

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der  
Universitätsmedizin Rostock (Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar)

**Experimentelle Pankreaskarzinomtherapie und Belastung  
von Versuchstieren durch Metformin und  
Laktatstoffwechselhemmung**

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von Edgar Heinz Uwe Wendt

geb. am 27.09.1993 in Ueckermünde

Rostock, November 2023

**Dekan:** Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

**1. Gutachter:** PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner

**2. Gutachter:** Prof. Dr. med. Robert Jaster

**3. Gutachter:** Prof. Dr. med. Lars Ivo Partecke

**Jahr der Einreichung:** 2023

**Jahr der Verteidigung:** 2023

## Studien der kumulativen Dissertation

### Studie I:

**Wendt EHU**, Schönrogge M, Vollmar B & Zechner D. Galloflavin Plus Metformin Treatment Impairs Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2020; 40(1):153-160. doi: 10.21873/anticancerres.13936.

### Studie II:

Zhang X, Schönrogge M, Eichberg J, **Wendt EHU**, Kumstel S, Stenzel J, Lindner T, Jaster R, Krause BJ, Vollmar B & Zechner D. Blocking Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Supports Chemotherapy in Pancreatic Cancer Cells. *Front Oncol* 2018; 8:1–10. doi: 10.3389/fonc.2018.00590.

### Studie III:

Kumstel S, **Wendt EHU**, Eichberg J, Talbot SR, Häger C, Zhang X, Schönrogge M, Palme R, Bleich A, Vollmar B & Zechner D. Grading animal distress and side effects of therapies; *Ann N Y Acad Sci* 2020; 1473(1):20–34. doi: 10.1111/nyas.14338.

Die Studien sind im Anhang ab Seite 44 zu finden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
2.1 Pankreaskarzinom beim Menschen .....	6
2.2 Metabolismus des Pankreaskarzinoms .....	6
2.3 Murines Pankreaskarzinommodell .....	6
2.4 Experimentelle Therapien des Pankreaskarzinoms .....	7
<b>3 Fragestellung</b> .....	<b>8</b>
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
4.1 Reagenzien .....	9
4.2 Zellkultur (Studie I+II) .....	9
4.3 Tierversuche (Studie II+III) .....	10
4.4 Statistik und Datenanalyse .....	13
<b>5 Ergebnisse</b> .....	<b>15</b>
5.1 Studie I .....	15
5.2 Studie II .....	16
5.3 Studie III .....	18
<b>6 Diskussion</b> .....	<b>20</b>
6.1 Studie I .....	20
6.2 Studie II .....	22
6.3 Studie III .....	23
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>26</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>27</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>38</b>
Thesen .....	39
Erklärung .....	40
Danksagung .....	41
Wissenschaftlicher Lebenslauf .....	42
Eigene Publikationsliste .....	43
Verwendete Originalarbeiten zur kumulativen Dissertation .....	44

## 1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit untersuchten die Studien I – III, ob eine Kombinationstherapie aus Laktatstoffwechselhemmstoffen und Metformin eine wirksame Therapie gegen das duktales Pankreaskarzinom *in vitro* darstellt, ob die Hemmung der Autophagie in Tumor-assoziierten Fibroblasten diese Therapie unterstützt und wie die Belastung der Versuchstiere als Indikator für Nebenwirkungen der Therapien quantifiziert werden kann. Dabei konnte die Studie I aufzeigen, dass durch die Kombination aus Galloflavin und Metformin *in vitro* unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen ein additiver Effekt auf die Zelltodinduktion und Proliferationsinhibition der Pankreaskarzinomzellen erzielt wird. Die Studie II kam zu dem Ergebnis, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten in der Co-Kultur einen Einfluss auf die Chemoresistenz der untersuchten Karzinomzelllinien haben und die Autophagie in diesen Fibroblasten dabei ein wahrscheinlich wichtiger Mechanismus ist. Dabei konnte *in vitro* durch Zugabe der Autophagieinhibitoren Chloroquin bzw. Bafilomycin A1 der proliferationshemmende Effekt der Chemotherapien auf die co-kultivierten Tumorzellen signifikant verstärkt werden. Die Studie III zeigte, dass eine Methodenkombination zu aussagekräftigen Schlussfolgerungen über die Belastung der Tiere durch unterschiedliche Therapien führt und dass die Galloflavin plus Metformin Kombinationstherapie belastender als eine  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure plus Metformin Kombinationstherapie ist.

Als Fazit dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass die Kombination aus Laktatstoffwechselhemmstoffen und Komplex I – Inhibitoren eine vielversprechende Therapie des Pankreaskarzinoms ist, welche in weiteren präklinischen Studien und in Kombination mit Autophagiehemmstoffen untersucht werden sollte. Ferner ist die weitere Etablierung von mehrdimensionalen Belastungsanalysen als experimenteller Standard geboten, mit nicht-invasiven Methoden umsetzbar und in der Lage die Belastung der Versuchstiere durch Therapeutika im Sinne einer optimalen Versorgung von Patientinnen und Patienten bereits präklinisch zu erkennen.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Pankreaskarzinom beim Menschen**

Das Pankreaskarzinom ist, alle Entitäten zusammengenommen, aktuell die dritthäufigste nicht geschlechtsspezifische krebsbedingte Todesursache in Industrienationen wie den USA und Deutschland mit einer relativen 5-Jahresüberlebensrate von nur 10-12% über alle Stadien und Entitäten hinweg (1, 2). Hauptgründe für diese hohe Letalität sind das häufig späte Erkennen von Pankreaskarzinomen aufgrund unspezifischer Symptome in frühen Stadien, die rasche Metastasierungstendenz und das schlechte Ansprechen auf die Chemotherapie (2, 3). Die einzige kurative Therapie stellt die operative Entfernung des Karzinoms dar (3, 4) mit anschließender adjuvanter Chemotherapie innerhalb von 12 Wochen nach der Operation (3). Die S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom empfiehlt für die adjuvante Chemotherapie den Einsatz von FOLFIRINOX (5-Fluoruracil (5-FU)/Folinsäure/Irinotecan/Oxaliplatin) oder Gemcitabin als Monotherapie oder in Kombination mit Capecitabin (3). Bei Inoperabilität bleibt bislang jedoch nur eine palliative Chemotherapie, mit einer medianen Überlebenszeit von weniger als einem Jahr (3, 5). Deshalb wird auch weiterhin nach neuen Behandlungsstrategien geforscht.

### **2.2 Metabolismus des Pankreaskarzinoms**

Ein möglicher Ansatz für die Therapie des Pankreaskarzinoms ist dessen veränderter Stoffwechsel. Die speziellen metabolischen Eigenschaften von Pankreaskarzinomen sind schon seit Jahrzehnten bekannt. Diese als Warburg-Effekt benannte Veränderung äußert sich in der bevorzugten Metabolisierung von Pyruvat zu Laktat, auch unter sauerstoffreichen Bedingungen (6–8). In schnell wachsenden Tumorgeweben ist diese Veränderung ein zunehmender Selektionsvorteil, da im Zuge des schnellen Wachstums der Anteil an Mitochondrien die in ihrer Funktion eingeschränkt sind wächst, was eine oxydative Energiegewinnung erschwert (9–12). Ferner bieten die Anreicherung des Interzellularraumes mit Laktat und die konsekutive Erniedrigung des pH-Wertes einen zusätzlichen Schutz vor dem Immunsystem (13–19). Aus diesem Umstand ergeben sich zwei mögliche therapeutische Ansätze. Zum einen ist eine Transformation des veränderten Metabolismus hin zu einer physiologischen oxydativen Energiegewinnung denkbar, zum anderen eine Blockierung des neuen beziehungsweise bevorzugten Weges zur Energiegewinnung. In dieser Arbeit wurde die zweite Strategie verfolgt.

Abseits des Laktatstoffwechsels spielt auch die Beziehung zu den umgebenden Zellen, insbesondere dem peritumorösen Bindegewebe, welches mit dem Karzinom in Wechselwirkung steht und unter anderem die Nährstoffversorgung des Tumors durch Abkapselung verändert, eine wichtige Rolle. Zunehmend zeigen Studien, dass dabei dem Austausch von Metaboliten wie Laktat zwischen Tumorzellen und peritumorösen Zellen eine entscheidende Rolle zufällt und die physische Barriere wahrscheinlich zweitrangig ist (20, 21). Über diesen Austausch ist auch ein direkter Einfluss der Karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF) auf die Resistenz des Karzinoms gegenüber der Chemotherapie denkbar (21–25). Ein möglicher Mechanismus dafür ist die Autophagie in den CAF (23, 26–30). Im Rahmen der Studie II wurde deshalb auch der Einfluss der Autophagie-Inhibition auf die Wirksamkeit der Tumorthherapie untersucht.

### **2.3 Murines Pankreaskarzinommodell**

Die realistische Nachstellung einer Erkrankung ist entscheidend für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Erkrankung beim Menschen. Für diese Arbeit wurde deshalb ein orthotopes Mausmodell des Pankreaskarzinoms genutzt um auch die anatomischen Bedingungen der Erkrankung abzubilden. Denn in einem nicht unerheblichen Teil der humanen

Pankreaskarzinome ist eine Störung des Galleabflusses der Grund für die initiale ärztliche Vorstellung der Erkrankten (3). Besonders der schmerzlose Ikterus (Gelbsucht) gilt dabei als Warnsignal und muss „diagnostische Untersuchungen für ein Pankreaskarzinom auslösen“ (3). Weiterhin lassen sich die Bedingungen einer peritumorösen Stromareaktion, wie sie insbesondere in der Studie II betrachtet wurden, in der Zellkultur nur in Ansätzen nachstellen.

Das Tierwohl stellt einen weiteren wichtigen Aspekt dar und wurde in Studie III analysiert. Ein belastungsarmer Versuchsaufbau schafft die Möglichkeit auftretende Belastungen den Therapien und Prozeduren zuzuordnen. Ferner ist ein ethischer Umgang mit den Tieren Bestandteil des Selbstverständnisses in der Forschung an Tieren und wird durch die EU-Richtlinie von 2010 geregelt (31). Die Studie III stellt hierbei die Frage, wie die Belastung der Tiere konkret gemessen und beurteilt werden kann und beantwortet diese Frage am orthotopen Pankreaskarzinom-Mausmodell mithilfe einer Kombination verschiedener Methoden. Zu den dafür verwendeten Tests gehört beispielsweise die Quantifizierung der durch die Mäuse gebuddelten Menge von Futterpellets aus einer definierten Röhre. Diese Methode ahmt das natürliche Buddeln der Mäuse nach und schafft es durch die Quantifizierbarkeit Rückschlüsse auf die Belastung der Tiere zu ziehen (32, 33). Eine andere Methode ist die Beurteilung des Nistverhaltens. Auch hier wird ein natürliches Verhaltensmuster untersucht und Ausprägungen oder Abweichungen interpretiert (33). Im Rahmen der Studie III wurden jedoch nicht nur Verhaltensmuster, sondern auch Biomarker wie Cortison und dessen Metabolite als Indikatoren für Stress bestimmt (34, 35). Schließlich wurden die Tiere auch anhand eines bereits etablierten Gesundheitsscores eingeschätzt (36, 37).

Im Hinblick auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tierversuch auf die möglichen menschlichen Patient\*innen lassen sich die Untersuchungen in drei Kategorien einteilen. So entspricht der an den Mäusen erhobene Gesundheitsscore einer routinierten körperlichen Untersuchung durch den behandelnden Arzt. Die Verhaltensanalysen der Mäuse sind vergleichbar mit den Aktivitäten des täglichen Lebens (ADL, activities of daily living) der Patient\*innen außerhalb der Klinik oder Praxis (33). Die Bestimmung von Cortison und seiner Metabolite ist eine labormedizinische Analyse, die auch beim Menschen durchgeführt werden kann. Im klinischen Alltag wird dies jedoch nicht zur Quantifizierung von Stress genutzt um durch die Untersuchung keinen zusätzlichen Stress oder Ängste bei Patienten auszulösen (38).

## **2.4 Experimentelle Therapien des Pankreaskarzinoms**

In dieser Arbeit werden drei verschiedene Wirkstoffe untersucht. Der Bekannteste ist das Metformin, welches als orales Antidiabetikum einer sehr großen Zahl von Patient\*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 verordnet wird (39). Dabei nutzt man die durch Metformin verbesserte Insulinwirkung um dauerhaft die zugrunde liegende Insulinresistenz zu bessern und den Blutzuckerspiegel zu normalisieren. Der genaue Wirkmechanismus ist dabei immer noch nicht verstanden. Jedoch ist bekannt, dass Metformin unter anderem den Komplex I der Atmungskette hemmt (40–42). Dies führt zu einer Verschiebung der Zellstoffwechsellage zugunsten der anaeroben ATP-Synthese über die Laktatbildung. Daraus leitet sich auch als schwer wiegende Nebenwirkung die Laktatazidose ab, welche bei Beachtung der Kontraindikationen jedoch nur äußerst selten auftritt. In einigen Arbeiten konnte ein Überlebensvorteil von an Pankreaskarzinomen erkrankten Patient\*innen unter Medikation mit Metformin festgestellt werden (43, 44). In anderen Studien zeigte sich dieser Effekt explizit nicht (43, 45, 46). Ältere Arbeiten vermuteten sogar einen präventiven Nutzen von Metformin auf die Entstehung von Malignomen (47, 48). Ferner erklärten beispielsweise Foretz et al. einen möglichen Nutzen einer hochdosierte Gabe von Metformin bei der Tumorthherapie (49).

In dieser Arbeit wurde insbesondere der Synergismus von Metformin als Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung und Laktatstoffwechselhemmstoffen auf das Pankreaskarzinom untersucht. Dabei wurden hohe Dosen von Metformin verwendet die bei einem durchschnittlichen Menschen dem drei- bis viereinhalbfachen der üblichen antidiabetischen Dosierung entsprechen.

Die zweite Hälfte des experimentellen therapeutischen Konzeptes dieser Arbeit besteht aus den Laktatstoffwechselhemmstoffen. Diese sind aktuell nicht als Medikamente für Menschen zugelassen und finden deshalb ausschließlich im Rahmen der medizinischen Forschung Anwendung. So ist Galloflavin, ein struktureller Abkömmling der Gallensäure, chemisch sehr lipophil und deshalb zu Injektionszwecken schwer löslich. Es ist ein direkter unspezifischer Inhibitor der Laktatdehydrogenase (LDH) (50–52). Bisher fand Galloflavin insbesondere in der experimentellen Therapie von hepatozellulären, kolorektalen und Endometriumkarzinomen Anwendung (50, 53, 54). Im Rahmen der Studien I und III wurde die Wirkung auf das Pankreaskarzinom, sowohl in Kombination mit Metformin als auch als Monotherapie, untersucht (55, 56).

Der zweite Wirkstoff, welcher in den Studien II und III untersucht wurde ist die  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-5-methoxy-Zimtsäure (CHC). Diese wirkt nicht als LDH-Hemmstoff, sondern als Inhibitor des zellulären Ausstromes von Laktat über die Blockierung von Monocarboxylat-Transportern (MCT) (57, 58). Im Rahmen der veränderten Stoffwechsellage der Karzinomzellen werden die Transportproteine GLUT-1 und MCT-4 verstärkt exprimiert um die Glukoseaufnahme (via GLUT-1) und die Laktatausschleusung (via MCT) zu gewährleisten (59, 60). Eine gehemmte Ausschleusung von Laktat sollte dann die Ansäuerung der peritumorösen Umgebung verhindern, eine Produkthemmung der LDH fördern und damit eine ATP-Synthese-Hemmung zur Folge haben. Auf diesem Wege kann die Apoptose der Tumorzellen eingeleitet werden. Zum Einsatz kam CHC bislang insbesondere in der experimentellen Therapie von Brustkrebszellen (57, 61). Im Rahmen der Studien II und III wurde CHC sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Metformin zur Pankreaskarzinomtherapie eingesetzt. Dadurch sollte wiederum ein synergistischer Effekt aus Inhibition der Zellatmung und des Laktatstoffwechsels erzielt werden (56, 62).

### 3 Fragestellung

Jede der drei Studien hatte eine individuelle Fragestellung. Dennoch ergänzen sie sich. So versucht die Studie I die Frage zu beantworten, ob eine Kombination aus Galloflavin, also einem LDH-Inhibitor, und Metformin als ein neuer und wirksamer experimenteller Therapieansatz bei duktalem Pankreaskarzinom gelten kann. Die Studie II untersuchte die therapeutische Synergie aus CHC, also einem Laktattransportproteininhibitor, und Metformin. Zugleich nahm sie die Autophagie in CAF als einen möglichen Chemoresistenzmechanismus des Pankreaskarzinoms an und untersuchte ob eine gezielte Hemmung der Autophagie somit auch eine verminderte Chemoresistenz der co-kultivierten Karzinomzellen bedeutete. Die Studie III betrachtet vorrangig nicht die Wirkung dieser beiden Kombinationstherapien, sondern deren Belastungspotential für die damit behandelten Tiere. Solch eine Belastungsanalyse könnte ungewünschte Nebenwirkungen von Therapien aufzeigen. Zusammenfassend ergibt sich in dieser Arbeit somit die Frage ob Kombinationstherapien aus Metformin und Laktatstoffwechselhemmstoffen einen zu verfolgenden experimentellen Therapieansatz bei duktalem Pankreaskarzinom darstellen, ob diese Therapien im Tierversuch eine große Belastung für die Tiere darstellen und wie man zu diesem Zweck Belastung bei Mäusen am effektivsten quantifiziert.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Reagenzien

Die folgenden Reagenzien wurden für Studie I, II oder III verwendet: Dimethylsulfoxid (DMSO, Code: D2438, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland), Phosphat-gepufferte Salzlösung pH 7.4 (PBS, Code: 10010-015, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Galloflavin (Code: 4795, Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland), Metformin (Code: D150959, Sigma-Aldrich), Trypan Blau (Code: 15250, Thermo Fisher Scientific),  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (CHC, Code: D150959, Sigma-Aldrich), Gemcitabin (Code: G6423, Sigma-Aldrich), Mitomycin C (MCC, Code: M7949, Sigma-Aldrich), Chloroquin (CQ, Code: PHR1258, Sigma-Aldrich), Bafilomycin A1 (BAF, Code: 1960000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland); Antikörper: primäre Antikörper gegen Typ I Kollagen (Kollagen I, Code: ab34710, Abcam, Cambridge, UK), primäre Antikörper gegen p62 (Code: ab109012-100, Abcam), primäre Antikörper gegen  $\beta$ -Actin (Code: A5441, Sigma-Aldrich), sekundäre Antikörper: Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobuline (Code: D0487, Dako, Hamburg, Deutschland), Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper (Code: 7074, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Peroxidase-gekoppelte Anti-Maus-Antikörper (Code: A9044, Sigma-Aldrich), Liquid Permanent Red (LPR, Code: K0640, Dako)

### 4.2 Zellkultur (Studie I+II)

#### 4.2.1 „Mono-Kultur“ und Behandlungen

Für Studie I wurde die murine pankreatische Adenokarzinomzelllinie 6606PDA, ein Geschenk von Prof. Tuveson (University of Cambridge, UK), sowie die menschliche pankreatische Krebszelllinie MIA PaCa-2, gekauft von ATCC (Manassas, USA), in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, code: FG0435, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit einer Glukosekonzentration von 4,5 g/L (high glucose) oder 0,5 g/L (low glucose) kultiviert. Den Medien wurde 10% fetales Kalbserum (FCS, code S0615, Biochrom GmbH), 100 Einheiten/ml Penicillin und Streptomycin (code A2212, Biochrom GmbH) sowie 8  $\mu$ g/ml Tylosin (code: T3397, Sigma-Aldrich) zugesetzt. Die Zellen wurden mit Galloflavin, welches im Trägermedium DMSO gelöst war, in einer finalen Konzentration von 5  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 80  $\mu$ M oder 320  $\mu$ M für 30 Stunden behandelt. Dies geschah sowohl ohne Zugabe weiterer Therapeutika als auch in Kombination mit 20 mM Metformin. Um ferner den Einfluss des Sauerstoffangebots auf die Medikamentenwirksamkeit zu untersuchen, wurden die 6606PDA-Zellen mit den oben genannten Wirkstoffen für 30 Stunden unter normoxiden (19% O<sub>2</sub>) oder hypoxiden (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen in einem Innova® CO-48-230 Inkubator (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA) kultiviert.

In Studie II wurden ebenfalls 6606PDA-Zellen untersucht und über 48 Stunden mit 10 mM CHC, 5 mM Metformin, einer Kombination der beiden oder mit Trägersubstanz (Sham) behandelt. Weiterhin wurden Large T immortalized cells (LTC)-Zellen (CAF), eine von Sparmann et al. isolierte und charakterisierte immortalisierte Zelllinie pankreatischer Sternzellen von Ratten (63), in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Code: FG4605, Biochrom GmbH) mit 4,5 g/L Glukose unter Zusatz von 10% FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin und Streptomycin (Biochrom GmbH) sowie 1% nicht-essentielle Aminosäurenlösung (Code: M7145, Sigma-Aldrich) kultiviert. Anschließend wurden auch diese Zellen mit CHC, Metformin bzw. Sham in den angegebenen Konzentrationen oder mit 0,1  $\mu$ M Gemcitabin behandelt.

#### 4.2.2 „Co-Kultur“ und Behandlungen (Studie II)

Um die Funktion der CAF *in vitro* zu untersuchen wurden zunächst LTC-Zellen in einer 96-Well-Platte für 24 Stunden kultiviert. Zum Stoppen der Zellteilung wurde den LTC-Zellen für drei Stunden 5  $\mu$ g/ml MMC zugesetzt, um damit eine Verzerrung der Proliferationsmessung in

der Co-Kultur zu verhindern. Die Autophagie in den LTC-Zellen wurde anschließend durch Zugabe von 50 µM CQ oder 0,2 µM BAF für drei Stunden inhibiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 24 Stunden mit 6606PDA- oder MIA PaCa-2-Zellen co-kultiviert. Schließlich wurden die Zellen mit CHC, Metformin, einer Kombination der beiden oder Sham für 48 Stunden behandelt. Alternativ wurden die co-kultivierten Zellen über 24 Stunden mit Gemcitabin oder Sham behandelt.

#### **4.2.3 Evaluation der Laktatkonzentrationen (Studie I)**

Für den Nachweis der LDH-Inhibition durch Galloflavin wurde im Zelllysat und im Zellüberstand mit dem lactate colorimetric assay kit II (BioVision Incorporated, Milpitas, USA) die Laktatkonzentration bestimmt, nachdem die 6606PDA-Zellen mit 80 µM Galloflavin oder Trägermedium (DMSO) für 30 Stunden behandelt wurden. Da hohe FCS-Konzentrationen den Laktat Assay stören, wuchsen die Zellen in einem Medium dem 1% statt 10% FCS zugefügt wurde.

#### **4.2.4 Evaluation von Proliferation und Zelltod (Studie I+II)**

Zur Bestimmung der Proliferation wurde ein Kit (code: 11 647 229 001, Roche, Basel, Switzerland), welches die Aufnahme von 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) in die Zellen misst, genutzt (BrdU-Assay). Nach dem Ausplattieren der 6606PDA- (Studie I+II) bzw. MIA PaCa-2- (Studie I) auf einer 96 Well-Platte wurden die Zellen am folgenden Tag mit den angegebenen Wirkstoffen für 24h behandelt. Der BrdU-Assay wurde dann, wie vom Hersteller vorgesehen, durchgeführt und die absolute Absorption bei 450 nm mit einem PerkinElmer Victor X3 Plattenleser (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt.

Der Zelltod wurde durch die Färbung mit Trypan Blau quantifiziert. Diese färbt Zellen, welche entweder nekrotisch oder in einer späten Phase der Apoptose sind. Um die toten Zellen zu quantifizieren wurden erneut 6606PDA- bzw. MIA PaCa-2-Zellen auf einer 24 Well-Platte ausgesät. An den folgenden Tagen wurden im Rahmen der Studie I die Zellen über 30 Stunden mit den angegebenen Wirkstoffen behandelt. Für die Studie II wurden die 6606PDA-Zellen über 56 Stunden mit 10 mM CHC, 5 mM Metformin, einer Kombination der beiden oder Sham behandelt. Anschließend wurden alle Zellen mit Trypsin-EDTA (Biochrom GmbH) gelöst und mit Trypan Blau Lösung (Thermo Fischer Scientific) gefärbt. Danach wurde eine repräsentative Zahl von 100 Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die gefärbten und ungefärbten Zellen wurden evaluiert und ins Verhältnis zur Gesamtzahl gesetzt.

#### **4.2.5 Western Blot (Studie II)**

Für die Quantifizierung von p62, einem Autophagie-Markerprotein (64), wurden LTC-Zellen auf eine 6-Well-Platte gesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen dann mit 10 mM CHC, 5 mM Metformin, einer Kombination aus beiden, Sham oder 0,1 µM Gemcitabin über 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Western Blots unter Nutzung von Primär- und Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Visualisierung der Proteine wurde mittels Chemilumineszenz (ECL Plus™, GE Healthcare, München, Deutschland) und dem ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) realisiert.

### **4.3 Tierversuche (Studie II+III)**

#### **4.3.1 Orthotopes Pankreaskarzinommodell**

Die Tierversuche wurden an männlichen C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse wurden von den Charles River Laboratories (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) gekauft und in der Zentralen Versuchstierhaltung gezüchtet. Die Versuche wurden entsprechend der EU-Direktive 2010/63/EU und nach Genehmigung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF)

durchgeführt. Für das syngene orthotope Pankreaskarzinom-Modell wurden die Mäuse inhalativ mit 1,2-2,0% Isofluran narkotisiert und erhielten zur perioperativen Analgesie 5 min vor dem Schnitt eine subkutane Injektion von 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland). Intraoperativ wurden die Augen der Mäuse durch Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt und die Körpertemperatur durch das Operieren auf einer beheizten Unterlage (ca. 37°C) vor zu starkem Absinken bewahrt. Nach Rasur und Hautdesinfektion wurde das Abdomen per Oberbauchquerschnitt eröffnet und im Verlauf 5 µl der Tumorzellsuspension (6606PDA-Zellen,  $2,5 \times 10^5$  Zellen je 5µl in Matrigel®) in den Pankreaskopf mit Hilfe einer 25 µl-Spritze (Hamilton Syringe, Reno, NV, USA) injiziert. Im Anschluss an das Einbringen der Tumorzellen wurden das Peritoneum und die Haut vernäht und die Mäuse vor einer Wärmelampe platziert um auch postoperativ ein Auskühlen zu verhindern. Die Operation dauerte pro Maus 15 bis 20 Minuten. Die postoperative Analgesie wurde durch das Einbringen von Metamizol (1250 mg/L, Novaminsulfon-ratiopharm® 500 mg/mL Tropfen, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) in das Trinkwasser der Mäuse sichergestellt und bis zur Euthanasie der Tiere fortgesetzt. Diese Analgesie ist in dieser Darreichungsform leicht zu verabreichen und ein etablierter Bestandteil dieses Tiermodells (65, 66).

Im Versuchsablauf ist der Tag der Tumorzellinjektion Tag Null. Tag 1 entspricht somit dem ersten postoperativen Tag. Ab Tag 4 begann die Therapie der Mäuse über intraperitoneale Injektionen von Sham, CHC, Metformin oder der Kombination aus CHC und Metformin (Studie II) bzw. der Kombinationstherapie aus Galloflavin und Metformin oder CHC und Metformin (Studie III). In der Studie II wurden zur Bestimmung der geeigneten CHC-Dosis folgende drei Dosierungen untersucht: 15 mg/kg CHC plus 125 mg/kg Metformin (n=3), 60 mg/kg CHC plus 125 mg/kg Metformin (n=3), 240 mg/kg CHC plus 125 mg/kg Metformin (n=3). Um den Effekt einer Hemmung von Autophagie auch *in vivo* zu untersuchen wurde den Mäusen zudem zweimal pro Woche 60 mg/kg CQ intraperitoneal injiziert. An Tag 37, nach der Euthanasie der Tiere, wurde der Tumor von dem Pankreas separiert, entnommen, dessen Gewicht aufgezeichnet und anschließend formalinfixiert. Für die Studie III wurden die Tiere den Behandlungsgruppen nichtzufällig anhand ihrer Leistung in den präexperimentellen Verhaltensanalysen (Buddeln und Nisten) zugeordnet. So erhielten jeweils sieben Mäuse täglich die Kombinationstherapie aus Metformin (125 mg/kg in PBS) und CHC (15 mg/kg in 50% DMSO), die korrespondierende Sham-Therapie (PBS und 50% DMSO) und die zweite Therapie bestehend aus Metformin (125 mg/kg in PBS, täglich) und Galloflavin (20 mg/kg in 100% DMSO, dreimal pro Woche). Fünf Mäuse erhielten PBS (täglich) und 100% DMSO (dreimal pro Woche) als jeweilige Sham-Therapie. Das Verabreichen der Therapeutika und die Evaluation der Belastung der Tiere wurden unverblindet von unterschiedlichen Personen durchgeführt. Metformin und PBS wurden jeweils am Morgen zwischen 9:00 Uhr und 11:00 Uhr injiziert, während Galloflavin, CHC und deren entsprechende Trägersubstanzen zwischen 14:30 Uhr und 15:00 Uhr verabreicht wurden.

#### **4.3.2 Bildgebung mit PET-CT und 7-T-MRT (Studie II)**

An Tag 34 wurden die Mäuse in inhalativer Narkose mit 1,2-2,0% Isofluran mit einer 7-Tesla-Kleintier-MRT (BioSpec 70/30, 7.0 Tesla) in Verbindung mit einem Übertragungsvolumenresonator und einer Oberflächenempfängerspule (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Deutschland) dargestellt. Die Bildgebung wurde mittels morphologischen T2-gewichteten TurboRARE- (T2w-TurboRARE) und Diffusions-gewichteten Bildgebungssequenzen (DWI) durchgeführt. An Tag 35 wurde dann die Bildgebung mit 18F-FDG-PET/CT durchgeführt. Die Mäuse wurden dazu erneut narkotisiert. Anschließend wurde ihnen eine Dosis von etwa 15 MBq des 18F-FDG (2-Fluor-2-desoxy-D-Glukose) intravenös über einen in einer Schwanzvene platzierten Mikrokatheter injiziert. Nach einer Verteilungszeit von 60 Minuten

wurde eine statische PET-Aufnahme in Bauchlage mit einem Kleintier-Mikro-PET/CT-Scanner (Inveon PET/CT Siemens, Knoxville, TN, USA) durchgeführt. Die Rekonstruktion der PET-Bilder erfolgte per 2D-OSEM (2-dimensional ordered subset expectation maximization algorithm).

#### **4.3.3 Immunhistochemische Färbung (Studie II)**

Zur Evaluation der peritumorösen Stromareaktion wurde an 4 µm Paraffinschnitten der entnommenen Tumore Kollagen I mit Kaninchen-Anti-Kollagen I-Antikörpern (200-fache Verdünnung) und Alkalische Phosphatase-konjugierte Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper (100-fache Verdünnung), gefolgt von Permanentfärbung mit LPR angefärbt. Die Kollagen I-Bilder wurden mit einem Olympus-Mikroskop BX51, ausgestattet mit einer ColorView II-Kamera (Olympus, Tokyo, Japan), aufgenommen. Zur Messung der Dicke der Stromareaktion wurde der Abstand zwischen dem inneren und äußeren Rand der Kollagen I Ablagerung jeweils bei 12 Uhr, 3 Uhr, 6 Uhr und 9 Uhr gemessen. Der Mittelwert dieser vier Abstände wurde dann genutzt um die Dicke der Stromareaktion zu definieren.

#### **4.3.4 Beurteilung von Belastungsparametern (Studie III)**

Um die Belastung der Tiere durch Laparotomie und Tumorzellinjektion zu analysieren wurden alle Parameter vor und nach der Operation bis zum zweiten postoperativen Tag beurteilt. Anschließend wurden die Belastungsparameter während der frühen (Tag 4 – 8), der mittleren (Tag 18 – 19) und der späten (Tag 34 – 35) Therapiephase quantifiziert, um exemplarisch den Verlauf der Belastung unter der Chemotherapie zu untersuchen.

Das KG wurde jeweils 24 Stunden nach der Operation oder der letzten Therapeutikainjektion bestimmt, um genug Zeit für eine KG-Anpassung zu lassen. Die hierbei berechnete relative KG-Änderung bezog sich stets auf das Gewicht vor der Operation.

Die Belastungsanalyse mittels Belastungsscore-Bogen ist ein seit langem etabliertes Werkzeug (36, 37). Zu dessen Bestimmung werden die Mäuse für wenige Minuten in ihren Käfigen beobachtet und der Allgemeinzustand, das spontane Verhalten, das Fluchtverhalten (Interaktion des Beobachters mit den Mäusen) und versuchsspezifische Kriterien beurteilt. Erhoben wurde er jeweils 30 Minuten nach der letzten Therapeutikainjektion.

Das Buddelverhalten der Mäuse wurde entsprechend der Arbeit von Deacon et al. analysiert. (32, 33) Dazu wurden Buddelröhren mit 200 g an Futterpellets (ssniff-Spezialdiäten GmbH) gefüllt und eine bis eineinhalb Stunden nach der letzten Therapeutikainjektion sowie zweieinhalb bis drei Stunden vor der Dunkelphase (16 Uhr – 16:30 Uhr) im Käfig platziert. Nach Ablauf von zwei Stunden wurde das Gewicht der aus den Buddelröhren herausgebuddelten Pellets ermittelt.

Für die Untersuchung des Nistverhaltens der Mäuse erhielt jedes Tier ein bis zwei Stunden vor der Dunkelphase (18 Uhr – 18:30 Uhr) ein definiertes Nestlet (5 cm-Quadrate aus gepresster Watte, ZOONLAB GmbH). Am folgenden Tag, zwischen 9 Uhr und 11 Uhr wurden die Nester begutachtet und erhielten einen Score-Wert, ähnlich der Punkteskala von Deacon et al. (33). Zusätzlich zu den bei Deacon vergebenen 1 – 5 Punkten vergaben wir 6 Punkte für ein „perfektes Nest“ (>90 % des Nestlets zerrissen), das wie ein Krater aussieht und bei dem mehr als 90 % der Zirkumferenz des Nestes die Körperhöhe der Maus überragt. Zu Beginn des Experimentes wurden beide Verhaltensanalysen zweimalig durchgeführt während die Tiere noch in Gruppen gehalten wurden, da Hinweise bestehen, dass Mäuse voneinander lernen können (33). Nach dieser Lernphase wurden die Mäuse einzeln gehalten.

Die Konzentrationen von Corticosteron im Plasma und von dessen Metaboliten im Kot (FCM) wurden als mögliche Indikatoren für Stress bzw. Belastung bestimmt. Dafür wurde jeweils 24 Stunden nach der letzten Intervention Kot (pro Maus 200 – 400 mg) aus den Käfigen

gesammelt, für 4 Stunden bei 65 °C getrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert. Später wurden dann 50 mg des getrockneten Kots mit 1 ml von 80 % Methanol extrahiert und mit einem 5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,21-triol-20-on-Enzymimmunoassay analysiert (34, 67). Zur Quantifizierung des Corticosterons im Plasma wurden weitere 10 Mäuse genutzt, da die Blutentnahme selbst eine Stressreaktion verursacht (68) und damit u.a. auch die Buddel- und Nistaktivität beeinflussen könnte. 6 dieser Mäuse erhielten Metformin plus Galloflavin als Therapie, während die restlichen 4 Tiere die zugehörige Sham-Behandlung bekamen. Das Blut wurde jeweils 30 Minuten nach der Therapeutikainjektion per retroorbitaler Punktion nach Narkose mit 5 % Isofluran entnommen. Die schnelle Entnahme des Blutes unter Isofluran innerhalb von 3 Minuten ist dabei obligatorisch um eine Beeinflussung der Corticosteron-Konzentration durch die Blutentnahme selbst auszuschließen (35, 68). Die Blutproben wurden anschließend zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei -20 °C gelagert. Die Plasma-Corticosteron-Konzentrationen wurden mittels ELISA-Kit (Code: DEV9922, Demeditec Diagnostics GmbH, Erfurt, Deutschland) gemessen.

## **4.4 Statistik und Datenanalyse**

### **4.4.1 Statistik (Studie I+II)**

Die Graphen und Statistiken für die Studie I wurden mit GraphPad Prism 6 (Version 6.05 für Windows, GraphPad Software, La Jolla, California, USA) erstellt. Die Ergebnisse wurden entweder als Line Plots mit Mittelwert und Standardabweichung oder als Box Plots mit dargestelltem Median, 25. und 75. Perzentile in Form der Box mit der 5. und 95. Perzentile als Antennen präsentiert. Unterschiede in den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-Rangsummen-Test, gefolgt von der Bonferroni-Korrektur, evaluiert. Somit wurden die erhaltenen Unterschiede mit  $P \leq 0,05$  geteilt durch die Anzahl der sinnvollen Vergleiche als signifikant angesehen, wohingegen Unterschiede mit  $P \leq 0,08$  geteilt durch die Anzahl der sinnvollen Vergleiche als Tendenz-zeigend angesehen wurden.

Alle Graphen und Statistiken für Studie II wurden mit SigmaPlot® 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) angefertigt. Die Ergebnisse wurden als Line Plots bzw. Box Plots präsentiert. Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-Rangsummen-Test, gefolgt von der Bonferroni-Korrektur, evaluiert. Die erhaltenen Unterschiede mit  $P \leq 0,05$  geteilt durch die Anzahl der sinnvollen Vergleiche wurden als signifikant angesehen.

### **4.4.2 Datenanalyse (Studie III)**

Die Daten der Studie III wurden statistisch mit SigmaPlot® 12.0 (Systat Software Inc.) analysiert. Sie wurden mittels Shapiro-Wilk- und Levene-Test auf mögliche Normalverteilung und Gleichheit der Varianz untersucht. Alle nachträglichen Tests wurden ebenfalls mit SigmaPlot® 12.0 durchgeführt. Bei parametrischen Daten wurden signifikante Unterschiede in der perioperativen Phase mittels Einweg-Varianzanalyse mit wiederholten Messungen mit paarweisem Vergleich nach der Holm-Sidak-Methode untersucht. Nicht-parametrische Daten wurden mit einer Rangplatzsummen-Varianzanalyse (dem Kruskal-Wallis-Test) gefolgt von der Student-Newman-Keuls-Methode auf signifikante Unterschiede untersucht. Die Daten der Therapiephase wurden anhand einer Zweiweg-Varianzanalyse mit Vergleich von Therapie und Phase nach der Holm-Sidak-Methode auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Unterschiede mit  $P \leq 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

Um die Leistung der einzelnen quantifizierenden Parameter zu vergleichen wurde eine Analyse der Kurven auf parameterabhängige Charakteristika (ROC, receiver operating characteristics) durchgeführt. Die Daten von allen Tieren vom Tag vor und nach der operativen Intervention wurden für eine Vorhersage der Belastung genutzt und die Fläche unter der Kurve (AUC, area under the curve) der ROC-Kurve, die 95% Konfidenzintervalle und der P-Wert

wurden für jeden Parameter berechnet. Dabei erlauben die ROC-Kurven eine Darstellung der Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests (69). Eine AUC von 1,0 bedeutet, dass dieser Parameter perfekt ist um zwischen prä- und postoperativen Tieren zu unterscheiden, wohingegen ein Wert von 0,5 anzeigt, dass keine Unterscheidungsmöglichkeit anhand dieses Parameters möglich ist. Um die AUC der Kombination von allen drei Parametern zu analysieren wurden die Daten durch ein Modell für multiple logistische Regression kombiniert und ROC-Kurven berechnet. Der beste Cut-Off für einzelne Parameter, wie KG-Veränderung, Buddeln und FCMs, wurde mit Youden's J-Index berechnet und die Datenerhebungspunkte während der Therapiephase wurden anhand der Cut-Off-Werte auf Belastungsstufe 1 und 2 aufgeteilt.

#### **4.4.3 Mehrdimensionales Modell durch logistische Regression (Studie III)**

Die im Versuch vor (pre) und nach (op) der Operation gesammelten Daten (n=26; 52 Datenpunkte insgesamt) wurden zunächst als Trainingsdatensatz verwendet. Die Aufstellung der Daten bestand aus zwei unabhängigen Variablen (Buddeln und FCMs) und dem Status an jedem Datenpunkt (pre und op) als abhängige Größen. Es wurde eine (multidimensionale) logistische Regression in R (70) genutzt um mittels einfachem binomischen Modell Stichproben in zwei Kategorien (pre/op versus mittlere Belastungsstufe 1/2) einzuordnen. Unter Nutzung der Koeffizienten aus dieser Zuordnung wurde die Stufen-Trennlinie in der Ebene (Achsen: x= FCMs, y= Buddeln) der Trainingsdaten eingezeichnet. Die Klassifikationsgrenze für die Vorhersage wurde durch ROC-Analyse optimiert (Cut-off am kombinierten Sensitivitäts-/Spezifitätsmaximum). Die erhaltene Grenze wurde anschließend für Vorhersagen zu Training- und Testdaten genutzt um die Leistung und den Klassifikationserfolg zu beurteilen. Alle gesammelten Daten der einzelnen Therapiephasen (früh, mittel und spät) wurden als Testdatensätze für die jeweilige Behandlung (Metformin + Galloflavin, n=7, 21 Datenpunkte; Metformin + CHC, n=7, 21 Datenpunkte) zusammengeführt. Schließlich wurden die beiden Therapien einzeln einer der beiden Belastungsstufen zugeordnet (Stufe 1 oder 2).

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Studie I**

#### **5.1.1 Galloflavin hemmt die Laktatproduktion**

Zunächst wurde überprüft in wie weit Galloflavin die Laktatproduktion in 6606PDA Zellen hemmt. Abhängig von der Dosis reduzierte Galloflavin die Laktatkonzentration in diesen Zellen [(55), Figure 1A, Studie I]. Ab einer Konzentration von 80µM wurde eine signifikante Reduktion der Laktatkonzentration festgestellt [(55), Figure 1B, Studie I]. Die Wirkung auf die Laktatkonzentration im Zellüberstand zeigte eine ähnliche Dosisabhängigkeit [(55), Figure 1C, Studie I]. Auch hier war die Laktatkonzentration bei 80 µM Galloflavin gegenüber der Behandlung mit Trägermedium signifikant verringert [(55), Figure 1D, Studie I]. Der proportionale Abfall von Laktat sowohl im Zellüberstand, als auch im Zelllysate bestätigt, dass die Behandlung mit Galloflavin nicht den zellulären Ausstrom von Laktat, sondern die Laktatproduktion durch Inhibition der LDH beeinflusst.

#### **5.1.2 Galloflavin plus Metformin hemmt die Proliferation und fördert den Zelltod**

Die Behandlung von 6606PDA-Zellen mit Galloflavin führte zu einer dosisabhängig verminderten Proliferation [(55), Figure 2A, Studie I]. Das Hinzufügen von 20 mM Metformin verstärkte die Wachstumshemmung zusätzlich [(55), F Figure. 2A, Studie I]. Die Behandlung mit Metformin reduzierte die Proliferation kaum, wohingegen Galloflavin eine signifikante Hemmung des Zellwachstums, verglichen mit Zellen die mit Sham behandelt wurden, bewirkte [(55), Figure 2B, Studie I]. Die Kombinationstherapie Galloflavin plus Metformin behinderte das Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur Galloflavin-Monotherapie leicht und verglichen zur Metformin-Monotherapie signifikant [(55), Figure 2B, Studie I]. Eine ähnliche Dosisabhängigkeit in der Zellwachstumshemmung wurde bei der Behandlung von MIA PaCa-2-Zellen mit Galloflavin beobachtet [(55), Figure 2C, Studie I]. Bei Konzentrationen von 5 µM und 20 µM Galloflavin führte die Hinzugabe von 20 mM Metformin zu einer signifikant erhöhten Hemmung des Wachstums [(55), Figure 2C, Studie I]. In dieser Zelllinie reduzierte bereits die Kombination aus 20 µM Galloflavin und 20 mM Metformin das Wachstum signifikant verglichen mit Sham oder Galloflavin [(55), Figure 2D, Studie I]. Diese Daten lassen darauf schließen, dass Galloflavin plus Metformin einen additiven Effekt auf die Hemmung der Proliferation von Bauchspeicheldrüsenkrebszellen hat.

Galloflavin induziert in 6606PDA-Zellen den Zelltod dosisabhängig, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Metformin [(55), Figure 3A, Studie I]. Bei Konzentrationen von 5 und 20 µM zeigt Galloflavin plus 20 mM Metformin, eine signifikante Steigerung der Zelltodinduktion [(55), Figure 3A, Studie I]. Die Behandlung mit 20 mM Metformin oder 80 µM Galloflavin induzierte den Zelltod signifikant, verglichen mit Sham-Therapie-Zellen [(55), Figure 3B, Studie I]. Die Kombination Galloflavin plus Metformin induzierte den Zelltod etwas mehr als die Galloflavin-Monotherapie und signifikant mehr als die Metformin-Monotherapie [(55), Figure 3B, Studie I]. Auf die MIA PaCa-2 Zellen wirkte Galloflavin ebenfalls dosisabhängig zelltodinduzierend, sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Metformin [(55), Figure 3C, Studie I]. Wobei die Hinzugabe von Metformin nicht zu einer signifikant höheren Zelltodinduktion durch Galloflavin führte [(55), Figure 3C – D, Studie I]. Diese Ergebnisse belegen, dass der additive Effekt der Therapie auf die Zelltodinduktion durch Galloflavin plus Metformin nur in einigen pankreatischen Krebszelllinien beobachtet werden kann.

#### **5.1.3 Galloflavin plus Metformin hemmt das Wachstum unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen**

Bei der Untersuchung der Auswirkung von Hypoxie (Sauerstoffarmut) auf die Wirksamkeit von Galloflavin und Metformin, wurden 6606PDA Zellen mit diesen Wirkstoffen jeweils über 30

Stunden unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen behandelt. In beiden Fällen hemmten 20  $\mu$ M Galloflavin das Wachstum nur leicht, wohingegen die 20 mM Metformin-Monotherapie eine signifikante Wachstumshemmung verursachte [(55), Figure 4A – B, Studie I]. Die Kombinationstherapie Galloflavin plus Metformin hemmte das Wachstum signifikant, verglichen mit den Monotherapien [(55), Figure 4A – B, Studie I]. Dies lässt vermuten, dass die Kombinationsbehandlung Galloflavin plus Metformin sowohl auf sauerstoffunterversorgte, große, solide Tumoren als auch auf gut sauerstoffversorgte, kleinere Krebszellansammlungen, wie Metastasen, eine wachstumshemmende Wirkung hätte.

## **5.2 Studie II**

### **5.2.1 CHC plus Metformin hemmt die Proliferation und fördert den Zelltod**

Im Gegensatz zu Galloflavin hemmt CHC den zellulären Ausstrom des Laktates und greift damit an anderer Stelle in den Laktatstoffwechsel ein. Um zu untersuchen, ob auch dieser Eingriff in den Zellstoffwechsel zu einer Proliferationshemmung und zur Förderung des Zelltodes von 6606PDA Zellen führt, wurden diese mit 10 mM CHC, 5 mM Metformin oder einer Kombination der beiden behandelt. Dabei zeigte sich, dass die Monotherapien verglichen mit Sham die Proliferation signifikant hemmten [(62), Figure 2A, Studie II]. Die Kombinationstherapie CHC plus Metformin hemmte die Proliferation ebenfalls signifikant, sowohl verglichen mit Sham als auch mit den Monotherapien [(62), Figure 2A, Studie II]. Die Dosis von 10 mM CHC induzierte verglichen mit Sham den Zelltod signifikant, während 5 mM Metformin den Anteil der toten Zellen nur leicht erhöhte [(62), Figure 2B, Studie II]. Die Kombination CHC plus Metformin wiederum induzierte verglichen mit den Monotherapien und Sham den Zelltod signifikant [(62), Figure 2B, Studie II].

### **5.2.2 CHC plus Metformin ist sicher für Mäuse und behindert das Pankreaskarzinom**

Bei der Bestimmung der geeigneten Dosierung *in vivo* im syngenem orthotopen Pankreaskarzinom-Modell wurden drei Behandlungsstrategien evaluiert. 15 mg/kg CHC plus 125 mg/kg Metformin (low dose), 60 mg/kg CHC plus 125 mg/kg Metformin (moderate dose) sowie 240 mg/kg CHC plus Metformin (high dose) wurden zur Behandlung der operativ induzierten Tumore genutzt [(62), Figure 2C, Studie II]. Hierbei überlebten nur wenige Mäuse die mittlere beziehungsweise hohe Dosierung [(62), Figure 2D, Studie II], während alle mit der niedrigen Dosierung behandelten Mäuse überlebten [(62), Figure 2D, Studie II]. Bei der Therapie mit 15 mg/kg CHC, 125 mg/kg Metformin und der Kombination aus beiden zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Aspartataminotransferase (AST)- und Alaninaminotransferase (ALT)-Aktivität, zwei Indikatoren für Hepatotoxizität, im Blutplasma [(62), Figure 2E und S1A, Studie II]. Ferner führte die Medikation zu keiner Erhöhung der Lipase-Aktivität, ein Indikator für Inflammation des Pankreas, im Blutplasma [(62), Figure S1B, Studie II]. So wurde die Dosierung von 15 mg/kg CHC genutzt, um den Behandlungsvorteil durch CHC plus Metformin *in vivo* zu untersuchen. Es zeigte sich eine geringe Verminderung des Tumorgewichtes durch die Behandlung mit CHC oder CHC plus Metformin im Vergleich zu Sham-Therapie-Tieren [(62), Figure 2F, Studie II]. Jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant. Interessanterweise verursachten die Behandlungen mit CHC und CHC plus Metformin eine signifikante Zunahme der peritumorösen Stromareaktion, definiert durch die Kollagen I-Ablagerung [(62), Figure 3A – C, Studie II]. Zwischen den Tumoren der Metformin- und Sham-Behandlungsgruppen gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede. Daraus lässt sich ableiten, dass CHC aber nicht Metformin die CAF zur vermehrten Produktion vom Kollagen I anregt. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass die CAF die proliferationshemmende Wirkung von CHC und Metformin beeinträchtigen.

### **5.2.3 Hemmung der Autophagie in CAF verstärkt die Wirksamkeit der Chemotherapeutika**

Um die Rolle der CAF bei der Beeinträchtigung der antiproliferativen Wirkung der Chemotherapeutika zu untersuchen, folgten Zellkultur-Experimente. Dazu wurden LTC und 6606PDA-Zellen co-kultiviert und mit CHC, Metformin oder einer Kombination aus beiden behandelt. Es zeigte sich dabei eine Abschwächung des proliferationshemmenden Effektes aller Therapien in Anwesenheit der LTC, jedoch ohne einen maßgeblichen Einfluss der LTC auf die Proliferation von unbehandelten Zellen [(62), Figure 3D – F, Studie II]. Diese Beobachtung suggeriert, dass die LTC die Resistenz gegenüber Chemotherapien in Pankreaskarzinomen induzieren. Um zu untersuchen ob Autophagie in CAF zu dieser Resistenzinduktion beiträgt wurden die LTC im nächsten Schritt mit 50  $\mu$ M CQ, einem Autophagie-Hemmstoff, vorbehandelt. Nach der Blockierung der Autophagie waren die co-kultivierten pankreatischen Tumorzellen empfindlicher gegenüber den Therapien [(62), Figure 4, Studie II]. Um zu eruieren, ob die Hemmung der Autophagie auch die Wirksamkeit von Gemcitabin, einem Erst-Linien-Therapeutikum bei inoperablem Pankreaskarzinom (3), steigern kann wurden zunächst zwei unterschiedliche Tumorzelllinien (MIA PaCa-2 und 6606PDA) mit LTC co-kultiviert und anschließend mit Gemcitabin behandelt. Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Proliferationshemmung durch Gemcitabin in der Co-Kultur [(62), Figure 5A – B, Studie II]. Auch hier hatte die Co-Kultur mit LTC selbst keinen maßgeblichen Einfluss auf die Proliferation der unbehandelten Zellen [(62), Figure 5A – B, Studie II]. Daraus lässt sich schließen, dass die LTC eine Resistenz in pankreatischen Tumorzellen induzieren. Nach Blockierung der Autophagie in den LTC mit CQ zeigten die co-kultivierten Tumorzellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Gemcitabin [(62), Figure 5C, Studie II]. Diese Ergebnisse ließen sich durch den Einsatz von BAF, ein anderer Autophagie-Hemmstoff, bestätigen [(62), Figure 5D, Studie II]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass zwei unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen [(62), Figure 5E, Studie II]. So stimulieren CAF die Proliferation von pankreatischen Tumorzellen nicht signifikant, schützen diese jedoch vor den Chemotherapeutika. Ein separater Prozess ist die Hemmung der Autophagie. Die Blockierung der Autophagie in CAF hemmt die Proliferation der Tumorzellen.

Schließlich wurde der Effekt der Inhibition der Autophagie, im Sinne eines Grundsatzbeweises, im Tierversuch auf dessen Verträglichkeit und Einfluss auf das Tumorstadium untersucht. Nach Tumorzellinjektion und Behandlung einer Kohorte mit CQ, zeigte sich eine signifikante Reduktion des Tumorgewichtes in dieser Kohorte im Vergleich zur Sham-Therapie [(62), Figure 6A, Studie II]. CQ verursachte dabei, gemessen an der KG-Änderung, keine starke Belastung der Mäuse [(62), Figure 6B, Studie II].

### **5.2.4 Chemotherapeutika modulieren die Autophagie in LTC-Zellen**

Für die Beurteilung des Einflusses der Chemotherapien auf die Autophagie in LTC wurden diese mit Metformin, CHC, CHC plus Metformin oder Gemcitabin behandelt. Die Behandlungen mit CHC und CHC plus Metformin führte zu einer erhöhten Akkumulation von p62 [(62), Figure 7A, Studie II]. Daraus lässt sich schließen, dass diese Chemotherapien den Autophagieablauf blockieren. Ferner zeigte sich, dass Metformin die p62-Konzentration in LTC erniedrigt und damit den Autophagieablauf fördert. Schließlich wurde unter Gemcitabin-Therapie eine verminderte Akkumulation von p62 in LTC [(62), Figure 7B, Studie II] detektiert, was wiederum die Induktion der Autophagie in LTC durch Gemcitabin suggeriert. Womit die verschiedenen Therapeutika also gegensätzliche Wirkungen auf die Autophagie in CAF haben.

### **5.3 Studie III**

#### **5.3.1 Belastung durch Laparotomie und Tumorzellinjektion**

Neben der Wirkung der Chemotherapien wurden schließlich auch deren Nebenwirkungen untersucht. Beginnend mit der Quantifizierung der Belastung im Vergleich zum operativen Eingriff und mit dem Ziel der Einordnung der Belastung durch die Therapeutika für die Versuchstiere wurden dazu diverse Indikatoren untersucht.

Zur Evaluation der Belastung nach Laparotomie und Tumorzellinjektion wurden alle Belastungsparameter vor, am Tag der Operation sowie an Tag 1 und Tag 2, den Tagen der Erholung, erhoben [(56), Fig. 1, Studie III]. Der Belastungsscore war 30 Minuten nach dem Eingriff leicht erhöht. Jedoch erholten sich die Mäuse innerhalb eines Tages [(56), Fig. 2A, Studie III]. Das Nistverhalten war nach der Operation signifikant reduziert, erholte sich aber ebenfalls rasch [(56), Fig. 2B, Studie III]. Im Anschluss an die Laparotomie zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion des KG, welche bis Tag 2 anhielt [(56), Fig. 2C, Studie III]. Das Buddelverhalten war nach dem Eingriff signifikant vermindert und erholte sich innerhalb eines Tages [(56), Fig. 2D, Studie III]. Es zeigte sich außerdem ein signifikanter Anstieg der FCM-Konzentration nach dem Eingriff bis Tag 2 [(56), Fig. 2E, Studie III].

#### **5.3.2 Belastung während der chemotherapeutischen Intervention**

Um die Belastung durch zwei unterschiedliche Chemotherapien zu eruieren erhielten die Mäuse entweder Metformin plus Galloflavin oder Metformin plus CHC. Während der Therapie wurde die Belastung der Tiere evaluiert indem unter anderem das KG, das Buddelverhalten und die FCM-Konzentration analysiert wurden.

Die Mäuse der Metformin + Galloflavin-Therapiegruppe zeigten während der frühen Therapiephase eine signifikante KG-Reduktion im Vergleich zu den Vorwerten, wohingegen die Sham-Tiere erst in der späten Phase der Intervention eine signifikante Verminderung des KG zeigten [(56), Fig. 4A, Studie III]. Auch nach Metformin + CHC zeigte sich erst in der späten Therapiephase eine signifikante KG-Reduktion [(56), Fig. 4A, Studie III]. Das Buddelverhalten war unter Metformin + Galloflavin in der frühen und mittleren Phase signifikant reduziert [(56), Fig. 4C, Studie III]. Im Gegensatz dazu wurde in der Met + CHC- sowie in der entsprechenden Sham-Gruppe während der gesamten Therapiephase keine signifikante Reduktion im Buddelverhalten beobachtet [(56), Fig. 4D, Studie III]. Die FCM-Konzentrationen waren während der gesamten Therapiephase mit Metformin + Galloflavin erhöht, während unter Sham-Therapie erst in der späten Phase signifikante Erhöhungen gemessen wurden [(56), Fig. 4E, Studie III]. In der mittleren Phase der Therapie waren die FCM-Konzentrationen unter Metformin + Galloflavin im Vergleich mit Sham signifikant höher [(56), Fig. 4E, Studie III]. Zur Verifizierung dieser Daten wurde zusätzlich die Plasmacorticosteron-Konzentration an zehn zusätzlichen Mäusen ermittelt. Im Ergebnis zeigten sich auch hier signifikant erhöhte Konzentrationen während der mittleren Phase [(56), Fig. S3, Studie III]. Im Gegensatz zu Metformin + Galloflavin zeigte sich unter Metformin + CHC keine erhöhte FCM-Konzentration [(56), Fig. 4F, Studie III]. Somit scheint Metformin + Galloflavin im Vergleich eine höhere Belastung der Mäuse zu verursachen.

#### **5.3.3 Klassifizierung der Belastung**

Zunächst wurde evaluiert in wie weit KG-Änderung, Buddelverhalten und FCM-Konzentration zwischen Belastung vor und nach dem operativen Eingriff zu differenzieren vermag. Dazu wurde nach einer ROC-Kurvenanalyse (receiver operating characteristics) die AUC (area under the curve) als Maß für die Fähigkeit der Methoden zwischen den skizzierten Belastungsstufen zu unterscheiden genutzt. Hierbei zeigte die prozentuale KG-Änderung eine geringe diskriminative Stärke in der Unterscheidung zwischen prä- und postoperativen Daten,

wohingegen das Buddelverhalten und die FCM-Konzentration signifikant bessere Anzeigeparameter darstellten [(56), Fig. 5A – C, Studie III]. Die Kombination aus Buddelverhalten und FCM-Konzentration sowie die Kombination aller drei Parameter mittels multipler logistischer Regression ergab eine sehr hohe AUC [(56), Fig. 5D – E, Studie III]. Dies weist darauf hin, dass eine multifaktorielle Belastungsanalyse zwischen Belastungsstufen besser unterscheiden kann als die Verwendung einzelner Methoden.

Um für die Zuordnung zu definierten Belastungsniveaus die effizientesten Anzeigeparameter zu kombinieren wurde zunächst ein Übungsmodell generiert. Die Werte aus den Buddel- und FCM-Analysen für jedes Tier wurden zum Zeitpunkt vor (pre) und nach der Operation (op) in ein 2D-Streuungsdiagramm eingezeichnet [(56), Fig. 6A, Studie III]. Durch multivariate logistische Regression wurden diese beiden Cluster mittels Definierung eines Diskriminators getrennt. Das Cluster, in dem 96% der präinterventionellen Datenpunkte lagen, wurde als Belastungsniveau 1 klassifiziert. Das andere Cluster, bestehend aus 87% der Datenpunkte der postoperativen Tiere, wurde als Belastungsniveau 2 definiert [(56), Fig. 6B, Studie III]. Mit dem so etablierten Diskriminator erreichte das Übungsmodell eine Genauigkeit von 0,9231, eine Sensitivität von 0,9583 und eine Spezifität von 0,8926 [(56), Fig. 6B, Studie III]. Anschließend wurden die Einzeltestdatenpunkte für Metformin + Galloflavin und Metformin + CHC, jeweils aus der frühen, mittleren und späten Phase in dem Übungsmodell erfasst und mithilfe des Diskriminators den zwei Belastungsniveaus zugeordnet [(56), Fig. 6C – D, Studie III]. Aus der Metformin + Galloflavin – Gruppe wurden damit zwei Datenpunkte dem Belastungsniveau 1 und 19 Datenpunkte dem Belastungsniveau 2 zugeordnet [(56), Table 1, Studie III]. Aus der Metformin + CHC – Gruppe wurden so 12 Datenpunkte dem Belastungsniveau 1 und neun Datenpunkte dem Niveau 2 zugeordnet. Der exakte Fisher-Test bestätigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Belastungsniveaus unter den zwei Behandlungen ( $P = 0,003$ ) [(56), Table 1, Studie III]. Schließlich wurde noch die Effektivität der Belastungseinschätzung mithilfe von einzelnen Parameter untersucht. Dazu wurde der beste Cutoff zwischen den präoperativen (pre) und postoperativen (op) Daten mit dem *Youden's J* – Index berechnet. Die Daten der frühen, mittleren und späten Therapiephasen wurden anschließend gebündelt und den Belastungsniveaus anhand des zuvor berechneten Cutoffs zugeordnet. Bei der anschließenden Zuordnung der Daten anhand der KG-Änderung wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Metformin + Galloflavin und Metformin + CHC festgestellt [(56), Table 2, Studie III]. Dies bestätigt die niedrige Leistung der KG-Änderung für die Unterscheidung zwischen prä- und postoperativen Tieren [(56), Fig. 5A, Studie III]. In der Separierung der Belastungsniveaus mithilfe des Buddelverhaltens wurden die meisten Tiere der Metformin + Galloflavin – Gruppe dem Niveau 2 zugeordnet, während die Metformin + CHC – Gruppe vor allem dem Niveau 1 zugeordnet wurden [(56), Table 2, Studie III]. Im exakten Fisher-Test bestätigte sich der signifikante Unterschied ( $P = 0,028$ ) in der Zuordnung der beiden Therapien. Bei der Beurteilung mittels FCM-Konzentration ergab sich für die Metformin + Galloflavin – Gruppe für fast alle Tiere die Zuordnung zum Belastungsniveau 2, während sich der größte Teil der Metformin + CHC – Gruppe im Belastungsniveau 1 befand [(56), Table 2, Studie III]. Der exakte Fisher-Test bestätigte auch hier einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Therapien ( $P < 0,001$ ). Sowohl die multifaktorielle Belastungsanalyse als auch die Belastungsanalyse mit den Einzelparametern Buddelverhalten und FCM zeigen, dass die Metformin + Galloflavin – Therapie eine höhere Belastung der Mäuse verursacht als Metformin + CHC.

## 6 Diskussion

### 6.1 Studie I

Die Studie I zeigte, dass durch die Kombination aus Galloflavin und Metformin ein additiver Effekt auf die Zelltodinduktion und Proliferationsinhibition der Pankreaskarzinomzellen sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen erzielt wird. Dies suggeriert eine effektive Wirkung sowohl in gut versorgten kleineren Tumormassen, wie Metastasen, als auch in größeren Tumoren, welche aufgrund des zum Tumorstadium disproportionalen Gefäßwachstums zunächst relativ und im Verlauf meist auch absolut unterversorgt mit Nährstoffen und Sauerstoff sind.

Die Nutzung von Metformin, einem Erstlinienmedikament bei Diabetes mellitus Typ 2, stellte dabei die Grundlage der Therapie dar. Studien wie die von Evans et al. sahen anhand von Registerdaten bei antidiabetisch dosiertem Metformin ein im Sinne einer prophylaktischen Wirkung reduziertes Krebsrisiko von an Diabetes Typ 2 Erkrankten (47). Dabei wurde jedoch allgemein nach Krebsdiagnosen gesucht ohne einzelne Entitäten zu betrachten, weshalb die Aussagekraft auch von den Autor\*innen selbst als eher unsicher beschrieben wurde und diese prospektiven Studien forderten. Als Mechanismus für die protektive Wirkung vermuteten Evans et al. dabei die Wirkung von Metformin auf die Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte Proteinkinase und deren Interaktion mit LKB1 (Liver kinase B1), einem vorgeschalteten Tumorsuppressorprotein (42, 49, 71, 72). Kordes et al. hingegen stellten fest, dass eine antidiabetische Metformintherapie bei bereits Pankreaskarzinomkranken keinen Überlebensvorteil darstellte (46). Wei et al. legten sich 2019 im Rahmen einer Metaanalyse schließlich fest, dass die beschriebenen antikanzerösen Effekte in klinischen Studien nicht auf Metformin zurückgehen konnten, sondern Folge eines immortal time bias wären (73). In den vergangenen Jahren konnte in präklinischen Studien schon mehrfach eine direkte Wirkung von hochdosiertem Metformin auf Tumoren gezeigt werden (49, 74–76). Diese Arbeit bestätigte die Wirkung unter Verwendung der 6606PDA-Zelllinie. Die Daten weisen jedoch darauf hin, dass für eine Hemmung der Karzinomzellproliferation eine hohe Metforminkonzentration (20mM) verwendet werden muss. Dies weist auf einen deutlich höheren Schwellenwert für die antikanzeröse im Vergleich zur antidiabetischen Wirkung hin. Ferner zeigt die bisherige Inkonsistenz der Ergebnisse allerdings auch, dass weitere klinische und präklinische Studien notwendig sind, um eine klar wirkungsvolle Therapieoption bei Pankreaskarzinomen mit Metformin zu definieren. Metformin als Basis für die in dieser Arbeit untersuchte Kombinationstherapie ist vor allem aufgrund seiner gut bekannten Verträglichkeit und Wirkung ausgewählt worden. Jedoch gibt es auch andere, teils gut bekannte Wirkstoffe aus der Klasse der Biguanide, die in Frage kämen. So ist Phenformin, wie auch Metformin, seit den 1950er Jahren als antidiabetischer Wirkstoff bekannt und hat eine deutlich größere Wirkpotenz (77, 78). Jedoch ist es auch mit einem höheren Risiko für Laktatazidosen verbunden und deshalb in den 1970er Jahren vom Markt genommen worden (77, 79). Dies führte dazu, dass Phenformin im Vergleich deutlich später in der Tumortheraieforschung betrachtet wurde. Anhand der Zugehörigkeit zur selben Wirkstoffklasse kann dabei von einer gleichartigen antikanzerösen Wirkung ausgegangen werden, was bisher auch in mehreren Studien nachgewiesen wurde (78, 80–84). Es zeigte sich dabei eine Überlegenheit von Phenformin gegenüber Metformin in Bezug auf die Wirksamkeit (78, 79, 82, 85). Diese beruht unter anderem auf einer im Vergleich höheren intrazellulären Konzentration von Phenformin durch einen nicht-Transporter-abhängigen Eintritt in die Zellen (79, 84, 85). Dadurch ist auch eine Wirkung in Zellen mit deutlich reduzierter Expression der entsprechenden organischen-Kation-Transporter möglich. Größter Nachteil von Phenformin gegenüber Metformin bleibt jedoch das deutliche und lang bekannte Risiko für Laktatazidosen (78, 79, 85,

86). Dieses Risiko liegt allerdings in der Literatur mit 40 bis 64 Fällen pro 100.000 Patientenjahren in einem - absolut betrachtet - kleinen Bereich, verglichen mit anderen potentiell schwerwiegenden Nebenwirkungen der Standard-Wirkstoffe aus der Tumorthherapie (87, 88). Ein weiteres Biguanid, das als Alternative in Frage kommt, ist das Buformin. Dieses steht biochemisch gesehen zwischen Phenformin und Metformin, bezogen sowohl auf die Lipophilie als auch auf die Wirksamkeit in vitro auf unterschiedliche Tumorzelllinien (85, 89–92). Jedoch ließ sich in der Literatur kein echter Vorteil gegenüber Phenformin finden, zumal auch für Buformin das erhöhte Risiko für Laktatazidosen, bei geringerer Wirksamkeit als Phenformin, besteht (90, 93). Ein anderer Wirkstoff mit Hemmwirkung auf den Komplex I der Atmungskette ist IACS-010759 (94, 95). Ein kleines Molekül mit spezifischer Wirkung auf die Nicotinamadeninindinukleotid (NADH)-Ubichinon-Oxidoreduktase, welches nicht zu den Biguaniden gehört. Für diesen konnte bereits eine gute Wirksamkeit gegen mehrere Tumorentitäten in vitro und/oder in vivo gezeigt werden (94–99). Aktuell befindet sich IACS-010759 in zwei klinischen Phase 1 – Studien, welche zwar abgeschlossen sind, ihre Ergebnisse bislang jedoch nicht veröffentlicht haben (100, 101). In einer der beiden Studien sind hierbei auch Patient\*innen mit duktalem Pankreaskarzinom eingeschlossen worden. (100) Ein Vorteil von IACS-010759 gegenüber den anderen Komplex I - Hemmstoffen scheint dabei die gute Wirksamkeit zu sein. Unerwünschte Wirkungen wurden bisher von Molina et al. im akute myeloische Leukämie (AML)-Mausmodell beschrieben (95). So wurde eine beobachtbare Lethargie, KG-Reduktion und Hypothermie im Hochdosisbereich (25mg/kgKG) beobachtet, wobei sich die gewünschte Wirkung auf die AML bereits bei 5 und 10 mg/kgKG beobachtet wurde (95). Daneben zeigte sich auch eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit des Chlorwasserstoffsalzes von IACS-010759, wodurch keine invasive Medikation notwendig war. (95) Unter der Voraussetzung einer guten Verträglichkeit im Rahmen der noch ausstehenden Phase 1 – Studienergebnisse (100, 101) ist somit eine Nutzung von IACS-010759 vielversprechend genug um eine präklinische Ausweitung auf Pankreaskarzinommodelle und Kombinationstherapien mit LDH-Inhibitoren zu rechtfertigen (97).

Hemmstoffe der ATP-Synthese können insbesondere in Kombination mit einem LDH-Hemmstoff antitumoröse Wirkung entfalten, da durch eine derartige Kombinationstherapie sowohl die Funktion der Atmungskette gehemmt und die anaerobe Glykolyse reduziert wird. In dieser Studie wurde Galloflavin, ein LDH-Inhibitor ausgewählt (50, 52, 102). In der Zellkultur konnte die Wirkung anhand der dosisabhängigen Laktatkonzentrationsreduktion bestätigt werden [(55), Figure 1, Studie I]. Jedoch stellt Galloflavin chemisch eine Herausforderung dar, weil es sehr lipophil ist und somit in klinisch üblichen Lösungsmittel wie isotoner Kochsalz- oder Glukoselösung nicht verabreicht werden kann (52). Andere LDH-Inhibitoren wie Oxamat, FX-11 oder Verbindungen aus der Gruppe der N-Hydroxyindole (NHI) würden deshalb denkbare Alternativen darstellen (103–105). Dabei stellt Oxamat den wohl ältesten Wirkstoff dieser Gruppe dar, weshalb die biologischen und chemischen Eigenschaften gut untersucht sind. So hat Oxamat eine höhere Bindungsaffinität an die LDH als Galloflavin, ist jedoch kaum in der Lage intakte Zellmembranen zu überwinden, was das Erreichen ausreichend hoher intrazellulärer Wirkspiegel verhindert (103). Ferner ist Oxamat ein unselektiver Wirkstoff und wirkt auch auf andere Enzyme wie die AST sogar mit höherer Affinität als gegenüber der LDH (103). Ähnliches gilt für FX-11, ein Derivat der 2,3-Dihydroxy-1-Naphthoesäure, welches ursprünglich als Antiprotozoikum entwickelt wurde und ebenfalls unselektiv, jedoch mit deutlicher Präferenz für das menschliche LDH-5-Isoenzym, wirkt. In Tierversuchen konnte für FX-11 bereits eine Tumorwachstum-hemmende Wirkung in einem Lymphom- und einem Pankreaskarzinom-model nachgewiesen werden, wobei in der Arbeit von Le et al. die angestrebten Dosen aufgrund der schlechten Löslichkeit von FX-11 nicht erreicht wurden (105). Eine weitere Alternative stellen die durch Granchi et al. beschriebenen NHI - basierten

LDH-Inhibitoren dar (103, 106, 107). Diese zeichnen sich durch ihre Selektivität für die humane LDH-A und die potente kompetitive Inhibition sowohl an der Substratbindungsstelle als auch an der Bindungsstelle des Co-Faktors (NADH) aus (106, 107). Darüber hinaus konnte bereits eine antiproliferative Wirkung auf zwei Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt werden (107). Eine ebenfalls vielversprechende Alternative stellen die von Amr et al. 2020 beschriebenen modifizierten Tetrapeptide dar (108). In ihrer Arbeit konnten sie eine unter anderem gegenüber Galloflavin überlegene Wirkung auf die humane LDH-A sowohl in vitro wie auch in vivo auf Brustkrebszellen zeigen (108). Jedoch sind die hier in vitro ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen deutlich höher als die der NHI (107, 108). Ein aktuell noch bleibender Vorteil von Galloflavin ist die kommerzielle Verfügbarkeit im Vergleich zu den neu beschriebenen Substanzen. Angesichts der bisherigen Ergebnisse stellen die NHI eine vielversprechende, zukünftig weiter zu verfolgende Tumorthherapie dar und sollten im Rahmen von in vivo Pankreaskarzinommodellen weiter evaluiert werden. Die Recherche nach weiteren potenten LDH-Inhibitoren ergab, dass Ward et al. Substratbindungsstellen analysierten und anschließend stereochemisch begründet passende Molekülfragmente kombinierten, um noch unbenannte LDH-Inhibitoren mit deutlich niedrigeren IC<sub>50</sub>-Konzentrationen im Vergleich zu NHI zu synthetisieren (109). So waren die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen der NHI 1h, 1i und 1j (Granchi et al. (106)) im niedrigen zweistelligen mikromolaren Bereich in Bezug auf eine suffiziente Proliferationshemmung in der LPC006-Pankreaskarzinomzellkultur, wohingegen Ward et al. von IC<sub>50</sub>-Konzentrationen der Substanzen 31 und 34 im nanomolaren Bereich gegenüber aufgereinigten LDH-A-Enzymlösungen berichteten (106, 109). Ward et al. zogen in ihrer Arbeit das Fazit, dass es bei den beschriebenen Wirkstoffen noch weiterer Anpassungen bedürfe bevor diese in vivo untersucht werden könnten (109). Einer der von Granchi et al. beschriebenen Wirkstoffe lässt sich inzwischen als „NHI 2“ online finden und bestellen (110). Dieser entspricht einer C1-methylierten Form des von Granchi et al. beschriebenen Wirkstoffes 1j (106, 110).

Bei der Betrachtung dieser Inhibitoren ergibt sich die Frage ob eine hochselektive Wirkung auf LDH-A notwendig ist, weil eine Hemmung von sowohl LDH-A als auch LDH-B zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) führen könnte. Bereits 1995 wurde von Kanno et al. gezeigt, dass selbst eine vollständige (hereditäre) LDH-B-Defizienz beim Menschen zu keiner Erkrankung führt und eher als laborchemischer Zufallsbefund gilt (111). Somit haben Inhibitoren, die beide LDH-Isoformen hemmen, im Vergleich zu spezifischen LDH-A Inhibitoren nicht automatisch ein höheres Risiko dem restlichen Organismus zu schaden. Eine reduzierte Enzymfunktion von LDH-A führt hingegen unter anaerobem Stress zu einer hepatischen Schädigung mit konsekutivem Anstieg von AST und ALT im Blut, was gelegentlich als chronische Hepatitis missdeutet wird (111). Es ließen sich allerdings auch keine Fallberichte zu irreversiblen hepatischen Schäden bei LDH-A-Defizienz-Erkrankten finden. Diese Publikationen unterstreichen die Annahme, dass die LDH-Inhibition eine nebenwirkungsarme Tumorthherapie darstellen könnte.

Zusammenfassend sollte der Therapieansatz aus Hemmung der oxydativen Phosphorylierung und LDH-Inhibition weiter verfolgt werden. Die Kombination aus IACS-010759 und NHI 2 ist dafür vielversprechend und sollte in kommenden präklinischen Studien angewendet werden.

## 6.2 Studie II

Die Studie II kommt zu zwei Ergebnissen. Die CAF verstärkten die Chemoresistenz der Pankreaskarzinomzelllinien MIA PaCa-2 und 6606PDA. Weiterhin konnte diese Studie zeigen, dass eine zusätzliche medikamentöse Autophagiehemmung in den CAF die Sensitivität der co-kultivierten Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika erhöhen kann (62).

Peritumoröse Bindegewebs- und Pankreaskarzinomzellen stehen in gegenseitigen

Wechselwirkungen (112–114). Die Analyse der Tumore in dem verwendeten orthotopen Pankreaskarzinommodell wiesen eine ausgeprägte peritumoröse Stromareaktion nach [(62) Figure 3A, Studie II]. Man vermutete zunächst, dass die dadurch entstehende mechanische Barriere den Zugang der Therapeutika zu den Tumoren verhindere (112, 115, 116). Inzwischen ist dieser Ansatz jedoch weitgehend verworfen, da in zahlreichen präklinischen Studien gezeigt werden konnte, dass die intergeweblichen Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und CAF zur Chemoresistenz führen (23, 112–115, 117). So exkretieren viele Tumore entsprechende Wachstumsfaktoren wie etwa FGF (fibroblast growth factor) (113, 115, 118). Dadurch kommt es zu einer Vermehrung der CAF und einer einhergehenden fortschreitenden Veränderung der direkten Tumorumgebung. In Studie II konnte gezeigt werden, dass auch CAF Pankreaskarzinomzellen beeinflussen. So führt die Hemmung der Autophagie in CAF zusätzlich zur Behandlung der Karzinomzellen mit antikanzerogenen Therapien zu einer verstärkten Reduktion der Karzinomzellproliferation [(62), Figure 4A-C, Studie II]. Interessant ist dabei, dass auch die verwendeten Wirkstoffe der Kombinationstherapien selbst unterschiedliche Wirkungen auf die Autophagie zeigten und diese im Fall von Gemcitabin und Metformin sogar förderten [(62) Figure 7, Studie II]. Dieses Ergebnis ist konsistent mit weiteren publizierten Studien (119–121). Zudem zeigte Hashimoto et al., dass die Inhibition der Autophagie selbst bereits eine antiproliferative Wirkung auf die pankreatischen Tumorzellen hat (120). Verantwortlich dafür ist die erhöhte Autophagierate in den Pankreaskarzinomzellen, welche für die Tumorgenese und –stase wichtig ist (122). Somit könnte die Hemmung der Autophagie sowohl in den CAF als auch direkt in den Karzinomzellen das Wachstum von Pankreaskarzinomen hemmen. Diese Hypothese wird durch Studie II unterstützt, in der eine signifikante Hemmung der Tumorgroße durch den Autophagieinhibitor CQ beschrieben wurde [(62), Figure 6A, Studie II].

In den vergangenen Jahren hat das Konzept der zusätzlichen Autophagieinhibition auch in die ersten klinischen Studien Einzug gehalten. Aktuell ließen sich dazu drei Phase I – Studien finden (123–125). Bislang ist eine dieser drei beendet, während sich die übrigen noch in der Rekrutierungsphase befinden. Allerdings ließen sich noch keine publizierten Ergebnisse finden, weshalb noch abzuwarten ist, ob eine Hemmung der Autophagie verträglich ist bevor man Phase II/III – Studien durchführt.

Die Erkenntnisse aus der Studie II und den aufgeführten Publikationen unterstreichen, dass ein zusätzlicher pharmakologischer Eingriff in die Tumormikroumgebung in Form von Autophagieinhibition das Potential hat, der Chemoresistenz des duktales Pankreaskarzinoms zu begegnen, wenngleich dies auch nur für Untergruppen des Pankreaskarzinoms der Fall sein könnte.

### **6.3 Studie III**

Die Studie III untersuchte die Belastung der Mäuse durch die in Studie I und Studie II verwendeten Kombinationstherapien und fand signifikante Unterschiede zwischen den Galloflavin + Metformin- und CHC + Metformin-Therapiearmen (56). Sie zeigte, dass Galloflavin + Metformin die stärker belastende Therapie darstellt und dass dies durch eine Kombination aus nicht-invasiven Analysen zuverlässig eingeschätzt werden konnte (56).

Es ist bekannt, dass verschiedene Chemotherapien auch unterschiedliche Nebenwirkungsprofile haben. So bilden die UAW bei adjuvanten Chemotherapien häufig die Grundlage der Entscheidung für oder gegen einen Wirkstoff (126, 127). Bei neuen Wirkstoffen müssen diese Nebenwirkungen jedoch zunächst untersucht und erkannt werden. Der Studie III gelang dies unter Nutzung mehrerer nicht-invasiver Methoden zur Evaluation der Belastung (56). Andere Arbeiten zeigten ebenfalls Vorteile einer ähnlichen Methodenkombination gegenüber invasiven und eindimensionalen Methoden (36, 56, 65, 66). Aktuell werden jedoch

vor allem laborchemische und histopathologische Untersuchungen genutzt um präklinisch die Toxizität von Wirkstoffen nachzuweisen (128–132). Arbeiten wie die von Silva et al. legen dar, dass durch die Nutzung von klinischen Zeichen (Verhalten, KG, Zustand des Fells etc.) bereits während des Experimentes Ergebnisse erhalten werden können, welche wahrscheinlich ebenso sensitiv sind, wie die Ergebnisse aus den Gewebeuntersuchungen der post mortem entnommenen Organe (133). So kann anhand der klinischen Zeichen eine Schädigung bereits nachgewiesen werden, wenn noch keine signifikante Erhöhung von Biomarkern vorliegt oder die nachweisenden Untersuchungen noch unmöglich sind, weil entsprechende Proben nicht von lebenden Tieren gewonnen werden können. Auf diese Weise können also Endpunkte früher erreicht und sowohl die Belastung als auch die Anzahl der Versuchstiere reduziert werden. In der Studie III wurden dazu die etablierten Methoden Buddeln, Gesundheitsscoring, KG-Analyse und FCM genutzt (32–34, 36, 56, 65, 66). Dabei wurden die prä- und postoperativen Daten als mehrdimensionale Datencluster in R mittels logistischer Regression mit dem Ziel der Diskrimination zweier Belastungsniveaus verarbeitet (56). Diese so erhaltenen zwei Belastungskategorien wurden dann auf die Daten der Kombinationstherapiearme angewandt. Es zeigte sich, dass die Nebenwirkungen der Therapien signifikant unterschiedlich ausfielen und den zuvor definierten Niveaus zugeordnet werden konnten (56). Ein solches Ergebnis in Form einer Befund- oder Belastungsgraduierung ist auch bei unterschiedlichen klinischen Scores zur Einschätzung von Patient\*innen zu finden. So wird beispielsweise bei der Alkoholentzugssyndrom-Skala (AES-Skala) eine Auswahl von sub- und objektiven Befunden erhoben und definierten Zahlenwerten zugeordnet. Deren Summe begründet die Zuordnung in die entsprechende Kategorie mit der Konsequenz, dass entweder keine, eine oder eine hochdosierte Medikation verabreicht wird um die Ausprägung des AES abzumildern und etwa symptomatische Krampfanfälle zu verhindern (134). Aber auch auf andere Modalitäten wird dieses Prinzip täglich angewandt. Eine klinisch alltägliche Belastungsqualität ist Schmerz. In den *in vivo* Versuchen zu dieser Arbeit wurde die dauerhafte Analgesie durch Metamizol im Trinkwasser der Mäuse und die perioperative Schmerztherapie durch subkutan appliziertes Carprofen sichergestellt (56, 62). Metformin ist als Schmerztherapie im Mausmodell gastrointestinaler Erkrankungen etabliert und auch in der Literatur in Bezug auf Wirksamkeit und Galenik als vorteilhaft beschrieben (37, 56, 62, 66, 135). Klinisch ist die Behandlung von Schmerz zum Beispiel bei Demenzerkrankten mit eingeschränkten kommunikativen Fähigkeiten durchaus herausfordernd und kann zu spät beginnen oder nicht hinreichend intensiv ausfallen. Deshalb gibt es etablierte Scores um auch diesen Patient\*innen gerecht zu werden. Für die Belastungsqualität Schmerz bei Demenzerkrankten sind etwa der BESD (Beurteilung von Schmerzen bei Demenz), BISAD (Beobachtungsinstrument für das Schmerzassessment bei alten Menschen mit Demenz) und ZOPA (Zurich Observation Pain Assessment) Score verbreitet (136–139). Aber auch andere Qualitäten können anhand gezielt gewählter Methoden beurteilt werden. Beispiele hierfür sind die FSS (Fatigue Severity Scale) für Fatigue, die ESS (Epworth Sleepiness Scale) für Schläfrigkeit, PHQ-9 (Patient Health Questionnaire) für Depressivität, HAMA (Hamilton-Angst-Skala) und PAS (Panik und Agoraphobie-Skala) für Angst- und Panikstörungen, sowie NRS (Nutritional Risk Screening) oder GUSS (Gugging Swallowing Screen) Score für Mangelernährungs- und Aspirationsrisiko (140–144). Diese Scorings sind dabei nur zielführend, wenn sie sinnvoll ausgewählt und korrekt angewendet werden, haben allerdings kaum einschränkenden Grundbedingungen. Sie sind somit auch bei abweichenden Rahmenbedingungen einsetzbar. Für die richtige Interpretation ist dann eine fachkundige und möglichst interdisziplinäre Beurteilung anzustreben. Darüber hinaus ist die Kombination unterschiedlicher Verfahren für ein differenziertes Bild unerlässlich. Da beispielsweise das Ergebnis der FSS durch eine ausgeprägte depressive Antriebsstörung krankhaft ausfallen

kann, auch wenn die Fatigue-Kriterien selbst nicht erfüllt werden. Die Studie III hat ein differenziertes Bild durch eine Kombination aus ADL-Verhaltensanalyse (hier: Buddelverhalten), der KG-Änderung und einem biochemischen Marker (hier: FCM) erreicht (56). Diese Methoden sind im Kern auch auf das Assessment der menschlichen Patient\*innen übertragbar. Auch im klinischen bzw. ambulanten Patientenumgang sind ein Rückzug aus sonst alltäglichen Gewohnheiten, Appetit- bzw. KG-Änderungen und auffällige laborchemische Biomarker mögliche Hin- oder Nachweise für Belastung und Krankheit. Diese Befunde lassen sich durch eine standardisierte Belastungsanalyse wie in der Studie III auch präklinisch erheben und erlauben Abschätzungen zu UAW.

Zusammenfassend sollte eine standardisierte und mehrdimensionale Belastungsanalyse nach dem Vorbild der Studie III, sowohl im Hinblick auf die Wirkungs- und Nebenwirkungsübertragbarkeit der präklinischen Ergebnisse auf klinische Studien als auch im Hinblick auf das Tierwohl, flächendeckend etabliert werden.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	-	5-Fluoruracil
ADL	-	Activity of daily living (Aktivitäten des täglichen Lebens)
ALT	-	Alaninaminotransferase
AML	-	Akute myeloische Leukämie
AMP	-	Adenosinmonophosphat
AST	-	Aspartataminotransferase
BrdU	-	5-Brom-2-desoxyuridin
BAF	-	Bafilomycin A1
CAF	-	Cancer-associated Fibroblasts (Krebs-assoziierte Fibroblasten)
CHC	-	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
CQ	-	Chloroquin
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
FCM	-	Fecal corticosterone metabolites, Corticosteron-Metabolite im Kot
FCS	-	Fetales Kälberserum
GLUT	-	passiver Transmembran-Monosaccharid-Transporter
hLDH-5	-	humane LDH-5; LDH-Isoform ausschließlich aus LDH-A-Untereinheiten
IC50	-	Halbmaximale (50%) inhibitorische Konzentration
IMEM	-	Iscove's Modified Delbecco's Medium
<i>in vitro</i>	-	lat. – "im Glas"; die (experimentelle) Arbeit in Zellkultur
<i>in vivo</i>	-	lat. – "im Lebendigen"; die (experimentelle) Arbeit am lebenden Objekt
KG	-	Körpergewicht
Komplex I	-	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, Teil der (mitoch.) Atmungskette
LDH	-	Laktatdehydrogenase
LKB1	-	Liver kinase B1 (auch STK11 [Serin/Threonin-Kinase 11])
LPR	-	Liquid Permanent Red
LTC	-	Large T immortalized cells
MCT	-	Monocarboxylat-Transporter
MMC	-	Mitomycin C
NADH	-	Nicotinamidadeninukleotid; Synonym: Coenzym 1
NHI	-	N-Hydroxyindole
PBS	-	Phosphatgepufferte Salzlösung
RARE	-	Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
ROC	-	Receiver operating characteristic
Sham	-	Kontrolle: Behandlung mit Lösungsmittel
UAW	-	unerwünschte Arzneimittelwirkung

## 8 Literaturverzeichnis

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023; 73(1):17–48. doi: 10.3322/caac.21763.
2. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2017/2018: Bauchspeicheldrüse C25 [Stand: 05.03.2023]. Verfügbar unter: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/krebs\\_in\\_deutschland\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html).
3. Seufferlein T, Mayerle J, Böck S, Brunner T, Etrich TJ, Grenacher L et al. S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom: AWMF-Registernummer: 032/010OL. *Z Gastroenterol* 2022; 60(11):e812-e909. doi: 10.1055/a-1856-7346.
4. Wong JC, Raman S. Surgical resectability of pancreatic adenocarcinoma: CTA. *Abdom Imaging* 2010; 35(4):471–80. doi: 10.1007/s00261-009-9539-2.
5. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J et al. nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107(2). doi: 10.1093/jnci/dju413.
6. Warburg O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Die Naturwissenschaften*; 1924(12(50)):1131–7. doi: 10.1007/BF01504608.
7. Warburg O, Minami S. Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe. *Klin Wochenschr* 1923; 2(17):776–7. doi: 10.1007/BF01712130.
8. Pascale RM, Calvisi DF, Simile MM, Feo CF, Feo F. The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery. *Cancers (Basel)* 2020; 12(10). doi: 10.3390/cancers12102819.
9. Schreiber JR, Balcavage WX, Morris HP and Pedersen PL. Enzymatic and Spectral Analysis of Cytochrome Oxidase in Adult and Fetal Rat Liver and Morris Hepatoma 3924A. *Cancer Res*; 1970(30 (10)):2497–501.
10. Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D et al. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(1):C125-36. doi: 10.1152/ajpcell.00247.2006.
11. López-Ríos F, Sánchez-Aragó M, García-García E, Ortega ÁD, Berrendero JR, Pozo-Rodríguez F, López-Encuentra Á, Ballestín C and Cuezva JM. Loss of the Mitochondrial Bioenergetic Capacity Underlies the Glucose Avidity of Carcinomas. *Cancer Res*; 2007(67 (19)):9013–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1678.
12. Oudard S, Boitier E, Miccoli L. Gliomas are Driven by Glycolysis: Putative Roles of Hexokinase, Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Ultrastructure. *Anticancer Res*; 1997(Vol. 17 Heft 3/C):1903–11. PMID: 9216643
13. Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J Immunol* 2013; 191(3):1486–95. doi: 10.4049/jimmunol.1202702.
14. Wang JX, Choi SYC, Niu X, Kang N, Xue H, Killam J et al. Lactic Acid and an Acidic Tumor Microenvironment suppress Anticancer Immunity. *Int J Mol Sci* 2020; 21(21):1–14. doi: 10.3390/ijms21218363.

15. Angelin A, Gil-de-Gómez L, Dahiya S, Jiao J, Guo L, Levine MH et al. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab* 2017; 25(6):1282-1293.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.018.
16. Watson MJ, Vignali PDA, Mullett SJ, Overacre-Delgoffe AE, Peralta RM, Grebinoski S et al. Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid. *Nature* 2021; 591(7851):645–51. doi: 10.1038/s41586-020-03045-2.
17. Geeraerts X, Fernández-García J, Hartmann FJ, Goede KE de, Martens L, Elkrim Y et al. Macrophages are metabolically heterogeneous within the tumor microenvironment. *Cell Rep* 2021; 37(13):1–19. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110171.
18. Quinn WJ, Jiao J, TeSlaa T, Stadanlick J, Wang Z, Wang L et al. Lactate Limits T Cell Proliferation via the NAD(H) Redox State. *Cell Rep* 2020; 33(11):1–27. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108500.
19. Pérez-Tomás R, Pérez-Guillén I. Lactate in the Tumor Microenvironment: An Essential Molecule in Cancer Progression and Treatment. *Cancers (Basel)* 2020; 12(11):1–29. doi: 10.3390/cancers12113244.
20. Ippolito L, Comito G, Parri M, Iozzo M, Duatti A, Virgilio F et al. Lactate Rewires Lipid Metabolism and Sustains a Metabolic-Epigenetic Axis in Prostate Cancer. *Cancer Res* 2022; 82(7):1267–82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0914.
21. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; 18(12):792–804. doi: 10.1038/s41571-021-00546-5.
22. Sousa CM, Biancur DE, Wang X, Halbrook CJ, Sherman MH, Zhang L et al. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* 2016; (536(7617)):479–83. doi: 10.1038/nature19084.
23. Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Howell A, Tykocinski ML, Nagajyothi F, Machado FS et al. Energy transfer in "parasitic" cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles' heel of tumor cells. *Cell Cycle* 2011; 10(24):4208–16. doi: 10.4161/cc.10.24.18487.
24. Mao X, Xu J, Wang W, Liang C, Hua J, Liu J et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer* 2021; 20(131):1–30. doi: 10.1186/s12943-021-01428-1.
25. Belhabib I, Zaghdoudi S, Lac C, Bousquet C, Jean C. Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy? *Cancers (Basel)* 2021; 13(3466):1–38. doi: 10.3390/cancers13143466.
26. Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T et al. Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice. *Gastroenterology* 2017; 152(6):1492-1506.e24. doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.010.
27. Xi L, Peng M, Liu S, Liu Y, Wan X, Hou Y et al. Hypoxia-stimulated ATM activation regulates autophagy-associated exosome release from cancer-associated fibroblasts to promote cancer cell invasion. *J Extracell Vesicles* 2021; 10(11):1-24. doi: 10.1002/jev2.12146.
28. Mukhopadhyay S, Mahapatra KK, Praharaj PP, Patil S, Bhutia SK. Recent progress of autophagy signaling in tumor microenvironment and its targeting for possible cancer

- therapeutics. *Semin Cancer Biol* 2021; 85:196–208.  
doi: 10.1016/j.semcancer.2021.09.003.
29. Jena BC, Das CK, Banerjee I, Bharadwaj D, Majumder R, Das S, Biswas A, Kundu M, Roy PK, Kundu CN, Mandal M. TGF- $\beta$ 1 induced autophagy in cancer associated fibroblasts during hypoxia contributes EMT and glycolysis via MCT4 upregulation. *Experimental Cell Research*; 2022 Aug 1(417(1)):1–20. doi: 10.1016/j.yexcr.2022.113195.
  30. Jena BC, Rout L, Dey A, Mandal M. Active autophagy in cancer-associated fibroblasts: Recent advances in understanding the novel mechanism of tumor progression and therapeutic response. *Journal of Cellular Physiology* 2021; (1):1–16. doi: 10.1002/jcp.30419.
  31. Europäisches Parlament. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere 2010 [Stand: 09.02.2023]. Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN>.
  32. Deacon R. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc* 2006; 1(1):118–21. doi: 10.1038/nprot.2006.19.
  33. Deacon R. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp* 2012; (59):1-12. doi: 10.3791/2607.
  34. Touma C, Palme R, Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav* 2004; 45(1):10–22. doi: 10.1016/j.yhbeh.2003.07.002.
  35. Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ et al. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289(5):E823-8. doi: 10.1152/ajpendo.00122.2005.
  36. Zhang X, Kumstel S, Tang G, Talbot SR, Seume N, Abshagen K et al. A rational approach of early humane endpoint determination in a murine model for cholestasis. *ALTEX* 2020; 37(2):197–207. doi: 10.14573/altex.1909111.
  37. Kumstel S, Tang G, Zhang X, Kerndl H, Vollmar B, Zechner D. Grading Distress of Different Animal Models for Gastrointestinal Diseases Based on Plasma Corticosterone Kinetics. *Animals (Basel)* 2019; 9:1–15. doi: 10.3390/ani9040145.
  38. Roenneberg C. S3 Leitlinie "Funktionelle Körperbeschwerden": AWMF-Registernummer: 051-001. AWMF online; 2018:50–63.
  39. Deutsche Diabetes Gesellschaft. S2k-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus im Alter, 2. Auflage: AWMF-Registernummer: 057-017. AWMF online 2018:43–4.
  40. Fontaine E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:1–9. doi: 10.3389/fendo.2018.00753.
  41. Marini C, Cossu V, Bauckneht M, Lanfranchi F, Raffa S, Orengo AM et al. Metformin and Cancer Glucose Metabolism: At the Bench or at the Bedside? *Biomolecules* 2021; 11(8):1–10. doi: 10.3390/biom11081231.

42. Bridges HR, Jones AJY, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J* 2014; 462(3):475–87. doi: 10.1042/BJ20140620.
43. Gyawali M, Venkatesan N, Ogeyingbo OD, Bhandari R, Botleroo RA, Kareem R et al. Magic of a Common Sugar Pill in Cancer: Can Metformin Raise Survival in Pancreatic Cancer Patients? *Cureus* 2021; 13(8):1-8. doi: 10.7759/cureus.16916.
44. Zhou P-T, Li B, Liu F-R, Zhang M-C, Wang Q, Li Y-Y et al. Metformin is associated with survival benefit in pancreatic cancer patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8(15):25242–50. doi: 10.18632/oncotarget.15692.
45. Hwang AL, Haynes K, Hwang W-T, Yang Y-X. Metformin and survival in pancreatic cancer: a retrospective cohort study. *Pancreas* 2013; 42(7):1054–9. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182965a3c.
46. Kordes S, Pollak MN, Zwinderman AH, Mathôt RA, Weterman MJ, Beeker A et al. Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2015; 16(7):839–47. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00027-3.
47. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005; 330(7503):1304–5. doi: 10.1136/bmj.38415.708634.F7.
48. Wu BU. Diabetes and pancreatic cancer: recent insights with implications for early diagnosis, treatment and prevention. *Current Opinion in Gastroenterology* 2021; 2021(Band 37 Heft 5):539–43. doi: 10.1097/MOG.0000000000000763.
49. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 2014; 20(6):953–66. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.018.
50. Farabegoli F, Vettrai M, Manerba M, Fiume L, Roberti M, Di Stefano G. Galloflavin, a new lactate dehydrogenase inhibitor, induces the death of human breast cancer cells with different glycolytic attitude by affecting distinct signaling pathways. *Eur J Pharm Sci* 2012; 47(4):729–38. doi: 10.1016/j.ejps.2012.08.012.
51. Rahnasto-Rilla M, Järvenpää J, Huovinen M, Schroderus A-M, Ihantola E-L, Küblbeck J et al. Effects of galloflavin and ellagic acid on sirtuin 6 and its anti-tumorigenic activities. *Biomed Pharmacother* 2020; 131:1–9. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110701.
52. Manerba M, Vettrai M, Fiume L, Di Stefano G, Sartini A, Giacomini E, Buonfiglio R, Roberti M, and Recanatini M. Galloflavin (CAS 568-80-9) : A Novel Inhibitor of Lactate Dehydrogenase. *ChemMedChem* 2012; (7(2)):311–7. doi: 10.1002/cmdc.201100471.
53. Han X, Sheng X, Jones HM, Jackson AL, Kilgore J, Stine JE et al. Evaluation of the anti-tumor effects of lactate dehydrogenase inhibitor galloflavin in endometrial cancer cells. *J Hematol Oncol* 2015; 8:1–4. doi: 10.1186/s13045-014-0097-x.
54. Guo L, Yang Y, Sheng Y, Wang J, Li W, Zhou X et al. Galloflavin Relieves the Malignant Behavior of Colorectal Cancer Cells in the Inflammatory Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol* 2021; (12):1–12. doi: 10.3389/fphar.2021.752118.
55. Wendt EHU, Schoenrogge M, Vollmar B, Zechner D. Galloflavin Plus Metformin Treatment Impairs Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res* 2020; 40(1):153–60. doi: 10.21873/anticancer.13936.

56. Kumstel S, Wendt EHU, Eichberg J, Talbot SR, Häger C, Zhang X et al. Grading animal distress and side effects of therapies. *Ann N Y Acad Sci* 2020; 1473(1):20–34. doi: 10.1111/nyas.14338.
57. Hamdan L, Arrar Z, Al Muataz Y, Suleiman L, Négrier C, Mulengi JK et al. Alpha cyano-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human breast cancer cells. *PLoS One* 2013; 8(9):1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0072953.
58. Yu J, Wei Z, Li Q, Wan F, Chao Z, Zhang X et al. Advanced Cancer Starvation Therapy by Simultaneous Deprivation of Lactate and Glucose Using a MOF Nanoplatfom. *Adv Sci (Weinh)* 2021; 8(19):1-13. doi: 10.1002/adv.202101467.
59. Zhao M, Zhang Z. Glucose Transporter Regulation in Cancer: A Profile and the Loops. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2016; 26(3):223–38. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016016531.
60. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281(14):9030–7. doi: 10.1074/jbc.M511397200.
61. Guan X, Morris ME. In Vitro and In Vivo Efficacy of AZD3965 and Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid in the Murine 4T1 Breast Tumor Model. *AAPS J* 2020; 22(4):1–20. doi: 10.1208/s12248-020-00466-9.
62. Zhang X, Schönrogge M, Eichberg J, Wendt EHU, Kumstel S, Stenzel J et al. Blocking Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Supports Chemotherapy of Pancreatic Cancer Cells. *Front Oncol* 2018; 8:1–10. doi: 10.3389/fonc.2018.00590.
63. Sparmann G, Hohenadl C, Tornøe J, Jaster R, Fitzner B, Koczan D et al. Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(1):G211-9. doi: 10.1152/ajpgi.00347.2003.
64. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett* 2016; 21(29):1–14. doi: 10.1186/s11658-016-0031-z.
65. Abdelrahman A, Kumstel S, Zhang X, Liebig M, Wendt EHU, Eichberg J et al. A novel multi-parametric analysis of non-invasive methods to assess animal distress during chronic pancreatitis. *Sci Rep* 2019; 9(1):1–13. doi: 10.1038/s41598-019-50682-3.
66. Kumstel S, Vasudevan P, Palme R, Zhang X, Wendt EHU, David R et al. Benefits of non-invasive methods compared to telemetry for distress analysis in a murine model of pancreatic cancer. *J Adv Res* 2020; 21:35–47. doi: 10.1016/j.jare.2019.09.002.
67. Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology* 2003; 130(3):267–78. doi: 10.1016/S0016-6480(02)00620-2.
68. van Herck H, Baumans V, Brandt CJ, Boere HA, Hesp AP, van Lith HA et al. Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein and the tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Lab Anim* 2001; 35(2):131–9. doi: 10.1258/0023677011911499.
69. Karimollah Hajian-Tilaki. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med* 2013; (4(2)):627–35. doi: 10.1046/j.0013-0427.2003.00027.x.

70. Wollschläger D. Grundlagen der Datenanalyse mit R: Eine anwendungsorientierte Einführung. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2020. (Statistik und ihre Anwendungen).
71. Lizcano JM, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Mäkelä TP, Hardie DG and Alessi DR. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO Journal* 2004; (23):833–43. doi: 10.1038/sj.emboj.7600110.
72. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, Alessi DR and Hardie DG. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD $\alpha$ /beta and MO25 $\alpha$ /beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology* 2003; *Journal of Biology* 2003(2):1–16. doi: 10.1186/1475-4924-2-28.
73. Wei M, Liu Y, Bi Y, Zhang Z-J. Metformin and pancreatic cancer survival: Real effect or immortal time bias? *Int J Cancer* 2019; 145(7):1822–8. doi: 10.1002/ijc.32254.
74. Bao B, Wang Z, Ali S, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH et al. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5(3):355–64. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0299.
75. Kisfalvi K, Eibl G, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. *Cancer Res* 2009; 69(16):6539–45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0418.
76. Wang L-W, Li Z-S, Zou D-W, Jin Z-D, Gao J, Xu G-M. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14(47):7192–8. doi: 10.3748/wjg.14.7192.
77. Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, Ryu S, Jung Y-S, Choi JY. Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One* 2014; 9(1):1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0085576.
78. Geoghegan F, Chadderton N, Farrar GJ, Zisterer DM, Porter RK. Direct effects of phenformin on metabolism/bioenergetics and viability of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Oncol Lett* 2017; 14(5):6298–306. doi: 10.3892/ol.2017.6929.
79. García Rubiño ME, Carrillo E, Ruiz Alcalá G, Domínguez-Martín A, A Marchal J, Boulaiz H. Phenformin as an Anticancer Agent: Challenges and Prospects. *Int J Mol Sci* 2019; 20(13):1–17. doi: 10.3390/ijms20133316.
80. Appleyard MVCL, Murray KE, Coates PJ, Wullschleger S, Bray SE, Kernohan NM et al. Phenformin as prophylaxis and therapy in breast cancer xenografts. *Br J Cancer* 2012; 106(6):1117–22. doi: 10.1038/bjc.2012.56.
81. Coperchini F, Croce L, Denegri M, Awwad O, Ngnitejeu ST, Magri F et al. The anti-cancer effects of phenformin in thyroid cancer cell lines and in normal thyrocytes. *Oncotarget* 2019; 10(60):6432–43. doi: 10.18632/oncotarget.27266.
82. Park J-H, Kim Y-H, Park EH, Lee S-J, Kim H, Kim A et al. Effects of metformin and phenformin on apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in chemoresistant rectal cancer. *Cancer Sci* 2019; 110(9):2834–45. doi: 10.1111/cas.14124.

83. Hu S, Ouyang Q, Cheng Q, Wang J, Feng F, Qiao L et al. Phenformin inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis and autophagy in cholangiocarcinoma. *Mol Med Rep* 2018; 17(4):6028–32. doi: 10.3892/mmr.2018.8573.
84. Jackson AL, Sun W, Kilgore J, Guo H, Fang Z, Yin Y et al. Phenformin has anti-tumorigenic effects in human ovarian cancer cells and in an orthotopic mouse model of serous ovarian cancer. *Oncotarget* 2017; 8(59):100113–27. doi: 10.18632/oncotarget.22012.
85. Bridges HR, Jones AJY, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J* 2014; 462(3):475–87. doi: 10.1042/BJ20140620.
86. Dembo AJ, Marliss EB and Halperin ML. Insulin Therapy in Phenformin-Associated Lactic Acidosis: A Case Report, Biochemical Considerations and Review of the Literature. *Diabetes* 1975; 24(1):28–35. doi: 10.2337/diab.24.1.28.
87. Stang M, Wysowski DK, Butler-Jones D. Incidence of lactic acidosis in metformin users. *Diabetes Care* 1999; 22(6):925–7. doi: 10.2337/diacare.22.6.925.
88. Zhao H, Swanson KD, Zheng B. Therapeutic Repurposing of Biguanides in Cancer. *Trends in Cancer* 2021; 7(8):714–30. doi: 10.1016/j.trecan.2021.03.001.
89. Kilgore J, Jackson AL, Clark LH, Hui G, Zhang L, Jones HM, Gilliam TP, Gehrig PA, Zhou C, Bae-Jump VL. Buformin exhibits anti-proliferative and anti-invasive effects in endometrial cancer cells. *American Journal of Translational Research* 2016; 2016(8(6)):2705–15. PMID: 27398153
90. Lea MA, Kim H, Des Bordes C. Effects of Biguanides on Growth and Glycolysis of Bladder and Colon Cancer Cells. *Anticancer Res* 2018; 38(9):5003–11. doi: 10.21873/anticancer.12819.
91. Li J, Chen L, Liu Q, Tang M, Wang Y, Yu J. Buformin suppresses proliferation and invasion via AMPK/S6 pathway in cervical cancer and synergizes with paclitaxel. *Cancer Biol Ther* 2018; 19(6):507–17. doi: 10.1080/15384047.2018.1433504.
92. Yakisich JS, Azad N, Kaushik V, Iyer AKV. The Biguanides Metformin and Buformin in Combination with 2-Deoxy-glucose or WZB-117 Inhibit the Viability of Highly Resistant Human Lung Cancer Cells. *Stem Cells Int* 2019; 2019:1–11. doi: 10.1155/2019/6254269.
93. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang X-M, Braddock DT, Albright RA et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 2014; 510(7506):542–6. doi: 10.1038/nature13270.
94. Tsuji A, Akao T, Masuya T, Murai M, Miyoshi H. IACS-010759, a potent inhibitor of glycolysis-deficient hypoxic tumor cells, inhibits mitochondrial respiratory complex I through a unique mechanism. *J Biol Chem* 2020; 295(21):7481–91. doi: 10.1074/jbc.RA120.013366.
95. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, McAfoos T, Morlacchi P, Ackroyd J, Agip A-NA, Al-Atrash G, Asara J, Bardenhagen J, Carrillo CC, Caroll C, Chang E, Ciurea S, Cross JB, Czako B, Deem A, Daver N, de Groot JF, Dong J-W, Feng N, Gao G, Gay J, Do MG, Greer J, Giuliani V, Han J, Han L, Henry VK, Hirst J, Huang S, Jiang Y, Kang Z, Khor T, Konoplev S, Lin Y-H, Liu G, Lodi A, Lofton T, Ma H, Mahendra M, Matre P, Mullinax R, Peoples M, Petrocchi A, Rodriguez-Canale J, Serreli R, Shi T, Smith M, Tabe Y, Theroff J, Tiziani S, Xu Q, Zhang Q, Muller F, DePinho RA, Toniatti C, Draetta GF, Heffernan TB, Konopleva M, Joney P, Di Francesco ME and Marszalek JR. An

- inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nature Medicine* 2018; 24:1036–46. doi: 10.1038/s41591-018-0052-4.
96. Zhang L, Yao Y, Zhang S, Yang L, Guo H, Ahmed M, Bell T, Zhang H, Han G, Lorence E, Badillo M, Zhou S, Sun Y, Di Francesco ME, Feng N, Haun R, Lan R, Mackintosh SG, Mao X, Song X, Zhang J, PhamLV, Lorenzi PL, Marszalek J, Heffernan T, Draetta G, Jones P, Futreal A, Nomie K, Wang L, Wang M. Metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation identifies a therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Science Translational Medicine* 2019; 11(419):1–16. doi: 10.1126/scitranslmed.aau1167.
97. Vashisht Gopal YN, Gammon S, Prasad R, Knighton B, Pisaneschi F, Roszik J et al. A Novel Mitochondrial Inhibitor Blocks MAPK Pathway and Overcomes MAPK Inhibitor Resistance in Melanoma. *Clin Cancer Res* 2019; 25(21):6429–42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0836.
98. Lissanu Deribe Y, Sun Y, Terranova C, Khan F, Martinez-Ledesma J, Gay J et al. Mutations in the SWI/SNF complex induce a targetable dependence on oxidative phosphorylation in lung cancer. *Nature Medicine* 2018; 24(7):1047–57. doi: 10.1038/s41591-018-0019-5.
99. Evans KW, Yuca E, Scott SS, Zhao M, Paez Arango N, Cruz Pico CX et al. Oxidative Phosphorylation Is a Metabolic Vulnerability in Chemotherapy-Resistant Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* 2021; 81(21):5572–81. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3242.
100. M.D. Anderson Cancer Center. A Phase 1 Study to Evaluate the Safety and Tolerability of IACS-010759 in Subjects With Advanced Solid Tumors and Lymphoma: M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, United States [Stand: 06.03.2023]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03291938?term=03291938&draw=2&rank=1>.
101. M.D. Anderson Cancer Center. Phase 1 Study of IACS-010759 in Subjects With Relapsed or Refractory AML: M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, United States [Stand: 06.03.2023]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02882321>.
102. Altamimi A-MS, Alafeefy AM, Balode A, Vozny I, Pustenko A, El Shikh ME et al. Symmetric molecules with 1,4-triazole moieties as potent inhibitors of tumour-associated lactate dehydrogenase-A. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2018; 33(1):147–50. doi: 10.1080/14756366.2017.1404593.
103. Granchi C, Minutolo F. Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *ChemMedChem* 2012; 7(8):1318–50. doi: 10.1002/cmdc.201200176.
104. Solyanik GI, Karaman OM, Yakshibaeva YR, Pyaskovskaya ON, Kolesnik DL. Oxamate, an inhibitor of lactate dehydrogenase, can stimulate M2 polarization of peritoneal macrophages in mice with Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol* 2021; 43(3):270–3. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-3.16530.
105. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(5):2037–42. doi: 10.1073/pnas.0914433107.
106. Granchi C, Roy S, Giacomelli C, Macchia M, Tuccinardi T, Martinelli A, Lanza M, Betti L, Giannaccini G, Lucacchini A, Funel N, León LG, Giovannetti E, Peters GJ, Palchaudhuri R, Calvaresi EC, Hergenrother PJ, and Minutolo F. Discovery of N-Hydroxyindole-Based Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenase Isoform A (LDH-A) as Starvation Agents

- against Cancer Cells. *Journal of Medical Chemistry* 2011; 54(6):1599–612. doi: 10.1021/jm101007q.
107. Granchi C, Roy S, De Simone A, Salvetti I, Tuccinardi T, Martinelli A, Macchia M, Lanza M, Betti L, Giannacchini G, Lucacchini A, Giovannetti E, Sciarillo R, Peters GJ, Minutolo F. N-Hydroxyindole-based inhibitors of lactate dehydrogenase against cancer cell proliferation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46(11):5398–407. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.08.046.
108. Amr AE-GE, Mageid REA, El-Naggar M, Naglah AM, Nossier ES, Elsayed EA. Chiral Pyridine-3,5-bis- (L-phenylalaninyl-L-leucinyl) Schiff Base Peptides as Potential Anticancer Agents: Design, Synthesis, and Molecular Docking Studies Targeting Lactate Dehydrogenase-A. *Molecules* 2020; 25(5):1–22. doi: 10.3390/molecules25051096.
109. Ward RA, Brassington C, Breeze AL, Caputo A, Critchlow S, Davies G, Goodwin L, Hassall G, Greenwood R, Holdgate GA, Mrosek M, Norman RA, Pearson S, Tart J, Tucker JA, Vogtherr M, Whittaker D, Wingfield J, Winter J, and Hudson K. Design and Synthesis of Novel Lactate Dehydrogenase A Inhibitors by Fragment-Based Lead Generation. *Journal of Medical Chemistry* 2012; 55(7):3285–306. doi: 10.1021/jm201734r.
110. Tocris. NHI 2 - Certificate of Analysis: CAS Number: 1269802-97-2: Tocris; 22.5.2020 [Stand: 06.03.2023]. Verfügbar unter: [https://documents.tocris.com/pdfs/tocris\\_coa/5363\\_2\\_coa.pdf?1670682872](https://documents.tocris.com/pdfs/tocris_coa/5363_2_coa.pdf?1670682872).
111. Kanno T, Maekawa M. Lactate dehydrogenase M-subunit deficiencies: clinical features, metabolic background, and genetic heterogeneities. *Muscle Nerve Suppl* 1995; 3:S54-60. doi: 10.1002/mus.880181413.
112. Apte MV, Wilson JS, Lugea A, Pandol SJ. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology* 2013; 144(6):1210–9. doi: 10.1053/j.gastro.2012.11.037.
113. Kharraishvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int* 2014; 14:1–8. doi: 10.1186/1475-2867-14-41.
114. Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World J Gastroenterol* 2014; 20(32):11216–29. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11216.
115. Mueller MM FNE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4:839–49. doi: 10.1038/nrc1477.
116. Choi I-K, Strauss R, Richter M, Yun C-O, Lieber A. Strategies to increase drug penetration in solid tumors. *Front Oncol* 2013; 3:1–18. doi: 10.3389/fonc.2013.00193.
117. Liang C, Shi S, Meng Q, Liang D, Ji S, Zhang B et al. Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: where we are and where we are going. *Exp Mol Med* 2017; 49(12):1-10. doi: 10.1038/emm.2017.255.
118. Liu M, Xu J, Deng H. Tangled fibroblasts in tumor-stroma interactions. *Int J Cancer* 2011; 129(8):1795–805. doi: 10.1002/ijc.26116.
119. Ling S, Song L, Fan N, Feng T, Liu L, Yang X et al. Combination of metformin and sorafenib suppresses proliferation and induces autophagy of hepatocellular carcinoma via

- targeting the mTOR pathway. *Int J Oncol* 2017; 50(1):297–309. doi: 10.3892/ijo.2016.3799.
120. Hashimoto D, Bläuer M, Hirota M, Ikonen NH, Sand J, Laukkarinen J. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *Eur J Cancer* 2014; 50(7):1382–90. doi: 10.1016/j.ejca.2014.01.011.
121. Piffoux M, Eriau E, Cassier PA. Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2021; 124(2):333–44. doi: 10.1038/s41416-020-01039-5.
122. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 2011; 25(7):717–29. doi: 10.1101/gad.2016111.
123. M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, United States. Binimetinib Plus Hydroxychloroquine in KRAS Mutant Metastatic Pancreatic Cancer: M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, United States [Stand: 06.03.2023]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04132505?term=NCT04132505&draw=2&rank=1>.
124. University of Utah. THREAD: A Phase I Trial of Trametinib and Hydroxychloroquine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: University of Utah; 2022 [Stand: 06.03.2023]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03825289?term=NCT03825289&draw=2&rank=1>.
125. University of Utah. A Phase I Trial of Ulixertinib (BVD-523) and Hydroxychloroquine in Patients With Advanced MAPK-Mutated Gastrointestinal Adenocarcinomas: University of Utah [Stand: 06.03.2023]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04145297?term=NCT04145297&draw=2&rank=1>.
126. Mayer EL. Early and late long-term effects of adjuvant chemotherapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013:9–14. doi: 10.14694/EdBook\_AM.2013.33.9.
127. Partridge AH, Burstein HJ, Winer EP. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; (30):135–42. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003451.
128. Perše M. Cisplatin Mouse Models: Treatment, Toxicity and Translatability. *Biomedicines* 2021; 9:1–28. doi: 10.3390/biomedicines9101406.
129. Greaves P, Williams A, Eve M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(3):226–36. doi: 10.1038/nrd1329.
130. Luft J, Bode G. Integration of safety pharmacology endpoints into toxicology studies. *Fundam Clin Pharmacol* 2002; 16(2):91–103. doi: 10.1046/j.1472-8206.2002.00084.x.
131. Mahdian-Shakib A, Hashemzadeh MS, Anissian A, Oraei M, Mirshafiey A. Evaluation of the acute and 28-day sub-acute intravenous toxicity of  $\alpha$ -l-guluronic acid (ALG; G2013) in mice. *Drug Chem Toxicol* 2022; 45(1):151–60. doi: 10.1080/01480545.2019.1665679.
132. Bevan C, Stadler JC, Elliott GS, Frame SR, Baldwin JK, Leung HW et al. Subchronic toxicity of 4-vinylcyclohexene in rats and mice by inhalation exposure. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 32(1):1–10. doi: 10.1006/faat.1996.0101.
133. Silva AV, Norinder U, Liiv E, Platzack B, Öberg M, Törnqvist E. Associations between clinical signs and pathological findings in toxicity testing. *ALTEX* 2021; 38(2):198–214. doi: 10.14573/altex.2003311.

134. Wetterling T VC. Diagnostik und Therapie von Alkoholproblemen: Ein Leitfaden [Kapitel: Therapeutische Interventionen zur Erreichung einer Abstinenz]. Heidelberg: Springer-Verlag; 1997.
135. Stumpf F, Algül H, Thoeringer CK, Schmid RM, Wolf E, Schneider MR et al. Metamizol Relieves Pain Without Interfering With Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Pancreas* 2016; 45(4):572–8. doi: 10.1097/MPA.0000000000000483.
136. Kölzsch M, Wulff I, Ellert S, Fischer T, Kopke K, Kalinowski S, Dräger D, Kreutz R. Deficits in pain treatment in nursing homes in Germany: A cross-sectional study. *European Journal of Pain* 2011; 16(3):439–46. doi: 10.1002/j.1532-2149.2011.00029.x.
137. Basler HD, Hüger D, Kunz R, Luckmann J, Lukas A, Nikolaus T et al. Beurteilung von Schmerz bei Demenz (BESD). Untersuchung zur Validität eines Verfahrens zur Beobachtung des Schmerzverhaltens. *Schmerz* 2006; 20(6):519–26. doi: 10.1007/s00482-006-0490-7.
138. DZNE, Deutsche Schmerzgesellschaft. S3 Leitlinie -Schmerzassessment bei Älteren Menschen in der vollstationären Altenhilfe: AWMF-Registernummer: 145 – 001. AWMF online; 2017:65–6.
139. College of Nursing Barbara and Richard Csomay Center for Gerontological Excellence. Acute Pain Management in Older Adults. The University of Iowa; 2016:21–4 [Stand: 06.03.2023]. Verfügbar unter: [https://geriatricpain.org/sites/geriatricpain.org/files/2021-03/2016\\_acute\\_pain\\_guideline\\_electronic.pdf](https://geriatricpain.org/sites/geriatricpain.org/files/2021-03/2016_acute_pain_guideline_electronic.pdf).
140. Shahid A, Wilkinson K, Marcu S, Shapiro CM, Hrsg. STOP, THAT and One Hundred Other Sleep Scales. 1. Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag; 2012.
141. Löwe B, Zipfel S und Herzog W. Deutsche Übersetzung des „Patient Health Questionnaire (PHQ-9)“ durch B. Löwe, S. Zipfel und W. Herzog, Medizinische Universitätsklinik Heidelberg: (Englische Originalversion: Spitzer, Kroenke & Williams, 1999) [Stand: 06.01.2023]. Verfügbar unter: <https://kompetenzzentrum-allgemeinmedizin-mv.de/wp-content/uploads/2018/07/PHQ9-Depressionsfragebogen-2018.pdf>.
142. Trapl M, Enderle P, Nowotny M, Teuschl Y, Matz K, Dachenhausen A et al. Dysphagia bedside screening for acute-stroke patients: the Gugging Swallowing Screen. *Stroke* 2007; 38(11):2948–52. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.483933.
143. Schütz T, Valentini L, Plauth M. Screening auf Mangelernährung im Krankenhaus Nutritional Risk Screening (NRS 2002): Screening auf Mangelernährung nach den ESPEN-Leitlinien 2002. [nach Kondrup J et al., *Clinical Nutrition* 2003; 22: 415-421]. *Aktuel Ernähr Med* 2005 2002; (30):99–103. doi: 10.1055/s-0032-1332980
144. Bandelow B. S3-Leitlinie Angststörungen Version 2: AWMF-Registernummer: 051-028. AWMF online 2021:59.

# **Anhang**

- **Thesen**
- **Erklärung**
- **Danksagung**
- **Wissenschaftlicher Lebenslauf**
- **Eigene Publikationsliste**
- **Verwendete Originalarbeiten zur kumulativen Dissertation**

# Thesen

1. Pankreaskarzinome sprechen kaum auf Chemotherapien an, weshalb es notwendig ist weitere adjuvante, neoadjuvante und palliative Chemotherapien zu entwickeln.
2. Der Warburg-Effekt beschreibt einen veränderten Stoffwechsel von Tumorzellen, wird charakterisiert durch Energiegewinn bei gleichzeitiger vermehrter Laktatproduktion und stellt für Laktatstoffwechselhemmstoffe einen Therapieansatzpunkt auch für das Pankreaskarzinom dar.
3. Sowohl Galloflavin, ein Laktatdehydrogenaseinhibitor, als auch CHC, ein Laktattransportinhibitor, hemmen das Wachstum von pankreatischen Karzinomzellen.
4. Hochdosiertes Metformin hemmt den Komplex I der Atmungskette wodurch zur Energiegewinnung in Tumorzellen vermehrt Laktat gebildet wird.
5. Die Kombinationstherapie Metformin + Galloflavin oder Metformin + CHC hemmen die Karzinomzellproliferation in vitro stärker als die Monotherapien.
6. In einem syngenem orthotopen Mausmodell lässt sich die Wirkung der Chemotherapien auf den Tumor und zugleich die Belastung der Mäuse quantifizieren, wobei die Kombinationstherapie Metformin + Galloflavin eine signifikant stärkere Belastung der Mäuse verursacht als eine Metformin + CHC Therapie.
7. In vivo bewirkten beide Kombinationstherapien keine signifikante Reduktion des Tumorgewichtes, wobei in diesem Tiermodell eine starke desmoplastische Reaktion, geprägt von Krebs-assoziierten Fibroblasten, beobachtet wurde.
8. In der Co-Kultur mit Krebs-assoziierten Fibroblasten nimmt die hemmende Wirkung von CHC, Metformin und CHC + Metformin auf die Proliferation von Karzinomzellen ab, wobei eine Hemmung der Autophagie in diesen Krebs-assoziierten Fibroblasten die inhibierende Wirkung der Kombinationstherapien auf die Karzinomzellproliferation verstärkte.
9. Während die getesteten Kombinationstherapien in vivo als nicht vielversprechend erscheinen, könnten neue Kombinationen aus Hemmstoff des Komplex I der Atmungskette und Laktatdehydrogenaseinhibitoren, wie zum Beispiel IACS-010759 + NHI 2 in Kombination mit der Hemmung von Autophagie erfolgversprechender sein.
10. Zudem sollte man in zukünftigen Studien standardisierte Belastungsanalysen der Versuchstiere erheben, um neben der Wirksamkeit der Therapien auch nicht gewünschte Nebenwirkungen der Therapeutika zu erkennen.

## Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, den

(Die Originalunterschrift fehlt aus Gründen des Datenschutzes.)

---

Edgar Heinz Uwe Wendt

## **Danksagung**

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Edgar H.U. Wendt

## **Wissenschaftlicher Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## Eigene Publikationsliste

Wendt EHU, Schönrogge M, Vollmar B & Zechner D. **Galloflavin Plus Metformin Treatment Impairs Pancreatic Cancer Cells**. *Anticancer Res.* 2020; 40(1):153-160. doi: 10.21873/anticancer.13936. Impact-Faktor: 2,48.

Zhang X, Schönrogge M, Eichberg J, **Wendt EHU**, Kumstel S, Stenzel J, Lindner T, Jaster R, Krause BJ, Vollmar B & Zechner D. **Blocking Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Supports Chemotherapy in Pancreatic Cancer Cells**. *Front Oncol* 2018; 8:1–10. doi: 10.3389/fonc.2018.00590. Impact-Faktor: 4,137.

Kumstel S, Vasudevan P, Palme R, Zhang X, **Wendt EHU**, David R, Vollmar B, Zechner D. **Benefits of non-invasive methods compared to telemetry for distress analysis in a murine model of pancreatic cancer**. *J Adv Res.* 2019; 21:35-47. doi: 10.1016/j.jare.2019.09.002. Impact-Faktor: 6,992.

Abdelrahman A, Kumstel S, Zhang X, Liebig M, **Wendt EHU**, Eichberg J, Palme R, Thum T, Vollmar B & Zechner D. **A novel multi-parametric analysis of non-invasive methods to assess animal distress during chronic pancreatitis**. *Sci Rep.* 2019; 9(1):1-13. doi: 10.1038/s41598-019-50682-3. Impact-Faktor: 3,998.

Kumstel S, **Wendt EHU**, Eichberg J, Talbot SR, Häger C, Zhang X, Schönrogge M, Palme R, Bleich A, Vollmar B & Zechner D. **Grading animal distress and side effects of therapies**; *Ann N Y Acad Sci* 2020; 1473(1):20–34. doi: 10.1111/nyas.14338. Impact-Faktor: 5,691.

Kumstel S, Janssen-Peters H, Abdelrahman A, Tang G, Xiao K, Ernst N, **Wendt EHU**, Palme R, Seume N, Vollmar B, Thum T & Zechner D. **MicroRNAs as systemic biomarkers to assess distress in animal models for gastrointestinal diseases**. *Sci Rep.* 2020; 10(1):1-14. doi: 10.1038/s41598-020-73972-7. Impact-Faktor: 4,379.

Kumstel S, Schreiber T, Goldstein L, Stenzel J, Lindner T, Joks M, Zhang X, **Wendt EHU**, Schönrogge M, Krause B, Vollmar B, Zechner D. **Targeting pancreatic cancer with combinatorial treatment of CPI-613 and inhibitors of lactate metabolism**. *PLOS ONE* 17(4): (e0266601) 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0266601. Impact-Faktor: 3,752.

Talbot SR, Kumstel S, Schulz B, Tang G, Abdelrahman A, Seume N, **Wendt EHU**, Eichberg J, Häger C, Bleich A, Vollmar B, Zechner D. **Robustness of a multivariate composite score when evaluating distress of animal models for gastrointestinal diseases**. *Sci Rep* 2023; 13(1): (2605)1-14. doi: 10.1038/s41598-023-29623-8. Impact-Faktor: 4,996.

Hamburg, den

(Die Originalunterschrift fehlt aus Gründen des Datenschutzes.)

---

Edgar Heinz Uwe Wendt

## **Verwendete Originalarbeiten zur kumulativen Dissertation**

# Galloflavin Plus Metformin Treatment Impairs Pancreatic Cancer Cells

EDGAR HEINZ UWE WENDT, MARIA SCHOENROGGE, BRIGITTE VOLLMAR and DIETMAR ZECHNER

*Institute for Experimental Surgery, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany*

**Abstract.** *Background/Aim:* In this study, we evaluated the effect of galloflavin, an inhibitor of lactate dehydrogenase, in combination with metformin, an anti-diabetic drug and inhibitor of oxidative phosphorylation, on pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Materials and Methods:* We explored the effect of galloflavin and metformin on proliferation and cell death of murine 6606PDA and human MIA PaCa-2 cells. *Results:* We observed that monotherapies of galloflavin and metformin both inhibit proliferation and induce cancer cell death. Moreover, the combination of both agents increased these effects on pancreatic ductal adenocarcinoma cells. The inhibition of proliferation by this combination therapy can be detected under hypoxic and normoxic conditions, leading to the assumption that this therapy might impair insufficiently supplied solid tumors as well as small clusters of cancer cells, e.g. after metastatic dissemination. *Conclusion:* Galloflavin, especially in combination with metformin, has a strong anti-cancerous effect on pancreatic ductal adenocarcinoma cells.

Pancreatic cancer patients have a very poor five-year relative survival of 9% for all stages (1). Hence, pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer-related death in both women and men in the USA. This demonstrates that surgical intervention plus adjuvant chemotherapy still lacks the needed efficacy to treat most of these patients successfully. Recent studies state that long-term ingestion of metformin, an often used anti-diabetic drug, is likely to reduce the risk of diabetic patients for the development of pancreatic cancer (2, 3). It was also suggested that metformin improves the survival of patients, who suffer from pancreatic cancer (4-

6). However, Wei *et al.* published a meta-analysis stating that mainly studies, which might be flawed by not considering the so-called immortal time bias, show an effect of metformin on pancreatic cancer (7). Moreover, Kordes *et al.* demonstrated that therapy with a regularly low anti-diabetic dose of metformin, besides standard chemotherapy, does not improve the overall survival compared to standard chemotherapy alone (8). However, this publication also suggested that patients with high metformin concentration in the blood might survive longer (8, 9). Thus, it is still controversially discussed, if this drug has an anti-cancerous effect and if metformin should be applied in combination with standard therapies or needs to be tested in combination with other experimental drugs. The anti-cancerous effect of metformin has been suggested to be mediated by its inhibition of oxidative phosphorylation (9), which is a key process to generate ATP. Another promising option for an effective chemotherapy is the inhibition of lactate dehydrogenase A (LDH-A) (10), which is a key enzyme in cancer, because cancer cells often favor metabolism *via* glycolysis (11-13). Indeed, genetic disruption of lactate dehydrogenases ablates the Warburg effect and restricts tumor growth (14). Thus, we decided to use galloflavin, an inhibitor of LDH, to evaluate if it inhibits proliferation and can induce death in pancreatic cancer cells. We also tested the combination therapy, galloflavin plus a high dose of metformin, in order to gain a therapeutic benefit by impairing oxidative phosphorylation and glycolysis.

## Materials and Methods

*Reagents.* Dimethyl sulfoxide (DMSO, code: D2438, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS, code: 10010-015, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), galloflavin (code: 4795, Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany), metformin (code: D150959, Sigma-Aldrich), trypan blue (code: 15250, Thermo Fisher Scientific).

*Cell culture and treatments.* The murine pancreatic adenocarcinoma cell line 6606PDA, a gift from Prof. Tuveson (University of Cambridge, UK), and the human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2, which was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA),

*Correspondence to:* PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner, Institute for Experimental Surgery, Rostock University Medical Center, Schillingallee 69a, 18057 Rostock, Germany. Tel: +49 381494 2512, Fax: +49 3814942502, e-mail: dietmar.zechner@uni-rostock.de

**Key Words:** Pancreatic ductal adenocarcinoma, cancer metabolism, combination therapy, polytherapy, anti-diabetic medication.

were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, code: FG0435, Biochrom GmbH, Berlin, Germany) containing 4.5 g/l glucose (high glucose) or in DMEM (Biochrom GmbH) supplemented with glucose to a concentration of 0.5 g/l (low glucose). The media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, code S0615, Biochrom GmbH), 100 units/ml penicillin and streptomycin (code A2212, Biochrom GmbH) and 8 µg/ml Tylosin (code: T3397, Sigma-Aldrich). The cells were treated with vehicle (DMSO), 5 µM, 20 µM, 80 µM and 320 µM of galloflavin or each dosage combined with 20 mM of metformin. In order to evaluate the influence of oxygen supply on drug efficacy, 6606PDA cells were cultured with the above drugs for 30 h under normoxic (19% oxygen) or hypoxic (1% oxygen) conditions in an Innova® CO-48-230 incubator (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, USA).

*Evaluation of lactate concentration, proliferation and cell death.* Lactate was quantified in the cell lysate and supernatant by the lactate colorimetric assay kit II (BioVision Incorporated, Milpitas, CA, USA) after treating the cells with 80 µM galloflavin or vehicle (DMSO) for 30 h ( $4 \times 10^3$  cells per well were plated in a 96-well plate). Since high FCS concentrations interfered with the lactate assay, the cells were grown in medium only supplemented with 1% instead of 10% FCS.

For assessing proliferation, a kit (code: 11 647 229 001, Roche, Basel, Switzerland), which measured 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) incorporation into cells was used. After plating  $8 \times 10^3$  6606PDA or  $4 \times 10^3$  MIA PaCa-2 cells per well in a 96-well plate, the cells were treated the next day with the indicated drugs for 24 h. The BrdU assay was then performed as suggested by the manufacturer and the absolute absorption at 450 nm was determined using a PerkinElmer Victor X3 plate reader (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA).

*Cell death was quantified by trypan blue staining of cells.* This dye stains cells, which are necrotic or in a late stage of apoptosis. In order to quantify dead cells,  $3 \times 10^4$  6606PDA or  $2.5 \times 10^4$  of MIA PaCa-2 cells per well were plated in a 24-well plate. On the following days the cells were treated for 30 h with the indicated drugs, detached by treatment with trypsin-EDTA (Biochrom) and stained with trypan blue solution (Thermo Fisher Scientific). Afterwards a representative amount of 100 cells per well were counted using a Neubauer counting chamber. The stained and unstained cells were evaluated to obtain the percentage of trypan blue positive cells.

*Statistics.* The graphs and statistics were performed with GraphPad Prism 6 (version 6.05 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The results are presented as line plots with mean and standard deviation or as box plots indicating the median, the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile in the form of a box with the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles as whiskers. Differences between the groups were evaluated by the two-tailed Mann-Whitney rank-sum test, followed by Bonferroni correction. Thus, differences with  $p \leq 0.05$  divided by the number of meaningful comparisons were considered to be significant while differences with  $p \leq 0.08$  divided by the number of meaningful comparisons were considered to show a tendency.

## Results

*Galloflavin inhibits lactate production.* At first, the lactate metabolism of 6606PDA cells was characterized by treating these cells with distinct concentrations of glucose and

oxygen. The lactate concentration was significantly increased in high glucose medium when compared to low glucose medium both in the cell lysate and the cell supernatant (data not shown). A significantly higher lactate concentration under hypoxic conditions was also observed in the cell supernatant, but was not detected in the cell lysate, when compared to normoxic conditions (data not shown). This suggests that lactate production of 6606PDA cells is induced by glucose and hypoxia. The inhibition of lactate production by galloflavin depends on the dosage (Figure 1A) and is significant at a dosage of 80 µM when compared to the vehicle treatment (Figure 1B). A similar dosage-dependent decrease of the lactate concentration caused by galloflavin was observed in the cell supernatant (Figure 1C) and is significant at a galloflavin concentration of 80 µM compared to vehicle treatment (Figure 1D). The proportional decrease of the intracellular and extracellular lactate concentrations after galloflavin treatment suggests that galloflavin doesn't interfere with the cellular efflux of lactate but impacts the production of lactate by inhibition of lactate dehydrogenase.

*Galloflavin and metformin inhibit proliferation.* A dose-dependent decrease in proliferation was observed when treating 6606PDA cells with galloflavin (Figure 2A). Adding 20 mM metformin caused additional inhibition of proliferation (Figure 2A). Treatment with 20 mM metformin slightly reduced proliferation, whereas 80 µM of galloflavin caused significant inhibition of proliferation when compared to vehicle treated control cells (Figure 2B). The combination therapy of 80 µM of galloflavin plus 20 mM of metformin also caused a slight decrease in proliferation when compared to galloflavin treated cells and a significant decrease in proliferation when compared to metformin treated cells (Figure 2B). A similar dose dependence in inhibiting cell proliferation is observed when treating MIA PaCa-2 cells with galloflavin (Figure 2C). At the concentration of 5 and 20 µM of galloflavin the addition of 20 mM metformin caused a significantly increased inhibition of proliferation (Figure 2C). In this cell line, the combination of 20 µM galloflavin plus 20 mM metformin reduced proliferation significantly when compared to vehicle treated or galloflavin treated cells (Figure 2D). These data suggest that galloflavin and metformin have an additive effect in inhibiting proliferation of pancreatic cancer cells.

*Galloflavin and metformin induce cell death.* In 6606PDA cells, galloflavin induced cell death in a dose-dependent manner in the absence and presence of metformin (Figure 3A). At the concentrations of 5 and 20 µM galloflavin the addition of 20 mM metformin caused a significantly increased induction of cell death (Figure 3A). Treatment with 20 mM of metformin or 80 µM galloflavin induced

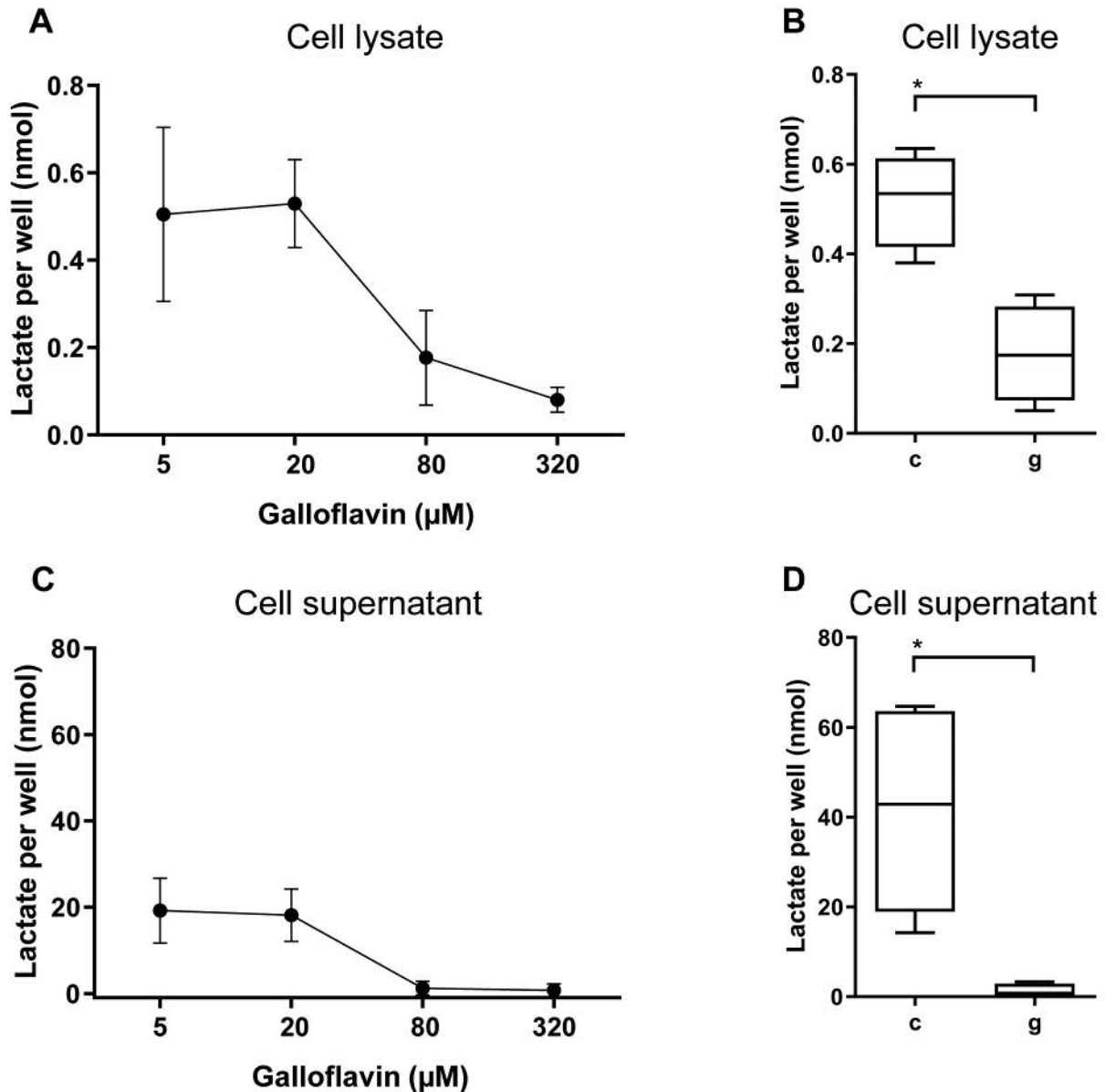


Figure 1. Inhibition of lactate metabolism in 6606PDA cells. (A) Galloflavin reduces lactate concentration in a dosage-dependent manner in the cell lysate. (B) 80 μM galloflavin (g) leads to a significant reduction of lactate concentration when compared to vehicle treated cells (c) used as control. (C) A similar dosage dependence and (D) significant reduction of lactate concentration was observed when analyzing the cell supernatant. Significant differences: \* $p \leq 0.029$  (B), \* $p \leq 0.004$  (D);  $n=4$  (A),  $n=4$  (B),  $n=4$  (C),  $n(c)=8$  and  $n(g)=4$  (D).

significant cell death, when compared to control treated cells (Figure 3B). The combination of metformin plus galloflavin induced slightly more cell death than galloflavin and significantly more cell death than metformin monotherapy (Figure 3B). In MIA PaCa-2 cells, galloflavin also induced cell death in a dose-dependent manner in the absence or presence of metformin (Figure 3C). However, adding metformin did not significantly increase galloflavin-induced

cell death (Figure 3C and D). These findings suggest, that only in some cell lines an additive effect on cell death can be observed when treating pancreatic cancer cell lines with metformin plus galloflavin.

*Galloflavin and metformin inhibit proliferation under normoxic and hypoxic conditions.* In order to evaluate if hypoxia influences the efficacy of galloflavin and

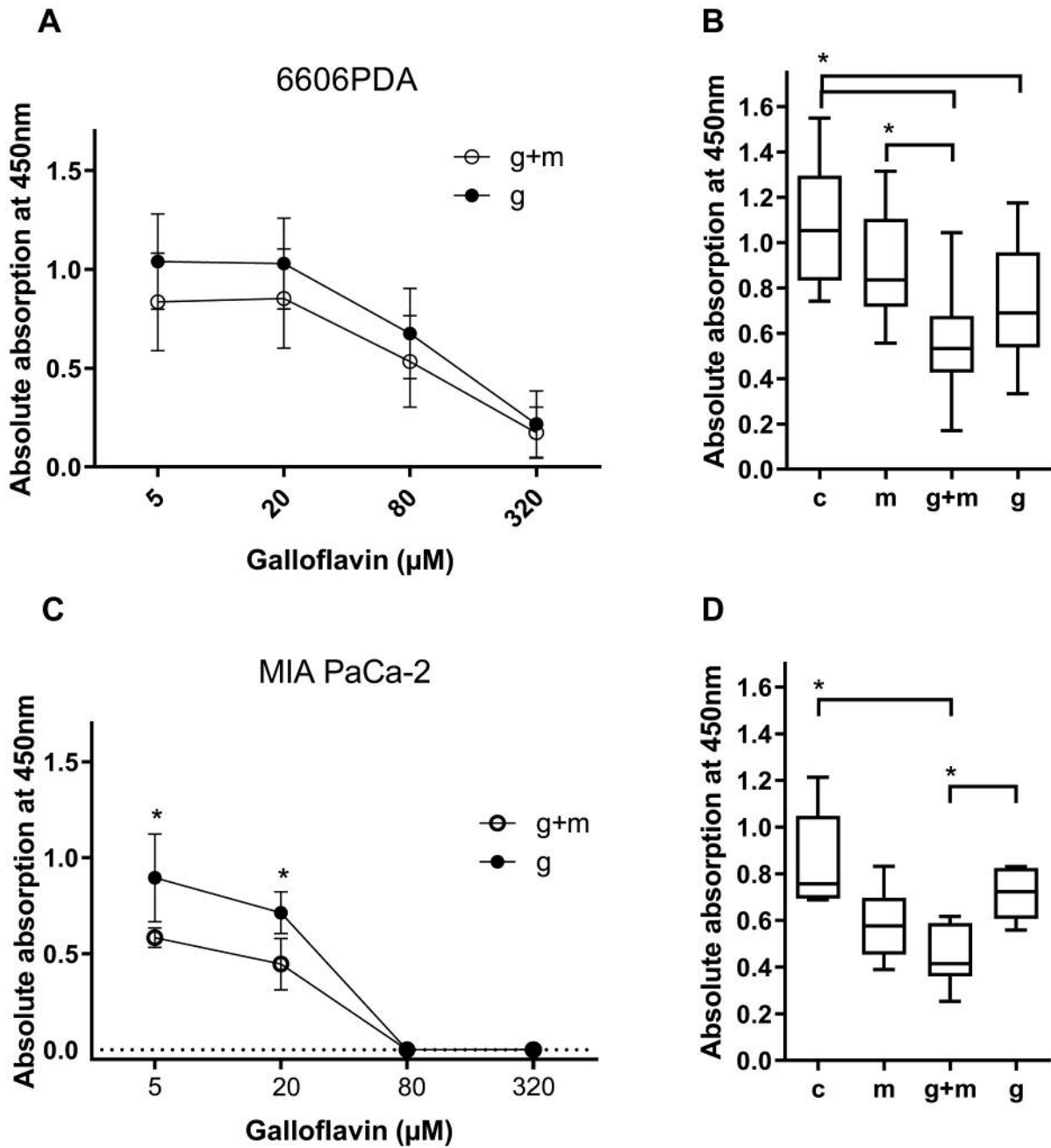


Figure 2. Metformin and galloflavin inhibit the proliferation of pancreatic cancer cells. (A) Galloflavin (g) and metformin plus galloflavin (g+m) reduce the proliferation of 6606PDA cells in a dosage-dependent manner. (B) Compared to vehicle treated cells (c) the proliferation of 6606PDA cells is slightly reduced by metformin (m) and significantly reduced by 80  $\mu\text{M}$  galloflavin (g) and the combination of galloflavin plus metformin. (C) A similar dosage dependence is observed in MIA PaCa-2 cells. (D) Compared to vehicle treated cells (c) the proliferation of MIA PaCa-2 cells is slightly reduced by metformin (m) and significantly reduced by 20  $\mu\text{M}$  galloflavin (g) and the combination of galloflavin plus metformin. Significant differences: \* $p \leq 0.005$  (B); \* $p \leq 0.004$  (C); \* $p \leq 0.009$  (D);  $n=10$  (A),  $n=12$  (B),  $n=6$  (C),  $n=6$  (D).

metformin, the cells were treated with these drugs for 30 h under normoxic or hypoxic conditions. Under both conditions, 20  $\mu\text{M}$  galloflavin only slightly inhibited

proliferation, whereas metformin monotherapy caused a significant inhibition of proliferation (Figure 4A and B). The galloflavin plus metformin combination therapy

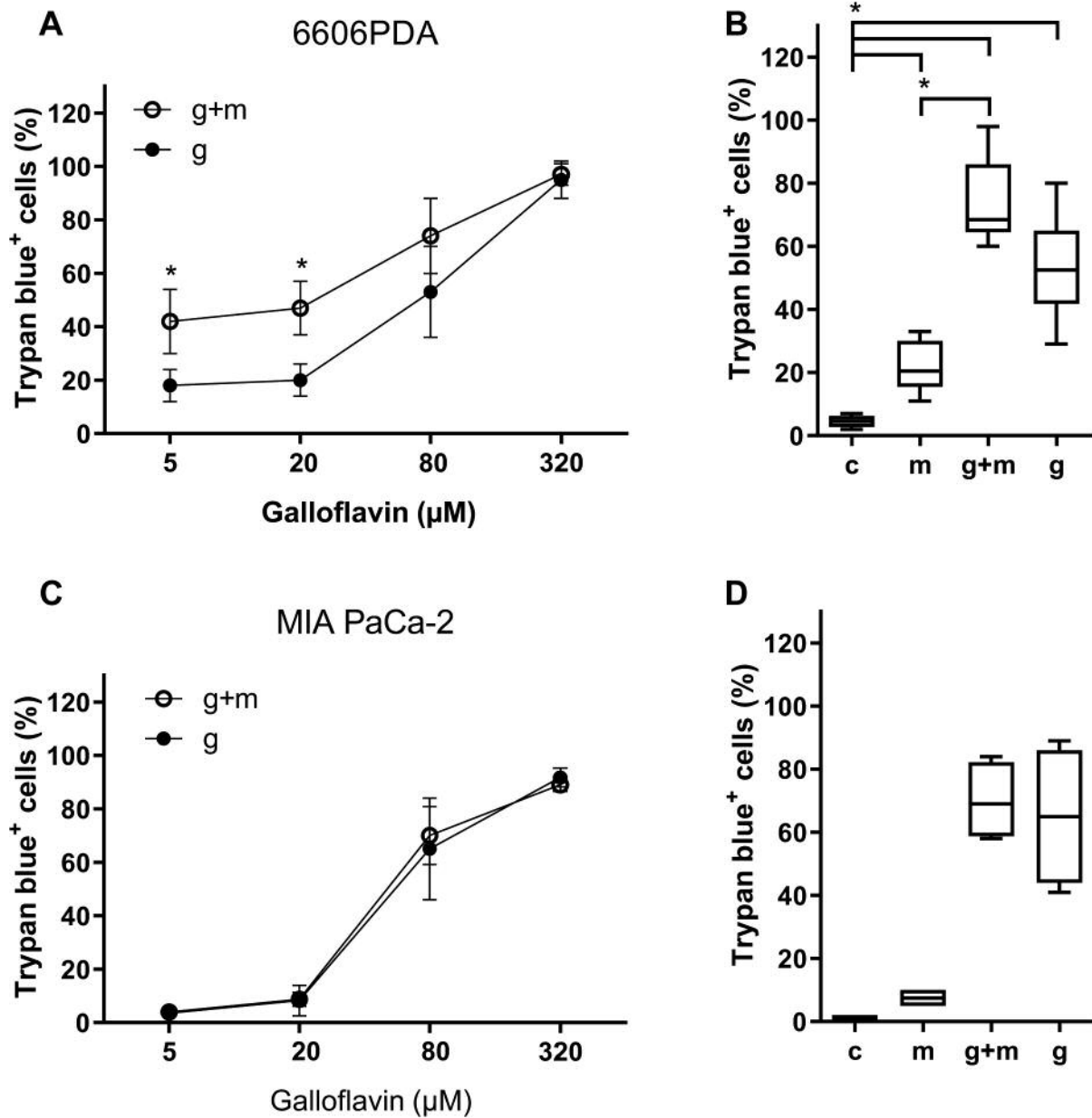


Figure 3. Metformin and galloflavin induce cell death in pancreatic cancer cells. (A) Galloflavin (g) and metformin plus galloflavin (g+m) induce cell death of 6606PDA cells in a dosage-dependent manner. (B) Compared to vehicle treated cells (c) cell death of 6606PDA cells is significantly increased by metformin (m), 80  $\mu$ M galloflavin (g) and the combination of galloflavin plus metformin. (C) A similar dosage dependence is observed in MIA PaCa-2 cells. (D) Compared to vehicle treated cells (c) the cell death of MIA PaCa-2 cells is induced by metformin (m), 80  $\mu$ M galloflavin (g), and the combination of galloflavin plus metformin. Significant differences:  $*p \leq 0.009$  (A),  $*p \leq 0.030$  (B);  $n=6$  (A),  $n=6$  (B),  $n=4$  (C),  $n=4$  (D).

significantly inhibited proliferation when compared to the monotherapies (Figure 4A and B). This suggests that a combination treatment with galloflavin and metformin could inhibit proliferation in *e.g.* hypoxic large solid tumors as well as in normoxic smaller clusters of cancer cells, *e.g.* after metastatic dissemination.

## Discussion

In this study we confirmed that galloflavin inhibits lactate production. We found that there is an additive effect of metformin and galloflavin on the inhibition of proliferation and the induction of cell death in pancreatic cancer cells.

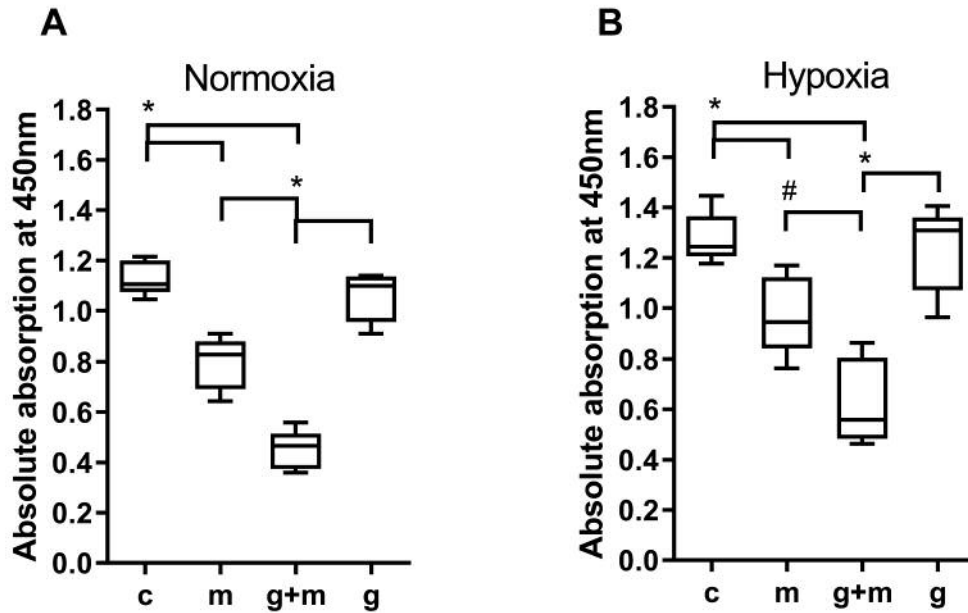


Figure 4. Metformin and galloflavin inhibit the proliferation of pancreatic cancer cells under normoxic and hypoxic conditions. Compared to vehicle treated cells (c) the proliferation of 6606PDA cells is slightly reduced by 20  $\mu$ M galloflavin (g) and significantly reduced by 20 mM metformin (m) and the combination of galloflavin plus metformin (g+m) under (A) normoxic and (B) hypoxic conditions. Significant differences: \* $p \leq 0.008$  (A), \* $p \leq 0.008$  (B); tendentious difference: # $p \leq 0.016$  (B),  $n=5$  (A),  $n=5$  (B).

Furthermore, we observed that the inhibition of proliferation by this combinational therapy can be detected under hypoxic and normoxic conditions, leading to the assumption that this combinational therapy could impair insufficiently supplied solid tumors as well as small normoxic clusters of cancer cells, *e.g.* after metastatic dissemination.

The anti-cancerous effect of metformin, as demonstrated in this study, is consistent with numerous previous publications, which also indicate that metformin monotherapy inhibits pancreatic cancer cell proliferation and induces apoptosis (15-17). Galloflavin has, to our knowledge, not been tested in pancreatic cancer cells. The observed anti-cancerous effects of galloflavin are, however, consistent with observations demonstrating that galloflavin impairs cell expansion of various cell lines (18-21). The presented data also demonstrate that the combination of galloflavin and metformin has an additive anti-cancerous effect, which suggests that inhibition of LDH and oxidative phosphorylation might be a useful strategy to treat cancer.

However, it is still controversial which drugs might be best for such a combination therapy. For example, there are promising studies demonstrating that other LDH inhibitors such as N-hydroxyindole-2-carboxylates and FX11 can impair cancer cell proliferation (22, 23).

Furthermore, one study by Miskimins *et al.* suggests that the combination of phenformin, a biguanide inhibiting oxidative phosphorylation, and the LDH inhibitor oxamate synergistically

induces cancer cell death in breast, lung, melanoma, colon, prostate and tonsil cancer cells (24). At first glance, phenformin seems to be a more appropriate drug than metformin, because it has a higher efficacy in inhibiting oxidative phosphorylation (24, 25). Yet, it has also a higher risk of inducing lactate acidosis (26, 27), whereas metformin is known for its safer use in patients (27, 28). Other alternatives for metformin could be the highly potent and selective inhibitor of oxidative phosphorylation, called IACS-010759 (29). Oxamate, since it inhibits LDH, can in principle be used in combination with metformin or other inhibitors of oxidative phosphorylation. However, oxamate is a very old drug, which is hydrophilic and is known to penetrate the cytoplasmic membrane poorly, suggesting that it is a good LDH inhibitor for biochemical studies using protein extract, but a poor inhibitor when using entire cells (30, 31). Oxamate has also an about 500-fold higher IC50 than galloflavin when applied to whole cells (31). Thus, there are some aspects suggesting that galloflavin is superior to oxamate and that metformin has advantages over phenformin. In conclusion, this study suggests that a galloflavin metformin combination therapy should be tested in preclinical studies for treating pancreatic cancer.

### Funding

The study was supported by B. BRAUN-STIFTUNG (grant number: BBST-D-15-00003).

## Conflicts of Interest

The Authors declare no conflicts of interest regarding this study.

## Authors' Contributions

Study concepts: DZ, BV; Study design: DZ, BV; Data acquisition: EHUW, MS; Quality control of data and algorithms: EHUW, MS, DZ; Data analysis and interpretation: EHUW, MS, DZ; Statistical analysis: EHUW, MS, DZ; Manuscript preparation: EHUW, DZ; Manuscript editing and review: all Authors.

## Acknowledgements

The Authors would like to thank Prof. Barbara Nebe for providing the hypoxic incubator (Center for Medical Research, Dept. of Cell Biology) and Berit Blendow (Institute for Experimental Surgery, University of Rostock) for excellent technical assistance.

## References

- Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69(1): 7-34, 2019. PMID: 30620402. DOI: 10.3322/caac.21551
- Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M and Abbruzzese JL: Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 137(2): 482-488, 2009. PMID: 19375425. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.04.013
- Wang Z, Lai ST, Xie L, Zhao JD, Ma NY, Zhu J, Ren ZG and Jiang GL: Metformin is associated with reduced risk of pancreatic cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 106(1): 19-26, 2014. PMID: 24837144. DOI: 10.1016/j.diabres.2014.04.007
- Zhou PT, Li B, Liu FR, Zhang MC, Wang Q, Li YY, Xu C, Liu YH, Yao Y and Li D: Metformin is associated with survival benefit in pancreatic cancer patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8(15): 25242-25250, 2017. PMID: 28445955. DOI: 10.18632/oncotarget.15692
- Li X, Li T, Liu Z, Gou S and Wang C: The effect of metformin on survival of patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 7(1): 5825, 2017. PMID: 28724893. DOI: 10.1038/s41598-017-06207-x
- Choi Y, Kim TY, Oh DY, Lee KH, Han SW, Im SA, Kim TY and Bang YJ: the impact of diabetes mellitus and metformin treatment on survival of patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy. *Cancer Res Treat* 48(1): 171-179, 2016. PMID: 25779362. DOI: 10.4143/crt.2014.292
- Wei M, Liu Y, Bi Y and Zhang ZJ: Metformin and pancreatic cancer survival: Real effect or immortal time bias? *Int J Cancer* 145(7): 1822-1828, 2019. PMID: 30848544. DOI: 10.1002/ijc.32254
- Kordes S, Pollak MN, Zwinderman AH, Mathôt RA, Weterman MJ, Beeker A, Punt CJ, Richel DJ and Wilmink JW: Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* 16(7): 839-847, 2015. PMID: 26067687. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00027-3
- Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M and Viollet B: Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 20(6): 953-966, 2014. PMID: 25456737. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.09.018
- Allison SJ, Knight JR, Granchi C, Rani R, Minutolo F, Milner J and Phillips RM: Identification of LDH-A as a therapeutic target for cancer cell killing *via* (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent pathways. *Oncogenesis* 3: e102, 2014. PMID: 24819061. DOI: 10.1038/oncsis.2014.16
- Goldman RD, Kaplan NO and Hall TC: Lactic dehydrogenase in human neoplastic tissues. *Cancer Res* 24: 389-399, 1964. PMID: 14147812.
- Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D and Lou W: Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol* 34(3): 1523-1530, 2013. PMID: 23404405. DOI: 10.1007/s13277-013-0679-1
- Shi M, Cui J, Du J, Wei D, Jia Z, Zhang J, Zhu Z, Gao Y and Xie K: A novel KLF4/LDHA signaling pathway regulates aerobic glycolysis in and progression of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 20(16): 4370-4380, 2014. PMID: 24947925. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0186
- Ždravlečić M, Brand A, Di Ianni L, Dettmer K, Reinders J, Singer K, Peter K, Schnell A, Bruss C, Decking SM, Koehl G, Felipe-Abrio B, Durivault J, Bayer P, Evangelista M, O'Brien T, Oefner PJ, Renner K, Pouysségur J and Kreutz M: Double genetic disruption of lactate dehydrogenases A and B is required to ablate the "Warburg effect" restricting tumor growth to oxidative metabolism. *J Biol Chem* 293(41): 15947-15961, 2018. PMID: 30158244. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004180
- Bao B, Wang Z, Ali S, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Banerjee S, Kong D, Li Y, Thakur S and Sarkar FH: Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 5(3): 355-364, 2012. PMID: 22086681. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0299
- Kisfalvi K, Eibl G, Sinnott-Smith J and Rozenegurt E: Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. *Cancer Res* 69(16): 6539-6545, 2009. PMID: 19679549. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0418
- Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J and Xu GM: Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 14(47): 7192-7198, 2008. PMID: 19084933. DOI: 10.3748/wjg.14.7192
- Manerba M, Vettraiño M, Fiume L, Di Stefano G, Sartini A, Giacomini E, Buonfiglio R, Roberti M and Recanatini M: Galloflavin (CAS 568-80-9): a novel inhibitor of lactate dehydrogenase. *ChemMedChem* 7(2): 311-317, 2012. PMID: 22052811. DOI: 10.1002/cmdc.201100471
- Farabegoli F, Vettraiño M, Manerba M, Fiume L, Roberti M and Di Stefano G: Galloflavin, a new lactate dehydrogenase inhibitor, induces the death of human breast cancer cells with different glycolytic attitude by affecting distinct signaling pathways. *Eur J Pharm Sci* 47(4): 729-738, 2012. PMID: 22954722. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.08.012
- Vettraiño M, Manerba M, Govoni M and Di Stefano G: Galloflavin suppresses lactate dehydrogenase activity and causes MYC downregulation in Burkitt lymphoma cells through NAD/NADH-dependent inhibition of sirtuin-1. *Anticancer Drugs* 24(8): 862-870, 2013. PMID: 23797802. DOI: 10.1097/CAD.0b013e328363ae50
- Han X, Sheng X, Jones HM, Jackson AL, Kilgore J, Stine JE, Schointuch MN, Zhou C and Bae-Jump VL: Evaluation of the

- anti-tumor effects of lactate dehydrogenase inhibitor galloflavin in endometrial cancer cells. *J Hematol Oncol* 8: 2, 2015. PMID: 25631326. DOI: 10.1186/s13045-014-0097-x
- 22 Granchi C, Roy S, De Simone A, Salvetti I, Tuccinardi T, Martinelli A, Macchia M, Lanza M, Betti L, Giannaccini G, Lucacchini A, Giovannetti E, Sciarrillo R, Peters GJ and Minutolo F: N-Hydroxyindole-based inhibitors of lactate dehydrogenase against cancer cell proliferation. *Eur J Med Chem* 46(11): 5398-5407, 2011. PMID: 21944286. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.08.046
- 23 Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL and Dang CV: Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(5): 2037-2042, 2010. PMID: 20133848. DOI: 10.1073/pnas.0914433107
- 24 Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, Ryu S, Jung YS and Choi JY: Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One* 9(1): e85576, 2014. PMID: 24465604. DOI: 10.1371/journal.pone.0085576
- 25 Lea MA, Guzman Y, Desbordes C: Inhibition of growth by combined treatment with inhibitors of lactate dehydrogenase and either phenformin or inhibitors of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3. *Anticancer Res* 36(4): 1479-1488, 2016. PMID: 27069123.
- 26 McGuinness ME and Talbert RL: Phenformin-induced lactic acidosis: a forgotten adverse drug reaction. *Ann Pharmacother* 27(10): 1183-1187, 1993. PMID: 8251683.
- 27 Bando K, Ochiai S, Kunimatsu T, Deguchi J, Kimura J, Funabashi H and Seki T: Comparison of potential risks of lactic acidosis induction by biguanides in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 58(1): 155-160, 2010. PMID: 20488215. DOI: 10.1016/j.yrtph.2010.05.005
- 28 Aharaz A, Pottgård A, Henriksen DP, Hallas J, Beck-Nielsen H and Lassen AT: Risk of lactic acidosis in type 2 diabetes patients using metformin: A case control study. *PLoS One* 13(5): e0196122, 2018. PMID: 29738540. DOI: 10.1371/journal.pone.0196122
- 29 Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, McAfoos T, Morlacchi P, Ackroyd J, Agip AA, Al-Atrash G, Asara J, Bardenhagen J, Carrillo CC, Carroll C, Chang E, Ciurea S, Cross JB, Czako B, Deem A, Daver N, de Groot JF, Dong JW, Feng N, Gao G, Gay J, Do MG, Greer J, Giuliani V, Han J, Han L, Henry VK, Hirst J, Huang S, Jiang Y, Kang Z, Khor T, Konoplev S, Lin YH, Liu G, Lodi A, Lofton T, Ma H, Mahendra M, Matre P, Mullinax R, Peoples M, Petrocchi A, Rodriguez-Canale J, Serreli R, Shi T, Smith M, Tabe Y, Theroff J, Tiziani S, Xu Q, Zhang Q, Muller F, DePinho RA, Toniatti C, Draetta GF, Heffernan TP, Konopleva M, Jones P, Di Francesco ME and Marszalek JR: An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med* 24(7): 1036-1046, 2018. PMID: 29892070. DOI: 10.1038/s41591-018-0052-4
- 30 Granchi C and Minutolo F: Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *ChemMedChem* 7(8): 1318-1350, 2012. PMID: 22684868. DOI: 10.1002/cmdc.201200176
- 31 Manerba M, Di Ianni L, Fiume L, Roberti M, Recanatini M and Di Stefano G: Lactate dehydrogenase inhibitors sensitize lymphoma cells to cisplatin without enhancing the drug effects on immortalized normal lymphocytes. *Eur J Pharm Sci* 74: 95-102, 2015. PMID: 25930121. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.04.022

*Received November 18, 2019*

*Revised November 25, 2019*

*Accepted November 28, 2019*



# Blocking Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Supports Chemotherapy of Pancreatic Cancer Cells

Xianbin Zhang<sup>1\*</sup>, Maria Schönrogge<sup>1</sup>, Johanna Eichberg<sup>1</sup>, Edgar Heinz Uwe Wendt<sup>1</sup>, Simone Kumstel<sup>1</sup>, Jan Stenzel<sup>2</sup>, Tobias Lindner<sup>2</sup>, Robert Jaster<sup>3</sup>, Bernd Joachim Krause<sup>4</sup>, Brigitte Vollmar<sup>1</sup> and Dietmar Zechner<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Experimental Surgery, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany, <sup>2</sup> Core Facility Multimodal Small Animal Imaging, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany, <sup>3</sup> Division of Gastroenterology, Department of Medicine II, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany, <sup>4</sup> Department of Nuclear Medicine, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Patrizia Agostinis,  
KU Leuven, Belgium

### Reviewed by:

Carine Michiels,  
Université de Namur, Belgium  
Bilikere S. Dwarakanath,  
Shanghai Proton and Heavy Ion  
Center (SPHIC), China

### \*Correspondence:

Xianbin Zhang  
zhangxianbin@hotmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular and Cellular Oncology,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

**Received:** 19 August 2018

**Accepted:** 23 November 2018

**Published:** 05 December 2018

### Citation:

Zhang X, Schönrogge M, Eichberg J, Wendt EHU, Kumstel S, Stenzel J, Lindner T, Jaster R, Krause BJ, Vollmar B and Zechner D (2018) Blocking Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Supports Chemotherapy of Pancreatic Cancer Cells. *Front. Oncol.* 8:590. doi: 10.3389/fonc.2018.00590

In this study we evaluated the interaction of pancreatic cancer cells, cancer-associated fibroblasts, and distinct drugs such as  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate, metformin, and gemcitabine. We observed that  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate as monotherapy or in combination with metformin could significantly induce collagen I deposition within the stromal reaction. Subsequently, we demonstrated that cancer-associated fibroblasts impaired the anti-proliferation efficacy of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate, metformin and gemcitabine. Interestingly, inhibition of autophagy in these fibroblasts can augment the anti-proliferation effect of these chemotherapeutics *in vitro* and can reduce the tumor weight in a syngeneic pancreatic cancer model. These results suggest that inhibiting autophagy in cancer-associated fibroblasts may contribute to strategies targeting cancer.

**Keywords:** autophagy, cancer-associated fibroblasts, gemcitabine, metformin,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate, pancreatic cancer

## INTRODUCTION

Despite decades of intensive effort, the 5-years relative survival rate of pancreatic cancer is still only 8% (1). Although several treatment strategies showed promising preclinical anti-cancer activity, most of them failed to show significant efficacy in clinical trials. One reason might be that these treatment strategies only targeted pancreatic cancer cells, but ignored the abundant desmoplastic stroma around the tumor (2). This stromal reaction impairs vasculature and functions as a barrier to chemotherapeutics. Unfortunately, most preclinical pancreatic cancer models fail to replicate the dense stroma accurately (2).

An important cell type of the stromal reaction is the cancer-associated fibroblast (CAF). Several studies demonstrated that these fibroblasts contribute to tumor progression and chemoresistance in pancreatic cancer (3, 4). Thus, research has lately focused on the evaluation of drugs, which deplete CAFs (5–7). However, subsequent clinical trials demonstrated that reducing fibrosis in addition to a first-line therapy was not beneficial for patients (8). This suggests that reduction of CAFs is not a good option for cancer therapy. A better option may be to modify specific aspects of interactions between CAFs and carcinoma cells.

Lactate is an important mediator for the interaction of CAFs and cancer cells. For example, CAFs are stimulated by cancer cells to produce and export lactate. Subsequently, cancer cells

import this lactate to fuel the Krebs cycle and support anabolic processes as well as cell proliferation (9). This interaction between CAFs and carcinoma cells can be blocked by  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC), an inhibitor of lactate transporter (9).

In addition, another process, called autophagy (10–12), is also involved in the interaction between tumor and CAFs (13–15). Recent evidence proved that CAFs promote tumor growth through autophagy, which is responsible for providing nutrients to carcinoma cells (13). Moreover, autophagy is often necessary for the survival of cells, especially when cells are starved or treated by chemotherapeutics (10, 11). Multiple studies have explored this effect of autophagy in pancreatic cancer (10, 12). However, it is unknown, if and how distinct chemotherapeutics influence autophagy in CAFs, or whether blocking the autophagic flux in CAFs can improve the efficacy of chemotherapies in pancreatic cancer cells.

It was the aim of this study to evaluate the interaction among drugs, carcinoma cells, and autophagy in CAFs. Specifically, we wanted to address the question if inhibiting autophagy in CAFs could support the anti-proliferation activity of metabolic inhibitors, such as metformin and CHC or gemcitabine, a first-line therapy for the treatment of pancreatic cancer.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and Antibodies

Dimethyl sulfoxide (DMSO, code D2438), CHC (code 476870), metformin (code D150959), gemcitabine (code G6423), mitomycin C (MCC, code M7949), and chloroquine (CQ, code PHR1258) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Bafilomycin A1 (BAF, code 196000) was obtained from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Primary antibodies against type I collagen (collagen I, code ab34710), p62 (code ab109012-100), and  $\beta$ -actin (code A5441) were obtained from Abcam (Cambridge, UK) or Sigma-Aldrich. Secondary antibodies, goat anti-rabbit immunoglobulins (code D0487), peroxidase linked anti-rabbit antibody (code 7074), peroxidase linked anti-mouse antibody (code A9044), and liquid permanent red system (code K0640) were purchased from Dako (Hamburg, Germany), Cell Signaling (Danvers, USA) or Sigma-Aldrich.

### Cell Culture and Treatment of Distinct Chemotherapeutic Strategies

The murine pancreatic adenocarcinoma cell line 6606PDA was a gift from Prof. Tuveson at the University of Cambridge, UK. The human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 was purchased from ATCC (Manassas, USA). These cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, code FG0435, Biochrom, GmbH, Berlin, Germany) supplemented with 10% fetal calf plasma (FCS), 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. The generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cell line, LTC-Tet (LTC),

were described previously (16, 17). These cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, code FG4605, Biochrom, GmbH, Berlin, Germany) supplemented with 10% FCS, 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich, code M7145). Cells were treated with 10 mM CHC, 5 mM metformin, both drugs, 0.1  $\mu$ M gemcitabine or an appropriate vehicle (Sham) as indicated in each figure.

### Evaluation of Proliferation and Cell Death

In order to evaluate the benefit of CHC and metformin for treating pancreatic cancer,  $2 \times 10^3$  6606PDA cells per well were seeded in a 96 well microplate. After 24 h, these cells were treated with the indicated chemotherapeutic agents for 48 h. To evaluate the function of CAFs *in vitro*,  $1 \times 10^4$  LTC cells per well were cultured in a 96 well microplate for 24 h. To stop proliferation, all LTC cells were treated with 5  $\mu$ g/ml MMC for 3 h (see **Figures 3–5**). As indicated in **Figures 4, 5C,D**, autophagy in LTC cells was inhibited by additionally pretreating with 50  $\mu$ M CQ or 0.2  $\mu$ M BAF for 3 h. These cells were then washed two times with phosphate buffered saline (PBS), and co-cultured with  $2 \times 10^3$  6606PDA or  $4 \times 10^3$  MIA PaCa-2 cells per well for 24 h. Afterwards, these cells were treated with CHC, metformin, both drugs, or appropriate vehicle (Sham) for 48 h. Alternatively, these co-cultured cells were treated with gemcitabine or vehicle (Sham) for 24 h. Subsequently, the proliferation of 6606PDA cells was quantified by incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) with colorimetric Cell Proliferation ELISA kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, code 11647229001) and Perkin Elmer Victor X3 model 2030 Multilabel Plate Reader platform (PerkinElmer, Waltham, USA).

To assess the synergistic effect of CHC and metformin in cell death,  $3 \times 10^4$  6606PDA cells per well were plated in a 24 well plate. On the following day these cells were treated for 56 h with chemotherapeutic agents as indicated in **Figure 2B**. Subsequently, the percentage of dead cells was determined with the help of a trypan blue solution.

### Western Blot

For western blots,  $2.4 \times 10^5$  LTC cells per well were plated in a 6 well plate. After 24 h these cells were treated with distinct drugs as indicated in **Figure 7**; and then the western blots were performed as previously described using rabbit anti-p62 antibody (dilution: 8,000 $\times$ ), mouse anti- $\beta$ -actin antibody (dilution: 20,000 $\times$ ), peroxidase linked anti-rabbit antibody (dilution: 10,000 $\times$ ) and peroxidase linked anti-mouse antibody (dilution: 60,000 $\times$ ). Proteins were visualized by luminol-enhanced chemiluminescence (ECL plus; GE Healthcare, Munich, Germany) and Chemi-Doc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) (18).

### Animals and the Syngeneic Orthotopic Pancreatic Cancer Model

C57BL/6J male mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), and bred in our local animal facility. All processes of keeping mice and performing experiments were in accordance with the EU-directive

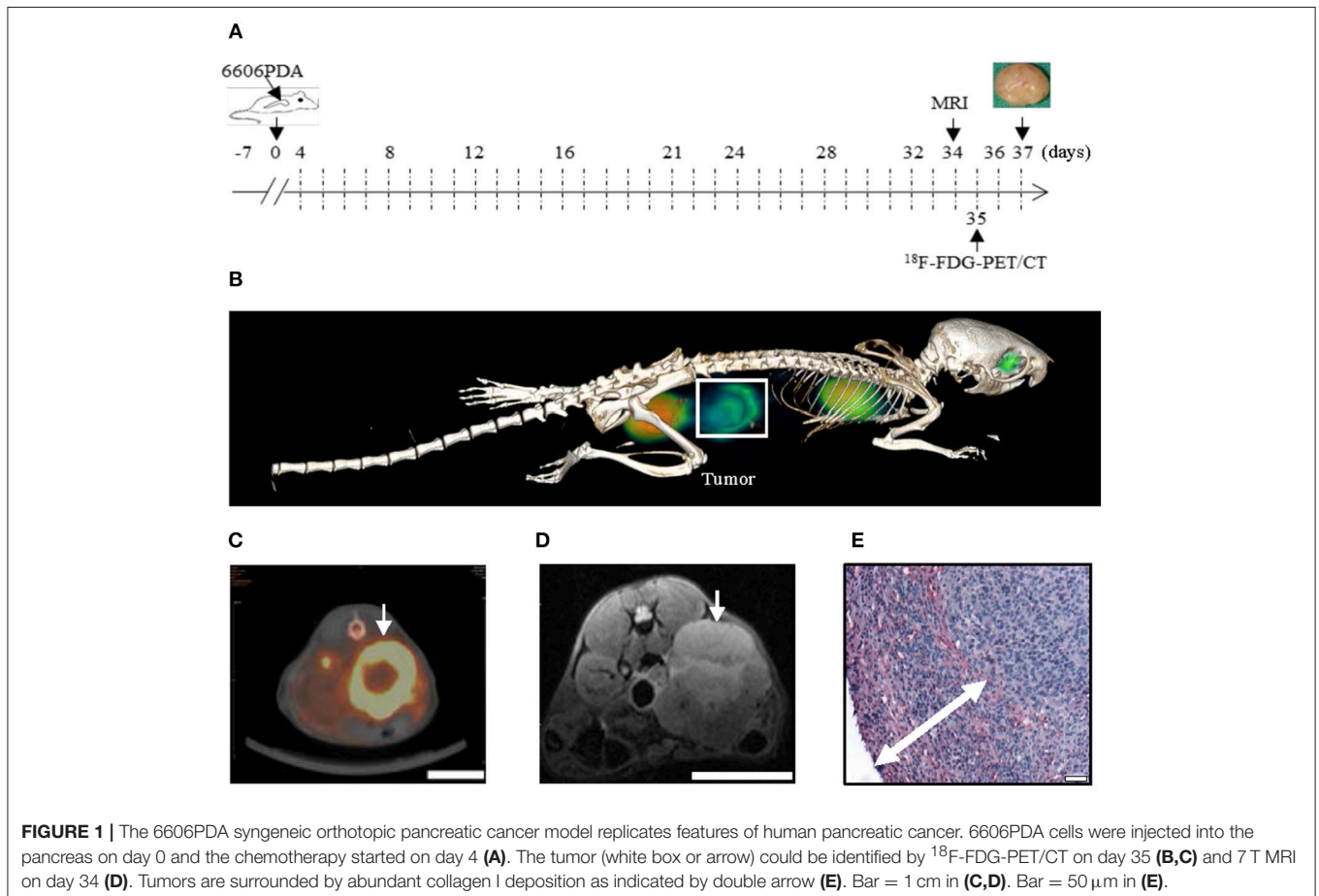
**Abbreviations:** CAFs, cancer-associated fibroblasts; CHC,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate; MMC, mitomycin C; CQ, chloroquine; BAF, bafilomycin A1.

2010/63/EU, and approved by the local animal care committee (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern). The syngeneic orthotopic pancreatic cancer model was performed as described previously (19). Briefly, after 1 week of accustoming to the environment,  $2.5 \times 10^5$  6606PDA were injected into the pancreas of mice (Figure 1A). To relieve pain 5 mg/kg carprofen (Pfizer GmbH, Berlin, Germany) was injected (sc) before surgery and 1,250 mg/L metamizol (Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) was added to the drinking water until euthanasia of the mice. On day 4 after cell injection, mice were daily treated (i.p.) with vehicle solution (Sham), CHC, 125 mg/kg metformin or CHC plus metformin. To evaluate an appropriate CHC dose for mice, three strategies, 15 mg/kg CHC plus 125 mg/kg metformin ( $n = 3$ ), 60 mg/kg CHC plus 125 mg/kg metformin ( $n = 3$ ), or 240 mg/kg CHC plus 125 mg/kg metformin ( $n = 3$ ), were evaluated. In order to evaluate inhibition of autophagy *in vivo*, mice were i.p. injected with 60 mg/kg CQ or an appropriate volume of PBS twice per week. On day 37, after euthanasia, the tumor was separated from the pancreas and the weight was recorded.

## 7T MRI and $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT Imaging

Anesthetized (1.2–2.5% isoflurane in oxygen) mice were scanned with a 7T small animal MRI (BioSpec 70/30, 7.0 Tesla,

gradient inset: BGA-12S, max. gradient strength: 440 mT/m) in combination with a transmit volume-resonator (86 mm inner diameter) and receive surface-coil (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen) on day 34 after 6606PDA cells injection (as indicated in Figure 1A). Animals were scanned using morphological T2 weighted TurboRARE (T2w-TurboRARE) and diffusion weighted imaging (DWI) sequences with following parameters: transversal T2w TurboRARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement): TE/TR: 25/1880 ms; FoV: approx.  $40 \times 28$  mm; matrix:  $200 \times 200$ ; voxel size:  $0.2 \times 0.14$  mm, slice thickness 1 mm, 25 slices; transversal DWI-spin-echo sequence: 4 b values ( $b = 100, 300, 700, 1,000$  s/mm<sup>2</sup>), one A0 image; 3 directions; TE/TR: 22/2500 ms; FoV:  $28 \times 20$  mm, matrix:  $128 \times 128$ ; voxel size:  $0.22$  mm  $\times$   $0.156$  mm, slice thickness 0.9 mm; 12 slices. On day 35 after 6606PDA cells injection, the  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT imaging was performed. Mice were anesthetized as mentioned above. Under anesthesia, the mice were injected with  $\sim 15$  MBq of  $^{18}\text{F}$ -FDG intravenously via a microcatheter placed in a tail vein. After an uptake period of 60 min, static PET scans in head-prone position were acquired for 15 min using a small animal micro PET/CT scanner (Inveon PET/CT Siemens, Knoxville, TN, USA). Throughout the imaging session, respiration of the mice was controlled and body temperature was constantly kept at 38°C via a heating pad. The PET image reconstruction method consisted of a 2-dimensional ordered subset expectation



maximization algorithm (2D-OSEM) with four iterations and 6 subsets. Attenuation correction was performed on the basis whole body CT scan and a decay correction for  $^{18}\text{F}$  was applied. PET images were also corrected for random coincidences, dead time and scatter.

## Immunohistochemical Staining

To evaluate the stromal reaction, collagen I staining was performed on 4  $\mu\text{m}$  paraffin sections using rabbit anti-collagen I antibody (dilution: 200 $\times$ ) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (dilution: 100 $\times$ ), followed by permanent staining. All images of collagen I were obtained by an Olympus microscope, BX51, equipped with a ColorView II camera (Olympus, Tokyo, Japan). To measure the thickness of stromal reaction, the distance from the outside to the inside edge of collagen I deposition was measured at 12 o'clock, 3 o'clock, 6 o'clock and 9 o'clock position of the section. The mean value of these four distances was used to define the thickness of stromal reaction.

## Analysis of Blood

To evaluate the concentration of alanine aminotransferase (ALT), alanine transaminase (AST), and lipase in plasma, blood samples were taken before euthanasia of the mice and analyzed using the Cobas c111 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

## Statistics

The results were presented as box plots. The Mann-Whitney rank sum test, followed by Bonferroni correction determined the significance of differences. Differences with  $P \leq 0.05$ , divided by the number of meaningful comparisons, were considered to be significant. All statistics were performed by Sigmaplot 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

## RESULTS

### An *in vivo* Model Replicating Features of Human Pancreatic Cancer

In order to evaluate if injection of 6606PDA cells gives rise to tumors with characteristic features of human pancreatic cancer, tumors were assessed by *in vivo* imaging and histological studies (Figure 1). We found that tumors could be identified by  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT (Figures 1B,C) and 7T MRI (Figure 1D). To monitor the stromal reaction around the tumor, collagen I immunohistochemistry was performed. We observed that the carcinoma was surrounded by extensive collagen I deposition (Figure 1E).

### CHC Plus Metformin Inhibits Proliferation and Induces Cell Death

In order to assess if inhibitors of cell metabolism impair pancreatic cancer cells, 6606PDA cells were treated with 10 mM CHC, 5 mM metformin or both drugs. We observed that the monotherapies significantly inhibited the proliferation of 6606PDA cells, compared to Sham-treated cells. The combination therapy, CHC plus metformin, also significantly inhibited proliferation, when compared to both monotherapies

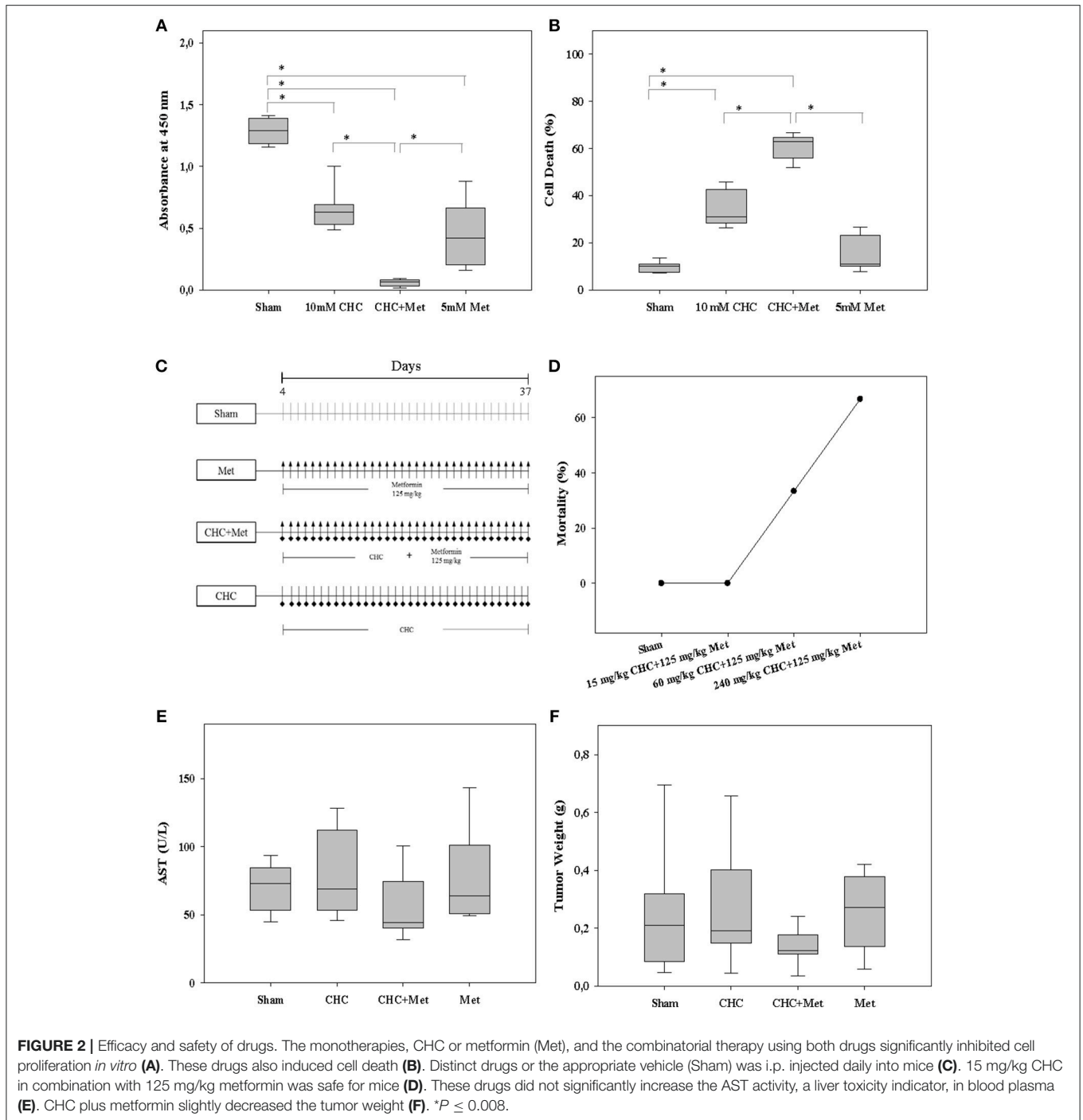
and Sham treatment (Figure 2A). In addition, we observed that 10 mM CHC significantly induced cell death while 5 mM metformin moderately increased the percentage of dead cells, when compared to cells treated with Sham (Figure 2B). Moreover, CHC in combination with metformin significantly induced cell death when compared to Sham, CHC, or metformin treated cells (Figure 2B).

### CHC Plus Metformin Is Safe for Mice and Slightly Impairs Pancreatic Cancer

To determine an appropriate drug dose for mice, we evaluated three strategies, 15 mg/kg CHC plus 125 mg/kg metformin (low dose), 60 mg/kg CHC plus 125 mg/kg metformin (moderate dose) and 240 mg/kg CHC plus 125 mg/kg metformin (high dose) using the 6606PDA syngeneic orthotopic pancreatic cancer model (Figure 2C). We observed that only few mice survived after treating them with high dose and moderate dose of therapeutics (Figure 2D). However, all mice survived in the low dose group (Figure 2D). In addition, treatment with 15 mg/kg CHC, 125 mg/kg metformin, and the combination of both drugs did not significantly increase the AST and ALT activity, two indicators of liver toxicity in blood plasma (Figure 2E and Figure S1A). These drugs also failed to significantly increase lipase activity, an indicator of inflammation in the pancreas (Figure S1B). Thus, we chose 15 mg/kg CHC to evaluate the benefit of CHC and metformin *in vivo*. We observed a minor decrease in tumor weight after treating mice with CHC or CHC plus metformin when compared to Sham-treated mice (Figure 2F). Interestingly, we also observed that CHC or CHC plus metformin therapy significantly increased the thickness of stroma as defined by collagen I deposition (Figures 3A–C). However, there was no significant difference between metformin treated and Sham-treated tumors. This suggest that CHC activates CAFs to produce more collagen. This observation triggered speculations that these CAFs can impair the anti-proliferation efficacy of CHC and metformin.

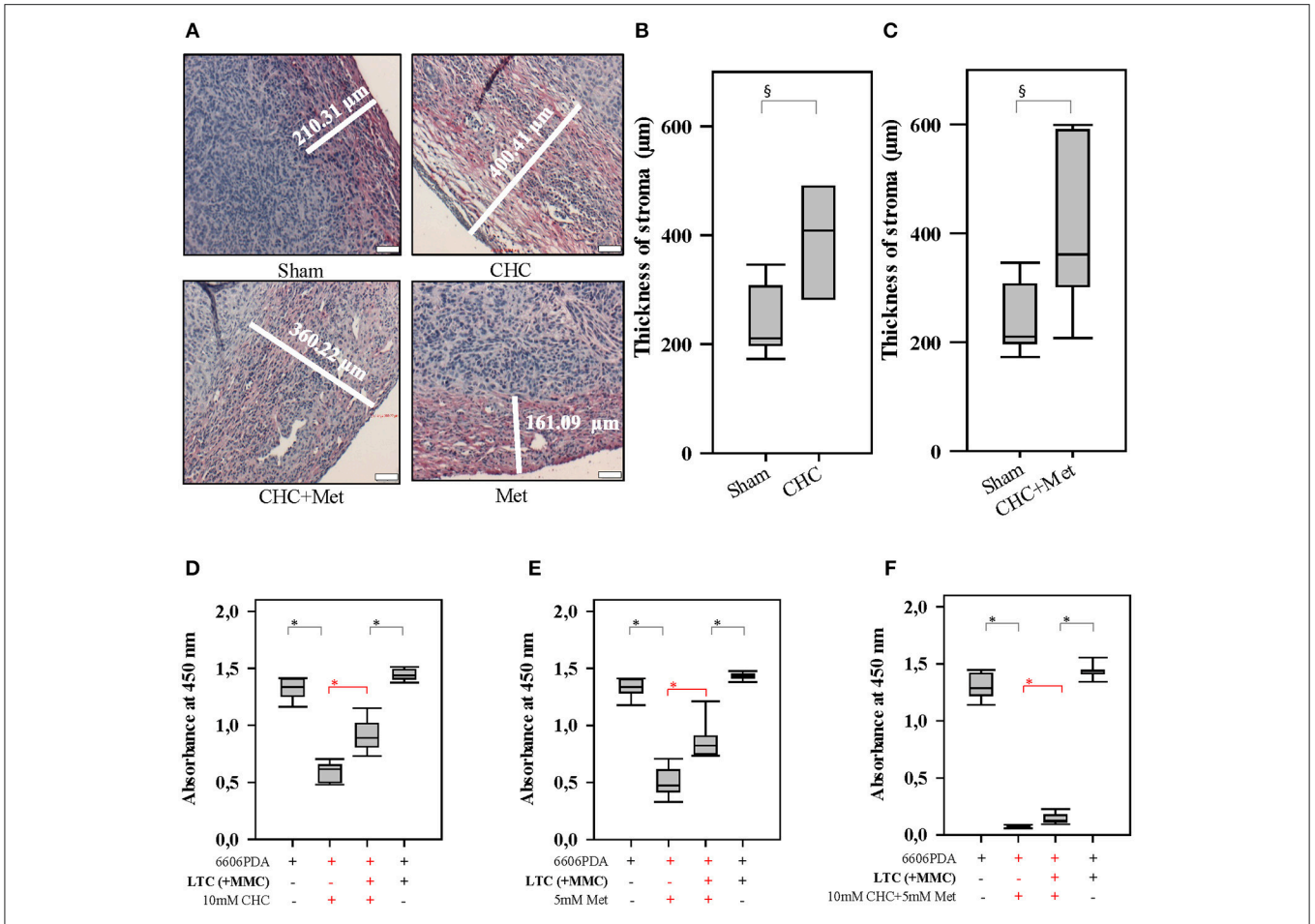
### Inhibition of Autophagy in CAFs Enhances the Efficacy of Chemotherapeutic Agents

In order to address the question, if CAFs are capable of impairing the anti-proliferation effect of chemotherapeutic agents, we pursued *in vitro* experiments. We co-cultured LTC cells and 6606PDA cells. Subsequently, these co-cultured cells were treated with CHC, metformin or a combinatorial treatment. We observed that LTC cells impaired the anti-proliferative effect of CHC, metformin, and CHC plus metformin without having a major influence on the proliferation of untreated cancer cells (significant difference is shown in red in Figures 3D–F). This suggests that LTC cells induce chemoresistance in pancreatic cancer cells. In order to evaluate if autophagy in CAFs contributes to the observed chemoresistance, we pretreated LTC cells with 50  $\mu\text{M}$  CQ, a well-known inhibitor of autophagy. Interestingly, after blocking autophagy in LTC cells, the co-cultured pancreatic cancer cells were more sensitive to CHC, metformin, and CHC plus metformin (significant difference is shown in red in Figure 4).

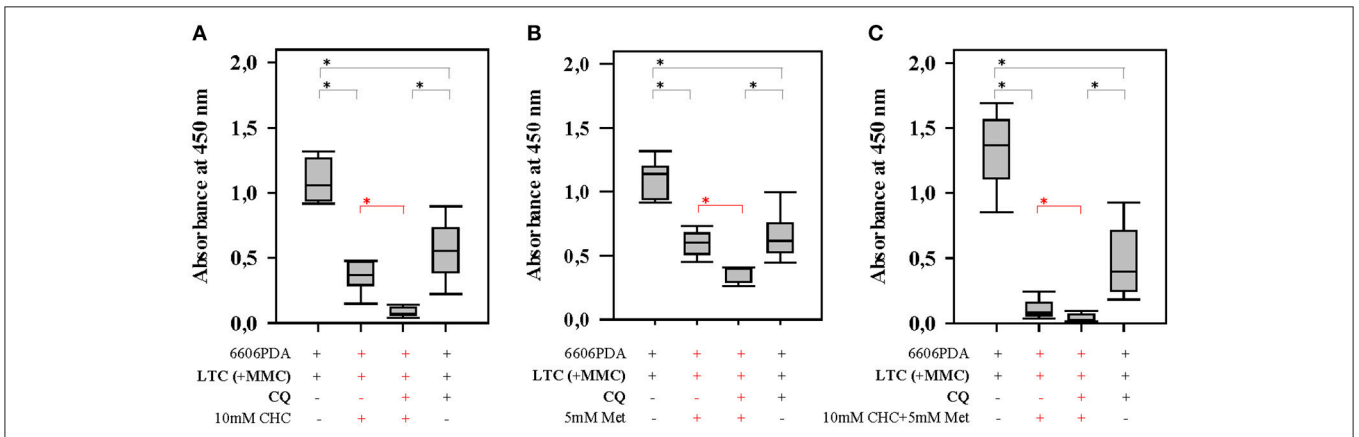


Next we verified, if inhibition of autophagy in CAFs also improved the efficacy of gemcitabine, a first-line therapy for the treatment of pancreatic cancer. When pancreatic cancer cells were co-cultured with LTC cells, we observed that LTC cells significantly reduced the anti-proliferative effect of gemcitabine in two distinct cell line, 6606PDA and MIA PaCa-2 (significant difference is shown in red in **Figures 5A,B**). However, LTC cells did not have a major influence on the proliferation of

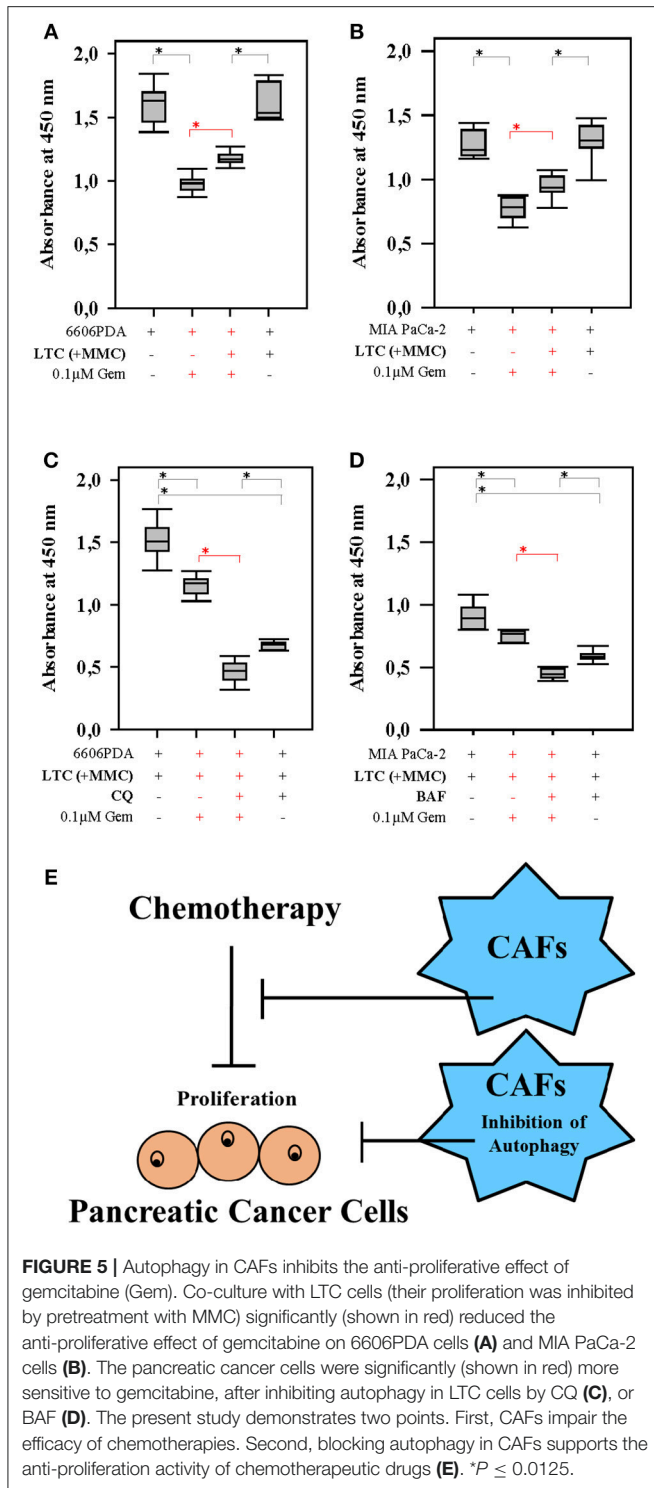
untreated cancer cells (**Figures 5A,B**). This suggests that LTC cells induce resistance to gemcitabine in pancreatic cancer cells. After blocking autophagy in LTC cells with CQ, the co-cultured pancreatic cancer cells were more sensitive to gemcitabine (significant difference is shown in red in **Figure 5C**). We confirmed this result by using another inhibitor of autophagy, BAF. Indeed, after blocking autophagy in LTC cells with BAF, the co-cultured pancreatic cancer cells were also more sensitive to



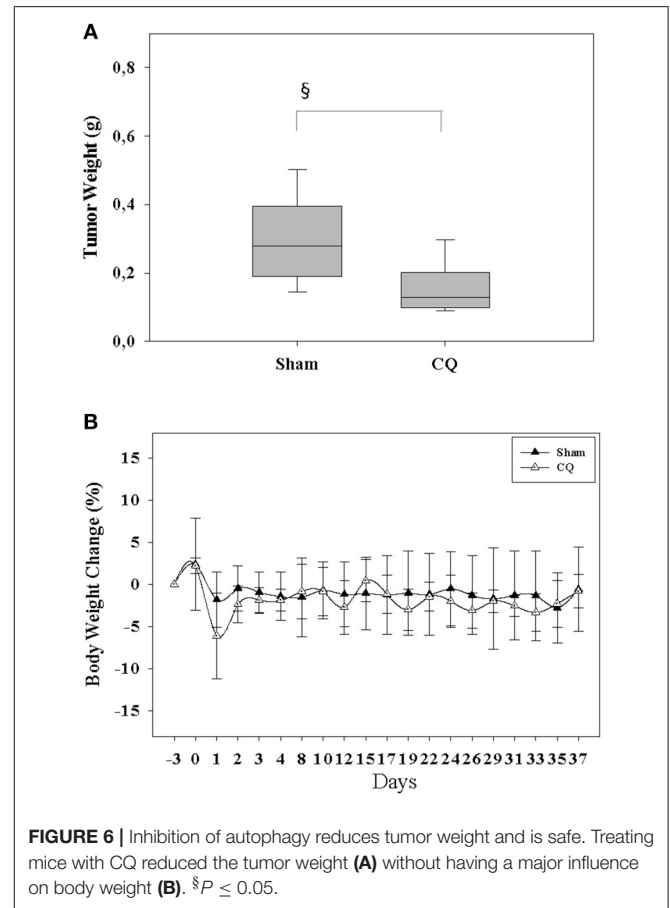
**FIGURE 3 |** Drugs influence the tumor stroma and CAFs influence the sensitivity to drugs. CHC and CHC plus metformin (Met) significantly induced the stromal reaction (collagen I deposition stained in red) when compared to Sham treatment (A–C). While CHC (D), metformin (E), or CHC plus metformin (F) treatment inhibited the proliferation of pancreatic cancer cells, the addition of LTC cells (their proliferation was inhibited by pretreatment with MMC) significantly (shown in red) reduced this anti-proliferative effect. § $P \leq 0.05$ , \* $P \leq 0.0125$ . Bar = 50  $\mu\text{m}$ .



**FIGURE 4 |** Autophagy in CAFs attenuates the anti-proliferation activity of CHC and metformin (Met). Blocking autophagy in LTC cells (their proliferation was inhibited by pretreatment with MMC) with CQ significantly (shown in red) increased the sensitivity of pancreatic cancer cells to CHC (A), metformin (B), or CHC plus metformin (C). \* $P \leq 0.0125$ .



gemcitabine (significant difference is shown in red in Figure 5D). These data suggests that we observe two distinct processes (Figure 5E). First, CAFs do not significantly stimulate the proliferation of carcinoma cells, but protect carcinoma cells from chemotherapeutic agents. A separate process is the inhibition

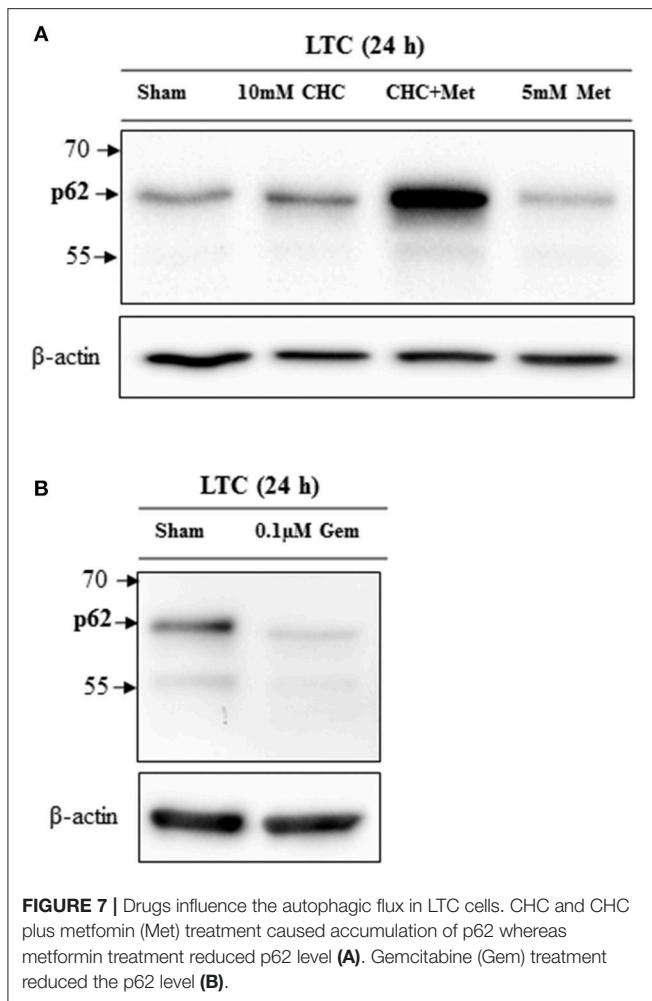


of autophagy. Blockage of autophagy in CAFs inhibits cancer cell proliferation.

We next assessed in an *in vivo* proof of principle experiment, if inhibition of autophagy is well-tolerated and can reduce tumor growth. We injected 6606PDA cells into the pancreas of mice and treated one cohort of mice with CQ. Therapy with CQ reduced the tumor weight significantly compared to Sham treated mice (Figure 6A), without causing any obvious burden to mice as demonstrated by little change in body weight throughout the experiment (Figure 6B).

### Chemotherapeutic Agents Modulate Autophagy

In order to assess, if chemotherapies have an influence on autophagy, we treated LTC cells with metformin, CHC, the combinational therapy or gemcitabine. Both, CHC and CHC plus metformin treatment increased the accumulation of p62 (Figure 7A). This suggests that these chemotherapies block the autophagy flux. However, we observed that metformin decreased the level of p62 (Figure 7A) and, therefore, induced the autophagy flux. In addition, we observed that gemcitabine decreased the accumulation of p62 in LTC cells (Figure 7B), which suggests that gemcitabine induces autophagy in these cells.



This proposes that distinct agents can have opposite effects on autophagy in CAFs.

## DISCUSSION

The present study demonstrates that CAFs protect carcinoma cells from chemotherapeutic agents. It is well-known that pancreatic cancer is usually surrounded by an extensive stromal reaction containing CAFs and that these CAFs can influence the sensitivity of carcinoma cells to chemotherapy (2, 20, 21). Originally, it was assumed that the stromal reaction forms a physical barrier to protect cancer cells from chemotherapeutics (22–25). Indeed, we also noticed, in our orthotopic cancer model, an intense barrier like stromal reaction (Figure 3A) and only moderate reduction of tumor weight in response to chemotherapies (Figure 2F). We observed that LTC cells inhibit the anti-proliferation activity of chemotherapeutic drugs *in vitro* (Figures 3D–F, 5A,B). This argues for an active function of CAFs in controlling chemoresistance of cancer cells.

In addition, the present study demonstrates that the blockage of autophagy in CAFs inhibits cancer cell proliferation. We

observed this inhibition of proliferation in the presence, but also in the absence of drugs such as CHC, metformin and gemcitabine (Figures 4, 5C,D). This suggests that this effect is very robust. Indeed, our data demonstrate that this anti-proliferative effect is also, for example, independent of the effect of chemotherapeutic drugs on autophagy. We and other studies suggest that metformin and gemcitabine induce autophagy (26, 27). Surprisingly, we also observed that other treatments such as CHC and CHC in combination with metformin block autophagic flux in CAFs. Nevertheless, our data demonstrate that blocking autophagic flux in CAFs inhibits proliferation of cancer cells, independent if these chemotherapeutic agents induce or inhibit autophagy. Possibly, the synergistic anti-proliferation effect of CQ and CHC treatment is caused by an additive effect of both drugs on the inhibition of autophagy. On the contrary, CQ enhances the anti-proliferation effect of metformin or gemcitabine by blocking their induction of autophagy. Moreover, we noticed that CQ can also inhibit directly cancer cell proliferation, even when cancer cells are not co-cultured with CAFs (data not shown). This suggests that the blockage of autophagy in both CAFs as well as cancer cells has the identical effect: The reduction of cancer cell proliferation. Both effects might reduce tumor size *in vivo* as demonstrated in Figure 6A.

Many preclinical studies demonstrated that the strategy to abolish stromal reaction could increase the sensitivity of cancer cells to several chemotherapeutics (4, 7, 28). Unfortunately, some of these strategies, such as using vismodegib (GDC-0449), failed to give rise to a survival benefit for pancreatic cancer patients in clinical trials (8). In addition, Özdemir et al. demonstrated that depletion of CAFs results in multiple adverse outcomes and leads to a poor prognosis *in vivo* (29). This suggests that blocking or reducing the stromal reaction to cancer might not be part of a successful anti-cancer therapy. We suggest that modifying specific interactions between CAFs and cancer cells, for example by inhibition of autophagy in CAFs, may be a more promising strategy to treat pancreatic cancer. The following two therapeutical options could be explored in additional studies: First, one could evaluate if there are beneficial effects when inhibiting autophagy in CAFs in addition to manipulating other mechanisms, which have also been demonstrated to regulate cancer cell proliferation, survival or drug resistance. A promising strategy could be to regulate the SDF1 alpha/CXCR4 axis or mTOR/4E-BP1 signaling in CAFs (6, 30, 31). Second, one could evaluate in which cancer types inhibition of autophagy in combination with the first-line therapeutics has a beneficial effect.

Blocking autophagy in fibroblast like cells might also have therapeutic potential in other diseases. Recent studies suggest that increased autophagy contributes to various diseases, such as liver fibrosis or rheumatoid arthritis (32, 33). However, the function of autophagy in these diseases is still highly controversial (34). Thus, additional studies will be necessary to understand the contributions of autophagy in fibroblast-rich diseases, in order to provide a basis for novel therapies.

In conclusion, the present study demonstrated that blocking autophagy in CAFs successfully supports the anti-proliferation

activity of three distinct drugs, CHC, metformin and gemcitabine, in pancreatic cancer cells.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DZ, BV, BK, and RJ: study concepts. XZ, DZ, and MS: study design; XZ, MS, DZ, JE, EW, SK, JS, and TL: data acquisition; XZ and DZ: quality control of data and algorithms; XZ and DZ: data analysis and interpretation; XZ: statistical analysis; XZ and DZ: manuscript preparation. All authors reviewed and edited the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dorothea Frenz, Eva Lorbeer-Rehfeldt, Maren Nerowski, and Berit Blendow (Institute for Experimental

Surgery, Rostock University Medical Center) for excellent technical assistance. XZ was supported by the China Scholarship Council (grant number: 201608080159). The study was supported by B. BRAUN-STIFTUNG (project BBST-D-15-00003) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG research group for 2591, grant number: 321137804, ZE 712/1-1, and VO 450/15-1).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00590/full#supplementary-material>

**Figure S1** | Drugs do not cause liver toxicity or inflammation in the pancreas. The monotherapies, CHC or metformin (Met), and the combinatorial therapy had only little influence on ALT activity (**A**) or lipase activity (**B**) in blood plasma of mice.

## REFERENCES

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *Cancer J Clin.* (2018) 68:7–30. doi: 10.3322/caac.21442
- Apte MV, Wilson JS, Lugea A, Pandolfi SJ. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology* (2013) 144:1210–9. doi: 10.1053/j.gastro.2012.11.037
- Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* (2008) 68:918–26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5714
- Miao L, Liu Q, Lin CM, Luo C, Wang Y, Liu L, et al. Targeting tumor-associated fibroblasts for therapeutic delivery in desmoplastic tumors. *Cancer Res.* (2017) 77:719–31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0866
- Carapuça EF, Gemenetzidis E, Feig C, Bapiro TE, Williams MD, Wilson AS, et al. Anti-stromal treatment together with chemotherapy targets multiple signalling pathways in pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol.* (2016) 239:286–96. doi: 10.1002/path.4727
- Duluc C, Moatassim-Billah S, Chalabi-Dchar M, Perraud A, Samain R, Breibach F, et al. Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO J.* (2015) 7:735–53. doi: 10.15252/emmm.201404346
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* (2009) 324:1457–61. doi: 10.1126/science.1171362
- Gu J, Saiyin H, Fu D, Li J. Stroma - A double-edged sword in pancreatic cancer: A lesson from targeting stroma in pancreatic cancer with Hedgehog signaling inhibitors. *Pancreas* (2018) 47:382–9. doi: 10.1097/MPA.0000000000001023
- Fiaschi T, Marini A, Giannoni E, Taddei ML, Gandellini P, De Donatis A, et al. Reciprocal metabolic reprogramming through lactate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay. *Cancer Res.* (2012) 72:5130–40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1949
- Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov.* (2012) 11:709–30. doi: 10.1038/nrd3802
- Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC, Der CJ. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem Sci.* (2014) 39:91–100. doi: 10.1016/j.tibs.2013.12.004
- Gukovsky I, Li N, Todoric J, Gukovskaya A, Karin M. Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* (2013) 144:1199–209 e4. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.007
- Sousa CM, Biancur DE, Wang X, Halbrook CJ, Sherman MH, Zhang L, et al. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* (2016) 536:479–83. doi: 10.1038/nature19084
- Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, et al. Autophagy is required for activation of pancreatic stellate cells, associated with pancreatic cancer progression and promotes growth of pancreatic tumors in mice. *Gastroenterology* (2017) 152:1492–506 e24. doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.010
- Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Howell A, Tykocinski ML, Nagajyothi F, Machado FS, et al. Energy transfer in “parasitic” cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles’ heel of tumor cells. *Cell Cycle* (2011) 10:4208–16. doi: 10.4161/cc.10.24.18487
- Jaster R, Lichte P, Fitzner B, Brock P, Glass A, Karopka T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med.* (2005) 9:670–82. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00497.x
- Sparmann G, Hohenadl C, Tornøe J, Jaster R, Fitzner B, Koczan D, et al. Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2004) 287: G211–9. doi: 10.1152/ajpgi.00347.2003
- Zechner D, Albert AC, Burtin F, Vollmar B. Metformin inhibits gemcitabine induced apoptosis in pancreatic cancer cell lines. *J Cancer* (2017) 8:1744–9. doi: 10.7150/jca.17972
- Zechner D, Radecke T, Amme J, Burtin F, Albert AC, Partecke LI, et al. Impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer. *BMC Cancer* (2015) 15:51. doi: 10.1186/s12885-015-1047-x
- Kharashvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int.* (2014) 14:41. doi: 10.1186/1475-2867-14-41
- Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World J Gastroenterol.* (2014) 20:11216–29. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11216
- Choi IK, Strauss R, Richter M, Yun CO, Lieber A. Strategies to increase drug penetration in solid tumors. *Front Oncol.* (2013) 3:193. doi: 10.3389/fonc.2013.00193
- Liang C, Shi S, Meng Q, Liang D, Ji S, Zhang B, et al. Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: where we are and where we are going. *Exp Mol Med.* (2017) 49:e406. doi: 10.1038/emmm.2017.255
- New J, Arnold L, Ananth M, Alvi S, Thornton M, Werner L, et al. Secretory autophagy in cancer-associated fibroblasts promotes head and neck cancer progression and offers a novel therapeutic target. *Cancer Res.* (2017) 77:6679–91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1077

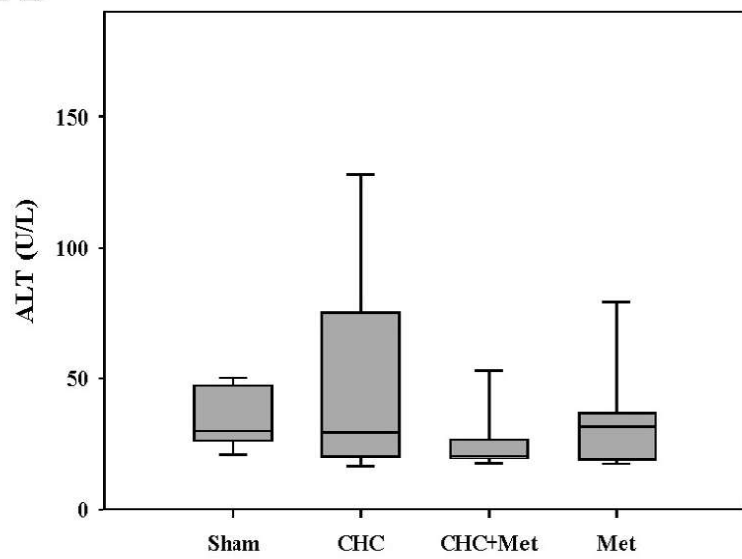
25. von Ahrens D, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol.* (2017) 10:76. doi: 10.1186/s13045-017-0448-5
26. Ling S, Song L, Fan N, Feng T, Liu L, Yang X, et al. Combination of metformin and sorafenib suppresses proliferation and induces autophagy of hepatocellular carcinoma via targeting the mTOR pathway. *Int J Oncol.* (2017) 50:297–309. doi: 10.3892/ijo.2016.3799
27. Hashimoto D, Blauer M, Hirota M, Ikonen NH, Sand J, Laukkanen J. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *Eur J Cancer* (2014) 50:1382–90. doi: 10.1016/j.ejca.2014.01.011
28. Hessmann E, Patzak MS, Klein L, Chen N, Kari V, Ramu I, et al. Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* (2018) 67:497–507. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311954
29. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell.* (2014) 25:719–34. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.005
30. Zhang H, Wu H, Guan J, Wang L, Ren X, Shi X, et al. Paracrine SDF-1 $\alpha$  signaling mediates the effects of PSCs on GEM chemoresistance through an IL-6 autocrine loop in pancreatic cancer cells. *Oncotarget* (2015) 6:3085–97. doi: 10.18632/oncotarget.3099
31. Long KB, Tooker G, Tooker E, Luque SL, Lee JW, Pan X, et al. IL6 receptor blockade enhances chemotherapy efficacy in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* (2017) 16:1898–908. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0899
32. Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* (2012) 142:938–46. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.044
33. Shin YJ, Han SH, Kim DS, Lee GH, Yoo WH, Kang YM, et al. Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress. *Arthritis Res Ther.* (2010) 12:R19. doi: 10.1186/ar2921
34. Del Principe D, Lista P, Malorni W, Giammarioli AM. Fibroblast autophagy in fibrotic disorders. *J Pathol.* (2013) 229:208–20. doi: 10.1002/path.4115

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

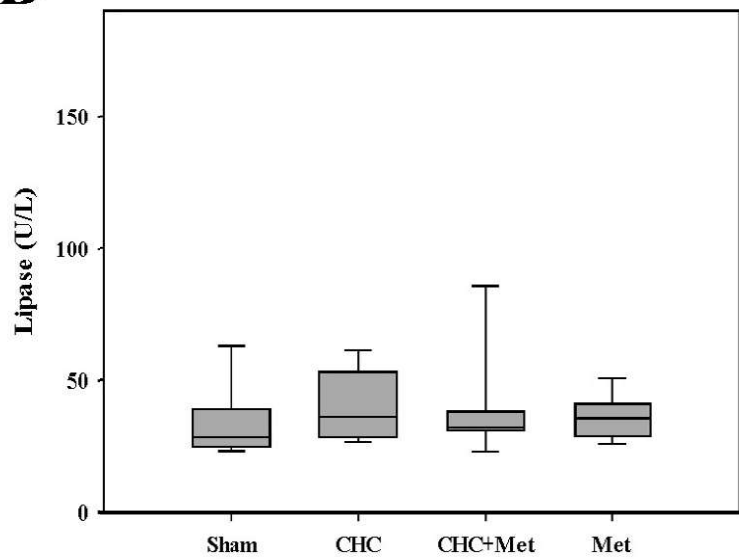
Copyright © 2018 Zhang, Schönrogge, Eichberg, Wendt, Kumstel, Stenzel, Lindner, Jaster, Krause, Vollmar and Zechner. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Figure S1.**

**A**



**B**






## ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES

Special Issue: Annals Reports

ORIGINAL ARTICLE

# Grading animal distress and side effects of therapies

Simone Kumstel,<sup>1</sup>  Edgar H. U. Wendt,<sup>1</sup> Johanna Eichberg,<sup>1</sup> Steven R. Talbot,<sup>2</sup> Christine Häger,<sup>2</sup> Xianbin Zhang,<sup>1</sup> Ahmed Abdelrahman,<sup>1</sup> Maria Schönrogge,<sup>1</sup> Rupert Palme,<sup>3</sup> André Bleich,<sup>2</sup> Brigitte Vollmar,<sup>1</sup> and Dietmar Zechner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rudolf-Zenker Institute of Experimental Surgery, University Medical Center, Rostock, Germany. <sup>2</sup>Institute for Laboratory Animal Science, Hannover Medical School, Hanover, Germany. <sup>3</sup>Unit of Physiology, Pathophysiology and Experimental Endocrinology, Department of Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

Address for correspondence: Simone Kumstel, Rudolf-Zenker Institute of Experimental Surgery, University Medical Center, Schillingallee 69a, 18057 Rostock, Germany. simone.kumstel@uni-rostock.de

In order to combine high-quality research with minimal harm to animals, a prospective severity assessment for animal experiments is legally required in many countries. In addition, an assessment of the evidence-based severity level might allow realistic harm–benefit analysis and the appraisal of refinement methods. However, only a few examples describe the distress of animals by simple, cost-efficient, and noninvasive methods. We, therefore, evaluated the severity of an orthotopic mouse model for pancreatic cancer using C57BL/6J mice when pursuing two different chemotherapies. We assessed fecal corticosterone metabolites, body weight, distress score, and burrowing, as well as nesting activity. Moreover, we established a multifactorial model using multivariate logistic regression to describe animal distress. This multifactorial analysis revealed that metformin + galloflavin treatment caused higher distress than metformin +  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate therapy. Similar results were obtained by using the best cutoff calculated by Youden's *J* index when using only single parameters, such as burrowing activity or fecal corticosterone metabolite concentration. Thus, the present study revealed that single readout parameters, as well as multivariate analysis, can help to assess the severity of animal experiments and detect side effects of therapies.

**Keywords:** distress analysis; severity assessment; pancreatic cancer; chemotherapy

## Introduction

Animal welfare must be considered as an important aspect of biomedical research, because of its implications on moral issues and the quality of science.<sup>1</sup> In order to combine a high quality of research with minimal harm to animals, multiple regulations have been implemented in many countries during the last decades. When planning *in vivo* experiments, scientists should consider the 3R concept (replacement, reduction, and refinement) and conduct an extensive harm–benefit analysis based on the severity of an animal model.<sup>2</sup> Some prospective severity classifications of specific interventions are defined in the European Union (EU) Directive 2010/63/EU in annex VIII. This annex describes certain procedures, which can be classified as “nonrecovery,” “mild,” “moderate,” or “severe.” In addition, some

EU guidance documents provide suggestions on how to meet legal requirements<sup>3</sup> of this directive. However, the annex VIII only provides a few examples for severity classification, and mostly lists procedural steps, rather than full procedures or the distress of entire disease models.<sup>4</sup> Moreover, only a few publications give some additional examples<sup>5</sup> for assessing the severity of animal experiments. Therefore, it is necessary to implement methods, which allow us to define the level of distress caused by widely used interventions and specific animal experiments.<sup>5,6</sup> An evidence-based evaluation will allow a realistic harm–benefit analysis and the use of appropriate refinement methods, which might lead to a sustainable reduction of animal suffering.<sup>6</sup>

The hypothetical ideal level of welfare might be accomplished when the nutritional, environmental, health, behavioral, and mental needs of laboratory

doi: 10.1111/nyas.14338

Ann. N.Y. Acad. Sci. xxxx (2020) 1–15 © 2020 The Authors. *Annals of the New York Academy of Sciences* published by Wiley Periodicals LLC. on behalf of New York Academy of Sciences.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

animals are met.<sup>7</sup> However, different stressors or interventions, such as handling, surgery, or injections, might provoke short time stress responses or even distress when an animal is unable to cope with a stressor within a distinct period of time.<sup>8</sup> Distress can be caused by pain, but it can also be caused, for example, by anxiety. Therefore, it has been suggested that minimizing distress will be more important for improving the welfare of animals than only focusing on pain reduction. In this context, distress refers to any mental unpleasant level of stress without differentiating between distinct causes. To reliably detect any deviation of the ideal state of welfare, which might lead to distress, the British Working Group on Refinement suggested to analyze parameters, which describe the physical, physiological, and psychological states of the animals.<sup>6</sup>

The physical state of animals can be described by parameters, such as body weight (BW) and posture, as well as the physiological state, such as heart rate or stress hormones.<sup>6</sup> In addition, distress can influence their natural behavior. The latter can be quantitatively assessed by the analysis of burrowing and nesting activity,<sup>9–11</sup> whereas the physiological stress response of animals is often characterized by analyzing the corticosterone concentration in the blood or its metabolites in feces (fecal corticosterone metabolites (FCMs)).<sup>12–15</sup>

The aim of our current study was to evaluate a method for multifactorial distress analysis. A variety of physical, behavioral, and hormonal parameters for animal welfare were assessed in male C57BL/6J mice bearing pancreatic cancer (PC) and undergoing two distinct chemotherapies. The application of the most powerful parameters in a 2D scatter plot followed by multivariate logistic regression was used as a multifactorial model. This method was further compared with the performance of single parameters in order to evaluate and score animal distress.

## Materials and methods

### *Ethical statement*

All animal experiments were approved by the German local authority: Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (7221.3-1-019/15), in accordance with the German animal protection law and the EU Guideline 2010/63/EU.<sup>4</sup> The experiments are reported according to the Arrive

Guidelines.<sup>16</sup> Breeding pairs of C57BL/6J mice were originally purchased from Charles River Laboratories and further bred in our facility of the University Medical Center in Rostock under specific pathogen-free conditions. During the experiment, the mice were kept single-housed in type III cages (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Germany) at 12-h dark:light cycle, the temperature of  $21 \pm 2$  °C, and relative humidity of  $60 \pm 20\%$  with food (pellets, 10 mm, ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) and tap water ad libitum; and enrichment was provided by nesting material (shredded tissue paper, Verbandmittel GmbH, Frankenberg, Deutschland), paper roll (75 × 38 mm, H 0528–151, ssniff-Spezialdiäten GmbH), and a wooden stick (40 × 16 × 10 mm, Abedd, Vienna, Austria).

### *Syngeneic orthotopic PC model*

For orthotopic injection of PC cells, 26 male C57BL/6J mice aged 16.7 (14–18.4) weeks (median/interquartile range) and with an average BW of 27 (25.3–27.7) g (median/interquartile range) were anesthetized in the laboratory with 1.2–2.0% isoflurane and a single subcutaneous injection of 5 mg/kg carprofen (Rimadyl<sup>®</sup>, Pfizer GmbH, Berlin, Germany) was applied 5 min before surgery as analgesia. Isoflurane was chosen because it allowed a fast recovery from anesthesia. The eyes were kept wet by eye ointment. The abdomen of the mice was shaven and disinfected, and the abdominal cavity was opened by laparotomy, and 5 µL of the cell suspension (murine cell line 6606PDA,  $2.5 \times 10^5/5$  µL cells in matrigel) was injected slowly with a 25-µL syringe (Hamilton Syringe, Reno, NV) into the pancreas. The pancreas was placed back into the cavity and the peritoneum was closed by a coated 5-0 Vicryl<sup>®</sup> suture (Johnson & Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ). The skin was sewn with a 5-0 Prolene<sup>®</sup> suture (Johnson & Johnson Medical GmbH) and the mice were placed in front of a heating lamp. The surgery lasted for 15–20 min for each mouse. The chemotherapeutic treatment of the mice started 4 days after tumor cell injection until day 37. Twenty-six mice were allocated in a nonrandom manner, matching the performance of the preexperimental behavior tests (burrowing and nesting) between the sham and treatment groups. Seven mice aged 18.3 (18.3–21.3) weeks (median/interquartile range) and with a BW of 27 (26.3–27.7) g (median/interquartile

range) received the combinatorial chemotherapy of metformin (Met; 125 mg/kg in phosphate-buffered saline (PBS), daily; Merck, Darmstadt, Germany) and CHC (15 mg/kg in 50% dimethyl sulfoxide (DMSO), daily; Tocris Bioscience, Bristol, UK). The corresponding sham treatment (PBS, 50% DMSO) was performed on an additional seven mice, which were 18.3 (18.3–21.4) weeks old (median/interquartile range) and weighed 28 (27.5–28.5) g (median/interquartile range). The second therapeutic intervention Met (125 mg/kg in PBS; daily) in combination with galloflavin (Gallo) (20 mg/kg in 100% DMSO, three times a week; Tocris Bioscience) was performed on seven mice of an average age of 13.6 (13.4–14.0) (median/interquartile range) and the initial BW of 25 (23.1–26.3) g (median/interquartile range), and five mice of an exact age of 14 weeks and the average BW of 26 (24.4–26.4) g (median/interquartile range) were treated with the respective vehicle (PBS, 100% DMSO). The unequal group size was caused by the termination of the project because the original goal to see an effect on tumor weight was not met. An overview of the number of animals used for each figure is illustrated in Figure S1 (online only). One scientist administered the therapy and another scientist evaluated the distress in a nonblinded fashion. Met and PBS were injected in the morning between 9:00 and 11:00 a.m., while Gallo, CHC, or the corresponding vehicle (100% DMSO, 50%) were injected between 2:30 and 3:00 p.m. In addition to the single intraoperative injection of carprofen (5 mg/kg), 1250 mg/L metamizol (Ratiopharm, Ulm, Germany) was provided daily in the drinking water during the whole experimental period. This multimodal analgesia regime proved to be useful for this animal model in previous studies.<sup>17,18</sup> The benefit of metamizol is that it is self-applicable via drinking water, and it is known to be an effective analgesic for gastrointestinal diseases in mice.<sup>19</sup>

### Assessment of distress parameters

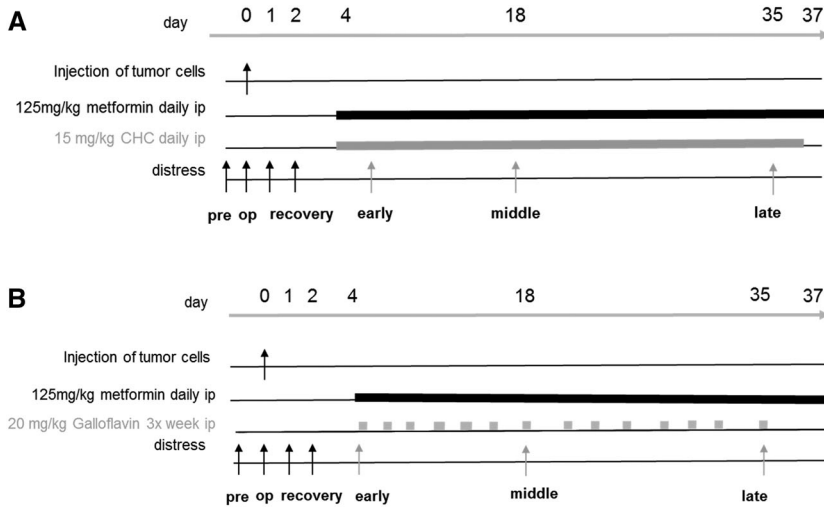
To analyze animal distress upon laparotomy and tumor cell injection, all distress parameters were assessed before (pre) and directly after operation (op) until recovery day 2. During chemotherapy, all distress parameters were quantified during the early (days 4–8), middle (days 18–19), and late (days 34–35) phases of therapy, to exemplarily analyze the course of distress during the treatments

(Fig. 1). This time schedule proved to be useful for various projects, for example, for comparing distress between different animal models.<sup>18</sup>

The BW was determined 24 h after surgery or last injection of therapeutic intervention in order to allow enough time for a BW adjustment. The percentage of BW change for all days was always calculated referring to the BW measured before surgery. The distress score was always assessed according to a scoresheet, which was previously published by our working group<sup>20,21</sup> and based on other scoresheets.<sup>22,23</sup> The mice were, therefore, observed in their home cage for a few minutes and a score was assessed when one or more defined criteria were diagnosed concerning the general condition, spontaneous behavior, flight behavior, or process-specific criteria. The distress score was assessed 30 min after the last injection of compounds (Gallo, CHC, or the appropriate vehicle) around 3:00–3:30 p.m.

The burrowing behavior was analyzed according to Deacon *et al.*, a burrowing tube (15 × 0.03 × 6.5 cm) was filled with 200-g food pellets (ssniff-Spezialdiäten GmbH) and was placed in the cage 2.5–3 h before the dark phase and 1–1.5 h after the last injection of the chemotherapeutics (Gallo, CHC, or the appropriate vehicle) at 4:00–4:30 p.m. in the animal facility.<sup>24,25</sup> After 2 h, the amount of pellets displaced from the tube was calculated. Animals, which burrowed less than 100-g pellets during the preexperimental phase, were excluded from further analysis (20.8% of the animals). To analyze the nesting behavior, a nestlet was supplied for each mouse 1–2 h before the dark phase (6:00–6:30 p.m.) (5-cm square of pressed cotton batting, ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Germany) and on the next day (9:00–11:00 a.m.), the score of the nest was assessed similar to a point scale from Deacon.<sup>24</sup> In addition to 1–5 points from Deacon, we scored 6 points for a perfect nest (>90% is torn) that looks like a crater and more than 90% of the circumference of the nest wall is higher than the body height of the mouse. At the beginning of the experiment, both behavior assays were performed two times in group housing, since it was suggested that mice can learn from each other.<sup>24</sup> After the learning period during the whole experiment, all the animals were housed individually.

The concentrations of corticosterone were measured in blood plasma and its metabolites in feces



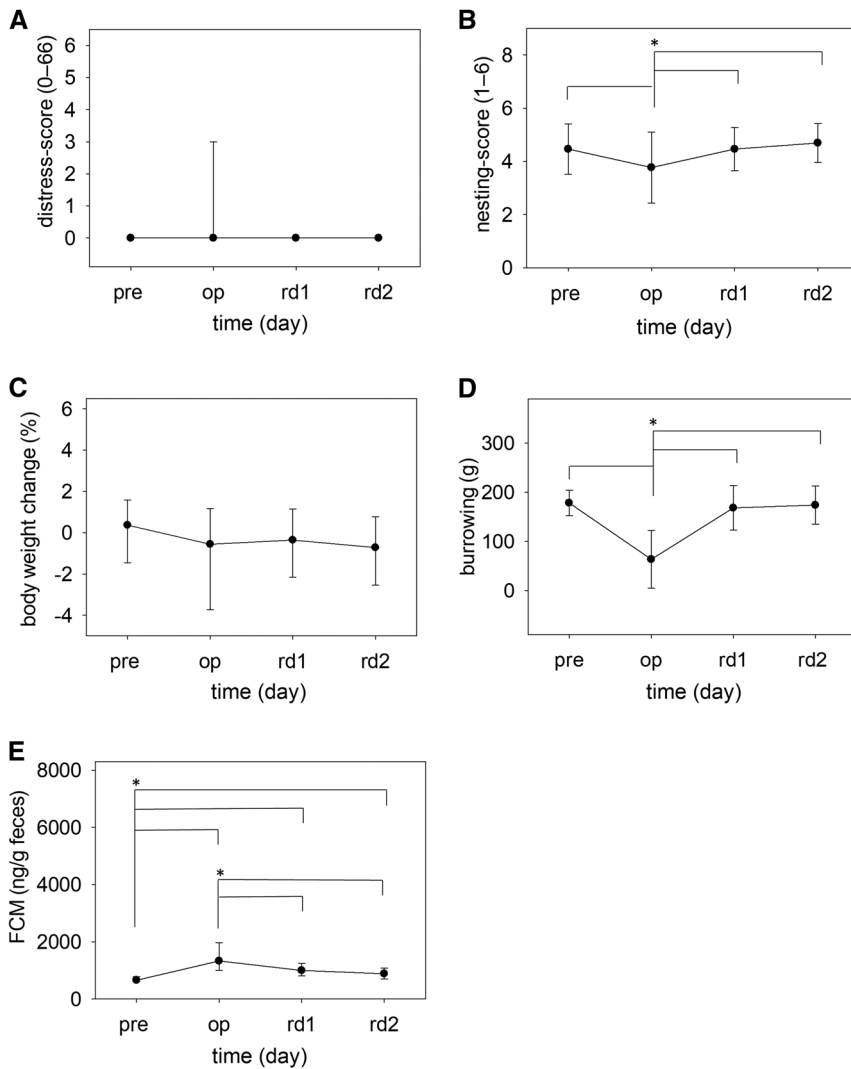
**Figure 1.** Experimental procedure for the pancreatic carcinoma model. Laparotomy was executed, and tumor cells were injected into the murine pancreas on day 0. After a few recovery days, the chemotherapeutic treatments were conducted from day 4 until day 37. Met (125 mg/kg) and CHC (15 mg/kg) were i.p. injected daily (A), while Gallo (20 mg/kg) was i.p. injected three times a week (B). All distress parameters were assessed before (pre) and directly after operation (op) until recovery day 2. During chemotherapy, all parameters were quantified during the early, middle, and late phase of the therapy.

(FCMs). Feces (200–400 mg) were collected from home cages 24 h after intervention, dried for 4 h at 65 °C, and stored at –20 °C. Afterward, 50 mg of the dry feces was extracted with 1 mL 80% methanol for subsequent analysis using a 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,21-triol-20-one enzyme immunoassay.<sup>13,14</sup> For the quantification of corticosterone in blood plasma, we used an additional 10 mice because the blood sampling procedure leads to a stress response<sup>26</sup> and might influence burrowing and nesting activity, as well as FCM concentrations. Six mice of an average age of 16.7 (16.1–17.3) weeks (median/interquartile range) and the average BW of 28.2 (25–30) g (median/interquartile range) received Met + Gallo treatment and four mice of a mean age of 17.4 (14.5–17.6) weeks (median/interquartile range) and an average weight of 26.2 (24.9–28) g (median/interquartile range) were treated with the corresponding sham intervention. Blood was collected 30 min after chemotherapy by a retro-orbital puncture after 2–3 min anesthesia with isoflurane (5%). The fast sampling via isoflurane within 3 min is mandatory to exclude an influence of the sampling method to the corticosterone level.<sup>26,27</sup> The blood samples were centrifuged (1200  $\times$  g for 10 min) and plasma was stored at –20 °C. Plasma corticosterone concentrations were measured using an ELISA-Kit (DEV

9922, Demeditec Diagnostics GmbH, Erfurt, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### Data analysis

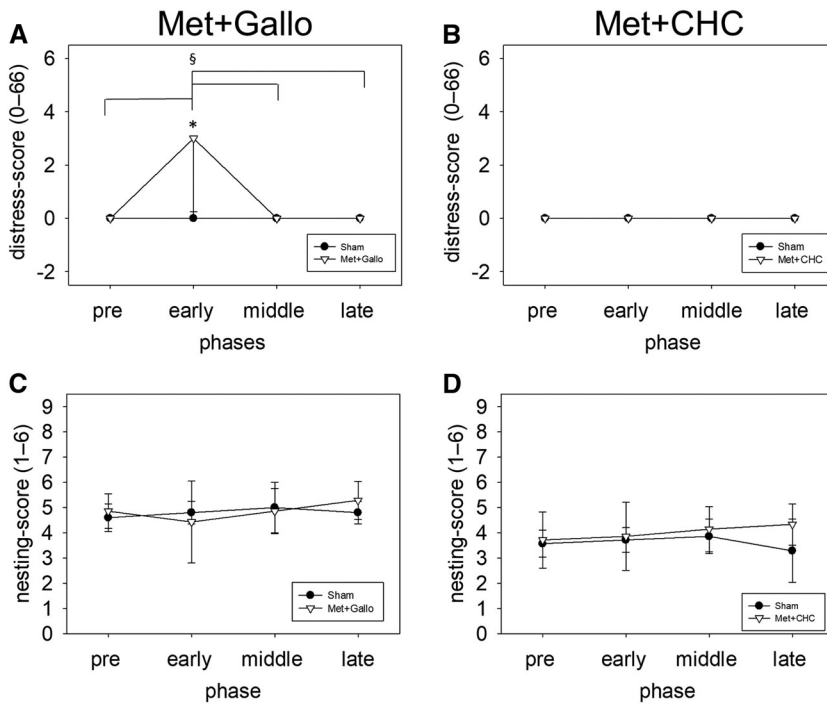
Data for Figures 2–4 are presented in the form of a line graph revealing the mean value  $\pm$  standard deviation for parametric data with equal variance and median  $\pm$  interquartile range for nonparametric data. For statistical evaluation, the data were analyzed with the SigmaPlot<sup>®</sup> 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA) program. The characteristics of data were assessed by the Shapiro–Wilk and Levene median equal variance tests. All post-hoc tests were performed as suggested by this software. In the case of parametric data, significances of differences during the perioperative phase were evaluated by a one-way repeated-measures ANOVA, with pairwise comparison by the Holm–Sidak method. In the case of nonparametric data, differences were analyzed by ANOVA on ranks (the Kruskal–Wallis test), followed by the Student–Newman–Keuls method. Significances of differences during the therapy phases were analyzed by a two-way repeated-measures ANOVA (treatment and phase), with pairwise comparison by the Holm–Sidak method. Differences with  $P \leq 0.05$  were considered to be significant.



**Figure 2.** Animal distress after laparotomy and tumor cell injection. Distress score (A), nesting behavior (B), percentage of BW change (C), burrowing behavior (D), and FCMs (E) were evaluated before any intervention (pre), after operation (op), and during recovery (recovery days: rd1 and rd2). Parametric data with equal variance are described as the mean  $\pm$  standard deviation, and significances were determined by a one-way repeated-measures ANOVA, followed by pairwise comparison with a Tukey test (B, D, and E). Nonparametric data are represented as the median  $\pm$  interquartile range and were analyzed with a repeated-measures ANOVA on ranks (Kruskal–Wallis test), followed by the Student–Newman–Keuls method (A and C): \* $P \leq 0.05$ . (A, B, C, D, and E;  $n = 26$ ).

To compare the performance of each parameter for distress quantification, receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed. The data of all animals before and on the day of surgical intervention were used for distress prediction and the area under the ROC curve (AUC), the 95% confidence intervals (CIs), and the  $P$  value were calculated for each parameter. ROC curves are able

to graph the sensitivity of a diagnostic test.<sup>28</sup> The AUC of 1.0 means that the parameter is perfect to discriminate between the animals before and after operation, whereas a value of 0.5 indicates no discriminative power for this parameter. To analyze the AUC of the combination of all three parameters, the data sets were combined by multiple logistic regression model and the ROC curves were calculated



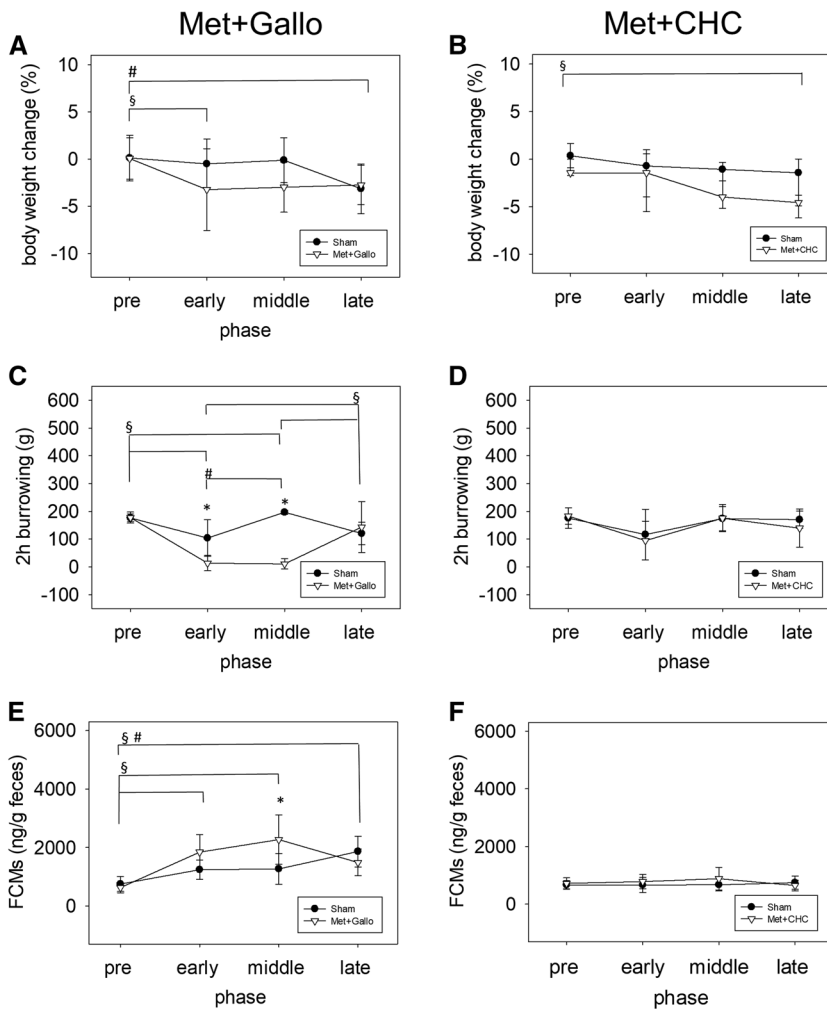
**Figure 3.** Animal distress during distinct chemotherapeutic treatments. The distress score was determined at the indicated phases after Met + Gallo treatment (A) or Met + CHC therapy (B), and compared with the distress score after injection of the appropriate vehicle (sham). Nesting behavior was evaluated after injection of the appropriate vehicle or after treatment with Met + Gallo (C) or Met + CHC (D). Nonparametric data are described as the median  $\pm$  interquartile range (A and B), and parametric data with equal variance are represented as the mean  $\pm$  SD (C and D). Significances were determined by a two-way repeated-measures ANOVA with pairwise comparison by the Holm–Sidak method: \* $P < 0.05$ , sham versus treatment groups; § $P < 0.05$ , phase versus phase within treatment groups (A + C: sham  $n = 5$ , and Met + Gallo,  $n = 7$ ; B + D: sham,  $n = 7$ , and Met + CHC,  $n = 7$ ).

afterward. The best cutoff for the single parameters, such as BW change, burrowing, and FCMs, was calculated by Youden's  $J$  index, and the data points during the therapy phases were distributed to distress levels 1 and 2, according to the cutoff values.

#### Multivariate model by logistic regression

Data collected from animals before (pre) and directly after surgery (op) ( $n = 26$ ; 52 data point in total) were used as a training data set. The data table consisted of two independent variables (burrowing and FCMs) and the status of each data point (pre or postop) as the dependent variable. Both independent variables were tested for normality (the Shapiro–Wilk test), as well as multivariate normality (the Shapiro–Wilk multivariate normality test<sup>29</sup>) and in both cases, the tests failed to reject the null hypothesis for normality. Therefore, (multivariate)

logistic regression was used to fit the basic binomial model for the classification of sample states (pre/op, meaning severity level 1/2) in R.<sup>30</sup> Using the coefficients from the fit, the discriminator (line) was plotted into the two-dimensional space of the training data (variables  $x = \text{FCMs}$  and  $y = \text{burrowing}$ ). The classification threshold for predictions was optimized using ROC analysis (cutoff at the combined sensitivity/specificity maximum).<sup>30</sup> The resulting threshold was then used in the subsequent predictions for both the training and test data to assess the model's performance and classification success. All data collected during the distinct therapy phases (early, middle, and late) were pooled as test data sets for each treatment (Met + Gallo,  $n = 7$ , 21 data points, or Met +  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate (Met + CHC)  $n = 7$ , 21 data points). Finally, these two categories of treatments were classified separately into either state (level 1 or 2).



**Figure 4.** Analysis of sensitive distress parameters during distinct chemotherapeutic treatments. The percentage of BW change was analyzed after injection of Met + Gallo (A), Met + CHC (B), or the corresponding vehicle solutions (sham) during the indicated therapy phases. Burrowing behavior was quantified after Met + Gallo (C), Met + CHC (D), or sham treatment. FCM concentrations were analyzed after treatment with Met + Gallo (E), Met + CHC, or an appropriate vehicle (F). Parametric data with equal variance are described as the mean  $\pm$  SD (A, C, D, E, and F), and nonparametric are illustrated as the median  $\pm$  interquartile range (B). Significances were determined by a two-way repeated-measures ANOVA with pairwise comparisons by the Holm–Sidak method: \* $P \leq 0.05$ , sham versus treatment groups; § $P \leq 0.05$ , phase versus phase within treatment group; # $P \leq 0.05$ , phase versus phase within sham groups; (A, C, and E: sham,  $n = 5$ , and Met + Gallo,  $n = 7$ ; B, D, and F: sham,  $n = 7$ , and Met + CHC,  $n = 7$ ).

## Results

### *The distress of laparotomy and tumor cell injection*

For the evaluation of animal distress after laparotomy and tumor cell injection, all distress parameters were assessed before and directly after operation, and on recovery days 1 and 2 (Fig. 1). The distress score was slightly increased when assessed

30 min after operation owing to the fact that 42% of mice displayed an abnormal posture by a slightly curved position (score 3<sup>20,21</sup>). However, the mice recovered within 1 day (Fig. 2A). The nesting behavior was reduced significantly after surgery, followed by a fast recovery (Fig. 2B). We noticed a slightly nonsignificant reduction in BW after operation until recovery day 2 (Fig. 2C). The burrowing behavior was reduced significantly

after surgery but recovered within 1 day (Fig. 2D). We also observed a significant increase in FCM concentration after operation until recovery day 2 (Fig. 2E). When adding 40 more mice from other studies to assess distress score and BW change, a significant change after surgery can be observed for all distress parameters (Fig. S2, online only).

### *Distress during chemotherapeutic interventions*

We evaluated the distress of two distinct chemotherapies, by treating mice either with (Met + Gallo) or (Met + CHC). These chemotherapeutic agents are reported to inhibit the metabolism of carcinoma cells.<sup>31–33</sup>

The distress score after Met + Gallo treatment was significantly increased during the early phase of therapy, reflected by a score of 3 (abnormal posture,<sup>20,21</sup> caused by stretching of the hind legs) in 57.1% of the mice. These symptoms were neither detectable in sham (Fig. 3A), nor in Met + CHC-treated mice (Fig. 3B). Mice of both combinatorial treatments constructed nearly perfect nests during the chemotherapeutic treatment, as given by a constant nesting score of 4 to 5 (Fig. 3C and D).

We observed a significant reduction in BW during the early therapy phase after Met + Gallo treatment, compared with the prevalues, while sham animals displayed only a significant BW reduction at the late phase of therapeutic intervention (Fig. 4A). After Met + CHC treatment, a significant BW loss was detected at the late therapy phase (Fig. 4B).

Burrowing behavior was significantly reduced after Met + Gallo treatment at the early and middle phases of therapeutic intervention (Fig. 4C). By contrast, after Met + CHC and its corresponding sham treatment, no significant reduction in burrowing behavior was observed throughout the entire therapy period (Fig. 4D).

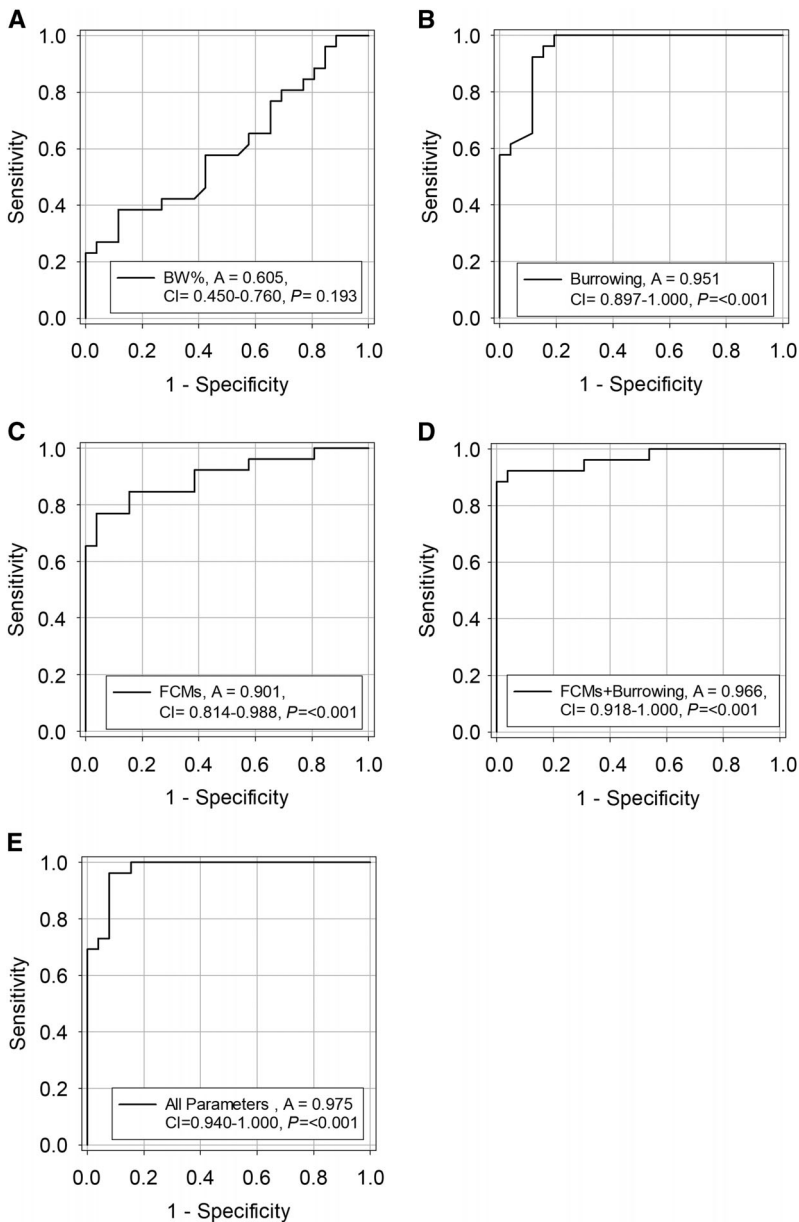
After Met + Gallo treatment, FCM concentrations were increased throughout the therapy period, while sham-treated mice showed only a significant rise in corticosterone metabolites at the late phase of therapy (Fig. 4E). At the middle phase of therapy, significantly higher FCM concentrations were evaluated after Met + Gallo, compared with the sham group (Fig. 4E). We wanted to verify these data and assessed, therefore, the plasma corticosterone concentration on 10 additional mice. These results also indicated significant higher corticosterone

concentrations during the middle therapy phase (Fig. S3, online only). In contrast to Met + Gallo, the treatment with Met + CHC caused no increase in FCMs (Fig. 4F). In summary, Met + Gallo treatment seems to cause more distress to mice when compared with Met + CHC therapy. Especially, the parameters BW change, burrowing behavior, and FCMs proved to be sensitive for distress assessment after chemotherapy, owing to significant alterations in the therapy phases (Fig. 4A–F). However, few significant changes were observed in the assessment of distress–score and nesting behavior after both combinatorial treatments (Fig. 3). Therefore, we excluded these parameters when classifying distress during these chemotherapies.

### *Classification of distress during chemotherapies*

In order to pursue a multifactorial distress analysis, we first evaluated the performance of BW change, burrowing behavior, and FCM concentration, when differentiating between distress measured before and after surgical intervention. For this purpose, we used ROC curve analysis. While the percentage of BW change displayed a low discriminative power ( $A = 0.605$ , 95% CI: 0.450–0.760) to differentiate between pre- and postoperative data, burrowing behavior ( $A = 0.951$ , 95% CI: 0.897 to –1.000) and FCMs ( $A = 0.901$ , 95% CI: 0.814–0.988) proved to be significantly (due to nonoverlapping CIs) better readout parameters (Fig. 5A–C). However, the combination of burrowing behavior and FCMs ( $A = 0.966$ , 95% CI: 0.918–1.000), as well as the combination of all three distress parameters ( $A = 0.975$ , 95% CI: 0.940–1.000), had the highest performance as indicated by the AUC (Fig. 5D and E).

With the goal to combine the most efficient readout parameters in a multifactorial distress analysis and to classify distinct severity levels, we generated a training model. Thus, the values of burrowing behavior and FCM concentrations were plotted for each animal before (pre) and after surgical intervention (op) in a 2D scatter diagram (Fig. 6A). Multivariate logistic regression separated two clusters by defining a discriminator (intercept ( $\beta_0$ ) = –1.6368,  $P = 0.5259$ , burrowing ( $\beta_1$ ) = 0.0467,  $P = 0.0067$ ; FCMs ( $\beta_2$ ) = –0.00572,  $P = 0.0312$ ). The cluster, which included 96% data points of animals before any interventions, was

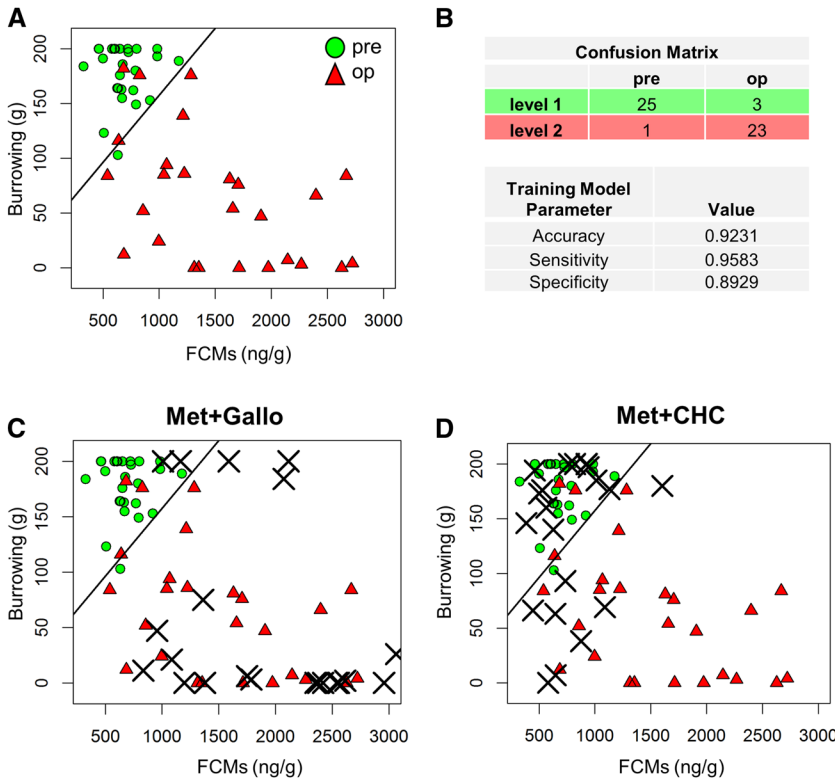


**Figure 5.** ROC curve analysis to evaluate the performance of each single parameter and the combination of parameters for distress quantification. Data before operation (pre) and after operation (op) from 26 mice were used to analyze the discriminatory power of each parameter. The AUC (A), 95% CI, and *P* value were assessed separately for BW changes (A), burrowing behavior (B), and FCMs (C). Additionally, these parameters were determined using multiple logistic regression for the combination of burrowing + FCMs (D) and the combination of all parameters (E). (A–E: pre and op,  $n = 26$ ).

classified as severity level 1. The cluster consisting of 87% data points from animals after surgery was defined as distress level 2 (Fig. 6B). Using the established discriminator, to distinguish distress of animals before and after surgery, this training

model achieved an accuracy of 0.9231, a sensitivity of 0.9583, and a specificity of 0.8926 (Fig. 6B).

To classify the distress caused during the therapy phases, the data assessed at the early, middle, and late phases after each therapy were pooled. The



**Figure 6.** A generated 2D training model based on pre- and postoperative data was used to grade the severity of the distinct therapies. Single data points, which were derived from 26 animals before any intervention (pre; green dots) and after operation (op, red triangles), are presented in the form of a two-dimensional scatter plot, based on the parameters burrowing and FCMs (A). To generate a training model, these data points were spatially separated into two clusters using multivariate logistic regression. The cluster, including 96% data points of animals before any interventions, was classified as severity level 1 (B). The cluster consisting of 87% data points from animals after surgery was defined as distress level 2. Using the established discriminator, the model is further characterized by a confusion matrix showing the accuracy, sensitivity, and specificity of the training data (B). Single data points (crosses), which present the individual distress assessed from the identical animals during the therapy phases (early, middle, and late) after Met + Gallo (C) or Met + CHC intervention (D), were plotted in the training model. Pre,  $n = 26$ , and op,  $n = 26$ , 52 data points in total (A); Met + Gallo,  $n = 7$ , 21 data points (C), and Met + CHC,  $n = 7$ , 21 data points (D).

single test data points were plotted, respectively, for Met + Gallo and Met + CHC treatment into the generated training model and were separated into two distress levels by the discriminator (Fig. 6C and D). On this basis of this training model, two data points were assigned to distress level 1 and 19 data points to distress level 2 after Met + Gallo intervention (Table. 1). By contrast, after Met + CHC therapy, 12 data points were classified to distress level 1 and 9 data points to distress level 2. Thus, during Met + Gallo treatment, mice usually experienced a higher distress level 2, while animals mostly experienced a lower distress level 1 during Met + CHC treatment. Fisher’s exact test confirmed a significant difference ( $P = 0.003$ ) in the distress

**Table 1.** Distribution of distress level after Met + Gallo compared with Met + CHC intervention, according to the 2D scatter plot and multivariate logistic regression

	Met + Gallo	Met + CHC
Level 1	2	12
Level 2	19	9

NOTE:  $P = 0.003$  by Fisher’s exact test.

level distribution between these two therapies (Table 1). In addition, the efficiency of distress classification for single parameters, such as BW change, burrowing activity, and FCMs, was evaluated. For this purpose, the best cutoff between pre and

**Table 2.** Distribution of distress level by single variables after Met + Gallo and Met + CHC intervention, according to the calculated cutoff for the percentage of body weight change (−1.97%), burrowing (144 g), and FCMs (989 ng/g) by Youden's *J* index

	Body weight change (%)		Burrowing (g)		FCMs (ng/g)	
	Met + Gallo	Met + CHC	Met + Gallo	Met + CHC	Met + Gallo	Met + CHC
Level 1	6	7	5	13	2	17
Level 2	15	14	16	8	19	4
	nonsignificant		$P = 0.028$ by Fisher's exact test		$P < 0.001$ by Fisher's exact test	

postoperative (op) data was calculated by Youden's *J* index. Data assessed at the early, middle, and late phases after each therapy were pooled and assigned to distress level 1 or 2 according to the calculated cutoff. The cutoff for BW change was determined at −1.97%, for burrowing activity at 144 g, and for FCMs at 989.9 nanograms per gram. When assigning BW data according to the determined cutoff of −1.97%, no significant difference was observed when comparing Met + Gallo with Met + CHC therapy (Table 2). This is consistent with a low performance of BW when differentiating between pre and postoperative distress levels (Fig. 5A). When analyzing burrowing activity as a single readout parameter, animals experienced at most time points distress level 2 during Met + Gallo treatment, while animals mostly experienced distress level 1 during Met + CHC treatment (Table 2). Fisher's exact test confirmed a significant difference ( $P = 0.028$ ) in the distress level distribution between these two therapies. When evaluating FCMs, animals mostly experienced distress level 2 during Met + Gallo, while Met + CHC-treated animals usually experienced distress level 1 (Table 2). Fisher's exact test confirmed a significant difference ( $P < 0.001$ ) in the distribution between these two therapies. These results demonstrate that Met + Gallo treatment causes more distress than Met + CHC intervention.

## Discussion

This study concluded that simple, noninvasive methods can identify the side effects of therapies and grade the severity of animal experiments. A 2D scatter plot followed by multivariate logistic regression was able to combine multiple readout parameters when defining specific distress levels. Similar distress levels were also obtained, when using a single readout parameter, by the application of ROC curve analysis and Youden's *J* index. Such

multi and univariate methods might be beneficial for future evaluation of animal experiments and might detect side effects of therapies.

Multivariate analysis was also applied in other studies to analyze the distress of animals. For example, Häger *et al.* assessed the severity of a murine colitis model and restrain stress intervention by *k*-means clustering of BW and voluntary wheel running data.<sup>34</sup> Seiffert *et al.* used principal component analysis to quantify, if tethered or telemetric monitoring of epileptic seizures causes more distress to rats.<sup>35</sup> In contrast to these studies, we critically evaluated the efficiency of single parameters for distress quantification compared with a multifactorial method. Using burrowing and FCMs as a single readout parameter, as well as using them in the form of a multifactorial analysis, supported the same conclusion. Thus, one could critically ask the question, whether it is not enough to rely on a single parameter. However, one of our previous studies demonstrated that the performance of different readout parameters differs between distinct animal models, such as chronic pancreatitis or laparotomy.<sup>31</sup> In addition, some of the used parameters might not score exclusively distress. They might also be influenced by positive excitement or different physiological responses.<sup>6</sup> Even corticosterone is known to be influenced by, for example, the circadian rhythm,<sup>36–38</sup> estrus cycle,<sup>36,39</sup> or sexual arousal.<sup>40</sup> Thus, relying on only one parameter increases the risk to reach an incorrect conclusion. This potential bias is reduced when using a multivariate distress analysis. However, the subjective bias during the assessment of the parameters was unfortunately not reduced by randomization or blinding, which is a limitation of the present study.

In this study, we determined two distinct severity levels using the univariate and multivariate analysis. Severity level 1 was defined in the 2D scatter plot

by a cluster, which included 96% of the data points measured before any intervention (Fig. 6). The univariate discrimination of burrowing behavior and FCMs by Youden's *J* index obtained a similar confusion matrix with 91.7–96.0% of data points assessed before intervention assigned to distress level 1 (data not shown). The burrowing activity, as well as the FCM concentrations, is similar to data of healthy mice<sup>41,42</sup> or mice undergoing very mild stressors, such as single isoflurane anesthesia.<sup>43</sup> We, therefore, suggest that severity level 1 represents “mild” distress.

Severity level 2 was defined as a cluster that included 87% of the data points after and 4% of data points before surgery (Fig. 6). A similar reduction of burrowing activity (~50–100%) or an increase in FCM concentrations (3- to 4-fold) could also be observed after intrabone marrow transplantation<sup>44</sup> or during chronic pancreatitis.<sup>18</sup> The EU-Directive 2010/63/EU suggests that surgical interventions with proper anesthesia might be ranked as moderate severity.<sup>4</sup> According to the fact that the cluster defining severity level 2 obtained most data measured after surgical intervention and in agreement with the above-cited literature and considering the EU-Directive 2010/63/EU, we suggest that the severity level 2 represents “moderate” distress. We recognized that not only surgery but also anesthesia and analgesia may influence our used distress parameters. For example, isoflurane anesthesia without any surgery is reported to provoke significant alterations of burrowing and nesting activity.<sup>10,45,46</sup> However, anesthesia and analgesia are mandatory for surgical interventions and we did not separately analyze these aspects in this study.

On the basis of the classification of all data points to distress levels 1 and 2, we can define that mice after the Met + Gallo intervention experience mainly “moderate” and rarely “mild” distress. By contrast, the distress caused by the Met + CHC intervention can be mainly classified as “mild.” These data are consistent with clinical studies, which describe that different chemotherapeutic treatments have distinct side effects and can, therefore, cause different levels of distress.<sup>47</sup> Met is known as an antidiabetic drug with recently described anticancer effects.<sup>48</sup> Therefore, Met is used in several clinical trials as a treatment for different cancer types, with minor side effects.<sup>49</sup> Gallo and CHC were not used in clinical trials so far and

little is known about potential side effects. During the early phase of Gallo treatment, we observed that some mice showed writhing behavior, which is expressed by a stretching of the hind legs and a pressing of the abdomen into the substrate 30 min after injection. This behavior is known to be a sign of abdominal discomfort<sup>50</sup> and supports the assumption that Gallo causes drug-specific distress in animals. Writhing behavior is mostly associated with visceral pain,<sup>50</sup> which might imply that the used analgesic metamizol is unable to completely cover the pain induced by Gallo. Thus, the concentration of the self-administered metamizol might be insufficient in some mice, or even more efficient analgesics, such as opioids, might be required in future animal studies to cover drug-induced pain. However, in the late phase of chemotherapy, these animals seem to desensitize to the Gallo injection, showing fewer signs of discomfort (Fig. 3A). This observation is in line with reports that mice are able to habituate to chronic stressors like intraperitoneal (i.p.) injections.<sup>37</sup> Thus, our results indicate that besides severity assessment, multivariate or univariate distress analysis could also be used for judging side effects of therapies. Toxicological analysis of potent drugs in animals is mandatory before clinical trials. Current toxicological studies include monitoring of the cardiovascular and respiratory system combined with histopathological, biochemical, immunological, and hematological analysis.<sup>51–53</sup> Blood collection and analytic methods to monitor the cardiovascular and respiratory systems are highly invasive or require the restraining of animals and might, therefore, influence physiological readout parameters.<sup>52</sup> However, using noninvasive parameters, such as burrowing and FCMs, in longitudinal studies allows to detect side effects of some therapies without additional stress induction. This would, therefore, contribute to the refinement of pharmaceutical research without increasing the number of animals. For example, cardiovascular monitoring of rodents is mainly performed with implanted radiotelemetric transmitters.<sup>54</sup> Our working group analyzed in a previous study that noninvasive parameters, such as burrowing, nesting, FCMs, and BW, are as efficient as continuous monitoring of heart rate, body temperature, and activity by telemetry for distress analysis.<sup>17</sup>

Burrowing activity is also comparable with the so-called “activities of daily living” in humans

and impairment can be an early indicator for neurological disorders.<sup>55–57</sup> Activity and motoric dysfunction of rodents are currently used to identify the potential neurotoxicity of drugs.<sup>58</sup> The addition of noninvasive behavior tests, such as burrowing activity, might be the first step to assess side effects, such as headache, dizziness, or mental disturbances, which can barely be assessed by traditional toxicological methods.<sup>8</sup>

Besides contributing to the refinement by evaluating the side effects of drugs, the presented multivariate model can be used as a practical tool to assess distress in many different animal models and interventions. This could provide the basis not only for correctly classifying animal models according to their severity but could also be used to assess the effect of refinement methods in animal-based research, that is, analgesia or environmental enrichment.

### Acknowledgments

The authors are grateful for the excellent technical assistance from Berit Blendow and Edith Klobetz-Rassam. This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG research group FOR 2591, project numbers: 321137804, ZE 712/1-1, and VO 450/15-1). X.Z. was supported by the China Scholarship Council (Grant number: 201608080159).

### Author contributions

D.Z. and B.V. acquired the funding for this project. D.Z., B.V., and S.K. designed the project. S.K., E.H.U.W., J.E., M.S., D.Z., R.P., and X.Z. acquired the data. S.K., S.R.T., D.Z., A.A., C.H., and A.B. did the statistical analysis. S.K., B.V., D.Z., and S.R.T. wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

### Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Figure S1.** Flowchart: sample size determination for experiments.

**Figure S2.** Animal distress after laparotomy and tumor cell injection, using up to 40 additional mice.

**Figure S3.** Corticosterone concentration in blood plasma.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### References

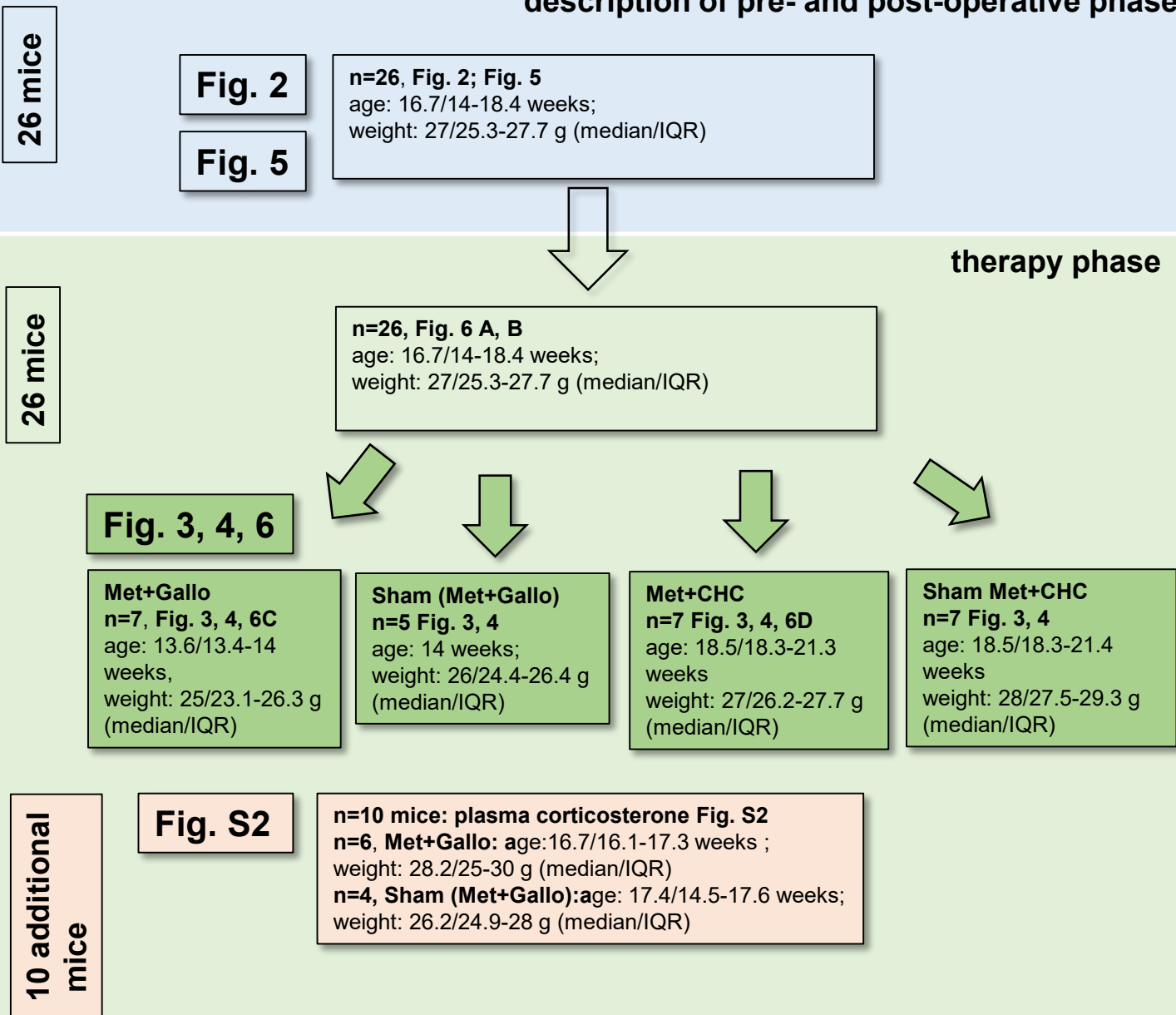
1. Prescott, M.J. & K. Lidster. 2017. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Lab. Anim. (NY)* **46**: 152–156.
2. Graham, M.L. & M.J. Prescott. 2015. The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm–benefit analysis in animal models of disease. *Eur. J. Pharmacol.* **759**: 19–29.
3. European Commission. 2013. Caring for animals, aiming for better science. Accessed on January 20, 2020. [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/guidance/project\\_evaluation/en.pdf](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/project_evaluation/en.pdf).
4. The European Parliament and the Council of the European Union. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 2010/63/EU.
5. Smith, D., D. Anderson, A.-D. Degryse, *et al.* 2018. Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. *Lab. Anim.* **52**: 5–57.
6. Hawkins, P., D.B. Morton, O. Burman, *et al.* 2011. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFOW Joint Working Group on Refinement. *Lab. Anim.* **45**: 1–13.
7. Mellor, D.J. & C.S.W. Reid. 1994. *Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. Improving the well-being of animals in research environment.* Australian and New Zealand Council for Care of Animals in Research and Teaching (ANZCCART). 3–18.
8. 2004. *Intentional human dosing studies for EPA regulatory purposes: scientific and ethical issues.* Washington, DC: The National Academies Press.
9. Jirkof, P., N. Cesarovic, A. Rettich, *et al.* 2010. Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front. Behav. Neurosci.* **4**: 165.
10. Jirkof, P., T. Fleischmann, N. Cesarovic, *et al.* 2013. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab. Anim.* **47**: 153–161.
11. Peng, M., C. Zhang, Y. Dong, *et al.* 2016. Battery of behavioral tests in mice to study postoperative delirium. *Sci. Rep.* **6**: 29874.
12. Benedetti, M., R. Merino, R. Kusuda, *et al.* 2012. Plasma corticosterone levels in mouse models of pain. *Eur. J. Pain* **16**: 803–815.
13. Touma, C., N. Sachser, E. Möstl, *et al.* 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* **130**: 267–278.
14. Touma, C., R. Palme & N. Sachser. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm. Behav.* **45**: 10–22.
15. Palme, R. 2019. Non-invasive measurement of glucocorticoids. Advances and problems. *Physiol. Behav.* **199**: 229–243.

16. Kilkenny, C., W.J. Browne, I.C. Cuthill, *et al.* 2010. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **8**: e1000412.
17. Kumstel, S., P. Vasudevan, R. Palme, *et al.* 2020. Benefits of non-invasive methods compared to telemetry for distress analysis in a murine model of pancreatic cancer. *J. Adv. Res.* **21**: 35–47.
18. Abdelrahman, A., S. Kumstel, X. Zhang, *et al.* 2019. A novel multi-parametric analysis of non-invasive methods to assess animal distress during chronic pancreatitis. *Sci. Rep.* **9**: 14084.
19. Stumpf, F., H. Algül, C.K. Thoeringer, *et al.* 2016. Metamizol relieves pain without interfering with cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas* **45**: 572–578.
20. Kumstel, S., G. Tang, X. Zhang, *et al.* 2019. Grading distress of different animal models for gastrointestinal diseases based on plasma corticosterone kinetics. *Animals (Basel)* **9**: E145.
21. Zhang, X., S. Kumstel, G. Tang, *et al.* 2019. A rational approach of early humane endpoint determination in a murine model for cholestasis. *ALTEX* <https://doi.org/10.14573/altex.1909111>.
22. Morton, D. & P. Griffiths. 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* **116**: 431–436.
23. Paster, E.V., K.A. Villines & D.L. Hickman. 2009. Endpoints for mouse abdominal tumor models. Refinement of current criteria. *Comp. Med.* **59**: 234–241.
24. Deacon, R. 2012. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J. Vis. Exp.* e2607. <https://doi.org/10.3791/2607>.
25. Deacon, R.M.J. 2006. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat. Protoc.* **1**: 118–121.
26. van Herck, H., V. Baumans, C.J. Brandt, *et al.* 2001. Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein and the tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Lab. Anim.* **35**: 131–139.
27. Vahl, T.P., Y.M. Ulrich-Lai, M.M. Ostrander, *et al.* 2005. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289**: E823–E828.
28. Hajian-Tilaki, K. 2013. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian J. Intern. Med.* **4**: 627–635.
29. Slawomir, J. 2012. mvnrmtest: normality test for multi-variables. R package version 0.1-9. Accessed on October 18, 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=MVnormttest>.
30. R Core Team. 2019. R: a language and environment for statistical computing. Accessed on October 18, 2019. <https://www.R-project.org/>.
31. Foretz, M., B. Guigas, L. Bertrand, *et al.* 2014. Metformin. From mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* **20**: 953–966.
32. Colen, C.B., Y. Shen, F. Ghoddoussi, *et al.* 2011. Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis. An *in vivo* study. *Neoplasia* **13**: 620–632.
33. Farabegoli, F., M. Vettrano, M. Manerba, *et al.* 2012. Galloflavin, a new lactate dehydrogenase inhibitor, induces the death of human breast cancer cells with different glycolytic attitude by affecting distinct signaling pathways. *Eur. J. Pharm. Sci.* **47**: 729–738.
34. Häger, C., L.M. Keubler, S.R. Talbot, *et al.* 2018. Running in the wheel: defining individual severity levels in mice. *PLoS Biol.* **16**: e2006159.
35. Seiffert, I., R.M. van Dijk, I. Koska, *et al.* 2019. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: III. Electrical post-status epilepticus model. *Epilepsia* **60**: 1539–1551.
36. Gong, S., Y.-L. Miao, G.-Z. Jiao, *et al.* 2015. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One* **10**: e0117503.
37. Dalm, S., L. Enthoven, O.C. Meijer, *et al.* 2005. Age-related changes in hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity of male C57BL/6J mice. *Neuroendocrinology* **81**: 372–380.
38. Teilmann, A.C., O. Kalliokoski, D.B. Sørensen, *et al.* 2014. Manual versus automated blood sampling. Impact of repeated blood sampling on stress parameters and behavior in male NMRI mice. *Lab. Anim.* **48**: 278–291.
39. Nichols, D.J. & P.F. Chevins. 1981. Plasma corticosterone fluctuations during the oestrous cycle of the house mouse. *Experientia* **37**: 319–320.
40. Bronson, F.H. & C. Desjardins. 1982. Endocrine responses to sexual arousal in male mice. *Endocrinology* **111**: 1286–1291.
41. Gurfein, B.T., B. Hasdemir, J.M. Milush, *et al.* 2017. Enriched environment and stress exposure influence splenic B lymphocyte composition. *PLoS One* **12**: e0180771.
42. Möller, C., F. Wolf, R.M. van Dijk, *et al.* 2018. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures. I. Electrical kindling. *Epilepsia* **59**: 765–777.
43. Hohlbaum, K., B. Bert, S. Dietze, *et al.* 2017. Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6J mice—assessing the degree of distress. *PLoS One* **12**: e0179588.
44. Pfeiffenberger, U., T. Yau, D. Fink, *et al.* 2015. Assessment and refinement of intra-bone marrow transplantation in mice. *Lab. Anim.* **49**: 121–131.
45. Cesarovic, N., F. Nicholls, A. Rettich, *et al.* 2010. Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. *Lab. Anim.* **44**: 329–336.
46. Jirkof, P., N. Cesarovic, A. Rettich, *et al.* 2012. Individual housing of female mice: influence on postsurgical behaviour and recovery. *Lab. Anim.* **46**: 325–334.
47. Partridge, A.H., H.J. Burstein & E.P. Winer. 2001. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2001**: 135–142.
48. Decensi, A., M. Puntoni, P. Goodwin, *et al.* 2010. Metformin and cancer risk in diabetic patients. A systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* **3**: 1451–1461.
49. Chae, Y.K., A. Arya, M.-K. Malecek, *et al.* 2016. Repurposing metformin for cancer treatment. Current clinical studies. *Oncotarget* **7**: 40767–40780.

50. Ness, T.J. 1999. Models of visceral nociception. *ILAR J.* **40**: 119–128.
51. Greaves, P., A. Williams & M. Eve. 2004. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**: 226–236.
52. Luft, J. & G. Bode. 2002. Integration of safety pharmacology endpoints into toxicology studies. *Fund. Clin. Pharmacol.* **16**: 91–103.
53. Rix, A., N.I. Drude, A. Mrugalla, *et al.* 2019. Assessment of chemotherapy-induced organ damage with Ga-68 labeled duramycin. *Mol. Imaging Biol.* <https://doi.org/10.1007/s11307-019-01417-3>.
54. Farraj, A.K., M.S. Hazari & W.E. Cascio. 2011. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicol. Sci.* **121**: 11–30.
55. Deacon, R.M.J., D. Reisel, V.H. Perry, *et al.* 2005. Hippocampal scrapie infection impairs operant DRL performance in mice. *Behav. Brain Res.* **157**: 99–105.
56. Felton, L.M., C. Cunningham, E.L. Rankine, *et al.* 2005. MCP-1 and murine prion disease: separation of early behavioural dysfunction from overt clinical disease. *Neurobiol. Dis.* **20**: 283–295.
57. Yuan, D., C. Liu, J. Wu, *et al.* 2018. Nest-building activity as a reproducible and long-term stroke deficit test in a mouse model of stroke. *Brain Behav.* **8**: e00993.
58. United States Environmental Protection Agency (EPA). 1996. Health effects test guidelines OPPTS 870.6200 neurotoxicity screening battery public draft. Accessed on November 10, 2019. <https://nepis.epa.gov>.

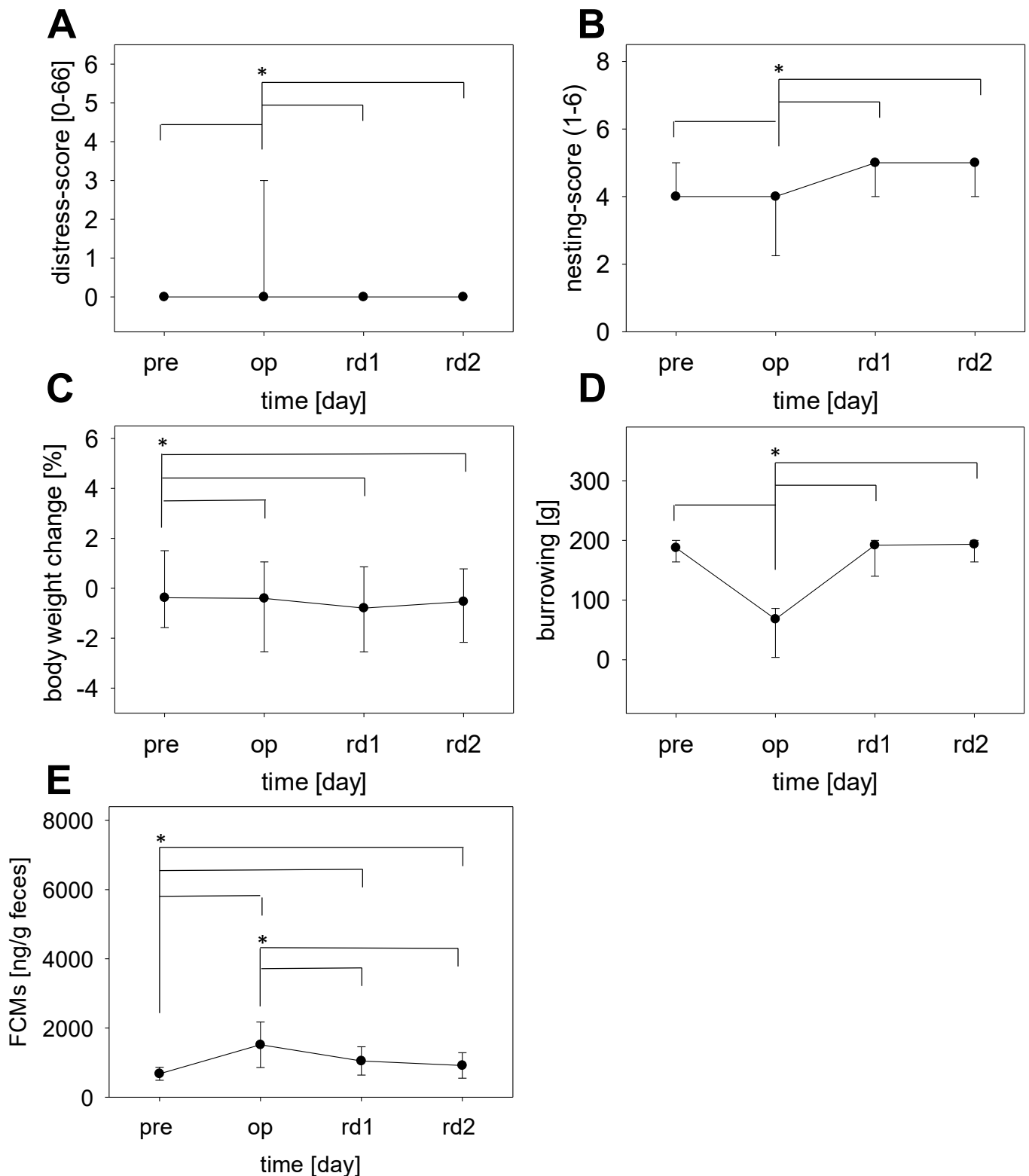
# Fig. S1

## description of pre- and post-operative phase



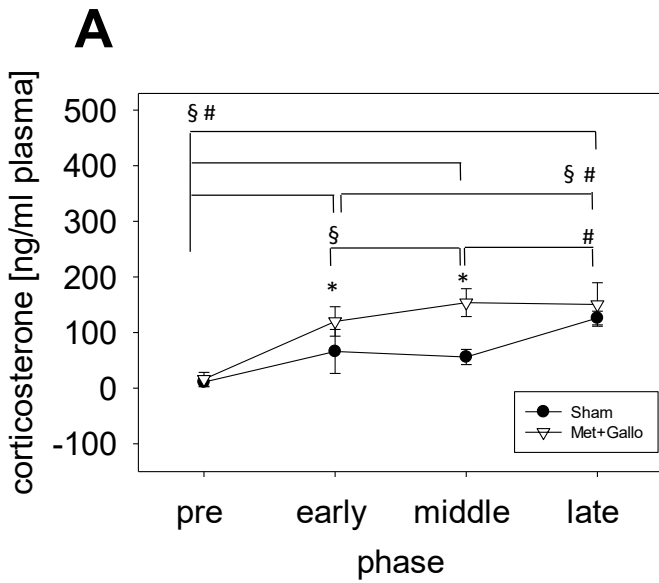
**Fig. S1 Number of animals for distress assessment.** Data for the description of the pre- and post-operative phase was obtained from 26 mice (**Fig. 2, 5**). The same mice were also used as training datasets for the multivariate distress analysis (**Fig. 6A, B**). These mice were further allocated into the distinct treatment groups Met+Gallo n=7, Sham (Met+Gallo) n=5; Met+CHC n=7, Sham (Met+CHC) n=7 (**Fig. 3, 4, 6C, D**). 10 additional mice were used for the analysis of plasma corticosterone concentration during Met+Gallo (n=6) and the corresponding Sham treatment (n=4) (**Fig. S3**).

# Fig. S2



**Fig. S2. Animal distress after laparotomy and tumor cell injection, using up to 40 additional mice** A distress-score (A), nesting behavior (B), percentage of body weight change (C), burrowing behavior (D) and fecal corticosterone metabolites (FCMs) (E) were evaluated before any intervention (pre), after operation (op) and during recovery (recovery days: rd1 and rd2). Parametric data with equal variance are described as mean  $\pm$  standard deviation and significances were determined by one way repeated measure ANOVA, followed by pairwise comparison with Holm-Sidak-Method (E). Non-parametric data are represented as median  $\pm$  interquartile range and were analyzed with repeated-measures ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis test), followed by Student-Newman-Keuls-Method (A, B, C, D): \* $p \leq 0.05$ . (A+C:  $n = 66$ ; B:  $n = 43$ ; D:  $n = 30$ ; E:  $n = 28$ ).

**Fig. S3**



**Fig. S3. Corticosterone concentration in blood plasma.** Corticosterone concentrations were analyzed after treatment with Met+Gallo or the appropriate vehicle (Sham) before any intervention (pre), and during the early, middle and late phase of therapy. Significances were determined by two way repeated measures ANOVA with pairwise comparisons by Holm-Sidak-Method: \* $p \leq 0.05$ : Sham vs. treatment group; § $p \leq 0.05$ : phase vs. phase within treatment group; # $p \leq 0.05$ : phase vs. phase within Sham group. (Sham  $n=4$ ; Met+Gallo  $n=6$ ).