

UNIVERSITÄT ROSTOCK

RUDOLF-ZENKER INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE CHIRURGIE

DIREKTORIN: PROF. DR. MED. BRIGITTE VOLLMAR

EVIDENZ-BASIERTE BELASTUNGSBEURTEILUNG UND ETABLIERUNG VON FRÜHEN HUMANEN ENDPUNKTEN IN VERSCHIEDENEN PANKREASKARZINOM-MODELLEN

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

INGO KOOPMANN

AUS HASELDORF

ROSTOCK, 2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005644

DISSERTATION

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Gutachter:

Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Universität Rostock, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

PD Dr. rer. nat. Claudia Maletzki

Universität Rostock, Klinik und Poliklinik für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie
Stammzelltherapie und Palliativmedizin

Prof. Dr. med. vet. Lars Theyse

Universität Leipzig, Klinik für Kleintiere, Abteilung Chirurgie für Kleintiere

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2025

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ZUSAMMENFASSUNG	1
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	2
III.	EINLEITUNG	4
3.1	PANKREASKARZINOM.....	4
3.1.1	EPIDEMIOLOGIE, ÄTIOLOGIE UND PATHOLOGIE	4
3.1.2	SYMPTOMATIK, DIAGNOSTIK, THERAPIE UND PROGNOSE	6
3.2	NOTWENDIGKEIT DER IN VIVO FORSCHUNG	8
3.3	TIERMODELLE	9
3.3.1	IN VIVO TIERMODELLE DES PANKREASKARZINOMS	9
3.3.2	ZIELLINIEN-BASIERTE TIERMODELLE	10
3.4	BELASTUNGSEINSCHÄTZUNG UND REFINEMENT.....	10
3.4.1	TIERSCHUTZ IN DER TIEREXPERIMENTELLEN FORSCHUNG	10
3.4.2	BELASTUNGSEINSCHÄTZUNG IM TIERVERSUCH.....	11
3.4.3	REFINEMENT-STRATEGIEN FÜR PANKREASKARZINOM-MODELLE.....	13
IV.	ZIELSTELLUNG	15
V.	MATERIAL UND METHODEN	15
5.1	IN VIVO VERSUCHE	15
5.1.1	VERSUCHSTIERE UND ZELLINIEN.....	15
5.1.2	ZELLINIEN -BASIERTE TIERMODELLE.....	16
5.1.2.1	ORTHOTOPES TIERMODELL.....	16
5.1.2.2	SUBKUTANES TIERMODELL.....	17
5.1.2.3	INTRAVENÖSES TIERMODELL.....	17
5.2	BELASTUNGSANALYSEN	18
5.2.1	PHYSIOLOGISCHE PARAMETER.....	18
5.2.2	VERHALTENSPARAMETER.....	19
5.2.3	HORMONELLE PARAMETER	19
5.2.4	VERSUCHSAUFBAU	20

5.3	MONITORING DES TUMORWACHSTUMS	21
5.3.1	PET-CT BILDGEBUNG	21
5.3.2	MESSUNG MIT DER SCHIEBELEHRE	22
5.4	HISTOLOGIE	22
5.5	STATISTIK	23
VI.	ERGEBNISSE	25
6.1	GESCHLECHTERVERGLEICH BEI DER TUMORPROGRESSION.....	25
6.1.1	ORTHOTOPES TIERMODELL.....	25
6.1.2	SUBKUTANES TIERMODELL.....	26
6.1.3	INTRAVENÖSES TIERMODELL	27
6.2	TIERMODELLE IM VERGLEICH.....	28
6.2.1	POSTOPERATIVE PHASE	28
6.2.2	TUMORPROGRESSION.....	30
6.2.3	HUMANE ENDPUNKTE	32
6.3	MULTIVARIANTE ANALYSE	35
VII.	DISKUSSION.....	39
7.1	EVIDENZ-BASIERTE BELASTUNGSANALYSE VON PDA-MODELLEN	39
7.1.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	39
7.1.2	DATENBASIERTE SCHWEREGRADE	39
7.1.3	RELSA-ANALYSE.....	42
7.1.4	SCHWEREGRADE DER TUMORMODELLE	43
7.2	HUMANE ENDPUNKTE VON PDA-MODELLEN.....	46
7.2.1	BELASTUNG WÄHREND DER HUMANEN ENDPUNKT-PHASE.....	46
7.2.2	KRITERIEN ZUR EVALUATION DES FRÜHEN HUMANEN ENDPUNKTES	48
7.3	DIE WAHL DES RICHTIGEN TIERMODELLS	51
VIII.	SCHLUSSFOLGERUNG.....	53
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	54
X.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	67
10.1	ABBILDUNGEN	67

10.2	TABELLEN	67
XI.	ANHANG	68
XII.	DANKSAGUNG.....	73
XIII.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	74
XIV.	LEBENS LAUF	75
XV.	THESEN ZUR DISSERTATION.....	79

I. ZUSAMMENFASSUNG

In vivo Forschung ist für die präklinische onkologische Forschung aufgrund fehlender Alternativmethoden immer noch unerlässlich. Alle Tierversuche müssen im Einklang mit den 3R-Prinzipien (reduce, replace und refine) geplant werden. Die Gesetzgebung der Europäischen Union fordert ein kontinuierliches Refinement sowie eine pro- und retrospektive Bewertung der Belastungsschwere. Onkologische Tiermodelle werden in der europäischen Richtlinie allen Schweregraden zugeordnet, wodurch eine klare Bewertung der Belastungsschwere erschwert wird. Die Lösung ist eine datenbasierte und vergleichende Belastungsanalyse der verschiedenen onkologischen Modelle. In dieser Studie erfolgte die Injektion der Panc02-Zellen orthotop, subkutan oder intravenös, um zunächst alle syngenischen Pankreaskarzinommodelle in der evidenz-basierten Belastungseinschätzung abzudecken. Es wurde eine detaillierte Belastungsanalyse dieser onkologischen Mausmodelle mittels verschiedener physiologischer Parameter, wie Körpergewichtsänderung, perianaler Temperatur, Gesundheitsscore und Mouse Grimace Scale, Verhaltensparameter, wie Buddel- sowie Nestbauaktivität, und hormonelle Parameter, wie Kortikosteronmetabolite im Kot sowie die Plasmakortikosteron-Konzentration, durchgeführt. Die aussagekräftigsten Parameter wurden mittels Relative Severity Assessment Algorithmus in einem einzigen Score vereint, um den maximalen Schweregrad während der Tumorprogression für jedes Tier zu erhalten. Für die Tiere im orthotopen Modell wurde ein signifikant höherer maximaler Relative Severity Assessment Score quantifiziert im Vergleich zum subkutanen oder intravenösen Tiermodell. Im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Tiermodellen, wiesen die Pankreaskarzinommodelle eine geringere Belastung für die Mäuse auf. Dennoch sollte die Wahl des Tiermodells immer nach der jeweiligen wissenschaftlichen Fragestellung erfolgen.

Um in diesen Tiermodellen erhebliche Belastung in zukünftigen Studien zu vermeiden, wurden frühe humane Endpunkte in dieser Studie etabliert. Sobald bei den Mäusen 5 % Körpergewichtsreduktion zum Vortag oder ein Kriterium im Score-Sheet gescort wurde, erfolgten hierzu, bis zum Erreichen der Abbruchkriterien, wie 15 % Körpergewichtsverlust oder Tumorulzeration, täglich die Belastungsanalysen. Die Fähigkeit jedes einzelnen Parameters, den humanen Endpunkt frühzeitig mit hoher Sensitivität und Spezifität vorherzusagen, wurde mittels Grenzwertoptimierungskurve berechnet. Hierbei zeigte sich, dass eine Reduktion des Buddelverhaltens von mindestens 50 %, sowohl nach zwei Stunden wie auch über Nacht, den humanen Endpunkt in allen drei Modellen 48h Stunden vorher mit sehr hoher Sensitivität und Spezifität voraussagen konnte. Buddelverhalten kann daher als robuster Parameter zur Bestimmung früher humaner Endpunkt in murinen Pankreaskarzinommodellen verwendet werden.

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µm ²	Quadratmikrometer
¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-Fluordeoxyglucose
%	Prozent
Abb.	Abbildung
AUC	Area under the Curve
B	Breite
B2h	Buddelaktivität nach zwei Stunden
BDL	Gallengangsligatur
BÜN	Buddelaktivität über Nacht
CCl ₄	Tetrachlormethan
CT	Computertomographie
EU	Europäische Union
FCM	Kortikosteron Konzentration im Kot
g	Gramm
G	Gauge
GS	Gesundheitsscore
hEP	humaner Endpunkt
IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
KG	Körpergewicht
L	Länge

MBq	Megabecquerel
Met. Vol.	metabolisches Tumervolumen
mg	Milligram
MGS	Mouse Grimace Scale
mm ³	Kubikmillimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Nestingscore
ng	Nanogramm
PaCDM	Pankreaskrebs assoziierter Diabetes mellitus
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDA	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PDX	Derived Xenograft Modell
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie
pTemp	Perineale Temperatur
RELSA	Relative Severity Assessment Score
RELSA _{max}	Maximaler Relative Severity Assessment Score
ROC	Grenzwertoptimierungskurve
ROI	Region of Interest
Tab.	Tabelle
Vol.	Tumervolumen
Vol. %	Volumenprozent

III. EINLEITUNG

3.1 PANKREASKARZINOM

3.1.1 EPIDEMIOLOGIE, ÄTIOLOGIE UND PATHOLOGIE

Das Pankreaskarzinom, mit einer Inzidenz von 495.773 Fällen im Jahr 2020 und einer Mortalität von 466.003 Menschen, stellt eine der bedeutendsten und häufigsten Krebserkrankungen weltweit dar (Hu et al. 2021). Die Erkrankung tritt im fortgeschrittenen Lebensalter vermehrt auf, wodurch sich aufgrund der steigenden Lebenserwartung das globale Auftreten in den vergangenen zwei Jahrzehnten mehr als verdoppelt hat (Klein 2021). Generell zeigt sich dabei eine leichte Disposition zum männlichen Geschlecht (Klein 2021).

Die Ursachen des Pankreaskarzinoms sind bis heute unzureichend erforscht. Es gibt lediglich einige anerkannte Risikofaktoren wie Rauchen, Alkohol, Adipositas, Diabetes, Bewegungsmangel und Genetik (Ilic und Ilic 2016).

Zigarettenraucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein um 75 % erhöhtes Risiko an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken. Dieses erhöhte Risiko bleibt auch nach dem Rauchstopp für mindestens zehn weitere Jahre bestehen (Iodice et al. 2008). Außerdem korreliert Alkoholkonsum positiv mit der Entstehung eines Pankreaskarzinoms bei Männern, nicht aber signifikant bei Frauen (Naudin et al. 2018). Das Risiko zu erkranken ist mengenabhängig. Starker Alkoholkonsum geht im Vergleich zu schwachen Alkoholkonsum mit deutlich erhöhtem Risiko einher. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko beim regelmäßigen Konsum von Bier oder Spirituosen, weniger jedoch bei regelmäßigem Weinkonsum bei gleicher Energieaufnahme aus den Alkoholquellen (Naudin et al. 2018).

Für Adipositas (Body-Mass-Index > 25) zeigt sich eine altersunabhängige Assoziation zum Pankreaskarzinom, wobei das Risiko proportional zur Dauer sowie zum Grad der Adipositas ist (Bosetti et al. 2014). In Kombination mit einer Diabetes mellitus Typ II Erkrankung ist das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, zusätzlich erhöht. In einer prospektiven Kohortenstudie konnte das ätiologische Risiko auf 14 % beziffert werden (Stolzenberg-Solomon et al. 2013). Diabetes mellitus Typ II kann dabei sowohl Folge der Erkrankung, als auch eigenständiger Risikofaktor sein. Bis zu zwei Jahrzehnte zeigt sich bei Diagnosestellung eines

Diabetes mellitus Typ II ein erhöhtes Risiko, welches mit zunehmender Erkrankungsdauer allmählich abnimmt. Zudem gibt es Hinweise, dass auch Diabetes Typ I mit einem schwach erhöhten Risiko einhergeht (Bosetti et al. 2014).

Patienten mit ausgeheilter akuter Pankreatitis weisen ebenfalls eine erhöhte Disposition zum Pankreaskarzinom auf. Innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung ist das Risiko am größten. Zehn Jahre danach besteht, im Vergleich zum Gesunden, ein doppelt so hohes Restrisiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Kirkegård et al. 2018).

Genetische Risikofaktoren sind gut erforscht. Besonders häufig finden sich somatische Mutationen im *KRAS*, *p16/CDKN2A*, *TP53* und im *SMAD4/DPC4*-Gen. Eine familiäre Vorbelastung mit Erkrankungen bei Verwandten ersten oder zweiten Grades besteht bei circa 10 % der Pankreaskarzinome (Norris et al. 2015). Zu den risikofördernden genetischen Faktoren gehören trunkierende Mutationen im *BRCA2*-Gen, Mutationen in Basenfehlpaarungsreparatur-Genen für ein hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom oder Polymorphismen im *ABO*-Gen. Zudem können das Peutz-Jeghers-Syndrom mit einer Mutation im *LKB1*-Gen, die hereditäre Pankreatitis durch Mutation im *PRSS1*-Gen oder das familiäre atypische Melanom-Syndrom mit multiplen Leberflecken mit Mutation im *CDKN2A*-Gen mit einem erhöhten Risiko einhergehen. Eine familiäre Vorbelastung mit Prostatakrebs zeigt ebenfalls ein deutlich erhöhtes Risiko für ein Pankreaskarzinom (Jacobs et al. 2010).

Fast alle Pankreaskarzinome sind Adenokarzinome, entwickeln sich aus dukталen Epithelzellen und gehören dementsprechend zum histologischen Subtyp des dukталen Adenokarzinoms. Jedes pankreatische duktale Adenokarzinom (PDA) geht aus einer hyperplastischen Läsion, einer pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) oder einer intradukталen papillären muzinösen Neoplasie (IPMN) hervor (**Abb. 1**). Ein starker Treiber für die Entstehung und Aufrechterhaltung ist eine Mutation im Protoonkogen *KRAS* (Grant et al. 2016). Molekulargenetisch findet sich diese bei 67,6 % der Adenokarzinome (Huang et al. 2021). Weitere Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *CDKN2A/p16*, *TP53* und *SMAD4* sind für das aggressive Tumorstadium ursächlich (Grant et al. 2016).

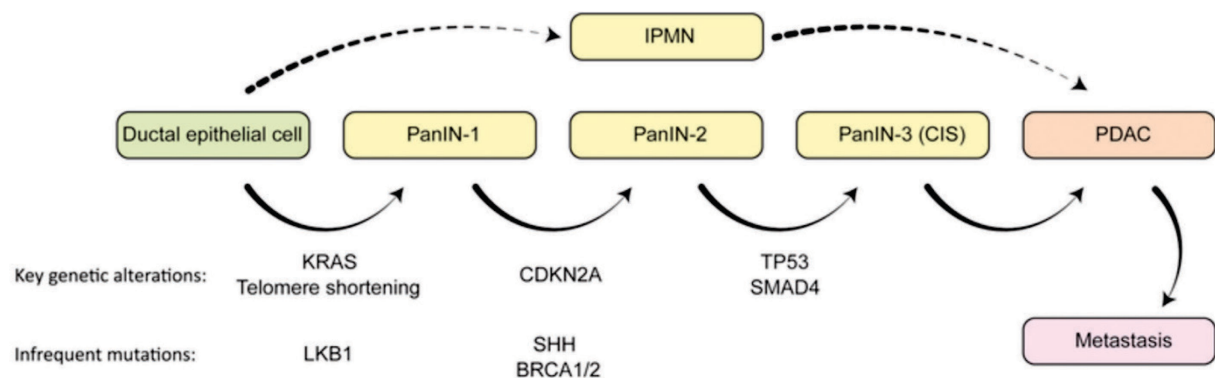


Abb. 1: Schematische Darstellung der Pathogenese des Pankreaskarzinoms. Molekulare Veränderungen führen zur Entstehung einer der histologisch unterschiedlichen Präkanzerösen PanIN oder IPMN und führen zu einer zunehmenden Zellveränderung (Grant et al. 2016).

Histologisch bestehen PDAs aus malignen Drüsenzellen mit willkürlicher Architektur, welche in ein dichtes desmoplastisches Stroma eingebettet sind. In einem Gewebefragment können so ohne Anreicherung neoplastischer Zellen weniger als 10 % maligne sein. Morphologische Varianten sind das adenosquamöse oder das undifferenzierte Karzinom mit osteoklastenähnlichen Riesenzellen (Wood et al. 2022).

3.1.2 SYMPTOMATIK, DIAGNOSTIK, THERAPIE UND PROGNOSE

Im Frühstadium verläuft das Pankreaskarzinom in der Regel klinisch stumm. Erst, wenn eine Infiltration in umliegendes Gewebe geschieht oder die Erkrankung metastasiert, entwickeln die Patienten Symptome (Kelsen et al. 1997). Typische Symptome sind Müdigkeit, Gewichtsverlust, Anorexie, Bauch- oder Rückenschmerzen, obstruktiver Ikterus oder Juckreiz. Weniger häufig finden sich Steatorrhö, akute Pankreatitiden, venöse Thromboembolien oder Obstruktionen des Magenausganges (Wood et al. 2022). Darüber hinaus entwickeln fast die Hälfte aller Patienten innerhalb von zwei Jahren einen Pankreaskarzinom assoziierten Diabetes mellitus (PaCDM) (Pannala et al. 2008).

Eine Diagnostik mittels spezifischer Bildgebung in Kombination mit Tumormarkern stellt die wohl sicherste Screening-Methode dar (Gemmell et al. 2009). Obwohl die Qualität von computertomographischen Methoden (CT) variiert, ist das dreiphasige Pankreasprotokoll-CT eine der besten diagnostischen Methoden zur Erstdiagnose (Vincent et al. 2011). Bei Kontrastmittelunverträglichkeit führt auch der endoskopische Ultraschall mit diagnostischer Zytologie zu sehr genauen Ergebnissen. Zum Screening nach Lungenmetastasen bietet sich eine Röntgenauf-

nahme oder ein CT des Brustkorbes an. Das Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie (PET-CT) ist derzeit keine routinemäßige Untersuchung, bietet jedoch Vorteile zur Identifizierung unbestimmter Läsionen (Vincent et al. 2011). Auch die diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie kann zur Differenzierung von Massenbildungen und der Identifizierung eines Pankreaskarzinoms beitragen (Fattahi et al. 2009). Zur Bestätigung einer Verdachtsdiagnose dient die zytologische Diagnostik. Entsprechendes Material kann durch eine endoskopische ultraschallgestützte Feinnadelbiopsie mit einer Sensitivität von bis zu 80 % gewonnen werden (Harewood und Wiersema 2002). Für das vollständige Tumor-Staging bietet die Magnetresonanztomographie (MRT) eine Sensitivität von nahezu 100 % (Yang et al. 2018).

Derzeit gibt es fünf gängige Serum-Tumorbiomarker: CA19-9, CA242, CEA, CA125 und microRNA (Ge et al. 2017). Die Sensitivität dieser Marker beträgt jedoch nur zwischen 39,5 % und 75,4 %, bei einer Spezifität zwischen 77,6 % und 83 % (Zhang et al. 2015). Der Biomarker CA19-9 allein ist besser zur Kontrolle des Therapieerfolgs geeignet und weniger zum primären Screening bei asymptomatischen Patienten (Fahrman et al. 2019). Dabei erhöht die Kombination von CA19-9 mit CA125 die Sensitivität und die Kombination mit CEA die Spezifität im Vergleich zum alleinigen CA19-9 (Zhao und Liu 2020).

Die Behandlung des Pankreaskarzinoms erfolgt idealerweise multidisziplinär durch ein Team aus Onkologen, Chirurgen, Radiologen, Gastroenterologen, Radioonkologen, Pathologen, Schmerztherapeuten, Sozialarbeitern, Ernährungsberatern und Palliativmedizinern (Pawlik et al. 2008).

Die chirurgische Resektion ist die einzige kurative Therapieoption. Abhängig von der anatomischen Lage gibt es die Möglichkeiten einer Duodenopankreatektomie, einer distalen oder einer totalen Pankreatektomie (McGuigan et al. 2018). Eine neoadjuvante Chemotherapie oder Bestrahlung kann potenzielle Metastasen beseitigen (He et al. 2014b). Die Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie kann das Outcome noch einmal deutlich verbessern. Eine Anschlussbehandlung mit dem sehr gut verträglichen Nukleosidanalogen Gemcitabin (Green 1996) kann das mittlere krankheitsfreie Überleben und die 5-Jahres Überlebensrate verlängern (Oettle et al. 2013). Die Kombination von Gemcitabin mit Capecitabin, einem Prodrug von 5-Fluorouracil (Siddiqui et al. 2019), erhöht dabei das Gesamtüberleben nochmals signifikant (Neoptolemos et al. 2017).

Beim metastasierten Pankreaskarzinom führt FOLFIRINOX, eine Kombination von Leucovorin, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin, im Vergleich zu Gemcitabin, zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens von 6,8 zu 11,1 Monaten sowie einer Verlängerung des mittleren progressionsfreien Überlebens von 3,3 zu 6,4 Monaten; ist dabei jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Deshalb wird diese Behandlung nur bei der palliativen Therapie von Patienten mit sehr guter Konstitution empfohlen (Conroy et al. 2011).

Mittlerweile ist es auch möglich das Pankreaskarzinom laparoskopisch zu resektieren. In einer monozentrischen Studie konnte gezeigt werden, dass diese Methode weniger Komplikationen im Vergleich zur offenen Pankreatektomie und einer kürzeren Hospitalisierungsdauer einherging. Jedoch stellt diese Technik eine höhere Anforderung an den Operateur dar (Shin et al. 2015).

Die Prognose für das Pankreaskarzinom ist nach wie vor sehr schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt derzeit etwa 12 % (Halbrook et al. 2023). Zurückzuführen ist dies auf die oftmals späte Diagnosestellung. Lediglich 20 % der Karzinome befinden sich zu diesem Zeitpunkt in einem Frühstadium und sind chirurgisch therapierbar (He et al. 2014a). Bei Patienten mit chirurgischer Intervention lässt sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf 15 % bis 25 % erhöhen. Hierbei beträgt die 30-Tage-Mortalitätsrate 1 % und die 90-Tage-Mortalitätsrate 4 % nach Duodenopankreatektomie (He et al. 2014a). In 80 % der Fälle kommt es nach radikaler Resektion eines PDA zur Bildung eines Rezidivs. Die Gesamtüberlebenszeit bei Lebermetastasen beträgt dabei bis zu 18 Monate und bei Lungenmetastasen bis zu 40 Monate (Groot et al. 2018).

3.2 NOTWENDIGKEIT DER IN VIVO FORSCHUNG

Krebserkrankungen stellen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar. Im Jahr 2020 verstarben fast zehn Millionen Menschen an einer solchen, was ungefähr jedem sechsten Todesfall entspricht. Viele Krebserkrankungen sind kurativ behandelbar, wenn diese frühzeitig erkannt und wirksam behandelt werden (World Health Organisation WHO 2022). Aus ethischen Gründen beschränkt sich die onkologische Forschung am Menschen meist auf analytische oder deskriptive Studien sowie klinische Therapiestudien (Gengenbacher et al. 2017). In vitro Modelle stellen den Ausgangspunkt für biologische und medizinische Forschung dar (Joshi et al. 2022). Zweidimensionale Zellkulturmodelle sind nicht in der Lage die Hauptmerkmale eines malignen Krankheitsbildes wiederzugeben, weshalb jüngste Forschung dabei ist, die Entwicklung innovativer dreidimensionaler Modelle, wie Organoide zur Untersuchung der pathologi-

schen Mechanismen von Tumoren, voranzutreiben (Siervi und Turato 2023). Weitere Methoden wie Organ-on-a-Chip sind innovative Werkzeuge, um Interaktionen von Zellen in verschiedenen Organen sowie Wechselwirkungen zwischen Immunzellen und Krebszellen zu untersuchen (Mattei et al. 2021). Basierend auf einem dynamischen Kultursystem sind Tumor-on-a-Chip-Modelle in der Lage ein besseres Verständnis des Tumorwachstums und der Metastasierung, durch die Simulation der 3D-Mikrostruktur und der mikrophysiologischen Funktionen menschlicher Organe und Gewebe zu ermöglichen und bieten damit eine attraktive Perspektive für die onkologische Forschung (Liu et al. 2021). Derzeit sind jedoch nur in vivo Versuche geeignet, um die Komplexität neoplastischer Zellen in Wechselwirkung mit verschiedenen Immunzellen und der systemischen Umgebung vollständig darzustellen. Die präklinische Forschung an Mausmodellen stellt daher einen unverzichtbaren Zwischenschritt im Transfer der experimentellen Forschung von der in vitro Forschung zu Humanstudien dar (Gengenbacher et al. 2017).

3.3 TIERMODELLE

3.3.1 IN VIVO TIERMODELLE DES PANKREASKARZINOMS

Die präklinische onkologische Forschung in Mausmodellen basiert am häufigsten auf der Xenotransplantation menschlicher Krebszellen oder der Allotransplantation von Maustumorzelllinien (Kersten et al. 2017). Xenotransplantationsstudien bieten beispielsweise Einblicke in die Mechanismen intrinsischer Resistenzen beim kolorektalen Karzinom (Prahallad et al. 2012) und Allotransplantatmodelle liefern grundlegende Erkenntnisse über Antitumorimmunität, T-Zell-Toleranzmechanismen oder Immunfluchtwege bei Tumoren (Leach et al. 1996). Die Allotransplantation von Mauskrebszelllinien erfolgt dabei syngene, in immunkompetente Tiere. Wo bei die Xenotransplantation in immundefiziente Mäuse erfolgen muss, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern (Kersten et al. 2017). Diese Methode ist daher ungeeignet die Rolle des Immunsystems bei der Tumorgenese zu untersuchen. Tumore von gentechnisch veränderten Mausmodellen zeigen histopathologische und molekulare Merkmale humaner Tumorentitäten. Durch spezifische Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen kann eine reale Tumorprogression in immunkompetenter Umgebung nachvollzogen werden. Dabei weisen die Tumore eine genetische Heterogenität auf und zeigen ein Fortschreiten der Erkrankung bis hin zur Metastasen Bildung (Kersten et al. 2017).

3.3.2 ZIELLINIEN-BASIERTE TIERMODELLE

Zelllinien-basierte Tumormodelle können nach dem Transplantationsort in heterotop, orthotop oder systemisch unterschieden werden (Gengenbacher et al. 2017). Das heterotope, meist subkutane, Tiermodell ist durch eine außeranatomische Lage des Tumors und der Abwesenheit von Metastasen charakterisiert. Die Tumorzellen oder auch Tumorstücke, bei patient derived Xenograft Modellen (PDX) werden meist subkutan in die Flanke der Mäuse implantiert, damit die Tiere durch das Tumorwachstum nicht in Ihrer Motorik eingeschränkt werden (Mittal et al. 2015). Beim orthotopen Modell erfolgt die Tumorprogression im jeweiligen Ursprungsorgan, wobei einige Zelllinien und Tumorentitäten kliniknahe Metastasierungsprozesse zeigen (Gengenbacher et al. 2017). Beim systemischen Modell werden die Tumorzellen zumeist intravenös oder intrasplenisch injiziert, wodurch eine Untersuchung der metastatischen Ausbreitung ermöglicht wird (Mittal et al. 2015; Hackl et al. 2013). Hierbei kommt es jedoch vorwiegend zu einer Zellkolonisierung in der Lunge oder Leber, wodurch sich der Metastasierungsprozess von Primärtumoren nicht realitätsnah abbilden lässt. Zelllinien-basierte Tumormodelle werden mit 60 - 95 % am häufigsten in der präklinischen Forschung verwendet (Gengenbacher et al. 2017). Die genetischen und karzinogen induzierten Modelle sowie die PDX-Modelle finden deutlich weniger Anwendung. Dies ist besonders auf die kostengünstige Durchführung und eine schnelle Tumorprogression zurückzuführen. Genetische Modelle erfordern zudem teure Imaging-Methoden wie Biolumineszenz, MRT oder PET-CT, um ein longitudinales in vivo Monitoring der in vivo Tumorprogression zu ermöglichen (Gengenbacher et al. 2017).

3.4 BELASTUNGSEINSCHÄTZUNG UND REFINEMENT

3.4.1 TIERSCHUTZ IN DER TIEREXPERIMENTELLEN FORSCHUNG

In Deutschland werden die meisten Tierversuche für die Grundlagenforschung sowie für die translationale und angewandte Forschung verwendet (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2018). Für die onkologische Forschung wurden im Jahr 2015 in Deutschland mit 23 % die meisten Tierversuche beantragt, gefolgt von kardiovaskulärer (13 %) und neurologischer Forschung (10 %) (Bert et al. 2017). Tierschutz in der tierexperimentellen Forschung ist in Deutschland aber auch in der Europäischen Union (EU) von großer Bedeutung. Gesetzlich reguliert werden Tierversuche auf nationaler Ebene über das Tierschutzgesetz und die Tierschutz-Versuchstierverordnung sowie durch die europäische Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz von Versuchstieren (Bundesministerium für Justiz 2006; Official Journal of the European Union 2010).

Tierversuche in der EU unterliegen strengen Regularien (Official Journal of the European Union 2010). Tierversuchsvorhaben müssen von Wissenschaftlern beantragt und behördlich genehmigt werden. Nur wenn eine detaillierte Schaden-Nutzen-Analyse erfolgt ist und der Versuch als ethisch vertretbar eingeschätzt wird, kann ein Versuchsvorhaben genehmigt werden. Generell müssen Schmerzen, Leiden, Schäden oder Ängste von Versuchstieren auf ein absolutes Minimum reduziert werden. Zudem müssen Tierversuchsvorhaben streng nach den 3R-Prinzip geplant werden (Official Journal of the European Union 2010). Das 3R-Prinzip wurde 1959 in dem Buch „The Principles of Human Experimentel Technique“ von William Russel und Rex Burch niedergeschrieben. Das Prinzip beschreibt den Leitgedanken der tierexperimentellen Forschung und steht für replace, reduce, refine (Vermeidung, Verringerung und Verbesserung) (Russell, W. M. S., Burch, R. L. 1959). Tierversuche dürfen nur durchgeführt werden, wenn keine andere geeignete wissenschaftliche Methode zur Verfügung steht (replace) und die Anzahl sowie die Belastung der Tiere auf ein unerlässliches Maß beschränkt wird (reduce). Eine kontinuierliche Verbesserung des Tierwohls (refine) sowohl in der Haltung, als auch bei Versuchsvorhaben ist nicht nur Bestandteil der 3R, sondern wird insbesondere seit der Novellierung des Tierschutzgesetzes im Jahr 2021 explizit eingefordert und bei zukünftigen Vorhaben von großer Bedeutung sein (Bundesministerium für Justiz 2006). Um dennoch ausreichend hohe wissenschaftliche Standards zu gewährleisten, sollten die Aspekte des 3R-Prinzips bereits in der Ausarbeitung von Forschungsprojekten fest verankert werden sowie in der Planung und Durchführung berücksichtigt werden (Deutsche Forschungsgesellschaft 2019). Seit 2013 wird eine konsequente Umsetzung des 3R-Prinzipes in der Tierschutz-Versuchstierverordnung vorgeschrieben (Robert Koch Institut 2021).

3.4.2 BELASTUNGSEINSCHÄTZUNG IM TIERVERSUCH

Die EU-Richtlinie 2010/63/EU fordert sowohl eine prospektive und eine retrospektive Belastungseinschätzung durchzuführender Eingriffen, als auch eine Einschätzung der kumulativen Belastung der Tiere im Versuchsvorhaben (Official Journal of the European Union 2010). Die Eingriffe sollen in verschiedenen Schweregraden, keine Wiederherstellung der Lebensfunktion, gering, mittel und schwer, eingeteilt werden. Jede Intervention oder Manipulation ist im Rahmen eines Verfahrens einer Kategorie zuzuordnen. Der jeweilige Schweregrad ist abhängig von Ausmaß und Dauer der voraussichtlich auftretenden Schmerzen, Leiden und Schäden, die die Tiere während der entsprechenden Intervention erfahren. Die EU-Richtlinie bietet im Anhang VIII einige Beispiele für die prospektive Belastungseinschätzung verschiedener Verfahren. So werden operative Eingriffe mindestens als mittlere Belastung eingestuft und Organtransplantationen mit möglichen Abstoßungsreaktionen als schwere Belastung. (Official Journal of the European Union 2010).

Die Beispiele reichen nicht aus, um eine umfangreiche prospektive Belastungseinschätzung für alle möglichen Tiermodelle und Verfahren zu erzielen. Die retrospektive Belastungseinschätzung soll während des Versuches an jedem Tier einzeln über die Evaluation von gesundheitsspezifischen Kriterien erfolgen. In den sogenannten Score-Sheets werden tiermodellspezifische Kriterien definiert um Schmerzen, Leiden und Schäden bei den Tieren zu erkennen und in entsprechende Schweregrade einzuteilen. Hierzu gehören Kriterien wie Körpergewicht (KG), Körpertemperatur, Körperhaltung, Zustand des Fells, Verhalten und Aktivität (Morton und Griffiths 1985; Hawkins et al. 2011). Ein großer Nachteil der Score-Sheets ist, dass die Auswertung der meisten Kriterien immer vom jeweiligen Beobachter abhängig und damit subjektiv ist. Eine Verbesserung sowohl der prospektiven als auch der retrospektiven Belastungseinschätzung ist daher erstrebenswert. So wird empfohlen, neben den meist klinischen Parametern im Score-Sheet, zusätzlich den psychologischen Zustand der Versuchstiere mit Verhaltensparametern zu erfassen und den physiologischen mit Hilfe von Stressparametern, wie Stresshormone und Herzfrequenz, zu analysieren (Hawkins et al. 2011).

Schmerzen aktivieren die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und stimulieren somit die Freisetzung von Kortikosteron (Benedetti et al. 2012). Kortikosteron ist für die Regulierung zahlreicher Stressreaktionen verantwortlich, wodurch sich die Plasmakortikosteron-Konzentration als besonders geeigneter Stressindikator darstellt (Gong et al. 2015; Munck et al. 1984). Eine Erhöhung des Plasmakortikosterons sowie eine Erhöhung der Kortikosteron-metabolite im Kot (FCM) konnte nach akuter und chronischer Stressinduktion und nach chirurgischen Eingriffen nachgewiesen werden (Pfeiffenberger et al. 2015; Sundbom et al. 2011; Benedetti et al. 2012). Stress kann eine Hypertonie induzieren, weshalb auch die Körpertemperatur als wichtiger Belastungsparameter gilt (Brodkin et al. 2002). Bereits das Einsetzen einer rektalen Sonde, als Modell für Angstzustände, kann zu einer stressinduzierten Hypertonie führen (Adriaan Bouwknecht et al. 2007).

Um das Wohlbefinden von Versuchstieren zu analysieren hat sich die Analyse des freiwilligen Buddel- und Nestbauverhaltens in den letzten Jahren etabliert (Deacon 2006a, 2006b). Während eine korrekte Ausführung dieser Verhaltensweisen einen Indikator für das Wohlbefinden bei Nagetieren darstellt, kann eine Reduktion auf neurologische Erkrankungen hinweisen oder Schmerzen und Stress widerspiegeln (Jirkof 2014; Deacon et al. 2005; Jirkof et al. 2013). Ein standardisiertes System zur Verhaltenskodierung von subjektiven Schmerzerfahrungen wurde 2010 von Langford et. al. entwickelt (Langford et al. 2010). Der Mouse Grimace Scale (MGS) ermöglicht die Erkennung von Schmerzen längerer Dauer und wurde bereits in einer Vielzahl präklinischer Schmerztests validiert, wobei der Fokus hierbei hauptsächlich in der Bewertung

von akuten Schmerzen sowie in der Schmerz- und Neurowissenschaftsforschung lag (Whittaker et al. 2021; Langford et al. 2010; Duffy et al. 2016; Almeida et al. 2020).

3.4.3 REFINEMENT-STRATEGIEN FÜR PANKREASKARZINOM-MODELLE

Die datenbasierte Belastungseinschätzung ermöglicht eine realistische Schaden-Nutzen-Analyse für zukünftige Tierexperimente. Um die Aussage der unterschiedlichen Belastungsparameter zu kombinieren, wurden in vielen Studien multivariate statistische Verfahren angewendet. So konnte in einer Studie die Verbindung von Parametern wie Körpergewicht, Buddelverhalten, Nestbauaktivität (N) und FCM mittels multipler logistischer Regression und Youden's Index zeigen, dass ein murines Pankreatitis Modell geringer belastend ist als der operative Eingriff der Laparotomie (Abdelrahman et al. 2019). Anhand von Parametern wie Körpergewicht, Gesundheitsscore (GS) und Buddelverhalten mittels Stützvektor Klassifizierung konnte nachgewiesen werden, dass die Intoxikation mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) eine deutliche geringere Belastung verursacht als das Gallengangligaturmodell (BDL), um Leberzirrhose bei Mäusen zu induzieren (Tang et al. 2020). Hierdurch kann die Belastung der verschiedenen Tiermodelle untereinander verglichen werden, wodurch es möglich ist, zukünftig auf Modelle mit geringerer Belastung zurückzugreifen oder die angewendeten Methoden zu verfeinern.

Ein direkter daten-basierter Belastungsvergleich von verschiedenen Tiermodellen ist mit dem Relative Severity Assessment Score (RELSA) möglich. Mit dem RELSA-Algorithmus können mehrere Belastungsparameter zu einem Score kombiniert werden. Anschließend erfolgt ein Abgleich mit einem Referenzdatensatz. Der Zeitpunkt, an dem die Belastung eines Tieres am höchsten ist, wird als maximaler Relative Severity Assessment Score ($\text{RELSA}_{\text{max}}$) berechnet. Hiermit lässt sich die Belastung von Tiermodellen anhand der individuellen maximalen Schweregrade jedes einzelnen Tieres vergleichen (Talbot et al. 2022). So konnten beispielsweise anhand der Belastungsparameter Körpergewicht, Buddelverhalten und Gesundheitsscore für vier gastrointestinale Tiermodelle, wie Leberzirrhose mittels CCl_4 Intoxikation, PDA, Cerulein induzierte Pankreatitis und Gallengangligaturmodell eine Reihenfolge des Schweregrades erstellt werden (Talbot et al. 2023). In einer anderen Studie zur Induktion von Depressionen bei Mäusen konnte mit dem RELSA und den Input-Variablen Buddelaktivität, Körpergewicht und FCM gezeigt werden, dass die Supplementierung von Kortikosteron in der Ernährung das Wohlbefinden stärker beeinflusst, als Immobilisierung oder die genetische Veränderung mittels GluA1-Knockout (Mallien et al. 2022).

Eine Analgesie bei onkologischen Tiermodellen ist gesetzlich vorgeschrieben und beugt Schmerz als Stressor vor (Bundesministerium für Justiz 2006). Schmerzen und Stress beeinflussen nachweislich die Tumorprogression und haben somit einen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse (Kim et al. 2018). Die datenbasierte Belastungsanalyse ist daher auch besonders geeignet, die Wirksamkeit verschiedener Analgetika zu testen, wodurch zukünftige eine optimale Schmerzausschaltung zu gewährleisten ist. So konnte mit den Parametern Trinkwasseraufnahme, Nahrungsaufnahme, Körpergewicht, MGS, Nestbauaktivität sowie einen modellspezifischen Schmerzscore in einem Maus-Osteotomie Modell gezeigt werden, dass eine hohe Konzentration von Tramadol die Analgesie im Vergleich zu niedrig dosiertem Tramadol und Buprenorphin nicht verbessert, sich jedoch negativ auf das Wohlbefinden der Tiere auswirkt (Jirkof et al. 2019). In einer anderen Studie konnte durch Messung von Körpergewicht, Nahrungsaufnahme, Buddelaktivität, Nestbauaktivität, MGS, Frey-Test sowie FCM nach Laparotomie gezeigt werden, dass Mäuse, die mit einer Kombination aus lokalem Bupivacain und Lidocain und systemischen Paracetamol im Vergleich zur alleinigen lokalen oder systemischen Therapie nicht weniger postoperative Schmerzen oder eine verbesserte Genesung zeigten (Durst et al. 2021b). Bei einer Studie zur Cerulein induzierten Pankreatitis wurde durch Bewertung der Parameter Gewichtsveränderung, Wasseraufnahme, Buddelverhalten, MGS sowie FCM herausgefunden, dass durch Trinkwasser aufgenommenes Buprenorphin einen Wirkungsvorteil gegenüber Paracetamol in Kombination mit Tramadol und Metamizol bei der Analgesie hat (Durst et al. 2021a).

Für die Translation von tierexperimentellen onkologischen Studien und deren Ergebnissen in die humane Krebstherapie, ist die Gesamtüberlebenszeit der Tiere einer der wichtigsten Parameter (Prasad et al. 2015). Ein Refinement in Überlebensstudien erfordert die Etablierung früher humaner Endpunkte (hEP). Die datenbasierte Belastungsanalyse ermöglicht eine retrospektive Evaluierung von Parametern, die zur Bestimmung von frühen humanen Endpunkten genutzt werden können. In einer Studie konnte mit Hilfe von Algorithmen zum maschinellen Lernen und Daten zum Körpergewicht, Körpertemperatur und verschiedenen klinischen und neurologischen Scores gezeigt werden, dass Mäuse mit erhöhtem Sterberisiko, in einem Sepsis- und Schlaganfallmodell, frühzeitig identifiziert werden können (Mei et al. 2019). In einer retrospektiven Studie wurden die Parameter Körpergewicht, klinischer Score sowie Buddelaktivität und Nestbauaktivität, anhand eines Mausmodells zur Gallengangsligatur, mittels Cox-Regression und Konkordanz-Index nach Harrell analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein Körpergewichtsverlust von 10-20 % in Kombination mit einer Reduktion der Buddelaktivität einen frühen hEP innerhalb von zwei Tagen vorhersagen kann (Zhang et al. 2020). Die Anwendung solcher oder ähnlicher Ansätze können langfristig zum Refinement verschiedener Tierversuche beitragen.

IV. ZIELSTELLUNG

Ziel der experimentellen Studie war ein direkter Vergleich der Belastung verschiedener Pankreaskarzinommodelle in Mäusen anhand einer datenbasierten Belastungsbeurteilung. Zusätzlich wurde analysiert, welche der erhobenen Belastungsparameter sich zur Bestimmung von frühen humanen Endpunkten eignen, um die Qualität zukünftiger onkologischer in vivo Forschung unter Berücksichtigung der geltenden Tierschutzbestimmungen zu erhöhen.

V. MATERIAL UND METHODEN

5.1 IN VIVO VERSUCHE

5.1.1 VERSUCHSTIERE UND ZELLINIEN

Die in vivo Versuche wurden gemäß §8 Tierschutzgesetz unter den Aktenkennzeichen 7221.3-1-010/21 von dem Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Verwendet wurden männliche und weibliche C57BL/6J Mäuse mit einem Ausgangskörpergewicht zwischen 19,1 g und 32,6 g sowie einem Alter zwischen 16 und 21 Wochen. Zur Induktion der Tumore wurden murine Panc02-Zellen verwendet, welche uns vom National Cancer Institute zur Verfügung gestellt wurden.

Panc02-Zellen haben die Eigenschaft zu migrieren und zu proliferieren. Dabei haben sie ein unregelmäßiges, fingerartiges Wachstum und zeigen histologisch ein sarkomartiges, undifferenziertes Wachstumsmuster, womit sie das menschliche Adenokarzinom des Pankreas sehr gut nachahmen können (Partecke et al. 2011). Die Zellen wurden in Vorbereitung auf bis zu 90 % Konfluenz wachsen gelassen (Medium: RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10 % FCS, 1x PEN/Strep). Das Medium wurde anschließend entfernt und einmalig mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 2 ml Trypsin/EDTA gelöst. Das Trypsin wurde anschließend mit 10 ml Medium neutralisiert und die Zellen anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 3 min). Die ausgezählten Zellen wurden danach zusammen in PBS (subkutane und intravenöse Modell), beziehungsweise PBS und Matrigel für das orthotope Tumormodell (Verhältnis 1:1) aufgenommen (**Tab. 1**, siehe Anhang) und vor dem Injizieren auf Eis gelagert. Das Matrigel, härtet bei Körpertemperatur aus und verhindert dadurch eine Peritonealkarzinose (Partecke et al. 2011). Die Injektion erfolgte nach Tabelle an drei experimentellen Gruppen, dem orthotopen (n=9), dem subkutanem (n=9) und dem intravenösen Tiermodell (n=8).

5.1.2 ZELLINIEN -BASIERTE TIERMODELLE

5.1.2.1 ORTHOTOPES TIERMODELL

Beim orthotopen Tiermodell erfolgte zunächst präoperativ die Messung und die Dokumentation der Ausgangsgewichte der Versuchstiere. Die anschließende Narkose wurde inhalativ mit Isofluran (Sedaconda® 100 vol.%, Sedana Medical AB, Schweden) durchgeführt. Initial wurden die Mäuse mit Isofluran 2,5 vol.% in einer Narkosebox anästhesiert und die Narkose anschließend mit Isofluran 1,2 vol.% über eine Maske aufrechterhalten. Als Trägergase wurden O₂ (0.8 L/min) und N₂O (1.6 L/min) verwendet. Zunächst erfolgte eine Befeuchtung der Augen mittels Augensalbe. Die Lagerung erfolgte auf dem Rücken auf einer Heizplatte. Dann folgte eine Nassrasur des Bauches sowie eine Hautdesinfektion (Skinsept® F, Ecolab Deutschland GmbH, Monheim a. Rhein, Deutschland). Als perioperative Analgesie wurde 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) subkutan appliziert.

Anschließend wurde der Bauchraum knapp unterhalb des Brustkorbes mittels Querlaparotomie eröffnet. Die duodenalen Darmschlingen wurden einschließlich Pankreas mit Wattestäbchen hervordrückt. Es folgte die Injektion von 5 µl Zellsuspension (1×10^4 Panc02 Zellen in 1:1 PBS / Matrigel (354248, Corning, Inc., New York, USA) mittels Hamilton Spritze (Reno, Nevada). Die Hamilton Spritze verblieb 20 Sekunden im Pankreasgewebe, bevor diese zurückgezogen wurde. Mit einem Wattestäbchen wurde überprüft, ob Injektionsflüssigkeit aus dem Pankreas ausgetreten war und das Ergebnis anschließend im Protokoll notiert. Abschließend erfolgte der zweischichtige Wundverschluss, muskulär mittels fortlaufender Vicryl rapid (Johnson & Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ) Naht und kutan mittels Einzelknopfnäht mit Prolene (Johnson & Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ) sowie die Hautdesinfektion.

Postoperativ wurden die Mäuse bis zum Aufwachen mittels Rotlichtlampe warmgehalten. Der Tszustand wurde mittels Score-Sheet (**Tab. 2**, siehe Anhang) nach 30 Minuten überprüft. Zur Analgesie erhielten die Mäuse zwölf Tropfen 500 mg/ml Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm®, Ulm, Germany) in 100 ml Trinkwasser im gesamten weiteren Verlauf und bereits ab einer Woche vor Intervention. Dies entspricht einer Konzentration von 3 mg/ml.

5.1.2.2 SUBKUTANES TIERMODELL

Analog zum orthotopen Tiermodell wurde vor der Injektion bei den subkutanen Mäusen zunächst das Ausgangskörpergewicht bestimmt und protokolliert. Die initiale Anästhesie und die Behandlung mit Augensalbe erfolgten analog zum orthotopen Modell. Die Tiere wurden in Bauchlage auf der Heizplatte gelagert. Dann wurden die Flanken beidseits nassrasiert und anschließend desinfiziert.

Die Injektion der Zellsuspension (5×10^5 Panc02 Zellen in 100 μ L PBS) erfolgte beidseits, indem die Cutis mit einer Pinzette angehoben wurde und anschließend die Nadel (30G) einer Insulinspritze (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) subkutan eingeführt wurde. Nach der vollständigen Injektion verblieb die Nadel für 20 Sekunden subkutan und wurde anschließend herausgezogen. Mit einem Wattestäbchen wurde überprüft, ob Suspensionslösung entwichen war. Abschließend wurden die Einstichstellen desinfiziert.

Nach der Injektion wurden die Mäuse wieder analog zum orthotopen Tiermodell mittels Rotlichtlampe warmgehalten. Der Gesundheitszustand wurde nach 30 Minuten überprüft. Zur Analgesie erhielten die Mäuse zwölf Tropfen 500 mg/ml Metamizol in 100 ml Trinkwasser im gesamten weiteren Verlauf.

5.1.2.3 INTRAVENÖSES TIERMODELL

Auch beim intravenösen Tiermodell erfolgte die Vorbereitung und die Narkose mit Isofluran analog zu den beiden anderen Modellen. Die Lagerung der Maus auf der Heizplatte erfolgte seitlich.

Nach kurzer Desinfizierung und Erwärmung des Schwanzes auf einer Heizplatte, wurde die Schwanzvene mit einer 30 G Kanüle (BD, Franklin Lakes, NJ) punktiert, anschließend unter Sichtkontrolle die Zellsuspension (1×10^6 Zellen in 50 μ L PBS) über einen circa 10 cm langen Katheter (ICU Medical, Inc., San Clemente, CA) langsam injiziert und mit 20-30 μ L NaCl 0,9 % (Burg Pharma GmbH, Bernburg, Deutschland) nachgespült. Nach dem Herausziehen der Nadel wurde die Injektionsstelle optisch überprüft und die Blutung mittels Kompression gestillt. Anschließend wurde die Einstichstelle nochmals desinfiziert.

Analog zu den beiden anderen Tiermodellen, wurden die Mäuse vor der Wärmelampe gelagert, die Gesundheit nach 30 min überprüft und analgetisch mit Metamizol behandelt.

5.2 BELASTUNGSANALYSEN

5.2.1 PHYSIOLOGISCHE PARAMETER

Der physiologische Zustand der Versuchstiere wurden über die Parameter Körpergewichtsänderung, Gesundheitsscore, perianale Temperatur (pTemp) und MGS evaluiert. Täglich wurde das Körpergewichts morgens dokumentiert. Die Körpergewichtsänderung wurde prozentual zum Ausgangswert bestimmt.

Der Gesundheitsscore wurde ebenfalls täglich morgens ermittelt. Die Tiere wurden hierfür in ihrem Heimatkäfig beobachtet und es wurde geprüft, ob sie gesundheitliche Einschränkungen aufwiesen. Das Score-Sheet setzt sich aus Kriterien wie Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten, Fluchtverhalten bei Berührung und verfahrensspezifische Kriterien zusammen (**Tab. 2**, siehe Anhang).

In der detaillierten Belastungsanalyse wird die nicht-invasive perianale Temperatur erhoben. Die Tiere wurden auf den Käfigdeckel gesetzt und die perianale Temperatur mit dem kontaktlosen Infrarot-Thermometer (apornorm®, WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co KG, Hilscheid, Deutschland) dreimal gemessen (Mei et al. 2018) und anschließend für den jeweiligen Tag der Mittelwert errechnet.

Der MGS wurde entsprechend der Studie von Langford et al. durchgeführt (Langford et al. 2010). Die Mäuse wurden hierfür in eine farblose Plexiglasbox (9×5×5 cm) gesetzt. Der Hintergrund der Box wurde einheitlich Weiß gehalten und die Box wurde zusätzlich mit Weißlicht beleuchtet. Nach einer Eingewöhnung von fünf Minuten, wurden die Mäuse für weitere fünf Minuten in dieser Box mit einer Kamera (Canon EOS 70D, Tokyo, Japan) gefilmt. Von einer fünfminütigen Videoaufnahme wurden drei Bilder je Maus ausgeschnitten und randomisiert. Anschließend wurden die Bilder von drei verschiedenen Mitarbeitern verblindet gescort. Die Gesichtsausdrücke der Mäuse wurde entsprechend dem Punkte System von Langford et. al. (Langford et al. 2010) nach den fünf Parametern „Orbital tightening“, „Nose bulge“, „Cheek bulge“, „Ear position“ und „Whisker change“ mit 0, 1 oder 2, je nach Stärke der Ausprägung bewertet. Der Summenscore der drei Mitarbeiter wurde anschließend gemittelt und auf den Baselinewert der entsprechenden gesunden Maus normalisiert.

5.2.2 VERHALTENSPARAMETER

Das Nestbauverhalten wurde analysiert, indem ein bis zwei Stunden vor der Dunkelphase ein Baumwollnestlet (5x5 cm, ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland) in den Heimatkäfig gegeben wurde. Das übrige Nestmaterial wurde dabei entfernt. Die Qualität des Nestbaues wurde am nächsten Morgen anhand einer 5-Punkte Skala von Deacon et. al (Deacon 2006a) bewertet, zusätzlich zu dem Score von Deacon wurde ein Score von 6 für ein perfektes Nest vergeben, wenn das Nest einem Krater gleicht und 90 % des Umfanges höher ist als die Körperhöhe der Maus ist.

Um das Buddelverhalten der Mäuse zu evaluieren, wurde entsprechend dem Protokoll von Deacon et. al (Deacon 2006b) eine Röhre (15 cm x 0,03 cm x 6,5 cm, der Eingang ist 2,5 cm erhöht, hinten ist die Röhre geschlossen) mit 200 g Pellets (10 mm, ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gefüllt und zwei bis drei Stunden vor der Dunkelphase in den Heimatkäfig gegeben. Die Menge an gebuddelten Pellets wurde nach zwei Stunden und am nächsten Morgen evaluiert.

5.2.3 HORMONELLE PARAMETER

Im Kot wurde die Konzentration des Kortikosterons bestimmt, indem die Mäuse in den Tagen vor der geplanten Belastungsanalyse, in einen Käfig mit frischem Einstreu, umgesetzt worden sind. Nach 24 Stunden wurde der Kot gesammelt, für vier Stunden bei 65 °C getrocknet und anschließend bei -20 °C aufbewahrt. Jeweils 50 mg des getrockneten Kots wurden anschließend mit 1 ml 80 vol.% Methanol extrahiert und anschließend mit einem 5 α -Pregnan-3 β ,11 β ,21-triol-20-on-Enzymimmunoassay von unserem Kooperationspartner Prof. Rupert Palme (Veterinärmedizinische Universität Wien) analysiert (Touma et al. 2004).

Zur Analyse der Kortikosteron-Konzentration im Plasma wurden Prä-OP, zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Tumorprogression und am humanen Endpunkt das Blut der Mäuse retrobulbär entnommen. Hierfür narkotisierten wir die Maus inhalativ für ungefähr zwei Minuten mit Isofluran 4-5 vol.%. Sobald die entsprechende Narkosetiefe erreicht worden war, stauten wir den retrobulbären Venenplexus und entnahmen 100-150 μ l Blut mit einer Glaskapillare. Das entnommene Blut wurde in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen und anschließend zentrifugiert (1200 g für 10 min bei 4 °C), Das Blutplasma wurde abpipettiert und bei -80 °C gelagert. Abschließend wurden die Plasmakortikosteron-Konzentrationen der gesammelten Proben mit einem ELISA-Kit (DEV9922, Demeditec Diagnostics GmbH, Erfurt, Deutschland) bestimmt. Hierfür wurden je 10 μ l Plasma und Kalibrator gemischt und anschließend mit jeweils

100 µl Inkubationspuffer und 50 µl Enzymkonjugat (Kortikosteron konjugiert mit Meerrettichperoxidase) in eine 96-Well Platte gegeben. Nach zweistündiger Inkubation auf der Mikroplatte wurde die Probe mit je 300 µl Waschlösung viermal gespült und anschließend mit 200 µl Substratlösung (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einer gepufferten Matrix) versetzt. Nach dreißig-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion mit einer Salzsäurelösung gestoppt und anschließend die Absorption bei 450 nm bestimmt. Die Kortikosteron-Konzentration verhält sich umgekehrt proportional zur gemessenen Dichte und konnte anschließend anhand der Kalibrierungskurve berechnet werden.

5.2.4 VERSUCHSAUFBAU

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Haltung der Versuchstiere geschlechtergetrennt mit jeweils zwei bis vier Tieren in Typ III Käfigen (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland) in der chronischen Haltung. Nach der Eingewöhnungsphase wurden die Tiere in Typ III Käfigen bis zum Ende des Experimentes separiert, damit die Verhaltensanalysen akkurat durchgeführt werden konnten.

Vor den Tumorzellinjektionen erfolgte bei allen drei Tiermodellen die Erhebung aller Belastungsparameter an gesunden Tieren. Die Baselinewerte wurden in Form von KG, GS, perianaler Temperatur, Buddelaktivität nach zwei Stunden (B2h) und über Nacht (BüN), Nestbauverhalten in Form des Nestingscores und Konzentration des Plasmakortikosterons quantifiziert. Zudem erfolgte eine Gewöhnung an die Mausboxen zur Erhebung des Mouse Grimace Scales.

Während des gesamten Ablaufes wurden die Parameter Körpergewichtänderung und Gesundheitsscore kontinuierlich täglich ermittelt. Die detaillierten Belastungsanalysen erfolgten durch die Parameter perianale Temperatur, B2h und BüN, Nestbauaktivität, MGS-Analyse, der Kortikosteronmetabolite im Kot und der Kortikosteron Konzentration im Plasma direkt am Operationstag und an den drei postoperativen Tagen während der OP-Phase sowie modellspezifisch zu drei Zeitpunkten der Tumorprogressionsphase (früh, mittel, spät, **Abb. 2**). Zur Ermittlung des individuellen Endpunktes wurden die Belastungsparameter bis zum Tag des humanen Endpunktes täglich erhoben, sobald ein Kriterium laut Score-Sheet auftrat oder das Tier mehr als 5 % Gewicht zum Vortag verloren hat (**Tab. 2**). Die Tiere wurden entsprechend der Abbruchkriterien im Score-Sheet, unter Isofluran Narkose, schmerzfrei durch zervikale Dislokation euthanasiert.

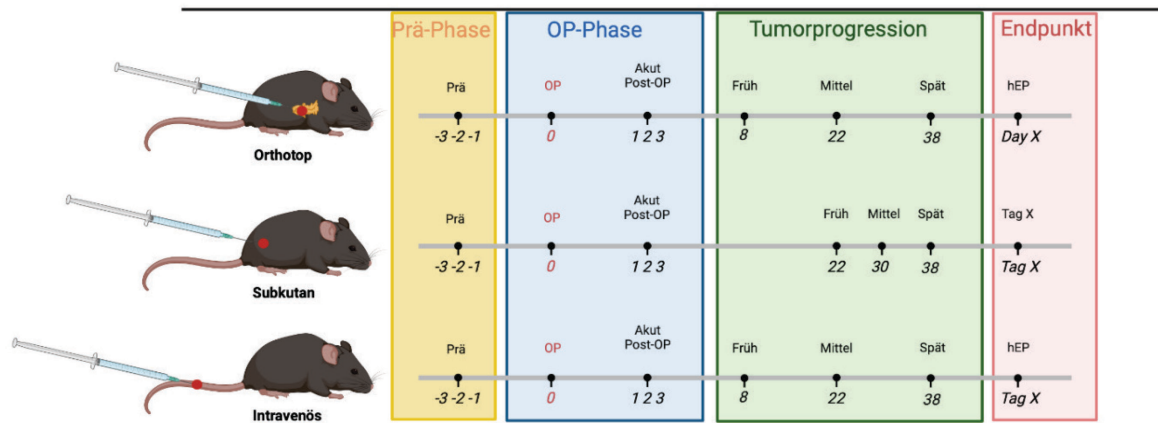


Abb. 2.: Versuchsaufbau zur evidenzbasierten Belastungsbeurteilung von verschiedenen Pankreaskarzinommodellen. In der Prä-Phase wurde die Belastung an den Tagen -3 bis -1 vor jedem Eingriff an den gesunden Mäusen erfasst. Zusätzlich erfolgte die Belastungsanalyse am Tag nach der Tumorzellinjektion (OP) und an den post-operativen Tagen 1-3 (Akut Post-OP), zur frühen, mittleren und späten Phase während der Tumorprogression sowie an den Tagen vor dem individuellen humanen Endpunkt jedes Tieres. Die Grafik wurde erstellt mit BioRander.com

5.3 MONITORING DES TUMORWACHSTUMS

5.3.1 PET-CT BILDGEBUNG

Um die individuelle Belastung mit der Tumorgöße oder der Metastasen-Progression zu korrelieren, wurde beim orthotopen Mausmodell ein longitudinales Tumorimaging mittels PET-CT (Inveon PET-CT Siemens, Knoxville, TN) durchgeführt. Durch die PET-CT Bildgebung können Informationen über Tumorwachstumsmerkmale wie Stoffwechsel, Hypoxie oder Proliferation gewonnen werden. Eine Integration des Tracers ^{18}F -Fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) ermöglicht die Detektion des metabolisch aktiven Tumorgewebes (Fonti et al. 2019). Der Tracer fungiert als Glucose-Analogon und reichert sich im metabolisch aktiven Gewebe an, wird aber nicht weiter verstoffwechselt. Das Monitoring erfolgte zur mittleren und späten Phase der Tumorprogression. Hierfür wurden die Mäuse zunächst mittels Inhalation von Isofluran 2,5 vol.% anästhesiert und anschließend circa 15 MBq des ^{18}F -FDG über die Schwanzvene injiziert. Eine Stunde später erfolgte die statische PET-CT Aufnahme für 15 Minuten. Die Körpertemperatur der Mäuse wurde dabei mittels Heizplatte aufrechterhalten. Durch die ^{18}F -FDG Aufnahme (Prozent injizierte Dosis pro Gramm Körpergewicht) wurde das metabolische Tumervolumen

(met. Vol.; 30 % des hottest Voxel) mit dem Programm Inveon Research Workplace (Siemens Healthcare AG, Zürich, Schweiz) ermittelt.

5.3.2 MESSUNG MIT DER SCHIEBELEHRE

Sobald ein Tumor beim subkutanen Modell optisch erkennbar war, wurde zweimal wöchentlich, jeweils montags und freitags, die Tumorgrößenbestimmung mittels Schiebelehre durchgeführt. Hierfür anästhesierten wir die Mäuse initial mittels Isofluran 2,5 vol.% und erhielten anschließend die Kurznarkose mit Isofluran 1,2 vol.% unter Maske aufrecht. Die Lagerung erfolgte in Bauchlage auf einer Heizplatte. Länge (L) und Breite (B) des Tumors wurde anschließend mit der Schiebelehre bestimmt. Die erhaltenen Messungen wurden dokumentiert und final zur Bestimmung des Tumolvolumens verwendet. Das Tumolvolumen (Vol.) wurde entsprechend der Formel $V = 0.52 \times L \times B^2$ berechnet (Jensen et al. 2008). Bis zum Wiedererwachen wurden die Mäuse auf der Seite gelagert und mit einer Rotlichtlampe gewärmt. Zum Abschluss erfolgte eine kurze Überprüfung der Gesundheit.

5.4 HISTOLOGIE

Zur Quantifizierung der Lungenmetastasen wurde das entnommene Lungengewebe in 4 vol.% Paraformaldehyd (Grimm med Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) in einer Gewebekassette (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Deutschland) fixiert, anschließend in einen Präparate-Korb (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Deutschland) mit Leitungswasser gespült und in einem Entwässerungsautomaten (Leica TP1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Deutschland) in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Paraffin (Paraplast Plus, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Deutschland) eingebettet. Danach wurde das Gewebe in vier µm dünne Schichten seriell geschnitten und jeder achte Lungenschnitt auf einen Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit final drei Lungenschnitten überführt. Die anschließende Trocknung erfolgte bei 65 °C für zwei Stunden. Danach wurden die Gewebeschnitte in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Die Übersichtsfärbung erfolgte mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung und wurde abschließend unter Raumluft getrocknet.

Die fertigen Objektträger wurden vor der mikroskopischen Betrachtung von einer dritten Person verblindet. Mikroskopierte wurde an einem Mikroskop der Firma Carl Zeiss AG (ZEN 3.3 Blue Edition, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), mit einem Objektiv in 1,25-facher Vergrößerung. Alle ersichtlichen Metastasen wurden fotografiert und anschließend digital mit der Objektträgernummer abgespeichert.

Die Quantifizierung der Metastasen erfolgte mit dem Programm QuPath 0.4.3. Hier wurden die Metastasen über eine Region of Interest (ROI) markiert und anschließend die Fläche der Metastasen pro Lungenschnitt evaluiert. Protokolliert wurden pro Objektträger und pro Lunge die Anzahl der einzelnen Metastasen und die Gesamtfläche dieser. Nach der abschließenden Entblindung wurden die Ergebnisse den einzelnen Tieren zugeordnet und die Gesamtanzahl der Metastasen sowie die Gesamtfläche derer pro Tier errechnet.

5.5 STATISTIK

Die primär erfassten Daten wurden zur elektronischen Datenverarbeitung in das Programm Excel 16.83 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) überführt. Die anschließende statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA). Für die Abbildungen 3 - 5 sind die Daten als Punkplot mit Median $\pm$ 95 % Konfidenzintervall, oder mittels Überlebenskurven dargestellt. Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk Test geprüft. Der Vergleich von Tumorgroße, Tumorgewicht und Lungenmetastasen zwischen den Geschlechtern erfolgte bei Annahme der Normalverteilung mittels ungepaarten T-Test beziehungsweise Mann Whitney Test. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant erachtet. Unterschiede bei den Überlebenskurven wurden mittels Log-rank Test quantifiziert. Die Daten der Abbildungen 6 - 8 wurden als Box-Plot-Diagramm mit Median $\pm$ 95 % Konfidenzintervall visualisiert. Der Geschlechtervergleich erfolgte mittels TWO-Way-ANOVA, gefolgt von einem Dunnett-Test zum prä-Wert-Vergleich und einem Tukey-Test zur Unterschiedserfassung zwischen den Tiermodellen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Weitere Unterscheidungen hinsichtlich des Signifikanzniveaus wurden nicht vorgenommen.

Mittels RELSA Algorithmus konnte der individuelle maximale Schweregrad eines Tieres über den gesamten experimentellen Zeitraum ermittelt werden. Hierüber wurde der Schweregrad der verschiedenen Tiermodelle (**Abb. 9**) verglichen und der belastungsabhängige Geschlechtervergleich innerhalb jedes Tiermodells (**Abb. 10**) durchgeführt. Der RELSA wurden mit dem RELSA R-package (<https://talbotsr.com/RELSA/index.html>) von unserem Kooperationspartner Steven R. Talbot (Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt. Für den RELSA wurden die Variablen Körpergewicht, Buddeln und Gesundheitsscore, zu den Zeitpunkten vor und nach der Intervention sowie in der frühen, mittleren und späten Phase der Tumorprogression, verwendet. Diese Input-Variablen wurden gegen einen Referenzdatensatz zur Transmitterimplantation in Mäusen von einer vorherigen Studie gewichtet (Kumstel et al. 2020a; Talbot et al. 2023). Der Zeitpunkt mit der höchsten Belastung eines Tieres im Experiment wurde als $RELSA_{max}$ berechnet. Die $RELSA_{max}$ Werte innerhalb eines Tiermodells wurden 10.000-fach

gebootstrappt und die Daten als Median und 95 % Konfidenzintervallen dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Tiermodellen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und geschlechterspezifische Unterschiede mittels ANOVA bestimmt.

Die Aussagekraft der einzelnen Belastungsparameter wurde hinsichtlich der Prognose eines frühen humanen Endpunktes für die unterschiedlichen Tiermodelle (**Abb. 11**) mittels Grenzwertoptimierungskurve (ROC) berechnet. Diese stellt die relative Häufigkeitsverteilung der Sensitivität und Spezifität der einzelnen Parameter dar. Hierfür wurden die Tage vor beziehungsweise am humanen Endpunkt mit den Prä-Werten der einzelnen Parameter vor Intervention verglichen. Bei der ROC-Analyse wird auf die X-Achse die falsch-positiv Rate und auf die Y-Achse die richtig-positiv Rate aufgetragen und anschließend die Area under the Curve (AUC) berechnet. Die Fläche der AUC spiegelt die Leistungsfähigkeit des Parameters wider, zwischen gesundem und krankem Tier zu unterscheiden.

VI. ERGEBNISSE

6.1 GESCHLECHTERVERGLEICH BEI DER TUMORPROGRESSION

6.1.1 ORTHOTOPES TIERMODELL

Die orthotope Tumorzellinjektion führte zu einer einhundertprozentigen Anwachsrate von Pancreastumoren bei allen Tieren. Die durchschnittliche Überlebenszeit bis zum Erreichen des hEP, entsprechend den Abbruchkriterien im Score-Sheet (**Tab. 2**) betrug 46,6 Tage. Dabei erreichten die weiblichen Tiere eine durchschnittliche Überlebenszeit von 50 Tagen und die männlichen Tiere eine durchschnittliche Überlebenszeit von 42,3 Tagen, wobei die unterschiedliche durchschnittliche Überlebenszeit nicht signifikant war (**Abb. 3A**). Das mittlere Tumorgewicht zum individuellen hEP betrug 736 mg, wobei die weiblichen Tiere im Vergleich zu den männlichen Tieren mit 923,6 mg zu 501,5 mg ein signifikant größeres Tumorgewicht aufwiesen (**Abb. 3B**). Dennoch ergab die zeitgleiche Quantifizierung des metabolischen Tumorsvolumens (30 % der hottest Voxel) bei beiden Geschlechtern, mittels PET-CT und dem Tracer ^{18}F -FDG zum mittleren und späten Zeitpunkt der Tumorprogression, keinen signifikanten Unterschied (**Abb. 3C, Abb. 3D**).

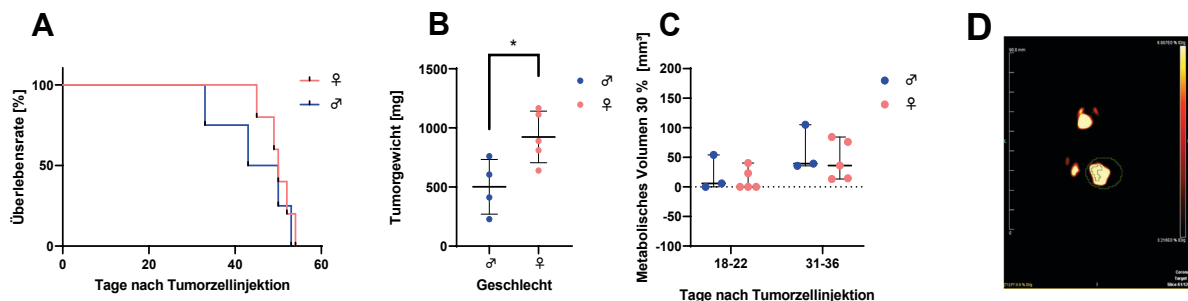


Abb. 3.: Geschlechtervergleich zur Tumorprogression im orthotopen Mausmodell. Quantifizierung der Überlebensrate nach Tagen der Tumorzellinjektion (A). Darstellung der Tumorlast über das Tumorgewicht zum Endzeitpunkt (B) und das metabolische Tumorsvolumen 30 % zu zwei Messzeitpunkten (C), ermittelt durch ^{18}F -FDG Bildgebung im PET-CT (D). Geschlechtsspezifische Unterschiede beim Tumorgewicht wurden mittels ungepaarten T-Test bestimmt (* $p \leq 0.05$, $n = 3 - 5$).

6.1.2 SUBKUTANES TIERMODELL

Bei allen untersuchten Mäusen sind jeweils zwei Tumore (einer in jeder Flanke) angewachsen. Die durchschnittliche Überlebenszeit bis zum Erreichen des hEP betrug laut Score-Sheet Kriterien (**Tab. 2**) 63,8 Tage. Dabei erreichten die weiblichen Tiere eine durchschnittliche Überlebenszeit von 63 Tagen und die männlichen Tiere eine durchschnittliche Überlebenszeit von 64,8 Tagen (**Abb. 4A**). Zwischen den Geschlechtern gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Tumorprogression ermittelt über das gemittelte Tumolvolumen (**Abb. 4B**) und dem Tumorgewicht zum individuellen Endzeitpunkt (**Abb. 4C**). Das mittlere Tumorgewicht zum individuellen humanen Endpunkt ergab 290,8 mg, das mittlere Tumorgewicht bei den Männchen betrug 346,1 mg und bei den Weibchen 246,6 mg (**Abb. 4C**). Die Tiere wurden alle aufgrund einer leichten Tumorulzeration zwischen den Tagen 51 und 77 schmerzfrei euthanasiert (**Abb. 4D**). Dabei zeigten diese ein vermehrtes Kratzen des Tumors, waren jedoch in Ihrer Motorik nicht eingeschränkt.

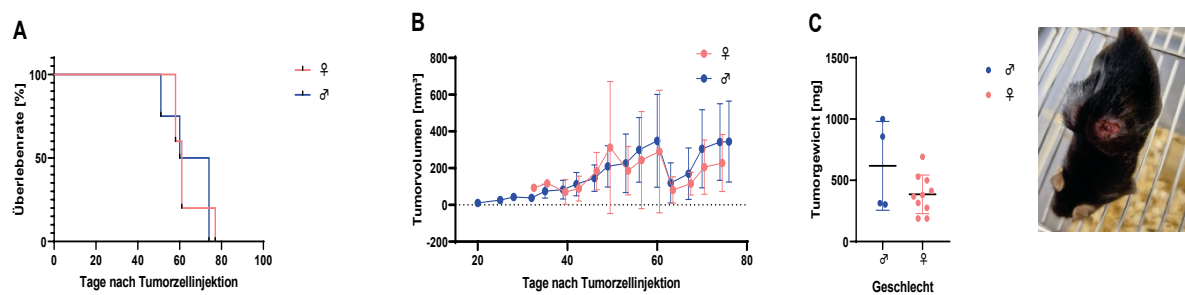


Abb. 4.: Geschlechtervergleich zur Tumorprogression im subkutanen Tiermodell. Darstellung der Überlebensrate (A), des Tumolvolumens über den Zeitraum der Tumorprogression (B) sowie die Gewichte beider subkutaner Flankentumore zum Endzeitpunkt (C) in männlichen und weiblichen Mäusen. Beispielbild eines ulzerierten, subkutanen Tumors bei der Maus, als direktes Abbruchkriterium (D) (n = 4 - 5 Mäuse; n = 8 - 10 Tumore).

6.1.3 INTRAVENÖSES TIERMODELL

Die intravenöse Injektion der Tumorzellen führte bei allen Mäusen zu einer Tumorzellkolonisierung in der Lunge. Die durchschnittliche Überlebenszeit bis zum Erreichen des hEP betrug 63,3 Tage. Dabei erreichten die weiblichen Tiere eine durchschnittliche Überlebenszeit von 55 Tagen und die männlichen Tiere von 68,5 Tagen (**Abb. 5A**). Zwischen Männchen und Weibchen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Quantifizierung von Metastasen in der Lunge. Das Verhältnis von Lungen- zu Körpergewicht war im Vergleich zu gesunden Tieren deutlich höher, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern zeigte (**Abb. 5B**). Die Anzahl der gezählten Metastasen ergab im Durchschnitt 3,4 pro Schnitt, bei den Männchen 3,8 und bei den Weibchen 2,8 (**Abb. 5C**). Die Fläche der Metastasen verhielt sich analog und erreichte $3,15 \times 10^7 \mu\text{m}^2$, wobei die männlichen Tieren $4,35 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ im Vergleich zu den weiblichen Tieren mit $1,55 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ eine größere Metastasenfläche aufwies (**Abb. 5D**). Die Metastasen wurden am histologisch aufgearbeiteten und gefärbten Präparat ausgewertet. (**Abb. 5E**).

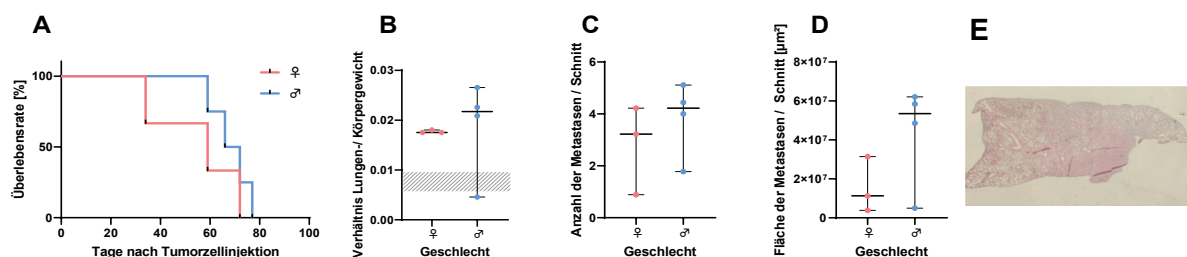


Abb. 5.: Geschlechtervergleich zur Tumorprogression im intravenösen Mausmodell. Quantifizierung der Überlebensrate (A), Darstellung der Metastasenlast durch das Verhältnis Lungen- zu Körpergewicht (B, grauer Bereich zeigt den durchschnittlichen Lungen-/Körpergewichtsindex von gesunden Mäusen), die Anzahl der Metastasen (C) sowie die Fläche der Metastasen (D) pro Hämatoxylin-Eosin gefärbten Lungenschnitt (E) werden dargestellt (n = 3 - 4).

6.2 TIERMODELLE IM VERGLEICH

6.2.1 POSTOPERATIVE PHASE

Die Belastungsparameter wurden auf geschlechtsspezifische Unterschiede während der Tage vor und nach Tumorzellinjektion untersucht. An wenigen Zeitpunkten (7 von 120) zeigten sich signifikante Unterschiede bei den Parametern perianale Temperatur, Buddelverhalten und FCM (**Tab. 3, Tab. 4, Tab. 5**). Aufgrund der geringen Anzahl an signifikanten Unterschieden wurden die Daten von Männchen und Weibchen bei den folgenden Analysen zusammengefasst.

Präoperativ war die Körpergewichtsänderung der Tiere für das intravenöse Modell signifikant höher im Vergleich zum orthotopen Tiermodell. Am Tag der Intervention kam es bei dem orthotopen Tiermodell zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichtes. Diese Körpergewichtsänderung war im Vergleich zu den anderen beiden Modellen nach der Operation signifikant reduziert. Am ersten postinterventionellen Tag wurde zusätzlich eine signifikante Reduktion gegenüber des subkutanen Tiermodells quantifiziert. Drei Tage nach Tumorzellinjektion wiesen die Tiere des intravenösen Modells eine signifikant höhere Körpergewichtsänderung im Vergleich zum orthotopen Modell auf (**Abb. 6A**). Der Gesundheitsscore war bei den Tieren direkt nach der orthotopen und subkutanen Tumorzellinjektion leicht erhöht. Hier zeigten zwei Tiere des orthotopen und ein Tier des subkutanen Modells von insgesamt 26 Versuchstieren gesträubtes Fell und zwei weitere orthotope Tiere eine Gewichtsreduktion zum Ausgangskörpergewicht von > 10 %. (**Abb. 6B**). Am ersten postinterventionellen Tag war die perianale Temperatur bei Mäusen vom intravenösen Modell mit 29,8 °C im Vergleich zum subkutanen Tiermodell mit 30,6 °C signifikant verringert (**Abb. 6C**). Es konnten keine signifikanten Änderungen der Nestbauaktivität nach der Tumorzellinjektion quantifiziert werden (**Abb. 6D**). Die gebuddelte Menge an Pellets nach zwei Stunden war bei den Tieren im orthotopen Modell mit 68,8 g signifikant reduziert zum Ausgangswert und signifikant reduziert im Vergleich zum subkutanen Tiermodell mit 150,4 g gebuddelten Pellets. Die Tiere im intravenösen Modell zeigten signifikant reduziertes Buddelverhalten zum Ausgangswert an den postoperativen Tagen zwei und drei (**Abb. 6E**). Bei der Buddelaktivität über Nacht zeigten die Mäuse in allen Modellen eine hohe Buddelaktivität, jedoch konnte eine signifikante Reduktion beim intravenösen Tiermodell an Tag drei im Vergleich zum Ausgangswert und im Vergleich zum orthotopen Modell quantifiziert werden (**Abb. 6F**). Der MGS-Score war am Tag der Intervention beim orthotopen Tiermodell leicht erhöht, es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Modellen oder zum Ausgangswert nachgewiesen werden (**Abb. 6G**). Die FCM waren bei den Tieren im orthotopen Modell am Tag der Operation und am ersten Erholungstag signifikant

erhöht im Vergleich zum Ausgangswert und bei den Tieren im subkutanen Modell konnte eine signifikante Erhöhung der FCM am ersten postoperativen Tag im Vergleich zum Ausgangswert quantifiziert werden (**Abb. 6H**).

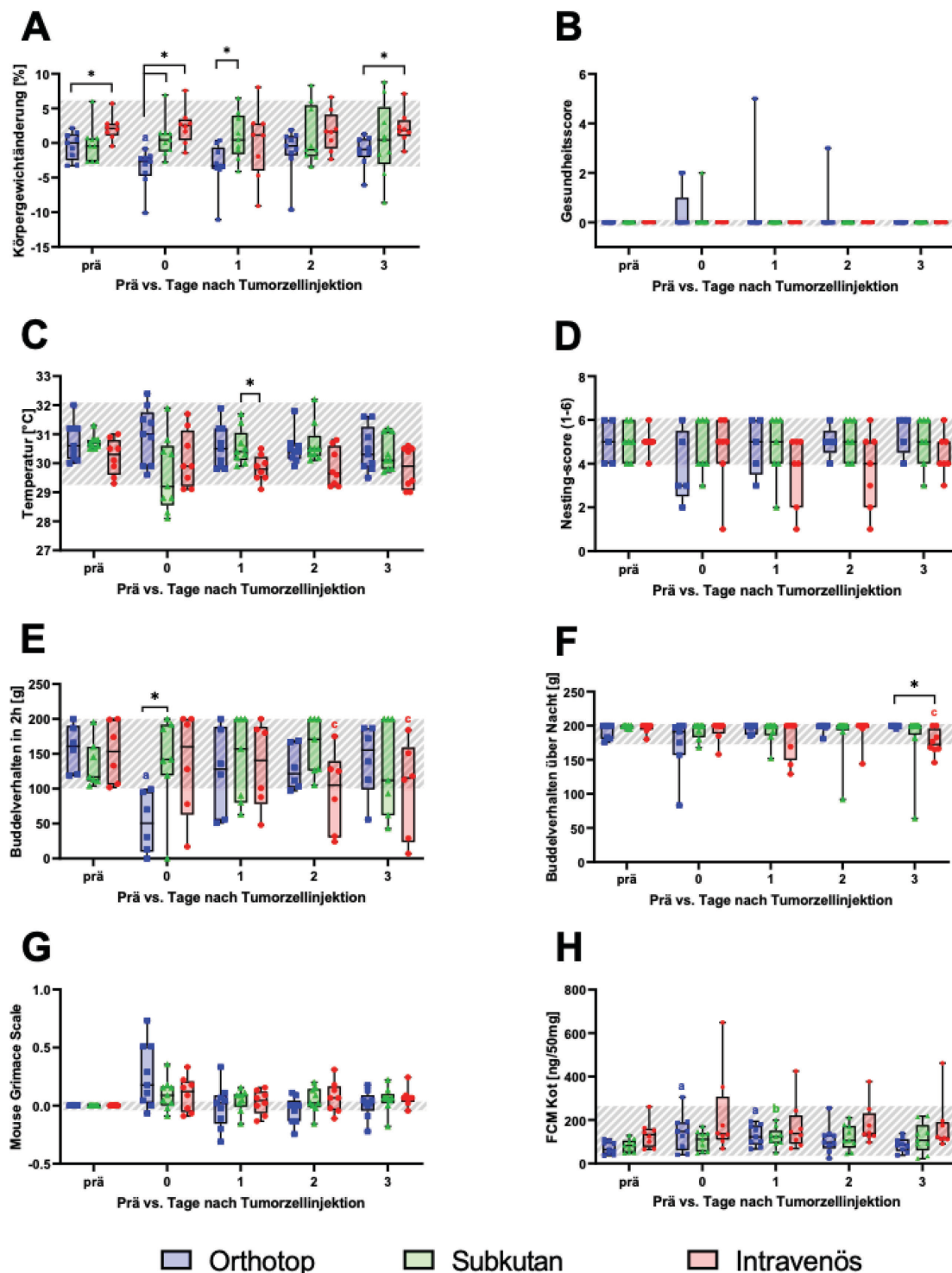


Abb. 6.: Quantifizierung der Belastungsparameter vor und nach orthotoper, subkutaner und intravenöser Tumorzellinjektion. Die Parameter Körpergewichtsänderung (A), Gesundheitsscore (B), perianale Temperatur (C), Nesting-Score (D), Buddelverhalten nach zwei Stunden (E) und über Nacht (F), Mouse Grimace Scale (G) und Kortikosteronmetabolite im Kot (H)

wurden an gesunden Mäusen vor der Operation (prä), am Tag nach der Intervention (0) und an den post-operativen Tagen (1 - 3) erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way-ANOVA, gefolgt von einem Dunnett-Test zum prä-Wert-Vergleich und einem Tukey-Test zur Unterschiedserfassung zwischen den Modellen (* $p \leq 0.05$, signifikante Unterschiede zu den prä-Werten und innerhalb jedes Modells a: orthotop ($n = 5 - 9$); b: subkutan ($n = 7 - 9$), c: intravenös ($n = 6 - 8$)).

6.2.2 TUMORPROGRESSION

Die Belastungsparameter wurden während der Tumorprogression zu einem frühen, mittleren und späten Zeitpunkt erhoben. Zum mittleren Zeitpunkt stellte sich ein signifikanter Anstieg des Körpergewichts im intravenösen Tiermodell im Vergleich zum Referenzwert sowie zum orthotopen Tiermodell dar. In der späten Phase kam es zudem zu einer signifikanten Körpergewichtszunahme beim subkutanem Tiermodell (**Abb. 7A**). Beim Gesundheitsscore wurde über alle Modelle hinweg ein konstanter Wert von null beobachtet (**Abb. 7B**). Auch bei der mittleren perianalen Temperatur konnten keine signifikanten Änderungen während der Tumorprogression quantifiziert werden (**Abb. 7C**). Die Mäuse des subkutanen Modells zeigten eine signifikant reduzierte Nestbauaktivität mit einem durchschnittlichen Score von 3,7 in der späten Phase (**Abb. 7D**). Dagegen konnte eine signifikante Zunahme der Buddelaktivität nach zwei Stunden beim gleichen Modell in der mittleren und in der späten Tumorprogressionsphase auf 187,7 g beziehungsweise 196,7 g gebuddelten Pellets verzeichnet werden (**Abb. 7E**). Die Buddelaktivität über Nacht war in allem Modellen konstant hoch während der Tumorprogression (**Abb. 7F**). In der Prä-Phase konnte eine signifikant höhere FCM-Konzentration beim intravenösen Tiermodell im Durchschnitt von 116,2 ng/50mg im Vergleich zum orthotopen Tiermodell mit 66,8 ng/50mg nachgewiesen werden (**Abb. 7G**). Keine signifikanten Änderungen wurden bei der Kortikosteron-Konzentration des Plasmas sowie beim MGS-Score nachgewiesen (**Abb. 7H, Abb. 7I**).

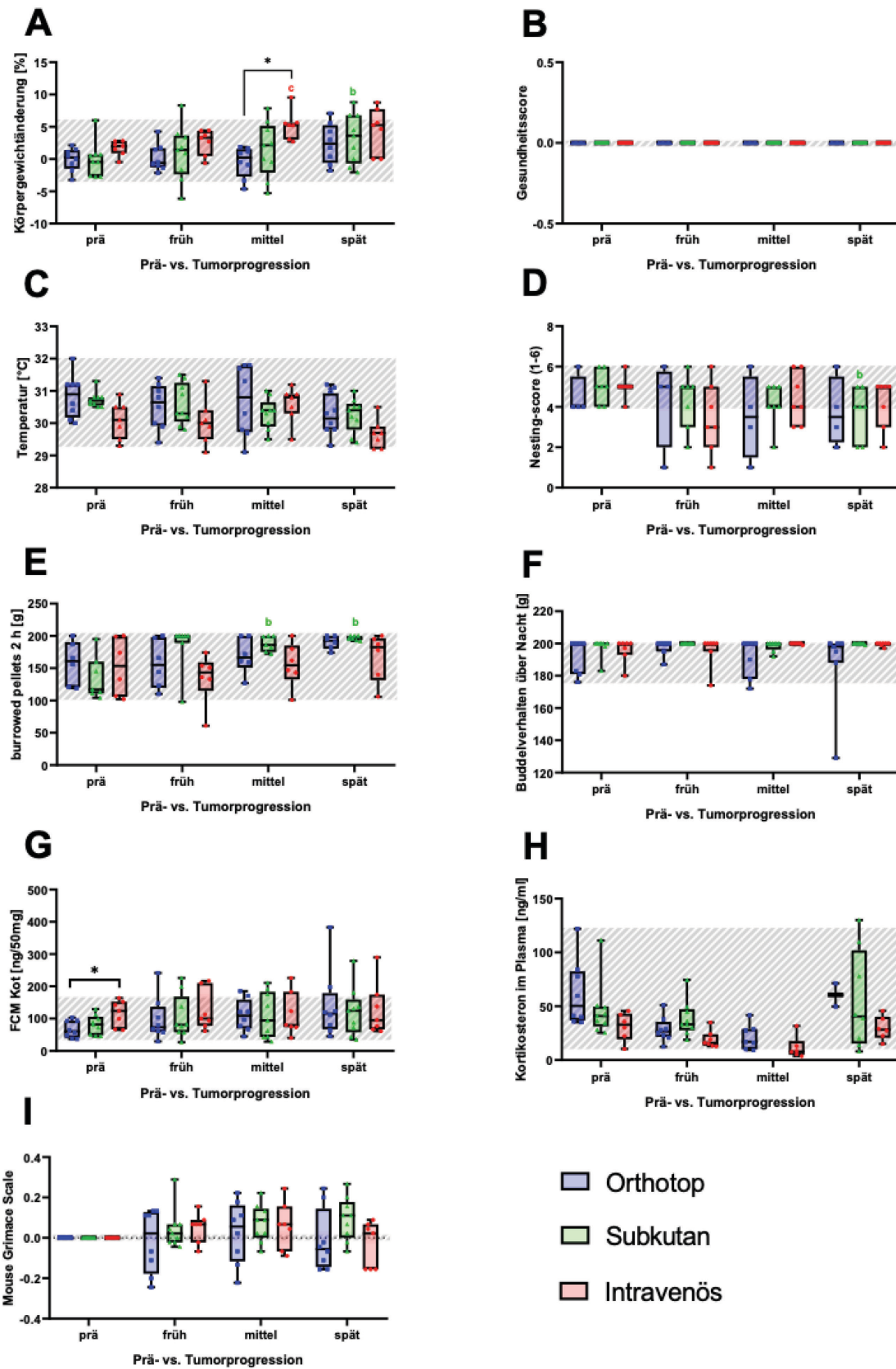


Abb. 7.: Quantifizierung der Belastungsparameter während der Tumorprogressionsphase im orthotopen, subkutanen und intravenösen Mausmodell. Veränderung des Körpergewichtes

(A), Gesundheitsscore (B), perianale Temperatur (C), Nesting-Score (D), Buddelverhalten nach zwei Stunden (E) und über Nacht (F), Kortikosteronmetabolite im Kot (G), Plasmakonzentration von Kortikosteron (H) und der Mouse Grimace Scale (I) wurden vor jeglicher Intervention (prä) und während der frühen, mittleren und späten Tumorprogressionsphase erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way-ANOVA (A, C-F) oder einem gemischten Modell (B, G-I), gefolgt von einem Dunnett-Test zum prä-Wert-Vergleich und einem Tukey-Test zur Unterschiedserfassung zwischen den Modellen (* $p \leq 0.05$, signifikante Unterschiede zu den prä-Werten und innerhalb jedes Modells a: orthotop ($n = 4 - 9$); b: subkutan ($n = 7 - 9$), c: intravenös ($n = 6 - 8$)).

6.2.3 HUMANE ENDPUNKTE

Beim Vergleich der Prä-Werte zeigte das orthotope Tiermodell ein signifikant niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zum intravenösen Tiermodell. Drei Tage vor dem humanen Endpunkt war die Körpergewichtsänderung des orthotopen Modells im Vergleich der beiden anderen Tiermodellen weiterhin signifikant verringert. Am Tag vor dem humanen Endpunkt und am Tag selbst, verringerte sich das Körpergewicht der Mäuse im orthotopen Modell nochmals signifikant im Vergleich zum Ausgangswert und war am Tag des hEPs auch im Vergleich zum subkutanem Tiermodell signifikant niedriger (**Abb. 8A**). Der Gesundheitsscore war am Tag des hEPs beim orthotopen und intravenösen Tiermodell mit einem Durchschnittswert von 9,7 beziehungsweise 7,7 signifikant im Vergleich zum subkutanen Tiermodell mit einem Wert von 4,3 erhöht, da für die Tiere im orthotopen und intravenösen Modell meist mehrere Kriterien des Gesundheitsscore nachgewiesen werden konnten. Am Tag des humanen Endpunktes zeigten alle Tiere im orthotopen Tiermodell eine unnormale Haltung und fünf von neun zusätzlich eine Körpergewichtsreduktion $> 10\%$ (**Abb. 8B**). Bereits ein bis zwei Tage vor den humanen Endpunkte konnten im orthotopen Modell fünf beziehungsweise viermal eine unnormale Haltung und eine Körpergewichtsreduktion $> 10\%$ gescort werden. Während für sechs von sieben Tieren im subkutanen Modell eine Tumorulzeration am Tag des hEP nachgewiesen wurde. Bereits einen Tag vor dem hEP konnte beim subkutanen Modell zweimal eine unnormale Haltung gescort werden. Am Tag des hEP wurde bei fünf von sieben Tieren des intravenösen Tiermodells eine unnormale Haltung und eine ruckartige Atmung nachgewiesen. Zwei Tiere zeigten eine starke Körpergewichtsreduktion und veränderte Atmung. Am Tag vor dem hEP wurde beim intravenösen Tiermodell viermal veränderte Atmung und dreimal eine unnormale Haltung gescort (**Abb. 8B**). Beim intravenösen Tiermodell konnte eine signifikante Abnahme der perianalen Temperatur am hEP von im Durchschnitt $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ nachgewiesen werden (**Abb. 8C**). Die Mäuse in allen Modellen zeigten eine reduzierte Nestbau- und Buddelaktivität nach zwei Stunden am Tag vor und am hEP (**Abb. 8D, Abb. 8E**). Im orthotopen

Tiermodell konnte eine signifikant reduzierte Buddelaktivität über Nacht, am Tag vor und am Tag des humanen Endpunktes nachgewiesen, werden. Diese war am Tag des humanen Endpunktes signifikant geringer im Vergleich zum subkutanem Tiermodell (**Abb. 8F**). Eine Erhöhung des durchschnittlichen MGS-Scores konnte bei allen Modellen zum Tag des humanen Endpunktes quantifiziert werden (**Abb. 8G**). Bei Tieren des orthotopen und intravenösen Tiermodells wurde eine signifikante Erhöhung der Plasmakortikosteron-Konzentration auf im Durchschnitt 291,4 ng/ml beziehungsweise 219 ng/ml am hEP im Vergleich zum Ausgangswert und im Vergleich zum subkutanem Tiermodell mit einer Konzentration von 59,4 ng/ml nachgewiesen (**Abb. 8H**).

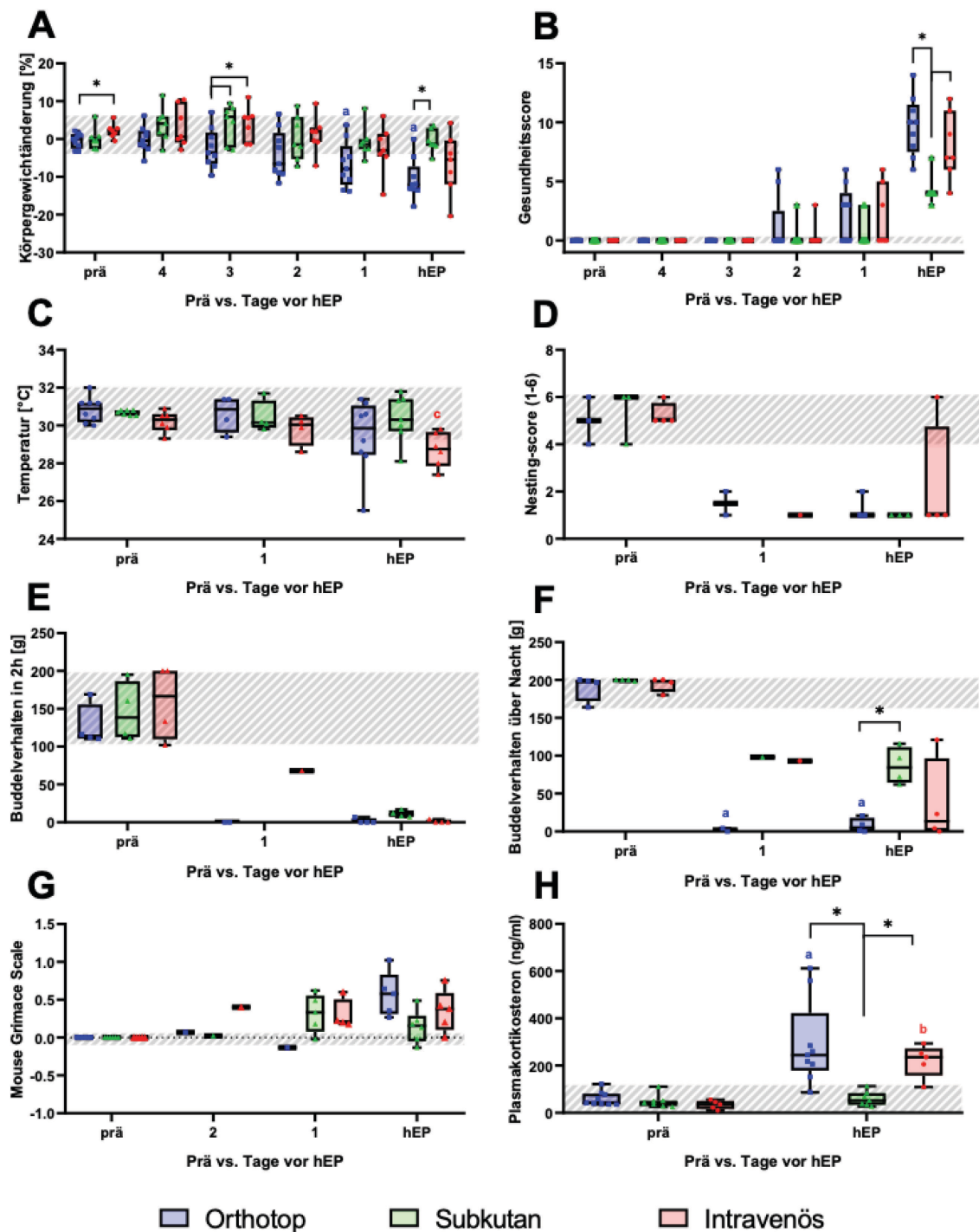


Abb. 8.: Quantifizierung der Belastungsparameter an den Tagen unmittelbar vor und am Tag des individuellen humanen Endpunktes. Die Veränderung des Körpergewichtes (A), und des Gesundheitsscores (B) wurden an den vier Tagen vor und am humanen Endpunkt (hEP) aufgezeichnet und mit dem Prä-Wert (Prä) verglichen. Die perianale Temperatur (C), der Nesting-Score (D), Buddelverhalten nach zwei Stunden (E) sowie über Nacht (F) wurden an den letzten beiden Tagen (1, hEP) erhoben. Der Mouse Grimace Scale (G) wurde die letzten drei Tage

(2, 1, hEP) und die Plasma-Kortikosteron Konzentration (H) wurde am Tag des humanen Endpunktes (hEP) evaluiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way-ANOVA (A, B, H) und dem gemischten Modell (C - G). Zudem wurde ein Dunnett-Test zum prä-Wert-Vergleich und ein Tukey-Test zur Unterschiedserfassung zwischen den Modellen durchgeführt. (* $p \leq 0.05$, signifikante Unterschiede zu den prä-Werten und innerhalb jedes Modells a: orthotop ($n = 3 - 9$); b: subkutan ($n = 3 - 7$), c: intravenös ($n = 4 - 7$))

6.3 MULTIVARIANTE ANALYSE

Mit den Input-Variablen Körpergewicht, Gesundheitsscore und Buddelverhalten nach zwei Stunden konnte mittels dem RELSA-Algorithmus der maximale Schweregrad des individuellen Tieres während der Tumorprogression ermittelt werden. Hierüber lassen sich dann die relativen Schweregrade der verschiedenen Tumormodelle miteinander vergleichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Mäuse im orthotopen Tiermodell einer signifikant höheren Belastung im Vergleich zu Mäusen im intravenösen sowie subkutanen Tiermodell ausgesetzt waren (**Abb. 9A**). Für das subkutane Tiermodell konnte über den $RELSA_{max}$ eine leicht höhere Belastung im Vergleich zum intravenösen Tiermodell ermittelt werden (**Abb. 9A**). Der $RELSA_{max}$ der unterschiedlichen Pankreaskarzinom-Modelle konnte dann mit $RELSA_{max}$ -Werten von anderen gastrointestinalen Tiermodellen wie einem Modell für CCl_4 induzierter Leberfibrose, einem Pankreatitis Modell, einem Gallengangsligaturmodell und einem anderen orthotopen Pankreaskarzinommodell aus einer vorherigen Studie verglichen werden (Talbot et al. 2023). Der geringste Schweregrad wurde dabei für das intravenöse und subkutane Tiermodell beobachtet, wobei das intravenöse Tiermodell signifikant niedrigere $RELSA_{max}$ -Werte im Vergleich zu den Krankheitsmodellen für Leberfibrose, orthotope Pankreaskarzinome, Pankreatitis und Gallengangsligatur aufwies. Die Tiere im subkutanen Tiermodell zeigten signifikant niedrigere $RELSA_{max}$ -Werte im Vergleich zum orthotopen 6606PDA-Zell induziertem Pankreaskarzinommodell, dem Pankreatitis Modell und dem Gallengangsligaturmodell (**Abb. 9B**). Das orthotope Tiermodell belegte den vierten und damit mittleren Rang unter den sieben Tiermodellen, wobei für das Modell der Pankreatitis und das Gallengangsligaturmodell ein signifikant höherer Schweregrad im Vergleich festgestellt wurde (**Abb. 9B**).

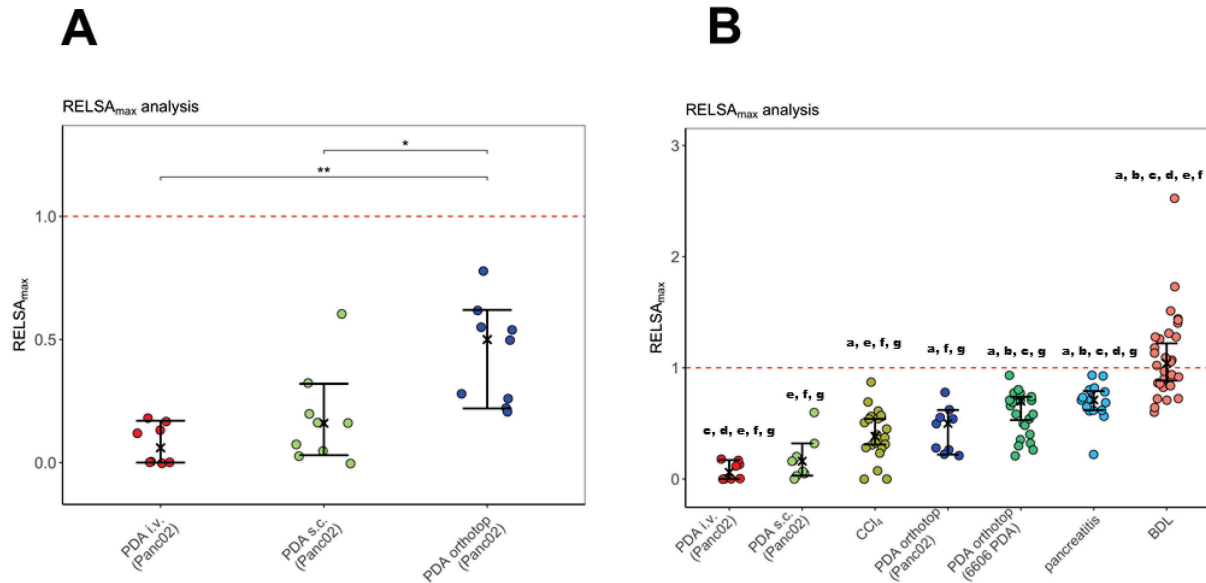


Abb. 9.: Vergleich des relativen Schweregrades der Tumormodelle mittels RELSA_{max}. Quantifizierung der relativen Belastung im intravenösen (PDA i.v.), subkutanen (PDA s.c.) und orthotopen (PDA orthotop) Tiermodell unter Verwendung der Panc02-Zellen. Die Beurteilung der signifikanten Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt ($X^2 = 14,048$, $df = 2$, p -Wert = 0,00089) (A). Ein Vergleich der RELSA_{max} Werte erfolgte auch mit anderen murinen gastrointestinalen Tiermodellen. Hierbei wurden Modelle für Leberfibrose, induziert mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4), ein weiteres orthotopes Pankreaskarzinommodell mit 6606PDA-Zellen (PDA orthotop (6606 PDA)), ein Cerulein induziertes Pankreatitis-Modell (pancreatitis) und ein Gallengangsligaturmodell (BDL) verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test ($X^2 = 83,345$, $df = 6$, p -Wert = < 0,0001) (B). PDA i.v. (Panc02): $n = 8$, $\hat{R} = 0.075$, $CI_{95\%} = [-0.049; 0.199]$; PDA s.c. (Panc02): $n = 9$, $\hat{R} = 0.177$, $CI_{95\%} = [0.060; 0.294]$; PDA orthotop (Panc02): $n = 9$, $\hat{R} = 0.440$, $CI_{95\%} = [0.323; 0.557]$; CCl_4 : $n = 22$, $\hat{R} = 0.401$, $CI_{95\%} = [0.293-0.510]$; PDA orthotop (6606PDA): $n = 26$, $\hat{R} = 0.698$, $CI_{95\%} = [0.507; 0.706]$; Pankreatitis: $n = 16$, $\hat{R} = 0.698$, $CI_{95\%} = [0.571; 0.825]$; BDL: $n = 30$, $\hat{R} = 1.102$, $CI_{95\%} = [1.009; 1.194]$. Die individuellen RELSA_{max} Werte werden in den Diagrammen als Mediane mit dem 95%-Konfidenzintervall gezeigt. Bootstrapping erfolgte zur Schätzung der Mediationseffekte. Signifikante Unterschiede werden durch A: * $p \leq 0.05$ und ** $p \leq 0.01$; B: * $p \leq 0.05$; * $p \leq 0.05$ zu a (PDA i.v.), b (PDA s.c.), c (CCl_4), d (PDA orthotop (Panc02)), e (PDA orthotop (6606PDA)), f (pancreatitis) und g (BDL) dargestellt.

Um einen geschlechtsspezifischen Effekt beim RELSA_{max} zu untersuchen, wurden die RELSA_{max} Werte nach Männchen und Weibchen getrennt für die Modelle graphisch dargestellt (Abb. 10). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied der RELSA_{max} Werte zwischen den Geschlechtern in dem jeweiligen Modell (Abb. 10).

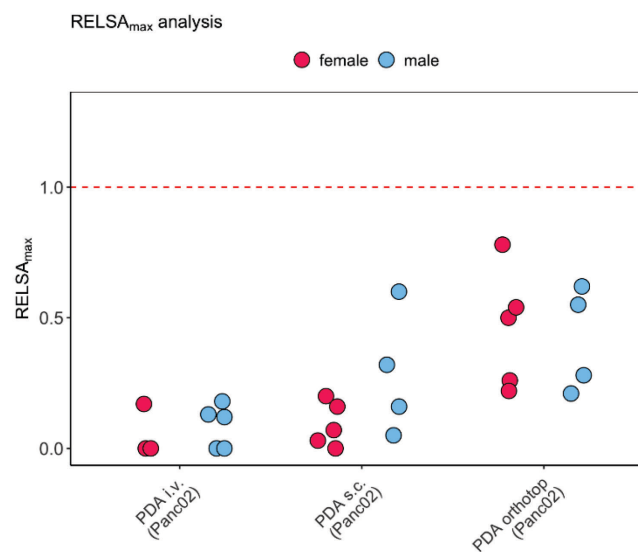


Abb. 10.: Vergleich der $RELSA_{max}$ -Werte auf geschlechtsspezifische Unterschiede. Getrennte graphische Darstellung der $RELSA_{max}$ Werte von weiblichen (rot) und männlichen (blau) Mäusen für das mittels Panc02-Zellen induzierte intravenöse (PDA i.v.), subkutane (PDA s.c.) und orthotop (PDA orthotop) Pankreaskarzinommodell. Die Statistik wurde mittels ANOVA durchgeführt. ($F(1) = [0.0788]$, $p = 0.3852$).

Um zu analysieren, welche der Belastungsparameter besonders gut zur Quantifizierung von frühen humanen Endpunkten in den Tiermodellen geeignet sind, wurden Grenz-Wert-Optimierung Kurven verwendet. Hierfür wurden die Tage vor beziehungsweise am humanen Endpunkt mit dem Prä-Werten der einzelnen Parameter verglichen. Daraufhin die falsch-positiv Rate und die richtig-positiv Rate auf die X- beziehungsweise Y-Achse aufgetragen und anschließend die Leistungsfähigkeit der einzelnen Parameter mit Hilfe der AUC errechnet. Die Ergebnisse wurden für jedes Modell in Form einer Heatmap dargestellt, wobei die Parameter farblich von Grün mit hoher Vorhersagekraft zu Rot mit niedriger Vorhersagekraft hervorgehoben wurden (**Abb. 11**). Die Parameter Buddelverhalten nach zwei Stunden und über Nacht quantifizierten bei allen Tiermodellen die höchste Prädiktion zur frühen hEP-Bestimmung mit einer AUC von 1.0 bis zu zwei Tage vorher (**Abb. 11**). Der MGS-Score zeigte zwei Tage vorm Erreichen des hEPs eine sehr hohe Trennschärfe zur Unterscheidung von gesunden und kranken Tieren im intravenösen (AUC = 1.0) und subkutanen Modell (AUC = 1.0 - 0.9), während der Score beim orthotopen Modell (AUC = 0.8 - 0.7) nicht ganz so prädiktiv war (**Abb. 11**). Auch die Nestbauaktivität zeigte zwei Tage vor dem hEP eine sehr hohe Trennschärfe beim intravenösen Tiermodell (AUC = 1.0), während die Aktivität beim subkutanen (AUC = 0.8) und orthotopen Tiermodell (AUC = 0.8) weniger prädiktiv war (**Abb. 11**). Am hEP wies der Gesundheitsscore eine

hohe Trennschärfe bei allen Tiermodellen (AUC = 1.0), die Körpergewichtsänderung beim intravenösen (AUC = 0.9) sowie orthotopen Tiermodell (AUC = 0.9) und die perianale Temperatur beim intravenösen Tiermodell (AUC = 0.9) auf (**Abb. 11**). Hingegen zeigten sich am hEP die Körpergewichtsänderung beim subkutanem Tiermodell (AUC = 0.6) und die perianale Temperatur beim subkutanem (AUC = 0.6) sowie orthotopen Tiermodell (AUC = 0.6) als nicht prädiktiv (**Abb. 11**).

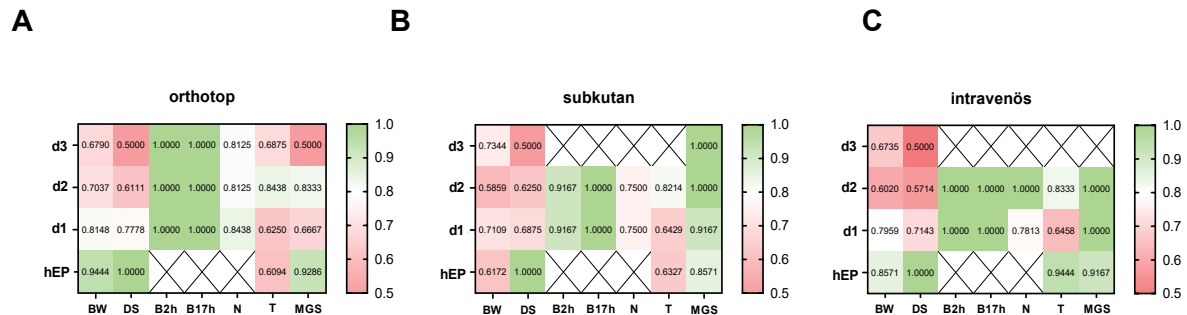


Abb. 11.: Aussagekraft der Belastungsparameter für die Prognose eines frühen humanen Endpunktes in den verschiedenen Tumormodellen. Die Aussagekraft der einzelnen Belastungsparameter wurden für das orthotope (A), das subkutane (B) und das intravenöse Tiermodell (C) mittels Grenzwertoptimierungskurve (ROC) berechnet, indem die Tage vor/am humanen Endpunkt mit dem Tag vor der Intervention (prä) verglichen wurden (Werte ≤ 0.5 , schlechte Prognose für hEP; Werte ≥ 1.0 gute Prädiktion für den hEP). BW: Körpergewichtsänderung; DS: Gesundheitsscore; B2h: Buddeln nach zwei Stunden; B17h: Buddeln über Nacht; N: Nesting Score; T: perianale Temperatur; MGS: Mouse Grimace Scale.

VII. DISKUSSION

7.1 EVIDENZ-BASIERTE BELASTUNGSANALYSE VON PDA-MODELLEN

7.1.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Mittels datenbasierter Belastungsbeurteilung bei verschiedenen Pankreaskarzinom-Modellen und multivariater Analyse über den RELSA-Algorithmus konnte gezeigt werden, dass die Belastung des orthotopen Tiermodells mit einer signifikant höheren Belastung im Vergleich zum subkutanen oder intravenösen Modell einhergeht (**Abb. 9**). Ebenso konnte herausgefunden werden, dass sich insbesondere der Belastungsparameter Buddelverhalten sowohl nach zwei Stunden wie auch über Nacht modellübergreifend als frühes humanes Endpunktkriterium, 24 bis 48 Stunden vor dem Erreichen der humanen Abbruchkriterien, eignet (**Abb. 11**).

7.1.2 DATENBASIERTE SCHWEREGRADE

Es ist wichtig eine datenbasierte Belastungseinschätzung bei Mäusen durchzuführen, da die Beurteilung von außen durch die natürliche Unterdrückung von Schmerzäußerungen der Beutetiere schwierig ist und eine rein subjektive Beurteilung, wie es durch Einschätzung mit Score-Sheets im Rahmen von Tierversuchen durchgeführt wird, von dem jeweiligen Beobachter anhängig ist (Morton und Griffiths 1985). Objektiv lässt sich der Gesundheitszustand von Mäusen durch verschiedene physiologische, hormonelle und Verhaltensparametern quantifizieren (Smith et al. 2018; Hawkins et al. 2011). Direkt messbare und objektive Indikatoren liefern dabei klare Indizien für das Wohlergehen, wobei der körperliche Zustand am einfachsten durch allgemeine Parameter, wie Körpergewicht, Körpertemperatur, Futter- und Wasseraufnahme, zu bestimmen ist, sich anschließend projektspezifisch durch laborchemische oder psychologische Parameter ergänzen und schlussendlich zusammen mit Verhaltens- und Aktivitätsparametern zur Beurteilung der Belastungssituation zusammenfügen lässt (Hawkins et al. 2011; Morton und Griffiths 1985). Der MGS eignet sich als Parameter für die postoperative Schmerzbeurteilung bei Nagetieren (Aulehner et al. 2022) und die Kombination aus Körpertemperatur und Gewichtsveränderung zur prädiktiven Erkennung humaner Endpunkte (Jesus et al. 2023; Hankenson et al. 2013; Ray et al. 2010). In einer Studie zur Sepsis zeigte sich bei der Belastungsbeurteilung, dass die Temperaturregulation der Mäuse bis zu 23 Tage nach Induktion durch eine niedrigere Amplitude im Tagesverlauf gekennzeichnet ist und dass das Körperge-

wicht in dieser Zeit abfällt (Granger et al. 2013). Auch die Verhaltensparameter Nestbauaktivität und Buddelaktivität können als sensitiver Marker für Stress oder Schmerzen und damit einer Reduktion des Wohlergehen des Tieres genutzt werden (Talbot et al. 2022; Jirkof 2014). Dies konnte bereits für verschiedene gastrointestinale Krankheitsmodelle oder für ein Modell zur Depression gezeigt werden (Talbot et al. 2023; Mallien et al. 2022). Zur Messung der Stressreaktion eignet sich auch die Bestimmung der Kortikosteronmetabolite im Kot der Mäuse, wie es bereits bei verschiedenen Modellen zur partiellen Hepatektomie, Laparotomie oder bei Krampfanfällen gezeigt wurde (Boldt et al. 2021; Zieglowski et al. 2021).

In der Literatur wird darauf hingedeutet, dass die Erhebung einzelner Parameter nicht ausreicht, um die multifaktorielle Stressantwort bei Nagetieren zu erfassen und eine detaillierte Belastungseinschätzung von verschiedene Modelle zu ermöglichen (Keubler et al. 2020). Auch der Bias bei der Erhebung einzelner Parameter ist zu berücksichtigen, so scheint der MGS durch biologische Variationen, wie Geschlecht oder durch die Konstanz sowie der Geübtheit des Beobachters, beeinflusst zu werden (Whittaker et al. 2021). In der Regel wird eine Körpergewichtsreduktion > 20 % mit schwerem Leiden der Tiere assoziiert, jedoch zeigten Versuchstiere nach der Induktion eines chronischen Diabetes oder einer akuten Kolitis mehr als 20 % Körpergewichtsreduktion ohne weitere Anzeichen größerer Not (Talbot et al. 2020). Bei dem von uns verwendeten C57BL/6J-Mäusestamm ist eine positive Korrelation junger Erwachsener Mäuse zwischen Körpergewicht und Körpertemperatur sowie eine negative Korrelation zwischen Körpertemperatur und Alter bekannt, sodass eine Beeinflussung durch das Körpergewicht und dem Alter nicht ausgeschlossen werden kann (Talan 1984). Auch eine hohe Nestbauaktivität kann die Körpertemperatur erhöhen, da gut gebaute Nester isolierender wirken und somit die Abgabe von Strahlungswärme minimieren (Gaskill et al. 2013). Der Gesundheitsscore zeigt Anfälligkeit bei Veränderung des experimentellen Designs (Talbot et al. 2023) und Verhaltensparameter wie Nestbauaktivität und Buddelaktivität unterliegen natürlichen täglichen Schwankungen, lokalen Einflüssen und der Notwendigkeit einer ausreichend langen Lernphase (Jirkof et al. 2020; Schwabe et al. 2020). Die Ausschüttung von Kortikosteron erfolgt pulsatil, abhängig von Tages- oder Saisonrhythmen, Umweltfaktoren, Alter sowie physiologischem Zustand und wird dabei nicht nur bei Stress-, Angst- und Schmerzreaktionen, sondern auch bei Vergnügen, Aufregung und Erregung ausgeschüttet und ist damit nicht nur Stress-spezifisch (Mormède et al. 2007; Ralph und Tilbrook 2016). Die Aussagekraft einzelner Belastungsparameter, wie Körpergewicht oder Gesundheitsscore, ist modellabhängig, auch wenn sich die meisten Parameter widerstandsfähig gegenüber leichten Abweichungen im experimentellem Design zeigen (Talbot et al. 2023).

Dass die Sensitivität der Belastungsparameter auch abhängig vom jeweiligen Tiermodell ist, zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. So reduzierte sich am hEP das Körpergewicht und die Buddelaktivität über Nacht nur beim orthotopen Tiermodell signifikant (**Abb. 8**). Beim intravenösen Tiermodell kam es hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Körpertemperatur (**Abb. 8**). Auch die Kortikosteron-Konzentration im Plasma und der Gesundheitsscore erhöhten sich signifikant für das orthotope und intravenöse Tiermodell, nicht aber beim subkutanem Tiermodell (**Abb. 8**). Beim Gesundheitsscore konnte man zudem eine hohe Intervariabilität in den gescorten Kategorien erkennen (**Abb. 8**). So wurde beim orthotopen Modell am häufigsten die unnormale Haltung, beim intravenösen die veränderte Atmung und beim subkutanen die Tumorulzeration in Kombination mit der unnormalen Haltung gescort (**Tab. 2**).

Um die Komplexität der Belastung aussagekräftig darzustellen und datenbasiert zu vergleichen, werden mehrere Belastungsparameter benötigt (Keubler et al. 2020; Zechner et al. 2022). Die Aussagekraft durch Kombination mehrerer Parameter, in Bezug auf die Belastungsanalyse, lässt sich durch binäre logistische Regression und anschließender ROC-Analyse analysieren und modellübergreifend vergleichen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass beispielsweise eine Kombination aus Körpergewichtsänderung, Nestbauaktivität, Buddelaktivität und FCM genauer zwischen gesunden und kranken Mäusen unterscheiden kann (AUC = 0.98), als die einzelnen Parameter selbst (AUC = 0.7 - 0.91) (Abdelrahman et al. 2019). Mittels Youden-Index konnte die Schwere der Belastung anhand der vier Parameter bei einem Modell zur chronischen Pankreatitis und einem Modell der Laparotomie direkt verglichen werden (Abdelrahman et al. 2019). In einer anderen Studie konnte bestätigt werden, dass durch Kombination von FCM und Buddelverhalten mittels multivariater logistischer Regression, Nebenwirkungen von neuen Pharmaka in präklinischen Studien quantifiziert werden können (Kumstel et al. 2020b). Eine weitere Möglichkeit der multivariaten Belastungsanalyse stellt das Clustering von Daten dar. In einer Studie konnten mit den Parametern Laufrad-Aktivität und Körpergewichtsänderung unter Verwendung des k-Mean-Algorithmus unterschiedliche Schweregrade für Mausmodelle in einen Dextransulfat-Natrium-induziertem Kolitis Modell klassifiziert werden und die Validität anschließend in einem Maus Modell für akuten Zurückhalteteststress überprüft werden (Häger et al. 2018). Das gleiche Modell wurde verwendet um die Belastung einer chemotherapeutischen Behandlung im murinen orthotopen Pankreaskarzinom zu quantifizieren (Weegh et al. 2021). Mit Hilfe von maschinellem Lernen und Support Vector Machine Klassifizierung ist es möglich, die Belastung zweier Modelle unter Berücksichtigung mehrerer Parameter (Körpergewicht, Gesundheitsscore, Buddelaktivität) zu vergleichen (Tang et al. 2020). So konnte gezeigt werden, dass ein Gallengangsligaturmodell mit höherer Belastung für die Mäuse einhergeht, als ein durch CCl₄ induzierten Leberschaden (Tang et al. 2020). Der Einfluss der einzelnen Parameter kann durch die Messung der Varianz

mittels Hauptkomponentenanalyse bestimmt werden, wodurch Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Tiere durch das experimentelle Verfahren gezogen werden kann, wie es bereits mit verschiedenen Verhaltenstests wie soziale Interaktion, Buddelaktivität und Nestbauaktivität kombiniert mit biochemischer Parameter, beispielsweise Kortikosteronmetabolite, in Nagetier-Epilepsie-Modellen durchgeführt wurde (Möller et al. 2018; Seiffert et al. 2019). Mit Hilfe des RELSA_{max} ist es möglich allgemein anwendbare sensible Parameter zu kombinieren sowie eine datenbasierte Einstufung der Belastungsschwere durchzuführen, um eine modellübergreifende Vergleichbarkeit zu erreichen, wie es bereits bei verschiedenen Modellen zur Colitis, Sepsis und Depression bei Mäusen durchgeführt wurde (Talbot et al. 2022; Mallien et al. 2022). Hierfür werden die Parameter hinsichtlich ihrer maximalen Änderung im Vergleich zum Referenzwert gewichtet, anschließend das mittlere Wurzelmittelquadrat ermittelt und geclustert. Der daraus resultierende RELSA_{max}-Wert wird 10.000-fach gebootstrappt. Der RELSA ermöglicht somit als einzige vorgestellte multivariante Analyse einen modellübergreifenden Vergleich des Schweregrades der Belastung (Talbot et al. 2022).

7.1.3 RELSA-ANALYSE

Mit dem RELSA_{max} lässt sich die Belastung verschiedener Tiermodelle retrospektiv vergleichen. Der RELSA_{max} gibt den maximalen Schweregrad im Laufe eines Experimentes für jedes einzelne Tier an und erfüllt somit die Anforderung der EU-Empfehlung zur retrospektiven Zuordnung zu einem Schweregrad (Official Journal of the European Union 2010). Mit dem RELSA_{max} konnte datenbasiert evaluiert werden, dass die verwendeten Tumormodelle, orthotopes, subkutan und intravenöses PDA, im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Modellen mit Platz eins, zwei sowie vier eine deutlich geringere Belastung aufweisen, wie zum Beispiel das BDL- oder Pankreatitis-Modell (**Abb. 9**). Beim Pankreatitismodell konnte ein durchschnittlicher Körpergewichtsverlust von $5,6 \pm 3,3 \%$ und beim BDL-Modell von $11,4 \pm 6 \%$ sowie ein erhöhter Gesundheitsscore beim BDL-Modell von $6,6 \pm 2,4$ quantifiziert werden (Talbot et al. 2023). Im Vergleich dazu ist es am Tag der Tumorzellinjektion zur höchsten durchschnittlichen Körpergewichtsreduktion im orthotopen Modell von $-3,6 \pm 2,8 \%$ gekommen (**Abb. 6**). Das 6606PDA-Zell induzierte Modell weist eine leicht höhere, aber nicht signifikantere Belastung im Vergleich zum Panc02-Zell induziertem Modell auf (**Abb. 9**). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass beim 6606PDA-Zell-Modell bei einigen Tieren im Vorfeld bereits Transmitter zum radiotelemetrischen Monitoring von EKG, Aktivität und Körpertemperatur implantiert wurden und die Tiere mit verschiedenen Therapeutika behandelt wurden (Talbot et al. 2023). Trotz dieser Variation der Daten gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den

RELSA_{max}-Werten der beiden orthotopen PDA-Modelle. Es wird deutlich, dass der RELSA Algorithmus ein sehr robustes Werkzeug zur daten-basierten Belastungseinschätzung ist (Talbot et al. 2023).

Die europäische Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere fordert die retrospektive Einstufung aller Tiere nach entsprechenden Verfahren in die Schweregrade: gering, mittel oder schwer (Official Journal of the European Union 2010). Eine exakte Zuteilung der Tiere in diese Schweregrade ist bisher mit dem RELSA nicht möglich. Hierzu braucht es einen großen standardisierten Referenzdatensatz, in welchem alle Parameter vorhanden sind und eine eindeutige Zuordnung der Intervention ermöglicht wird. Eine grobe Einteilung ist über den Referenz-Datensatz der Transmitterimplantation möglich (RELSA_{max} = 1.0) (Talbot et al. 2023). Nach europäischer Richtlinie kann ein solches chirurgisches Verfahren als mittlere Belastung eingestuft werden (Official Journal of the European Union 2010). Die durchschnittlichen RELSA_{max}-Werte der PDA-Modelle betrugen beim intravenösen Modell 0,1, beim subkutanem Modell 0,2 und beim orthotopen Modell 0,4 und können somit in die Schweregrade Gering, bis Mittel eingeordnet werden (**Abb. 10**). Insbesondere für das intravenöse Modell steht dies im Widerspruch zur EU-Richtlinie, da in dieser metastasierende Tumormodelle und Geschwür-bildende Tumormodelle als Schwer eingestuft werden (Official Journal of the European Union 2010). Dieser Widerspruch zur Schweregradeinordnung der verschiedenen Tumormodelle durch den RELSA_{max} (**Abb. 10**) zur europäischen Richtlinie zeigt die Notwendigkeit der Einführung einer datenbasierten Belastungseinschätzung zur Optimierung der Qualität der in vivo Forschung bei gleichzeitiger Berücksichtigung des Tierschutzes (Bundesministerium für Justiz 2006).

7.1.4 SCHWEREGRADE DER TUMORMODELLE

Die Mäuse im orthotopen Tiermodell zeigten eine signifikant höhere Belastung im Vergleich zu den Tieren im subkutanen und intravenösen Tumormodell. Dies konnte sowohl beim direkten Vergleich über die multivariate Datenanalyse mittels RELSA_{max}, als auch über Einzelparameter, wie Körpergewicht, Gesundheitsscore, Buddelaktivität und Plasmakortikosteron-Konzentration gezeigt werden (**Abb. 6-9**). Die höchste Belastung aller Modelle wurde dabei unmittelbar nach der Tumorzellinjektion und insbesondere in der humanen Endpunktphase festgestellt (**Abb. 6, Abb. 8**). In der Tumorprogressionsphase konnten kaum Veränderung der Belastungsparameter nachgewiesen werden (**Abb. 7**). Am Tag der Tumorzellimplantation konnte bei den Tieren im orthotopen Tumormodell ein signifikant reduziertes Körpergewicht, eine verringerte Buddelaktivität und eine erhöhte FCM-Konzentration quantifiziert werden (**Abb. 6**), hingegen waren keine signifikanten Änderungen dieser Parameter beim subkutanem und intravenösen Mausmodell zu verzeichnen (**Abb. 6**). Am hEP konnte eine signifikante Reduktion

des Körpergewichtes und der Buddelaktivität über Nacht sowie ein signifikanter Anstieg der Plasmakortikosteron-Konzentration beim orthotopen Tiermodell und eine signifikante Reduktion der perianalen Temperatur sowie ein signifikanter Anstieg der Plasmakortikosteron-Konzentration beim intravenösen Tiermodell abgebildet werden (**Abb. 8**). Für die orthotope Tumorzellimplantation ist eine Narkose des Tieres von 20 bis 30 Minuten einschließlich Laparotomie notwendig. Die Tumorzellinjektion beim subkutanen und intravenösen Modell dauert hingegen fünf bis zehn Minuten. Bereits eine Isofluran-Anästhesie von zehn Minuten Dauer kann zu einer Erhöhung des MGS-Scores führen (Miller et al. 2015). Eine 45-minütige Narkose kann zusätzlich die Buddelaktivität und die FCM-Konzentration beeinflussen (Hohlbaum et al. 2017). Die zusätzliche Belastung durch eine Laparotomie kann zur Reduktion von Verhaltensparameter, wie der Nestbau- und Buddelaktivität, führen (Jirkof et al. 2012; Jirkof et al. 2010). Da die vorherigen Studien mit den gesammelten Daten übereinstimmen, lässt sich die erhöhte Belastung des orthotopen Modells am Tumorimplantationstag am ehesten auf die längere Narkosezeit sowie die zusätzliche Laparotomie zurückführen.

Unter kontinuierlicher Analgesie mit Metamizol konnte während der Tumorprogressionsphase keine signifikant erhöhte Belastung mit den analysierten Parametern quantifiziert werden (**Abb. 7**). Die signifikante Zunahme des Körpergewichts beim subkutanem und intravenösen Tiermodell, lässt sich auf das natürliche Wachstum der Mäuse und auf die Größenprogredienz der Flankentumore zurückführen (**Abb. 4**), wobei die signifikant erhöhte Buddelaktivität über den Zeitverlauf eher darauf hindeutet, dass es den Mäusen gesundheitlich sehr gut geht (Jirkof 2014). Die Mäuse waren durch die Tumore weder in ihrer Bewegung eingeschränkt, noch konnten andere gesundheitseinschränkende Kriterien nachgewiesen werden (**Abb. 7**). Das Pankreaskarzinom ist ein hochinvasiver, asymptomatisch wachsender Tumor der zu den am häufigsten entdeckten malignen Tumoren in Autopsie-Studien gehört (Zhao und Liu 2020; Avgerinos und Björnsson 2001; Sens et al. 2009). Das PDA fällt regelmäßig erst im Spätstadium auf und ist dann, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, nicht mehr zu resezieren (80 - 90 %) (Oberstein und Olive 2013; Lambe et al. 2011; Ilic und Ilic 2016). Das asymptotische Wachstum beim Menschen deckt sich mit der belastungsfreien Tumorprogressionsphase der untersuchten Tiermodelle (**Abb. 7**).

Das intravenöse Tiermodell zeigt, bei der Quantifizierung der relativen Belastung im Tiermodellvergleich mittels RELSA_{max}-Analyse, die geringste Belastung (**Abb. 9**). Die Hauptbelastung maligner Lungeninfiltration beim Menschen resultiert aus Sorgen, Nebenwirkungen der Krankheitsbehandlung, Atmung, Schmerzen und Schlafstörungen (Zhang et al. 2024). Hiervon wurden bei den Mäusen die Atmung und die Schmerzen indirekt mittels MGS und den Gesund-

heitsscore quantifiziert. Diese Parameter zeigten erst einen Anstieg der Belastung in der Endpunktphase. Es ist anzunehmen, dass die Beeinträchtigung durch Metastasen bis zur späten Tumorprogressionsphase so gering war, dass es weder zur Quantifizierung von Belastung noch von gesundheitlichen Einschränkungen gekommen ist (**Abb. 7**). Eine Studie zum TIMP1-Mangel konnte eine ausgiebige Metastasierung bereits nach 14 Tagen nachweisen (Hermann et al. 2021). Aus diesem Grund sollten die erhobenen Daten kritisch betrachtet werden und in zukünftiger Forschung reevaluiert werden.

In der Versuchsreihe wurde nur eine Zelllinie verwendet. Das mit der Zelllinie Panc02 induzierte Pankreaskarzinom ist in der Lage die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms beim Menschen nachzuahmen, wobei die orthotope Injektion erst zur Infiltration und Wachstum im Pankreas selbst führt, bevor die Ausbreitung auf andere Gewebe erfolgt (Griffin et al. 2024). Durch das syngene Modell im immunkompetenten Mausstamm kommt es zur Ausbildung der desmoplastischen Reaktion (Wood et al. 2022). Die verwendeten Zellen zur Herstellung einer orthotopischen Pankreas- oder metastatischen Neoplasie beim Mausmodell waren die Ersten, die mit einer hohen Anwachsrate der Tumore sowie einer ähnlichen Tumorentwicklung wie beim Menschen und Überleben mit vorhersehbaren Ergebnissen einhergingen (Griffin et al. 2024). Dabei zeigte sich, dass das Panc02 induzierte duktales Adenokarzinom hoch widerstandsfähig gegen jede bekannte Klasse klinisch aktiver Antitumormittel ist (Priebe et al. 1992). Die C57BL/6J Maus, welche wir verwendeten, ursprünglich aus dem Jackson Laboratory ist und zu den am häufigsten verwendeten Inzuchtstämmen in der Forschung gehört (Mekada et al. 2009). Ein Vorteil der Inzucht ist die genetische Ähnlichkeit, sodass phänotypische Unterschiede zwischen den Individuen minimal bleiben (Silva et al. 1997). Bei umfangreich sequenziertem Genom (Waterston et al. 2002), konnte bei elf leicht verfügbaren Inzuchtstämmen, zu denen auch die C57BL/6J-Maus gehört, eine mäßige bis hohe Vererbbarkeit der thermischen, mechanischen, chemischen und neuropathischen Nozizeption nachgewiesen werden (Mogil et al. 1999). Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in Bezug auf die Belastung der Tiere innerhalb der einzelnen Tumormodellen feststellen (**Abb. 10**), obwohl es bekannt ist, dass weibliche Krebspatienten eine höhere Belastungsreaktion im Gegensatz zu männlichen zeigen (Carlson et al. 2019; Linden et al. 2012). Männliche BALB/c-Mäuse zeigten in einem Modell zum kolorektalen Karzinom eine signifikant häufigere Bildung von Metastasen (Sorski et al. 2014), hingegen zeigten weibliche C57BL/6-Mäuse beim B16-Melanom und weibliche BALB/c-Mäuse beim 4T-1-dreifach negative-Brustkrebs ein deutlich schnelleres Tumorstadium (Thompson et al. 2017) und auch bei männlichen C57BL/6J-Mäusen in einem PDA-Modell infiltrierten CD8-positive Zellen weniger in den Tumor, die Tumore wurden größer, es zeigten sich vermehrt Lungenmetastasen, die Überlebenswahrscheinlichkeit war geringer und das Ansprechen von Therapeutika stellte sich effizienter im

Vergleich zu weiblichen Mäusen dar (Schulz et al. 2024). Aus diesem Grund bleibt es trotz unserer Ergebnisse wichtig, geschlechtsspezifische Unterschiede für andere Zelllinien und Mausstämme zu prüfen.

7.2 HUMANE ENDPUNKTE VON PDA-MODELLEN

7.2.1 BELASTUNG WÄHREND DER HUMANEN ENDPUNKT-PHASE

Tumorprogression und Metastasierung verursachen gesundheitliche Probleme und führen so zu einer starken Belastung in der Phase des frühen humanen Endpunktes, bis zum Erreichen der entsprechenden Abbruchkriterien (**Tab.2**). Es ist wichtig die Belastung frühzeitig zu erkennen, um die Schmerzen, Leiden, Schäden oder Ängste der Versuchstieren auf ein absolutes Minimum zu reduzieren und so den Vorgaben der EU-Richtlinie gerecht zu werden (Official Journal of the European Union 2010). Das PDA verläuft im Frühstadium klinisch stumm, sodass wesentliche Symptome erst im Spätstadium erkannt werden (Kelsen et al. 1997). Belastungsdaten, die zu diesem Zeitpunkt erhoben wurden, konnten oftmals nur kurzzeitig erfasst werden. Die Erhebung der humanen Endpunkte startete bei Erreichen eines Kriteriums vom Score-Sheet, wie beispielsweise gesträubtes Fell, oder eine Körpergewichtsreduktion um mehr als 5 % im Vergleich zum Vortag. Bis zum Erreichen der Abbruchkriterien im Score Sheet, wie beispielsweise zuckende oder ruckartige Atmung, Tumorulzeration oder 15 % Körpergewichtsreduktion zum Ausgangsgewicht, vergingen meist nur wenige Tage, sodass der Zeitraum zur Bestimmung der frühen humanen Endpunkte nicht länger als zwei Tage betrug (**Tab. 2**).

In der Phase der humanen Endpunkte zeigte sich beim orthotopen Tiermodell die höchste Belastung, quantifiziert durch eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes und der Buddelaktivität über Nacht sowie einen signifikanten Anstieg des Gesundheitsscores und der Plasmakortikosteron-Konzentration. Dabei waren die Parameter Körpergewicht und Buddelaktivität bereits einen Tag vor dem humanen Endpunkt signifikant verringert (**Abb. 8**). Diese Ergebnisse decken sich mit einer Studie, in welcher die Kombination aus reduziertem Körpergewicht und verminderter Buddelaktivität in der Lage war, den Sterbezeitpunkt zuverlässig zwei Tage im Voraus in einem Modell zur Cholestase vorherzusagen (Zhang et al. 2020). In einer anderen Studie zur intrakraniellen Bildung von Gliomen war ein Algorithmus zur Analyse des Körpergewichtes in der Lage 97 % der Endpunkte vorherzusagen (Helgers et al. 2020). Da die Mäuse aufgrund von Tumorulzeration beim subkutanem Tiermodell euthanasiert wurden, zeigte sich das Körpergewicht zum humanen Endpunkt kaum reduziert, obwohl die Tiere ansonsten sehr fit waren. Hingegen war das Buddelverhalten bei allen Mausmodellen am Tag des humanen Endpunktes sehr gering. Bei den subkutanen und intravenösen Modellen war

diese starke Verringerung durch die geringe N-Zahl und die Berechnung im gemischten Modell nicht signifikant.

Die Plasmakortikosteron-Konzentration zeigte sich sowohl beim orthotopen wie auch beim intravenösen Tiermodell signifikant erhöht am humanen Endpunkt (**Abb. 8**). In einer Studie, in welcher unter anderem akute und chronische Stressfaktoren unterschiedlichen Schweregrades bei Mäusen untersucht wurden, zeigte sich ein Anstieg der Kortikosteron-Konzentration in Situationen akuter Belastung, während die Messwerte der Konzentration bei wiederholender Belastung zurückgingen (Gong et al. 2015). Somit scheint die Plasmakortikosteron-Konzentration ein verlässlicher Indikator akuter Belastung zu sein. In einer vorherigen Studie konnte die Plasmakortikosteron-Konzentration dafür verwendet werden, um die Belastung für die Induktion unterschiedlicher gastrointestinaler Tiermodelle zu vergleichen (Kumstel et al. 2019). In dieser konnte man eine deutliche Korrelation zwischen Gesundheitsscore und Kortikosteron-Konzentration im Plasma nachweisen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich sowohl der Gesundheitsscore als auch die Kortikosteron-Konzentration im Plasma signifikant beim intravenösen und orthotopen Tumormodell im Vergleich zum subkutanen Modell erhöht (**Abb. 8B und H**). Dies deutet darauf hin, dass zum humanen Endpunkt die Belastung im subkutanen Modell deutlich geringer war als in den anderen Modellen. Da die Daten der humanen Endpunkt-Phase nicht in den RELSA eingegangen sind, kann es durchaus sein dass sich die Belastungseinschätzung der einzelnen Modelle in der humanen Endpunktphase ändert. Anhand der vorliegenden Daten ist davon auszugehen, dass das subkutane Modell die geringste Belastung am humanen Endpunkt aufweist, gefolgt vom intravenösen und orthotopen Modell. Auch wenn sich die Plasmakortikosteron-Konzentration als sehr sensibler Parameter darstellt, ist sie als Indikator für den frühen humanen Endpunkt ungeeignet, da sie eine Blutentnahme erfordert und somit mit einer mindestens geringen Belastung für das Tier einhergeht. Zudem ist auch die photometrische Messung des Plasmas zeitlich aufwendig. Parameter zur Bestimmung des frühen humanen Endpunktes sollten nicht-invasiv und unmittelbar auswertbar sein.

Die mittlere Überlebenszeit der Tiere des orthotopen Modells mit 46,6 Tage (**Abb. 3A**) im Vergleich zum subkutanem und intravenösen Tiermodell mit durchschnittlichen 63,8 Tage (**Abb. 4A**) beziehungsweise 63,3 Tage (**Abb. 5A**) suggeriert ein schnelleres und aggressiveres Tumorstadium im orthotopen Modell. Dabei waren die häufigsten Abbruchkriterien im orthotopen Tiermodell Körpergewichtsverlust von mehr als 15 % oder eine unnormale Körperhaltung, beim subkutanem Tiermodell die Tumoralteration und beim intravenösen Tiermodell eine zuckende oder ruckartige Atmung (**Tab. 2**). Zum Zeitpunkt der Euthanasie waren die Mäuse des subkutanen Modells abgesehen der Tumoralterationen nach aktiv und zeigten kaum Belastungszeichen (**Abb. 8**). Die Mäuse des intravenösen Tiermodells wiesen, ausgenommen von

der Atmung, kaum andere Auffälligkeiten laut Score-Sheet auf (**Tab. 2**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wahl der frühen humanen Endpunkte und die Definition der Abbruchkriterien tiermodellspezifisch ist. Eine tägliche Gesundheitskontrolle ist deshalb notwendig, um die Belastung in Überlebensstudien zu überwachen und zu reduzieren, damit gleichzeitig qualitativ hochwertige Daten gesammelt werden können, um zukünftig die Definition früher humaner Endpunkte weiter zu verfeinern.

7.2.2 KRIERIEN ZUR EVALUATION DES FRÜHEN HUMANEN ENDPUNKTES

Desto sensitiver ein Belastungsparameter zur Erkennung der frühen humanen Endpunkte ist, umso früher kann eine Belastung nachgewiesen werden. Diese Leistungsfähigkeit der einzelnen Parameter zwischen gesundem sowie krankem Tier zu unterscheiden und hinsichtlich der Prognose früher humaner Endpunkte zu beurteilen, lässt sich mittels Grenzwertoptimierungskurve quantifizieren. Insbesondere Buddelaktivität über Nacht zeigt mit einer AUC von 1,0 in allen drei Modellen die höchste Trennschärfe. Die Buddelaktivität nach zwei Stunden ist mit einer AUC von 0,92 - 1,0 sehr gut geeignet zur humanen Endpunkt-Prognose (**Abb. 11**). Das unter anderem Buddelverhalten als Parameter zur Bestimmung humaner Endpunkte verwendet werden kann, bestätigt die bereits von Zhang et al. publizierte Studie, in der eine Reduktion des Buddelverhaltens in Kombination mit einem 10 % reduzierten Körpergewicht den humanen Endpunkt von Tieren in einem Gallengangsligaturmodell innerhalb von zwei Tagen prognostizieren konnte (Zhang et al. 2020). Hingegen zeigte sich das Körpergewicht an den Tagen vor dem hEP als weniger sensitives Kriterium in allen Modellen (AUC: 0,59 - 0,81). Dies könnte beim subkutanen und intravenösen Modell mit den frühen sehr spezifisch-greifenden Abbruchkriterien zusammenhängen. Es könnte sein, dass die Zunahme der Tumormasse den Verlust des allgemeinen Körpergewichtes maskiert. Ein Hinweis hierauf könnte sein, dass bei einer Studie zum Peritoneal-Lymphom keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe beim Gewichtsverlust gefunden wurden (Paster et al. 2009). In anderen Endpunktstudien mit Modellen mit geringerem Tumorgroßenwachstum oder außerhalb der Tumorforschung zeigte sich das Körpergewicht als geeigneter Parameter zur Bestimmung der humanen Endpunkte. So konnte mit einem Algorithmus zur Analyse des Körpergewichtes in einem Modell für intrakranielle Gliome 97 % der Endpunkte vorhergesagt werden und mit maschinellem Lernen konnten bei einem Schlaganfallmodell 93 % beziehungsweise bei einem Sepsismodell 96 % der Tiere mit einem hohen Todesrisiko 48 sowie 72 Stunden vorher identifiziert werden (Helgers et al. 2020; Mei et al. 2019). Häufig wird ein Gewichtsverlust von mehr als 20 % des ursprünglichen Körpergewichtes als Endpunktentscheidung angenommen. Eine

vergleichende Studie zeigte, dass in den meisten Experimenten, beispielsweise für unterschiedliche Modelle der Epilepsie, Pankreasresektion und Leberresektion, die Tiere weniger als 20 % ihres ursprünglichen Körpergewichtes verloren hatten oder im Gegensatz, Modelle zur Induktion von chronischem Diabetes oder akuter Kolitis, kaum anderen Belastungszeichen aufwiesen, obwohl diese mehr als 20 % Körpergewichtsverlust erlitten hatten (Talbot et al. 2020). Eine ausschließliche Betrachtung des Abbruchkriteriums Körpergewichtsreduktion um 20 % ist daher nicht ausreichend und sollte deshalb mit zusätzlichen Kriterien kombiniert werden.

Der Gesundheitsscore wies am Tag des humanen Endpunktes eine hohe Trennschärfe für alle Tiermodelle auf, da er das ausschlaggebende Kriterium für die Euthanasie darstellt (**Tab. 2**). Dennoch zeigte sich an den zwei Tagen vor dem hEP nur eine sehr geringe prädiktive Power (AUC: 0.57 - 0.78) für den Gesundheitsscore (**Abb. 11**). Ferguson et al. zeigte auf, dass die in den Gesundheitsscore einfließenden Parameter Atemzustand, Aktivität und Reaktion auf Reize eine hohe Aussagekraft zur Identifizierung von Mäusen bei Sepsismodellen haben, welche zeitlich unmittelbar spontan versterben werden, wobei diese Parameter eine geringere Empfindlichkeit und Spezifität aufwiesen Mäuse zu erkennen, die irgendwann während des Versuchszeitrahmens sterben werden (Ferguson et al. 2023). Zudem könnte das analgetische Regime den klinischen Zustand, Aktivität oder Reaktion auf Reize eines Tieres maskieren, weshalb der Gesundheitsscore mit anderen Parametern kombiniert werden sollte, um die rechtzeitige Bestimmung der humanen Endpunkte zu gewährleisten.

Der MGS-Score wies eine geringe bis hohe prädiktive Power (AUC: 0,67 - 1,0) in den Tiermodellen auf. Obwohl die meisten Parameter darauf hindeuten, dass das orthotope Modell mit der höchsten Belastung für die Tiere in der humanen Endpunktphase einherging, war der MGS am wenigsten prädiktiv beim orthotopen Tiermodell. Dies liegt daran, dass zwei Tiere, die sich bereits in der humanen Endpunktphase befanden, einen MGS-Score von null hatten und dadurch den gemittelten Score stark senken. Eines der Tiere hat selbst am Tag des humanen Endpunktes noch einen Score von null, wodurch am hEP keine AUC von 1,0 erzielt werden kann (**Abb. 11**). Dies könnte ein Hinweis auf ein ausreichendes Refinement durch die analgetische Therapie sein. Allerdings ging das orthotope Modell am humanen Endpunkt mit mehr Schmerzen im Vergleich zu den anderen beiden Modellen einher, welches sich durch die insgesamt höheren MGS-Werte zeigte (**Abb. 8G**). Der MGS ist besonders gut geeignet, um akute postoperative und chronisch neuropathischen Schmerz nachzuweisen (Akintola et al. 2017; Matsumiya et al. 2012). Eventuell trifft dies für unterschwellige chronische Schmerzen nicht zu. Es könnte auch sein, dass eine Analgesie mit Metamizol am humanen Endpunkt nicht

mehr ausgereicht hat, beispielsweise wenn der Tumor in den Darm infiltriert oder den Gallengang abdrückt.

Da Belastungssituationen zur Veränderung der Körpertemperatur führen können, stellt die Temperatur in der Literatur eines der wichtigsten Endpunktkriterien dar (Brodkin et al. 2002). In unserer Versuchsreihe zeigte sich, außer beim intravenösen Tiermodell, eine niedrige Vorhersagekraft für die perianale Temperatur (AUC: 0.63 - 0.84). Dies könnte zum Beispiel daran liegen, dass die Messungen durch die kontaktlosen Infrarot-Thermometer ungenau waren. Auch könnte es sein, dass die subkutanen Tiere zum Zeitpunkt der Euthanasie, durch das Erreichen des Abbruchkriteriums Tumorulzeration, ansonsten keine Belastung aufwiesen (**Abb. 8**). Ein Temperaturabfall ist oftmals erst kurz vor dem humanen Endpunkt zu erheben, wie es beispielsweise in der Studie von Koch et al. ein bis zwei Tage vorher der Fall war (Koch et al. 2016).

Das Nestbauverhalten zeigte sich mit einer AUC von 0.75 - 1.0 eher als mittelmäßig prädiktiver Parameter zur humanen Endpunktbestimmung. Dies lässt sich durch die natürlichen täglichen Schwankungen des Verhaltensparameters selbst und durch die notwendige Anpassungsphase bis zum optimalen Nestbauverhalten erklären (Schwabe et al. 2020). Zudem fand Abdelrahman et al. heraus, dass die Sensitivität der Nestbauaktivität bei einer Intervention zwischen chronischer Pankreatitis und Laparotomie unterschiedlich ist, sodass eine Kombination mit anderen Belastungsparametern zu empfehlen ist (Abdelrahman et al. 2019).

Mit der ROC-Kurven Analyse konnten gezeigt werden, dass die Analyse des Buddelverhaltens (B2h und BüN), sehr gut als Parameter zur frühen humanen Endpunkt Bestimmung in allen Tiermodellen geeignet ist. Eine Reduktion des Buddelverhaltens im orthotopen Modell, nach zwei Stunden um 100 % sowie über Nacht um 88 %, kann den humanen Endpunkt mit einer einhundertprozentigen Sensitivität und Spezifität drei Tage im Voraus vorhersagen. Für das intravenöse Modell ist eine Prognose mit einer AUC von 0,92 - 1,0 bei einem reduzierten Buddelverhalten von 66 % nach zwei Stunden und 54 % über Nacht zwei Tage im Voraus möglich. Mit einer AUC von 1,0 kann der humane Endpunkt zwei Tage im Voraus beim subkutanen Modell mit einer Reduktion des Buddelverhaltens um 54 % nach zwei Stunden und über Nacht prognostiziert werden. In zukünftigen Studien könnten die Mäuse frühzeitig euthanasiert werden, sobald sich das Buddelverhalten deutlich reduziert, damit eine erhebliche Belastung der Tiere vermieden wird. Aufgrund der sehr geringen N-Zahl der Tiere, die an den entsprechenden Tagen zum humanen Endpunkt evaluiert wurden, ist dieses Ergebnis noch nicht valide (orthotop N = 2 - 5; s.c. N = 2 - 6; i.v. N = 1 - 4). Die geringe N-Zahl der Tiere insbesondere in der humanen Endpunktphase ist eine erhebliche Limitation dieser Arbeit.

Die prädiktive Power der einzelnen Parameter zur frühen humanen Endpunktbestimmung wurden mittels ROC-Kurven Analyse bestimmt. Diese Analyse eignet sich sehr gut um damit die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Parameter, zur Unterscheidung zwischen gesunden und kranken Tieren, trotz der geringen N-Zahl, zu ermitteln. Es wäre möglich, dass eine Kombination aus mehreren Parametern ebenfalls sehr gut geeignet wäre, um den humanen Endpunkt zu prognostizieren. In einer retrospektiven Studie mit Daten von Balb/CANCrI-Mäusen nach Gallengangligatur, wurde die Leistung zur frühen humanen Endpunktbestimmung einzelner Score-Sheet Kriterien, Buddel- und Nestbauverhalten sowie die Kombination dieser Parameter mittels Cox-Proportional-Hazards-Modell gefolgt vom Harrell's C-Index analysiert (Zhang et al. 2020). Hier konnte festgestellt werden, dass ein Körpergewichtsverlust von 10 - 20 %, in Kombination mit einer Verringerung der Buddelaktivität um mehr als 79,4 %, in der Lage war, den humanen Endpunkt für die Tiere zwei Tage im Voraus vorherzusagen (Zhang et al. 2020). In einer anderen Studie wurde ein Modell mit Hilfe von maschinellem Lernen unter der Verwendung von Körpergewichtsänderung, Körpertemperatur und Neuroscore für die Endpunktbestimmung in Mausmodellen für Sepsis und Schlaganfällen entwickelt (Mei et al. 2019). In dieser Arbeit konnten diese oder andere vergleichbare mathematische Methoden aufgrund der niedrigen N-Zahl und der wenigen Datenpunkte jedoch nicht verwenden. Auch der genutzte RELSA_{max} eignet sich nicht zur Vorhersage der prädiktiven Power der einzelnen Belastungsparameter, da er nur den maximalen Schweregrad für jedes Tier berechnet (Talbot et al. 2023). In der zukünftigen Forschung sollten weitere Daten gesammelt werden, sodass auch andere mathematische Methoden zur Bestimmung und Validierung früher humaner Endpunkte eingesetzt werden können.

7.3 DIE WAHL DES RICHTIGEN TIERMODELLS

Die untersuchten Tiermodelle weisen in der Tumorprogressionsphase eine unterschiedliche schwere der Belastung auf, wobei das orthotope Tiermodell im Vergleich zum intravenösen und subkutanen Tiermodell signifikant höher belastend war (**Abb. 10**). Abhängig von der Forschungshypothese kann die richtige Auswahl eines geeigneten Tiermodells zur Reduktion der Belastung der Tiere beitragen. Subkutane Tiermodelle sind vergleichbar einfach umzusetzen, gehen mit geringer Belastung einher und können zum Beispiel in der präklinischen Medikamentenentwicklung eingesetzt werden, auch wenn sie ein langsames Tumorwachstum, die Bildung einer anderen spezifischen Tumormikroumgebung sowie eine andere Beteiligung der Immunreaktion im Vergleich zum orthotopen Modell aufweisen (Stribbling und Ryan 2022). In einem zellinduzierten Modell zu Lungenkrebs zeigten sich sogar widersprüchliche therapeuti-

sche Wirkungen, indem eine Behandlung mit Olaparib, Ceralasertib und ionisierender Strahlung das Tumorwachstum beim subkutanen Tiermodell verzögerte, jedoch beim orthotopen Tiermodell nur eine begrenzte Wirksamkeit mit Anzeichen von Toxizität aufwies. In einem Modell zum Brustkrebs zeigten sich je nach Injektionsort unterschiedliche Ausprägungen von Nekrosen und der Vaskularisierung (Cai et al. 2022; Tran Chau et al. 2020). Das subkutane Tiermodell erlaubt nicht die Betrachtung der Tumorprogression unter orthotopen Gewebebedingungen, da die Wachstums Umgebung des Tumorursprungs nicht genau widergespiegelt wird (Stribbling und Ryan 2022). Die Verwendung subkutaner Tiermodelle in der Forschung kann ein erster Schritt sein, um die Belastung der Tiere in in vivo Experimenten gering zu halten, bevor man stärker belastende orthotope Modelle verwendet.

Die Metastasierung des Primärtumors kann durch das intravenöse Tiermodell simuliert werden. In einem Modell zu Brustkrebsmetastasen in der Lunge konnte gezeigt werden, dass nach Schwanzveneninjektion von Tumorzellen die Ausbildung eines Primärtumors ausblieb, hingegen die Zellanreicherung in der gesamten Lunge erfolgte (Rashid et al. 2013). Insbesondere das PDA wird oftmals erst spät diagnostiziert, ist zu diesem Zeitpunkt metastasiert und chirurgisch nicht kurativ behandelbar (He et al. 2014a). Zur Beseitigung potenzieller Metastasen kommen deshalb Chemotherapeutika zum Einsatz (He et al. 2014b). Das intravenöse Modell ermöglicht die Testung neuer Therapeutika zur Bekämpfung von Metastasen. Dies zeigt, dass zur Beantwortung der spezifischen Forschungsfrage die Wahl des Tiermodells genauso wichtig ist, wie die Berücksichtigung der Belastungsschwere des Tiermodells.

VIII. SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Belastung von verschiedenen murinen Pankreaskarzinom Modellen mit Hilfe unterschiedlicher Belastungsparameter evidenz-basiert quantifizieren lässt. Ein direkter Vergleich dieser multivariaten Belastung wurde mit dem RELSA-Algorithmus ermöglicht. Hier zeigte sich während der Tumorprogression ein signifikant höherer $RELSA_{max}$ beim orthotopen Pankreaskarzinom im Vergleich zum subkutanen und intravenösen Modell. Andere gastrointestinale Tiermodelle wiesen eine deutlich höhere Belastung im Vergleich zu den PDA-Modellen auf. Trotz der unterschiedlichen Schweregrade muss die spezifische Forschungshypothese bei der Wahl des richtigen Tiermodells berücksichtigt werden.

Gleichzeitig konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die Reduktion von Buddelverhalten als prädiktiver humaner Endpunkt in allen untersuchten Pankreasmodellen verwendet werden kann. Durch die Verwendung der Buddelanalyse als frühes humanes Endpunktkriterium, kann eine erhebliche Belastung in zukünftigen Studien verhindert werden. Diese Aussage lässt sich jedoch nicht modellübergreifend für alle onkologischen Tiermodelle verallgemeinern, sodass die gewählten Parameter modellspezifisch angepasst werden müssen. Für eine spezifische Empfehlung bedarf es zusätzlicher Forschung, wodurch es möglich wird durch die datenbasierte Analyse das Leid der Tiere standardisiert auf ein Minimum zu beschränken. Hierfür eignen sich gegebenenfalls andere mathematische Methoden wie maschinelles Lernen, die aufgrund der niedrigen N-Zahlen nicht genutzt werden konnten. Mit Hilfe weiterer Forschung zur Bestimmung evidenz-basierter früher humaner Endpunkte sowie der Auswahl eines geeigneten Tiermodells unter Berücksichtigung der evidenzbasierten Belastungsschwere, lässt sich das Leid von Labortieren weiter verringern.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelrahman, Ahmed; Kumstel, Simone; Zhang, Xianbin; Liebig, Marie; Wendt, Edgar Heinz Uwe; Eichberg, Johanna et al. (2019): A novel multi-parametric analysis of non-invasive methods to assess animal distress during chronic pancreatitis. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 14084. DOI: 10.1038/s41598-019-50682-3.

Adriaan Bouwknecht, J.; Olivier, Berend; Paylor, Richard E. (2007): The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: A review of pharmacological and genetic studies in the mouse. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31 (1), S. 41–59. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2006.02.002.

Akintola, Titilola; Raver, Charles; Studlack, Paige; Uddin, Olivia; Masri, Radi; Keller, Asaf (2017): The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. In: *Neurobiology of pain (Cambridge, Mass.)* 2, S. 13–17. DOI: 10.1016/j.ynpai.2017.10.001.

Almeida, Amanda Spring de; Rigo, Flávia Karine; Prá, Samira Dal-Toé de; Milioli, Alessandra Marcone; Pereira, Gabriele Cheiran; Lückemeyer, Débora Denardin et al. (2020): Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma. In: *Pharmacological research* 152, S. 104576. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104576.

Aulehner, Katharina; Leenaars, Cathalijn; Buchecker, Verena; Stirling, Helen; Schönhoff, Katharina; King, Hannah et al. (2022): Grimace scale, burrowing, and nest building for the assessment of post-surgical pain in mice and rats-A systematic review. In: *Frontiers in veterinary science* 9, S. 930005. DOI: 10.3389/fvets.2022.930005.

Avgerinos, D. V.; Björnsson, J. (2001): Malignant neoplasms: discordance between clinical diagnoses and autopsy findings in 3,118 cases. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 109 (11), S. 774–780. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2001.d01-145.x.

Benedetti, M.; Merino, R.; Kusuda, R.; Ravanelli, M. I.; Cadetti, F.; dos Santos, P. et al. (2012): Plasma corticosterone levels in mouse models of pain. In: *European journal of pain (London, England)* 16 (6), S. 803–815. DOI: 10.1002/j.1532-2149.2011.00066.x.

Bert, Bettina; Dörendahl, Antje; Leich, Nora; Vietze, Julia; Steinfath, Matthias; Chmielewska, Justyna et al. (2017): Rethinking 3R strategies: Digging deeper into AnimalTestInfo promotes transparency in in vivo biomedical research. In: *PLoS biology* 15 (12), e2003217. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003217.

Boldt, Lena; Koska, Ines; van Maarten Dijk, R.; Talbot, Steven R.; Miljanovic, Nina; Palme, Rupert et al. (2021): Toward evidence-based severity assessment in mouse models with repeated seizures: I. Electrical kindling. In: *Epilepsy & behavior : E&B* 115, S. 107689. DOI: 10.1016/j.yebeh.2020.107689.

- Bosetti, C.; Rosato, V.; Li, D.; Silverman, D.; Petersen, G. M.; Bracci, P. M. et al. (2014): Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. In: *Annals of Oncology* 25 (10), S. 2065–2072. DOI: 10.1093/annonc/mdu276.
- Brodkin, J.; Bradbury, M.; Busse, C.; Warren, N.; Bristow, L. J.; Varney, M. A. (2002): Reduced stress-induced hyperthermia in mGluR5 knockout mice. In: *The European journal of neuroscience* 16 (11), S. 2241–2244. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2002.02294.x.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2018): Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2017. Online verfügbar unter <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/versuchstierzahlen2017.html>, zuletzt geprüft am 21.02.2024.
- Bundesministerium für Justiz (2006): TierSchG - Tierschutzgesetz. Online verfügbar unter <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>, zuletzt geprüft am 22.02.2024.
- Cai, YeYu; Chen, TaiLi; Liu, JiaYi; Peng, ShuHui; Liu, Huan; Lv, Min et al. (2022): Orthotopic Versus Allotopic Implantation: Comparison of Radiological and Pathological Characteristics. In: *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 55 (4), S. 1133–1140. DOI: 10.1002/jmri.27940.
- Carlson, Linda E.; Zelinski, Erin L.; Toivonen, Kirsti I.; Sundstrom, Laura; Jobin, Chad T.; Damaskos, Penny; Zebrack, Brad (2019): Prevalence of psychosocial distress in cancer patients across 55 North American cancer centers. In: *Journal of psychosocial oncology* 37 (1), S. 5–21. DOI: 10.1080/07347332.2018.1521490.
- Conroy, Thierry; Desseigne, Françoise; Ychou, Marc; Bouché, Olivier; Guimbaud, Rosine; Bécouarn, Yves et al. (2011): FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. In: *The New England journal of medicine* 364 (19), S. 1817–1825. DOI: 10.1056/NEJMoa1011923.
- Deacon, Robert M. J. (2006a): Assessing nest building in mice. In: *Nature protocols* 1 (3), S. 1117–1119. DOI: 10.1038/nprot.2006.170.
- Deacon, Robert M. J. (2006b): Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. In: *Nature protocols* 1 (1), S. 118–121. DOI: 10.1038/nprot.2006.19.
- Deacon, Robert M. J.; Reisel, Daniel; Perry, V. Hugh; Nicholas, J.; Rawlins, P. (2005): Hippocampal scrapie infection impairs operant DRL performance in mice. In: *Behavioural brain research* 157 (1), S. 99–105. DOI: 10.1016/j.bbr.2004.06.013.
- Der Schweizerische Bundesrat (2008): Tierschutzverordnung (TSchV). Online verfügbar unter <https://www.fedlex.admin.ch/eli/cc/2008/416/de>, zuletzt geprüft am 28.02.2024.
- Deutsche Forschungsgesellschaft (2019): Tierversuche in der Forschung: Das 3R-Prinzip und die Aussagekraft wissenschaftlicher Forschung. Handreichung der Ständigen Senatskommission für tierexperimentelle Forschung der DFG zur Planung und Beschreibung tierexperimenteller Forschungsprojekte. Online verfügbar unter <https://www.dfg.de/resource/blob/309210/f6c41e7837a3936896dad950a83c0e32/handreichung-sk-tierversuche-data.pdf>, zuletzt geprüft am 21.02.2024.

- Duffy, Samuel S.; Perera, Chamini J.; Makker, Preet G. S.; Lees, Justin G.; Carrive, Pascal; Moalem-Taylor, Gila (2016): Peripheral and Central Neuroinflammatory Changes and Pain Behaviors in an Animal Model of Multiple Sclerosis. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 369. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00369.
- Durst, Mattea; Graf, Theresia Reding; Graf, Rolf; Kron, Mareike; Arras, Margarete; Zechner, Dietmar et al. (2021a): Analysis of Pain and Analgesia Protocols in Acute Cerulein-Induced Pancreatitis in Male C57BL/6 Mice. In: *Frontiers in physiology* 12, S. 744638. DOI: 10.3389/fphys.2021.744638.
- Durst, Mattea S.; Arras, Margarete; Palme, Rupert; Talbot, Steven R.; Jirkof, Paulin (2021b): Lidocaine and bupivacaine as part of multimodal pain management in a C57BL/6J laparotomy mouse model. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 10918. DOI: 10.1038/s41598-021-90331-2.
- Fahrmann, Johannes F.; Bantis, Leonidas E.; Capello, Michela; Scelo, Ghislaine; Dennison, Jennifer B.; Patel, Nikul et al. (2019): A Plasma-Derived Protein-Metabolite Multiplexed Panel for Early-Stage Pancreatic Cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 111 (4), S. 372–379. DOI: 10.1093/jnci/djy126.
- Fattahi, Rana; Balci, N. Cem; Perman, William H.; Hsueh, Eddy C.; Alkaade, Samer; Havlioglu, Necat; Burton, Frank R. (2009): Pancreatic diffusion-weighted imaging (DWI): comparison between mass-forming focal pancreatitis (FP), pancreatic cancer (PC), and normal pancreas. In: *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 29 (2), S. 350–356. DOI: 10.1002/jmri.21651.
- Ferguson, Lindsey T.; Rashied, Ammar A.; Liang, Zhe; Yumoto, Tetsuya; Anyalebechi, Jerome C.; Swift, David A. et al. (2023): A Novel Scoring System for Humane Endpoints in Mice with Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis. In: *Comparative medicine* 73 (6), S. 446–460. DOI: 10.30802/AALAS-CM-22-000124.
- Fonti, Rosa; Conson, Manuel; Del Vecchio, Silvana (2019): PET/CT in radiation oncology. In: *Seminars in oncology* 46 (3), S. 202–209. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2019.07.001.
- Gaskill, Brianna N.; Gordon, Christopher J.; Pajor, Edmond A.; Lucas, Jeffrey R.; Davis, Jerry K.; Garner, Joseph P. (2013): Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. In: *Physiology & behavior* 110–111, S. 87–95. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.12.018.
- Ge, Long; Pan, Bei; Song, Fujian; Ma, Jichun; Zeraatkar, Dena; Zhou, Jianguo; Tian, Jinhui (2017): Comparing the diagnostic accuracy of five common tumour biomarkers and CA19-9 for pancreatic cancer: a protocol for a network meta-analysis of diagnostic test accuracy. In: *BMJ open* 7 (12), e018175. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-018175.
- Gemmel, Christian; Eickhoff, Axel; Helmstädter, Lars; Riemann, Jürgen F. (2009): Pancreatic cancer screening: state of the art. In: *Expert review of gastroenterology & hepatology* 3 (1), S. 89–96. DOI: 10.1586/17474124.3.1.89.
- Gengenbacher, Nicolas; Singhal, Mahak; Augustin, Hellmut G. (2017): Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. In: *Nature reviews. Cancer* 17 (12), S. 751–765. DOI: 10.1038/nrc.2017.92.
- Gong, Shuai; Miao, Yi-Long; Jiao, Guang-Zhong; Sun, Ming-Ju; Li, Hong; Lin, Juan et al. (2015): Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice. In: *PLoS ONE* 10 (2), e0117503. DOI: 10.1371/journal.pone.0117503.

- Granger, Jill I.; Ratti, Pietro-Luca; Datta, Subhash C.; Raymond, Richard M.; Opp, Mark R. (2013): Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. In: *Psychoneuroendocrinology* 38 (7), S. 1047–1057. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2012.10.010.
- Grant, T. J.; Hua, K.; Singh, A. (2016): Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. In: *Progress in molecular biology and translational science* 144, S. 241–275. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.008.
- Green, M. R. (1996): Gemcitabine safety overview. In: *Seminars in oncology* 23 (5 Suppl 10), S. 32–35.
- Griffin, James I.; Chen, Xinyue; Duan, Luqi; Mu, Qingxin; Ho, Rodney J. Y. (2024): Inoculation of Pan02 cells produces tumor nodules in mouse pancreas: Characterization of a novel orthotopic pancreatic ductal adenocarcinoma tumor model for interventional studies. In: *PloS one* 19 (3), e0300723. DOI: 10.1371/journal.pone.0300723.
- Groot, Vincent P.; Gemenetzi, Georgios; Blair, Alex B.; Ding, Ding; Javed, Ammar A.; Burkhart, Richard A. et al. (2018): Implications of the Pattern of Disease Recurrence on Survival Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. In: *Annals of surgical oncology* 25 (8), S. 2475–2483. DOI: 10.1245/s10434-018-6558-7.
- Hackl, Christina; Man, Shan; Francia, Giulio; Milsom, Chloe; Xu, Ping; Kerbel, Robert S. (2013): Metronomic oral topotecan prolongs survival and reduces liver metastasis in improved pre-clinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. In: *Gut* 62 (2), S. 259–271. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301585.
- Häger, Christine; Keubler, Lydia M.; Talbot, Steven R.; Biernot, Svenja; Weegh, Nora; Buchheiser, Stephanie et al. (2018): Running in the wheel: Defining individual severity levels in mice. In: *PLoS biology* 16 (10), e2006159. DOI: 10.1371/journal.pbio.2006159.
- Halbrook, Christopher J.; Lyssiotis, Costas A.; Di Pasca Magliano, Marina; Maitra, Anirban (2023): Pancreatic cancer: Advances and challenges. In: *Cell* 186 (8), S. 1729–1754. DOI: 10.1016/j.cell.2023.02.014.
- Hankenson, F. Claire; Ruskoski, Nicholas; van Saun, Marjorie; Ying, Gui-Shuang; Oh, Jaewook; Fraser, Nigel W. (2013): Weight loss and reduced body temperature determine humane endpoints in a mouse model of ocular herpesvirus infection. In: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 52 (3), S. 277–285.
- Harewood, Gavin C.; Wiersema, Maurits J. (2002): Endosonography-guided fine needle aspiration biopsy in the evaluation of pancreatic masses. In: *The American journal of gastroenterology* 97 (6), S. 1386–1391. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.05777.x.
- Hawkins, P.; Morton, D. B.; Burman, O.; Dennison, N.; Honess, P.; Jennings, M. et al. (2011): A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. In: *Laboratory animals* 45 (1), S. 1–13. DOI: 10.1258/la.2010.010031.
- He, Jin; Ahuja, Nita; Makary, Martin A.; Cameron, John L.; Eckhauser, Frederic E.; Choti, Michael A. et al. (2014a): 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 16 (1), S. 83–90. DOI: 10.1111/hpb.12078.

- He, Jin; Page, Andrew J.; Weiss, Matthew; Wolfgang, Christopher L.; Herman, Joseph M.; Pawlik, Timothy M. (2014b): Management of borderline and locally advanced pancreatic cancer: where do we stand? In: *World journal of gastroenterology* 20 (9), S. 2255–2266. DOI: 10.3748/wjg.v20.i9.2255.
- Helgers, Simeon O. A.; Talbot, Steven R.; Riedesel, Ann-Kristin; Wassermann, Laura; Wu, Zhiqun; Krauss, Joachim K. et al. (2020): Body weight algorithm predicts humane endpoint in an intracranial rat glioma model. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 9020. DOI: 10.1038/s41598-020-65783-7.
- Hermann, Chris D.; Schoeps, Benjamin; Eckfeld, Celina; Munkhbaatar, Enkhtsetseg; Kniep, Lukas; Prokopchuk, Olga et al. (2021): TIMP1 expression underlies sex disparity in liver metastasis and survival in pancreatic cancer. In: *The Journal of experimental medicine* 218 (11). DOI: 10.1084/jem.20210911.
- Hohlbaum, Katharina; Bert, Bettina; Dietze, Silke; Palme, Rupert; Fink, Heidrun; Thöne-Reinke, Christa (2017): Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice-Assessing the degree of distress. In: *PloS one* 12 (6), e0179588. DOI: 10.1371/journal.pone.0179588.
- Hu, Jian-Xiong; Zhao, Cheng-Fei; Chen, Wen-Biao; Liu, Qi-Cai; Li, Qu-Wen; Lin, Yan-Ya; Gao, Feng (2021): Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. In: *World journal of gastroenterology* 27 (27), S. 4298–4321. DOI: 10.3748/wjg.v27.i27.4298.
- Huang, Lamei; Guo, Zhixing; Wang, Fang; Fu, Liwu (2021): KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. In: *Signal transduction and targeted therapy* 6 (1), S. 386. DOI: 10.1038/s41392-021-00780-4.
- Ilic, Milena; Ilic, Irena (2016): Epidemiology of pancreatic cancer. In: *World journal of gastroenterology* 22 (44), S. 9694–9705. DOI: 10.3748/wjg.v22.i44.9694.
- Iodice, Simona; Gandini, Sara; Maisonneuve, Patrick; Lowenfels, Albert B. (2008): Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. In: *Langenbeck's archives of surgery* 393 (4), S. 535–545. DOI: 10.1007/s00423-007-0266-2.
- Jacobs, Eric J.; Chanock, Stephen J.; Fuchs, Charles S.; Lacroix, Andrea; McWilliams, Robert R.; Steplowski, Emily et al. (2010): Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). In: *International journal of cancer* 127 (6), S. 1421–1428. DOI: 10.1002/ijc.25148.
- Jensen, Mette Munk; Jørgensen, Jesper Tranekjaer; Binderup, Tina; Kjaer, Andreas (2008): Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. In: *BMC medical imaging* 8, S. 16. DOI: 10.1186/1471-2342-8-16.
- Jesus, Rosa de; Tratner, Adam E.; Madrid, Alanna; Rivera-Mondragón, Andrés; Navas, Goy E.; Leonart, Ricardo et al. (2023): Body Temperature Drop as a Humane Endpoint in Snake Venom-Lethality Neutralization Tests. In: *Toxins* 15 (9). DOI: 10.3390/toxins15090525.
- Jirkof, Paulin (2014): Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. In: *Journal of neuroscience methods* 234, S. 139–146. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2014.02.001.

- Jirkof, Paulin; Abdelrahman, Ahmed; Bleich, André; Durst, Mattea; Keubler, Lydia; Potschka, Heidrun et al. (2020): A safe bet? Inter-laboratory variability in behaviour-based severity assessment. In: *Laboratory animals* 54 (1), S. 73–82. DOI: 10.1177/0023677219881481.
- Jirkof, Paulin; Cesarovic, Nikola; Rettich, Andreas; Fleischmann, Thea; Arras, Margarete (2012): Individual housing of female mice: influence on postsurgical behaviour and recovery. In: *Laboratory animals* 46 (4), S. 325–334. DOI: 10.1258/la.2012.012027.
- Jirkof, Paulin; Cesarovic, Nikola; Rettich, Andreas; Nicholls, Flora; Seifert, Burkhardt; Arras, Margarete (2010): Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 4, S. 165. DOI: 10.3389/fnbeh.2010.00165.
- Jirkof, Paulin; Durst, Mattea; Klopffleisch, Robert; Palme, Rupert; Thöne-Reineke, Christa; Buttgereit, Frank et al. (2019): Administration of Tramadol or Buprenorphine via the drinking water for post-operative analgesia in a mouse-osteotomy model. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 10749. DOI: 10.1038/s41598-019-47186-5.
- Jirkof, Paulin; Fleischmann, Thea; Cesarovic, Nikola; Rettich, Andreas; Vogel, Johannes; Arras, Margarete (2013): Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. In: *Laboratory animals* 47 (3), S. 153–161. DOI: 10.1177/0023677213475603.
- Joshi, Abhishek; Soni, Arun; Acharya, Sanjeev (2022): In vitro models and ex vivo systems used in inflammatory bowel disease. In: *In vitro models* 1 (3), S. 213–227. DOI: 10.1007/s44164-022-00017-w.
- Kelsen, D. P.; Portenoy, R.; Thaler, H.; Tao, Y.; Brennan, M. (1997): Pain as a predictor of outcome in patients with operable pancreatic carcinoma. In: *Surgery* 122 (1), S. 53–59. DOI: 10.1016/s0039-6060(97)90264-6.
- Kersten, Kelly; Visser, Karin E. de; van Miltenburg, Martine H.; Jonkers, Jos (2017): Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. In: *EMBO molecular medicine* 9 (2), S. 137–153. DOI: 10.15252/emmm.201606857.
- Keubler, Lydia M.; Hoppe, Nils; Potschka, Heidrun; Talbot, Steven R.; Vollmar, Brigitte; Zechner, Dietmar et al. (2020): Where are we heading? Challenges in evidence-based severity assessment. In: *Laboratory animals* 54 (1), S. 50–62. DOI: 10.1177/0023677219877216.
- Kim, Aeyung; Im, Minju; Ma, Jin Yeul (2018): A novel herbal formula, SGE, induces endoplasmic reticulum stress-mediated cancer cell death and alleviates cachexia symptoms induced by colon-26 adenocarcinoma. In: *Oncotarget* 9 (23), S. 16284–16296. DOI: 10.18632/oncotarget.24616.
- Kirkegård, Jakob; Cronin-Fenton, Deirdre; Heide-Jørgensen, Uffe; Mortensen, Frank Viborg (2018): Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Nationwide Matched-Cohort Study in Denmark. In: *Gastroenterology* 154 (6), S. 1729–1736. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.02.011.
- Klein, Alison P. (2021): Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 18 (7), S. 493–502. DOI: 10.1038/s41575-021-00457-x.
- Koch, Amory; Gulani, Jatinder; King, Gregory; Hieber, Kevin; Chappell, Mark; Ossetrova, Natalia (2016): Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model. In: *PloS one* 11 (8), e0161079. DOI: 10.1371/journal.pone.0161079.

- Kumstel, Simone; Tang, Guanglin; Zhang, Xianbin; Kerndl, Hagen; Vollmar, Brigitte; Zechner, Dietmar (2019): Grading Distress of Different Animal Models for Gastrointestinal Diseases Based on Plasma Corticosterone Kinetics. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 9 (4). DOI: 10.3390/ani9040145.
- Kumstel, Simone; Vasudevan, Praveen; Palme, Rupert; Zhang, Xianbin; Wendt, Edgar Heinz Uwe; David, Robert et al. (2020a): Benefits of non-invasive methods compared to telemetry for distress analysis in a murine model of pancreatic cancer. In: *Journal of advanced research* 21, S. 35–47. DOI: 10.1016/j.jare.2019.09.002.
- Kumstel, Simone; Wendt, Edgar H. U.; Eichberg, Johanna; Talbot, Steven R.; Häger, Christine; Zhang, Xianbin et al. (2020b): Grading animal distress and side effects of therapies. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1473 (1), S. 20–34. DOI: 10.1111/nyas.14338.
- Lambe, Mats; Eloranta, Sandra; Wigertz, Annette; Blomqvist, Paul (2011): Pancreatic cancer; reporting and long-term survival in Sweden. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 50 (8), S. 1220–1227. DOI: 10.3109/0284186X.2011.599338.
- Langford, Dale J.; Bailey, Andrea L.; Chanda, Mona Lisa; Clarke, Sarah E.; Drummond, Tanya E.; Echols, Stephanie et al. (2010): Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. In: *Nature methods* 7 (6), S. 447–449. DOI: 10.1038/nmeth.1455.
- Leach, D. R.; Krummel, M. F.; Allison, J. P. (1996): Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. In: *Science (New York, N.Y.)* 271 (5256), S. 1734–1736. DOI: 10.1126/science.271.5256.1734.
- Linden, Wolfgang; Vodermaier, Andrea; Mackenzie, Regina; Greig, Duncan (2012): Anxiety and depression after cancer diagnosis: prevalence rates by cancer type, gender, and age. In: *Journal of affective disorders* 141 (2-3), S. 343–351. DOI: 10.1016/j.jad.2012.03.025.
- Liu, Xingxing; Fang, Jiaru; Huang, Shuang; Wu, Xiaoxue; Xie, Xi; Wang, Ji et al. (2021): Tumor-on-a-chip: from bioinspired design to biomedical application. In: *Microsystems & nanoengineering* 7, S. 50. DOI: 10.1038/s41378-021-00277-8.
- Mallien, Anne Stephanie; Pfeiffer, Natascha; Brandwein, Christiane; Inta, Dragos; Sprengel, Rolf; Palme, Rupert et al. (2022): Comparative Severity Assessment of Genetic, Stress-Based, and Pharmacological Mouse Models of Depression. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 16, S. 908366. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.908366.
- Matsumiya, Lynn C.; Sorge, Robert E.; Sotocinal, Susana G.; Tabaka, John M.; Wieskopf, Jeffrey S.; Zaloum, Austin et al. (2012): Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. In: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 51 (1), S. 42–49.
- Mattei, Fabrizio; Andreone, Sara; Mencattini, Arianna; Ninno, Adele de; Businaro, Luca; Martinelli, Eugenio; Schiavoni, Giovanna (2021): Oncoimmunology Meets Organs-on-Chip. In: *Frontiers in molecular biosciences* 8, S. 627454. DOI: 10.3389/fmolb.2021.627454.
- McGuigan, Andrew; Kelly, Paul; Turkington, Richard C.; Jones, Claire; Coleman, Helen G.; McCain, R. Stephen (2018): Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. In: *World journal of gastroenterology* 24 (43), S. 4846–4861. DOI: 10.3748/wjg.v24.i43.4846.

- Mei, Jie; Banneke, Stefanie; Lips, Janet; Kuffner, Melanie T. C.; Hoffmann, Christian J.; Dirnagl, Ulrich et al. (2019): Refining humane endpoints in mouse models of disease by systematic review and machine learning-based endpoint definition. In: *ALTEX* 36 (4), S. 555–571. DOI: 10.14573/altex.1812231.
- Mei, Jie; Riedel, Nico; Grittner, Ulrike; Endres, Matthias; Banneke, Stefanie; Emmrich, Julius Valentin (2018): Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 3526. DOI: 10.1038/s41598-018-22020-6.
- Mekada, Kazuyuki; Abe, Kuniya; Murakami, Ayumi; Nakamura, Satoe; Nakata, Hatsumi; Moriwaki, Kazuo et al. (2009): Genetic differences among C57BL/6 substrains. In: *Experimental animals* 58 (2), S. 141–149. DOI: 10.1538/expanim.58.141.
- Miller, Amy; Kitson, Gemma; Skalkoyannis, Benjamin; Leach, Matthew (2015): The effect of isoflurane anaesthesia and buprenorphine on the mouse grimace scale and behaviour in CBA and DBA/2 mice. In: *Applied animal behaviour science* 172, S. 58–62. DOI: 10.1016/j.applanim.2015.08.038.
- Mittal, Vijay K.; Bhullar, Jasneet Singh; Jayant, Kumar (2015): Animal models of human colorectal cancer: Current status, uses and limitations. In: *World journal of gastroenterology* 21 (41), S. 11854–11861. DOI: 10.3748/wjg.v21.i41.11854.
- Mogil, J. S.; Wilson, S. G.; Bon, K.; Lee, S. E.; Chung, K.; Raber, P. et al. (1999): Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. In: *Pain* 80 (1-2), S. 67–82. DOI: 10.1016/s0304-3959(98)00197-3.
- Möller, Christina; Wolf, Fabio; van Dijk, R. Maarten; Di Liberto, Valentina; Russmann, Vera; Keck, Michael et al. (2018): Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: I. Electrical kindling. In: *Epilepsia* 59 (4), S. 765–777. DOI: 10.1111/epi.14028.
- Mormède, Pierre; Andanson, Stéphane; Aupérin, Benoit; Beerda, Bonne; Guémené, Daniel; Malmkvist, Jens et al. (2007): Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. In: *Physiology & behavior* 92 (3), S. 317–339. DOI: 10.1016/j.physbeh.2006.12.003.
- Morton, D. B.; Griffiths, P. H. (1985): Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. In: *The Veterinary record* 116 (16), S. 431–436. DOI: 10.1136/vr.116.16.431.
- Munck, A.; Guyre, P. M.; Holbrook, N. J. (1984): Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. In: *Endocrine Reviews* 5 (1), S. 25–44. DOI: 10.1210/edrv-5-1-25.
- Naudin, Sabine; Li, Kuanrong; Jaouen, Tristan; Assi, Nada; Kyrø, Cecilie; Tjønneland, Anne et al. (2018): Lifetime and baseline alcohol intakes and risk of pancreatic cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. In: *International journal of cancer* 143 (4), S. 801–812. DOI: 10.1002/ijc.31367.
- Neoptolemos, John P.; Palmer, Daniel H.; Ghaneh, Paula; Psarelli, Eftychia E.; Valle, Juan W.; Halloran, Christopher M. et al. (2017): Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine

with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. In: *Lancet (London, England)* 389 (10073), S. 1011–1024. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32409-6.

Norris, Alexis L.; Roberts, Nicholas J.; Jones, Siân; Wheelan, Sarah J.; Papadopoulos, Nickolas; Vogelstein, Bert et al. (2015): Familial and sporadic pancreatic cancer share the same molecular pathogenesis. In: *Familial cancer* 14 (1), S. 95–103. DOI: 10.1007/s10689-014-9755-y.

Oberstein, Paul E.; Olive, Kenneth P. (2013): Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? In: *Therapeutic advances in gastroenterology* 6 (4), S. 321–337. DOI: 10.1177/1756283X13478680.

Oettle, Helmut; Neuhaus, Peter; Hochhaus, Andreas; Hartmann, Jörg Thomas; Gellert, Klaus; Ridwelski, Karsten et al. (2013): Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. In: *JAMA* 310 (14), S. 1473–1481. DOI: 10.1001/jama.2013.279201.

Official Journal 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 Text with EEA relevance. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>, zuletzt geprüft am 21.02.2024.

Pannala, Rahul; Leirness, Jeffery B.; Bamlet, William R.; Basu, Ananda; Petersen, Gloria M.; Chari, Suresh T. (2008): Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. In: *Gastroenterology* 134 (4), S. 981–987. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.01.039.

Partecke, L. I.; Sendler, M.; Kaeding, A.; Weiss, F. U.; Mayerle, J.; Dummer, A. et al. (2011): A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. In: *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 47 (2), S. 98–107. DOI: 10.1159/000329413.

Paster, Eden V.; Villines, Kimberly A.; Hickman, Debra L. (2009): Endpoints for mouse abdominal tumor models: refinement of current criteria. In: *Comparative medicine* 59 (3), S. 234–241.

Pawlik, Timothy M.; Laheru, Daniel; Hruban, Ralph H.; Coleman, Joann; Wolfgang, Christopher L.; Campbell, Kurt et al. (2008): Evaluating the impact of a single-day multidisciplinary clinic on the management of pancreatic cancer. In: *Annals of surgical oncology* 15 (8), S. 2081–2088. DOI: 10.1245/s10434-008-9929-7.

Pfeiffenberger, U.; Yau, T.; Fink, D.; Tichy, A.; Palme, R.; Egerbacher, M.; Rülcke, T. (2015): Assessment and refinement of intra-bone marrow transplantation in mice. In: *Laboratory animals* 49 (2), S. 121–131. DOI: 10.1177/0023677214559627.

Prahallad, Anirudh; Sun, Chong; Huang, Sidong; Di Nicolantonio, Federica; Salazar, Ramon; Zecchin, Davide et al. (2012): Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. In: *Nature* 483 (7387), S. 100–103. DOI: 10.1038/nature10868.

Prasad, Vinay; Kim, Chul; Burotto, Mauricio; Vandross, Andrae (2015): The Strength of Association Between Surrogate End Points and Survival in Oncology: A Systematic Review of Trial-Level Meta-analyses. In: *JAMA internal medicine* 175 (8), S. 1389–1398. DOI: 10.1001/jamainternmed.2015.2829.

- Priebe, T. S.; Atkinson, E. N.; Pan, B. F.; Nelson, J. A. (1992): Intrinsic resistance to anticancer agents in the murine pancreatic adenocarcinoma PANC02. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 29 (6), S. 485–489. DOI: 10.1007/BF00684853.
- Ralph, C. R.; Tilbrook, A. J. (2016): INVITED REVIEW: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. In: *Journal of animal science* 94 (2), S. 457–470. DOI: 10.2527/jas.2015-9645.
- Rashid, Omar M.; Nagahashi, Masayuki; Ramachandran, Suburamianiam; Dumur, Catherine I.; Schaum, Julia C.; Yamada, Akimitsu et al. (2013): Is tail vein injection a relevant breast cancer lung metastasis model? In: *Journal of thoracic disease* 5 (4), S. 385–392. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.17.
- Ray, Maria A.; Johnston, Nancy A.; Verhulst, Steven; Trammell, Rita A.; Toth, Linda A. (2010): Identification of markers for imminent death in mice used in longevity and aging research. In: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 49 (3), S. 282–288.
- Robert Koch Institut (2021): Forschung zum 3R-Prinzip (Replace, Reduce, Refine). Online verfügbar unter <https://www.rki.de/DE/Content/Forsch/Versuchstierhaltung/Alternativmethoden.html>, zuletzt geprüft am 21.02.2024.
- Russell, W. M. S., Burch, R. L. (1959): The principles of humane experimental technique. London: Methuen.
- Schulz, Benjamin; Leitner, Emily; Schreiber, Tim; Lindner, Tobias; Schwarz, Rico; Aboutara, Nadine et al. (2024): Sex Matters—Insights from Testing Drug Efficacy in an Animal Model of Pancreatic Cancer. In: *Cancers* 16 (10), S. 1901. DOI: 10.3390/cancers16101901.
- Schwabe, Kerstin; Boldt, Lena; Bleich, André; van Dijk, Roelof Maarten; Helgers, Simeon Oscar Arnulfo; Häger, Christine et al. (2020): Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex. In: *Laboratory animals* 54 (1), S. 17–25. DOI: 10.1177/0023677219862004.
- Seiffert, Isabel; van Dijk, Roelof Maarten; Koska, Ines; Di Liberto, Valentina; Möller, Christina; Palme, Rupert et al. (2019): Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: III. Electrical post-status epilepticus model. In: *Epilepsia* 60 (8), S. 1539–1551. DOI: 10.1111/epi.16095.
- Sens, Mary Ann; Zhou, XuDong; Weiland, Timothy; Cooley, A. Marvin (2009): Unexpected neoplasia in autopsies: potential implications for tissue and organ safety. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 133 (12), S. 1923–1931. DOI: 10.5858/133.12.1923.
- Shin, Sang Hyun; Kim, Song Cheol; Song, Ki Byung; Hwang, Dae Wook; Lee, Jae Hoon; Lee, Dongjoo et al. (2015): A comparative study of laparoscopic vs. open distal pancreatectomy for left-sided ductal adenocarcinoma: a propensity score-matched analysis. In: *Journal of the American College of Surgeons* 220 (2), S. 177–185. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2014.10.014.
- Siddiqui, Nauman S.; Godara, Amandeep; Byrne, Margaret M.; Saif, Muhammad Wasif (2019): Capecitabine for the treatment of pancreatic cancer. In: *Expert opinion on pharmacotherapy* 20 (4), S. 399–409. DOI: 10.1080/14656566.2018.1560422.

Siervi, Silvia de; Turato, Cristian (2023): Liver Organoids as an In Vitro Model to Study Primary Liver Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 24 (5). DOI: 10.3390/ijms24054529.

Silva, Alcino J.; Simpson, Elizabeth M.; Takahashi, Joseph S.; Lipp, Hans-Peter; Nakanishi, Shigetada; Wehner, Jeanne M. et al. (1997): Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury Conference on genetic background in mice. In: *Neuron* 19 (4), S. 755–759. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80958-7.

Smith, David; Anderson, David; Degryse, Anne-Dominique; Bol, Carla; Criado, Ana; Ferrara, Alessia et al. (2018): Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. In: *Laboratory animals* 52 (1_suppl), S. 5–57. DOI: 10.1177/0023677217744587.

Sorski, Liat; Levi, Ben; Shaashua, Lee; Neeman, Elad; Benish, Marganit; Matzner, Pini et al. (2014): Impact of surgical extent and sex on the hepatic metastasis of colon cancer. In: *Surgery today* 44 (10), S. 1925–1934. DOI: 10.1007/s00595-013-0768-1.

Stolzenberg-Solomon, Rachael Z.; Schairer, Catherine; Moore, Steve; Hollenbeck, Albert; Silverman, Debra T. (2013): Lifetime adiposity and risk of pancreatic cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. In: *The American journal of clinical nutrition* 98 (4), S. 1057–1065. DOI: 10.3945/ajcn.113.058123.

Stribbling, Stephen M.; Ryan, Anderson J. (2022): The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. In: *Nature protocols* 17 (9), S. 2108–2128. DOI: 10.1038/s41596-022-00709-3.

Sundbom, Renée; Jacobsen, Kirsten R.; Kalliokoski, Otto; Hau, Jann; Abelson, Klas S. P. (2011): Post-operative corticosterone levels in plasma and feces of mice subjected to permanent catheterization and automated blood sampling. In: *In vivo (Athens, Greece)* 25 (3), S. 335–342.

Talan, M. (1984): Body temperature of C57BL/6J mice with age. In: *Experimental gerontology* 19 (1), S. 25–29. DOI: 10.1016/0531-5565(84)90028-7.

Talbot, Steven R.; Biernot, Svenja; Bleich, Andre; van Dijk, Roelof Maarten; Ernst, Lisa; Häger, Christine et al. (2020): Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. In: *Laboratory animals* 54 (1), S. 99–110. DOI: 10.1177/0023677219883319.

Talbot, Steven R.; Kumstel, Simone; Schulz, Benjamin; Tang, Guanglin; Abdelrahman, Ahmed; Seume, Nico et al. (2023): Robustness of a multivariate composite score when evaluating distress of animal models for gastrointestinal diseases. In: *Scientific reports* 13 (1), S. 2605. DOI: 10.1038/s41598-023-29623-8.

Talbot, Steven R.; Struve, Birgitta; Wassermann, Laura; Heider, Miriam; Weegh, Nora; Knape, Tilo et al. (2022): RELSA-A multidimensional procedure for the comparative assessment of well-being and the quantitative determination of severity in experimental procedures. In: *Frontiers in veterinary science* 9, S. 937711. DOI: 10.3389/fvets.2022.937711.

Tang, Guanglin; Seume, Nico; Häger, Christine; Kumstel, Simone; Abshagen, Kerstin; Bleich, André et al. (2020): Comparing distress of mouse models for liver damage. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 19814. DOI: 10.1038/s41598-020-76391-w.

- Thompson, Matthew G.; Peiffer, Daniel S.; Larson, Michelle; Navarro, Flor; Watkins, Stephanie K. (2017): FOXO3, estrogen receptor alpha, and androgen receptor impact tumor growth rate and infiltration of dendritic cell subsets differentially between male and female mice. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 66 (5), S. 615–625. DOI: 10.1007/s00262-017-1972-4.
- Touma, Chadi; Palme, Rupert; Sachser, Norbert (2004): Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. In: *Hormones and behavior* 45 (1), S. 10–22. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2003.07.002.
- Tran Chau, Vanessa; Liu, Winchygn; Gerbé de Thoré, Marine; Meziani, Lydia; Mondini, Michele; O'Connor, Mark J. et al. (2020): Differential therapeutic effects of PARP and ATR inhibition combined with radiotherapy in the treatment of subcutaneous versus orthotopic lung tumour models. In: *British journal of cancer* 123 (5), S. 762–771. DOI: 10.1038/s41416-020-0931-6.
- Vincent, Audrey; Herman, Joseph; Schulick, Rich; Hruban, Ralph H.; Goggins, Michael (2011): Pancreatic cancer. In: *Lancet (London, England)* 378 (9791), S. 607–620. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
- Waterston, Robert H.; Lindblad-Toh, Kerstin; Birney, Ewan; Rogers, Jane; Abril, Josep F.; Agarwal, Pankaj et al. (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. In: *Nature* 420 (6915), S. 520–562. DOI: 10.1038/nature01262.
- Weegh, Nora; Zentrich, Eva; Zechner, Dietmar; Struve, Birgitta; Wassermann, Laura; Talbot, Steven Roger et al. (2021): Voluntary wheel running behaviour as a tool to assess the severity in a mouse pancreatic cancer model. In: *PloS one* 16 (12), e0261662. DOI: 10.1371/journal.pone.0261662.
- Whittaker, Alexandra L.; Liu, Yifan; Barker, Timothy H. (2021): Methods Used and Application of the Mouse Grimace Scale in Biomedical Research 10 Years on: A Scoping Review. In: *Animals* 11 (3), S. 673. DOI: 10.3390/ani11030673.
- Wood, Laura D.; Canto, Marcia Irene; Jaffee, Elizabeth M.; Simeone, Diane M. (2022): Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. In: *Gastroenterology* 163 (2), 386-402.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2022.03.056.
- World Health Organisation WHO (2022): Cancer. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, zuletzt geprüft am 20.02.2024.
- Yang, Shufang; Liu, Jie; Jin, Haiying; He, Xiang; Nie, Peng; Wang, Changfu (2018): Value of magnetic resonance images in preoperative staging and resectability assessment of pancreatic cancer. In: *Journal of cancer research and therapeutics* 14 (1), S. 155–158. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_590_17.
- Zechner, Dietmar; Schulz, Benjamin; Tang, Guanglin; Abdelrahman, Ahmed; Kumstel, Simone; Seume, Nico et al. (2022): Generalizability, Robustness and Replicability When Evaluating Wellbeing of Laboratory Mice with Various Methods. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 12 (21). DOI: 10.3390/ani12212927.
- Zhang, Lemeng; Liu, Xiaohong; Tong, Fei; Zou, Ran; Peng, Wanglian; Yang, Hui et al. (2024): Lung cancer distress: screening thermometer meta-analysis. In: *BMJ supportive & palliative care* 13 (e3), e1084-e1092. DOI: 10.1136/bmjspcare-2021-003290.

Zhang, Xianbin; Kumstel, Simone; Tang, Guanglin; Talbot, Steven R.; Seume, Nico; Abshagen, Kerstin et al. (2020): A rational approach of early humane endpoint determination in a murine model for cholestasis. In: *ALTEX* 37 (2), S. 197–207. DOI: 10.14573/altex.1909111.

Zhang, Yimin; Yang, Jun; Li, Hongjuan; Wu, Yihua; Zhang, Honghe; Chen, Wenhui (2015): Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis. In: *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (7), S. 11683–11691.

Zhao, Zhiyu; Liu, Wei (2020): Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. In: *Technology in cancer research & treatment* 19, 1533033820962117. DOI: 10.1177/1533033820962117.

Zieglowski, Leonie; Kümmecke, Anna Maria; Ernst, Lisa; Palme, Rupert; Weiskirchen, Ralf; Talbot, Steven R.; Tolba, René H. (2021): Assessing the severity of laparotomy and partial hepatectomy in male rats-A multimodal approach. In: *PloS one* 16 (8), e0255175. DOI: 10.1371/journal.pone.0255175.

X. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

10.1 ABBILDUNGEN

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Pathogenese des Pankreaskarzinoms
- Abb. 2: Versuchsaufbau zur evidenzbasierten Belastungsbeurteilung von verschiedenen Pankreaskarzinommodellen
- Abb. 3: Geschlechtervergleich zur Tumorprogression im orthotopen Mausmodell
- Abb. 4: Geschlechtervergleich zur Tumorprogression im subkutanen Mausmodell
- Abb. 5: Geschlechtervergleich zur Tumorprogression im intravenösen Mausmodell
- Abb. 6: Quantifizierung der Belastungsparameter vor und nach orthotoper, subkutaner und intravenöser Tumorzellinjektion
- Abb. 7: Quantifizierung der Belastungsparameter während der Tumorprogressionsphase im orthotopen, subkutanen und intravenösen Mausmodell
- Abb. 8: Quantifizierung der Belastungsparameter an den Tagen unmittelbar vor und am Tag des individuellen humanen Endpunktes
- Abb. 9: Vergleich des relativen Schweregrades der Tumormodelle mittels $RELSA_{max}$
- Abb. 10: Vergleich der $RELSA_{max}$ -Werte auf geschlechtsspezifische Unterschiede.
- Abb. 11: Aussagekraft der Belastungsparameter für die Prognose eines frühen humanen Endpunktes in den verschiedenen Tumormodellen

10.2 TABELLEN

- Tab. 1: Zellinjektion nach Tiermodell
- Tab. 2: Score-Sheet zum Gesundheitsscore
- Tab. 3: Geschlechtervergleich bei der Belastungseinschätzung während der operativen Phase beim orthotopen Tiermodell
- Tab. 4: Geschlechtervergleich bei der Belastungseinschätzung während der operativen Phase beim intravenösen Tiermodell
- Tab. 5: Geschlechtervergleich bei der Belastungseinschätzung während der operativen Phase beim subkutanem Tiermodell

XI. ANHANG

Tabelle 1: Zellinjektion nach Tiermodell

Applikationsart	Konzentration in Zellen / μl	Trägermaterial
Orthotop	$1 \times 10^4/5$	PBS / Matrigel (1:1)
Subkutan	$5 \times 10^5/100$	PBS
Intravenös	$1 \times 10^6/50$	PBS

Tab. 1: Quantitative Darstellung der injizierten Tumorzellkonzentration mit entsprechendem Trägermaterial in die verschiedenen Tiermodellen.

Tabelle 2: Score-Sheet zum Gesundheitsscore

Beobachtungen	Score
1. Körpergewicht	
Reduktion zum Ausgangsgewicht:	
1a > 10%	3
1b > 15%	4
2. Allgemeinzustand	
Erscheinungsbild	
2a Zahnüberstand, zu lange Zähne	1 (A)
2b Fell stumpf, gestäubt oder ungepflegt	2
2c Augen trüb oder zusammengekniffen	2
2d verklebte Körperöffnungen	3
2e unnormale Haltung	3
2f Dehydratation	3
Einschränkungen/ Auffälligkeiten	
2g kurze, vorübergehende Krämpfe oder veränderte Atmung	3
2h Lähmungserscheinungen, dauerhafte Krämpfe	4
2i untypische Atemgeräusche, zuckende/ ruckartige Atmung,	4
Tier fühlt sich kalt an	
2j Zustand der Kachexie (Body Condition Score von BC 2)	4
3. Spontanverhalten	
3a Tier ist träger / überaktiver	2
3b Ausgeprägte Apathie, Hyperkinesie, Isolation	4
3c Schmerzäußerung	4
3d Automutilation	4
4. Fluchtverhalten bei Berührung	
4a Tier ist etwas träge oder überaktiv	2
4b Ausgeprägte Apathie, Hyperkinetik	4
5. Verfahrensspezifische Kriterien	
5a Wundheilungsstörung	2
5b Aufbeißen der Nähte	1 (B)
5c Lokale Entzündung	2
5d Aszites	4
5e rektale Blutung/ Analprolaps	4
5f Tumorgroße $\geq 2000 \text{ mm}^3$	4
5g Beeinträchtigung bei der Bewegung durch den Tumor	4
5h Tumor Ulzeration	4
5i aufgeblähter Bauch und runde Körperhaltung	4

Tab. 2: Quantitative Score-Sheet zum Gesundheitsscore. Die einzelnen Parameter zum Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten, Fluchtverhalten sowie weitere verfahrensspezifische Kriterien werden beurteilt und zu einem Gesamtscore zusammenaddiert.

Tabelle 3: Operative Phase beim orthotopen Tiermodell

Parameter	Geschlecht	N-Zahl		Tage vor/nach Tumorzellinjektion				
				Prä	0	1	2	3
KG	♀	5	MW±SD	-0.472 2.062	-4.222 3.659	-2.436 1.693	0.016 1.359	-0.644 1.546
	♂	4	MW±SD	-0.363 2.174	-1.123 1.670	-3.200 0.855	-3.128 5.431	-2.685 4.762
DS	♀	5	MW±SD	0.000 0.000	0.400 0.894	1.000 2.236	0.000 0.000	0.000 0.000
	♂	4	MW±SD	0.000 0.000	0.500 1.000	0.000 0.000	0.750 1.500	0.000 0.000
pTemp	♀	5	MW±SD	31.120 0.716	31.560 0.643	31.100* 0.543	30.740 0.623	30.840 0.796
	♂	4	MW±SD	30.325 0.222	30.200 0.812	29,900* 0.141	30,225 0.275	29,975 0.411
B2h	♀	3	MW±SD	135.333 26.577	66.667 34.122	81.000 47.697	133.667 32.083	118.667 65.684
	♂	3	MW±SD	181.00 22.605	36.000 51.507	168.333 42.525	126.000 37.987	166.000 24.556
BüN	♀	4	MW±SD	191.000 10.424	168.000 56.798	196.250 6.238	199.250 0.957	198.750 1.893
	♂	3	MW±SD	192.000 13.856	177.333 21.595	195.000 8.660	193.667 10.970	200.000 0.000
Nest	♀	2	MW±SD	4.000 0.000	2.500 0.707	4.000 1.414	5.000# 0.000	5.000 1.414
	♂	3	MW±SD	5.000 1.000	4.000 2.646	5.667 0.577	4.000 2.000	4.333 2.887
MGS	♀	5	MW±SD	0.000 0.000	0.244 0.356	-0.080 0.177	-0.080 0.138	-0.027 0.135
	♂	4	MW±SD	0.000 0.000	0.272 0.175	0.061 0.192	0.011 0.056	0.067 0.077
FCM	♀	5	MW±SD	71.240 20.972	130.920 56.008	120.180# 40.725	91.440 26.442	84.920 14.801
	♂	4	MW±SD	72.200 40.260	153.150 118.409	141.025 58.412	135.650 94.551	86.125 49.901

Tab. 3: Geschlechtervergleich bei der Belastungseinschätzung während der operativen Phase beim orthotopen Tiermodell (# $p \leq 0.05$ im Vergleich zum Prä-Wert; * $p \leq 0.05$ im Vergleich zum anderen Geschlecht zum selben Zeitpunkt)

Tabelle 4: Operative Phase beim subkutanen Tiermodell

Parameter	Geschlecht	N-Zahl		Tage vor/nach Tumorzellinjektion				
				Prä	0	1	2	3
KG	♀	5	MW±SD	0.570 3.265	1.750 3.127	1.712 3.605	1.992 4.400	2.356 3.909
	♂	4	MW±SD	-0.993 1.955	-0.575 1.744	-0.038 3.284	-0.105 4.221	-1.810 6.818
DS	♀	5	MW±SD	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000
	♂	4	MW±SD	0.000 0.000	-0.500 1.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000
pTemp	♀	5	MW±SD	30.680 0.130	28.640#* 0.439	30.860 0.688	30.940 0.850	30.760 0.518
	♂	4	MW±SD	30.775 0.359	30.625* 0.263	30.200# 0.216	30.325 0.126	29.850 0.173
B2h	♀	4	MW±SD	145.750 39.424	166.750 30.369	142.500 66.521	139.750* 41.492	77.500 30.881
	♂	3	MW±SD	120.667 21.548	103.667 96.914	140.000 70.064	190.333* 16.743	200.000 0.000
BüN	♀	4	MW±SD	200.000 0.000	195.000 10.000	196.000 8.000	197.750 4.500	195.500 9.000
	♂	4	MW±SD	198.500 2.380	190.000 15.144	185.750 22.897	173.000 54.000	166.000 68.000
Nest	♀	3	MW±SD	5.000 1.000	5.333 1.155	4.667 2.309	5.667 0.577	5.333 0.577
	♂	4	MW±SD	5.000 0.816	4.250 1.258	4.750 0.957	4.750 0.957	4.750 1.500
MGS	♀	5	MW±SD	0.000 0.000	0.027 0.099	0.018 0.101	0.058 0.141	0.018 0.119
	♂	4	MW±SD	0.000 0.000	0.189 0.115	0.078 0.086	0.039 0.066	0.100 0.082
FCM	♀	5	MW±SD	102.160* 19.267	139.380* 21.376	144.360 41.707	145.940 48.986	162.700* 49.860
	♂	4	MW±SD	54.700* 11.840	60.150* 17.832	93.825 33.632	91.350 57.928	58.500* 36.151

Tab. 4: Geschlechtervergleich bei der Belastungseinschätzung während der operativen Phase beim subkutanen Tiermodell (# $p \leq 0.05$ im Vergleich zum Prä-Wert; * $p \leq 0.05$ im Vergleich zum anderen Geschlecht zum selben Zeitpunkt)

Tabelle 5: Operative Phase beim intravenösen Tiermodell

Parameter	Geschlecht	N-Zahl		Tage vor/nach Tumorzellinjektion				
				Prä	0	1	2	3
KG	♀	3	MW±SD	2.477 3.089	2.610 4.570	1.490 6.384	1.983 4.504	3.707 2.967
	♂	5	MW±SD	2.014 0.818	2.308 1.371	-0.840 5.001	1.522 2.229	1.348 1.761
DS	♀	3	MW±SD	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000
	♂	5	MW±SD	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000
pTemp	♀	3	MW±SD	30.667 0.289	30.967 0.945	30.167 0.416	30.200 0.557	30.500 0.100
	♂	5	MW±SD	29.940 0.623	29.640 0.631	29.600 0.361	29.640 0.680	29.440 0.619
B2h	♀	2	MW±SD	104.500 3.536	47.500 43.134	68.000 28.284	28.000# 5.657	18.000* 15.556
	♂	4	MW±SD	176.500 31.395	180.000 34.871	166.500 44.486	128.250# 36.818	141.500* 32.970
BüN	♀	3	MW±SD	200.000 0.000	181.000 21.284	189.667 17.898	181.333 32.332	183.000 17.000
	♂	5	MW±SD	195.600 8.735	199.800 0.447	174.400 35.402	199.200 1.789	171.200 19.665
Nest	♀	2	MW±SD	4.500 0.707	3.000 2.828	1.500# 0.707	2.000 1.414	3.500# 0.707
	♂	5	MW±SD	5.200 0.447	5.200 0.837	4.600 0.548	4.400 1.517	4.800 0.837
MGS	♀	3	MW±SD	0.000 0.000	0.081 0.148	-0.007 0.078	0.119 0.173	0.126 0.103
	♂	5	MW±SD	0.000 0.000	0.111 0.167	0.053 0.116	0.044 0.121	0.040 0.053
FCM	♀	3	MW±SD	192.300 59.601	380.033 255.796	270.967 142.026	267.233 102.245	277.500 159.854
	♂	5	MW±SD	99.480 34.200	121.280 39.422	110.320 35.946	124.860 16.477	110.060 11.991

Tab. 5: Geschlechtervergleich bei der Belastungseinschätzung während der operativen Phase beim intravenösen Tiermodell (# $p \leq 0.05$ im Vergleich zum Prä-Wert; * $p \leq 0.05$ im Vergleich zum anderen Geschlecht zum selben Zeitpunkt)

XII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. hum. Simone Kumstel, der Leiterin der Arbeitsgruppe „Präklinische Studien und 3R-Forschung viszeraler Tumorentitäten“ am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie und Tierschutzbeauftragte der Universitätsmedizin Rostock, für Ihre Betreuung und stetige Unterstützung. Auch möchte ich Ihr für Ihre Hilfe bei der Veröffentlichung der eigenen Forschungsergebnisse, der Fertigstellung der Arbeit und Ihre Geduld bei allen Fragen und Problemen sehr herzlich danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen.

Großer Dank gilt auch Herrn Dipl. Pharm. Tim Schreiber und Herrn Jakob Brandstetter, M. Sc. für ihre professionelle und ausgezeichnete technische Unterstützung bei der Durchführung komplexer Experimente und Ihrer Bereitschaft in Notlagen auszuweichen.

Auch danke ich Benjamin Schulz, M. Sc. und Emily Leitner, M. Sc. sowie meiner Kommilitonin Lisa Hoffmann, für die professionelle Zusammenarbeit und die konstruktiven Diskussionen während der gemeinsamen Forschungsprojekte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Berit Blendow, Eva Lorbeer und Dorothea Frenz für ihre stetige Hilfsbereitschaft und wertvolle technische Assistenz im Laboralltag.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Frau Anja Gellert für ihre fortwährende Hilfe und Unterstützung bedanken und unseren Kooperationspartner Herrn AO. Univ.-Prof. Dr. med. vet. Rupert Palme vom Institut für experimentelle Endokrinologie der veterinärmedizinischen Universität Wien und Herrn Dr. Steven R. Talbot, Leiter der Arbeitsgruppe „Präklinische Datenwissenschaften“ der medizinischen Hochschule Hannover für die reibungslose Zusammenarbeit danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der experimentellen Chirurgie, auch den hier nicht namentlich genannten, für die gute und freundliche Zusammenarbeit und für das angenehme Arbeitsklima am Institut danken.

Mein Dank gilt all meinen Freundinnen und Freunden, die mich im Studium und während der Promotion nicht nur tatkräftig unterstützten, sondern mich stets motivierten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern sowie bei meiner Partnerin und deren Familie für ihre vor allem moralische Unterstützung durch mein Studium sowie bei der Erstellung dieser Dissertation bedanken.

XIII. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

03/2025
(Abgabedatum)

Ingo Koopmann
(Vollständige Unterschrift)

XIV. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Zur Person

Ingo Koopmann

[REDACTED]

[REDACTED]

Kontakt Daten

[REDACTED]

[REDACTED]

Akademischer Werdegang

Promotion

Seit 02/2022

Thema

„Evidenz-basierte Belastungsbeurteilung und Etablierung von frühen humanen Endpunkten in verschiedenen Pankreaskarzinom-Modellen“

Themenvergabe

Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Institut

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie,
Universität Rostock

06/2023

Ende der Experimente

Studium

12/2025

Voraussichtlicher Studienabschluss

10/2024

2. Ärztliche Prüfung

Seit 10/2021

Studium der Humanmedizin, Universität Rostock

09/2021

1. Ärztliche Prüfung

2019-2021

Studium der Humanmedizin, MSH Medical School Hamburg
GmbH, Hamburg

Schul- und Berufsbildung

2016-2019	Ausbildung zum Chirurgisch-technischen Assistenten, KMG Klinikum Güstrow GmbH, Güstrow
2007-2016	Ludwig-Meyn-Gymnasium Uetersen, Uetersen
2003-2007	Grundschule Haseldorfer Marsch, Haseldorf

Beruflicher Werdegang

Gesellschafter-Geschäftsführer

Seit 01/2025	Wittmoorhof eGbR, Haseldorf
Seit 01/2024	Koopmann Capital GmbH, Haseldorf

Praktisches Jahr

06-10/2025	Innere Medizin, Klinikum Itzehoe, Itzehoe
03-06/2025	Orthopädie / Unfallchirurgie, Regio Kliniken GmbH, Pinneberg
11/2024-03/2025	Chirurgie, Klinikum Itzehoe, Itzehoe

Famulaturen

08-09/2023	Berufsausbildungsgemeinschaft für hausärztliche Versorgung, Ärztehaus Heist, Dr. Plümer, Heist
02/2023	Hausarztpraxis im alten Rathaus, Dr. Blaschke, Uetersen
08-09/2022	Zentrum für Orthopädie, Unfall- und Wirbelsäulenchirurgie, KMG Klinikum Güstrow GmbH, Güstrow
07-08/2022	Gemeinschaftspraxis für Chirurgie, Unfallchirurgie, Orthopädie, Handchirurgie / D-Ärzte, Dr. Fechner, Güstrow
02-03/2022	Klinik für Urologie, KMG Klinikum Güstrow GmbH, Güstrow

Chirurgisch-technischer-Assistent

08-09/2019	Klinikgruppe Dr. Guth GmbH & Co. KG, Klinik Dr. Guth, Hamburg
------------	---

Aushilfstätigkeiten

Seit 03/2020	Malereibetrieb G&D Koopmann GmbH, Haseldorf
2012-2016	Malereibetrieb G&D Koopmann GmbH, Haseldorf

Praktika

01/2016	Berufsorientierendes OP-Pflege Praktikum, Regio Kliniken GmbH, Elmshorn
---------	---

Publikationsverzeichnis

Peer-review Originalarbeiten

Schreiber, T.; Koopmann, I.; Brandstetter, J.; Talbot, S.R.; Goldstein, L.; Hoffmann, L.; Schildt, A.; Joks, M.; Krause, B.; Jaster, R.; et al. *Evidence-Based Severity Assessment of Animal Models for Pancreatic Cancer*. *Biomedicine* 2024, 12, 1494. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071494>

Brandstetter, J.; Hoffmann, L.; Koopmann, I.; Schreiber, T.; Schulz, B.; Rosshart, S.P.; Zechner, D.; Vollmar, B.; Kumstel, S. *Burrowing Behavior as Robust Parameter for Early Humane Endpoint Determination in Murine Models for Pancreatic Cancer*. *Animals* 2025, 15, 1241. <https://doi.org/10.3390/ani15091241>

Kongressbeiträge

Brandstetter, J.; Koopmann, I.; Schreiber, T.; Goldstein, L.; Palme, R.; Vollmar, B.; Kumstel, S. *Animal welfare assessment and early humane endpoint determination in animal models for pancreatic cancer*. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Niagara Falls, Canada, 27.-31.08.2023.

Stipendien und Auszeichnungen

Stipendien

Seit 2019	Konrad-Adenauer-Stiftung
2017-2019	Dr. Wolfgang Neubert Stiftung

Auszeichnungen

2019	Bester Absolvent als Chirurgisch-technischer Assistent
------	--

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	B1-Niveau
Latein	Großes Latinum

XV. THESEN ZUR DISSERTATION

1. Mit circa 500.000 neuerkrankten Menschen im Jahr 2020 und circa 466.000 Todesfällen, ist das Pankreaskarzinom eine der tödlichsten Krebserkrankungen weltweit und bedarf unbedingt weiterer Forschung zur Entwicklung neuer Therapien.
2. In den letzten Jahren wurden verschiedenen Pankreaskarzinommodelle in der Maus für die präklinische in vivo Forschung etabliert.
3. In der EU-Richtlinie 2010/63/EU wird eine pro- und retrospektive Belastungseinschätzung und eine kontinuierliche Verbesserung aller Tiermodelle gefordert. Onkologische Tiermodelle werden dabei allen drei Kategorien der Schweregrade „gering, mittel und schwer“ zugeordnet, wodurch eine klare Zuteilung erschwert wird.
4. Ein Ziel dieser Arbeit war es eine evidenz-basierte Belastungsanalyse in verschiedenen syngenem Pankreaskarzinommodellen zu etablieren und die Belastung der Modelle statistisch zu vergleichen.
5. Unter der Verwendung von physiologischen, hormonellen und Verhaltensparametern sowie dem RELSA-Algorithmus konnte gezeigt werden, dass das orthotope Pankreasmodell, signifikant belastender für Mäuse ist, als das subkutane und intravenöse Modell.
6. Die Wahl des onkologischen Tiermodells sollte nicht nur von der Belastungseinschätzung, sondern auch von der wissenschaftlichen Fragestellung abhängig sein.
7. Alle syngenem Pankreastumormodelle sind weniger belastend im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Tiermodellen, wie beispielsweise nach Gallengangsligatur oder Induktion einer Pankreatitis.
8. Durch die Etablierung tiermodell-spezifischer früher humaner Endpunkte kann eine erhebliche Belastung der Tiere in zukünftigen Studien verhindert werden.
9. Mittels Grenzwert-Optimierungskurven konnte nachgewiesen werden, dass eine Reduktion des Buddelverhaltens in allen Pankreaskarzinommodellen den humanen Endpunkt 48 Stunden im Voraus prognostizieren kann.
10. Die Analyse des Buddelverhaltens eignet sich sehr gut zur frühen humanen Endpunktbestimmung in den Pankreaskarzinommodellen.