



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Urologische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)

Effekte von Retinoiden alleine sowie in Kombination mit Gemcitabin in humanen Harnblasenkarzinomzelllinien

Christian Matthias Reger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend

2. apl. Prof. Dr. M. Retz

Die Dissertation wurde am 18.12.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.07.2016 angenommen.

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	1
1.1 Harnblasenkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.3 Pathologie	3
1.1.4 Staging, Grading und Residualtumor	4
1.1.5 Symptomatik	5
1.1.6 Diagnostik	6
1.1.7 Therapie und Prognose	6
1.1.8 Gemcitabin	14
1.2 Retinoide	17
1.2.1 Isotretinoin (13-cis-RA, 13cRA)	20
1.2.2 4-Hydroxyphenylretinamid (4-HPR, Fenretinid)	21
1.2.3 Retinoide beim Harnblasenkarzinom	22
1.3 Ziele der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Statistik	25
2.2 Zellkultur	28
2.2.1 RT112 (ATCC)	28
2.2.2 EJ28 (ATCC)	29
2.3 Reagenzien und Lösungen	29
2.3.1 Medien	30
2.3.2 Lösungen für die Zellkultivierung	30
2.3.3 XTT-Reagens	31
2.3.4 Stammlösungen der Testsubstanzen	31
2.4 Arbeitsmittel	31
2.5 Kulturbedingungen	32
2.5.1 Subkultivierung	32
2.5.2 Medienwechsel	34
2.5.3 Mykoplasmentest	34

2.6	XTT-Test.....	34
2.7	Versuchsansatz und Versuchsbeschreibung.....	36
2.7.1	Alleinige Applikation der Testsubstanzen.....	36
2.7.2	Kombinationsversuche	38
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Applikation der Einzelsubstanzen	40
3.1.1	Retinoid 13-cis-RA.....	40
3.1.2	Retinoid 4-HPR.....	42
3.1.3	Gemcitabin	43
3.2	Kombinierte Applikation	46
3.2.1	Kombinierte Applikation in der Zelllinie RT112.....	46
3.2.2	Kombinierte Applikation in der Zelllinie EJ28	53
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der kombinierten Applikation	59
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	71
7	Danksagung.....	88
8	Lebenslauf	89

1 Einleitung

1.1 Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms zeigt in den Industrienationen steigende Tendenzen. Ebenso nimmt die Prävalenz mit steigendem Lebensalter der Bevölkerung zu. Das mittlere Diagnosealter liegt bei Männern bei 72 Jahren, bei Frauen bei 74 Jahren. (RKI und GEKID 2013). Es ist insgesamt der zweithäufigste Tumor des Urogenitalsystems. In 3,5% aller letal endenden Krebserkrankungen ist die Ursache ein Malignom der Harnblase. In den Jahren 2009/2010 erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland pro Jahr 28.500 Menschen neu an Harnblasenkrebs (RKI und GEKID 2013). Dabei sind Männer im Vergleich zu Frauen dreimal so häufig betroffen (Hautmann 2006).

Altersspezifische Inzidenz des Harnblasenkarzinoms in Deutschland 2009/2010:

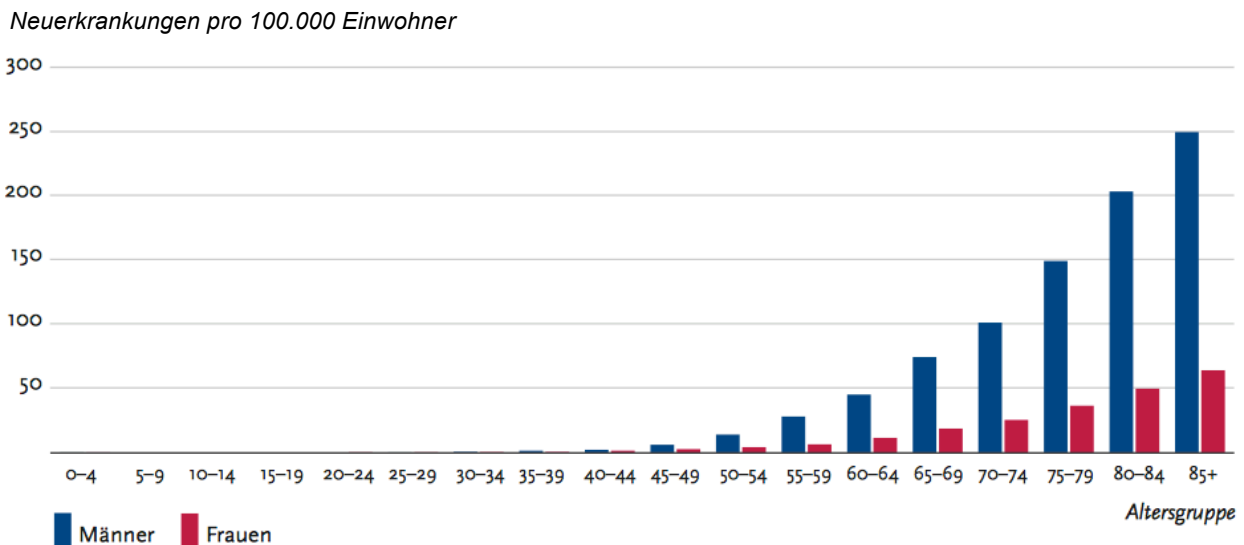


Abb.1: Altersspezifische Inzidenz des Harnblasenkarzinoms in Deutschland 2009-2010 (RKI und GEKID 2013)

1.1.2 Ätiologie

Neben der beruflichen Exposition durch Umgang mit Farbstoffen, Metallen, Gummi und Leder, speziell mit Arylaminen, Benzidinen und β -Naphthylaminen (Golka 1994) stellen Nikotinabusus mit der direkten karzinogenen Wirkung der Verbrennungsprodukte (4-Aminobiphenyl und o-Toluidin; IARC 2004) und der damit verbundenen verzögerten Tryptophanmetabolisierung, Analgetikanephropathie mit terminaler Niereninsuffizienz (Classen 2009) und ein erhöhter Urin-pH-Wert wichtige Risikofaktoren dar, an einem Harnblasentumor zu erkranken.

Die Karzinogenität von Nitrosaminen, welche im Rahmen chronischer Infektionen der Harnblase durch *Escherichia coli*, *Proteus* und *Schistosoma haematobium* gebildet werden, wurde anhand zahlreicher experimenteller Untersuchungen nachgewiesen. Deshalb zeigt sich infektbedingt bei Patienten mit Urozystolithiasis oder/und Dauerurinableitungen eine erhöhte Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms (Rübben 2009).

Ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besitzen Männer mit einer Erkrankung oder einer Hyperplasie der Prostata, da hierdurch der Harnabfluss behindert wird und dadurch Urinkarzinogene länger auf das Urothel der Harnblase einwirken können. Dies erklärt auch die vermehrte Prävalenz für Männer, an einer malignen Veränderung der Blase zu erkranken (Altwein 1993).

Für das Chemotherapeutikum Cyclophosphamid konnte dosisabhängig ein deutlicher Risikoanstieg für die Inzidenz eines Harnblasenkarzinoms gezeigt werden (Travis 1995).

Molekularbiologisch von Bedeutung ist bei der Karzinogenese des Urothelkarzinoms die Veränderung der Chromosomenstruktur durch Punktmutation des Onkogens Ha-ras, welches ein G-Protein-Analogon darstellt (Kroft 1994). Weitere chromosomale Abnormitäten wie die Deletion des Chromosoms 9 (Habuchi 1995) oder des Chromosoms 17p mit dem Verlust des Tumorsuppressorgens p53 und Alterationen des Retinoblastom(Rb)-Gens auf Chromosom 13 gehen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher (Ozen 1998; Hartmann 1999).

Abschließend muss man davon ausgehen, dass bei der Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms, dessen Latenzzeit zwischen 10 und 45 Jahren liegen kann, nicht nur ein Karzinogen ursächlich sein kann. Es gilt vielmehr als erwiesen, dass auf das Urothel ein multifaktorielles Geschehen einwirkt, welches zum Auftreten von Malignomen führt (Rübben 2009).

1.1.3 Pathologie

Das Harnblasenkarzinom entsteht morphologisch aus dem Urothel der ableitenden Harnwege. Man unterscheidet epitheliale, mesenchymale und sekundäre Tumore. In der Histologie finden sich die typischen Zeichen einer Entartung:

- Verlorenegegangene Zellpolarität
- Abnorme Zellreifungen
- Riesenzellen
- Prominente Nukleolen
- Zahlreiche Mitosen
- Verklumptes Chromatin
- Verschobener Kern/Zytoplasma-Quotient

In über 95% der Fälle handelt es sich beim Harnblasenkarzinom um Tumore urothelialen Ursprungs, in 3-5% um Plattenepithelkarzinome und in 0,2-2% um Adenokarzinome bzw. undifferenzierte Karzinome.

Der Hauptlokalisationsort des Harnblasenkarzinoms ist mit über 70% die Blasen hinterwand und die Blasen seitenwand (Altwein 1993). Ein multilokuläres Auftreten liegt in 40% der Fälle vor (Rübben 2009).

1.1.4 Staging, Grading und Residualtumor

Die Stadieneinteilung erfolgt durch das TNM-System gemäß den UICC-Richtlinien, welches das Harnblasenkarzinom nach Invasionstiefe (T) des Primärtumors, Lymphknotenstatus (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zuordnet:

Tab. 1: Die TNM-Klassifikation für das Harnblasenkarzinom (UICC 2010)

T:	Lokale Tumorausbreitung
Ta:	nicht-invasives papilläres Karzinom
Tis:	flaches anaplastisches Epithel mit geringgradiger Differenzierung, ohne Polarität und ohne Invasion (Carcinoma in situ)
T1:	Infiltration bis subepitheliales Bindegewebe (Lamina submucosa)
T2:	Infiltration der Harnblasenmuskulatur
T2a:	Infiltration bis innere Hälfte Lamina muscularis
T2b:	Infiltration bis äußere Hälfte Lamina muscularis
T3:	Perivesikale Tumordinfiltration
T3a:	mikroskopische perivesikale Infiltration
T3b:	makroskopische perivesikale Infiltration
T4:	Infiltration von Nachbarorganen
T4a:	Infiltration Prostata, Uterus und Vagina
T4b:	Infiltration Becken- oder Bauchwand
N:	Lymphknotenbefall
N0:	keine befallenen Lymphknoten
N1:	Lk-Metastasen kleiner 2cm
N2:	Lk-Metastasen zwischen 2–5 cm
N3:	Lk-Metastasen größer 5 cm
M:	Fernmetastasen
M0:	keine Fernmetastasen
M1:	Fernmetastasen

G-Stadium (Histopathologisches Grading)

Das G-Stadium wird durch die mikroskopische Untersuchung des Tumorgewebes bestimmt. Dabei wird die Ähnlichkeit der Tumorzellen mit den Organzellen verglichen. Hierdurch können Aussagen zur Bösartigkeit des Tumors gemacht werden.

Tab. 2: Die Grading-Einteilung für das Harnblasenkarzinom (UICC 2010)

- urotheliales Papillom
- Papilläre Neoplasie von niedrig malignom Potential (PUNLMP)
- low grade (entspricht G1): gut differenziert und G2: mäßig differenziert
- high grade (entspricht G3): schlecht bis undifferenziert

Residualtumor

Die Residualtumor-Einteilung gibt an, ob der Tumor durch die Operation vollständig entfernt werden konnte.

Tab. 3: Die Residualtumor-Einteilung für das Harnblasenkarzinom (UICC 2010)

RX	Residualtumor kann nicht bestimmt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor
R2	Makroskopisch sichtbarer Residualtumor

1.1.5 Symptomatik

In frühen Stadien ist das Harnblasenkarzinom häufig symptomlos. Im weiteren Verlauf kann es zu schmerzhafter oder schmerzloser Mikro- oder Makrohämaturie, Dysurie und Pollakisurie kommen (Messing 1990).

Die Symptome treten aber nicht obligat auf. Bei einer Tumorlokalisierung im Bereich der Ureterostien sind uni- bzw. bilaterale Obstruktion, konsekutiver Harnstau und Flankenschmerzen mögliche Symptome.

Bei fortgeschrittener Erkrankung treten häufig Symptome wie abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust, Stuhlnunregelmäßigkeiten bei Rektuminfiltration, Lymphödem der unteren Extremitäten und bei ossärer Metastasierung Knochenschmerzen auf (Bichler 1994).

1.1.6 Diagnostik

Zur Diagnose eines Harnblasenkarzinoms zählen neben der Anamnese vor allem Laborbefunde (Blutbild, Leber- und Nierenparameter, Urinuntersuchung inklusive bislang nur eingeschränkt empfohlener urinbasierter Tumormarker), bildgebende Verfahren wie Röntgenuntersuchung des Urogenitaltraktes (Ausscheidungsurogramm, CT, MRT, PET-CT, Skelettszintigraphie), perkutane Sonographie sowie Urethrozystoskopie mit Gewinnung von Urinzytologie und ggf. multiplen Blasenbiopsien. Alle Untersuchungen zielen auf die Erfassung der lokalen Tumorausdehnung mit Beurteilung des lokalen Tumorstadiums. Hierbei wird zwischen oberflächlichen und muskelinfiltrierenden Tumoren unterschieden, der Differenzierungsgrad bestimmt und das Vorhandensein eines assoziierten Cis sowie einer lymphogenen bzw. hämatogenen Metastasierung untersucht.

1.1.7 Therapie und Prognose

Entscheidend für die Wahl der richtigen Therapie und für die Prognose ist sowohl die Stadieneinteilung als auch die morphologische Differenzierung des Harnblasentumors. Bei allen Harnblasenkarzinomen erfolgt zunächst deren transurethrale Resektion (ggf. mittels photodynamischer Diagnostik). Dieser Eingriff dient der Beurteilung der Invasionstiefe (T-Stadium) und des Gradings. Er besitzt bei oberflächlichen Tumoren diagnostischen und therapeutischen Charakter, bei lokal fortgeschrittenen Tumoren nur diagnostischen Charakter. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren erfolgt in der Regel danach eine radikale Zystektomie. Nicht-muskelinvasive Blasentumore können auch transurethral mittels Laser abgetragen werden.

- **Nicht muskelinvasive Harnblasenkarzinome**

Wegen der hohen Rezidivhäufigkeit der nicht-muskelinvasiven Harnblasentumore von 50-80% innerhalb von zwei Jahren sowie bei Vorliegen eines Carcinoma in situ (Cis) oder multifokalem Tumorwachstums sollte zusätzlich zu o.g. Therapieoptionen eine adjuvante Therapie erfolgen, um die Rezidivhäufigkeit zu senken. Die intravesikale Applikation von Chemotherapeutika (z.B. Mitomycin C, Epirubicin, Doxorubicin) und Immuntherapeutika (z.B. BCG) wird bei oberflächlichen Blasentumoren nach vorausgegangenem TURB im Sinne einer Rezidivprophylaxe und beim Cis als kuratives Therapieverfahren eingesetzt.

Die oberflächlichen Harnblasentumore lassen sich in drei Untergruppen mit jeweils verschiedenen Tumorentitäten und Risikopotentialen zur Tumorprogression einteilen:

Tab. 4: Tumorentitäten und Risikopotentiale (nach Messing 1992; Klan 1991; Bichler 1998; Borden 2004)

Tumorentität	Risiko Progression (%)	5-Jahres-Überlebensrate (%)
pTaG1	4,1	95
pTaG2/3 und pT1G1/2	18,8	81
pT1G3 und Cis	31	64

- **Muskelinvasive Harnblasenkarzinome**

Radikale Zystektomie

Die muskelinvasiven Tumore der Harnblase (pT2-T4) sowie nicht erfolgreich behandelbare oberflächliche Rezidivkarzinome (pT1G3/pTis) bzw. ein hohes Progressionsrisiko und Nichtansprechen einer BCG-Instillationstherapie stellen die Indikation zur radikalen Zystektomie und pelviner Lymphadenektomie dar (Kulkarni 2010).

Die Überlebensraten nach radikaler Zystektomie korrelieren mit der Infiltrationstiefe des Tumors sowie der konsekutiven Wahrscheinlichkeit der Metastasierung. Ebenso hängt die Langzeitüberlebensrate vom intraoperativen Lymphknotenstatus ab.

Tab. 5: Tumorspezifisches Überleben nach radikaler Zystektomie bei muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase (Gschwend 2002)

Tumorstadium	n	5-Jahres-Überlebensrate	10-Jahres-Überlebensrate
<pT3a	374	78,9%	72,9%
>pT3b	312	36,8%	33,3 %
pN0	493	66,7%	61,7%
pN+	193	31,2%	27,7%

Blasenerhalt bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

Ziel von blasenerhaltenden Therapieformen beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom ist neben dem Erhalt der Blasenfunktion sowie der Kontinenz und des neurovaskulären Bündels auch die lokale Tumorkontrolle. Die Indikationsstellung ist hierbei aber nur auf gut zugängliche solitäre Tumore oder Divertikelkarzinom jeweils ohne begleitendes Cis beschränkt (Rübben 2009).

Eine Alternative zur Zystektomie beim Tumorstadium T2 sowie unifokalem Tumorwachstum, einer Tumorgröße unter 5 cm und Fehlen einer lymphatischen oder vaskulären Infiltration ist heute die komplette TUR des Primärtumors mit alleiniger Radiotherapie oder mit kombinierter Radiochemotherapie (RCT) (Rödel 2002 und 2004; Bellmunt 2010).

Eine Radiatio in Verbindung mit einer Chemotherapie mittels Cisplatin ist in der Prognose der alleinigen Radiatio deutlich überlegen (Chakravarti 2005) und stellt eine Therapiealternative dar, wenn eine Zystektomie nicht möglich ist (Bellmunt 2010).

In folgender Tabelle sind die Überlebensraten bei blasenerhaltender Therapie dargestellt:

Tab. 6: Überlebensraten bei blasenerhaltender Therapie (Rodel 2002; Housset 2003; Shipley 2005)

Serien	Patientenzahl	Komplette Remission	5-Jahres-Gesamtüberleben
Erlangen	415	72%	50%
Paris	120	77%	63%
Boston	190	71%	54%

Adjuvante/neoadjuvante Chemotherapie des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms

Über den Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie nach radikaler Zystektomie zur Kurierung von Mikrometastasen und zur Konsolidierung des Operationserfolges existieren derzeit kontroverse Ergebnisse.

Studer et al. (1994) sah keinen Benefit in der adjuvanten Chemotherapie, andere Arbeitsgruppen (Skinner 1991; Stöckle 1996) berichten von vorteilhaften Ergebnissen, v.a. bei Patienten mit Lymphknotenbefall (Bellmunt 2010 ; Heck 2010). In einer von der Advanced Bladder Cancer Trial Group (ABC) veröffentlichten Metaanalyse der Cisplatin-basierten adjuvanten Chemotherapieschemata ergab für die adjuvante Therapie einen absoluten Überlebensvorteil von 9% nach 3 Jahren. Aufgrund der kleinen Anzahl an Studienpatienten (n=491) konnte hieraus jedoch keine Evidenz abgeleitet werden (ABC 2005 ; Sylvester 2000). Eine adjuvante Chemotherapie wird derzeit von der European Association of Urology (EAU) routinemäßig nicht empfohlen (EAU 2015).

Eine neoadjuvante Chemotherapie mit dem Ziel des Down-Staging vor einer operativen Therapie bzw. Radiatio zeigte in einer Metaanalyse unter Leitung des Medical Research Council einen Überlebensvorteil durch eine Platin-basierte Chemotherapie bei Harnblasenkarzinompatienten unabhängig vom Tumorstadium (Advanced Bladder Cancer Meta-Analysis Collaboration 2005). Hierbei stellte sich durch die neoadjuvante Chemotherapie ein 5-Jahres-Überlebensvorteil von 5% gegenüber der Kontrollgruppe dar. Ebenfalls zeigte sich die cisplatinbasierte Polychemotherapie gegenüber der Monotherapie deutlich überlegen.

Einen statistisch-signifikante Verbesserung des 10-Jahres-Überlebens von 30% auf 36% konnte 2011 eine Gruppe um Griffiths für die neoadjuvante Chemotherapie mittels Cisplatin, Methotrexat und Vinblastin (CMV) nachweisen.

In der Leitlinie der EAU 2015 wird die neoadjuvante cisplatin-basierte Kombinationschemotherapie Patienten mit T2-T4a-Harnblasenkarzinom nach Ausschluss einer nodalen oder Fernmetastasierung empfohlen (EAU 2015).

- **Das metastasierte Urothelkarzinom**

Die Therapieform des metastasierten Urothelkarzinoms der Harnblase ist die Chemotherapie.

Das angestrebte Ziel der Chemotherapie ist die Beseitigung sämtlicher Tumorzellen. Grundprinzip der Chemotherapie ist, dass die Zytostatika eher Krebszellen angreifen als normales Gewebe. Bei den Zytostatika handelt es sich um Wirkstoffe, die das Wachstum der Zellen verhindern, indem sie in die Zellteilung eingreifen. Da Tumorzellen sich ständig vermehren, werden diese auch besonders stark geschädigt.

Die Dosis der Zytostatika ist in der Klinik durch die auftretenden Nebenwirkungen limitiert. Durch die Kombination von Zytostatika mit verschiedenen Angriffsorten im Zellzyklus wird daher versucht, die unerwünschten Wirkungen möglichst gering zu halten und die Effektivität der Tumorbeseitigung zu steigern.

Beim metastasierten Urothelkarzinom sind Monochemotherapien den Kombinationschemotherapien in der Wirksamkeit deutlich unterlegen. In folgender Tabelle sind die Ansprechraten einzelner Monochemotherapeutika aufgeführt.

Tab. 7: Monochemotherapie metastasierter Harnblasenkarzinome

Substanz	Komplette Remission (%)	Partielle Remission (%)	Autoren
Gemcitabin	-	31 (27-46)	van Moorsel 1997
Gemcitabin	7	26	Stadler 1997
Docetaxe/Paclitaxel	27	15	Roth 1995
Cisplatin	9	22	Hillcoat 1989
Methotrexat	-	26	Natale 1981
Vinblastin	-	18	Stoter 1985
Doxorubicin	-	22	Stoter 1985
Pemetrexed	6,4	21,3	Sweeney 2006
Vinflunin	-	9	Bellmunt 2009

Deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich der Wirksamkeit konnten mit Kombinationchemotherapeutika erzielt werden:

Die wichtigsten Polychemotherapie-Protokolle sind cisplatin- und/oder methotrexathaltige Kombinationen. Herausragend war zunächst das MVAC-Schema, welches Methotrexat, Vinblastin, Cisplatin und Doxorubicin beinhaltet. Durch Hochdosis-MVAC konnte die Effizienz noch gesteigert werden (Sternberg 2006). Eine komplette Remission war bei 19% der Patienten und partielle Remission bei 31% der Patienten zu verzeichnen (Sternberg 1989 ; Logothetis 1990 ; Loehrer 1992 ; v.d. Maase 2000 ; Siefker-Radtke 2002 ; Dreicer 2003 ; Bamias 2004 ; Sternberg 2006). Weitere Methotrexat-haltige Kombinationen mit Cisplatin und Vinblastin bzw. Paclitaxel und Gemcitabin zeigten im Vergleich zu MVAC schlechtere Ergebnisse (Hillcoat 1989 ; de Mulder 1990 ; Mead 1998; Lara 2004).

Aufgrund des Nebenwirkungsprofils wurde das lange Zeit favorisierte MVAC- bzw. das geringer kardiotoxische MVEC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Epirubicin, Cisplatin) zunehmend durch das weniger myelo- und schleimhauttoxische Gemcitabin/Cisplatin-Schema ersetzt (Mead 1998). Die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate ist mit 15% in der MVAC-Gruppe und 13% in der Gemcitabin/Cisplatin-Gruppe bei einem medianen Überleben von 15 bzw. 14 Monaten nahezu identisch (v. der Maase 2005).

Paclitaxel in Kombination mit dem Platin-Derivat Cisplatin zeigte Gesamtansprechraten zwischen 50 und 72% bei Komplettremissionsraten von 8 bis 34% (Burch 2000 ; Dreicer 2000). Wurde Paclitaxel mit Carboplatin kombiniert, lagen die Ansprechraten bei 21 bis 65% sowie die Komplettremissionsraten zwischen 0 und 40% (Vaughn 1998 ; Redman 1998 ; Zielinski 1998 ; Small 2000 ; Friedland 2004).

Docetaxel und Cisplatin in Kombination zeigte in 3 Studien Komplettremissionswerte zwischen 12 und 26% sowie Teilremissionswerte zwischen 34 und 40% (Sengelov 1998 ; Dimopoulos 1999).

Das besonders in der Therapie solider Tumore aktive Gemcitabin wurde in weiteren Studien mit Taxanen und Platinderivaten kombiniert. Hierbei zeigte hinsichtlich der Komplettremission und der partiellen Remission für die Kombination von Paclitaxel und Gemcitabin bessere Erfolgsraten als für Cisplatin/Gemcitabin, Carboplatin/Gemcitabin, Oxaliplatin/Gemcitabin oder Docetaxel/Gemcitabin (Moore 1999 ; v.d. Maase 1999 ; Kaufman 2000 ; Meluch 2001 ; Shannon 2001 ; Sternberg 2001 ; Gitlitz 2003; Dreicer 2004 ; Kaufman 2004 ; Ardavanis 2005 ; Li 2005 ; Bamias 2006 ; Theodore 2006 ; Carles 2007 ; Dogliotti 2007).

Enttäuschende Ansprechraten ergab in zwei Studien die Kombination von Gemcitabin mit dem Folsäureantagonisten Pemetrexed (v.d. Maase 2006, Dreicer 2008).

Ebenfalls wurden die Ansprechraten von Dreifachkombinationen getestet : Dabei konnten für Cisplatin/Paclitaxel/Gemcitabin in zwei Studien Komplettremissionsraten von 20% (12-28%) und Teilremissionsraten von 41% (31-50%) nachgewiesen werden (Bellmunt 2000 ; Lorusso 2005). Wurde hierbei Cisplatin durch Carboplatin ersetzt, lagen die Komplettremissionsraten für Carboplatin/Paclitaxel/Gemcitabin bei 22% (12-32%) und Teilremissionsraten bei 34% (31-36%) (Hussain 2001 ; Hainsworth 2005).

Pectasides konnte in einer Studie 2002 für die Kombination von Cisplatin, Docetaxel und Gemcitabin eine Teilremission in 37% der Patienten sowie eine Vollremission in 29% der Patienten erreichen. Die Dreifachkombination von Cisplatin, Paclitaxel und Ifosfamid zeigte eine Vollremission in 23% der Fälle sowie eine Teilremission in 45% der Fälle (Bajorin 2000). Wurden Methotrexat, Paclitaxel und Gemcitabin kombiniert, so betragen die Komplettremissionsrate 28% und die Teilremissionsrate 29% (Lara 2004).

Desweiteren zeigten Gemcitabin, Cisplatin und Etoposid eine Vollremission in 19% der Patienten und eine Teilremission in 49% der Patienten (Tsukamoto 2006) und schließlich die Kombination aus Cisplatin, Paclitaxel und 5-Fluorouracil Komplettremissionsraten von 25% und Teilremissionsraten von 43% (Lin 2007).

In folgender Tabelle ist eine Übersicht über Kombinationschemotherapien in der Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms zusammengestellt :

Tab. 8: Kombinationschemotherapie metastasierter Urothelkarzinome (nach Hillcoat 1989; de Mulder 1990; Mead 1998; Khandekar 1985; Sternberg 1989; Logothetis 1990; Loehrer 1992; Redman 1998; Sengelov 1998; Vaughn 1998; Zielinski 1998; Dimopoulos 1999; v.d. Maase 1999; Bajorin 2000; Bellmunt 2000; Burch 2000; Dreicer 2000; Kaufman 2000; Small 2000; v.d. Maase 2000; Hussain 2001; Meluch 2001; Shannon 2001; Sternberg 2001; Pectasides 2002; Siefker-Radtke 2002; Dreicer 2003; Gitlitz 2003; Bamias 2004; Dreicer 2004; Friedland 2004; Kaufman 2004; Lara 2004; Ardavanis 2005; Hainsworth 2005; Li 2005; Lorusso 2005; Bamias 2006; Sternberg 2006; Theodore 2006; Tsukamoto 2006; v.d. Maase 2006; Carles 2007; Dogliotti 2007; Lin 2007; Dreicer 2008)

Substanzen	Studien (n)	Patienten (n)	Komplette Remission (%)	Partielle Remission (%)
Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin	8	791	19 (9-35)	31 (23-41)
Carboplatin, Paclitaxel	5	137	16 (0-40)	26 (15-40)
Cisplatin, Gemcitabin	4	192	13 (8-18)	31 (21-49)
Carboplatin, Gemcitabin	4	228	12 (2-18)	40 (38-41)
Paclitaxel, Gemcitabin	4	185	22 (7-42)	34 (27-47)
Cisplatin, Paclitaxel	3	101	21 (8-34)	43 (38-50)
Cisplatin, Docetaxel	3	123	20 (12-26)	38 (34-40)
Docetaxel, Gemcitabin	3	87	8 (3-13)	26 (14-39)
Cisplatin, Methotrexat	2	83	11 (9-12)	40 (36-44)
Cisplatin, Adriamycin, Cyclophosphamid	2	122	17,5 (10-25)	27(33-21)
Cisplatin, Methotrexat, Vinblastin	2	109	7 (4-10)	34 (31-36)
Oxaliplatin, Gemcitabin	2	76	3 (3)	45 (44-45)
Pemetrexed, Gemcitabin	2	110	3 (2-3)	24 (17-30)
Cisplatin, Paclitaxel, Gemcitabin	2	143	20 (12-28)	41 (31-50)
Carboplatin, Paclitaxel, Gemcitabin	2	109	22 (12-32)	34 (31-36)
Methotrexat, Vinblastin	1	93	7	12
Cisplatin, Docetaxel, Gemcitabin	1	35	29	37
Cisplatin, Paclitaxel, Ifosfamid	1	44	23	45
Methotrexat, Paclitaxel, Gemcitabin	1	21	28	29
Gemcitabin, Cisplatin, Etoposid	1	31	19	49
Cisplatin, Paclitaxel, 5-FU	1	44	25	43

1.1.8 Gemcitabin

Aufgrund der Häufigkeit des Einsatzes von Gemcitabin im Rahmen von Chemotherapien beim metastasierten Urothelkarzinom wurde diese Substanz für diese Arbeit ausgewählt um Effekte von Retinoiden in Kombination mit Gemcitabin in vitro zu untersuchen.

Gemcitabin (Gemzar®, 2',2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) ist ein Pyrimidin-Antimetabolit und gehört zur Gruppe der Nukleosid-Analoga. Als Zytostatikum wirkt es gegen eine Vielzahl von soliden Tumoren wie z.B. nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Pankreaskarzinom, metastasierendes Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und Blasenkarzinom (Kaye 1994; Daikeler 1997).

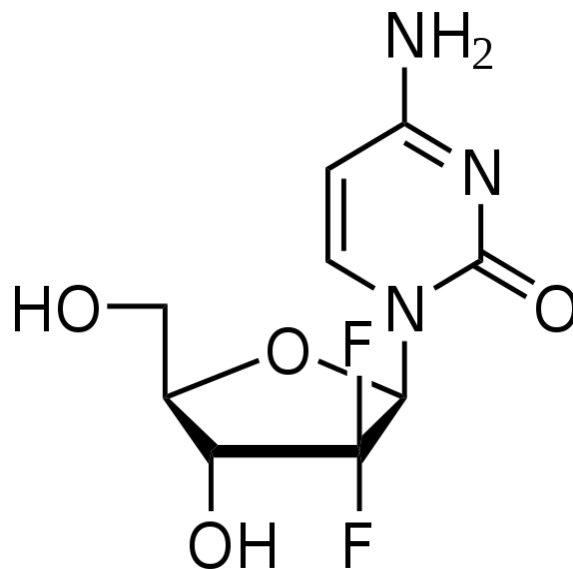


Abb. 2: Strukturformel Gemcitabin

Wirkungsmechanismus

Gemcitabin wirkt zytotoxisch. Es wirkt zellphasenspezifisch, wobei hauptsächlich Zellen während der DNA-Synthese (S-Phase) abgetötet werden; unter bestimmten Bedingungen wird die Zellprogression am Übergang von der G1- zur S-Phase blockiert (Huang 1991).

Gemcitabin (dFdC) wird durch Nukleosidkinasen intrazellulär zu dem wirksamen Gemcitabin-Biphosphat (dFdCDP) und -Triphosphat (dFdCTP) metabolisiert. Die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin scheint auf zwei Wirkungen von Gemcitabin-Bi- und Triphosphat zu beruhen. Zum einen blockiert Gemcitabin-Biphosphat die

Ribonukleotidreduktase, welche die Reaktion katalysiert, die Deoxynukleosidtriphosphate für die DNA-Synthese liefert. Die Blockade dieses Enzyms durch Gemcitabin-Biphosphat bewirkt eine allgemeine Reduktion der Konzentration von Deoxynukleotiden und speziell von Deoxycytosintriphosphat (dCTP). Zum anderen konkurriert Gemcitabin-Triphosphat mit dCTP um den Einbau in die DNA. Außerdem kann in geringem Ausmaß ebenfalls Gemcitabin in die RNA eingebaut werden. Durch die Reduktion an intrazellulärem dCTP wird der Einbau von Gemcitabin-Triphosphat in die DNA verstärkt. Die DNA-Polymerase Epsilon ist in hohem Maße nicht in der Lage, Gemcitabin zu entfernen und die wachsenden DNA-Stränge zu reparieren (Heinemann 1995).

Nachdem Gemcitabin-Triphosphat in die DNA eingebaut wurde, erfolgt der Einbau eines weiteren Nukleotids. Danach wird die weitere DNA-Synthese vollständig inhibiert (maskierte Ketten-Beendigung). Nach Einbau in die DNA scheint Gemcitabin-Triphosphat einen programmierten Zelltod (Apoptose) einzuleiten (Ruiz van Haperen 1993; Tolis 1999; van Moorsel 1997).

Der selbstpotenzierende Wirkmechanismus des Gemcitabin führt zu einer gesteigerten Bildung von Gemcitabin-Bi- und Triphosphat, zu einer verringerten Bildung des Cytidin-Triphosphates und zu einer verminderten Elimination des Gemcitabin durch die verringerte Bildung des Deoxyuridin-Monophosphat (dFdUMP) (Kaye 1994; Margreiter 1999).

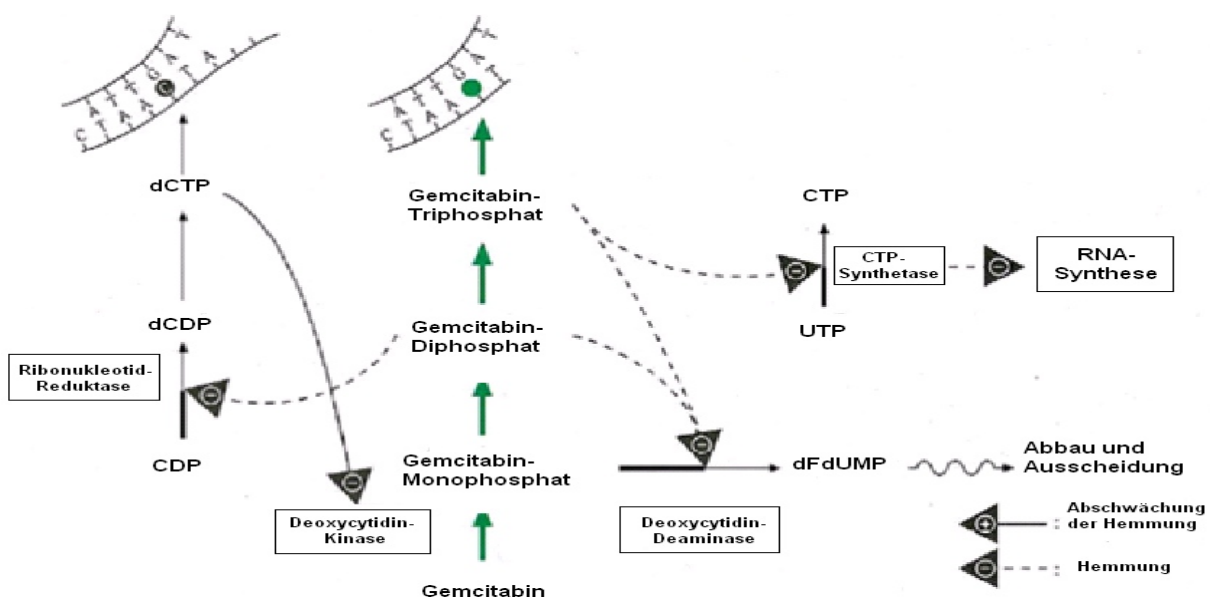


Abb.3: Wirkmechanismus und Metabolismus von Gemcitabin (Jung 2002)

Toxizität

Gemcitabin besitzt ein geringes systemisches Toxizitätsprofil und wird im Allgemeinen sehr gut toleriert (Kaye 1994; van Moorsel 1997). Die häufigsten Nebenwirkungen sind Nausea, Abgeschlagenheit, grippeähnliche Symptome, Dyspnoe und reversible Hautausschläge (Daikeler 1997; Green 1996).

Über eine dosislimitierende Knochenmarksschädigung mit der Folge einer Verminderung aller Knochenmarkszellen, verbunden mit einer Pancytopenie (v.a. Thrombocytopenie) im peripheren Blut wurde in mehreren Studien berichtet (Lund 1993; Green 1996).

In der Datenbank über unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind jedoch auch Fälle beschrieben, bei denen konträr zu obigem auch von Thrombozytosen berichtet wurde (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2005).

Auch wurde in manchen Fällen von einer Gemcitabin-induzierten schweren Lungentoxizität (GISPT) berichtet (Barlesi 2004).

Die Eigenschaft des Gemcitabin, dass es in den DNA-Reparaturmechanismus eingreift (Crul 2003; Huang 1991; Ruiz van Haperen 1993), macht es zu einem idealen Kombinationspartner mit anderen Substanzen, welche den DNA-Zyklus beeinflussen – sei es durch Strangbruch oder Quervernetzung.

1.2 Retinoide

Retinoide sind Abkömmlinge (Derivate) des Vitamin A (Reynolds 2003). Sie besitzen eine antiproliferative Wirkung und sind wichtige Faktoren bei Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Karzinogenese (Alizadeh 2014; Pettersson 2001; Studer 1995).

Biologische Effekte

Unter entsprechenden physiologischen Bedingungen beeinflussen die Retinoide bei Mensch und Tier die Embryonalentwicklung, das Wachstum, die Reproduktionsfunktion, das Sehvermögen, die Modulation des Immunsystems und die Zelldifferenzierung (Smith 1992). Bereits in den 20er Jahren wurde erkannt, dass die Retinoide einen Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung von Gewebe haben (Wolbach 1925). Schließlich dauerte es rund weitere 50 Jahre, bis die experimentelle Forschung über die Funktion der Retinoide intensiviert wurde (Pfahl 1996).

Erst nach Veröffentlichung der Erfolge in der Therapie der Promyelozytenleukämie Ende der 80er bzw. Anfang der 90er Jahre wurden die Retinoide als Therapeutika bei onkologischen Indikationen im Rahmen klinischer Studien vermehrt beachtet.

Die Retinoide leiten einerseits eine Zelldifferenzierung ein und hemmen die Zellproliferation. Zusätzlich begründen weitere biologische Effekte den Einsatz der Retinoide in der Therapie und Prävention maligner Erkrankungen. Zu diesen auch derzeit noch nicht hinreichend genau erforschten Wirkungen gehören z.B. die Unterdrückung der Expression von Onkogenen, die Induktion der Apoptose, die Hemmung der Angiogenese sowie die Stimulation des Immunsystems. Die immunmodulatorische Funktion der Retinoide äußert sich in einer Steigerung der Zytokin-Freisetzung, einer Veränderung von Zelloberflächenantigenen und einer Aktivierung von Effektorzellen (Smith 1992; Goss 1992; Miller 1998).

Molekülaufbau

Die Grundstruktur eines Retinoid-Moleküls setzt sich zusammen aus einer zyklischen Endgruppe, einer polyenen Seitenkette und einer polaren Endgruppe. Die Retinoide der ersten Generation, wozu auch Isotretinoin (13-cis-RA) gehört, unterscheiden sich von Retinol durch Veränderung des polaren Endes. Durch Veränderungen der Ringbildung innerhalb der Polyen-Kette entstehen synthetische Retinoide der zweiten und dritten Generation, wie z.B. Fenretinid (4-Hydroxy-Phenyl-Retinamid; 4-HPR) (Goss 1992).

Stoffwechsel

Vitamin A ist in Form der pflanzlichen Carotinoide und der in tierischen Geweben vorkommenden Retinyl-Ester ein wesentlicher Bestandteil der menschlichen Nahrung. Nach oraler Aufnahme werden die diätetischen Formen des Vitamin A zusammen mit anderen Lipiden im Magen emulgiert und im Dünndarm nach Hydrolyse der Ester resorbiert. In der Mukosazelle findet die Metabolisierung von β -Carotin zu Retinol sowie eine erneute Veresterung von Retinol statt. Der größte Teil der Retinyl-Ester wird dann über das Lymphsystem in Chylomikronen zur Leber transportiert und dort gespeichert (Goss 1992). Von der Leber aus erfolgt die Freisetzung der Retinoide in den Blutkreislauf. Die Retinoide werden über eine Cytochrom-P450 abhängige Hydroxylierung und anschließende Oxidation zu 4-oxo-Metaboliten abgebaut, welche nach Konjugation mit Glukuronsäure über die Galle ausgeschieden werden (Smith 1992; Miller 1998).

Signaltransduktion

Die komplexen biologischen Eigenschaften der Retinoide werden vermittelt über die Interaktion mit nukleären Rezeptoren, welche zur Superfamilie der Steroid-Thyroid-Hormon-Rezeptoren gehören (Lotan 1991). Die Retinoidrezeptoren werden in die retinoic acid receptors (RAR) und die retinoid X receptors (RXR) eingeteilt, von denen es jeweils mindestens drei Subtypen (α , β , γ) gibt. Die verschiedenen RAR und RXR unterscheiden sich in ihrer biologischen Funktion und in ihrem Vorkommen in verschiedenen Geweben und binden an spezifische DNA-Sequenzen (Retinoic Acid Response Elements: RARE), welche wiederum Retinoid-Zielgene aktivieren (McCaffery 2000).

Klinische Studien

Das bekannteste Beispiel für den klinischen Einsatz von Retinoiden bei onkologischen Indikationen ist die akute Promyelozytenleukämie. Bei verschiedenen klinischen Studien konnte bei der Mehrheit der Patienten durch die differenzierungsfördernde Wirkung von Tretinoin die Induktion einer kompletten Remission erreicht werden, wenn auch die kurzen Remissionszeiten eine remissionserhaltende Chemotherapie notwendig machten (Evans 1999). Auch bei weiteren hämatologischen Erkrankungen und bei einigen soliden Tumoren konnten klinische Erfolge durch die Behandlung mit Retinoiden erzielt werden. Solche Indikationen, bei denen Retinoide allein oder in Kombination mit anderen antineoplastischen Substanzen eingesetzt wurden, sind z.B.

die chronisch juvenile Leukämie, T-Zell-Lymphome, Plattenepithelkarzinome der Haut und der Zervix und Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs (Kiemle-Kallee 1993; Smith 1992). Außerdem konnte in klinischen Studien zur präventiven Funktion der Retinoide bei Patienten mit kutanen, oralen oder zervikalen Präkanzerosen das Risiko des Auftretens von Karzinomen verkleinert werden (Evans 1999).

Die „klassischen“ Indikationen für eine Therapie mit Retinoiden sind jedoch nicht onkologische Erkrankungen, sondern Dermatosen. Insbesondere 13-cis-RA ist bei schweren, therapieresistenten Formen der Akne ein effektives Therapeutikum und ist für diese Indikation in Deutschland zugelassen.

Toxizität

Die Toxizität von Retinoiden entspricht den Symptomen einer Vitamin-A-Überdosierung, wobei das synthetische Retinoid 4-HPR deutlich besser toleriert wird als 13-cis-RA. Austrocknung von Haut und Schleimhaut sind häufige unerwünschte Wirkungen. Zudem können Knochenveränderungen, Haarausfall, Störungen des Fettstoffwechsels, Schäden der Leber, Kopfschmerzen und andere ZNS-Symptome auftreten (Aapro 1995). Ein Punkt, der bei der klinischen Anwendung von Retinoiden berücksichtigt werden muss, ist ihre teratogene Wirkung. Die endogenen Retinoide spielen eine wesentliche Rolle in der Embryonalentwicklung, indem sie die Transkription der für diesen Prozess wichtigen Gene regulieren. Sowohl ein Mangel, als auch eine Überdosierung von Retinoiden während der Schwangerschaft kann zu Missbildungen des Embryos führen (Collins 1999). Dieser Umstand verdeutlicht wiederum, welche komplexen biologischen Funktionen die in ihrer Molekülstruktur relativ einfach aufgebauten Retinoide besitzen.

1.2.1 Isotretinoin (13-cis-RA, 13cRA)

Isotretinoin (13-cis-Retinsäure) ist ein natürliches Derivat des Vitamin A. Es besitzt eine zytotoxische und antiinflammatorische Wirkung und ein breites Wirkspektrum gegen viele Tumorarten. Seit Mitte der 80er Jahre ist es im klinischen Einsatz v.a. in der Behandlung der promyeloischen Leukämie und in der Prävention von Tumorrezidiven. Klinische Erfolge zeigt 13-cis-RA auch in der Therapie von follikulären Schilddrüsenkarzinomen und Neuroblastomen (Bushue 2010). In einer Übersichtsarbeit beschrieb Alizadeh die präventive Wirkung von 13-cis-RA von Zweitumoren im Aerodigestiv-Trakt bei Patienten mit resezierten Kopf- und Halskarzinomen (Alizadeh 2014). 13-cis-RA schützt nicht nur vor neu auftretenden Entartungen, sondern wirkt auch gegen schon entartete Zellen im Anfangsstadium (Reynolds 2001).

Dosislimitierend für 13-cis-RA ist die schleimhauttoxische Wirkung (Reynolds 1991).

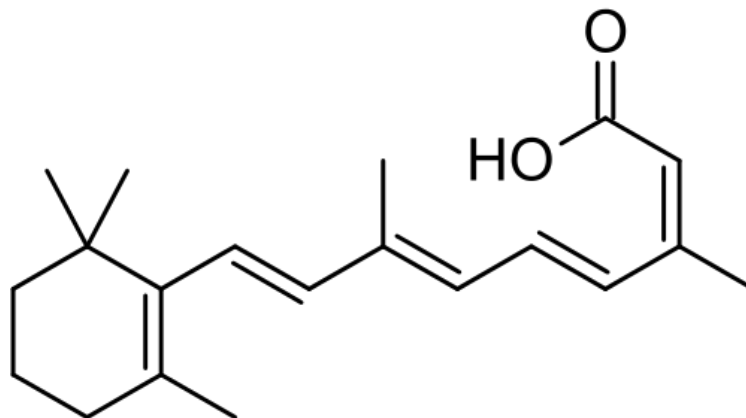


Abb. 4: Strukturformel 13-cis-RA

Wirkungsmechanismus

Die Wirkung des 13-cis-RA wird über RAR- α - und RAR- β - Rezeptoren vermittelt, welche wiederum an DNS-Sequenzen binden, welche die Transkription bestimmter Gene steuern. Es induziert eine Permeabilitätserhöhung in der Mitochondrienmembran und setzt das Membranpotential der Zelle herab. Durch Stimulation der Freisetzung von Cytochrom-c kommt es zur Apoptose der Zelle (Reynolds 2003).

1.2.2 4-Hydroxyphenylretinamid (4-HPR, Fenretinid)

4-HPR ist ein synthetisch hergestelltes Retinoid. Es zeichnet sich durch eine hohe Aktivität in Tumorzellen und eine schwache systemische Toxizität aus.

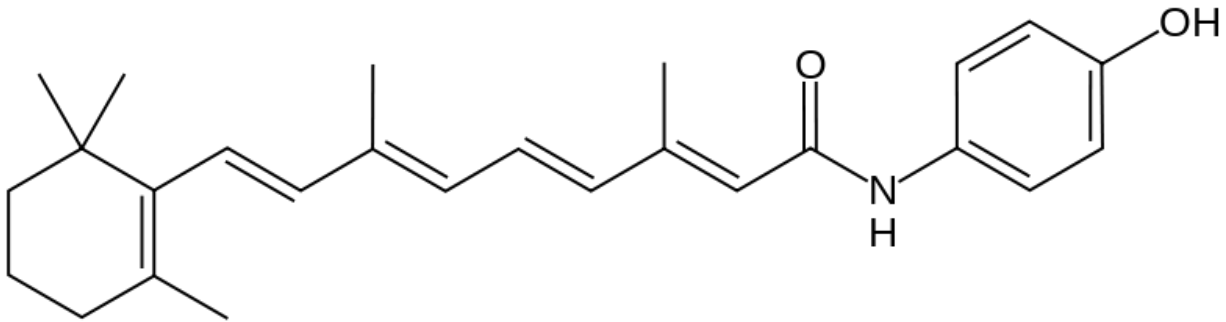


Abb. 5: Strukturformel 4-HPR

Wirkungsmechanismus

4-HPR wirkt unabhängig von Retinoid-Rezeptoren. Daher ist es auch wirksam gegen Zelllinien, die gegen Retinoide resistent sind. 4-HPR wirkt unabhängig von p53 gegen verschiedene Arten von Tumorzellen und ist wirksamer als natürliche Derivate des Vitamin A (Oridate 1997; Zou 1998).

Die zytotoxische Wirkung wird direkt über die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (ROS) (Wu 2001) und indirekt über die Induktion der de-novo-Synthese von Ceramiden erreicht (Erdreich-Epstein 2002).

Ceramid ist an der intrazellulären Signaltransduktion als second messenger beteiligt. Die intrazelluläre Akkumulation der Ceramide führt zu einer gesteigerten Expression der MnSOD (Mangan-Superoxid-Dismutase), die wiederum die intramitochondriale Produktion von ROS erhöht (Schulze-Osthoff 1992; Schulze-Osthoff 1993; Zamzami 1995). Es kommt zur Apoptose und zur Nekrose der Zelle (Reynolds 2003). Nachfolgend werden bislang beschriebene Wirkmechanismen von Ceramiden dargestellt:

a) Die Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase (CAPP), zuerst beschrieben von der Arbeitsgruppe um Hannun (Dobrowsky 1992), gehört zur Familie der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A (PP2A). Sie wird spezifisch von Ceramid stimuliert.

Andere Sphingolipid-Abkömmlinge verändern die Enzymaktivität nicht (Dobrowsky 1993). Die CAPP ist in der Regel in die biologische Antwort, die zur Hemmung des

Zellwachstums und zur Apoptose führt, involviert. Das Zellwachstum wird gehemmt durch die Suppression des Gens c-myc (Wolff 1994).

b) Die Ceramid-aktivierte Proteinkinase (CAPK) gehört zur Gruppe der Prolin-gerichteten Serin/Threonin-Proteinkinasen. Sie ist ein strikt membrangebundenes 97-kDa Protein (Liu 1994) und unterscheidet sich hierdurch von den MAP-Kinasen, die eine ähnliche Konsensusfolge haben, aber zytosolisch lokalisiert sind (Davis 1993). Untersuchungen zufolge ist CAPK ein Kinase-Suppressor von Ras (Zhang 1997). Gut untersucht ist ihre Aktivierung durch TNF α , IL-1 β , bakterielle Sphingomyelinasen und durch Ceramid-Analoga. Der von CAPK genutzte Signalweg führt über TNF α zu Proliferation und Entzündung.

c) Die Phospholipase D (PLD) wird durch Ceramid gehemmt (Jones 1995). Es wird vermutet, dass PLD wichtig für den Vesikeltransport ist (Nickel 1997). Auch ist bekannt, dass Ceramid den Vesikeltransport unterbindet (Hannun 1997) und möglicherweise dies unter anderem durch die Hemmung der PLD geschieht. Außerdem wurde deutlich, dass die Ceramid-induzierte Apoptose mit einer erniedrigten Phospholipase-D-Aktivität einhergeht (Iwasaki-Bessho 1998).

d) Auch die Proteinkinasen C (PKC) werden von Ceramid moduliert. Proteinkinase C ζ (zeta) wird durch Ceramid zur Autophosphorylierung angeregt (Müller 1995). Im weiteren Ablauf führt PKC ζ zur Aktivierung von NF- κ B, wobei der genaue Verlauf der Reaktion noch nicht bekannt ist. Proteinkinasen α , δ und ϵ werden durch Ceramid von der Zellmembran zum Zytosol transportiert und dadurch inaktiviert. Diese Inaktivierung ist für die Einleitung der Apoptose durch Ceramid von Bedeutung. Falls diese Translokation gehemmt wird, wird die Apoptose blockiert (Sawai 1997).

1.2.3 Retinoide beim Harnblasenkarzinom

Retinoide modulieren das Zellwachstum sowie die Genexpression und induzieren Apoptose. In mehreren Studien wurden die Effekte von Retinoiden am Harnblasenkarzinom untersucht.

Die Studiengruppe um Zou verglich die in-vitro-Effekte der Retinoiden ATRA (Tretinoin), 9-cis-RA (Alitretinoin), 4-HPR und LGD1069 in Harnblasenkarzinomzelllinien. Hierbei zeigte sich eine eindeutige Wachstumshemmung sowie Apoptoseeinleitung durch 4-HPR bei einer Dosis von 10^{-5} M in sämtlichen Zelllinien unabhängig von der Ausbildung des Retinoid-Rezeptors-beta. Zelllinien ohne Ausbildung des Retinoid-Rezeptors-beta waren resistent gegenüber ATRA und 9-cis-RA unabhängig vom Grading. Das Retinoid LGD1069 zeigte in sämtlichen Zelllinien keinerlei Wirkung (Zou 2001).

In einer vergleichbaren in-vitro-Studie von Laaksovirta konnte für 9-cis-RA und für 13-cis-RA, nicht aber für ATRA eine zytostatische Wirkung auf Harnblasenkarzinomzellen nachgewiesen werden (Laaksovirta 1999). Wang zeigte für EJ28-Zellen eine Wachstumshemmung ATRA ab einer Konzentration von 10^{-6} mmol/l (Wang 2000).

Klinische Studien hinsichtlich der Effekte von Retinoiden beim Harnblasenkarzinom zeigten kontroverse Ergebnisse. Hameed konnte in einer 2008 veröffentlichten klinischen Studie durch den Einsatz von Retinoiden bei Patienten mit oberflächlichen Harnblasenkarzinomen (Ta und T1, G1-G3) die Rezidivrate senken sowie die Überlebensrate steigern. Dabei konnte nach erfolgter TURB durch die orale Gabe des Retinoids ATRA in einer Dosis von 1mg/kg KG an 5 Tagen pro Woche über 3 Monate in Kombination mit Ketoconazol 200mg zweimal täglich an 5 Tagen pro Woche über 3 Monate bei geringen Nebenwirkungen das tumorfreie Überleben von 7,5 Monaten auf 16 Monate verbessert werden sowie die Rezidivrate pro 100 Patienten und Monat von 18,6 auf 2,9 signifikant gesenkt werden (Hameed 2008).

Andererseits zeigte Sabichi in einer klinischen Studie, dass das in vitro sehr potente Retinoid Isotretinoin (4-HPR) bei oberflächlichem Harnblasenkarzinom zu keiner Senkung der Rezidivrate führt. Hierbei konnte in der Doppelblind-Studie nach durchgeführter TURB bei Patienten mit Ta G1-2, T1 und Tis-Harnblasenkarzinomen nach zwölfmonatiger oraler 4-HPR-Gabe von 200mg pro Tag vs. Placebo-Gabe fast identische 1-Jahres-Rezidivraten von 31,5% (4-HPR) bzw. 32,3% (Placebo) nachgewiesen werden (Sabichi 2008).

1.3 Ziele der Arbeit

Die meisten Zytostatika werden in der Krebstherapie nur selten alleine (Monotherapie) eingesetzt, da die Ansprechraten der einzeln eingesetzten Substanzen klinisch nicht befriedigend sind. Dies gilt auch für das metastasierte Urothelkarzinom.

Daher wird versucht, das Wirkprofil der verschiedenen Zytostatika durch Kombination mit anderen Substanzen zu optimieren, damit die Ansprechraten zu erhöhen und die unerwünschten Wirkungen zu minimieren.

Aus diesem Grund werden neue Kombinationen von Substanzen meist empirisch festgelegt unter Beachtung folgender Aspekte:

- Metabolische und biologische Interaktionen der Substanzen
- Applikationsschema (scheduling)
- Pharmakokinetische Profile
- Toxizitäten
- Antitumor-Aktivität

(Peters 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zytotoxischen Effekte des für die Chemotherapie beim metastasiertem Urothelkarzinom am häufigsten eingesetzten Zytostatikums Gemcitabin nach alleiniger sowie nach kombinierter Applikation mit den beiden Retinoiden 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin, 13-cis-RA) und 4-HPR (Fenretinid) in zwei humanen Harnblasenkarzinom-Zelllinien (RT112: G1-2, EJ28: G3-4) untersucht. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welches Retinoid ist bei alleiniger Applikation effektiver?
2. Besteht eine unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien gegenüber den Retinoiden?
3. Ergibt sich eine Steigerung der Zytotoxizität von Gemcitabin durch die kombinierte Applikation mit den genannten Retinoiden (im Sinne einer additiven oder synergistischen Wirkung)?

2 Material und Methoden

2.1 Statistik

Zur Bearbeitung der Dosis-Wirkungs-Kurven (Versuche zur Modulation der Zellproliferation) wurde ein MATLAB-basiertes Computerprogramm (MATLAB-Software IBG) entwickelt, welches mittels einer logistischen 4-Parameter Regression die Bestimmung der X-Werte (Konzentrationen) und deren 95%-Konfidenzintervalle für definierte Y-Werte ermöglicht (Wagenpfeil 2006). Für die Beschreibung einer Dosis-Wirkungsbeziehung sowie zur vergleichenden Beurteilung der zytotoxischen Effekte der Einzelsubstanzen wurden die Parameter „Inhibitory concentration at 50% effect“ (IC50) sowie deren jeweilige 95%-Konfidenzintervalle mit deren Ober- und Untergrenzen (KI-O; KI-U) bestimmt, welche wie folgt definiert sind:

Parameter	Definition
Inhibitory concentration at 50% effect (IC50)	Konzentration bei 50% Hemmung des Zellüberlebens
95%-Konfidenzintervall	Punktschätzwert für IC50 ± 95% Konfidenzwert (dabei bedeutet: KI-O: Obergrenze des Konfidenzintervalls KI-U: Untergrenze des Konfidenzintervalls)

Die Beurteilung der zytotoxischen Effekte einer kombinierten Applikation von Retinoid mit Gemcitabin erfolgte durch Berechnung und grafischer Erstellung von Isobogrammen, welche ursprünglich von Steel und Peckham beschrieben wurden (Steel 1979).

Dazu mussten zunächst die Dose-response-Kurven der Einzelsubstanzen ermittelt werden. Anschließend konnte ein Diagramm der Kombinationen der Hemmkonzentrationen erstellt werden. Dieses wurde nun durch Mode-I- und Mode-II-Kurven modifiziert, welche den als „envelope of additivity“ bezeichneten Bereich umschreiben. Auf Basis dieser dose-response-Kurven können nun drei Effekt-Linien erstellt werden:

Liegen die Datenpunkte nahe der Mode-I-Linie, so wirken die Substanzen unabhängig voneinander additiv. Wenn die Substanzen über einen ähnlichen Mechanismus additiv wirken, liegen die Datenpunkte nahe der Mode-II-Linie.

Anschließend werden die Datenpunkte aus den Werten der jeweils benötigten Substanzkonzentration für eine 50-prozentige Hemmung der Zellproliferation (IC₅₀) in den Kombinationsversuchen im Verhältnis zu der 50-prozentigen Hemmung der Zellproliferation der Einzelversuche ermittelt. Anhand dieser Isobogramme werden die Effekte und Wechselwirkungen der verschiedenen Substanzkombinationen ersichtlich:

Falls die Datenpunkte innerhalb des „envelope of additivity“ liegen, wird der Effekt als additiv bezeichnet. Datenpunkte, die unterhalb des envelope liegen, liegen bei supra-additiven bzw. synergistischen Effekten vor. Wenn die Datenpunkte oberhalb des envelope liegen, spricht man von antagonistischen Kombinationseffekten.

Ebenfalls können für Datenpunkte innerhalb des „envelope of additivity“ prädiktive Minima und Maxima errechnet werden. Diese entsprechen der jeweiligen Konzentration der Kombinationssubstanz, welche nötig ist, um eine 50 prozentige Hemmung der Zellproliferation zu erreichen. Liegen die ermittelten Datenpunkte zwischen den prädiktiven Minima und Maxima, wird der Kombinationseffekt als additiv eingestuft. Ermittelte Werte unterhalb des prädiktiven Minimum entsprechen synergistische Effekten, Werte oberhalb des prädiktiven Maximums entsprechen antagonistischen Effekten. Nur bei signifikanten Werten ($p < 0,05$) wurden Kombinationen als synergistisch oder antagonistisch angesehen; bei nicht signifikanten Werten wurden die Kombinationen als additiv bis antagonistisch bzw. als additiv bis synergistisch erachtet.

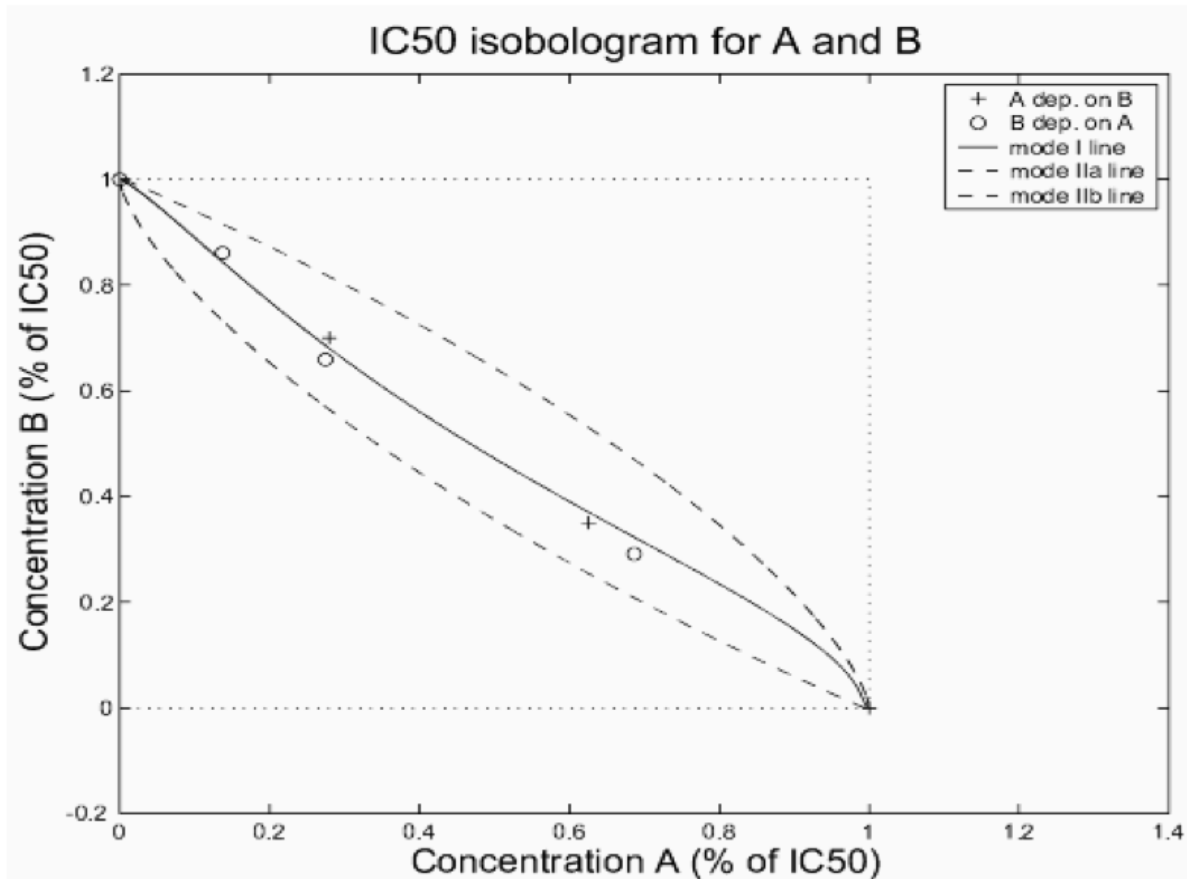


Abb. 6: Klassisches IC50-Isobologramm für die Substanzen A und B. Die Konzentration, welche eine 50-prozentige Hemmung des Zellüberlebens bewirkt, wurde bei dem Wert 1 der Koordinaten eingetragen. Der „envelope of additivity“ wird begrenzt durch die Mode-I- und Mode-II-Linie (Wagenpfeil 2006).

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Stefan Wagenpfeil vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München.

2.2 Zellkultur

Für die heutige medizinische Forschung ist die Kultivierung von Zellen unter möglichst definierten Bedingungen unerlässlich. Bei dieser Arbeit wurden zwei humane Blasenkarzinomzelllinien verwendet. Sie wurden von der Firma Cell Lines Service (CLS), Heidelberg erworben.

2.2.1 RT112 (ATCC)

Diese Zelllinie wird in Studien als Modell für nichtinvasive oberflächliche Blasentumore beim Menschen verwendet. Es handelt sich in der Grading-Einteilung um gut differenzierte Karzinomzellen (G1-2) (Fujiyama 2001; Fechner 2003). Sie bilden in der Regel keine Metastasen und sind E-Cadherin und EGFR positiv (Gaetje 1997; Nutt 2004). RT112-Zellen exprimieren ausgeprägt die Retinoidrezeptoren RAR- α , RAR- β und RXR- α (Abedin 2009).

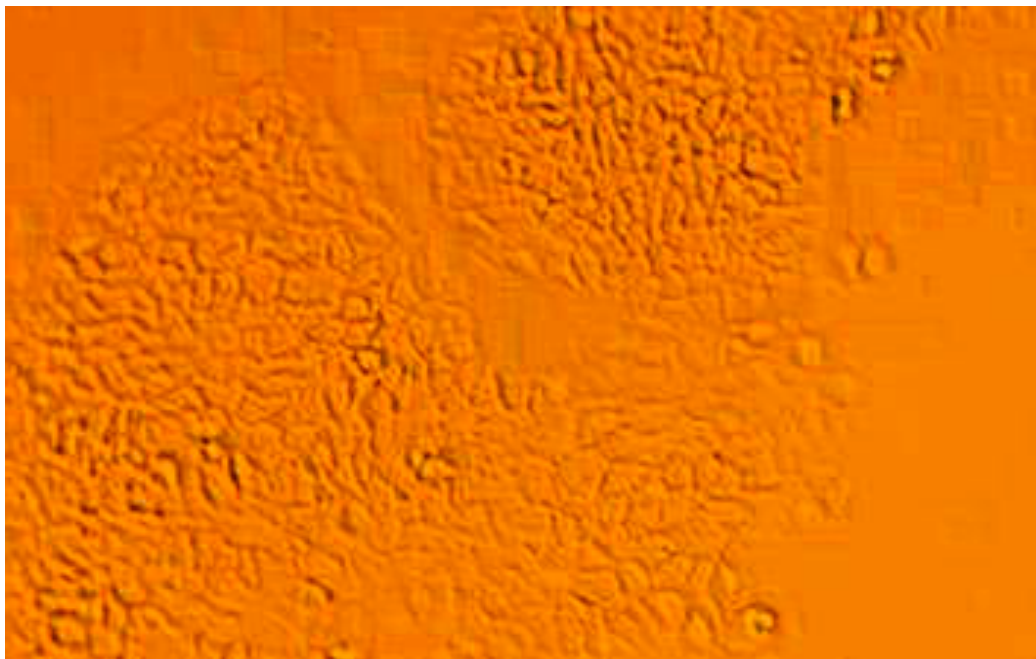


Abb. 7: Zellkultur RT112 (Lichtmikroskop, x100)

2.2.2 EJ28 (ATCC)

Zellen der Linie EJ28 sind schlecht differenzierte (G3-4) menschliche Harnblasenkarzinome (Fujiyama 2001). Sie metastasieren häufig und sind E-Cadherin negativ (Gaetje 1997). EJ28-Zellen besitzen im Vergleich zu RT112-Zellen nur gering ausgeprägte RAR- α -, RAR- β - und RXR- α -Rezeptoren (Abedin 2009).

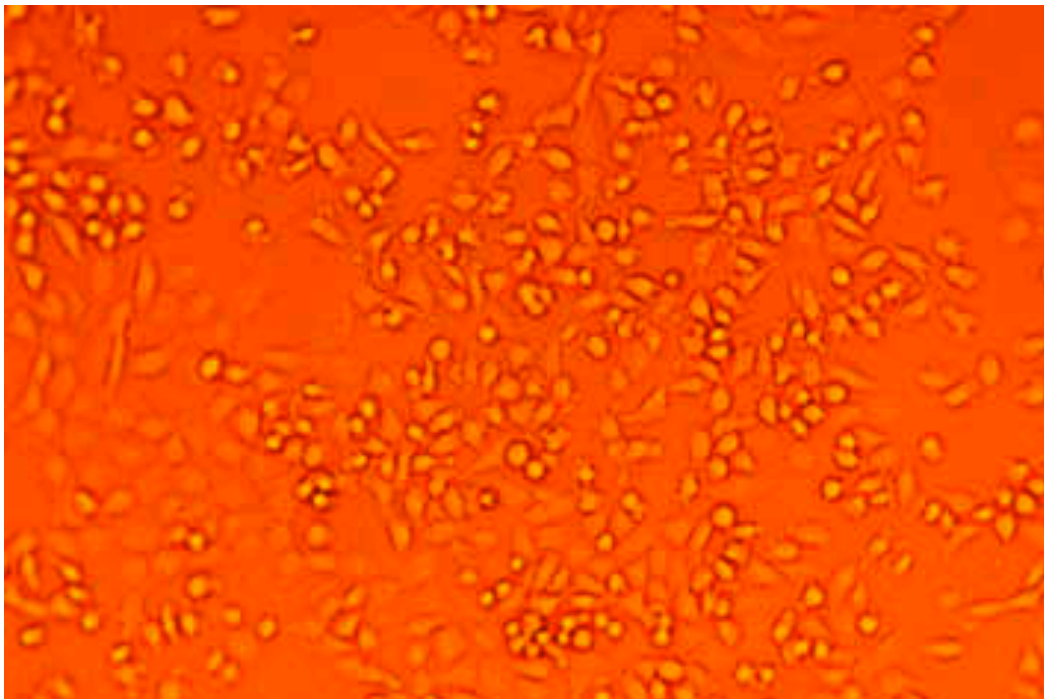


Abb. 8: Zellkultur EJ28 (Lichtmikroskop, x100)

2.3 Reagenzien und Lösungen

Alle Lösungen und Reagenzien wurden steril gehandhabt und im Kühlschrank bei +4°C bzw. im Tiefkühlschrank bei -20°C gelagert.

2.3.1 Medien

2.3.1.1 Medium I für die Kultivierung/Stammhaltung

hergestellt aus:

- 500 ml RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin, Kat.Nr. FG 1215)
- 50 ml Fetales Kälberserum: FKS, (Seromed, Biochrom AG, Berlin, Kat.Nr. S 0115); hitzeinaktiviert bei 56°C für 20 min
- 5 ml nichtessentielle Aminosäuren (Seromed, Biochrom AG, Berlin, Kat.Nr. K 0293)
- 5 ml Antibiotic Antimycotic solution, stabilised (Sigma, Kat.Nr. A 5955)

2.3.1.2 Medium II für Zytotoxizitätsversuche

hergestellt aus:

- 500 ml RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin, Kat.Nr. FG 1215)
- 25 ml Fetales Kälberserum: FKS, (Seromed, Biochrom AG, Berlin, Kat.Nr. S 0115); hitzeinaktiviert bei 56°C für 20 min
- 5 ml nichtessentielle Aminosäuren, (Seromed, Biochrom AG, Berlin, Kat.Nr. K 0293)

2.3.2 Lösungen für die Zellkultivierung

- PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,2-7,4, hergestellt aus:
 - 8 g NaCl
 - 0,2 g KH_2PO_4
 - 1,15 g Na_2HPO_4
 - 0,2 g KClmit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt, autoklaviert
- Trypsin/EDTA-Lösung: 0,05%/0,02% (w/v) in PBS (w/o) Ca, Mg, (Biochrom AG, Berlin, Kat.Nr. L 2143); zum Ablösen der Zellen von den Kulturgefäßböden und zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen.

2.3.3 XTT-Reagens

bestehend aus:

- 5 ml XTT (Natrium 3'- [1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzolsulfonsäure) (Sigma, Kat.Nr. X 4626), aufgelöst in RPMI 1640 Medium; Endkonzentration 1 mg/ml
- 100 µl PMS Phenazinmethosulfat, (Sigma, Kat.Nr. P 9625); Endkonzentration 0,383 mg/ml, in PBS

2.3.4 Stammlösungen der Testsubstanzen

- **13-cis-Retinsäure (Sigma, Kat.Nr. R-3255)**
gelöst in Ethanol, Endkonzentration 10 mM.
- **4-HPR (Sigma, Kat.Nr. H-7779)**
gelöst in Ethanol, Endkonzentration 200 µM.
- **Gemcitabin (als Gemzar 1000 von Fa. Lilly freundlicherweise zur Verfügung gestellt)**
gelöst in NaCl-Lösung, Endkonzentration 40 mg/ml.

2.4 Arbeitsmittel

Hinsichtlich der notwendigen Sterilität wurde in einer Reinraumwerkbank (Laminair HB 2448, Heraeus; mit vertikaler Luftströmung) gearbeitet, deren Arbeitsplatte vor und nach Gebrauch mit 70% Ethanol gereinigt wurde.

Zur Anzucht der Zellen wurden Gewebekulturgefäße (Cellstar Nr. 690175, Greiner Bio-One GmbH; Tissue Culture Flasks, non pyrogenic, 50 ml, 25 cm², sterile, DNase-RNase-free) verwendet. Für sämtliche Versuche wurden die Zellen in sterilen 96-Well-Mikrotiterplatten mit Planboden (Greiner Nr. 655180) ausgebracht.

Um Nährmedium zu entfernen wurden sterile Pasteurpipetten (145 mm, hitzesterilisiert), um Nährmedium zuzugeben wurden sterile Pipetten (Greiner) mit einer Pipettierhilfe (pipetboy acu, Integra Biosciences) benutzt. Für die Ausbringung der Zellsuspension auf die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden Eppendorf Multipettoren verwendet. Um mögliche Kontaminationen zu verhindern, wurden mit einem Bunsenbrenner (Fireboy eco, Integra Biosciences) Pipettenspitzen, Flaschenöffnungen und Flaschenverschlüsse abgeflammt.

Zum Zentrifugieren dienten eine Hettich Rotina 48 Zentrifuge und Zentrifugenröhrchen (12 ml, Greiner Nr. 164161).

Zur Proliferation der Zellen wurden die Gewebekulturflaschen und Mikrotiterplatten in einem Begasungszellkulturschrank (Fa. Heraeus, Typ B5061 EC/CO₂) aufbewahrt.

Das Auszählen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und einem Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 135, Zeiss). Für die Auswertung der Mikrotiterplatten wurde ein Photometer (Microplate Reader, Thermo max, Molecular Devices) und das Computerprogramm Softmax Pro 3.0 (Molecular Devices Corporation) verwendet.

2.5 Kulturbedingungen

Die Anzucht der Zellen fand in einem Begasungszellkulturschrank statt. Im Inneren des Zellkulturschranks herrschte eine konstante Temperatur von 37°C, ein CO₂-Partialdruck von 5% und eine relative Luftfeuchtigkeit von annähernd 100%. Die hohe Luftfeuchtigkeit verhinderte ein Verdunsten des Nährmediums in den Kulturgefäßen, der hohe CO₂-Gehalt der Luft verhinderte zusammen mit dem Hydrogencarbonat-Puffersystem des Nährmediums größere Schwankungen des pH-Wertes. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde der Brutschrank regelmäßig gereinigt. Für die optimale Durchmischung der Zellen mit dem Medium wurde ein Vortex-Rüttler (Bender und Hobein AG) verwendet.

2.5.1 Subkultivierung

Bei allen Experimenten wurden keine Primärkulturen, sondern durch Subkultivierung gewonnene Zellen verwendet. Da ab einer gewissen Zelldichte die Proliferationsrate

der Zellen abnimmt und dies zum Absterben der Kultur führen kann, wurden in regelmäßigen Abständen Subkulturen durch Passagieren angelegt:

Das Nährmedium wurde unter sterilen Bedingungen in der Reinluftbank mit Pasteurpipetten und Vakuumbauchung aus den Kulturgefäßen entfernt. Danach wurde das Kulturgefäß mit 5 ml PBS gespült und das PBS wieder abgesaugt. Anschließend wurden 2 ml der Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben, durch leichtes Schwenken des Gefäßes über den ganzen Zellrasen verteilt und für fünf Minuten im Wärmeschrank inkubiert, um die am Gefäßboden adhärenen Zellen abzulösen. Die Ablösung und das Vorliegen von Einzelzellen wurde unter dem Durchlichtmikroskop kontrolliert. Zur Neutralisation der Trypsin/EDTA-Lösung wurden 8 ml Medium I hinzupipettiert, da das in dem Medium enthaltene FKS die Trypsinwirkung hemmt. Die Zellsuspension wurde daraufhin in sterile Zentrifugenröhrchen überführt, bei 240 g für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Zellsediment wurde mit 10 ml Medium II resuspendiert.

Die Auszählung der Zellen erfolgte mit einem Gemisch von dieser Suspension und Trypanblau in einem Mischverhältnis von 1:1 in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung. Dabei wurden nur die ungefärbten Zellen aus den beiden Mittelquadranten der Zählkammer gezählt, da nur diese vital sind und die Gesamtzellzahl wie folgt berechnet:

$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen in beiden Mittelquadranten} \times 10^4 \times \text{Volumen [ml]}$
--

Zur Neuaussaat der Zellen wurden nun $0,8 \times 10^5$ Zellen pro Gewebekulturgefäß eingesetzt. Das jeweilige Volumen der Zellsuspension und 5 ml Medium I wurden in ein Kulturgefäß pipettiert und diese dann in den Brutschrank zurückgestellt.

Ein derartiges Passagieren der Zellen fand in der Regel einmal wöchentlich statt. Die Passagennummer der Zellen n (EJ28/n bzw. RT112/n) erhöhte sich somit jede Woche um $n=1$.

Für die Versuche wurden Zellen der folgenden Passagennummern verwendet:

EJ28: 31-68
RT112: 27-65

2.5.2 Medienwechsel

Zur Wachstumsförderung und Vitalitätserhaltung der Zellkulturen wurde in regelmäßigen Abständen alle vier Tage das Medium in den Zellkulturgefäßen ausgetauscht.

2.5.3 Mykoplasmentest

Zum Ausschluss einer Kontamination beider Zelllinien mit Mykoplasmen wurde einmal pro Monat ein Mykoplasmentest (Roche Diagnostics GmbH Nr.1296744, Mannheim; Enzyme immunoassay for the detection of mycoplasmas / acholeplasmas in cell culture) durchgeführt.

2.6 XTT-Test

Der XTT-Test wird für die Messung der Vitalität, d.h. der metabolischen Aktivität lebender Zellen, herangezogen. Dabei wird das transparente Tetrazolium-Salz XTT (Natrium 3'- [1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzolsulfonsäure) durch die intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität bei Anwesenheit eines elektronenbindenden Agens (PMS) in das orangefarbene wasserlösliche Formazan umgewandelt (Abb. 9). Vollständig inhibierte mitochondriale Dehydrogenasen können kein Formazan aus XTT bilden. Die Farbintensität korreliert zur Menge der lebenden Zellen. Die spektralphotometrische Quantifizierung der Formazanbildung erfolgte mittels des Mikroplattenphotometer (ELISA-Reader, Thermo max, microplate reader, Molecular Devices) bei $\lambda=450$ nm und einer Referenzwellenlänge von $\lambda=650$ nm.

(Meletiadis 2001 ; Scudiero 1988).

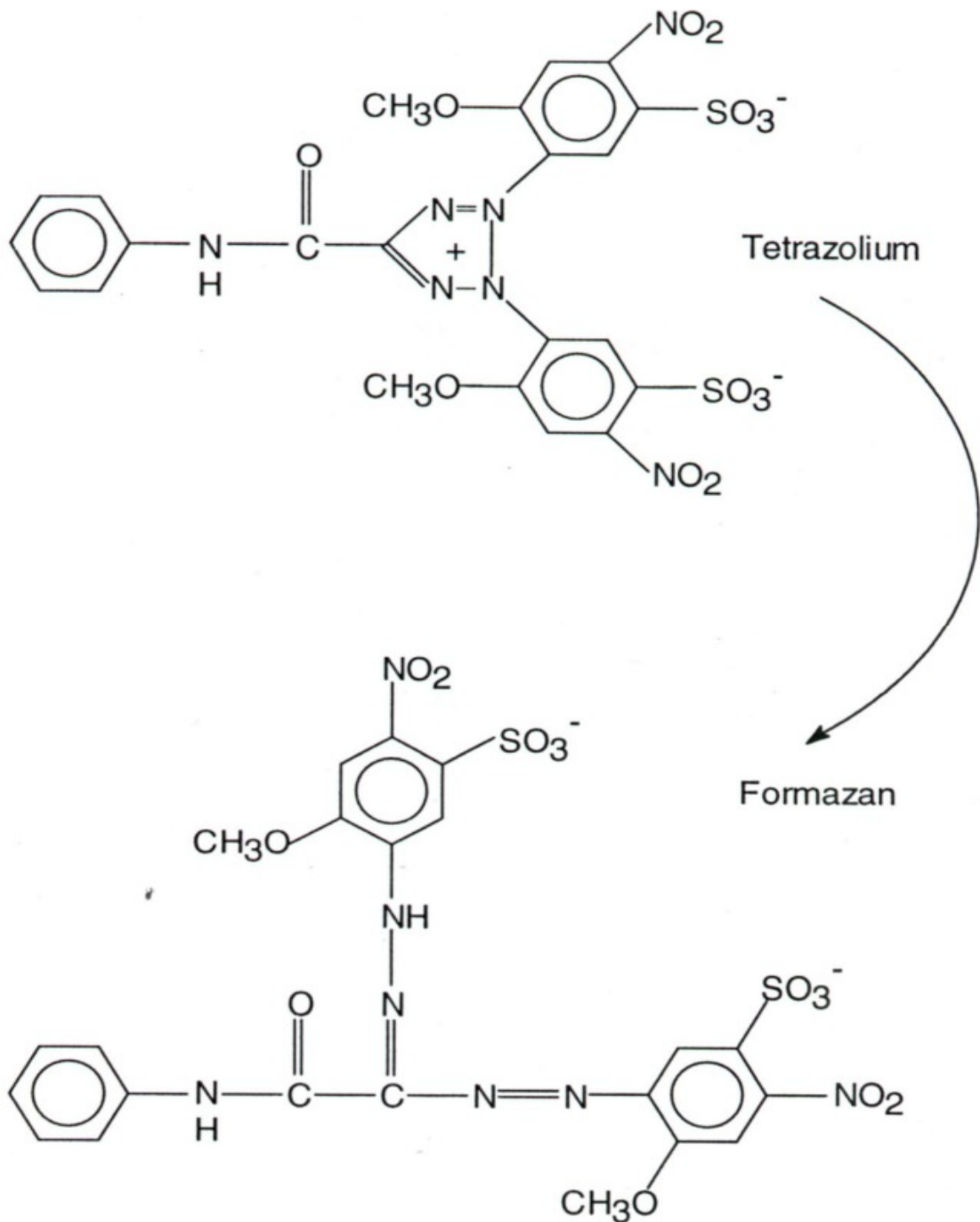


Abb. 9: Reaktionsverlauf des XTT-Tests: Reduktion des transparenten Tetrazolium-Salzes XTT in den Mitochondrien durch mitochondriale Dehydrogenasen zu dem wasserlöslichen, orange-farbenen Farbstoff Formazan (Scudiero 1988).

2.7 Versuchsansatz und Versuchsbeschreibung

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven der Einzelsubstanzen und zur Durchführung der Kombinationsversuche wurde im Rahmen von Vorversuchen eine Versuchsdauer von insgesamt 168 Stunden (7 Tage) festgelegt. Die Zugabe der Testsubstanz 13-cis-RA erfolgte zweimalig im Versuchszeitraum 24 Stunden und 96 Stunden nach Zellaussaat. Die Zugabe von 4-HPR bzw. Gemcitabin erfolgte einmalig 24 Stunden nach Zellaussaat.

Weiterhin musste zur genauen Beurteilung der Effekte ein möglichst großer Konzentrationsbereich untersucht werden, um mögliche biphasische Effekte der Retinoide zu erfassen und um vergleichbare Maßzahlen für den beobachteten Effekt, wie z.B. die Angabe der Substanzkonzentration bei halbmaximaler Wachstumshemmung (IC₅₀-Wert) berechnen zu können. Aus diesem Grund wurden vor den Kombinationsversuchen für sämtliche Versuchsreihen Einzelversuche der jeweiligen Substanzen zur Dosisfindung für die nachfolgenden Kombinationsversuche durchgeführt. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde 13-cis-RA im Konzentrationsbereich 0-100 µM, 4-HPR im Bereich 0-10 µM und Gemcitabin im Konzentrationsbereich 0-20 µM eingesetzt.

2.7.1 Alleinige Applikation der Testsubstanzen

Für die Proliferationsversuche beider Zelllinien bei alleiniger Applikation der Testsubstanzen wurden jeweils 1000 Zellen suspendiert in 100 µl Medium II pro Well der 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Für jede Konzentration wurden jeweils vier Wells angesetzt. In die ersten vier Wells (Reihe 1, A- D) wurden 200 µl Medium II ohne Zellen für den Blank-Kontrollwert gegeben. In die weiteren Wells wurden pro Well die jeweiligen Substanzen in 100 µl Medium II gelöst und damit auf die in den Tabellen 13 und 14 genannten Endkonzentrationen gebracht.

Aufgrund der unterschiedlich ausgeprägten Dosis-Wirkungs-Beziehung beider Zelllinien wurden zusätzliche Konzentrationsabstufungen je nach Zelllinie hinzugefügt.

Die Substanz 13-cis-RA wurde im Verlauf eines Versuchsansatzes zu zwei Zeitpunkten dazugegeben (24 und 96 Stunden nach Zellaussaat); die Substanzen 4-HPR bzw. Gemcitabin wurden nur einmalig appliziert (24 Stunden nach Zellaussaat).

Tab. 9: Konzentrationen der Testsubstanzen in den Einzelversuchen für Zelllinie EJ28 (* Gem = Gemcitabin)

	Konzentrationen (µM)																
Gem *	0,0	0,001	0,01	0,1	0,25	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,9	1,0	1,5	2,0	2,5	5,0	10
13cRA	0,0	0,1	1,0	5,0	7,5	10,0	20	30	40	50	60	70	80	100			
4HPR	0,0	0,01	0,1	1,0	2,5	5,0	7,5	10	15	20							

Tab. 10: Konzentrationen der Testsubstanzen in den Einzelversuchen für die Zelllinie RT112 (* Gem = Gemcitabin)

	Konzentrationen (µM)																
Gem *	0,0	0,001	0,01	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0	10	20	
13cRA	0,0	0,1	1,0	10,0	25	50	60	70	80	100							
4HPR	0,0	0,01	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	5,0	10						

Das XTT-Reagens (50µl/Well) wurde 144h nach Zellaussaat in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C wurde die optische Dichte der Titerplatten bei 450–650 nm Wellenlänge gemessen (Abb. 11).

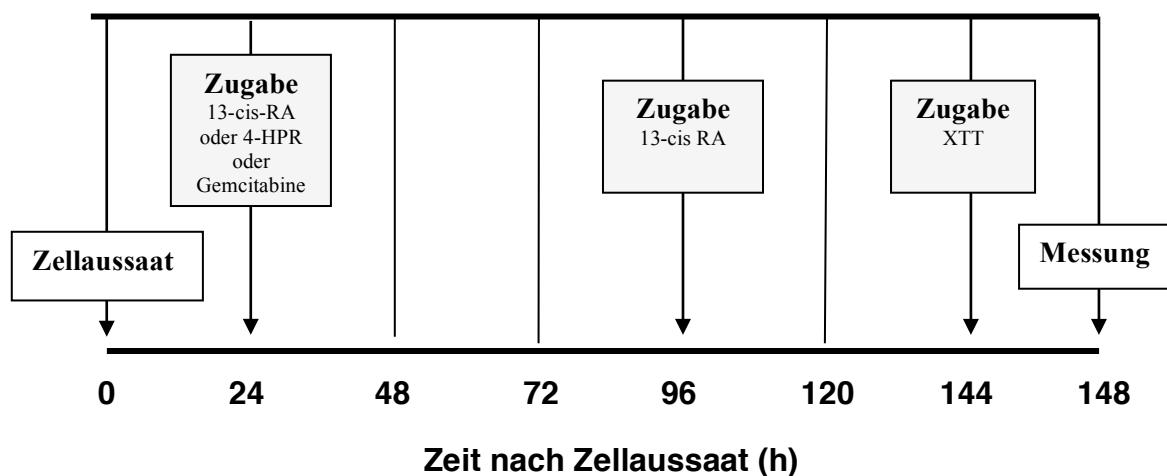


Abb. 10: Versuchsansatz bei alleiniger Applikation der Testsubstanzen (13-cis-RA, 4-HPR und Gemcitabin)

Alle Versuche wurden zeitlich unabhängig dreimal wiederholt. Aus den sich ergebenden Messwerten wurden Mittelwerte berechnet. Die Werte der mit den verschiedenen Substanzen inkubierter Proben wurden in % der Kontrollwerte (Proben ohne Testsubstanzen) ausgedrückt.

2.7.2 Kombinationsversuche

Aufgrund der ausgeprägteren zytotoxischen Effekte von 4-HPR und dessen geringere klinische Toxizität im Vergleich zu 13-cis-RA wurde diese Substanz für die kombinierte Applikation mit Gemcitabin ausgewählt. Die Applikation von 4-HPR und Gemcitabin wurde einmalig 24 Stunden nach Zellaussaat durchgeführt. Dabei wurden sämtliche Konzentrationen der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR (0-10 μ M) mit allen Konzentrationen der Dosis-Wirkungs-Kurve von Gemcitabin (0-10 μ M) miteinander kombiniert. Pro Konzentrationskombination wurden jeweils vier Wells auspipettiert. Zum Ausgleich der möglichen unterschiedlichen zytotoxischen Effekte der Einzelsubstanzen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auspipettierens wurde jeder Versuch doppelt angesetzt: zunächst Einpipettieren von 4-HPR, dann nach 1h Gabe von Gemcitabin (4-HPR \rightarrow Gemcitabin) und am selben Tag in umgekehrter Reihenfolge (Gemcitabin \rightarrow 4-HPR). Dieser komplexe Versuchsansatz wurde jeweils dreimal zu unabhängigen Zeitpunkten wiederholt. Eingesetzte Zelllinien, Volumina und Materialien sind identisch zu den Versuchen bei alleiniger Applikation der Testsubstanzen.

Tab. 11: Konzentrationen der Testsubstanzen in den Kombinationsversuchen (* Gem = Gemcitabin)

	Konzentrationen											
Gem (μ M)*	0,0	0,1	0,15	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	3,0	5,0	10,0
HPR (μ M)	0,0	0,01	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	5,0	10,0	

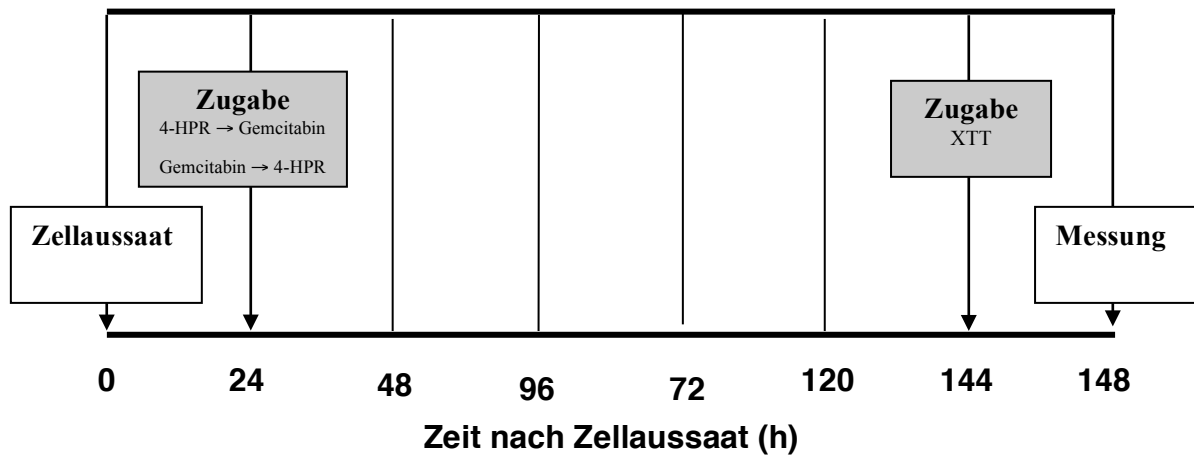


Abb. 11: Versuchsansatz der kombinierten Applikation der Testsubstanzen

3 Ergebnisse

3.1 Applikation der Einzelsubstanzen

Vor den Kombinationsversuchen wurden die Einzelversuche zur Dosisfindung für jede Substanz und für beide Zelllinien durchgeführt.

In den folgenden Tabellen (12-15) und Abbildungen (12-17) sind die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Versuche für Retinoide (13-cis-RA und 4-HPR) und Gemcitabin zusammengefasst:

3.1.1 Retinoid 13-cis-RA

Die Tabelle 12 gibt die Mittelwerte des Zellüberlebens (in %) mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall bei zunehmender Konzentration von 13-cis-RA an.

Tab. 12: Dosis-Wirkungs-Beziehung von 13-cis-RA

13-cis-RA	EJ28		RT112	
Konzentration (μM)	MW (Überleben) %	95%-KW	MW (Überleben) %	95%-KW
0	100	12,6	100	6,9
0,1	92	10,5	94	6,8
1	92	11,6	84	9,7
5	96	10,3	-	-
7,5	98	8,9	-	-
10	85	20,9	80	10,0
20	65	13,2	-	-
25	-	-	72	7,2
30	61	13,6	-	-
40	33	9,0	-	-
50	11	3,3	69	8,6
60	11	2,0	58	11,6
70	7	1,5	23	5,2
80	7	1,4	21	5,2
100	4	0,5	7	1,3

MW = Mittelwert; 95%-KW = 95%-Konfidenzwert

Die nachfolgenden Abbildungen 12 und 13 zeigen die grafische Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung für 13-cis-RA in den Zelllinien EJ-28 und RT112.

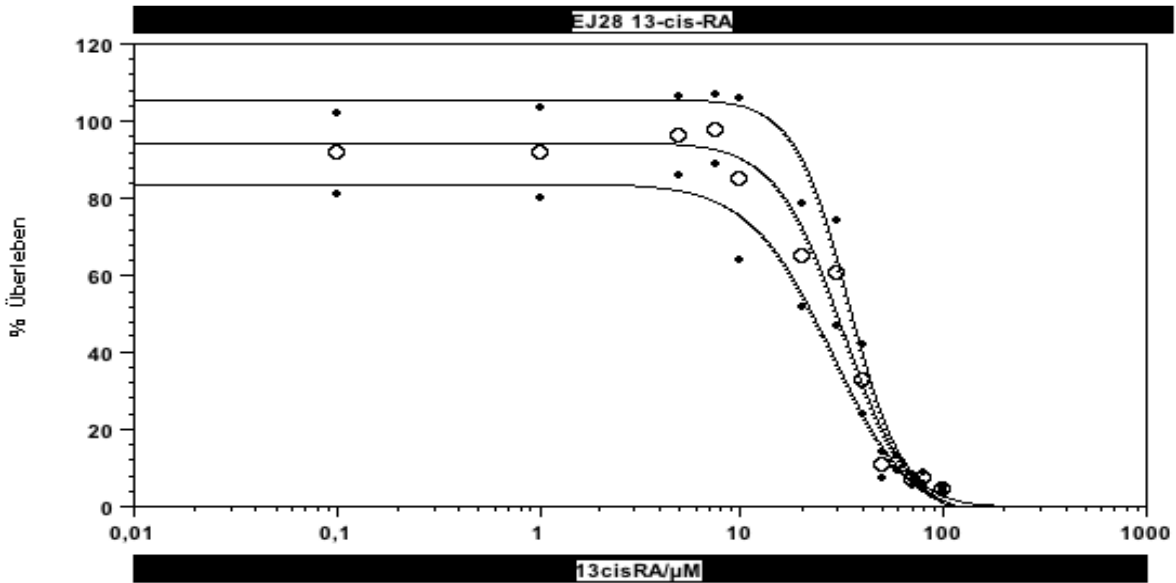


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Beziehung für 13-cis-RA in EJ28-Zellen

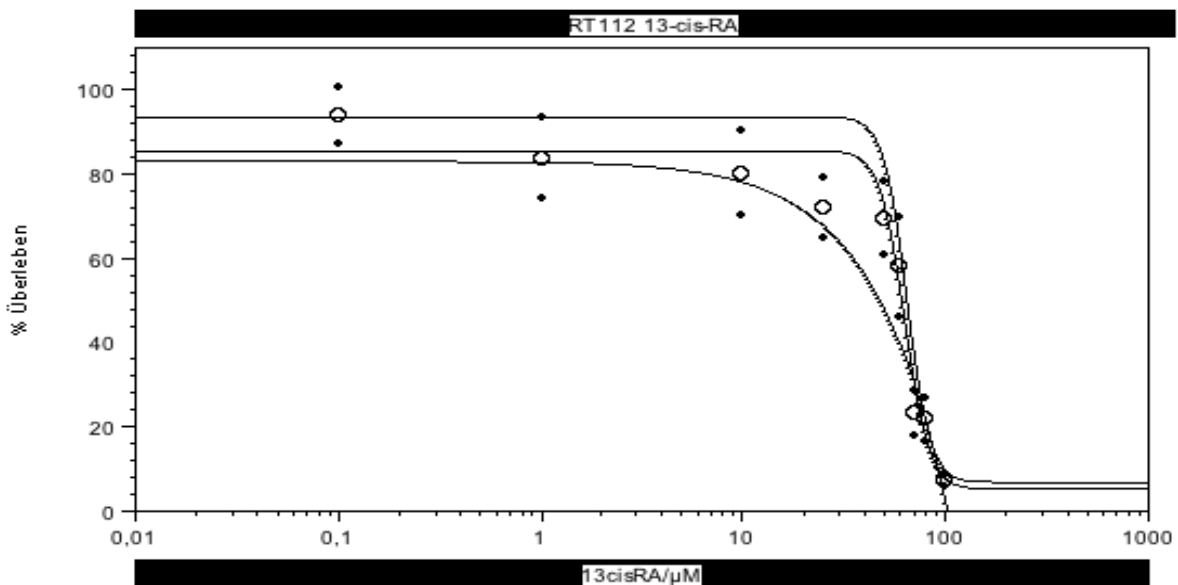


Abb. 13: Dosis-Wirkungs-Beziehung für 13-cis-RA in RT112-Zellen

3.1.2 Retinoid 4-HPR

Die Tabelle 13 gibt die Mittelwerte des Zellüberlebens (in %) mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall bei zunehmender Konzentration von 4-HPR wieder.

Tab. 13: Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4-HPR

4-HPR Konzentration (μM)	EJ28		RT112	
	MW (Überleben) %	95%-KW	MW (Überleben) %	95%-KW
0	100	7,4	100	7,6
0,01	93	4,5	96	8,0
0,1	91	5,4	88	10,0
0,25	-	-	86	11,0
0,5	-	-	79	13,5
1,0	94	8,4	70	5,8
1,5	-	-	64	5,4
2,0	-	-	50	8,6
2,5	30	10,0	-	-
3,0	-	-	34	5,6
5	15	6,2	15	1,4
7,5	1,5	0,3	-	-
10	2,0	0,6	1,4	0,7
15	2,4	0,4	-	-
20	3,3	0,3	-	-

MW = Mittelwert; 95%-KW = 95%-Konfidenzwert

Die Abbildungen 14 und 15 die Dosis-Wirkungsbeziehung für 4-HPR in den Zelllinien EJ-28 und RT112 grafisch dar.

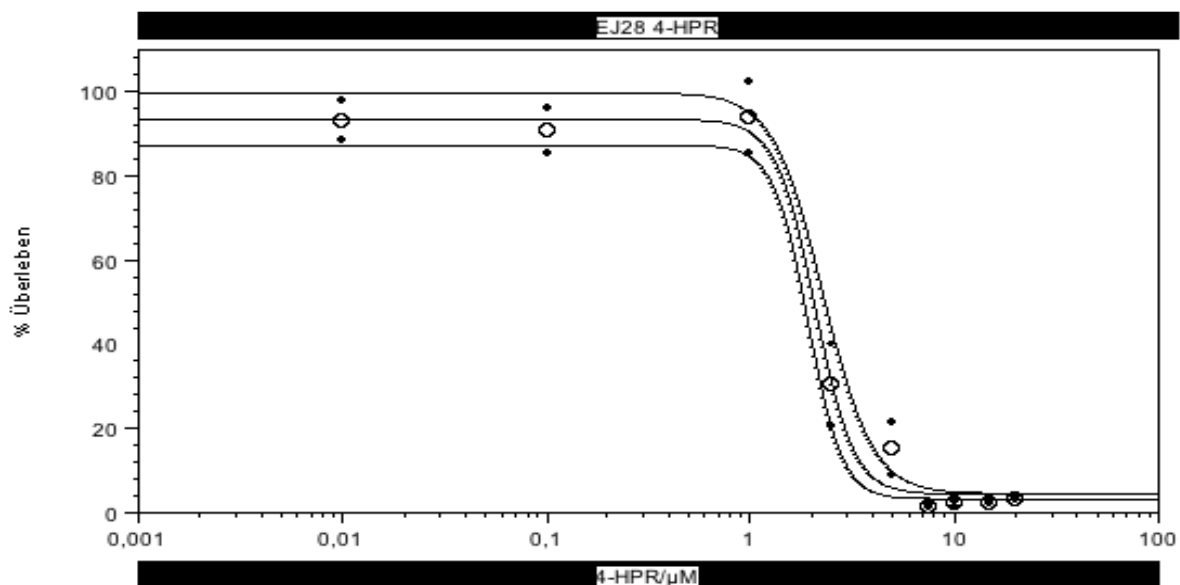


Abb. 14: Dosis-Wirkungs-Beziehung für 4-HPR in EJ28-Zellen

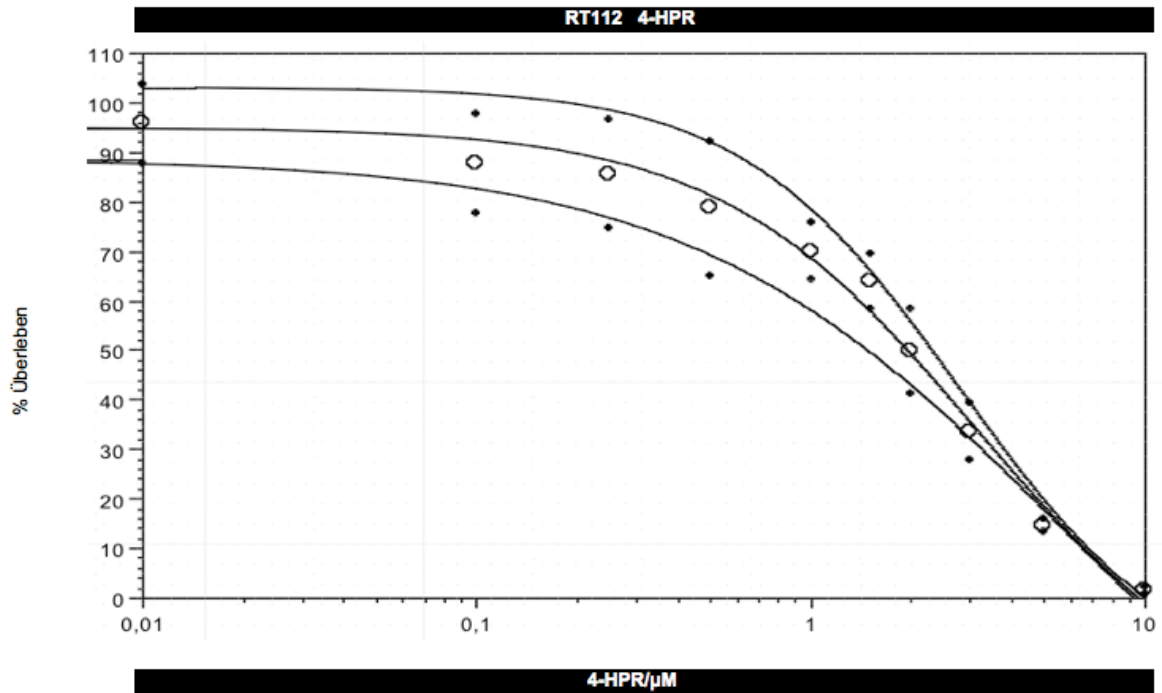


Abb. 15: Dosis-Wirkungs-Beziehung für 4-HPR in RT112-Zellen

3.1.3 Gemcitabin

In nachfolgender Tabelle (Tab. 14) sind die Mittelwerte des Zellüberlebens (in %) mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall bei zunehmender Konzentration von Gemcitabin aufgeführt.

Tab. 14: Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gemcitabin

Gemcitabin Konzentration (μM)	EJ28		RT112	
	MW (Überleben) %	95%-KW	MW (Überleben) %	95%-KW
0	100	8,7	100	10,6
0,001	106	17,6	95	8,8
0,01	104	13,5	96	7,0
0,1	102	11,5	92	10,1
0,25	92	11,1	104	12,1
0,5	76	9,2	94	7,7
0,6	63	17,2	-	-
0,7	52	12,6	-	-
0,75	41	10,4	90	14,1
0,8	45	6,6	-	-
0,9	40	6,1	-	-
1,0	22	9,7	80	8,7
1,5	5	2,3	50	4,4
2,0	3	0,6	31	4,7
2,5	4	2,3	19	1,6
3,0	-	-	12	2,8
4,0	-	-	9	1,0
5,0	3	1,5	6	1,2
10	1	0,3	3	0,9
20	-	-	5	0,3

MW = Mittelwert; 95%-KW = 95%-Konfidenzwert

Die folgenden Abbildungen 16 und 17 stellen die Dosis-Wirkungsbeziehung für Gemcitabin in den Zelllinien EJ28 und RT112 dar.

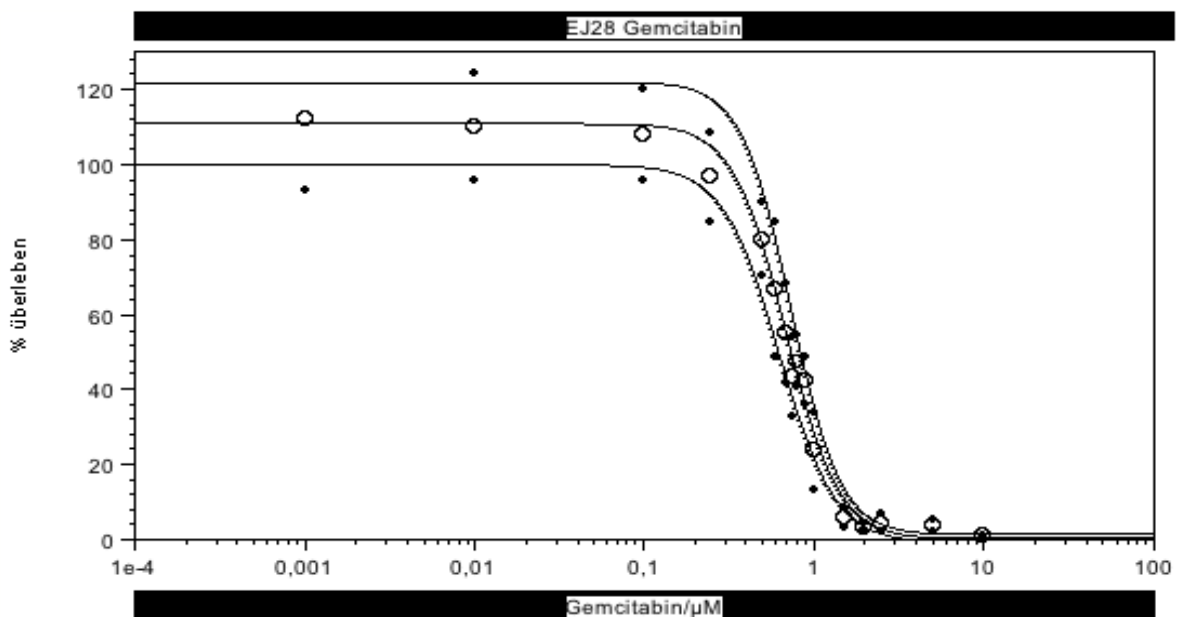


Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Gemcitabin in EJ28-Zellen

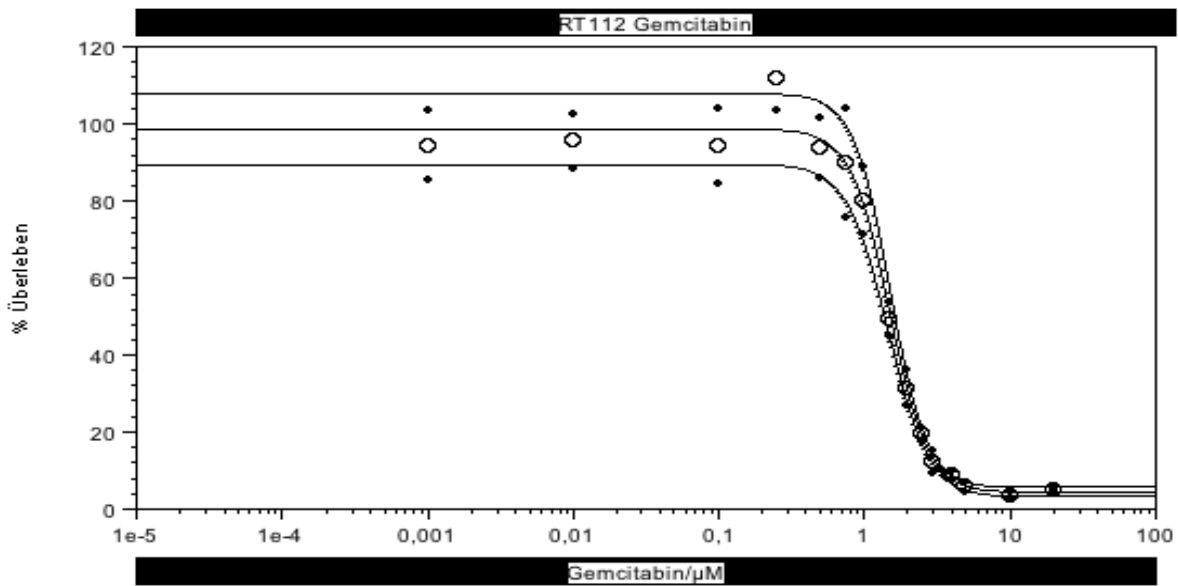


Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Gemcitabin in RT112-Zellen

Die IC50-Werte der Einzelsubstanzen der Versuche zur Dosisfindung und deren 95%-Konfidenzintervall sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst:

Tab.15: IC50-Werte der Testsubstanzen

Zelllinie	MW 13-cis-RA (95%-KI)	MW 4-HPR (95%-KI)	MW Gemcitabin (95%-KI)
EJ 28	34 µM (28,9-38,5 µM)	2,1 µM (1,4-2,4 µM)	0,72 µM (0,66-0,76 µM)
RT 112	61 µM (53-68 µM)	2,45 µM (2,2-2,7 µM)	1,54 µM (1,4-1,64 µM)

MW = Mittelwert; 95%-KI = 95%-Konfidenzintervall

Aufgrund der bestimmten IC50-Werte wurden die Konzentrationsintervalle der einzelnen Substanzen in den folgenden Kombinationsversuchen festgesetzt.

Hinsichtlich der IC50-Werte ist das Retinoid 4-HPR im Vergleich zu 13-cisRA in beiden Zelllinien signifikant zytotoxischer wirksam. Hinsichtlich beider Retinoide ist die schlechter differenzierte Zelllinie EJ28 sensitiver im Vergleich zur besser differenzierten Linie RT112. Dies dokumentieren die unterschiedlichen IC50-Werte (34 μ M vs. 61 μ M bzw. 2,1 μ M vs. 2,45 μ M).

Ähnlich verhält sich das Ansprechen der Zelllinien gegenüber Gemcitabin. Die Zellen der Linie EJ28 sind gegenüber Gemcitabin signifikant sensitiver als die Zellen der Linie RT112 (0,72 μ M vs. 1,54 μ M).

3.2 Kombinierte Applikation

Aufgrund der besseren Zytotoxizität von 4-HPR in vitro und der besseren klinischen Verträglichkeit erfolgten die Kombinationsversuche von Gemcitabin mit dem Retinoid 4-HPR.

Die nachfolgenden Tabellen und Grafiken stellen die Ergebnisse der kombinierten Applikation von 4-HPR und Gemcitabin in Form der Angaben des Zellüberlebens in Prozent dar. Aufgrund der langen Zeitdauer des Pipettiervorganges sind die Ergebnisse hinsichtlich der Reihenfolge der applizierten Substanzen einzeln dargestellt: Applikation von 4-HPR gefolgt von Gemcitabin (4-HPR \rightarrow Gem) bzw. Applikation von Gemcitabin gefolgt von 4-HPR (Gem \rightarrow 4-HPR). Die Darstellungen erfolgen für jede Zelllinie getrennt.

3.2.1 Kombinierte Applikation in der Zelllinie RT112

- **Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin**

Die Tabellen 16-18 sowie die Abbildungen 18 und 19 stellen die Ergebnisse der kombinierten Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in der Linie RT112 dar.

Die Tabelle 16 zeigt die absoluten Mittelwerte (in %) der Überlebensraten von RT112-Zellen bei Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin.

Tab. 16: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in RT112-Zellen

4-HPR (μM)	Gemcitabin (μM)					
	0	0,15	0,25	0,5	0,75	1
0	100	53,2	17,7	16,5	5,9	4,9
0,01	97,6	52,4	23,1	20,4	8,3	5,5
0,1	92,5	44,9	22,2	20,8	7,2	4,1
0,25	89,5	50,9	22,2	19,4	8,5	5,1
0,5	87,2	56,3	21,3	22,3	8,7	5,8
1	70,4	44,9	28,9	25,9	10,9	7,7
1,5	71,8	46,5	31,6	30,2	8	9,6
2	69,4	47,7	33,4	28,7	13,3	8,7
3	38,8	31,6	21,3	21,9	12,9	8,2
5	17,5	10,9	11,6	13	7,3	7,3
10	2,4	3,3	1,9	2,7	2,7	3,6

In Abbildung 18 stellt die oberste Kurve die Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4-HPR ohne Gemcitabin dar. Die darunter verlaufenden Kurven stellen die Ergebnisse der Kombination mit den zugegebenen Konzentrationen von Gemcitabin dar.

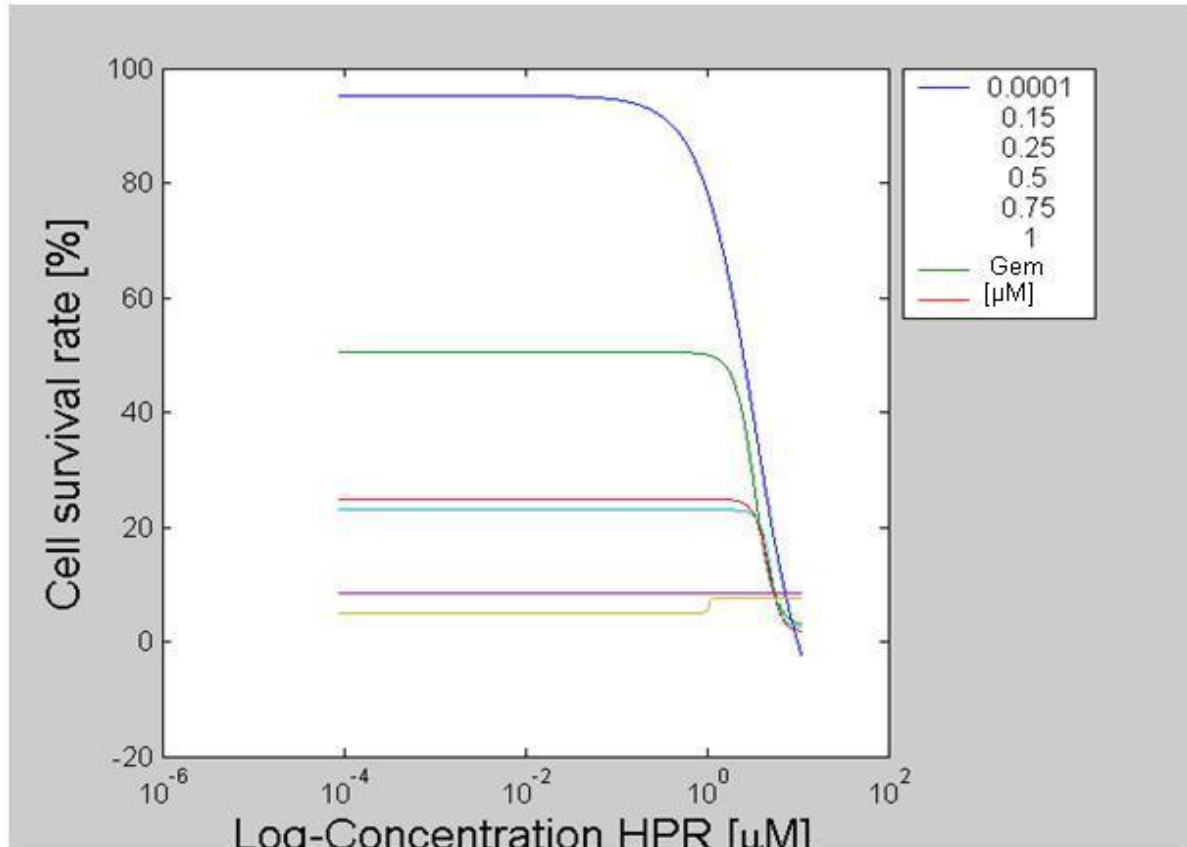


Abb. 18: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von 4-HPR (μM) zeitlich gefolgt von Gemcitabin (μM) in RT112-Zellen.

Die nachfolgenden Tabellen 17 und 18 zeigen die in Tabelle 16 dargestellten Daten mit 95%-Konfidenzintervallen mit den mittels des speziell entwickelten Statistikprogrammes ermittelten prädiktiven Werten für Minimum und Maximum. Hierbei gilt: Wenn das 95%-Konfidenzintervall für eine definierte Konzentration der jeweiligen Substanz innerhalb der Grenzen des prädiktiven Minimums und des prädiktiven Maximums liegt, dann wird der jeweilige Datenpunkt als statistisch signifikant additiv bezeichnet. Liegen beide Werte des Konfidenzintervalls über dem prädiktiven Maximum, so gilt der Datenpunkt als statistisch signifikant antagonistisch. Sind beide Werte des Konfidenzintervalles unterhalb des prädiktiven Minimums, so ist der Datenpunkt als statistisch signifikant synergistisch zu bewerten.

Tab. 17: Relative IC50-Werte für Gemcitabin (Gem) mit 95%-Konfidenzintervallen in Abhängigkeit von 4-HPR bei kombinierter Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in RT112-Zellen

4-HPR (µM)	4-HPR (%)	IC 50 Gem	IC 50 Gem (%)	KI-u	KI-o	prädikt. Minimum	prädikt. Maximum
0.000	0.000	0.155	1.000	0.552	1.491	1.000	1.000
0.010	0.004	0.153	0.988	0.325	1.810	0.887	0.950
0.100	0.040	0.116	0.748	0.049	1.744	0.732	0.941
0.250	0.099	0.149	0.964	0.348	1.712	0.620	0.920
0.500	0.198	0.162	1.045	0.426	1.818	0.506	0.878
1.000	0.397	0.084	0.544	0.000	1.540	0.355	0.779
1.500	0.595	0.098	0.633	0.000	3.073	0.242	0.669
2.000	0.793	0.103	0.662	0.000	1.681	0.146	0.537
3.000	1.190	0.000	0.000	0.000	0.672	0.000	0.000
5.000	1.984	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10.000	3.967	0.000	0.000	0.000	1.912	0.000	0.000

Tab. 18: Relative IC50-Werte für 4-HPR mit 95%-Konfidenzintervallen in Abhängigkeit von Gemcitabin (Gem) bei kombinierter Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in RT112-Zellen

Gem (µM)	Gem (%)	IC 50 4-HPR	IC 50 4-HPR (%)	KI-u	KI-o	prädikt. Minimum	prädikt. Maximum
0.000	0.001	2.521	1.000	0.815	1.269	1.000	1.000
0.150	0.968	1.065	0.422	0.000	0.888	0.000	0.000
0.250	1.613	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.500	3.225	0.000	0.000	0.000	1.482	0.000	0.000
0.750	4.838	0.000	0.000	0.000	Inf	0.000	0.000
1.000	6.451	0.000	0.000	0.000	0.647	0.000	0.000

Das IC50-Isobologramm zeigt die Effekte und Wechselwirkungen von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in der Zelllinie RT112 (Abb. 19).

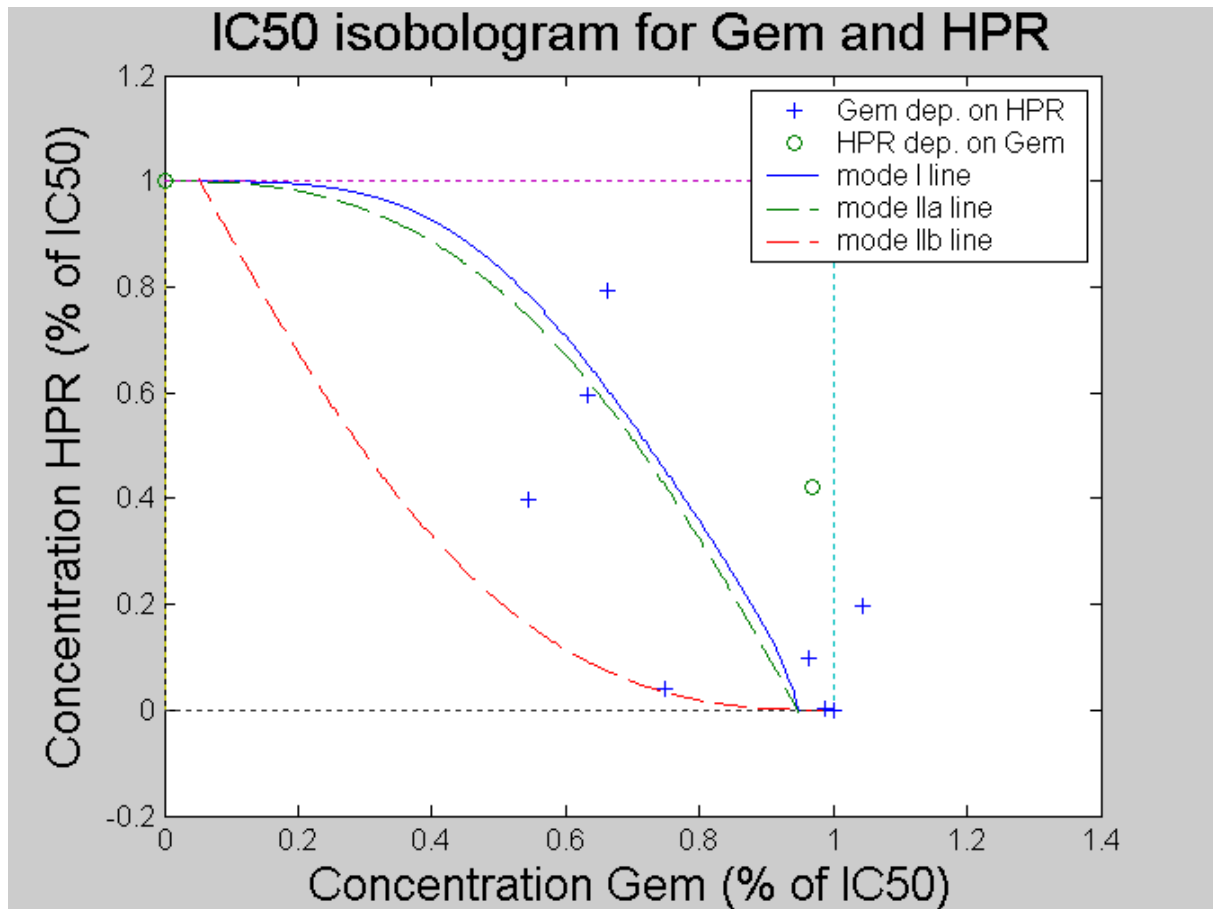


Abb. 19: IC50-Isobologramm der Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in RT112-Zellen

- **Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR**

Die Tabellen 19-21 sowie die Abbildungen 20 und 21 stellen die Ergebnisse der kombinierten Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in der Linie RT112 dar.

In Tabelle 29 werden die absoluten Mittelwerte (in %) der Überlebensraten von RT112-Zellen bei Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR wiedergegeben.

Tab. 19: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in RT112-Zellen

Gemcitabin (μM)	4-HPR/ μM									
	0	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2	3	5	10
0	100,0	81,6	44,5	51,4	37,8	65,2	41,9	24,7	24,2	5,0
0,1	95,0	54,0	37,8	60,4	55,4	65,3	37,5	22,3	20,5	3,8
0,15	96,6	48,6	42,9	51,1	58,9	62,7	33,2	23,6	20,8	4,7
0,25	85,1	28,4	40,0	36,6	49,6	62,8	34,3	15,1	16,9	-2,0
0,5	85,4	16,2	19,1	31,1	32,4	50,0	23,9	16,2	12,2	4,7
0,75	72,0	15,9	24,3	34,9	33,4	54,6	27,5	16,7	11,1	5,2
1	44,8	12,8	20,0	32,4	29,8	54,2	22,7	14,7	9,4	4,0
1,5	21,0	12,1	23,1	16,5	33,7	35,6	34,2	19,7	10,6	4,1
2	9,4	5,5	12,7	21,2	20,8	21,6	21,5	15,5	7,9	3,9
3	4,5	1,6	3,8	10,8	9,7	12,8	16,1	9,2	5,5	4,1
5	2,1	2,3	2,3	3,5	3,8	5,3	6,2	3,5	2,8	2,6
10	0,5	2,4	2,7	3,2	3,2	3,9	4,5	3,0	2,9	5,0

In Abbildung 20 zeigt die oberste Kurve die Dosis-Wirkungsbeziehung von Gemcitabin ohne 4-HPR. Die darunter verlaufenden Kurven stellen die Ergebnisse der Kombinationen mit den zugegebenen Konzentrationen von 4-HPR dar.

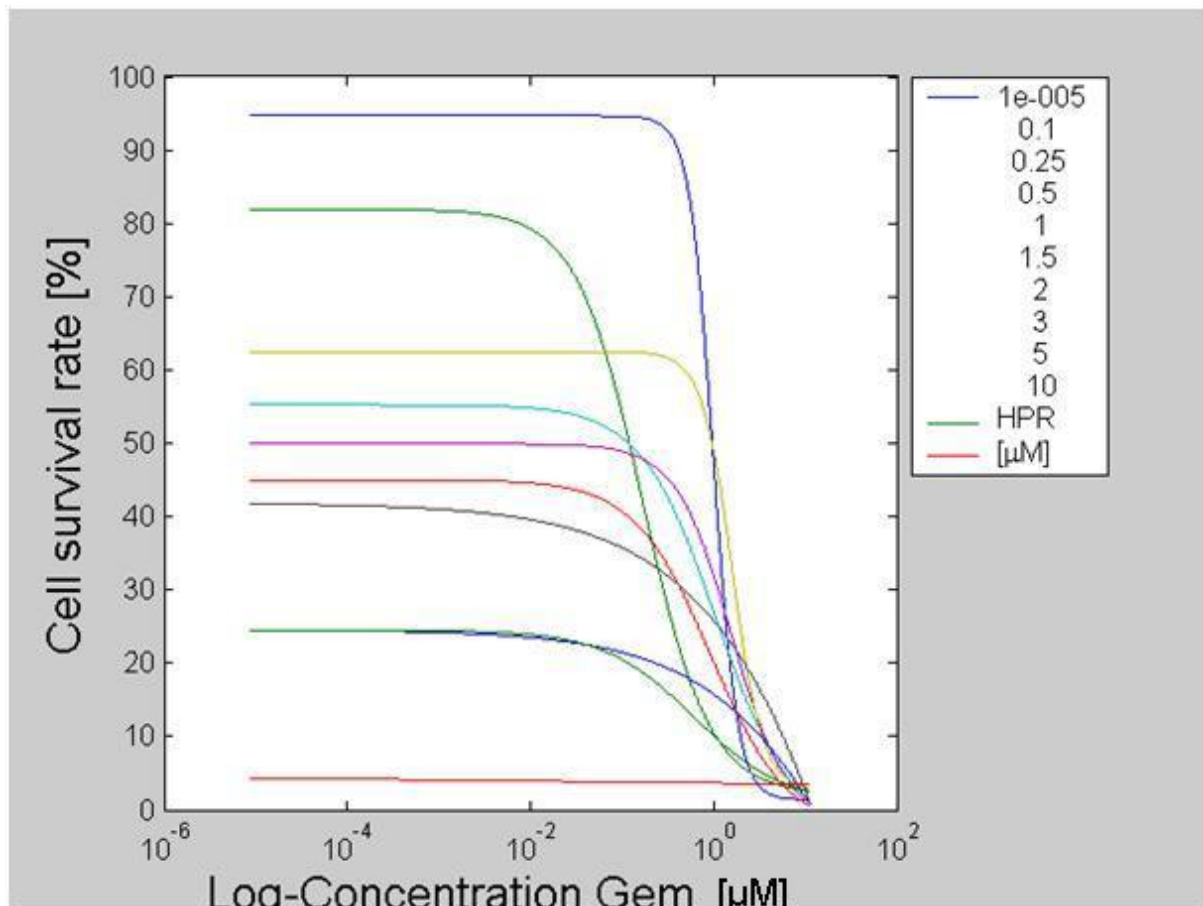


Abb. 20: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von Gemcitabin (μM) zeitlich gefolgt von 4-HPR (μM) in RT112-Zellen

In den Tabellen 20 und 21 werden die in Tabelle 19 dargestellten Daten mit den errechneten Werten für das prädiktive Minimum und prädiktive Maximum wiedergegeben.

Tab. 20: Relative IC50-Werte für Gemcitabin (Gem) mit 95%-Konfidenzintervall in Abhängigkeit von 4-HPR bei kombinierter Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in RT112-Zellen

4-HPR (µM)	4-HPR (%)	IC 50 Gem	IC 50 Gem (%)	KI-u	KI-o	prädikt. Minimum	prädikt. Maximum
0.000	0.000	0.969	1.000	0.919	1.085	1.000	1.000
0.100	0.127	0.120	0.124	0.095	0.150	0.194	1.000
0.250	0.318	0.000	0.000	0.000	0.053	0.096	1.000
0.500	0.635	0.119	0.122	0.000	0.331	0.006	0.920
1.000	1.271	0.000	0.000	0.000	0.599	0.000	0.000
1.500	1.906	0.964	0.994	0.768	1.229	0.000	0.000
2.000	2.541	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
3.000	3.812	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5.000	6.353	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10.000	12.707	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tab. 21: Relative IC50-Werte für 4-HPR mit 95%-Konfidenzintervall in Abhängigkeit von Gemcitabin (Gem) bei kombinierter Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in RT112-Zellen

Gem (µM)	Gem (%)	IC 50 4-HPR	IC 50 4-HPR (%)	KI-u	KI-o	prädikt. Minimum	prädikt. Maximum
0.000	0.000	0.787	1.000	0.011	3.259	1.000	1.000
0.100	0.103	0.652	0.829	0.001	3.716	0.301	1.000
0.150	0.155	0.499	0.634	0.000	3.083	0.188	1.000
0.250	0.258	0.137	0.174	0.000	2.541	0.062	1.000
0.500	0.516	0.002	0.002	0.000	13.901	0.001	0.998
0.750	0.774	0.002	0.002	0.000	0.386	0.000	0.910
1.000	1.032	0.000	0.000	0.000	3.741	0.000	0.000
1.500	1.547	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.000	2.063	0.000	0.000	0.000	0.807	0.000	0.000
3.000	3.095	0.000	0.000	0.000	Inf	0.000	0.000
5.000	5.158	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10.000	10.316	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Das IC50-Isobologramm zeigt die Effekte und Wechselwirkungen von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in der Zelllinie RT112 (Abb. 21).

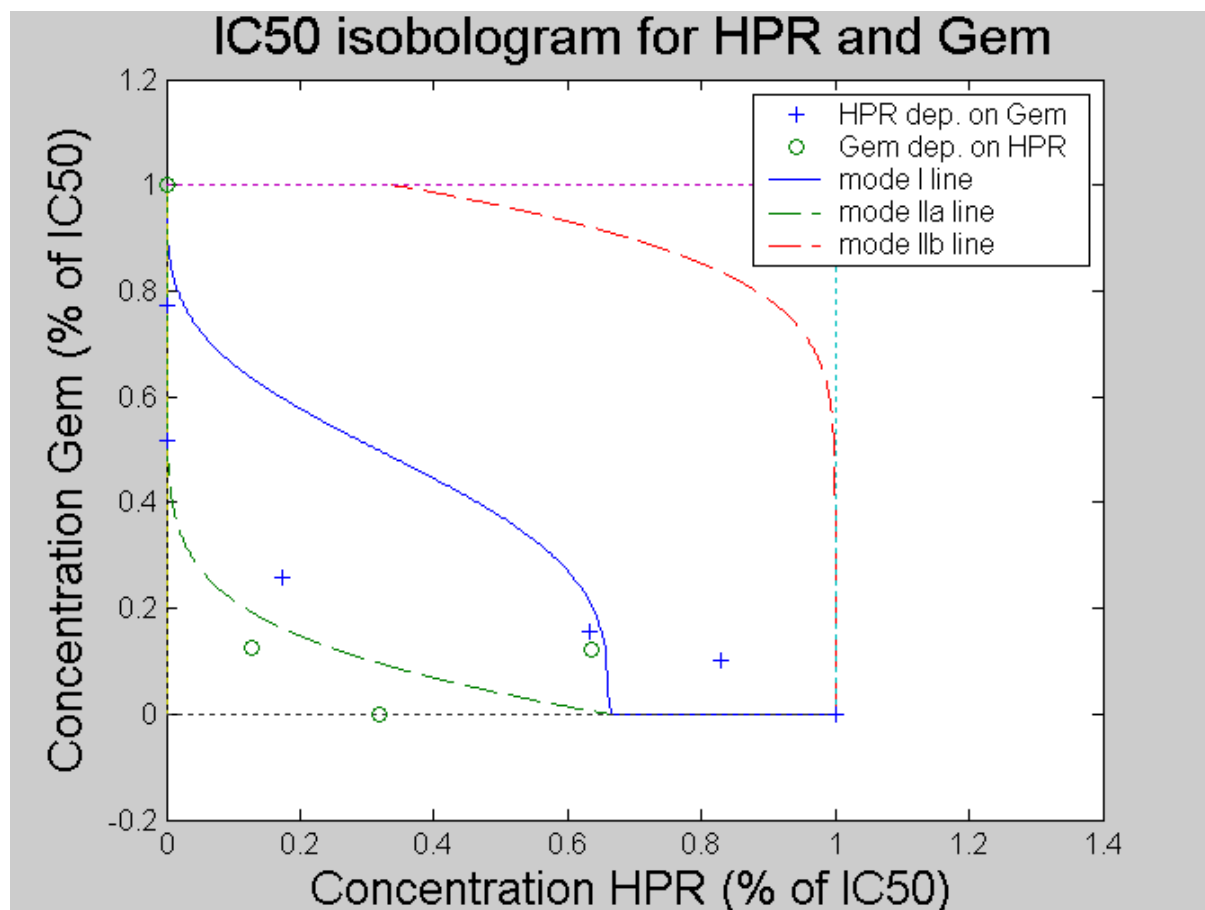


Abb. 21: IC50-Isobologramm der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in RT112-Zellen

In Tabelle 22 ist der biologische Effekt dieser Kombination dargestellt. Bei insgesamt 14 verwertbaren Datenpunkten weist die Kombination von 4-HPR und Gemcitabin in RT112 signifikant additiv antiproliferative Effekte auf. Dieser additive Effekt findet sich unabhängig von der zeitlichen Reihenfolge des Pipettierens der Substanzen (4-HPR → Gemcitabin vs. Gemcitabin → 4-HPR).

Tab. 22: Ergebnisse der kombinierten Applikation in der Zelllinie RT112

Zelllinie	Kombination und Applikationsreihenfolge	Anzahl Datenpunkte	Mittelwert Datenpunkte	Mittelwert prädiktives Minimum	Mittelwert prädiktives Maximum	biologische Interaktion
RT112	4-HPR → Gem	7	0,798	0,498	0,811	additiv
	Gem → 4-HPR	7	0,270	0,107	0,975	additiv

3.2.2 Kombinierte Applikation in der Zelllinie EJ28

- **Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin**

Die Tabellen 23-25 und die Abbildungen 22 und 23 stellen die Ergebnisse für die Kombination von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in der Zelllinie EJ28 dar.

In Tabelle 23 sind die absoluten Mittelwerte (in %) der Überlebensraten von EJ28-Zellen bei Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin wiedergegeben.

Tab. 23: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in EJ28-Zellen

4-HPR (μM)	Gemcitabin (μM)									
	0,00	0,005	0,01	0,025	0,05	0,10	0,20	0,25	0,50	1,00
0,00	100,00	98,05	97,29	101,19	103,90	91,18	61,94	57,30	-1,83	-2,10
0,01	97,59	92,66	97,03	97,45	99,43	88,39	79,49	60,89	1,36	0,39
0,10	90,59	86,81	90,74	89,34	97,55	87,31	76,78	55,23	1,51	0,69
0,25	91,01	82,10	89,38	91,20	96,88	83,16	65,96	53,50	1,73	0,39
0,50	85,31	84,31	88,81	87,00	93,58	81,80	66,30	50,08	1,91	0,08
1,00	71,60	76,56	78,23	80,56	90,38	70,96	61,58	53,63	2,46	0,21
1,50	42,64	62,38	66,50	63,83	73,25	62,15	56,89	48,79	4,45	0,24
2,00	25,25	51,29	52,74	53,13	59,83	49,66	44,95	42,21	5,43	0,60
3,00	13,71	33,63	33,09	34,59	45,80	31,36	30,40	28,06	14,31	2,31
5,00	13,91	27,80	29,19	29,54	32,08	25,36	26,15	24,16	26,68	8,58
10,00	12,50	30,98	31,38	30,46	31,20	29,35	27,85	31,21	23,34	11,65

In Abbildung 22 stellt die oberste Kurve die Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4-HPR ohne Gemcitabin dar. Die darunter verlaufenden Kurven geben die Ergebnisse der Kombination mit den zugegebenen Konzentrationen von Gemcitabin wieder.

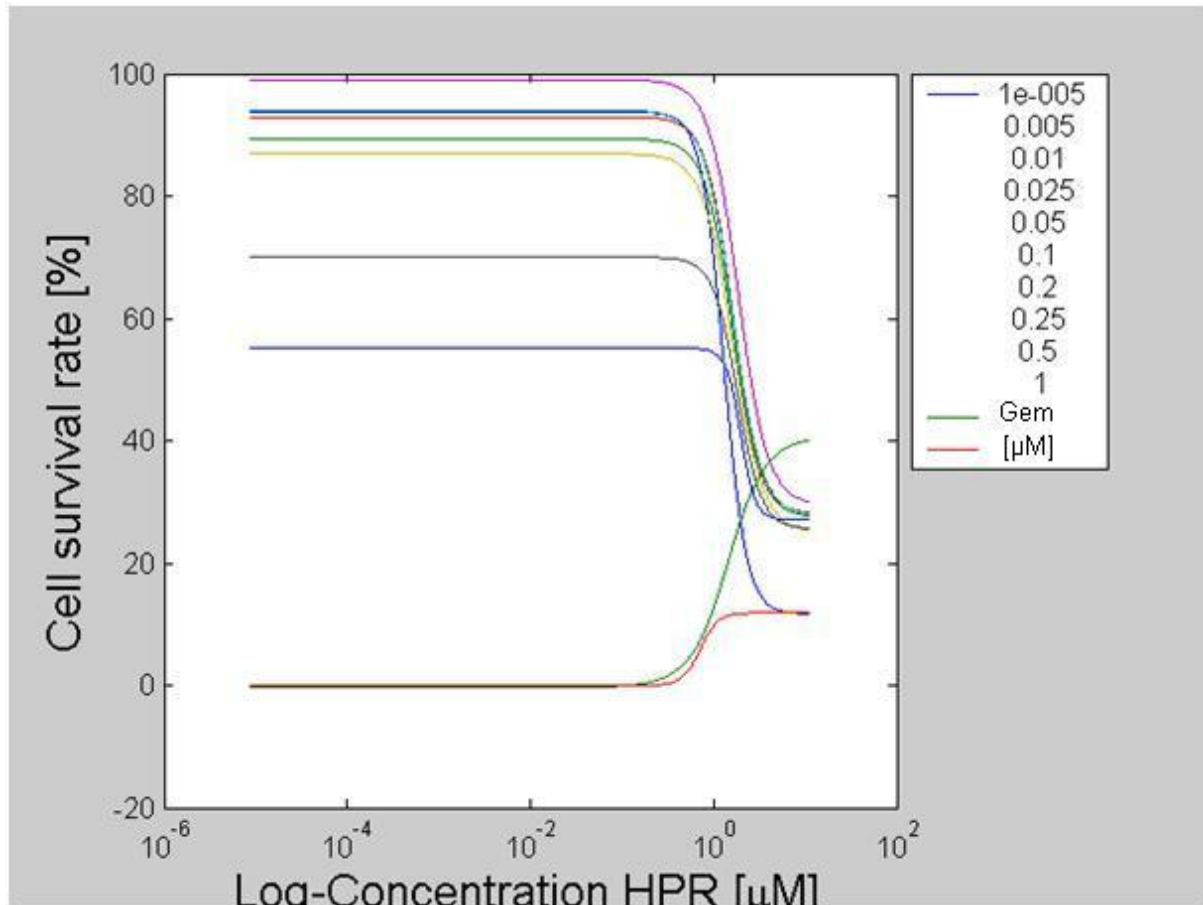


Abb. 22: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von 4-HPR (µM) zeitlich gefolgt von Gemcitabin (µM) in EJ28-Zellen

Die nachfolgenden Tabellen 24 und 25 zeigen die in Tabelle 23 dargestellten Daten mit 95%-Konfidenzintervallen mit den errechneten prädiktiven Werten für Minimum und Maximum.

Tab. 24: Relative IC₅₀-Werte für Gemcitabin (Gem) mit 95%-Konfidenzintervall in Abhängigkeit von 4-HPR bei kombinierter Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in EJ28-Zellen

4-HPR (µM)	4-HPR (%)	IC 50 Gem	IC 50 Gem (%)	KI-u	KI-o	prädikt. Minimum	prädikt. Maximum
0.000	0.000	0.249	1.000	0.887	1.177	1.000	1.000
0.010	0.007	0.272	1.089	1.013	1.254	0.929	0.995
0.100	0.075	0.260	1.042	0.984	1.183	0.872	0.942
0.250	0.186	0.252	1.010	0.903	1.211	0.773	0.929
0.500	0.373	0.247	0.990	0.919	1.104	0.593	0.903
1.000	0.745	0.252	1.010	0.843	1.359	0.224	0.662
1.500	1.118	0.244	0.977	0.673	1.681	0.000	0.000
2.000	1.490	0.000	0.000	0.000	1.750	0.000	0.000
3.000	2.236	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5.000	3.726	0.000	0.000	0.000	0.769	0.000	0.000
10.000	7.452	0.000	0.000	0.000	0.532	0.000	0.000

Tab. 25: Relative IC50-Werte für 4-HPR mit 95%-Konfidenzintervall in Abhängigkeit von Gemcitabin (Gem) bei kombinierter Applikation von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in EJ28-Zellen

Gem (µM)	Gem (%)	IC 50 4-HPR	IC 50 4-HPR (%)	KI-u	KI-o	prädikt. Minimum	prädikt. Maximum
0.000	0.000	1.342	1.000	0.900	1.100	1.000	1.000
0.005	0.020	1.968	1.467	1.228	1.846	0.972	1.000
0.010	0.040	2.041	1.521	1.334	1.784	0.947	1.000
0.025	0.100	2.051	1.528	1.307	1.859	0.878	0.999
0.050	0.201	2.553	1.903	1.699	2.179	0.769	0.993
0.100	0.401	1.884	1.404	1.228	1.653	0.566	0.937
0.200	0.802	1.709	1.273	0.906	1.747	0.156	0.584
0.250	1.003	1.507	1.123	0.806	1.420	0.000	0.000
0.500	2.005	0.000	0.000	0.000	0.173	0.000	0.000
1.000	4.010	0.000	0.000	0.000	0.747	0.000	0.000

Das IC50-Isobologramm stellt die Effekte und Wechselwirkungen von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in der Zelllinie EJ28 dar (Abb. 23).

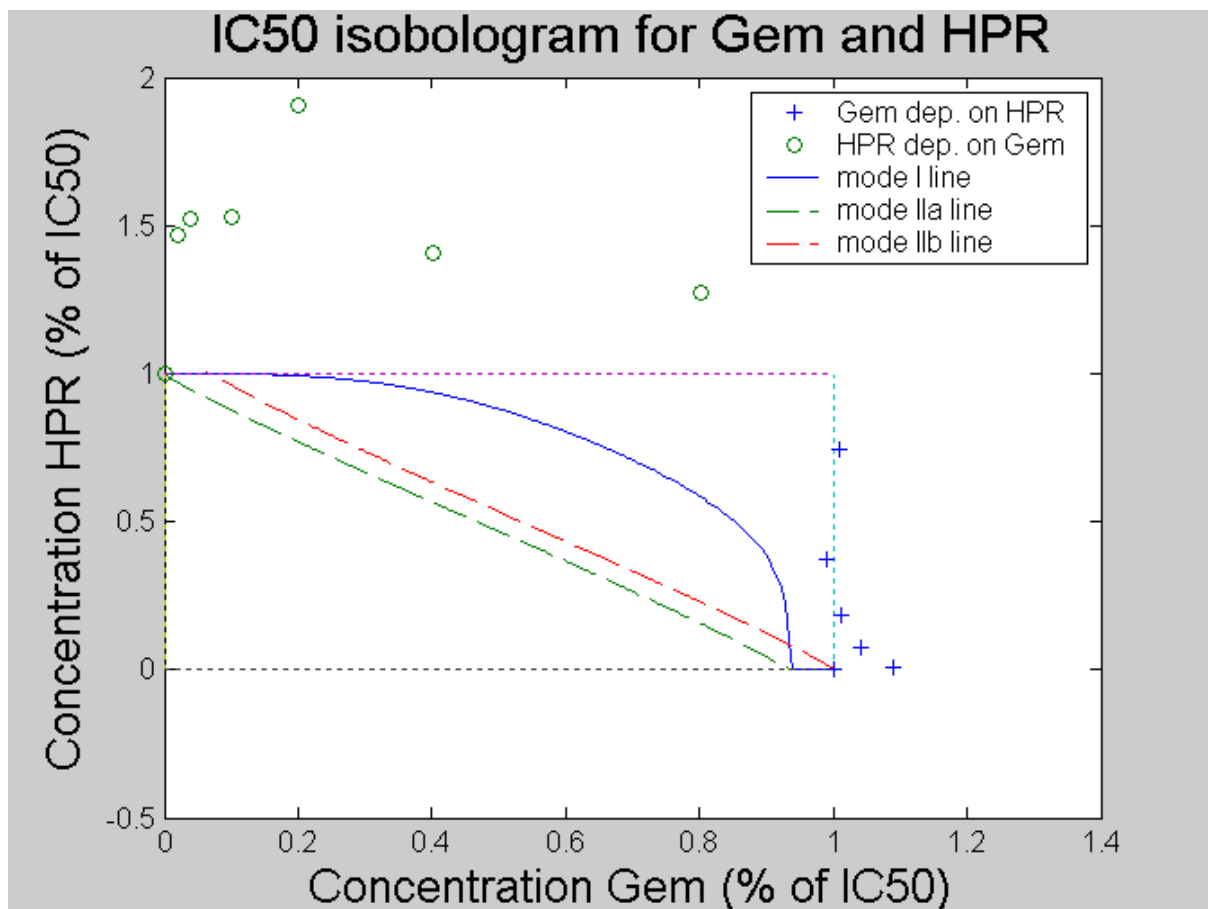


Abb. 23: IC50-Isobologramm der Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4-HPR zeitlich gefolgt von Gemcitabin in EJ28-Zellen

- **Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR**

Die Tabellen 26-28 sowie die Abbildungen 24 und 25 stellen die Ergebnisse der kombinierten Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in der Linie EJ28 dar.

Die Tabelle 26 zeigt die absoluten Mittelwerte (in %) der Überlebensraten von EJ28-Zellen bei Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR.

Tab. 26: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in EJ28-Zellen

Gemcitabin (μM)	4-HPR (μM)									
	0,00	0,01	0,10	0,25	0,50	1,00	1,50	2,00	3,00	10,00
0,00	100,00	76,43	85,09	78,29	67,93	67,65	50,83	39,99	20,56	10,40
0,01	84,33	74,19	80,40	72,43	71,54	63,29	62,03	53,88	44,56	28,40
0,05	64,21	66,73	71,34	67,59	58,78	62,45	62,96	43,89	36,59	31,58
0,10	60,20	61,10	68,88	66,80	59,16	62,83	61,43	48,08	39,76	27,78
0,15	43,61	54,63	59,18	60,63	51,96	54,80	53,65	48,33	39,31	22,68
0,25	12,65	36,00	36,39	42,03	35,63	48,13	44,18	38,95	33,11	25,93
0,50	-1,61	4,41	4,71	11,37	5,11	12,18	16,94	20,81	24,90	18,40
0,75	-2,04	0,66	0,88	1,00	0,78	2,37	3,49	5,24	15,29	11,45
1,00	-2,30	0,54	0,60	0,92	0,72	0,90	1,14	1,21	7,13	6,25
5,00	-2,20	0,20	0,38	0,40	0,20	0,32	0,45	0,10	0,36	0,30
10,00	-1,73	0,46	0,46	0,45	0,24	0,45	0,33	0,30	0,40	0,15

In Abbildung 24 stellt die oberste Kurve die Dosis-Wirkungsbeziehung von Gemcitabin ohne 4-HPR dar. Die darunter folgenden Kurven stellen die Ergebnisse der Kombination mit den zugegebenen Konzentrationen von 4-HPR dar.

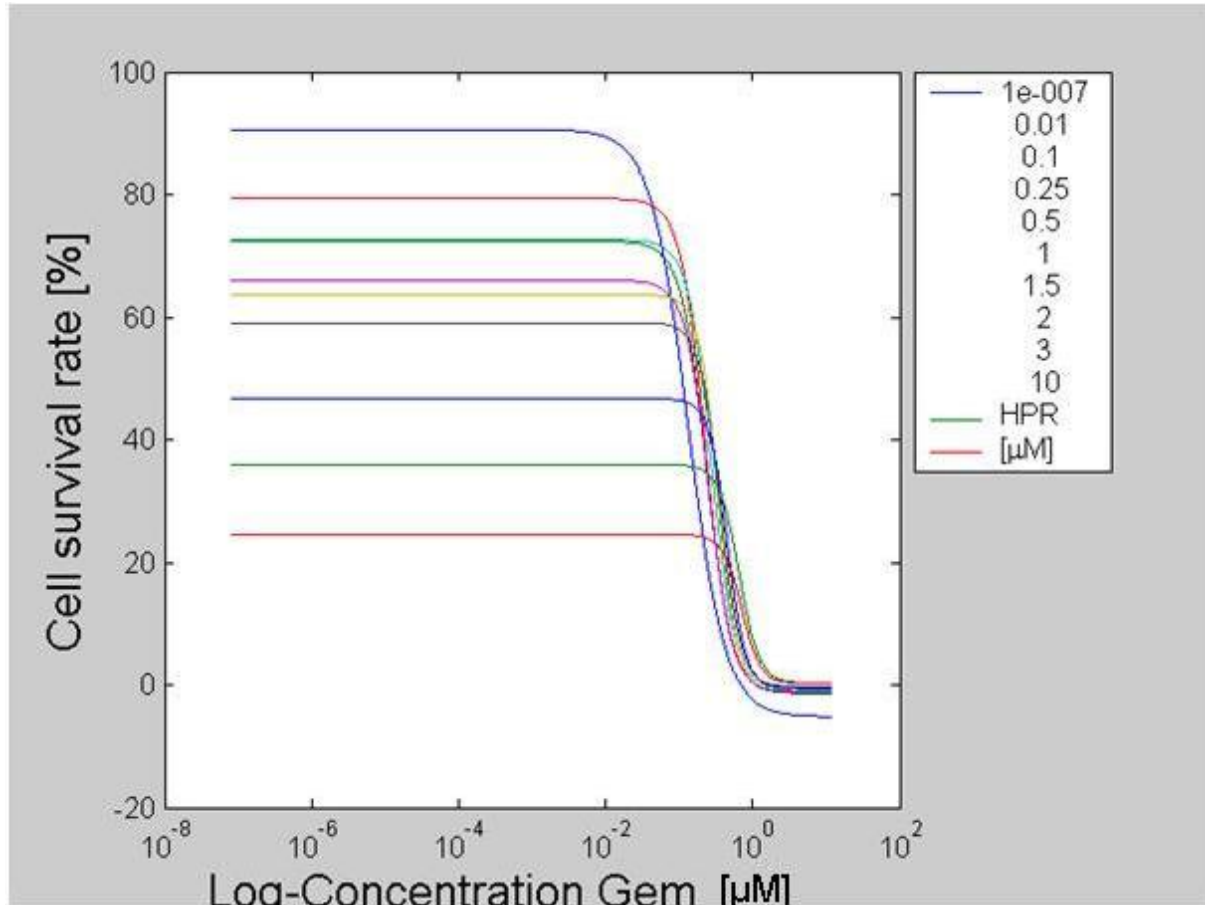


Abb. 24: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von Gemcitabin (µM) zeitlich gefolgt von 4-HPR (µM) in EJ28-Zellen

Die folgenden Tabellen 27 und 28 zeigen die in Tabelle 26 dargestellten Daten mit 95%-Konfidenzintervallen mit den mittels Statistikprogramm ermittelten prädiktiven Werten für Minimum und Maximum.

Tab. 27: Relative IC50-Werte für Gemcitabin (Gem) mit 95% Konfidenzintervall in Abhängigkeit von 4-HPR bei kombinierter Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in EJ28-Zellen

4-HPR (µM)	4-HPR (%)	IC 50 Gem	IC 50 Gem (%)	KI-u	KI-o	prädikt. Minimum	prädikt. Maximum
0.000	0.000	0.110	1.000	0.712	1.307	1.000	1.000
0.010	0.007	0.168	1.535	1.307	1.771	0.877	0.999
0.100	0.070	0.182	1.665	1.433	1.906	0.830	0.979
0.250	0.174	0.205	1.872	1.630	2.129	0.749	0.915
0.500	0.348	0.164	1.496	1.203	1.804	0.606	0.769
1.000	0.696	0.226	2.058	1.787	2.356	0.302	0.470
1.500	1.044	0.208	1.901	1.420	2.513	0.000	0.000
2.000	1.392	0.000	0.000	0.000	1.368	0.000	0.000
3.000	2.088	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10.000	6.959	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tab. 28: Relative IC50-Werte für 4-HPR mit 95% Konfidenzintervall in Abhängigkeit von Gemcitabin (Gem) bei kombinierter Applikation von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in EJ28-Zellen

Gem (µM)	Gem (%)	IC 50 4-HPR	IC 50 4-HPR (%)	KI-u	KI-o	prädikt. Minimum	prädikt. Maximum
0.000	0.000	1.437	1.000	0.623	1.495	1.000	1.000
0.010	0.091	2.501	1.741	1.302	2.574	0.916	1.000
0.050	0.456	1.860	1.294	1.073	1.495	0.523	0.715
0.100	0.912	2.083	1.449	1.103	1.899	0.000	0.176
0.150	1.369	1.913	1.331	0.000	2.928	0.000	0.000
0.250	2.281	0.000	0.000	0.000	0.208	0.000	0.000
0.500	4.562	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.750	6.843	0.000	0.000	0.000	2.458	0.000	0.000
1.000	9.124	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5.000	45.622	0.000	0.000	0.000	Inf	0.000	0.000
10.000	91.243	0.000	0.000	0.000	Inf	0.000	0.000

Das IC-50-Isobologramm zeigt die Effekte und Wechselwirkungen von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in EJ28-Zellen (Abb. 25).

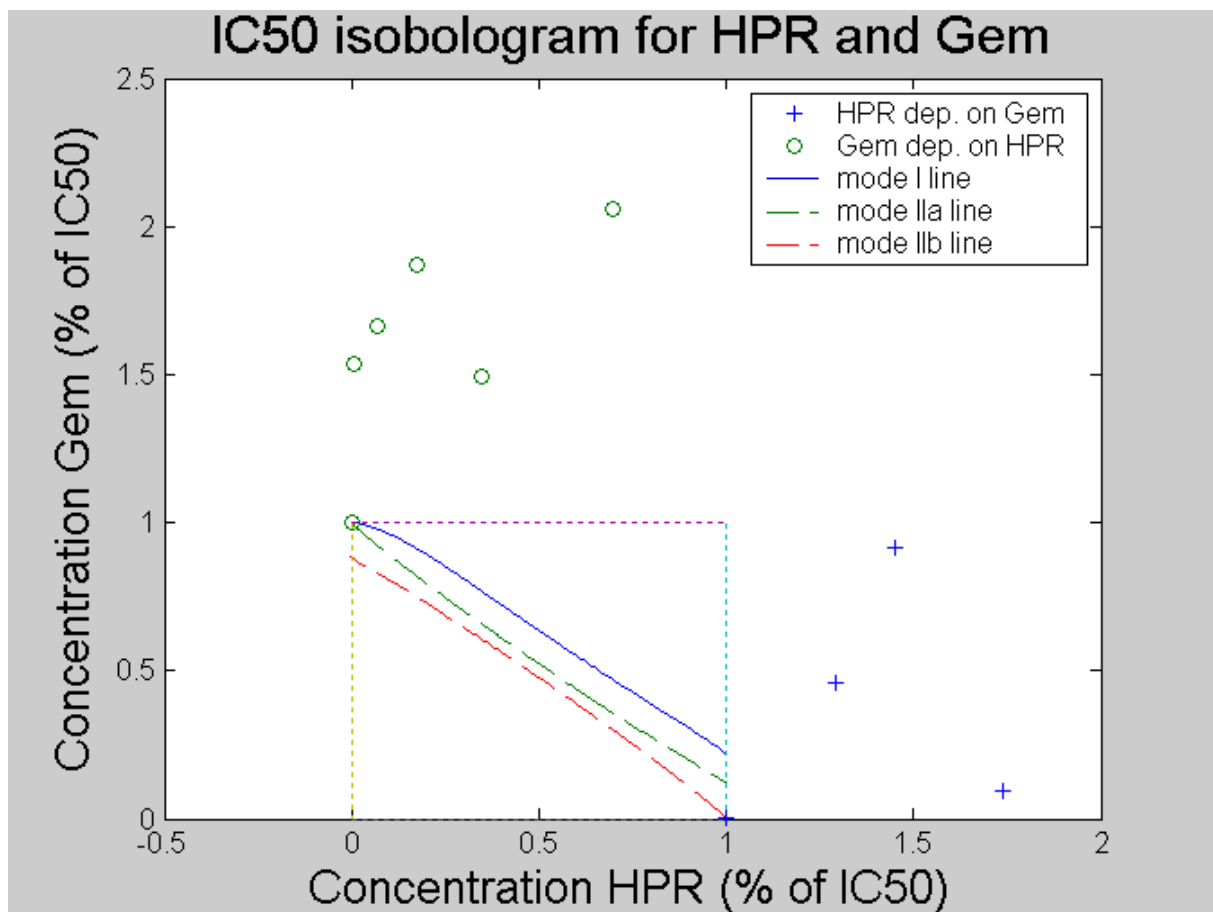


Abb. 25: IC50-Isobologramm der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gemcitabin zeitlich gefolgt von 4-HPR in EJ28-Zellen

In Tabelle 29 ist der biologische Effekt der Kombination dargestellt. Bei insgesamt 19 verwertbaren Datenpunkten weist die Kombination von 4-HPR und Gemcitabin in der Zelllinie EJ28 signifikant antagonistische Effekte auf. Dieser antagonistische findet sich unabhängig von der zeitlichen Reihenfolge des Pipettierens der Substanzen (4-HPR → Gemcitabin vs. Gemcitabin → 4-HPR).

Tab. 29: Ergebnisse der kombinierten Applikation in der Zelllinie EJ28

Zelllinie	Kombination und Applikationsreihenfolge	Anzahl Datenpunkte	Mittelwert Datenpunkte	Mittelwert prädiktives Minimum	Mittelwert prädiktives Maximum	biologische Interaktion
EJ28	4-HPR → Gem	11	1,294	0,698	0,904	antagonistisch
	Gem → 4-HPR	8	1,639	0,600	0,753	antagonistisch

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der kombinierten Applikation

Die Mittelwerte der gesammelten Datenwerte sowie die entsprechenden prädiktiven Minima und Maxima und die biologischen Interaktion werden in folgender Tabelle zusammenfassend dargestellt:

Tab. 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der Kombinationstherapie

Zelllinie	Kombination und Applikationsreihenfolge	Anzahl Datenpunkte	Mittelwert Datenpunkte	Mittelwert prädiktives Minimum	Mittelwert prädiktives Maximum	Biologische Interaktion
RT112	4HPR → Gem	7	0,798	0,498	0,811	additiv
	Gem → 4HPR	7	0,270	0,107	0,975	additiv
EJ28	4HPR → Gem	11	1,294	0,698	0,904	antagonistisch
	Gem → 4HPR	8	1,639	0,600	0,753	antagonistisch

Die Kombination der beiden Substanzen Gemcitabin und 4-HPR in RT112-Zellen wiesen additive Effekte auf. Das bedeutet, dass der erzielte antiproliferative Effekt der Summe der Einzeleffekte der beiden Substanzen entspricht.

Die Reihenfolge der Zugabe der beiden Substanzen hatte auf diesen Effekt keinen Einfluss.

Für die Zelllinie EJ28 konnten in den Kombinationsversuchen von Gemcitabin mit dem Retinoid 4-HPR vorwiegend antagonistische antiproliferative Effekte nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass der Wirkungsgrad der Kombination geringer ist als die Summe der Effekte bei Verabreichung der Einzelsubstanzen.

Die unterschiedliche Reihenfolge der Applikation der Substanzen zeigte auch in dieser Zelllinie keine unterschiedlichen Effekte.

4 Diskussion

Die Chemotherapie des Harnblasenkarzinoms stellt heutzutage unverändert eine wesentliche Option in der Therapie im fortgeschrittenen Krankheitsstadium und in der Verhinderung des Auftretens von Rezidiven dar. Leider sind die Ansprechraten und Nebenwirkungsspektren der in der Vergangenheit eingesetzten Chemotherapeutika nicht zufriedenstellend. Die Unterschiede bezüglich der Remissionsraten sind wesentlich durch unterschiedliche und verschiedenartige Remissionskriterien und in der Patientenselektion begründet. Die Heterogenität der Tumorzellen des Harnblasenkarzinoms spiegelt sich in einer unterschiedlichen Überlebensdauer wider, wobei die medianen 5-Jahres-Überlebensraten abhängig vom Tumorstadium in einem Intervall zwischen 96% und 6% liegen (Rübben 2009). Dieser zeitliche Aspekt in Zusammenhang mit dem Allgemeinzustand sowie der Begleiterkrankungen der meist älteren Patienten sind für Auswahl, Applikationsart und Therapieschema der verfügbaren Chemotherapeutika von grundlegender Bedeutung. Ziel der Forschung muss es sein, effektivere Substanzen auf diesem Gebiet zu finden. Grundsätzlich sind hierbei Kombinationstherapien mit unterschiedlichen Wirkmechanismen sinnvoll, da dadurch Resistenzentwicklungen seltener sind und durch Dosisreduktion auch die Nebenwirkungen vermindert werden können.

Vor dem klinischen Einsatz muss jedoch zunächst die Wirksamkeit neuer Therapieformen überprüft werden. Hierfür sind zunächst in-vitro-Versuchsreihen unverzichtbar. Diese werden unter standardisierten Bedingungen, welche jederzeit reproduzierbar sind, durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit an invasiven und nichtinvasiven humanen Blasenkarzinomzelllinien vergleichend untersuchten Effekte von Retinoiden (13-cis-RA und 4-HPR) und dem Chemotherapeutikum Gemcitabin wurden in standardisierten Zellkonzentrationen und standardisierten Wachstumsbedingungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte immer im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Die Ergebnisse waren in Wiederholungsversuchen gut reproduzierbar.

Die untersuchten Effekte der Retinoide 13-cis-RA und 4-HPR und des Antimetaboliten Gemcitabin und die kombinierte Applikation von Gemcitabin und 4-HPR in unterschiedlichen Applikationsreihenfolgen sollten klären, ob der Einsatz von Retinoiden in der Therapie des Harnblasenkarzinoms grundsätzlich sinnvoll sein könnte.

Dabei wurde die direkte antiproliferative Wirkung der Retinoide und des Antimetaboliten Gemcitabin und deren kombinierte Applikation in Tumorzellen unabhängig von einer möglichen indirekten Beeinflussung über die Aktivierung anderer Zellsysteme untersucht.

Zur Auswertung der biologischen Interaktion wurde die Methode der Isobogramme nach Steel and Peckham herangezogen. Da zum Zeitpunkt der Versuchsauswertung die Erstellung von Isobogrammen nur graphisch und analog möglich war, erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München die Entwicklung eines speziellen „Matlab“-basierten PC-Programmes zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung für die kombinierte Applikation von zwei Testsubstanzen in Zelllinien im in-vitro-Modell (sog. 2D-Isobogramme).

Anhand der Versuche konnte gezeigt werden, dass die beiden Retinoide 13-cis-RA und 4-HPR die Zellproliferation in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig hemmen. In äquimolaren Konzentrationen besitzt das synthetische Retinoid 4-HPR eine signifikant stärkere antiproliferative Wirkung als das natürliche Retinoid 13-cis-RA.

Im Vergleich der Wachstumshemmung zwischen den beiden Zelllinien war die schlecht differenzierte Zelllinie EJ28 sensitiver gegenüber beiden Retinoiden als die gut differenzierte Zelllinie RT112.

Durch die kombinierte Gabe von 4-HPR und Gemcitabin konnten in der Zelllinie RT112 additive Effekte unabhängig von der zeitlichen Applikationsreihenfolge nachgewiesen werden während für die Zelllinie EJ28 antagonistische Effekte - wiederum unabhängig von der Reihenfolge der Applikation - gezeigt werden konnten.

Die Effekte der Einzelsubstanzen Gemcitabin, 13-cis-RA und 4-HPR auf das Harnblasenkarzinom wurden bereits von einigen Arbeitsgruppen beschrieben: so konnte in Einzelversuchen mit Gemcitabin in einer Studie von van der Heijden 2005 auf RT112-Zellverbände ein IC₅₀-Wert von 21mM Gemcitabin ermittelt werden.

Durch den Einsatz des Retinoids 13-cis-RA konnten zytotoxische Effekte auf die Blasenzelllinien RT4 (gut differenziert), 5637 (mäßig differenziert) und T24 (schlecht differenziert) von der Arbeitsgruppe um Laaksovirta 1999 ab einer Konzentration von 3µg/ml 13-cis-RA (Zelllinien RT4 und 5637) und ab 30µg/ml 13-cis-RA (Zelllinie T24) nachgewiesen werden.

In-vivo konnte Thompson 1981 für 13-cis-RA präventive Effekte hinsichtlich des Harnblasenkarzinoms in Mäusen nachweisen. In klinischen Versuchen jedoch enttäuschte die orale Gabe von 13-cis-RA: so wurde aufgrund der hohen Nebenwirkungsrate und ausbleibender positiver Effekte eine Studie von Prout 1992 an Patienten mit oberflächlichem Harnblasenkarzinom (Ta und T1) und einer Gabe zwischen 0,5mg 13-cis-RA/kg KG/d und 1mg 13-cis-RA/kg KG/d beendet. Ebenfalls konnten in einer Studie von Trump 1994 entgegen positiver präklinischer Ergebnisse im klinischen Teil keine positiven Effekte von 13-cis-RA auf Harnblasentumore gezeigt werden.

Zou untersuchte im Jahre 2001 die Auswirkung der Applikation der Retinoide 4-HPR, 9-cis-RA und ATRA auf Blasen tumorzellen unterschiedlichen Gradings. Die Autoren berichten in-vitro von einer gegenüber ATRA und 9-cis-RA etwa 10-fach höheren Effektivität von 4-HPR mit einer fast vollständigen Wachstumshemmung ab einer Konzentration von 10µM für 4-HPR. Hierbei korrelierte der Effekt der Wachstumshemmung nicht mit dem Grading der Tumorzellen. In der vorliegenden Arbeit war 4-HPR ebenfalls wesentlich effektiver als 13-cis-RA. Allerdings lag der IC50-Wert für 4-HPR in der schlechter differenzierten Linie EJ28 mit 2,1 µM signifikant niedriger als in der besser differenzierten Linie RT112 (2,5 µM). Zou et al. begründeten die höhere Effektivität von 4-HPR neben der Induktion der Apoptose mit dem Retinoid-Rezeptor-unabhängigen Wirkungsmechanismus des 4-HPR sowie der Resistenz des RAR-β-Rezeptors gegenüber ATRA und 9-cis-RA (Zou 2001).

In einer klinischen Studie zeigte Decensi 1992 bei Patienten nach TURB bei oberflächlichen Harnblasenkarzinomen unter oraler Gabe von 200mg 4-HPR/d einen deutlichen Rückgang der Aneuploidie (58%→45%) im Vergleich zu einem Anstieg in der Vergleichsgruppe ohne Retinoidgabe (41%→59%). Kontrovers hierzu zeigte eine von Sabichi 2008 veröffentlichten Multicenter-Phase III-Studie bei Patienten nach TURB mit nichtinvasivem Harnblasenkarzinom (pTa, pT1, pTis) durch die orale Gabe von 200mg 4-HPR/d keine Verlängerung des rezidivfreien Intervalles (Rezidivrate nach 1 Jahr: Placebo 32,3% vs. 31,5% 4-HPR).

Die in dieser Arbeit verwendeten Retinoide 13-cis-RA und 4-HPR zeigten bereits in laborexperimentellen Arbeiten für weitere Tumorentitäten antiproliferative bzw.

zytotoxische Effekte in mit der vorliegenden Arbeit vergleichbaren Konzentrationsbereichen:

So konnte Tang 2011 in Retinoblastomzellen eine halbmaximale Proliferationshemmung (IC₅₀) bei einer Konzentration von 7,4 µM 13-cis-RA nachweisen. In der vorliegenden Arbeit lagen die IC₅₀-Werte für 13-cis-RA in RT112 bei 61 µM und in EJ28 bei 34 µM.

Das Retinoid 4-HPR zeigte in Small-Cell-Lung-Cancer-Zellen eine halbmaximale Proliferationshemmung in einer Konzentration zwischen 0,1µM und 3,0µM (Kalemkerian 1995). Treiber konnte 2002 für Prostatakarzinomzellen IC₅₀-Werte von 4-HPR zwischen 3,6µM (Zelllinie DU145) und 4,2µM (Zelllinie PC3) zeigen. Für Ovarialkarzinome, Cervixkarzinome und Endometriumkarzinome zeigte Sabichi 1998 hinsichtlich 4-HPR IC₅₀-Werte zwischen 0,9µM und 3µM. Für Glioblastomzellen lag in einer Studie von Smith 2011 der IC₅₀-Wert für 4-HPR zwischen 1,4µM und 6,9µM, für Mammakarzinomzellen zwischen 0,4µM und 2,2µM und für Rhabdoidtumorzellen zwischen 0,1µM und 2,2µM. Vergleichbare Ergebnisse zeigte die vorliegende Arbeit; hierbei lagen IC₅₀-Werte für 4-HPR in RT112-Zellen bei 2,45 µM und in EJ28-Zellen bei 2,1 µM.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals kombinatorische Effekte des Retinoids 4-HPR und Gemcitabin in Zelllinien des Harnblasenkarzinoms dargestellt werden; vergleichbare Studien existierten im Zeitraum der Versuchsdurchführung dieser Arbeit nicht.

Eine nur eingeschränkt vergleichbare, klinische Studie in der Therapie des lokal fortgeschrittenen, metastasierten und inoperablen Pankreaskarzinoms, in der die Effekte der Kombination von sechs Zyklen Gemcitabin (1000mg/m² Körperoberfläche am Tag 8, 15, 22) und dem Retinoid 13-cis-RA (1mg/kg Körpergewicht an den Tagen 1-14) näher untersucht wurden, erbrachte keine Verbesserung der Ansprechrate durch die Kombination der Substanzen (Michael 2007).

Eher enttäuschende Ergebnisse hinsichtlich des onkologischen Einsatzes von 13-cis-RA bzw. 4-HPR als Kombinationspartner zeigten mehrere Studien: so konnte Pillai entgegen vielversprechender in-vitro-Ergebnisse in einer klinischen Studie zur Therapie von Small-Cell-Lung-Cancer-Zellen keinen Benefit durch die Kombination von 13-cis-RA, dem Taxan Paclitaxel und Interferon-alpha nachweisen (Pillai 2014).

In der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms konnte Motzer in einer Phase-III-Studie keine Überlegenheit der Kombination von 13-cis-RA mit Interferon-alpha-2a im Vergleich zu Interferon-alpha-2a-mono zeigen (Motzer 2000).

Positive Ergebnisse zeigte die Kombination von 13-cis-RA und Interferon-alpha in der Therapie von Lymphomen (Tsimberidou 2004).

Ebenfalls konnten in der Behandlung von fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen der Haut bzw. der Zervix durch die Kombination von 13-cis-RA und Interferon-alpha synergistische Ergebnisse gezeigt werden, während in der Behandlung von Basalzellkarzinomen durch die Kombination kein Benefit nachgewiesen werden konnte (Sollitto 1996).

Im Rahmen des hier vorgestellten in-vitro-Modells zur potentiellen Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms zeigten die beiden Retinoide 4-HPR und 13-cis-RA eine antiproliferative Wirkung, die in der Linie RT112 durch die Kombination von 4-HPR mit Gemcitabin additive antiproliferative Effekte aufwies, während die kombinierte Applikation von 4-HPR und Gemcitabin in EJ28-Zellen antagonistische Effekte zeigte.

Der Effekt der kombinierten Applikation von 4-HPR und Gemcitabin ist in der vorliegenden Untersuchung abhängig vom Differenzierungsgrad der Tumorzelllinien.

Die Untersuchung der biologischen Effekte bei kombinierter Applikation von zwei potentiell zytotoxischen Substanzen mittels der Technik der 2D-Isobologramm-Analysen kann dazu beitragen, die jeweils besten Substanzkombinationen (additiv oder synergistisch) zu finden. Diese können dann in nachfolgenden in-vivo-Versuchen und klinischen Studien mit Patienten weiter untersucht werden.

Sehr aufwändig sind kombinierte Applikationen von 3 Testsubstanzen im Rahmen von in-vitro-Untersuchungen mit Darstellung in 3D-Isobogrammen.

Ferner ist vor allem in vivo die biologische Heterogenität von Tumoren zu beachten, da ein Tumor mehrere Foci unterschiedlicher Zelldifferenzierung aufweisen kann, welche wiederum unterschiedliches Ansprechen auf die Testsubstanzen aufweisen können.

Wie schwierig eine sinnvolle Substanzwahl sein kann, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da sich im gleichen Tumormodell (Urothelkarzinom) in

Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der untersuchten Zelllinien völlig unterschiedliche Ergebnisse fanden.

Die Kombination von Retinoiden mit Chemotherapeutika zur Minderung der Toxizität oder zur Steigerung der Effektivität stellt insgesamt ein vielversprechendes Behandlungskonzept dar. Das Retinoid 4-HPR wäre gegenüber 13-cis-RA aufgrund der besseren Effektivität *in vitro*, aber auch aufgrund der Literatur beschriebenen ausgeprägteren Antitumoreffekte *in vivo* und einem günstigeren Toxizitätsprofil zu bevorzugen. Auch sind nach einer Phase-I-Studie von Garaventa *in-vivo*-Konzentrationen von 4-HPR in einem Bereich zwischen 1µM und 15µM erreichbar (Garaventa 2003).

Der genaue Wirkmechanismus der Retinoide ist derzeit jedoch noch nicht hinreichend untersucht. So wird z.B. für das Retinoid 4-HPR die Annahme postuliert, dass für die Induktion der Apoptose mittels ROS ein Schwellenwert existiert, dessen Überschreiten die Apoptose einleitet (Oridate 1997). Sicherlich wird aber durch die Retinoide die Expression von weiteren Zytokinen, Zellzyklusregulatoren und apoptosesteuernden Proteinen moduliert, deren eingehende Erforschung sinnvoll und interessant ist.

Zusammenfassend liefern laborexperimentelle Daten Hinweise und Anhaltspunkte für den sinnvollen Einsatz von Retinoiden und Gemcitabin in der Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms. Dabei muss bedacht werden, dass die Beobachtungen *in vitro* nicht ohne weiteres auf Bedingungen *in vivo* übertragen werden können. Beim Vergleich der unterschiedlichen Substanzen müssen zusätzlich noch einige Aspekte beachtet werden, die die Verhältnisse *in vivo* betreffen. Hierzu zählt z.B. auch die unterschiedliche Pharmakokinetik und Applikationsarten der eingesetzten Substanzen.

Der kombinierte Einsatz von Retinoiden mit Substanzen, welche den Retinoidmetabolismus differenzierter beeinflussen, sowie die Entwicklung neuer Retinoide oder retinoidähnlicher Substanzen könnte in Zukunft möglicherweise therapeutische Bedeutung gewinnen.

Die komplexe, bisher nur ansatzweise verstandene Rolle der Retinoide in der Regulation von Genen, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen

beeinflussen, bleibt hinsichtlich der Therapie des Harnblasenkarzinoms weiterhin ein interessanter Ansatzpunkt.

Auf dem Weg zur Entwicklung neuer sinnvoller Therapiestrategien ist weiterhin die Grundlagenforschung zur Tumorbiologie des Harnblasenkarzinoms gefordert. Die genaue Definition des biologischen Stellenwertes der Retinoide und ihrer Metabolite im Prozess der malignen Transformation von Harnblasentumorzellen könnte dabei ebenso einen wichtigen Schritt darstellen.

5 Zusammenfassung

Heutzutage ist die Chemotherapie eine wesentliche Therapieoption des Harnblasen- bzw. Urothelkarzinoms im fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Leider sind aber die Ansprechraten und die Nebenwirkungsspektren der derzeit eingesetzten Chemotherapeutika und das Chemotherapieregime klinisch nicht befriedigend. Daher muss das Ziel der Forschung auf diesem Gebiet die Suche nach effektiveren Substanzen oder Kombinationstherapien mit reduzierten Nebenwirkungen beinhalten.

Der Antimetabolit Gemcitabin mit seinem geringen systemischen Toxizitätsprofil gehört heute zu den am häufigsten eingesetzten und etablierten Chemotherapeutika in der Behandlung des Harnblasenkarzinoms. Seine Ansprechrate liegt als Monotherapie allerdings nur bei 31-55% (Stadler 1997; van Moorsel 1997). Daher wird versucht, durch mögliche Kombinationspartner von Gemcitabin die Ansprechraten zu erhöhen. Derzeit als Standard anzusehen ist die Kombination mit Cisplatin, wobei in der Regel sechs Zyklen verabreicht werden.

Retinoide sind natürliche und synthetische Derivate des Vitamin A. Für Retinoide konnte gezeigt werden, dass sie hemmend auf die Karzinogenese epithelialer Tumoren, differenzierungsinduzierend und hemmend auf lokales Tumorwachstum und Metastasierung wirken. Somit würden sie sich als mögliche Kombinationspartner in der Therapie des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms eignen. Zunächst müssen jedoch die wesentlichen biologischen Effekte *in vitro* vergleichend überprüft werden. Das synthetische Retinoid N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid (4-HPR, Fenretinid) gilt als klinisch besser verträglich als das natürliche Retinoid 13-cis-Retinsäure (13-cis-RA, Isotretinoin).

Die Retinoide 13-cis-RA und 4-HPR in Kombination mit dem Antimetaboliten Gemcitabin sollten deshalb hinsichtlich der antiproliferativen Effekte in den humanen Blasentumorzelllinien EJ28 (invasiv, schlecht differenziert, geringe Expression der Retinoidrezeptoren RAR- α , RAR- β und RXR- α) und RT112 (nichtinvasiv, gut differenziert, ausgeprägte Expression der Retinoidrezeptoren RAR- α , RAR- β und RXR- α) untersucht werden. Vorab wurden zur Bestimmung der Konzentrationsbereiche Versuche mit den Einzelsubstanzen durchgeführt. Die Retinoide wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,01-20 μ M für 4-HPR und

0,1-100 μM für 13-cis-RA eingesetzt. Der eingesetzte Konzentrationsbereich für Gemcitabin lag bei 0,001-20 μM .

Die Untersuchungen der antiproliferativen Effekte erfolgten in 96-Well-Mikrotiterplatten als Monolayerkulturen unter optimalen Wachstumsbedingungen. Die Zellen ($n=1000$) wurden 24 Stunden nach Aussaat mit den einzelnen Substanzen und Substanzkombinationen in unterschiedlicher Applikationsreihenfolge inkubiert. Nach weiteren 120 Stunden erfolgte die Zugabe des Tetrazolium-Salzes XTT. Die Bestimmung der Zellproliferation wurde nach weiteren vier Stunden photometrisch bestimmt. Dabei erfolgte die Berechnung der Konzentration der halbmaximalen Wachstumshemmung (IC50-Werte) sowie der dazugehörigen 95%-Konfidenzintervalle.

In beiden Zelllinien konnte eine konzentrationsabhängige vollständige Hemmung der Zellproliferation durch alle drei Substanzen nachgewiesen werden.

Die IC50-Werte lagen bei Einzelapplikation der Testsubstanzen in der Zelllinie RT112 für Gemcitabin bei 1,54 μM , für 13-cis-RA bei 61 μM und für 4-HPR bei 2,45 μM sowie in der Zelllinie EJ28 für Gemcitabin bei 0,72 μM , für 13-cis-RA bei 34 μM und für 4-HPR bei 2,1 μM .

Das synthetische Retinoid 4-HPR zeigte sich effektiver als das natürliche Retinoid 13-cis-RA, die Zelllinie EJ28 war gegenüber den Testsubstanzen sensitiver als die Zelllinie RT112.

Bei kombinierter Applikation von Gemcitabin und 4-HPR konnten in der Zelllinie RT112 unabhängig von der Reihenfolge der Substanzzugabe additive antiproliferative Effekte, in der Zelllinie EJ28 wiederum unabhängig von der Applikationsreihenfolge antagonistische antiproliferative Effekte nachgewiesen werden.

Aufgrund der für eine adäquate Zellantwort sehr hohen einzusetzenden Konzentrationen von 13-cis-RA, die sich in den Einzelsubstanzversuchen zeigte, wurde von Kombinationsversuchen von 13-cis-RA und Gemcitabin abgesehen.

Die Ergebnisse der kombinierten Applikation von 4-HPR und Gemcitabin unterstreichen eindrücklich aufgrund der unterschiedlichen biologischen Effekte bezüglich der Proliferationshemmung (in RT112 additive, in EJ28 antagonistische Effekte) die Wichtigkeit von in-vitro Untersuchungen bevor neue

Substanzkombinationen in vivo bzw. in klinischen Studien an Patienten eingesetzt werden.

Das Retinoid 4-HPR bzw. neue synthetische Retinoide oder andere Modulatoren der Zelldifferenzierung stellen dennoch potentiell interessante Kombinationspartner für die klassischen Chemotherapeutika in der Therapie des fortgeschrittenen Urothelkarzinoms dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Aapro MS. Retinoids in oncology. *Eur J Cancer* 31A (5): 834-5, 1995.
2. Abedin SA, Thorne JL, Battaglia S, Maguire O, Hornung LB, Doherty AP, Mills IG, Campbell MJ. Elevated NCOR1 disrupts a network of dietary-sensing nuclear receptors in bladder cancer cells. *Carcinogenesis* 30 (3): 449-56, 2009.
3. Advanced Bladder Cancer ABC. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol* 48 (2): 202-5; discussion 205-6, 2005.
4. Alizadeh F, Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ, Naji T, Bidgoli SA. Retinoids and their biological effects against cancer. *Int Immunopharmacol* 18 (1): 43-9.
5. Altwein JE, Rübber H. *Urologie*. 4.Auflage ed. Stuttgart: Thieme, 1993.
6. Ardavanis A, Tryfonopoulos D, Alexopoulos A, Kandyliis C, Lainakis G, Rigatos G. Gemcitabine and docetaxel as first-line treatment for advanced urothelial carcinoma: a phase II study. *Br J Cancer* 92 (4): 645-50, 2005.
7. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft AddÄ. Schwere Thrombozytose mit arteriellem Verschluss nach Gemcitabin, 2005.
8. Bajorin DF, McCaffrey JA, Dodd PM, Hilton S, Mazumdar M, Kelly WK, Herr H, Scher HI, Icasiano E, Higgins G. Ifosfamide, paclitaxel, and cisplatin for patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract: final report of a phase II trial evaluating two dosing schedules. *Cancer* 88 (7): 1671-8, 2000.
9. Bamias A, Deliveliotis C, Karayiannis A, Varkarakis I, Zervas I, Pantazopoulos D, Gika D, Dimopoulos MA. Neoadjuvant chemotherapy with docetaxel and cisplatin in patients with high-risk resectable bladder carcinoma: long term results. *Eur Urol* 46 (3): 344-50; discussion 350-1, 2004.
10. Bamias A, Mouloupoulos LA, Koutras A, Aravantinos G, Fountzilas G, Pectasides D, Kastritis E, Gika D, Skarlos D, Linardou H, Kalofonos HP, Dimopoulos MA. The combination of gemcitabine and carboplatin as first-line treatment in patients with advanced urothelial carcinoma. A Phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Cancer* 106 (2): 297-303, 2006.
11. Barlesi F, Villani P, Doddoli C, Gimenez C, Kleisbauer JP. Gemcitabine-induced severe pulmonary toxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 18 (1): 85-91, 2004.

12. Bellmunt J, Guillem V, Paz-Ares L, Gonzalez-Larriba JL, Carles J, Batiste-Alentorn E, Saenz A, Lopez-Brea M, Font A, Nogue M, Bastus R, Climent MA, de la Cruz JJ, Albanell J, Banus JM, Gallardo E, Diaz-Rubio E, Cortes-Funes H, Baselga J. Phase I-II study of paclitaxel, cisplatin, and gemcitabine in advanced transitional-cell carcinoma of the urothelium. Spanish Oncology Genitourinary Group. *J Clin Oncol* 18 (18): 3247-55, 2000.
13. Bellmunt J, Orsola A, Maldonado X, Kataja V. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5: v134-6, 2010.
14. Bellmunt J, Theodore C, Demkov T, Komyakov B, Sengelov L, Daugaard G, Caty A, Carles J, Jagiello-Gruszfeld A, Karyakin O, Delgado FM, Hurteloup P, Winquist E, Morsli N, Salhi Y, Culine S, von der Maase H. Phase III trial of vinflunine plus best supportive care compared with best supportive care alone after a platinum-containing regimen in patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract. *J Clin Oncol* 27 (27): 4454-61, 2009.
15. Bichler KH, Harzmann R. Das Harnblasenkarzinom - Epidemiologie, Pathogenese, Früherkennung. Berlin: Springer, 1994.
16. Bichler KH, Wilbert D, Wechsel HW, Strohmaier WL. Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms. 1998.
17. Borden LS, Jr., Clark PE, Hall MC. Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 16 (3): 257-62, 2004.
18. Burch PA, Richardson RL, Cha SS, Sargent DJ, Pitot HC, Kaur JS, Camoriano JK. Phase II study of paclitaxel and cisplatin for advanced urothelial cancer. *J Urol* 164 (5): 1538-42, 2000.
19. Bushue N, Wan YJ. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (13): 1285-98, 2010.
20. Carles J, Esteban E, Climent M, Font A, Gonzalez-Larriba JL, Berrocal A, Garcia-Ribas I, Marfa X, Fabregat X, Albanell J, Bellmunt J. Gemcitabine and oxaliplatin combination: a multicenter phase II trial in unfit patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer. *Ann Oncol* 18 (8): 1359-62, 2007.
21. Chakravarti A, Winter K, Wu CL, Kaufman D, Hammond E, Parliament M, Tester W, Hagan M, Grignon D, Heney N, Pollack A, Sandler H, Shipley W. Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invasive bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: a report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62 (2): 309-17, 2005.
22. Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Hallek M. Innere Medizin. 6. Auflage ed: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2009.
23. Collins MD, Mao GE. Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 399-430, 1999.

24. Crul M, van Waardenburg RC, Bocxe S, van Eijndhoven MA, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH. DNA repair mechanisms involved in gemcitabine cytotoxicity and in the interaction between gemcitabine and cisplatin. *Biochem Pharmacol* 65 (2): 275-82, 2003.
25. Daikeler T, Maas K, Hartmann JT, Kanz L, Bokemeyer C. Weekly short infusions of gemcitabine are not associated with suppression of lymphatic activity in patients with solid tumors. *Anticancer Drugs* 8 (6): 643-4, 1997.
26. Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268 (20): 14553-6, 1993.
27. De Mulder PH, Debruyne FM, Keinzer HJ. Randomized phase II study of methotrexate, cisplatin and methotrexate, cisplatin and vinblastin in patients with advanced transitional carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 18 (Suppl. 1: 5), 1990.
28. Decensi A, Bruno S, Giaretti W, Torrisi R, Curotto A, Gatteschi B, Geido E, Polizzi A, Costantini M, Bruzzi P, et al. Activity of 4-HPR in superficial bladder cancer using DNA flow cytometry as an intermediate endpoint. *J Cell Biochem Suppl* 161: 139-47, 1992.
29. Dimopoulos MA, Bakoyannis C, Georgoulas V, Papadimitriou C, Mouloupoulos LA, Deliveliotis C, Karayannis A, Varkarakis I, Aravantinos G, Zervas A, Pantazopoulos D, Fountzilas G, Bamias A, Kyriakakis Z, Anagnostopoulos A, Giannopoulos A, Kosmidis P. Docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in advanced carcinoma of the urothelium: a multicenter phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Ann Oncol* 10 (11): 1385-8, 1999.
30. Dobrowsky RT, Hannun YA. Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol Chem* 267 (8): 5048-51, 1992.
31. Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 268 (21): 15523-30, 1993.
32. Dogliotti L, Carteni G, Siena S, Bertetto O, Martoni A, Bono A, Amadori D, Onat H, Marini L. Gemcitabine plus cisplatin versus gemcitabine plus carboplatin as first-line chemotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the urothelium: results of a randomized phase 2 trial. *Eur Urol* 52 (1): 134-41, 2007.
33. Dreicer R, Li H, Cooney MM, Wilding G, Roth BJ. Phase 2 trial of pemetrexed disodium and gemcitabine in advanced urothelial cancer (E4802): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 112 (12): 2671-5, 2008.
34. Dreicer R, Manola J, Roth BJ, Cohen MB, Hatfield AK, Wilding G. Phase II study of cisplatin and paclitaxel in advanced carcinoma of the urothelium: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 18 (5): 1058-61, 2000.

35. Dreicer R, Manola J, Roth BJ, See WA, Kuross S, Edelman MJ, Hudes GR, Wilding G. Phase III trial of methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin versus carboplatin and paclitaxel in patients with advanced carcinoma of the urothelium. *Cancer* 100 (8): 1639-45, 2004.
36. Dreicer R, Manola J, Schneider DJ, Schwerkoske JF, George CS, Roth BJ, Wilding G. Phase II trial of gemcitabine and docetaxel in patients with advanced carcinoma of the urothelium: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 97 (11): 2743-7, 2003.
37. Erdreich-Epstein A, Tran LB, Bowman NN, Wang H, Cabot MC, Durden DL, Vlckova J, Reynolds CP, Stins MF, Groshen S, Millard M. Ceramide signaling in fenretinide-induced endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 277 (51): 49531-7, 2002.
38. Evans TR, Kaye SB. Retinoids: present role and future potential. *Br J Cancer* 80 (1-2): 1-8, 1999.
39. Fechner G, Perabo FG, Schmidt DH, Haase L, Ludwig E, Schueller H, Blatter J, Mller SC, Albers P. Preclinical evaluation of a radiosensitizing effect of gemcitabine in p53 mutant and p53 wild type bladder cancer cells. *Urology* 61 (2): 468-73, 2003.
40. Friedland DM, Dakhil S, Hollen C, Gregurich MA, Asmar L. A phase II evaluation of weekly paclitaxel plus carboplatin in advanced urothelial cancer. *Cancer Invest* 22 (3): 374-82, 2004.
41. Frohneberg D. Muskelinvasives Harnblasenkarzinom: Teil 3 der Serie zum Harnblasenkarzinom. *Dtsch Arztebl* 104 (13): A 868-72, 2007.
42. Fujiyama C, Jones A, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, Harris AL. Human bladder cancer invasion model using rat bladder in vitro and its use to test mechanisms and therapeutic inhibitors of invasion. *Br J Cancer* 84 (4): 558-64, 2001.
43. Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol* 150 (2): 461-7, 1997.
44. Garaventa A, Luksch R, Lo Piccolo MS, Cavadini E, Montaldo PG, Pizzitola MR, Boni L, Ponzoni M, Decensi A, De Bernardi B, Bellani FF, Formelli F. Phase I trial and pharmacokinetics of fenretinide in children with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 9 (6): 2032-9, 2003.
45. Gitlitz BJ, Baker C, Chapman Y, Allen HJ, Bosserman LD, Patel R, Sanchez JD, Shapiro RM, Figlin RA. A phase II study of gemcitabine and docetaxel therapy in patients with advanced urothelial carcinoma. *Cancer* 98 (9): 1863-9, 2003.
46. Golka K, Schops W, Kierfeld G, Bolt HM. [Urothelial diseases as an occupational disease]. *Versicherungsmedizin* 46 (5): 158-61, 1994.

47. Goss GD, McBurney MW. Physiological and clinical aspects of vitamin A and its metabolites. *Crit Rev Clin Lab Sci* 29 (3-4): 185-215, 1992.
48. Green MR. Gemcitabine safety overview. *Semin Oncol* 23 (5 Suppl 10): 32-5, 1996.
49. Griffiths G, Hall R, Sylvester R, Raghavan D, Parmar MK. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J Clin Oncol* 29 (16): 2171-7.
50. Gschwend JE, Dahm P, Fair WR. Disease specific survival as endpoint of outcome for bladder cancer patients following radical cystectomy. *Eur Urol* 41 (4): 440-8, 2002.
51. Habuchi T, Devlin J, Elder PA, Knowles MA. Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene* 11 (8): 1671-4, 1995.
52. Hainsworth JD, Meluch AA, Litchy S, Schnell FM, Bearden JD, Yost K, Greco FA. Paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in the treatment of patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *Cancer* 103 (11): 2298-303, 2005.
53. Hameed DA, el-Metwally TH. The effectiveness of retinoic acid treatment in bladder cancer: impact on recurrence, survival and TGFalpha and VEGF as end-point biomarkers. *Cancer Biol Ther* 7 (1): 92-100, 2008.
54. Hannun YA. Sphingolipid second messengers: tumor suppressor lipids. *Adv Exp Med Biol* 400A: 305-12, 1997.
55. Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 154 (3): 721-7, 1999.
56. Hautmann R, Huland H. *Urologie*. 2006.
57. Heck MM, Gschwend JE, Retz M. [Update on chemotherapy for bladder cancer. Update 2010]. *Urologe A* 49 (10): 1294-300, 2010.
58. Heinemann V, Schulz L, Issels RD, Plunkett W. Gemcitabine: a modulator of intracellular nucleotide and deoxynucleotide metabolism. *Semin Oncol* 22 (4 Suppl 11): 11-8, 1995.
59. Hillcoat BL, Raghavan D, Matthews J, Kefford R, Yuen K, Woods R, Olver I, Bishop J, Pearson B, Coorey G, et al. A randomized trial of cisplatin versus cisplatin plus methotrexate in advanced cancer of the urothelial tract. *J Clin Oncol* 7 (6): 706-9, 1989.
60. Housset M, Maulard C, Chretien Y, Dufour B, Delanian S, Huart J, Colardelle F, Brunel P, Baillet F. Combined radiation and chemotherapy for invasive transitional-cell carcinoma of the bladder: a prospective study. *J Clin Oncol* 11 (11): 2150-7, 1993.

61. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 51 (22): 6110-7, 1991.
62. Hussain M, Vaishampayan U, Du W, Redman B, Smith DC. Combination paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine is an active treatment for advanced urothelial cancer. *J Clin Oncol* 19 (9): 2527-33, 2001.
63. IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 83: 1-1438, 2004.
64. Iwasaki-Bessho Y, Banno Y, Yoshimura S, Ito Y, Kitajima Y, Nozawa Y. Decreased phospholipase D (PLD) activity in ceramide-induced apoptosis of human keratinocyte cell line HaCaT. *J Invest Dermatol* 110 (4): 376-82, 1998.
65. Jones MJ, Murray AW. Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C-alpha translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D. *J Biol Chem* 270 (10): 5007-13, 1995.
66. Kalemkerian GP, Slusher R, Ramalingam S, Gadgeel S, Mabry M. Growth inhibition and induction of apoptosis by fenretinide in small-cell lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 87 (22): 1674-80, 1995.
67. Kaufman D, Raghavan D, Carducci M, Levine EG, Murphy B, Aisner J, Kuzel T, Nicol S, Oh W, Stadler W. Phase II trial of gemcitabine plus cisplatin in patients with metastatic urothelial cancer. *J Clin Oncol* 18 (9): 1921-7, 2000.
68. Kaufman DS, Carducci MA, Kuzel TM, Todd MB, Oh WK, Smith MR, Ye Z, Nicol SJ, Stadler WM. A multi-institutional phase II trial of gemcitabine plus paclitaxel in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer. *Urol Oncol* 22 (5): 393-7, 2004.
69. Kaye SB. Gemcitabine: current status of phase I and II trials. *J Clin Oncol* 12 (8): 1527-31, 1994.
70. Khandekar JD, Elson PJ, DeWys WD, Slayton RE, Harris DT. Comparative activity and toxicity of cis-diamminedichloroplatinum (DDP) and a combination of doxorubicin, cyclophosphamide, and DDP in disseminated transitional cell carcinomas of the urinary tract. *J Clin Oncol* 3 (4): 539-45, 1985.
71. Kiemle-Kallee J, Porzolt F. [Retinoids in oncology]. *Dtsch Med Wochenschr* 118 (11): 390-4, 1993.
72. Klan R, Loy V, Huland H. Residual tumor discovered in routine second transurethral resection in patients with stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 146 (2): 316-8, 1991.
73. Kriegmair M, Zaak D, Knuechel R, Baumgartner R, Hofstetter A. 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy for the detection of lower urinary tract tumors. *Urol Int* 63 (1): 27-31, 1999.
74. Kroft SH, Oyasu R. Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. *Lab Invest* 71 (2): 158-74, 1994.

75. Kulkarni GS, Hakenberg OW, Gschwend JE, Thalmann G, Kassouf W, Kamat A, Zlotta A. An updated critical analysis of the treatment strategy for newly diagnosed high-grade T1 (previously T1G3) bladder cancer. *Eur Urol* 57 (1): 60-70, 2010.
76. Kumar NU, Dey P, Mondal AK, Singh SK, Vohra H. DNA flow cytometry and bladder irrigation cytology in detection of bladder carcinoma. *Diagn Cytopathol* 24 (3): 153-6, 2001.
77. Laaksovirta S, Rajala P, Nurmi M, Tammela TL, Laato M. The cytostatic effect of 9-cis-retinoic acid, tretinoin, and isotretinoin on three different human bladder cancer cell lines in vitro. *Urol Res* 27 (1): 17-22, 1999.
78. Lara PN, Jr., Meyers FJ, Law LY, Dawson NA, Houston J, Lauder I, Edelman MJ. Platinum-free combination chemotherapy in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *Cancer* 100 (1): 82-8, 2004.
79. Li J, Juliar B, Yiannoutsos C, Ansari R, Fox E, Fisch MJ, Einhorn LH, Sweeney CJ. Weekly paclitaxel and gemcitabine in advanced transitional-cell carcinoma of the urothelium: a phase II Hoosier Oncology Group study. *J Clin Oncol* 23 (6): 1185-91, 2005.
80. Lin CC, Hsu CH, Huang CY, Cheng AL, Vogelzang NJ, Pu YS. Phase II trial of weekly paclitaxel, cisplatin plus infusional high dose 5-fluorouracil and leucovorin for metastatic urothelial carcinoma. *J Urol* 177 (1): 84-9; discussion 89, 2007.
81. Liu J, Mathias S, Yang Z, Kolesnick RN. Renaturation and tumor necrosis factor-alpha stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase. *J Biol Chem* 269 (4): 3047-52, 1994.
82. Loehrer PJ, Sr., Einhorn LH, Elson PJ, Crawford ED, Kuebler P, Tannock I, Raghavan D, Stuart-Harris R, Sarosdy MF, Lowe BA, et al. A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *J Clin Oncol* 10 (7): 1066-73, 1992.
83. Logothetis CJ, Dexeus FH, Finn L, Sella A, Amato RJ, Ayala AG, Kilbourn RG. A prospective randomized trial comparing MVAC and CISCA chemotherapy for patients with metastatic urothelial tumors. *J Clin Oncol* 8 (6): 1050-5, 1990.
84. Logothetis CJ, Johnson DE, Chong C, Dexeus FH, Ogden S, von Eschenbach A, Ayala A. Adjuvant chemotherapy of bladder cancer: a preliminary report. *J Urol* 139 (6): 1207-11, 1988.
85. Lorusso V, Crucitta E, Silvestris N, Rosati G, Manzione L, De Lena M, Palmeri S, Gebbia V, Mancarella S, Sobrero A, Pezzella G, Comella P, Mangiameli A, Muci D. Randomised, open-label, phase II trial of paclitaxel, gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin as first-line chemotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *Oncol Rep* 13 (2): 283-7, 2005.

86. Lotan R, Clifford JL. Nuclear receptors for retinoids: mediators of retinoid effects on normal and malignant cells. *Biomed Pharmacother* 45 (4-5): 145-56, 1991.
87. Lund B, Kristjansen PE, Hansen HH. Clinical and preclinical activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Cancer Treat Rev* 19 (1): 45-55, 1993.
88. Margreiter R, Fischer M, Roberts K, Schmid T, Hittmair A, Schirmer M, Geisen F, Tiefenthaler M, Konwalinka G. Gemcitabine--a novel immunosuppressive agent--prevents rejection in a rat cardiac transplantation model. *Transplantation* 68 (7): 1051-3, 1999.
89. McCaffery P, Drager UC. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11 (3): 233-49, 2000.
90. Mead GM, Russell M, Clark P, Harland SJ, Harper PG, Cowan R, Roberts JT, Uscinska BM, Griffiths GO, Parmar MK. A randomized trial comparing methotrexate and vinblastine (MV) with cisplatin, methotrexate and vinblastine (CMV) in advanced transitional cell carcinoma: results and a report on prognostic factors in a Medical Research Council study. MRC Advanced Bladder Cancer Working Party. *Br J Cancer* 78 (8): 1067-75, 1998.
91. Meletiadiis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Donnelly PJ, Verweij PE. Comparison of spectrophotometric and visual readings of NCCLS method and evaluation of a colorimetric method based on reduction of a soluble tetrazolium salt, 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide], for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 39 (12): 4256-63, 2001.
92. Meluch AA, Greco FA, Burris HA, 3rd, O'Rourke T, Ortega G, Steis RG, Morrissey LH, Johnson V, Hainsworth JD. Paclitaxel and gemcitabine chemotherapy for advanced transitional-cell carcinoma of the urothelial tract: a phase II trial of the Minnie pearl cancer research network. *J Clin Oncol* 19 (12): 3018-24, 2001.
93. Messing EM. Growth factors and bladder cancer: clinical implications of the interactions between growth factors and their urothelial receptors. *Semin Surg Oncol* 8 (5): 285-92, 1992.
94. Messing EM, Vaillancourt A. Hematuria screening for bladder cancer. *J Occup Med* 32 (9): 838-45, 1990.
95. Meta-analysis Collaboration M-aC. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol* 48 (2): 202-5; discussion 205-6, 2005.
96. Mhaweck-Fauceglia P, Cheney RT, Fischer G, Beck A, Herrmann FR. FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer. *Eur J Surg Oncol* 32 (2): 231-7, 2006.

97. Michael A, Hill M, Maraveyas A, Dalglish A, Lofts F. 13-cis-Retinoic acid in combination with gemcitabine in the treatment of locally advanced and metastatic pancreatic cancer--report of a pilot phase II study. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19 (2): 150-3, 2007.
98. Miller WH, Jr. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 83 (8): 1471-82, 1998.
99. Motzer RJ, Murphy BA, Bacik J, Schwartz LH, Nanus DM, Mariani T, Loehrer P, Wilding G, Fairclough DL, Cella D, Mazumdar M. Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *L Clin Oncol.* 18(16): 2972-80, 2000.
100. Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *Embo J* 14 (9): 1961-9, 1995.
101. Natale RB, Yagoda A, Watson RC, Whitmore WF, Blumenreich M, Braun DW, Jr. Methotrexate: an active drug in bladder cancer. *Cancer* 47 (6): 1246-50, 1981.
102. Nickel W, Wieland FT. Biogenesis of COPI-coated transport vesicles. *FEBS Lett* 413 (3): 395-400, 1997.
103. Nutt JE, Lazarowicz HP, Mellon JK, Lunec J. Gefitinib ('Iressa', ZD1839) inhibits the growth response of bladder tumour cell lines to epidermal growth factor and induces TIMP2. *Br J Cancer* 90 (8): 1679-85, 2004.
104. Oridate N, Suzuki S, Higuchi M, Mitchell MF, Hong WK, Lotan R. Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89 (16): 1191-8, 1997.
105. Ozen H. Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 10 (3): 273-8, 1998.
106. Pectasides D, Glotsos J, Bountouroglou N, Kouloubinis A, Mitakidis N, Karvounis N, Ziras N, Athanassiou A. Weekly chemotherapy with docetaxel, gemcitabine and cisplatin in advanced transitional cell urothelial cancer: a phase II trial. *Ann Oncol* 13 (2): 243-50, 2002.
107. Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorsel CJ, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Ther* 87 (2-3): 227-53, 2000.
108. Pettersson F, Colston KW, Dalglish AG. Retinoic acid enhances the cytotoxic effects of gemcitabine and cisplatin in pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas* 23 (3): 273-9, 2001.
109. Pfahl M, Chytil F. Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Annu Rev Nutr* 16: 257-83, 1996.

110. Pillai RN, Aisner J, Dahlberg SE, Rogers JS, DiPaola RS, Aisner S, Ramalingam SS Schiller JH. Interferon alpha plus 13-cis-retinoic acid modulation of BCL-2 plus paclitaxel for recurrent small-cell lung cancer (SCLC): an Eastern Cooperative Oncology Group study (E6501). *Cancer Chemother Pharmacol* 74(1): 177-83, 2014.
111. Prout GR, Jr., Barton BA. 13-cis-retinoic acid in chemoprevention of superficial bladder cancer. The National Bladder Cancer Group. *J Cell Biochem Suppl* 16I: 148-52, 1992.
112. Redman BG, Smith DC, Flaherty L, Du W, Hussain M. Phase II trial of paclitaxel and carboplatin in the treatment of advanced urothelial carcinoma. *J Clin Oncol* 16 (5): 1844-8, 1998.
113. Reynolds CP, Lemons RS. Retinoid therapy of childhood cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 15 (5): 867-910, 2001.
114. Reynolds CP, Matthay KK, Villablanca JG, Maurer BJ. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197 (1-2): 185-92, 2003.
115. Reynolds NJ, Gough M, Clamp JR, Burton JL. Effect of oral isotretinoin therapy on saliva volume and composition. *Br J Dermatol* 125 (2): 189-90, 1991.
116. Robert Koch-Institut (Hrsg.) udGdeKiDeH. Krebs in Deutschland 2009/2010, 2013.
117. Rodel C. Current status of radiation therapy and combined-modality treatment for bladder cancer. *Strahlenther Onkol* 180 (11): 701-9, 2004.
118. Rodel C, Grabenbauer GG, Kuhn R, Dunst J, Papadopoulos T, Schrott KM, Sauer R. Invasive bladder cancer: organ preservation by radiochemotherapy. *Front Radiat Ther Oncol* 36: 118-30, 2002.
119. Roth BJ. Preliminary experience with paclitaxel in advanced bladder cancer. *Semin Oncol* 22 (3 Suppl 6): 1-5, 1995.
120. Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Vermorcken JB, Peters GJ. 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem Pharmacol* 46 (4): 762-6, 1993.
121. Rübber. Uroonkologie. Vol. 5. Aufl. Berlin: Springer, 2009.
122. Sabichi AL, Lerner SP, Atkinson EN, Grossman HB, Caraway NP, Dinney CP, Penson DF, Matin S, Kamat A, Pisters LL, Lin DW, Katz RL, Brenner DE, Hemstreet GP, 3rd, Wargo M, Bleyer A, Sanders WH, Clifford JL, Parnes HL, Lippman SM. Phase III prevention trial of fenretinide in patients with resected non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 14 (1): 224-9, 2008.
123. Sabichi AL, Lerner SP, Grossman HB, Lippman SM. Retinoids in the chemoprevention of bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 10 (5): 479-84, 1998.

124. Sawai H, Okazaki T, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Kishi S, Umehara H, Domae N. Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. Implications in apoptosis. *J Biol Chem* 272 (4): 2452-8, 1997.
125. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267 (8): 5317-23, 1992.
126. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *Embo J* 12 (8): 3095-104, 1993.
127. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48 (17): 4827-33, 1988.
128. Sengelov L, Kamby C, Lund B, Engelholm SA. Docetaxel and cisplatin in metastatic urothelial cancer: a phase II study. *J Clin Oncol* 16 (10): 3392-7, 1998.
129. Shannon C, Crombie C, Brooks A, Lau H, Drummond M, Gurney H. Carboplatin and gemcitabine in metastatic transitional cell carcinoma of the urothelium: effective treatment of patients with poor prognostic features. *Ann Oncol* 12 (7): 947-52, 2001.
130. Shipley WU, Zietman AL, Kaufman DS, Coen JJ, Sandler HM. Selective bladder preservation by trimodality therapy for patients with muscularis propria-invasive bladder cancer and who are cystectomy candidates--the Massachusetts General Hospital and Radiation Therapy Oncology Group experiences. *Semin Radiat Oncol* 15 (1): 36-41, 2005.
131. Siefker-Radtke AO, Millikan RE, Tu SM, Moore DF, Jr., Smith TL, Williams D, Logothetis CJ. Phase III trial of fluorouracil, interferon alpha-2b, and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in metastatic or unresectable urothelial cancer. *J Clin Oncol* 20 (5): 1361-7, 2002.
132. Skinner DG, Daniels JR, Russell CA, Lieskovsky G, Boyd SD, Nichols P, Kern W, Sakamoto J, Krailo M, Groshen S. The role of adjuvant chemotherapy following cystectomy for invasive bladder cancer: a prospective comparative trial. *J Urol* 145 (3): 459-64; discussion 464-7, 1991.
133. Small EJ, Lew D, Redman BG, Petrylak DP, Hammond N, Gross HM, Eastham JA, Crawford ED. Southwest Oncology Group Study of paclitaxel and carboplatin for advanced transitional-cell carcinoma: the importance of survival as a clinical trial end point. *J Clin Oncol* 18 (13): 2537-44, 2000.
134. Smith ME, Das BC, Kalpana GV. In vitro activities of novel 4-HPR derivatives on a panel of rhabdoid and other tumor cell lines. *Cancer Cell Int* 11: 34, 2011.

135. Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA. Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol* 10 (5): 839-64, 1992.
136. Sollitto RB, DiGiovanna JJ. Failure of interferon alfa and isotretinoin combination therapy in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Arch Dermatol* 132 (1): 94-5, 1996.
137. Stadler WM, Kuzel T, Roth B, Raghavan D, Dorr FA. Phase II study of single-agent gemcitabine in previously untreated patients with metastatic urothelial cancer. *J Clin Oncol* 15 (11): 3394-8, 1997.
138. Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5 (1): 85-91, 1979.
139. Sternberg CN, Calabro F, Pizzocaro G, Marini L, Schnetzer S, Sella A. Chemotherapy with an every-2-week regimen of gemcitabine and paclitaxel in patients with transitional cell carcinoma who have received prior cisplatin-based therapy. *Cancer* 92 (12): 2993-8, 2001.
140. Sternberg CN, de Mulder P, Schornagel JH, Theodore C, Fossa SD, van Oosterom AT, Witjes JA, Spina M, van Groeningen CJ, Duclos B, Roberts JT, de Balincourt C, Collette L. Seven year update of an EORTC phase III trial of high-dose intensity M-VAC chemotherapy and G-CSF versus classic M-VAC in advanced urothelial tract tumours. *Eur J Cancer* 42 (1): 50-4, 2006.
141. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Geller N, Herr HW, Morse MJ, Sogani PC, Vaughan ED, Bander N, et al. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer* 64 (12): 2448-58, 1989.
142. Stockle M, Wellek S, Meyenburg W, Voges GE, Fischer U, Gertenbach U, Thuroff JW, Huber C, Hohenfellner R. Radical cystectomy with or without adjuvant polychemotherapy for non-organ-confined transitional cell carcinoma of the urinary bladder: prognostic impact of lymph node involvement. *Urology* 48 (6): 868-75, 1996.
143. Stoter G. Chemotherapy for metastatic bladder carcinoma. *World J Urol* 3 (110), 1985.
144. Studer UE, Bacchi M, Biedermann C, Jaeger P, Kraft R, Mazzucchelli L, Markwalder R, Senn E, Sonntag RW. Adjuvant cisplatin chemotherapy following cystectomy for bladder cancer: results of a prospective randomized trial. *J Urol* 152 (1): 81-4, 1994.
145. Studer UE, Jenzer S, Biedermann C, Chollet D, Kraft R, von Toggenburg H, Vonbank F. Adjuvant treatment with a vitamin A analogue (etretinate) after transurethral resection of superficial bladder tumors. Final analysis of a prospective, randomized multicenter trial in Switzerland. *Eur Urol* 28 (4): 284-90, 1995.

146. Sweeney CJ, Roth BJ, Kabbinavar FF, Vaughn DJ, Arning M, Curiel RE, Obasaju CK, Wang Y, Nicol SJ, Kaufman DS. Phase II study of pemetrexed for second-line treatment of transitional cell cancer of the urothelium. *J Clin Oncol* 24 (21): 3451-7, 2006.
147. Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol* 171 (6 Pt 1): 2186-90, quiz 2435, 2004.
148. Tang XH, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol* 6: 345-64.
149. Theodore C, Bidault F, Bouvet-Forteau N, Abdelatif M, Fizazi K, di Palma M, Wibault P, de Crevoisier R, Laplanche A. A phase II monocentric study of oxaliplatin in combination with gemcitabine (GEMOX) in patients with advanced/metastatic transitional cell carcinoma (TCC) of the urothelial tract. *Ann Oncol* 17 (6): 990-4, 2006.
150. Thompson HJ, Becci PJ, Grubbs CJ, Shealy YF, Stanek EJ, Brown CC, Sporn MB, Moon RC. Inhibition of urinary bladder cancer by N-(ethyl)-all-trans-retinamide and N-(2-hydroxyethyl)-all-trans-retinamide in rats and mice. *Cancer Res* 41 (3): 933-6, 1981.
151. Tolis C, Peters GJ, Ferreira CG, Pinedo HM, Giaccone G. Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* 35 (5): 796-807, 1999.
152. Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, Holowaty EJ, Van Leeuwen FE, Lynch CF, Hagenbeek A, Stovall M, Banks PM, Adami J, et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 87 (7): 524-30, 1995.
153. Treiber U. Habilitationsschrift: Effekte von Retinoiden in humanen Prostatakarzinom-Zelllinien. 2002.
154. Trump DL. Retinoids in bladder, testis and prostate cancer: epidemiologic, pre-clinical and clinical observations. *Leukemia* 8 Suppl 3: S50-4, 1994.
155. Tsimberidou AM, Giles F, Romaguera J, Duvic M, Kurzrock R. Activity of interferon-alpha and isotretinoin in patients with advanced, refractory lymphoid malignancies. *Cancer* 100 (3): 574-80, 2004.
156. Tsukamoto T, Yonese J, Ohkubo Y, Fukui I. Phase I/II study of a combined gemcitabine, etoposide, and cisplatin chemotherapy regimen for metastatic urothelial carcinoma. *Cancer* 106 (11): 2363-8, 2006.
157. UICC. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7.Auflage ed, 2010.
158. van der Heijden AG, Verhaegh G, Jansen CF, Schalken JA, Witjes JA. Effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 4 chemotherapeutic agents currently used for the treatment of transitional cell carcinoma of the bladder: an in vitro study. *J Urol* 173 (4): 1375-80, 2005.

159. van Moorsel CJ, Peters GJ, Pinedo HM. Gemcitabine: Future Prospects of Single-Agent and Combination Studies. *Oncologist* 2 (3): 127-134, 1997.
160. Vaughn DJ, Malkowicz SB, Zoltick B, Mick R, Ramchandani P, Holroyde C, Armstead B, Fox K, Wein A. Paclitaxel plus carboplatin in advanced carcinoma of the urothelium: an active and tolerable outpatient regimen. *J Clin Oncol* 16 (1): 255-60, 1998.
161. von der Maase H. Gemcitabine and cisplatin in locally advanced and/or metastatic bladder cancer. *Eur J Cancer* 36 Suppl 2: 13-6, 2000.
162. von der Maase H, Andersen L, Crino L, Weinknecht S, Dogliotti L. Weekly gemcitabine and cisplatin combination therapy in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium: a phase II clinical trial. *Ann Oncol* 10 (12): 1461-5, 1999.
163. von der Maase H, Lehmann J, Gravis G, Joensuu H, Geertsen PF, Gough J, Chen G, Kania M. A phase II trial of pemetrexed plus gemcitabine in locally advanced and/or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelium. *Ann Oncol* 17 (10): 1533-8, 2006.
164. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 23 (21): 4602-8, 2005.
165. Wagenpfeil S, Treiber U, Lehmer A. Statistical analysis of combined dose effects for experiments with two agents. *Artif Intell Med* 37 (1): 65-71, 2006.
166. Wang Z, Zhang Z, Liu Y, Chen Y, Li Q, Duanguolan, Qin D, Liu G, Wang L. Effect of retinoic acid and its complexes with transition metals on human bladder cancer cell line EJ in vitro. *Urol Res* 28 (3): 191-5, 2000.
167. Witjes JA, Comperat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, James N, Le Bret T, Sherif A, Ribal MJ, Van der Heijden AG. EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: European Association of Urology 2015 [Online im Internet:] URL:<http://uroweb.org/guideline/bladder-cancer-muscle-invasive-and-metastatic/> [Stand 03.05.2015, 20:30]
168. Wolbach SB, Howe PR. Tissue Changes Following Deprivation Of Fat-Soluble A Vitamin. *J Exp Med* 42 (6): 753-77, 1925.
169. Wolff RA, Dobrowsky RT, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA. Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 269 (30): 19605-9, 1994.
170. Wu JM, DiPietrantonio AM, Hsieh TC. Mechanism of fenretinide (4-HPR)-induced cell death. *Apoptosis* 6 (5): 377-88, 2001.

171. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182 (2): 367-77, 1995.
172. Zhang Y, Yao B, Delikat S, Bayoumy S, Lin XH, Basu S, McGinley M, Chan-Hui PY, Lichenstein H, Kolesnick R. Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* 89 (1): 63-72, 1997.
173. Zielinski CC, Schnack B, Grbovic M, Brodowicz T, Wiltschke C, Steger G, Pfluger H, Marberger M. Paclitaxel and carboplatin in patients with metastatic urothelial cancer: results of a phase II trial. *Br J Cancer* 78 (3): 370-4, 1998.
174. Zou C, Liebert M, Zou C, Grossman HB, Lotan R. Identification of effective retinoids for inhibiting growth and inducing apoptosis in bladder cancer cells. *J Urol* 165 (3): 986-92, 2001.
175. Zou C, Ramakumar S, Qian L, Zou C, Zang R, Wang J, Grossman HB, Lotan R, Liebert M. Effect of retinoic acid and interferon alpha-2a on transitional cell carcinoma of bladder. *J Urol* 173 (1): 247-51, 2005.
176. Zou C, Wang L, Liebert M, Grossman HB, Lotan R, Wei Q. Combined effect of chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) and gamma-radiation on bladder cancer cell lines. *Int J Oncol* 13 (5): 1037-41, 1998.

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Altersspezifische Inzidenz des Harnblasenkarzinoms in Deutschland 2009-2010 (aus: Krebs in Deutschland 2009/2010. 9.Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg). Berlin, 2013)

Abb. 2: Strukturformel Gemcitabin

Abb. 3: Wirkmechanismus und Metabolismus von Gemcitabin (aus: Jung FJ. Gemcitabin im Modell der akuten und akzelerierten Transplantatabstossung, Dissertation, Giessen 2002)

Abb. 4: Strukturformel 13-cis-RA

Abb. 5: Strukturformel 4-HPR

Abb. 6: Klassisches IC50-Isobologramm für die Substanzen A und B (aus: Wagenpfeil S, Treiber U, Lehmer A. Statistical analysis of combined dose effects for experiments with two agents. Artif Intell Med 37: 65-71, 2006)

Abb. 7: Zellkultur RT112 (Lichtmikroskop, x100)

Abb. 8: Zellkultur EJ28 (Lichtmikroskop, x100)

Abb. 9: Reaktionsverlauf des XTT-Tests: Reduktion des transparenten Tetrazolium Salzes XTT mit NAD(P)H + H in den Mitochondrien durch mitochondriale Dehydrogenasen zu dem wasserlöslichen, orangefarbenen Farbstoff Formazan (aus: Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res 48 (17): 4827-33, 1988)

Abb. 10: Versuchsansatz bei alleiniger Applikation der Testsubstanzen (13-cis-RA, 4-HPR und Gemcitabin)

Abb. 11: Versuchsansatz der kombinierten Applikation der Testsubstanzen

Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Beziehung für 13-cis-RA in EJ28-Zellen

Abb. 13: Dosis-Wirkungs-Beziehung für 13-cis-RA in RT112-Zellen

Abb. 14: Dosis-Wirkungs-Beziehung für 4-HPR in EJ28-Zellen

Abb. 15: Dosis-Wirkungs-Beziehung für 4-HPR in RT112-Zellen

Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Gemcitabin in EJ28-Zellen

Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Gemcitabin in RT112-Zellen

Abb. 18: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von 4-HPR (μM) zeitlich gefolgt von Gemcitabin (ng/ml) in RT112

Abb. 19: IC50-Isobologramm der Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4-HPR und Gemcitabin in RT112-Zellen

Abb. 20: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von Gemcitabin (ng/ml) zeitlich gefolgt von 4-HPR (μM) in RT112

Abb. 21: IC50-Isobologramm der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gemcitabin und 4-HPR in RT112-Zellen

Abb. 22: Zellüberleben (MW in %) bei kombinierter Applikation von 4-HPR (μM) zeitlich gefolgt von Gemcitabin (ng/ml) in EJ28

Abb. 23: IC50-Isobologramm der Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4-HPR und Gemcitabin in EJ28-Zellen

Abb. 24: Zellüberleben (MV in %) bei kombinierter Applikation von Gemcitabin (ng/ml) zeitlich gefolgt von 4-HPR (μM) in EJ28

Abb. 25: IC50-Isobologramm der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gemcitabin und 4-HPR in EJ28-Zellen

7 Danksagung

Herrn Univ.-Professor Dr. med. J. E. Gschwend und seinem Vorgänger Herrn Univ.-Professor Dr. med. R. Hartung danke ich für die Möglichkeit, die Versuche in seiner Klinik durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. U. Treiber, der mir das Thema für diese Arbeit überlassen hat und mich tatkräftig bei der Durchführung dieser Aufgabe unterstützte. Herr Prof. Dr. Treiber weckte und förderte durch diese Zusammenarbeit maßgeblich mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten.

Ebenfalls zu sehr großem Dank verpflichtet bin ich Frau Dr. rer. nat. A. Lehmer, die mir immer freundlich und stets hilfsbereit nicht nur bei labortechnischen Problemen, sondern auch bei sämtlichen auftauchenden Schwierigkeiten zur Seite stand und mir die Sachverhalte geduldig erklärte.

Den medizinisch technischen Assistentinnen des wissenschaftlichen Labors, Frau Rämisch und Frau Langer, möchte ich für die große Hilfe und die sehr entgegenkommende Unterstützung bei den in-vitro-Versuchen und für das freundliche und lustige Arbeitsklima danken.

Herrn Prof. Dr. Wagenpfeil vom Institut für Statistik und Epidemiologie der TU München danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuche.

Für die permanente Unterstützung während meines Studiums und während der Durchführung dieser Arbeit gebührt meinen Eltern ein ganz besonderer Dank.

Herzlichen Dank auch an meine Freundin Myriam Frick für das große Verständnis und die vielseitige Unterstützung während dieser Arbeit.

8 Lebenslauf

Name: *Christian Matthias Reger*

Geburtsdatum: *22.08.1979*

Geburtsort: *Ehingen/Donau*

Eltern: *Otto Reger*
Theresia Reger, geb. Schorer

Geschwister: *Gerald Reger*
Kathrin Reger

Schulbildung: *Grundschule Längenfeld Ehingen*
Gymnasium Ehingen, Abitur 1999

Studium: *Beginn: Mai 2000*
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: August 2002 (LMU München)
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: November 2006 (TU München)

Praktisches Jahr: *August-Dezember 2005: Innere Medizin, Universitätsspital Basel, Schweiz*
Dezember 2005-April 2006: Chirurgie, Hospital de Clinicas, Buenos Aires, Argentinien
April-August 2006: Wahlfach Urologie, Klinikum rechts der Isar, München

Berufstätigkeit: *April-September 2007: Assistenzarzt Chirurgie, Diakoniewerk München*
Oktober 2007-Juli 2009: Assistenzarzt Chirurgie, Kreiskrankenhaus Ehingen
August 2009-aktuell: Assistenzarzt Urologie, seit März 2015 Facharzt für Urologie, Klinikverbund Südwest, Kliniken Nagold