

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Urologische Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)**

**Effekte des synthetischen Retinoids
Fenretinid (4-HPR)
in Kombination mit Bestrahlung
in humanen Prostatakarzinom-Zelllinien**

Ulrike Margarete Eid

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. U. R. Treiber

2. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

Die Dissertation wurde am 11.11.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	5
1.1 Das Prostatakarzinom	5
1.1.1 Epidemiologie	5
1.1.2 Ätiologie	5
1.1.3 Manifestationsformen	5
1.1.4 Pathogenese	6
1.1.5 Histologie und Grading	8
1.1.6 Stadieneinteilung	10
1.1.7 Klinik	11
1.1.8 Diagnostik	11
1.1.9 Therapie des Prostatakarzinoms	15
1.1.10 Tumornachsorge	21
1.2 Strahlentherapie des Prostatakarzinoms	23
1.2.1 Biologische Grundlagen der Strahlentherapie	23
1.2.2 Zeitliche Dosisverteilung	23
1.2.3 Perkutane Strahlentherapie	24
1.2.4 Brachytherapie	25
1.2.5 Palliative Strahlentherapie	27
1.2.6 Nebenwirkungen der Strahlentherapie	28
1.3 Kombination von Bestrahlung und potentiell zytotoxischen Substanzen beim Prostatakarzinom	29
1.3.1 Ergebnisse in-vitro	29
1.3.2 Ergebnisse in-vivo	29
1.4 Retinoide	31
1.4.1 Physiologie des Retinoidstoffwechsels	31
1.4.2 Retinoidrezeptoren	33
1.4.3 Effekte von Retinoiden in vitro	34
1.4.4 Effekte von Retinoiden in vivo	37

1.4.5	Klinische Anwendung von Retinoiden in der Onkologie	38
1.4.6	Einsatz von Retinoiden beim Prostatakarzinom	40
2	Zielsetzung	44
3	Material und Methoden	45
3.1	Verwendete Zelllinien	45
3.1.1	LNCaP (CRL 1740, ATCC)	45
3.1.2	PC3 (CRL-1435, ATCC)	46
3.2	Kulturgefäße und Well-Platten	48
3.3	Medien und Zusätze	48
3.4	Testzusätze	48
3.5	Das Retinoid 4-HPR (Fenretinid)	49
3.6	Bestrahlung der Zellen	49
3.7	Zellkultivierung	49
3.7.1	Anzucht	50
3.7.2	Passagieren der Zellen	50
3.7.3	Medienwechsel	51
3.8	XTT-Test	51
3.9	Versuche	52
3.9.1	Versuchsaufbau und Durchführung	52
3.9.2	Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR bei initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung	52
3.9.3	Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR bei initialer Bestrahlung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Applikation des Retinoids	53
3.9.4	Statistische Auswertung	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR bei initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung	56
4.1.1	Ergebnisse in der Zelllinie PC3	61
4.1.2	Ergebnisse in der Zelllinie LNCaP	62
4.1.3	Vergleich der Linien PC3 und LNCaP	63

4.2	Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR bei initialer Bestrahlung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Applikation des Retinoids	65
4.2.1	Ergebnisse in der Zelllinie PC3	68
4.2.2	Ergebnisse in der Zelllinie LNCaP	69
4.2.3	Vergleich der Linien PC3 und LNCaP	70
5	Diskussion	71
6	Zusammenfassung und Ausblick	78
7	Literaturverzeichnis	82
8	Abbildungsverzeichnis	94
9	Tabellenverzeichnis	95
10	Abkürzungsverzeichnis	96
11	Eidesstattliche Erklärung	99

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2002 betrug der prozentuale Anteil von Prostatakarzinom an den Krebsneuerkrankungen in Deutschland 22,3% (Robert Koch Institut, 2006). Damit ist das Prostatakarzinom der häufigste maligne Tumor mit der höchsten Inzidenz, gefolgt von Darm- (16,3%) und Lungenkarzinomen (14,9%). Das Alter bei Diagnosestellung beträgt im Durchschnitt 71,4 Jahre, das mittlere Sterbealter 78,4 Jahre. Bei Autopsien findet sich eine mit steigendem Alter ansteigende Prävalenz des Prostatakarzinoms. Hinsichtlich der Krebssterbefälle in Deutschland 2002 belegt das Prostatakarzinom hinter den Lungen- (26,3%) und Darmkarzinomen (12,8%) mit 10,4% den dritten Platz (Robert Koch Institut, 2006).

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist noch nicht genau bekannt. Man nimmt an, dass ethnographische Faktoren eine Rolle spielen. So erkrankten schwarze Amerikaner deutlich häufiger als Japaner, Bewohner westlicher Länder häufiger als Bewohner östlicher Länder. Außerdem vermutet man eine Ursache in fettreicher, ballaststoffarmer Kost. Aber auch die Genetik mit einer positiven Familienanamnese und berufliche Einflüsse wie Cadmiumexposition sind von Bedeutung. Über Einflüsse von Infektionen auf die Entstehung des Prostatakarzinoms wird ebenfalls diskutiert. Unter all diesen Risikofaktoren haben ethnographische Faktoren, Vererbung und Diät die größte Bedeutung (Haese, 2007; Breul, 2003).

1.1.3 Manifestationsformen

Es sind vier verschiedene Manifestationsformen bekannt:

Das latente Prostatakarzinom

Es tritt klinisch nicht in Erscheinung, sondern wird im Rahmen einer Autopsie entdeckt (Börgermann, 2007).

Das inzidente Prostatakarzinom

Es handelt sich hierbei um einen Zufallsbefund, der bei einer histologischen Untersuchung nach einer transurethralen Prostataresektion oder nach einer offenen Prostataadenomenukleation im Rahmen der Therapie einer benignen Prostatahyperplasie entdeckt wird. Die Inzidenz wird mit 6 – 20 % angegeben (Börgermann, 2007).

Das okkulte Prostatakarzinom

Hierbei wird eine Metastase als Erstes klinisch auffällig, während der Primärtumor keine Symptome verursacht und auch palpatorisch nicht nachgewiesen werden kann. Die Diagnose wird mittels PSA-Nachweises im Serum und Biopsie der Prostata gestellt (Börgermann, 2007).

Das klinische Prostatakarzinom

Dieses ist rektal palpabel und kann mit Symptomen einher gehen. Es tritt mit oder ohne Metastasierung auf. Eine auffällige Palpation zusammen mit einem erhöhten Serumwert für PSA (>10 ng/ml) erhärtet den Verdacht auf ein klinisches Prostatakarzinom. Die Bestätigung erfolgt histologisch durch eine Prostatastanzbiopsie.

1.1.4 Pathogenese

Den Hauptteil des Drüsenvolumens nehmen die beiden peripheren Zonen der Prostata ein, gefolgt von der zentralen Zone und der Übergangzone (Abbildung 1). Dementsprechend entstehen ca. 70% bis 90 % der Prostatakarzinome in der peripheren Zone (Huland, 2006), während in der Übergangzone ca. 20 % und in der zentralen Zone nur ca. 5 % bis 10 % der Karzinome auftreten.

Es gibt zwei verschiedene Vorstufen bei der Entstehung eines Prostatakarzinoms: zum Einen die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN), zum Anderen die ASAP (atypical small acinar proliferation). Charakteristisch für die PIN ist eine intraazinäre Proliferation von sekretorischen Zellen mit Kernaplasie. Man unterscheidet dabei eine Low-grade-PIN, die biologisch unbedeutend ist von einer High-grade-PIN, die als Präkanzerose gilt (Breul; 2003). Die PIN tritt hauptsächlich in der peripheren Zone auf. Im Gegensatz dazu findet man die

AAH vorwiegend in der zentralen Zone bzw. der Übergangszone (Börgermann, 2007; Breul, 2003). Kennzeichen der AAH ist eine mikroglanduläre Hyperplasie mit Proliferation neu gebildeter Azini.

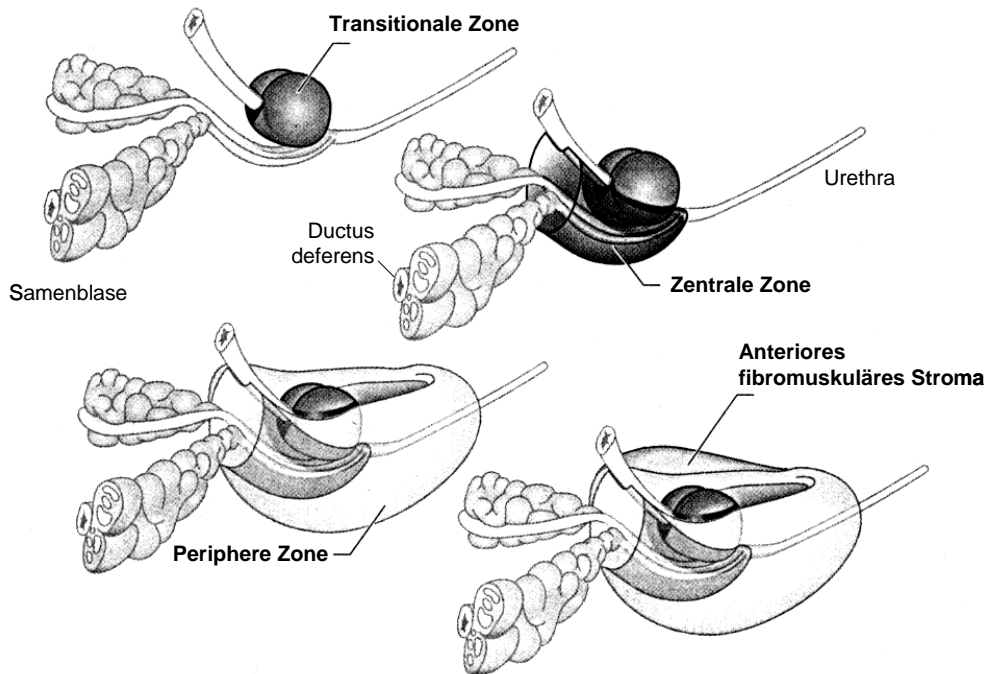


Abbildung 1: Zonale Anatomie der Prostata nach McNeal (Brooks, 1998)

Häufig tritt zusammen mit dem Karzinom auch ein Adenom der Prostata auf, wobei sich das Karzinom nicht aus dem Adenom entwickelt.

Das Prostatakarzinom ist meist hormonsensibel. Testosteron fördert das Wachstum, während Androgenentzug es hemmt.

Bei der rektalen Palpation fällt es als holzharte Induration auf. Zunächst erfolgt das Tumorwachstum innerhalb der Drüse, bevor es zur Infiltration und Penetration von Prostatakapsel und Samenblasen kommt (Huland, 2006). Meist findet kein Wachstum durch die Rektumschleimhaut statt. Statt dessen erfolgt die Ausbreitung entlang von Gefäßwänden und vor allem Nervenscheiden als perineurales Wachstum. Zuerst kommt es meist zur lymphogenen Metastasierung. Dabei werden anfangs die Lymphknoten in der Fossa obturatoria befallen, anschließend auch die präsakralen und anderen iliakalen, später erst die retroperitonealen Lymphknoten (Huland, 2006; Breul, 2003). Die hämatogene Tumorausbreitung findet mittels des periprostativen venösen Plexus über die paravertebralen Venen statt. Dadurch kommt es zu meist osteoblastischen Metastasen im Skelettsystem, v.a. in der Lendenwirbelsäule, dem proximalen Femur und dem knöchernen Becken. Nur selten kommt es zur hämatogenen

Streuung in viszerale Organe wie Lunge, Leber und Nebenniere (Huland, 2006).

1.1.5 Histologie und Grading

Die histologische Klassifikation der Prostatakarzinome beruht sowohl anhand einer modifizierten WHO-Klassifikation, als auch anhand der in Deutschland häufig verbreiteten Klassifikation nach Dohm auf einer Aufteilung in gewöhnliche Adenokarzinome und ungewöhnliche Karzinome (Golz, 1999; Miller, 1999; Börgermann, 2007).

Karzinomtyp		Rel. Häufigkeit (%)
Gewöhnliche Adenokarzinome		90-95
uniform:		40-50
	hoch differenziertes Adenokarzinom	
	wenig differenziertes Adenokarzinom	
	kribriiformes Karzinom	
	solides, undifferenziertes Karzinom	
pluriform:		50-60
	hoch- und wenig differenziertes Adenokarzinom	
	kribriiformes und solides Karzinom	
	kribriiforme Muster in anderen Typen	
	andere Kombinationen	
	Adenokarzinom der Prostatagänge („prostatic duct carcinoma“)	0,4-0,8
	muzinöses Adenokarzinom	ca. 50 publizierte Fälle
Ungewöhnliche Karzinome		5-10
	Transitionalzellkarzinom	1-4
	Neuroendokrines Karzinom	1-2
	Plattenepithelkarzinom	ca. 50 publizierte Fälle
	Sarkomatoides Karzinom	selten
	Kleinzelliges anaplastisches Karzinom	selten
	Pyloider Tumor	Rarität

Tabelle 1: *Histologische Typen des Prostatakarzinoms und ihre relativen Häufigkeiten (Golz, 1999)*

Grading des Prostatakarzinoms

Bei der Tumorgradierung (Grading) sind drei verschiedene Systeme von Bedeutung: das WHO-Grading, das Gleason-Grading und das Grading nach Empfehlungen des Pathologisch-Urologischen Arbeitskreises „Prostatakarzinom“ (Schlomm, 2007; Breul, 2003; Bürgermann, 2007).

Das WHO-Grading

Hierbei gibt es drei Differenzierungsgrade G1-3:

G1: gut differenziert

G2: mäßig differenziert

G3 schlecht differenziert.

Teilweise findet man auch noch die Stufe G4 für eine undifferenzierte ausgeprägte Anaplasie. Ist eine Beurteilung der Differenzierung nicht möglich, bezeichnet man dies als GX.

Das Gleason-Grading

Es basiert auf der Bewertung der Wachstumsmuster. Bei dieser Einteilung finden zelluläre Anaplasien keine Berücksichtigung. Man unterscheidet und beurteilt ein primäres und ein sekundäres Differenzierungsmuster der Drüsen, das in jeweils fünf Grade unterteilt wird. Diese beiden Punktwerte werden addiert und ergeben den „Gleason-Score“, der minimal zwei Punkte und maximal zehn Punkte beträgt. Liegt ein unterschiedliches Wachstumsmuster vor, wird erst die vorherrschende Form und dann getrennt die weitere vorkommende Form bewertet (Schlomm, 2007; Breul, 2003; Bürgermann, 2007). Je höher der Gleason-Score ist, umso höher ist auch die Malignität des Tumors.

Bei einem Vergleich des Gleason-Gradings mit dem WHO-Grading ergibt sich folgende Übereinstimmung:

G1 = Gleason-Score 2 – 4

G2 = Gleason-Score 5 – 6

G3-4 = Gleason-Score 7 – 10

Das Grading nach Empfehlungen des Pathologisch-Urologischen Arbeitskreises „Prostatakarzinom“

Diese Einteilung wird v.a. im deutschsprachigen Raum angewendet und beurteilt sowohl strukturelle (drüsige, kribriiforme bzw. solide Karzinomanteile) als auch zytologische Gesichtspunkte (geringe, mäßige und starke Kernaplasie).

Sie umfasst die Malignitätsgrade Ia,b, IIa,b und IIIa,b. Die Prognose für Ia – IIa ist dabei deutlich besser als IIb – IIIb (Breul, 2003).

1.1.6 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem TNM-System:

T-Primärtumor		
Tx		Primärtumor nicht bestimmbar
T0		Kein Nachweis eines Primärtumors
T1		Klinisch inapparenter Tumor, nicht palpabel oder durch bildgebende Verfahren nachweisbar
	T1a	Inzidenteller Tumor: histologisch in 5% oder weniger des Resektionsgewebes nachweisbar
	T1b	Inzidenteller Tumor: histologisch in mehr als 5% des Resektionsgewebes nachweisbar
	T1c	Tumor identifiziert durch Nadelbiopsie bei z.B. erhöhtem PSA-Wert
T2		Tumor begrenzt auf Prostata
	T2a	Tumor erfasst einen Seitenlappen mit weniger als 50%
	T2b	Tumor erfasst einen Seitenlappen mit mehr als 50%
	T2c	Tumor erfasst beide Seitenlappen
T3		Tumor überschreitet Prostatakapsel
	T3a	Extrakapsulärer Tumor
	T3b	Tumor infiltriert die Samenblasen
T4		Tumor ist fixiert oder infiltriert benachbarte Strukturen
N-Regionäre Lymphknoten		
Nx		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1		Regionärer Lymphknotenbefall
M-Fernmetastasen		
Mx		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0		Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen
	M1a	Extraregionärer Lymphknotenbefall
	M1b	Knochenmetastasen
	M1c	Andere Manifestationen

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Adenokarzinoms der Prostata (Heidenreich, 2008)

1.1.7 Klinik

Symptome beim Prostatakarzinom entstehen manchmal durch obstruktive Miktionsbeschwerden wie sie auch beim Prostataadenom auftreten. Dazu gehören Startschwierigkeiten, Strahlabschwächung, Nachträufeln, Nykturie, Harnverhalt sowie eventuell Hämospemie oder Hämaturie (Huland, 2006).

Die Beschwerden treten allerdings häufig erst in einem späteren Stadium auf, so dass oft zuerst die Symptome auffällig werden, die durch Metastasen, v.a. Lymphknoten- und Knochenmetastasen, verursacht werden:

- Lumbosakrale ischialgiforme Schmerzen durch osteoblastische Metastasen
- Gewichtsverlust und Tumoranämie durch Knochenmarksinfiltration bei fortgeschrittener Erkrankung
- Urämische Symptome bis hin zum postrenalen Nierenversagen durch Harnleiterverschluss in Folge Tumorwachstum im Bereich des Blasenbodens oder durch extrinsische Harnleiterkompression in Folge von Lymphknotenmetastasen im Retroperitoneum und kleinen Becken
- Lymphödem im Genitalbereich oder an den unteren Extremitäten bei Lymphknotenmetastasen

1.1.8 Diagnostik

Digitale rektale Palpation

Es handelt sich hierbei um die einfachste, kostengünstigste und schonendste Methode. Zu tasten sind dabei jedoch nur etwa 10-15% der Prostatakarzinome mit einem PSA-Wert $\leq 4\text{ng/ml}$ (Börgermann, 2007). Von Interesse sind dabei Größe, Form, Abgrenzbarkeit und Induration des Knotens und Verschieblichkeit der Rektumschleimhaut (Breul, 2003).

Das Prostata-spezifische Antigen (PSA)

PSA ist eine Glykoprotein-Serin-Protease, die fast ausschließlich von epithelialen Prostatazellen gebildet wird. Der Normwert im Serum reicht bis 4,0 ng/ml. PSA ist ein organ-spezifischer, kein karzinomspezifischer Marker der Prostata. Dies bedeutet, dass eine Erhöhung sowohl bei benignen (z.B. Benigne Prostatahyperplasie, Prostatitis) als auch bei malignen Prostataveränderungen bzw. -erkrankungen oder auch nach Manipulationen (Prostatamassage, Zystoskopie, Prokto-, Rektoskopie) auftritt. Andererseits führt ein Testoste-

ronmangel, z.B. nach Kastration, durch ein LHRH-Analogon oder ein Antian-drogen zu einem Abfall des PSA-Wertes im Serum (Börgermann, 2007). Der positive prädiktive Wert für eine Tumorerkrankung liegt zwischen 4 ng/ml und 10 ng/ml bei 25 % bis 35 %, bei Werten über 10 ng/ml bei 50 % bis 80 %. Allerdings verursachen nicht alle Prostatakarzinome eine PSA-Erhöhung. Insgesamt kommt dem PSA eine sehr hohe Bedeutung bei der Verlaufskontrolle bei Prostatakarzinomen zu.

PSA wird mittels Radio- oder Enzymimmunoassays bestimmt, wobei es eine Grauzone zwischen 4 ng/ml und 10 ng/ml gibt (Börgermann, 2007). Um deshalb die Unterscheidung zwischen benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom zu erleichtern, bestimmt man das freie PSA (fPSA) und das totale PSA (tPSA) und bildet daraus den Quotienten fPSA/tPSA. Bestimmte Cut-off-Werte, die abhängig von den verwendeten Assays sind, zusammen mit den Werten für das Gesamt-PSA (tPSA) ermöglichen eine verbesserte Aussagekraft im Rahmen der Diagnostik (Börgermann, 2007).

Weitere Laboruntersuchungen

Neben allgemeinen Parametern wie Blutbild, Elektrolyte, Kreatinin, Transaminasen, LDH, γ -GT und BSG sind Calcium und v.a. die alkalische Phosphatase von Interesse. Diese ist bei osteoblastischen Metastasen erhöht. Allerdings ist sie kein tumorspezifischer Marker. Zudem ist sie neben ihre Funktion als Indikator für Knochenveränderungen auch ein Parameter, der Cholestase anzeigt.

Transrektaler Ultraschall

Dieser wird mit hochauflösenden hochfrequenten (7-9 MHz) Sonden durchgeführt, die in das Rektum eingeführt werden. Verdächtig auf ein Prostatakarzinom sind dabei v.a. peripher gelegene hypoechogene Bezirke (Börgermann, 2007; Fornara, 2007; Börgermann, 2007).

Das Prostatakarzinom ist im TRUS als echoarmes Areal in der P-Zone median und im linken Seitenlappen darstellbar (cT2), dies ist in Abbildung 2 und Abbildung 3 dargestellt.

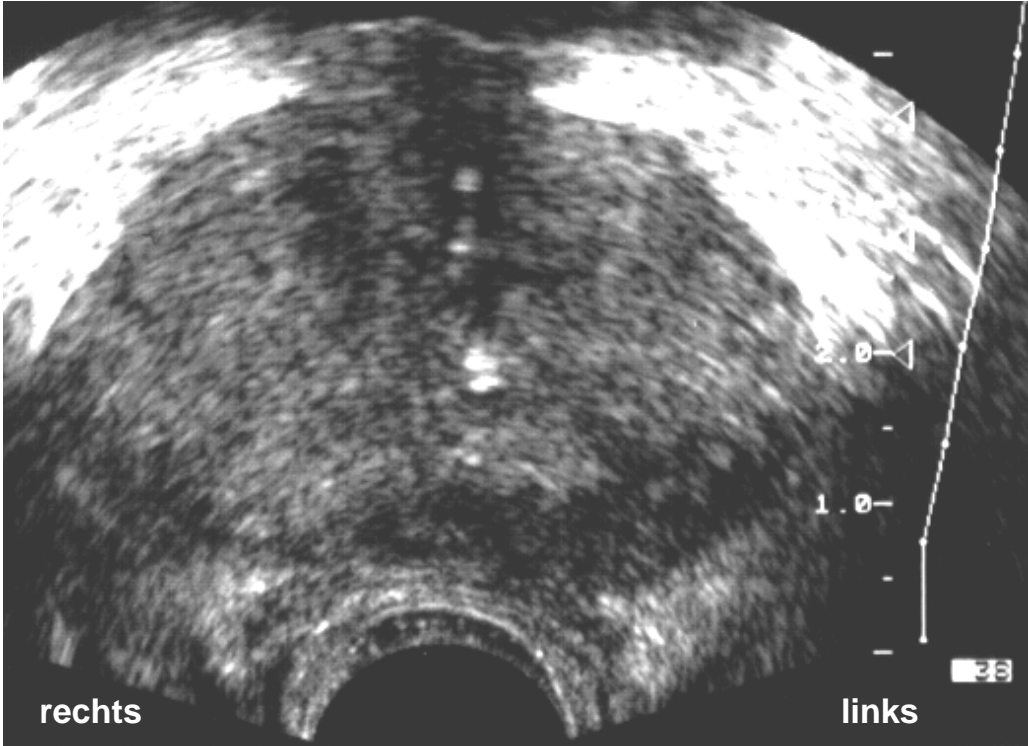


Abbildung 2: basaler Querschnitt

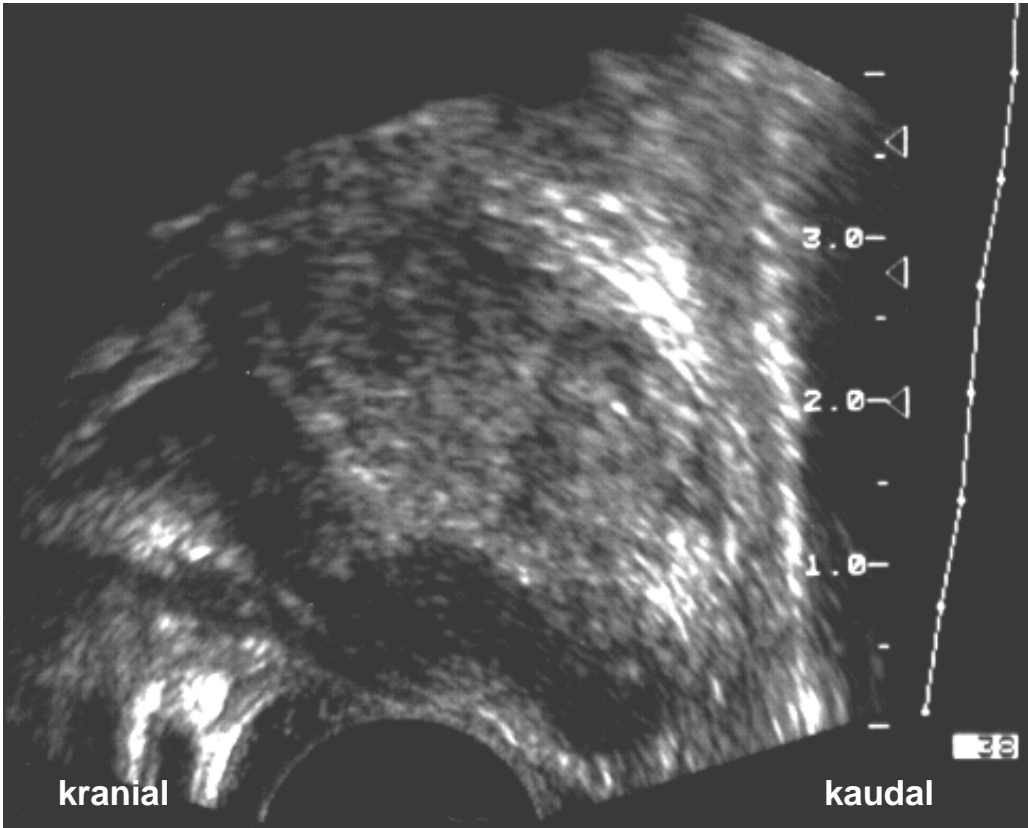


Abbildung 3: median-sagittaler Längsschnitt

Prostatabiopsie

Die Indikation zur Prostatabiopsie ist bei Verdacht auf ein Prostatakarzinom zu stellen. Ein als suspekt tastbarer Knoten in der Prostata oder ein PSA-Wert ≥ 4 ng/ml sind typische Indikationen hierfür. Sie erfolgt als transrektale oder selten auch perineale Prostata-Stanzbiopsie unter transrektaler Ultraschallkontrolle. In der Vergangenheit erfolgte sie als Sextantenbiopsie, bei der sechs Biopsien gewonnen wurden, die dann histologisch untersucht wurden (Börgermann, 2007; Börgermann, 2007). Aktuell werden 10-12 Proben pro Biopsie entnommen (Leitlinien DGU, 2002)

Bildgebende Untersuchungsverfahren

CT und MRT

Beide Verfahren haben nur einen geringen Stellenwert innerhalb der Diagnostik. Das CT kann nur Lymphknotenvergrößerungen von mehr als 1,0 cm bei massivem Lymphknotenbefall nachweisen (Huland, 2006). Mit Hilfe der Kernspintomographie gelingt eine gute Darstellung der zonalen Anatomie der Prostata und des umgebenden Bindegewebes und oft auch der Nachweis kleinerer Lymphknoten. Allerdings sind die erkennbaren Auffälligkeiten oft nicht spezifisch, so dass der Nutzen auch des MRT nur in ausgewählten Fällen gegeben ist (Huland, 2006). Aktuelle Entwicklungen erbringen diagnostische Vorteile für PET/CT und hochauflösendes MRT mit 3T-Magneten.

Skelettszintigraphie

Ihr kommt eine besondere Bedeutung bei der Suche nach Fernmetastasen zu, da das fortgeschrittene Prostatakarzinom oft Skelettmetastasen aufweist. Diese können mit Hilfe von ^{99m}Tc -markierten Bisphosphonaten aufgrund des lokal gesteigerten Mineralstoffwechsels aufgezeigt werden. Die Sensitivität beträgt dabei beinahe 100 %, die Spezifität ist aber deutlich geringer, da auch entzündliche und degenerative Erkrankungen ähnliche Befunde liefern können (Fornara, 2007; Huland, 2006).

Konventionelles Röntgen

Es dient der Verbesserung der Spezifität der Knochenszintigraphie. Bezüglich der Sensitivität für Knochenumbauprozesse liefert die Szintigraphie deutlich bessere Ergebnisse (Fornara, 2007; Huland, 2006).

Zystoskopie, Sonographie der Nieren, intravenöses Urogramm (Ausscheidungsurogramm)

Bei der Erstuntersuchung bzw. vor einer radikalen Prostatektomie empfehlen sich diese Untersuchungen in ausgewählten Fällen, da dadurch eine Beteiligung bzw. Beeinträchtigung von Blase, Nieren und Harnleiter aufgedeckt werden können (Börgermann, 2007; Huland, 2006). Die Zystoskopie wird dabei vor allem bei Verdacht auf Infiltration des Blasenbodens durchgeführt.

Pelvine Lymphadenektomie

Sie gilt als wichtigste diagnostische Massnahme im Rahmen der radikalen Prostatektomie. Es werden dabei die Lymphknoten der Fossa obturatoria entfernt und histologisch untersucht. Derzeit erfolgen Untersuchungen über den Stellenwert einer erweiterten Lymphadenektomie im Rahmen der radikalen Prostatektomie bei lokal fortgeschrittenen Tumoren.

1.1.9 Therapie des Prostatakarzinoms

Wie bei jedem Karzinom hängt die Wahl der Therapieform von bestimmten Faktoren ab: Alter und Allgemeinzustand des Patienten, seine Lebenserwartung, Tumorstadium (TNM) und Differenzierungsgrad des Tumors. Beim Prostatakarzinom spielt zusätzlich noch der PSA-Wert eine Rolle, da bei einem höheren Wert auch die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Metastasen bzw. für einen Organ überschreitenden Befund erhöht ist. Dementsprechend gibt es auch unterschiedliche Therapieoptionen für ein lokal begrenztes und für ein disseminiertes Prostatakarzinom.

1.1.9.1 Therapie bei einem lokal begrenzten Prostatakarzinom (T2-T3/N0/M0)

Es gibt hierbei drei verschiedene Möglichkeiten: Die radikale Prostatektomie, die Strahlentherapie und die sogenannte „Active Surveillance“ (Wirth, 2007).

Radikale Prostatektomie

Eine wichtige Indikation hierfür ist neben der lokalen Begrenztheit des Tumors noch die voraussichtliche mittlere Lebenserwartung des Patienten von mindestens zehn Jahren (Breul, 2003), da der Patient aufgrund der langsamen Wachstumsfraktion des Prostatakarzinoms von < 5 % nur dann von dieser

Therapieart profitiert (Wirth, 2001). Durch die lokale Begrenztheit und die daraus folgende Möglichkeit den Patienten durch die Entfernung der gesamten Prostata und somit auch des kompletten Karzinoms zu heilen, ist die radikale Prostatektomie die Therapie der Wahl (Huland, 2006). Der Zugang hierfür erfolgt meist retropubisch oder auch perineal. Bei der radikalen retropubischen Prostatektomie werden dabei zunächst die Lymphknoten der Fossa obturatoria entfernt und gegebenenfalls mittels Schnellschnittuntersuchung auf Metastasen überprüft. Nur wenn die Lymphknoten noch nicht befallen sind, wird mit der Operation fortgefahren (Huland, 2006) und die gesamte Prostata mit den Samenblasen und der darüber liegenden Denonvillierschen Faszie entfernt. Anschließend wird nach Rekonstruktion des Blasenhalses eine Anastomose zwischen Blasenauslass und Harnröhrenstumpf gebildet.

Neben der offenen operativen Entfernung der Prostata kann diese auch durch laparoskopische Verfahren entfernt werden (Breul, 2003). Bei der radikalen Prostatektomie können Nebenwirkungen bzw. Komplikationen auftreten. Möglich sind dabei erektile Dysfunktion, Harninkontinenz, Blasenhalstriktur, Urethrastriktur, Ureterläsionen, Blutverlust, Rektumverletzung, Nervenverletzung, thromboembolische Komplikationen (Huland, 2006; Breul, 2003; Wirth, 2007).

Eine Sonderstellung nimmt das inzidente Prostatakarzinom ein, das z.B. im Rahmen einer transurethralen Prostataresektion bei benigner Prostatahyperplasie gefunden wird. Beträgt das Karzinomvolumen < 5 % des resezierten Materials, so ist vor allem bei hoch differenzieren Tumoren und älteren Patienten oft keine weitere aktive Therapie erforderlich. Da aber bei 15 % - 20 % der Patienten nach ca. zehn Jahren ein Tumorprogress auftreten kann, führt man bei jüngeren Patienten eine radikale Prostatektomie durch.

Bei der laparoskopischen Entfernung der Prostata ist die Morbidität geringer und der postoperative Krankenhausaufenthalt für den Patienten kürzer (Breul, 2003).

Strahlentherapie

Die Strahlentherapie kann als Mehrfelderbestrahlung, das heißt als externe Bestrahlung oder als permanente interstitielle Strahlentherapie durchgeführt werden. Die externe Radiotherapie wird mittels Telekobalt oder mittels Linearbeschleuniger durchgeführt und erreicht über Tagesdosen von 1,8 Gy bis 2,0 Gy eine Gesamtdosis zwischen 62 Gy und 74 Gy. Bei der interstitiellen Therapie werden sogenannte „Seeds“ meist aus ¹²⁵Jod oder auch ¹⁹²Iridium oder ¹⁰³Palladium direkt in die Prostata eingebracht. Eine perkutane

Aufsättigung durch weitere externe Bestrahlung für eine optimale Gesamtdosis kann dabei zusätzlich erfolgen. Diese Aufsättigung ist auch bei der sogenannten „Afterloading“-Behandlung nötig, bei der temporär radioaktives Iridium durch perineale Nadeln ultraschallgesteuert in die Prostata eingebracht wird (Breul, 2003; Huland, 2006).

Neben den positiven Effekten auf das Karzinom treten auch einige unerwünschte Wirkungen bei der Strahlentherapie auf. Deren Ausmaß und Häufigkeit hängen ab von der Bestrahlungstechnik, der Einzel- und der Gesamtdosis. Am Rektum kann es zu Tenesmen, Ulzerationen und Schleimhautödem sowie später zu chronischer Proktitis, Ulzera, Stenosen und Fisteln kommen. Mögliche Bestrahlungsfolgen an Harnblase und Urethra sind Teleangiektasien und konsekutive Blutungen, chronische Zystitis, Schrumpfblase und Urethrastiktur. Am Dünndarm, vor allem am terminalen Ileum, kann eine Fibrose mit nachfolgender Stenose auftreten. Ein Lymphödem kommt vor allem nach einer kombinierten operativen und Strahlentherapie vor. Ferner können als Spätfolgen einer Bestrahlung Impotenz und Harninkontinenz auftreten. Generell lässt sich also feststellen, dass hauptsächlich Gewebe mit einem raschen Zellwechsel und einer hohen Fähigkeit zur Erneuerung von den Nebenwirkungen einer Bestrahlung betroffen sind (Wirth, 2007; Breul, 2003).

Tabelle 3 fasst die Ergebnisse der verschiedenen Therapiemöglichkeiten bei T2-Tumoren zusammen.

	Radikale Prostatektomie	Strahlentherapie	Brachytherapie
Fünfjahres-ÜL	68,9-95,0 %	51,4-93,0 %	57,0-93,0 %
Progressionsfreies ÜL	81,9-92,0 %	32,0-93,0 %	38,0-90,0 %
Zehnjahres-ÜL	44,4-88,0 %	41,4-70,0 %	k.A.
Progressionsfreies ÜL	82,0-82,0 %	40,0-64,0 %	50,0-90,0 %

Tabelle 3: Ergebnisse der radikalen Prostatektomie bei T2-Tumoren im Vergleich zu Strahlentherapie und Brachytherapie (Nach Middleton et al. 1995 in Wirth, 2001)

„Active Surveillance“

Die Definition einer Patientengruppe mit niedrigem Progressionsrisiko erlaubt die Durchführung einer „Active Surveillance“. Parameter hierbei sind: PSA ≤ 10 ng/ml, Gleason-Score ≤ 6 , T1c-T2a Tumor (bei Männern < 75 Jahren und einer Lebenserwartung > 10 Jahren). Für Männer im Alter von 50-60 Jahren gelten folgende Parameter: Beteiligung von < 3 positiven Stanzbiopsien und $< 50\%$ Tumornachweis in den positiven Stanzbiopsien. Bei Männern > 75 Jah-

ren muss der PSA-Wert ≤ 15 ng/ml und der Gleason-Score ≤ 7 (3+4) sein. Durch ein definiertes Nachuntersuchungsprogramm wird der Verlauf der Erkrankung beobachtet und bei Erreichen bestimmter Parameter eine aktive Therapie eingeleitet (Klotz, 2007)

1.1.9.2 Therapie bei einem lokal fortgeschritten oder metastasierten Prostatakarzinom

Die Therapie in diesem Stadium hat palliativen Charakter, da beim Vorliegen von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen keine kurative Behandlung mehr möglich ist (Wolff, 2007). Das Ziel hierbei ist eine Wachstumshemmung des Prostatakarzinoms durch Entzug der Androgene, da 80 % der Tumorzellklone zunächst noch hormonsensitiv sind (Huland, 2006). Hierfür gibt es folgende Möglichkeiten:

Orchiektomie

90 % der zirkulierenden Androgene werden von den Leydigzellen in den Hoden gebildet. Deshalb bietet die Orchiektomie bzw. die subkapsuläre Orchiektomie nach Riba (Ausschälung des Parenchyms) eine wirkungsvolle Möglichkeit zur Senkung des Testosteronspiegels. Als unerwünschte Nebenwirkungen können dabei psychische Veränderungen und Hitzewallungen auftreten (Wolff, 2007).

Medikamentös

Östrogene

Diese wurden früher als gute Alternative zur Orchiektomie angesehen, da sie Testosteron nachahmen und durch negative Rückkopplung mit der Hypophyse zu einem Rückgang der LH- und FSH-Sekretion führen. Dies wiederum bewirkt eine Senkung des Testosteronspiegels. Auf Grund erheblicher kardiovaskulärer Komplikationen (kardiovaskulärer Tod durch z.B. Herzinfarkt, dekompensierte Herzinsuffizienz) und feminisierender Nebenwirkungen und Impotenz wurde die Östrogentherapie wieder verlassen (Wolff, 2007).

LH-RH-Agonisten bzw. –Analoga

Dazu gehören z.B. Buserelin und Leuprolide. Sie führen in „supraphysiologischer“ Dosierung und kontinuierlicher Therapieabfolge zu einem Abfall von LH. Dadurch kommt es zu einer Senkung von Testosteron bis in den Kastrationsbereich. Mögliche Nebenwirkungen sind dabei Hitzewallungen, Gynäkomastie und Übelkeit (Wolff, 2007).

Allerdings kommt es zu Anfang dieser Therapie (vor allem in den ersten zwei Wochen) durch die LH-RH-Agonisten zu einer Stimulierung der hypophysären LH-Produktion. Der daraus resultierende temporär erhöhte Testosteron-Spiegel bewirkt eine Stimulation des Prostatakarzinoms (sogenannte Flare-up). Zur Verminderung des Flare-up-Phänomens erfolgt zu Beginn der Therapie mit LH-RH-Agonisten temporär zusätzlich die orale Gabe von nichtsteroidalen Antiandrogenen. Die LH-RH-Ausschüttung erfolgt jedoch physiologisch pulsatil und nicht kontinuierlich, so dass eine kontinuierliche -Gabe von LH-RH-Agonisten als alle 1-3 Monate verabreichte Subkutanspritzen schließlich zu einer Erschöpfung der LH-RH-Ausschüttung führt und den Testosteronspiegel dauerhaft senkt.

LH-RH-Antagonisten

Diese blockieren sofort und kompetitiv die hypophysären LH-RH-Rezeptoren. Dabei wird nicht nur der LH-Spiegel, sondern auch der FSH-Spiegel gesenkt, es kommt zu einem schnellen und reversiblen Abfall der Gonadotropine. Als Nebenwirkungen wurden, zusätzlich zu den bereits von der chirurgischen Kastration bekannten Nebenwirkungen, noch eine Histaminfreisetzung und allergische Reaktionen beschrieben (Wolff, 2007).

Antiandrogene

Diese wirken am Erfolgsorgan einschließlich Hypothalamus und Hypophyse und hemmen dort die Testosteronwirkung. Man unterscheidet dabei nichtsteroidale Antiandrogene (Flutamid, Nilutamid, Bicalutamid), die sonst keine weiteren endokrinen Effekte haben, von antigonadotropen, steroidal Antiandrogenen (Cyproteronacetat, Megestrolacetat) und Pharmaka mit antiandrogener Nebenwirkung (Cimetidin, Spironolacton). Die nichtsteroidalen Antiandrogene führen neben einer kompetitiven Hemmung an den Androgenrezeptoren der Prostata auch zu einer Hemmung der zentralen Androgenrezeptoren des Hypothalamus und der Hypophyse und dadurch zu einer LH-RH- und LH-Ausschüttung (Wolff, 2007). Mögliche Nebenwirkungen sind, abhängig von der eingesetzten Substanz, Impotenz (Cyproteron-acetat), Durchfall und Hepatotoxizität (Flutamid). Gynäkomastie ist fast immer möglich, ebenso wie Hitze-wallungen. Zur Prophylaxe der Gynäkomastie erfolgt eine Bestrahlung der Mamillen mit 12 Gy vor Therapiebeginn.

Ca. 80 % der Prostatakarzinome sprechen initial auf den Hormonentzug an. Nach ca. 12-33 Monaten bedürfen aber fast alle Patienten einer sekundären Hormonmanipulation (Wolff, 2007). Unter anderem werden folgende Gründe für die entstandene Hormonempfindlichkeit diskutiert: Reduzierte Expression

des Androgenrezeptors, Androgenrezeptormutation, klonale Selektion androgenunabhängiger Zellen (durch verschiedene Wachstumseigenschaften und durch die Therapie) (Miller, 2007). In diesem Stadium gibt es folgende Therapieoptionen:

Zytotoxische Chemotherapie

Als Kriterium für ein Ansprechen der Therapie gilt ein PSA-Abfall über 50 % des Ausgangswertes und messbare Remission. Verwendung fanden dabei unter anderem Estramustinphosphat (EMP), Mitoxantron und Etoposid. Das Ansprechen auf diese Substanzen ist nur mäßig bis schlecht. Allerdings haben 2 aktuelle Studien (SWOG 9916 und TAX 327) mit dem Taxan Docetaxel den Nachweis von signifikant längerem Überleben von 1,9 bzw. 2,4 Monaten erbracht (Sonpavde, 2006).

Neue Therapieansätze

Zurzeit gibt es einige Studien für neue Therapieansätze, die alle eine Verbesserung und Erhaltung der Lebensqualität für den Patienten als Ziel haben. Zur Steigerung der Effektivität der Chemotherapie mit Docetaxel wird derzeit in vielen klinischen Studien die Kombination von Docetaxel mit anderen Substanzen untersucht. Als Kombinationspartner wurden dabei z.B. Calcitriol, Trypsinkinaseinhibitoren, Antikörper und Antisenseoligonukleotide (ASO) eingesetzt. Darüber hinaus erfolgt die Entwicklung von Medikamenten anderer Substanzklassen einschließlich der Gentherapie (Breul, 2003).

Supportive Therapie

Hierzu gehört die Therapie der Symptome und Komplikationen des hormonrefraktären Prostatakarzinoms. Zentrale Bedeutung hat dabei die Schmerztherapie. Neben Analgetika ist auch die Chemotherapie hierfür eine gute Möglichkeit. Sehr wichtig ist in diesem Zusammenhang die palliative Radiotherapie. Wenn ein sogenannter „Superscan“ im Knochenszintigramm, das heißt eine ausgeprägte Knochenmetastasierung vorliegt, kann man auch die enossale Radiotherapie mit Rhenium oder Strontium anwenden (Breul, 2003). Auch bei intrazerebralen Metastasen wird die Radiotherapie (neben einer Glukokortikoidtherapie) durchgeführt.

Weitere prostatakarzinombedingte Komplikationen sind durch entsprechende Maßnahmen zu behandeln: bei Harnleiterobstruktion perkutane Nephrostomie oder Einlage von Ureterkathetern, transurethrale Elektroresektion bei Miktionsbeschwerden oder doppelläufiger Anus praeter bei Rektumkompression mit konsekutivem Ileus, Strahlentherapie oder Operation bei Rückenmarks-

kompression, Bestrahlung bei drohender Knochenfraktur und operative Versorgung bei einer eingetretenen Knochenfraktur (Schostak, 2007).

1.1.10 Tumornachsorge

Im Hintergrund der Nachsorge steht vor allem das Ziel, ein Tumorrezidiv oder ein Tumorresiduum frühzeitig zu erkennen sowie Komplikationen zu erkennen und zu behandeln. Das Untersuchungsprogramm und die Häufigkeit hängen dabei von der Zeit ab, die seit der Primärtherapie vergangen ist. Folgende Untersuchungen werden dabei durchgeführt (Breul, 2003; Schrader, 2007):

Ausführliche Anamnese

Interessant sind dabei unter anderem: Miktionsbeschwerden, Hämaturie, Allgemeinesbefinden, Leistungsfähigkeit, Inappetenz, Gewichtsabnahme, Stuhlnormmäßigkeiten, Beinödeme, Gefühlsstörungen (Extremitäten) und Skelettschmerzen.

Untersuchung

Digitale rektale Untersuchung im Hinblick auf Tumormasse und Beschaffenheit der Prostata, digitale rektale Untersuchung der Rektumampulle bei Zustand nach radikaler Prostatektomie (Vorhandensein eines Lokalrezidivs?), Untersuchung des äußeren Genitale, der allgemeinen körperlichen Bewegungsfähigkeit, der Wirbelsäule (Klopfschmerz?), der groben neurologischen Funktionen, der Lunge (Perkussion, Auskultation) und des Abdomens (Palpation, Perkussion, Auskultation) sowie Gewichtskontrolle.

Sonographie des Abdomens

Besonderes Augenmerk auf die Nieren (Stau?), die Blase (Restharn?) und die Leber (Filiae?), bei suspekten transrektalen Tastbefunden gegebenenfalls einen transrektalen Ultraschall.

Laborwerte

PSA, Kreatinin, Kalzium, alkalische Phosphatase, Hämoglobin, Leukozyten und BSG.

Neben dem transrektalen Ultraschall stehen bei auffälligen Befunden in diesen Untersuchungen noch weitere Methoden zur Verfügung wie CT, PET/CT, MRT, konventionelles Röntgen und die Skelettszintigraphie.

Dies gilt für die Nachsorge nach kurativer Therapie. Bei bereits metastasiertem Prostatakarzinom findet keine schematisierte Nachsorge, sondern eine

symptomorientierte Betreuung statt. Im Vordergrund stehen dabei die frühzeitige Erkennung von Schmerzen, neurologischen Symptomen und anderer Komplikationen sowie deren Behandlung.

1.2 Strahlentherapie des Prostatakarzinoms

1.2.1 Biologische Grundlagen der Strahlentherapie

Als Ziel der Strahlentherapie gilt die Zerstörung der Tumorzellen oder wenigstens die Hemmung weiterer Zellteilungen. Dabei sollen das gesunde Gewebe und gesunde Organe möglichst nicht von der Bestrahlung geschädigt werden. Das Ausmaß von Veränderungen im gesunden Gewebe ist abhängig von der Gesamtdosis, der Fraktionierung (Höhe der Einzeldosis, Abstand der Einzeldosen und Dauer der Strahlenbehandlung) und dem bestrahlten Volumen (Sack, 2001). Man unterscheidet akute, subakute und chronische Nebenwirkungen. Letztere (Spätfolgen) hängen in Ausmaß und Schwere nicht von der Schwere der akuten Nebenwirkungen ab.

Die fraktionierte und auch die protrahierte Bestrahlung ruft die sog. 4 „R“s hervor:

- **Reparatur:** Fähigkeit, hervorgerufene DNA-Schäden zu reparieren
- **Repopulierung:** Zellvermehrung und Tumorwachstum
- **Reoxygenierung:** Bestrahlung tötet v.a die euoxyschen Zellen ab, somit gelangen die hypoxyschen Zellen näher an die Kapillaren und werden dadurch reoxygeniert
- **Redistribution:** Synchronisation der Zellen durch Blockade der sensiblen G2- und M-Phasen und durch temporäre Abnahme des Mitoseindex. Nach Aufhebung des Blockes wandern die Zellen synchronisiert in den Mitosezyklus und sind bei weiterer Bestrahlung sensibler

Generell beruht die biologische Wirkung ionisierender Strahlen auf der Energieabsorption der Gewebe.

1.2.2 Zeitliche Dosisverteilung

Es existieren verschiedene Fraktionierungsschemata, die alle das Ziel haben, das therapeutische Verhältnis, d.h. den Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit der Tumorkontrolle (Tumorzerstörung) zur Wahrscheinlichkeit größerer Kom-

plikationen (Spätfolgen) zu verbessern (Sack, 2001). Folgende Vorteile der Dosisfraktionierung wurden beschrieben:

- Verminderung der Zahl der hypoxischen Zellen durch Zelltod und Reoxygenierung
- Verminderung der absoluten Tumorzellzahl durch die ersten Fraktionen und die Abtötung der besser oxygenierten Zellen. Wenn die Menge des verfügbaren Sauerstoffs konstant bleibt und weniger Tumorzellen anwesend sind, steigt die Sauerstoffmenge für die verbleibenden Zellen
- Entlastung von Blutgefäßen, die durch einen wachsenden Tumor bisher komprimiert wurden, dadurch verbesserte Sauerstoffversorgung
- Sensibilisierung rasch proliferierender Tumorzellen durch induzierte Redistribution
- Verminderung der akuten Wirkungen der einzelnen Strahlendosen auf gesundes Gewebe

Die Fraktionierung schont gesundes Gewebe durch die Erholung vom subletalen Strahlenschaden zwischen den Fraktionen und die Repopulierung und verstärkt gleichzeitig die Schädigung des Tumors durch Reoxygenierung und Redistribution (Sack, 2001).

1.2.3 Perkutane Strahlentherapie

Die Vorteile dieser Therapieform liegen in der Anwendbarkeit ohne Narkose. Harninkontinenz und erektile Dysfunktion wurden seltener als bei der radikalen (nicht nerverhaltenden) Prostatektomie, die Potenserhaltungswahrscheinlichkeit entspricht derjenigen bei der radikalen Prostatektomie (Wirth, 2007). Nachteile sind im Fehlen eines histopathologischen Stagings, der radiogenen Schädigung des Rektums und der potentiellen Induktion von Zweittumoren im Bestrahlungsgebiet zu sehen.

1.2.3.1 Bestrahlungsplanung

Die dreidimensionale Bestrahlungsplanung und die Konformationsstrahlenbehandlung gelten als Voraussetzungen für eine erfolgreiche nebenwirkungsarme Behandlung und eine Herabsetzung der Spätfolgen (Wirth, 2007). Das Zielvolumen wird dabei über 4-7 Strahlenfelder dosiert. Dadurch kommt es zu keiner Überlagerung der Risikoorgane wie Blase und Rektum. Diese können

zudem in den Strahlenfeldern individuell ausgeblendet werden. Bei konventioneller Fraktionierung wird die Strahlendosis mit Einzeldosen von 1,8-2,0 Gy pro Tag an 5 Tagen der Woche appliziert, so dass die Gesamtbehandlungsdauer 7-8 Wochen beträgt. Eine Strahlendosis von mindestens 72 Gy gilt dabei als erforderlich, um bei der Strahlentherapie vergleichbare Ergebnisse wie bei der radikalen Prostatektomie zu erzielen (Wirth, 2007, Heidenreich, 2008)

1.2.3.2 Adjuvante Strahlenbehandlung

Nachdem lange der Nutzen einer adjuvanten Strahlentherapie nach radikaler Prostatektomie nur retrospektiv über Untersuchungen eingeschätzt werden konnte, gibt es mittlerweile erste Ergebnisse einer prospektiv randomisierten Studie. Dabei zeigte sich, dass durch adjuvante Bestrahlung die Wahrscheinlichkeit für eine biochemische Rezidivfreiheit von 53% auf 74% gehoben werden konnte und das Risiko für ein Lokalrezidiv von 15% auf 5% gesenkt werden konnte (Wirth, 2007).

1.2.3.3 Behandlungsergebnisse

Einzelne Ergebnisse von Studien weisen daraufhin, dass mit der externen Strahlentherapie ähnliche Ergebnisse wie bei der radikalen Prostatektomie erzielt werden können. Im Rahmen einer Langzeitstudie wurde eine tumorspezifische Überlebensrate von etwa 90% beschrieben. Da das 10-Jahres-Gesamtüberleben jedoch nur bei etwa 50% lag, muss die Aussagekraft dieser Studie als eingeschränkt angesehen werden (Wirth, 2007).

1.2.4 Brachytherapie

Darunter versteht man die Verwendung von radioaktiven Strahlern, die in Kontakt zum Tumor gebracht werden (Sack, 2001). Zur Vermeidung von Strahlenbelastung für das Personal wird eine Form der Brachytherapie als Afterloading-Brachytherapie durchgeführt. Dabei wird zuerst ein leerer Applikator eingebracht. Dieser ist mittels eines Schlauchs mit dem Behälter für die radioaktiven Quellen verbunden. Die radioaktiven Quellen können dann automatisch über den Schlauch zugeführt werden. Dadurch muss kein Personal der Strahlung ausgesetzt werden.

Ferner kann die Brachytherapie intrakavitär (Einlage in einen Hohlraum, z.B. bei gynäkologischen Tumoren) oder interstitiell („Spickung“ des tumortragenden Organs z.B. mit Jod-Seeds) erfolgen.

Der Vorteil dieser Therapieform besteht in der Schonung des umgebenden Gewebes und der gezielteren Tumorvernichtung.

1.2.4.1 Allgemeines zur interstitiellen Brachytherapie

Bei der interstitiellen Brachytherapie können die verwendeten Radionuklide entweder im Tumor verbleiben (permanente Einlage) oder nach Erreichen der gewünschten Dosis wieder entfernt werden (temporäre Einlage). Die Auswahl wird durch die Halbwertszeit des verwendeten Nuklids bestimmt. Nuklide mit einer langen Halbwertszeit müssen entfernt werden. Weitere Gesichtspunkte sind die Reichweite der Strahlung und damit die Strahlenbelastung der Umgebung.

Die Brachytherapie kann mit hoher Dosisleistung (Applikation der Dosis in wenigen Minuten) oder mit niedriger Dosisleistung (Applikation der Dosis über Stunden bis Tage) durchgeführt werden.

Ein Nachteil der Brachytherapie ergibt sich aus dem steilen Dosisabfall, der in etwa dem Abstand-Quadrat-Gesetz folgt. Deshalb müssen die Abstände zwischen den einzelnen radioaktiven Seeds auch jeweils einen genau definierten Abstand haben, der exakt eingehalten werden muss. Andernfalls besteht die Gefahr der Überdosierung mit eventueller konsekutiver Nekrose, Fistel- oder Ulkusbildung bzw. die Gefahr der Unterdosierung mit eventuellem konsekutivem Rezidiv (Sack, 2001).

1.2.4.2 Interstitielle Brachytherapie beim Prostatakarzinom

Sie kann mit der permanenten Einlage von ^{125}Jod -Seeds oder $^{103}\text{Palladium}$ -Seeds bzw. auch mit der temporären Afterload-Technik mit $^{192}\text{Iridium}$ durchgeführt werden. (Ash, 2000). Bei der interstitiellen Brachytherapie sind Dosen von bis zu 145 Gy möglich, während bei der perkutanen Strahlentherapie ab einer Dosis von mehr als 80 Gy inakzeptable Nebenwirkungen auftreten (Langley, 2002). Als Kontraindikationen für diese Therapieform werden in Studien eine Lebenserwartung unter 5 Jahren, bestehende Metastasierung und ein Prostatavolumen von mehr als 50 cm^3 angeführt (Ash, 2000). Kriterium für den Therapieerfolg ist im Allgemeinen, dass der PSA-Wert nach Erreichen des

Nadirs nicht mehr ansteigt. In mehreren Studien wurde dabei gezeigt, dass für das Prostatakarzinom im Frühstadium mit einem PSA-Wert kleiner 10 ng/ml und einem Gleason-Score ≤ 6 mit der interstitiellen Brachytherapie gute und nebenwirkungsarme Ergebnisse erzielt werden können (Langley, 2002). Je höher jedoch bereits der PSA-Wert vor Therapiebeginn ist, umso geringer sind die Erfolgsaussichten dieser Therapie. Insgesamt sind die Ergebnisse einer selektionierten Brachytherapie aber bezogen auf krankheitsfreies Überleben und Komplikationsraten vergleichbar mit den Ergebnissen von radikaler Prostatektomie und perkutaner Strahlentherapie (Norderhaug, 2003).

1.2.5 Palliative Strahlentherapie

Ihr Ziel besteht in einer Verbesserung der Qualität des verbleibenden Lebens und eventuell auch in einer Lebensverlängerung bei unheilbar kranken Tumorpatienten. Die Indikation ist bei Metastasen von Skelett, Gehirn, Leber und Querschnittssymptomatik gesichert. Die Ansprechraten betragen dabei mehr als 70% (Rübben, 2001). Bei Knochenmetastasen ist auch noch die Möglichkeit der Radionuklidtherapie zu erwähnen. Dabei sind allerdings deutlich geringere Ansprechwahrscheinlichkeiten zu erwarten.

1.2.5.1 Strahlentherapie bei Knochenmetastasen

Die Indikation ist bei Schmerzen oder bei Frakturgefahr zu stellen. Die Schmerzen lassen sich bei bis zu 90% der Patienten positiv beeinflussen, oft trat in der bestrahlten Region auch kein Rezidiv auf (Sack, 2001; Rübben, 2001). Die Therapie erfolgt dabei meist als perkutane Strahlentherapie. Bei Versagen der Chemo- und Schmerztherapie bzw. wenn keine anderen therapeutischen Alternativen mehr bestehen, kann der Einsatz der Isotope Strontium, Rhenium und Yttrium im Rahmen einer enossalen Strahlentherapie hilfreich sein. Als Folge der Strahlenbehandlung tritt bei 60-80% der Patienten eine Kalkeinlagerung im bestrahlten Bereich und damit eine Stabilisierung des Knochens auf (Sack, 2001).

1.2.5.2 Strahlentherapie bei Hirnmetastasen

Bei Hirnmetastasen sowohl im Kleinhirn als auch im Großhirn stellt die Radiotherapie eine sehr wirkungsvolle Therapieoption dar. Die Strahlentherapie verlängert die Lebenserwartung der Patienten von 5-25 Wochen ohne Behand-

lung auf durchschnittlich 6 Monate (Sack, 2001). Die Bestrahlung bewirkte bei ca. 50% der Patienten eine Verbesserung der neurologischen Ausfälle und bei ca. 80% der Patienten eine Verbesserung der Kopfschmerzen (Sack, 2001; Rübber, 2001).

1.2.6 Nebenwirkungen der Strahlentherapie

Dabei muss man akute und späte Nebenwirkungen unterscheiden. Akute Nebenwirkungen treten an Geweben mit hohem Zellumsatz, wie z.B. Dünndarm, Rektum und Harnblase auf. Meist handelt es sich um Entzündungen, die in der Regel nach Ende der Strahlentherapie schnell abklingen und medikamentös gut beherrschbar sind. Es sind auch Blutungen aus Darm und Blase möglich, die konservativ behandelt werden können, wenn nicht zeitgleich eine Therapie mit Antikoagulantien durchgeführt wird.

Die Spätfolgen hängen von der Bestrahlungstechnik, der Einzel- und der Gesamtdosis ab. An Rektum und Rektosigmoid kann es zu Tenesmen, Ulzerationen, ödematöser und leicht verletzlicher Schleimhaut, chronischer Proktitis, Ulzera, Stenosen und Fisteln kommen (Wirth, 2007). An der Blase wird empfohlen, in gefülltem Zustand zu bestrahlen, da dadurch die Blasenvorderwand nicht im Zielvolumen liegt. Trotzdem häufen sich oberhalb von 70 Gy die Spätfolgen. Es sind dies Teleangiektasien mit Blutungsgefahr, chronische Zystitis, Schrumpfblase, Harnstauungsniere und Strikturen der Urethra. Am Dünndarm ist vor allem das terminale Ileum betroffen, das oberhalb der Harnblase und damit oft im Zielvolumen liegt. Dies kann zu einer Fibrose und in der Folge zu einer Stenose führen (Wirth, 2007). Eine weitere Spätfolge stellen Lymphödeme dar. Die Gesamtoxizität beträgt für den Harntrakt 15,9%, sowie für den Darm 9,8%. Die Rate therapieassoziiierter Todesfälle lag bei 1% und damit höher als in aktuellen Serien zur radikalen Prostatektomie (Wirth, 2007).

1.3 Kombination von Bestrahlung und potentiell zytotoxischen Substanzen beim Prostatakarzinom

1.3.1 Ergebnisse in-vitro

Ziel mehrerer Studien war in letzter Zeit die Untersuchung der Frage, ob durch bestimmte Chemotherapeutika oder anderer Substanzen eine erhöhte Strahlensensibilität der Zellen erreicht werden kann. So wurde bei einer Studie gezeigt, dass durch die Verwendung von Paclitaxel zusätzlich zur direkten Toxizität der Substanz eine erhöhte Strahlensensibilität von Tumorzellpopulationen erreicht werden kann. Dabei zeigten ca. 50% der getesteten Zelllinien (u.a. Astrocytom-Zelllinie G18, Leukämie-Zelllinie HL 60, Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 und der Prostatakarzinomzelllinie PC3) eine Zunahme der Strahlensensibilisierung (Kurdoglu, 1999). Ein weiteres Ergebnis dieser Studie war die Vermutung, dass das Ausmaß des Zelltodes nach der Paclitaxel-Behandlung Voraussagen über die durch Paclitaxel-verursachte Strahlensensibilisierung zulässt. Auch bei den Substanzen Phenylacetat (PA) und Phenylbutyrat (PB) wurden bei Zervixtumoren entsprechende Versuche durchgeführt. Diese zeigten, dass durch die beiden Substanzen die Strahlensensibilität der Zelllinie SW756 (Zellen eines HPV 18-positiven Zervixkarzinoms) erhöht wird. Bei diesen Untersuchungen konnte zudem noch ein zusätzlicher Effekt bei der Kombination von Bestrahlung mit PA und PB und zusätzlicher Gabe von Cisplatin nachgewiesen werden (Ferrandina, 2001). Casarez konnte nachweisen, dass durch 2-Methoxyestradiol durch Beeinflussung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase ebenfalls eine Erhöhung der Strahlensensibilität erreicht werden konnte (Casarez 2007).

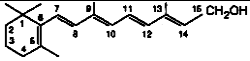
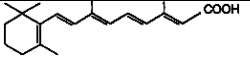
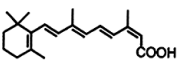
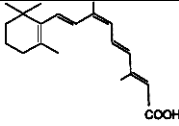
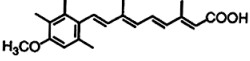
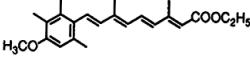
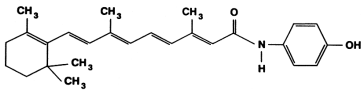
1.3.2 Ergebnisse in-vivo

Auch bei in-vivo-Untersuchungen konnte mittlerweile der positive Effekt der Chemotherapie auf die Strahlensensibilität der Tumorzellen bewiesen werden. Im Rahmen einer Studie wurden dabei Nacktmäusen PC3-Zellen subkutan und LNCaP-Zellen in die Prostata injiziert. Sowohl bei den PC3-Zellen als auch bei den Zellen der Linie LNCaP konnte durch eine kombinierte Therapie aus Adenovirus-vermittelter p53-Gen-Therapie und nachfolgender Bestrahlung mit 5 Gy ein signifikant besseres Ergebnis als bei alleiniger Adenovirus-

vermittelter p53-Gen-Therapie erzielt werden (Cowen, 2000). Wang wies bei Nacktmäusen in der Therapie eines Prostatakarzinoms durch Blockade von Anti-MDM2-Oligonukleotiden, die bei verschiedenen Krebsarten (Prostata, Brust, Kolon) vermehrt vorhanden sind, eine Erhöhung der Sensibilität gegen Bestrahlung und verschiedene Chemotherapeutika (Irinotecan, Paclitaxel, Rituxan) nach (Wang, 2003). Eine weitere Möglichkeit, die Strahlensensibilität beim Prostatakarzinom signifikant zu erhöhen, gelang durch die Kombination von 2-Methoxyestradiol und nachfolgender Bestrahlung bei Untersuchungen mit Nacktmäusen (Casarez, 2007).

1.4 Retinoide

Bei Retinoiden handelt es sich um eine pharmakologische Substanzklasse, die aus Vitamin A (Retinol) und dessen natürlichen (z.B. 13-*cis*-Retinsäure) und synthetischen (z.B. N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid) Derivaten besteht (Smith, 1992; Kiemle-Kallee, 1993). Sie dienen als essentielle Faktoren für die Wachstumsmodulation und Zelldifferenzierung *in vitro* und *in vivo* (Lotan, 1993) sowie für die Regulation komplexer biologischer Systeme lebender Organismen. Dazu gehören z.B. die Regulation der Reproduktion, Morphogenese und Hämatopoese, der Sehfunktion und des Immunsystems. Tabelle 4 zeigt die Strukturformeln der am häufigsten untersuchten Retinoide.

Strukturformel	Substanzname (INN)	Handelsname
	Retinol	Vitamin A
	All- <i>trans</i> -Retinsäure	Vesanoid® (Tretinoin, ATRA)
	13- <i>cis</i> -Retinsäure	Roaccutan® (Isotretinoin, 13cRA)
	9- <i>cis</i> -Retinsäure (9cRA)	nicht im Handel
	Acitretin	Neotigason®
	Etretinat	Tigason*
	N-(4-Hydroxyphenyl)-retinamid (4-HPR)	Fenretinid*

*: in Deutschland nicht im Handel

Tabelle 4: Strukturformeln häufig untersuchter Retinoide

1.4.1 Physiologie des Retinoidstoffwechsels

Die Resorption der Retinoide findet im Dünndarm statt. Sie erfolgt aus diätetischen Quellen in zwei verschiedenen Formen: als Retinylester aus tierischen Nahrungsmitteln und als β -Carotin aus vegetarischen Nahrungsmitteln (Wolf,

1984). Dabei werden Retinylester vorher zu Retinol lysiert und dann erst in die Mucosazelle aufgenommen. Carotinoide werden erst intrazellulär teilweise zu Retinol gespalten (Wang, 1991; Rigtrup, 1992; Blomhoff, 1990). In den Enterozyten kommt es zur sofortigen Bindung an das zelluläre Retinolbindungsprotein Typ II (CRBP II) und anschließend zur Reveresterung mit langkettigen Fettsäuren. Die entstandenen Retinylester werden in Chylomikronen eingebaut. Sie gelangen durch Exozytose in die intestinale Lymphe und über das Blut in die Leber (Ong, 1987). Auf diesem Weg finden einige Hydrolyse- und Apolipoproteinaustauschvorgänge statt, so dass die Chylomikronen als „Chylomikronen-Remnants“ die Leber erreichen. In diesen ist beinahe das gesamte resorbierte Retinol enthalten (Blomhoff, 1990). Zur jetzt folgenden Prozessierung in der Leber tragen hauptsächlich zwei Zellarten bei. Die Hepatozyten dienen der Aufnahme des Metabolismus und der Wiedergabe des Retinols an das Blutplasma, die Lipozyten (Sternzellen, Ito cells) sorgen für die Speicherung des Retinols (Blaner, 1985). Nach Aufnahme der Chylomikronen-Remnants in die Hepatozyten mittels Apolipoprotein-Rezeptoren (LDL-receptor related protein, LDL-Rezeptor) findet sofort die Hydrolyse der Retinylester zu Retinol statt (Blomhoff, 1990; Harrison, 1989). Der hepatische Metabolismus ist abhängig von spezifischen Bindungsproteinen, dem zellulären Retinolbindungsprotein Typ I (CRBP I) und dem plasmatischen Retinolbindungsprotein (RBP). Beide werden in hohem Ausmaß in der Leber exprimiert. Das Verhältnis der beiden Bindungsproteine hängt dabei von der Menge des intestinal resorbierten Retinols ab. Es beeinflusst zum einen die Speicherung von Retinol in den Lipozyten nach Bindung an CRBP I und Reveresterung zu Retinylestern, zum anderen dessen Wiedergabe nach Bindung an RBP an das Blutplasma (Blaner, 1994). Durch diese Vorgänge wird die Aufrechterhaltung der Retinolplasmakonzentration von ca. 2 μM unabhängig von den Schwankungen der täglichen Aufnahme an Vitamin A erreicht. Mittels Bindung an RBP, das im Plasma reversibel an das Thyroidhormon-Bindungsprotein Transthyretin (55 kDa) gebunden ist, wird Retinol von der Leber zur peripheren Zielzelle transportiert. Die Aufnahme von freiem Retinol bzw. von an RBP gebundenem Retinol in die Zielzelle kann wohl auf zwei Arten erfolgen: über einen spezifischen RBP-Membranrezeptor (Bavic, 1991; Heller, 1975) bzw. rezeptorunabhängig (Noy, 1990). Eine weitere Möglichkeit ergibt sich bei der im Plasma an Albumin gebundenen all-trans-Retinsäure, deren Plasmakonzentration 5-20 nM beträgt. Die intrazelluläre Aufnahme dieses Retinoids geschieht mittels eines unspezifischen Membrantransfers. In der Zelle finden dann zuerst zwei Oxydationsreaktionen, die durch Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen katalysiert werden, statt, die zur Umwandlung von Retinol in

aktive Metaboliten führen. Dabei entsteht zunächst die all-trans-Retinsäure (ATRA) und daraus verschiedene Stereoisomere (9-, 11-, 13-cis-Retinsäure) mit unterschiedlichen Affinitäten zu den nukleären Retinoidrezeptoren, über die sie ihre biologische Wirkung entfalten (Mangelsdorf, 1994; Heyman, 1992).

Retinoide werden auf biliärem Weg aus der Zelle eliminiert. Mittels mikrosomaler, mischfunktioneller, Cytochrom P-450 abhängiger Mono-Oxygenasen werden die stark hydrophoben Moleküle erst hydroxyliert, wobei aus der 4-hydroxy-Retinsäure schließlich die 4-oxo-Retinsäure entsteht (Roberts, 1980; Nebert, 1987; Roberts, 1992). Nach der Konjugation mit Glucuronsäure erfolgt die biliäre Exkretion als β -Glucuronid. Von den ausgeschiedenen Retinoiden werden jedoch ca. 30% wieder enteral resorbiert (Blomhoff, 1990; Blaner, 1994).

1.4.2 Retinoidrezeptoren

Zytoplasmatische und nukleäre Bindungsproteine vermitteln die Wirkung der Retinoide. Die „cellular retinol-binding proteins“ (CRBP I und II) und die „cellular retinoic acid-binding proteins“ (CRABP I und II) sind dabei die zytoplasmatischen Bindungsproteine. Sie sind zuständig für den Transport von Retinol und dessen Derivaten zum Zellkern sowie für die Sequestrierung und Metabolisierung der Retinoide, die dadurch bereits im Zytoplasma inaktiviert werden können (Ong, 1994).

Nukleäre Rezeptoren gehören zu den ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktoren (Pemrick, 1994). Sie vermitteln die biologische Wirkung der Retinoide sowie auch die Wirkung von Steroiden, Vitamin D und Thyroidhormonen. Zwei Arten von Retinoidrezeptoren sind zur Zeit bekannt: die Retinsäurerezeptoren (RAR) und die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), von denen jeweils drei Subtypen definiert wurden (Kastner, 1990; Giguere, 1990; Smith, 1992). In Abhängigkeit vom Entwicklungsstand des jeweiligen Organismus zeigt sich eine gewebespezifische Verteilung der verschiedenen Isoformen (Smith, 1992). So weisen Kleinhirn, Hypocampus, Hypothalamus, Nebennieren, Hoden und Keratinozyten der Haut eine hohe Konzentration von RAR α mRNA auf. Auch bezüglich der Ligandenaffinität zeigen sich Unterschiede. RAR zeigt hohe Affinität zu all-trans-Retinsäure (ATRA). RXR hingegen bindet diesen Liganden kaum, statt dessen aber dessen Stereoisomer 9-cis-Retinsäure (9cRA) (Levin, 1992). Die Signaltransduktion erfolgt über bestimmte strukturelle Domänen innerhalb der Rezeptoren (Lotan, 1991; Pemrick, 1994). Einige Domänen zeigen innerhalb einer Rezeptorart eine hohe Übereinstimmung auf Aminosäureebene. Dies ist

ein Hinweis auf ein Ansprechen gemeinsamer Liganden und eine Modulation ähnlicher, retinoidregulierter Gene.

Derzeit sind zwei Wege für die Signaltransduktion bekannt:

Zum einen bilden Liganden (Retinoide) und Rezeptoren (RAR, RXR) abhängig von der intrazellulären Konzentration Rezeptor-Homodimere bzw. Rezeptor-Heterodimere. Diese wiederum binden mit unterschiedlicher Affinität an spezifische Regionen der DNA (RARE: retinoid acid response elements, RXRE: retinoid X response elements) (Pemrick, 1994; Pfahl, 1994). Die Bindung selbst findet für jedes Rezeptormolekül separat an zwei benachbarten, identischen Nukleotidsequenzen (AGGTCA) statt. Diese Sequenzen sind durch fünf Nukleotidpaare unterbrochen. RARE und RXRE sind innerhalb der Promotorregion retinoidregulierender Gene lokalisiert. Dies ermöglicht in Abhängigkeit vom gebundenen Liganden unter nachfolgender Konformationsänderung des Rezeptors die Aktivierung oder Repression der Gentranskription.

Zum anderen bildet die Interaktion mit dem nukleären Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator-Protein 1) die zweite Möglichkeit bei der Signaltransduktion der Retinoide (Pfahl, 1993a; Pfahl, 1993b; Pfahl, 1994). AP-1 ist ein Proteinkomplex aus den Proto-Onkogenen c-Fos, c-Jun und anderer assoziierter Proteine. Es bindet an spezifische DNA-Bindungsstellen und induziert Zellproliferation. Die Wirkung von Retinoiden kann durch Bildung von Heterodimeren aber auch blockiert werden, da diese nicht an die spezifischen DNA-Sequenzen binden können.

Klärungsbedarf besteht allerdings noch bei der Frage, auf welche Art und Weise Retinoide konkret die Differenzierung und das Proliferationsverhalten von Zellen beeinflussen. Bekannt ist, dass Enzymsysteme wie die Ornithindecarboxylase, die Transglutaminase und c-AMP-unabhängige Proteinkinase bzw. die Proteinkinase C retinoid-sensitiv sind.

1.4.3 Effekte von Retinoiden in vitro

In vitro können Retinoide in Tumorzellen folgende biologische Effekte auslösen:

Inhibition von Proliferation, Angiogenese, Motilität und Invasivität, Induktion der Apoptose und Modulation der Gen-Transkription von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Bollag, 1994).

Wachstumshemmung:

Bereits bei alleiniger Gabe von Retinoiden konnte in vitro bei den meisten Zelllinien unterschiedlicher solider Tumoren, die untersucht wurden, abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer eine Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden. Als mögliche Ursache hierfür erachtet man die Akkumulation von Tumorzellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, die bei Zelllinien von Mammakarzinom und Melanom beobachtet wurde (Marth, 1985; Rubin, 1994; Lotan, 1981). Aber auch bei Zelllinien von Neuroblastom und Kopf-Hals-Tumoren trat eine retinoidbedingte Wachstumshemmung auf (Ponzoni, 1995; Oridate, 1995).

Bei Kombination von Retinoiden mit Interferonen (IFN α, β, γ) und Zytokinen (TNF α , TGF β , IL-1) stellte sich eine teils deutliche Zunahme der Wachstumshemmung in Folge synergistischer antiproliferativer Effekte heraus. Bei epithelialen Tumoren (Mamma, Kopf-Hals, Zervix) wurde der synergistische Effekt vornehmlich durch die Zytokine und nicht durch die Art des verwendeten Retinoids beeinflusst. Am effektivsten erwies sich dabei die Kombination mit INF α 1000 U/l (Bollag, 1994). Man vermutet als Grund für den Synergismus die Induktion der Expression von Retinoidrezeptoren durch Interferone sowie wechselseitige Modulation zellmembrangebundener Zytokinrezeptoren und nukleärer Retinoidrezeptoren.

Aber auch die Kombination von Retinoiden mit Chemotherapeutika hatte eine Zunahme der Wachstumshemmung zur Folge, die sich beispielsweise bei dem Einsatz von ATRA und Cisplatin bzw. Paclitaxel bei Ovarialkarzinomzelllinien im Vergleich zum alleinigen Einsatz von Cisplatin bzw. Paclitaxel zeigte (Jozan, 1996; Gercel-Taylor, 1996).

Ein positiver Effekt bezüglich der Wachstumshemmung zeigte sich auch im kombinierten Einsatz von Retinoiden und Vitamin D sowie dessen synthetischen Derivat EB 1089. Zugmaier und Mitarbeiter beobachteten ca. 25% Inhibition bei alleiniger Gabe von Vitamin D bzw. EB 1089 (1 nM) und eine 40%ige bzw. 25%ige Inhibition, die durch alleinige Gabe von ATRA bzw. 9cRA (je 10 nM) erzielt wurde. Diese Raten konnten durch Kombination von EB 1089 mit ATRA bzw. 9cRA auf eine Wachstumshemmung von 75-90% gesteigert werden (Zugmaier, 1996).

Ähnlich hohe Wachstumsinhibition fand sich bei der gemeinsamen Zugabe von Retinoiden und Hormonrezeptorantagonisten. Dabei konnten durch die Kombination von ATRA (1 μM) und Tamoxifen (3 μM) die Wachstumsinhibition auf maximal 95% erhöht werden (Fontana, 1987).

Setzt man Retinoide in vitro gemeinsam mit einer Bestrahlung als Therapie ein, stellt man bei Zelllinien eines Zervixkarzinoms und eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches eine deutliche Zytotoxizität fest. Dabei wurden die Zellen zuerst mit ATRA (10 μM) und $\text{IFN}\alpha$ (50 U/ml) über 24 Stunden therapiert, gefolgt von einer subletalen Radiatio mit einer Einzeldosis von 2 Gy. Dies führte zu einer fast vollständigen Wachstumshemmung (Hoffmann, 1994). Man nimmt an, dass eine Kombinationstherapie von Retinoiden mit Radiatio die Radiotoxizität durch Induktion terminaler Zelldifferenzierungsstufen steigert.

Differenzierungsinduktion:

Sowohl durch alleinigen Gabe von Retinoiden wie auch in Kombination mit Zytokinen, Zytostatika und Vitamin D3 kann eine Zelldifferenzierung induziert werden. Als Beispiele hierfür gelten die Promyelozytenleukämiezelllinie HL-60, bei der ATRA eine vollständige Differenzierung der Tumorzellen zu Granulozyten bewirkt, und die Zelllinien von Neuroblastom, Melanom, Mamma- und Endometrium-, Prostata-Karzinom und von Keimzelltumoren (Smith, 1992; Preis, 1988; Hendrix, 1990; Higuchi, 1991; Ponzoni, 1991; Carter, 1996). Die Induktion der Zelldifferenzierung kann folgende Effekte hervorrufen: Veränderungen der Morphologie, Modulation der Expression von Enzymen, Zytokinen und deren Rezeptoren, Tumoroberflächenantigenen, Proteinen der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts, Proteasen und bestimmten Tumormarkern.

Apoptoseinduktion:

Auch wenn der genaue Mechanismus derzeit noch unklar ist, so ist bereits erwiesen, dass Retinoide (ATRA, 9cRA, 13cRA, 4-HPR) die Induktion von Apoptose bewirken. Dies wurde bei Zelllinien solider Tumoren von Mamma, Neuroblastom, Ovar, Zervix, Kopf-Hals, Lunge und Prostata beobachtet (Wang, 1996; Danforth, 1996; Ponzoni, 1995; Oridate, 1995; Oridate, 1996; Kalemkerian, 1995a; Kalemkerian, 1995b; Hwang, 1995).

Inhibition der Zellmotilität:

Die Gabe von Retinoiden (ATRA, 4-HPR) hatte in Melanom-, Keimzelltumoren- und Prostatakarzinomzelllinien eine Hemmung von Zellmotilität und Invasivität sowie eine Zunahme der Zelladhäsion zur Folge (Hendrix, 1990; Weiss, 1994). Beim Melanom und Prostatakarzinom tritt gleichzeitig mit diesem Effekt eine verminderte Aktivität proteolytischer Enzyme (Kollagenase Typ IV, t-PA) auf.

1.4.4 Effekte von Retinoiden in vivo

Im Rahmen verschiedener Tiermodelle wurden bisher die Auswirkungen einer Retinoidgabe in Bezug auf die Fähigkeit zur Modulation der Karzinogenese und des Wachstums von Primärtumoren und Metastasen untersucht. Die Chemoprävention der Retinoide, das heißt ihre Fähigkeit, die Karzinogenese zu inhibieren, zeigt dabei unterschiedliche Ausprägungen. Sie ist abhängig von Art, Dosis, Applikationsschema, -weg und -zeitpunkt von Karzinogen und Retinoid sowie von Zielorgan, Spezies und Versuchsbedingungen des Wirtstieres (Moon, 1994). Insbesondere bei karzinogeninduzierten Tumoren von Haut, Mamma, Zungen- und Wangenschleimhaut haben Retinoide deutliche inhibitorische Effekte zur Folge. Während Retinoide auf die Karzinogenese von Lungen-, Pankreas-, Ösophagus- und Kolontumoren sowohl einen hemmenden als auch fördernden Einfluss haben, zeigte sich bei Lebertumoren eine Zunahme der Karzinogenese durch verschiedene Retinoide.

Eine Limitierung des klinischen und experimentellen Einsatzes natürlicher Retinoide ergibt sich aus ihrer Toxizität. Als Alternativen zu den natürlichen Retinoiden bieten sich die synthetischen Retinoide an (z.B. N-(4-Hydroxyphenylamid)retinamid (4-HPR)), die bei gleichem Antitumoreffekt deutlich weniger toxisch sind. Ebenso kann eine Kombination von Retinoiden (13cRA, 4-HPR) mit anderen antikanzerogenen Substanzen (Tamoxifen, Bromocriptin, DFMO, Kalzium-Glucarat, Selen, Oltipraz) appliziert werden, die sich als effektiv in der Therapie bei Mamma-, Lungen- und Harnblasenkarzinom erwiesen haben.

Vergleicht man in vivo die chemotherapeutischen Effekte von Retinoiden in transplantierten und karzinogeninduzierten soliden Tumoren mit den chemopräventiven Effekten, so stellen sich die chemotherapeutischen Effekte als deutlich geringer heraus. Dies trifft jedoch nicht für alle Retinoide im gleichen Maß zu. ATRA, 13cRA, 4-HPR, Etretinat und Motretinid bewirken auch im chemotherapeutischen Ansatz eine Reduktion von Wachstumsrate, Tumorge-

wicht, Anzahl und Inzidenz von Lungenmetastasen bei Melanomen, Mammatumoren und Chondrosarkomen (Moon, 1994).

1.4.5 Klinische Anwendung von Retinoiden in der Onkologie

1.4.5.1 Einsatz von Retinoiden in klinischen Studien

Im Rahmen klinischer Studien über die Behandlungserfolge beim Einsatz von Retinoiden konnten mittlerweile gute Ergebnisse nachgewiesen werden. Durch komplette Remissionsraten von über 90% bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL) (Fenaux, 1994; Hong, 1994; Ohno, 1994; Thalmann, 1996), bei verschiedenen soliden Tumoren (Mamma, Melanom, Cervix) und Präkanzerosen (orale Leukoplakien, bronchiale Metaplasien) erhöhte sich das Interesse am Einsatz von Retinoiden in der Tumorthherapie noch weiter (Hong, 1994).

1.4.5.2 Klinische Toxizität von Retinoiden

Retinoide können in therapeutischen Dosen sowohl akute als auch chronische Nebenwirkungen hervorrufen, wobei diese hauptsächlich als Folge einer Vitamin A-Überdosierung auftreten. Da es sich hauptsächlich um dosisabhängige Nebenwirkungen handelt, bessern sich diese meist nach Dosisreduktion bzw. Absetzen.

Nebenwirkungen einer akuten Vitamin A-Überdosierung können sich an der Haut und den Schleimhäuten (Desquamation, Cheilitis, trockene Schleimhäute, Alopezie), am ZNS (Schwindel, Somnolenz, erhöhter Liquordruck, okzipitale Kopfschmerzen, meningeale Irritation), am Intestinum (Übelkeit, Erbrechen, Anorexie, Hepatosplenomegalie, portale Hypertension), am Skelettsystem (Druckschmerzhaftigkeit der langen Röhrenknochen), an den Gefäßen (Petechien, Epistaxis) und anhand der Laborparameter (Vitamin A-Spiegel \uparrow , alkalische Phosphatase \uparrow , Kalzium \uparrow , Serumtransaminasen (GOT, GPT) \uparrow , γ -GT \uparrow , Hypertriglyceridämie, Hypercholesterinämie, VLDL \uparrow , LDL \uparrow , HDL \downarrow) zeigen (Dimery).

Bei einer chronischen Vitamin A-Intoxikation zeigen sich Symptome an der Haut und den Schleimhäuten (u.a. Desquamation, Erythem, Pruritus, abnormales Haarwachstum, trockene Schleimhaut, Cheilitis, Gingivitis), am ZNS (u.a. okzipitale Kopfschmerzen, Schlafstörungen, enzephalographische Veränderungen), am Intestinum (u.a. Anorexie, Hepatosplenomegalie), am Ske-

lettsystem (Druckschmerzhaftigkeit der langen Röhrenknochen, Hyperostosis der Kortikalis), an den Gefäßen (Epistaxis), an den Augen (Sehstörungen durch Papillenödem, Diplopie) und an den Laborparametern (alkalische Phosphatase↑, Kalzium↑, Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie, VLDL↑, LDL↑, HDL↓, Hypoprothrombinämie).

Durch die Erhöhung von VLDL- und LDL bei gleichzeitigem Abfall von HDL kann aufgrund der Entwicklung einer Arteriosklerose das Risiko einer koronaren Herzkrankheit ansteigen.

Des Weiteren haben Retinoide teratogene Nebenwirkungen, weshalb sie bei Frauen im gebärfähigen Alter oder bei inadäquater Kontrazeption nicht angewandt werden dürfen (Dimery; Kiemle-Kalle, 1993).

1.4.5.3 Das Retinoid Fenretinid (4-HPR)

Das Retinoid N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid (4-HPR, Fenretinid) wird aus ATRA und 4-Aminophenol synthetisch hergestellt. Es besitzt ein Molekulargewicht von 391,55 Da und wurde im Rahmen klinischer Studien v.a. zur Chemoprävention bei Mamma-, Zervix-, Ovar-, Lungen- und Hauttumoren und bei oralen Leukoplakien eingesetzt (IARC, 1999). Die Resorption des Retinoids, das meist in einer täglichen Dosis von 200 mg verabreicht wird, wird durch fettreiche Nahrung erhöht und durch kohlenhydratreiche Nahrung gesenkt. 4-HPR wurde Patientinnen mit nodalnegativen Mammakarzinomen in einer täglichen Dosis von 200 mg über 12 Monate verabreicht. Dadurch ergaben sich für die Monate 9-12 während der Einnahme eine Plasmakonzentration für 4-HPR von etwa 400 ng/ml (1 µM) und für den biologisch ebenfalls aktiven Hauptmetaboliten N-(4-Methoxyphenyl)retinamid (4-MPR) von 420-460 ng/ml (Formelli, 1989). Durch eine erhöhte Gabe von 300 mg/Tag in den ersten 6 Monaten des Studienzeitraumes und von 200 mg/Tag in den folgenden Monaten konnte die Plasmakonzentration erhöht werden. Sie betrug dann in den Monaten 9-12 für 4-HPR 620-700 ng/ml und für 4-MPR 670-800 ng/ml. Je nach Dosis sinkt bereits 24 Stunden nach oraler Gabe von 200 mg 4-HPR die Plasmakonzentration von Retinol um 38% und des Retinol-Bindungsproteins um 26%. Dadurch kommt es zu einer der klinisch bedeutsamsten Nebenwirkungen, der reversiblen Verschlechterung des Nachtsehens, weshalb bei Langzeitgabe am Ende eines jeden Therapiemonats eine Einnahmepause von drei Tagen durchgeführt wird. Weitere Nebenwirkungen wurden in einer randomisierten Studie zur Chemoprävention bei Patientinnen mit Mammakarzinom (n=1432) über einen Zeitraum von 5 Jahren untersucht (Camerini, 2001). Dabei traten eine Ver-

schlechterung der Dunkeladaptation (19%), Hautveränderungen (19%), gastrointestinale Nebenwirkungen (13%) und Veränderungen an der Augenoberfläche (11%) auf. Auch Veränderungen der Laborparameter, wie Leberenzyme (GOT, GPT, Bilirubin, AP) bei 7,4%, Cholesterin- und Triglyceridspiegel bei 7,1% und Blutbild bei 1,1%) waren zu beobachten. Deren Inzidenzen waren jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden. Insgesamt waren die Nebenwirkungen im Behandlungszeitraum rückläufig. Deshalb gilt 4-HPR im Vergleich z.B. zu 13-cis-Retinsäure (13cRA) als Substanz mit günstigerem Langzeitprofil und somit als Substanz mit künftiger Bedeutung bei Therapie und Prävention bestimmter solider Tumoren.

1.4.6 Einsatz von Retinoiden beim Prostatakarzinom

1.4.6.1 Effekte in vitro

Sowohl durch alleinige Gabe von ATRA, 9cRA, 13cRA, 4-HPR und rezeptorspezifischer Retinoide als auch durch deren Kombination mit Zytokinen ($TGF\alpha$, $TGF\beta$, EGF), Androgenen, Phenylacetat, Paclitaxel, Vitamin D und dessen Analoga konnte in vitro gezeigt werden, dass deren Applikation antiproliferative Effekte auslöst. Außerdem bewirkt sie die Induktion von Apoptose, die Inhibition von Invasivität und Zellmotilität sowie eine Differenzierungsinduktion (Sekretionsänderung von PSA, Expressionszunahme von Cytokeratin 8 und 18, Expressionsabnahme von Vimentin). Durch Unterschiede hinsichtlich Versuchsdauer, Expositionszeiten, Kulturbedingungen und Konzentrationsbereichen kamen einzelne Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen, teils auch gegensätzlichen Ergebnissen. Allerdings wurde oft auch nur eine Zelllinie und ein Parameter untersucht und das Retinoid nur in kleinen Konzentrationsbereichen eingesetzt. Dies alles schränkt die direkte Vergleichbarkeit der beobachteten Effekte ein. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse von in vitro Untersuchungen in den humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3 bei Einsatz unterschiedlicher Retinoide unter alleiniger Gabe sowie in Kombination mit anderen Substanzen zusammenfassend dargestellt.

Zelllinie	Retinoide	Zellwachstum Alleinige Gabe	Zellwachstum Kombinierte Gabe	Autor/Jahr
LNCaP	ATRA	↑↓ ↓ ↓ ↓ ↔ ↔	EGF, TGF α , TGF β , DHT:↓ Phenylacetat:↓* DHT:↓*	Fong 1993 Wood 1994 Tao 1996 Blutt 1997 Myers 1998 Sun 1999
	9cRA	↓ ↓ ↔ ↓	Vit.-D3-Analoga:↓* Vit.-D3-Analoga:↓*	Esquenet 1996 Blutt 1997 Myers 1998 Elstner 1999
	13cRA	↓ ↓ ↓ ↓	DHT:↓* Phenylbutarat:↓* Docetaxel:↓*	Dahiya 1994 Tao 1996 Pili 2001 Budman 2002
	4-HPR	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	 Butyrat: ^a Safingol:↓*	Hsieh 1997 Myers 1998 Shen 1999 Küfer 2007 Sun 1999 Chen 1999 Maurer 2000
	RAR-selektive Retinoide	↓ ↓ ↓	Vit.-D3-Analoga:↓*	Campbell 1998 Vos 1997 Liang 1999
PC3	ATRA	↓ ↑ ↔		Hwang 1995 Jones 1997 Myers 1998
	9cRA	↓ ↔		Hwang 1995 Myers 1998
	13cRA	↓ ↓	Paclitaxel:↓* Docetaxel:↓*	Cabrespine 2005 Budman 2002
	4-HPR	↓ ↓ ↓ ↓ ↓	 Safingol:↓*	Pienta 1993 Roberson 1997 Myers 1998 Shen 1999 Maurer 2000
	RAR-selektive Retinoide	↓ ↓ ↓	Vit.-D3-Analoga:↓*	Campbell 1998 Vos 1997 Liang 1999

↓: Hemmung; ↓*: Zunahme der Hemmung; ↑: Zunahme; ↔: keine Beeinflussung; ↑↓: biphasischer Effekt;

^a: antagonistischer Effekt; DHT: Dihydrotestosteron

Tabelle 5: Modulation des Zellwachstums der humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 durch Retinoide

1.4.6.2 Effekte in vivo

In 4 von 8 Studien konnte in vivo unter alleinigem Einsatz von 4-HPR eine Abnahme von Tumorinzidenz, -gewicht, Lymphknoten- und Organfiliae beobachtet werden (Ohshima, 1985; Pollard, 1991a; Pollard, 1991b; Pienta, 1993; Slawin, 1993; Lucia, 1995; McCormick, 1998; Shaker, 2001).

In einer aktuellen Untersuchung konnten Küfer und Mitarbeiter zeigen, dass die Kombination von 4-HPR und Butyrat in der Linie LNCaP sowohl in vitro als auch in vivo jedoch antagonistisch auf das Tumorwachstum wirkte (Küfer, 2007).

Nach Vorbehandlung der Zellen der Linie LNCaP mit 1 μ M 13cRA über 7 Tage und anschließender subkutaner Injektion in Nacktmäuse konnte 45 Tage nach Injektion eine Abnahme des Tumorumens um etwa 70% beobachtet werden (Dahiya, 1994).

Unter oraler Gabe von 13cRA in Kombination mit intraperitonealer Gabe von Phenylbutyrat (PB) beginnend 2-5 Tage nach subkutaner Implantation von LNCaP bzw. DU145 wurde im Maus-Modell eine additiv-inhibitorische Wirkung nachgewiesen. Das Tumorwachstum wurde dabei um maximal 82-92% gehemmt (Pili, 2001).

In subkutan bzw. subkapsulär renal implantierten Tumoren in der Ratte des R3327G Dunning Adenokarzinoms verursachte die Gabe von Liarozol eine Abnahme des lokalen Tumorumens um maximal 80%. Dies entsprach dem nach Kastration erreichten Effekt von 82% (Van Ginckel, 1990).

1.4.6.3 Effekte in klinischen Studien

In insgesamt 5 Studien mit 523 Patienten bewirkte der Einsatz von Liarozol (Liazal™) eine Reduktion des PSA in 20-51% der Fälle sowie eine Schmerzreduktion bei 55-66% der Patienten. Da jedoch Nebenwirkungen auftraten, die einer chronischen Vitamin A-Überdosierung entsprachen (Dijkman, 1997; Debruyne, 1998), wurde der klinische Einsatz von Liazal™ beendet.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse klinischer Studien bei Einsatz von Retinoiden bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom dargestellt.

Retinoid	Pat. (n)	Dosis	Ansprechen	Autor/Jahr
ATRA	17	150 mg/m ² /d	Kein Ansprechen	Trumpf 1997
	14	150 mg/m ² /d	Kein Ansprechen	Kelly 1993
	26	45 mg/m ² /d	- PSA↓ in 15% - kein Ansprechen in messbaren Läsionen	Culine 1999
Liazorol	105	300-600 mg/d	- PSA (>50%)↓ in 30% - MÜLZ 14Monate	Denis 1995
	135	2x75-300 mg/d	PSA (>50%)↓ in 51%	Smith 1996
	42	2*300 mg/d	- PSA (>50%) ↓ in 41% - Schmerz ↓ in 55%	Dijkman 1997
	161	2*300 mg/d	- PSA (>50%) ↓ in 20% - PSA ↔ in 64% - Schmerz ↓ in 66%	Debruyne 1998
Liarozol, Prednison, AB	80	2x300 mg/d 15 mg/d	PSA (>50%)↓ in 22% Lebensqualität ↑ in 52%	Andel 1999
13cRA, IFN α	14	1 mg/kg KG/d	PSA ↓ in 14%	Kelly 1996
	10	1 mg/kg KG/d	PSA ↓ in 80%	Higano 1996

↓: Hemmung; ↔: keine Beeinflussung, MÜLZ: Mediane Überlebenszeit, AB: Androgenblockade

Tabelle 6: Einsatz von Retinoiden bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom in klinischen Studien

2 Zielsetzung

Bisher gibt es für das metastasierte, androgenunabhängige und –resistente Prostatakarzinom keine etablierte Therapie, die einerseits klinisch zufrieden stellend wirksam ist und andererseits abgesehen vom Einsatz des Chemotherapeutikums Docetaxel signifikant lebensverlängernd ist. Retinoide weisen als Monosubstanzen und in Kombination mit zytotoxischen, immunmodulierenden und differenzierungsinduzierenden Substanzen beim Prostatakarzinom und anderen malignen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* deutliche antiproliferative Effekte auf. Untersuchungen zur Wirkungsweise einer kombinierten Applikation von Retinoiden und Bestrahlung in humanen Prostatakarzinomzelllinien liegen bislang nicht vor. Das synthetische Retinoid 4-HPR wurde aufgrund seiner antiproliferativen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* in humanen Prostatakarzinomzelllinien sowie wegen seines günstigen klinischen Toxizitätsprofils für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte einer kombinierten Applikation von Bestrahlung und dem Retinoid N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid (4-HPR) an der androgenabhängigen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP und der androgenunabhängigen Linie PC3 *in vitro* zu untersuchen. Durch zeitlich unterschiedliche Applikation der einzelnen Komponenten sollten die Effekte einer simultanen Gabe im Vergleich zu einer sequentiellen Gabe überprüft werden. Hierbei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Führt das Retinoid 4-HPR in Kombination mit Bestrahlung zu einer Zunahme der Zytotoxizität im Vergleich zu den zytotoxischen Effekten bei der jeweils alleinigen Applikation des Retinoids oder der Bestrahlung?
- Finden sich Änderungen des zytotoxischen Effektes bei kombinierter Applikation in Abhängigkeit von der zeitlichen Reihenfolge der Applikation (Sequenzeffekte)?
- Bestehen zelllinienspezifische Unterschiede hinsichtlich der Modulation der Zytotoxizität bei kombinierter Applikation von Retinoid und Bestrahlung?

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Zelllinien

3.1.1 LNCaP (CRL 1740, ATCC)

Diese Zellen stammten aus der Tumorbank der Heidelberger Firma CLS (Cell Lines Service). Die permanente humane Prostatakarzinomzelllinie LNCaP stammte ursprünglich von einem Patienten mit einer supraclaviculären Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Kulturmedium aus RPMI 1640 mit Glutamin, 10% fetalem Kälberserum und nicht essentiellen Aminosäuren. LNCaP-Zellen sind androgenabhängig und bilden prostataspezifisches Antigen (PSA) und prostataspezifische saure Phosphatase.

In Abbildung 4 und Abbildung 5 sind die Zellen der Linie LNCaP nach einer Kulturdauer von 120 Stunden ohne und mit Gabe von 4-HPR (5 μ M) dargestellt.

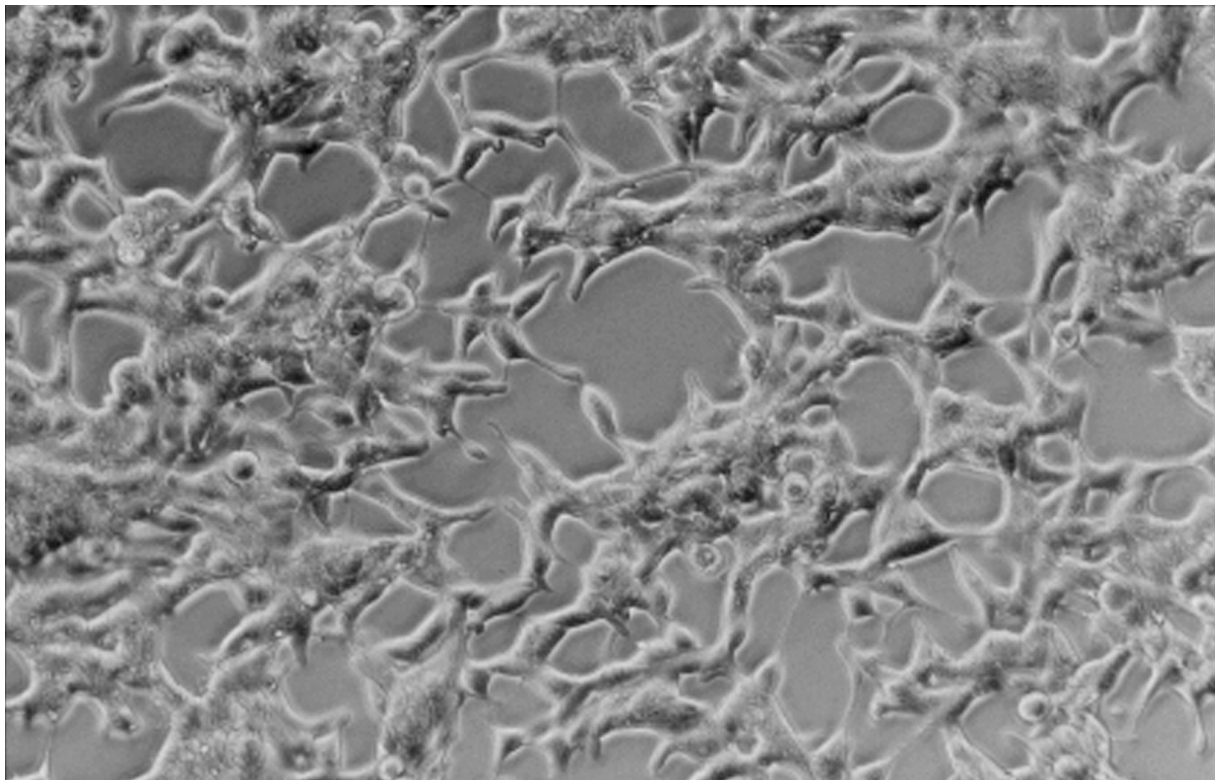


Abbildung 4: Zelllinie LNCaP, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)

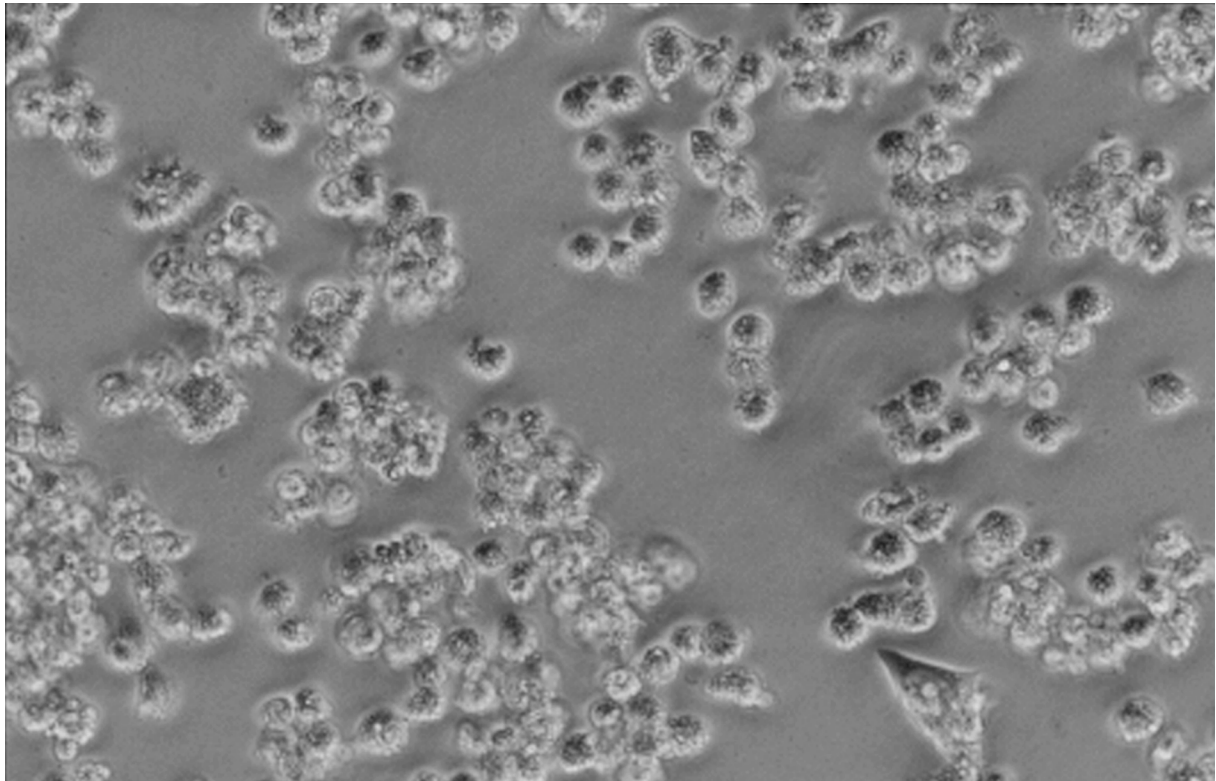


Abbildung 5: Zelllinie LNCaP, 120 Stunden, 5 μ M 4-HPR (x320)

3.1.2 PC3 (CRL-1435, ATCC)

Diese Zellen stammten aus der Tumorbank der Heidelberger Firma CLS (Cell Lines Service). Die PC3-Zellen wurden beim ersten Mal aus einer Knochenmetastase eines Patienten mit einem Adenokarzinom der Prostata entnommen. Zellen der Linie PC3 sind androgenunabhängig, bilden kein PSA, besitzen aber in geringen Mengen saure Phosphatase- und Testosteron-5 α -Reduktase-Aktivität.

In Abbildung 6 und Abbildung 7 sind die Zellen der Linie PC3 nach einer Kulturdauer von 120 Stunden ohne und mit Gabe von 4-HPR dargestellt.

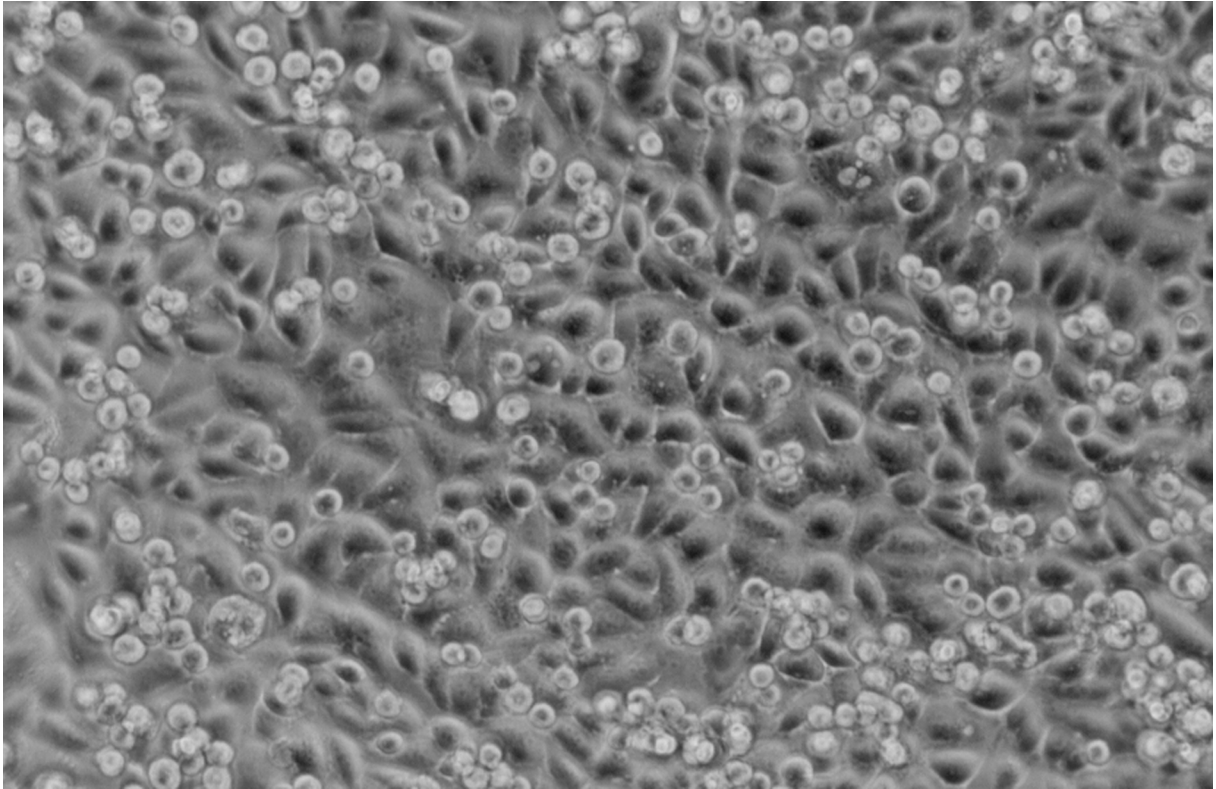


Abbildung 6: Zelllinie PC3, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)

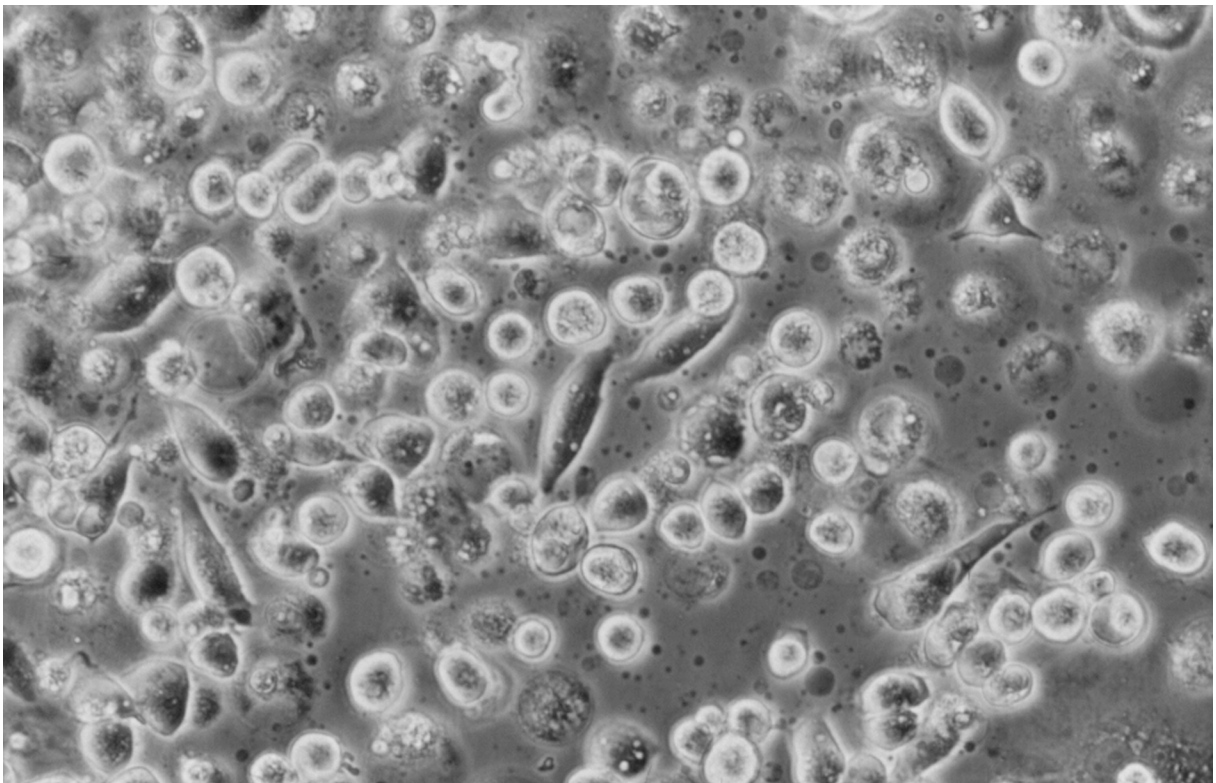


Abbildung 7: Zelllinie PC3, 120 Stunden, 5 μ M 4-HPR (x320)

3.2 Kulturgefäße und Well-Platten

Die Zellanzüchtung erfolgte in Kulturgefäßen der Marke Cellstar® Greiner Nr.: 690175 mit einem Fassungsvermögen von 50 ml.

Für die Versuche wurden 96 Well-Platten mit Abdeckplatten der Marke Cellstar® verwendet. Bei diesen Platten von der Firma Greiner Labortechnik hatte jedes Well ein maximales Füllungsvolumen von 380 µl.

3.3 Medien und Zusätze

Alle Medien und Medienzusätze wurden bei +2° bis +8°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640-Medium der Firma Biochrom AG (w 2,0 g/l NaHCO₃, w 0.532 g/l stabil glutamine tested for endotoxin, Cat. No. FG 1215 500ml) verwendet.

Für alle Medien wurden 5 ml Non-Essential-Amino-Acids (NEAS) der Firma Biochrom (Cat. No.K0293 100ml) hinzupipettiert.

Das Medium für die Anzucht der Zellen enthielt 10% des Fetal Bovine Serum (FKS) der Firma Biochrom AG (getestet gegen Mykoplasmen, hitzeinaktiviert bei 56°C für 20 min, CAT. No. 50115 500 ml), das Medium für die Proliferationsversuche enthielt 5% FKS.

Für die PC3 Zellen wurde zusätzlich 5 ml Sodium Pyruvate (Cat. No. L0473 100 ml) der Firma Biochrom KG zugefügt.

Trypsin/EDTA-Lösung der Firma Biochrom KG (0,05%/ 0,02% (w/v) in PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Cat No. L2143 100ml) wurde dazu verwendet, um die Zellen vom Boden der Kulturgefäße wieder abzulösen.

PBS ist eine phosphatgepufferte Salzlösung: pH 7,2-7,4; 1fach hergestellt aus 8g NaCl, 0,2g KH₂PO₄, 1,15g Na₂HPO₄, 0,2g KCl mit Aqua dest auf 1l auffüllen und autoklavieren.

3.4 Testzusätze

XTT (Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl 2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt): es handelte sich um ein lösliches, lichtempfindliches Salz der Firma Sigma. Dieses wird in RPMI 1640-Medium ohne Zusätze aufgelöst. Die Endkonzent-

ration betrug dabei 1 mg/ml. Die fertige Mischung wurde im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

PMS (phenazin methosulfat; N-Methyldibenzopyrazin, Best. Nr. P-5812 1g, Sigma Chemicals Co St. Louis, USA): Lichtempfindliche elektronenpaarbindende Substanz, die zur Beschleunigung der Bioreduktion von XTT diente. PMS wurde in PBS aufgelöst bis zur Endkonzentration von 0,383 mg/ml und anschließend im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

3.5 Das Retinoid 4-HPR (Fenretinid)

Das Retinoid 4-HPR mit einem Molekulargewicht von 391,6 Da wurde von der Firma Sigma bezogen und im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Durch Mischung von 5 mg des Retinoids mit 1,28 ml 96%igem Ethanol wurde eine 10 mM Lösung hergestellt und mit Medium im Verhältnis 1:50 verdünnt. Dadurch wurde die für die Versuchreihen benötigte 200 μM Lösung gewonnen.

4-HPR wurde für die Testung der Zellproliferation bei unterschiedlicher Vor- bzw. Nachbehandlung der Zellen mit Bestrahlung verwendet.

3.6 Bestrahlung der Zellen

Die Bestrahlung der Kuturgefäße erfolgte im Institut für Strahlentherapie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls) mit einem Hochvolt-Linearbeschleuniger der Fa. Siemens durchgeführt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in Gewebekulturplatten bei Raumtemperatur bei 335 Monitoreinheiten entsprechend 5 Gy. Der Abstand der Strahlenquelle zum Monolayer betrug 80 cm und die Feldgröße 30x30 cm. Als Gewebeelement wurde 3 cm dickes Plexiglas verwendet.

3.7 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank Lamin Air der Firma Heraeus Instruments (HB2448) mit vertikaler Strömung.

3.7.1 Anzucht

Zur Zellanzucht wurden Kulturgefäße der Marke Cellstar[®] der Firma Greiner Labortechnik verwendet.

Um optimale Bedingungen für die Zellproliferation zu gewährleisten, wurden die Gefäße während der Wachstumsphasen in einem Heraeus Brutschrank aufbewahrt (Fabrik-Nr B6030, Kulturbedingungen: 37°C, 5% CO₂, 95% Luft, 100% rel. Luftfeuchte).

3.7.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen für die Versuche waren jeweils in flüssigen N₂ bei -196°C eingefrorene Tumorzellen. Nach Wiederauftauen dieser Tumorzellen wurden diese in Kulturgefäßen gezüchtet. Da die Zellen sich gegenseitig in ihrem Wachstum hemmen, wenn eine gewisse Dichte in den Gefäßen überschritten ist, mussten sie regelmäßig passagiert werden (bei PC3 jeden sechsten Tag, bei LNCaP nur jeden siebten Tag). Zusätzlich konnte durch das Passagieren auch die Zellzahl ermittelt werden. Diese musste bekannt sein, damit die nötige Menge an Zellen für die Aussaat in den Kulturgefäßen bzw. für die Versuchsansätze in den 96-Well-Platten bestimmt werden konnte.

Beim Passagieren erfolgt zunächst das Absaugen des Mediums aus den Kulturgefäßen. Anschließend wurden 5 ml PBS zum Spülen der Zellen hinzupipettiert und danach erneut abgesaugt. Daraufhin wurden 2 ml Trypsin dazugegeben, das gleichmäßig über den Gefäßboden verteilt wurde. Zum Ablösen der Zellen vom Boden wurden die Gefäße mit dem Trypsin 5 min bis 10 min in einem Brutschrank inkubiert und der Erfolg dann unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Durch Schütteln der Kulturgefäße trennten sich die Zellen voneinander. Nach Zugabe von 5 ml 10%igem FKS wurden die Zellen mitsamt der Flüssigkeit in 10 ml fassende Röhrchen pipettiert und 5 Minuten lang mit 300 g zentrifugiert. Der Überstand konnte dann abgesaugt werden. Hierauf wurde das Sediment bei darauffolgenden Versuchen mit 5%igem FKS, sonst mit 10%igem FKS aufgelöst und die Zellzahl anschließend bestimmt. Dazu wurden 20 µl des zellenhaltigen Mediums mit 20 µl Trypanblau gemischt und anschließend in eine Neubauer-Zählkammer eingefüllt. Unter dem Lichtmikroskop wurde dann die Zellzahl ausgezählt. Die daraufhin zur Zellanzucht bzw. für die Versuche notwendige Menge des Zell-Medium-Gemisches wurde dann bestimmt. Diese wurde in Kulturgefäßen mit 10% FKS-Medium auf 5ml aufgefüllt. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Testung von Medien und Tu-

morzellen auf Mykoplasmen. Alle getesteten Medien und Zellen waren dabei während der Gesamtdauer der Versuchsdurchführungen immer negativ.

3.7.3 Medienwechsel

Für optimale Wachstumsbedingungen musste das Zellmedium in den Kurlturgefäßen alle drei bis vier Tage gewechselt werden. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und in die Gefäße neues 10% FKS-Medium pipettiert.

3.8 XTT-Test

XTT ist ein nicht toxisches Tetrazoliumsalz. Dieses wird in den Zellmitochondrien durch Dehydrogenaseenzyme in einen wasserlöslichen Formazan-Farbstoff umgewandelt (Roehm, 1991). Voraussetzung hierfür ist jedoch eine intakte Atmungskette in den Mitochondrien. Diese ist nur in lebenden Zellen vorhanden. Somit besteht ein Zusammenhang zwischen der Menge an entstandenem Farbstoff und der Anzahl noch lebender Zellen. Die Bestimmung des vorhandenen Farbstoffes erfolgt durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät.

Zunächst wurden XTT und PMS wegen ihrer Lichtempfindlichkeit in dunklen Schränken aufgetaut. In der Testlösung hatte die Mischung von XTT und PMS ein Verhältnis 50:1, es wurden also 5ml XTT mit 100µl PMS in ein Reagenzglas pipettiert. Danach wurden jedem Well der Platten 50µl der entstandenen Mischung aus XTT und PMS hinzugefügt.

Am Versuchsende wurden die Tumorzellen mit der XTT/PMS-Lösung vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Absorption des entstandenen gelben Formazan-Farbstoffs in einem Mikroplattenphotometer (Thermo max Mikroplate Reader, Molekular Devices, made in USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

3.9 Versuche

3.9.1 Versuchsaufbau und Durchführung

Für alle Versuche wurden Mikrotiterplatten mit 96 Well verwendet. Die verwendeten Passagennummern der Tumorzellen lagen jeweils zwischen 30 und 90, da die Zellen bei höheren Passagennummern ihre Wachstumseigenschaften verändern können. Bei den Versuchen wurde RPMI-Medium mit 5% FKS verwendet. Bei der Aussaat kamen in jedes Well 200 µl Testmedium. Für die Wells ohne Zellen waren dies 200 µl Medium, die übrigen Wells enthielten Zellsuspension. Für jede Zellart war die Zellzahl dabei unterschiedlich. Zur Zellaussaat wurden bei LNCaP 6000 Zellen/Well und bei PC3 3000 Zellen/Well eingesetzt. Nach der Zellaussaat erfolgte nach 24 Stunden die Applikation des Retinoids (4-HPR) oder die Bestrahlung (RTX). Aufgrund der Erfahrungen bei anderen in-vitro-Arbeiten wurde bei der Bestrahlung eine Dosis von 5 Gy gewählt, so dass in allen Versuchen, bei denen Tumorzellen bestrahlt wurden, 5 Gy appliziert wurden. Alle Versuche wurden zeitlich unabhängig voneinander dreimal durchgeführt. Jede eingesetzte Konzentration von 4-HPR erfolgte in vierfachem Ansatz (4 Wells).

Beim gewählten Versuchsaufbau erfolgte zunächst die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Hierbei erfolgte die Ermittlung des Tumorzellüberlebens in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration von 4-HPR (0,001-10 µM). Zum anderen wurde das Zellüberleben bei den unterschiedlichen Therapieansätzen bei der Konzentration von 4-HPR untersucht, bei der anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven ein 50%iges Zellüberleben der nur mit 4-HPR behandelten Zellen festgestellt worden war. Dazu wurden zwei vom Versuchansatz unterschiedliche Versuche durchgeführt.

3.9.2 Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR bei initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung

Der Versuchsansatz erfolgte dabei in 4 96-Wellplatten und wurde zeitlich unabhängig dreimal durchgeführt. Dabei erfolgte die Zellaussaat zelllinienspezifisch mit unterschiedlichen Zellzahlen pro Well: LNCaP: 6000 Zellen/Well, PC3: 3000 Zellen/Well. Nach einer Adhärenzzeit von 24 h erfolgte die Exposition der Zellen mit insgesamt 13 unterschiedlichen Konzentrationen von 4-

HPR (0,001-10 μM), wobei für jede der Konzentrationen 4 Wells auspipettiert wurden. Die Bestrahlung mit 5 Gy erfolgte in einer Platte unmittelbar nach Zupipettierung des 4-HPR (d1, 24 Stunden nach Zellaussaat). in einer zweiten und dritten Platte, in welche ebenfalls nach 24 Stunden das Retinoid zugegeben wurde, 72 Stunden bzw. 120 Stunden nach Zellaussaat (s. Abbildung 8). Eine vierte Platte diente als Kontrolle zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve von 4-HPR ohne Bestrahlung. Der Versuch wurde 144 Stunden nach Zellaussaat beendet. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Messung der Farbstoffextinktion mittels XTT-Test.

Testplatten

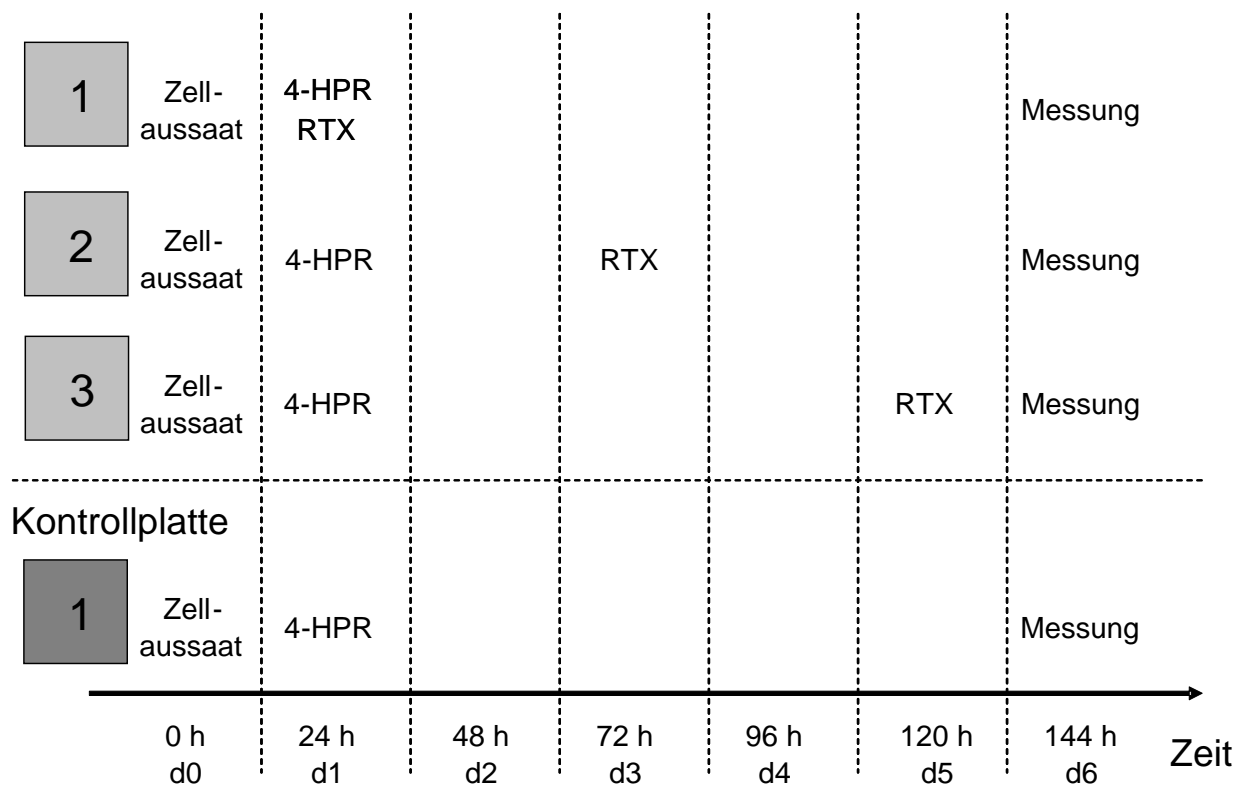


Abbildung 8: Versuchsplan zur Überprüfung der Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurven von 4-HPR (0,001-10 μM) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der einmaligen Bestrahlung (5 Gy)

3.9.3 Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR bei initialer Bestrahlung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Applikation des Retinoids

Der Versuchansatz erfolgte wiederum in 4 96-Wellplatten und wurde zeitlich unabhängig dreifach durchgeführt. Die Zellaussaat erfolgte zelllinienspezifisch

mit unterschiedlicher Zellzahl pro Well: LNCaP: 6000 Zellen/Well, PC3: 3000 Zellen/Well.

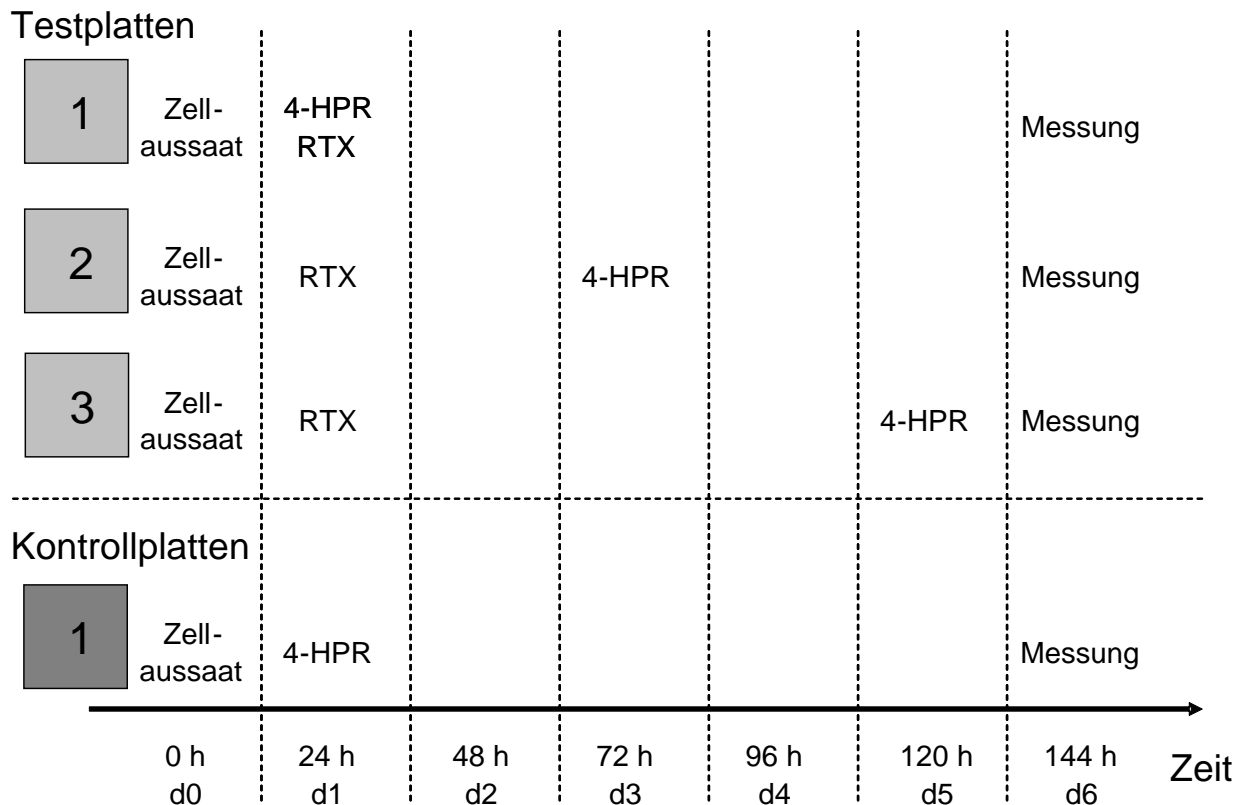


Abbildung 9: Versuchsplan zur Überprüfung der Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR (0,001-10 μ M) bei initialer, einmaliger Bestrahlung (5 Gy) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Retinoidapplikation

Nach einer Adhärenzzeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit 5 Gy bestrahlt. Die Hinzugabe der unterschiedlichen Konzentrationen von 4-HPR (0,001-10 μ M), wobei für jede der Konzentrationen 4 Wells ausgespiet wurden, erfolgte bei einer Platte unmittelbar nach der Bestrahlung. Bei einer zweiten und dritten Platte wurde nach initialer einmaliger Bestrahlung mit 5 Gy nach 24 Stunden das 4-HPR (0,001-10 μ M) 72 bzw. 120 Stunden nach Zellaussaat hinzugespiet (s. Abbildung 9). Zur Kontrolle wurde pro Zelllinie jeweils eine Platte vorbereitet, die nicht bestrahlt wurde. Die Zugabe von 4-HPR (0,001-10 μ M) erfolgte 24 Stunden nach Zellaussaat. Der Versuch wurde 144 Stunden nach Zellaussaat beendet. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Messung der Farbstoffextinktion mittels XTT-Test.

3.9.4 Statistische Auswertung

Zur Bearbeitung der Dosis-Wirkungs-Kurven, anhand derer das Zellüberleben dargestellt wurde, wurde das Computerprogramm SOFTmax PRO 3.0 verwendet. Ein entscheidender Parameter zur Beschreibung der Ergebnisse war dabei der IC50-Wert. Dieser gibt die Retinoidkonzentration an, bei der eine 50%ige Hemmung des Zellwachstums auftrat.

Zu jedem Mittelwert einer Retinoidkonzentration wurde über die Standardabweichung für ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ das entsprechende 95%-Konfidenzintervall berechnet. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte durch den t-Test für unverbundene Stichproben.

4 Ergebnisse

4.1 Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR bei initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung

Die Berechnung der IC₅₀-Werte von 4-HPR ohne Bestrahlung in den Linien PC3 und LNCaP ergab signifikant unterschiedliche Werte (siehe Tabelle 7, Abbildung 11 und Abbildung 12).

In der Linie PC3 wurde ein IC₅₀-Wert von 3,9 µM mit einem Konfidenzintervall von 2,6-5,8 µM ermittelt, während der IC₅₀-Wert in der Linie LNCaP 1,1 µM bei einem Konfidenzintervall von 1,0-1,3 µM betrug. Die Zellen der Linie LNCaP sind gegenüber den Retinoid 4-HPR damit signifikant sensibler als die Zellen der Linie PC3.

	PC3	LNCaP
IC ₅₀ -Wert	3,9 µM	1,1 µM
Konfidenzintervall	2,6-5,8 µM	1,0-1,3 µM

Tabelle 7: IC₅₀-Werte und Konfidenzintervalle für das Retinoid 4-HPR in den Zelllinien PC3 und LNCaP

Die Ergebnisse einer alleinigen, einmaligen Bestrahlung von 5 Gy der Linien PC3 und LNCaP sind in Tabelle 8 zusammengefasst und in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

	Zellüberleben (%)					
	PC3			LNCaP		
	MW	95%-KW	95%-KI	MW	95%-KW	95%-KI
RTX/d1 ohne 4-HPR	51,6	4,6	47,0-56,2	25,8	3,1	22,7-28,9
RTX/d3 ohne 4-HPR	49,2	3,3	45,9-52,5	34,9	0,9	34,0-35,8
RTX/d5 ohne 4-HPR	83,1	4,6	78,5-87,7	75,9	2,4	73,5-78,3

MW: Mittelwert, 95%-KW: 95%-Konfidenzwert, 95%-KI: 95%-Konfidenzintervall

Tabelle 8: Zellüberleben (%) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer alleinigen, einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Zelllinien PC3 und LNCaP

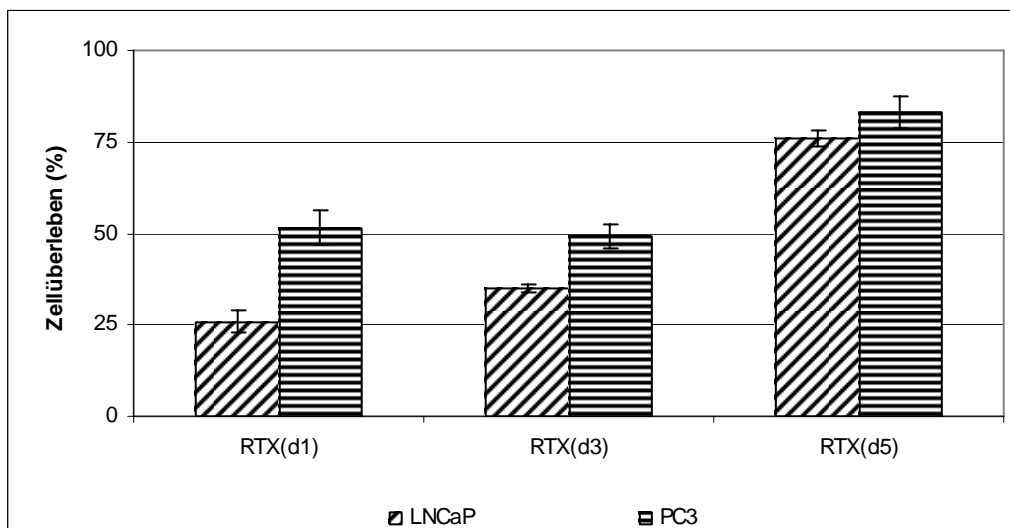


Abbildung 10: Zellüberleben (%) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer alleinigen, einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Zelllinien PC3 und LNCaP

Hierbei zeigt sich, dass die Zellen der Linie LNCaP zu allen Messzeitpunkten signifikant strahlensensibler sind als die Zellen der Linie PC3. Ferner zeigt sich, dass das Zellüberleben nach Bestrahlung bei Zunahme des Zeitintervalls von Bestrahlungszeitpunkt zu Messzeitpunkt abnimmt. So ist das Zellüberleben bei Bestrahlung 24 Stunden nach Zellaussaat bei einem Zeitintervall von

120 Stunden in beiden Zelllinien signifikant niedriger als bei Bestrahlung 120 Stunden nach Zellaussaat mit einem Zeitintervall von nur 24 Stunden.

Die Ergebnisse der kombinierten Applikation von 4-HPR und Bestrahlung bei einmaliger, initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Bestrahlung in den Linien PC3 und LNCaP sind in Tabelle 9 zusammengefasst und in Abbildung 11 bis Abbildung 13 graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) des Zellüberlebens in Prozent sowie die dazugehörigen 95%-Konfidenzwerte (95%-KW) und die daraus zu errechnenden 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI).

Um die Wirkung der kombinierten Applikation von Retinoid und Bestrahlung vergleichen zu können, erfolgte die Bestimmung des Zellüberlebens der drei Kurven der kombinierten Gabe im Vergleich zum Zellüberleben der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR ohne Bestrahlung (=Kontrolle) bei dem jeweiligen, zelllinienspezifischen IC50-Wert (PC3: 3,9 µM, LNCaP: 1,1 µM). Der Wert des Zellüberlebens beim IC50-Wert beträgt definitionsgemäß 50%. In Tabelle 9 finden sich diese Werte zusammen mit den jeweiligen 95%-Konfidenzwerten und 95%-Konfidenzintervallen.

	Zellüberleben (%)					
	PC3			LNCaP		
	MW	95%-KW	95%-KI	MW	95%-KW	95%-KI
4-HPR/d1 ohne RTX	50,0	7,2	42,9-57,2	50,0	8,9	40,9-58,7
4-HPR/d1 + RTX/d1	24,2	4,7	19,5-28,9	21,0	3,7	17,2-24,6
4-HPR/d1 + RTX/d3	30,1	5,2	25,1-35,4	24,5	3,5	21,8-28,7
4-HPR/d1 + RTX/d5	36,1	6,4	29,8-42,5	47,0	5,2	41,7-52,1

MW: Mittelwert, 95%-KW: 95%-Konfidenzwert, 95%-KI: 95%-Konfidenzintervall

Tabelle 9: *Kombinierte Applikation von 4-HPR (0,001-10 µM) bei initialer Gabe des Retinoids (24 Stunden nach Zellaussaat) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Linien PC3 und LNCaP*

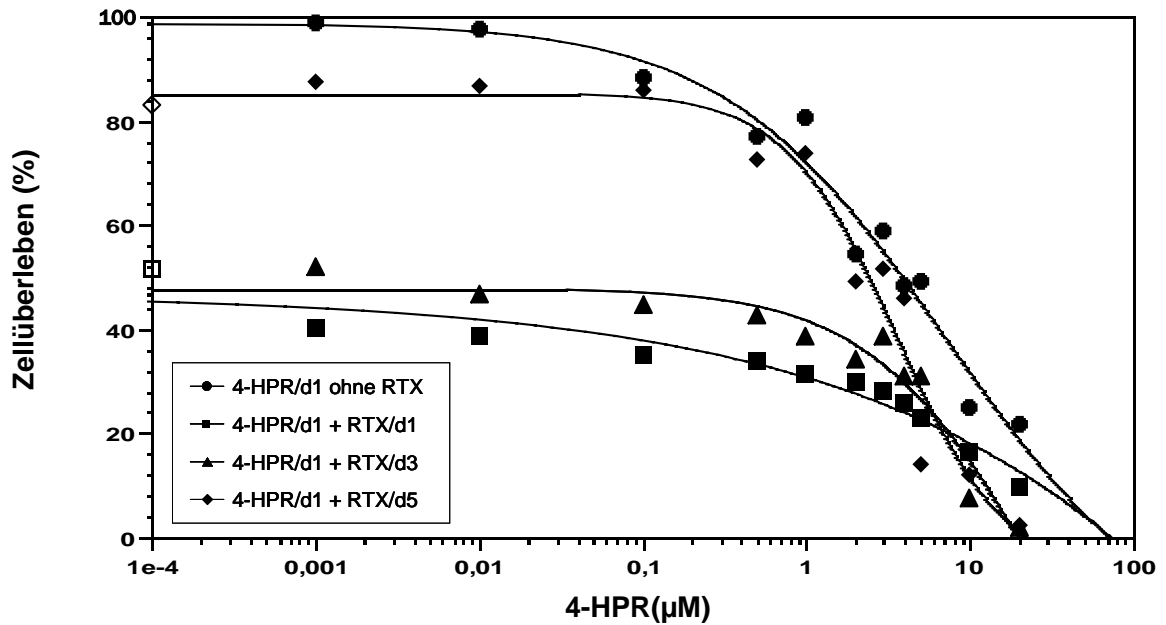


Abbildung 11: Zellüberleben (%) bei initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in der Zelllinie PC3

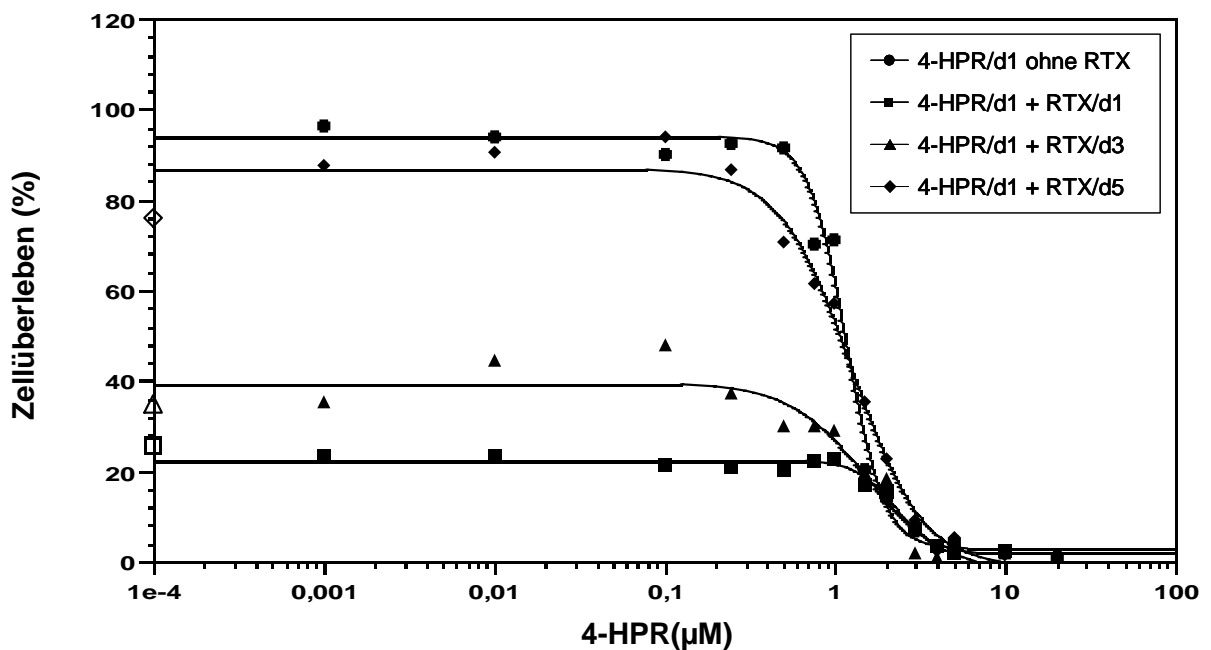


Abbildung 12: Zellüberleben (%) bei initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in der Zelllinie LNCaP

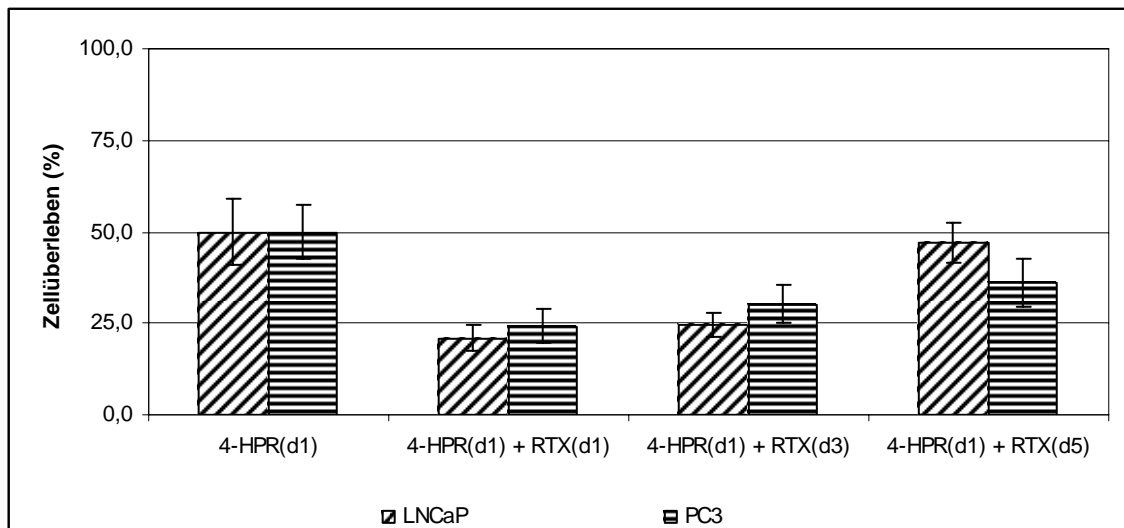


Abbildung 13: Kombinierte Applikation von 4-HPR (0,001-10 μ M) bei initialer Gabe des Retinoids (24 Stunden nach Zellaussaat) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Linien PC3 und LNCaP

4.1.1 Ergebnisse in der Zelllinie PC3

Im Vergleich zum Zellüberleben beim IC50-Wert für 4-HPR ohne Bestrahlung in der Linie PC3 (3,9 μM), welcher definitionsgemäß 50% beträgt, fanden sich bei dieser 4-HPR-Konzentration in allen drei Versuchsansätzen der kombinierten Applikation von Retinoid und Bestrahlung signifikant niedrigere Werte für das mittlere Zellüberleben (50,0% vs 24,2% vs 30,1% vs 36,1%). Mit abnehmender Wirkdauer der Bestrahlung (Zeitintervall: Bestrahlung-Messzeitpunkt) wurde dabei eine signifikante Abnahme der Zytotoxizität der kombinierten Applikation von Retinoid und Bestrahlung beobachtet. So ergab die simultane Applikation von Retinoid und Bestrahlung 24 Stunden nach Zellaussaat (Tag 1) das absolut geringste Zellüberleben von 24,2% bei einer Wirkdauer der Bestrahlung von 120 Stunden, während die Applikation des Retinoids 24 Stunden nach Zellaussaat (Tag 1) und die sequentielle Bestrahlung 120 Stunden nach Zellaussaat (Tag 5) ein signifikant höheres Zellüberleben von 36,1% bei einer Wirkdauer der Bestrahlung von nur 24 Stunden ergab. Allerdings war das Zellüberleben bei sequentieller Bestrahlung 72 Stunden und 120 Stunden nach Zellaussaat nicht signifikant verschieden (30,1% vs 36,1%).

Bezogen auf den antiproliferativen Effekt einer alleinigen Bestrahlung mit 5 Gy 24 Stunden, 72 Stunden und 120 Stunden nach Zellaussaat ergab die Kombination mit 4-HPR ebenfalls eine signifikante Abnahme des Zellüberlebens zu allen drei Bestrahlungszeitpunkten. Das Zellüberleben der Kombination betrug im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung bei RTX an Tag 1 47%, bei RTX an Tag 3 61% sowie bei RTX an Tag 5 43%. Im Mittel betrug die Zunahme der Wachstumshemmung für alle Bestrahlungszeitpunkte bei Kombination von Retinoid und Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung 50%.

Hieraus kann gefolgert werden, dass in der weniger strahlensensiblen Linie PC3 die Kombination von Retinoid und Bestrahlung zu einer Zunahme der antiproliferativen Wirkung der Einzelkomponenten führt. Hinsichtlich des maximal erreichten antiproliferativen Effekts (Zellüberleben 24,2%) wurde dieser bei simultanter Gabe von Retinoid und Bestrahlung 24 Stunden nach Zellaussaat erreicht.

4.1.2 Ergebnisse in der Zelllinie LNCaP

Im Vergleich zum Zellüberleben beim IC50-Wert für 4-HPR ohne Bestrahlung in der Linie LNCaP (1,1 μ M), welcher definitionsgemäß 50% beträgt, fanden sich bei dieser 4-HPR-Konzentration in zwei von drei Versuchsansätzen der kombinierten Applikation von Retinoid und Bestrahlung signifikant niedrigere Werte für das mittlere Zellüberleben (50,0% vs 21,0% vs 24,5% vs 47,0%). Mit abnehmender Wirkdauer der Bestrahlung (Zeitintervall: Bestrahlungszeitpunkt-Messzeitpunkt) wurde dabei eine signifikante Abnahme der Zytotoxizität der kombinierten Applikation von Retinoid und Bestrahlung beobachtet. So ergab die simultane Applikation von Retinoid und Bestrahlung 24 Stunden nach Zellaussaat (Tag 1) das absolut geringste Zellüberleben von 21,0% bei einer Wirkdauer der Bestrahlung von 120 Stunden, während die Applikation des Retinoids 24 Stunden nach Zellaussaat (Tag 1) und die sequentielle Bestrahlung 120 Stunden nach Zellaussaat (Tag 5) keinen Unterschied des Zellüberlebens im Vergleich zur Kontrolle (alleinige Gabe von 4-HPR) ergab (50% vs 47%). Allerdings war das Zellüberleben bei simultaner Bestrahlung 24 Stunden und sequentieller Bestrahlung 72 Stunden nach Zellaussaat nicht signifikant verschieden (21,0% vs 24,5%).

Bezogen auf den antiproliferativen Effekt einer alleinigen Bestrahlung mit 5 Gy 24 Stunden, 72 Stunden und 120 Stunden nach Zellaussaat ergab die Kombination mit 4-HPR eine signifikante Abnahme des Zellüberlebens zu allen drei Bestrahlungszeitpunkten. Das Zellüberleben der Kombination betrug im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung bei RTX an Tag 1 81%, bei RTX an Tag 3 70% sowie bei RTX an Tag 5 62%. Damit fand sich bei abnehmender Wirkdauer der Bestrahlung bei der Kombination eine Zunahme hinsichtlich der zusätzlichen Wachstumshemmung (19% vs 30% vs 38%) Im Mittel betrug die Zunahme der Wachstumshemmung bei Kombination von Retinoid und Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung 29%.

Hieraus kann gefolgert werden, dass in der strahlensensiblen Linie LNCaP die Kombination von Retinoid und Bestrahlung zu einer Zunahme der antiproliferativen Wirkung der Einzelkomponenten führt. Hinsichtlich der maximal erreichten antiproliferativen Effekte wurden diese erreicht sowohl bei simultaner Gabe von Retinoid und Bestrahlung 24 Stunden nach Zellaussaat als auch bei kombinierter Gabe von Retinoid und sequentieller Bestrahlung 72 Stunden nach Zellaussaat (Zellüberleben 21,0% vs 24,5%). Für diese beiden Bestrahlungszeitpunkte fand sich kein signifikanter Unterschied.

4.1.3 Vergleich der Linien PC3 und LNCaP

Hinsichtlich des maximal erreichten antiproliferativen Effektes der Kombination von Retinoid und Bestrahlung fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Linien, wenn die Bestrahlung simultan zur Retinoidgabe (Tag 1) oder sequentiell nach Retinoidgabe 72 Stunden nach Zellaussaat (Tag 3) erfolgte. Bei sequentieller Bestrahlung 120 Stunden nach Zellaussaat (Tag 5) wurde mit der Kombination in PC3 ein signifikant niedrigeres Zellüberleben erzielt als in LNCaP (36,1% vs 47,0%)

Abbildung 14 zeigt das Zellüberleben bei kombinierter Applikation von Retinoid und Bestrahlung in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt für beide Zelllinien im direkten Vergleich.

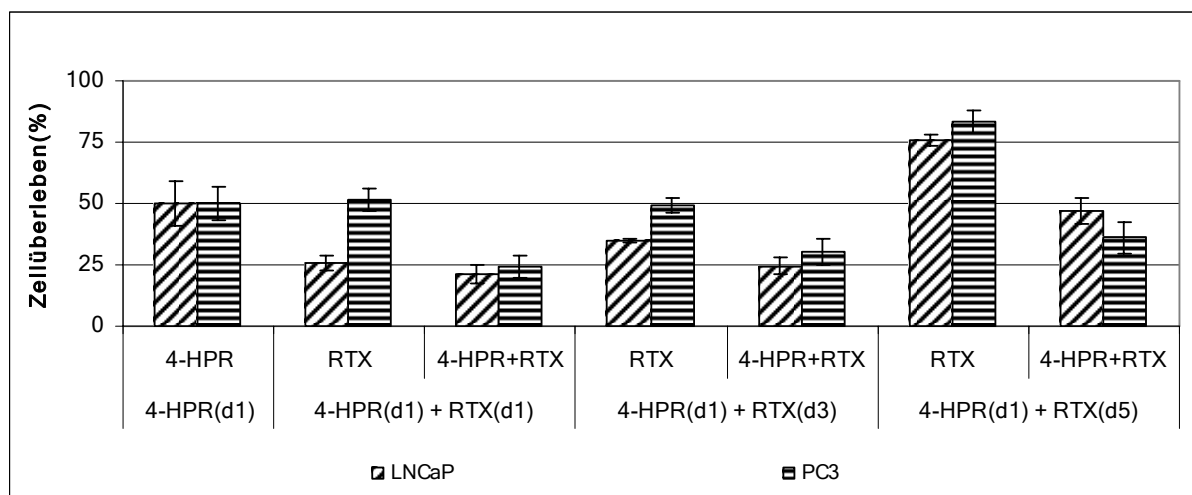


Abbildung 14: Kombinierte Applikation von Retinoid und Bestrahlung in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt für die Zelllinien PC3 und LNCaP (RTX: einmalige Bestrahlung mit 5 Gy)

In der weniger strahlensensiblen Linie PC3 war aufgrund der erzielten Zellüberlebensraten bei kombinierter Applikation von Retinoid und Bestrahlung zu allen 3 Bestrahlungszeitpunkten eine Zunahme der Strahlensensibilität der Zellen durch 4-HPR zu beobachten, da die mittlere Zunahme der Wachstums- hemmung 50% betrug. Dieser Effekt war maximal ausgeprägt bei simultaner Gabe von Retinoid und Bestrahlung 24 Stunden nach Zellaussaat (Tag 1).

In der strahlensensiblen Linie LNCaP fanden sich bei der Kombinationsbe- handlung maximal antiproliferative Effekte bei simultaner Bestrahlung (Tag1)

und bei sequentieller Bestrahlung 72 Stunden nach Zellaussaat (Tag 3). Diese wurden im wesentlichen durch die Bestrahlung bedingt, welche Einwirkzeiten von 120 Stunden bzw. 72 Stunden hatten. Bei sequentieller Bestrahlung 120 Stunden nach Zellaussaat (Tag 5) betrug die Einwirkzeit bis zum Versuchsende nur 24 Stunden, wodurch im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zu diesem Zeitpunkt immer noch eine signifikante Abnahme des Zellüberlebens zu beobachten war (75,9% vs 47,0%), jedoch im Vergleich zum Zellüberleben bezogen auf die alleinige Retinoidgabe kein signifikanter Unterschied nachweisbar war (50,0% vs 47,0). Somit fanden sich in der Linie LNCaP zu allen drei Bestrahlungszeitpunkten Hinweise auf eine Zunahme der Strahlensensibilität, welche im Vergleich zu der Linie PC3 im Mittel deutlich geringer ausgeprägt war (mittlere Zunahme der Wachstumshemmung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung 29% in LNCaP vs 50% in PC3).

4.2 Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR bei initialer Bestrahlung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Applikation des Retinoids

Bei der kombinierten Applikation von initialer Bestrahlung mit 5 Gy 24 Stunden nach Zellaussaat erfolgte in diesem Ansatz die Gabe des Retinoids 4-HPR unmittelbar nach der Bestrahlung (ebenfalls 24 Stunden nach Zellaussaat) sowie in separaten Versuchsansätzen zu zwei weiteren Zeitpunkten: 72 Stunden und 120 Stunden nach Zellaussaat. In einem Kontrollansatz mit Gabe des Retinoids 4-HPR 24 Stunden nach Zellaussaat ohne Bestrahlung wurden die zelllinienspezifischen IC50-Werte von PC3 und LNCaP ermittelt und in Tabelle 10 dargestellt.

	PC3	LNCaP
IC50-Wert	3,9 μ M	1,1 μ M
Konfidenzintervall	2,6-5,8 μ M	1,0-1,3 μ M

Tabelle 10: IC50-Werte und Konfidenzintervalle für das Retinoid 4-HPR in den Zelllinien PC3 und LNCaP

Die Ergebnisse der Kombination von initialer Bestrahlung und zeitabhängiger Retinoidgabe sind in der nachfolgenden Tabelle 11 zusammengefasst und in Abbildung 15 bis Abbildung 17 graphisch dargestellt. Die Angaben des Zellüberlebens in Prozent beziehen sich jeweils auf die IC50-Konzentration von 4-HPR (gegeben 24 Stunden nach Zellaussaat; unmittelbar nach der Radiatio, mit einer Expositionszeit von 120 Stunden) der jeweiligen Zelllinie.

	Zellüberleben (%)					
	PC3			LNCaP		
	MW	95%-KW	95%-KI	MW	95%-KW	95%-KI
4-HPR/d1 ohne RTX	50,0	7,2	42,9-57,2	50,0	8,9	40,9-58,7
RTX/d1 + 4-HPR/d1	24,2	4,7	19,5-28,9	21,0	3,7	17,3-24,6
RTX/d1 + 4-HPR/d3	48,3	5,2	43,0-53,5	16,3	6,5	9,7-22,6
RTX/d1 + 4-HPR/d5	68,6	5,7	62,9-74,2	31,5	7,6	23,4-38,6

MW: Mittelwert, 95%-KW: 95%-Konfidenzwert, 95%-KI: 95%-Konfidenzintervall

Tabelle 11: Kombinierte Applikation von 4-HPR (0,001-10 µM) bei initialer Bestrahlung mit 5 Gy (24 Stunden nach Zellaussaat) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Gabe des Retinoids (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Linien PC3 und LNCaP

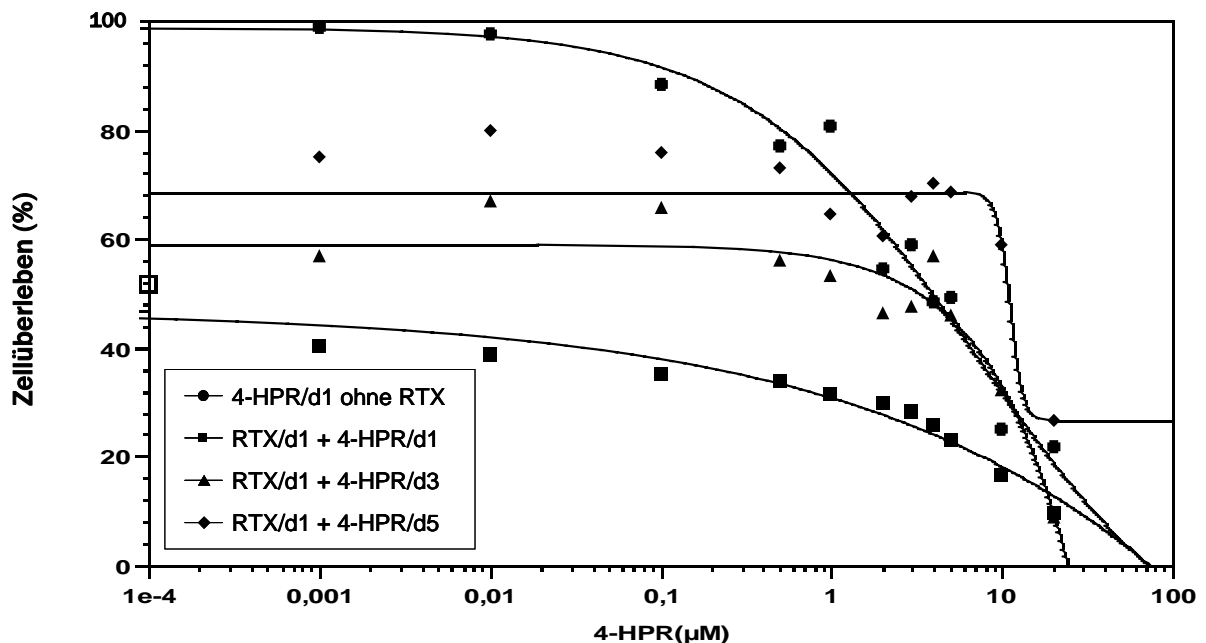


Abbildung 15: Zellüberleben (%) bei initialer Bestrahlung mit 5 Gy in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe des Retinoids (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in der Zelllinie PC3

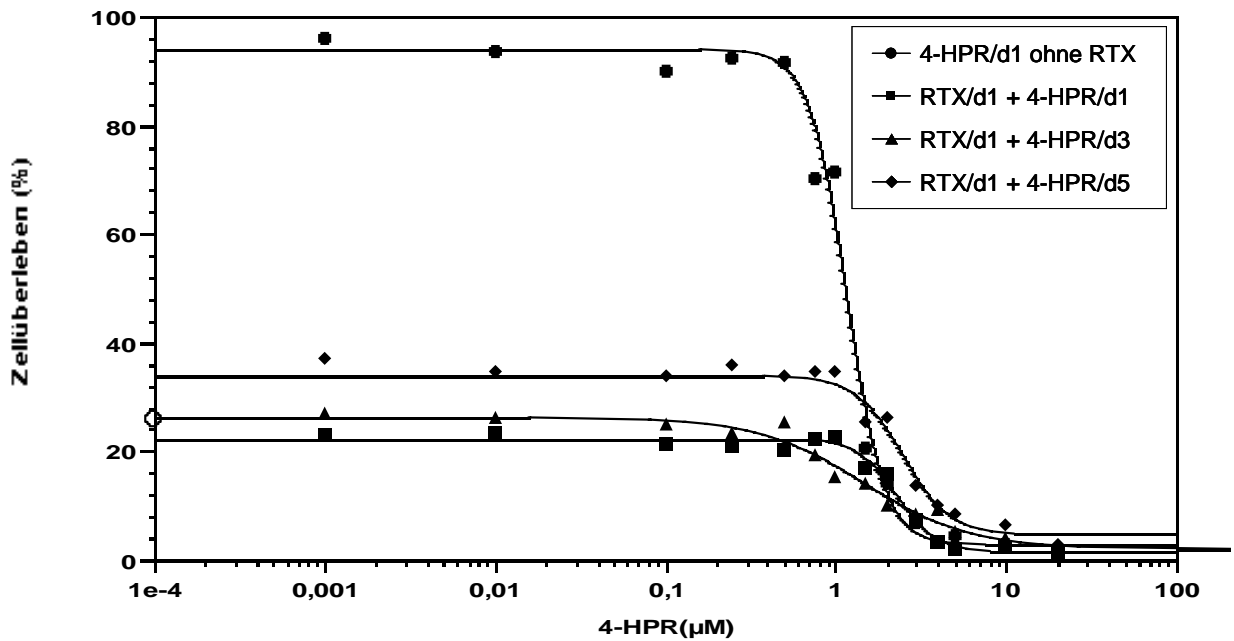


Abbildung 16: Zellüberleben (%) bei initialer Bestrahlung mit 5 Gy in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe des Retinoids (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in der Zelllinie LNCaP

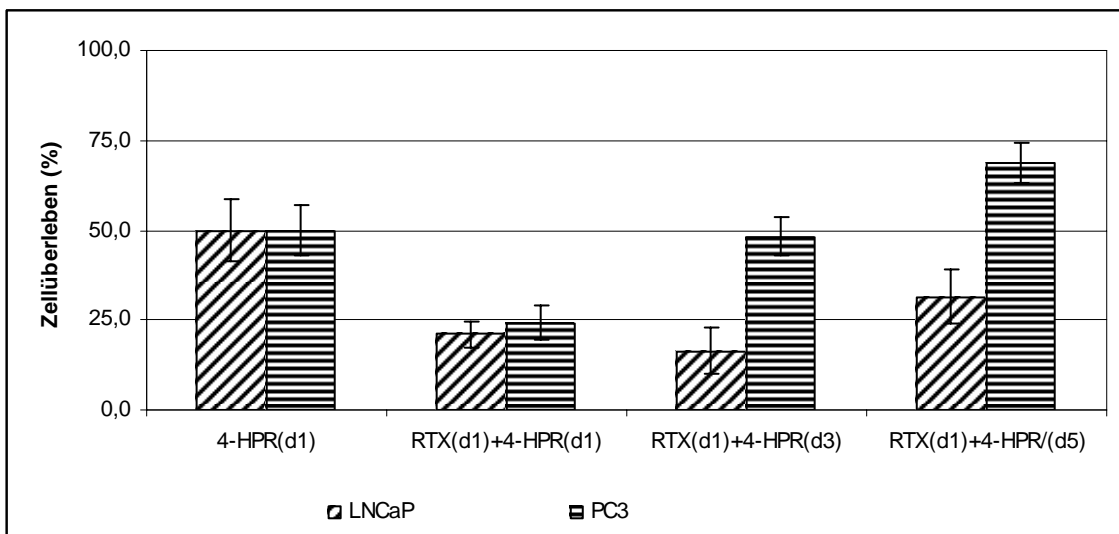


Abbildung 17: Kombinierte Applikation von 4-HPR (0,001-10 µM) bei initialer Bestrahlung mit 5 Gy (24 Stunden nach Zellaussaat) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Gabe des Retinoids (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Linien PC3 und LNCaP

4.2.1 Ergebnisse in der Zelllinie PC3

Bei Kombination von initialer Bestrahlung mit zeitabhängiger Retinoidgabe in der Linie PC3 fand sich nur bei simultaner Retinoidgabe (Tag 1, d.h. 24 Stunden nach Zellaussaat) eine signifikante Abnahme des Zellwachstums. Diese Abnahme betrug gegenüber der Kontrolle mit alleinigem 4-HPR 52% und gegenüber der alleinigen Bestrahlung 53% und somit im Mittel etwa 52%.

Bei Gabe des Retinoids 72 Stunden nach Zellaussaat (Tag 3) war das maximale Zellüberleben von 48,3% nicht signifikant von der alleinigen Retinoidgabe (50%) oder der alleinigen Bestrahlung (51,6%) verschieden. Bei Gabe des Retinoids am Tag 5 (120 Stunden nach Zellaussaat) fand sich eine signifikante Zunahme des Zellüberlebens auf 68,6%. Die Zunahme des Zellüberlebens betrug gegenüber der alleinigen Retinoidgabe 37% und gegenüber der alleinigen Bestrahlung 33% und somit im Mittel 35%.

Hieraus kann gefolgert werden, dass in der weniger strahlensensiblen Linie PC3 die simultane Applikation von Bestrahlung und Retinoid zu einer Verstärkung der antiproliferativen Wirkung der Einzelkomponenten führte. Die Retinoidgabe 120 Stunden nach Zellaussaat mit einer Expositionszeit von nur 24 Stunden führte in dieser Zelllinie zu einem antagonistischen Effekt bezogen auf die Effekte der Einzelkomponenten.

4.2.2 Ergebnisse in der Zelllinie LNCaP

Bei der Kombination von initialer Bestrahlung mit zeitabhängiger Retinoidgabe in der Linie LNCaP fand sich eine signifikante Abnahme des Zellwachstums gegenüber der alleinigen Bestrahlung nur bei simultaner Retinoidgabe am Tag 1 (24 Stunden nach Zellaussaat) und bei sequentieller Retinoidgabe am Tag 3 (72 Stunden nach Zellaussaat). Die Abnahme des Zellwachstums betrug bei Retinoidgabe am Tag 1 19% und bei Retinoidgabe am Tag 3 37% und somit im Mittel 28%. Das maximale Zellüberleben bei kombinierter Gabe unterschied sich zu diesen beiden Zeitpunkten der Retinoidgabe nicht signifikant (21% vs 16,3%). Bei Retinoidgabe am Tag 5 fand sich kein signifikanter Unterschied des maximalen Zellüberlebens gegenüber der alleinigen Bestrahlung. Hieraus kann gefolgert werden, dass in der strahlensensiblen Linie LNCaP sowohl die simultane (Tag 1) als auch die sequentielle Retinoidgabe am Tag 3 zu einer Verstärkung der antiproliferativen Wirkung der Bestrahlung führte. Dieser Effekt war jedoch gegenüber dem Effekt in PC3 geringer ausgeprägt (simultane Retinoidgabe am Tag 1: Abnahme des Zellüberlebens in PC3 um 53%, in LNCaP um 19%).

4.2.3 Vergleich der Linien PC3 und LNCaP

Hinsichtlich der maximal erreichbaren antiproliferativen Effekte der Kombination von initialer Bestrahlung und simultaner Retinoidgabe (Tag 1) fand sich kein signifikanter Unterschied (PC3: 24,2% vs LNCaP 21,0%). Bei Retinoidgaben am Tag 3 und 5 fanden sich signifikante Unterschiede, wobei in PC3 das Zellüberleben jeweils am höchsten war. Abbildung 17 zeigt das Zellüberleben bei kombinierter Applikation von Radiation und Retinoid in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Retinoidgabe für beide Zelllinien im direkten Vergleich.

In der weniger strahlensensiblen Linie PC3 führte nur die simultane Retinoidgabe (am Tag 1) zu einer zumindest additiven, antiproliferativen Wirkung, während diese in der strahlensensiblen Linie LNCaP bei Retinoidgabe an Tag 1 und 3 zu beobachten, dabei jedoch geringer ausgeprägt war. Somit war eine Zunahme der Strahlensensibilität unter 4-HPR in beiden Zelllinien zu beobachten, die bei PC3 am deutlichsten bei simultaner Retinoidgabe und in LNCaP bei simultaner (an Tag 1) und bei sequentieller Retinoidgabe (Tag 3) ausgeprägt war. Das Auftreten eines antagonistischen, antiproliferativen Effekts in PC3 bei sequentieller Gabe des Retinoids am Tag 5 zeigt die Bedeutung der Überprüfung von Sequenzeffekten in vitro bei der Kombination unterschiedlicher Therapieformen auf. Dies kann zu bedeutsamen Folgen in der klinischen Therapie von Patienten führen.

5 Diskussion

Ausgehend von der Tatsache, dass es bisher für das metastasierte, androgen-unabhängige und -resistente Prostatakarzinom keine etablierte Therapie gibt, die einerseits klinisch zufriedenstellend, andererseits (abgesehen von Docetaxel) tatsächlich deutlich lebensverlängernd ist, wurden in dieser Arbeit die Effekte einer kombinierten Applikation von Bestrahlung und dem Retinoid N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid (4-HPR) an der androgenabhängigen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP und der androgenunabhängigen Linie PC3 in vitro untersucht.

Eine kombinierte Applikation von Chemotherapie und Bestrahlung ist bereits bei mehreren Tumorarten klinisch etabliert, unter anderem bei Ösophagus-, Lungen-, Magen-, Pankreas- und Zervixkarzinomen (Kvols, 2005).

Mehrere Studien untersuchten die Wirkungen und Wechselwirkungen zwischen medikamentöser Therapie bzw. Chemotherapie und Bestrahlung beim Prostatakarzinom (Kurdoglu, 1999; Barker, 2006; Zhang, 2004), beim Kolonkarzinom (Shewach, 1996; Schaffer, 2005; Hofstetter, 2005; Itani, 2007), beim Pankreaskarzinom (Shewach, 1996; Barker, 2006; Zhang, 2004), beim Zervixkarzinom (Ferrandina, 2001; Kurdoglu, 1999; Scribner, 2002; Cheng, 2007), beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Fukuoka, 2002), bei Harnblasenkarzinom (Schaffer, 2005), bei Mammakarzinom (Zhang, 2004; Cheng, 2007; Kil, 2008), beim Gliom (Barker, 2006; Zhang, 2004; Kil, 2008) und beim Glioblastom (Schaffer, 2005).

Dabei zeigt sich, dass die Zytotoxizität der kombinierten Therapie von verschiedenen Parametern abhängig sein kann. Im Einzelnen beeinflussen folgende Parameter die Resultate:

- die untersuchte Zelllinie
- die Art des Medikaments bzw. Chemotherapeutikums
- die Dosis des Medikaments bzw. Chemotherapeutikums
- die Dosis der Bestrahlung
- die Inkubationszeit und die zeitliche Reihenfolge der Applikation

Die In-vitro-Studien zeigen bei Prostata-, Kolon-, Pankreas-, Zervix-, Gliom-, Glioblastom-, Blase-, Brust- und Lungenkarzinomzelllinien, dass sich durch Gabe von geeigneten Medikamenten bzw. Chemotherapeutika die Strahlensensibilität der Zelllinien steigern lässt.

Vereinzelt wurden in Studien auch gleichzeitig mehrere Chemotherapeutika mit Bestrahlung kombiniert, wobei die untersuchten Mehrfachkombinationen das Zellüberleben bei einigen Zelllinien signifikant senken konnten (Scribner, 2002; Hofstetter, 2005; Cheng, 2007).

Der Vergleich der vorliegenden Arbeit mit bereits veröffentlichten Studien ist vor allem für Bereiche mit teilweise gleichen Ausgangsparametern interessant.

Kurdoglu et al. untersuchten die Auswirkungen von Paclitaxel auf die Zelllinie PC3. Dabei wurde ab einer Konzentration von 10 nM Paclitaxel durch Verdopplung der Einwirkzeit von 24 Stunden auf 48 Stunden eine signifikante Zunahme der Zytotoxizität beobachtet. Zudem fanden Kurdoglu et al. 1999 eine Zunahme der Strahlensensibilität bei einer Kombination mit Paclitaxel in einem Dosisbereich zwischen 5 nM und 20 nM. Untersucht wurden Bestrahlungsdosen zwischen 0 und 8 Gy und Konzentrationen des Chemotherapeutikums zwischen 0 und 100 nM für einen Zeitraum von 24 Stunden. Hierbei zeigte sich beispielsweise, dass bei Gabe von 20 nM Paclitaxel für 24 Stunden der Anteil der überlebenden Zellen um 60% abnimmt. Bei zusätzlicher Bestrahlung mit 2 Gy sinkt der Anteil der überlebenden Zellen auf 20%.

Neben der Zelllinie PC3 wurde die Zelllinie HeLa eines Zervix-Karzinoms unter gleichen Versuchsbedingungen untersucht. Hier zeigte sich im Gegensatz zur Zelllinie PC3 eine etwas größere Sensibilität gegenüber Paclitaxel bei alleiniger Gabe des Chemotherapeutikums. Dagegen fand sich bei den mit Paclitaxel behandelten HeLa-Zellen eine vergleichbare Strahlensensibilität wie bei Zellen, die vor Bestrahlung nicht mit Paclitaxel behandelt wurden. In der Schlussfolgerung zeigt die Zelllinie HeLa eine deutlich geringere Strahlensensibilisierung durch Paclitaxel als die Zelllinie PC3 (Kurdoglu, 1999).

Zhang et al. untersuchten 2004 die strahlensensibilisierende Wirkung der Antisense-Oligonukleotide *in vitro* und *in vivo* an verschiedenen Karzinomzelllinien. Zum Einsatz kamen Oligo AS und Oligo ASM, die ihre Wirkung gegen das MDM2-Onkogen richten und deren antitumoröse Effekte bereits bei alleiniger Gabe und in Kombination mit anderen Chemotherapeutika nachgewiesen werden konnten. An den Zelllinien LNCaP und PC3 (Prostatakarzinom), MCF-7 und MDA-MB-468 (Mammakarzinom), PANC-1 (Pankreaskarzinom) und A172 (Gliom) wurde die Wirkung einer Kombination von Bestrahlung und Oligonukleotid *in vitro* untersucht. Die Gabe von Oligo AS bzw. Oligo ASM mit der Dosis 10 nM (LNCaP, A172) und 25 nM (MCF-7, PANC-1, PC3, MDA-MB-

468) wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden kombiniert mit Bestrahlung mit Dosen zwischen 4 Gy (A172), 5 Gy (LNCaP, MCF-7, PANC-1) und 10 Gy (PC3, MDA-MB-468). Im Ergebnis zeigte sich in allen Zelllinien, dass durch die Gabe von Oligo AS eine Strahlensensibilisierung erreicht werden konnte.

So war bei der Zelllinie PC3 zu beobachten, dass bei alleiniger Bestrahlung mit 10 Gy das Zellüberleben 0,59% beträgt. Bei der Kombination von initialer Gabe von Oligo AS (25 nM) mit anschließender Bestrahlung (10 Gy) sank das Zellüberleben auf 0,01%, was einer Steigerung der Wirksamkeit der Therapie um den Faktor 59 entspricht (bei einer statistischen Signifikanz von $p < 0,01$). Die Gabe von Oligo ASM hatte hingegen keine Strahlensensibilisierung zur Folge.

Bei der Zelllinie LNCaP konnte bei alleiniger Bestrahlung mit 5 Gy das Zellüberleben auf 0,57% gesenkt werden. Bei der Kombination von initialer Gabe von Oligo AS (10 nM) mit anschließender Bestrahlung (5 Gy) sank das Zellüberleben auf 0,04%, was einer Steigerung der Wirksamkeit der Therapie um den Faktor 14,3 entspricht (bei einer statistischen Signifikanz von $p < 0,01$). Bei der Gabe von Oligo ASM hatte die Kombinationstherapie nur eine geringe Wirksamkeitssteigerung (Faktor 1,4) zur Folge.

Die in vivo Untersuchung fand an Mäusen mit den Zelllinien LNCaP, PC3, MCF-7, MDA-MB-468 und PANC-1 statt. Dabei wurde die Gabe von Oligo AS bzw. Oligo ASM über vier Wochen mit einer Dosis von 25 mg/kg/d an 5 Tagen/Woche kombiniert mit Bestrahlung bei einer Dosis von jeweils 3 Gy an den Tagen 2 und 3 (LNCaP) bzw. an den Tagen 2 bis 5 (PC3). Im Ergebnis hatte die Gabe von Oligo ASM keinen Effekt auf eine Strahlensensibilisierung der Tumorzellen, die Gabe von Oligo AS jedoch steigerte signifikant die wachstumshemmende Wirkung der Bestrahlung. Zur Beurteilung der Wirksamkeit wurde die Kontrollgruppe mit 0,9%-iger NaCl-Lösung anstelle der Chemotherapeutika behandelt.

Bei der Zelllinie PC3 war zu beobachten, dass bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy das Tumorstadium gegenüber der Kontrollgruppe 25% betrug. Bei der Kombination von Bestrahlung und Gabe von Oligo AS betrug das Tumorstadium nur mehr 13% gegenüber der Kontrollgruppe. Dies bedeutet eine Steigerung der Wirksamkeit der Therapie um den Faktor 1,92 (bei einer statistischen Signifikanz von $p < 0,01$). Die Gabe von Oligo ASM hatte hingegen keine Strahlensensibilisierung zur Folge.

Bei der Zelllinie LNCaP konnte bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy das Tumorstadium gegenüber der Kontrollgruppe auf 28% gesenkt werden. Bei der

Kombination von Bestrahlung und Gabe von Oligo AS betrug das Tumorstromwachstum 11% gegenüber der Kontrollgruppe. Dies bedeutet eine Steigerung der Wirksamkeit der Therapie um den Faktor 2,55 (bei einer statistischen Signifikanz von $p < 0,01$). Die Gabe von Oligo ASM hatte wie schon bei der Zelllinie PC3 keine Strahlensensibilisierung zur Folge. (Zhang, 2004).

Die Ergebnisse der Studien von Kurdoglu et al. und Zhang et al. konnten mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Bei der Zelllinie PC3 konnte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von 4-HPR bei Kombination mit Bestrahlung gegenüber der alleinigen Gabe von 4-HPR signifikant gesteigert werden. Bezüglich des mittleren Zellüberlebens von 50% bei alleiniger Gabe von 4-HPR ergab die Kombinationstherapie eine Reduktion des Zellüberlebens auf 24,2%. Im Vergleich ergab sich bei Kurdoglu et al. eine Abnahme des Anteils der überlebenden Zellen um 60% bei alleiniger Gabe von 20 nM Paclitaxel für 24 Stunden. Bei zusätzlicher Bestrahlung mit 2 Gy konnte der Anteil der überlebenden Zellen auf 20% gesenkt werden. Die Kombinationstherapie zeigte somit in beiden Studien für PC3 eine vergleichbare Wirkung.

Bei der Zelllinie PC3 konnte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Bestrahlung bei Kombination mit 4-HPR gegenüber alleiniger Bestrahlung signifikant gesteigert werden. Im Mittel betrug die Zunahme der Wachstumshemmung für alle Bestrahlungszeitpunkte bei Kombination von Retinoid und Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung 50%. In der Studie von Zhang et al. war bei der Zelllinie PC3 zu beobachten, dass bei der Kombination von initialer Gabe von Oligo AS (25 nM) mit anschließender Bestrahlung (10 Gy) gegenüber alleiniger Bestrahlung mit 10 Gy die Wirksamkeit der Therapie um den Faktor 59 gesteigert werden konnte. Im Ergebnis zeigte sich bei beiden Studien für PC3, dass durch die Gabe eines Chemotherapeutikums eine Zunahme der Strahlensensibilisierung erreicht werden konnte.

Bei der Zelllinie LNCaP konnte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Bestrahlung bei Kombination mit 4-HPR gegenüber alleiniger Bestrahlung signifikant gesteigert werden. Im Mittel betrug die Zunahme der Wachstumshemmung für alle Bestrahlungszeitpunkte bei Kombination von Retinoid und Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung 29%. In der Studie von Zhang et al. war bei der Zelllinie LNCaP zu beobachten, dass bei der Kombination von initialer Gabe von Oligo AS (10 nM) mit anschließender Bestrahlung (5 Gy) gegenüber alleiniger Bestrahlung mit 5 Gy die Wirksamkeit der

Therapie um den Faktor 14,3 gesteigert werden konnte. Im Ergebnis zeigte sich bei beiden Studien für LNCaP, dass durch die Gabe eines Retinoids bzw. eines Antisense-Oligonukleotids (Oligo AS) eine Zunahme der Strahlensensibilisierung erreicht werden konnte.

Die strahlensensibilisierende Wirkung von Triapine (ein Ribonukleotidreduktase-Inhibitor) untersuchten Barker et al. in vitro und in vivo an drei verschiedenen Zelllinien: untersucht wurden die Gliomzelllinie U251, die Pankreaskarzinomzelllinie PSN1 und die Prostatakarzinomzelllinie DU145. Dabei ließ sich gegenüber einer Kontrollversuchsreihe, die nur bestrahlt wurde (Bestrahlung jeweils mit einer Dosis von 0 bis 8 Gy), bei allen drei Zelllinien eine Strahlensensibilisierung durch zusätzliche Applikation von Triapine nachweisen. Diese Wirkung zeigte sich bei verschiedenen Reihenfolgen der Applikation in allen drei Zelllinien, sowohl bei vorausgehender Gabe (16 Stunden vor Bestrahlung) des Chemotherapeutikums als auch bei simultaner Gabe, d.h. unmittelbar nach der Bestrahlung (Bestrahlung jeweils mit einer Dosis von 0 bis 8 Gy). In den Zelllinien DU145 (5 µmol/l Triapine) und U251 (5 µmol/l Triapine) hatte der unterschiedliche Applikationszeitpunkt von Triapine (16 h vor Bestrahlung vs unmittelbar nach Bestrahlung) keinen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben. Hingegen bewirkte in der Zelllinie PSN1 (3 µmol/l Triapine) die Gabe von Triapine 16 Stunden vor Bestrahlung ein signifikant geringeres Zellüberleben, als die simultane Gabe unmittelbar nach der Bestrahlung.

Die in vivo Untersuchung fand nur an den Zelllinien U251 und PSN1 statt. Untersucht wurde neben einer Kontrollgruppe die Wirkung von alleiniger Gabe von 60 mg/kg Triapine, alleinige Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy, Gabe von 60 mg/kg Triapine 6 Stunden vor Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy und die Gabe von 60 mg/kg Triapine unmittelbar nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. Insgesamt konnte ebenfalls eine Zunahme der Strahlensensibilisierung bei kombinierter Applikation in beiden Zelllinien beobachtet werden, was sich in verringerter Zunahme der Tumorumfänge zeigte. Der größte antiproliferative Effekt konnte in beiden Zelllinien durch Bestrahlung und unmittelbar anschließender Gabe von Triapine erreicht werden (Barker, 2006).

Die Studie von Barker et al. bestätigt, dass für das Prostatakarzinom (im Falle der Studie für die Zelllinie DU145) eine Kombinationstherapie aus geeignetem Medikament und Bestrahlung eine erfolversprechende Therapieform sein könnte.

Hinsichtlich des Einsatzes von Retinoiden zur Erhöhung der Radiozytotoxizität zeigten Scribner et al., dass die Retinoide 4-HPR und 9-cis-RA bei zusätzlicher Kombination mit Cisplatin die Strahlensensibilität von Zervix-Karzinomzellen (SiHa) erhöhen können. Weder die Kombination von 4-HPR oder 9-cis-RA mit Bestrahlung oder die Gabe von Cisplatin alleine reduzierten signifikant die Überlebensrate der Karzinomzellen. Erst die Dreifachkombination von 4-HPR (3 μ M) oder 9-cis-RA (5 μ M) bei einer Inkubationszeit von 3 Tagen mit sowohl 2 Gy Bestrahlungsdosis als auch 3 μ M Cisplatin zeigte eine signifikante Zunahme des antiproliferativen Effekts (Scribner, 2002).

Damit zeigt sich, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete 4-HPR auch bei anderen Karzinom-Zelllinien das Potential von strahlensensibilisierender Wirkung aufweist, wenn auch in der Untersuchung von Scribner et al. nur in Kombination mit Cisplatin.

Vom grundlegenden Versuchsansatz, Versuchsmethodik und Untersuchungsziel ähnlich zur vorliegenden Arbeit sind die Studien von Shewach et al. sowie von Ferrandina und Mitarbeiter.

In der Studie von Shewach et. al. wurde die Wirkung von Gemcitabine auf die Strahlensensibilität der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 und die Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und BxPC-3 untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei der Zelllinie HT-29 gegenüber einem Kontrollversuch das Zellüberleben durch Bestrahlung im Dosisbereich zwischen 2 und 10 Gy bei Gabe von 10 nmol/l Gemcitabine für 24 Stunden um den Faktor 1,8 reduziert werden konnte, bei 30 nmol/l Gemcitabine sogar um den Faktor 2,3. Untersucht wurde auch die notwendige Inkubationszeit, um eine signifikante Strahlensensibilisierung erreichen zu können. Hier zeigte sich, dass mit steigender Dosis Gemcitabine und damit steigender Zytotoxizität auch die Strahlensensibilisierung zunahm. Bei einer Dosis von 10 nmol/l Gemcitabine war eine Inkubationszeit von 16 Stunden, bei einer Dosis von 30 nmol/l Gemcitabine war eine Inkubationszeit von 8 Stunden erforderlich, um eine signifikante Strahlensensibilisierung zu erreichen. Wie in der Zelllinie HT-29 konnte auch bei den beiden Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und BxPC-3 festgestellt werden, dass die Strahlensensibilisierung sowohl mit zunehmender Konzentration als auch mit zunehmender Inkubationszeit von Gemcitabine steigt. Eine Dosis von 10 nmol/l Gemcitabine bei BxPC-3 und 100 nmol/l Gemcitabine bei

PANC-1 erzeugten die gleiche Strahlensensibilisierung nach 16-stündiger Inkubationszeit (Shewach, 1996).

In der Studie von Ferrandina et al. wurde die Wirkung von Phenylacetat und Phenylbutyrat auf die Strahlensensibilität der humanen Zervixkarzinomzelllinie SW756 untersucht. Da beide Substanzen eine inkubationszeit- und konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung auf die Zellen haben, wurde im Experiment für eine initiale Bestrahlungsdosis von 0 bis 4 Gy die Überlebensrate der Zellen bei Exposition mit 0,5 mM Phenylbutyrat, 1,0 mM Phenylbutyrat und 5 mM Phenylacetat gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Substanzen zu einer Zunahme der Strahlensensibilität der Zelllinie SW756 führen (Ferrandina, 2001).

Die vorgenannten Untersuchungen zeigen, dass es durch die Kombination unterschiedlicher Substanzen bzw. Chemotherapeutika mit Radiatio bei verschiedenen Karzinomzelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten zu einer Zunahme der Strahlensensibilität kommt. Auch bei Zelllinien des Prostatakarzinoms ist unter Kombination von Paclitaxel, Antisensoligonukleotiden und Ribonukleotidreduktase-Inhibitoren mit Bestrahlung eine Zunahme der Strahlensensibilität in vitro und in vivo beobachtet worden.

Die in der vorgelegten Arbeit im in-vitro-Ansatz dargestellte Zunahme der Strahlensensibilität in humanen Prostatakarzinomzelllinien unter dem Retinoid 4-HPR ist ein weiterer Hinweis auf die Attraktivität des kombinierten Applikationsansatzes. Von besonderer Bedeutung ist die Erforschung der optimalen Applikationsfolge. So bedarf jede Art einer Zelllinie einer separaten Überprüfung der Applikationsfolge von Substanz und Bestrahlung, um festzustellen, ob eine simultane Applikation gegenüber einer sequentiellen Applikation (Gabe Substanz vor Radiatio oder Gabe Substanz nach Radiatio) eine Zunahme der Strahlensensibilität bewirkt.

Für das Prostatakarzinom müssen diesbezüglich noch viele Aspekte erforscht werden. Bei dieser und anderen Tumorentitäten befinden sich derzeit – neben dem Einsatz neuer Retinoide und anderen Substanzen mit anderen Wirkmechanismen – virale Vektoren sowie neue Galenikformen (z.B. Nanotechnologie) in der Überprüfung.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Für das metastasierte, androgenunabhängige Prostatakarzinom gibt es derzeit, mit Ausnahme des Chemotherapeutikums Docetaxel, keine Mono- oder Kombinationstherapien, die klinisch zufriedenstellend und signifikant lebensverlängernd sind. Deshalb hat derzeit unverändert die Suche nach neuen Substanzen oder Substanz- bzw. Therapiekombinationen für dieses Erkrankungsstadium einen hohen Stellenwert.

Der Einsatz von Retinoiden als Monosubstanzen oder in Kombination mit zytotoxischen, immunmodulierenden und anderen differenzierungsinduzierenden Substanzen zeigte beim Prostatakarzinom und anderen humanen malignen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* deutlich antiproliferative Effekte. Da das Prostatakarzinom bevorzugt in das Skelettsystem metastasiert und oftmals hierbei eine palliative Strahlentherapie durchgeführt wird, sollte durch die vorliegenden Arbeit *in vitro* überprüft werden, ob eine Kombination der Gabe eines Retinoids und Bestrahlung zu einer Zunahme der Zytotoxizität der Einzelkomponenten führt. Als Retinoid wurde das synthetische Retinoid 4-HPR (Fenretinid) ausgewählt, das es in eigenen Vorarbeiten und nach Studium der internationalen Literatur *in vitro* und *in vivo* in humanen Prostatakarzinomzelllinien antiproliferative Effekte auswies und sich gegenüber anderen Retinoiden durch ein sehr günstiges klinisches Toxizitätsprofil auszeichnete. Als humane Prostatakarzinomzelllinien wurden die hormonsensible, aus einer Lymphknotenmetastase stammende Zelllinie LNCaP sowie die aus einer Knochenmetastase stammende, androgenresistente Zelllinie PC3 ausgewählt.

Unter *in vitro*-Bedingungen erfolgte die Überprüfung der antiproliferativen Effekte der einmaligen Gabe des Retinoids 4-HPR (0,001-10 μM) und einer einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy zunächst jeweils alleine und nachfolgend als kombinierte Applikation. Die Gabe des Retinoids bzw. die Bestrahlung erfolgte 24 Stunden nach Zellaussaat. Bei der Kombination sollten durch zeitlich unterschiedliche Applikation der Einzelkomponenten die Effekte einer simultanen Gabe im Vergleich zur sequentiellen Gabe überprüft werden. Die maximale Einwirkzeit von Retinoid bzw. Bestrahlung bzw. der Kombination von beiden betrug 120 Stunden, danach wurden die Versuche jeweils beendet und das maximale Zellüberleben mittels XTT-Test bestimmt.

Bei alleiniger Applikation des Retinoids 4-HPR fand sich eine konzentrationsabhängige und vollständige Inhibition des Zellwachstums in beiden Prostatakarzinomzelllinien. Die Zellen der Linie LNCaP waren dabei signifikant sensib-

ler gegenüber dem Retinoid als die Zellen der Linie PC3 (bei Inkubationsdauer von 120 Stunden: LNCaP: IC50-Wert = 1,1 μM ; PC3: IC50-Wert = 3,9 μM).

Bei alleiniger Radiatio wurde das geringste Zellüberleben in der Linie PC3 bei einer Einwirkzeit der Bestrahlung von 72 Stunden bzw. 120 Stunden beobachtet (Zellüberleben jeweils etwa 50%), während das geringste Zellüberleben in der Linie LNCaP nur bei einer Einwirkzeit von 120 Stunden beobachtet wurde (Zellüberleben etwa 25%). Somit erwies sich die Linie LNCaP als signifikant strahlensensibler als die Linie PC3.

Die Kombination von initialer Gabe des Retinoids (nach 24 Stunden) mit simultaner (nach 24 Stunden) oder sequentieller (nach 72 Stunden oder nach 120 Stunden) Bestrahlung ergab in beiden Zelllinien zu allen drei Bestrahlungszeitpunkten eine Zunahme der Wachstumshemmung. Die mittlere Zunahme der Wachstumshemmung war in der Linie PC3 signifikant stärker ausgeprägt als in der Linie LNCaP (50% vs 29%). Die dabei maximal erreichte Wachstumshemmung fand sich in der Linie PC3 bei simultaner Gabe des Retinoids und der Bestrahlung 24 Stunden nach Zellaussaat sowie in der Linie LNCaP ebenfalls bei simultaner Gabe von Retinoid und Bestrahlung 24 Stunden nach Zellaussaat und bei sequentieller Bestrahlung 72 Stunden nach Zellaussaat.

Die Kombination von initialer Bestrahlung (24 Stunden nach Zellaussaat) mit simultaner oder sequentieller Retinoidgabe (72 Stunden oder 120 Stunden nach Zellaussaat) ergab in der Linie PC3 nur bei simultaner Applikation eine signifikante Abnahme des Zellüberlebens. Bei sequentieller Gabe des Retinoids nach 72 Stunden fand sich im Vergleich zur alleinigen Applikation der Einzelkomponenten kein Unterschied des Zellüberlebens. Bei Retinoidgabe 120 Stunden nach Zellaussaat war sogar eine signifikante Zunahme des Zellüberlebens und damit ein antagonistischer Effekt zu beobachten.

In der Linie LNCaP wurde eine Zunahme der Wachstumshemmung neben der simultanen Gabe nur unter der sequentiellen Retinoidgabe 72 Stunden nach Zellaussaat beobachtet.

Hieraus kann zusammenfassend festgestellt werden, dass in der weniger strahlen- und retinoidsensiblen Linie PC3 die maximale antiproliferative Wirkung der Kombination von Retinoid und Bestrahlung nur bei simultaner Applikation der beiden Komponenten 24 Stunden nach Zellaussaat zu beobachten

war. Bei sequentieller Gabe des Retinoids (nach initialer Bestrahlung) 120 Stunden nach Zellaussaat ergab sich sogar ein antagonistischer Effekt.

Bei der Kombination von Retinoid und Bestrahlung in der stärker strahlen- und retinoidsensiblen Linie LNCaP fand sich die beste antiproliferative Wirkung sowohl bei simultaner Applikation der beiden Komponenten als auch bei deren sequentiellen Applikation, wenn die Applikation der zweiten Komponente 72 Stunden nach Zellaussaat erfolgte. Die Abfolge der Sequenz (initiale Retinoidgabe gefolgt von Bestrahlung vs initiale Bestrahlung gefolgt von Retinoidgabe) ergab dabei keine wesentlich unterschiedlichen antiproliferativen Effekte.

Abschließend kann gefolgert werden, dass in beiden untersuchten Zelllinien durch die kombinierte Applikation von Retinoid und Bestrahlung zelllinienspezifisch unterschiedlich eine Zunahme der Strahlensensibilität zu beobachten war. Dieser Effekt war in der Linie PC3 stärker ausgeprägt als in der Linie LNCaP.

Das geringste Zellüberleben war in der Linie PC3 bei simultaner Applikation zu beobachten, während dies in der Linie LNCaP sowohl bei simultaner Applikation, als auch bei sequentieller Applikation der zweiten Komponente 72 Stunden nach Zellaussaat nachweisbar war. Hierbei war die Abfolge der Sequenz ohne wesentliche Bedeutung hinsichtlich des Zellüberlebens.

Vorausgesetzt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergäben in entsprechenden in vivo-Versuchen zumindest ähnliche Resultate, würde das für die klinische Anwendung von Retinoiden und Bestrahlung beim hormonrefraktären Prostatakarzinom mit Skelettmetastasen bedeuten, dass eine Kombinationstherapie bessere Antitumoreffekte aufweist als die Applikation der Einzelkomponenten und dass der günstigste Applikationsmodus in der simultanen Gabe der Einzelkomponenten besteht. Bei der simultanen Applikation der beiden Komponenten wird auch der besonderen Biologie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms Rechnung getragen, da dies überwiegend aus androgenrefraktären Tumorzellen besteht. Die im Vergleich zur Linie LNCaP stärker ausgeprägten strahlensensibilisierenden Effekte bei simultaner Applikation von Retinoid und Bestrahlung in der hormonrefraktären Linie PC3 unterstreichen die Bedeutung der simultanen Applikation der Einzelkomponenten bei einem solchen Therapieansatz.

Die Überprüfung der Antitumoreffekte von Einzelsubstanzen oder Therapieverfahren sowohl hinsichtlich deren Kombinationsmöglichkeiten, als auch hinsichtlich deren Sequenzeffekte wird beim metastasierten Prostatakarzinom im Rahmen der präklinischen und klinischen Forschung auch zukünftig einen hohen Stellenwert besitzen.

7 Literaturverzeichnis

Andel G, Fernandez del Moral P, Karthaus H, Wim W (1999)
Quality of life assessment in patients with relapsed hormone resistant prostate cancer (HRPC) treated with RAMBA (R) or RAMBA plus prednisone (R+P).
Eur Urol 35: suppl. 2, 47, abstract 188

Ash D, Flynn A, Battermann J, de Reijke T, Lavagnini P, Blank L (2000)
ESTRO/EAU/EORTC recommendations on permanent seed implantation for localized prostate cancer.
Radiotherapy and Oncology 57: 315-321

Barker CA, Burgan WE, Carter DJ, Cerna D, Gius D, Hollingshead MG, Camphausen K, Tofilon PJ (2006)
In vitro and in vivo radiosensitization induced by the ribonucleotide reductase inhibitor Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone).
Clin Cancer Res; 12 (9) May 1: 2912-2918.

Bavic CO, Erickson U, Allen RA, Peterson PA (1991)
Identification and partial characterization of a retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma-retinol-binding protein.
J Biol Chem 266: 14978-14985.

Berges R, Senge TH (2001)
Benigne Prostatahyperplasie (BPH-Syndrom).
In Urologie.
Herausgeber: Hautmann RE, Huland H, Springer Verlag, 2. vollständig überarbeitete Auflage: S. 269-284

Blaner WS, Hendricks HFJ, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL, Goodman DS (1985)
Retinoids, retinoid binding proteins and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells.
J Lipid Res 26: 1241-1251

Blaner WS, Olson JA (1994)
Hepatic metabolism and storage of retinol.
In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) The retinoids. Raven Press, New York: pp 229-255

Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR (1990)
Transport and storage of vitamin A.
Science 250: 399-403

Blutt SE, Allegretto A, Pike JW, Weigel NL (1997)
1,25-Dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cells and cause accumulation of cells in G1.
Endocrinology 138: 1491-1497

Börgermann C, Chun FK-H, Fornara P, Fröhner M, Graefen M, Haese A, Hakenberg O, Hammerer P, Heine K, Huland H, Loertzer H, Luboldt, H-J, Miller K, Rübben H, Schlomm T, Schrader M, Schröder FH, Schostak M, Schwarz R, Wirth M, Wolff JM (2007)
Prostatakarzinom
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübben H), Springer Verlag, 4.Auflage: 381-519

Bollag W, Peck R (1994)
Cancer chemotherapy by combinations of retinoids with cytokines and vitamin D analogs. Experimental and clinical results.
Ann Oncol 5 (Suppl. 9): 17-22

- Breul J, Zimmermann F, Dettmar P, Paul R (2003)
Prostatakarzinom
Manual Urogenitale Tumoren
Herausgeber: Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München: 1-34
- Brooks JD (1998)
Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia.
Campbell's Urology (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ), 7th edition, W.B. Saunders Company, 89-128
- Budman DR, Calabro A, Kreis W (2002)
Synergistic and antagonistic combinations of drugs in human prostate cancer cell lines in vitro.
Anticancer Drugs. Nov; 13 (10). 1011-6
- Cabrespine A, Bay JO, Barthomeuf C, Curé H, Chollet P, Debiton E (2005)
In vitro assessment of cytotoxic agent combinations for hormone-refractory prostate cancer treatment.
Anticancer Drugs. Apr; 16 (4). 417-22
- Camerini T, Mariani L, De Palo G, Marubini E, Di Mauro MG, Decensi A, Costa A, Veronesi U (2001)
Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer.
J Clin Oncol 19: 1664-1670
- Campbell MJ, Park S, Uskokovic MR, Dawson MI, Koeffler HP (1998)
Expression of retinoic acid receptor- β sensitizes prostate cancer cells to growth inhibition mediated by combinations of retinoids and a 19-nor hexafluoride Vitamin D3 analog.
Endocrinology 139: 1972-1980
- Carter CA, Pogribny M, Davidson A, Jackson CD, McGarrity LJ, Morris SM (1996)
Effects of retinoic acid on cell differentiation and reversion toward normal in human endometrial adenocarcinoma (RL95-2) cells.
Anticancer Res 16: 17-24
- Casarez EV, Dunlap-Brown ME, Conaway MR, Amorino GP (2007)
Radiosensitization and modulation of p44/42 mitogen-activated protein kinase by 2-methoxyestradiol in prostate cancer models.
Cancer Res; 67:8316-8324
- Chen YR, Zhou G, Tan TH (1999)
C-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide.
Mol Pharmacol 56: 1271-1279
- Cowen D, Salem N, Ashoori F, Meyn R, Meistrich ML, Roth JA, Pollack A (2000)
Prostate cancer radiosensitization in vivo with adenovirus-mediated p53 gene therapy.
Clinical Cancer Research; Vol 6: 4402-4408
- Culine S, Kramar A, Droz JP, Theodore C (1999)
Phase II study of all-trans retinoic acid administered intermittently for hormone refractory prostate cancer.
J Urol 161: 173-175
- Dahiya R, Park HD, Cusick J, Vesella RL, Fournier G, Narayan P (1994)
Inhibition of tumorigenic potential and prostate-specific antigen expression in LNCaP human prostate cancer cell line by 13-cis retinoic acid.
Int J Cancer 59: 126-132
- Danforth DN (1996)
All-trans and 9-cis-retinoic acid act additively with hydroxytamoxifen to stimulate apoptosis in MCF-7 breast cancer cells.
Proc AACR 37: 231

Debruyne FJM, Murray R, Fradet Y, Johansson JE, Tyrrell C, Boccardo F, Denis L, Marberger JM, Brune D, Rassweiler J, Vangeneugden T, Bruynseels J, Janssens M, De Porre P (1998)
Liarozole-A novel treatment approach for advanced prostate cancer: results of a large randomized trial versus cyproterone acetate.
Urology 52: 72-81

Denis L (1995)
Liarozole-fumarate (LIA) a novel antitumoral drug: clinical update.
International Symposium on recent advances in diagnosis and treatment of prostate cancer, Sept 21-23, Quebec, Canada

DGU (Deutsche Gesellschaft für Urologie) (2002)
Leitlinie PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik.

Dijkman GA, Moral PF, Bruynseels J, Porre PD, Denis L, Debruyne FJM (1997)
Liarozole (R75251) in hormone-resistant prostate cancer patients.
Prostate 33: 26-31

Dimery IW
Clinical toxicity of retinoids.
S.127-146

Elstner E, Campbell MJ, Munker R, Shintaku P; Binderup L; Heber D; Said J; Koeffler HP (1999)
Novel 20-epi-vitamin D3 analog combined with 9-cis retinoic acid markedly inhibits colony growth of prostate cancer cells.
Prostate 40: 141-149

Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G (1996)
Control of LNCaP proliferation and differentiation: actions and interactions of androgens, $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol, all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid and phenylacetate.
Prostate 28: 182-194

Fenaux P (1994)
Results of APL 91 European trial combining ATRA and chemotherapy: presentation of APL 1993 trial.
Leukemia, Vol 8, Suppl 3, 70-72

Ferrandina G, Filippini P, Ferlini C, Maggiano N, Stoler A, Fruscella E, Mozzetti S, Mancuso S, Freedman R, Scambia G, Raneletti F (2001)
Growth inhibitory effects and radiosensitization induced by fatty aromatic acids on human cervical cancer cells.
Oncology Research, Vol. 12: pp. 429-440

Fong CJ, Sutkowski DM, Braun EJ, Bauer KD, Sherwood ER, Lee C, Kozlowski JM (1993)
Effects of retinoic acid on the proliferation and secretory activity of androgen-responsive prostatic carcinoma cells.
J Urol 149: 1190-1194

Fontana JA (1987)
Interaction of retinoids and tamoxifen on the inhibition of human mammary carcinoma cell proliferation.
Expl Cell Biol 55: 136-144

Formelli F, Carsana R, Costa A, Buranelli F, Campa T, Dossena G, Magni A, Pizzichetta M (1989)
Plasma retinol level reduction by the synthetic retinoid fenretinide: a one year follow-up study of breast cancer patients.
Cancer Res 49: 6149-6152

Fornara P, Loertzer H (2007)
Diagnostik des Prostatakarzinoms.
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübber H), Springer Verlag, 4. Auflage: 414-428

Fukuoka K, Arioka H, Iwamoto Y, Fukumoto H, Kurokawa H, Ishida T, Tomonari A, Suzuki T, Usuda J, Kanzawa F, Kimura H, Saijo N, Nishio K (2002)
Mechanism of vinorelbine-induced radiosensitization of human small lung cancer cells.
In: *Cancer Chemother Pharmacol* 49: 385-90

Gercel-Taylor C, Gibb RK, Taylor DD (1996)
Effect of all-trans retinoic acid on the apoptosis induced by cisplatin and taxol in ovarian cancer cell lines.
Proc AACR 37: 23

Giguere V, Shago M, Zirngibl R (1990)
Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor- γ expressed in the mouse embryo.
Mol cell Biol 10: 2335-2340

Golz R, Störkel S (1999)
Pathologische Anatomie maligner Tumoren der Prostata.
Prostatakarzinom (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer-Verlag, 3-46

Haese A, Huland H (2007)
Epidemiologie, Ätiologie des Prostatakarzinoms
In: *Uroonkologie* (Hrsg.: Rübber H), Springer Verlag, 4. Auflage: 381-395

Harrison HE, Gad MZ (1989)
Hydrolysis of retinol palmitate by enzymes of rat pancreas and liver.
J Biol Chem 264: 17142-17147

Heidenreich A, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F (2008)
EAU Guidelines on Prostate Cancer.
Eur Urol 53: 68-80

Heller J (1975)
Interactions of plasma-retinol-binding protein to its receptor: specific binding of bovine and human retinol-binding protein to pigment epithelial cells of bovine eyes.
J Biol Chem 250: 3613-3919

Hendrix MJC, Wood WR, Seftor EA, Lotan D, Nakajima M, Misiorowski RL, Seftor REB, Stetler-Stevenson WG, Bevaqua SJ, Liotta LA, Sobel ME, Raz A, Lotan R (1990)
Retinoid acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor.
Cancer Res 50: 4121-4130

Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C (1992)
9-cis-retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoic X receptor.
Cell 68: 397-406

Higano CS, Chielens D (1996)
Alfa interferon and cis-retinoic acid in combination for treatment of hormone refractory prostate cancer, preliminary results of an ongoing trial.
Proc Am Soc Clin Oncol 15: 243, abstract 611

Higuchi T, Hannigan GE, Malkin D, Yeger H, Williams BRG (1991)
Enhancement by retinoic acid and dibutyryl cyclic adenosine 3':5'-monophosphate of the differentiation and gene expression of human neuroblastoma cells induced by interferon.
Cancer Res 51: 3958-3964

Hoffmann W, Schlack I, Schiller U, Bamberg M, Rodemann HP (1994)
Growth modulating effects of all-trans-retinoic acid, interferon- α and ionizing radiation in human head and neck and cervical cancer cell lines.
Ann Oncol 5; Suppl 9: 7-10

Hofstetter B, Vuong V, Brogini-Tenzer A, Bodis S, Ciernik IF, Fabbro D, Wartmann M, Folkers G, Pruschy M (2005)

Patupilone acts as radiosensitizing agent in multidrug-resistant cancer cells in vitro and in vivo. *Clinical Cancer research* Vol. 11: 1588-1596

Hong TS, Ritter MA, Tome WA, Harari PM (2005)

Intensity-modulated radiation therapy: emerging cancer treatment technology. *British Journal of Cancer* 92: 1819-1824

Hong WK, Itri LM (1994)

Retinoids and human cancer.

In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) *The Retinoids*. Raven Press, New York, pp 597-630

Hsieh TC, Wu JM (1997)

Effects of fenretinide (4-HPR) on prostate LNCaP cell growth, apoptosis and prostate-specific gene expression.

Prostate 33: 97-104

Huland H. (2006)

Prostatakarzinom.

In: *Urologie*.

Herausgeber: Hautmann RE, Huland H, Springer Verlag, 3. vollständig überarbeitete Auflage, S.229-241

Hwang MS, Thompson KL, Ahn CH (1995)

p-53-independent induction of p21 and apoptosis by all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid in human prostate cancer cell lines.

Proc AACR 36: 10

IARC (1999)

Handbook of cancer prevention.

Volume 4: Retinoids

Itani W, Geara F, Haykal J, Haddadin M, Gali-Muhtasib H (2007)

Radiosensitization by 2-benzoyl-3-phenyl-6,7-dichloroquinoxaline 1,4-dioxide under oxia and hypoxia in human colon cancer cells.

Radiation oncology 2007, 2.1

Jones HE, Eaton CL, Barrow D, Dutkowski C, Griffith K (1997)

Response of cell growth and retinoic acid receptor expression to retinoic acid in neoplastic and non-neoplastic prostate cell lines.

Prostate 30: 174-182

Jozan S, Lafon C, Mathieu C, Caliaro MJ, Barboule, Bugat R, Valette A (1996)

Enhancement of cisplatin cytotoxicity by trans retinoic acid in a human ovarian carcinoma cell liine (OVCCRC1) is characterized by apoptosis.

Proc AACR 37: 414

Kalemkerian GP, Slusher R, Ramalingam S, Gadgeel S, Mabry M (1995a)

Growth inhibition and induction of apoptosis by fenretinide in small-cell lung cancer cell lines.

J Natl Cancer inst 87: 1674-1680

Kalemkerian GP, Slusher R, Ramalingam S, Mabry M (1995b)

Fenretinamide inhibits growth and potentiates etoposide cytotoxicity in small cell lung cancer.

Proc AACR 36: 510

Kastner P, Krust A, Mendelsohn C (1990)

Murine isoforms of retinoid receptor gamma with specific patterns of expression.

Proc Am Assoc Cancer Res 34: 203, abstract 1210

- Kaver I, Ware JL, Wilson JD, Koontz WW (1991)
Effects of radiation combined with hyperthermia on human prostatic carcinoma cell lines in culture.
Urology, volume XXXVIII, number 1: 88-92
- Kelly WK, Scher HI, Muindi J (1993)
Phase II of all-trans retinoic acid in patients with adenocarcinoma of the prostate.
Proc Am Assoc Cancer Res 34: 203, abstract 1210
- Kelly WK, Curley T, Liebertz C, Kim B, Scher H (1996)
Phase II trial of 13-cis retinoic acid and interferon-alpha 2a in patients with adenocarcinoma of the prostate.
Proc Am Soc Clin Oncol 15: 254, abstract 652
- Kiemle-Kallee, Porzsolt F (1993)
Retinoide in der Onkologie.
DMW 118: 390-394
- Kil WJ, Cerna D, Burgan WE, Beam K, Carter D, Steeg PS, Tofilon PJ, Camphausen K (2008)
In vitro and in vivo radiosensitization induced by the DANN methylating agent temozolomide.
Clinical Cancer Research 14: 931-938
- Klotz L (2007)
Rational selection of candidates for active surveillance for prostate cancer.
American Society of Clinical Oncology: 262-265
- Küfer R, Grenze F, Zugmaier W, Hautmann RE, Rinnab L, Gschend JE, Angelmeier M, Estrada A, Büchele B (2007)
Antagonistic effects of sodium butyrate and N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide on prostate cancer.
Neoplasia. Mar; 9 (3): 246-53
- Kurdoglu B, Cheong N, Guan J, Corn B, Curran W Jr., Iliakis G (1999)
Apoptosis as a predictor of paclitaxel-induced radiosensitization in human tumor cell lines.
Clinical Cancer Research, Vol. 5: 2580-2587
- Kvols L (2005)
Radiation sensitizers: a selective review of molecules targeting DNA and non-DNA targets
J Nucl Med; 46:187-190
- Langley S.E.M., Laing R (2002)
Prostate brachytherapy has come out of age: a review of the technique and results.
BJU International 89: 241-249
- Leith JT (1994)
In vitro radiation sensitivity for the LNCaP prostatic tumor cell line.
The Prostate 24: 119-124
- Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A, Grippo JF (1992)
9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha.
Nature 355: 359-361
- Liang JY, Fontana JA, Rao JN, Ordonez JV, Dawson MI, Shroot B, Wilber JF, Feng P (1999)
Synthetic retinoid CD437 induces S-phase arrest and apoptosis in human prostate cancer cells LNCaP and PC3
Prostate 38: 228-236
- Lotan R, Neumann G, Lotan D (1981)
Characterization of retinoic acid-induced alterations in the proliferation and differentiation of a murine and human melanoma cell line in culture.
NY Acad Sci, 359: 150-170

Lotan R, Clifford JL (1991)

Nuclear receptors for retinoids: mediators of retinoid effects on normal and malignant cells.
Biomed & Pharmacother 45: 145-156

Lotan R (1993)

Retinoids and squamous cell differentiation.

In: Hong WK, Lotan R (eds) Retinoids in Oncology. Dekker Inc., New York Basel Hong Kong, pp 43-72

Lucia MS, Anzano MA, Slayter MV, Anver MR, Green DM, Shrader MW, Logsdon DL, Driver CL, Brown CC, Peer CW, Roberts AB, Sporn MB (1995)

Chemopreventive activity of tamoxifen, N-(4-hydroxyphenyl)retinamid and the vitamin D analogue Ro 24-5531 for androgen-promoted carcinomas of the rat seminal vesicle and prostate.
Cancer Res 55: 5621-5627

Mangar S, Huddart R, Parker C, Dearnley D, Khoo V, Horwich A (2005)

Technological advances in radiotherapy for the treatment of localised prostate cancer.
European Journal of Cancer 41: 908-921

Mangelsdorf DJ, Umesonso K, Evans RM (1994)

The retinoid receptors.

In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) The retinoids, Raven Press, New York, pp 319-349

Marth C, Böck G, Daxenbichler G (1985)

Effects of 4-hydroxyphenylretinamide and retinoic acid on proliferation and cell cycle of cultured human breast cancer cells.

JNCI, Vol 75, No 5, 871-875

Maurer BJ, Melton L, Billups C, Cabot MC (2000)

Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and ovariectomy.

J Natl Cancer Inst 92: 1897-1909

McCormick DL, Rao KVN, Dooley L, Stelle VE, Lubet RA, Kelloff GJ, Bosland MC (1998)

Influence of N-methyl-N-nitrosourea, testosterone, and N-(4-hydroxyphenyl)-all-trans retinamide on prostate cancer induction in Wistar-Unilever rats.

Cancer Res 58: 3282-3288

Miller K, Rübber, H (2007)

Therapie des hormonrefraktären metastasierten Prostatakarzinoms.

In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübber H), Springer Verlag, 4. Auflage: 468-485

Miller K, Weißbach L (1999)

Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen.

Urologe A 38: 388-401

Moon RC, Mehta RG, Rao KVN (1994)

Retinoids and cancer in experimental animals.

In: The Retinoids: biology, chemistry and medicine. Eds.: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, Raven Press, New York: 573-596

Morris D, Emami B, Mauch P, Konski A, Tao M, Ng A, Klein E, Mohideen N, Hurwitz M, Fraas B, Roach M, Gore E, Trepper J (2005)

Evidence-based review of three-dimensional conformal radiotherapy for localized prostate cancer: an astro outcomes initiative.

Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 62, No 1: pp. 3-19

Myers RB, Lieberman R, Kelloff GJ, Grizzle WE (1998)

Effects of chemopreventive agents on the growth of prostatic adenocarcinoma cell lines in vitro.

Proc Am Assoc Cancer Res 39: 193, abstract 1320

Nebert DW, Gonzales FJ (1987)

The p-450-genes: structure, evolution and regulation.
Ann Rev Biochem 56: 945-993

Norderhaug, Dahl, Hoisaeter, Heikkila, Klepp, Olsen, Kristiansen, Waehre, Johansen (2003)
Brachytherapy for prostate cancer: Systematic review of clinical and cost effectiveness.
European Urology, Vol 44, Issue 1

Noy N, Xu ZJ (1990)

Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanism of uptake by cells.
Biochem 29: 3878-3883

Ohno R, Ohnishi K, Takeshita A, Tanimoto M, Murakami H, Kanamaru A, Asou N, Kobayashi T, Kuriyama K, Ohmoto E, Sakamaki H, Tsubaki K, Hiraoka A, Yamada O, Oh H, Furusawa S, Matsuda S, Naoe T (1994)

All-trans retinoic acid therapy in relapsed/refractory or newly diagnosed acute promyelocytic leukaemia (APL) in Japan.
Leukemia Vol 8, Suppl 3: 64-69

Ong DE, Kakkad B, MacDonald PN (1987)

Acyl-CoA independent esterification of retinol bound to cellular retinol binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine.
J Biol Chem 262: 2729-2763

Ong DE, Newcomer ME, Chytil F (1994)

Cellular retinoid-binding proteins.
In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) The retinoids. Raven Press, New York, pp 283-317

Oridate N, Lotan D, Xu XC, Hong WK, Lotan R (1995)

Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.
Proc AACR 36: 601

Oridate N, Higuchi M, Hong Wk, Lotan R (1996)

Pro-oxidant activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) may mediate induction of apoptosis in carcinoma cells.
Proc AACR 37: 232

Oshima M, Ward JM, Wenk MI (1985)

Preventive and enhancing effects of retinoids on the development of naturally occurring tumors of skin, prostate gland and endocrine pancreas in aged male ACI/seg HapBR rats.
J Natl Cancer Inst 74: 517-524

Pemrick SM, Lucas DA, Grippo JF (1994)

The retinoid receptors.
Leukemia Vol 8, Suppl. 3: 1-10

Pfahl M (1993a)

Signal transduction by retinoid receptors.
Skin Pharmacol 6: 8-16

Pfahl M (1993b)

Nuclear receptor/AP-1 interaction.
Endocr Rev 14: 651-658

Pfahl M (1994)

The retinoid response: a molecular dissection.
Ann Oncol Vol 5, Suppl. 9: 11-15

Pienta KJ, Nguyen NM, Lehr JE (1993)

Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretinid.
Cancer Res 53: 224-226

Pili R, Kruszewski MP, Hager BW, Lantz J, Carducci MA (2001)

Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis.
Cancer Res 61: 1477-1485

Pisansky T (2005)

External beam radiotherapy as curative treatment of prostate cancer.
Mayo Clin. Proc.: 883-898

Pollard M, Luckert PH (1991a)

The inhibitory effect of 4-hydroxyphenylretinamid (4-HPR) on metastasis of prostate adenocarcinoma-III cells in Lobund Wistar rats.
Cancer Lett 59: 159-163

Pollard M, Luckert PH, Sporn MB (1991b)

Prevention of primary prostate cancer in Lobund Wistar rats by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide.
Cancer Res 51: 3610-3611

Ponzoni M, Casalaro A, Cornaglia-Ferraris P (1991)

Interferon gamma synergizes with retinoic acid and tumor necrosis factor in inducing human neuroblastoma cell differentiation.
Proc AACR 32: 24

Ponzoni M, Bocca P, Chiesa V, Decensi A, Pistoia V, Raffaghello L, Rozzo C, Montaldo PG (1995)

Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation.
Cancer Res 55: 853-861

Potters L, Morgenstern C, Calugaru E, Fearn P, Jassal A, Presser J, Mullen E (2005)

12-Year outcomes following permanent prostate brachytherapy in patients with clinically localized prostate cancer.
Journal of Urology, Vol. 173: 1562-1566

Preis PN, Saya H, Nadasdi L, Hochhaus G, Levin V, Sadee W (1988)

Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A.
Cancer Res 48: 6530-6534

Rigtrup KE, Ong DE (1992)

A retinyl-ester-hydrolase activity intrinsic to the brush border membrane of rat small intestine.
Biochem 31: 2920-2926

Roberson KM, Penland SN, Padilla GM, Selvan RS, Kim CS, Fine RL, Robertson CN (1997)

Fenretinide: induction of apoptosis and endogenous transforming growth factor b in PC-3 prostate cancer cells.
Cell Growth & Differentiation 8: 101-111

Robert Koch Institut (2006)

Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends.
5. überarbeitete und aktualisierte Auflage

Roberts AB, Lamb LC, Sporn MB (1980)

Metabolism of all-trans-retinoic acid in hamster liver microsomes: oxidation of 4-hydroxy- to 4-keto-retinoic acid.
Arch Biochem Biophys 199: 374-383

- Roberts ES, Vaz ADN, Conn MJ (1992)
Role of isoenzymes of rabbit microsomal cytochrome p-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol and retinal.
Mol Pharmacol 41: 427-433
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL (1991)
An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT.
Journal of immunological Methods, vol 142, Issue 2, 13 September: 257-265
- Rubin M, Fenig E, Rosenauer A, Menendez-Botet C, Achkar C, Bentel JM, Yahalom J, Mendelsohn J, Miller WH (1994)
9-cis retinoic acid inhibits growth of breast cancer cells and down-regulates estrogen receptor RNA and protein.
Cancer Res 54: 6549-6556
- Rübben H, Altwein JE (2001)
Therapie des hormonrefraktären metastasierten Prostatakarzinoms.
In: Prostatakarzinom (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer Verlag: 313-350
- Sack H (2001)
Radioonkologie.
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübben H), 4. Auflage, Springer-Verlag: 641-669
- Schaffer M, Ertl-Wagner B, Schaffer PM, Kulka U, Jori G, Dühmke E, Hofstetter A (2005)
The application of Photofrin II^R as a sensitizing agent for ionizing radiation: A new approach in tumor therapy?
Current medicinal chemistry, vol 12, n°10: 1209-1215
- Schlomm T, Chun FK-H, Graefen M, Huland H (2007)
Onkologische Kennzeichen des Prostatakarzinoms.
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübben H), 4. Auflage, Springer-Verlag: 396-406
- Schostak M, Miller K (2007)
Behandlung prostatakarzinomspezifischer Komplikationen.
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübben H), 4. Auflage, Springer-Verlag: 485-488
- Schrader M, Miller K (2007)
Nachsorge beim Prostatakarzinom.
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübben H), 4. Auflage, Springer-Verlag: 488-493
- Scribner DR, Benbrook DM (2002)
Retinoids enhance cisplatin-based chemoradiation in cervical cancer cells in vitro.
Gynecologic Oncology, volume 85, issue 1: 223-225
- Serrano D, Baglietto L, Johansson H, Mariette F, Torrisi R, Onetto M, Paganuzzi M, Decensi A (2005)
Effect of the synthetic retinoid fenretinide on circulating free prostate-specific antigen, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-3 levels in men with superficial bladder cancer.
Clin Cancer Res.; 11 (5): 2083-8
- Shaker MR, Yang G, Timme TL, Parks SH, Kadmon D, Ren CZ, Ji XR, Lee HM, Sehgal I, Anzano M, Sporn MB, Thompson TC (2001)
Dietary 4-HPR suppresses the development of bone metastasis in vivo in a mouse model of prostate cancer progression.
Clin and Exp Metastasis 18: 429-438
- Shen JC, Wang TTY, Chang S, Hursting SD (1999)
Mechanistic studies of the effects of the retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on prostate cancer cell growth and apoptosis.
Mol Carcinogenesis 24: 160-168

- Shewach D, Lawrence T (1996)
Radiosensitization of human solid tumor cell lines with gemcitabine
Seminars in Oncology, Vol 23, No 5, Suppl 10 (October), 65-71
- Slawin K, Kadmon D, Park SH, Scardino PT, Anzano M, Sporn MB, Thompson TC (1993)
Dietary fenretinide, a synthetic fenretinoid, decreases the tumor incidence and the tumor mass of ras+myc-induced carcinomas in the mouse prostate reconstitution model system.
Cancer Res: 4461-4465
- Smith J, Andriole G, Ahmann F, Schellhammer P, Stein B, Chodak G, Kozlowski J, Kreis W, Strum S, Ding C, Ouyang P, Connolly M, Kremer A (1996)
Effects of liarozole (LIA) on PSA levels in patients with relapsed stage D prostate cancer.
Proc Am Soc Clin Oncol 15: 250, abstract 636
- Smith Ma, Parkinson DR, Cheson BD, Frieman MA (1992)
Retinoids in cancer therapy.
J Clin Oncol, Vol 10, No 5: 839-864
- Sobin LH, Wittekind C (1997)
TNM Classification of malignant Tumors.
Wiley-Liss, fifth Edition, 170-173
- Sonpavde G, Hutson T.E. (2006)
New approaches in hormone refractory prostate cancer.
Am J Clin Oncol; 29: 196-201
- Sun SY, Yue P, Lotan R (1999)
Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and its association with reactive oxygen species, nuclear retinoic acid receptors, and apoptosis-related genes in human prostate carcinoma cells.
Mol Pharmacol 55: 403-410
- Tao W, Ossowski L, Waxman S, Platica M, Ferrari A (1996)
Retinoids induce apoptosis of androgen dependent and independent prostate cancer cells and androgens potentiate this effect.
Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res 37: A 1383
- Thalmann GN, Sikes RA, Chang SM, Johnston DA, von Eschenbach AC, Chung LW (1996)
Suramin-induced decrease in prostate-specific antigen expression with no effect on tumor growth in the LNCaP model of human prostate cancer.
J Natl Cancer Inst 88: 794-801
- Treiber U, Hartung R, Breul J (2001)
Einsatz von Retinoiden bei urologischen Tumoren.
Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
Vortrag Tumorzentrum München am 21.06.
- Trump DL, Smith DC, Stiff D, Adedoyin A, Day R, Bahnson RR, Hofacker J, Branch RA (1997)
A phase II trial of all-trans-retinoic acid in hormon-refractory prostate cancer: a clinical trial with detailed pharmacokinetic analysis.
Cancer Chemother Pharmacol 39: 349-356
- Van Ginckel R, De Coster R, Wouters W, Vanherck W, van der Veer R, Goeminne N, Jagers E, Van Cauteren H, Wouters L, Distelmans W (1990)
Antitumoral effects of R75251 on the growth of transplantable R3327 prostatic adenocarcinoma in rats.
Prostate 16: 313-323
- Vos S, Dawson MI, Holden S, Le T, Wang A, Cho SK, Chen DL, Koeffler HP (1997)
Effects of retinoid X receptor-selective ligands on proliferation of prostate cancer cells.
Prostate 32: 115-121

- Wang H, Oliver P, Zhang Z, Agrawal S, Zhang R (2003)
Chemosensitization and radiosensitization of human cancer by antisense anti-MDM2 oligonucleotides, in vitro and in vivo activities and mechanisms.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1002: 217-235
- Wang XD, Tang GW, Fox JG, Krinsky NI, Russel RM (1991)
Enzymatic conversion of beta-carotene to beta-apocarotenals and retinoids by human, monkey, ferret and rat tissues.
Arch Biochem Biophys 285: 8-16
- Wang TTY, Phang JM (1996)
Effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on apoptosis in human breast cancer cells.
Cancer Letters 107: 65-71
- Weiss RE, Cordon-Cardo C, Fair WR (1994)
Inhibition of invasion of human testis tumor cell lines by N-retinamide.
J Urol 151: 412 A
- Wirth, M (2001)
Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms.
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübber H), Springer-Verlag, 3. Auflage:233-277
- Wirth M, Hakenberg O, Fröhner M (2007)
Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms.
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübber H), Springer Verlag, 4. Auflage: 429-445
- Wolf G (1984)
The intestinal metabolism of vitamin A.
Physiol Rev 64: 873-878
- Wolff JM, Börgermann C, Hammerer P, Heine K (2007)
Therapie des virginell metastasierten Prostatakarzinoms.
In: Uroonkologie (Hrsg.: Rübber H), Springer Verlag, 4. Auflage: 452-468
- Wood CG, Lee C, Koszłowski JM (1994)
Phenylacetate and retinoic acid act synergistically to promote cellular differentiation in the prostate cancer cell line LNCaP.
J Urol 151: 491 A
- Zhang Z, Wang H, Prasad G, Li M, Yu D, Bonner JA, Agrawal S, Zhang R (2004)
Radiosensitization by antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligonucleotide in vitro and in vivo human cancer models.
Clinical Cancer Research, Vol. 10:1263-1273
- Zugmaier G, Jäger R, Grage B, Gottardis MM, Havemann K, Knabbe C (1996)
Growth-inhibitory effects of vitamin D analogues and retinoids on human pancreatic cancer cells.
Br J Cancer 73. 1341-1346

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Zonale Anatomie der Prostata nach McNeal (Brooks, 1998)	7
Abbildung 2:	basaler Querschnitt	13
Abbildung 3:	median-saggitaler Längsschnitt	13
Abbildung 4:	Zelllinie LNCaP, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)	45
Abbildung 5:	Zelllinie LNCaP, 120 Stunden, 5 μ M 4-HPR (x320)	46
Abbildung 6:	Zelllinie PC3, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)	47
Abbildung 7:	Zelllinie PC3, 120 Stunden, 5 μ M 4-HPR (x320)	47
Abbildung 8:	Versuchsplan zur Überprüfung der Modulation der Dosis-wirkungs-Kurven von 4-HPR (0,001-10 μ M) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der einmaligen Bestrahlung (5 Gy)	53
Abbildung 9:	Versuchsplan zur Überprüfung der Modulation der Dosis-Wirkungs-Kurve von 4-HPR (0,001-10 μ M) bei initialer, einmaliger Bestrahlung (5 Gy) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Retinoidapplikation	54
Abbildung 10:	Zellüberleben (%) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer alleinigen, einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Zelllinien PC3 und LNCaP	57
Abbildung 11:	Zellüberleben (%) bei initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in der Zelllinie PC3	59
Abbildung 12:	Zellüberleben (%) bei initialer Gabe des Retinoids in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in der Zelllinie LNCaP	59
Abbildung 13:	Kombinierte Applikation von 4-HPR (0,001-10 μ M) bei initialer Gabe des Retinoids (24 Stunden nach Zellaussaat) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Linien PC3 und LNCaP	60
Abbildung 14:	Kombinierte Applikation von Retinoid und Bestrahlung in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt für die Zelllinien PC3 und LNCaP (RTX: einmalige Bestrahlung mit 5 Gy)	63
Abbildung 15:	Zellüberleben (%) bei initialer Bestrahlung mit 5 Gy in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe des Retinoids (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in der Zelllinie PC3	66
Abbildung 16:	Zellüberleben (%) bei initialer Bestrahlung mit 5 Gy in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe des Retinoids (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in der Zelllinie LNCaP	67
Abbildung 17:	Kombinierte Applikation von 4-HPR (0,001-10 μ M) bei initialer Bestrahlung mit 5 Gy (24 Stunden nach Zellaussaat) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Gabe des Retinoids (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Linien PC3 und LNCaP	67

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Histologische Typen des Prostatakarzinoms und ihre relativen Häufigkeiten (Golz, 1999) _____	8
Tabelle 2:	TNM-Klassifikation des Adenokarzinoms der Prostata (Heidenreich, 2008) _____	10
Tabelle 3:	Ergebnisse der radikalen Prostatektomie bei T2-Tumoren im Vergleich zu Strahlentherapie und Brachytherapie (Nach Middleton et al. 1995 in Wirth, 2001) _____	17
Tabelle 4:	Strukturformeln häufig untersuchter Retinoide _____	31
Tabelle 5:	Modulation des Zellwachstums der humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 durch Retinoide _____	41
Tabelle 6:	Einsatz von Retinoiden bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom in klinischen Studien _____	43
Tabelle 7:	IC50-Werte und Konfidenzintervalle für das Retinoid 4-HPR in den Zelllinien PC3 und LNCaP _____	56
Tabelle 8:	Zellüberleben (%) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer alleinigen, einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Zelllinien PC3 und LNCaP _____	57
Tabelle 9:	Kombinierte Applikation von 4-HPR (0,001-10 µM) bei initialer Gabe des Retinoids (24 Stunden nach Zellaussaat) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Bestrahlung mit 5 Gy (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Linien PC3 und LNCaP _____	58
Tabelle 10:	IC50-Werte und Konfidenzintervalle für das Retinoid 4-HPR in den Zelllinien PC3 und LNCaP _____	65
Tabelle 11:	Kombinierte Applikation von 4-HPR (0,001-10 µM) bei initialer Bestrahlung mit 5 Gy (24 Stunden nach Zellaussaat) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer einmaligen Gabe des Retinoids (d1=24 h, d3=72 h, d5=120 h nach Zellaussaat) in den Linien PC3 und LNCaP _____	66

10 Abkürzungsverzeichnis

13cRA	13-cis-Retinsäure
4-HPR	N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid
4-MPR	N-(4-Methoxyphenyl)retinamid
9cRA	9-cis-Retinsäure
AAH	atypische adenomatöse Hyperplasie
AP	Alkalische Phosphatase
APL	akute Promyelozytenleukämie
AP-1	Aktivator-Protein-1
AR	Androgenrezeptor
ATRA	all-trans-Retinsäure
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CRABP I	Cellular retinoic acid-binding protein (Typ I)
CRABP II	Cellular retinoic acid-binding protein (Typ II)
CRBP I	Cellular retinol-binding protein (Typ I)
CRBP II	Cellular retinol-binding protein (Typ II)
CT	Computertomographie
DHT	Dihydrotestosteron
DN101	High-dose calcitriol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
EMP	Estramustinphosphat
FKS	Fetales Kälberserum
fPSA	Freies prostataspezifisches Antigen
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
Gy	Gray (Maßeinheit der Energiedosis)
γ -GT	Gammaglutamyltransferase
HDL	High density lipoproteins

Abkürzungsverzeichnis

IC50	Konzentration, die zu einem Zellabsterben von 50% führt
IFN α, β, γ	Interferon α, β, γ
IL-1	Interleukin-1
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low density lipoproteins
LH	Luteinisierendes Hormon
LH-RH-Agonisten	Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon-Antagonisten
LNCaP	Zelllinie; Tumorzellen von Lymphknotenmetastasen eines Prostatakarzinoms
mRNA	Mitochondriale Ribonucleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MV	Mean value / Mittelwert
NCI	National Cancer Institute
NEAS	Non-Essential-Amino-Acids
PA	Phenylacetat
PB	Phenylbutyrat
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC3	Zelllinie; Tumorzellen von Knochenmetastasen eines Prostatakarzinoms
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PMS	phenazin methosulfat: N-Methyldibenzopyrazin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RAR	Retinoic-Acid-Receptors
RARE	Retinoc acid response elements
RBP	Retinolbindungsprotein
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
RTX	Bestrahlung
RXR	Retinoic-X-Receptors

Abkürzungsverzeichnis

RXRE	Retinoic X response elements
TGF α , β	Transforming growth factor α , β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNM	T(umor)N(odulus)M(etastase)
t-PA	Tissue-type plasminogen activator
TRUS	Transrektale Ultraschalluntersuchung
VLDL	Very low density lipoproteins
WHO	World Health Organisation
XTT	Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl 2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt
ZNS	Zentrales Nervensystem

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Landshut, November 2008

Ulrike Eid