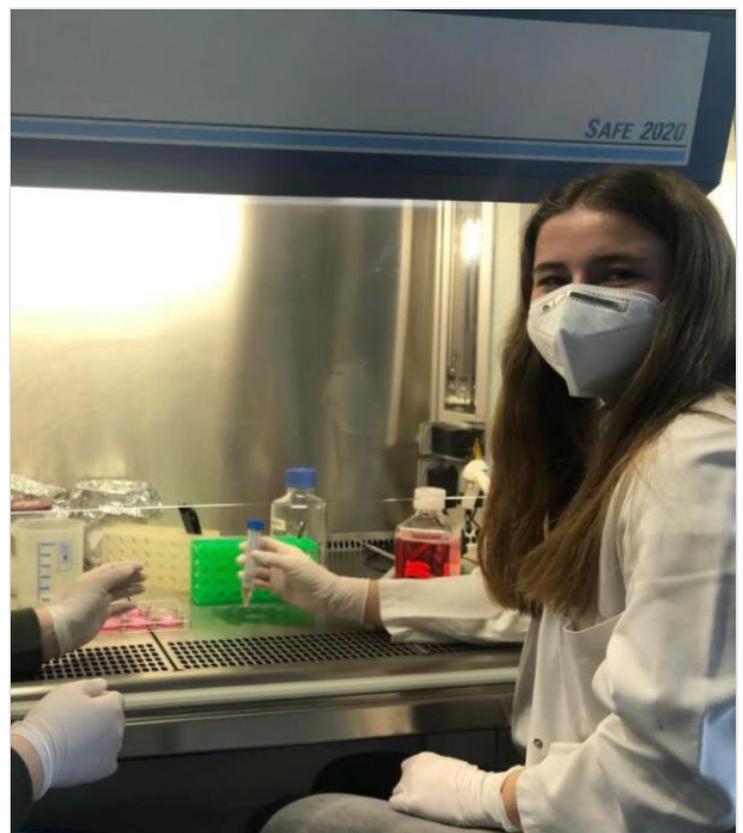
- Sphäroide sind multizelluläre, dreidimensionale, mechanisch stabile Zellaggregate, welche von der selben Zelllinie wie die Monolayer Zellen ausgehen
- damit sie sich nicht am Boden der Sixwell-Platte ansiedeln können, werden sie in sogenannten Low Adhesion Plates ausgesät
- > dadurch schwimmen die Zellen in dem Nährmedium und finden sich zu Zellaggregaten zusammen
- durch Sphäroide können das Tumorwachstum und die Einflüsse der Mikroumgebung besser abgebildet werden
- es werden in dem Experiment zusätzlich Sphäroide verwendet, da sie einem Tumor von der Struktur und Verhalten her ähnlicher sind als die Monolayer Zellen



Vorbereitung

Die sterile Werkbank

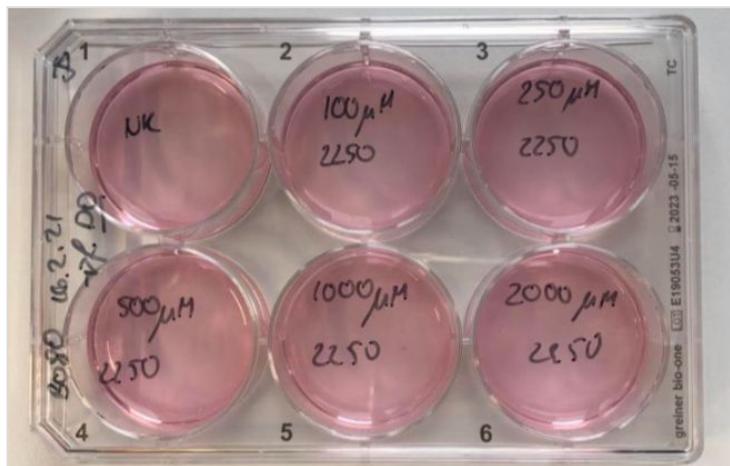
- alle beschriebenen Versuche werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt
- vor dem Benutzen der Werkbank muss diese desinfiziert und vorbereitet werden
- dazu wird sie zunächst für 30 min mit ihrem integrierten UV-Licht bestrahlt
- die Scheibe wird dann zu ein Viertel hochgefahren und der Arbeitsbereich desinfiziert
- alle Arbeitsgegenstände, sowie Handschuhe müssen vorerst mit einem in 70 prozentigen Ethanol getränkten Stofftuch gesäubert werden
- die Werkbank verfügt zudem über ein Lüftungssystem
- dieses verhindert, dass Bakterien oder Pilze von Außen eindringen
- nach Abschluss der Arbeiten erfolgt eine erneute Flächendesinfektion



Spalten der Monolayer Zellen

- Splitten ist ein Prozess zum Vorbereiten der Zellen auf ein Experiment
- die Zellen wurden drei Tage vor Durchführung in einem Nährmedium angesetzt und konnten in einem Brutschrank wachsen
- zunächst wurde das Nährmedium mit einer elektrischen Pipette abgesaugt
- danach wurden die Zellen mit einer Phosphatgepufferten Salzlösung gespült, um sie von bereits toten Zellen zu reinigen
- dann wurde 1 ml Trypsin mit einer Pipette hinzugegeben -> Trypsin ist ein Enzym, welches die Monolayer Zellen, die sich am Boden der Zellen angesiedelt haben, ablöst
- nun schwimmen die Zellen auf dem Nährmedium
- dazu muss die Sixwell-Platte für einige Minuten in den Brutschrank gelegt werden
- um die Reaktion zu stoppen, muss ein neues Nährmedium dazugegeben werden, da die Zellen sonst beschädigt werden
- der gesamte Inhalt der Platte wird dann in ein Zentrifugationsröhrchen gefüllt und für 4 Minuten bei 230 xg (relative Zentrifugalkraft) zentrifugiert
- dadurch setzen sich die Zellen ab und der Überstand kann abgesaugt werden
- die Zellen werden dann in einen neue Sixwell-Platte gefüllt und mit frischen Nährmedium angesetzt

Sixwell-Platte mit Nährmedium und Zellen:



Durchführung

Experiment mit Monolayer Zellen

- nachdem die Zellen in eine Sixwell-Platte mit neuem Medium gefüllt wurden, werden die verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes GP 2250 zubereitet
- es wurden die Konzentrationen 100 µm (Micromolar), 200 µm, 500 µm, 1000 µm und 2000 µm verwendet, um die bestmögliche Konzentration zur Bekämpfung des Karzinoms zu ermitteln
- die Substanz mit der jeweiligen Konzentration wird mit einer Pipette in die Schalen der Sixwell-Platte gefüllt
- zusätzlich wird eine Negativ Kontrolle (NK) angefertigt
- eine NK wird verwendet um die Ergebnisse des Experiments mit dem Zustand der Zellen ohne Medikament zu vergleichen -> zu den Zellen in der NK wird demnach kein Zellgift

hinzugegeben

- nach dem Anfertigen wird die Platte in den Brutschrank gelegt
- in dem Brutschrank herrschen dieselben Voraussetzungen wie im menschlichen Körper (37°C und 5% Kohlenstoffdioxidkonzentration)
- dort werden die Zellen mehrmals kontrolliert und dann nach ca. 6 Stunden mikroskopiert

Experiment mit Sphäroiden

- die Sphäroide werden ebenfalls in eine Sixwell-Platte gefüllt
- dann wurde das identische Zellgift GP 2250 hinzugegeben
- hierfür wurden 500 µm und 1000 µm verwendet
- zusätzlich zu den beiden Konzentrationen wurde auch hier eine NK angefertigt
- die Platte wird nun ebenfalls in dem Brutschrank platziert und kontrolliert sowie nach ca. 6 Stunden mikroskopiert

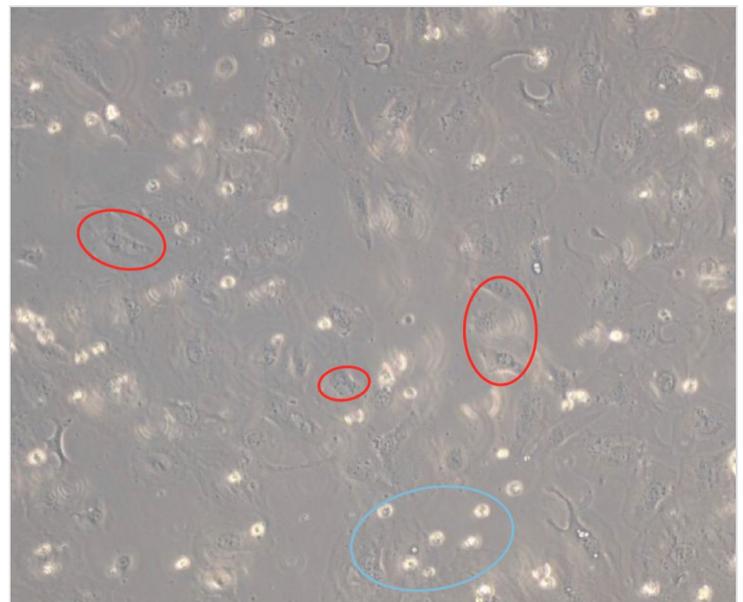
Beobachtungen

Beobachtung der Monolayer Zellen

- abgestorbene Zellen sind unter dem Mikroskop als helle, kleine Kreise zu erkennen, welche im Vordergrund zu sehen sind (im Folgenden werden diese zur Verdeutlichung beispielhaft in blau eingekreist)
- lebende Monolayer Zellen sind flach im Hintergrund zu erkennen (rot)

Negativ Kontrolle

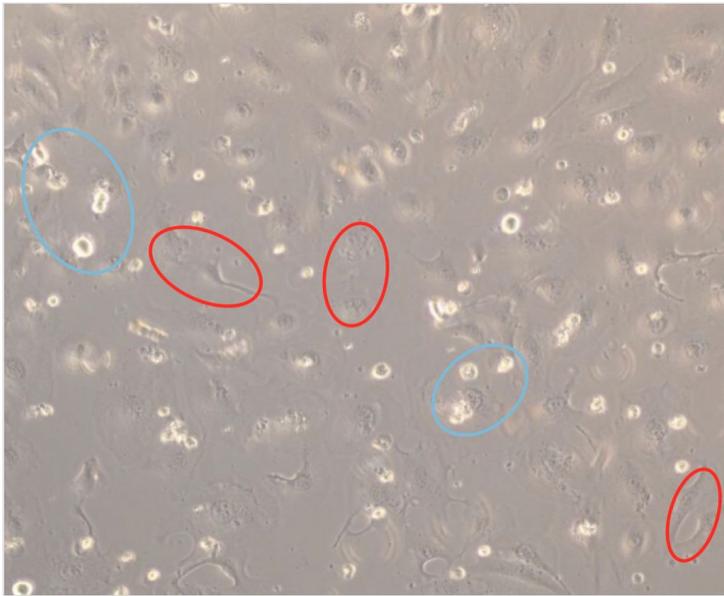
- die NK zeigt sehr wenige tote Zellen, welche im Nährmedium schwimmen und viele vitale Zellen auf dem Plattenboden (da kein Zellgift hinzugegeben wurde)
- das trotzdem einige Zellen abgestorben sind, lässt sich durch den natürlichen Lebenszyklus von Zellen begründen



100 µm

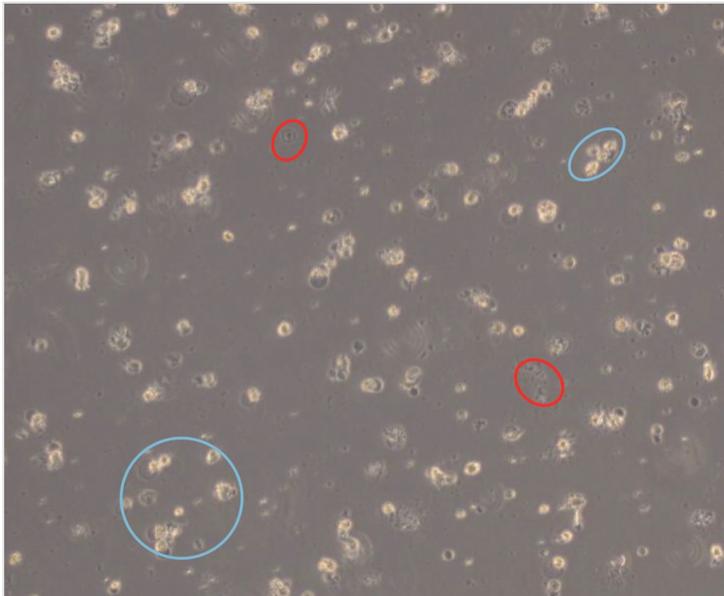
- es sind deutlich mehr avitale Zellen unter dem Mikroskop zu

erkennen



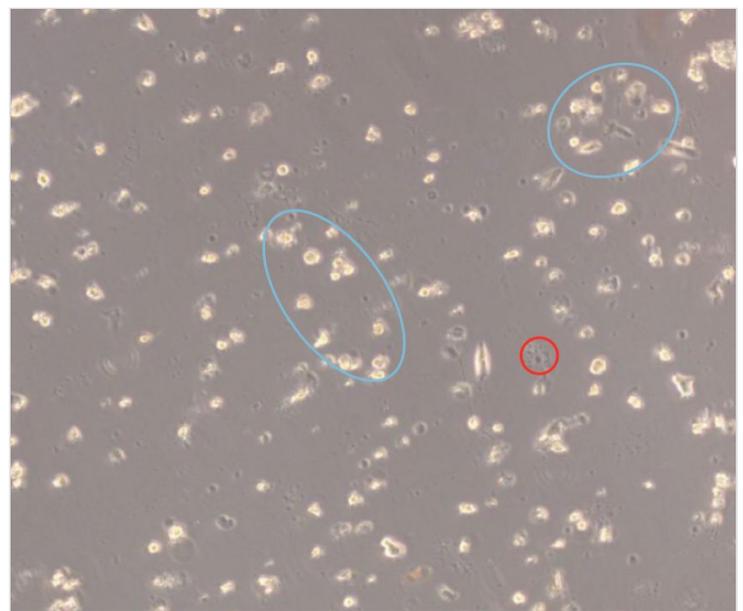
250 μm

- es sind kaum noch lebende Zellen auf dem Boden zu erkennen und überwiegend tote Zellen im Nährmedium



500 μm

- bis auf einige Ausnahmen sind keine vitalen Zellen zu erkennen
- es sind ausschließlich avitale Zellen im Nährmedium, was bedeutet, dass GP 2250 alle Teilungszyklen der Zellen gehemmt und die Zellen abgetötet hat
- da bei einer Konzentration von 500 μm bereits alle Zellen abgestorben sind, wurden keine Untersuchungen zu den Konzentrationen 1000 μm und 2000 μm durchgeführt

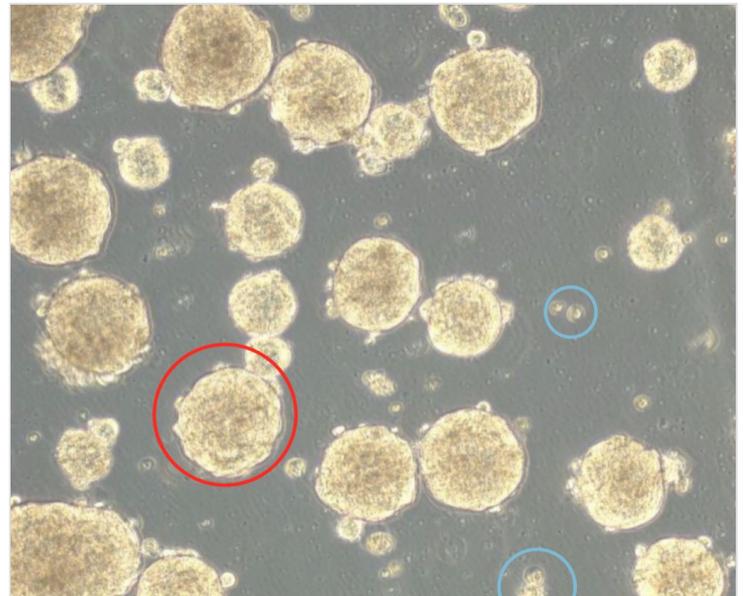


Beobachtung der Sphäroide

- Sphäroide sind als dreidimensionale Zellaggregate zu erkennen, welche mechanisch stabil sind (im Folgenden werden diese zur Verdeutlichung beispielhaft in rot eingekreist) -> diese Stabilität wird im folgenden Experiment durch GP 2250 zerstört
- aus diesem Zellaggregat abgelöste Zellen gelten als avital (blau)

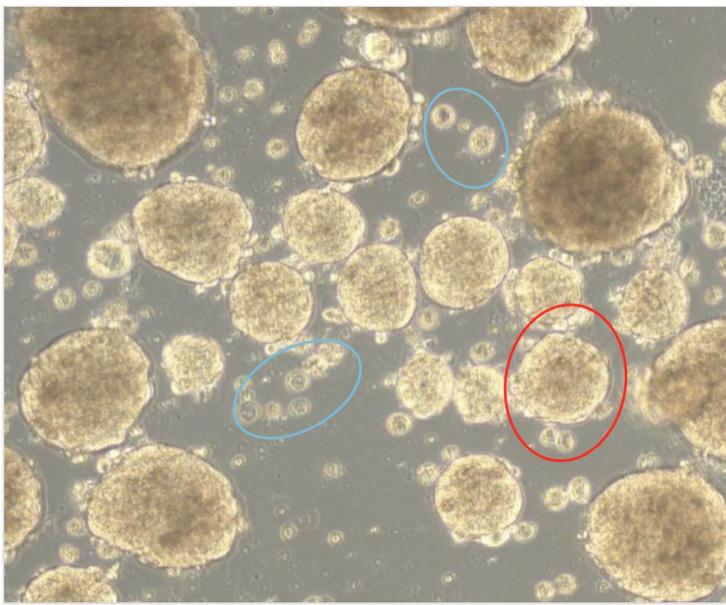
Negativ Kontrolle

- die NK zeigt mehr gut ausgebildete und stabile Sphäroide, welche an ihren glatten Rändern zu erkennen sind
- nur wenige Zellen sind abgestorben, da kein Zellgift hinzugegeben wurde



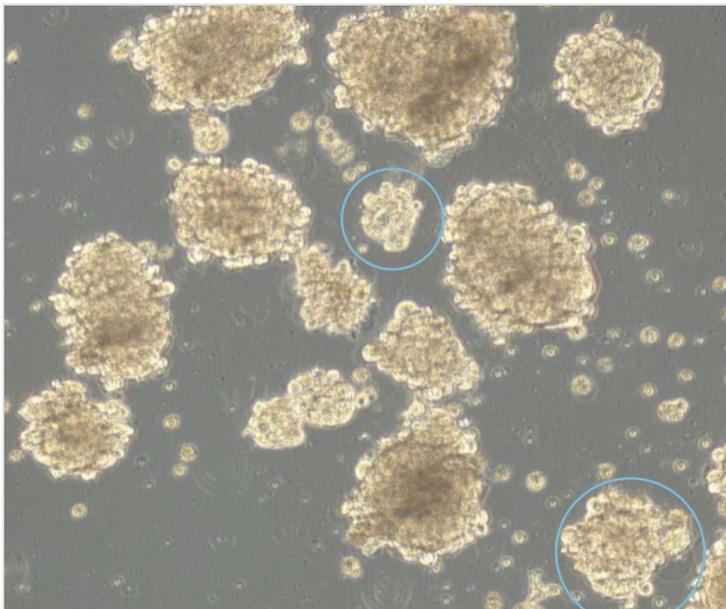
500 μm

- nach der Applikation von 500 μm GP 2250 sind bereits viele Zellen abgestorben, was an den Rändern der Sphäroide und im Nährmedium zu sehen ist
- allerdings sind die Herde der Sphäroide noch nicht abgegriffen worden, weshalb diese Konzentration noch nicht wirksam gegen einen Tumor wäre



1000 µm

- in der Platte mit einer Konzentration von 1000 µm sind überwiegend avitale Zellen zu erkennen
- die stabile Struktur der Sphäroide zerfällt und die Anzahl der avitalen Zellen nimmt stark zu



Fazit des Experiments

Wirkungsweise

- das Experiment hat gezeigt, dass der Wirkstoff GP 2250 die Zellteilung hemmt und die antineoplastische Wirksamkeit mit steigender Konzentration zunimmt
- > dadurch werden die Konzentrationen schnell letal (tödlich)
- die Wirksamkeit lässt sich durch die Sauerstoffradikale erklären:
- die Sauerstoffradikale ist ein für Zellen schädlicher Stoff, welcher durch den Wirkstoff GP 2250 freigegeben wird

Auswertung der Konzentrationen

- für den Versuch mit den Monolayer Zellen konnte herausgefunden werden, dass eine höhere Konzentration als 500 µm nicht nötig ist, da die Zellen bei dieser Konzentration bereits nekrotisch sind
- eine höhere Konzentration hätte demnach in der Praxis unnötige Nebenwirkungen und Spätfolgen ausgelöst
- Konzentrationen von 100 µm und 200 µm reichen nicht aus, um das Karzinom effektiv zu bekämpfen, da zu viele Zellen noch vital sind
- da die Sphäroide in einem Zellverband existieren, sind sie resistenter gegenüber Medikamenten
- das liegt daran, dass der Wirkstoff vorerst die äußeren Zellen des Verbands geschädigt werden
- die Inneren Zellen sind allerdings noch vital, weshalb sich der Tumor zurückbilden kann
- > somit muss für Sphäroide eine deutlich höhere Konzentration verwendet werden
- bei 1000 µm konnte man erkennen, dass auch die inneren Zellen der Sphäroide avital werden und sich aus dem Zellverband lösen
- dadurch wird die Struktur der Sphäroide instabiler und auch der Teilungszyklus der inneren Zellen wird angegriffen
- niedrigere Konzentrationen als 1000 µm sind allerdings nicht ausreichen, da dort nur den äußeren Zellen geschadet wird

Ausblick auf die Zukunft

GP 2250 wird zurzeit noch im Rahmen vorklinischer Studien im Labor getestet. Als nächsten Schritt in der Forschung wird der Wirkstoff dann an Kleinsäugetieren getestet, um zu überprüfen ob er von einem komplexen Organismus aufgenommen und abgebaut werden kann. Dies wird dann zunächst an Mäusen erforscht, indem Krebszellen unter die Haut am Rücken der Mäuse injiziert wird, welche dann mit dem Wirkstoff behandelt werden. Sobald GP 2250 die vorklinischen Studien durchlaufen hat und sich keine relevanten Komplikationen gezeigt haben, wird es zu klinischen Studien zugelassen. Dort wird es dann an gesunden Probanden getestet und schließlich mit anderen eingesetzten Chemotherapeutika kombiniert.

Quellen von Inhalt und Abbildungen

- Alamia, S., Van Der Kuip, H., Heller, R. et al. (2015): 3D-Sphäroidkulturen für die onkologische Wirkstoffforschung, Biospektrum 21, 194-195
- Belyaev, O., Bösch, F., Brunner, M., et al. (2020): Von der deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie konsentrierte Operationsindikationen beim duktalem Pankreasadenokarzinom, Georg Thieme Verlag
- Buchholz, M. (2017): Innovative substance 2250 as a highly promising antineoplastic agent in malignant pancreatic carcinoma - in vitro and in vivo, National Library of Medicine
- Deutsches Krebsforschungszentrum (2019): Krebsforschung und klinische Studien

- Frings, T. (2020): Analyse der pH-Abhängigkeit der antineoplastischen Wirkung unterschiedlicher Oxathiazinderivate anhand von Pankreaskarzinomzellen, Westfälische Hochschule Recklinghausen.
- Peters, I. (2021): Charakterisierung des neuen Wirkstoffs GP-2250 durch Kombination mit etablierten Chemotherapeutika und Analysen des Wirkmechanismus, IFL Bochum.
- RKI (2016): Zentrum für Krebsregisterdaten
- Schloßberger, A., Ditsch, N., Kahlert, S. et al. (2005): Chemotherapie. Onkologie 11, 785- 792
- Schulte, K. (2019): Antineoplastische Charakterisierung der Substanz GP-2250 in Kombination mit dem

- Standardtherapeutikum Gemcitabin in vitro anhand von primären Pankreaskarzinomzellen, Westfälische Hochschule
- Siegfried D., Rae-Dupree J., DuPree P., (2017): Anatomie und Physiologie 3. Auflage, S. 214- 215
 - Stöver I., Feyer P. (2018): Pankreaskarzinom. In: Praxismanual Strahlentherapie. Springer, Berlin, Heidelberg, S.213-219s
 - Tannapfel, A. (2010): Pankreaskarzinom. Pathologie 31, 225–228
 - Uhl, W., Braumann, C. (2020): Bauchspeicheldrüsenerkrankungen akute und chronische Entzündungen sowie Tumore
