

Aus dem Institut der Diagnostischen und Interventionellen Radiologie
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. David Maintz

Multimodale Charakterisierung eines Pankreaskarzinom-Tumormodells in der Ratte

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Patrick Schmidt
aus Korbach

promoviert am 16. Dezember 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. H. Grüll
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Schmidt
3. Gutachter: Professor Dr. med. T. Weber

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in der für diese Arbeit zugrundeliegenden wissenschaftlichen Publikation angegebenen Vorarbeiten an Zellen *in vitro*, Operationen an Versuchstieren, einschließlich Tumorgenerierung und Tumorgewebegewinnung wurden von mir selbst durchgeführt. Die Erstellung der Wachstumskurve der einzelnen Tumore wurde von Herrn Sven Saniternik erstellt und von mir interpretiert. Die Experimente am MRT sind nach entsprechender Anleitung durch Johannes Lindemeyer von mir selbst mit Unterstützung von Frau Pranali Raut und Herrn Markus Schütz durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden von mir selbst und Joahannes Lindemeyer ausgewertet und von mir interpretiert. Die immunologischen Analysen wurden von Herrn Martin Thelen und Herrn Hans Schlößer durchgeführt. Die Interpretation der Immunologischen Ergebnisse wurde von mir selbst durchgeführt. Die histologischen Schnitte wurden durch Herrn Alexander Quaas angefertigt, die vorliegenden Abbildungen zu diesen Schnitten wurden von mir selbst erstellt. Die Anfertigung des PET-Tracers wurde von Herrn Thomas Fischer vorgenommen, die Injektion, Durchführung der Untersuchung und Erstellung der PET-Grafik wurden von Frau Heike Endepols durchgeführt. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte durch mich. Das Manuskript wurde von mir selbst erstellt und von den Co-Autoren bearbeitet. Die Publikation wurde von mir selbst eingereicht und während des Review-Prozesses bis zur Publikation von mir als Erstautor betreut.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 27.05.2024

Unterschrift:

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuallererst den Tieren, die für diese Forschung eingesetzt werden mussten; ihr Beitrag zur Wissenschaft ist von unschätzbarem Wert, und ich erkenne dies mit großer Demut an.

Mein besonderer Dank gilt allen Labormitarbeitern und Wissenschaftlern, die maßgeblich an der Durchführung der Experimente beteiligt waren, insbesondere unserem Gruppenleiter Prof. Dr. Holger Grüll, der mich zu jeder Zeit während meiner wissenschaftlichen Reise mit seinem Enthusiasmus begleitet und angesteckt hat.

Ein herzlicher Dank geht an Pranali Raut, die mich während dieser Arbeit immer wieder motiviert hat und gleichzeitig als meine persönlichere Gesundheitsberaterin stets darauf achtete, dass ich nicht über meine Grenzen gehe. Ihre Unterstützung und Fürsorge haben mir sehr geholfen, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Ein tief empfundener Dank gebührt meinem Ehemann, Serhan Kara, dessen Weg ich am Ende der Welt kreuzte und der seither mein ständiger Begleiter ist. Deine unerschütterliche Unterstützung und Liebe haben mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Reise getragen. Ich freue mich darauf, mit dir weiterhin die Welt zu entdecken und neue Abenteuer zu erleben. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht das, was sie heute ist.

Widmung

In Anerkennung all derer, die in Deutschland aus nicht-akademischen Verhältnissen stammen und sich durch das Bildungssystem kämpfen. Diese Arbeit ist für euch – als Inspiration und Beweis, dass sozialer Aufstieg durch Bildung erreichbar ist.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
2. EINLEITUNG	8
2.1. Das duktales Pankreaskarzinom im Menschen	8
2.1.1. Ätiologie und Pathophysiologie	8
2.1.2. Bildgebung als Methode der Diagnostik	10
2.1.3. Aktuelle Behandlungsstrategien	11
2.1.4. Neue mögliche Therapieansätze	11
2.2. Das duktales Pankreaskarzinom als Tiermodell	12
2.2.1. Vorteile von Tumormodellen in Tieren	12
2.2.2. Murine Pankreaskarzinom-Modelle	13
2.2.3. Das DSL-6A/C1 Modell	14
2.3. Fragestellung und Ziel der Arbeit	15
3. PUBLIKATION	17
4. DISKUSSION	35
4.1. Ergebnisdiskussion	35
4.2. Methodendiskussion	37
4.3. Fazit und Ausblick	39
5. LITERATURVERZEICHNIS	40

Abkürzungsverzeichnis

CAF	Cancer-associated Fibroblasts (krebsassoziierte Fibroblasten)
CT	Computertomographie
FAP1	Fibroblast Activation Protein Inhibitor
FDG	Fluordesoxyglukose
FOLFIRINOX	Chemotherapieschema zur Behandlung des Pankreaskarzinoms
Ga	Gallium
ICI	Immune Checkpoint Inhibitor
IL-6	Interleukin-6
IPMN	Intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie
KRAS, TP53, SMAD4, CDKN2A	- Bezeichnungen für spezifische Gene oder Proteine, die häufig in Bezug auf Krebsmutationen erwähnt werden
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MR-HIFU	Magnetresonanzgesteuerter hochintensiver fokussierter Ultraschall
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PDAC	Pankreatisches Duktales Adenokarzinom
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie / Computertomographie

1. Zusammenfassung

Das murine duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) Tumormodell, basierend auf subkutan implantierten DSL-6A/C1 Zellen, wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit in männlichen Lewis-Ratten etabliert und durch eine umfassende multiparametrische Analyse charakterisiert. Die DSL-6A/C1-Tumore wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens untersucht, wobei hier ein sehr heterogenes Wachstum beobachtet wurde. Darüber hinaus wurden die Tumore histologisch analysiert, um PDAC-Merkmale zu studieren. Hier wurden einerseits entartete duktales Zellen, wie sie typischerweise bei PDAC vorkommen und Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAF) nachgewiesen. Die Tumor-Mikroumgebung wurde ebenfalls auf das Vorkommen von Immunzellen untersucht, wobei sich eine erhöhte Prävalenz von CD4+ T-Zellen und eine reduzierte Anzahl an B-Zellen und Natürliche Killer (NK-) Zellen fand. Die multiparametrische MRT-Bildgebung wurden verwendet, um das Signal- und Kontrastmittelanreicherungsverhalten des Tumormodells zu studieren, wobei sich eine im Verlauf zunehmende zentrale Nekrose und eine zunehmend randständige Kontrastmittelaufnahme zeigte. In der ⁶⁸Ga-Fapi-46 PET/CT konnte eine starke Traceraufnahme im Tumorgewebe beobachtet werden, was für eine hohe Dichte an CAF spricht. Wir haben in der vorliegenden Studie gezeigt, dass das DSL-6A/C1-Tumormodell somit aufgrund seiner hohen Tumorigenität, Tumorgroße und CAF-Dichte eine geeignete Alternative zu etablierten Kleintiermodellen für viele Formen präklinischer Analysen und therapeutischer Studien des PDAC darstellen kann.

2. Einleitung

2.1. Das duktales Pankreaskarzinom im Menschen

Das duktales Pankreaskarzinom ist mit einer 5 Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von unter 5% einer der letalsten Tumore des Menschen, an dem pro Jahr in Deutschland ca. 20.000 Personen erkranken ^{1,2}. In vielen Tumorentitäten konnten in den letzten Jahren deutliche Therapiefortschritte erzielt werden, das Pankreaskarzinom weist aber weiterhin eine hohe Letalität auf, die insbesondere auf die späte Diagnosestellung und die frühe Metastasierung zurückzuführen ist ³.

2.1.1. Ätiologie und Pathophysiologie

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Auslösemechanismen der Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms diskutiert und identifiziert. Insbesondere wurde für das aktive Rauchen von Tabak schon frühzeitig eine positive Korrelation zur Entstehung von Pankreaskarzinomen herausgearbeitet ⁴. Ein weiterer Lebensstilfaktor, welcher mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit ein Pankreaskarzinom zu entwickeln verbunden ist, ist der

Konsum von Alkohol⁵. Hier ist einerseits der Alkohol als direkte toxische und kanzerogene Noxe zu nennen, jedoch vor allem auch dessen Folge bei chronischem Alkoholkonsum, die chronische Pankreatitis⁶. Bei letzterer kommt es durch die chronische Entzündungsreaktion im Pankreasgewebe zu einer konstanten Freisetzung von Zytokinen und anderen Entzündungsfaktoren, welche hier im Verlauf die Entstehung eines Tumors begünstigen⁷. Darüber hinaus haben Menschen mit Übergewicht und Diabetes ebenfalls ein erhöhtes Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln⁸. Andere Lebensstilfaktoren wie der erhöhte Konsum von rotem Fleisch haben zwar mediale Aufmerksamkeit erhalten, jedoch ist hier die aktuelle wissenschaftliche Studienlage durchaus widersprüchlich⁹. Neben diesen grundsätzlich individuell modifizierbaren Faktoren, die ein erhöhtes Karzinomrisiko bedeuten können, gibt es weitere Auslöser für duktale Pankreaskarzinome. Hier sind in erster Linie das Alter und Geschlecht zu nennen. Grundsätzlich ist das duktale Pankreaskarzinom eher eine Erkrankung des höheren Alters. 90% der Neudiagnosen erfolgen in Patienten die älter als 55 Jahre alt sind, hiervon hauptsächlich in der 7. und 8. Lebensdekade¹⁰. Die Inzidenz ist hierbei in Männern höher als in Frauen¹¹.

Hinsichtlich der Pathogenese wurden verschiedene Mutationen und Vorläuferläsionen identifiziert, die mit der Entstehung des Pankreaskarzinoms verbunden sind. Im ersten Schritt stehen hier zum Teil grundsätzlich heilbare Läsionen, aus denen im Verlauf duktale Pankreaskarzinome entstehen können. Hier sind vor allem die intraepithelialen Neoplasien (PanIN) und die intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN) zu nennen¹². Molekularpathologisch liegen hier oftmals Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen vor. Insbesondere KRAS als Onkogen und CDKN2A, TP53 und SMAD4 als Tumorsuppressorgene sind hier zu nennen, welche bisher in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien untersucht wurden¹³. Darüber hinaus sind jedoch auch andere Mutationen wie beispielsweise die Methylierung von Histonen oder der DNA ursächlich für die Entstehung von Pankreaskarzinomen^{14,15}.

Ein weiterer Faktor, der die Tumorentstehung und das Tumorwachstum begünstigt findet sich im Tumormikromilieu, welches immunologische Veränderungen wie beispielsweise ein vermehrtes Auftreten von immunsuppressiven, regulatorischen T-Zellen aufweist, welche die Immunreaktion im Tumorgewebe reduzieren und von tumor-assoziierten Makrophagen, die IL-6 sezernieren und Tumorstufen hierdurch stimulieren¹⁶. Weiterhin sind hier CAF zu nennen, welche in den letzten Jahren zunehmend im Rahmen der Forschung ins Licht gerückt sind, da sie eine entscheidende Rolle im Verlauf der Tumorentwicklung zu spielen scheinen¹⁷. Diese Zellen sind hauptsächlich für das dichte Tumorstroma verantwortlich und scheinen gleichzeitig, über die Interaktion mit dem Immun-Mikromilieu zum Teil Tumor-unterdrückende und stimulierende Eigenschaften zu besitzen, welche sie in den letzten Jahren zunehmend im Rahmen präklinischer und klinischer Studien in den Fokus haben rücken lassen^{18,19}.

2.1.2. Bildgebung als Methode der Diagnostik

Die weiterhin hohe Letalität des Pankreaskarzinoms ist vor allem dadurch bedingt, dass die Diagnosestellung meist erst im Stadium der Metastasierung erfolgt. Nur 11% der Patienten haben bei Diagnosezeitpunkt einen lokale begrenzten, resezierbaren Befund innerhalb des Pankreas^{20,21}. Da die Überlebensrate vornehmlich von der Tumorgroße, Infiltration umgebender Strukturen sowie dem Vorliegen einer Metastasierung abhängt, ist es unabdingbar, das Screening und die Früherkennung des duktales Pankreaskarzinoms zu verbessern²².

Bei Symptomen wie schmerzlosem Ikterus oder Abdominalschmerzen erfolgt oftmals initial ein abdominaler Ultraschall, welcher die kostengünstigste und weitverbreitetste Diagnosemöglichkeit des Pankreaskarzinoms darstellt. Hinweise auf ein Pankreaskarzinom können hier eine abzugrenzende Raumforderung innerhalb des Pankreas oder eine Dilatation des Hauptgallengangs sein. Aufgrund der relativ geringen Sensitivität und der grundsätzlichen Notwendigkeit einer weiterführenden Schnittbildgebung zum Ausschluss etwaiger Metastasen zur Therapieplanung, ist in den deutschen Leitlinien die CT oder MRT des Abdomens als Standard definiert²³. CT und MRT zeigen eine ähnliche Sensitivität und Spezifität, wobei aufgrund der höheren Kosten und längeren Dauer initial oft die CT vorgezogen wird und die MRT oftmals in der CT isodensen oder unklaren Läsionen vorbehalten ist. Außerdem bewährt sich die MRT, insbesondere die MRCP vor allem in der Klassifikation zystischer Pankreasläsionen und bei Gallengangsanomalien. Typischerweise stellen sich duktales Pankreaskarzinome in der MRT im Vergleich zum normalen Pankreasparenchym hypointens in der T₁ dar mit verzögerter Kontrastmittelaufnahme in der Kontrastmitteldynamik und assoziierter Diffusionsstörung in der DWI²⁴. Die diagnostische FDG-PET/CT ist aktuell kein Standard im Rahmen des Stagings von Pankreaskarzinomen. Dennoch kann sie, insbesondere bei in der CT und MRT unklaren Befunden oder im postoperativen Setting aufgrund der Nuklidmehrbelegung in stoffwechselaktivem Tumorgewebe einen Mehrwert bieten und hier Hinweise auf eine maligne Grunderkrankung liefern²⁵. Der Nachteil des FDG-PET/CT ist allerdings seine fehlenden Spezifität hinsichtlich der zu Grunde liegenden Grunderkrankung: Einerseits ist eine Nuklidmehrbelegung im Pankreas auch bei entzündlicher Genese oder gerade im postoperativen Setting rein reaktiv möglich²⁶, andererseits ist auch die Art der malignen Grunderkrankung keineswegs eindeutig, da die meisten Tumore einen erhöhten Nuklidstoffwechsel aufweisen und hier keineswegs sicher ist, dass es sich um ein duktales Pankreaskarzinom handelt. Hier bietet die ⁶⁸Ga-FAPI-PET/CT einen relativ neuen Ansatz, da hier CAFs als Target dienen, die ausschließlich tumorassoziiert auftreten und hier somit eine Differenzierung zwischen Tumor und Entzündung bzw. reaktiven Veränderungen zulassen²⁷.

Die ⁶⁸Ga-FAPI-PET/CT ist hierdurch in den letzten Jahren zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus gerückt und bietet aufgrund ihrer Spezifität nicht nur eine verbesserte Diagnosemöglichkeit, sondern ebenfalls einen potenziellen Behandlungsansatz²⁸.

2.1.3. Aktuelle Behandlungsstrategien

Die aktuell einzige kurative Therapieoption besteht in der Resektion des Tumors sowie der angrenzenden Strukturen, meist in Form einer pyloruserhaltenden partiellen Duodenopankreatektomie, jedoch ist bei Diagnosestellung nur bei 15-20% der Patienten eine kurative Operabilität gegeben²⁹. Anschließend erfolgt meist eine adjuvante Chemotherapie nach dem FOLFIRINOX-Regime, welche aus Irinotecan, Oxaliplatin, Folsäure und 5-Fluoracil besteht. Diese kann auch neoadjuvant erfolgen, um eine sekundäre Resektabilität herzustellen. Wenn der Tumor vollständig entfernt werden konnte, liegt das mediane Überleben bei ca. 38 Monaten und bei sekundärer Resektion nach erfolgter Chemotherapie liegt das mediane Überleben bei ungefähr 25 Monaten³⁰. Im palliativen Setting ist ebenfalls FOLFIRINOX das Mittel der Wahl und, sofern dies vom Patienten nicht toleriert wird, kann eine Kombination aus Gemcitabin und nab-Paclitaxel verabreicht werden²³. Im palliativen Setting sinkt die mittlere Überlebensrate drastisch auf 6 bis 9 Monate^{31,32}. Darüber hinaus existieren noch zielgerichtete Therapien, welche beispielsweise bei Patienten mit einer BRCA1/2-Keimbahnmutationen angewendet werden können. Hier kann als Erstlinientherapie platinbasierte Chemotherapeutika eingesetzt werden und als Erhaltungstherapie Olaparib eingesetzt werden³³. Allerdings weisen diese Mutation nur unter 10% der Patienten auf^{34,35}.

2.1.4. Neue mögliche Therapieansätze

Da das Pankreaskarzinom weiterhin einer der lethalsten Tumore darstellt, sind neue Therapieansätze notwendig, um das mediane Überleben der Patienten zu erhöhen.

Da über 90% der PDAC-Patienten eine KRAS-Mutation aufweisen, besteht hier seit Jahren ein hohes Interesse die Therapiemöglichkeiten mittels targeted therapy an dieser Schnittstelle zu verbessern¹⁴. In den letzten Jahren wurde hier beispielsweise der erste Inhibitor der G12D-Mutation untersucht, welcher in vitro und in vivo bisher vielversprechende Ergebnisse zeigt³⁶. Jedoch liegen aufgrund der späten Diagnosestellung des Pankreaskarzinoms bei vielen Patienten sekundäre Mutationen vor, welche die zielgerichtete Therapie eines einzelnen Gens schwierig gestalten. Neben KRAS sind hier vor allem TP53, SMAD4 und CDKN2A zu nennen, welche alle für Proteine kodieren, die an der Tumorprogression beteiligt sind¹³.

Neben dem Eingriff auf Genomebene und den daraus exprimierten Proteinen ist, wie bei vielen anderen Tumorentitäten in den letzten Jahren, die Therapie mittels Immuncheckpoint-

Inhibitoren (ICI) zunehmend in den Fokus gerückt. Insbesondere bei Melanom und Kleinzelligem Lungenkarzinom konnten hier in den letzten Jahren deutliche Verbesserungen für die Patienten erreicht werden³⁷. Jedoch konnten diese positiven Effekte bisher in Patienten mit PDAC nicht reproduziert werden. Beispielsweise zeigte eine klinische Studie mit dem anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab kein signifikantes Therapieansprechen³⁸. Ähnlich verlief es in einer Phase-1 Studie mit Pembrolizumab als anti-PD-1 Antikörper³⁹. Da das Stroma des duktales Pankreaskarzinoms insgesamt eine herunterregulierte Immunzellpopulation besitzt, ist ein weiterer Therapieansatz, diese initial mittels Chemotherapie zu stimulieren und vermehrt CD4+ und CD8+ Zellen zum Migrieren in die Tumorumgebung zu stimulieren und dieses mit ICI zu behandeln. Bei anderen Tumorentitäten wurden hier durchaus Erfolge in der Therapie erzielt, jedoch scheinen diese sich nicht in PDAC-Patienten zu bestätigen⁴⁰. Dies alles zeigt, dass weiterhin ein hoher Bedarf besteht, die Pathomechanismen in der Entstehung des Pankreaskarzinoms besser zu verstehen, um geeignetere Behandlungsansätze zu entwickeln.

Neben der Verbesserung der medianen Überlebenszeit als quantitativer Fokus, ist allerdings auch die Verbesserung der Lebensqualität ein entscheidender Faktor. Hier werden neue Therapiekonzepte erprobt, um die Symptome sowie die Tumorlast zu reduzieren. Insbesondere bei Tumoren im Pankreaskopf haben die Patienten oftmals ausgeprägte Schmerzen, die nicht immer konservativ behandelbar sind⁴¹. Neben den aktuellen etablierten invasiven Methoden wie Coeliacusblockade⁴² ist die MRT gesteuerte, ultraschallbasierte Ablation des Pankreas eine neue mögliche non-invasive Behandlungsmethode, um die Tumorlast zu reduzieren und mittels Ablation der lokalen Nervenstränge die Schmerzen zu senken. Diese Methode erzielte in einer Machbarkeitsstudie im Schweinemodell gute Ergebnisse und wird aktuell am Universitätsklinikum Köln in einer klinischen Studie erprobt wird⁴³.

2.2. Das duktales Pankreaskarzinom als Tiermodell

2.2.1. Vorteile von Tumormodellen in Tieren

Präklinische Studien anhand in-vivo Tumormodellen in Tieren bieten einzigartige Vorteile gegenüber in-vitro Studien, die für die Erforschung von verschiedenen Krebsentitäten von entscheidender Bedeutung sind. Einer der Hauptvorteile von Tiermodellen ist ihre pathophysiologische Relevanz. Tumore sind durch eine komplexe Wechselwirkung zwischen Krebszellen und der sie umgebenden Mikroumgebung gekennzeichnet und Tiermodelle ermöglichen die Nachahmung dieser Interaktion in einem lebenden Organismus, was für das Verständnis der Entstehungsmechanismen von Krebs von entscheidender Bedeutung ist^{44,45}. Hierdurch können Wissenschaftler die Faktoren untersuchen, die bei der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren eine Rolle spielen.

Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der genetischen Manipulation in Tiermodellen. Die modernen Technologien erlauben die gezielte Modifikation von Genen in Tumormodellen, um spezifische Mutationen zu induzieren, wie sie im menschlichen Tumorgewebe vorkommen⁴⁶. Diese genetisch veränderten Modelle bieten nun die Möglichkeit, einzelne Gene oder Signalwege in der Tumorentwicklung zu untersuchen und tragen hierdurch wesentlich zum Verständnis der molekularen Mechanismen bei, die zur Entstehung und Metastasierung von Karzinomen führen^{47,48}.

Daraus ergibt sich die Möglichkeit der Bewertung von Therapiestrategien. Präklinische Tumormodelle bieten eine grundlegende Plattform für die Vorab-Testung von Medikamenten und Behandlungsansätzen. Dies ist insbesondere wichtig für Patienten mit PDAC, bei denen die etablierten Therapien oft wenig wirksam sind. In Tiermodellen können neue Medikamente und Kombinationstherapien in einem kontrollierten Umfeld getestet werden, um deren Wirksamkeit und Sicherheit zu bewerten, bevor man sie in klinischen Studien einsetzt^{49,50}.

Ferner bieten Tumormodelle den Vorteil der Reduktion von Forschungskosten und -zeit. Im Vergleich zu klinischen Studien sind sie kosteneffizienter und ermöglichen es, Hypothesen schnell zu testen und vorläufige Daten zu generieren, ein essenzieller Schritt für die Planung und Durchführung umfangreicher klinischer Studien.

Trotz dieser Vorteile ist es wichtig ethische Aspekte bei der Nutzung von Tiermodellen zu berücksichtigen. Die Forschung muss sich an strenge ethische Richtlinien halten und sicherstellen, dass Tiermodelle nur verwendet werden, wenn es keine alternativen Methoden gibt. Außerdem müssen die Ergebnisse aus Tiermodellen sorgfältig auf ihre Übertragbarkeit auf den Menschen geprüft werden^{51,52}.

2.2.2. Murine Pankreaskarzinom-Modelle

Für Forschungszwecke sind eine Vielzahl von tierischen Pankreaskrebsmodellen bekannt, die vornehmlich in Mäusen etabliert wurden. Eines der am weitesten verbreitete Modelle für das duktales Pankreaskarzinom ist die genetisch veränderte KPC-Maus⁵³. Das KPC-Modell weist Mutationen in den KRAS- und p53-Genen auf, die ebenfalls im humanen duktales Pankreaskarzinom häufig zu finden sind. Dieses Tumormodell zeigt, im Vergleich zum humanen PDAC ein vergleichbar dichtes Stroma, aber nicht die typisch hohe T-Zell-Dichte des menschlichen Pankreaskarzinoms auf, was die Verwendung des Tumormodells für immunologische Studien einschränkt⁵⁴.

Ein weiteres breit verwendetes Pankreas-Tumormodell ist die murine syngene Panc02-Zelllinie, die für eine breite Palette von immunbiologischen und immuntherapeutischen Analysen und therapeutischen Studien mit Chemotherapeutika und Checkpoint-Inhibitoren verwendet wird⁵⁵. Obwohl dieses Tumormodell den Phänotyp eines duktales

Pankreaskarzinoms zeigt, fehlt ihm die desmoplastische Reaktion und das typische dichte Stroma, einer der Hauptgründe für die schwache Empfindlichkeit gegenüber chemotherapeutischen Wirkstoffen bei Patienten mit PDAC ⁵⁶.

Darüber hinaus existieren Xenograft-Tumormodelle von menschlichen Pankreaskarzinomen, die den histologischen Phänotyp besser darstellen als tierische Modelle, aber auch diese haben verschiedene Einschränkungen, da immunsupprimierte Tiere verwendet werden. Folglich sind die Reaktion des Immunsystems und Immuntherapien hierauf schwer zu studieren. Hinsichtlich der CAFs können Xenograft-Modelle eine zum Menschen differente Mikroumgebung im Tumorgewebe ausbilden, da murine Fibroblasten aus dem umgebenden (Maus)spezifischen Wirtsgewebe rekrutiert werden und in die vom Menschen abgeleiteten Tumoren einwandern ^{57,58}.

Insgesamt bieten Mausmodelle eine Vielzahl von Vorteilen, wie ihre grundsätzliche genetische Ähnlichkeit zum Menschen, ihre leicht zu manipulierende Genetik sowie ihrem hohen Reproduktionsraten. Jedoch weisen sie auch Nachteile auf. Aufgrund der geringen Größe der Tiere und der erhaltenen Tumore ergeben sich, insbesondere für interventionelle Therapien deutliche Limitationen. Beispielsweise sind sie weitgehend ungeeignet für viele thermische und mechanische Therapieformen wie die Tumorablation und die ultraschallinduzierte Histotripsie ^{59,60}. Hier bieten Rattenmodelle deutliche Vorteile, da hier zum Teil die gleichen technischen Systeme genutzt werden können, welche auch im Menschen eingesetzt werden ⁶¹. Potenzielle Alternativen für Studien, die lokale Therapien mittels technischer Großgeräte beinhalten, sind Neoplasien, die bei Hamstern durch karzinogene Wirkstoffe erzeugt wurden, von denen einige eine hohe Tumorigenität aufweisen, aber einen sehr heterogenen Phänotyp zeigen und schwer zu kontrollieren sind, was dazu führt, dass die Tiere Tumorentitäten in mehreren Organen neben dem Pankreas entwickeln ⁶².

2.2.3. Das DSL-6A/C1 Modell

Das DSL-6A/C1 Tumormodell ist ursprünglich aus einem Azinuszellkarzinom entstanden und erstmals 1993 von Pettengill *et al.* beschrieben ⁶³. Während dieser Transformation gingen wesentliche Merkmale eines Azinuszellkarzinoms verloren, sodass das DSL-6A/C1 Tumormodell in vivo einen duktalem Phänotyp ausbildet, jedoch genetische Merkmale beider Tumorentitäten zeigt ⁶⁴. Die DSL-6A/C1 Tumoren ermöglichen die Bildung größerer Tumorumfänge, was es zu einem geeigneten Kandidaten für Studien macht, die auf therapeutische Ansätze abzielen, welche in kleinvolumigen Mausmodellen nicht praktikabel wären. Darüber hinaus besitzt dieses Tumormodell, ähnlich wie das humane duktales Pankreaskarzinom, ein dichtes Tumorstroma, was das Vorliegen von CAFs nahelegt ^{63,65,66}.

Da dieses Tumormodell bisher nicht systematisch beschrieben wurde, jedoch unter anderem aufgrund seiner Entstehungsgeschichte einzigartige genetische Merkmale aufweist und als

eines der wenigen dukalen Pankreaskarzinommodelle in der Ratte grundsätzlich von Interesse in der präklinischen Forschung ist, haben wir in der hier vorliegenden Dissertationsarbeit das DSL-6A/C1 Tumormodell mittels subkutaner Tumore in Lewis-Ratten umfassend mittels Wachstumskurven, multimodaler Bildgebung, Immunologie und Histologie charakterisiert. Hiermit wollen wir einen Beitrag für weitere präklinische Forschungsprojekte wie die Behandlung eines Pankreastumors mittels MR-HIFU leisten, um die Prognose von Pankreaskarzinomen zu verbessern⁶⁷.

2.3. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das dukale Pankreaskarzinom ist, bei vielversprechenden neuen Therapieformen für ein großes Spektrum an Krebsarten, leider weiterhin mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Viele neue Therapieformen werden hierbei initial in präklinischen Studien an Tiermodellen erprobt und anschließend bei Erfolg im Patienten eingesetzt. Jedes dieser Tiermodelle besitzt aufgrund der unterschiedlichen Gewebetypen gewisse Vor- und Nachteile und keines hiervon ist in jeder Eigenschaft, wie histologischem Typus, Tumormikromilieu oder Mutationsspektrum mit einem Pankreaskarzinom im Menschen deckungsgleich.

Ziel dieser Dissertation ist es, das Pankreaskarzinommodell DSL-6A/C1 in der Ratte mit verschiedenen wissenschaftlichen Methoden zu charakterisieren und somit die Möglichkeit für weitere Forschungsvorhaben zur Verbesserung der Therapieoptionen bei PDAC zu ermöglichen und die Vor- und Nachteile dieses Tumormodells herauszuarbeiten.

Hierbei werden verschiedene Modalitäten der Charakterisierung eingesetzt. Mittels MRT werden Signalverhalten und Perfusion dargestellt, die PET/CT dient der Analyse der CAF-Dichte welche in der histologischen Aufarbeitung validiert wird und mittels immunologischen Assays arbeiten wir die Zusammensetzung und Quantität der immunogenen Zellen heraus. Darüber hinaus dient die Analyse des Wachstumsverhaltens hauptsächlich dem Ziel der technischen Planbarkeit etwaiger präklinischer Versuche.

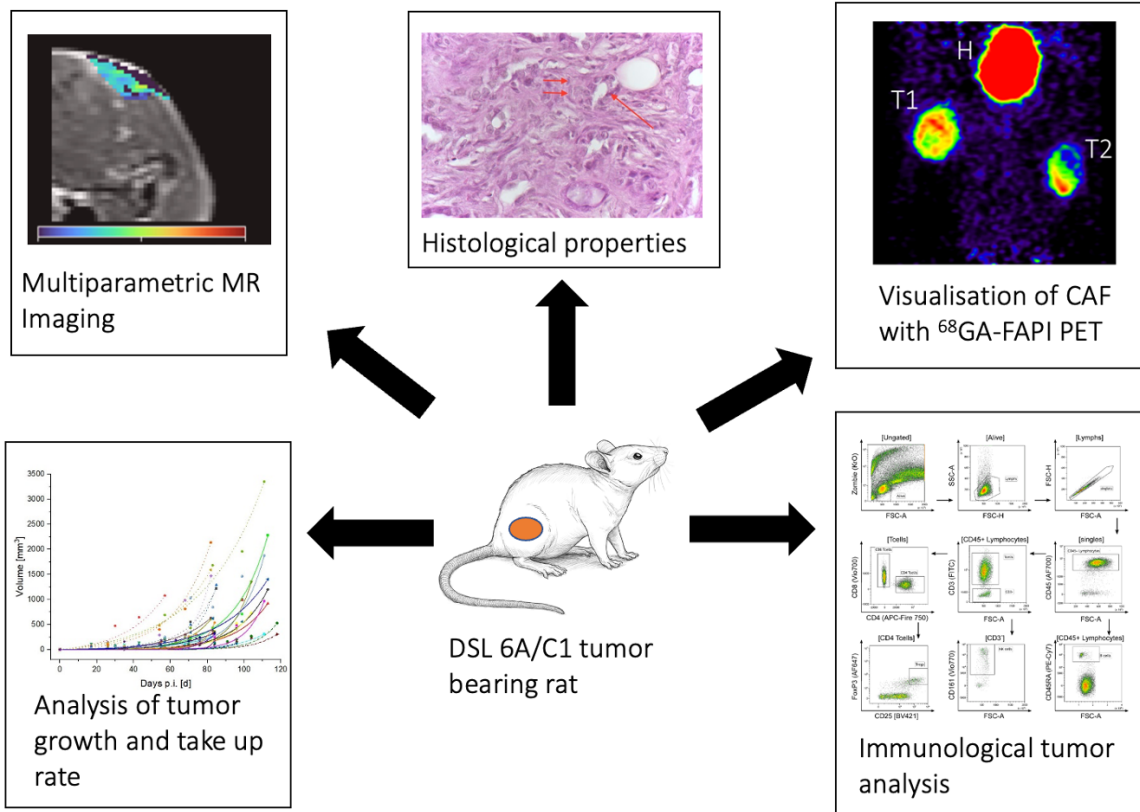


Abbildung 1: Übersicht über die in der vorliegenden Studie untersuchten Parameter, entnommen aus *Schmidt et al, 2024*⁶⁸.

3. Publikation

Titel: Multiparametric Characterization of the DSL-6A/C1 Pancreatic Cancer Model in Rats

Autoren: Schmidt P, Lindemeyer J, Raut P, Schütz M, Saniternik S, Jönsson J, Endepols H, Fischer T, Quaas A, Schlößer HA, Thelen M, Grill H.

Zeitschrift: Cancers

PMID: PMC11049193

DOI: 10.3390/cancers16081535

Article

Multiparametric Characterization of the DSL-6A/C1 Pancreatic Cancer Model in Rats

Patrick Schmidt ¹, Johannes Lindemeyer ¹, Pranali Raut ¹, Markus Schütz ^{1,2}, Sven Saniternik ^{1,2}, Jannika Jönsson ¹, Heike Endepols ^{3,4,5}, Thomas Fischer ⁴, Alexander Quaas ⁶, Hans Anton Schlößer ^{7,8}, Martin Thelen ⁷ and Holger Grüll ^{1,2,*}

¹ Faculty of Medicine and University Hospital of Cologne, Institute of Diagnostic and Interventional Radiology, University of Cologne, 50937 Cologne, Germany; patrick.schmidt@uk-koeln.de (P.S.); johannes.lindemeyer@uk-koeln.de (J.L.); p.raut@erasmusmc.nl (P.R.); markus.b.schuetz@gmail.com (M.S.); sven.saniternik@uk-koeln.de (S.S.); jannika.joensson@uk-koeln.de (J.J.)

² Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Department of Chemistry, University of Cologne, 50937 Cologne, Germany

³ Faculty of Medicine and University Hospital of Cologne, Institute of Radiochemistry and Experimental Molecular Imaging, University of Cologne, 50937 Cologne, Germany; heike.endepols@uk-koeln.de

⁴ Faculty of Medicine and University Hospital of Cologne, Department of Nuclear Medicine, University of Cologne, 50937 Cologne, Germany; thomas.fischer@uk-koeln.de

⁵ Nuclear Chemistry, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-5), Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany

⁶ Faculty of Medicine and University Hospital of Cologne, Institute of Pathology, University of Cologne, 50937 Cologne, Germany; alexander.quaas@uk-koeln.de

⁷ Center for Molecular Medicine Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50937 Cologne, Germany; hans.schloesser@uk-koeln.de (H.A.S.); martin.thelen@uk-koeln.de (M.T.)

⁸ Department of General, Visceral, Cancer and Transplantation Surgery, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50937 Cologne, Germany

* Correspondence: holger.gruell@uk-koeln.de; Tel.: +49-221-478-89684; Fax: +49-221-478-82384



Citation: Schmidt, P.; Lindemeyer, J.; Raut, P.; Schütz, M.; Saniternik, S.; Jönsson, J.; Endepols, H.; Fischer, T.; Quaas, A.; Schlößer, H.A.; et al. Multiparametric Characterization of the DSL-6A/C1 Pancreatic Cancer Model in Rats. *Cancers* **2024**, *16*, 1535. <https://doi.org/10.3390/cancers16081535>

Academic Editor: Ernest Ramsay Camp

Received: 5 March 2024

Revised: 4 April 2024

Accepted: 12 April 2024

Published: 17 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: In this study, a rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) was established and extensively analyzed. The histological examination confirmed that the model displayed features of PDAC, such as malformed malignant ductal cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). The study delved into the tumor microenvironment, revealing a unique immune profile with increased CD8⁺ cytotoxic T cells, suggesting a stronger anti-tumor immune response. Different imaging techniques were employed, showing contrast enhancement on MRI and a strong uptake of ⁶⁸Ga-FAPI (fibroblast activation protein inhibitor) tracers in tumor tissues. This model's suitability for further research in ⁶⁸Ga-FAPI imaging and therapeutic approaches was highlighted. While some limitations exist, such as late-stage edema and heterogeneous growth patterns, this model provides valuable insights for PDAC studies and potential therapeutic strategies.

Abstract: The DSL-6A/C1 murine pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tumor model was established in Lewis rats and characterized through a comprehensive multiparametric analysis to compare it to other preclinical tumor models and explore potential diagnostic and therapeutical targets. DSL-6A/C1 tumors were histologically analyzed to elucidate PDAC features. The tumor microenvironment was studied for immune cell prevalence. Multiparametric MRI and PET imaging were utilized to characterize tumors, and ⁶⁸Ga-FAPI-46-targeting cancer-associated fibroblasts (CAFs), were used to validate the histological findings. The histology confirmed typical PDAC characteristics, such as malformed pancreatic ductal malignant cells and CAFs. Distinct immune landscapes were identified, revealing an increased presence of CD8⁺ T cells and a decreased CD4⁺ T cell fraction within the tumor microenvironment. PET imaging with ⁶⁸Ga-FAPI tracers exhibited strong tracer uptake in tumor tissues. The MRI parameters indicated increasing intralesional necrosis over time and elevated contrast media uptake in vital tumor areas. We have demonstrated that the DSL-6A/C1 tumor model, particularly due to its high tumorigenicity, tumor size, and ⁶⁸Ga-FAPI-46 sensitivity, is

a suitable alternative to established small animal models for many forms of preclinical analyses and therapeutic studies of PDAC.

Keywords: pancreatic cancer; DSL-6A/C1; magnetic resonance imaging; FAPI; cancer-associated fibroblasts; murine tumor model

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive cancer entities, causing about 130,000 deaths in Europe per year and 4.2% of cancer-related deaths worldwide [1,2]. While the mean time of survival for other types of cancer has improved over the past years thanks to new therapeutic options, the 5-year survival rate for PDAC has remained low at 6% [3,4]. Due to a lack of symptoms and the early onset of metastases, PDAC is commonly diagnosed in a vast majority of patients at a late stage. The tumor tissue of PDAC is poorly perfused and characterized by a dense stroma with a high density of cancer-associated fibroblasts (CAFs). Poor drug penetration is therefore one of the reasons for the therapy resistance and poor response of PDAC [5–7].

Clinical diagnoses and staging are currently performed with Computed Tomography (CT) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) [8]. CT is currently the primary imaging modality for initial diagnosis with an evaluation of the contrast agent uptake in the arterial and portal venous phase. Due to low perfusion and dense stroma, PDAC nodules appear to be hypointense in the arterial phase after contrast injection compared to the surrounding pancreatic tissue. The proper detection of small lesions or lesions that appear to be isodense to the surrounding tissue is challenging [9–11]. In this context, we recently showed that new energy-resolving CT systems, which provide for example iodine concentration maps, offer improved diagnostics of PDAC [12]. Magnetic Resonance Imaging (MRI) offers high-contrast soft tissue images based on different contrast mechanisms, such as T_1 and T_2 , T_2^* weighted images, quantitative T_1 and T_2 maps, [13–15], diffusion-weighted images (DWIs) [16], perfusion, or dynamic contrast-enhanced images, allowing us to assess pharmacokinetic parameters [17,18]. Hence, MRI is an essential tool to gain in-depth knowledge about tissue properties and the tumor microenvironment and is suitable for monitoring therapy responses [19].

Due to the typically dense stroma in PDAC resulting from a high number of CAFs in the tumor tissue, imaging using Positron Emission Tomography (PET) tracers based on a ^{68}Ga (^{68}Ga)-labelled fibroblast activation protein inhibitor (FAPI) has gained increasing importance in recent years [20]. Besides presenting a biomarker for tumor detection, CAFs are gaining increasing importance as targets of potential therapeutic options for PDAC due to their function as promoters of tumor growth, as well as immune suppression [21]. CAF imaging with ^{68}Ga -FAPI PET/CT allows for improved detection of smaller lesions and an improved differentiation of PDAC from inflammatory processes compared to ^{18}F -FDG-PET [22,23].

Research on new therapeutic options, as well as new imaging methods, for PDAC rely on a representative animal model mimicking the pathology that is observed in patients. For research purposes, a variety of animal pancreatic cancer models are known, mainly in mice. One of the most widely used models for PDAC is the genetically engineered KPC mouse, developed in 2005 [24]. The KPC model shows mutations in the KRAS and p53 genes that are typical for human PDAC, as well as a comparable dense stroma but lacks the typically high T cell density of human PDAC, limiting the use of the tumor model for immunological studies [25]. Another widely used PDAC tumor model is the murine syngeneic Panc02 cell line which is used for a wide range of immunobiological and immunotherapeutic analyses and therapeutic studies using chemotherapeutics and checkpoint inhibitors [26]. Although this tumor model shows a PDAC phenotype, it lacks a desmoplastic reaction, which is one of the main reasons for the weak sensitivity to chemotherapeutic agents in

human patients [27]. In addition, xenograft tumor models from human PDAC represent the histological phenotype better than homograft animal models, but they also have various limitations, as immunosuppressed animals are used. Consequently, immune therapies, as well as the response of the immune system to therapies, are difficult to study. With respect to CAFs, xenograft models may form a different microenvironment in the tumor tissue, as murine fibroblasts are recruited from the surrounding host tissue and migrate into a human-derived tumor [28,29]. Furthermore, donor tissue can only be obtained from resectable human PDAC, for which only a minority of patients are eligible [30]. Moreover, as most of the established tumor models are grown in mice, their small tumor volume presents a challenge for performing therapeutic studies employing device-based physical therapies using radiofrequency, microwave, or high-intensity focused ultrasound [24,26,31]. Potential alternatives in larger animals for studies involving local therapies include neoplasms produced by carcinogenic agents in hamsters, some of which have high tumorigenicity, but show a very heterogeneous phenotype and are difficult to control, resulting in animals developing tumor entities in several organs besides the pancreas [32].

As a result of the above limitations, PDAC models in rats appear promising for studying certain therapeutic approaches which require larger tumor volumes or certain tissue and growth properties. In this study, we characterize the DSL-6A/C1 tumor model in detail, a pancreatic ductal cell line in the rat arising from a DSL-6 acinar cell carcinoma that was first described by Pettengill et al. in 1993 [33]. In particular, we use multiparametric MRI, FAPI-PET/CT, as well as histology and immunological and growth analysis of the DSL 6A/C1 PDAC tumor model to highlight its advantages and disadvantages compared to other tumor models.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male Lewis rats were obtained from Charles River (Sulzfeld, Germany) and maintained in standard housing at 20–24 °C and 12 h light/12 h dark cycles. All animals were provided with water and food ad libitum. All animal experiments were conducted in accordance with local institutional guidelines and approved by the LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Northrhine-Westphalia, Germany).

2.2. Cell Line and Culture

The rat pancreatic ductal adenocarcinoma DSL 6A/C1 cell line derived from the DSL-6 acinar cell carcinoma was purchased from CLS (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany) and cultured in Waymouth's medium (Thermo Fisher Scientific, Schwerte (Northrhine-Westphalia), Germany). The cell culture medium was supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific), penicillin G (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL). The cells were incubated at 37 °C in humidified air with 5% CO₂. The medium was replaced twice weekly, and cells were maintained by serial passaging after trypsinization with Trypsin 0.5%/EDTA 0.2% in PBS.

2.3. Tumor Induction and Growth Measurement

For the creation of the tumors, male Lewis rats, 6–8 weeks of age, were anesthetized using a mixture of 3–5% isoflurane and oxygen. Meloxicam (0.5 mg/kg, s.c.) and metamizole (100 mg/kg, s.c.) were used as a pain medication. Then, 10⁷ DSL-6A/C1 cells were suspended in Matrigel and Waymouth medium (1:1, final volume 100 µL) and injected s.c. into each hindleg. Tumor dimensions were determined every second day by measuring the length (l), width (w), and depth (d) using a caliper, and the tumor volume was calculated using the formula $V = 0.5 \times l \times w \times d$. In addition, tumor volumes were determined every second week using MRI with segmentations of T2-weighted images performed with ITK-SNAP [34]. In another group of 10 female Lewis rats, we did not observe any tumor growth over the time span of 5 months.

2.4. Euthanasia, Tissue Collection, and Histology

Euthanasia was performed in adherence to ethical standards and animal welfare considerations. The endpoint for each animal was determined by one or more of the following criteria: tumor size in one dimension exceeding 3 cm or manifestation of wasting syndrome. Some animals, especially in the slow-growing tumor group, had to be euthanized according to local COVID-19 restrictions. After euthanasia, tumors were extracted and fixed in 4% buffered formalin for 48 h prior to paraffin embedding. Sections were cut at 3 μ m thickness. Representative sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and analyzed for cancer-associated fibroblasts using a transmitted-light phase-contrast microscope (Zeiss Axioskop 2, Carl Zeiss, Jena (Thuringia), Germany).

2.5. Magnetic Resonance Imaging

After tumor cell injection, the animals underwent MRI monitoring every second week until euthanasia. The scans were acquired using a clinical 3.0 T MRI (Achieva[®], Philips Healthcare, Best (North Brabant), The Netherlands) with a dedicated animal bed and ventilation setup embedded in an eight-channel receive-only rat body coil (RAPID Biomedical, Rimpfing (Bavaria), Germany). The animals were anaesthetized with a mixture of isoflurane and oxygen before and during image acquisition, with the dose of isoflurane being adjusted to establish a therapeutically adequate anesthetic depth, while maintaining stable respiratory cycles. The hind legs of the animals were naturally cocked to the sides, resting between the lower abdomen and the side of the animal bed, close to the coil center and the magnet isocenter.

Tumors were localized with a transverse T₂-weighted 2D turbo-spin echo (acronym T2TSE) sequence covering the animal roughly from the lower abdomen to the lower leg. Quantitative and contrast-enhanced acquisitions were recorded at selected time points (three time points are illustrated below). The following scans were obtained in the same reduced FOV of 60 × 60 × 21 mm³. For quantification of T₂, a multi-slice turbo-spin echo sequence (acronym T2MAP) was acquired. Based on a Look-Locker-related acquisition (Ref Look-Locker), data for T₁ relaxation mapping was obtained (acronym T1MAP) [35]. Dynamic contrast-enhanced (DCE) imaging was recorded based on a 3D FFE sequence. All relevant sequence parameters are listed in Table 1. Contrast agent (Clariscan[™], GE Healthcare, Chicago, IL, USA) was injected during the 15th dynamic acquisition using an automatic pump and an infusion line via the tail vein (0.2 mmol/kg bodyweight).

Table 1. Summary of MRI scanning parameters.

Protocol	TSE2D	FFE2D	T2MAP	T1MAP	DCE
Sequence Type	2D TSE	2D FFE	2D TSE	IR Look-Locker	3D FFE
TE (ms)	30	4.8	6.25 + $n \times 25$	3.7	2.8
TR (ms)	12117	230	11970	8000	6
Field of View (mm ³)	~90 × 60 × 50	~90 × 60 × 66	60 × 60 × 21	60 × 60 × 21	60 × 60 × 20
Reconstruction voxel size (mm ³)	0.2 × 0.2 × 1.0	0.28 × 0.28 × 1.00	0.63 × 0.63 × 2.1	0.63 × 0.63 × 2.1	0.62 × 0.62 × 0.7
Acquisition voxel size (mm ³)	0.3 × 0.3 × 1	0.3 × 0.3 × 1	0.94 × 0.94 × 2.1	0.94 × 1.00 × 2.1	0.7 × 0.7 × 0.7
NSA	1	2			
Flip Angle (°)	90	60	90	5	15
No. of frames (Slices)	40	60	10	10	29
Fat saturation	no	no	SPIR	SPIR	no
Other parameters				TI = 22 + $n \times 100$ ms	RF-spoiled, dyn. scan time = 9.7 s

Abbreviations: TSE: Turbo Spin Echo; FFE: Fast Field Echo; IR: Inversion Recovery; n : echo number [0, . . . , 15] for T2MAP and [0, . . . , 64] for T1MAP, respectively; SPIR: Spectral Presaturation with Inversion Recovery; RF: Radiofrequency.

2.6. MRI Data Image Processing and Analysis

Based on the TSE2D data, the tumor volume was segmented for all subjects with ITK-Snap [34]. The T_2 relaxivity was determined by fitting an exponential curve to the echo–time curve with non-linear least squares. For T_1 , the acquired data were flipped left of the zero-crossing and fitted to a simplified Look–Locker model, correcting for saturation effects as described in Deichmann et al. [36]. T_1 and T_2 maps, as well as the segmentation, were resampled to the through-slice resolution of the DCE data by nearest neighbor interpolation. In acquisitions where a hyperintense part within the tumor existed, it was segmented based on the resampled T_1 maps. Image analysis for DCE data was performed with a dedicated open-source software, Rocketship [37], using a manually segmented vessel for AIF estimation and the provided nested model to derive the pharmacokinetic parameters. AIF smoothing and automated time point detection were employed.

2.7. Synthesis and Quality Control of ^{68}Ga -FAPI

A total of 50 μg FAPI-46 (ABX, Radeberg, Germany) in 1.5 M HEPES buffer was labeled with 500 to 800 MBq [^{68}Ga]-gallium chloride (^{68}Ga -FAPI-46) in 0.1 M HCl using a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator (Eckert& Ziegler, Berlin, Germany) and the GRP synthesis module from Scintomics (Gräfelting, Germany). The reaction was carried out at 125 °C for 10 min. Afterwards, the reaction mixture was purified via C18 column chromatography (Waters C18 cartridge) and consequently diluted with isotonic saline.

Radiochemical purity was determined by HPLC (Eluent A: water (HPLC Grade) + 0.1% trifluoro acetate (TFA), eluent B: acetonitrile (HPLC Grade) + 0.1% TFA, gradient: 95% A for 2 min, then to 5% A within 15 min, flow: 1.2 mL/min, UV detection: 254 nm, injection volume: 20 μL ; free ^{68}Ga was eluted after 2–3 min, product after 8 min) and TLC (ITLC-SG strips, 1.5 \times 10 cm, 1 M Ammoniumacetat/Methanol 1:1, TLC Scanner from Raytest, Straubenhardt, Germany; ^{68}Ga -colloid remained at the origin).

2.8. Positron Emission Tomography

Small animal PET imaging was performed when the tumor was visible on 3 consecutive MRI scans on a FOCUS 220 micro-PET scanner (CTI-Siemens, Germany). The rats were anesthetized with isoflurane in O_2/air 3:7 (induction 5%, maintenance 2%), and a catheter for tracer injection was inserted into the lateral tail vein. After fixation in the animal holder, the emission scan started with intravenous injection of 10 to 64 MBq ^{68}Ga -FAPI-46 in 500 μL 0.9% NaCl. The acquisition time was 60 min to 120 min. Emission scans were followed by an 8 min transmission scan with a rotating ^{57}Co -point source.

Breathing rate and body temperature were monitored and held at approx. 60 breaths/min and 37 °C, respectively. The emission scans were histogrammed into time frames (2 \times 1 min, 2 \times 2 min, 6 \times 4 min, 18 \times 5 min for time–activity curves, and 4 \times 30 min/4 \times 15 min for display) and fully 3D rebinned (span 3, ring difference 47), followed by OSEM3D/MAP reconstruction. The resulting voxel sizes were 0.38 \times 0.38 \times 0.80 mm³. For all further processing of the images, including statistics, the software VINCI 5.21 for MacOS X (Max Planck Institute for Metabolism Research, Cologne, Germany) was used. Images were intensity-normalized to injected dose and corrected for body weight (SUV_{bw}). To this end, every frame was divided by injected dose and multiplied by body weight times 100.

2.9. Isolation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Rat Tissue and Flow Cytometry

Tumors used for immunological analysis had to be detectable on at least 3 consecutive MRI scans before removal. The scans took place every second week. During extraction, surrounding muscular tissue was removed. Tumor specimens were processed mechanically (gentleMACSDissociator, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach (Northrhine-Westphalia), Germany) and enzymatically (320 U/mL collagenase-IV, Worthington OH, USA and 100 U/mL DNase-I, Applichem, Darmstadt (Hesse), Germany) at 37 °C for 1 h to obtain a single-cell suspension containing the tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). The suspension was filtered using a 100 μm and a 70 μm cell strainer (Corning, New York, NY, USA). Spleens of

tumor-bearing rats were mashed through a 100 μm cell strainer, followed by a subsequent filter step with a 70 μm cell strainer. Splenocytes and TILs were stained for multi-color flow cytometry (detailed antibody list, Appendix A Table A1). Intracellular Foxp3 staining was performed using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set according to the manufacturer's protocol (eBioscience, San Diego, CA, USA). Samples were acquired on a Cytoflex LX flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

To evaluate the potential of the pancreatic ductal adenocarcinoma cell line DSL-6A/C1 as a preclinical tumor model, TILs in DSL-6A/C1 tumors were analyzed. First, a single-cell suspension of fresh tumor tissue was generated after resection. Subsequently, lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded, and single lymphocytes were identified by forward–sideward scatter and CD45 expression. Subsequently, CD3⁺ T cells, CD3⁺CD4⁺ T cells and CD3⁺CD8⁺ T cells, CD19⁺ B cells, and CD3-CD56⁺ NK cells were identified, as depicted in Figure 1.

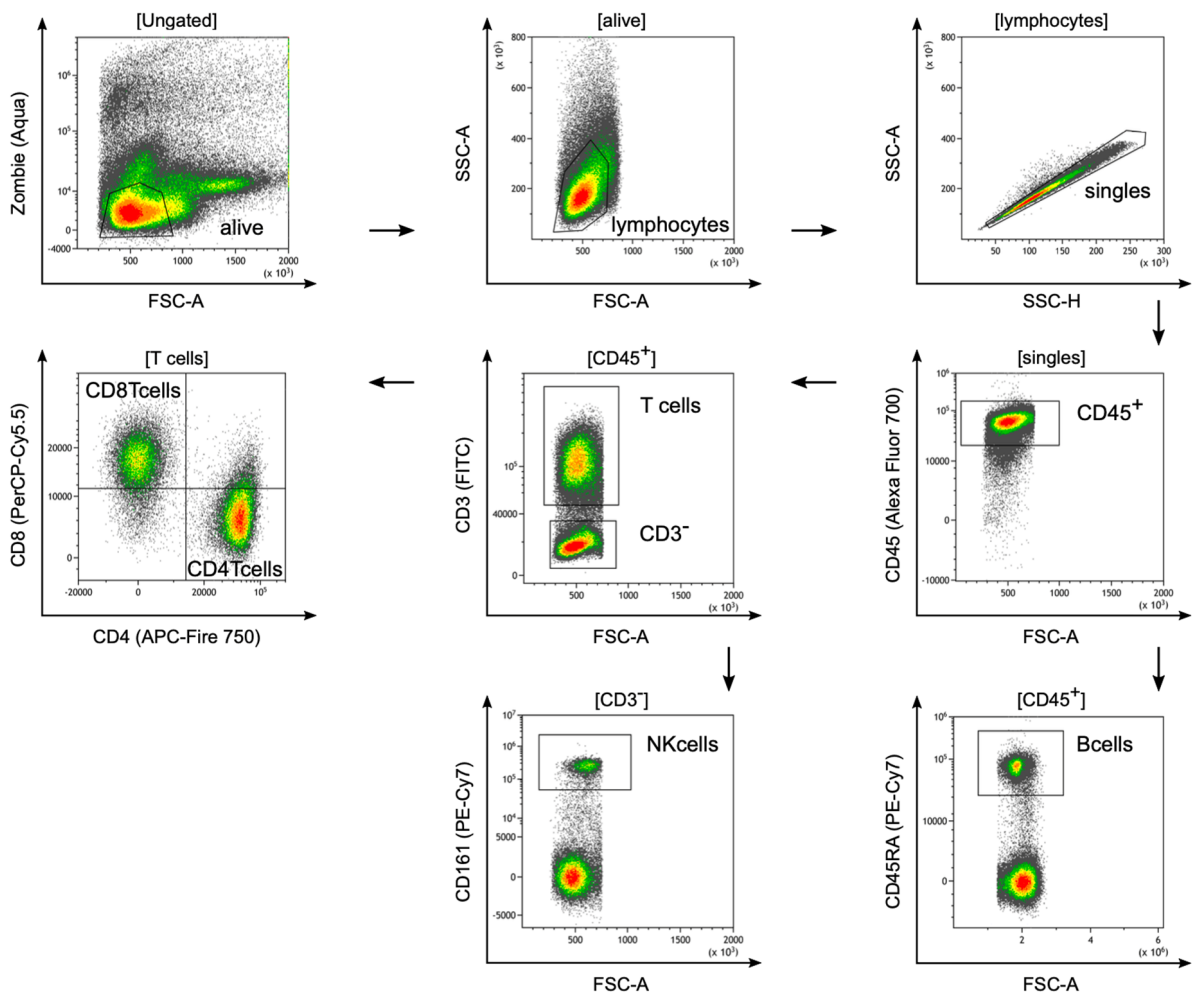


Figure 1. Representative flow cytometry plots and detailed gating strategy of tumor-infiltrating lymphocytes in DSL-6A/C1 tumors. Dead cells were excluded using a zombie dye (alive). Lymphocytes were selected by gating for size and granularity (Forward Scatter Area (FSC-A) versus Side Scatter Area (SSC-A)). Living lymphocytes were further plotted by SSC-H versus SSC-A to gate single cells. From the single cells (singles), lymphocytes (CD45⁺) were gated based on their CD45 expression. B cells were defined as CD45⁺ lymphocytes and the expression of CD45RA (B cells). T cells were defined by gating on CD45⁺ lymphocytes and the expression of CD3 (T cells), whereas CD3 cells expressing CD161 were considered NK cells (NK cells). T cells were further divided into CD8 T cells (CD8 T cells) or CD4 T cells (CD4 T cells).

3. Results

3.1. Tumor Take-up Rate and Growth

Subcutaneous tumor cell injections were successful in 16 out of 20 rats, resulting in a tumor formation rate of 80%, which is slightly lower than what is described in previous research [38]. In a group of 10 female rats, no tumor growth was seen over the time span of 5 months. Tumors were first identifiable (or visible) on MRI after 38 days (± 12 days) and showed a very heterogeneous growth reaching an average tumor size of 815 mm^3 ($\pm 628 \text{ mm}^3$) after 100 days. Generally, all tumors demonstrated exponential growth after a variable time lag, varying from 40 days to 100 days after tumor implantation (Figure 2). In larger tumors, increasing intralesional edema and necrosis were seen over time and were clearly observable for 81% of all tumors on the last MRI scan (Figure 3), whereas distant metastases in the abdominal or thoracic cavity were not found either in PET-CT scans nor in autopsies. Cutaneous ulcerations were found in one out of twenty animals.

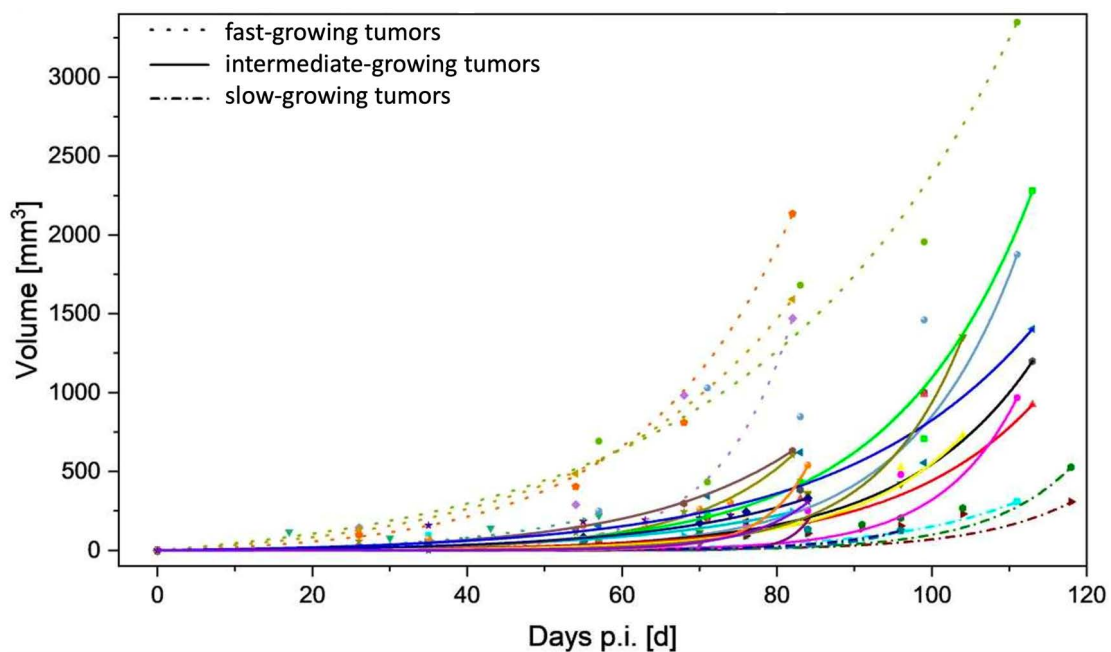


Figure 2. Tumor growth as a function of time. For a better overview, tumors were visually divided into fast-growing (dots only), intermediate-growing (solid lines), and slow-growing (dashed lines) tumors (p.i.—post injection). Missing time points reflect early euthanasia related to local COVID-19 restrictions.

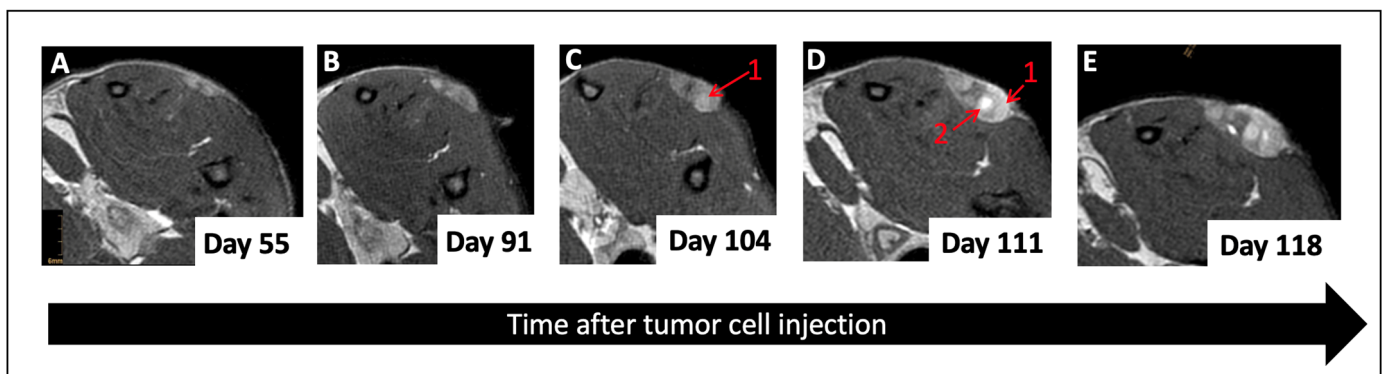


Figure 3. Representative T_2 MRI images at various time points after inoculation. Unlike the earlier time points (A,B), the latest time points (C–E) show increasing edema (1) and cyst formation (2) within the tumor.

3.2. Multiparametric MRI

Examples for the acquired DCE signal magnitude curves are illustrated for three time points in Figure 4, while the calculated relaxation parameters can be found in Figure 5. The non-contrast T_1 relaxation time in the tumor tissue showed moderately higher values compared to healthy muscle and remained at a constantly high level over the acquisition period. The tumors exhibited clear hyperintense contrast in the T_1 maps, with an average difference of 80 to 250 ms (up to 1240 ms in tumors compared to 930 ms to 990 ms in tissue), which is comparable to other murine PDAC tumor models found in the literature [39,40].

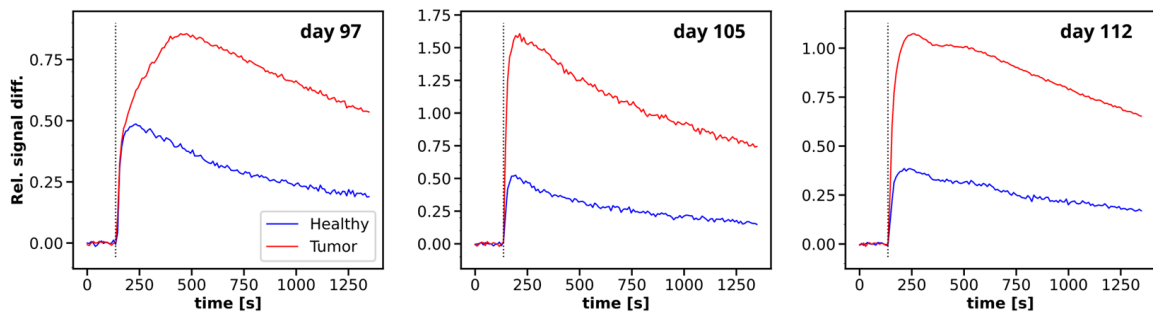


Figure 4. Average uptake curves of DCE acquisitions for tumor and healthy reference tissue on three different measurement days, illustrated by normalized difference to average baseline signal. Injection time is indicated by vertical black dashed line.

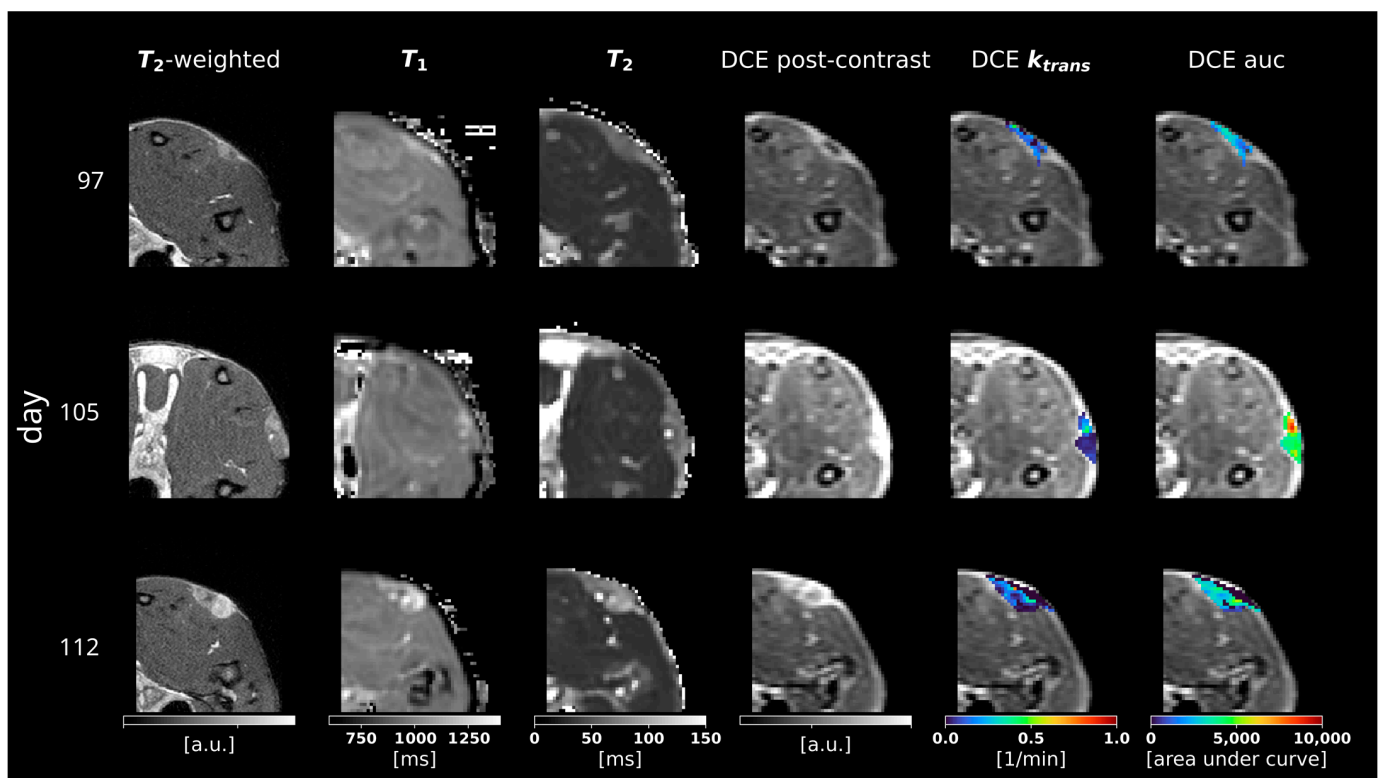


Figure 5. Representative slices of the acquired overview and quantitative MRI relaxation parameters, as well as the quantitative DCE MRI parameters (columns) at three different measurement days after inoculation (rows). The last three columns show the contrast-enhanced DCE magnitude as an underlay.

The initial T_2 values in the tumor tissue showed higher relaxation values compared to muscle (mean values of 60 to 90 ms in tumors compared to about 35 ms in muscles), which are slightly higher than those described in other small animal PDAC models [39]. Over time, the T_2 relaxation times increased significantly in the central locations of the tumor and reached up to 110 ms, indicating the presence of cystic liquid formations within the lesion.

Due to the high perfusion and presence of malformed vascular structures within the PDAC tissue, the tumor showed significantly increased signal intensity after contrast agent injection in DCE images compared to healthy tissue, as displayed in Figure 5. As a measure of capillary permeability, the average tumor k_{trans} values ranged from 0.05 to 0.12 min^{-1} , which is similar to other preclinical pancreatic cancer tumor models [41–43].

3.3. ^{68}Ga -FAPI-46 PET Imaging

All tumors showed an immediate uptake of ^{68}Ga -FAPI-46, which was higher in the bigger tumors of rat #1 compared to the small tumors of rat #2 (Figure 6). Other than the tumor tissue and the urinary bladder, through which the tracer is excreted, no other organ of the lower abdomen showed any notable uptake. The bigger tumors were heterogeneous, with a higher tracer uptake at the outer rim, while the center seemed to be necrotic. In the smaller tumors, the highest uptake was seen in the center.

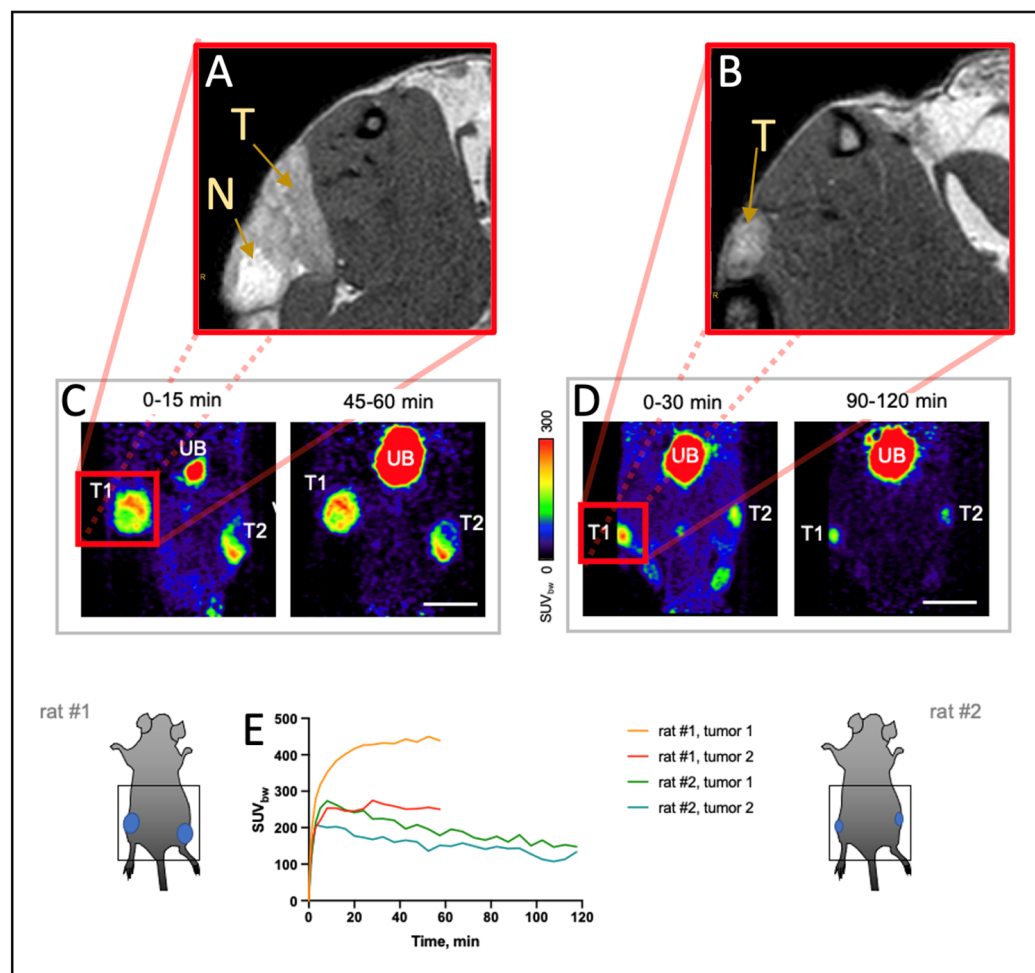


Figure 6. ^{68}Ga -FAPI-46 PET imaging of the DSL-6A/C1 tumors. (A,B) T_2 MR images of the the s.c. tumors (T) at the time of PET acquisition showing central necrosis (N) in the larger tumors. (C–E) PET measurements with ^{68}Ga -FAPI-46 in the same rats, each bearing two tumors; T1/T2—tumor 1/2; UB—urinary bladder; scale bar: 20 mm.

3.4. Tissue Extraction and Histology

Macroscopically, solid and well-defined tumor tissue was present. This is histologically composed of abundant tumor cells that repeatedly form primitive ductular structures. In the peritumoral stroma, located interstitially among the tumor cells, CAFs were identified. All tumors showed a phenotype corresponding to ductal-type adenocarcinomas in HE-stained sections (Figure 7).

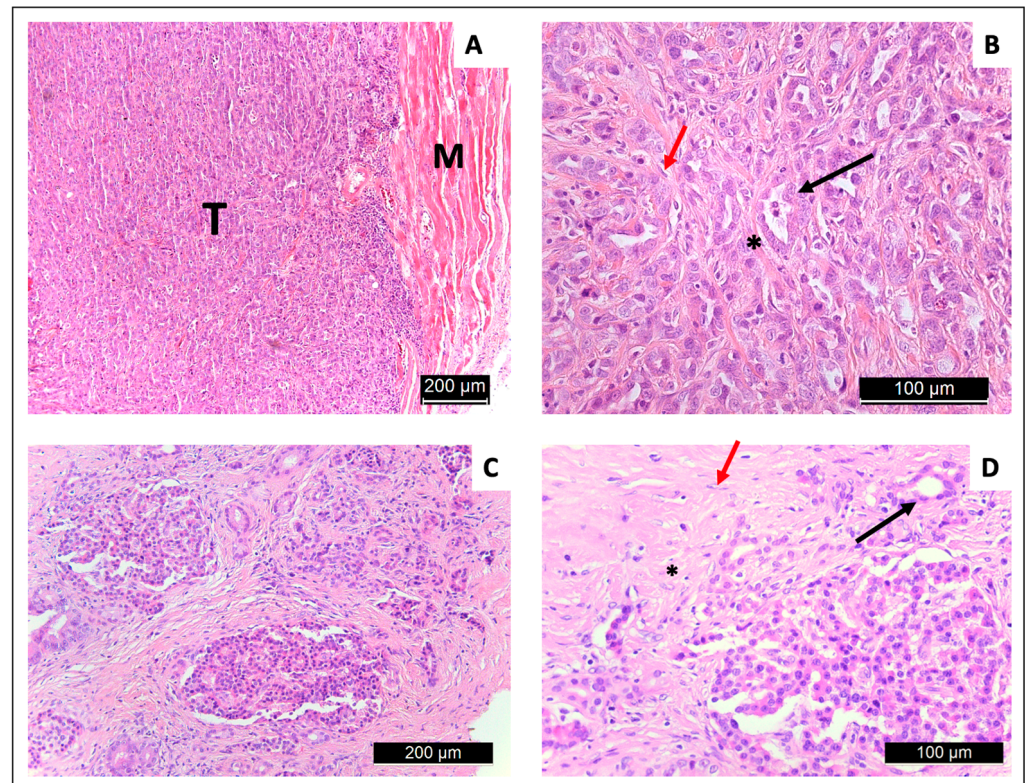


Figure 7. HE-stained histology slices of an s.c. DSL-6A/C1 neoplasm (A,B) in comparison to a human PDAC tumor (C,D), showing tumor (T) and muscle tissue (M), in the tumor stroma cancer-associated fibroblasts (red arrows) are present. Tumor cells forming tubulo-ductular structures (black arrows) and collagenous fibers (*) are found. Both carcinomas (rat and human) are formed by ductularly arranged tumor cells.

3.5. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in DSL-6A/C1 Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Tumors

TILs from DSL-6A/C1 tumors (left and right flank) with splenocytes of these rats ($n = 4$) were compared and showed an increase in $CD3^+$ T cells in terms of percent of all $CD45^+$ lymphocytes in TILs compared to splenocytes (Figure 8B). In the T cell fraction of TILs, an increased percentage of $CD8^+$ cytotoxic T cells was found, whereas the percentage of the $CD4^+$ T cell compartment was reduced in TILs compared to splenocytes. In addition, the flow cytometric analysis revealed that TILs contained fewer B cells, but similar percentages of NK cells compared with splenocytes (Figure 8B).

Next, functionally distinct subsets of these lymphocyte lineages based on specific phenotypes were analyzed and showed increased percentages of activated T cells in TILs, but similar percentages of regulatory T cells and similar expression levels of the co-inhibitory molecule CTLA-4 compared with splenocytes of tumor-bearing rats (Figure 1).

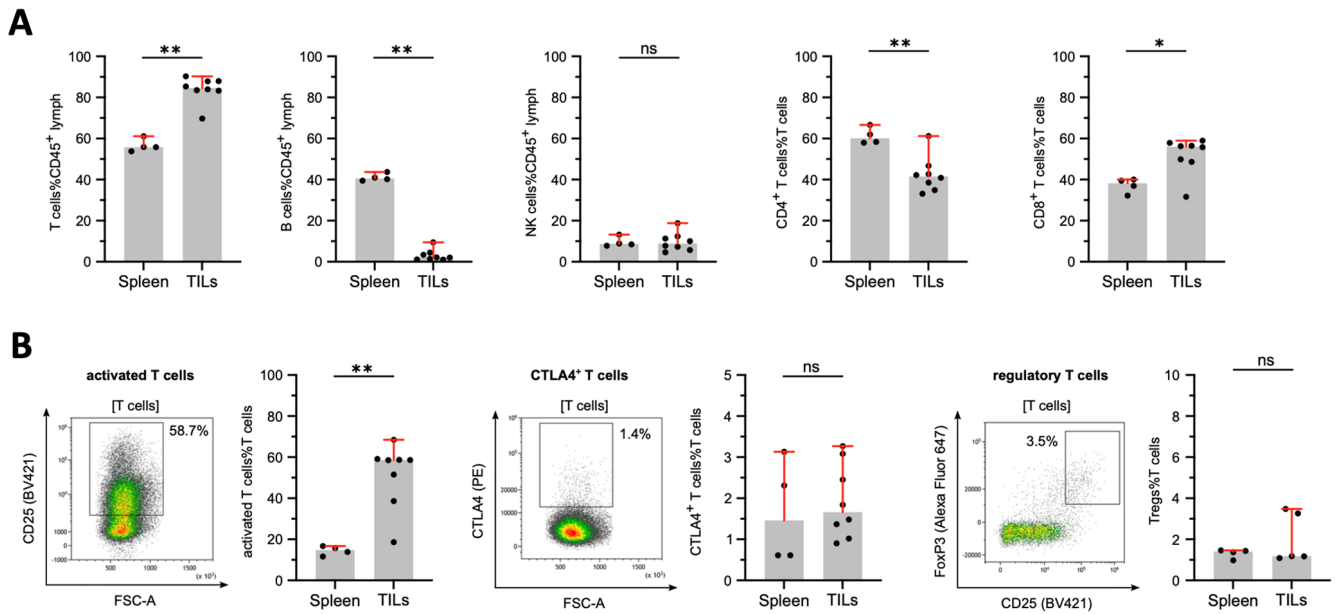


Figure 8. Tumor-infiltrating lymphocytes in DSL-6A/C1 tumors. (A) Lymphocyte subset in percent of all living lymphocytes. (B) Activated T cells (CD25⁺ T cells), regulatory T cells (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ T cells), and CTLA4⁺ T cells in percent of all T cells. Significant differences, determined by the non-parametric, unpaired, two-tailed Mann-Whitney test, are denoted by asterisks (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ns: not significant). Mean \pm 95% confidence interval is indicated in red where applicable.

4. Discussion

The DSL-6A/C1 tumor cells were initially derived from an acinar cell carcinoma and displayed genetical characteristics of both acinar cell carcinoma and PDAC [44]. Our histological results, obtained from established tumors, showed features of PDAC, such as malformed pancreatic ductal malignant cells and CAFs in the tumor stroma [33,44]. Nevertheless, compared to human PDAC and tumor models in mice, the DSL-6A/C1 tumors showed a less pronounced deposition of collagen and desmoplastic stroma reaction [25,45]. The histology shows a more displacing growth pattern rather than infiltration of the surrounding tissue, which might be a result of the s.c. growth. A more infiltrative growth is described for this tumor model after orthotopic implantation in reference [38].

The tumor microenvironment plays a crucial role in cancer's progression, metastasis, and response to therapies. Our findings highlight distinct immune landscapes in TILs compared to splenocytes. The increased presence of CD8⁺ cytotoxic T cells within the tumor microenvironment suggests an augmented anti-tumor immune response which, in human subjects, seems to be an indicator for longer survival [46]. In contrast, the observed decreased CD4⁺ T cell fraction raises questions about tumor-mediated immune alterations [47].

Interestingly, the reduced B cell prevalence in TILs might indicate a diminished role for humoral immunity in the tumor microenvironment, while the consistent NK cell percentages suggest unchanged innate immune surveillance. The elevated activated T cell percentages within TILs demonstrate the heightened immune reactions against tumor antigens. However, the parallel expression of regulatory T cells and the co-inhibitory molecule CTLA-4 between TILs and splenocytes hint at potential immune modulation within the tumor [48,49]. Comparatively, the immune profile of the DSL6-A/C1 tumor model exhibits a unique signature that is not commonly observed in other preclinical models, particularly in the context of CD8⁺ T cell infiltration [50]. Especially the relatively high inflammatory effector cells, such as NK cells and CD8⁺ T cells are, in humans, generally associated with longer survival and less aggressive tumor growth [51], which needs to be considered when using this tumor model for immunological studies on PDAC progression. Nevertheless, the balance between effector and regulatory elements within the DSL6-A/C1

model could offer valuable insights into the mechanisms of immune evasion, which are pivotal in the design of immunotherapies [52]. As flow cytometry was used as a method for in-depth characterization of TILs but with a lack of spatial resolution, a pronounced tumor rim location of the immune cells is possible and needs further investigation. Furthermore, the unique genetical characteristics, with a lack of the typical Tp53 and KRAS mutations and properties of both ductal and acinar pancreatic carcinoma, that is described in the literature need to be taken into account when further analyzing the immune signaling of the DSL-6A/C1 PDAC tumor model [44].

Tumors were further characterized with multimodal, multiparametric MRI and PET imaging. On MR scans, tumorous tissue produced clear contrast in multiple MRI parameters, such as an increased contrast on T₁- and T₂-weighted images. The T₁ and T₂ relaxation values are significantly higher compared to the surrounding tissue and in the range reported from other groups analyzing the DSL-6A/C1 tumor model and for other tumors induced in the pancreatic head [53,54]. The T₂-weighted scans also revealed increasing intralesional edema, observable in almost all tumors at later time points, which is a consequence of a central necrosis. The latter is typically observed at the late stages in poorly perfused malignant tumors. In contrast to the typical hypointense human PDAC, DCE MR acquisitions of s.c. DSL-6A/C1 tumors show an increase in contrast agent enhancement at the tumor rim and, in the early stages, within the tumor compared to healthy tissue. A possible explanation is the subcutaneous localization that might contribute to an atypical vascularization pattern, which is divergent from orthotopic tumors. Moreover, a maintained localized inflammatory response could also account for the observed peripheral enhancement in the later stages of tumor progression. These findings need further investigation in future studies but might underscore the importance of tumors' microenvironment and location in mediating vascular dynamics and may have implications for the interpretation of imaging results and the design of therapeutic strategies. However, poorly perfused intralesional areas associated with central necrosis are found in later stages of tumor progression. The relatively dense tumor stroma is also reflected by low k_{trans} values derived from DCE-MR measurements. The k_{trans} values are considerably lower compared to human PDAC [55], but similar compared to other fast-growing murine subcutaneous tumor models [41,43].

PET imaging using ⁶⁸Ga-FAPI tracers demonstrated strong uptake in all tumor tissues, with low off-target uptake of the tracer and urinary excretion. The tracer binds specifically to the FAP protein, which is overexpressed on CAFs. Our histological findings confirm the presence of CAFs in the tumor microenvironment, which may explain the significant uptake of tracers within the tumor, along with the high sensitivity of PET imaging. However, recent studies also showed that FAP can be overexpressed on cancer cells themselves, among others also in human-derived pancreatic cancer cell lines [56–58]. So far, the FAP expression of DSL-6A/C1 has not been investigated, but it will be the topic of a future study. Furthermore, ⁶⁸Ga-FAPI uptake can not only be seen in CAF, but also in non-malignant conditions, such as inflammatory lymph nodes, atherosclerosis, or surgical scars [59]. Nevertheless, the high tracer uptake is described in ⁶⁸Ga-FAPI PET images obtained from human PDAC patients [22,60]. CAFs have been identified as a target in tumor diagnosis and therapy, as they seem to play a key role in various parts of tumor development, such as tumor growth, metastasis formation, and the immune response [61,62]. Clinically, ⁶⁸Ga-FAPI-PET imaging can be used to screen for distant metastases, but also to evaluate therapy efficacy and to optimize staging in the context of therapy planning [22,23].

No local or distant metastases were detected by post-mortem workup of the organs and on ⁶⁸Ga-FAPI-PET. Notably, also no local lymph node metastases were found in the iliac and inguinal stromal areas. However, distant metastases to lymph nodes and the liver have been described in the literature for this tumor model [54], but since these occurred in tumors that grew orthotopically in the pancreas, the reason may be a consequence of our protocol, where tumors were implanted subcutaneously in the hind legs.

Generally, subcutaneous DSL-6A/C1 tumors show a heterogenous growth pattern, with exponential growth after a variable and sometimes relatively long time lag ranging

from 40 to 100 days after implantation. Nevertheless, the average tumor volume of 815 mm³ after 100 days is significantly larger compared to the tumor volumes which can be achieved in mice. This model is therefore particularly advantageous for studying certain physical therapeutic interventions using devices such as radiofrequency applicators or magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound (MR-HIFU) [63]. Furthermore, the slow-growing tumors together with the high uptake of FAP-specific tracers offer the possibility to study different PET tracers in consecutive imaging studies within the same animal. Therefore, less animals are needed for tracer development, and the results are less affected by inter-animal variations or rapid tumor growth, which is often associated with large changes in the uptake pattern.

Limiting factors in terms of the usability of the DSL-6A/C1 model are the frequent formation of intralesional edema in the late stages of tumor growth and the heterogeneous growth pattern, resulting in a relatively unpredictable treatment window for interventional therapies. Also, the subcutaneous models may show differences in their microenvironment and metastasis formation compared to an orthotopic tumor implantation, which has not yet been investigated. In female rats, no tumor growth was observed due to unknown reasons.

5. Conclusions

In summary, we have demonstrated in initial experiments that the DSL-6A/C1 tumor model, particularly due to its high tumorigenicity, ⁶⁸Ga-FAPI sensitivity, and tumor size, is a suitable alternative to established small animal models for many forms of preclinical analysis and therapeutic studies of PDAC.

Author Contributions: Conceptualization, H.G.; methodology, H.G.; software, P.R. and J.L.; validation, P.S., J.L. and P.R.; formal analysis, P.S., P.R., J.L., M.T., H.E. and A.Q.; investigation, P.S., M.S., P.R., J.L., M.T., S.S. and J.J.; resources, P.S., M.S., J.J., S.S., A.Q., M.T., H.A.S., H.E. and T.F.; data curation, P.R. and J.L.; writing—original draft preparation, P.S.; writing—review and editing, all authors; visualization, P.S., J.L., M.T., S.S., H.E., A.Q. and H.A.S.; supervision, H.G. and J.L.; project administration, H.G.; funding acquisition, H.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF), grant number 13GW0364D (“MR-HIFU Pancreas”).

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were conducted in accordance with local institutional guidelines and approved by the LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Northrhine-Westphalia, Germany; protocol code: AZ 81-02.04.2018.A299 and date for the approval: 1 December 2018).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article.

Acknowledgments: We thank SOFIE for providing the [⁶⁸Ga] Ga-FAPI-46 precursor free of charge.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Appendix A

Table A1. List of antibodies used for the immunological analysis of the DSL-6A/C1 tumors.

Antibody	Fluorochrome	Clone	Host	Company	Catalogue
Zombie Aqua				Biologend	423102
CD38	FITC	REA683	Human cell line	Miltenyi	130-110-277
CD3	FITC	REA223	Human cell line	Miltenyi	130-102-678
IgG	PerCp Cy5.5	Poly4054	Goat	Biologend	405424
CD8a	PerCP-Vio 700	REA437	Human cell line	Miltenyi	130-132-092
CD54	PE	1A29	Mouse	Biologend	202405

Table A1. Cont.

Antibody	Fluorochrome	Clone	Host	Company	Catalogue
CD11a	PE	REA596	Human cell line	Miltenyi	130-109-171
CD152 (CTLA4)	PE	WKH203	Mouse	Biologend	203007
CD27	PE Dazzle 594	LG.3A10	Armenian Hamster	Biologend	124228
CD45RA	PE-Cy7	OX-33	Mouse	Biologend	202316
CD161	PE-Vio 770	REA227	Human cell line	Miltenyi	130-102-714
CD86	APC	24F	Mouse	Miltenyi	130-109-130
CD314 (NKG2D)	APC	REA471	Human cell line	Miltenyi	130-106-992
FoxP3	Alexa Fluor 647	150D	Mouse	Biologend	320014
CD45	Alexa Fluor 700	OX-1	Mouse	Biologend	202218
CD4	APC Cy7	W3/25	Mouse	Biologend	201518
CD80	BV421	3H5	Mouse	BD	743863
CD25	BV421	OX-39	Mouse	BD	565608
CD134 (OX40)	BV421	OX-40	Mouse	BD	744815

References

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1941–1953. [\[CrossRef\]](#)
2. Dyba, T.; Randi, G.; Bray, F.; Martos, C.; Giusti, F.; Nicholson, N.; Gavin, A.; Flego, M.; Neamtiu, L.; Dimitrova, N.; et al. The European Cancer Burden in 2020: Incidence and Mortality Estimates for 40 Countries and 25 Major Cancers. *Eur. J. Cancer* **2021**, *157*, 308–347. [\[CrossRef\]](#)
3. Coleman, M.; Forman, D.; Bryant, H.; Butler, J.; Rachet, B.; Maringe, C.; Nur, U.; Tracey, E.; Coory, M.; Hatcher, J.; et al. Cancer Survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995–2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): An Analysis of Population-Based Cancer Registry Data. *Lancet* **2011**, *377*, 127–138. [\[CrossRef\]](#)
4. Wood, L.D.; Canto, M.I.; Jaffee, E.M.; Simeone, D.M. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* **2022**, *163*, 386–402.e1. [\[CrossRef\]](#)
5. Zhang, L.; Sanagapalli, S.; Stoita, A. Challenges in Diagnosis of Pancreatic Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 2047–2060. [\[CrossRef\]](#)
6. Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouché, O.; Guimbaud, R.; Bécouarn, Y.; Adenis, A.; Raoul, J.-L.; Gourgou-Bourgade, S.; de la Fouchardière, C.; et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1817–1825. [\[CrossRef\]](#)
7. Hosein, A.N.; Brekken, R.A.; Maitra, A. Pancreatic Cancer Stroma: An Update on Therapeutic Targeting Strategies. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *17*, 487–505. [\[CrossRef\]](#)
8. Schima, W.; Böhm, G.; Rösch, C.S.; Klaus, A.; Függer, R.; Kopf, H. Mass-Forming Pancreatitis versus Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: CT and MR Imaging for Differentiation. *Cancer Imaging* **2020**, *20*, 52. [\[CrossRef\]](#)
9. Klapman, J.; Malafa, M.P. Early Detection of Pancreatic Cancer: Why, Who, and How to Screen. *Cancer Control* **2008**, *15*, 280–287. [\[CrossRef\]](#)
10. Bronstein, Y.L.; Loyer, E.M.; Kaur, H.; Choi, H.; David, C.; DuBrow, R.A.; Broemeling, L.D.; Cleary, K.R.; Charnsangavej, C. Detection of Small Pancreatic Tumors with Multiphasic Helical CT. *Am. J. Roentgenol.* **2004**, *182*, 619–623. [\[CrossRef\]](#)
11. Prokesch, R.W.; Chow, L.C.; Beaulieu, C.F.; Bammer, R.; Jr, R.B.J. Isoattenuating Pancreatic Adenocarcinoma at Multi-Detector Row CT: Secondary Signs. *Radiology* **2002**, *224*, 764–768. [\[CrossRef\]](#)
12. Kayal, N.E.; Lennartz, S.; Ekdawi, S.; Holz, J.; Slebocki, K.; Haneder, S.; Wybranski, C.; Mohallel, A.; Eid, M.; Grull, H.; et al. Value of Spectral Detector Computed Tomography for Assessment of Pancreatic Lesions. *Eur. J. Radiol.* **2019**, *118*, 215–222. [\[CrossRef\]](#)
13. Beall, P.T.; Asch, B.B.; Chang, D.C.; Medina, D.; Hazlewood, C.F. Distinction of Normal, Preneoplastic, and Neoplastic Mouse Mammary Primary Cell Cultures by Water Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Times. *J. Natl. Cancer Inst.* **1980**, *64*, 335–338. [\[CrossRef\]](#)
14. Gambarota, G.; Veltien, A.; van Laarhoven, H.; Philippens, M.; Jonker, A.; Mook, O.R.; Frederiks, W.M.; Heerschap, A. Measurements of T1 and T2 Relaxation Times of Colon Cancer Metastases in Rat Liver at 7 T. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **2004**, *17*, 281–287. [\[CrossRef\]](#)
15. Ravoori, M.K.; Nishimura, M.; Singh, S.P.; Lu, C.; Han, L.; Hobbs, B.P.; Pradeep, S.; Choi, H.J.; Bankson, J.A.; Sood, A.K.; et al. Tumor T1 Relaxation Time for Assessing Response to Bevacizumab Anti-Angiogenic Therapy in a Mouse Ovarian Cancer Model. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131095. [\[CrossRef\]](#)

16. Muraoka, N.; Uematsu, H.; Kimura, H.; Imamura, Y.; Fujiwara, Y.; Murakami, M.; Yamaguchi, A.; Itoh, H. Apparent Diffusion Coefficient in Pancreatic Cancer: Characterization and Histopathological Correlations. *J. Magn. Reson. Imaging* **2008**, *27*, 1302–1308. [[CrossRef](#)]
17. Karaosmanoglu, A.D.; Onur, M.R.; Ozmen, M.N.; Akata, D.; Karcaaltincaba, M. Magnetic Resonance Imaging of Liver Metastasis. *Semin. Ultrasound Ct Mri* **2016**, *37*, 533–548. [[CrossRef](#)]
18. Nguyen, H.T.; Jia, G.; Shah, Z.K.; Pohar, K.; Mortazavi, A.; Zynger, D.L.; Wei, L.; Yang, X.; Clark, D.; Knopp, M.V. Prediction of Chemotherapeutic Response in Bladder Cancer Using K-means Clustering of Dynamic Contrast-enhanced (DCE)-MRI Pharmacokinetic Parameters. *J. Magn. Reson. Imaging* **2015**, *41*, 1374–1382. [[CrossRef](#)]
19. Hectors, S.J.C.G.; Jacobs, I.; Moonen, C.T.W.; Strijkers, G.J.; Nicolay, K. MRI Methods for the Evaluation of High Intensity Focused Ultrasound Tumor Treatment: Current Status and Future Needs. *Magn. Reson. Med.* **2016**, *75*, 302–317. [[CrossRef](#)]
20. Chen, Y.; McAndrews, K.M.; Kalluri, R. Clinical and Therapeutic Relevance of Cancer-Associated Fibroblasts. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, *18*, 792–804. [[CrossRef](#)]
21. Orimo, A.; Gupta, P.B.; Sgroi, D.C.; Arenzana-Seisdedos, F.; Delaunay, T.; Naeem, R.; Carey, V.J.; Richardson, A.L.; Weinberg, R.A. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* **2005**, *121*, 335–348. [[CrossRef](#)]
22. Röhrich, M.; Naumann, P.; Giesel, F.L.; Choyke, P.L.; Staudinger, F.; Wefers, A.; Liew, D.P.; Kratochwil, C.; Rathke, H.; Liermann, J.; et al. Impact of 68Ga-FAPI PET/CT Imaging on the Therapeutic Management of Primary and Recurrent Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *J. Nucl. Med.* **2021**, *62*, 779–786. [[CrossRef](#)]
23. Zhang, Z.; Jia, G.; Pan, G.; Cao, K.; Yang, Q.; Meng, H.; Yang, J.; Zhang, L.; Wang, T.; Cheng, C.; et al. Comparison of the Diagnostic Efficacy of 68 Ga-FAPI-04 PET/MR and 18F-FDG PET/CT in Patients with Pancreatic Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2022**, *49*, 2877–2888. [[CrossRef](#)]
24. Hingorani, S.R.; Wang, L.; Multani, A.S.; Combs, C.; Deramaudt, T.B.; Hruban, R.H.; Rustgi, A.K.; Chang, S.; Tuveson, D.A. Trp53R172H and KrasG12D Cooperate to Promote Chromosomal Instability and Widely Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 469–483. [[CrossRef](#)]
25. Pham, T.N.D.; Shields, M.A.; Spaulding, C.; Principe, D.R.; Li, B.; Underwood, P.W.; Trevino, J.G.; Bentrem, D.J.; Munshi, H.G. Preclinical Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Utility in Immunotherapy Studies. *Cancers* **2021**, *13*, 440. [[CrossRef](#)]
26. Lee, J.W.; Komar, C.A.; Bengsch, F.; Graham, K.; Beatty, G.L. Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Cancer: The KPC Model (LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+;Pdx-1-Cre), Its Variants, and Their Application in Immuno-oncology Drug Discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2016**, *73*, 14.39.1–14.39.20. [[CrossRef](#)]
27. Suklabaidya, S.; Dash, P.; Das, B.; Suresh, V.; Sasmal, P.K.; Senapati, S. Experimental Models of Pancreatic Cancer Desmoplasia. *Lab. Investig.* **2018**, *98*, 27–40. [[CrossRef](#)]
28. Rubio-Viqueira, B.; Jimeno, A.; Cusatis, G.; Zhang, X.; Iacobuzio-Donahue, C.; Karikari, C.; Shi, C.; Danenberg, K.; Danenberg, P.V.; Kuramochi, H.; et al. An In Vivo Platform for Translational Drug Development in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 4652–4661. [[CrossRef](#)]
29. Garrido-Laguna, I.; Uson, M.; Rajeshkumar, N.V.; Tan, A.C.; de Oliveira, E.; Karikari, C.; Villaroel, M.C.; Salomon, A.; Taylor, G.; Sharma, R.; et al. Tumor Engraftment in Nude Mice and Enrichment in Stroma- Related Gene Pathways Predict Poor Survival and Resistance to Gemcitabine in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 5793–5800. [[CrossRef](#)]
30. Hidalgo, M.; Amant, F.; Biankin, A.V.; Budinská, E.; Byrne, A.T.; Caldas, C.; Clarke, R.B.; de Jong, S.; Jonkers, J.; Mælandsmo, G.M.; et al. Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 998–1013. [[CrossRef](#)]
31. Partecke, L.I.; Sandler, M.; Kaeding, A.; Weiss, F.U.; Mayerle, J.; Dummer, A.; Nguyen, T.D.; Albers, N.; Speerforck, S.; Lerch, M.M.; et al. A Syngeneic Orthotopic Murine Model of Pancreatic Adenocarcinoma in the C57/BL6 Mouse Using the Panc02 and 6606PDA Cell Lines. *Eur. Surg. Res.* **2011**, *47*, 98–107. [[CrossRef](#)]
32. Pour, P.; Wallcave, L.; Gingell, R.; Nagel, D.; Lawson, T.; Salmasi, S.; Tines, S. Carcinogenic Effect of N-Nitroso(2-Hydroxypropyl)(2-Oxopropyl)amine, a Postulated Proximate Pancreatic Carcinogen in Syrian Hamsters. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 3828–3833.
33. Pettengill, O.S.; Faris, R.A.; Bell, R.H.; Kuhlmann, E.T.; Longnecker, D.S. Derivation of Ductlike Cell Lines from a Transplantable Acinar Cell Carcinoma of the Rat Pancreas. *Am. J. Pathol.* **1993**, *143*, 292–303.
34. Yushkevich, P.A.; Piven, J.; Hazlett, H.C.; Smith, R.G.; Ho, S.; Gee, J.C.; Gerig, G. User-Guided 3D Active Contour Segmentation of Anatomical Structures: Significantly Improved Efficiency and Reliability. *Neuroimage* **2006**, *31*, 1116–1128. [[CrossRef](#)]
35. Look, D.C.; Locker, D.R. Time Saving in Measurement of NMR and EPR Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.* **1970**, *41*, 250–251. [[CrossRef](#)]
36. Deichmann, R.; Haase, A. Quantification of T1 Values by SNAPSHOT-FLASH NMR Imaging. *J. Magnetic Reson. (1969)* **1992**, *96*, 608–612. [[CrossRef](#)]
37. Barnes, S.R.; Ng, T.S.C.; Santa-Maria, N.; Montagne, A.; Zlokovic, B.V.; Jacobs, R.E. ROCKETSHIP: A Flexible and Modular Software Tool for the Planning, Processing and Analysis of Dynamic MRI Studies. *BMC Med. Imaging* **2015**, *15*, 19. [[CrossRef](#)]
38. Mäkinen, K.; Loimas, S.; Kosma, V.-M.; Wahlfors, J.; Pettengill, O.S.; Longnecker, D.S.; Johansson, R.; Alhava, E. Azaserine-Induced Rat Pancreas Tumor Model with Transplantable Cultured Cells. *Pancreas* **1998**, *16*, 160–164. [[CrossRef](#)]

39. Vohra, R.; Park, J.; Wang, Y.-N.; Gravelle, K.; Whang, S.; Hwang, J.-H.; Lee, D. Evaluation of Pancreatic Tumor Development in KPC Mice Using Multi-Parametric MRI. *Cancer Imaging* **2018**, *18*, 41. [[CrossRef](#)]
40. Maloney, E.; Wang, Y.-N.; Vohra, R.; Son, H.; Whang, S.; Khokhlova, T.; Park, J.; Gravelle, K.; Totten, S.; Hwang, J.H.; et al. Magnetic Resonance Imaging Biomarkers for Pulsed Focused Ultrasound Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2020**, *26*, 904–917. [[CrossRef](#)]
41. Wegner, C.S.; Hauge, A.; Gaustad, J.-V.; Andersen, L.M.K.; Simonsen, T.G.; Galappathi, K.; Rofstad, E.K. Dynamic Contrast-Enhanced MRI of the Microenvironment of Pancreatic Adenocarcinoma Xenografts. *Acta Oncol.* **2017**, *56*, 1754–1762. [[CrossRef](#)]
42. Cao, J.; Pickup, S.; Clendenin, C.; Blouw, B.; Choi, H.; Kang, D.; Rosen, M.; O'Dwyer, P.J.; Zhou, R. Dynamic Contrast-Enhanced MRI Detects Responses to Stroma-Directed Therapy in Mouse Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 2314–2322. [[CrossRef](#)]
43. Kim, H.; Samuel, S.; Totenhagen, J.W.; Warren, M.; Sellers, J.C.; Buchsbaum, D.J. Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging of an Orthotopic Pancreatic Cancer Mouse Model. *J. Vis. Exp.* **2015**, *98*, e52641. [[CrossRef](#)]
44. Foley, J.F.; Phadke, D.P.; Hardy, O.; Hardy, S.; Miller, V.; Madan, A.; Howard, K.; Kruse, K.; Lord, C.; Ramaiahgari, S.; et al. Whole Exome Sequencing in the Rat. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 487. [[CrossRef](#)]
45. Majumder, K.; Arora, N.; Modi, S.; Chugh, R.; Nomura, A.; Giri, B.; Dawra, R.; Ramakrishnan, S.; Banerjee, S.; Saluja, A.; et al. A Novel Immunocompetent Mouse Model of Pancreatic Cancer with Robust Stroma: A Valuable Tool for Preclinical Evaluation of New Therapies. *J. Gastrointest. Surg.* **2016**, *20*, 53–65. [[CrossRef](#)]
46. Ino, Y.; Yamazaki-Itoh, R.; Shimada, K.; Iwasaki, M.; Kosuge, T.; Kanai, Y.; Hiraoka, N. Immune Cell Infiltration as an Indicator of the Immune Microenvironment of Pancreatic Cancer. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 914–923. [[CrossRef](#)]
47. Goulart, M.R.; Stasinou, K.; Fincham, R.E.A.; Delvecchio, F.R.; Kocher, H.M. T Cells in Pancreatic Cancer Stroma. *World J. Gastroenterol.* **2021**, *27*, 7956–7968. [[CrossRef](#)]
48. Foucher, E.D.; Ghigo, C.; Chouaib, S.; Galon, J.; Iovanna, J.; Olive, D. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Strong Imbalance of Good and Bad Immunological Cops in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1044. [[CrossRef](#)]
49. Anandappa, A.J.; Wu, C.J.; Ott, P.A. Directing Traffic: How to Effectively Drive T Cells into Tumors. *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 185–197. [[CrossRef](#)]
50. Picard, F.S.R.; Lutz, V.; Brichkina, A.; Neuhaus, F.; Ruckenbrod, T.; Hupfer, A.; Raifer, H.; Klein, M.; Bopp, T.; Pfefferle, P.I.; et al. IL-17A-Producing CD8+ T Cells Promote PDAC via Induction of Inflammatory Cancer-Associated Fibroblasts. *Gut* **2023**, *72*, 1510–1522. [[CrossRef](#)]
51. Muller, M.; Haghnejad, V.; Schaefer, M.; Gauchotte, G.; Caron, B.; Peyrin-Biroulet, L.; Bronowicki, J.-P.; Neuzillet, C.; Lopez, A. The Immune Landscape of Human Pancreatic Ductal Carcinoma: Key Players, Clinical Implications, and Challenges. *Cancers* **2022**, *14*, 995. [[CrossRef](#)]
52. Hu, Z.I.; O'Reilly, E.M. Therapeutic Developments in Pancreatic Cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2024**, *21*, 7–24. [[CrossRef](#)]
53. Yin, T.; Peeters, R.; Feng, Y.; Liu, Y.; Yu, J.; Dymarkowski, S.; Himmelreich, U.; Oyen, R.; Ni, Y. Characterization of a Rat Orthotopic Pancreatic Head Tumor Model Using Three-dimensional and Quantitative Multi-parametric MRI. *NMR Biomed.* **2017**, *30*, e3676. [[CrossRef](#)]
54. Zhang, Z.; Zheng, L.; Li, W.; Gordon, A.C.; Huan, Y.; Shanguan, J.; Procissi, D.; Bentrem, D.J.; Larson, A.C. Quantitative Functional MRI in a Clinical Orthotopic Model of Pancreatic Cancer in Immunocompetent Lewis Rats. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 1475–1486.
55. Klaassen, R.; Steins, A.; Gurney-Champion, O.J.; Bijlsma, M.F.; Tienhoven, G.; Engelbrecht, M.R.W.; Eijck, C.H.J.; Suker, M.; Wilmsink, J.W.; Besselink, M.G.; et al. Pathological Validation and Prognostic Potential of Quantitative MRI in the Characterization of Pancreas Cancer: Preliminary Experience. *Mol. Oncol.* **2020**, *14*, 2176–2189. [[CrossRef](#)]
56. Antonova, D.V.; Gnatenko, D.A.; Kotova, E.S.; Pleshkan, V.V.; Kuzmich, A.I.; Didych, D.A.; Sverdlov, E.D.; Alekseenko, I.V. Cell-Specific Expression of the FAP Gene Is Regulated by Enhancer Elements. *Front. Mol. Biosci.* **2023**, *10*, 1111511. [[CrossRef](#)]
57. Xin, L.; Gao, J.; Zheng, Z.; Chen, Y.; Lv, S.; Zhao, Z.; Yu, C.; Yang, X.; Zhang, R. Fibroblast Activation Protein- α as a Target in the Bench-to-Bedside Diagnosis and Treatment of Tumors: A Narrative Review. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 648187. [[CrossRef](#)]
58. Shi, M.; Yu, D.-H.; Chen, Y.; Zhao, C.-Y.; Zhang, J.; Liu, Q.-H.; Ni, C.-R.; Zhu, M.-H. Expression of Fibroblast Activation Protein in Human Pancreatic Adenocarcinoma and Its Clinicopathological Significance. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 840–846. [[CrossRef](#)]
59. Qi, N.; Wang, H.; Wang, H.; Ren, S.; You, Z.; Chen, X.; Guan, Y.; Xie, F.; Hua, F.; Zhao, J. Non-Tumoral Uptake of ^{68}Ga -FAPI-04 PET: A Retrospective Study. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 989595. [[CrossRef](#)]
60. Guberina, N.; Kessler, L.; Pöttgen, C.; Guberina, M.; Metzenmacher, M.; Herrmann, K.; Mucha, M.; Rischpler, C.; Indenkampen, F.; Siveke, J.T.; et al. [^{68}Ga]FAPI-PET/CT for Radiation Therapy Planning in Biliary Tract, Pancreatic Ductal Adeno-, and Adenoidcystic Carcinomas. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 16261. [[CrossRef](#)]
61. Mao, X.; Xu, J.; Wang, W.; Liang, C.; Hua, J.; Liu, J.; Zhang, B.; Meng, Q.; Yu, X.; Shi, S. Crosstalk between Cancer-Associated Fibroblasts and Immune Cells in the Tumor Microenvironment: New Findings and Future Perspectives. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 131. [[CrossRef](#)]

62. von Ahrens, D.; Bhagat, T.D.; Nagrath, D.; Maitra, A.; Verma, A. The Role of Stromal Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 76. [[CrossRef](#)]
63. Hendricks-Wenger, A.; Sereno, J.; Gannon, J.; Zeher, A.; Brock, R.M.; Beitel-White, N.; Simon, A.; Davalos, R.V.; Coutermarsh-Ott, S.; Vlaisavljevich, E.; et al. Histotripsy Ablation Alters the Tumor Microenvironment and Promotes Immune System Activation in a Subcutaneous Model of Pancreatic Cancer. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2021**, *68*, 2987–3000. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4. Diskussion

4.1. Ergebnisdiskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das DSL-6A/C1 Tumormodell, trotz seines azinären Ursprungs und der in der Literatur beschriebenen genetischen Merkmale eines azinären Pankreaskarzinoms, diverse Merkmale duktaler Pankreaskarzinome zeigt ⁶⁴. Histologisch konnten wir hierbei das Vorkommen dicht liegender, atypisch geformter Tumorzellen zeigen sowie das Vorliegen von CAF, welche jedoch in geringerer Dichte vorliegen als in einigen PDAC-Tumormodellen in der Maus ^{54,69}. In der Histologie zeigte sich in den subkutanen Tumoren insgesamt ein verdrängendes Wachstumsverhalten mit leichter Infiltration des umgebenden Muskelgewebes. Für orthotop wachsende Tumore wurde in früheren Studien dagegen eine stärkere Infiltration des umliegenden Pankreasgewebes beobachtet, die mehr der humanen Situation ähnelt ⁶⁶. Unsere Ergebnisse sind hierbei vergleichbar mit ähnlichen Studien in einem Pankreasmodell in der Maus, die subkutane und orthotop wachsende Pankreaskarzinome studiert haben ⁷⁰.

Im Rahmen der immunologischen Analyse konnten wir ein erhöhtes Vorkommen von CD8⁺ Zellen nachweisen, was ein Hinweis für eine erhaltene Immunantwort gegen die Tumorzellen zeigen könnte und, insbesondere im Menschen, einen Indikator für ein verbessertes Überleben in Pankreaskarzinompatienten darstellt ⁷¹. Weiterhin zeigt sich ein reduziertes Vorkommen von CD-4⁺ und B-Zellen, welches auf eine herabgesetzte humorale Immunantwort deutet ⁷². Insgesamt zeigt das DSL-6A/C1 Tumormodell ein einzigartiges Immunprofil, welches in weiterführenden Studien analysiert werden sollte, insbesondere hinsichtlich der Ortsauflösung der einzelnen Immunzellen, da wir hier die Durchflusszytometrie als Analysemethode verwendet haben, die zwar eine detaillierte Aufschlüsselung der einzelnen Immunzellen ermöglicht, jedoch keine Möglichkeit der Ortsauflösung bietet.

Die Tumorigenität lag mit 80% leicht unterhalb der in der Literatur beschriebenen Tumor-Formierungsrate für dieses Tumormodell ⁶⁵. Interessanterweise konnten wir kein Tumorstadium in weiblichen Ratten feststellen, was die Frage nach geschlechtsspezifischen Wachstumsfaktoren für das DSL-6A/C1 Modell nahelegt. Das Wachstumsverhalten der Pankreastumore zeigt ein sehr heterogenes Verhalten. Im Rahmen unserer Studie konnten wir beobachten, dass generell alle Tumore nach einem gewissen Zeitintervall ein exponentielles Wachstum zeigten, jedoch der Beginn dieser Phase in einem Zeitraum zwischen 40 bis 100 Tagen nach Tumorinduktion sehr variabel ist. Dies macht die Planung für eine entsprechende Studie anhand dieses Tumormodelles entsprechend herausfordernd, da

eine hohe Flexibilität des Studienteams notwendig ist. Hier zeigen andere Tumormodelle in der Maus ein deutlich homogeneres und vorhersehbareres Wachstumsverhalten ⁷³.

Darüber hinaus wurden die Tumore mittels MRT multimodal charakterisiert. Hier zeigt sich im Frühstadium des Tumorwachstums eine flächige, vermehrte Kontrastmittelmehraufnahme im Vergleich zum umliegenden Gewebe, im Gegensatz zum eher minderperfundierten humanen PDAC ⁷⁴. Eine mögliche Erklärung ist hier, dass wir die Tumore subkutan implantiert haben, was eine im Vergleich zur orthotopen, intraabdominellen Lage, differentes Vaskularisierungsprofil zur Folge haben könnte. Ferner kann eine Ursache der vermehrten, in späten Tumorstadien zunehmend randständigen Kontrastmittelaufnahme sein, dass insbesondere im Randbereich gegen den Tumor gerichtete immunologische Reaktionen ablaufen könnten, worauf auch die von uns nachgewiesenen Immunzellen hindeuten. Im Zentralbereich der Tumore zeigt sich in fortgeschrittenen Tumorstadien eine zunehmende zentrale Nekrose, wie dies auch zum Teil in Maus basierten Pankreaskarzinommodellen beschrieben wird ⁷⁰. Hierzu korrelierend sehen wir in den zentralen Tumoranteilen einen zunehmenden Anstieg des T₂-Signals als Hinweis auf eine zunehmende zentrale Liquifizierung des Tumorgewebes, möglicherweise im Rahmen der fortschreitenden zentralen Nekrotisierung ⁷⁵.

In der PET-Bildgebung nutzten wir ⁶⁸Ga-FAPI, welches spezifisch an das FAP-Protein bindet, das vor allem in CAF überexprimiert wird. Korrelierend zum histologisch beschriebenen Nachweis von CAF im Tumorgewebe, zeigte sich eine sehr starke Traceraufnahme der subkutanen Tumore in den vitalen Tumorarealen als Hinweis auf eine hohe CAF-Dichte. Jedoch ist hier auch zu erwähnen, dass einige neuere Studien zeigen, dass neben CAF auch Tumorzellen selbst FAP exprimieren können ⁷⁶⁻⁷⁸. Darüber hinaus kann eine ⁶⁸Ga-FAPI Traceraufnahme auch bei einigen nicht malignen Erkrankungen, wie entzündete Lymphknoten, Artherosklerose oder OP-Narben auftreten ⁷⁹. Da die in unserer Studie beobachtete Traceraufnahme anatomisch nicht zu inflammatorischen Lymphknoten oder Artherosklerose passt und der operative Eingriff am Tag der PET-Aufnahme mehr als 2 Monate zurück lag ist eine nicht maligne Genese der starken ⁶⁸Ga-FAPI Aufnahme jedoch unwahrscheinlich. Im Rahmen der Bildgebungen und der Gewebeaufarbeitung nach Euthanasie konnten keine lokalen Tumorabsiedelungen oder Fernmetastasen beobachtet werden. Für dieses Tumormodell sind jedoch Fernmetastasen in Lymphknoten und Leber in der Literatur beschrieben, welche jedoch bei Tumoren auftraten, die orthotop im Pankreas gewachsen sind, sodass hier die Lokalisation eine maßgebliche Rolle zu spielen scheint ⁸⁰.

Die subkutanen DSL-6A/C1-Tumoren zeichnen sich durch ein vielfältiges Wachstumsmuster aus, wobei nach einer variierenden und teils beträchtlich langen Lag-phase, die 40 bis 100 Tage nach der Implantation beträgt, ein exponentielles Wachstum eintritt. Nichtsdestotrotz erreicht das durchschnittliche Tumolvolumen von 815 mm³ nach 100 Tagen ein signifikant größeres Volumen im Vergleich zu den Tumorgrößen, die in Mäusen erzielt werden können. Daher erweist sich dieses Modell als besonders vorteilhaft für die Untersuchung bestimmter Therapieansätze des Pankreaskarzinoms, die Geräte wie Radiofrequenzapplikatoren oder magnetresonanzgeführte hochintensive fokussierte Ultraschallbehandlungen (MR-HIFU) nutzen mit der Möglichkeit hier die selben Geräte zu verwenden, die auch an Menschen genutzt werden⁸¹⁻⁸³. Weiterhin bieten die langsam wachsenden Tumore in Verbindung mit der hohen Aufnahme von FAP-spezifischen Tracern die Möglichkeit, unterschiedliche PET-Tracer in aufeinanderfolgenden bildgebenden Untersuchungen innerhalb desselben Tieres zu studieren unter Beachtung der entsprechenden Halbwertszeiten. So werden weniger Tiere für die Entwicklung von Tracern benötigt, und die Resultate sind weniger durch interindividuelle Unterschiede oder rasches Tumorwachstum beeinflusst, das oft mit umfassenden Veränderungen im Aufnahmemuster einhergeht.

Einschränkende Faktoren bezüglich der Anwendbarkeit des DSL-6A/C1-Modells sind die häufige Entstehung von intraläsionalen Ödemen in späten Wachstumsphasen des Tumors und das insgesamt heterogene Wachstumsmuster, was zu einem relativ unvorhersehbaren Behandlungszeitraum für interventionelle Therapien führt. Zudem können subkutane Tumormodelle Unterschiede in ihrem Mikromilieu und im Metastasierungsverhalten im Vergleich zu einer orthotopen Tumorimplantation aufweisen, was in weiterführenden Studien untersucht werden sollte.

4.2. Methodendiskussion

Die Methodik dieser Arbeit wurde sorgfältig ausgewählt, um eine detaillierte und multiparametrische Charakterisierung des DSL-6A/C1 Tumormodells zu ermöglichen. Durch die Kombination verschiedener analytischer Ansätze konnten wir eine umfassende Bewertung des Tumormodells hinsichtlich seiner morphologischen, immunologischen und molekularen Eigenschaften vornehmen.

Das DSL-6A/C1 Tumormodell eignet sich grundsätzlich für eine Vielzahl von weiterführenden PDAC basierten Studien und die subkutane Implantation der Tumore ermöglicht es, lokale Therapien auf ihre Effektivität zu testen. Dennoch besitzt die subkutane Implantation von Tumoren auch gewisse Limitationen. Im Rahmen dieser Studie stellten wir beispielsweise fest, dass die Metastasierungsrate im Vergleich zu orthotop platzierten Tumoren deutlich geringer

zu sein scheint⁸⁰. Darüber hinaus sind Unterschiede im Wachstumsverhalten, Infiltration des umliegenden Gewebes und im Mikromilieu des Tumorgewebes möglich, beispielsweise in Hinblick auf die Anzahl der CAF, die im Rahmen dieser Studie nicht mit der orthotopen Tumorgenerierung verglichen wurde.

Die exklusive Nutzung von männlichen Lewis-Ratten stellt ebenfalls eine Beschränkung dar, da geschlechtsspezifische Unterschiede in der Tumorbehandlung zunehmend eine Rolle spielen^{84,85}. In dieser Studie wurde initial versucht, Tumore in weiblichen Lewis-Ratten zu induzieren, was jedoch nicht erfolgreich war. Dies weist auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin, die in weiteren Studien erforscht werden sollten, um das Modell vollständig zu verstehen und die Anwendbarkeit gegebenenfalls zu erweitern.

Die Verwendung der multiparametrischen MRT-Bildgebung ermöglichte es, dynamische Veränderungen innerhalb der Tumormikroumgebung zu visualisieren, insbesondere im Hinblick auf die Nekroseentwicklung und Kontrastmittelverteilung. Hierbei können neben den von uns genutzten Sequenzen natürlich noch eine Vielzahl weiterer Bildsequenzen genutzt werden, um bestimmte Eigenschaften eines Karzinoms zu charakterisieren und wir haben mit dem von uns erstellten Protokoll nur eine Grundlage schaffen können. Darüber hinaus kann die MR-Bildgebung auch als Möglichkeit dienen für weitere Forschungsprojekte, wie beispielsweise im Rahmen einer automatisierten Volumetrie vor und nach Tumorbehandlung mittels deep learning⁸⁶.

Die Anwendung der PET-CT unter Verwendung von ⁶⁸Ga-FAPI als Tracer hat sich als aussagekräftig für die Visualisierung der Tumore erwiesen. Die hohe Affinität des Tracers zu FAP, einem Protein, das hauptsächlich in CAFs überexprimiert wird, weist auf eine hohe Dichte dieser Fibroblasten im Tumormilieu hin. Jedoch ist hier zu beachten, dass der Einsatz von ⁶⁸Ga-FAPI trotz seiner hohen Spezifität für CAFs durch die Expression von FAP in verschiedenen Zelltypen und unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen auch Limitationen aufweist. Insbesondere die Tatsache, dass FAP in einigen Studien auch in Tumorzellen und in Geweben unter inflammatorischen Bedingungen nachgewiesen wurde, unterstreicht die Notwendigkeit einer sorgfältigen Interpretation der PET/CT-Daten. Zukünftige Studien sollten daher die Spezifität von ⁶⁸Ga-FAPI weiter evaluieren, um die diagnostische Genauigkeit dieser Methode zu verbessern und mögliche Überschneidungen mit anderen pathologischen Prozessen klarer abzugrenzen.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der immunologischen Analyse, die ein einzigartiges Immunprofil des Tumormodells offenbarte. Hier konnten wir gleichzeitig die Präsenz von

immunsuppressiven und immunsupportiven Zellen nachweisen. Da wir zur umfassenden Klassifizierung hierfür die Durchflusszytometrie verwendet haben und diese zum Nachweis eine Suspensionslösung des Tumorgewebes benötigt, fehlt bei dieser Methode die räumliche Auflösung der Immunzellen. Hierdurch haben wir zwar eine umfassendere Analyse der Immunzellen dargelegt, ob diese sich jedoch auf bestimmte Areale innerhalb des Tumors, wie beispielsweise an den Tumorrändern, konzentrieren, muss in weitführenden Studien analysiert werden.

Abschließend haben wir aufgezeigt, dass das DSL-6A/C1 Tumormodell trotz einiger Einschränkungen wertvolle Einblicke für präklinische Studien bietet. Zukünftige Forschungen werden die Vielzahl der von uns erhobenen Charakterisierungsparameter weiter vertiefen sowie diese als Grundlage für Therapiestudien nutzen. Somit hoffen wir, dass die Erkenntnisse aus dieser Arbeit den Grundstein für weiterführenden Studien legen und zu einem besseren Verständnis des Pankreaskarzinoms beitragen, was letztlich zu verbesserten Therapieansätzen führen wird.

4.3. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend liefert diese Dissertation wertvolle Erkenntnisse über das DSL-6A/C1 Tumormodell, die für die Weiterentwicklung präklinischer Modelle und die Verbesserung therapeutischer Strategien gegen das Pankreaskarzinom bedeutsam sind. Die multimodale Charakterisierung des Tumormodells hat tiefgehende Einblicke in die Tumormikroumgebung und das immunologische Profil geliefert, welche die Grundlage für die zukünftige Entwicklung gezielter Therapien bilden könnten. Angesichts der Tatsache, dass Pankreaskarzinome eine der größten Herausforderungen in der onkologischen Medizin darstellen, ist das Potenzial für die Anwendung dieser Forschungsergebnisse beträchtlich. Zukünftige Arbeiten sollten sich auf die Überwindung der in dieser Arbeit identifizierten methodischen Einschränkungen konzentrieren und dabei die Reproduzierbarkeit und Vorhersagbarkeit der Modelle verbessern. Darüber hinaus wäre es wichtig, die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Tumorwachstum weiter zu erforschen und zu verstehen, wie diese Informationen zur Personalisierung von Therapieansätzen genutzt werden können. Das hier charakterisierte Tumormodell stellt einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen dar, die letztlich das Ziel haben, die Überlebensraten und Lebensqualität von Patienten mit Pankreaskarzinom zu verbessern.

5. Literaturverzeichnis

1 RKI. Krebsdaten in Deutschland 2023.

https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2023/kid_2023_c25_bauchspeicheldruese.pdf?__blob=publicationFile (zuletzt abgerufen am 21.02.2024).

2 Bengtsson A, Andersson R, Ansari D. The actual 5-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma based on real-world data. *Sci Rep* 2020; **10**: 16425.

3 Dyba T, Randi G, Bray F, *et al.* The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *Eur J Cancer* 2021; **157**: 308–47.

4 Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Arch Surg* 2008; **393**: 535–45.

5 Michalak N, Małecka-Wojcieszko E. Modifiable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Risk Factors. *J Clin Med* 2023; **12**: 4318.

6 Poggetto ED, Ho I-L, Balestrieri C, *et al.* Epithelial memory of inflammation limits tissue damage while promoting pancreatic tumorigenesis. *Science* 2021; **373**: eabj0486.

7 Wan L, Lin K-T, Rahman MA, *et al.* Splicing Factor SRSF1 Promotes Pancreatitis and KRASG12D-Mediated Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* 2023; **13**: 1678–95.

8 Fund WCR. Pancreatic Cancer Statistics. 2015. <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/pancreatic-cancer-statistics>.

9 Sun Y, He X, Sun Y. Red and processed meat and pancreatic cancer risk: a meta-analysis. *Front Nutr* 2023; **10**: 1249407.

10 Midha S, Chawla S, Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett* 2016; **381**: 269–77.

11 Dong M, Cioffi G, Wang J, *et al.* Sex Differences in Cancer Incidence and Survival: A Pan-Cancer Analysis. *Cancer Epidemiology, Biomark Prev* 2020; **29**: 1389–97.

12 Scarlett CJ, Salisbury EL, Biankin AV, Kench J. Precursor lesions in pancreatic cancer: morphological and molecular pathology. *Pathology* 2011; **43**: 183–200.

13 Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2016; **144**: 241–75.

14 Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2021; **48**: 10–8.

15 Gu M, Sun J, Zhang S, *et al.* A novel methylation signature predicts inferior outcome of patients with PDAC. *Aging (Albany NY)* 2021; **13**: 2851–63.

16 Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, *et al.* Stat3/Socs3 Activation by IL-6 Transsignaling Promotes Progression of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Development of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 2011; **19**: 456–69.

- 17 Geng X, Chen H, Zhao L, *et al.* Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**: 655152.
- 18 Francescone R, Vendramini-Costa DB, Franco-Barraza J, *et al.* Netrin G1 promotes pancreatic tumorigenesis through cancer associated fibroblast driven nutritional support and immunosuppression. *bioRxiv* 2020; : 330209.
- 19 Catenacci DVT, Junttila MR, Karrison T, *et al.* Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 4284–92.
- 20 Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer J Clin* 2021; **71**: 7–33.
- 21 Institute NC. Cancer stat facts: pancreatic cancer. 2021. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>. (zuletzt abgerufen am 03.04.2024)
- 22 Hur C, Tramontano AC, Dowling EC, *et al.* Early Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Survival Is Dependent on Size: Positive Implications for Future Targeted Screening. *Pancreas* 2016; **45**: 1062–6.
- 23 Online A. S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. 2021. https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-010OLk_Exokrines-Pankreaskarzinom_2022-01.pdf.
- 24 Mergo PJ, Helmberger TK, Buetow PC, Helmberger RC, Ros PR. Pancreatic neoplasms: MR imaging and pathologic correlation. *Radiographics* 1997; **17**: 281–301.
- 25 Daamen LA, Groot VP, Goense L, *et al.* The diagnostic performance of CT versus FDG PET-CT for the detection of recurrent pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol* 2018; **106**: 128–36.
- 26 Rahman WT, Wale DJ, Viglianti BL, *et al.* The impact of infection and inflammation in oncologic 18F-FDG PET/CT imaging. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2019; **117**: 109168–109168.
- 27 Liu Q, Shi S, Liu S, *et al.* The added value of [68Ga]Ga-DOTA-FAPI-04 PET/CT in pancreatic cancer: a comparison to [18F]F-FDG. *Eur Radiol* 2023; **33**: 5007–16.
- 28 Liu Y, Watabe T, Kaneda-Nakashima K, *et al.* Fibroblast activation protein targeted therapy using [177Lu]FAPI-46 compared with [225Ac]FAPI-46 in a pancreatic cancer model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2022; **49**: 871–80.
- 29 Søreide K. Neoadjuvant and Adjuvant Therapy in Operable Pancreatic Cancer: Both Honey and Milk (but No Bread?). *Oncol Ther* 2021; **9**: 1–12.
- 30 Labori KJ, Bratlie SO, Andersson B, *et al.* Neoadjuvant FOLFIRINOX versus upfront surgery for resectable pancreatic head cancer (NORPACT-1): a multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2024; **9**: 205–17.
- 31 Bébarová L, Skalický P, Klos D, *et al.* [The survival of patients with radically non-resectable pancreatic cancer]. *Rozhl v Chir : mesicnik Ceskoslovenske Chir spolecnosti* 2016; **95**: 222–6.
- 32 Einama T, Takihata Y, Aosasa S, *et al.* Prognosis of Pancreatic Cancer Based on Resectability: A Single Center Experience. *Cancers* 2023; **15**: 1101.

- 33 Golan T, Hammel P, Reni M, *et al.* Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2019; **381**: 317–27.
- 34 Lai E, Ziranu P, Spanu D, *et al.* BRCA-mutant pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2021; **125**: 1321–32.
- 35 Park JH, Jo JH, Jang SI, *et al.* BRCA 1/2 Germline Mutation Predicts the Treatment Response of FOLFIRINOX with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Korean Patients. *Cancers* 2022; **14**: 236.
- 36 Sakamoto K, Masutani T, Hirokawa T. Generation of KS-58 as the first K-Ras(G12D)-inhibitory peptide presenting anti-cancer activity in vivo. *Sci Rep* 2020; **10**: 21671.
- 37 Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, *et al.* Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 1889–94.
- 38 Royal RE, Levy C, Turner K, *et al.* Phase 2 Trial of Single Agent Ipilimumab (Anti-CTLA-4) for Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *J Immunother* 2010; **33**: 828–33.
- 39 Patnaik A, Kang SP, Rasco D, *et al.* Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 4286–93.
- 40 Balsano R, Zanuso V, Pirozzi A, Rimassa L, Bozzarelli S. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Immune Checkpoint Inhibitors: The Gray Curtain of Immunotherapy and Spikes of Lights. *Curr Oncol* 2023; **30**: 3871–85.
- 41 Coveler AL, Mizrahi J, Eastman B, *et al.* Pancreas Cancer-Associated Pain Management. *Oncol* 2021; **26**: e971–82.
- 42 Rykowski JJ, Hilgier M. Efficacy of neurolytic celiac plexus block in varying locations of pancreatic cancer: influence on pain relief. *Anesthesiology* 2000; **92**: 347–54.
- 43 Sebeke LC, Rademann P, Maul AC, *et al.* Feasibility study of MR-guided pancreas ablation using high-intensity focused ultrasound in a healthy swine model. *Int J Hyperth* 2020; **37**: 786–98.
- 44 Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol* 2016; **4**: 12.
- 45 Sajjad H, Imtiaz S, Noor T, Siddiqui YH, Sajjad A, Zia M. Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. *Anim Model Exp Med* 2021; **4**: 87–103.
- 46 Drosten M, Guerra C, Barbacid M. Genetically Engineered Mouse Models of K-Ras-Driven Lung and Pancreatic Tumors: Validation of Therapeutic Targets. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; **8**: a031542.
- 47 Miquel M, Zhang S, Pilarsky C. Pre-clinical Models of Metastasis in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**: 748631.
- 48 Spadafora V, Pryce BR, Oles A, *et al.* Optimization of a mouse model of pancreatic cancer to simulate the human phenotypes of metastasis and cachexia. *BMC Cancer* 2024; **24**: 414.
- 49 Thota R, Maitra A, Berlin JD. Preclinical Rationale for the Phase III Trials in Metastatic Pancreatic Cancer. *Pancreas* 2017; **46**: 143–50.

- 50 Nisar M, Paracha RZ, Adil S, Qureshi SN, Janjua HA. An Extensive Review on Preclinical and Clinical Trials of Oncolytic Viruses Therapy for Pancreatic Cancer. *Front Oncol* 2022; **12**: 875188.
- 51 Mahalmani V, Sinha S, Prakash A, Medhi B. Translational research: Bridging the gap between preclinical and clinical research. *Indian J Pharmacol* 2022; **54**: 393–6.
- 52 Lalu MM, Montroy J, Begley CG, *et al.* Identifying and understanding factors that affect the translation of therapies from the laboratory to patients: a study protocol. *F1000Research* 2020; **9**: 485.
- 53 Hingorani SR, Wang L, Multani AS, *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005; **7**: 469–83.
- 54 Pham TND, Shields MA, Spaulding C, *et al.* Preclinical Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Utility in Immunotherapy Studies. *Cancers* 2021; **13**: 440.
- 55 Jiang Y-J, Lee C-L, Wang Q, *et al.* Establishment of an orthotopic pancreatic cancer mouse model: Cells suspended and injected in Matrigel. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 9476–85.
- 56 Suklabaidya S, Dash P, Das B, Suresh V, Sasmal PK, Senapati S. Experimental models of pancreatic cancer desmoplasia. *Lab Invest* 2018; **98**: 27–40.
- 57 Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Cusatis G, *et al.* An In vivo Platform for Translational Drug Development in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 4652–61.
- 58 Garrido-Laguna I, Uson M, Rajeshkumar NV, *et al.* Tumor Engraftment in Nude Mice and Enrichment in Stroma- Related Gene Pathways Predict Poor Survival and Resistance to Gemcitabine in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 5793–800.
- 59 Schade GR, Wang Y-N, D’Andrea S, Hwang JH, Liles WC, Khokhlova TD. Boiling Histotripsy Ablation of Renal Cell Carcinoma in the Eker Rat Promotes a Systemic Inflammatory Response. *Ultrasound Med Biol* 2019; **45**: 137–47.
- 60 Worlikar T, Mendiratta-Lala M, Vlasisavljevich E, *et al.* Effects of Histotripsy on Local Tumor Progression in an in vivo Orthotopic Rodent Liver Tumor Model. *BME Front* 2020; **2020**: 9830304.
- 61 Hijnen NM, Heijman E, Köhler MO, *et al.* Tumour hyperthermia and ablation in rats using a clinical MR-HIFU system equipped with a dedicated small animal set-up. *Int J Hyperther* 2012; **28**: 141–55.
- 62 Pour P, Wallcave L, Gingell R, *et al.* Carcinogenic effect of N-nitroso(2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl)amine, a postulated proximate pancreatic carcinogen in Syrian hamsters. *Cancer Res* 1979; **39**: 3828–33.
- 63 Pettengill OS, Faris RA, Bell RH, Kuhlmann ET, Longnecker DS. Derivation of ductlike cell lines from a transplantable acinar cell carcinoma of the rat pancreas. *Am J Pathology* 1993; **143**: 292–303.
- 64 Foley JF, Phadke DP, Hardy O, *et al.* Whole exome sequencing in the rat. *Bmc Genomics* 2018; **19**: 487.
- 65 Mäkinen K, Loimas S, Kosma V-M, *et al.* Azaserine-Induced Rat Pancreas Tumor Model with Transplantable Cultured Cells. *Pancreas* 1998; **16**: 160–4.

- 66 Hotz HG, Reber HA, Hotz B, *et al.* An Improved Clinical Model of Orthotopic Pancreatic Cancer in Immunocompetent Lewis Rats. *Pancreas* 2001; **22**: 113–21.
- 67 Copelan A, Hartman J, Chehab M, Venkatesan A. High-Intensity Focused Ultrasound: Current Status for Image-Guided Therapy. *Semin Interv Radiol* 2015; **32**: 398–415.
- 68 Schmidt P, Lindemeyer J, Raut P, *et al.* Multiparametric Characterization of the DSL-6A/C1 Pancreatic Cancer Model in Rats. *Cancers* 2024; **16**: 1535.
- 69 Majumder K, Arora N, Modi S, *et al.* A Novel Immunocompetent Mouse Model of Pancreatic Cancer with Robust Stroma: a Valuable Tool for Preclinical Evaluation of New Therapies. *J Gastrointest Surg* 2016; **20**: 53–65.
- 70 Fernandez JL, Årbogen S, Sadeghinia MJ, *et al.* A Comparative Analysis of Orthotopic and Subcutaneous Pancreatic Tumour Models: Tumour Microenvironment and Drug Delivery. *Cancers* 2023; **15**: 5415.
- 71 Picard FSR, Lutz V, Brichkina A, *et al.* IL-17A-producing CD8+ T cells promote PDAC via induction of inflammatory cancer-associated fibroblasts. *Gut* 2023; **72**: 1510–22.
- 72 Goulart MR, Stasinou K, Fincham REA, Delvecchio FR, Kocher HM. T cells in pancreatic cancer stroma. *World J Gastroenterol* 2021; **27**: 7956–68.
- 73 Qiu W, Su GH. Development of orthotopic pancreatic tumor mouse models. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)* 2013; **980**: 215–23.
- 74 Klaassen R, Steins A, Gurney-Champion OJ, *et al.* Pathological validation and prognostic potential of quantitative MRI in the characterization of pancreas cancer: preliminary experience. *Mol Oncol* 2020; **14**: 2176–89.
- 75 Kim S-Y, Kim E-K, Moon HJ, *et al.* Association among T2 signal intensity, necrosis, ADC and Ki-67 in estrogen receptor-positive and HER2-negative invasive ductal carcinoma. *Magn Reson Imaging* 2018; **54**: 176–82.
- 76 Antonova DV, Gnatenko DA, Kotova ES, *et al.* Cell-specific expression of the FAP gene is regulated by enhancer elements. *Front Mol Biosci* 2023; **10**: 1111511.
- 77 Xin L, Gao J, Zheng Z, *et al.* Fibroblast Activation Protein- α as a Target in the Bench-to-Bedside Diagnosis and Treatment of Tumors: A Narrative Review. *Front Oncol* 2021; **11**: 648187.
- 78 Shi M, Yu D-H, Chen Y, *et al.* Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 840–6.
- 79 Qi N, Wang H, Wang H, *et al.* Non-tumoral uptake of ^{68}Ga -FAPI-04 PET: A retrospective study. *Front Oncol* 2022; **12**: 989595.
- 80 Zhang Z, Zheng L, Li W, *et al.* Quantitative functional MRI in a clinical orthotopic model of pancreatic cancer in immunocompetent Lewis rats. *Am J Transl Res* 2015; **7**: 1475–86.
- 81 Hectors SJCG, Jacobs I, Heijman E, *et al.* Multiparametric MRI analysis for the evaluation of MR-guided high intensity focused ultrasound tumor treatment. *Nmr Biomed* 2015; **28**: 1125–40.

- 82 Siedek F, Yeo S, Heijman E, *et al.* Magnetic Resonance-Guided High-Intensity Focused Ultrasound (MR-HIFU): Overview of Emerging Applications (Part 2). *RöFo - Fortschritte auf dem Geb Röntgenstrahlen Bild Verfahr* 2019; **191**: 531–9.
- 83 Iancu DM, Budușan M, Capraș D, *et al.* The Role of Radio-Frequency and Stereotactic Ablation in the Treatment of Pancreatic Cancer. *Chir (Buchar, Rom : 1990)* 2022; **117**: 399–406.
- 84 Erning FN van, Greidanus NEM, Verhoeven RHA, *et al.* Gender differences in tumor characteristics, treatment and survival of colorectal cancer: A population-based study. *Cancer Epidemiology* 2023; **86**: 102441.
- 85 Caserta S, Gangemi S, Murdaca G, Allegra A. Gender Differences and miRNAs Expression in Cancer: Implications on Prognosis and Susceptibility. *Int J Mol Sci* 2023; **24**: 11544.
- 86 Buddenkotte T, Rundo L, Woitek R, *et al.* Deep learning-based segmentation of multisite disease in ovarian cancer. *Eur Radiol Exp* 2023; **7**: 77.