

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. H. L. Fehm

**Chloracetaldehyd trägt als Metabolit von Ifosfamid
neben 4-Hydroxyifosfamid zur zytostatischen
Wirkung in vivo bei**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Kirsten Börner
aus Hamburg
Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Wagner

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christopher Altgaßen

Tag der mündlichen Prüfung: 14.08.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.08.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
1 EINLEITUNG	5
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Versuchstiere	11
2.2 Tumorstamm	12
2.3 Pharmaka.....	13
2.3.1 Zytostatika und Metabolite	13
2.3.2 Anästhetika	13
2.4 Reagenzien zum Nachweis von Ifosfamid, 4-Hydroxyifosfamid	
und Chloracetaldehyd	14
2.4.1 Ifosfamid	14
2.4.2 4-Hydroxyifosfamid.....	14
2.4.3 Chloracetaldehyd	15
2.5 Versuchsaufbau und -durchführung.....	16
2.5.1 Anästhesie	16
2.5.2 Pharmakaapplikation.....	16
2.5.3 Pharmakokinetik.....	18
2.5.3.1 Ifosfamid-Nachweis	20
2.5.3.2 4-Hydroxyifosfamidnachweis	21
2.5.3.3 Chloracetaldehydnachweis	22
2.5.4 Tumortransplantation	23
2.5.5 Tumorwachstumsexperimente	24
2.5.5.1 Bestimmung des Tumorumfanges	24
2.5.5.2 Statistische Auswertung.....	25

3	ERGEBNISSE	26
3.1	Pharmakokinetiken	26
	3.1.1 Konzentrations-Zeit-Profile von Ifosfamid, Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid nach Ifosfamid-Bolusinjektion	26
	3.1.2 Konzentrations-Zeit-Profile der beiden Ifosfamid-Metabolite Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid als alleinige Infusion	31
3.2	Wachstumsverhalten der MX1-Tumoren nach Applikation äquimolarer Dosen von Ifosfamid, Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid	34
3.3	Wachstumsverhalten der MX1-Tumoren nach Applikation AUC-angepasster Dosen von Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid.....	36
4	DISKUSSION	38
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	44
6	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	46
7	LITERATURVERZEICHNIS	48
8	DANKSAGUNG.....	53
9	LEBENS LAUF.....	54
10	PUBLIKATIONEN	56

1 Einleitung

Lange Zeit bestand für die Behandlung von Tumoren nur die chirurgische Entfernung eines lokal soliden malignen Prozesses oder die Bestrahlung zur Verfügung. Nicht lokalisierte Tumoren sowie einige durch Absiedlung entstandene Metastasen waren auf diesem Wege unvollständig oder nicht erfassbar. Eine Erweiterung der Therapiemodalitäten durch Entdeckung und Entwicklung systemisch wirksamer Substanzen trug wesentlich zur Verbesserung der Behandlungsergebnisse bei.

Immer noch kann die chirurgische Entfernung des Primärtumors oder die von solitären Metastasen, z.B. der Lunge oder der Leber, die Therapie der Wahl sein. Die Eigenschaft maligner Tumoren infiltrierend zu wachsen und Metastasen abzusiedeln erschwert bei fortgeschrittenem Stadium die chirurgische Entfernung oder macht sie unmöglich. Die Strahlentherapie erzielt gute Erfolge in der Behandlung von Lymphomen, Seminomen und Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Auch als palliative Therapie zur Linderung von Symptomen lokaler Tumordestruktion nimmt die Strahlentherapie, z.B. durch Bestrahlung von Knochenmetastasen, einen wichtigen Stellenwert ein. Die Therapie systemischer onkologischer Erkrankungen und die Erfassung einzelner, z.B. nach einer Operation verbliebener, nicht diagnostizierbarer Tumorzellen macht jedoch eine Therapie auf zellulärer Ebene notwendig.

Auch die Chemotherapie verfolgt unterschiedliche Therapieansätze. Als kurative Behandlung mit dem Ziel der Heilung - z.B. von malignen Lymphomen, akuten Leukämien oder des Morbus Hodgkin, in palliativer Absicht zur Reduzierung des Tumorleidens, aber auch als neoadjuvante Therapie zur Herstellung einer operablen Situation und im Rahmen einer postoperativen Chemotherapie zur Verhinderung von Rezidiven und Metastasen - übernimmt die Chemotherapie eine wichtige Rolle in der onkologischen Behandlung. Eine Verknüpfung der unterschiedlichen Disziplinen und die Zusammenarbeit von Chirurgie, Onkologie

und Strahlentherapie ist für die Therapie vieler onkologischer Erkrankungen unerlässlich. Die interdisziplinäre Planung ermöglicht inzwischen eine umfassende Therapie bei malignen Erkrankungen - auch im Sinne einer adjuvanten und palliativen Behandlung.

Abgesehen von ihrer hohen Teilungsrate unterscheiden sich Tumorzellen in ihrem Stoffwechsel in vielen Punkten nicht von gesunden Zellen, was einen selektiven Eingriff in den Tumorstoffwechsel so gut wie unmöglich macht. Das gemeinsame Wirkprinzip der bekannten Zytostatika besteht darin, dass sie unterschiedliche Mechanismen der Zellteilung erschweren oder verhindern. Die Wirkung ist damit zwar bei Tumorzellen besonders stark ausgeprägt, betrifft aber auch andere Gewebe. Des Weiteren findet sich bei Tumorzellen häufig ein verminderter Repairmechanismus.

Es gibt unterschiedliche Angriffspunkte für Zytostatika, beispielhaft seien hier Alkylanzien, interkalierend wirkende Zytostatika, Antimetabolite - Folsäureanaloga, Pyrimidinanaloga und Purinanaloga, sowie Vinca-Alkaloide – genannt. Auch Hormone oder Antibiotika werden in der Therapie maligner Tumoren eingesetzt. Alkylierende Substanzen wirken primär phasenunspezifisch in jedem Stadium des Zellzyklus, da ihre zytostatische Wirkung auf eine Reaktion mit der DNA zurückzuführen ist. Der Wirkmechanismus ist durch die Bildung von positiven Alkylgruppen zu erklären, welche kovalente Bindungen mit den Stickstoffatomen von Adenin und Cytosin, dem Sauerstoff des Guanosin, den Phosphatgruppen der DNA und den Proteinen bilden. Bifunktionelle Alkylantien können darüber hinaus zu einer festen Quervernetzung der DNA-Stränge - sogenannten „cross-links“ - führen, die eine Trennung bei der Reduplikation unmöglich machen, oder welche die DNA fest an andere Moleküle binden und somit eine Hemmung der DNA-Synthese oder Strangbrüche bewirken (Kohn, 1996; Teicher, 1997; Colvin, 1999). Durch eine Kombination von Wirkstoffen mit unterschiedlichen Angriffspunkten lassen sich häufig Therapieerfolge verbessern. Ifosfamid wird aufgrund seines Wirkungsmechanismus zu den alkylierenden Verbindungen gezählt.

Die Entdeckung dieser alkylierenden chemotherapeutischen Substanzen nimmt den traurigen Ursprung in dem zunächst als Kampfgas entwickelten Stickstoff-Lost, dem sogenannten Senfgas, das im 2. Weltkrieg durch einen Luftangriff der Alliierten auf einen nazideutschen Tanker, der eine große Menge des Giftgases im italienischen Hafen Bari entlud, in großen Mengen freigesetzt wurde. Nach der Senfgasexplosion wurde bei den Betroffenen eine Hypoplasie des Knochenmarks und lymphatischen Gewebes festgestellt (Kohn, 1996; DeVita, 1997).

Bei der Suche nach einer für den Patienten nebenwirkungsärmeren Substanz wurden Stickstofflostderivate mit einem Oxazaphosphorinring entwickelt (Brock und Willmanns, 1958; Arnold et al., 1958). Sie können als inaktive Substanz, als „prodrug“, verabreicht werden und werden erst im Organismus zu ihrer Wirkform metabolisiert. Hier gehörte Cyclophosphamid zu den ersten aus dieser Gruppe eingesetzten Substanzen (Abb.1). Sein Struktur analogon Ifosfamid, entstanden durch die Verschiebung einer der beiden Chlorethylgruppen vom exozyklischen Stickstoff zu einem Stickstoff des Oxazaphosphorinringes (Wagner, 1994, Furlanut et al., 2003), zeigt bei der Metabolisierung durch Isoenzyme des P 450 in der Leber zu seinen aktiven Metaboliten eine Änderung bzw. Verschiebung der Produkte. Dieser Unterschied hat Veränderungen der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik zur Folge (Wagner et al., 1981, Sladek, 1988, Kaijser et al., 1994).

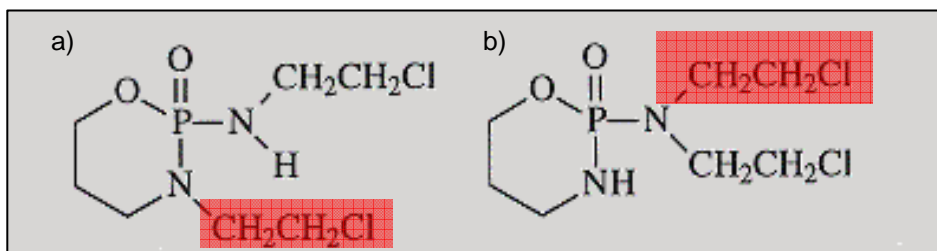


Abb.1: Strukturformeln von a) Ifosfamid, b) Cyclophosphamid. Die rot unterlegten Areale heben die Chlorethylgruppen hervor, welche beim Ifosfamid am Oxazyphosphorinring und beim Cyclophosphamid am exozyklischen Stickstoff gebunden sind.

Während Cyclophosphamid beim Menschen fast vollständig zu dem zytostatisch wirksamen, aktiven 4-Hydroxymetaboliten transformiert wird, sehen wir bei der Umwandlung von Ifosfamid einen zweiten Metabolismus. Bis zu 50% der zugeführten Dosis des Ifosfamid kann dechloroethyliert werden. Durch Seitenkettenoxidation wird ein inaktiver Metabolit gebildet – das 3-Dechloroethyl-Ifosfamid. Wie auf Abb.2 gezeigt kommt es dabei gleichzeitig zur Freisetzung von Chloracetaldehyd. Am extrazyklischen Stickstoffatom wird, wenn auch in geringerer Masse, unter Bildung von 2-Dechloroethylifosfamid ebenfalls Chloracetaldehyd freigesetzt.

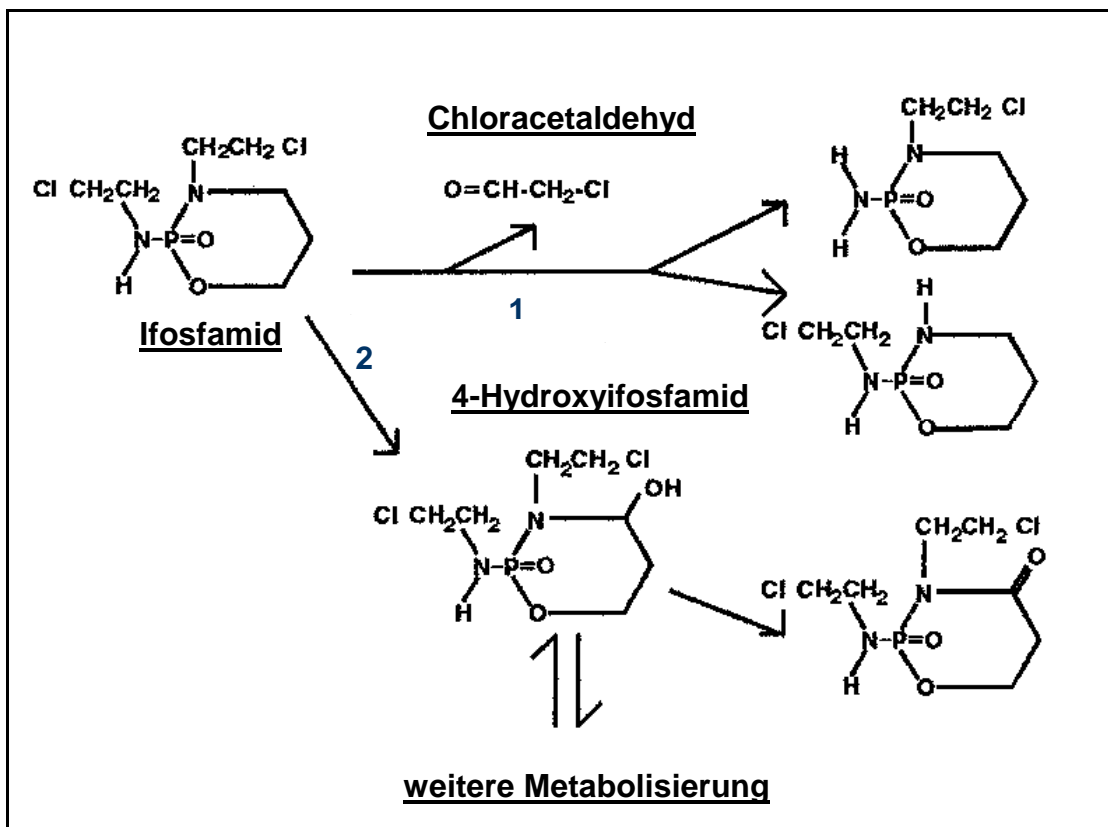


Abb.2: Metabolismus von Ifosfamid. Metabolisierungsweg 1 kennzeichnet die Freisetzung von Chloracetaldehyd, Metabolisierungsweg 2 die Aktivierung zu 4-Hydroxyifosfamid

Chloracetaldehyd wurde und wird für die Nebenwirkungen, wie Neurotoxizität (DiMaggio et al., 1994; Goren et al., 1996; Nicolao et al., 2003) und Nephrotoxizität (Skinner et al., 1993; Aleksa et al., 2004), verantwortlich gemacht. Um dieses Nebenwirkungsprofil zu reduzieren, wurde in tierexperimentellen Studien der Versuch unternommen, die für die Aktivierung benötigten Enzyme der Leber zu induzieren, so dass die Metabolisierung von Ifosfamid zugunsten des 4-Hydroxymetaboliten verschoben wurde, um die Bildung von Chloracetaldehyd zu reduzieren (Brain et al., 1998). Die Änderung der Pharmakokinetik zeigte allerdings keine Änderung der zytostatischen Potenz.

Untersuchungen von Chloracetaldehyd auf seine mutagene und kanzerogene Wirkung im Zusammenhang mit der Herstellung von Polyvinylchlorid in der biochemischen Industrie haben gezeigt, dass Chloracetaldehyd mit den Basen der Einzelstrang-DNS reagiert und so Schädigungen herbeiführt. Durch die Entstehung von zyklischen Etheno-DNS-Addukten wird die Fähigkeit der DNS zur Doppelhelixbildung beeinträchtigt (Jacobsen und Humayun, 1990; Kuchemmeister et al., 1998; Stevens et al., 1989; Spengler et al., 1998; B.Tudek et al., 1999). Choi et al. beschreibt die Fähigkeit des Chloracetaldehydes für Mutationen im Rahmen von C/G zu T/A-Transpositionen verantwortlich zu sein (Choi et al., 2004).

Klinische und experimentelle Studien zeigen, dass Ifosfamid und Cyclophosphamid bei einigen Tumoren, wie z.B. bei Weichteiltumoren, keine komplette Kreuzresistenz aufweisen und dass Ifosfamid ein grösseres zytotoxisches Potential aufweist (Brade et al., 1985; Bramwell et al., 1987).

In der Arbeit von Brüggemann et al. (Brüggemann et al., 1997) zeigte sich während der Untersuchung von Thiolen als mögliche Protectorsubstanzen für Nierentubuluszellen, dass bei der Gabe des Metaboliten Chloracetaldehyd in vitro keineswegs nur eine toxische Wirkung auf die Nierentubuluszellen ausgeübt wurde. Sowohl die Nierentubuluszellen als auch das Wachstum der getesteten Zellen solider Tumoren wurde drastisch eingeschränkt. Die Zellüberlebensrate der Tumorzellen aus der Zelllinie MX-1 wurde konzentrationsabhängig reduziert, wobei beide Metabolite, sowohl das Chloracetaldehyd als auch das 4-Hydroxyifosfamid, ähnliche zytotoxische Effekte aufwiesen. Wurden

Chloracetaldehyd bis dahin nur Nebenwirkungen zugeschrieben, zeigt sich somit zumindest *in vitro* auch eine konzentrationsabhängige klinisch relevante Reduktion von Tumorzellen. Durch die Kombination von 4-Hydroxyifosfamid mit Chloracetaldehyd konnte sogar ein additiver zytotoxischer Effekt bewiesen werden (Brüggemann et al., 1997). Die Kombination der beiden Einzelsubstanzen führte im Vergleich zur alleinigen Gabe der Metabolite des Ifosfamid zu einer deutlichen Verstärkung der Toxizität.

Nach diesen *in vitro* gewonnenen Erkenntnissen stellte sich nun die Frage, ob Chloracetaldehyd auch *in vivo* einen zytotoxischen Effekt auf solide Tumoren ausübt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die zytostatische Wirkung von Chloracetaldehyd im Vergleich zu 4-Hydroxyifosfamid, das bisher - analog zu 4-Hydroxycyclophosphamid - als einzig aktiver Metabolit angesehen wurde, *in vivo* im Tierversuch am Beispiel eines Mammakarzinoms zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Zur Gewinnung pharmakokinetischer Daten von Ifosfamid und seinen Metaboliten 4-Hydroxyifosfamid und Chloracetaldehyd wurden weibliche NMRI Mäuse (Charles River, Deutschland) und für die Therapieversuche weibliche athymische Nacktmäuse (nu-nu) mit MX1-xenotransplantierten Tumoren verwendet. Zum Zeitpunkt der Tumorimplantation waren die Tiere zwischen 5 und 6 Wochen alt und besaßen ein Gewicht zwischen 18 und 28 g.

Die Wahl zweier unterschiedlicher Mäusestämme ist durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Mäuse begründet. Die athymischen Nacktmäuse sind aufgrund der fehlenden Eigenschaft fremdes Gewebe abzustößen, was durch eine fehlende T-Zell-Prägung bedingt ist, sehr gut geeignet, um Therapieversuche an artfremden Tumoren durchzuführen. Somit besteht die Möglichkeit, den Tieren – wie in diesem Fall – menschliche Tumorzellen zu implantieren und bei der systemischen Behandlung der *Mäuse* den Effekt auf *menschliche* Tumorzellen zu untersuchen. Allerdings sind die Nacktmäuse durch die für die Transplantation von artfremdem, menschlichem Gewebe notwendige Immunsupprimierung - bedingt durch das Fehlen von suffizienten T-Zellen - sehr anfällig für Infektionen. Um diese zu verhindern und die Tiere nicht unnötig Keimen auszusetzen wurden entsprechende Maßnahmen zur Hygiene eingehalten. Die Blutentnahme bei Mäusen erfolgt über den retrobulbären Plexus in eine Kapillare. Hierbei wird den Tieren mit der notwendigen Häufigkeit zur Gewinnung pharmakokinetischer Daten durch Drehen der Kapillare am medialen Pol des Auges eine Verletzung und potentielle Erregereintrittspforte zugefügt. Um das Überleben der Tiere ohne Infektion über 30 Tage zu gewährleisten und nicht unnötig Mäuse aus der Untersuchung ausschließen zu müssen, wurden die pharmakokinetischen Untersuchungen an NMRI Mäusen durchgeführt.

Die Mäuse wurden in Gruppen bis zu 5 Tieren in einem autoklavierten Käfig der Größe 2 (Makrolon) mit Atromin-Sägemehl-Einstreu in einem keimarmen Raum mit konstanter Lufttemperatur von 24 (+/- 1) °C und einer Luftfeuchtigkeit von 70% gehalten. Von 18.00 Uhr bis 6.00 Uhr wurde eine Dunkelperiode eingehalten. Trinkwasser und Futter in pelletierter Form (Atromin-Standard-Diät) stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Das Tierversuchsvorhaben war vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein unter dem Aktenzeichen X 330a-72241.122-4 (33-5/97) am 5. September 1997 genehmigt worden.

2.2 Tumorstamm

Der verwendete MX-1-Tumor wurde von der Firma „Cell Lines Services“ in Heidelberg als Zellsuspension bezogen. MX-1 ist die Bezeichnung für ein vom Menschen stammendes, solide wachsendes Mammakarzinom, welches zu den Referenztumoren des NCI zählt.

2.3 Pharmaka

2.3.1 Zytostatika und Metabolite

Ifosfamid und 4-Hydroxyifosfamid (welches spontan in wässriger Lösung zu 4-Hydroxyifosfamid zerfällt) sind von Dr. J. Pohl (ASTA Medica AG, Frankfurt) freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

Ifosfamid: 3-(2-Chloräthyl)-2-(2-chloräthyl)-amino-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid
Summenformel: C₇ H₁₅ Cl₂ N₂ O₂ P
Molekulargewicht: 261,09

4-Hydroxyifosfamid:
Summenformel: C₇ H₁₅ Cl₂ N₂ O₃ P
Molekulargewicht: 277,09

Chloracetaldehyd (Sigma-Aldrich Chemical Co. Steinheim)
Summenformel: C₂ H₃ Cl₁ O₁
Molekulargewicht: 78,5

2.3.2 Anästhetika

Xylazin: 5,6-Dihydro-2-(2,6-xylidino)-4H-1,3-thiazin (Bayer Leverkusen)
Pentobarbital-Natrium: (Sanofi Ceva, Hannover)

Zur Betäubung der Tiere wurde ein Gemisch aus Xylazin und Pentobarbital-Natrium verwendet. Beide Lösungen wurden wegen sonst auftretender Ausfällungen zuerst getrennt voneinander im Verhältnis 1:10 mit 0,9% NaCl angesetzt und dann 1:1 gemischt.

2.4 Reagenzien zum Nachweis von Ifosfamid, 4-Hydroxyifosfamid und Chloracetaldehyd

2.4.1 Ifosfamid

Ifosfamid wurde mit Hilfe der N/P-Flammenionisations-Gaschromatographie quantitativ bestimmt. Bei den hierfür benötigten Reagenzien handelte es sich um:

Trofosfamid (interner Standard) (ASTA Medica)

Dichlormethan (Merck)

Ethanol (Merck)

Ethylacetat (Merck)

2.4.2 4-Hydroxyifosfamid

4-Hydroxyifosfamid wurde mittels der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) mit Hilfe der folgenden Reagenzien bestimmt:

5% Trichloressigsäure

Reagenzlösung: 250 mg 3-Aminophenol (Merck), 2 x umkristallisiert

300 mg Hydroxylammoniumchlorid

ad 100 ml 1N HCl

Die Reagenzlösung wurde unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt und lichtgeschützt verwahrt.

4-Hydroxyphosphamidsalz (ASTA Z 7557)

5N Carbonatpuffer, pH 9,8

Chloroform / Isopropanol (90:10, v/v) (Merck)

Fließmittel: 79% Aqua. Dest.

20% Acetonitril

1% Ameisensäure

2.4.3 Chloracetaldehyd

Chloracetaldehyd wurde in der Gaschromatographie nachgewiesen. Folgende Reagenzien wurden eingesetzt:

0,37% Formaldehydlösung (3,7% Formaldehyd (Riedel-de-Haen, Seelze)
1:100 verdünnt mit 0,9% NaCl)

Interner Standard :1µl Chloroform (CHCl₃) (Merck) auf 100 ml Methanol (Merck)
Chloracetaldehyd (Sigma-Aldrich)

2.5 Versuchsaufbau und -durchführung

2.5.1 Anästhesie

Die Mäuse wurden zur Tumortransplantation und für alle Versuche mit dem oben beschriebenen Xylazin/Pentobarbital-Natrium Gemisch intraperitoneal betäubt. Diese Art der Betäubung versetzt die Tiere in eine ca. 1 bis 1 ½ h dauernde Narkose. Für die Versuche zur Gewinnung pharmakokinetischer Daten und zum Tumorwachstum mussten die Mäuse ca. 3 h narkotisiert sein. Um die Tiere für den gewünschten Zeitraum ruhig zu stellen und somit eine komplikationslose Infusion zu garantieren, wurde die Narkosetiefe durch intermittierendes Testen des Kornealreflexes überwacht und gegebenenfalls Narkosemittel intraperitoneal nachgespritzt. Während der gesamten Narkose wurden die Tiere, um sie vor dem Auskühlen zu bewahren, mit einer Wärmelampe bestrahlt. Den gegenüber dem Auskühlen empfindlicheren Nacktmäusen stand auch in der Aufwachphase eine Wärmelampe für weitere 2 h zur Verfügung, so dass die Tiere - solange in Narkose - gewärmt wurden und dann die Möglichkeit hatten aus dem Wärmekegel herauszukrabbeln.

2.5.2 Pharmakaapplikation

Den narkotisierten Tieren wurde ein Zugang mit Hilfe einer Kanüle in eine der beiden lateralen der vier Schwanzvenen gelegt. An die Kanüle wurde ein Perfusorschlauch geschraubt. Der Zugang wurde mit Leukoplast fixiert, so dass die Kanüle ruhig in der Vene lag, um auch nur minimale Verletzungen der Venenwand durch die Kanülenspitze und ein damit verbundenes Infundieren der Pharmaka / Zytostatika paravasal zu verhindern (Abb.3).



Abb.3: Punktion der Schwanzvene der Maus nach intraperitonealer Anästhesie.

Für Versuche zur Pharmakokinetik wurden die Tiere hierfür auf einer Korkplatte gelagert. Während der Therapiephase wurde die tumortragende Extremität in einem Wasserbad auf einer konstanten Temperatur von $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ gehalten (Wiedemann et al., 1993).

Ifosfamid wurde als einziges Medikament als Bolus gespritzt, da die Muttersubstanz erst in der Leber zu den Metaboliten 4-Hydroxyifosfamid und Chloracetaldehyd abgebaut wird (Wagner, 1994). Um das pharmakokinetische Profil nachzuahmen, das bei der Metabolisierung von Ifosfamid im Blut entsteht, wurde bei der Untersuchung der Pharmakokinetik und der Wirkung der einzelnen Metabolite den Tieren eine $2 \frac{1}{2}$ h dauernde Infusion von 4-Hydroxyifosfamid oder Chloracetaldehyd verabreicht.

Die Mäuse erhielten zur Gewinnung pharmakokinetischer Daten und für die Therapieversuche von MX1-xenotransplantierten Mäusen entweder 250 mg/kg Ifosfamid, äquimolar 280 mg /kg 4-Hydroxyifosfamid, wirkungsgleich zu Chloracetaldehyd 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid oder ebenfalls zu Ifosfamid äquimolar 75 mg/kg Chloracetaldehyd. Die Pharmaka wurden den Tieren in einem Volumen von jeweils 2,5 ml appliziert. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge Ringerlösung - ebenfalls in einer $2 \frac{1}{2}$ h dauernden Infusion. Eine exakte

Applikation von nur 2,5 ml über einen Zeitraum von 2 ½ h konnte durch eine Spezialpumpe sichergestellt werden.

2.5.3 Pharmakokinetik

Zunächst erfolgte die Applikation der Muttersubstanz Ifosfamid (250 mg/kg) als Bolus, um die Blutspiegel von Ifosfamid, Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid nach Metabolisierung in der Leber zu bestimmen. Hierzu wurde den Tieren 10 µl Blut aus dem retrobulbären Venenplexus mit einer heparinisierten Kapillare entnommen. Bei der Entnahme wird der retrobulbäre Plexus geschädigt. Dieser Umstand limitiert die Entnahmehäufigkeit. Da für die Bestimmung der drei oben genannten Substanzen drei unterschiedliche Kapillaren notwendig sind, wurden verschiedene Mäuse für die Versuche benötigt. Hierin erklären sich die in Tab.4 abgebildeten unterschiedlich Fallzahlen.

Tabelle 4: Applikation von Ifosfamid und als Bolus und pharmakokinetische Bestimmung der Muttersubstanz und den in der Leber metabolisierten Abbauprodukten 4-Hydroxyifosfamid und Chloracetaldehyd mit Fallzahlen

Appliziertes Pharmakon	Bestimmung von	Fallzahlen
Ifosfamid 250 mg/kg	Ifosfamid	n=10
Ifosfamid 250 mg/kg	4-Hydroxyifosfamid	n=5
Ifosfamid 250 mg/kg	Chloracetaldehyd	n=6

Es erfolgte daraufhin die alleinige Infusion der Metabolite in äquimolaren Dosen. 280mg/kg 4-Hydroxyifosfamid entsprechen auf molarer Basis 250 mg/kg Ifosfamid. Allerdings zeigte sich bei der Auswertung der Wirkstoffspiegel, dass aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Chloracetaldehyd keine vergleichbaren Konzentrationen erreicht werden konnten. Es zeigte sich lediglich ein Peak bei der ersten Blutentnahme. Mit Dosissteigerung auf 75 mg/kg Chloracetaldehyd konnte ein Wirkstoffspiegel im Blut erreicht werden, welcher jedoch nicht die Spiegel nach Ifosfamidinjektion erreichte. Daraufhin erfolgte die Dosisreduktion von 4-Hydroxyifosfamid, um eine AUC-angepasste Pharmakaapplikation zu erreichen. Dies erklärt die Infusion von 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid (siehe Ergebnisse 3.3).

Tabelle 5: Applikation der einzelnen Metabolite und deren Bestimmung im Blut

Appliziertes Pharmakon	Bestimmung von	Fallzahlen
280 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid	4-Hydroxyifosfamid	n=7
75 mg/kg Chloracetaldehyd	Chloracetaldehyd	n=6
40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid	4-Hydroxyifosfamid	n=5

Nach Ifosfamid-Bolusinjektion zur Bestimmung der Muttersubstanz im Blut und Ermittlung der Halbwertszeit wurden Proben zu den Zeiten 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90 und 120 min entnommen. Zur Bestimmung der Metabolite, die nach Ifosfamid Bolusinfusion entstehen, wurden Proben sowohl zur Bestimmung von 4-Hydroxyifosfamid als auch Chloracetaldehyd zu den Zeiten 0, 15, 30, 60, 90, und 120 min entnommen.

Während alleiniger Infusion der beiden Metabolite Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid über 2 ½ h wurden Blutproben aus dem retrobulbären Venenplexus zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 158, und 165 min nach Start der Infusion gewonnen.

2.5.3.1 Ifosfamid-Nachweis

Die quantitative Messung von Ifosfamid erfolgte mittels N/P-Flammenionisations-Gaschromatographie (Kurowski und Wagner, 1993). Die 10 µl Kapillare wurden in 2 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und daraufhin mit 10µl des internen Trofosfamid-Standards (3,5 mg Trofosfamid gelöst in 10 ml Ethylacetat) versehen. Trofosfamid, welches als interner Standard benutzt wird, ist gleichfalls ein Oxazaphosphorinzytostatikum und weist drei β-Chlorethylgruppen auf und damit eine mehr als das Ifosfamid, das zwei β-Chlorethylgruppen besitzt. Es eignet sich gut als interner Standard, da es ein ähnliches physikochemisches Verhalten und für die Bestimmung am N/P-Flammenionisationsdetektor im Gaschromatographen ein gleiches Stickstoff/Phosphatverhältnis im Molekül aufweist.

Die Probe wurde zentrifugiert und danach 1,9 ml in ein konisches Schliffstoffglasröhrchen überführt. Erneut wurde die Probe mit 2 ml Dichlormethan extrahiert und nach Zentrifugation sind 1,9 ml der organischen Phase zu dem aus der ersten Extraktion gewonnenem Aliquot gegeben worden. Im Rotationsverdampfer wurde die Probe eingeeengt, mit 200 µl Ethylacetat aufgenommen. 1-2 µl der Probe wurden für die Bestimmung mittels der Gaschromatographie entnommen. Es wurde eine HP-5 Säule (Hewlett-Packard-5, 5% Phenyl-Methyl-Silikon) verwendet und N₂ als Trägergas benutzt. Die Temperatur des Ofens betrug 195°C, die des Injektors 300 °C und die des Detektors 300°C. Standards wurden hergestellt durch die Zugabe von bekannten Mengen Ifosfamid zu dem Plasma gesunder Probanden.

2.5.3.2 4-Hydroxyifosfamidnachweis

4-Hydroxyifosfamid wurde nach einer modifizierten Methode von Alacron bestimmt (Alacron, 1968). Störende Fluoreszenzen nach Erhitzen von Acrolein zusammen mit 3-Aminophenol und Umsetzung zu 7-Hydroxychinolin wurden durch einen zusätzlichen HPLC-Trennungsschritt entfernt (Kurowski und Wagner, 1993).

Zur Bestimmung von 4-Hydroxyifosfamid wurden 10 µl Mäuseblut nach der Entnahme direkt in 1000 µl 5% Trichloressigsäure enteweißt. Nach kräftigem Schütteln wurden die Proben für 3 min bei 3000 U /min zentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden abpipettiert und zu 600 µl der Reagenzlösung bestehend aus 3-Aminophenol, Hydroxylammoniumchlorid und HCl hinzugefügt. Nach erneutem Schütteln wurden die Proben für 20 min bei 95°C im Eppendorf Thermomixer inkubiert. Das dabei freigesetzte Acrolein reagiert unter diesen sauren Bedingungen mit 3-Aminophenol zu 7-Hydroxychinolin, das fluorometrisch bestimmt werden kann. Um, wie oben beschrieben, störende Fluoreszenzen zu verhindern und die Sensitivität der Methode zu erhöhen, wurde das 7-Hydroxychinolin aus dem entstandenen Gemisch noch extrahiert. Hierfür wurden 1000 µl des Derivatisierungsansatzes zunächst mit 110µl 5N NaOH neutralisiert und dann mit 200 µl Carbonatpuffer alkalisiert. Nach Zugabe von 6 ml Chloroform / Isopropanol wurde die Probe für 15 min in einen Rundaufschüttler gegeben (Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel). Zur Phasentrennung wurde 10 min bei 3000 U zentrifugiert und die obere Phase abgesaugt. 5 ml der organischen Phase wurden in ein Spitzbodenröhrchen überführt und im Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 35°C eingedunstet (Rotavapor RE111, Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Schweiz; Büchi 461 Water bath). Der Rückstand wurde in 80 µl Fließmittel aufgenommen und mit Hilfe des Vibrofix für 30 sec durchmischt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Trennung erfolgte durch HPLC (Hewlett Packard Series 1050) mit einer Phenyl-Säule bei einem Fluß von 1ml/min (Spherisorb-Phenyl, 239 x 4,6 mm innerer Durchmesser, Partikelgröße 5µm; Shandon, Astmoor, Cheshire, U.K.). 7-Hydroxychinolin wurde nach Auftrennung an einem Fluoreszenz-Detektor

gemessen (HP 1046A). Die Excitationswellenlänge betrug hierbei 350nm und die Emmissionswellenlänge 515 nm.

2.5.3.3 Chloracetaldehydnachweis

Chloracetaldehyd wurde mittels ECD-Gaschromatographie (electron-capture-detector) bestimmt (Kurowski und Wagner, 1993). Unverzöglich nach der Blutentnahme wurden die 10 µl –Kapillaren in Eppendorf-Cups in 100 µl 0,37% Formaldehydlösung 2 min ausgeschüttelt. Die Formaldehydlösung dient zum Schutz des Chloracetaldehyds ohne die Messung zu verändern, da in der Gaschromatographie das Chlor und nicht das Aldehyd gemessen wird. Die Zellfragmente der auf diese Weise lysierten Blutzellen wie, z. B. Erythrozyten, wurden bei 8000 U/min für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein leeres Eppendorf-Cup überführt. Bis zur weiteren Analyse, die stets in einem Zeitraum von 12 h erfolgte, wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Messung wurden 20 µl des gewonnenen Vollblutlysats mit 50 µl des internen Standards versetzt und vermischt. Hiervon wurde 1 µl in den Gaschromatographen (Gaschromatograph Hewlett-Packard Series II 5890) injiziert. Die verwendete HP-5 Säule (Hewlett-Packard, Crosslinked 5% Phenyl-Methyl-Silikon) benutzte Helium als Trägergas. Chloracetaldehyd und der interne Standard wurden bei 300°C durch einen EC-Detektor (⁶³Ni Electron-Capture Detector) bestimmt. Die Injektor-Temperatur betrug 200°C, die Ofentemperatur 35°C zu Anfang. Während der ersten drei Minuten wurde um 45°C pro Minute bis zu einer Endtemperatur von 120°C gesteigert und für eine Minute gehalten. Die Standards wurden, wie auch bei Ifosfamid, durch die Zugabe einer bekannten Chloracetaldehydmenge zu Blutproben gesunder Probanden hergestellt.

2.5.4 Tumortransplantation

Die aufbereitete Tumorzellsuspension wurde zum Heranzüchten eines soliden Tumors subkutan in den Nacken von ein bis zwei Nacktmäusen injiziert. Nach Heranwachsen auf eine Größe von ein bis eineinhalb cm^3 wurden die Tiere betäubt und der Tumor steril entnommen. Die Tiere wurden danach sofort getötet. Der entnommene Tumor wurde in ca. 1 mm^3 grosse Stücke geschnitten, welche bis zur Implantation auf die Versuchstiere in einer Petrischale in einem Nährmedium zwischengelagert wurden, um vitales Tumorgewebe als Xenotransplantate verwenden zu können.

Die für die Tumorwachstumsversuche vorgesehenen Tiere wurden intraperitoneal betäubt. Nach eingetretener Anästhesie und Desinfektion der Hinterpfote wurde die Haut dorsal, proximal der rechten Hinterpfote mit Hilfe eines Skalpellts inzidiert und mittels einer Knopfsonde die Haut subcutan über der Hinterpfote abgelöst. In die so entstandene Tasche wurde das bis dahin in der Petrischale in Medium gelagerte Tumorstück plziert. Um den entstandenen Defekt zu verschliessen und die Haut zu adaptieren wurden Steri-Stripes verwendet. Gleichzeitig verhinderte diese Verschlussstechnik das Abrutschen des Tumors nach proximal und gewährleistete ein Anwachsen des Tumors über der Hinterpfote, um vergleichbare Werte bei der Messung der Tumoren zu gewährleisten. Die Größe der Tumoren wurde 2 mal wöchentlich dokumentiert. Nach ca. 2-3 Wochen hatten die Tumoren eine Größe von $180 \pm 20 \text{ mm}^3$ erreicht. Die Wahl, die Tumoren auf die Hinterpfote der Tiere zu transplantieren, erfolgte, da hier die Möglichkeit der Temperaturkontrolle während der Therapie bestand. Wiedemann et al. (Wiedemann et al., 1993) hatten gezeigt, dass die Temperatur einen signifikanten Einfluß auf die Effektivität einer zytostatischen Therapie ausübt. Um die Wirkung auf menschliche MX1-Tumorzellen zu untersuchen, war es deshalb nötig, die Tumoren auf einer dem Menschen angepassten Temperatur von 37°C zu halten. Bei einer tumortragenden Pfote besteht die Möglichkeit, diese mittels eines erwärmten Wasserbades zusammen mit der Pfote auf der gewünschten Temperatur zu halten.

2.5.5 Tumorwachstumsexperimente

Nur Tiere mit geometrisch geformten Tumoren ohne äußerlich erkennbare Nekrosen wurden für Therapieversuche verwendet. Die Tiere wurden mit den in Tabelle 6 angegebenen Dosierungen behandelt. Als Kontrolle dienten Tiere, denen unter den gleichen Bedingungen, das heißt in Narkose, und innerhalb von 2,5 h 2,5 ml Ringerlösung infundiert wurde.

Tabelle 6: Fallzahlen für die Behandlung MX1-tumortragender Mäuse

Behandlung der MX1-tumortragenden Mäuse mit Dosisangabe	Fallzahlen
250 mg/kg Ifosfamid	n=6
280 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid	n=8
40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid	n=6
75 mg/kg Chloacetaldehyd	n=7
Kontrollen (Ringerlösung)	n=8

2.5.5.1 Bestimmung des Tumorumens

Um das Volumen der MX1-Tumoren auf den Pfoten der Mäuse bestimmen zu können, wurde eine Präzisionsschublehre benutzt. Es wurden die Länge (A), Breite (B) und die Höhe (C) der Tumoren bestimmt. Beim Ausmessen der Höhe der Tumoren wurde der Tumor plus die tumortragende Pfote mit der Schublehre

erfasst. Von der so ermittelten Höhe wurden 2 mm, damit die durchschnittliche Höhe der Pfoten, subtrahiert. Das Tumolvolumen wurde dann mit der Formel $(\pi/6) \cdot A \cdot B \cdot C$ bestimmt, welche eine halbe elipsoide Form errechnet.

2.5.5.2 Statistische Auswertung

Zur Berechnung der AUC (area under the curve), also der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve im Blut, mit Hilfe der Trapezregel und zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurde das Programm TOPFIT (Version 2.0, Heinzel et al., 1993) benutzt. Zur statistischen Signifikanzberechnung wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 Pharmakokinetiken

3.1.1 Konzentrations-Zeit-Profile von Ifosfamid, Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid nach Ifosfamid-Bolusinjektion

Wie in Abb. 7 a/b ersichtlich zeigt die Pharmakokinetik der Muttersubstanz Ifosfamid eine Kinetik erster Ordnung, das heißt der Anteil des Stoffes, der pro Zeiteinheit eliminiert wird, ist konstant und der Konzentrationsabfall stellt bei logarithmischer Darstellung eine Gerade dar.

Die Elimination von Ifosfamid ist durch die Metabolisierung von Ifosfamid in der Leber zu den beiden reaktiven Metaboliten Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid zu erklären. (siehe Abb. 2) Die renale Clearance ist bei der Elimination sehr gering.

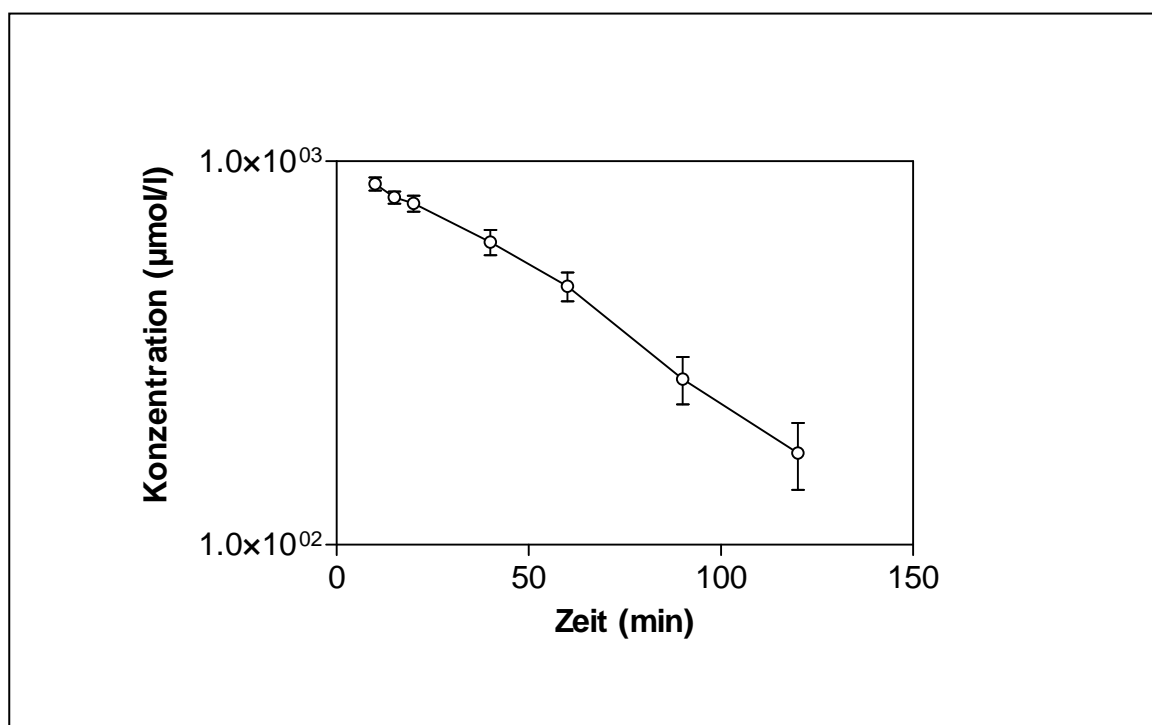


Abb. 7 a: Logarithmische Darstellung des Konzentrations-Zeit-Profiles von Ifosfamid (O) nach Applikation von 250 mg/kg Ifosfamid

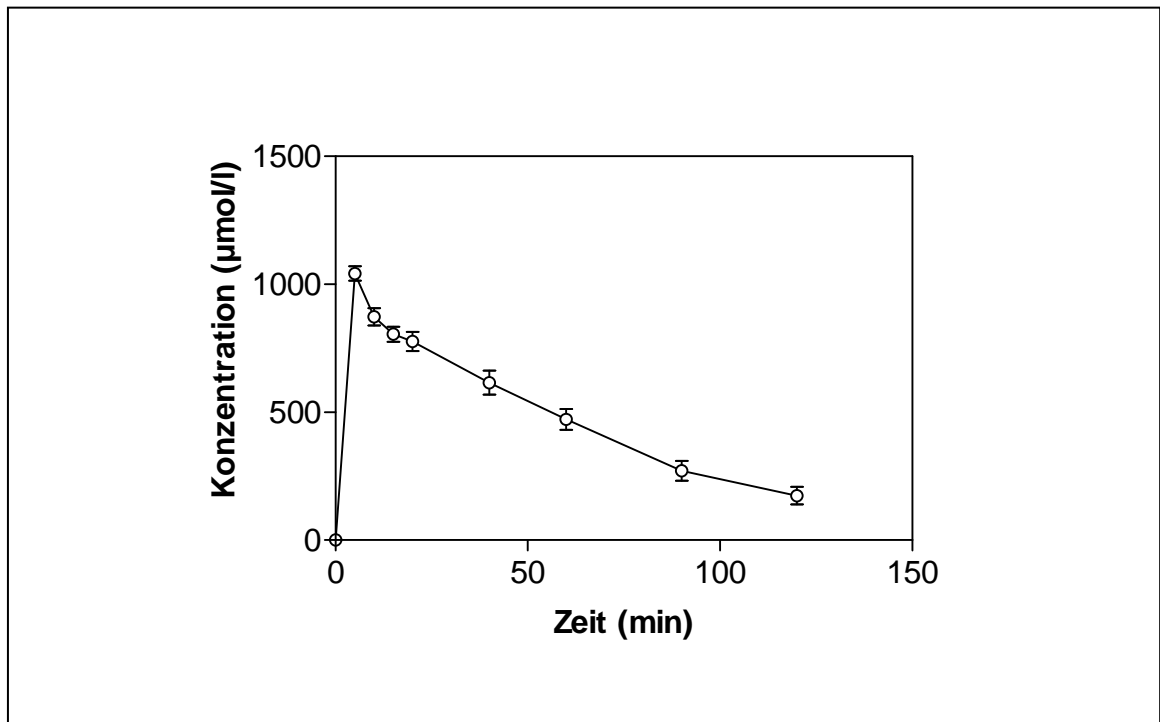


Abb.7 b: Konzentrations-Zeit-Profil von Ifosfamid (O) nach Applikation von 250 mg/kg Ifosfamid

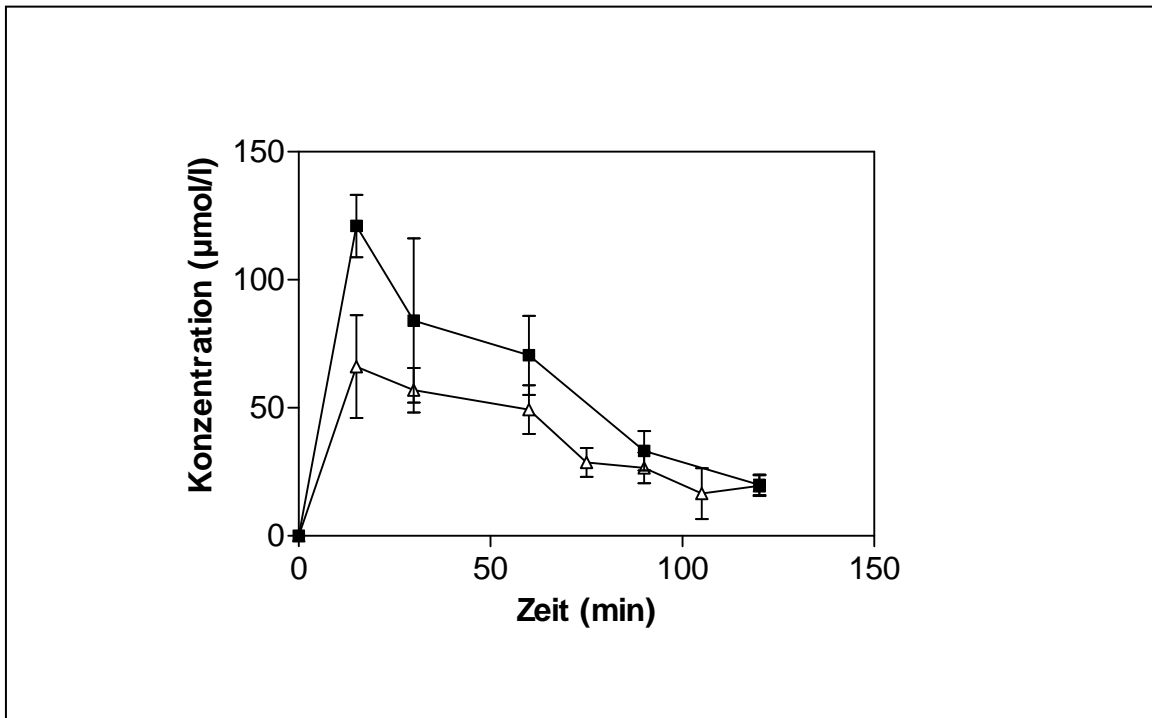


Abb.8: Konzentrations-Zeit-Profile von Chloroacetaldehyd (△) und 4-Hydroxyifosfamid (■) nach Gabe der Muttersubstanz Ifosfamid

Weiter wurden, wie in Abb. 8 gezeigt, die Konzentrationen von 4-Hydroxyifosfamid und Chloroacetaldehyd im Blut nach Ifosfamidgabe ermittelt, damit in den nachfolgenden Versuchen bei alleiniger Infusion der Metabolite deren Konzentrations-Zeit-Profile, wie sie nach Gabe der Muttersubstanz Ifosfamid gemessen wurden, für Chloroacetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid imitiert werden konnten. Wie aus Abbildung 8 zu entnehmen ist, zeigen die Blutspiegelkurven der beiden Metabolite einen annähernd parallelen Verlauf.

Allerdings zeigten sich höhere Peakkonzentrationen und AUC's (Tab. 9) für das 4-Hydroxyifosfamid im Vergleich zum Chloroacetaldehyd. Die in Tabelle 9 aufgeführten Halbwertszeiten für die beiden Metabolite nach Ifosfamid-Bolusgabe

sind lang. Dies erklärt sich aus der langen Halbwertszeit der Muttersubstanz Ifosfamid. Durch protrahierte metabolische Aktivierung erfolgt eine permanente Produktion der beiden Metabolite.

Tabelle 9: Terminale Halbwertszeiten und AUC der Muttersubstanz und der beiden Metabolite Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid nach Gabe von 250 mg/kg Ifosfamid

	t $\frac{1}{2}$ (min)	AUC ($\mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$)
Ifosfamid	55,2 \pm 14,4	1300,5 \pm 439,1
Chloracetaldehyd	51,1 \pm 11,5	102,4 \pm 35,1
4-Hydroxyifosfamid	41,5 \pm 2,3	138,5 \pm 31,5

Um die zytotoxische Wirkung der einzelnen Metabolite zu bestimmen, war es zunächst nötig, die Pharmakokinetik der beiden Metabolite getrennt voneinander zu untersuchen, um die Applikationsmenge und den Zeitraum, über welchen die Substanzen alleine zu verabreichen waren, zu bestimmen. Ein ähnliches Konzentrationszeitprofil und auch eine annähernd gleiche AUC nach Infusion von Chloracetaldehyd zu erreichen, stellte sich als schwierig heraus. Die Applikation von 75 mg/kg Chloracetaldehyd, einer zu 250 mg/kg Ifosfamid äquimolaren Dosis, als Bolus zeigte einen einzigen Peak ohne weitere messbare Chloracetaldehyd-Konzentrationen in den nachfolgenden Entnahmen. Da die Halbwertszeit von Chloracetaldehyd im Vollblut bei unter 4 min in vitro liegt, ist dieses Ergebnis erklärbar. Der erste Entnahmezeitpunkt, um die Konzentration von Chloracetaldehyd zu bestimmen, lag bei 15 min. Mit einer Bolusgabe eines Stoffes, dessen Halbwertszeit unter 4 min liegt, ist somit kein konstanter Spiegel der Substanz im Blut zu erzielen. Damit war eine AUC wie nach Gabe der Muttersubstanz nicht erreichbar. Eine Steigerung der Zeit auf einen

Injektionszeitraum von 20 min mit intermittierendem langsamen Nachspritzen über welche das Chloracetaldehyd appliziert wurde, zeigte, wenn überhaupt, nur eine leichte Annäherung an das gewünschte Profil. Zugleich stellte sich heraus, dass diese Art der Applikation mehrere Probleme aufwarf. Die Kanüle der Infusionsnadel verletzte durch nur minimale Bewegungen die Venenwand und gab so dem stark reaktiven Chloracetaldehyd die Möglichkeit, paravasal auszutreten und ein lokales Ödem hervorzurufen. Dieses führte zur vollständigen Verstopfung aller vier Schwanzvenen der Maus. Gleichzeitig wurde der Schwanz nach ca. zwei Tagen nekrotisch. Trat das Ödem schon in der Anfangsphase auf, war keine ordnungsgemäße Applikation des Pharmakons mehr möglich. Um das Problem der Venenwandverletzung zu beheben, wurden den Tieren die beiden Metabolite, wie unter Material und Methoden beschrieben, infundiert, das heißt, die Kanüle wurde fixiert, so daß keinerlei Bewegung mehr möglich war. Auch hier zeigte sich, dass das reaktive Chloracetaldehyd in einer hohen Konzentration und durch langsame Infusion über die Schwanzvene zu Schädigungen führte. Eine Erhöhung des zu infundierenden Volumens wurde nötig. Gleichzeitig sollte das infundierte Volumen aber noch in einem physiologischen Verhältnis zur Größe der Maus stehen.

Ein den Anforderungen am ehesten entsprechender Versuchsaufbau zeigte die Infusion der Metabolite in 2,5 ml über einen Zeitraum von 2,5 h. Bei langsamer Infusionsgeschwindigkeit über die Schwanzvene und einem Blutfluß, der zum Teil durch die einliegende Kanüle in der Schwanzvene blockiert wurde, war Chloracetaldehyd zum großen Teil abgebaut, bevor es zentral anlangte. Im Gegensatz hierzu gelangte Chloracetaldehyd bei der Metabolisierung von Ifosfamid über die Lebervene direkt innerhalb kürzester Zeit in den rechten Vorhof. Diese verlängerte Transitzeit erklärt die geringeren Konzentrationen von Chloracetaldehyd nach alleiniger Infusion.

3.1.2 Konzentrations-Zeit-Profile der beiden Ifosfamid-Metabolite Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid als alleinige Infusion

Um den jeweiligen zytotoxischen Effekt von Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid isoliert voneinander beurteilen und die Wirkung der beiden Metabolite miteinander vergleichen zu können, erhielten die Mäuse die beiden Metabolite in äquimolaren Dosen zu 250 mg/kg Ifosfamid. Dies entspricht beim Chloracetaldehyd 75 mg/kg und beim 4-Hydroxyifosfamid 280 mg/kg. Die Halbwertszeiten der beiden Metabolite liegen zwischen 4 und 10 min. Eine exakte Bestimmung war aufgrund des Entnahmepinzips aus dem retrobulbären Augenplexus nicht möglich, da die Schädigung in diesem Bereich keine weiteren Blutentnahmen in kürzeren Zeitabständen zuließ. Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeiten wurde, wie oben schon erwähnt, eine Infusionsdauer von 150 min gewählt, um AUC Werte zu erhalten, wie sie nach Ifosfamidbolusgabe gemessen worden waren. Die beiden Metabolite hatten nach der Ifosfamidbolusgabe bei AUC_{0-150} ungefähr 80% der $AUC_{0-\infty}$ erreicht. Wie in der Abb. 10 dargestellt zeigen sowohl Chloracetaldehyd als auch 4-Hydroxyifosfamid parallele Kurven mit einem zweizeitigen Verlauf mit einem unerwarteten Konzentrationsabfall nach 75 min. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die diesem Konzentrationsabfall vorausgegangene erneute intraperitoneale Injektion des Anästhetikums, welche notwendig war, um die Tiere über den gewünschten Zeitraum der Infusion in Narkose zu halten. Die Senkung von Herzfrequenz und Blutdruck durch das Anästhetikum und eine damit verbundene Verlangsamung der Verteilung des in die Schwanzvene injizierten Medikamentes könnte den Konzentrationsabfall bedingen. Diese erneute Injektion des Xylazin-Pentobarbital-Gemisches lag etwa 10 bis 15 min vor dem Konzentrationsabfall. Ganz sicher konnte dieses Phänomen nicht geklärt werden.

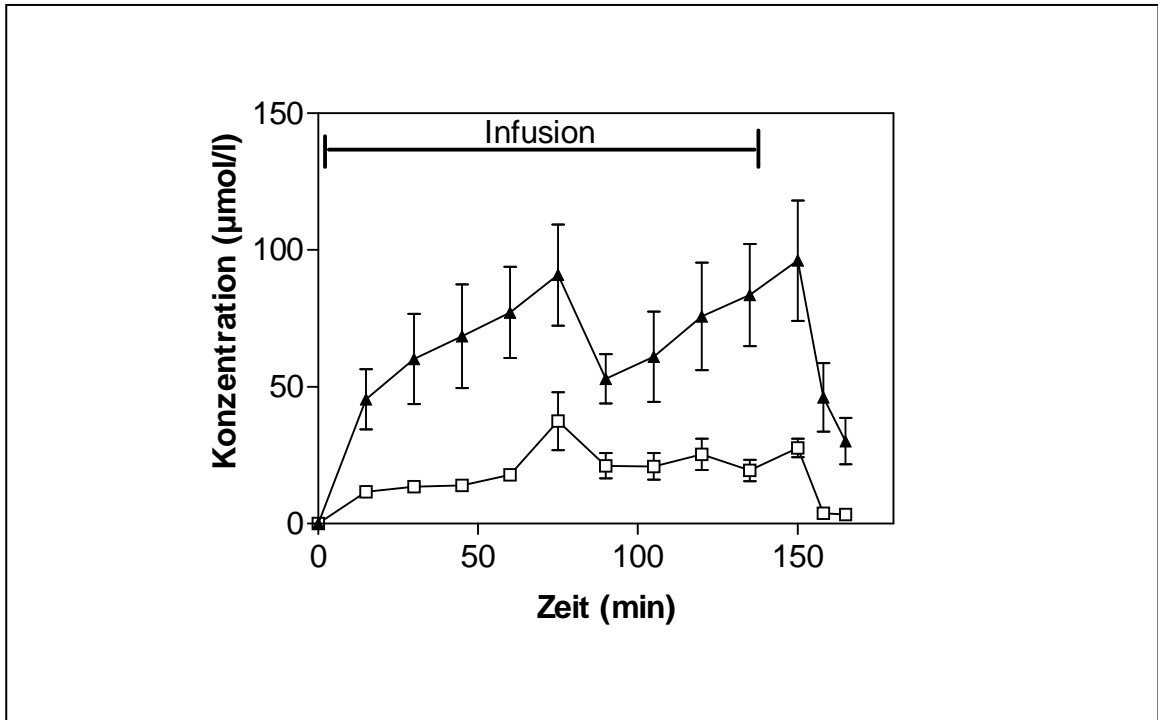


Abb. 10: Konzentrations-Zeit-Profile nach einzelner Infusion von 75 mg/kg Chloracetaldehyd (□) und 280 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid (▲)

Die hierbei erzielten AUC's (Tab.11) waren beim 4-Hydroxyifosfamid um ca. 25% größer als nach Ifosfamidbolusgabe (vergleiche Tab. 9). Im Vergleich hierzu erzielte die Infusion mit 75 mg/kg Chloracetaldehyd nur die Hälfte der AUC, wie sie nach Ifosfamidbolusgabe gemessen worden war.

Tabelle 11: AUC nach Gabe von Chloracetaldehyd und äquimolarer und äquitoxischer Dosen von 4-Hydroxyifosfamid zu Chloracetaldehyd

	AUC ($\mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$)
280 mg/ kg 4-Hydroxyifosfamid	$173,6 \pm 55,0$
40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid	$72,5 \pm 11,7$
75 mg/kg Chloracetaldehyd	$51,5 \pm 11,2$

Unter der Infusion von 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid konnten AUC's gemessen werden, welche jeweils die Hälfte der nach Ifosfamid-Bolus-Gabe erreichten Werte waren. Beide Kurven zeigen hier einen annähernd parallelen Verlauf (Abb.12).

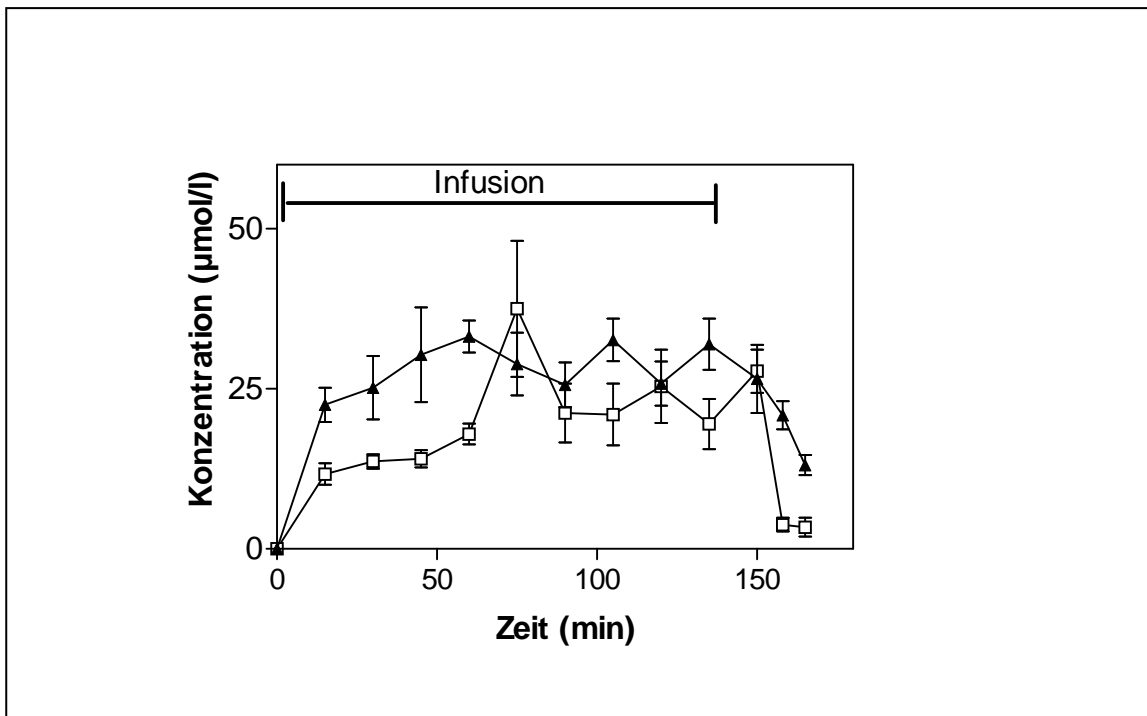


Abb. 12: Konzentrations-Zeit-Profile nach einzelner Infusion von 75 mg/kg Chloracetaldehyd (□) und 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid (▲)

3.2 Wachstumsverhalten der MX1-Tumoren nach Applikation äquimolarer Dosen von Ifosfamid, Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid

Um die wachstumshemmende Wirkung auf die MX-1 Tumoren bestimmen zu können, wurden die Kontrollmäuse, wie oben beschrieben, mit der gleichen Menge Ringer-Lösung behandelt. Diese Tumoren zeigten ein stetiges Wachstum bis zum 29 Tag (Abb.13). Tiere mit Tumoren, die nekrotisch wurden oder nicht geometrisch geformt waren und so eine exakte Messung des Tumolvolumens nicht zuließen, wurden nicht als Kontrollen verwendet. Die Behandlung MX1-tumortragender Nacktmäuse mit 250 mg/kg Ifosfamid führte in drei von sechs Tieren zu einer kompletten Remission ohne makroskopischen Nachweis eines Tumors an der Pfote über einen Beobachtungszeitraum von 29 Tagen.

Um die Auswirkungen der einzelnen Metabolite auf die Tumoren unter Einbeziehung der gewonnenen Daten aus den pharmakokinetischen Untersuchungen zu testen, wurden die Tiere mit den äquimolaren Dosen zu Ifosfamid behandelt. Bei der Behandlung mit 280 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid führte die Zytostatikagabe bei fünf von sieben Tieren zu einem kompletten Rückgang der Tumoren. Mit äquimolarer Chloracetaldehydbehandlung konnte keine komplette Remission erreicht werden. Allerdings zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung der MX1-Tumoren (Abb.13). Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich konkordant zu den Kontrollmäusen über einen Zeitraum von 29 Tagen. Die Größe der Tumoren am letzten Beobachtungstag lag für 280 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid bei $36,6 \pm 35,6 \text{ mm}^3$, für das Chloracetaldehyd bei $841,2 \pm 71,3 \text{ mm}^3$ und die Tumoren der Kontrollgruppe wiesen eine Größe von $1289,1 \pm 165,0 \text{ mm}^3$ auf.

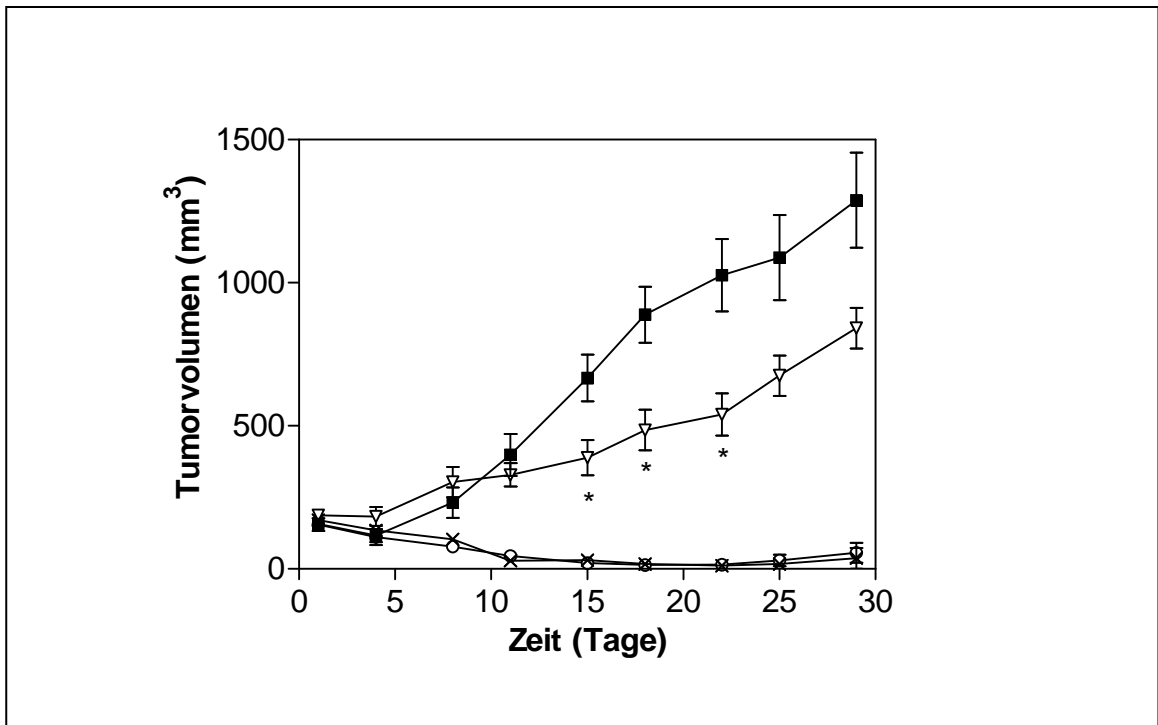


Abb.13: Tumorgroße von MX1-tumortragenden Nacktmäusen nach Behandlung mit 250 mg/kg Ifosfamid (○), 75 mg/kg Chloroacetaldehyd (▽) oder 280 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid (X) gegenüber den mit Ringerlösung behandelten Kontrollmäusen (■). P<0,05 (*)

3.3 Wachstumsverhalten der MX1-Tumoren nach Applikation AUC-angepasster Dosen von Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid

Da es, wie unter Punkt 3.1.2 ausführlich beschrieben, nicht möglich war, die AUC von Chloracetaldehyd über eine Erhöhung der applizierten Dosis zu steigern, um so AUC's von Chloracetaldehyd, die mit denen von 4-Hydroxyifosfamid vergleichbar sind, zu erzielen, wurde die Dosis von 4-Hydroxyifosfamid reduziert. Mit dem Ziel eine AUC-angepasste Dosis zu ermitteln, wurde die Gabe des 4-Hydroxymetaboliten bis auf 40 mg/kg gesenkt. Unter der Therapie mit dieser Dosis zeigte sich nun eine Angleichung der Kurve des 4-Hydroxyifosfamid an die Wachstumskurve der Tumoren des Chloracetaldehydes. Durch die Applikation von 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid konnte, ähnlich des Chloracetaldehydes, eine Wachstumshemmung der Tumoren erzielt werden. Die Größe der mit 40 mg 4-Hydroxyifosfamid behandelten Tumoren lag am letzten Beobachtungstag bei $812,0 \pm 121,3 \text{ mm}^3$. Wenn also Dosen von 4-Hydroxyifosfamid und Chloracetaldehyd verwendet werden, die zu weitgehend identischen AUC's führen (Tab.11), zeigt sich auch eine übereinstimmende Antitumorwirkung (Abb.14).

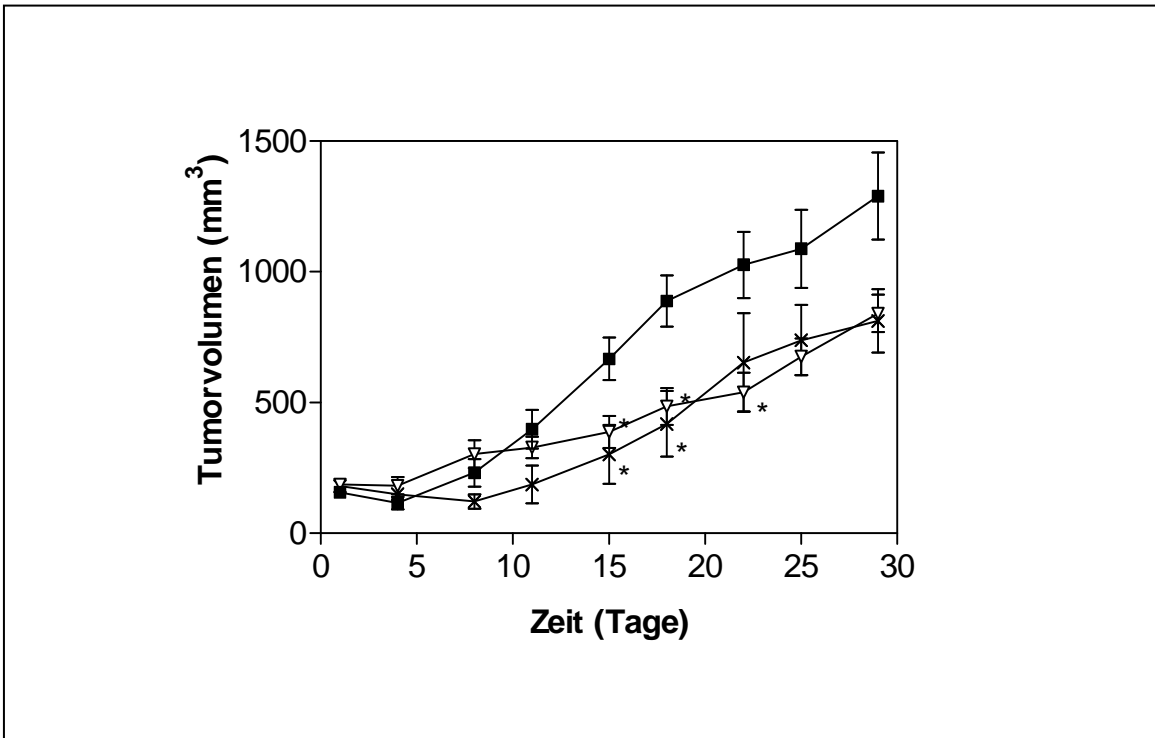


Abb. 14: Tumorgroße von MX1-tumortragenden Nacktmäusen nach Behandlung mit 250 mg/kg Ifosfamid (○), 75 mg/kg Chloroacetaldehyd (▽) oder 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid (X) im Vergleich zu mit Ringerlösung behandelten Kontrollmäusen (■). *P<0,05

4 Diskussion

Ifosfamid wird zu den beiden Metaboliten Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid metabolisiert. Es gehört zur Gruppe der Oxazaphosphorinzystostatika und unterscheidet sich nur geringfügig vom Cyclophosphamid. Beide Zytostatika werden durch Cytochrom P 450-Isoenzyme in der Leber zu Ihren 4-Hydroxymetaboliten aktiviert. Durch einen geringen strukturellen Unterschied, welcher darin besteht, dass sich eine funktionelle Chlorethylgruppe an einem anderen Stickstoffatom befindet (Brock, 1989; Sladek, 1988; Wagner 1994), wird beim Ifosfamid ein erheblich größerer Anteil Chloracetaldehyd freigesetzt (Kurowski und Wagner., 1993; Kaijser et al.,1994). So können beim Ifosfamid bis zu 50% der Muttersubstanz über Seitenkettenoxidation mit Freisetzung von Chloracetaldehyd metabolisiert werden (Kurowski und Wagner, 1997). Im Vergleich zum Cyclophosphamid bedeutet dies einen zehnfach höheren Anteil an Chloracetaldehyd (Goren et al.,1986; Dechant et al.,1991). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied in der Metabolisierung zugunsten des Chloracetaldehydes liefert die Arbeit von Chen et al.. Bei der Untersuchung unterschiedlicher Cytochrome P 450 stellte sich heraus, dass spezifische Untergruppen für die unterschiedlichen Metabolisierungswege existieren, beim Cyclophosphamid das Cytochrom P 450-2B6 und beim Ifosfamid das P 450-3A4. Die Bindung der zweiten Chlorethylgruppe an den Oxazaphosphorinring kann möglicherweise eine Bindung an die P 450 Enzyme der Leber, welche für die Metabolisierung zu 4-Hydroxyifosfamid notwendig sind, erschweren, so dass es vermehrt zu einer Seitenkettenoxidation kommt (Chen et al., 2004).

Während den 4-Hydroxymetaboliten der beiden Substanzen die eigentliche Wirkung als alkylierendes Zytostatikum zugeschrieben wurde, ist Chloracetaldehyd in vivo ausschließlich für die unerwünschten Nebenwirkungen, wie Störungen der Nierenfunktion bei Kindern (Aleksa et al. 2004), Fanconi-Syndrom, ähnlichen Störungen und ZNS-Toxizität, verantwortlich gemacht worden. Diese Überlegung resultiert aus dem Vergleich von Cyclophosphamid und Ifosfamid. Da die schweren Nebenwirkungen für das Ifosfamid spezifisch

sind, wurden sie aufgrund der vermehrten Freisetzung des Chloracetaldehyd bei Ifosfamid diesem Metaboliten zugeschrieben.

Daß Chloracetaldehyd außerdem an der zytostatischen Wirkung von Ifosfamid mitbeteiligt sein könnte, ist bis zum Zeitpunkt bislang nicht in Erwägung gezogen worden. Sehr wohl ist Chloracetaldehyd als Agens auf seine Mutagenität und Karzinogenität untersucht worden, weil es ein Grundstoff der chemischen Industrie beispielsweise bei der Synthese von PVC (Polyvinylchlorid) ist. Neben alkylierenden Eigenschaften und der Fähigkeit „cross-links“ zu verursachen, sind weitere molekulare Mechanismen beschrieben worden (Singer et al., 1984; Spengler et Singer, 1988; Kuchenmeister et al., 1998). Die Möglichkeit, dass Chloracetaldehyd jedoch nicht nur für die Nebenwirkungen verantwortlich ist, sondern seine zweifelsfrei auch mutagenen Eigenschaften zum zytostatischen Potential beitragen, wurde durch die Ergebnisse der Arbeit von Brüggemann et al. (Brüggemann et al., 1999) sichtbar. In der genannten Arbeit hatte sich *in vitro* gezeigt, dass Chloracetaldehyd nicht nur auf Nierentubuluszellen zytotoxisch wirkt, sondern in gleicher Weise auch auf Tumorzellen einen toxischen Effekt ausübt. Die hierbei eingesetzten Konzentrationen lagen dabei im klinisch relevanten Bereich, wie sie bei Patienten unter der Behandlung mit Ifosfamid mit Dosen von 5 g/m^2 gemessen wurden. Die zytotoxische Wirkung des Chloracetaldehyd war sogar mit der des 4-Hydroxyifosfamid vergleichbar.

Um nun in der vorliegenden Arbeit den zytotoxischen Effekt von Chloracetaldehyd *in vivo* zu überprüfen, war es nötig, Blutspiegel der beiden Metabolite im Mausmodell zu erzielen, wie sie nach Gabe der Muttersubstanz Ifosfamid auftreten, um dann die Tiere mit entsprechender Dosis zu behandeln. Die nach Gabe von 250 mg/kg Ifosfamid gemessenen AUC's zeigten eine um 20% niedrigere Konzentration von Chloracetaldehyd - verglichen mit denen des 4-Hydroxyifosfamid. Die Simulation gleicher Blutspiegel nach alleiniger Infusion von 4-Hydroxyifosfamid mit äquimolarer Dosis zu Ifosfamid zeigten sogar höhere AUC-Werte. Analog hierzu gelang es, eine komplette Remission der Tumoren nach Therapie bei MX1-xenotransplantierten Mäusen zu erzielen. Die Ergebnisse unterstützen also die Theorie, dass das 4-Hydroxyifosfamid als Metabolit des

Ifosfamid eine entscheidende zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen hat (Connors et al., 1974; Sladek, 1988).

Im Gegensatz hierzu stellte sich die Simulation eines ähnlichen Wirkstoffspiegels mit entsprechender AUC durch die alleinige Infusion des Chloracetaldehydes als äußerst schwierig heraus. Zunächst waren am Mausmodell keine ausreichenden Blutspiegel erzielbar. Dies beruht auf einer extrem kurzen Halbwertszeit des Chloracetaldehydes im Blut, bedingt durch seine hohe Reaktivität. Der langsame Blutfluß hinter der Punktionskanüle in der für Infusionszwecke genutzten Schwanzvene der Mäuse und die durch die Reaktivität des Chloracetaldehyd bedingte Vulnerabilität des Gefäßes ließen keine vergleichbaren Wirkstoffspiegel im Mäuseblut zu. Die Anlage eines zentralen Venenkatheters hätte möglicherweise die Probleme, welche durch die periphere Zufuhr des Metaboliten entstehen, lösen können. Diese Art der Applikationsform war bei den nu-nu-Nacktmäusen nicht möglich. Nach Präparation der Vena jugularis, Einführen eines Katheters und Abbinden der Vena jugularis nach erfolgter Versuchsdurchführung zeigten die immunsupprimierten Tiere eine hohe Infektanfälligkeit und Letalität, so dass eine Beobachtung der Tumoren über den gewünschten Zeitraum nicht möglich war. Übereinstimmend mit den niedrigen AUC's konnte nur eine, wenn auch signifikante, Wachstumsverlangsamung, jedoch keine komplette Remission der Tumoren der MX1-transplantierten Mäuse unter der Behandlung erzielt werden. Um die beiden Metabolite und deren zytotoxisches Potential miteinander vergleichen zu können, wurde die Dosis in den Versuchen zur Pharmakokinetik von 4-Hydroxyifosfamid in mehreren Schritten reduziert. Die AUC des Chloracetaldehydes hatte sich bei separater Infusion, verglichen mit der AUC nach Ifosfamidgabe, um die Hälfte reduziert. Ziel war es, für das 4-Hydroxyifosfamid eine dem Chloracetaldehyd angepasste Dosis zu finden, die zu gleichen AUC's beider Metabolite führte. Die Applikation von 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid zeigte ebenfalls eine um 50 % reduzierte AUC. Unter der Behandlung mit 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid zeigte sich nun eine ähnliche Regression der Tumoren wie unter der Behandlung mit 75 mg/kg Chloracetaldehyd. Damit sind die beiden Metabolite, wenn gleiche AUC's erzielt werden, auf molarer Ebene gegenüber den getesteten Tumoren ähnlich wirksam.

Im Vergleich der beiden Metabolite bei Applikation äquimolarer Dosen ist 4-Hydroxyifosfamid in seiner Wirkung scheinbar siebenfach potenter als das Chloracetaldehyd. Diese Ergebnisse stimmen jedoch nicht mit den in vitro-Ergebnissen von Brüggemann et al. (Brüggemann et al., 1999) überein, welche eine annähernd gleiche antitumorale Zytotoxizität zeigen. Eine mögliche Erklärung für diese Abweichungen liefern die AUC's. Während eine ähnliche AUC des 4-Hydroxyifosfamides nach alleiniger Infusion verglichen mit den Wirkstoffspiegeln nach Ifosfamidgabe und Metabolisierung zu 4-Hydroxyifosfamid erreicht werden konnte, war es nicht möglich, die Chloracetaldehyd-Spiegel, wegen oben beschriebener Verhältnisse mit der alleinigen Infusion von Chloracetaldehyd zu imitieren. Bezieht man allerdings die erzielte AUC mit ein und vergleicht die Zytotoxizität der beiden Metabolite auf AUC-Basis ist der Anteil des Chloracetaldehydes an der Antitumorwirkung des Ifosfamid höher. Diese These wird durch die Ergebnisse von Yu et al. (Yu et al., 1999) unterstützt, wenn man deren Ergebnisse im Licht der hier genannten Daten interpretiert. In der genannten Studie ist mit der Annahme, dass Chloracetaldehyd nur für die Nebenwirkungen verantwortlich ist, der Versuch unternommen worden, Cytochrom P 450 Isoenzyme zu induzieren bzw. zu inhibieren, um die Metabolisierung von Cyclophosphamid zu Chloracetaldehyd zu unterdrücken bzw. erheblich zu reduzieren. Die Untersuchung von Yu et al. wird mit Cyclophosphamid durchgeführt, dem Strukturanalogon des Ifosfamid. Allerdings ist im Rattenmodell, anders als beim Menschen, die Metabolisierung von Chloracetaldehyd erheblich erhöht, so dass die gewonnenen Daten und Erkenntnisse auf das Ifosfamid übertragen werden können, da die Bildung von Chloracetaldehyd speziesabhängig ist.

Die Metabolisierung von Cyclophosphamid zu 4-Hydroxycyclophosphamid wird durch die Cytochrom P 450-2B und P 450-2C katalysiert. Der alternative Abbau des Cyclophosphamides wird durch P 450-3A verstoffwechselt. Diese beiden miteinander konkurrierenden Abbauwege können durch Induktion und Inhibition beeinflusst werden. Am Rattenmodell gelang es, die Metabolisierung des Cyclophosphamides zu beeinflussen. Zum einen durch Troleandomycin, welches selektiv das P 450-3A inhibiert, und Phenobarbital, welches das P 450-2B induziert, wurde die Entstehung von Chloracetaldehyd inhibiert und die Produktion

von 4-Hydroxycyclophosphamid stimuliert. Mit diesen beiden Substanzen konnte eine Verdopplung der AUC des 4-Hydroxycyclophosphamides herbeigeführt werden. Die Behandlung von 9L Gliosakom tragenden Ratten ohne vorherige Behandlung und mit Behandlung des oben genannten Induktors und Inhibitors ergab jedoch keine Änderung der antitumoralen Aktivität. In der Annahme, dass Chloracetaldehyd nur für Nebenwirkungen verantwortlich zu machen ist und das 4-Hydroxycyclophosphamid allein die zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen ausübt, ist es ein erstaunliches und schwer zu erklärendes Ergebnis. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist allerdings eine alternative Erklärung möglich. Parallel zur vermehrten Produktion des 4-Hydroxymetaboliten wurde das Chloracetaldehyd bis zu 50% reduziert. Die fehlende Veränderung im Therapieresultat kann durch den fehlenden Beitrag des Chloracetaldehydes zu der antitumoralen Aktivität erklärt werden. Die Ergebnisse von Yu et al. (Yu et al., 1999) unterstützen damit die in dieser Arbeit dokumentierten Ergebnisse.

Der Wirkmechanismus des Chloracetaldehydes ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Chloracetaldehyd hemmt zwar die mitochondriale Funktion durch Blockierung der oxidativen Phosphorylierung (Sood et O'Brian, 1993) über eine Verringerung des Adenosintriphosphates in den Mitochondrien, allerdings konnte in einer neueren Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Brüggemann et al., 2005), dass ein ausreichender Effekt zur Schädigung einer Tumorzelle nur bei erheblich höheren Konzentrationen auftritt, als diese in vivo bei der Gabe von Ifosfamid erreicht werden. Da hypoxische Tumorzellen über die anaerobe Glykolyse das Adenosintriphosphat gewinnen, konnte ein toxischer Effekt nur unter Blockung der anaeroben Glykolyse bestätigt werden. Ohne die entsprechende Hemmung ist der beschriebene Effekt nicht auf in-vivo-Verhältnisse übertragbar. Auch die Erzeugung von „cross-links“ unter hohen Konzentrationen in vitro, wie durch Spengler et al. beschrieben, scheint nicht die Ursache für das zytostatische Potential von Chloracetaldehyd zu sein (Spengler et Singer, 1988). Chloracetaldehyd führt jedoch zu einer frühen Hemmung der DNA-Synthese (Kandala et al., 1990; Brüggemann et al., 2005) und erzeugt in klinisch relevanten Konzentrationen Einzelstrangbrüche.

Die zytotoxische Wirkung des Chloracetaldehydes bei gleichzeitiger stammzellprotektiver Wirkung ist im Vergleich zu Cyclophosphamid und Ifosfamid durch unsere Arbeitsgruppe weiter untersucht worden. Der zytotoxische Effekt nicht nur auf solide Tumorzellen, sondern auch auf maligne hämatologische Zellen der Zellreihen HL-60, HS-Sultan und TPH-1 konnte nachgewiesen und die zytotoxische Potenz von Chloracetaldehyd bestätigt werden (Brüggemann et al. 2002).

Im Vergleich der Wirkspektren von Ifosfamid und Cyclophosphamid zeigt sich, dass die beiden Medikamente keine komplette Kreuzresistenz aufweisen (Brade et al., 1985; Bramwell et al., 1997). Ifosfamid ist bei Tumoren, die resistent gegen Cyclophosphamid sind, teilweise noch wirksam. Dies konnte in dieser Arbeit in vivo an humanen Tumorengraften und der Nacktmaus durch die zytostatische Aktivität des Chloracetaldehydes hinreichend erklärt werden. Hiermit konnten zugleich die von Brüggemann et al. gewonnenen in vitro Daten voll bestätigt werden (Brüggemann et al., 1997)

5 Zusammenfassung

Die Oxazaphosphorin-Zytostatika Ifosfamid und Cyclophosphamid unterscheiden sich nur geringfügig mit Verschiebung einer der beiden β -Chlorethylgruppen vom extracyclischen Stickstoffatom auf das Stickstoffatom des Ringes. Allerdings hat die Verschiebung dieser Chlorethylgruppe Einfluß auf die Metabolisierung, so dass die Seitenkettenoxidation in Form einer Dechloroethylierung, bei der Chloracetaldehyd entsteht, bei der Metabolisierung von Ifosfamid bis zu 50% einnehmen kann, während beim Cyclophosphamid durch unterschiedliche Cytochrom P 450-Substratspezifität beim Menschen weniger als 10% dechloroethyliert werden. Das Chloracetaldehyd wird vor allem für Nephro- und Neurotoxizität verantwortlich gemacht und ist damit beim Ifosfamid mitunter therapie- und dosislimitierend. Die Antitumorwirkung hingegen wurde der alkylierenden Eigenschaft der 4-Hydroxy-Metabolite zugeschrieben. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass Chloracetaldehyd in vitro auch auf menschliche Tumorzellen toxisch wirkt.

Um den zytostatischen Effekt von Chloracetaldehyd in vivo zu untersuchen und die zytostatische Potenz von Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid miteinander zu vergleichen, wurden pharmokokinetische Untersuchungen an NMRI-Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden dabei separat mit der Muttersubstanz Ifosfamid, sowie mit den beiden Metaboliten Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid behandelt. Aufgrund der geringeren AUC's von Chloracetaldehyd, welche aufgrund der kurzen Halbwertszeit und der längeren Transitzeit bei peripherer alleiniger Infusion anstatt zentraler Metabolisierung nach Ifosfamid-Gabe gemessen wurden, wurde die Dosis von 4-Hydroxyifosfamid reduziert, so dass die beiden AUC's relativ zueinander die gleiche Größenordnung hatten. Hier zeigte sich, dass in Tumorwachstumsexperimenten das Chloracetaldehyd im Vergleich zum 4-Hydroxyifosfamid, bezogen auf ein identisches Konzentrations-Zeit-Produkt (AUC), eine weitgehend identische Wirkung besitzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die in vitro gewonnene Erkenntnis, dass Chloracetaldehyd eine zytostatische Wirkung besitzt, welche mit der des 4-Hydroxyifosfamid vergleichbar ist. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Chloracetaldehyd im Blut war es durch die separate Infusion von

Chloracetaldehyd nicht möglich, die gleichen Konzentrationen im Blut zu erreichen, wie sie nach Infusion der Muttersubstanz, also nach Dechloroethylierung von Ifosfamid, auftraten. Unter der Anpassung der AUC des 4-Hydroxyifosfamid durch Reduktion der zugeführten Menge des 4-Hydroxyifosfamid konnte jedoch durch die Therapie der gleiche signifikante Effekt in Bezug auf die Regression der Tumoren der MX1-tragenden nu-nu Mäuse nachgewiesen werden.

Chloracetaldehyd - als Metabolit von Ifosfamid - trägt neben 4-Hydroxyifosfamid zur zytostatischen Wirkung in vivo bei. Damit ist Chloracetaldehyd nicht nur für die Nebenwirkungen des Ifosfamides verantwortlich zu machen, sondern spielt eine wichtige Rolle im Wirkspektrum des Oxazaphosphorin-Zytostatikums Ifosfamid.

6 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

	SEITE
EINLEITUNG	
Abb.1: Strukturformeln von a:Ifosfamid, b:Cyclophosphamid.	7
Abb.2: Metabolismus von Ifosfamid.	8
MATERIAL UND METHODEN	
Abb.3: Punktion der Schwanzvene der Maus nach intraperitonealer Anästhesie und nachfolgender Fixierung	17
Tabelle 4: Applikation der Muttersubstanz Ifosfamid als Bolus und pharmakokinetische Bestimmung von Ifosfamid und den in der Leber metabolisierten Abbauprodukten 4-Hydroxyifosfamid und Chloracetaldehyd mit Fallzahlen	18
Tabelle 5: Applikation der einzelnen Metabolite und deren Bestimmung im Blut mit Fallzahlen	19
Tabelle 6: Fallzahlen für die Behandlung MX1-Tumortragender Mäuse	24
ERGEBNISSE	
Abb. 7 a: Logarithmische Darstellung des Konzentrations-Zeit-Profiles von Ifosfamid (O) nach Applikation von 250 mg/kg Ifosfamid	26
Abb.7 b: Konzentrations-Zeit-Profil von Ifosfamid nach Applikation von 250 mg/kg Ifosfamid	27

Abb.8: Konzentrations-Zeit-Profile von Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid nach Gabe der Muttersubstanz Ifosfamid	28
Tabelle 9: Halbwertszeiten der Muttersubstanz und der beiden Metabolite Chloracetaldehyd und 4-Hydroxyifosfamid nach Gabe von 250 mg/kg Ifosfamid	29
Abb. 10: Konzentrations-Zeit-Profile nach einzelner Infusion von 75 mg/kg Chloracetaldehyd und 280 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid	32
Tabelle 11: AUC nach Gabe von Chloracetaldehyd und äquimolarer und äquitoxischer Dosen von 4-Hydroxyifosfamid zu Chloracetaldehyd	33
Abb. 12: Konzentrations-Zeit-Profile nach einzelner Infusion von 75 mg/kg Chloracetaldehyd und 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid	33
Abb.13: Tumorgröße von MX1-tumortragenden Nacktmäusen nach Behandlung mit 250 mg/kg Ifosfamid, 75 mg/kg Chloracetaldehyd oder 280 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid im Vergleich zu mit Ringerlösung behandelten Kontrollmäusen	35
Abb. 14: Tumorgröße von MX1-tumortragenden Nacktmäusen nach Behandlung mit 250 mg/kg Ifosfamid, 75 mg/kg Chloracetaldehyd oder 40 mg/kg 4-Hydroxyifosfamid im Vergleich zu mit Ringerlösung behandelten Kontrollmäusen	37

7 Literaturverzeichnis

Aleksa K, Ito S, Koren G. Renal-tubule metabolism of ifosfamide to the nephrotoxic chloroacetaldehyde: Pharmacokinetic modelling for estimation of intracellular levels. *J. Lab. Clin. Med.* 143(3):159-162, 2004.

Alacron RA. Fluorometric determination of acrolein and related compounds with aminophenol. *Anal. Chem.* 40:1704-1708, 1968.

Arnold H, Bourseaux E, Brock N. Chemotherapeutic action of cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B518-ASTA) in experimental tumours of the rat. *Nature* 181: 931,1958.

Brade WP, Herdrich K, Varini M. Ifosfamide-pharmacology, safety and therapeutic potential. *Cancer Treat. Rev.* 12:1-47, 1985.

Brain EG, Yu LJ, Gustafsson K, Drews P, Waxman DJ. Modulation of P450-dependant ifosfamide pharmacokinetics: A better understanding of drug activation in vivo. *Br. J. Cancer* 77:1768-1776, 1998.

Bramwell VHC, Mouridsen HT, Santoro A, Blackledge G, Somers R, Vermey J, Dombernowsky P, Onsrud M, Thomas D, Sylvester R, van Oosterom A. Cyclophosphamide versus ifosfamide: Final report of a randomised phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23:311-321, 1987.

Brock N. Oxazaphosphorine cystostatics: past-present-future. Seventh Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 49(1):1-7,1989.

Brock N, Wilmanns H. Effect of cyclic nitrogen mustard-phosphamidester on experimentally induced tumors in rats; chemotherapeutic effect and pharmacological properties of B 518. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 83(12):453-458, 1958.

Brüggemann SK, Kisro J, Wagner T. Ifosfamide cytotoxicity on human tumor and renal cells: Role of chloroacetaldehyde in comparison to 4-hydroxyifosfamide. *Cancer Res.* 57:2676-268, 1997.

Brüggemann SK, Radike K, Braasch K, Hinrichs J, Kisro J, Hagenah W, Peters SO, Wagner T. Chloroacetaldehyde: mode of antitumor action to the ifosfamide metabolite. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005.

Brüggemann SK, Schlenke P, Klich S, Deeken M, Petres SO, Wagner T. Stem cell toxicity of oxazaphosphorine metabolites in comparison to their antileukemic activity. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1337-1341, 2002.

Chen CS, Lin JT, Goss KA, He Y, Halpert JR, Waxman DJ. Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: Identification of Cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. *Mol Pharmacol.* 65:1278-1285, 2004.

Choi JH, Pfeifer GP. DNA damage and mutations produced by chloroacetaldehyde in a CpG-methylated target gene. *Mutation Res.* 568:245-256, 2004.

Colvin OM. An Overview of Cyclophosphamide Development and Clinical Applications. *Current Pharmaceutical Design* 5(8): 555-560, 1999.

Connors TA, Cox PJ, Farmer PB, Foster AB, Jarman M. Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. *Biochem. Pharmacol.* 23:115-129, 1974.

Dechant KL, Brogden RN, Pilkington T, Faulds D. Ifosfamide/mesna. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. *Drugs* 42(3):428-467, 1991.

DeVita VJr. Principles of Cancer Management: Chemotherapy. In: Vincent T., DeVita Jr, Hellmann S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles and Practice of*

Oncology. 5th Edition. (17): 333-347, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York.1997.

DiMaggio JR, Brown R, Baile WF, Schapira D. Hallucinations and ifosfamide-induced neurotoxicity. *Cancer* 73:1909-1914, 1994.

Furlanut M, Franceschi L. Pharmacology of ifosfamide. *Oncology* 65: 2-6, 2003

Goren MP, Wright RK, Pratt CB, Pell FE. Dechloroethylation of ifosfamide and neurotoxicity. *Lancet* 2:1219-1220, 1986.

Heinzel G, Wolaszak R, Thoman P. Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Data Analysis System for the PC. Gustav Fischer Stuttgart, Jena, New York.

Jacobsen JS, Humayun MZ. Mechanisms of mutagenesis by vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde. Effect of gene-targeted in vitro aduction of M13 DNA on DNA template activity in vitro. *Biochemistry* 29(2):496-504, 1990.

Kandala JC, Mrema JE, DeAngelo A, Daniel FB, Guntaka RV. 2-Chloroacetaldehyde and 2-chloroacetal are potent inhibitors of DNA synthesis in animal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 167:457-463, 1990.

Kaijser GP, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJ. Ifosfamide metabolism and pharmacokinetics (review). *Anticancer Res.* 14(2A):517-531, 1994.

Kohn KW. Beyond DNA cross-linking: history and prospects of DNA-targeted cancer treatment – fifteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 56(24): 5533-5546, 1996.

Kuchenmeister F, Schmerzer P, Engelhardt G. Genotoxic bifunctional aldehydes produce specific images in the comet assay. *Mutat. Res.* 419:69-78, 1998.

Kurowski V, Wagner T. Comparative pharmacokinetics of ifosfamide, 4-hydroxyifosfamide, chloroacetaldehyde and 2- and 3-dechloroethylifosfamide in

patients on fractionated intravenous ifosfamide therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol* 33:36-42,1993.

Kurowski V, Wagner T. Urinary excretion of ifosfamide, 4-hydroxyifosfamide, 3- and 2-dechloroethylifosfamide, mesna and dimesna in patients on fractionated intravenous ifosfamide and concomitant mesna therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 39(5): 431-439,1997.

Nicolao P, Giometto. Neurological Toxicity of ifosfamide. *Oncol.* 66(2):11-16, 2003.

Singer B, Abbot LG, Spengler SJ. Assessment of mutagenic efficiency of two carcinogen-modified nucleosides, I.N⁶-ethenodeoxyadenosine and O⁴-methyldeoxythymidine, using polymerases of varying fidelity. *Carcinogenesis.* (Lond) 5: 11165-1171.

Skinner R, Sharkey IM, Pearson AD, Craft AW. Ifosfamide, mesna and nephrotoxicity in children. *J. Clin. Oncol.* 11(1) :173-190, 1993.

Sladek NE. Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacol. Ther.* 37(3): 301-355, 1988.

Sood C, O'Brian PJ. Molecular mechanism of chloroacetaldehyde-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 48:1621-1626, 1993.

Spengler SJ, Singer B. Formation of interstrand cross-links in chloroacetaldehyde-treated DNA demonstrated by ethidium bromide fluorescence. *Cancer Res.* 48:4804-4806, 1988.

Teicher BA. Pharmacology of Cancer Chemotherapy. Antitumor Alkylating Agents. In: Vincent T., DeVita Jr, Hellmann S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles and Practice of Oncology.* 5th Edition. (19.4): 405-418, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York.1997.

Tudek B, Kowalczyk P, Ciesla JM. Localisation of chloroacetaldehyde-induced DNA damage in human p53 gene by DNA polymerase fingerprint analysis. IARC Sci. Publ. 150:279-293, 1999.

Wagner T. Ifosfamide clinical pharmacokinetics. Clin. Pharmacokinet. 26(6): 439-456, 1994.

Wagner T, Heydrich D, Jork T, Voelcker G, Hohorst HJ. Comparative study on human pharmacokinetics of activated ifosfamide and cyclophosphamide by a modified fluorometric test. J.Cancer Res.Clin.Oncol. 100(1):95-104, 1981.

Wiedemann GJ, Siemens HJ, Mentzel M, Biersack A, Wösmann W, Knocks D, Weiss C, Wagner T. Effects of temperature on therapeutic efficacy and pharmacokinetics of ifosfamide. Cancer Res. 53:4268-4272, 1993.

Yu LIJ, Drewes P, Gustafsson K, Brain EGC, Hecht JED, Waxman DJ. In vivo modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: Impact on pharmacokinetics and antitumor activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 288(3):928-937, 1999.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. T. Wagner für die Überlassung des Dissertationsthemas und die weitere Betreuung durch wertvolle Ratschläge zur Anlage und Durchführung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Biggi Branke, Frau Heike Bahrs und Frau Monica Vollmert für die fruchtbare Zusammenarbeit im Labor und insbesondere Frau Biggi Branke für die Unterstützung bei der Betreuung der Versuchstiere im Tierlabor.

9 Lebenslauf

Kirsten Börner

Fischergrube 68-70, Haus 21
23552 Lübeck
Deutschland

Tel.: +49 451 863089
Email: boerner_k@web.de

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 21.Juni 1975
Geburtsort: Hamburg

Ausbildung

Schulbildung

08/1981 - 07/1985	Grundschule, Großhansdorf
08/1985 - 07/1994	Emil-von-Behring-Gymnasium, Großhansdorf
07/1994	Abitur

Universitäre Ausbildung

10/1994 - 04/2002	Studium Humanmedizin, Medizinische Universität zu Lübeck
10/1996	Physikum
04/1998	1. Staatsexamen
04/2000	2. Staatsexamen
06/2002	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr / Unterassistenz

04/2000 - 08/2000	Anästhesie, Medizinische Universität zu Lübeck
08/2000 - 11/2000	Innere Medizin, Ostholsteinkliniken, Klinik Eutin
02/2001 - 03/2001	Chirurgie, Städtisches Krankenhaus Süd, Lübeck
03/2001 - 06/2001	Chirurgie, Kantonales Spital Uznach, Schweiz
06/2002	Erlaubnis für die Tätigkeit als Ärztin im Praktikum

Klinische Laufbahn

Ärztin im Praktikum

07/2002 - 12/2003	Chirurgie, Sana Kliniken Lübeck GmbH
01/2004	Approbation als Ärztin

Assistenzärztin

seit 01/2004	Chirurgie, Sana Kliniken Lübeck GmbH
--------------	--------------------------------------

10 Publikationen

Originalpublikation

Boerner K, Kisro J, Brueggemann S, Hagenah W, Petersen L, Wagner T. Metabolism of ifosfamide to chloroacetaldehyde contributes to antitumor activity in vivo. *Drug Metab. Dispos.* 28(5):573-576, 2000.

Poster

Brueggemann S, Hagenah W, Boerner K, Kisro J, Petersen L, Hinrichs J, Braasch K, Kistner K, Wagner T. Chloroacetaldehyde – Antitumor activity in vivo and mode of action of the ifosfamide metabolite. Med Univ of Luebeck, Luebeck, Germany in: *Proceedings of the American Association for Cancer Research (AACR)* 41:424, March 2000 San Francisco, CA, USA.