

Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

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

**Proliferation von Prostatakarzinomzelllinien in vitro nach Behandlung mit Gefitinib
und in Kombination mit Docetaxel, Etoposid und Cyclophosphamid**

Alexander Kaspin

**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. H. van Randenborgh

2. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend

**Die Dissertation wurde am 21.01.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.07.2010 angenommen.**

„Der Mensch muß bei dem Glauben verharren,
daß das Unbegreifliche begreiflich sei; er würde
sonst nicht forschen.“

Johann Wolfgang von Goethe

*Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Anatomie der Prostata	6
1.2	Histologie und Morphologie	6
1.3	Prostatakarzinom:	8
1.3.1	Begriffsdefinition, Inzidenz.....	8
1.3.2	Ätiologie des Prostatakarzinoms	9
1.3.3	Histologie	12
1.3.4	Grading	12
1.3.5	Klinik.....	14
1.3.6	Diagnostik	15
1.3.7	Therapie.....	20
1.4	Ziel der Untersuchung	31
2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	Zelllinien	32
2.1.1	DU 145	32
2.1.2	LNCaP	33
2.1.3	PC 3	35
2.2	Materialien	36
2.2.1	Kulturmedien und Reagenzien	36
2.2.2	Arbeitsmittel.....	38
2.2.3	Verwendete Zytostatika.....	39
2.3	Handhabung und Subkultivierung der Zellen	43
2.3.1	Passagieren und Anzucht	43
2.3.2	Medienwechsel.....	44
2.3.3	Lagerung und Konservierung.....	44
2.3.4	Mykoplasmenkontrolle.....	45
2.4	Testverfahren	45

2.4.1	Testvorbereitung und Durchführung	45
2.4.2	Inkubation mit Zytostatika	46
2.4.3	Titerplattenphotometer- Messung	46
2.5	Statistische Auswertung und Darstellung	47
2.5.1	Dose-Response-Kurven.....	47
2.5.2	Isobologramme.....	48
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Rezeptoreigenschaften der Zelllinien	50
3.2	Proliferation bei Monotherapie.....	52
3.2.1	Gefitinib	52
3.2.2	Etoposid.....	55
3.2.3	Cyclophosphamid (CPM).....	58
3.2.4	Docetaxel (TXT)	61
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse bei Monotherapie	64
3.3	Proliferation bei Kombinationstherapie	65
3.3.1	Gefitinib und Etoposid	66
3.3.2	Gefitinib und Cyclophosphamid (CPM)	70
3.3.3	Gefitinib und Docetaxel (TXT).....	74
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse bei Kombinationstherapie mit Gefitinib	77
4	DISKUSSION	79
4.1	Beurteilung der Methoden.....	79
4.2	Beurteilung der Monotherapie im Vergleich zur Kombinationstherapie.....	81
4.3	Interpretation der Ergebnisse	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	86
	LITERATURVERZEICHNIS	88
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97

TABELLENVERZEICHNIS	99
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	101
DANKSAGUNG	102
LEBENS LAUF	103

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Prostata

Die Prostata ist ein esskastaniengroßes Organ und misst in ihrer Länge 3,2 bis 4,2 cm, in ihrer Breite 3,5 bis 5 cm, in ihrer Dicke 1,7 bis 2,3 cm. Sie wiegt bei ausgewachsenen jungen Männern zwischen 17 und 28 g und liegt extraperitoneal im Bindegewebe des Spatium subperitoneale eingebettet [54]. Nach kaudal verjüngt sie sich und erreicht mit ihrer Spitze das Diaphragma urogenitale. Ihre ventrale Seite weist gegen die Symphyse, ihre dorsale Fläche grenzt an die Rektumampulle und ist von dort aus auch tastbar [90].

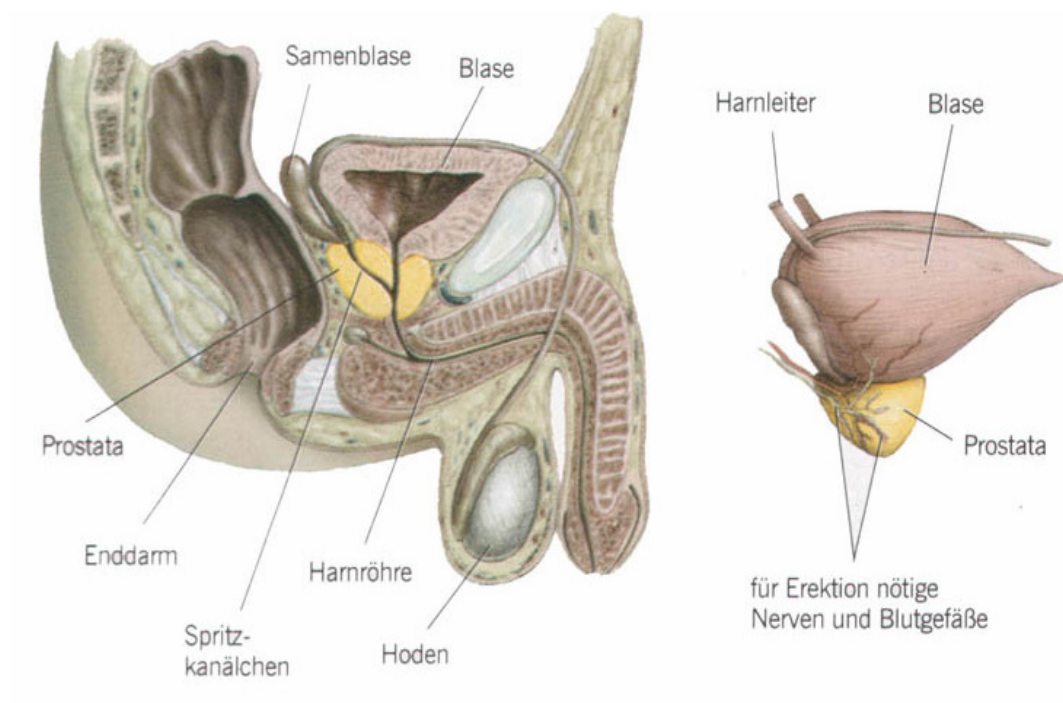


Abbildung 1: Anatomie der Prostata [83]

1.2 Histologie und Morphologie

Die Prostata besteht aus 30-50 verzweigten, tubuloalveolären Drüsen, deren Ausführungsgänge (15-30) beiderseits des Colliculus seminalis um den Sinus prostaticus der Pars prostatica der Urethra münden. Die Prostata wird von einer derben fibroelastischen Kapsel umgeben, deren innere Schicht viele glatte Muskelzellen enthält. Von hier ziehen breite Bindegewebssepten ins Organinnere. Das Bindegewebe der Prostata (Stroma) ist dicht und erhält außer zahlreichen kollagenen Fasern und einem Netzwerk elastischer Fasern als

besonderes morphologisches Kennzeichen viele glatte Muskelzellen. Außerdem kommen im Stroma zahlreiche Gefäße und Nerven vor. Die Prostata Drüsen selbst sind vielgestaltig: teilweise weitlumig, teilweise eng, häufig verzweigt. Das Drüsenlumen ist durch kleine Schleimhautfalten unterkammert. Das Epithel ist uneinheitlich. Meist ist es einschichtig hochprismatisch, aber auch mehrschichtig oder mehrreihig, sowie in Gebieten mit weitem Lumen platt oder kubisch. Es zeigt verschiedene Zelltypen, v.a. sekretorische Hauptzellen und deren Vorläufer (Basalzellen), aber auch- in geringer Zahl – enterochromaffine Zellen, kleine granulierte und sialomuzinbildende Zellen. Die Hauptzellen liegen in verschiedenen Funktionsstadien vor, zeigen aber stets alle Charakteristika von proteinbildenden Zellen. Außerdem sind sie sehr lysosomenreich und zeichnen sich histochemisch durch hohe Enzymaktivitäten aus. [43].

Ein Leitenzym ist die saure Phosphatase und das prostataspezifische Antigen. In den Drüsenzellen der Prostata findet man auch noch die Enzyme wie 5 α -Reduktase und Arginase. Das dabei in den Drüsenlichtungen gesammelte Sekret wird über die Drüsenausführungsgänge bei der Ejakulation mit Hilfe der Prostatamuskulatur ausgepresst. Durch Ausfällung von im Prostatasekret enthaltenen Stoffen, kann es in den Drüsenlumina zur Eindickung des Sekrets und damit zur Bildung so genannter Prostatasteine kommen.

Aufgrund histologischer und morphologischer und funktioneller Kriterien wird die Prostata in vier Zonen unterteilt nach McNeal 1988:

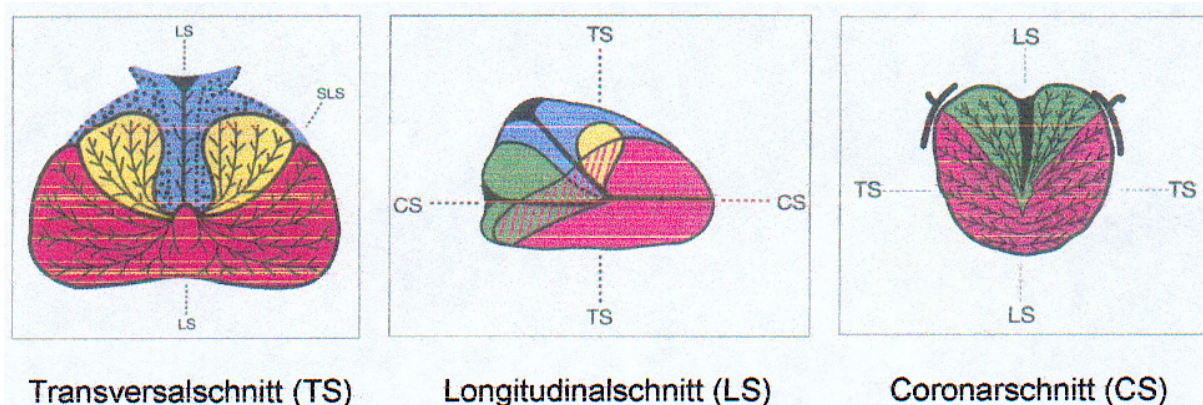


Abbildung 2: zonale Unterteilung der Prostata [59]

=> Anteriore Zone	- Fibromuskuläres Gewebe ohne glanduläre Strukturen
=> Zentrale Zone	- 25% des Prostatavolumens - Enthält die Ductus ejakulatorii - Entstehungsort von entzündlichen Prozessen
=> Übergangszone = Transitionalzone = T-Zone	- 5-10% des Prostatavolumens - Bestehend aus zwei Seitenlappen - Zusammen mit den periurethralen Drüsen Entstehungsort der BPH (=Benigne Prostata Hyperplasie)
=> Periphere Zone = P-Zone	- 70% des Prostatavolumens - Postero-inferiorer Anteil der Prostata

Tabelle 1: Zonale Unterteilung der Prostata nach Mc Neal [59]

1.3 Prostatakarzinom:

1.3.1 Begriffsdefinition, Inzidenz

Das Prostatakarzinom ist mittlerweile der häufigste maligne Tumor des Mannes. In Deutschland werden derzeit jährlich etwa 40.600 Prostatakarzinome diagnostiziert. Mit ca. 20 % lag das Prostatakarzinom im Jahr 2000 an erster Stelle unter den bösartigen Neubildungen beim Mann [76].

Obwohl das Prostatakarzinom überwiegend im hohen Alter auftritt, steht dieser Tumor immer noch auf dem dritten Platz bezüglich der tumorbedingten Sterblichkeit nach dem Bronchialkarzinom und kolorektalen Tumoren.

Unter urologischen Tumoren stellt das Prostatakarzinom die häufigste Todesursache dar und ist zugleich bei den Tumoren ab dem 80. Lebensjahr die häufigste tumorbedingte Todesursache überhaupt. Das mittlere Alter bei Diagnose liegt bei 71,4 Jahren, das mittlere Sterbealter bei 78 Jahren [14].

Folgende Formen des Prostatakarzinoms (PC) werden unterschieden:

- klinisch manifestes, histologisch gesichertes PC
- inzidentielles PC: dies ist ein zufällig vom Pathologen entdecktes PC, wobei das Material aus einer operativen Behandlung der BPH stammt.
- okkultes PC : bei bereits nachgewiesenen Metastasen wird dieser Tumor im Rahmen der Suche nach einem Primärtumor diagnostiziert
- latentes PC wird erst im Rahmen einer Autopsie entdeckt

1.3.2 Ätiologie des Prostatakarzinoms

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt. Für die Entstehung dieses Tumors werden verschiedene prädisponierende Ursachen verantwortlich gemacht. Es wurden endogene Ursachen sowie Umwelt und genetische Einflüsse diskutiert.

Alter

Vor dem 40. Lebensjahr wird das Prostatakarzinom nur selten beobachtet. Der Häufigkeitsgipfel liegt in der 7.-8. Lebensdekade. und steigt von 20/100.000 bei den 55jährigen auf 500/100.000 bei den 85jährigen. Die Wahrscheinlichkeit an einem Prostatakarzinom zu erkranken beträgt bei Männern unter 39 Jahren 1:10000, bei Männern zwischen 40 und 59 1:103 und zwischen 60 und 79 1:8 [102].

Genetische Faktoren

Bei Männern, die in jüngerem Alter erkranken, wird eine genetische Prädisposition diskutiert. Bei 45 % aller Männer unter 55 Jahren mit einem Prostatakarzinom lässt sich eine autosomal dominante Vererbung nachweisen [16].

In den epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass das Risiko eines Prostatakarzinoms bis zu dreimal höher ist, wenn ein Verwandter ersten Grades am Prostatakarzinom erkrankt ist. Dabei ist für die Brüder das Prostatakarzinom-Risiko höher als für die Söhne des Erkrankten [101]. Deutliche Hinweise auf erbliche Prostatakarzinome sind das Vorkommen von drei oder mehr betroffenen Familienmitgliedern ersten Grades, das Vorkommen in drei Generationen oder zwei betroffene Familienmitglieder vor dem 55. Lebensjahr. Ca. 9 % aller

Prostatakarzinome sind erbliche Prostatakarzinome, die in mehreren Generationen auftreten [16, 19].

Im Jahre 1996 beschrieb Smith den ersten Genlocus auf dem Chromosom 1 beim familiären Prostatakarzinom und nannte ihn HPC1 (hereditary prostate cancer) [89]. Ein weiterer Locus, der in Verbindung mit dem Prostatakarzinom gebracht wird, wurde 1998 von Berthon beschrieben. Dieser liegt ebenfalls auf dem Chromosom 1 und wird 1q42.2-33 bezeichnet [10]. In verschiedenen Studien wurde ein Gen beschrieben, welches bei einem vererbten Prostatakarzinom für eine autosomal-dominante Vererbung verantwortlich ist. [16, 81] In einigen Familien fanden sich Hinweise auf eine autosomal-rezessive oder X-gekoppelte Vererbung [65].

Ethnische und geographische Unterschiede

Neben dem familiären Prostatakarzinom wird ein erhöhtes Auftreten in der westlichen Welt beobachtet. So finden sich die höchsten Erkrankungsraten im europäischen Vergleich in Finnland, Schweden und Belgien, die niedrigsten in Griechenland, Lettland und Polen [76].

Auch weltweit werden starke Schwankungen in der Prostatakarzinomhäufigkeit beobachtet. Die höchste Wahrscheinlichkeit, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, besteht bei der farbigen Bevölkerung der Vereinigten Staaten [80]. Die asiatischen Völker weisen dagegen eine sehr niedrige Inzidenzrate auf [70]. Die Japaner, die in die USA auswanderten, weisen wiederum einen Anstieg der Inzidenz an PC auf [84]. Daraus lässt sich ebenfalls ableiten, dass neben den genetischen Faktoren auch Lebensgewohnheiten und Umweltfaktoren die Entstehung des Prostatakarzinoms beeinflussen.

Ernährung und Lebensweise

Zahlreiche epidemiologische Studien fanden Hinweise für einen Einfluss von fettreicher, faserarmer Nahrung auf die Prostatakarzinominzidenz [100, 30, 101].

Bestimmten Nahrungsbestandteilen wie Zink, Selen sowie fettlöslichen Vitaminen E und D wird ein protektiver Effekt zugeschrieben.

Insbesondere spielt der Vitamin-D- Rezeptor beim Prostatakarzinom eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass die Entstehung des Prostatakarzinoms durch einen Mangel an Vitamin D gefördert werden kann, und das Vitamin D₃ in malignen Zellen einen antiproliferativen Effekt

hat [88]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Auftreten des Prostatakarzinoms in den äquatornahen Ländern mit hoher Sonnenexposition seltener ist.

Die Annahme eines protektiven Effekts von Vitamin A wird kontrovers diskutiert. Vitamin A beteiligt sich an der Differenzierung der Epithelzellen und ist ein Vertreter der Antioxidantien. Im Tiermodell konnten Retinoide die Entstehung von experimentell induzierten Prostatakarzinomen unterdrücken.

Diphenolische Verbindungen, pflanzliche Liganden und Isoflavonoide die z.B in Getreide, Soja, Gemüse enthalten sind, werden von Darmbakterien zu schwachen Östrogenen abgebaut und wirken somit protektiv. Das erklärt möglicherweise eine niedrige Inzidenz des Prostatakarzinoms bei den Ostasiaten durch ihre täglichen Ernährungsgewohnheiten.

Eine Studie zur Untersuchung des protektiven Effekts von grünem Tee auf die Entstehung des Prostatakarzinoms zeigte die Abnahme der Inzidenz des Prostatakarzinoms mit steigender Frequenz des Teekonsums [44].

Weitere wahrscheinliche Risikofaktoren des Prostatakarzinoms sind [12]: Alkoholkonsum, Zigarettenrauchen, Kaffeekonsum, sozioökonomischer Status.

Prostatische intraepitheliale Neoplasie (PIN)

Prostatische intraepitheliale Neoplasie (PIN) und atypische kleinazinäre Proliferation (ASAP) sind zwei Veränderungen des Prostataepithels, die heutzutage mit der Prostatakarzinomentstehung in Verbindung gebracht werden.

Seit Ende der 1980er Jahre unterscheidet man zwischen low grade PIN(LG-PIN) und high grade PIN (HG-PIN). Die HG-PIN ist in ihrer Wertigkeit dem Adenom des Dickdarms gleichzusetzen [94].

Klinisch relevant ist die HG-PIN, die häufig mit einem Prostatakarzinom assoziiert ist. Die morphologischen Kriterien von HG-PIN sind vergrößerte, hyperchromatische und entrundete Zellkerne, Nukleolen in über 10% der Zellkerne und ein dunkles Zytoplasma [94].

Der Nachweis einer HG-PIN in Prostatabiopsien korreliert mit dem Nachweis eines invasiven Prostatakarzinoms im Prostataektomiepräparat [71]. Rebiopsien bei einer HG-PIN in der primären Biopsie weisen in ca. 23%-100% der untersuchten Proben Prostatakarzinome auf

[79, 2]. Die HG-PIN hat eine diagnostische aber keine therapeutische Bedeutung. Zurzeit empfehlen die urologischen Fachgesellschaften eine kurzfristige Rebiopsie, sowie regelmäßige PSA-Kontrollen [26]

ASAP stellt keine Diagnose dar, sie ist keine Erkrankung, sondern vielmehr eine Bezeichnung für eine histopathologische Struktur, die der Pathologe weder als gutartig noch als bösartig einzustufen vermag. In Folgebiopsien werden bei etwa 35% der Patienten Karzinome entdeckt, so dass der ASAP eine Rebiopsie kurzfristig anzuschließen ist [94].

1.3.3 Histologie

Es werden folgende histologische Subtypen des Prostatakarzinoms unterschieden [25]:

- Azinäres Adenokarzinom
- Muzinöses Adenokarzinom
- Duktales Adenokarzinom
- Plattenepithelkarzinom
- Transitionalzellkarzinom
- Neuroendokriner Tumor
- Kleinzelliges anaplastisches Karzinom
- Undifferenziertes Karzinom

1.3.4 Grading

Beim Grading des Prostatakarzinoms haben sich drei folgende Klassifikationen durchgesetzt:

- Grading nach Gleason
- Grading nach WHO
- Grading nach der Empfehlung des Pathologisch-Urologischen Arbeitskreises

Grading nach Gleason

Das Gleason-System betrachtet den Grad der glandulären Differenzierung und die Beziehung der Drüsen zum Stroma bei geringer Vergrößerung. Zytologische Eigenschaften, wie z.B. nukleäre Anaplasie spielen darin keine Rolle. Dieses System beinhaltet 5 verschiedene histologische Muster [31]:

- Gleason Grad 1: Umschriebene Knoten von einheitlichen, einzelnen, enggepackten und glatt begrenzten Drüsen.
- Gleason Grad 2: Drüsen eher locker angeordnet, aber immer noch umschrieben. Minimale Ausbreitung der neoplastischen Drüsen in das umgebende Stroma.
- Gleason Grad 3: Tumor infiltriert das umgebende Prostatagewebe. Die Drüsen variieren erheblich in Größe und Gestalt, sind aber abgrenzbare Einheiten.
- Gleason Grad 4: Die Drüsen sind nicht länger einzeln und abgegrenzt, sondern scheinen verschmolzen mit unregelmäßigen Grenzen.
- Gleason Grad 5: Aufhebung der glandulären Differenzierung. Die Tumoren bestehen aus soliden Nestern, Strängen oder Einzelzellen.

Da viele Tumoren multifokal wachsen und verschiedene Grade aufweisen, werden die Grade des größten und zweitgrößten Tumorareals addiert und als kombinierter Gleason Score angegeben. Der Gleason Score reicht von 2 (1 + 1) bis 10 (5 + 5).

Der Vorteil des Gleason Gratings gegenüber dem dreistufigen Grading nach WHO besteht in der besseren prognostischen Aussagekraft bei mäßig differenzierten Tumoren (Gleason Score 5-7, bzw. Grad 2). Es zeigte sich, dass Tumoren ab dem kombinierten Gleason Score 7 eine ungünstigere Prognose haben [85].

Grading nach WHO (Mostofi Klassifikation 1975)

Nach WHO wird das Prostatakarzinom in 3 Grade eingeteilt:

	G	Gleason-Score
gut differenziert/leichte Aplasie	1	2-4
moderat differenziert	2	5-6
moderat schlecht differenziert		7
schlecht differenziert-undifferenziert	3-4	8-10

Tabelle 2: WHO Grading und Gleason-Score

Schema des Pathologisch- urologischen Arbeitskreises "Prostatakarzinom"

Im deutschsprachigen Raum wird auch die Einteilung nach den Empfehlungen des Pathologisch-urologischen Arbeitskreises "Prostatakarzinom" vorgenommen. Diese Einteilung berücksichtigt in einer Punkteskala sowohl strukturelle Gesichtspunkte (drüsige, kribriiforme und solide Karzinomanteile) wie auch zytologische Kriterien (geringe, mäßige und starke Kernanaplasie). Es ergeben sich drei Malignitätsgrade I– III, die jeweils noch in a und b aufgegliedert werden [39].

Gleason-Score	PU-AK	WHO	Prognose
2	G Ia	Grad 1	Günstig
3 und 4	G Ib	Grad 1	Günstig
5 und 6	G IIa	Grad 2	Günstig
7	G IIb	Grad 3	Ungünstig
8 und 9	G IIIa	Grad 3	Ungünstig
10	G IIIb	Grad 3	Ungünstig

Tabelle 3: Vergleich Gleason-Score, PU-AK (Pathologisch- urologischer Arbeitskreis) und WHO

1.3.5 Klinik

Eine frühe Symptomatik beim Prostatakarzinom, einem langsam wachsenden Tumor, ist eher untypisch. Da das Prostatakarzinom von den kaspelnahen Bereichen der Prostata ausgeht, bedarf es oft einige Zeit, bis die Urethra in Mitleidenschaft gezogen wird und es zu obstruktiven und irritativen Miktionsbeschwerden kommt.

Selten ist eine Hämaturie, eine Hämospemie oder eine Verringerung des Ejakulationsvolumens bei Befall der Ductuli ejaculatorii festzustellen. Bei fortgeschrittenen Karzinomen kann es bei Befall der Beckenlymphknoten, der Venae iliacae zu Ödemen im Bereich der unteren Extremität oder des Genitals kommen.

Urämische Symptome im Sinne eines postrenalen Nierenversagens ergeben sich bei Kompression eines Harnleiters durch befallene Lymphknoten oder durch Befall des Blasenhalsses bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen. Unspezifische Tumorsymptome wie Gewichtsverlust, Fieber und Nachtschweiß sowie Tumoranämie sind insbesondere beim metastasierten Prostatakarzinom zu beobachten.

Die lymphogene Metastasierung erfolgt zunächst in die obturatorischen Lymphknoten, anschließend in die iliakalen, später in die lumbalen Lymphknoten. Von der hämatogenen Metastasierung ist in erster Linie das Achsenskelett betroffen mit entsprechenden Symptomen wie beispielsweise Rückenschmerzen. Im Endstadium werden auch parenchymatöse Organe, insbesondere Leber, Lunge oder Gehirn befallen [33].

1.3.6 Diagnostik

Da ein Prostatakarzinom nur selten Symptome verursacht, besitzt die Früherkennung dieses Tumors heutzutage einen hohen Stellenwert. Die Früherkennung wird im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung angeboten und beinhaltet die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens, die transrektale Ultraschalluntersuchung und die digital rektale Untersuchung. Die Vorsorgeuntersuchung wird ab dem 45. Lebensjahr angeboten.

Prostata-spezifisches Antigen (PSA)

Das prostataspezifische Antigen wurde zuerst entdeckt als „ausfallendes Antigen einer normalen Prostata“ [1]. Seine Hauptfunktion liegt in der Verflüssigung des Ejakulats durch Proteolyse der gelformenden Proteine Seminogelin I und II [55].

Im Jahre 1979 wurde PSA im normalen Prostatagewebe, bei BPH sowie im malignen Prostatagewebe entdeckt [99].

Das PSA ist organspezifisch, kann aber als reiner Tumormarker nicht verwendet werden, da es bei einer benignen Prostatahyperplasie und bei einer Prostatitis erhöht sein kann. Das PSA ist der meist verfügbare und der optimalste Biomarker für das Prostatakarzinom [4].

Es liegt im Serum in freier (fPSA) und gebundener Form (an alpha-1-Chymotrypsin und Makroglobulin komplexiert) vor. Durch die handelsüblichen Assays können sowohl das Gesamt-PSA als auch die freien Formen bestimmt werden.

Heutzutage gibt es unterschiedliche PSA- Messverfahren. Bei den meisten ist ein Normwert von 4 ng/ml anzusehen. Neuerdings gibt es Testsysteme mit altersspezifischen Grenzwerten. Das Ziel der Bestimmung der altersspezifischen PSA-Grenzwerte ist die Sensitivität der Karzinomerkennung bei jüngeren Patienten mit einem PSA-Wert zu erhöhen, welcher bei einem älteren Mann (z.B. 70 Jahre) keinen Anlass zum Karzinomverdacht geben würde [35].

Alter (Jahre)	PSA- Grenzwert (ng/ml)
40 – 49	< 2,5
50 - 59	< 3,5
60 - 69	< 4,5
70 - 79	< 6,5
> 80	< 8,5

Tabelle 4 Altersabhängige Serum-PSA-Grenzwerte

Die PSA Werte unterhalb des Normbereichs schließen ein Prostatakarzinom nicht aus. Aufgrund der unterschiedlichen PSA-Assays sollten nur die PSA Werte untereinander verglichen werden, die mit dem gleichen Testsystem bestimmt worden sind.

Weitere Sonderformen in der PSA-Bestimmung sind PSA-„Density“ und -„Velocity“.

PSA-Density oder PSA-Dichte ist definiert als Quotient aus dem PSA-Serumspiegel und dem Prostatavolumen. Das Prostatavolumen wird durch transrektalen Ultraschall ermittelt.

Es wird angenommen, dass Karzinomgewebe eine vielfach höhere PSA-Menge als benignes Prostatagewebe gleichen Volumens produziert. Die Bestimmung der PSA-Dichte dient der besseren Differenzierung zwischen einer benignen Prostatahyperplasie und einem Prostatakarzinom. Werte über 0,15 ng/ml gelten als karzinomsuspekt. Durch die sehr hohe Variabilität der individuellen Prostatavolumenbestimmung erscheint dieser Wert sehr fragwürdig und übersieht in bis zu 50% der Fälle ein Prostatakarzinom [3].

Die PSA-Velocity oder Anstiegsgeschwindigkeit ist definiert als Anstieg des PSA-Serumwertes pro Zeiteinheit. Sie wird beschrieben als $0,5 \times (PSA2 - PSA1 / \text{Zeitpunkt 1 in Jahren} + PSA3 - PSA2 / \text{Zeitpunkt 2 in Jahren})$, wobei PSA1 die erste, PSA2 die zweite und PSA3 die dritte PSA Bestimmung sind. Erste und dritte Bestimmung sollten dabei mindestens 18 – 24 Monate auseinander liegen. Eine Anstiegsrate von mehr als 0,75 ng/ml pro Jahr sollte laut Carter [18] beweisend für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms sein. Durch die vielfachen Testverfahren für die PSA-Wertbestimmung im Serum erscheint dieser Wert nicht sinnvoll zu sein. Er wurde nur an einem kleinen Kollektiv ermittelt und ist in Anbetracht möglicher Inter- und Intraassayschwankungen, gerade im niedrigen Messbereich mit Schwankungen von bis 0,8 ng/ml, nicht eindeutig verwertbar.

Ebenso wie die molekularen Sonderformen (z.B. komplexiertes PSA und die Isoformen des fPSA) haben diese Parameter bisher keinen eindeutigen Stellenwert. Sie werden aber teilweise in der differenzierten PSA-Diagnostik als Hilfsindikatoren eingesetzt und sind noch in klinischer Erprobung.

Digital- rektale Untersuchung (DRU)

Die digital-rektale Untersuchung stellt ebenso die Grundlage der Früherkennung der Prostatakarzinome dar. Durch DRU werden Größe, Oberflächenbeschaffenheit, Konsistenz, Druckschmerz und Abgrenzbarkeit der Prostata beurteilt. Darüber hinaus werden der anale Sphinktertonus, die Rektumampulle und Veränderungen im Analkanal beurteilt. Ein Nachteil der Untersuchung ist die geringe Sensitivität und Spezifität.

Die Prostatakarzinomdetektionsrate beträgt bei asymptomatischen Männern über 50 Jahre durch alleinige DRU 1,0-3,2%, durch PSA 4,6% und durch die Kombination beider Methoden 5,8% [20].

Transrektaler Ultraschall (TRUS), 3D-TRUS

Beim TRUS werden biplanare Hochfrequenzsonden mit 5 - 7,5 MHz verwendet. TRUS ermöglicht neben Prostatavolumetrie und Darstellung des Sonographiemusters die Verlaufsüberwachung der laufenden Therapie. Echoarme, hypoperfundierte Läsionen gelten als suspekt.

Eine weitere Entwicklung des TRUS stellt ein 3D-TRUS dar. Mit dieser Untersuchung ist es möglich, die Prostata gleichzeitig in 3 Ebenen (Sagittal-, Transversal- und Koronarebene) zu analysieren.

In der transrektalen dreidimensionalen Sonographie ist es erstmals möglich, das zu untersuchende Areal gleichzeitig in 3 Schnittebenen zu analysieren. Dadurch kann eine sehr genaue Beurteilung der anatomischen Strukturen des kleinen Beckens und der Beckenbodenregion durchgeführt werden. Bei dieser Untersuchung wird der Transrektalultraschallkopf für 3-4 Sekunden eingeführt, und es erfolgt ein Volumenscan des zu untersuchten Gebiets. Nach dieser Zeit ist die Untersuchung für den Patienten abgeschlossen und somit weniger belastbar, als der 2D TRUS.

Eine größere Studie aus dem Jahre 2003 durch Strasser et al. an 107 Männern vor radikaler Prostatektomie ergab eine Sensitivität von 87% und Spezifität von 94% für die 3D-Sonographie. Der positive Vorhersagewert für eine Kapselüberschreitung lag bei 97%. 16 Männer hatten histologisch eine Samenblaseninfiltration, 14 Samenblaseninfiltrationen konnten durch die 3D-Sonographie nachgewiesen werden (Sensitivität 88%, Spezifität 98%, positiver Vorhersagewert 98%). Eine weitere Studie an 100 Patienten ergab im Vergleich zum 2D-TRUS bezüglich Prostatakarzinomdetektion eine Sensitivität von 88% vs. 72% und eine Spezifität von 42% vs. 54% [74].

Moderne Ultraschallentwicklungen wie Kontrastmittel-TRUS und Doppler-TRUS haben eine Sensitivität und Spezifität von ca. 80 bis 93 % [78].

Eine weitere Entwicklung der ultraschallgesteuerten Prostatakarzinomdiagnostik ist das Histoscanning. Die Methode des Histoscanning beruht auf einer nicht-invasiven computergestützten Analyse der mit herkömmlichem 2D-Ultraschall erstellten Ultraschallbefunde. Die Ultraschallbefunde wurden ohne Kenntnis der Histologie ermittelt. Diese Methode befindet sich noch in klinischer Erprobung [13].

Biopsie

Die Prostatabiopsie ist bei jedem Verdacht eines Prostatakarzinoms der Diagnose indiziert. Zur Entdeckung des Prostatakarzinoms hat sich die systematische transrektale ultraschallgesteuerte Biopsie der Prostata etabliert. Ende der 1980er Jahre definierte Hodge die systematische Sextanten-Biopsie als den ersten goldenen Standard für die frühe Entdeckung des Prostatakarzinoms. Dies bedeutete die systematische Entnahme von je drei Stanz-Zylindern von beiden Seitenlappen der Prostata in parasagittaler Mittellinie an verschiedenen Stellen (Apex, Mitte, und Basis) [67]. Die so genannte randomisierte Sechsfach-Biopsie kann heutzutage nicht mehr als „Goldstandard“ gelten.

In den letzten Jahren wurden Modifikationen der Sextantenbiopsie durch Erhöhung der Anzahl der Biopsien angewendet.

Einige Studien haben gezeigt, dass die Karzinomdetektionsrate bei 10- bis 12-facher Biopsie steigt [6, 72].

Heutzutage bleibt die transrektale, systematische, ultraschallgesteuerte Prostatabiopsie die Methode der Wahl zur Diagnostik des Prostatakarzinoms.

Eindeutige Indikationen zur Re-Biopsie sind die „High-Grade-PIN“ und die „Atypical Small Acinar Proliferation“ in der Erstbiopsie. In diesen Fällen zeigt sich in der wiederholten Biopsie in bis zu 50 % ein koinzidentelles Prostatakarzinom.

Knochenszintigraphie

Die Knochenszintigraphie ist ein Untersuchungsverfahren, welches die Knochenumbauprozesse erfasst und somit zur Erkennung der osteoplastischen Knochenmetastasen dient. Sie ist bei einem PSA Wert über 10 ng/ml indiziert.

Weitere bildgebende Verfahren wie Computertomographie des Abdomens, Magnetresonanztomographie, Kernspintomographie der Prostata mit Endorektalspule sind beim Nachweis eines Prostatakarzinoms optional.

Die Anwendung von Positronenemissions-Computertomographie (PET-CT) wird derzeit nur in Studien eingesetzt und ist noch nicht genügend validiert.

Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms erfolgt in Deutschland nach dem TNM Schema der UICC (Union internationale contre le cancer). In den USA wird zum Teil noch die Jewett-Klassifikation verwendet.

TNM 2002		Amer. System
	Primärtumor	
TX	Keine Beurteilung möglich	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	A0
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor	
T1a	Zufälliger histologischer Befund in 5% oder weniger des resezierten Gewebes	A1
T1b	Zufälliger histologischer Befund in mehr als 5% des entnommenen (resezierten) Gewebes	A2
T1c	Tumor durch Biopsie diagnostiziert	
T2	Tumor auf Prostata begrenzt	
T2a	Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappen oder weniger	B1
T2b	Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappen	B2
T2c	Tumor infiltriert in beide Lappen	B3
T3	Überschreitung der Organkapsel	
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung	C1 / C2
T3b	Samenblaseninfiltration	C2
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert benachbarte Strukturen	C3
	Metastasen	
NX	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar	
N0	Keine regionalen Lymphknoten befallen	
N1	Regionaler Lymphknotenbefall	D1
MX	Nicht beurteilbar	
M0	Keine Fernmetastasen	
M1	Fernmetastasen vorhanden	D2

Tabelle 5: TNM-Klassifikation der UICC und Amerikanisches System nach Whitmore-Jewett

1.3.7 Therapie

Die Therapie des Prostatakarzinoms orientiert sich am Tumorstadium, wobei sowohl der Allgemeinzustand des Patienten als auch sein biologisches Alter in die Entscheidung einfließen [45].

Der kurative Therapieansatz betrifft Patienten mit lokal begrenztem Karzinom im guten Allgemeinzustand und einer Lebenserwartung von mehr als zehn Jahren.

Wenn die Erkrankung bereits fortgeschritten ist, ist eine Therapie in kurativer Absicht in der Regel nicht mehr möglich. Hier verbleibt die Möglichkeit einer palliativen Therapie mit dem Ziel der Verbesserung der Lebensqualität und Verlangsamung des Tumorwachstums.

1.3.7.1 Lokal begrenztes Prostatakarzinom

In den letzten Jahren bieten sich zunehmend mehr Therapieoptionen des lokal begrenzten Prostatakarzinoms an.

Neben der radikalen Prostatektomie werden heutzutage die perkutane Strahlentherapie sowie die Brachytherapie angewendet.

Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines biochemischen Rezidivs (PSA-Rezidiv nach kurativer Therapie) bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom abzuschätzen, werden die Patienten in drei Risikogruppen nach D'Amico [24] unterteilt:

- *low risk*: T1c – T2a, PSA < 10 ng/ml, Gleason-Score < 7
- *intermediate risk*: T2b oder PSA 10 – 20 ng/ml, oder Gleason-Score 7
- *high risk*: T2c – T3a oder PSA > 20 ng/ml oder Gleason-Score 8 – 10

Die 5-Jahres-PSA-rezidivfreie-Überlebenszeit für die jeweiligen Gruppen beträgt:

- 85% für *low risk*
- 50% für *intermediate risk*
- 33% für *high risk*

Gemessen am PSA-rezidivfreien Überleben zeigen die möglichen Therapieverfahren wie Brachytherapie, perkutane Radiatio und radikale Prostatektomie bei den *low risk* Tumoren nahezu gleichwertige Ergebnisse. Die Radikaloperation zeigt bei den *intermediate* und *high risk* Erkrankungen bessere Ergebnisse.

Operative Verfahren

Die radikale retropubische Prostatovesikulektomie mit pelviner Lymphadenektomie ist das operative Standardverfahren bei klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom.

Bei *low risk* Patienten erscheint die Pelvine Lymphadenektomie nicht erforderlich [23].

Neben der radikalen retropubischen Prostatovesikulektomie werden perineale sowie laparoskopische Prostatektomien in erfahrenen Zentren mit gleich guten Ergebnissen durchgeführt.

Zu den wichtigen postoperativen Komplikationen gehören die erektile Dysfunktion (40 – 50% auch bei bilateraler Erektionsprotektion), die Harninkontinenz (5 – 10%), die Ausbildung von Lymphozelen (5 – 20%) und die Anastomosenstriktur (3 – 5%).

Therapieerfolg wird definiert durch fehlenden PSA Anstieg und Fehlen eines klinischen Progress. Je nach Patientenkollektiv liegen PSA-rezidivfreie Überlebensraten nach 5, 10 and 15 Jahren entsprechend bei 84%, 72% und 61% nach radikaler Prostatektomie [36].

Strahlentherapie

Zu Behandlung des Prostatakarzinoms werden derzeit zwei Routineverfahren angewendet:

- perkutane Radiatio
- Brachytherapie (interstitielle Strahlentherapie)

Das Ziel ist die Applikation der zytotoxischen Strahlendosen im Bereich der Prostata mit hoher Präzision und Verringerung der Strahlenbelastung in der Umgebungsorganen.

Der Vorteil der perkutanen Strahlentherapie liegt in der Vermeidung des Narkose- und Operationsrisikos bei multimorbiden Patienten. Das Fehlen des pathologischen Staging und damit verbundenen Prognoseparameter erwies sich als nachteilig.

Darüber hinaus ist der PSA-Abfall nach der Strahlentherapie nicht einheitlich zu bewerten.

Bei Therapieversagen kann eine lokale Sekundärtherapie in Form einer Salvage-Prostatektomie durchgeführt werden.

Brachytherapie

Bei der ***permanenten Seed-Implantation***, auch ***low dose rate (LDR)***- Therapie genannt, werden wenige Millimeter große niedrigenergetische radioaktive ¹²⁵Iod- oder ¹⁰³Palladium-Partikel (Seeds) in die Prostata platziert und dort auf Dauer belassen.

Bei der ***high dose rate (HDR) - Brachytherapie*** im Afterloadingverfahren werden nicht dauerhaft, sondern temporär die Hohlnadeln in die Prostata eingeführt, in die dann eine ¹⁹²Iridium-Quelle positioniert wird, welche für die Prostatabestrahlung sorgt. Nach der Behandlung werden die Nadeln in Vollnarkose entfernt.

Obwohl die permanente Brachytherapie eine kurze Behandlungszeit beinhaltet und gering invasiv ist, ist sie mit dem Risiko der erektilen Dysfunktion und der Harnröhrenstriktur verbunden.

Unter Berücksichtigung der Einschlusskriterien (Prostatavolumen ≤ 50 ml, Restharn < 50 ml, PSA < 10 ng/ml, Gleason-Score ≤ 7 , nur mittelgradige Miktionsbeschwerden,) kann die Seed-Implantation nur beim lokal begrenzten *low risk* Prostatakarzinom als Therapiealternative angesehen werden.

Perkutane Bestrahlung der Prostata

Technologische Fortschritte im Laufe der letzten 20 Jahre haben die Präzision der perkutanen Bestrahlung erhöht, so dass die Therapieergebnisse verbessert wurden. Die dreidimensionale konformale Bestrahlung (3D-CRT) reduziert die dosislimitierte Toxizität und erlaubt die Erhöhung der Zieldosis bis zu 78 Gray. Die Intensitätsmodulierende Strahlentherapie (IMRT-intensity modulated radiotherapy) erreicht die Reduktion der Rektumnebenwirkungen, wenn die Zieldosis auf mehr als 80 Gray erhöht wird [58]. Stellt die Prostata ein Abflußhindernis beim Wasserlassen dar, ist die Brachytherapie kontraindiziert, eine perkutane Bestrahlung erscheint jedoch möglich [32]. Die begleitende Androgenblockade zur herkömmlichen Strahlentherapie hat einen Einfluss auf das Überleben. Eine neoadjuvante Hormontherapie verursacht die Zytoreduktion des Prostatakarzinoms, erlaubt eine Reduktion des Strahlentherapie-Zielvolumens und hat einen additiven Effekt auf die Zelltötung. Durch die adjuvante Langzeitandrogenblockade wird auch das Gesamtüberleben in fortgeschrittenen Tumoren verbessert [58].

Die 5-Jahres-PSA-rezidivfreien-Überlebensraten bei der perkutanen Bestrahlung betragen:

- *low risk* Tumore: 75 – 85%
- *intermediate risk* Tumore: 65%
- *high risk* Tumore: 35%

Watchful waiting und active surveillance

Watchful waiting bedeutet ein „abwartendes Verhalten“. Darunter ist eine Therapieoption, bei der meist eine Hormontherapie eingeleitet wird wenn es zum signifikanten Tumorprogress kommt. Dabei spielt das Alter des Patienten eine entscheidende Rolle für die Prognose. Dieses Verfahren ist für die Patienten mit weniger als 10 Jahren Lebenserwartung geeignet.

Active surveillance bedeutet dagegen eine Hinauszögerung der kurativen Therapie bei Patienten mit einem wenig oder nicht aggressiven Tumor bis zum Zeitpunkt, an dem sich die Tumorbilogie oder der Wunsch des Patienten nach einer Therapie ändert. Die Patienten werden umfassend aufgeklärt und anschließend konsequent und engmaschig einer klinischen Kontrolle unterzogen. Die Einleitung der kurativen Therapie erfolgt bei PSA-Progredienz gemessen an der PSA-Verdopplungszeit und einer Verschlechterung des Gleason-Scores bei der geplanten Rebiopsie nach 12-18 Monaten. Als häufigste sekundäre Behandlung wird dann die radikale Prostatektomie gewählt (48 %) [17].

1.3.7.2 Lokal fortgeschrittenes Karzinom

Die klinische Definition des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms besagt, dass der Tumor die Prostatakapsel überschritten hat, aber noch keine Fernmetastasen erkennbar sind [103]. Folgende Optionen stehen bei Behandlung des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zur Verfügung:

- radikale Prostatektomie
- externe Bestrahlung
- Hormontherapie

Radikale Prostatektomie

Bei klinischen T3-Tumoren liegt in 30% der Fälle eine Lymphknotenmetastasierung vor. Bei einer Durchführung der radikalen Prostatektomie in kurativer Absicht liegen die Langzeitüberlebensraten bei pN0 Karzinomen bei 60%. Bei Lymphknotenfilialisierung sind die postoperativen Langzeitüberlebensraten vom Erfolg einer Hormontherapie abhängig.

Strahlentherapie

Die Patienten mit klinischer Metastasenfreiheit und mit lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen sind potentielle Kandidaten für eine perkutane Strahlentherapie.

Hormontherapie des Prostatakarzinoms

Die Prostata ist ein Organ, welches unter hormonellem Einfluss steht. Hormone regeln die Zelldifferenzierung und das Wachstum sowohl bei gesunden Zellen als auch bei Tumorzellen.

Antihormonelle Therapien werden mit dem Ziel eingesetzt, die proliferationsfördernde Wirkung der Geschlechtshormone zu unterdrücken.

Seitdem Huggins und Hodges 1941 demonstriert haben, dass Prostatakarzinome androgenabhängig sind, wurde die Androgenablation zur Therapie der Wahl bei Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom der Prostata [77].

Zu den Hormonen, die den Regulationsmechanismus der Androgensynthese beeinflussen und für die Therapie des Prostatakarzinoms relevant sind, zählen Peptidhormone und Steroide. *Peptidhormone* werden im Hypothalamus und in der Hypophyse gebildet

Hormone hypothalamischen Ursprungs:

- Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) : wird im Hypothalamus gebildet und stimuliert die Synthese und Freisetzung von LH und FSH im Hypophysenvorderlappen
- Corticotropin-releasing Hormone (CRH): wird ebenfalls im Hypothalamus gebildet und stimuliert die Synthese und Freisetzung des ACTH im Hypophysenvorderlappen

Hormone hypophysären Ursprungs

Sie werden in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet:

<i>Follikelstimulierendes Hormon (FSH):</i>	bindet an Rezeptoren der Sertoli-Zellen in den Tubuli seminiferi der Hoden und fördert dort die Produktion verschiedener Peptide, unter anderem von Androgen-bindendem Protein (ABP), die für den Transport und Aufrechterhaltung ausreichender Testosteronkonzentration in den Tubuli seminiferi verantwortlich ist. Außerdem wird durch FSH die Spermatogenese über Sertolli-Zellen stimuliert.
<i>luteinisierendes Hormon (LH):</i>	bindet an Rezeptoren der Leydig-Zellen des Hodens und stimuliert dort die Produktion von Testosteron
<i>Adrenocorticotropes Hormon (ACTH):</i>	bindet an Rezeptoren auf der Zellmembran der Nebennierenrinde und stimuliert unter anderem die Synthese der Androgene Androstendion und Dehydroepiandrosteron

Tabelle 6: Hormone hypophysären Ursprung

Steroidhormone: Testosteron

Testosteron ist das wichtigste Androgen. Es bildet einen Komplex mit den in der Prostatazellmembran befindlichen Androgenrezeptoren. Dieser Komplex wird in die Zelle aufgenommen. Hier entsteht unter Einwirkung des Enzyms 5- α -Reduktase das biologisch wirksame Dihydrotestosteron (DHT). DHT bindet an den cytoplasmatischen Rezeptor (CR) und wird zum DHT-CR-Komplex. Durch Transformation erfolgt die Überführung von DHT an den nuklären Rezeptor (NR). Der DHT-NR-Komplex wird in den Zellkern aufgenommen, fördert dort die DNS-Synthese und regt dadurch das Tumorwachstum stark an.

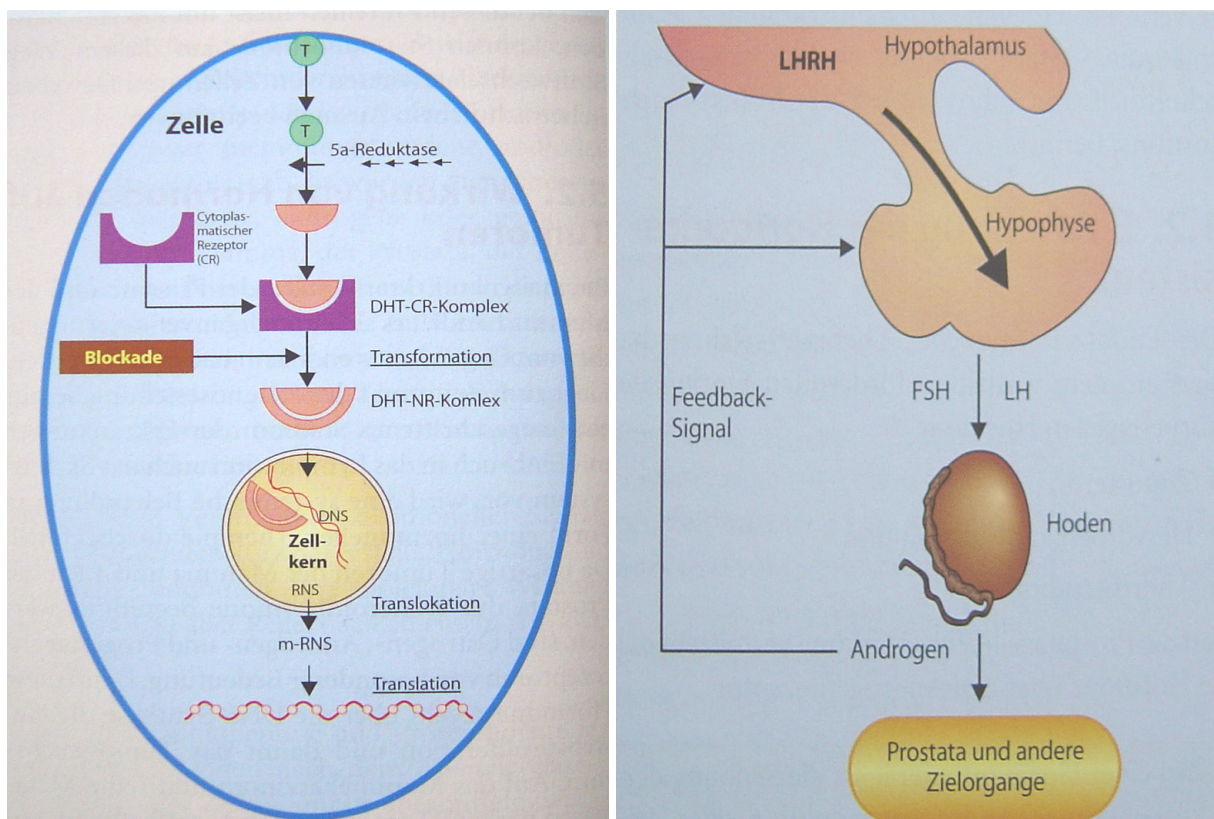


Abbildung 3: Blockade der Androgen-Rezeptor-Interaktion (links)

Abbildung 4: Hypothalamus-Hypophysen-Achse beim Mann [104]

Formen der Hormontherapie

Bei der Androgendeprivation unterscheidet man zwischen einfacher und maximaler Androgenblockade.

Die einfache Androgenblockade kann sowohl durch Orchiectomie als auch durch medikamentöse Kastration erreicht werden.

Die medikamentöse Behandlung kann auf einem von 3 Prinzipien beruhen:

- Beeinflussung der Produktion von Geschlechtshormonen durch LHRH Analoga (GnRH Agonisten) z.B. Buserelin, Goserelin, Leuprorelin.
- Blockierung von Hormonrezeptoren durch Antagonisten (Antiandrogene) , z.B. durch steroidale (Cyproteronacetat) und nichtsteroidale Antiandrogene (Bicalutamid, Flutamid)
- Störung der Wirkung körpereigener Hormone durch Gabe gegengeschlechtlicher Hormone (Östrogene bei männlichen Patienten), z.B. Dihydrostilbestrol. Diese Therapieform ist wegen ausgeprägter kardiovaskulärer Nebenwirkungen weitgehend obsolet.

Die maximale Androgenblockade (MAB) ist die Kombination aus der medikamentösen bzw. chirurgischen Kastration und der zusätzlichen Blockade der Androgenrezeptoren durch zum Beispiel Bicalutamid.

Bei ca. 80% der Patienten tritt nach Androgenentzug eine symptomatische und objektive Besserung ein; die PSA-Konzentration im Serum nimmt ab. Bei Patienten mit Prostatakarzinom und Knochenfiliae führt der Androgenentzug zu einem progressionsfreien Überleben von 12-33 Monaten bzw. einem Gesamtüberleben von 23-37 Monaten. Nach durchschnittlich 24 Monaten kommt es erneut zu einem PSA Anstieg [38].

Das metastasierte Prostatakarzinom wird bezüglich der therapeutischen Optionen in 3 Erkrankungsstadien klassifiziert [37]:

1. androgenabhängiges Stadium: jegliche Form der medikamentösen oder chirurgischen Androgendeprivation (AD) bedingt den PSA-Abfall
2. androgenunabhängiges, hormonsensitives Stadium: kein Ansprechen mehr auf primäre AD, aber auf eine sekundäre Hormontherapie wie Entzug steroidaler Antiandrogene, Östrogene, Ketokonazol, Glukokortikosteroide.
3. androgenunabhängiges und hormoninsensitives Stadium: kein Ansprechen mehr auf primäre oder sekundäre hormonelle Manipulation.

1.3.7.3 Hormonrefraktäres Prostatakarzinom

Ein hormonrefraktäres Prostatakarzinom wird definiert durch einen konsekutiven PSA Anstieg, der im Abstand von 2 Wochen 3-malig nachgewiesen wird, nach primärer und sekundärer Hormontherapie sowie Serumtestosteronwerten im Kastrationsbereich [15].

Darüber hinaus kommt es zur Progression von Knochen- und Weichteilmetastasen. Die mittlere Überlebenszeit beträgt dann meist weniger als 12 Monate. Die Lebensqualität kann aufgrund der zu diesem Zeitpunkt meist vorhandenen Knochenfilialisierung mit den daraus resultierenden Komplikationen wie Schmerzen, pathologischen Frakturen, Rückenmarkskompressionen und Tumoranämie stark eingeschränkt sein [38]. Für diese Patienten existiert zurzeit keine kurative Therapie. Das Hauptziel der Behandlung ist die Metastasenreduktion, Schmerzlinderung und Verbesserung der Lebensqualität.

Bereits seit circa 30 Jahren werden zytostatische Chemotherapien beim Prostatakarzinom eingesetzt. Diese Therapien galten lange Zeit als wenig wirksam, die Ergebnisse waren unbefriedigend und zeigten nur geringe Ansprechraten. Bei der Auswertung der 26 klinischen Studien (1987-1991) wurde eine Gesamtansprechrates von 8,7 % gefunden [105].

Die Daten der beiden prospektiv randomisierten Phase-III Studien TAX 327 [96] und SWOG 9916 [69] konnten erstmals den Überlebensvorteil bei Patienten unter Chemotherapie nachweisen. Patienten, behandelt mit Docetaxel und Estramustin oder Docetaxel alleine hatten im Vergleich zur Behandlungsgruppe unter Mitoxantron und Prednison ein Überlebensvorteil von ca. 2 Monaten. (Medianes Gesamtüberleben 18 versus 16 Monate).

Seit Oktober 2005 ist Docetaxel als first-line Chemotherapie zur Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms zugelassen.

Die Erprobung innovativer Therapieansätze und Entwicklung neuer Therapiestrategien beim HRPK stellen heute eine Herausforderung an die Forschung. Zurzeit ist die Kombination aus verschiedenen Substanzen der Gegenstand vieler Studien. Die zunehmenden molekularbiologischen Kenntnisse ermöglichen den Ansatz zu neuen Therapieformen.

Durch Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Signaltransduktionskaskaden wird versucht die in die Tumorproliferation, Progression und Metastasierung involvierte molekulare Abläufe zu beeinflussen.

Die Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) sind eine neue Gruppe von Substanzen, die bei der Behandlung der malignen Erkrankungen genutzt werden. Zurzeit sind drei Substanzen zugelassen: Gefitinib und Erlotinib für die Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) und Cetuximab für die Therapie des kolorektalen Karzinom [34].

Wachstumsfaktoren sind Substanzen, die mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche in Kontakt treten. Die EGFR-Familie gehört zum Typ Rezeptor-Tyrosinkinase und liegt an der Spitze der komplexen Signaltransduktionskaskade, die Zellproliferation, Zellwanderung, Überleben, Adhäsion und Differenzierung moduliert. Die abnorme Aktivität dieser Rezeptoren spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Wachstum der Tumorzellen. Zur Familie der EGFR gehören vier verschiedene Rezeptoren: EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 und HER4/ErbB-4 [106].

Diese Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären ligand-bindenden Domäne, einem transmembranen Teil und einer zytoplasmatischen Domäne mit Enzymaktivität der Tyrosinkinase.

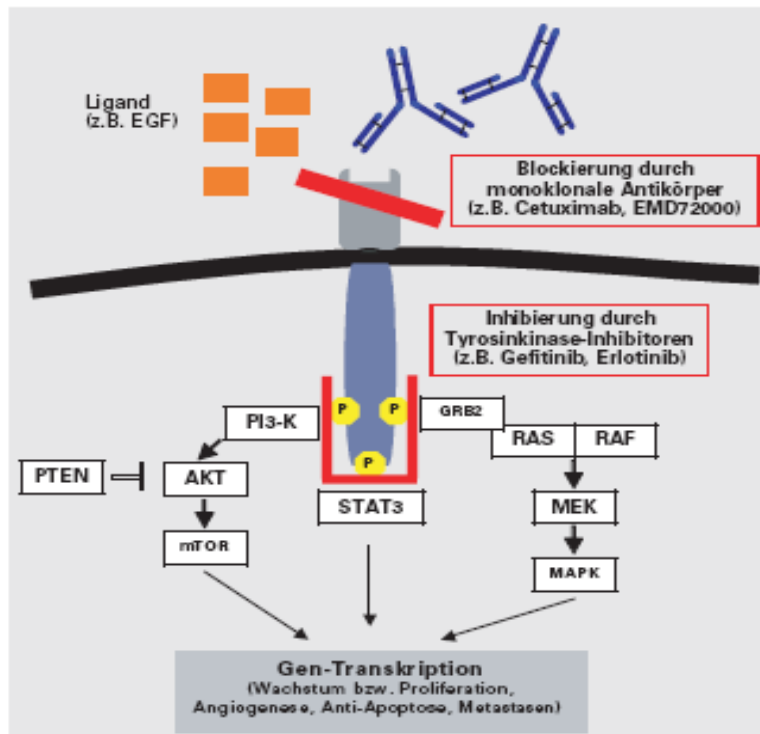


Abbildung 5: Hemmung von EGFR auf verschiedenen Ebenen [57]

Wachstumsfaktoren werden an die Rezeptoren an der Zelloberfläche gebunden. Dies führt zur Rezeptordimerisierung. Dieses aktivierte Dimer ist die Tyrosinkinase, ein Enzym, welches Phosphatgruppen an bestimmte Tyrosinreste überträgt, zuerst an sich selbst (Autophosphorylierung), dann an andere Proteine, die damit in ihre aktive Form umgewandelt werden. Viele von diesen Proteinen sind Tyrosinkinasen. Das menschliche Genom kodiert 90 verschiedene Tyrosinkinasen. Auf diese Weise erfolgt die Aktivierungskaskade im Zytosol.

Einige von diesen zytosolischen Tyrosinkinasen gelangen in den Zellkern, geben ihre Phosphatreste an die Transkriptionsfaktoren und beeinflussen somit direkt die Gentranskription. Andere agieren indirekt durch die Produktion von Second messengers [49].

In den letzten 20 Jahren wurde die EGFR-Expression in mehreren Tumorarten untersucht. EGFR wird in mehreren Tumorarten exprimiert bzw. überexprimiert unter anderem im Prostatakarzinom:

Tumor	EGFR- Expression (%)
Kopf- Hals Plattenepithelkarzinom	80-100
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)	40-100
Prostata	40-80
Magen	33-74
Mamma	14-91
Kolorektal	25-77
Pankreas	30-50
Ovar	35-70

Tabelle 7: EGFR Expression in soliden Tumoren [8]

Die Kenntnis von Mechanismen der Signaltransduktion des EGF-Rezeptors eröffnet die Möglichkeiten zur Verwendung neuer Chemotherapeutika, die speziell die EGFR Aktivität hemmen, wie z.B. der Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib.

Gefitinib ist ein hochselektiver Hemmer des EGF-Tyrosinkinase-Rezeptors. Er besetzt reversibel die ATP-Bindestelle und blockiert die EGFR-Autophosphorylierung in vielen Tumorzelllinien, die EGFR exprimieren und blockiert kompetitiv Liganden, die mit dem

EGF-Rezeptor agieren. Darüber hinaus ist er ein schwacher Inhibitor von anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen wie HER2 [11].

Gefitinib demonstrierte signifikante Wirksamkeit bei NSCLC, und ist für die Behandlung dieser refraktären Krankheit zugelassen. Phase-II-Studien mit der Kombination von Gefitinib und Platin beim NSCLC zeigten eine Verbesserung der krankheitsspezifischen Symptome. Die Ergebnisse von Phase-II-Studien der Kombination von Gefitinib mit Standardchemotherapie (5-Fluorouracil/Folinsäure mit Oxaliplatin beim kolorektalen Karzinom zeigten eine Ansprechrate von 75% im Vergleich zu 55% bei alleiniger Chemotherapie. Gefitinib in Kombination mit Flutamid bewirkt eine additive Wachstumshemmung im Prostatakarzinom [68].

1.4 Ziel der Untersuchung

Bei der Suche nach neuen Therapieansätzen für das HRPC ist das Interesse für eine so genannte "targeted cancer therapy" drastisch gestiegen. Der Begriff "targeted cancer therapy" betrifft die neue Generation von Substanzen, die spezielle molekulare Ziele angreifen, die Tumorwachstum und Progression beeinflussen und von normalen Zellen nicht überexprimiert werden [21]. Die besondere Aufmerksamkeit gilt Substanzen, die an der EGFR Interaktion beteiligt sind, wie zum Beispiel Gefitinib. Einige in vivo und in vitro durchgeführte Studien zeigen, dass die Kombination von Gefitinib mit anderen Medikamenten deren Wirkung verstärkt [48, 87].

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von Gefitinib sowohl als Einzelsubstanz als auch in Kombination mit Etoposid, Cyclophosphamid (CPM) sowie Docetaxel auf die Proliferation der Prostatakarzinom-Zelllinien PC3, DU 145 und LNCaP geprüft werden. Diese Substanzen alleine oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika bewirken in klinischen Studien einen signifikanten PSA-Abfall [104, 14].

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Für die Versuche wurden die Prostatakarzinomzelllinien DU 145 (ATCC HTB 81), LNCaP (ATCC CRL 1740 FCG-Clone) und PC3 (ATCC CRL 1435) verwendet. Diese wurden von der Firma CLS (Cell Line Service) Heidelberg erworben. Die Zellen für die eigenen Experimente wurden mit der Passagenummer 40 bis 60 verwendet.

2.1.1 DU 145

Die Zelllinie DU 145 wurde von Stone et al im Jahre 1978 aus einer Hirnmetastase eines 69-jährigen Patienten mit Prostatakarzinom isoliert. Es handelte sich dabei histologisch um ein undifferenziertes Adenokarzinom der Prostata mit epithelähnlicher Morphologie [92].

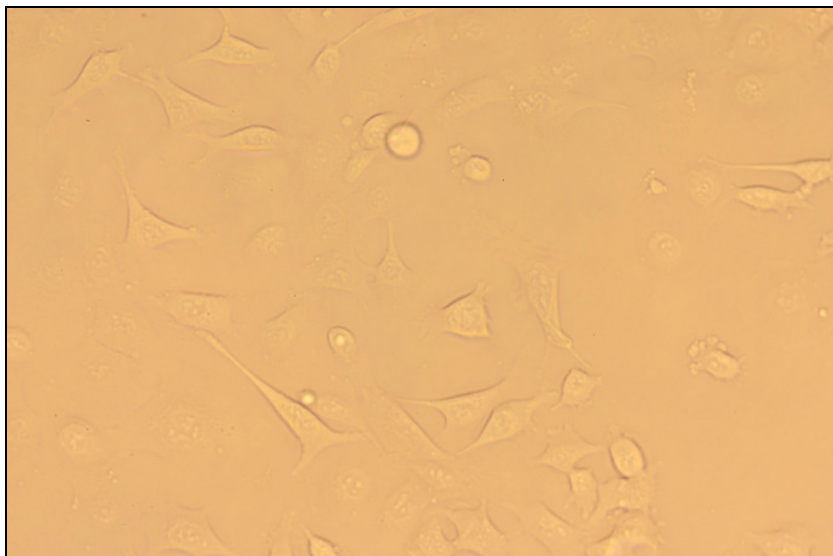


Abbildung 6: DU 145 bei 200-facher Vergrößerung

Sowohl im Nähragar als auch im Flüssigkeitsmedium sowie in der Nacktmaus zeigt die DU-145-Zelle ein optimales Wachstum. Regelrechte, vergleichbare Wachstumsverhältnisse sind unter Normalbedingungen im Allgemeinen bei über 90 Passagen vorhanden. Die Verdopplungszeit betrug bei optimalen Wachstumsbedingungen mit 20 % fetalem Kälberserum circa 34 Stunden bei Passage 39 [46].

Die bei der Passage 14, 57 und 90 erfolgten Karyotypanalysen ergaben einen hypotriploiden Chromosomensatz mit einem Durchschnitt von 64 Chromosomen (Passage 57) und einer Abweichung von 46 bis 143 Chromosomen.

Zur sicheren und eindeutigen Unterscheidung der Zelltypen voneinander werden Markerchromosomen im Karyogramm identifiziert. Für die Zelllinie DU 145 existieren als Marker drei lange, acrozentrische und ein metazentrisches Chromosom, welches als minute-marker bezeichnet wird. Das Y-Chromosom zeigt eine Translokation am langen Arm (Yq+).

DU 145 ist weder hormonsensitiv noch hormonabhängig und zeigt nur schwach positive Reaktion auf saure Phosphatase [93].

Die Ultrastruktur dieses Zelltyps im elektronenmikroskopischen Bild zeigt sehr irreguläre Zellen, die rund bis stark unförmig sind. Auf den Zelloberflächen zwischen den Zellen finden sich viele Mikrovilli. Daneben sind Tonofilamente, Desmosomen und viele leicht aufgetriebene Mitochondrien erkennbar. Ribosomen befinden sich vor allem im Zytoplasma und sind wenig strukturgebunden. Darüber hinaus findet sich ein gut entwickelter Golgiapparat und viele Vakuolen, Fettkörperchen sowie elektronendichte Einschlusskörperchen.

Das in-vitro-Gewebe unterscheidet sich quantitativ zum in vivo- Gewebe: die Dichte der Zellorganellen im in-vitro-Gewebe ist geringer [61].

2.1.2 LNCaP

Die Zelllinie LNCaP wurde erstmalig im Jahre 1980 von Horoszewicz et al beschrieben. Die Tumorzellen wurden im August 1977 aus einer links supra-claviculär gelegenen Lymphknotenmetastase eines mäßig differenzierten Adenocarcinoms der Prostata mittels Nadelbiopsie isoliert. Der Spender war ein fünfzigjähriger Mann, bei dem durch Feinnadelbiopsie der Prostata und retroperitoneale Lymphknotenexploration ein D1-Stadium des Prostatakarzinoms nach Flocks diagnostiziert wurde [41].

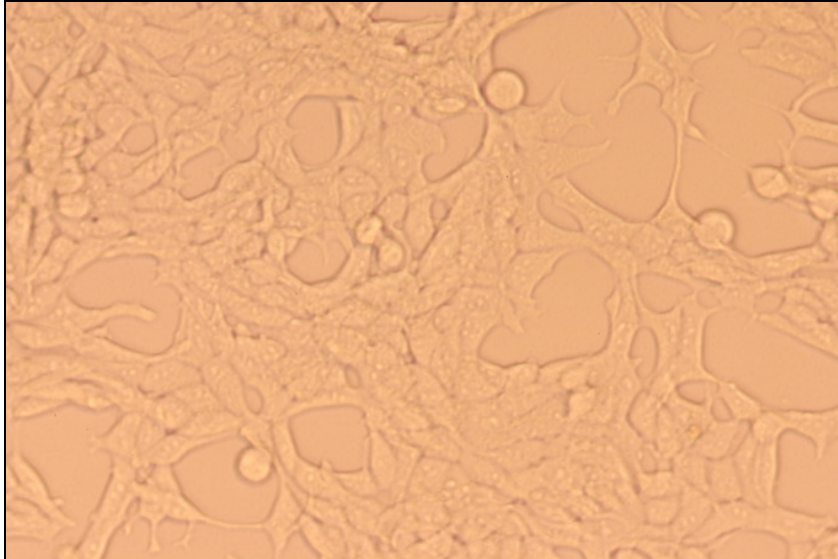


Abbildung 7: LNCaP bei 200-facher Vergrößerung

Sowohl in-vitro als auch in-vivo im Tierversuch zeigen die Zellen gute Wachstumseigenschaften. Es fällt jedoch auf, dass die Zellen ein geringes Anhaftungspotential am Boden aufweisen und unregelmäßig in der Monolayerkultur wachsen [41].

Die Zellen wurden im RPMI 1640-Medium (mit 1 mmol Glutamin, 50µg/ml Penicillin/Streptomycin) und 15% FKS (fetales Kälberserum) in Plastikfalschen angezüchtet. Dabei betrug die durchschnittliche Verdopplungszeit annähernd 72 Stunden. Das Konzentrationsoptimum liegt zwischen 2,5% und 15%. Dabei steigt die Proliferationsrate bei höheren Konzentrationen [41].

Bei den ersten genetischen Untersuchungen nach 12 und 32 Monaten, was in etwa Passage 100 bzw 300 entspricht, zeigte sich ein plumper, aneuploider männlicher Karyotyp mit einer Chromosomenzahl zwischen 33 und 91 (im Mitter 76 bis 91) bei 46 ausgezählten Metaphasen.

Darüberhinaus wurden einige persistierende Markerchromosome identifiziert wie m1 – lang, submetazentrisch, Ursprung unbekannt m4/m5 Translokation t (1;15) m6/m7 10q-, Defekt am langen Arm des Chromosoms 10.

Weitere Chromosomenabnormitäten mit geringer Frequenz sind zu finden [42].

Es sind sowohl Androgen- als auch Östrogenrezeptoren an den Zellen vorhanden, wobei die Androgenrezeptoren im Kern und im Zytosol und die Östrogenrezeptoren vorwiegend im Zytosol und nur sehr gering im Kern vorhanden sind.

Sowohl in-vitro als auch in-vivo in der Nacktmaus produziert die LNCaP Zelllinie kontinuierlich PSA sowie prostataspezifische saure Phosphatase (PAP) bis zu $300\mu\text{U/ml}/10^6$ [41]

Es gibt verschiedene Subkulturen von LNCaP-Zellen, die in Abhängigkeit von Kulturdauer, Selektionsbedingungen und Androgenkonzentration entstehen. Dabei haben sich von den ursprünglichen Zellen zwei große Hauptgruppen abgesondert, und zwar androgenabhängige und androgenunabhängige Subkulturen. Mit Hilfe der sekundären Markerchromosomen ist eine Unterscheidung der Subkulturen möglich. Alle hormonunabhängigen Chromosomen zeigen typische Veränderungen im Chromosom 8 wie 8p21, 8p23 [51].

2.1.3 PC 3

Das ursprüngliche Gewebe, aus dem die Zelllinie PC3 stammte, wurde von einem 62-jährigen Patienten mit einem schlecht differenzierten, metastasierten Adenokarzinom der Prostata im Jahre 1979 von Kaighn et al isoliert. Bei dem Gewebe handelte es sich um eine Knochenmetastase des Prostatakarzinoms in der Wirbelsäule. Diese Zelllinie zeigt epithelähnliche Morphologie und bildet traubenförmige Cluster. Sowohl in der Nährlösung als auch im flüssigen Medium sowie in der Nacktmaus zeigt PC3 positive Wachstumseigenschaften. Bei Verwendung von PFMR-1 Wachstumsmedium mit 7% fetalem Kälberserum (FKS) betrug die durchschnittliche Verdoppelungszeit bei Passage 8 eines Zellclones 33 Stunden [47].

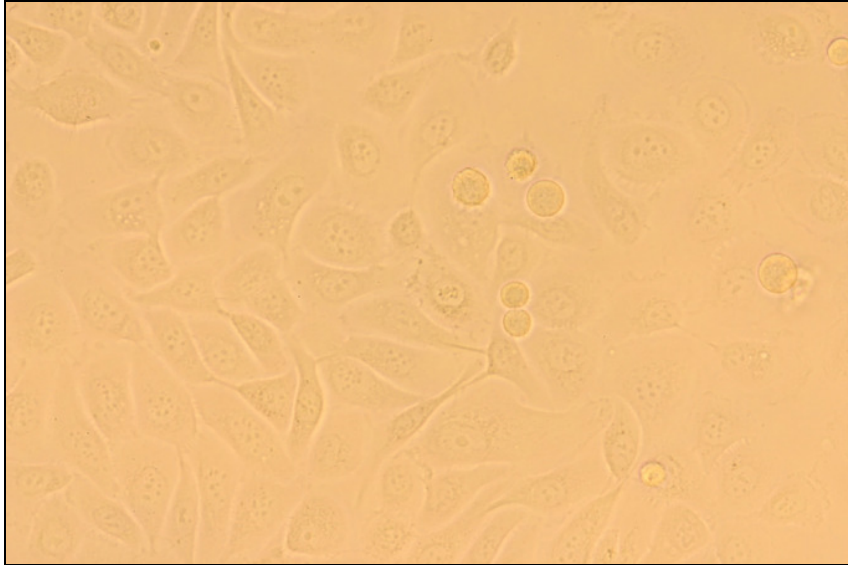


Abbildung 8: PC-3 bei 320-facher Vergrößerung

Die bei Passagen 5, 8, 17, 30 und 50 erfolgten Karyotypanalysen ergaben einen vollständig aneuploiden Karyotyp mit einer Chromosomenzahl von 55 bis 62.

Darüber hinaus konnten zwischen 10 und 20 Markerchromosomen identifiziert werden. Es fehlt jedoch ein Y-Chromosom, sowie die Chromosomen 5 und 15 [47].

Die Zellen wachsen hormonunabhängig, zeigen jedoch eine geringe Enzymaktivität der prostataspezifischen sauren Phosphatase [47].

Im elektronenmikroskopischen Bild zeigen PC3 Zellen zahlreiche Mikrovilli an der Oberfläche sowie einige Desmosomen, gelappte Zellkerne und hypertrophierte Nucleoli. Im Zellkörper sind abnorme Mitochondrien, zahlreiche Fettgranula und Lysosomen auffällig.

2.2 Materialien

2.2.1 Kulturmedien und Reagenzien

Sowohl in-vivo als auch in-vitro benötigen Zellen für ihre Proliferation und Differenzierung sowie für die Entfaltung ihrer spezifischen Zellfunktionen eine geeignete Umgebung. Um ein Fließgleichgewicht des Stoffwechsels zu erhalten, müssen essentielle, nicht selbst synthetisierbare Substanzen zugeführt werden und die Abbauprodukte eliminiert bzw. über

einen gewissen Zeitraum abgepuffert werden. Darüber hinaus werden Antibiotika zum Schutz vor Infektion bzw. Kontamination zugesetzt.

Medien

Für sämtliche Experimente wurde RPMI Medium 1640 (mit 2,0 g/l NaHCO₃; 0,532 g/l stabiles Glutamin; 0,5 ml 0,5%ige Phenolrotlösung), Kat. Nr. FG1215 (Biochrom AG, Berlin) verwendet.

Das Medium zur Anzucht beinhaltet folgende Komponenten:

- 500 ml RPMI 1640 Medium
- 5ml NEAS (Nichtessentielle Aminosäuren) Kat. Nr. K0293 (Biochrom AG, Berlin)
- 50 ml FKS Kat. Nr.50115 (Biochrom AG, Berlin) (Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert bei 56° C für 20 min), entspricht 10%FKS
- 5 ml ABM (Antibiotic Antimycotic Solution), Kat Nr. A5955 (Sigma Steinheim, Deutschland)

Das Medium für Experimente enthält 25 ml FKS in 500 ml RPMI 1640 Medium (5% FKS) und kein ABM, damit die Ergebnisse durch die Interaktion zwischen Tumorzellen und Antibiotika nicht verfälscht werden.

Bei der PC-3 Zelllinie wurde sowohl dem Zuchtmedium als auch dem Medium für Experimente zusätzlich 5 ml einer 100 mM Natriumpyruvat-Lösung (Kat. Nr. L0473, Biochrom AG Berlin) in 500 ml RPMI 1640 hinzugefügt.

PBS

Beim Passagieren der Zellen wurde PBS verwendet. PBS ist eine phosphatgepufferte Salzlösung mit einem pH-Wert von 7,2-7,4, hergestellt aus: 8 g NaCl; 0,2 g KH₂PO₄; 1,15 g Na₂HPO₄; 0,2 g KCl und 1 l Aqua dest.

Trypsin-EDTA

Zur Ablösung der Zellen wurde eine Trypsinlösung (Trypsin/EDTALösung 0,05%/0,02% in PBS gelöst, Kat. Nr. L2142, Biochrom AG, Berlin) verwendet.

XTT-Lösung

Für die photometrische Messung der Zellproliferation wurde eine Lösung aus XTT (Tetrazolium Salz) und PMS (Phenazine Methosulfate) verwendet:

- XTT(Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt,) Sigma Best. Nr.: X-4626) aufgelöst in RPMI 1640 Medium; Endkonzentration 1 mg/ml
- PMS (Phenazine Methosulfate, Best. Nr. P-5812, Sigma Chemicals Co St. Louis, USA), 0,383 mg/ml PBS

Für die Messungen wurde eine Lösung hergestellt, bestehend aus 100 µl PMS gelöst in 5ml XTT. Sowohl XTT als auch PMS werde bei -20 °C tiefgefroren aufbewahrt (siehe auch 2.4.3)

2.2.2 Arbeitsmittel

Aufgrund der spezifischen Kultureigenschaften der Zellen und somit verbundenen unterschiedlichen Proliferation ist die Auswahl der Kulturtechnik und der verwendeten Gefäße von großer Wichtigkeit. Zur Vermeidung der Kontamination mit z.B. Reinigungsmitteln, Rückständen usw. wurden ausschließlich Einmalmaterialien aus Glas oder Hartplastik verwendet.

Daher wurden zur Anzucht der Zellen Kulturflaschen aus Kunststoff der Firma Greiner verwendet (50ml/25cm², Best. Nr. 690175), die für adhäsive Kulturen speziell vorbehandelt wurden.

Proliferationstests wurden in Gewebekulturplatten (96well) (Greiner Nr. 655180) durchgeführt.

Die Zellkultivierung in den Kulturflaschen und Gewebekulturplatten erfolgte in einem Begasungsbrutschrank der Firma Heraeus, Typ B5061 EC/CO₂. Hier wird bei 37° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% CO₂ 5% zugemischt. Die CO₂-Zumischung zusammen mit dem Hydrogencarbonat-Puffersystem des Mediums dient der Erhaltung des pH-Wertes. Das Verdampfen des Mediums wird durch die hohe Luftfeuchtigkeit verhindert.

2.2.3 Verwendete Zytostatika

Zur Herstellung der Zytostatika-Stammlösungen und deren Verdünnung wurde DMSO verwendet. (Dimethylsulfoxid Kat. Nr. 1.02931.1000, Firma Merck Darmstadt)

Gefitinib

Gefitinib gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitoren und entfaltet seine Wirkung durch Blockade des EGF- Rezeptors.

Gefitinib wurde für die Experimente freundlicherweise von der Firma Astra-Zeneca unter dem Namen ZD 1839 zur Verfügung gestellt. Gefitinib ist auch unter dem Handelsnamen „Iressa“ bekannt. Aus ZD 1839 wurde eine Stammlösung 10mM in DMSO (4, 47 mg/ml) hergestellt und bei minus 20°C aufbewahrt.

Für die Herstellung der Testkonzentrationen (Verdünnungsreihen) wurde die Stammlösung vor den jeweiligen Versuchen auf Zimmertemperatur erwärmt und mit RPMI 1640 Medium verdünnt.

Chemische Eigenschaften von Gefitinib / Iressa / ZD 1839
Chemische Bezeichnung: 4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-7-methoxy-6-(3-morpholinopropoxy) quinazoline
Summenformel: C ₂₂ H ₂₄ ClFN ₄ O ₃
Molekulare Masse : 446,9

Tabelle 8: Chemische Eigenschaften von Gefitinib / Iressa / ZD 1839

Etoposid

Etoposid ist ein mit glykosidisch angeknüpften Substituenten versehenes Derivat von Podophyllotoin. Dieses stammt aus der Alraune (*Podophyllum peltatum*) und ist ein Mitosehemmstoff. Die zytostatische Wirkung von Etoposid beruht auf einer Hemmung der Topoisomerase II, welche beide DNS-Stränge spaltet, umlagert und wieder verschließt. Etoposid induziert DNS-Doppelstrangbrüche und es kommt zu einem Mitosearrest in der G₂-, S- und M-Phase.

Etoposid wurde für die Experimente käuflich von der FA. Sigma (Kat. Nr. E1383) erworben. Aus Etoposid wurde eine Stammlösung von 50 mM in DMSO hergestellt und bei minus 20° C aufbewahrt.

Für die Herstellung der Testkonzentrationen (Verdünnungsreihen) wurde die Stammlösung vor den jeweiligen Versuchen auf Zimmertemperatur erwärmt und mit RPMI 1640 Medium verdünnt, um jeweils einzelne Konzentrationen herzustellen.

Chemische Eigenschaften von Etoposid
Chemische Bezeichnung: 4'-Desmethylepipodophyllotoxin 9-4,6-Oethylidene-β-D-glucopyranoside
Summenformel: C ₂₉ H ₃₂ O ₁₃
Molekulare Masse : 588,6

Tabelle 9: Chemische Eigenschaften von Etoposid

Cyclophosphamid (CPM)

Cyclophosphamid gehört zu alkylierenden Substanzen. Diese sind chemisch labile Verbindungen und übertragen Alkyl-Reste auf körpereigene Strukturen. Es führt zur DNS- und RNS-Alkylierung, zu DNS-Strangbrüchen und zu einer Hemmung der DNS-Synthese. Am stärksten wirkt CPM in der S-Phase.

Cyclophosphamid für die Experimente wurde freundlicherweise von der Firma Baxter Oncology zur Verfügung gestellt. Aus Cyclophosphamid wurde eine Stammlösung von 10 mM in RPMI hergestellt und bei minus 20° C aufbewahrt.

Für die Herstellung der Testkonzentrationen (Verdünnungsreihen) wurde die Stammlösung vor den jeweiligen Versuchen auf Zimmertemperatur erwärmt und mit RPMI 1640 Medium verdünnt, um jeweils einzelne Konzentrationen herzustellen.

Chemische Eigenschaften von Cyclophosphamid
Chemische Bezeichnung: 2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-1,3,2-oxaphosphinan-2-oxid.
Summenformel: C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₄ P
Molekulare Masse : 293,1

Tabelle 10: Chemische Eigenschaften von Cyclophosphamid

Docetaxel

Docetaxel ist ein komplex aufgebauter Inhaltsstoff der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus baccata*).

Es beschleunigt die Polymerisation von Tubulus-Dimeren zu Mikrotubuli und blockiert dann deren Depolymerisation. Die Änderung des Gleichgewichts im Mikrotubulussystem führt zur Zerstörung des Spindelapparats und somit zur Störung der Zellteilung, sowie anderer vitaler Zellfunktionen, was letztendlich zum Zelltod führt.

Docetaxel wurde für die Experimente freundlicherweise von der Firma Aventis zur Verfügung gestellt. Aus Docetaxel wurde eine Stammlösung von 5 mg/ml (6,2 mM) in RPMI 1640 hergestellt und bei minus 20° C aufbewahrt.

Für die Herstellung der Testkonzentrationen (Verdünnungsreihen) wurde die Stammlösung vor den jeweiligen Versuchen auf Zimmertemperatur erwärmt und mit RPMI 1640 Medium verdünnt, um jeweils einzelne Konzentrationen herzustellen

Chemische Eigenschaften von Docetaxel
Chemische Bezeichnung: Docetaxel
Summenformel: C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄ / 3 H ₂ O
Molekulare Masse : 807,9

Tabelle 11: Chemische Eigenschaften von Docetaxel / Taxotere

2.3 Handhabung und Subkultivierung der Zellen

Bei der Zellkultivierung muss grundsätzlich die Art der verwendeten Zellen bezüglich Ihrer Herkunft definiert werden.

Als primäre Zelllinien werden ad definitionem Direktabkömmlinge von Organen oder Geweben des Spenderorganismus bezeichnet. Diese werden solange als Primärkulturen bezeichnet, bis sie nach der ersten Subkultur in eine Zelllinie übergehen. An die bestehenden Zelllinien werden Anforderungen gestellt, dass sie nach Primärisolierung noch mindestens 70 Passagen zulassen.

Eine vorherige Eignungsprüfung der gewählten Zelllinie für den geplanten Versuch, die Auswahl des geeigneten Kulturverfahrens sowie aller entsprechenden Einrichtungen ermöglicht die optimale Arbeit mit den Zelllinien.

Dies beinhaltet die Verwendung einer Reinluftraumwerkbank mit vertikalem Luftstrom (Lamin Air HB 2448 der Firma Heraeus) und einer Arbeitstechnik, welche den Anforderungen der Sterilität genügt, um eine mögliche Kontamination auszuschließen.

Dazu gehören auch folgende Maßnahmen: Reinigung der Arbeitsfläche vor und nach Benutzung mit Ethanol (70%), das Abflammen der verschiedenen Pipettenspitzen, Flaschenöffnungen- und verschlüsse sowie die Verwendung vom sterilem Einmalgerät.

2.3.1 Passagieren und Anzucht

Für alle Experimente wurden keine Primärkulturen verwendet, sondern eingefrorene und wiederaufgetaute oder in Kulturflaschen übernommene Subkulturen.

Wenn die Zelldichte eine gewisse Zahl übersteigt, sinkt die Proliferationsrate, was zum Absterben der Kultur führen kann. Daher wurden Zellen, die Ihre maximale Dichte erreicht haben durch Passagieren verdünnt.

Die praktizierte Methode, adhärente Zellen zu lösen, war die Behandlung mit Trypsinlösung. Dabei wurde unter sterilen Bedingungen in der Reinluftraumwerkbank das alte Medium mit der Pasteurpipette abgesaugt, und 10 ml PBS Lösung vorsichtig einpipettiert, um FKS-haltiges Medium vollständig zu entfernen (FKS hemmt die Trypsinwirkung). PBS Lösung und Rückstände werden abgesaugt, so dass nur die adhärenen Zellen in der Kulturflasche

verbleiben. Durch Zugabe von 2ml Trypsinlösung und Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 10 Minuten werden die Zellen abgelöst. Die Ablösung der Zellen wird unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 135) kontrolliert. Nach erfolgter Ablösung wird eine zur Trypsinlösung äquivalente Menge frischen Mediums (5ml) zur Neutralisation einpipettiert. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (5 min. bei 250 g. Rotina 48, Typ 4360, Firma Hettich, Tuttlingen), und anschließend wird der Überstand abgesaugt. Die Zellen werden in 10 ml frisches Medium resuspendiert, und nach Anfärbung mit Trypanblaulösung in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Anschließend wird eine definierte Zellzahl in die Kulturflasche mit ca. 5 ml Medium einpipettiert und die Kulturflasche im Brutschrank inkubiert.

2.3.2 Medienwechsel

Um das Zellwachstum zu fördern und die Zellvitalität zu erhalten ist es notwendig, einen Mediumwechsel in gewissen regelmäßigen Abständen durchzuführen.

Die Wechselabstände sind von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und deren Metabolisierungsrate abhängig und somit zelllinien-spezifisch.

Nach vorheriger Inspektion unter Lichtmikroskop wurde das Medium in den Anzuchtgefäßen alle 72 Stunden gewechselt. Das alte Medium wurde mit der Pasteurpipette abgesaugt, dabei wurde die adhärente Zellkultur nicht berührt. Eine volumenäquivalente Menge des frischen Mediums wurde einpipettiert.

2.3.3 Lagerung und Konservierung

Um der Variabilität der Zellen durch die Subkultivierung insbesondere bei längeren Versuchsreihen entgegenzuwirken und gleichzeitig einen gewissen Vorrat an Zellmaterial zu halten, werden Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196° kryokonserviert. Um die Zellen vor der Zerstörung durch die Kälte zu schützen wird FKS und DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet. Dabei werden nach dem Passagieren 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen in 1ml einer Lösung aus 0,25 ml DMSO, 0,8 ml FKS, und 0,2 ml RPMI 1640 Medium gelöst und zunächst 24 Stunden bei - 80°C aufbewahrt, um eine langsame Temperaturadaptation zu ermöglichen. Anschließend wird die Suspension bei -196°C im flüssigen Stickstoff kryokonserviert.

2.3.4 Mykoplasmenkontrolle

Alle Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Kontamination mit Mykoplasmen getestet, und alle Tests waren im Zeitraum der Versuche negativ. Für die Mykoplasmenkontrolle wurde Mykoplasmen Detection Kit verwendet. (Best. Nr. 1296744, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

2.4 Testverfahren

2.4.1 Testvorbereitung und Durchführung

Um den reibungslosen Ablauf der Experimente zu gewährleisten ist es notwendig bereits vor Versuchsbeginn alle benötigten Materialien bereitzustellen.

Die Dauer der Versuche beträgt pro Versuch 144 Stunden. Dabei wird die Aussaat der Zellen als Stunde 0 definiert. Die zytostatische Zugabe erfolgt nach 24 Stunden und die Messung nach weiteren 120 Stunden.

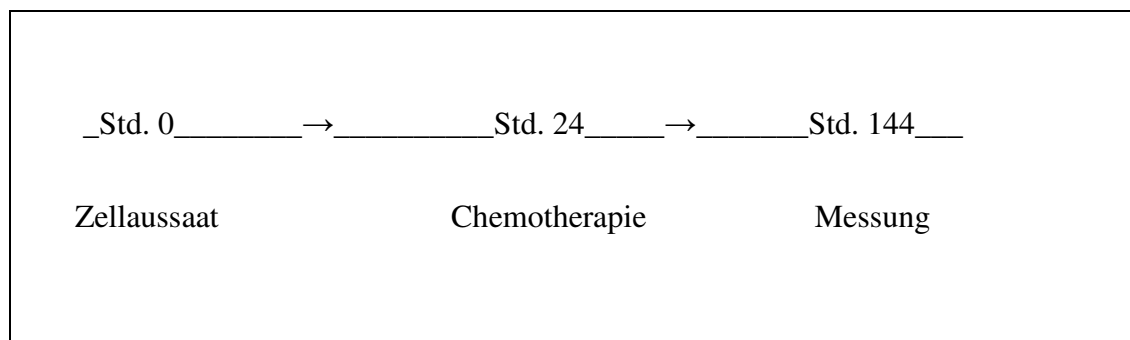


Abbildung 9: Versuchsansatz zur Untersuchung der Zellproliferation

Für das optimale Zellwachstum muss eine definierte Anzahl an Zellen vorhanden sein.

So wurden pro Well in Abhängigkeit von der Zelllinie folgende Zellzahlen, in 200 µl Medium suspendiert, festgelegt:

DU 145	1000 Zellen/Well
PC-3	3000 Zellen/Well
LNCaP	6000 Zellen/Well

Um bei der Titerplattenphotometer-Messung den Nullwert (Zellen ohne Substanz) zu ermitteln wurden bei jedem Ansatz 6 Wells mit 200µl Medium ohne Zellen aufgefüllt.

2.4.2 Inkubation mit Zytostatika

Die jeweiligen Zytostatika wurden den Zellen in Gewebekulturplatten nach 24 Stunden zugegeben. Vorher wurden sie mit dem Medium soweit vorverdünnt, dass die Zugabe von 10 bzw. 5 µl dieser Verdünnung die gewünschte Konzentration pro Well ergibt. Bis zum Zeitpunkt der Messung wurden die Zellen mit den Zytostatika bei 37°C inkubiert.

2.4.3 Titerplattenphotometer- Messung

Mit dem Titerplattenphotometer wird das Proliferationsverhalten der Zellen im XTT-Assay gemessen. Diese Methode des quantitativen Nachweises der Zellproliferation wurde von Roehm et al beschrieben [75]. Der XTT Test erfasst lebende Zellen. Bei XTT handelt es sich um ein Tetrazolium-Salz, welches von lebenden Zellen durch Dehydrogenaseenzyme bei Anwesenheit eines elektronenbildenden Agens (PMS) in ein wasserlösliches Formazan farbig umgesetzt wird. Die Farbveränderung kann über das Titerplattenphotometer (THERMOmax Microplatte Reader, Molecular Devices, Ismaning) direkt durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650nm quantifiziert werden. Der Blank-Kontrollwert (Leerwert) wird aus dem Mittelwert der Wells gebildet, in dem XTT/PMS-Lösung, aber keine Zellen vorhanden sind, und von den Absorptionswerten subtrahiert. Eine Blankmessung (Leerwertmessung), bedeutet die Ermittlung der Intensität des durchgehenden Lichtes ohne einen absorbierenden oder streuenden Stoff (Blank) im Meßvolumen. Bei Wells mit unterschiedlich hoher Zytostatikakonzentration erwartet man dementsprechend unterschiedliche Absorptionswerte. Bei größeren Proliferationsraten wird eine höhere Absorption beobachtet.

In jedes Well wurden 50µl XTT-Lösung pipettiert und bis zur Messung bei 37°C im Brutschrank für 4 Stunden inkubiert.

2.5 Statistische Auswertung und Darstellung

2.5.1 Dose-Response-Kurven

Dose-Response Kurven stellen graphisch die Zellproliferation in Abhängigkeit von der applizierten Dosis einer Einzelsubstanz dar. Bei dieser graphischen Darstellung wird auf der x-Achse die Konzentration der Substanz und auf der y-Achse der prozentuelle Anteil der überlebenden Zellen (cell survival rate, anteilig im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe) aufgetragen.

Diese Kurven sind typischerweise sigmoid mit einem steilen Abfall der Zellproliferation im optimalen Wirkungsbereich der Substanz. Aus den Diagrammen ist es möglich den IC₅₀ Wert abzulesen. Dieser Wert gibt die Wirkstoffkonzentration an, die zu einer 50%igen Hemmung des Zellüberlebens führt und ist der wichtigste Parameter für die Beurteilung der Zellproliferation.

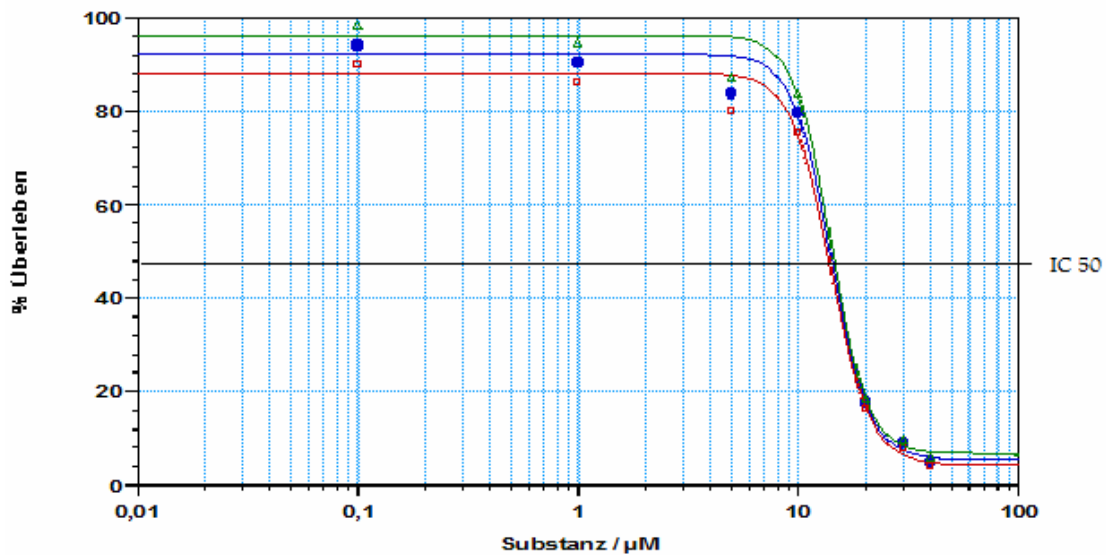
Um die Dose-Response-Kurven zu erstellen muss die Zellproliferation nach Inkubation mit ansteigenden Dosen der Zytostatika gemessen werden. Die Ergebnisse lassen sich in tabellarischer Form darstellen:

Conc./ μM	MV- %fu	SD- %fu	n	95%	Ki-o	Ki-u
0	100,0	7,2	12	4,0	104,0	96,0
2,5	89,4	10,0	12	6,5	95,9	82,9
5	81,7	17,7	12	11,0	92,7	70,7
10	49,2	8,2	12	5,3	54,6	43,9
12,5	38,9	8,3	12	6,1	45,0	32,7
15	37,1	15,8	12	9,8	46,8	27,3
17,5	29,1	8,3	12	5,1	34,2	23,9
20	13,6	8,4	12	5,5	19,1	8,1

Tabelle 12: Beispiel einer tabellarischen Darstellung der Dose-Response Kurve

Bezeichnungen:

Conc/ μM	Konzentration in μM im Well
MV-%fu	Mittelwert prozentuales Überleben im Vergleich zur unbehandelten Population
SD-%fu	Standardabweichung vom prozentualen Überleben
n	Anzahl der ausgewerteten Wells
95%	95% Konfidenzintervall
Ki-o/Ki-u	Ober-/Untergrenze Konfidenzintervall



○ MV, □ Ki-u, Δ Ki-o, IC 50

Abbildung 10: Beispiel einer Dose-Response-Kurve, graphische Darstellung

Für die Versuche wurden Dose-Response Kurven mit dem Programm SOFTmaxPRO, Version 3.0 (Molecular Devices, Ismaning) erstellt und ausgewertet.

2.5.2 Isobologramme

Wenn zwei oder mehrere Substanzen miteinander kombiniert werden, treten sie in pharmakodynamische Interaktionen. Darunter versteht man Antagonismen oder Synergismen von Medikamenten an Zielzellen,-organen oder Organsystemen. Die traditionelle

Beschreibung pharmakodynamischer Interaktionen erfolgt in Form eines mathematischen Modells durch Isobologramme [9, 95]. Dabei handelt es sich um ein Koordinatensystem, in dem sowohl auf der Abszisse (X-Achse) als auch auf der Ordinate (Y-Achse) bestimmte Konzentrationsverhältnisse von Substanz A und B eingetragen werden, z.B. basierend auf der Konzentration bei 50%iger Hemmung der Zellproliferation (IC 50 Wert).

Isobologramme sind gut geeignet, Medikamenteninteraktionen visuell als synergistisch, antagonistisch oder null-interaktiv zu beschreiben. Um die Isobologramme zu erstellen ist es notwendig die kompletten Dose-Response-Kurven der Einzelsubstanzen zu ermitteln.

Zum ersten Mal wurden Isobologramme in der zweidimensionalen Form im Jahre 1953 von Loewe beschrieben.

Die isobolographische Auswertung der eigenen Versuche erfolgte durch ein spezielles MATLAB-basiertes Computerprogramm, welches von Wagenpfeil entwickelt wurde [98]. Dabei werden Datenpunkte als additiv bezeichnet, wenn sie innerhalb der berechneten Mode I/II Grenzen liegen. Datenpunkte, die unterhalb dieses Bereiches liegen, sind Ausdruck eines Synergismus, Datenpunkte die oberhalb liegen drücken einen Antagonismus aus. Diese Datenpunkte werden berechnet aus der ermittelten IC50 Konzentration der jeweiligen Kombination, dividiert durch die IC50 aus der Dose response der Monotherapie (siehe Abbildung).

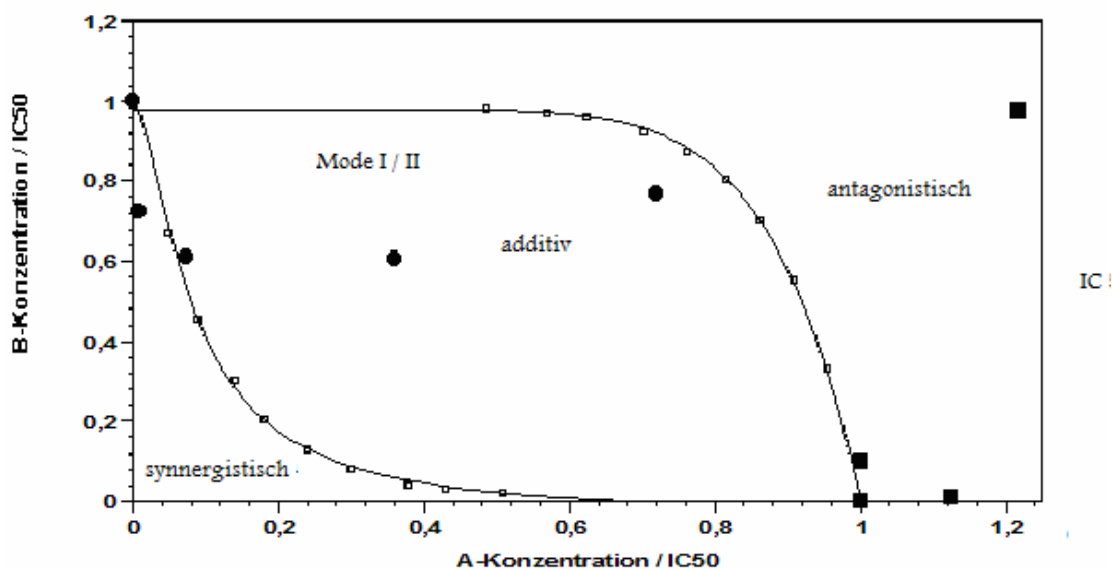


Abbildung 11: Beispiel eines Isobologramms

3 Ergebnisse

3.1 Rezeptoreigenschaften der Zelllinien

Alle Zelllinien wurden auf EGF-Rezeptor freundlicherweise vom pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar getestet und erwiesen sich als EGF-Rezeptor positiv.

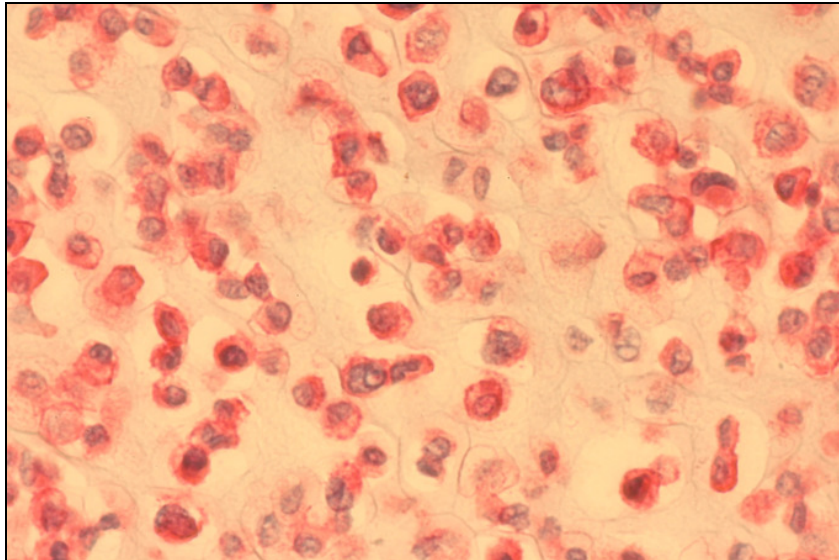


Abbildung 12: DU 145 bei 320-facher Vergrößerung mit EGF-Rezeptor Nachweis

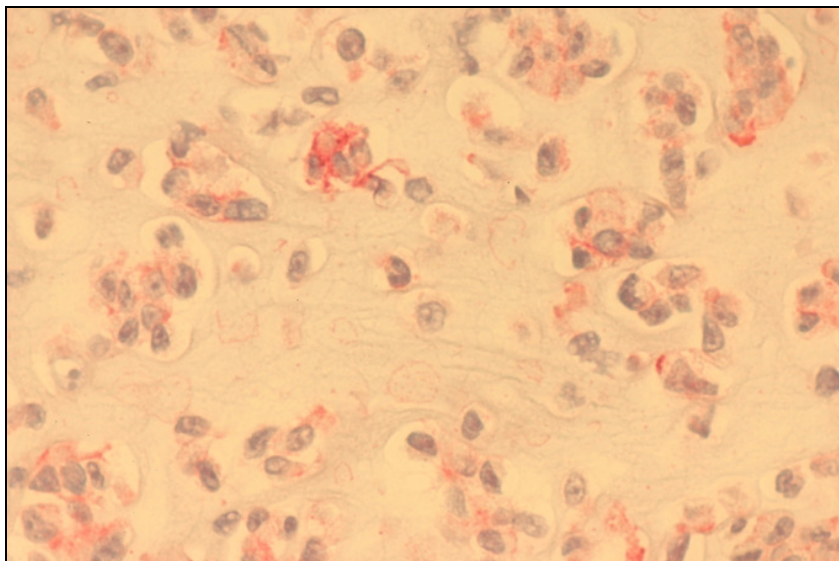


Abbildung 13: LNCaP bei 320-facher Vergrößerung mit EGF-Rezeptor Nachweis

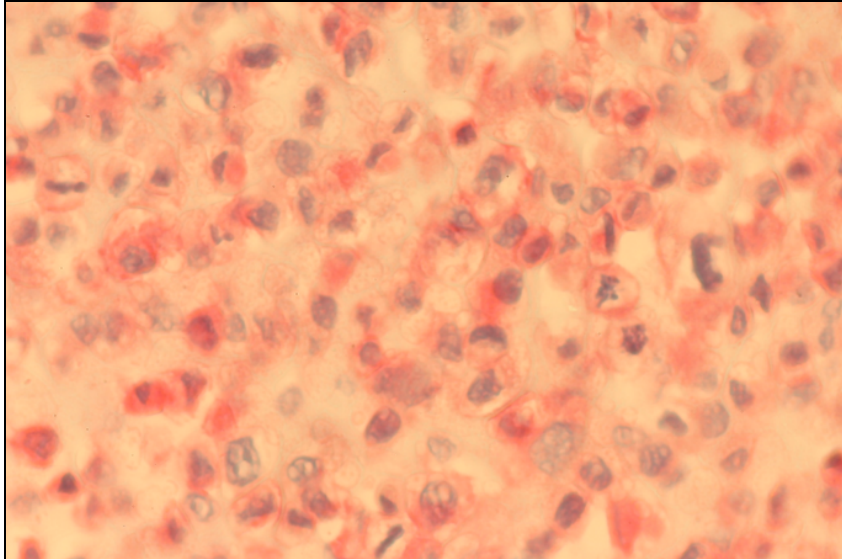


Abbildung 14: PC3 bei 320-facher Vergrößerung mit EGF-Rezeptor Nachweis

3.2 Proliferation bei Monotherapie

3.2.1 Gefitinib

PC-3:

Die PC-3 Zellen wurden mit Gefitinib in der Konzentration von 0,1 bis 40 μM inkubiert.

Gefitinib/ μM	% Überleben	Ki-u	Ki-o
0	100	96,6	103,4
0,1	94	89,7	98,3
1	90,2	85,9	94,6
5	83,7	79,8	87,5
10	79,5	75,3	83,7
20	17,5	16,3	18,6
30	8,9	7,9	9,8
40	5	3,9	6

Tabelle 13: Proliferation der PC-3 Zelllinie abhängig von Gefitinib

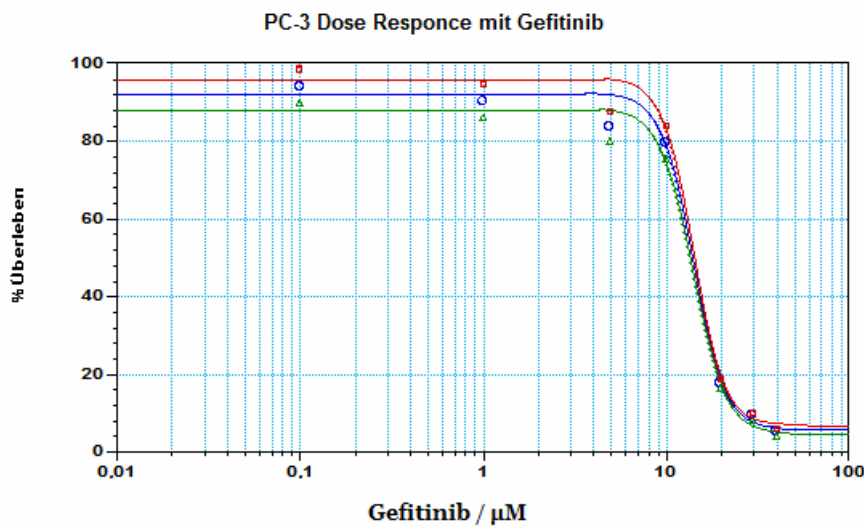


Abbildung 15: Proliferation abhängig von Gefitinib bei der Zelllinie PC3

Bei der Zelllinie PC-3 liegt der IC₅₀ Wert bei 13,89 μM

DU 145

Die DU 145 Zellen wurden mit Gefitinib in der Konzentration von 0,5 bis 25 μM inkubiert.

Gefitinib / μM	% Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	105,3	94,7
0,5	73,5	78,1	68,8
1	67,1	71,5	62,7
2	58,2	62,6	53,8
4	43,1	46,2	39,9
6	31,3	33,8	28,7
8	24,1	26,7	21,6
10	21,8	24,1	19,5
15	16,1	18,2	14
20	13,8	15,6	12,1
25	7,1	8,2	6

Tabelle 14: Proliferation von DU 145 Zelllinie abhängig von Gefitinib

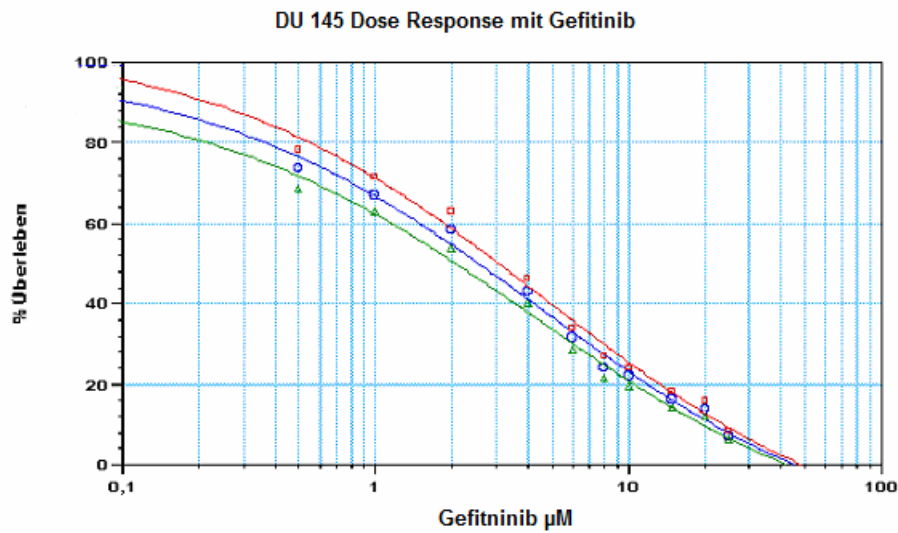


Abbildung 16: Proliferation abhängig von Gefitinib bei der Zelllinie DU 145

Bei der Zelllinie DU 145 liegt der IC 50 Wert bei 2,54 μM

LNCaP

Die LNCaP Zellen wurden mit Gefitinib in der Konzentration von 2,5 bis 50 μM inkubiert.

Gefitinib/ μM	% Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	103,8	96,2
2,5	97	101,7	92,3
5	88,2	93,1	83,2
10	55,1	60,7	49,6
12,5	43,9	50	37,7
15	38,5	44	33,1
17,5	32	35,9	28
20	17,7	22,4	13
50	9,1	13,6	4,6

Tabelle 11: Proliferation von LNCaP Zelllinie abhängig von Gefitinib

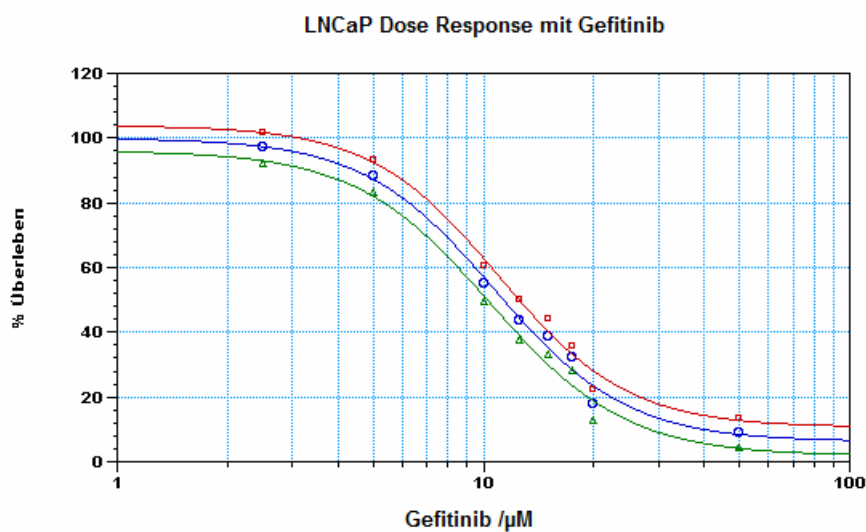


Abbildung 17: Proliferation abhängig von Gefitinib bei der Zelllinie LNCaP

Bei der Zelllinie LNCaP liegt der IC50 Wert bei 11,34 μM

3.2.2 Etoposid

PC-3

Die PC-3 Zellen wurden mit Etoposid in der Konzentration von 0,01 bis 50 μM inkubiert

Etoposid/ μM	% Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	103,4	96,6
0,01	94,8	99	90,5
0,1	78,7	85,3	72,1
0,5	54,5	64	45
1	54,5	60,5	48,5
5	24,7	29,3	20,1
10	33,6	38,8	28,4
20	26,6	31	22,2
50	11,9	14	9,9

Tabelle 12: Proliferation von PC-3 Zelllinie abhängig von Etoposid

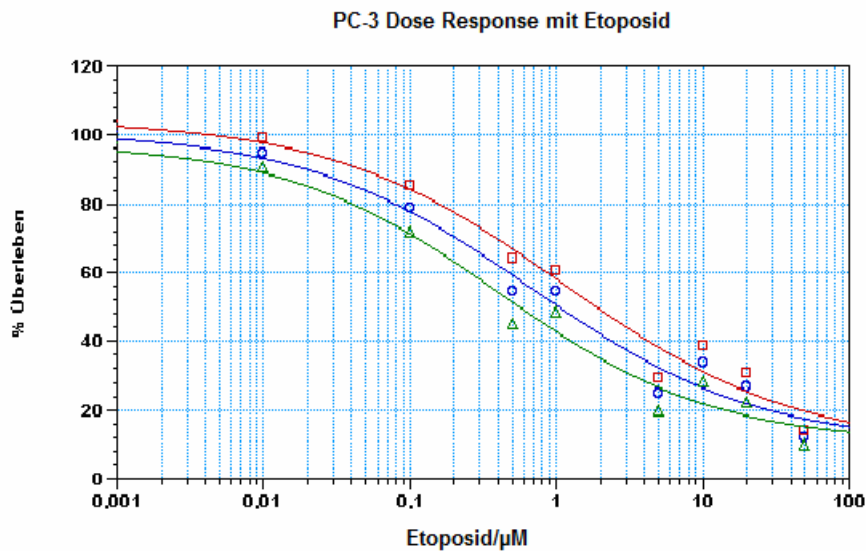


Abbildung 20: Proliferation abhängig von Etoposid bei der Zelllinie PC3

Bei der Zelllinie PC-3 liegt der IC50 Wert bei 1,03 μM

DU 145

Die DU 145 Zellen wurden mit Etoposid in der Konzentration von 0,01 bis 5 μM inkubiert

Etoposid/ μM	% Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	105,3	94,7
0,01	86,3	94,9	77,7
0,1	75,4	79,1	71,6
0,2	81,7	84,9	78,5
0,4	59,2	63,9	54,5
0,5	35,7	37,9	33,4
0,75	20,1	21,4	18,7
1	14,6	16	13,1
5	3,6	3,9	3,4

Tabelle 15: Proliferation von DU 145 Zelllinie abhängig von Etoposid

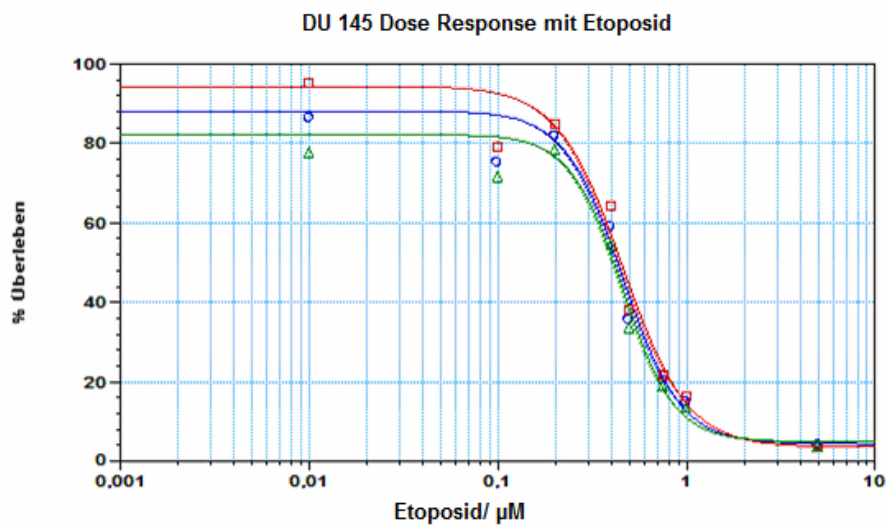


Abbildung 18: Proliferation abhängig von Etoposid bei der Zelllinie DU 145

Bei der Zelllinie DU 145 liegt der IC₅₀ Wert bei 0,43 μM

LNCaP

Die LNCaP Zellen wurden mit Etoposid in der Konzentration von 0,01 bis 50 μM inkubiert

Etoposid/ μM	% Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	103,8	96,2
0,01	89,3	92,9	85,8
0,1	76,3	84,3	68,3
0,2	61,2	67,3	55,1
0,4	46,7	52,4	40,9
0,5	44	47,2	40,8
1	31,4	37,5	25,3
10	14,8	15,8	13,8
50	12	13	11

Tabelle 16: Proliferation von LNCaP Zelllinie abhängig von Etoposid

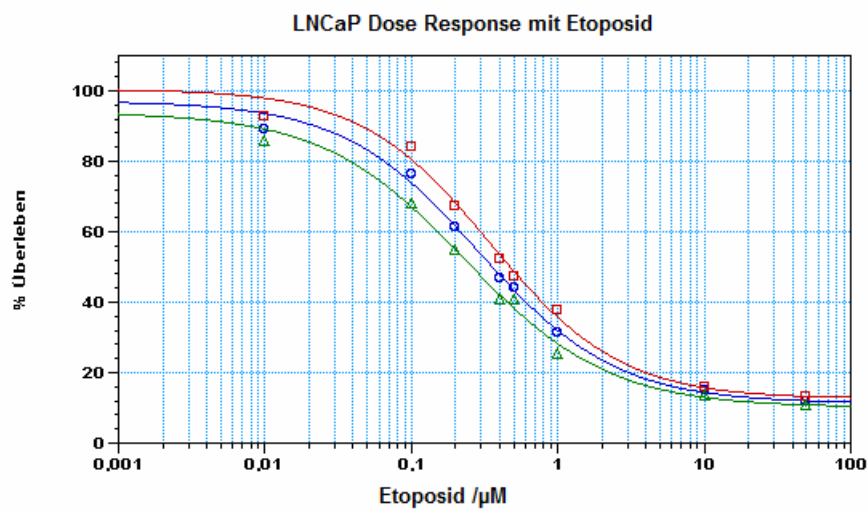


Abbildung 19: Proliferation abhängig von Etoposid bei der Zelllinie LNCaP

Bei der Zelllinie LNCaP liegt IC50 Wert bei 0,36 μM

3.2.3 Cyclophosphamid (CPM)

PC3

Die PC-3 Zellen wurden mit Cyclophosphamid in der Konzentration von 0,001 bis 50 μM inkubiert

CPM/ μM	%Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	103,4	96,6
0,001	100,1	107,9	92,3
0,1	98,9	106,7	91,1
1	82,2	88,8	75,5
2	65,3	71,2	59,4
5	54,9	57,3	52,6
10	34,3	35,6	33
20	2,6	3,3	1,9
50	0,9	1	0,7

Tabelle 17: Proliferation der PC-3 Zelllinie abhängig von Cyclophosphamid

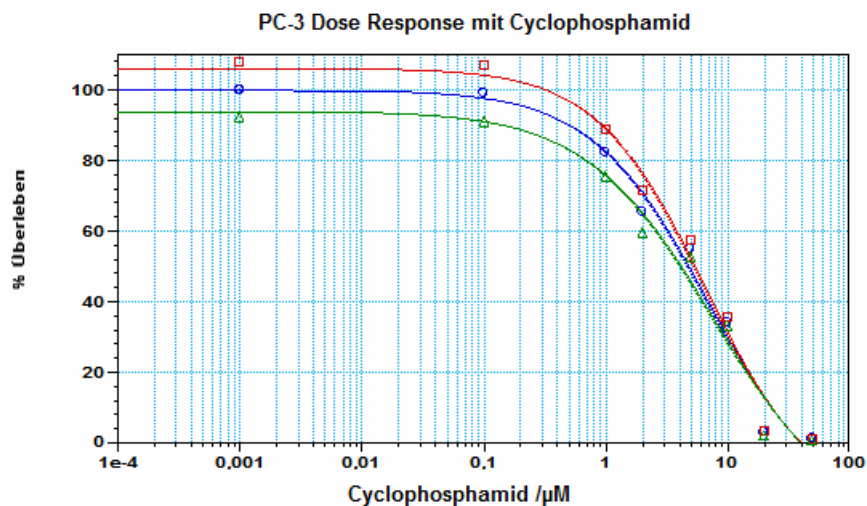


Abbildung 20: Proliferation abhängig von Cyclophosphamid bei der Zelllinie PC3

Bei der Zelllinie PC-3 liegt der IC50 Wert bei 4,8 μM

DU 145

Die DU 145 Zellen wurden mit Cyclophosphamid in der Konzentration von 0,1 bis 10 μM inkubiert

CPM/ μM	% Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	105,3	35
0,1	106,5	110,2	102,9
1	84,6	89	80,2
2	57,2	68,8	45,7
3	57,5	65,4	49,6
4	37,8	41,9	33,6
5	12,1	14,1	10
7,5	3,4	4,9	1,9
10	0,8	1	0,7

Tabelle 18: Proliferation von DU 145 Zelllinie abhängig von Cyclophosphamid

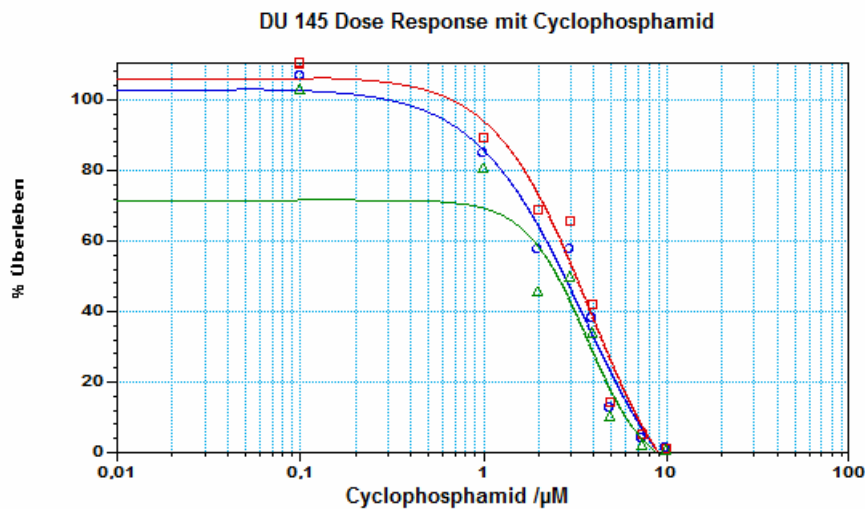


Abbildung 21: Proliferation abhängig von Cyclophosphamid bei der Zelllinie DU 145

Bei der Zelllinie DU 145 liegt der IC50 Wert bei 2,78 μM

LNCaP

Die LNCaP Zellen wurden mit Cyclophosphamid in der Konzentration von 0,001 bis 50 μM inkubiert

CPM/ μM	%Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	103,8	96,2
0,001	95,9	102,8	89
0,01	97,1	104,4	89,7
0,1	84,8	103,9	65,6
1	88,5	104,3	72,6
2	77,4	84,9	69,9
5	38,5	41,1	36
10	28,4	29,3	27,4
20	30,7	32,2	29,1
50	1,4	1,7	1,1

Tabelle 19: Proliferation von LNCaP Zelllinie abhängig von Cyclophosphamid

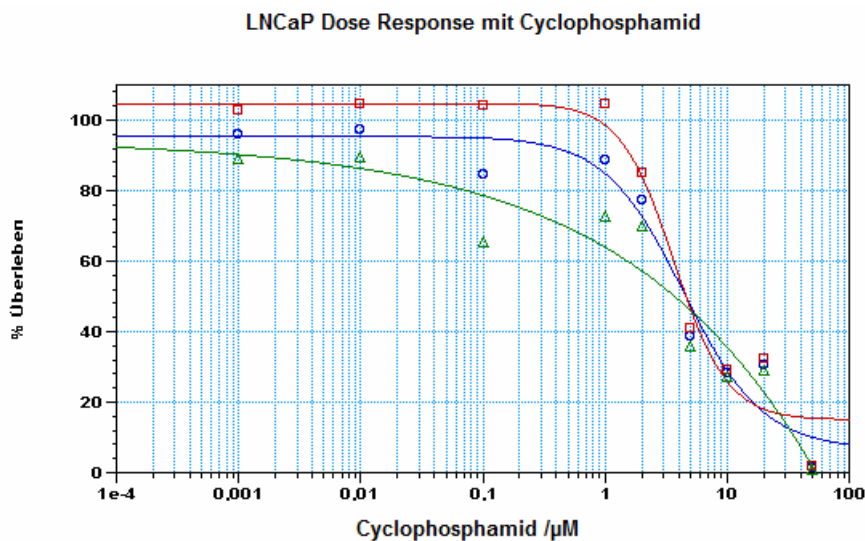


Abbildung 22: Proliferation abhängig von Cyclophosphamid bei der Zelllinie LNCaP

Bei der Zelllinie LNCaP liegt der IC_{50} Wert bei 4,59 μM

3.2.4 Docetaxel (TXT)

PC-3

Die PC-3 Zellen wurden mit Molaritäten von 0,0001 bis 20 μM inkubiert.

TXT/ μM	%Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	105,3	94,7
0,0001	71,1	83,9	58,2
0,00025	86,6	90,3	82,9
0,0005	71	73,3	68,6
0,001	18,2	23	13,5
0,0015	25	26,3	23,7
0,002	18,1	19,6	16,6
0,01	7,4	8,4	6,5
0,2	7,5	8,3	6,7
20	20,1	23,4	16,8

Tabelle 20: Proliferation von PC-3 Zelllinie abhängig von TXT

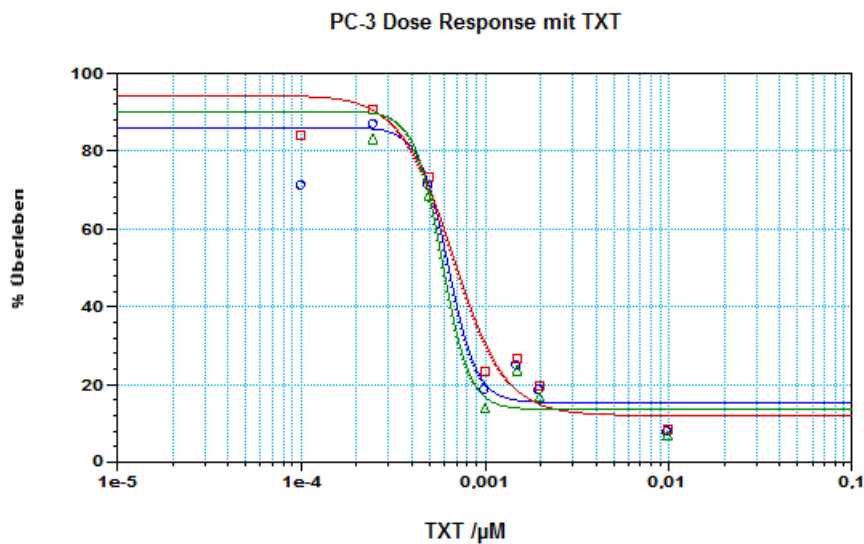


Abbildung 23: Proliferation abhängig von TXT bei der Zelllinie PC3

Bei der Zelllinie PC-3 liegt der IC50 Wert bei 0,00063 μM

DU 145

Die DU 145 Zellen wurden mit TXT in der Konzentration von 0,00005 bis 0,01 μM inkubiert

TXT/ μM	%Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	105,3	94,7
0,00005	94,2	100,9	87,5
0,0001	76,9	84,1	69,7
0,00025	83,5	89,5	77,6
0,0005	40,5	47,9	33
0,00075	25,8	29,4	22,2
0,001	9,4	10,4	8,4
0,0015	8,1	9	7,3
0,002	5,6	6,2	5,1
0,01	1,9	2,2	1,6

Tabelle 21: Proliferation von DU 145 Zelllinie abhängig von TXT

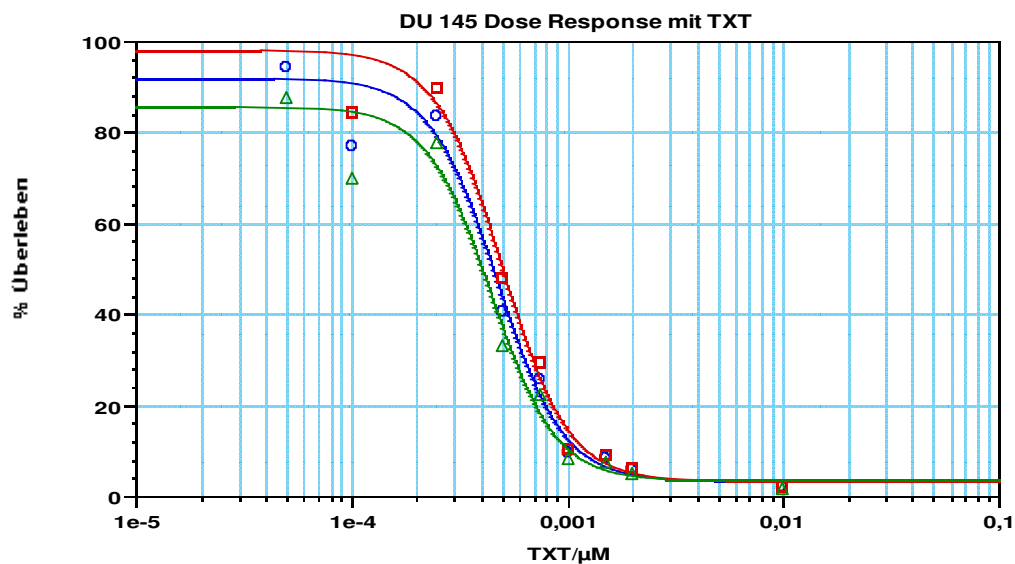


Abbildung 24: Proliferation abhängig von TXT bei der Zelllinie DU 145

Bei der Zelllinie DU 145 liegt der IC₅₀ Wert bei 0,00045 μM

LNCaP

Die LNCaP Zellen wurden mit Molaritäten von 0,1 bis 10 μM inkubiert

TXT/ μM	%Überleben	Ki-o	Ki-u
0	100	103,8	96,2
0,00001	88,1	95,3	80,9
0,00005	72,9	77,7	68,1
0,0001	84,2	91,5	77
0,0005	67,9	84,2	51,6
0,00075	19,8	22,9	16,7
0,001	19,7	24,4	15,1
0,0015	8	8,6	7,3
0,006	4,8	6,5	3,2
0,01	3,7	4,1	3,3

Tabelle 22: Proliferation von LNCaP Zelllinie abhängig von TXT

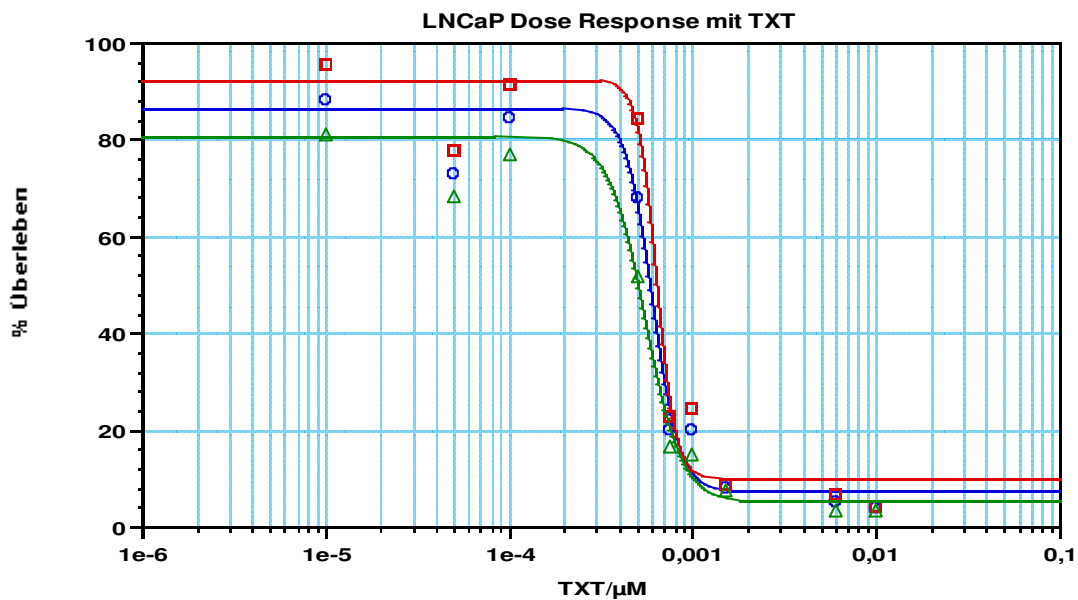


Abbildung 25: Proliferation abhängig von TXT bei der Zelllinie LNCaP

Bei der Zelllinie LNCaP liegt der IC₅₀ Wert bei 0,00058 μM

3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Monotherapie

In der nachfolgenden Tabelle wurden alle Konzentrationen und 95%-Konfidenzintervalle für eine 50% Zellproliferationshemmung zusammengestellt.

Iressa (µM)	PC3	DU 145	LNCaP
IC50	13,89	2,54	11,34
(95%KI)	(13,49-14,25)	(2,07-3,05)	(10,25-12,52)

Etoposid (µM)	PC3	DU 145	LNCaP
IC50	1,03	0,43	0,36
(95%KI)	(0,56 und 1,87)	(0,41-0,44)	(0,26-0,47)

CPM (µM)	PC3	DU 145	LNCaP
IC50	4,8	2,78	4,59
(95%KI)	(4,1-5,4)	(2,35 - 3,19)	(3,7-4,62)

TXT (µM)	PC3	DU 145	LNCaP
IC50	0,00063	0,00045	0,00058
(95%KI)	(0,00059-0,0007)	(0,0004 -0,0005)	(0,0005-0,00064)

Tabelle 23: IC50 Werte und 95% Konfidenzintervalle für alle Substanzen, Zusammenfassung

3.3 Proliferation bei Kombinationstherapie

Die aus den Versuchen mit Monosubstanzen ermittelten IC50 Werte dienen als Grundlage für die Kombinationsversuche. Pro Kombinationsversuch wurde jede Zelllinie mit Gefitinib-Konzentrationen im Bereich des IC50 Wertes inkubiert.

Um eine Vergleichs-Dose-Response von Gefitinib zu ermitteln wurde eine Gewebekulturplatte nur mit Gefitinib behandelt. Ebenso wurde eine Gewebekulturplatte nur mit der Kombinationssubstanz behandelt, um auch hier eine Vergleichs-Dose-Response zu ermitteln. Um die relativen IC50 Werte zu ermitteln, wurden den restlichen Gewebekulturplatten innerhalb der Platte konstante, ansteigende Konzentrationen im Bereich des IC50-Wertes der Kombinationssubstanz zugesetzt. Die zugefügte Substanz soll mindestens 3 Konzentrationen kleiner der IC50 enthalten, aber auch den gesamten Dose-Response Bereich abdecken.

Die aus den Kombinationsversuchen resultierenden Datenpunkte sind in den Tabellen mit prädikativen Minimum und Maximum dargestellt. Um als additiv bezeichnet zu werden muss der benötigte Anteil an IC50 Wert innerhalb dieses Bereichs liegen. Der Datenpunkt gilt als statistisch signifikant, wenn dieser innerhalb des 95% Konfidenzintervalls (Ki-u / Ki-o) liegt. Liegt der Datenpunkt über diesem Intervall, wird er statistisch signifikant antagonistisch bezeichnet, liegt er unter dem Intervall wird er dementsprechend statistisch signifikant als synergistisch bezeichnet.

Wenn sich das Konfidenzintervall und das Intervall des prädikativen Minimums/Maximum überschneiden, wird der Datenpunkt als additiv bis antagonistisch bezeichnet bzw. additiv bis synergistisch.

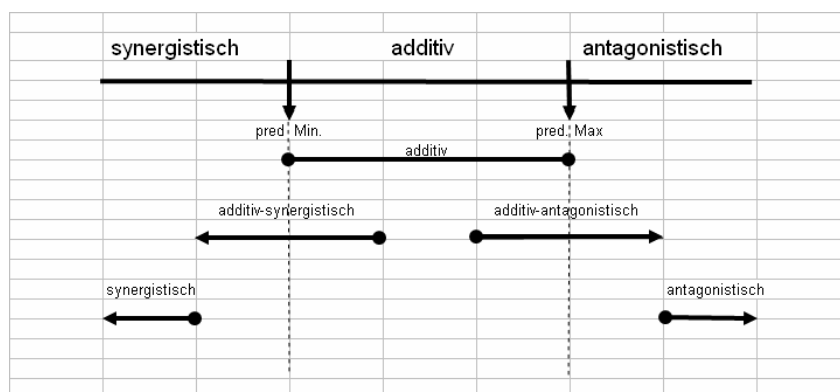


Abbildung 26: Wirkungsprinzip der Kombinationsversuche

3.3.1 Gefitinib und Etoposid

PC-3

Gefitinib / μ M	A-Conc./IC-50	B-Conc./IC50	B-u	B-o	pred.minB	pred.maxB	
0,00	0,000	1,000	0,538	1,802	0,998	0,981	
0,10	0,007	0,724	0,451	1,150	0,976	0,981	<-add->
1,00	0,072	0,611	0,390	0,937	0,540	0,981	<-add
5,00	0,360	0,605	0,388	0,942	0,059	0,981	add
10	0,720	0,766	0,411	1,374	-0,003	0,920	add->

Tabelle 24: Relative IC₅₀ Werte für Iressa in Abhängigkeit von Etoposid/PC-3

Etoposid/ μ M	B-Conc./IC-50	A-Conc./IC50	A-u	A-o	pred.minA	pred.maxA	
0	0	1,000	0,971	1,026	0,686	1,001	
0,01	0,01	1,127	1,119	1,142	0,588	1,000	ant
0,1	0,097	1,002	0,949	1,050	0,283	0,988	add->
1	0,972	1,218	0,000	1,273	0,008	0,578	<-add->

MV **0,865 0,530 1,124 0,350 0,918 add->**

Tabelle 25: Relative IC₅₀ Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Gefitinib/PC-3

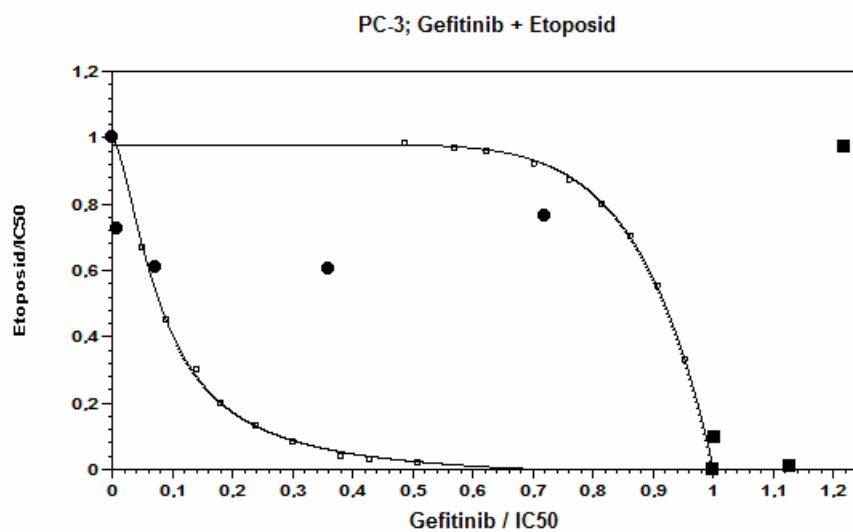


Abbildung 27: Isobologramm für Gefitinib/ Etoposid an PC3

DU 145

Gefitinib/ μM	A-Conc./IC-50	B-Conc./IC50	B-u	B-o	pred.minB	pred.maxB	
0	0	1,000	0,953	1,046	0,919	1,001	
0,5	0,196	0,652	0,472	0,773	0,449	0,917	add
1	0,393	0,047	0,015	0,113	0,26	0,896	syn
2	0,786	0,014	0,000	0,199	0,071	0,573	<-add

Tabelle 26: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von Etoposid/DU 145

Etoposid/ μM	B-Conc./IC-50	A-Conc./IC50	A-u	A-o	pred.minA	pred.maxA	
0	0	1	0,813	1,199	1,016	1,04	
0,01	0,023	0,287	0,18	0,446	0,946	1,009	syn
0,1	0,234	0,111	0,061	0,238	0,432	0,94	syn
0,2	0,467	0,47	0,307	0,681	0,183	0,842	add
0,4	0,935	0,023	0,009	0,043	0,007	0,05	Add

MV 0,265 0,174 0,382 0,380 0,776 <-add

Tabelle 27: Relative IC50 Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Gefitinib/DU 145

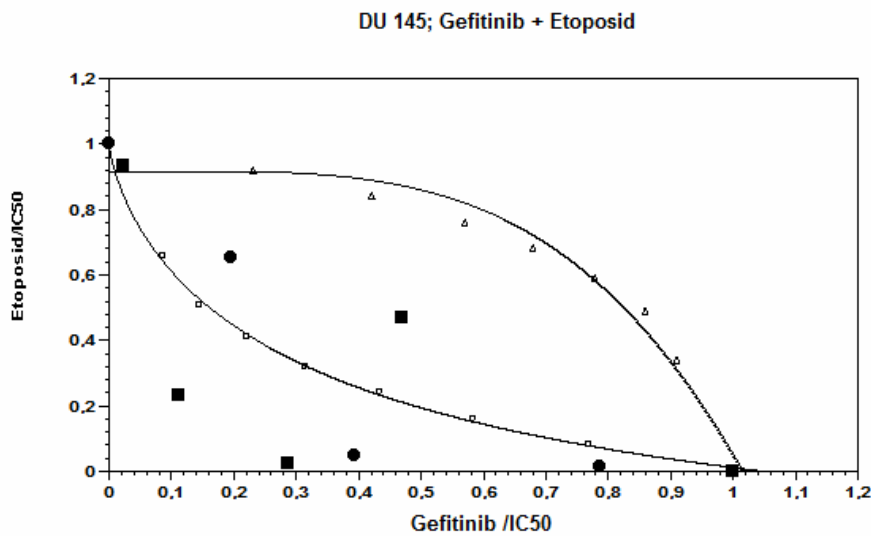


Abbildung 28: Isobologramm für Gefitinib / Etoposid an DU145

LNCaP

Gefitinib/ μ M	A-Conc./IC-50	B-Conc./IC50	B-u	B-o	pred.minB	pred.maxB	
0,00	0,00	1,00	0,725	1,323	0,991	1,004	
2,50	0,220	0,555	0,374	0,738	0,478	0,991	<-add
5,00	0,441	0,537	0,377	0,710	0,196	0,907	add
10,00	0,882	0,509	0,318	0,698	-0,018	0,298	add->

Tabelle 28: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von Etoposid/ LNCaP

Etoposid/ μ M	B-Conc./IC-50	A-Conc./IC50	A-u	A-o	pred.minA	pred.maxA	
0,00	0	1	0,903	1,103	0,819	1	
0,01	0,028	1,268	1,164	1,391	0,736	0,99	ant
0,10	0,28	0,996	0,93	1,092	0,356	0,89	ant
0,20	0,559	0,283	0,072	0,516	0,179	0,749	<-add

MV **0,691 0,539 0,858 0,321 0,804 add->**

Tabelle 29: Relative IC50 Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Gefitinib/ LNCaP

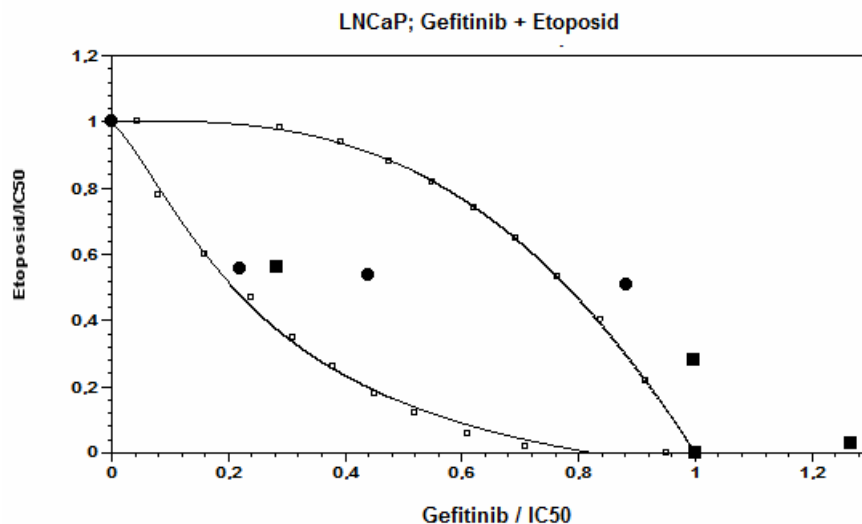


Abbildung 29: Isobologramm für Gefitinib / Etoposid an LNCaP

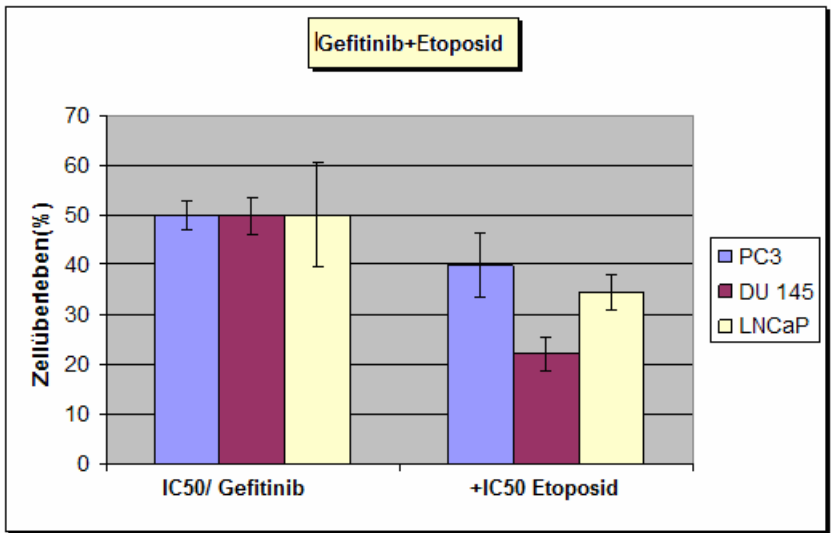


Abbildung 30: Zellüberleben bei Kombination von Gefitinib (IC50) mit Etoposid (IC50)

Die 50 % Zellhemmung durch Gefitinib (IC50) wird durch Zugabe von Etoposid (IC50) signifikant verstärkt

DU 145

Gefitinib/ μM	A-Conc./IC-50	B-Conc./IC50	B-u	B-o	pred.minB	pred.maxB	
0	0	1	0,917	1,156	0,901	0,946	
0,5	0,196	0,8	0,583	0,982	0,487	0,929	add->
1	0,393	0,72	0,533	0,915	0,319	0,86	add->
2	0,786	0,38	0	0,853	0,094	0,509	<-add->

Tabelle 32: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von CPM/ DU 145

CPM/ μM	B-Conc./IC-50	A-Conc./IC50	A-u	A-o	pred.minA	pred.maxA	
0	0	1	0,813	1,199	0,999	1,092	
0,1	0,036	1,173	1,016	1,35	0,913	1,074	add
1	0,36	0,594	0,417	0,789	0,338	0,89	add
2	0,72	0,292	0	0,62	0,039	0,593	<-add->

MV **0,660** **0,425** **0,918** **0,365** **0,809** **add->**

Tabelle 33: Relative IC50 Werte für CPM in Abhängigkeit von Gefitinib / DU 145

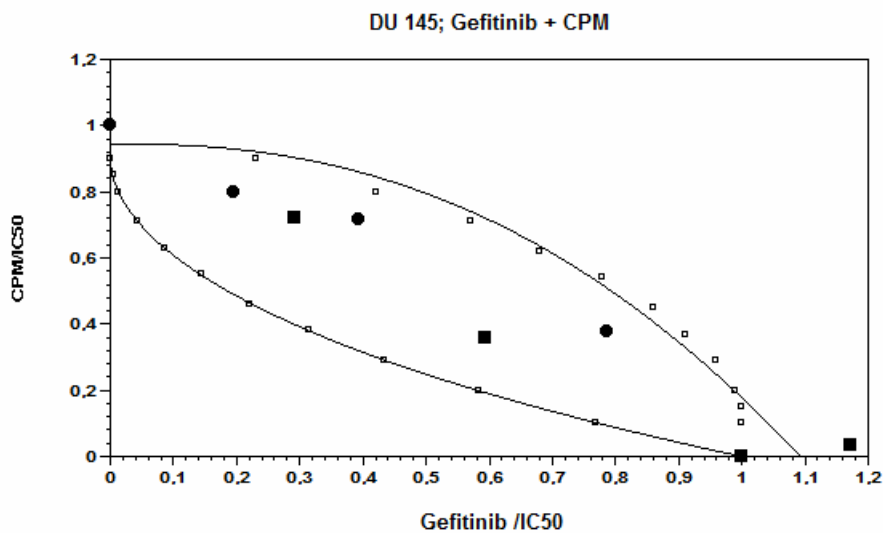


Abbildung 32: Isobologramm für Gefitinib / CPM an DU 145

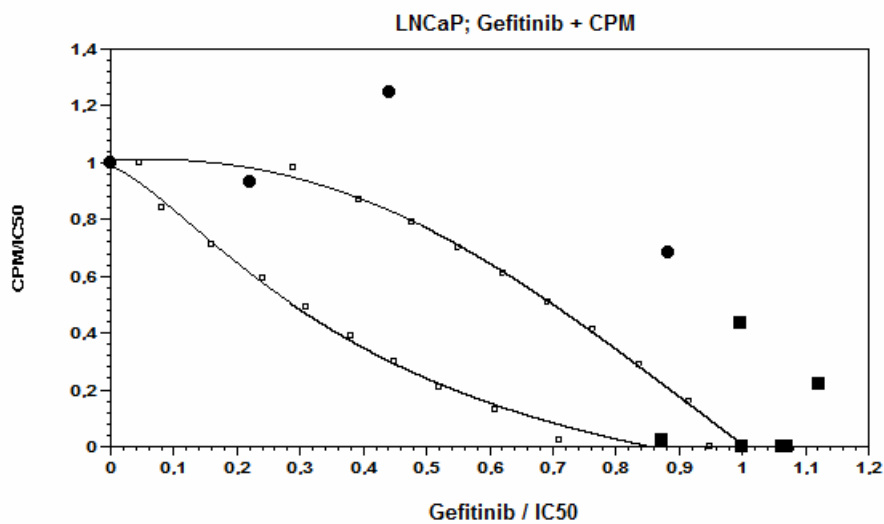
LNCaP

Gefitinib/ μM	A-Conc./IC-50	B-Conc./IC50	B-u	B-o	pred.minB	pred.maxB	
0	0	1,000	0,809	1,006	0,983	1,015	
2,5	0,22	0,934	0,862	0,945	0,611	0,98	add
5	0,441	1,249	0,660	1,435	0,301	0,831	add->
10	0,882	0,686	0,091	1,300	0	0,209	add->

Tabelle 34: Relative IC50 Werte für Gefitinib in Abhängigkeit von CPM/ LNCaP

CPM/ μM	B-Conc./IC-50	A-Conc./IC50	A-u	A-o	pred.minA	pred.maxA	
0	0	1	0,903	1,103	0,851	1,005	
0,001	0,0002	1,064	1,011	1,115	0,85	1,005	ant
0,01	0,002	1,07	0,941	1,171	0,846	1,004	add->
0,1	0,022	0,873	0,776	0,964	0,807	0,992	<-add
1	0,218	1,121	0,898	1,266	0,523	0,876	ant
2	0,436	0,997	0,875	1,099	0,332	0,743	ant

MV **0,999 0,764 1,162 0,534 0,830 add->**

Tabelle 35: Relative IC50 Werte für CPM in Abhängigkeit von Gefitinib/ LNCaP**Abbildung 33: Isobologramm für Gefitinib / CPM an LNCaP**

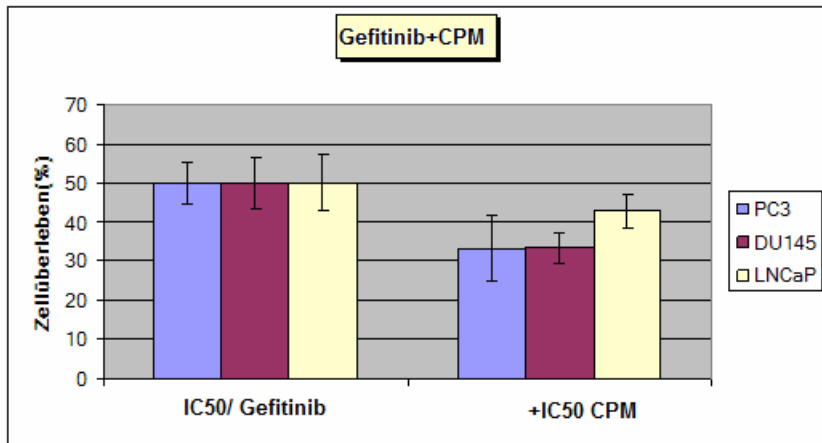


Abbildung 34: Zellüberleben bei Kombination von Gefitinib (IC50) mit CPM (IC50)

Die 50 % Zellhemmung durch Gefitinib (IC50) wird durch Zugabe von CPM (IC50) nur bei PC-3 und DU145 signifikant verstärkt

3.3.3 Gefitinib und Docetaxel (TXT)

PC-3

Gefitinib/ μM	A-Conc./IC-50	B-Conc./IC50	B-u	B-o	pred.minB	pred.maxB	
0,00	0,00	1	0,936	1,109	0,98	0,99	
0,10	0,007	1,271	1,132	1,087	0,979	0,99	ant
1	0,072	1,165	1,072	1,062	0,939	0,99	ant
5,00	0,360	1,017	0,864	1,187	0,532	0,966	add->
10,00	0,720	0,797	0,645	0,953	0,153	0,684	add->

Tabelle 36: Relative IC₅₀ Werte für Gefitinib in Abhängigkeit von TXT/ PC-3

TXT/ μM	B-Conc./IC-50	A-Conc./IC50	A-u	A-o	pred.minA	pred.maxA	
0	0	1	0,971	1,026	0,994	1	
0,0001	0,158	0,784	0,728	0,832	0,714	0,952	add
0,00025	0,394	0,833	0,786	0,873	0,465	0,866	add->
0,0005	0,789	0,763	0,653	0,846	0,189	0,642	ant

MV **0,947** **0,840** **0,977** **0,567** **0,870** **add->**

Tabelle 37: Relative IC₅₀ Werte für TXT in Abhängigkeit von Gefitinib / PC-3

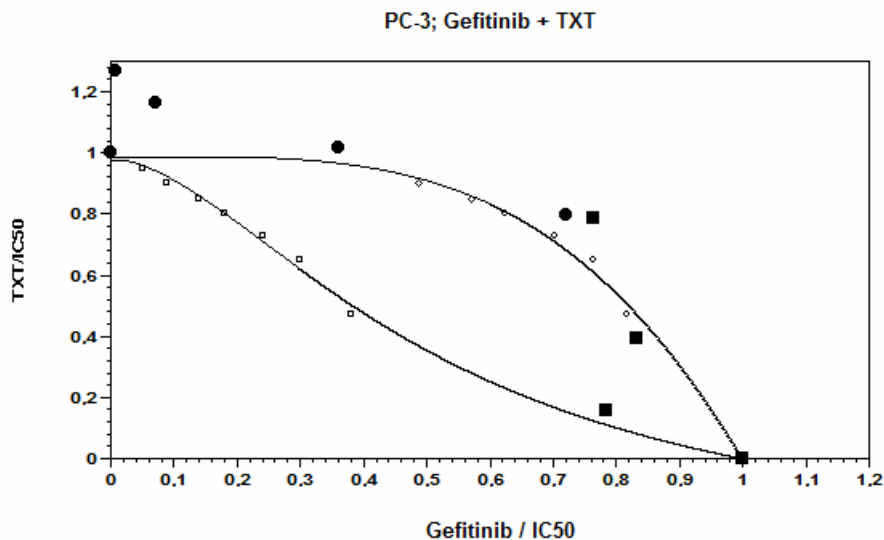


Abbildung 35: Isobologramm für Gefitinib/ TXT an PC-3

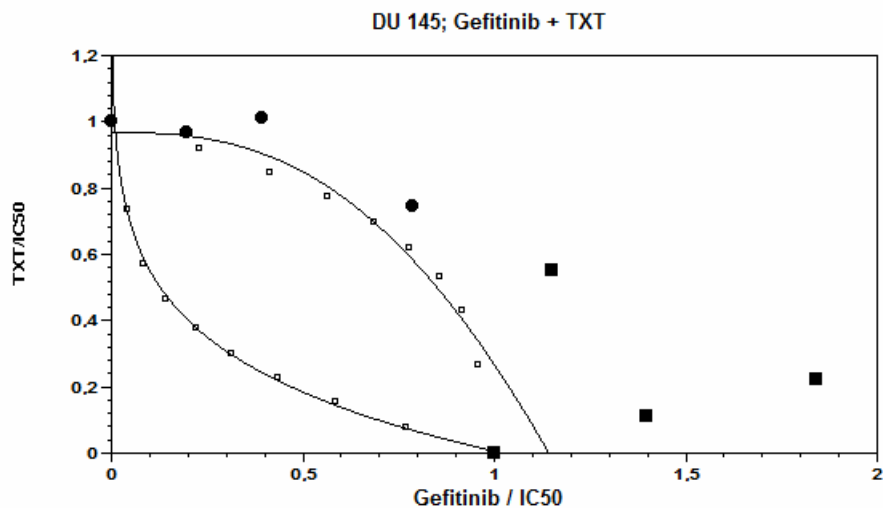
DU 145

Gefitinib/ μ M	A-Conc./IC-50	B-Conc./IC50	B-u	B-o	pred.minB	pred.maxB	
0	0	1	0,891	1,109	0,969	1,997	
0,5	0,196	0,97	0,825	1,092	0,405	0,958	add->
1	0,393	1,01	0,853	1,147	0,243	0,904	add->
2	0,786	0,745	0,515	0,948	0,069	0,584	add->

Tabelle 38: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von TXT/ DU 145

TXT/ μ M	B-Conc./IC-50	A-Conc./IC50	A-u	A-o	pred.minA	pred.maxA	
0	0	1	0,813	1,199	1,023	1,142	
0,00005	0,111	1,398	0,905	1,953	0,668	1,086	add->
0,0001	0,222	1,841	1,335	2,454	0,428	1,026	ant
0,00025	0,554	1,15	0,752	1,633	0,099	0,81	add->

MV 1,186 0,864 1,538 0,319 0,895 add->

Tabelle 39: Relative IC50 Werte für TXT in Abhängigkeit von Gefitinib / DU145**Abbildung 36: Isobologramm für Gefitinib / TXT an DU 145**

LNCaP

Gefitinib/ μ M	A-Conc./IC-50	B-Conc./IC50	B-u	B-o	pred.minB	pred.maxB	
0,00	0	1	0,861	1,091	0,978	0,984	
2,50	0,22	1,004	0,857	1,095	0,895	0,96	<-add->
5,00	0,441	0,604	0,307	1,116	0,519	0,844	<-add->
10,00	0,882	0,004	0,000	0,02	0,08	0,24	syn

Tabelle 40: Relative IC50 Werte für Gefitinib in Abhängigkeit von TXT/ LNCaP

TXT/ μ M	B-Conc./IC-50	A-Conc./IC50	A-u	A-o	pred.minA	pred.maxA	
0	0	1	0,903	1,103	0,948	1	
0,00001	0,017	0,912	0,827	0,973	0,934	0,992	<-add
0,00005	0,086	0,536	0,434	0,619	0,820	0,959	syn
0,0001	0,171	0,709	0,642	0,766	0,698	0,917	<-add
0,0005	0,856	0,662	0,337	0,757	0,255	0,426	add->

MV 0,738 0,486 0,764 0,600 0,763 <-add->

Tabelle 41: Relative IC50 Werte für TXT in Abhängigkeit von Gefitinib / LNCaP

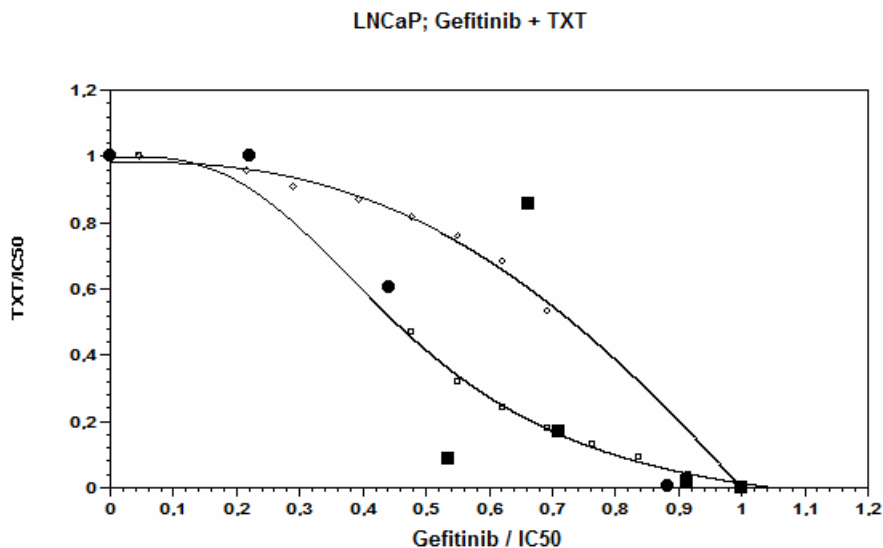


Abbildung 37: Isobologramm für Gefitinib/ TXT an DU 145

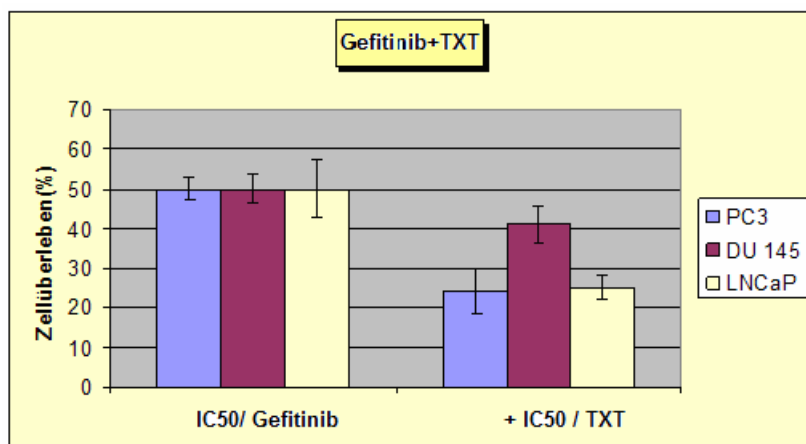


Abbildung 38: Zellüberleben bei Kombination von Gefitinib(IC50) mit TXT (IC50)

Die 50 % Zellhemmung durch Gefitinib(IC50) wird durch Zugabe von TXT (IC50) signifikant verstärkt

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Kombinationstherapie mit Gefitinib

Etoposid (µM)	PC3	DU 145	LNCaP
Ergebnis der Interaktion	add-ant	add-syn	add-ant
Mittelwert der Datenpunkte	0,865 (0,530-1,124)	0,265 (0,174-0,382)	0,691 (0,539-0,858)
Mittelwert des prädikativen Min	0,350	0,380	0,321
Mittelwert des prädikativen Max	0,918	0,776	0,804

Tabelle 42: Ergebnisse bei Kombinationstherapie Gefitinib mit Etoposid

CPM (μM)	PC3	DU 145	LNCaP
Ergebnis der Interaktion	add-ant	add-ant	add-ant
Mittelwert der Datenpunkte	0,870 (0,687-1,045)	0,660 (0,425-0,918)	0,999 (0,764-1,162)
Mittelwert des prädikativen Min	0,532	0,365	0,534
Mittelwert des prädikativen Max	0,931	0,809	0,830

Tabelle 43: Ergebnisse bei Kombinationstherapie Gefitinib mit CPM

TXT (μM)	PC3	DU 145	LNCaP
Ergebnis der Interaktion	add- ant	add-ant	add
Mittelwert der Datenpunkte	0,947 (0,840- 0,997)	1,186 (0,864 - 1,538)	0,738 (0,486-0,764)
Mittelwert des prädikativen Min	0,567	0,319	0,600
Mittelwert des prädikativen Max	0,870	0,895	0,763

Tabelle 44: Ergebnisse bei Kombinationstherapie Gefitinib mit TXT

4 Diskussion

Das hormonrefraktäre Prostatakarzinom gehört nach wie vor zu malignen Tumoren mit der letalen Prognose und stellt weiterhin eine große Herausforderung für die urologische Forschung dar. Lange Zeit galt HPRC als ein chemoresistenter Tumor. Diese Meinung hat sich mit Einführung der Taxane geändert. In den neueren Phase III Studien konnte bei Patienten zum ersten Mal ein Überlebensvorteil gegenüber Mitoxantrone gezeigt werden [96,69], so dass das HPRC nicht mehr als chemotherapieresistenter Tumor gelten kann. Mittlerweile gilt Docetaxel als Standardtherapie beim hormonrefraktären Prostatakarzinom. Kombinationstherapien könnten einerseits die Wirksamkeit erhöhen und andererseits die Anzahl der Nebenwirkungen reduzieren, indem nur geringere Konzentrationen der Kombinationspartner eingesetzt werden.

Die präklinische Untersuchung der Kombination von Etoposid, Cyclophosphamid und Docetaxel mit Gefitinib stellt für die experimentelle Untersuchung einen interessanten und neuen Therapieansatz dar.

4.1 Beurteilung der Methoden

Bevor die neuen Therapieformen eingesetzt werden, muss die Überprüfung der Wirksamkeit sowie die Erfassung von eventuellen Nebenwirkungen erfolgen. Da die klinischen Studien oft schlecht kontrollierbar und zeitaufwändig sind [46] bietet sich neben dem Experiment am Tier vor allem die Zellkultur als ideales Modell in der Tumorforschung an [27,60]. Die Forschung an Zellkulturen ist aufgrund der standardisierten Bedingungen und der Gleichförmigkeit der Zellkultur eine optimale Methode zur Erhebung der exakten Daten über die Wirkungen von externen Einflüssen wie z.B. Chemotherapie. Es wurde eine hohe in-vitro-in-vivo Korrelation im Vergleich von Experimenten an Monolayerkulturen und klinischen Tumoren ermittelt. Die Untersuchungen zeigten eine Übereinstimmung zum klinischen Tumor von 84%, bei einer Sensitivität von 72,8% [91].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Prostatakarzinom- Zelllinien für die in-vitro Untersuchungen sind in der Tumorforschung lange etabliert. Die Ursprungszellen wurden von unterschiedlichen Metastasierungslokalisationen dieses Karzinoms isoliert [92,41,47].

Zur Auswertung der Versuche wurden die Zelllinien in der Neubauer-Zählkammer sorgfältig manuell gezählt, wobei zufällige Fehler nicht ausgeschlossen sind.

Es wurde eine standardisierte Zellkonzentration pro Well zugegeben um solche Einflüsse zu vermeiden, wie das natürliche Absterben der Zellen beim Erreichen einer bestimmten Zelldichte. Um das Nährstoffangebot für die Zellen konstant zu halten, wurde ein Kulturmedienwechsel in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Sowohl die Ausgangskonzentration der Zellen als auch die Wechselfrequenz der Kulturmedien sind wichtige Parameter für den Verlauf der Wachstumskurven. Die Kontinuität dieser Faktoren ist unabdingbar für die Standardisierung der Versuche.

Um die Vergleichsmöglichkeit der einzelnen Versuche untereinander zu gewährleisten, erfolgte bei einem Ansatz immer die Angabe des prozentuellen Zellüberlebens im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Aus Gründen der Teststandardisierung wurden die Zellen 24 Stunden nach Aussaat mit Chemotherapie behandelt und die Zellproliferation 144 Stunden nach Aussaat gemessen.

Insgesamt zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit aller Ergebnisse in den Wiederholungsversuchen

Obwohl die Monolayerkulturen ein seit Jahrzehnten benutztes in-vitro Model zur Wirkungsanalyse der zytostatischen Substanzen darstellen, ist die Ergebnisinterpretation dieses Modells eingeschränkt. Faktoren wie Diffusionseigenschaften, Oxygenierung, pH-Änderung, Mikromillieu und interzelluläre Interaktionen haben einen Einfluß auf die Zytostatikainstabilität.

Die Verwendung der Isobogramme ist eine gut geeignete Methode zur Beurteilung der biologischen Interaktion zwischen unterschiedlichen Substanzen und der additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekte.

4.2 Beurteilung der Monotherapie im Vergleich zur Kombinationstherapie

Neben den zytostatischen Monotherapien werden die Kombinationen aus verschiedenen zytotoxischen Substanzen angewandt. Diese sind bei den meisten Tumorformen den Monotherapien dadurch überlegen, dass sie verschiedene Phasen des Zellzyklus beeinflussen und auf diese Weise unterschiedliche Mechanismen der Zellproliferation hemmen. Im Laufe der Behandlung mit Zytostatika entwickelt sich eine zunehmende Resistenz gegenüber der Einzelsubstanz, was zur regelmäßigen Abnahme der Therapiewirksamkeit führt. Daher ist es sinnvoll, die Kombinationstherapien anzuwenden, um eine schnelle Entwicklung resistenter Zellpopulationen zu unterbinden. Durch die Kombination der Einzelsubstanzen miteinander können sowohl additive als auch synergistische Effekte beobachtet werden. Dadurch kann die Dosierung der jeweiligen Einzelsubstanzen reduziert werden, um so das Ausmaß an Nebenwirkungen zu verringern.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zytostatika greifen in die unterschiedlichen Mechanismen der Zellproliferation ein. Vor der Anwendung im Rahmen der Kombinationstherapien müssen die Einzelsubstanzen auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Mit jeder Substanz konnte bei allen verwendeten Zelllinien eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation gezeigt werden. Es fällt auf, dass bei der Substanz Gefitinib insgesamt eine höhere Konzentration nötig ist, um eine 50 % Proliferationshemmung zu erreichen (2,54-13,89 μM) im Vergleich zu Etoposid (0,36-1,03 μM), Cyclophosphamid (4,8-4,59 μM) oder Docetaxel (0,00058-0,00063 μM).

Die Kombinationsversuche von Gefitinib und Cyclophosphamid zeigten bei allen drei Zelllinien additive, aber auch antagonistische Effekte.

Ebensfalls konnte bei den Kombinationen von Gefitinib mit Etoposid bei den Zelllinien PC-3 und LNCaP eine additive bis antagonistische Wirkung beobachtet werden, bei der Zelllinie DU145 wurde eine additive bis synergistische Wirkung beobachtet.

Die Kombination von Gefitinib mit Docetaxel zeigte bei den Zelllinien PC3 und DU 145 eine additive sowie antagonistische Wirkung, bei der Zelllinie LNCaP wurde eine rein additive Wirkung beobachtet.

4.3 Interpretation der Ergebnisse

In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Substanzen für die Tumorthherapie entwickelt, darunter auch der Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor (RTK) Gefitinib (Iressa). Um die Bedeutung der Blockade der RTK zu evaluieren, wurde die Wirkung von Gefitinib in zahlreichen klinischen Studien und bei verschiedenen Tumorarten sowohl in-vitro als auch in-vivo untersucht [22,86]. Um eine halbmaximale Proliferationshemmung zu erreichen, benötigten wir für unsere Versuche Gefitinibkonzentrationen zwischen 2,54µM und 13,89 µM.

Andere solide Tumore zeigen eine 50%ige Proliferationshemmung bei Gefitinib-Konzentrationen, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Tumor	N	IC50 (µM)
Mammakarzinom	8	7.27 (6.2–16.9)
Kolorektales Karzinom	18	3.19 (0.1–52.6)
Melanom der Haut	7	2.81 (1.9–29.4)
Melanom der Bindehaut	12	17.10 (0.04–69.9)
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	1	-
Plattenepithelkarzinom	2	2.83 (2.3–3.4)
Ösophaguskarzinom	4	3.58 (2.8–4.4)
Ovarialkarzinom	26	3.09 (0.2–23.1)
Karzinom bei unbekanntem Primärtumor	5	4.76 (0.05–14.3)
Sarkom	2	9.8
Schweißdrüsenkarzinom	1	24.67

Tabelle 45: IC-50 Wert (µM) für Einzelsubstanz Gefitinib für alle getesteten Tumore [50]

Der mediane IC50 Wert für Einzelsubstanz Gefitinib in allen getesteten Tumoren beträgt 3,98 µM [50]. Bezogen auf diesen Wert liegt der in unseren Versuchen ermittelnde Wert von 2,54 –13,89 µM im vergleichbaren Konzentrationsbereich der IC50 für andere solide Tumore.

Ciardiello et. al. [22] haben gezeigt, dass die Inkubation der Ovarial-, Mamma- und Kolonkarzinomzelllinien mit Gefitinib in vitro eine dosisabhängige Proliferationshemmung bei allen Zelllinien bewirkt.

Der antiproliferative Effekt war hauptsächlich zytotoxisch, bei höheren Dosen von Gefitinib wurde eine gesteigerte Apoptoserate beobachtet. Bei der Kombination von Gefitinib mit anderen zytotoxischen Substanzen wie Cisplatin, Docetaxel, Etoposid, Topotecan wurden bei den obengenannten Zelllinien dosisabhängige additive Effekte in Bezug auf die Wachstumshemmung beobachtet. Die Kombinationstherapie erhöhte deutlich auch die Apoptoserate im Vergleich zur Monotherapie.

Die Behandlung des Kolonkarzinom-Xenografts mit Gefitinib in der Nacktmaus zeigte eine dosisabhängige Hemmung des Tumorwachstums. Die Kombinationstherapie von Iressa mit Topotecan, Raltitrexed oder Paclitaxel ergab hier eine komplette Tumorwachstumshemmung bei allen Mäusen [22].

Daten mehrerer Phase-I-Studien ergaben ein günstiges Nebenwirkungsprofil unter Gefitinib-Monotherapie bei Patienten mit soliden Tumoren wie Prostata-, Ovarial-, Mamma-, Kolorektalkarzinom, Kopf-Hals Tumoren und NCLSL. Dabei wurden keine kardiotoxischen, neurotoxischen, nephrotoxischen, oder hämatologischen Nebenwirkungen festgestellt. Es wurden keine Allergie, Alopezie und Mukositis beobachtet. Die häufigsten Nebenwirkungen waren leichte Diarrhoe und Akne-ähnlicher Ausschlag. Darüber hinaus zeigte Gefitinib eine gute antitumorale Wirksamkeit, wobei teilweise lang andauernde Krankheitsstabilisierungen dokumentiert wurden [73,5].

Ausgehend von den zwei groß angelegten randomisierten Phase II Studien, IDEAL (Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer) 1 und 2, bei denen die Patienten unterschiedliche Dosierungen von Gefitinib erhielten [28,52,64,53], wurde diese Substanz 2002 in Japan und 2003 in den USA als Therapie des inoperablen oder rezidivierenden nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms zugelassen. In diesen Studien wurde gezeigt, dass bei ca. 40% der Patienten, bei denen andere Therapieoptionen ausgeschöpft waren, eine Tumorregression, Krankheitsstabilisierung und gesteigerte Lebensqualität unter Gefitinibtherapie erreicht werden konnte [28,52]. Die Schweiz, als erstes europäisches Land hat Gefitinib als 3rd-Line-Therapy bei lokal fortgeschrittenem und metastasiertem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) zugelassen.

In zwei Phase III Studien wurden die Kombinationen von Gefitinib mit Cisplatin und Gemcitabine (INTACT 2) [29] bzw. mit Paclitaxel und Carboplatin (INTACT 2) [40] untersucht. Dabei zeigte die Kombinationstherapie keinen Vorteil gegenüber der

Monotherapie. Dies ist unter anderem auf eine Mutation des EGF-Rezeptors zurückzuführen [56,66]. Beiden Studien gemeinsam [29, 40] ist allerdings, dass diese eine gute Verträglichkeit von Gefitinib bestätigten.

Die Datenlage zum Einsatz von Gefitinib beim Prostatakarzinom sowohl in-vitro als auch in-vivo ist sehr begrenzt.

Sgambato et. al. [82] untersuchten den Einfluss von Gefitinib auf die Proliferation der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurde das Proliferationsverhalten bei allen 3 Zelllinien photometrisch ermittelt. Diese Arbeitsgruppe zeigte eine dosisabhängige Abnahme der Zellzahl bei allen drei Zelllinien mit dem ermittelten IC₅₀ Wert von 10-20µM, wobei die DU145-Zelllinie die höchste Chemosensitivität gegenüber Gefitinib zeigte (IC₅₀ 10,1±0,6 µM), gefolgt von LNCaP (15,6 ± 1,1µM) und PC3 (20,1± 0,6µM). Die in unseren Untersuchungen gemessenen IC₅₀ Werte für PC3 (13,89µM), DU145 (2,54µM), LNCaP (11,34µM) zeigen ebenso die höchste Empfindlichkeit der DU145-Zelle, gefolgt von der LNCaP-Zelle und der PC3-Zelle.

Darüber hinaus untersuchten Sgambato et. al. [82] die Auswirkung der Kombinationstherapie von Gefitinib mit dem Androgenblocker Flutamid auf das Proliferationsverhalten von PC3, LNCaP und DU 145 Zelllinien. Sie konnten zeigen, dass die kombinierte Behandlung einen supra-additiven Effekt aufweist, d.h. eine deutlich gesteigerte Proliferationshemmung aller drei Zelllinien im Vergleich zur Behandlung der Zelllinien mit den Einzelsubstanzen. Beispielsweise verursachte die alleinige Behandlung der DU 145-Zellen mit Gefitinib (5µM) oder Flutamid (50µM) eine 20%-ige Proliferationshemmung, während mit der Kombinationstherapie eine ca. 46%-ige Hemmung erreicht werden konnte.

Vicentini et al. [97] untersuchten Effekte von Gefitinib auf EGFR die Autophosphorylierung und Zellproliferation bei verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien, unter anderem LNCaP, PC3 und DU 145. Sie zeigten dass bei EGFR- positive Zelllinien die Gefitinib-assoziierte Hemmung der Phosphorylierung innerhalb von 10-30 min bei einer IC₅₀ Konzentration von 0,46-0,97 µM erfolgte. Darüber hinaus fanden die Autoren heraus, dass Gefitinib in den Zellzyklus hemmend eingreift, sowie die Apoptose initiiert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass Gefitinib die Proliferation und Progression des humanen Prostatakarzinoms sogar in Anfangstadien hemmen kann.

Eine andere Arbeitsgruppe von Mimeault [62] untersuchte ebenfalls die antiproliferativen und zytotoxischen Eigenschaften von Gefitinib allein und in Kombination mit Etoposid. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Gefinib mit Etoposid eine erhöhte Apoptoserate bei hormonrefraktären Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich zur Wirkung der Einzelsubstanzen verursachte.

K.Nakagawa et al. [63] untersuchten in einer Phase I Studie die pharmakokinetischen Eigenschaften von Gefitinib. Bei oraler Applikation von 50, 100 und 225 mg pro Tag lassen sich durchschnittliche Plasmakonzentrationen von 0,031, 0,043 und 0,15 $\mu\text{g/ml}$ errechnen. Dies entspricht jeweils 0,07, 0,096 und 0,33 μM . Die in unseren Versuchen ermittelten Konzentrationen von Gefitinib zur 50%-igen Hemmung der Prostatakarzinomzelllinien liegen mit 2,54-13,89 μM jedoch außerhalb der durchschnittlichen Plasmakonzentration. Wie bereits erwähnt wurde, ist die Interpretation der Ergebnisse im Monolayermodell aufgrund der Zweidimensionalität eingeschränkt. Möglicherweise sind die Unterschiede zwischen in-vivo und in-vitro Konzentrationen auf solche Faktoren zurückzuführen wie Mikromilieu, Interzelluläre Kontaktphänomene, Oxygenierung sowie Metabolisierung im Organismus.

Alle diese Studien, sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Gefitinib ein geeigneter Kombinationspartner bei der Therapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms ist und sollte nicht zuletzt aufgrund seines niedrigen Toxizitätsprofils zur Planung der klinischen Phase I Studien verwendet werden.

5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist mittlerweile der häufigste maligne Tumor des Mannes. Bei der Therapie des Prostatakarzinoms im hormonrefraktären und metastasierten Stadium fehlen Therapieansätze. Die Hormontherapie zeigt nur ein limitiertes Ansprechen von durchschnittlich drei bis sechs Jahren. Unter den urologischen Tumoren stellt das Prostatakarzinom die häufigste Todesursache des Mannes dar und ist zugleich bei den Tumoren ab dem 80. Lebensjahr die häufigste tumorbedingte Todesursache überhaupt. Aus diesen Gründen ist eine intensive Analyse neuer Therapieoptionen insbesondere im Bereich der Chemotherapie notwendig.

80% der Prostatakarzinomzellen exprimieren den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), eine Tyrosinkinase. Ein spezifischer Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase, Gefitinib entfaltet seine Wirkung durch reversible Bindung der ATP-Bindestelle und blockiert somit die EGFR-Autophosphorylierung. Dadurch kommt es zur Hemmung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade.

Gefitinib induziert dadurch antitumoröse Effekte bei verschiedenen soliden Tumoren.

Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom findet Gefitinib bereits klinische Anwendung. Die Monotherapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms mit Gefitinib war bislang nicht erfolgreich. In der vorliegenden Arbeit wurde die zytotoxische Wirkung von Gefitinib in Kombination mit Cyclophosphamid, Etoposid und Docetaxel an Prostatakarzinomzelllinien DU 145, PC-3 und LNCaP untersucht. Die Versuche sollten zeigen, ob durch eine in-vitro Kombination ein verstärkter antiproliferativer Effekt auftritt.

Die in-vitro Untersuchung von Monolayerkulturen etablierter Tumorzelllinien stellt ein geeignetes Modell zur Testung der neuen Wirkstoffe dar. Durch die standardisierten Bedingungen und Gleichförmigkeit der Zellkultur ist dies eine sehr gute Methode zur Erhebung exakter Daten über Wirkungen von externen Einflüssen, wie Chemotherapie.

Die Zelllinien wurden zunächst mit Gefitinib als Monotherapie inkubiert. Die dosisabhängige Veränderung der Proliferationskinetik wurde mit dem XTT-Assay gemessen.

Antiproliferative bzw. zytotoxische Kombinationseffekte für Gefitinib mit Etoposid, Gefitinib mit Cyclophosphamid, sowie Gefitinib mit Docetaxel wurden mittels Isobologramm-Analyse nach Steel und Peckham evaluiert, ausgehend von der Konzentration, die für eine 50 %-ige Inhibition der Zellproliferation nötig ist.

Bei allen Zelllinien wurde eine EGF-Rezeptor-Bestimmung durchgeführt. Alle drei Zelllinien wurden 24 Stunden nach Aussaat mit den Substanzen inkubiert und nach insgesamt 144 Stunden mit dem XTT-Assay gemessen.

Zusammenfassend zeigten unsere Untersuchungen, dass

- alle drei Zelllinien den EGF-Rezeptor exprimieren
- die Kombinationsversuche von Gefitinib und Cyclophosphamid eine additive bis antagonistische Wirkung bei allen drei Zelllinien gezeigt haben
- die Kombinationen von Gefitinib mit Etoposid bei den Zelllinien PC-3 und LNCaP eine additive bis antagonistische Wirkung erzeugt haben
- die Kombination von Gefitinib mit Etoposid bei der Zelllinie DU145 eine additive bis synergistische Wirkung auslöste
- die Kombination von Gefitinib mit Docetaxel bei den Zelllinien PC3 und DU 145 eine additive bis antagonistische Wirkung bewirkte
- bei der Kombination von Gefitinib mit Docetaxel bei der Zelllinie LNCaP eine rein additive Wirkung beobachtet wurde

Alle Kombinationen in-vitro zeigen insgesamt eine signifikante additive antiproliferative Aktivität. Die ermittelten Daten weisen darauf hin, dass die Inhibition des EGFR-Tyrosinkinase-vermittelten Tumorwachstums durch Gefitinib in-vitro effektiv ist, und bei Patienten mit einem hormonrefraktären Prostatakarzinom eine therapeutische Option darstellen könnte. Es soll daher in prospektiv randomisierten klinischen Studien überprüft werden, ob die Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen die klinische Ansprechrate dieses schwierig zu behandelnden Tumors verbessern kann.

Literaturverzeichnis

1. Ablin, R.J., Soanes, W.A., Bron, P., Witebsky, E. Precipitating antigens of the normal human prostate. *J Reprod Fertil.* 22(1970) 573-574
2. Alsikafi, N.F., Brendler, C.B., Gerber, G.S., Yang, X.J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia with adjacent atypia is associated with a higher incidence of cancer on subsequent needle biopsy than high-grade prostatic intraepithelial neoplasia alone. *Urology* 57(2001) 296-300
3. Altwein, J. Diagnostik und Stadieneinteilung. In: *Uroonkologie*. Rübben, H. (Hrsg.), Springer Verlag, 1998, 2. Aufl. 67-94
4. Andriole, G. Djavan, B., Fleshner, N., Schröder F. The Case for Prostate Cancer Screening with Prostate-Specific Antigen. *Eur. Urol. Suppl.* 5 (2006) 737–745
5. Baselga, J., Rischin, D., Ranson, M., Calvert, H., Raymond, E., Kieback, D.G., Kaye, S.B., Gianni, L., Harris, A., Bjork, T., Averbuch, S.D., Feyereislova, A., Swaisland, H., Rojo, F., Albanell, J. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J. Clin. Oncol.* 20(2002) 4292-302
6. Bauer, J.J., Zeng, J., Zhang, W., McLeod, D.G., Sesterhenn, I.A., Connelly, R.R., Mun, S.K., Moul, J.W. Lateral biopsies added to the traditional sextant prostate biopsy pattern increases the detection rate of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3(2000) 43-46.
7. Becker, J.C., Müller-Tidow, C., Serve, H., Domschke, W., Pohle, T., Role of receptor tyrosine kinases in gastric cancer: New targets for a selective therapy. *World J Gastroenterol* 12(2006) 3297-3305
8. Bellezza, I., Bracarda, S., Caserta, C., and Minelli, A. Targeting of EGFR tyrosine kinase by ZD1839 (“Iressa”) in androgen-responsive prostate cancer in vitro. *Molecular Genetics and Metabolism.* 88 (2006) 114–122
9. Berenbaum, M.C. What is synergy? *Pharmacol. Rev.* 41(1989) 93–141
10. Berthon, P., Valeri, A., Cohen-Akenine, A., Paiss, T., Wöhr, G., Latil A., Millasseau, P., Mellah, I., Cohen, N., Blanché, H., Bellané-Chantelot, C., Demenais, F., Teillac, P., Le Duc, A., de Petriconi, R., Hautmann, R., Chumakov I., Bachner, L., Maitland, N J., Lidereau, R., Vogel, W., Fournier, G., Mangin, P., Cussenot, O. Predisposing gene for

- early-onset prostate cancer localized on chromosome 1q42.2-43. *Am. J. Hum. Genet.* 62(1998) 1416-1424
11. Blackledge, G., Averbuch, S. Gefitinib ('Iressa', ZD1839) and new epidermal growth factor receptor inhibitors. *Br. J. Cancer* 90 (2004)
 12. Boyle, P. Epidemiologie des Prostatakarzinoms. In: *Screening Prostatakarzinoms*. Faul, P., Altwein, J.E. (Hrsg.) Springer Verlag (1995) 11-19
 13. Braeckman, J., Autier, P., Garbar, C., Marichal, M.P., Soviany, C., Nir, R., Nir, D., Michielsen, D., Bleiberg, H., Egevad, L., Emberton, M. Computer-aided ultrasonography (HistoScanning): a novel technology for locating and characterizing prostate cancer. *BJU International*, 101(2008) 293-298
 14. Breul, J., Zimmermann, F., Dettmar, P., v. Randenborgh, H., Paul, R. Prostatakarzinom. In: *Manual Urogenitale Tumoren*. Tumorzentrum, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 2008
 15. Bubley, G.J., Carducci, M., Dahut. W., Dawson, N., Daliani, D., Eisenberger, M., Figg, W.D., Freidlin. B., Halabi, S., Hudes, G., Hussain, M., Kaplan, R., Myers, C. Eligibility and Response Guidelines for Phase II Clinical Trials in Androgen-Independent Prostate Cancer: Recommendations From the Prostate-Specific Antigen Working Group *Journal of Clinical Oncology*, 17(1999) 3461-3467
 16. Carter, B.S., Beaty, T.H., Steinberg HD: Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(1992) 3367-3371
 17. Carter, C.A., Donahue, T., Sun, L., Wu, H., McLeod, D.G., Amling, C., Lance, R., Foley, J., Sexton, W., Kusuda, L., Chung, A., Soderdahl, D., Jackmaan, S., Moul, J.W. Temporarily deferred therapy (watchful waiting) for men younger than 70 years and with low-risk localized prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *J. Clin. Oncol.* 21(2003) 4001-4008.
 18. Carter, H., Perason, J. Prostate-specific antigen velocity and repeated measures of prostate-specific antigen. *Urol. Clin. North. Am.* 24(1997) 333-338.
 19. Carter, H.B., Bova, G.S., Beaty, T.H., Steinberg, G.D., Childs, B., Isaacs, W.B., Walsh, P.C.. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J. Urol.* 150(1993) 797-802
 20. Catalona, W.J., Smith, D.S. 5-year tumor recurrence rates after anatomical retropublic prostatectomy for prostate cancer. *J. Urol.* 152(1994)1837-1842
 21. Chon, H.S., Hu, W., Kavanagh, J.J. Targeted therapies in gynecologic cancers. *Curr. Cancer Drug Targets.* 6(2006) 333-363

22. Ciardiello, F., Caputo, R., Bianco, R., Damiano, V., Pomatico, G., De Placido, S., Bianco, A.R., Tortora, G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.* 6(2000) 2053-2063.
23. Crawford, E.D., Batuello, J.T., Snow, P., Gamito, E.J., McLeod, D.G., Partin, A.W., Stone, N., Montie, J., Stock, R., Lynch, J., Brandt, J. The use of artificial intelligence technology to predict lymph node spread in men with clinically localized prostate carcinoma. *Cancer.* 88(2000) 2105-2109
24. D'Amico AV., Whittington, R., Fondurulia J., Chen MH., Tomaszewski JE., Wein, A., The combination of preoperative prostate specific antigen and postoperative pathological findings to predict prostate specific antigen outcome in clinically localized prostate cancer *J Urol* 160 (1998): 2096-2101
25. Denis, L.J., Murphy, G.P., Schröder, F.H. Report on the consensus workshop on screening and global strategy for prostate cancer. *Cancer* 75(1995) 1187-1207
26. Dovey, Z., Corbishley, C.M., Kirby, R.S. Prostatic intraepithelial neoplasia: a risk factor for prostate cancer. *Can. J. Urol.* 1(2005) 49-52
27. Franks, L.M. Primary cultures of human prostate. In: *Methods and Perspectives in Cell Biology: Cultured Human Tissues and Cells on Biomedical Research*, Harris, C.C., Trump, B.F., Stoner, G.D.(Hrsg.) Academic Press, 2(1980)
28. Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, JY., Nishiwaki. Y., Vansteenkiste, J., Kudoh, S., Rischin, D., Eek, R., Horai, T., Noda, K., Takata, I., Smit, E., Averbuch, S., Macleod, A., Feyereislova, A., Dong, RP., Baselga, J. A multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 21(2003) 2237-2246
29. Giaccone, G., Herbst, R.S., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Miller, V., Natale, RB., Schiller, JH., Von Pawel, J., Pluzanska, A., Gatzemeier, U., Grous, J., Ochs, JS., Averbuch, SD., Wolf, MK., Rennie, P., Fandi, A., Johnson, DH. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial – INTACT 1. *J. Clin. Oncol.* 22(2004) 777–784
30. Giovannucci, E., Rimm, E.B., Colditz, G.A. A prospective study on dietary fat and prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85(1993) 1571-1579
31. Gleason, D.F., Mellinger, G.T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.*(1974) 11158-64.

32. Graefen, M., Eichelberg, C., Huland, H. Therapieoptionen des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. *Blickpunkt der Mann* 3(2005) 13–18
33. Graf, H.J. Tumoren. In: *Urologie*. Merkle, W. (Hrsg.) Hippokrates, Stuttgart (1997) 182-192
34. Guhl, G., Gonzalez-de Arriba, A., Dauden, E. Epidermal growth factor receptor inhibitors side effects *Actas Dermosifiliogr.* 97(2006) 296-310
35. Haese, A., Graefen, M., Palisaar, J., Huland, E., Huland, H. Serummarker in der Früherkennung und dem Staging des Prostatakarzinoms. *Urologe* 42(2003) 1172-1187
36. Han, M., Partin, A.W., Zahurak, M., Piantadosi, S., Epstein, J.I., Walsh, P.C. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J. Urol.* 169(2003) 517-523
37. Heidenreich, A. Ohlmann, C.H. Therapieoptionen des hormonrefraktären Prostatakarzinoms. *Urologe* 44(2005) 1303-1314
38. Heine, K., Wolff, J.M. Chemotherapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms. *Aktuel. Urol.* 35(2004) 209-214
39. Helpap, B., Bücking, A., Dhom, G., Kastendieck, H., Leistenschneider, W., Müller, H.A. Klassifikation, histologisches und zytologisches Grading sowie Regressionsgrading des Prostatakarzinoms. *Pathologe* 6(1985) 3-7
40. Herbst, R.S., Giaccone, G., Schiller, J.H., Natale, R.B., Miller, V., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Oliff, I., Reeves, J.A., Wolf, M.K., Krebs, A.D., Averbuch, S.D., Ochs, J.S., Grous, J., Fandi, A., Johnson, D.H. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial – INTACT 2. *J. Clin. Oncol.* 22(2004) 785–794
41. Horoczewicz, J.S., Leong S.S., Chu, T.M., Wajzman, Z.L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L.S., Kakati, S., Arya, S.K., Sandberg, A.A. The LNCaP cell line- a new model for studies on human prostatic carcinoma. In: *Models for prostate cancer* Murphy, G.P.(Hrsg.) Alan. R. Liss. Inc. (1980) 116-132
42. Horoczewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Ming Chu, T., Mirand, E.A., Murphy, G.P. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Research* 43(1983) 1809-1818
43. Janqueura, L.C., Carneiro, J. *Histologie*. Springer Verlag 1994, 640 ff
44. Jian, L., Xie, L.P., Lee, A.H., Binns, C.W. Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *Int. J. Cancer.* 108(2004) 130-5
45. Jocham, D., Miller, K., *Praxis der Urologie*. Thieme Verlag; 2(1994) S.145

46. Kaighn, M.E. Human Prostatic Epithelial Cell Culture Models. *Investigative Urology*. 17(1980) 382-385
47. Kaighn, M.E., Shankar, Narayan, K. Establishment and Characterization of a humanic prostatic carcinoma cell line (PC3) *Invest. Urology*. 17(1979) 16-23
48. Kassouf, W., Luongo, T., Brown, G., Adam, L., Dinney, Colin P.N. Schedule dependent efficacy of gefitinib and docetaxel for bladder cancer. *J. Urol.*176(2006) 787-92
49. Kimballs Biology Pages (2008) Cell signaling.
(http://home.comcast.net/~john.kimball1/BiologyPages/C/CellSignaling.html#Steroid_Receptors) Stand 20.05.2009
50. Knight, L.A., Di Nicolantonio, F., Whitehouse, P., Mercer, S., Sharma, S., Glaysher, S., Johnson, P., Cree, Y.A. The in vitro effect of gefitinib ('Iressa') alone and in combination with cytotoxic chemotherapy on human solid tumours *BMC. Cancer*. 4(2004) 83
51. König, J.J, Kamst, E., Hagemeyer, A. Cytogenetic characterization of several androgen responsive and unresponsive sublines of the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. *Urol. Res.* 17(1989) 79-86
52. Kris, M., Natale, BR., Herbst, RS., Lynch, TJ., Prager, D., Belani, CP., Schiller, JH., Kelly, K., Spiridonidis, C., Albain, KS., Brahmer, JR., Sandler, A., Crawford, J., Lutzker, SG., Lilenbaum, R., Helms, L., Wolf, M., Averbuch, S., Ochs, J., Kay, A. A Phase II trial of ZD1839 ('Iressa') in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients who had failed platinum- and docetaxel-based regimens (IDEAL 2). 38th Am. Soc.Clin. Oncol.Meet. Orlando. (2002) 18-20
53. Kris, M., Natale, BR., Herbst, RS., Lynch, TJ., Prager, D., Belani, CP., Schiller, JH., Kelly, K., Spiridonidis, C., Sandler, A., Cella, D., Wolf, M., Averbuch, SD., Ochs, JJ., Kay, AC. Efficacy and safety of Gefitinib in symptomatic patients with advanced NSCLC (IressaTM). *Jama* 16(2003) 2149-2158
54. Leonhardt, H. Urogenitalsystem. In: Anatomie. Rauber, A., Kopsch, F. (Hrsg.) Thieme. Stuttgart. New York 2(1987): 470-471
55. Lubold, H.J., Rübber, H. PSA – Früherkennung des Prostatakarzinoms *Urologe*. A39(2000) 22-26
56. Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W. PSA – Früherkennung des Prostatakarzinoms cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350(2004) 2129–39
57. Mamot, C., Rochlitz, C.F. Iressa, Tarceva und Erbitux –Medikamente einer neuen Generation. *Schweiz. Med. Forum* 5(2005) 475–479

58. Mangar, S.A., Huddart, R.A., Parker, C.C., Dearnaley, D.P., Khoo, V.S., Horwich, A. Technological advances in radiotherapy for the treatment of localised prostate cancer. *Eur. J. Cancer.* 41(2005) 908-21
59. McNeal, J.E., Redwine, E.A., Freiha, F.S., Stamey, T.A. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma: Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am. J. Surg. Pathol.* 12 (1988) 897-906
60. Merchant, D.J. Prostatic cell growth and assessment. *Semin. Oncol.* 3. 131(1976)
61. Mickey, D.D., Stone, K.R., Wunderli, H. Heterotransplantation of human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res.* 37(1977) 4049- 4058
62. Mimeault, M., Venkatraman, G., Johansson, S.L., Moore, E., Henichart, J.P., Depreux, P., Lin, M.F., Batra, S.K. Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide. *Int. J. Cancer.* 120(2007) 160-9
63. Nakagawa, K., Tamura, T., Negoro, S., Kudoh, S., Yamamoto, N., Yamamoto, N., Takeda, K., Swaisland, H., Nakatani, I., Hirose, M., Dong, R.-P., Fukoka, M. Phase I pharmacokinetic trial of the selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib ('Iressa', ZD1839) in Japanese patients with solid malignant tumors. *Annals of Oncology* 14(2003) 922-930
64. Natale, R., Skarin, AT., Maddox, AM., Hammond, LA., Thomas, R., Gandara, DR., Gerstein, H., Panella, TJ., Cole, J., Jahanzeb, M., Kash, J., Hamm, J., Langer, CJ., Saleh, M., Stella, PJ., Heyes, A., Helms, L., Ochs, J., Averbuch, S., Wolf, M., Kay, A. Improvement in symptoms and quality of life for advanced non-small-cell lung cancer patients receiving ZD1839 ('Iressa') in IDEAL 2. 38th Am. Soc. Clin. Oncol. Meet. Orlando. (2002) 18-20
65. Nwosu, V., Carpten, J., Trent, J.M., Sheridan, R. Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Hum. Mol. Genet.* 10(2001) 2313-2318
66. Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, FJ., Lindeman, N., Baggon, TJ., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, MJ., Sellers, WR., Jonson, BE., Meyerson, M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 304(2004) 1497-500
67. Palisaar, J., Eggert, T., Graefen, M., Haese, A., Huland, H. Transrectal ultrasound-guided punch biopsies of the prostate. Indication, technique, results, and complications. *Urologe.* A42(2003) 1188-95

68. Penne, K., Bohlin, C., Schneider, S., Allen, D. *Cancer Nurs.* Gefitinib (Iressa, ZD1839) and tyrosine kinase inhibitors: the wave of the future in cancer therapy. 28(2005) 481-6
69. Pertylak, D.P., Macarthur, R.B., O'Connor, J., Shelton, G., Judge, T., Balog, J., Pfaff, C., Bagiella, E., Heitjan, D., Fine, R., Zuech, N., Sawczuk, I., Benson, M., Olsson C.A., Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 351(2004)1513-1520
70. Pienta, K.J., Espers, P.S. Risk factors for prostate cancer. *Ann. of Intern. Med.* 118(1993) 793-803
71. Prange W, Erbersdobler A, Hammerer P, Graefen M , Hautmann SH , Hautmann RE , Huland H, Henke RP; Significance of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsy specimens; *Urology.* 2001 Mar , 57(3): 486-90
72. Presti, J.C. Jr, O'Dowd, G.J., Miller, M.C., Mattu, R., Veltri, R.W. Extended peripheral zone biopsy schemes increase cancer detection rates and minimize variance in prostate specific antigen and age related cancer rates: results of a community multi-practice study. *J. Urol.* 169(2003) 125-9
73. Ranson, M., Hammond, L.A., Ferry, D., Kris, M., Tullo, A., Murray, P.I. Miller, V., Averbuch, S., Ochs, J., Morris, C., Feyereislova, A., Swaisland, H., Rowinsky, EK. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J. Clin. Oncol.* 20(2002) 2240-50
74. Rinnab, L., Küfer, R., Hautmann, R.E., Volkmer, B.G., Straub, M., Blumstein, N.M., Gottfried, H.W. Innovative Diagnostik in der Früherkennung und beim Staging des lokalisierten Prostatakarzinoms. *Der Urologe.* 44(2005) 1262
75. Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods.* 142(1991) 257-265
76. Rohde, V., Katalinic, A., Wasem, J., Aidelsburger, P. *Prostataerkrankungen.* Robert Koch-Institut, Berlin, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 36(2001)
77. Rosenberg, A.G., von Eschenbach, A.C. Hormonal therapy for prostate cancer. *Semin Surg Oncol.* 6(1990) 71-76
78. Roy, C., Buy. X., Lang, H., Saussine, C., Jacqmin, D. Contrast enhanced color Doppler endorectal sonography of prostate: efficiency for detecting peripheral zone tumors and role for biopsy procedure. *J. Urol.* 170(2003) 69-72

79. Sakr, W.A., Billis, A., Ekman, P., Wilt, T., Bostwick, D.G. Epidemiology of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 205(2000) 11-8
80. Sakr, W.A., Grignon, D.J., Haas, G.P. Pathology of premalignant lesions and carcinoma of the prostate in African-American men. *Semin. Urol. Oncol.* 16(1998) 214-220
81. Schaid, D.J., McDonnell, S.K., Blute, M.L., Thibodeau, S.N. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* (62)1998 1425-1438
82. Sgambato, A., Camerini, A., Ardito, R., Bianchino, G., Spada, D., Boninsegna, A., Valentini, V., Cittadini, A. Targeted Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase by ZD1839 ('Iressa') Induces Cell-Cycle Arrest and Inhibits Proliferation in Prostate Cancer Cells. *J. of cellular physiology* 201 (2004) 97-105
83. SHG Prostatakrebs Uwe Peters Rhein-Main.
(<http://www.prostatakrebs.de/themen/0005.htm>). 01.07.2007
84. Shimizu, H., Ross, R.K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B.E., Mack, T.M. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br. J. Cancer.* 63(1991) 963-966
85. Siegmund, M., Alken, P., Eble, M., Schmoll, J. Das Prostatakarzinom. Tumorzentrum Heidelberg/Mannheim. 2. Aufl.(1998)
86. Sirotnak, F.M., Zakowski M.F., Miller, V.A., Scher, H.I., Kris, M. Efficacy of Cytotoxic Agents against Human Tumor Xenografts Is Markedly Enhanced By Coadministration of ZD1839 (Iressa), an Inhibitor of EGFR Tyrosine Kinase. 6(2000) 4885-4892
87. Sirotnak, F.M., Zakowski, M.F., Miller, V.A., Scher, H.I., Kris, M.G. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin. Cancer. Res.* 6(2000) 4885-4892
88. Skowronski, R.J., Peehl, D.M., Feldman, D. Actions of vitamin D3 analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 136(1995) 20-6
89. Smith, J.R., Freije, D., Carpten, J.D. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search *Science* 274(1996) 1371-1374
90. Sökelland, J. *Urologie*. Thieme Verlag 31
91. Statistisches Bundesamt (Hrsg.) *Statistisches Jahrbuch 1993 für die Bundesrepublik*. Wiesbaden (1993)
92. Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., Paulson, D.F. Isolation of human carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* 21(1978) 276-281

93. Stonongton, O.G., Szweg, N., Webber, M. Isolation and Identification of the Human Prostatic Epithelial Cell in pure Monolayer Culture. *J. Urol.* 114(1975) 903-908
94. Susani, M. Präkanzeröse Läsionen der Prostata, *J. Urol. Urogyn.* SH1(2006) S9-11
95. Tallarida, R.J. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 298(2001) 865–872
96. Tannock, I.F., de Wit, R., Berry, WR., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, KN., Oudard, S., Théodore, C., James, ND., Turesson, I., Rosenthal, MA., Eisenberger, MA. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 351(2004) 1502-1512
97. Vicentini, C., Festuccia, C., Gravina, G.L., Angelucci, A., Marronaro, A., Bologna, M. Prostate cancer cell proliferation is strongly reduced by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in vitro on human cell lines and primary cultures, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129(2003) 165–174
98. Wagenpfeil, S., Treiber, U., Lehmer, A. Isobologram analysis in MATLAB for combined Effects of two agents in dose-response Experiments In: *Medical Data Analysis.* Perner, P., Brause, R., Holzhütter, H.G. (Hrsg.) Berlin. Heidelberg. New York. Springer Verlag (2003) 47-54
99. Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* 17(1979) 159-63
100. West, D.W., Slattery, M.L., Robison, L.M. Adult dietary intake and prostate cancer in Utah: A case-control study with special emphasis on aggressive tumors. *Cancer causes cont.* 2(1991) 84-94
101. Whittemore, A.S., Kolonel, L.N., Wu, A.H. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites and asians in the US and Canada. *J. Natl. Cancer. Inst.* 87(1995) 652-661
102. Wingo, P.A., Tong, T., Bolden, S. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 45(1995) 8-30
103. Wirth, M.P., Hakenberg, O.W., Fröhner, M. Therapie des lokal Fortgeschrittenen Prostatakarzinoms, *Urologe* 44(2005) 1295-1302
104. Wolff, J.M. *Das Hormonerfaktäre Prostatakarzinom.* 2. Aufl. Uni-Med. 2005
105. Yagoda, A., Petrylak, D. Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer. *Cancer.* 71(1993) 1098-109
106. Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities, *Eur. J. Cancer.* 37(2001) S3–S8

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Prostata [83]	6
Abbildung 2: zonale Unterteilung der Prostata [59]	7
Abbildung 3: Blockade der Androgen-Rezeptor-Interaktion (links)	26
Abbildung 4: Hypothalamus-Hypophysen-Achse beim Mann [104]	26
Abbildung 5: Hemmung von EGFR auf verschiedenen Ebenen [57]	29
Abbildung 6: DU 145 bei 200x Vergrößerung	32
Abbildung 7: LNCaP bei 200x Vergrößerung	34
Abbildung 8: PC-3 bei 320x Vergrößerung	36
Abbildung 9: Versuchsansatz zur Untersuchung der Zellproliferation	45
Abbildung 10: Beispiel einer Dose-Response-Kurve, graphische Darstellung	48
Abbildung 11: Beispiel eines Isobogramms	49
Abbildung 12: DU 145 bei 320 x Vergrößerung mit EGF-Rezeptor Nachweis	50
Abbildung 13: LNCaP bei 320 x Vergrößerung mit EGF-Rezeptor Nachweis	50
Abbildung 14: PC3 bei 320 x Vergrößerung mit EGF-Rezeptor Nachweis	51
Abbildung 15: Proliferation abhängig von Gefitinib bei der Zelllinie PC3	52
Abbildung 16: Proliferation abhängig von Gefitinib bei der Zelllinie DU 145	53
Abbildung 17: Proliferation abhängig von Gefitinib bei der Zelllinie LNCaP	54
Abbildung 18: Proliferation abhängig von Etoposid bei der Zelllinie DU 145	56
Abbildung 19: Proliferation abhängig von Etoposid bei der Zelllinie LNCaP	57
Abbildung 20: Proliferation abhängig von Cyclophosphamid bei der Zelllinie PC3	58
Abbildung 21: Proliferation abhängig von Cyclophosphamid bei der Zelllinie DU 145	59
Abbildung 22: Proliferation abhängig von Cyclophosphamid bei der Zelllinie LNCaP	60
Abbildung 23: Proliferation abhängig von TXT bei der Zelllinie PC3	61
Abbildung 24: Proliferation abhängig von TXT bei der Zelllinie DU 145	62
Abbildung 25: Proliferation abhängig von TXT bei der Zelllinie LNCaP	63
Abbildung 26: Wirkungsprinzip der Kombinationsversuche	65
Abbildung 27: Isobogramm für Gefitinib/ Etoposid an PC3	66
Abbildung 28: Isobogramm für Gefitinib / Etoposid an DU145	67
Abbildung 29: Isobogramm für Gefitinib / Etoposid an LNCaP	68
Abbildung 30: Zellüberleben bei Kombination von Gefitinib (IC50) mit Etoposid (IC50)	69
Abbildung 31: Isobogramm für Gefitinib / CPM an PC-3	70
Abbildung 32: Isobogramm für Gefitinib / CPM an DU 145	71

Abbildung 33: Isobologramm für Gefitinib / CPM an LNCaP	72
Abbildung 34: Zellüberleben bei Kombination von Gefitinib (IC50) mit CPM (IC50)	73
Abbildung 35: Isobologramm für Gefitinib/ TXT an PC-3	74
Abbildung 36: Isobologramm für Gefitinib / TXT an DU 145	75
Abbildung 37: Isobologramm für Gefitinib/ TXT an DU 145	76
Abbildung 38: Zellüberleben bei Kombination von Gefitinib(IC50) mit TXT (IC50)	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zonale Unterteilung der Prostata nach Mc Neal	8
Tabelle 2: WHO Grading und Gleason-Score	13
Tabelle 3: Vergleich Gleason-Score, PU-AK (Pathologisch- urologischen Arbeitskreises) und WHO	14
Tabelle 4 Altersabhängige Serum-PSA-Grenzwerte	16
Tabelle 5: TNM-Klassifikation der UICC und Amerikanisches System nach Whitmore-Jewett	20
Tabelle 6: Hormone hypophysären Ursprung	25
Tabelle 7: EGFR Expression in soliden Tumoren [8]	30
Tabelle 8: Chemische Eigenschaften von Gefitinib / Iressa / ZD 1839	39
Tabelle 9: Chemische Eigenschaften von Etoposid	40
Tabelle 10: Chemische Eigenschaften von Cyclophosphamid	41
Tabelle 11: Chemische Eigenschaften von Docetaxel / Taxotere	42
Tabelle 12: Beispiel einer tabellarischen Darstellung der Dose-Response Kurve	47
Tabelle 13: Proliferation der PC-3 Zelllinie abhängig von Gefitinib	52
Tabelle 14: Proliferation von DU 145 Zelllinie abhängig von Gefitinib	53
Tabelle 15: Proliferation von DU 145 Zelllinie abhängig von Etoposid	56
Tabelle 16: Proliferation von LNCaP Zelllinie abhängig von Etoposid	57
Tabelle 17: Proliferation der PC-3 Zelllinie abhängig von Cyclophosphamid	58
Tabelle 18: Proliferation von DU 145 Zelllinie abhängig von Cyclophosphamid	59
Tabelle 19: Proliferation von LNCaP Zelllinie abhängig von Cyclophosphamid	60
Tabelle 20: Proliferation von PC-3 Zelllinie abhängig von TXT	61
Tabelle 21: Proliferation von DU 145 Zelllinie abhängig von TXT	62
Tabelle 22: Proliferation von LNCaP Zelllinie abhängig von TXT	63
Tabelle 23: IC50 Werte und 95% Konfidenzintervalle für alle Substanzen, Zusammenfassung	64
Tabelle 24: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von Etoposid/PC-3	66
Tabelle 25: Relative IC50 Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Gefitinib/PC-3	66
Tabelle 26: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von Etoposid/DU 145	67
Tabelle 27: Relative IC50 Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Gefitinib/DU 145	67
Tabelle 28: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von Etoposid/ LNCaP	68
Tabelle 29: Relative IC50 Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Gefitinib/ LNCaP	68
	99

Tabelle 30: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von CPM/ PC3	70
Tabelle 31: Relative IC50 Werte für CPM in Abhängigkeit von Gefitinib / PC3	70
Tabelle 32: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von CPM/ DU 145	71
Tabelle 33: Relative IC50 Werte für CPM in Abhängigkeit von Gefitinib / DU 145	71
Tabelle 34: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von CPM/ LNCaP	72
Tabelle 35: Relative IC50 Werte für CPM in Abhängigkeit von Gefitinib/ LNCaP	72
Tabelle 36: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von TXT/ PC-3	74
Tabelle 37: Relative IC50 Werte für TXT in Abhängigkeit von Gefitinib / PC-3	74
Tabelle 38: Relative IC50 Werte für Iressa in Abhängigkeit von TXT/ DU 145	75
Tabelle 39: Relative IC50 Werte für TXT in Abhängigkeit von Gefitinib / DU145	75
Tabelle 40: Relative IC50 Werte für Gefitinib in Abhängigkeit von TXT/ LNCaP	76
Tabelle 41: Relative IC50 Werte für TXT in Abhängigkeit von Gefitinib / LNCaP	76
Tabelle 42: Ergebnisse bei Kombinationstherapie Gefitinib mit Etoposid	77
Tabelle 43: Ergebnisse bei Kombinationstherapie Gefitinib mit CPM	78
Tabelle 44: Ergebnisse bei Kombinationstherapie Gefitinib mit TXT	78
Tabelle 45: IC-50 Wert (μ M) für Einzelsubstanz Gefitinib für alle getesteten Tumore [50]	82

Abkürzungsverzeichnis

ABM: Antibiotic Antimycotic Solution

AP: Alkalische Phosphatase

ATCC: American Type Culture Collection

CT: Computertomographie

CLS: Cell Line Service

DMSO: Dimethylsulfoxid

DRU: Digitale rektale Untersuchung

EMP: Estramustinphosphat

FGC: Fast Growing Colony

FKS: Fetales Kälberserum

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon

HRPC: Hormonrefraktäres Prostatakarzinom

LDH: Laktatdehydrogenase

NEAS: Nichtessentielle Aminosäuren

PAP: Prostataspezifische Saure Phosphatase

PMS: Phenazine Methosulfate

PSA: Prostataspezifisches Antigen

RKI: Robert-Koch-Institut

TXT: Docetaxel

CPM: Cyclophosphamid

Danksagung

Für die Möglichkeit der Promotion möchte ich mich bei dem ehemaligen Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar in München, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf Hartung bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. med. Heiner van Randenborgh für die Überlassung des interessanten Themas, geduldige Betreuung und die Korrekturen der Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. med. Hubert Kübler für die Betreuung der Doktorarbeit.

Besonders möchte ich mich bei Fr. Dr. Antonie Lehmer, der ehemaligen Mitarbeiterin des Urologischen Forschungslabors des Klinikums rechts der Isar für Ihre intensive Betreuung und die wertvollen Ratschläge recht herzlich bedanken. Sie war für mich eine unerlässliche Hilfe während der gesamten Arbeit.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente gilt mein Dank an die Mitarbeiterinnen des Urologischen Forschungslabors des Klinikums rechts der Isar, Frau Stephanie Rämisch und Frau Doris Langer.

Für die Unterstützung bei der Gestaltung der Arbeit möchte ich mich bei meiner Verlobten Anna bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich hier bei meinen Eltern bedanken, die mir das alles ermöglicht haben.

Lebenslauf

Alexander Kaspin

Persönliche Daten

Geburtsdatum 04.04.1978
Geburtsort Charkow/Ukraine
Ausreise nach Deutschland 10/1994

Schulbildung

09/1984-07/1994 Gesamtschule in Charkow/Ukraine
01/1996-06/1996 Johann-Christian-Reinhard-Gymnasium in Hof
07/1998 Abschluss der allgemeinen Hochschulreife, Kolleg Volkmarsen

Studium

10/2000-09/2002 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
10/2002-11/2006 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
08/2002 ärztliche Vorprüfung
08/2003 1.Staatsexamen
08/2005 2.Staatsexamen
10/2005-10/2006 Praktisches Jahr in München, Israel (Chirurgie) und Zürich (Urologie)
11/2006 3.Staatsexamen (Note „sehr gut“)

Seit 12/2006 Assistenzarzt an der Urologischen Klinik München-Planegg