

Max-Planck-Gymnasium Dortmund

Kurs: Projektkurs

Lehrer: Herr Möller

Fach: Biologie

Schuljahr 2020/2021



Die Behandlung von Pankreaskarzinomen in der Forschung

Vorgelegt von:

Anna-Laura Kienle



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung, Aufbau und Ziel der Arbeit	1
1.2	Das Pankreas (Bauchspeicheldrüse)	1
1.3	Das Pankreaskarzinom	2
1.4	Symptome	3
1.5	Epidemiologie und Ätiologie	3
2	Diagnostik und Therapie	4
2.1	Diagnostik.....	4
2.2	Operative Therapie	5
2.2.1	Kausch-Whipple	5
2.2.2	Pankreaslinksresektion	6
2.2.3	Doppelbypass.....	6
2.2.4	Folgen nach Entfernung der Bauchspeicheldrüse	7
2.3	Chemotherapie	7
2.3.1	Klinische Anwendung.....	7
2.3.2	Adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie	7
2.3.3	Folgen und Nebenwirkungen.....	8
2.3.4	Chemotherapie in der Forschung	8
3	Experiment zur Bestimmung der Konzentration von GP 2250.....	9
3.1	Materialien	9
3.1.1	Die Substanz GP 2250	10
3.2	Die Zelllinie Bo80.....	10
3.2.1	Monolayer Zellen	10

3.2.2	Sphäroide	10
3.3	Methodik	12
3.3.1	Die sterile Werkbank	12
3.3.2	Splitten der Monolayer Kultur	12
3.4	Durchführung des Experiments	13
3.5	Beobachtungen	15
3.5.1	Monolayer Zellen	15
3.5.2	Sphäroide	18
3.6	Fazit des Experiments	20
4	Zusammenfassung und Ausblick	20
5	Literaturverzeichnis.....	22

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Lage des Pankreas (Quelle: Stöver-Feyer, 2018, S. 214).....	2
Abbildung 2: links: Resektionsbereich (grau dargestellt) und rechts: nach der Resektion (Quelle: Uhl & Braumann, 2020, S.7).....	5
Abbildung 3: links: Resektionsbereich (grau dargestellt) und rechts: nach der Resektion (Quelle: Uhl & Braumann, 2020, S.8).....	6
Abbildung 4: Substanz GP 2250 (Quelle: Frings, 2020, S. 12).....	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Tumorsphäroids (Quelle: Alamia, 2015, S.1)	11
Abbildung 6: Sphäroide unter dem Mikroskop (Quelle: Eigene Darstellung)	11
Abbildung 7: Arbeiten unter der sterilen Werkbank (Quelle: Eigene Darstellung).....	12
Abbildung 8: Durchführung des Splittens (Quelle: Eigene Darstellung)	13
Abbildung 9: Sixwell-Platte mit Beschriftung der jeweiligen Konzentrationen und der Negativ Kontrolle (Quelle: Eigene Darstellung)	14
Abbildung 10: Sixwell Platte unter dem Mikroskop mit Kamera (Quelle: Eigene Darstellung)	15
Abbildung 11: NK der Monolayer Zellen (Quelle: Eigene Darstellung)	16
Abbildung 12: Monolayer Zellen mit 100 µm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)	16
Abbildung 13: Monolayer Zellen mit 250 µm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)	17
Abbildung 14: Monolayer Zellen mit 500 µm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)	17
Abbildung 15: NK der Sphäroide (Quelle: Eigene Darstellung)	18
Abbildung 16: Sphäroide mit 500 µm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)	19
Abbildung 17: Sphäroide mit 1000 µm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)	19

1 Einleitung

1.1 Problemstellung, Aufbau und Ziel der Arbeit

Patienten, welche chemotherapeutisch behandelt werden müssen, erleiden Nebenwirkungen, Folgen und Langzeitschäden. Das liegt daran, dass die Konzentration des Medikaments bei der Chemotherapie häufig eine hohe Konzentration aufweist, damit dem Tumorwachstum entgegengewirkt werden kann. Außerdem ist es notwendig, die Effizienz der Therapien zu steigern, da die Anzahl an Krebsneuerkrankungen stetig ansteigt und Pankreaskarzinome aufgrund der Tumorbiologie eine sehr hohe Mortalitätsrate aufweisen (vgl. Schulte, 2019, S. 1). Deshalb soll nun an dem neu entwickelten Medikament GP 2250 untersucht werden, welche die minimale Konzentration ist, um effektiv gegen Krebs verwendet werden zu können und gleichzeitig möglichst wenig Nebenwirkungen und Spätfolgen hervorzurufen. GP 2250 ist aktuell noch nicht im klinischen Alltag angewandt worden, da es bisher nur im Rahmen vorklinischer Studien im Labor getestet wird (vgl. Schulte, 2019, S. 1).

In dieser Projektarbeit wird zuerst eine thematische Herleitung vorgenommen, in welcher der Aufbau und die Funktion des Pankreas sowie das Pankreaskarzinom beschrieben werden. Folgend werden grundlegende Behandlungsmöglichkeiten eines Pankreaskarzinoms dargelegt. Im zweiten Teil wird dann das selbst durchgeführte Experiment zur Bestimmung einer optimalen Behandlungskonzentration der Substanz GP 2250 mit Materialien, Durchführung und Beobachtung dargestellt. Die Projektarbeit endet mit einer Zusammenfassung und einem Ausblick.

1.2 Das Pankreas (Bauchspeicheldrüse)

Das Pankreas kann anatomisch in drei Abschnitte unterteilt werden: den Pankreaskopf, den Pankreaskörper und den Pankreasschwanz (siehe Abbildung 1). Die Bauchspeicheldrüse ist ein querliegendes Drüsenorgan und befindet sich im Oberbauch hinter dem Bauchfell und vor der Wirbelsäule. Sie ist ca. 15 cm lang, 3-4 cm breit und 0,5-1,5 cm dick. Bei erwachsenen Menschen erreicht das Pankreas ein Gewicht von ca. 80 g. Das Organ ist in Läppchen gegliedert, welche auch die Oberfläche charakteristisch strukturieren. Als angrenzende Organe lassen sich Milz, Leber, Gallenblase, Zwölffingerdarm und Magen erkennen (vgl. Frings, 2020, S. 8).

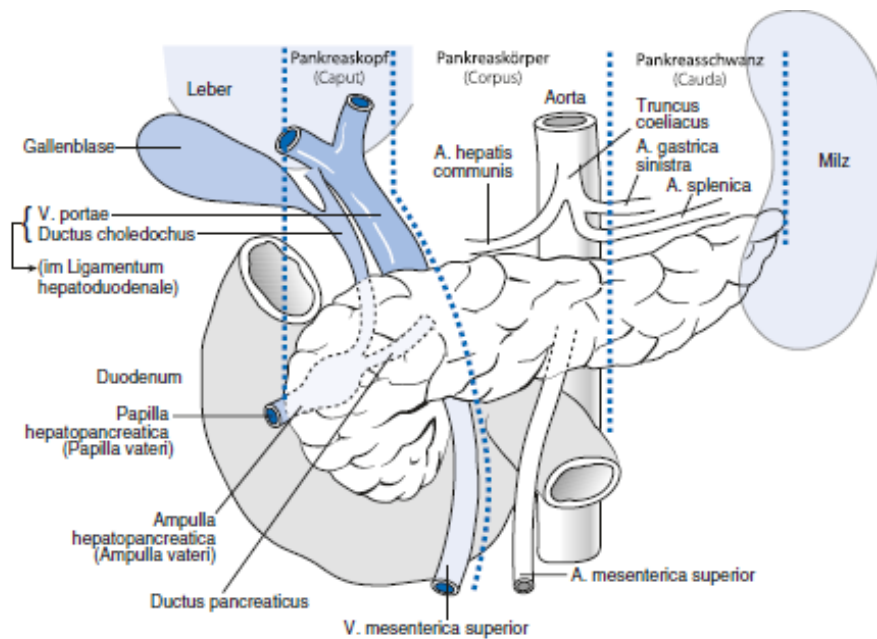


Abbildung 1: Anatomische Lage des Pankreas (Quelle: Stöver-Feyer, 2018, S. 214)

Zudem kann die Bauchspeicheldrüse in zwei wesentliche Drüsen unterteilt werden, welche die beiden Hauptfunktionen beschreiben (vgl. Siegfried et al., 2017, S. 214). Zum einen gibt es die exokrine Funktion, beziehungsweise die exokrine Drüse, welche essentiell für die Verdauung ist, da sie vielzählige Verdauungsenzyme in Form von Pankreassaften an den Zwölffingerdarm abgibt, um dort Kohlenhydrate, Fette und Proteine zu spalten.

Zum anderen gibt es die endokrine Funktion, beziehungsweise die endokrine Drüse, welche für die Bildung der Hormone Insulin und Glucagon und anderen zuständig ist, welche direkt in den Blutstrom abgegeben werden. Die Hormone werden durch die sogenannten Langerhans-Inseln gebildet. Insulin und Glucagon sind am Erhalt des Blutzuckerspiegels beteiligt (vgl. Siegfried et al., 2017, S. 214). Bei einer Schädigung der Funktion der Langerhans-Inseln kann ein Diabetes mellitus entstehen (vgl. Frings, 2020, S. 8).

1.3 Das Pankreaskarzinom

Bei der Entstehung von Krebs sind Mutationen des Erbguts einzelner Zellen vorhanden. Dadurch entsteht ein unkontrolliertes Zellwachstum. Es findet kein regulärer Zelltod mehr statt. Die Krebszellen können sich dann über die Blut- und Lymphgefäße ausbreiten und somit in andere Organe eindringen, wo sie daraus Metastasen bilden (vgl. Uhl & Braumann, 2020, S. 6).

Als Pankreaskarzinom bezeichnet man eine bösartige Krebserkrankung des endokrinen oder exokrinen Pankreas. Pankreaskarzinome betreffen in 60% der Fälle den Pankreaskopf,

in 10% der Fälle den Corplusbereich und in weiteren 10% den Pankreasschwanz. 20% der Karzinome betreffen das gesamte Organ. Die meisten Karzinome des Pankreas sind duktale Adenokarzinome mit einer Häufigkeit von 80-90%. Diese gehen aus den Epithelien des Pankreasganges hervor. Fernmetastasen treten relativ frühzeitig auf. Betroffen sind hauptsächlich Leber, Lunge, Bauchfell und Knochen (vgl. Frings, 2020, S. 9).

1.4 Symptome

Häufig wird Bauchspeicheldrüsenkrebs erst relativ spät erkannt, da es keine regelmäßigen und verlässlichen Vorsorgeuntersuchungen gibt und die Symptome zu unspezifisch sind. Zu den Symptomen zählen Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit. Zudem empfinden manche Patienten Schmerzen im Oberbauch sowie Rücken. Bei Tumoren des Pankreaskopfes kommt es häufig zu einer Störung des Gallenabflusses, dunklem Urin, hellem Stuhl und unstillbarem Hautjucken, welche als Gelbsucht bekannt ist. Diese entsteht, da der Gallengang von dem Krebs verschlossen wird. Dadurch wird die Galle in die Leber zurückgestaut. Es kann außerdem eine Blutzuckerkrankheit entstehen, wenn die endokrine Funktion des Pankreas gestört ist (vgl. Uhl & Braumann, 2020, S. 6).

1.5 Epidemiologie¹ und Ätiologie²

Die Inzidenz von Bauchspeicheldrüsenkrebs liegt in Deutschland bei ca. 5 - 10 Erkrankten pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Männer sind etwas häufiger betroffen. Pankreaskarzinome sind die vierthäufigste malignombedingte Todesursache in Deutschland. Der Altersgipfel der Erkrankten liegt zwischen dem 65. und dem 75. Lebensjahr (vgl. Stöver & Feyer, 2018, S. 214). Insgesamt ist die Prognose sehr schlecht, da das Tumorwachstum aggressiv und früh metastasierend sowie die Symptomatik meist unspezifisch ist und spät auftritt (vgl. Stöver & Feyer, 2018, S. 219). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei 9% und die relative 10-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei nur 7% (vgl. RKI, 2016). In 2016 erkrankten ca. 18.400 Menschen in Deutschland an Bauchspeicheldrüsenkrebs.

Das Pankreaskarzinom weist zudem eine der niedrigsten Überlebensraten unter allen Krebserkrankungen auf (vgl. RKI, 2016). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind nur 20% aller Patienten operabel, 40% weisen bereits lokal fortgeschrittene Tumorerkrankungen und

¹ Lehre der Verbreitung

² Lehre der Ursachen

Metastasen auf. Patienten mit einem operablen Tumor haben eine mittlere Überlebenszeit von 15-19 Monaten, wohingegen Patienten mit einem bereits fortgeschrittenen Tumor nur 6-10 Monate Überlebenszeit aufweisen und Patienten mit Fernmetastasen haben statistisch nur 3- 6 Monate (vgl. Tannapfel, 2010, S.227).

Die Wahrscheinlichkeit, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, wird durch genetische Dispositionen, übermäßiges Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus, häufigem Alkoholkonsum, durch eine langjährige chronische Pankreatitis³, sowie durch eine Cholezystektomie⁴ oder eine Gastrektomie⁵ erhöht (vgl. Stöver & Feyer, 2018, S. 214). 20% aller Pankreaskarzinome haben einen erblichen Hintergrund, wobei die häufigsten Mutationen die Tumorsuppressorgene p16 und p53, sowie K-ras oder BRCA1 und 2 betreffen. 5-10% weisen zudem eine positive Familienanamnese auf (vgl. Tannapfel, 2010, S. 225).

2 Diagnostik und Therapie

2.1 Diagnostik

Zu Beginn werden eine Anamnese und eine körperliche Untersuchung durchgeführt, bevor bildgebende Verfahren erfolgen. Zudem wird ein Routinelabor angeordnet, wobei zu beachten ist, dass Karzinome unter 2 cm meist zu keiner Verschiebung der Blutwerte führen. Typische Tumormarker sind CEA und CA 19-9. Daraufhin werden eine Sonografie des Abdomens und eine Endsonografie⁶, sowie eine CT und MRT des Abdomens, beziehungsweise des Beckens und eine CT des Thorax durchgeführt (vgl. Stöver & Feyer, 2018, S. 215). Anhand dieser Verfahren kann der Grad der Metastasierung, das Stadium der Krebserkrankung und die Operabilität festgestellt werden und daraufhin eine passende

³ Entzündung der Bauchspeicheldrüse

⁴ Gallenblasenentfernung

⁵ Entfernung des Magens

⁶ Von innen durchgeführter Ultraschall

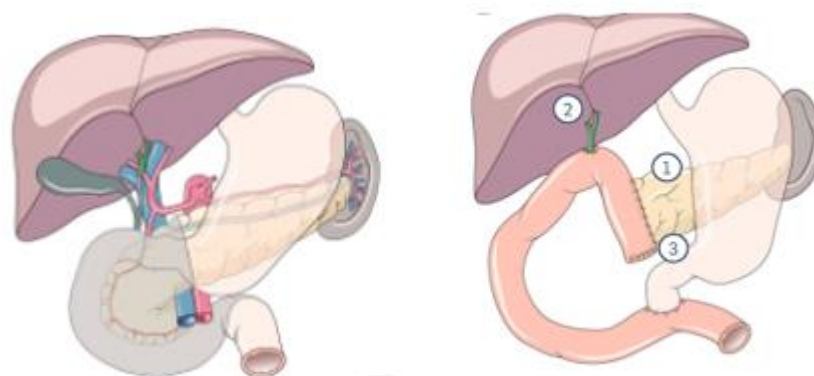
Therapie gewählt werden. Bei einem operablen Befund muss außerdem eine Biopsie⁷ des Karzinoms durchgeführt werden (vgl. Stöver & Feyer, 2018, S. 216).

2.2 Operative Therapie

Die chirurgische Resektion von Teilen der Bauchspeicheldrüse ist die einzige kurative Therapie beim Pankreaskarzinom (vgl. Belyaev et al., 2020, S. 362). Diese ist allerdings nur möglich, wenn keine Metastasen entstehen und kein Kontakt des Tumors mit umliegenden Gefäßen, wie zum Beispiel der Arteria mesenterica superior aorta, vorliegt (Uhl & Braumann, 2020, S. 7).

2.2.1 Kausch-Whipple

Die Whipple-Operation nach Dr. Kausch wird durchgeführt, wenn sich der Tumor im Pankreaskopf befindet. Dazu wird ein Teil des Gallengangs, der Zwölffingerdarm und die Gallenblase entfernt (siehe Abbildung 2). Wenn zusätzlich ein Teil des unteren Magens entfernt werden muss, spricht man von einem „klassischen Whipple“ (vgl. Uhl & Braumann, 2020, S. 7).



**Abbildung 2: links: Resektionsbereich (grau dargestellt) und rechts: nach der Resektion
(Quelle: Uhl & Braumann, 2020, S.7)**

Die Operation kann in Resektion und Rekonstruktion aufgeteilt werden. Für die Resektion, also die Entfernung der Organe, erfolgt ein langer, quer verlaufender Schnitt im Oberbauch. Bei der Rekonstruktion muss die Funktion der Magen-Darm-Passage wiederhergestellt werden. Hierfür wird das Pankreas mit dem Dünndarm vernäht (siehe 1 in Abbildung 2) und

⁷ Chirurgischer Eingriff zur Entnahme und Untersuchung einer kleinen Menge von Gewebe aus einem lebenden Organismus

der Stumpf des Gallengangs mit dem Darm (2). Der Magenpforter wird anschließend an den absteigenden Dünndarm angeschlossen (3). Zuletzt wird die Operationswunde mit Nähten geschlossen. Der Eingriff dauert ungefähr fünf bis sechs Stunden und wird unter Vollnarkose durchgeführt (vgl. Uhl & Braumann, 2020, S.7).

2.2.2 Pankreaslinksresektion

Die Pankreaslinksresektion wird durchgeführt, wenn sich der Tumor im Pankreaskörper oder Pankreasschwanz befindet. Bei dieser Operation werden das linksseitige Pankreas, die Milz und die umgebenden Lymphknoten entfernt (siehe Abbildung 3). Dabei bestimmt die Ausdehnung des Tumors die Größe des entfernten Bauchspeicheldrüsenanteils. Zur Rekonstruktion wird der Rest der Bauchspeicheldrüse an den Darm angeschlossen. Die Operation dauert ungefähr drei bis vier Stunden und wird unter Vollnarkose durchgeführt (vgl. Uhl & Braumann, 2020, S.8).

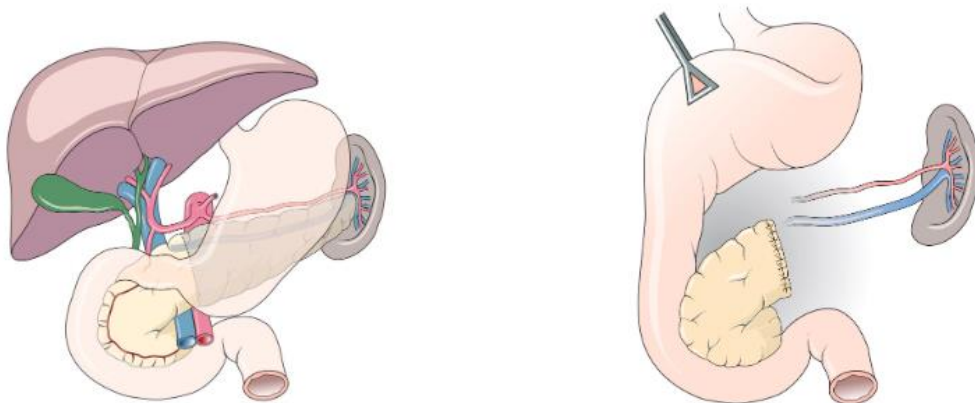


Abbildung 3: links: Resektionsbereich (grau dargestellt) und rechts: nach der Resektion
(Quelle: Uhl & Braumann, 2020, S.8)

2.2.3 Doppelbypass

Im Vordergrund dieser Operation steht die Symptomlinderung, da der Tumor schon fortgeschritten ist. Demnach hat sie eine palliative Absicht. Der Doppelbypass erfolgt, um eine Galleableitung herzustellen, damit die Symptome der Gelbsucht zurückgehen. Diese Galleableitung kann entweder endoskopisch durchgeführt werden, indem ein Stent in den Gallengang eingesetzt wird, oder operativ, indem ein Dünndarmabschnitt mit den Gallenwegen vernäht wird (vgl. Uhl & Braumann, 2020, S. 9).

2.2.4 Folgen nach Entfernung der Bauchspeicheldrüse

Eine Operation an der Bauchspeicheldrüse kann zu einer Blutzuckerkrankheit führen, wofür dann in manchen Fällen die Gabe von Insulin notwendig ist. Unter Umständen werden weniger Verdauungsenzyme produziert. Es können Blähungen und Durchfall entstehen. In diesem Fall sollten Bauchspeicheldrüsenenzyme als Kapseln zu den Mahlzeiten eingenommen werden, zum Beispiel Kreon oder Pankreozymin. Die Dosierung hängt von der Zusammensetzung der Nahrung und dem Beschwerdebild des Patienten ab (vgl. Uhl & Braumann, 2020, S. 10).

2.3 Chemotherapie

2.3.1 Klinische Anwendung

Die Chemotherapie wird eingesetzt, um bösartige Tumorerkrankungen zu behandeln. Dies wird durch sogenannte Zytostatika⁸ erreicht, welche in den Vermehrungszyklen der Zellen eingreifen und somit das Tumorwachstum hemmen (vgl. Peters, 2021, S. 3). Allerdings wird durch die Zytostatika nicht nur das Tumorwachstum, sondern auch die gesamte Zellteilung des Körpers gehemmt, weshalb es zu vielen Nebenwirkungen und Spätfolgen kommt. Die chemotherapeutische Behandlung kann sowohl stationär als auch ambulant stattfinden und wird individuell auf den Patienten abgestimmt (vgl. Peters, 2021, S.3).

Die Chemotherapie kann entweder eine kurative oder eine palliative Absicht haben. Wenn das Ziel ist, den Patienten von einer Krebserkrankung zu heilen, wird von einer kurativen Absicht gesprochen. Wenn eine Heilung allerdings nicht möglich ist, dient die palliative Chemotherapie dazu, Beschwerden zu lindern und das Überleben des Patienten zu verlängern (vgl. Peters, 2021, S. 3).

2.3.2 Adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie

Die kurative Behandlungsmethode kann in die neoadjuvante und die adjuvante Chemotherapie unterteilt werden. Bei der neoadjuvanten Therapie wird vor einer Operation eine Chemotherapie vorgenommen, um den Tumor zu verkleinern. Dadurch wird eine leichtere chirurgische Resektion erzielt (vgl. Frings, 2020, S. 11).

⁸ Chemische Substanz, welche die Entwicklung und Vermehrung schnell wachsender Zellen verlangsamt

Bei der adjuvanten Chemotherapie hingegen erfolgt eine Behandlung im Anschluss an die Operation. Oftmals wird dadurch ein Erliegen des Tumorwachstums für eine gewisse Zeit erreicht. Bei manchen Patienten wird eine Verkleinerung des Pankreaskarzinoms, eine Linderung der Schmerzen und eine Verhinderung des für Krebserkrankungen charakteristischen Gewichtsverlustes bewirkt (vgl. Frings, 2020, S. 11).

2.3.3 Folgen und Nebenwirkungen

Häufige akut auftretende Nebenwirkungen einer chemotherapeutischen Behandlung sind Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit, Durchfall, Haarausfall sowie eine erhöhte Infektionsanfälligkeit des Patienten (vgl. Frings, 2020, S. 12). Außerdem liegen langfristig auftretende Nebenwirkungen vor, wie zum Beispiel Osteoporose⁹, kognitive Dysfunktion¹⁰, Sekundärmalignome¹¹, Blutgerinnungsstörung und Organschäden an Leber, Niere und Herz (vgl. Schloßberger, 2005, S. 787).

2.3.4 Chemotherapie in der Forschung

Bevor ein neuer Wirkstoff in klinischen Studie am Menschen geprüft werden kann, müssen die grundlegenden Eigenschaften im Labor untersucht werden. Diese vorklinischen Studien liefern erste Hinweise zum Wirkmechanismus, zur Toxizität einer Substanz, zur Verstoffwechslung und zur möglichen Dosierung eines späteren Medikaments. Der Wirkstoff muss anschließend an Tiermodellen geprüft werden. Anhand der Experimente an Kleinsäugetieren soll die Aufnahme und der Abbau eines neuen Wirkstoffes überprüft werden. Nach Vorlage aller Daten kann er zu klinischen Studien zugelassen werden.

Klinische Studien erfolgen in vier aufeinanderfolgenden Phasen, deren Ziel es ist, die Sicherheit und Verträglichkeit eines Wirkstoffs im menschlichen Körper zu erforschen und zu optimieren. Zunächst wird der Wirkstoff an gesunden Probanden geprüft, um eventuelle Nebenwirkungen oder Folgeerkrankungen zu ermitteln. Anschließend erfolgen der Nachweis der therapeutischen Wirkung und die Ermittlung einer geeigneten Dosis. Dann wird gezeigt, ob der Wirkstoff praxistauglich ist und wie er sich im Vergleich zu bereits eingesetzten Medikamenten verhält. Schließlich wird das Medikament in der Therapie

⁹ Knochenschwund

¹⁰ Störung der Kognition (Prozesse des Wahrnehmens und Erkennens)

¹¹ Zweittumore

angewendet, um Wechselwirkungen mit kombinierten Medikamenten aufzudecken (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2019).

3 Experiment zur Bestimmung der Konzentration von GP 2250

Das Experiment wurde am 18.02.2021 im IFL (Institut für Forschung und Lehre) im Rahmen einer vorklinischen Studie am St. Josef-Hospital in Bochum durchgeführt. Ziel des Experiments war es, die Konzentration der Substanz GP 2250 anhand der antineoplastischen¹² Wirksamkeit zu optimieren.

3.1 Materialien

Folgende Materialien sowie Chemikalien werden in dem durchgeführten Experiment verwendet:

Materialien:

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

Chemikalien:

- Trypsin (siehe 3.3.2)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (siehe 3.3.2)
- Nährmedium (siehe 3.3.2)
- Ethanol 70%
- GP 2250 (siehe 3.1.1)

¹² Gegen Neoplasien (maligne Tumorzellen) gerichtet

3.1.1 Die Substanz GP 2250

Die Substanz GP 2250 besteht strukturell aus einer Hexamerstruktur, welche Stickstoff-, Sauerstoff-, und Schwefelatome beinhaltet (siehe Abbildung 4). Sie gehört zur Gruppe der Oxathiazin-Derivate (vgl. Frings, 2020, S. 14). Durch ihr antineoplastisches Potenzial sowie ihre Wirkungsweise liefert die Substanz GP 2250 vielversprechende Aussichten auf die zukünftige Anwendung bei Krebserkrankungen des Pankreas (vgl. Buchholz, 2017, S. 1).

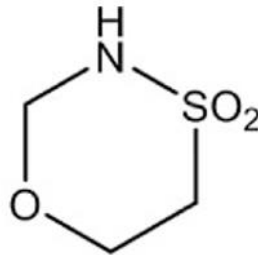


Abbildung 4: Substanz GP 2250 (Quelle: Frings, 2020, S. 12)

3.2 Die Zelllinie Bo80

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

3.2.1 Monolayer Zellen

Monolayer Zellen organisieren sich in der Zellkultur einschichtig. Sie lagern sich auf dem Boden der Sixwell-Platte an und vermehren sich dort (vgl. Schulte, 2019, S. 6). Unter dem Mikroskop sind sie flach im Hintergrund zu erkennen.

3.2.2 Sphäroide

Sphäroide sind multizelluläre, dreidimensionale, mechanisch stabile Zellaggregate. Sie gehen von derselben Zelllinie wie die zuvor beschriebenen Monolayer Zellen aus, werden aber anders kultiviert (siehe Abbildung 5).

Damit sie sich nicht am Boden der Petrischale ansiedeln können, werden sie in sogenannten Low Adhesion Plates ausgesät. Low Adhesion Plates besitzen eine mit Hydrogel beschichtete Oberfläche, sodass ionische und hydrophobe Wechselwirkungen entstehen. Unter diesen Bedingungen bilden einige Zelllinien dann Sphäroide aus, welche im Nährmedium schwimmen. Vor der Verwendung der Sphäroide wird eine Passagierung durchgeführt. Dafür werden die angesetzten Sphäroide durch ein Zellsieb gegeben,

wodurch eine Selektion erfolgt, da nur Aggregate mit einer gewissen mechanischen Stabilität weiterverwendet werden (vgl. Frings, 2020, S. 14).

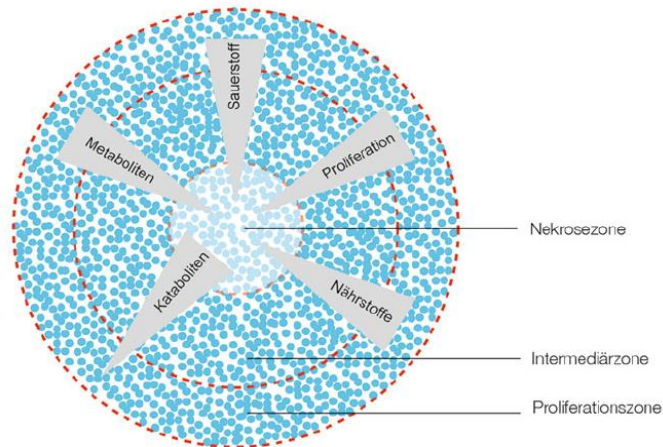


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Tumorsphäroids (Quelle: Alamia, 2015, S.1)

Einflüsse der Mikroumgebung und auf das Tumorwachstum, insbesondere in frühen Stadien und Metastasen können durch das dreidimensionale Wachstum der Sphäroide besser abgebildet werden (vgl. Frings, 2020, S. 14). Deshalb haben sie seit vielen Jahren eine hohe Bedeutung in der Forschung nach Medikamenten und einer Behandlung gegen Krebs (vgl. Alamia, 2015, S. 2). Unter dem Mikroskop sind sie als dreidimensionale Zellaggregate mit glatten Rändern zu erkennen (siehe Abbildung 6).

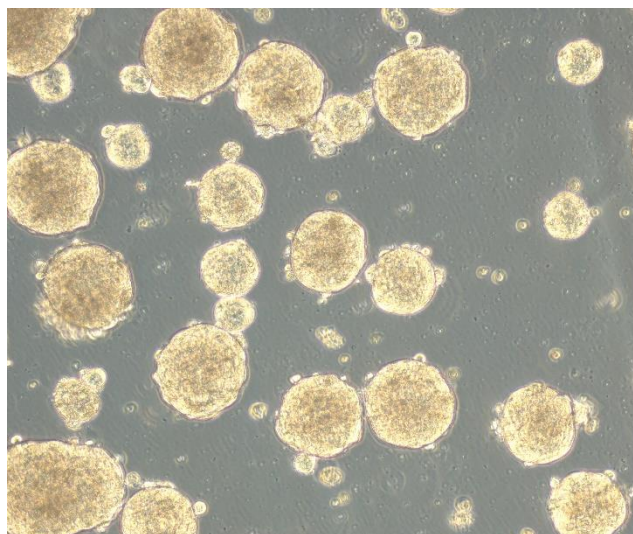


Abbildung 6: Sphäroide unter dem Mikroskop (Quelle: Eigene Darstellung)

3.3 Methodik

3.3.1 Die sterile Werkbank

Alle im folgenden Teil beschriebenen Versuche und Untersuchungen werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt (siehe Abbildung 7). Vor dem Benutzen wird die Bank für 30 Minuten mit in ihr integriertem UV-Licht bestrahlt. Danach wird die Scheibe zu ca. einem Viertel hochgefahren. Alle Arbeitsgegenstände und der Arbeitsbereich unter der Werkbank werden mit einem in 70 prozentigen Ethanol getränkten Stofftuch desinfiziert. Außerdem müssen Handschuhe getragen werden, welche ebenfalls desinfiziert werden. Die Werkbank verfügt zudem über ein Lüftungssystem, welches verhindert, dass Bakterien oder Pilze von außen eindringen. Nach Abschluss der Arbeiten erfolgt eine erneute Flächendesinfektion. Abschließend wird die Glasscheibe vollständig verschlossen und die Werkbank ausgeschaltet.



Abbildung 7: Arbeiten unter der sterilen Werkbank (Quelle: Eigene Darstellung während des Experiments)

3.3.2 Splitten der Monolayer Kultur

Drei Tage vor Durchführung des Experiments wurden die Zellen in einem Nährmedium angesetzt und konnten im Brutschrank wachsen. Sie wurden gesplittet, als ein gleichmäßiger Zellrasen vorlag. Als erstes wurde das Nährmedium mit einer elektrischen

Pipette abgesaugt, bis keine Flüssigkeit mehr auf der Platte vorhanden war. Dann wurden die Zellen mit 1 ml PBS¹³ abgespült und geschwenkt, sodass der komplette Boden der Platte gespült worden ist, bevor 1ml Trypsin hinzugegeben wurde. Trypsin ist ein Enzym, das die Monolayer Zellen, welche sich am Boden der Sixwell-Platte angesiedelt haben, vom Boden ablöst. Dazu musste die Platte bei 37° C Umgebungstemperatur in den Brutschrank gelegt werden. Um diese Reaktion zu stoppen, musste nach einigen Minuten ein neues Nährmedium hinzugegeben werden, da die Zellen sonst geschädigt werden würden. Die Dauer der Reaktion ist von den Zelllinien abhängig und benötigt demnach unterschiedlich viel Zeit. Dazu wurde 1ml von dem Nährmedium verwendet. Der gesamte Inhalt der Platte wurde dann in ein 50ml Zentrifugationsröhrchen gefüllt (siehe Abbildung 8) und anschließend vier Minuten bei 230 xg¹⁴ zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand erneut mit einer elektrischen Pipette abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert¹⁵.

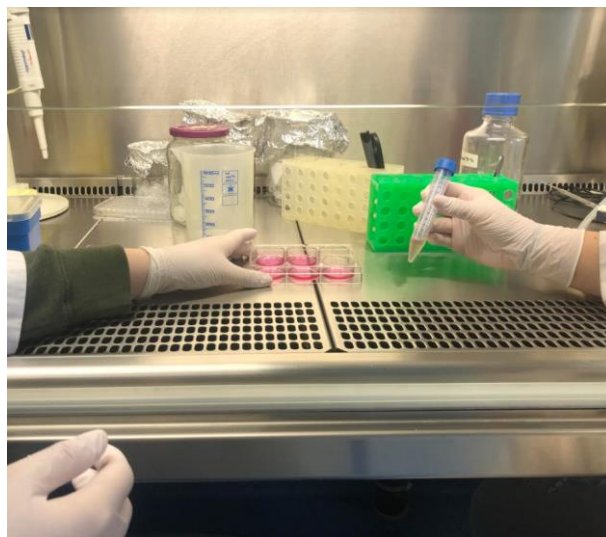


Abbildung 8: Durchführung des Splittens (Quelle: Eigene Darstellung)

3.4 Durchführung des Experiments

Nach dem Splitten und Vorbereiten des Labors wurden die Monolayer Zellen in eine Sixwell-Platte mit 1 ml Nährmedium gefüllt. In diese wird dann die Substanz GP 2250 hinzugegeben. Es wurden die Konzentrationen 100 μm^{16} , 250 μm , 500 μm , 1000 μm und

¹³ Phosphatgepufferte Salzlösung zum Reinigen von Zellkulturen

¹⁴ Relative Zentrifugalkraft

¹⁵ Neu angesetzt

¹⁶ Micromolar

2000 μm verwendet, um die bestmögliche Konzentration zur Bekämpfung des Tumorwachstums zu ermitteln (siehe Abbildung 9).

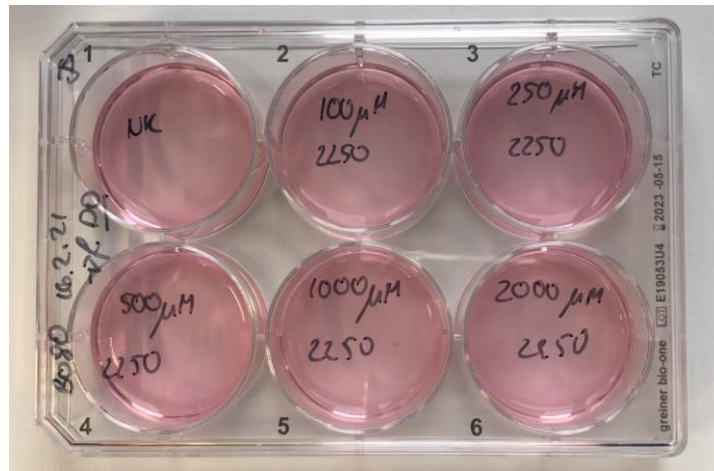


Abbildung 9: Sixwell-Platte mit Beschriftung der jeweiligen Konzentrationen und der Negativ Kontrolle (Quelle: Eigene Darstellung)

Das Experiment wurde dann erneut mit einem anderen Zelltyp, den Sphäroiden, durchgeführt, da diese das Tumorwachstum und die Struktur eines Tumors besser darstellen und die Ergebnisse genauer abbilden. Ziel ist es, die theoretischen Ergebnisse im Labor in der fortlaufenden Forschung besser auf die Praxis anwenden zu können.

Dafür wurden die zuvor angereicherten Sphäroide ebenfalls in eine Sixwell-Platte mit 1 ml Nährmedium gefüllt. Danach wurde das identische Zellgift mit den Konzentrationen 500 μm und 1000 μm zu den Sphäroiden gegeben. Zusätzlich wurden zu beiden Zelltypen jeweils eine Negativ Kontrolle angefertigt, welche im Verlauf mit NK abgekürzt wird. Zu den Zellen, welche als NK dienen, wird demnach kein Wirkstoff hinzugegeben. Die NK ist dafür da, die Auswirkungen des Medikaments direkt mit den nicht behandelten Zellen zu vergleichen. Sie zeigt also den Zustand der beiden Zelltypen ohne Medikament an.

Beide Platten wurden in den Brutschrank gestellt, in welchem dieselben Voraussetzungen gelten wie im menschlichen Körper, da es 37° C warm ist und eine Kohlenstoffdioxidkonzentration von 5% vorliegt. Nach einer und nach drei Stunden wurden die Zellen beobachtet und die Veränderungen mit dem Mikroskop überprüft. Nach ca. sechs Stunden wurden die Zellen erneut aus dem Brutschrank entnommen und mikroskopiert. In dem Mikroskop befindet sich eine integrierte Kamera, sodass es möglich ist, Fotos von den Zellen in der Sixwell-Platte durch das Mikroskop zu machen, welche in

den Beobachtungen zu sehen sind (siehe Abbildung 10). Dadurch können die Ergebnisse objektiv erfasst werden.

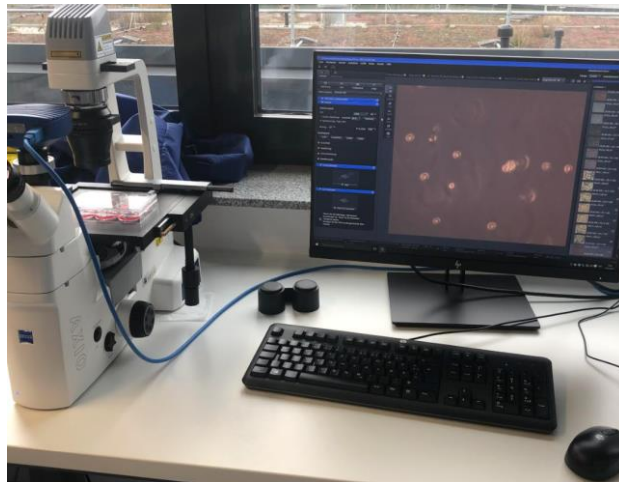


Abbildung 10: Sixwell Platte unter dem Mikroskop mit Kamera (Quelle: Eigene Darstellung)

3.5 Beobachtungen

3.5.1 Monolayer Zellen

Nach sechs Stunden im Brutschrank konnte man für die Monolayer Zellen folgende Ergebnisse feststellen:

Abgestorbene Zellen sind unter dem Mikroskop als helle, kleine Kreise zu erkennen, welche im Vordergrund zu sehen sind. Dieser Vordergrund bedeutet, dass die Zellen auf dem Nährmedium schwimmen, da sie sich vom Boden ablösen, sobald sie absterben. Lebende Monolayer Zellen sind flach im Hintergrund zu erkennen.

Die NK zeigt sehr wenig avitale Zellen, welche im Nährmedium schwimmen. Auf dem Boden der Sixwell-Platte sind viele vitale Zellen zu erkennen, da kein Zellgift hinzugegeben wurde (siehe Abbildung 11). Die Rate an avitalen Zellen ist physiologisch.

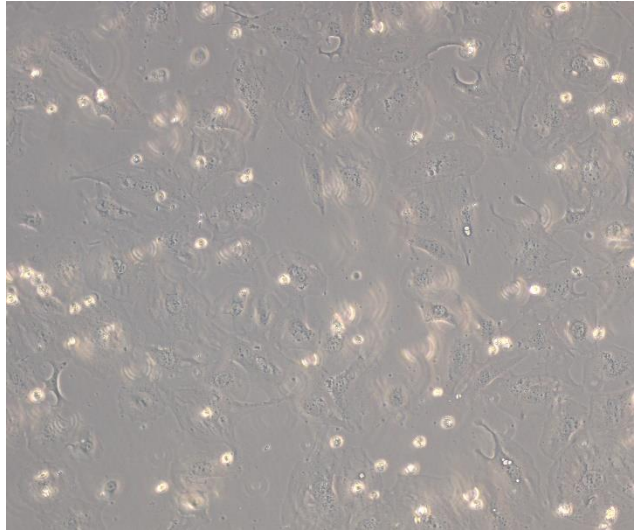


Abbildung 11: NK der Monolayer Zellen (Quelle: Eigene Darstellung)

Nach einer Behandlung mit 100 μm sieht man deutlich mehr avitale Zellen auf dem Bild unter dem Mikroskop. Im Hintergrund befinden sich weniger vitale Zellen auf dem Sixwell Plattenboden (siehe Abbildung 12).

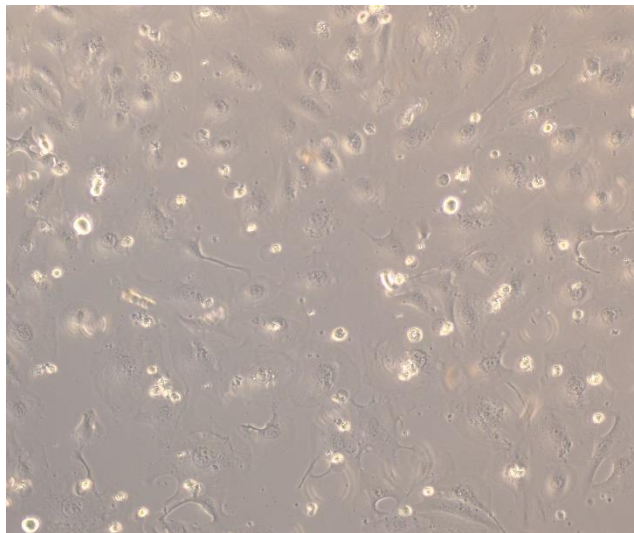


Abbildung 12: Monolayer Zellen mit 100 μm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)

In der Platte mit einer Konzentration von 250 μm mit der Substanz GP 2250 sind kaum noch vitale Zellen auf dem Boden zu sehen. Es befindet sich überwiegend tote Zellen im Nährmedium (siehe Abbildung 13).

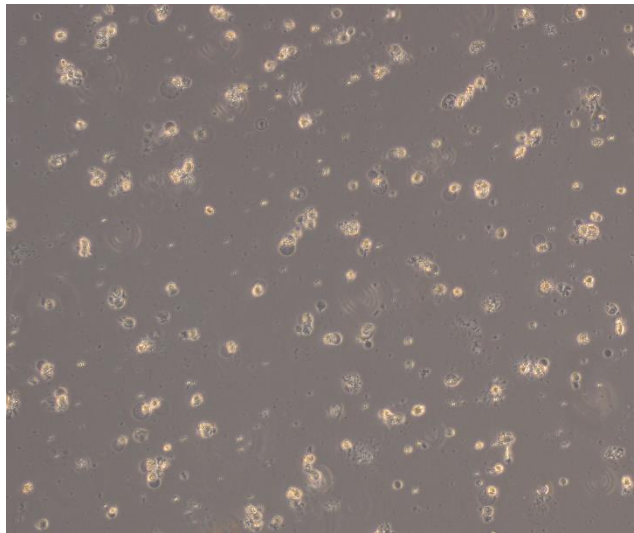


Abbildung 13: Monolayer Zellen mit 250 µm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)

Mit 500 µm sind unter dem Mikroskop, bis auf einige Ausnahmen, keine vitalen Zellen mehr auf dem Boden der Sixwell-Platte zu erkennen (siehe Abbildung 14). Es sind ausschließlich avitale Zellen im Nährmedium, was bedeutet, dass GP 2250 alle Teilungszyklen der Zellen gehemmt und die Zellen abgetötet hat.

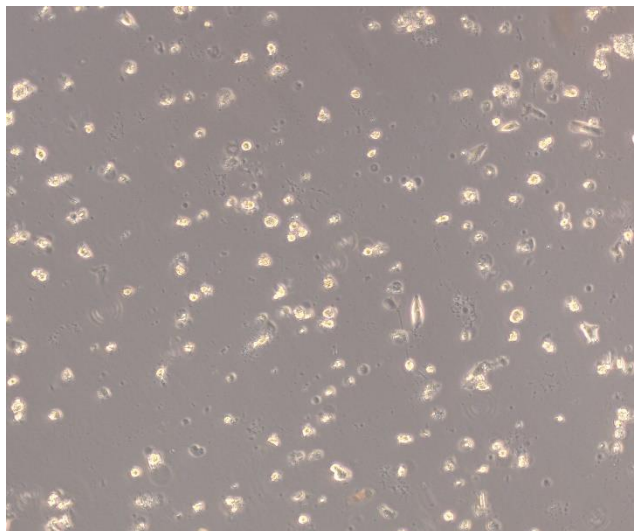


Abbildung 14: Monolayer Zellen mit 500 µm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)

Da bereits mit 500 µm alle Zellen in der Sixwell-Platte abgestorben sind, wurden keine Untersuchungen der letzten beiden Konzentrationen 1000 µm und 2000 µm durchgeführt. Die Konzentrationen werden demnach schnell letal.

3.5.2 Sphäroide

Nach sechs Stunden wurden bei Sphäroiden folgende Beobachtungen unter dem Mikroskop festgestellt:

Sphäroide sind als dreidimensionale Zellaggregate zu erkennen, welche mechanisch stabil sind. Diese Stabilität wird im folgenden Experiment durch GP 2250 zerstört. Abgelöste Zellen gelten als avital.

Die NK zeigt mehrere gut ausgebildete und stabile Sphäroide, welche an ihren glatten Rändern zu erkennen sind. Nur wenige Zellen sind nekrotisch, da kein Zellgift hinzugegeben wurde (siehe Abbildung 15).

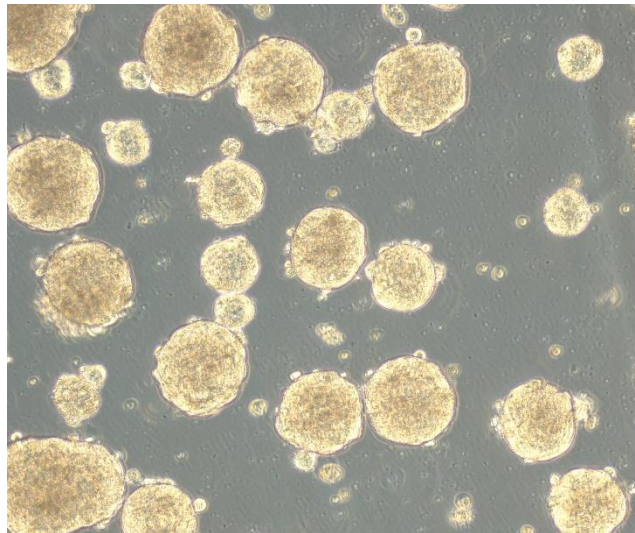


Abbildung 15: NK der Sphäroide (Quelle: Eigene Darstellung)

Nach der Applikation von 500 μm der Substanz GP 2250 sind bereits viele Zellen abgestorben, welche an den Rändern der Sphäroide zu sehen sind. Die nekrotischen Zellen lösen sich aus dem Verband und schwimmen einzeln im Nährmedium. Allerdings sind noch nicht die Herde der Sphäroide erfasst worden. Die Struktur ist deswegen noch sehr stabil (siehe Abbildung 16).

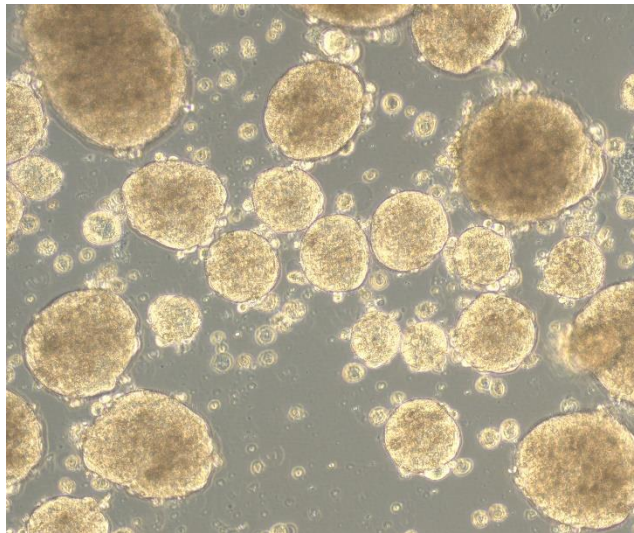


Abbildung 16: Sphäroide mit 500 μm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)

In der Platte mit einer Konzentration von 1000 μm sind überwiegend avitale Zellen zu erkennen. Die Sphäroide zerfallen und die Anzahl der avitalen Zellen nimmt stark zu (siehe Abbildung 17).

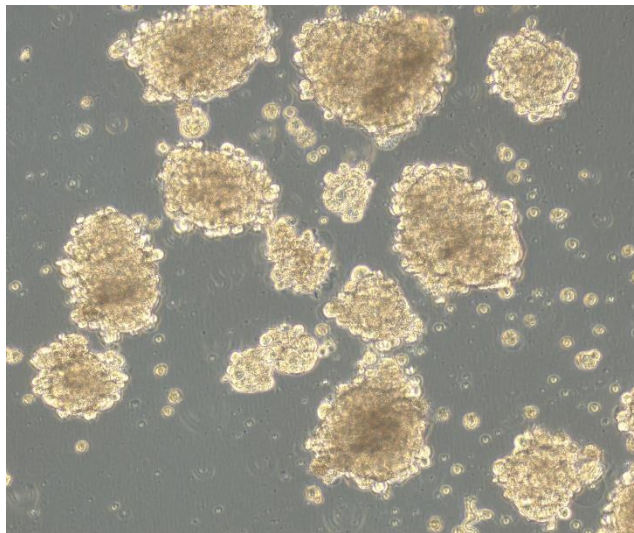


Abbildung 17: Sphäroide mit 1000 μm GP 2250 (Quelle: Eigene Darstellung)

3.6 Fazit des Experiments

Das Experiment hat gezeigt, dass das GP 2250 wirkt, da die Tumorzellen durch die Sauerstoffradikalen¹⁷ absterben, welche durch GP 2250 entstehen. Die Sauerstoffradikale oxidieren und stören somit ein bestimmtes Protein, das sogenannte Cofilin, in den Zellen. Zudem nimmt die antineoplastische Wirksamkeit mit steigender Konzentration zu, weshalb die Konzentrationen schnell letal werden.

Für den Versuch der Monolayer Zellen wurde festgestellt, dass eine Konzentration höher als 500 μm nicht nötig ist, da bei 500 μm bereits alle Zellen nekrotisch sind und eine höhere Konzentration in der Praxis nur unnötige Nebenwirkungen hervorrufen würde. Konzentrationen unter 500 μm reichen nicht aus, um das Karzinom effektiv zu bekämpfen, da noch zu viele vitale Zellen zu sehen waren.

Da die Sphäroide in einem Zellverband existieren, sind sie resistenter gegenüber Noxen¹⁸, wie zum Beispiel dem Medikament GP 2250. Dies liegt daran, dass der Wirkstoff vorerst die äußeren Zellen des Verbands schädigt, die Inneren aber zunächst unbeschädigt bleiben. Dadurch kann sich der Zellverband wieder zurückbilden, da sich die inneren Zellen vermehren können. Hier muss demnach eine höhere Konzentration angewandt werden.

Bei 1000 μm konnte man bei den Sphäroiden erkennen, dass auch innere Zellen avital werden und sich viele Zellen aus dem Zellverband lösen. Dadurch wird die Struktur instabiler und auch der Teilungszyklus der innen liegenden Zellen wird geschädigt. Niedrigere Konzentrationen als 1000 μm sind demnach nicht ausreichend, um gegen dreidimensionale Zellaggregate vorzugehen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Projektarbeit befasste sich mit dem Pankreaskarzinom und seiner Behandlung in der Grundlagenforschung. Dazu wurde zunächst der anatomische Aufbau des Pankreas und dessen Funktion beschrieben. Anschließend wurde das Karzinom und verschiedene

¹⁷ Für Zellen schädliche Form des Sauerstoffs, die bei vielen Erkrankungen und auch dem Alterungsprozess eine Rolle spielt

¹⁸ Stoff oder Umstand, der eine schädigende Wirkung auf den Organismus ausübt

Möglichkeiten seiner Behandlung geschildert. Eine Strategie ist der Einsatz von Chemotherapeutika, für die fortlaufend neue Wirkstoffe entwickelt und erforscht werden. Dadurch soll die Effizienz der bisherigen Behandlung gesteigert und die schlechte Prognose von Bauchspeicheldrüsenkrebs verbessert werden.

Im Rahmen dieser Projektarbeit wurde die Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen der Substanz GP 2250 untersucht.

Es zeigte sich, dass für die Avitalität der Bo80 Monolayer Zellen eine höhere Konzentration als 500 μm nicht notwendig ist. Für Sphäroide hingegen ist eine höhere Konzentration von 1000 μm erforderlich, da sie aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur und Stabilität resistenter gegen den Wirkstoff sind.

In Zukunft wird geprüft, ob GP 2250 von einem komplexen Organismus aufgenommen und abgebaut werden kann. Dies wird zunächst an Mäusen getestet, indem ihnen Krebszellen unter die Haut am Rücken injiziert werden, welche mit dem Wirkstoff behandelt werden. Wenn GP 2250 die vorklinischen Studien durchlaufen hat und sich keine relevanten Komplikationen zeigen, wird es zu klinischen Studien zugelassen. In Phase eins wird das Medikament zunächst an gesunden Probanden getestet, um eventuelle Nebenwirkungen oder Folgeerkrankungen zu ermitteln. Im späteren Verlauf kann der Wirkstoff mit anderen Medikamenten, welche bereits zur Behandlung verwendet werden, kombiniert werden, um eine bestmögliche antineoplastische Wirkung zu erzielen.

5 Literaturverzeichnis

Alamia, S., Van Der Kuip, H., Heller, R. *et al.* (2015): 3D-Sphäroidkulturen für die onkologische Wirkstoffforschung. *Biospektrum* 21, 194–195. <https://doi.org/10.1007/s12268-015-0561-3>

Belyaev, O., Bösch, F., Brunner, M., et al. (2020): Von der deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie konsentierete Operationsindikationen beim duktalem Pankreasadenokarzinom, Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/a-1161-9501>

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. Online abrufbar: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/grundlagen/krebsforschung-klinische-studien-index.php> (zuletzt geprüft: 11.04.2021)

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. Online abrufbar: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Krebsregisterdaten/krebs_node.html (zuletzt geprüft: 11.04.2021)

Schloßberger, A., Ditsch, N., Kahlert, S. et al. (2005): Chemotherapie. *Onkologie* 11, 785-792. <https://doi.org/10.1007/s00761-005-0918-1>

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. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56577-3_16

Tannapfel, A. (2010): Pankreaskarzinom. *Pathologe* 31, 225–228.
<https://doi.org/10.1007/s00292-010-1298-x>

Uhl, W., Braumann, C. (2020): Bauchspeicheldrüsenerkrankungen akute und chronische Entzündungen sowie Tumore, 2. Auflage, Katholisches Klinikum Bochum.

Rechercheergebnis zum RKI, Zentrum für Krebsregisterdaten:

Das Robert Koch Institut ist ein wissenschaftliches Institut, welches seit dem 01.03.2015 von Professor Dr. Lothar Heinz Wieler geleitet wird. Dr. Wieler studierte von 1980-1985 Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin und promovierte 1988 im Institut für Medizinische Mikrobiologie. Das Institut berät zudem die Bundes- sowie Landesregierung bei der aktuellen COVID-19 Pandemie.

Rechercheergebnisse zum Deutschen Krebsforschungszentrum:

Das deutsche Krebsforschungszentrum wird seit 2012 von Dr. med. Susanne Weg-Riemers geleitet. Nach dem Medizinstudium und ihrer Promotion arbeitete sie zunächst als Ärztin in der Inneren Medizin und wechselte dann in die biomedizinische Grundlagenforschung. Die Aufgabe des Deutschen Krebsinformationszentrum ist es, Patienten und Angehörige, aber auch Fachleute, zum Thema Krebs zu beraten und zu unterstützen.