

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

Wirkspiegel des Ifosfamidmetaboliten Chloracetaldehyd im
Verhältnis zu den Thiolen Cystein, Glutathion und Mesna im Blut
und in menschlichen Tumorexenograften bei der Nacktmaus

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von
Lars Petersen
aus Berlin

Lübeck 2003

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Heiko Iven

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2004

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.10.2004

Inhalt

ABKÜRZUNGEN	6
1 EINLEITUNG	7
1.1 Ifosfamid	9
1.2 Chloracetaldehyd	13
1.3 Mesna	14
1.4 Cystein, Glutathion	17
1.5 Ziel der Arbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Narkose	20
2.3 Tumor, Transplantation, Tumorabnahme und Gefrierstop	20
2.4 Blutentnahme	21
2.5 Therapie	21
2.6 Thiolbestimmung mit der HPLC	21
2.7 Messung aus Blut	23
2.8 Messung aus dem Tumor	23
2.9 Gesamtthiole	24
2.10 Chloracetaldehydbestimmung mit der Gaschromatographie	24
2.11 Messung aus Blut	26
2.12 Messung aus dem Tumor	26
2.13 Biometrische Auswertung	27
3 ERGEBNISSE	28

3.1 Methodenvalidierung	28
3.1.1 Cysteinmessung aus Blut	28
3.1.2 Glutathionmessung aus Blut	29
3.1.3 Mesnamessung aus Blut	29
3.1.4 Cysteinmessung aus dem Tumor	30
3.1.5 Glutathionmessung aus dem Tumor	31
3.1.6 Mesnamessung aus dem Tumor	31
3.1.7 Chloracetaldehydmessung aus dem Tumor	31
3.2 Native Thiolwerte unbehandelter nu-nu-Mäuse	32
3.3 Messungen nach der Gabe von Ifosfamid ohne Mesna	33
3.3.1 Cystein	34
3.3.2 Glutathion	34
3.3.3 Chloracetaldehyd	35
3.4 Messungen nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna	35
3.4.1 Cystein	36
3.4.2 Glutathion	37
3.4.3 Mesna	37
3.4.4 Chloracetaldehyd	38
3.5 Messungen nach der Gabe von Mesna	38
3.5.1 Cystein	39
3.5.2 Glutathion	39
3.5.3 Mesna	40
3.6 Messungen nach der Gabe von Cystein	40
3.6.1 Cystein	41
3.6.2 Glutathion	41
3.7 Chloracetaldehyd-Verminderung nach Mesnagabe	42
3.8 Verhältnis von Cystein und Chloracetaldehyd im Blut	43
4 DISKUSSION	44
4.1 Blutkonzentration der Protektorthiole	44
4.2 Konzentration der Protektorthiole im Tumor	45
4.3 Abhängigkeit der Konzentration der Protektorthiole im Gewebe von der Konzentration im Blut	47
4.4 Nachweis von Chloracetaldehyd im Tumor	47

4.5 Chloracetaldehyd-Verminderung nach Mesnagabe	48
4.6 Übertragbarkeit auf den Menschen	49
4.7 Schlußfolgerungen für den klinischen Einsatz von Mesna und Ifosfamid	50
5 ZUSAMMENFASSUNG	51
6 LITERATURVERZEICHNIS	53
7 ANHANG	61
7.1 Grundwerte unbehandelter Mäuse	61
7.1.1 Thiolwerte im Tumor	61
7.1.2 Thiolwerte im Blut	62
7.2 Konzentrationen zum Zeitpunkt 0:	63
7.2.1 Cysteinkonzentration	63
7.2.2 Glutathionkonzentration	63
7.3 Messungen nach der Gabe von Ifosfamid ohne Mesna	64
7.3.1 Cysteinkonzentration	64
7.3.2 Glutathionkonzentration	65
7.3.3 Chloracetaldehydkonzentration	66
7.4 Messungen nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna	67
7.4.1 Cysteinkonzentration	67
7.4.2 Glutathionkonzentration	69
7.4.3 Mesnakonzentration	70
7.4.4 Chloracetaldehydkonzentration	71
7.5 Messungen nach der Gabe von Mesna	72
7.5.1 Cysteinkonzentration	72
7.5.2 Glutathionkonzentration	73
7.5.3 Mesnakonzentration	74
7.6 Messungen nach der Gabe von Cystein	75
7.6.1 Cysteinkonzentration	75
7.6.2 Glutathionkonzentration	76
8 DANKSAGUNG	77
9 LEBENS LAUF	78

Abkürzungen

CAA	Chloracetaldehyd
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
Ifo	Ifosfamid
C	Konzentration
Tu	Tumor
P	Peakhöhe
M	Masse
Abb.	Abbildung
n	Anzahl

1 Einleitung

Zu den onkologischen Behandlungsmöglichkeiten gehören die chirurgische Intervention, die Bestrahlung und die Chemotherapie. Die Chemotherapie etablierte sich in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts. Durch Leukozytopenien bei Soldaten, die chemischen Waffen ausgesetzt waren, erkannte man den zellschädigenden Einfluß von Senfgas. Hieraus entwickelte sich der medizinische Einsatz der Oxazaphosphorine (Pochedly, 1987), zu denen neben Cyclophosphamid das Trofosfamid und das Ifosfamid zählen.

Alle Zytostatika haben Nebenwirkungen, die vor allem schnell proliferierende Gewebe betreffen, wie zum Beispiel Haare, Hämatopoese und Schleimhäute. Außerdem treten substanzspezifische Nebenwirkungen der verschiedenen Zytostatikagruppen auf. Zu diesen zählt bei den Oxazaphosphorinen die urothelschädigende Wirkung mit dem klinischen Bild der hämorrhagischen Zystitis (Brock et al., 1979).

Zytostatika sollen bei der Behandlung maligner Erkrankungen die malignen Zellen schädigen und gesundes Gewebe schonen. Um die schädigende Wirkung der Oxazaphosphorine zu begrenzen, werden Protektorthiole eingesetzt. Seit Ende der vierziger Jahre wurde vermutet, daß Thiolverbindungen einen schützenden Einfluß auf Zellen haben, als experimentell festgestellt wurde, daß Cystein die Strahlenwirkung abschwächt (Revesz und Modig, 1965). Durch die Erkenntnis, daß auch die schädigende Wirkung des Stickstofflöst durch Cystein abgeschwächt werden konnte, wurde ein ähnlicher Mechanismus der Schädigung durch alkylierende Substanzen und radioaktive Strahlung angenommen (Brandt und Griffin, 1951). Die Wirkung von Strahlung und Alkylantien liegt in einer Schädigung der DNA und von Proteinen. Die Alkylantien übertragen Alkylreste auf die Nukleinsäuren und verursachen Strangbrüche der DNA. Der Schutz vor Schäden erfolgt durch ein Abfangen von Radikalen und durch Reaktion des Protektorthiols mit dem schädigenden Agens. Alternative Formen der Uroprotektion wie Glukokortikoide (Morais et al., 1999) oder Pflanzenlectine als entzündungshemmende Substanz (Assrey et al., 1999) erwiesen sich als nicht ausreichend wirksam.

Ein natürliches Thiol mit der Fähigkeit einer protektiven Wirkung ist die Aminosäure Cystein. Ebenso mit einer Schwefelwasserstoffgruppe ausgestattet und zur Oxidationsprophylaxe befähigt ist das Glutathion. Dies ist ein zum Redoxsystem

gehörendes Tripeptid aus Cystein, Glutaminsäure und Glykokoll. Reduziert liegt das Glutathion in der Sulfhydrylform als Glutathionsulfhydryl (GSH) vor. Ein Problem ist, daß die Protektorthiole auch Metaboliten der Oxazaphosphorine binden, die den eigentlich therapeutischen Effekt bewirken. Somit ist bei einer Gabe von Cystein oder Glutathion neben der Verhinderung der Nebenwirkung auch die Wirkung herabgesetzt.

Der Angriffspunkt der Oxazaphosphorine liegt in der Tumorzelle. Um einen Schutz vor der hämorrhagischen Zystitis zu erreichen und gleichzeitig die Wirkung der Oxazaphosphorine nicht zu beeinträchtigen, benötigt man ein Protektorthiol, das in der Blase wirkt und nicht intrazellulär die zytostatisch aktiven Metabolite bindet. Ein Thiol, das nicht in die Tumorzelle eindringt und somit nicht die intrazelluläre Wirkung von Zytostatika hemmen kann, schien das 2-Mercapto-Äthansulfonat (Mesna) zu sein (Scheef et al., 1979). Dieser Stoff ist eine Verbindung, die wie Cystein und Glutathion eine endständige Schwefelwasserstoffgruppe enthält, welche in der Lage ist, schädliche Metaboliten zu binden. Klinisch wird der Einsatz der Oxazaphosphorine in den heute gebräuchlichen Dosierungen nur durch Mesna möglich. In unserem Labor stattgefundene Experimente geben allerdings Hinweise darauf, daß beim Einsatz von Mesna auch durch extrazellulär aus Dimesna gebildetem Cystein intrazellulär Cystein erhöht und die Wirkung der Oxazaphosphorine abgeschwächt werden kann.

Chloracetaldehyd (CAA) ist ein Metabolit des Ifosfamid. Es wurde lange als ein nur für Nebenwirkungen verantwortliches und nicht zytostatisch aktives Agens betrachtet. Seine zytotoxische Wirkung hätte aus arbeitsmedizinischen Forschungen im Zusammenhang mit der Verwendung von Vinylchlorid in der chemischen Industrie abgeleitet werden können (Malaveille et al., 1975). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zielen auf eine Erforschung des zytotoxischen Effekts von Chloracetaldehyd hin. Parallel zu dieser Arbeit wurde in anderen Versuchen die Wirkung von Chloracetaldehyd auf Xenograften in vivo untersucht. Chloracetaldehyd hat eine kurze Halbwertszeit von etwa zwei Minuten in vivo im Blut. Dies wäre eine mögliche Ursache für einen fehlenden zytostatischen Einfluß von Chloracetaldehyd auf Tumorzellen. Wichtig für einen zytostatischen Effekt ist auch das Verhältnis des Metaboliten Chloracetaldehyd zu den Protektorthiolen. Bei früheren Forschungen unserer Arbeitsgruppe wurde bereits ein anderer Metabolit des Ifosfamid, das 4-OH-Ifosfamid untersucht (Wiedemann et al., 1994), wobei sich ein deutliches Konzentrationsgefälle zwischen Tumor und Blut zeigte.

1.1 Ifosfamid

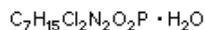
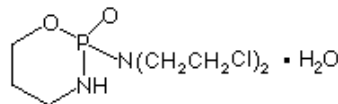
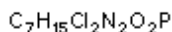
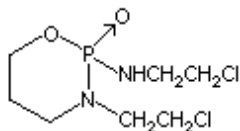


Abbildung 1: Ifosfamid (links) und Cyclophosphamid (rechts). Beide Stoffe besitzen zwei Chloräthylgruppen (-NHCH₂CH₂Cl), von denen beim Ifosfamid eine am zyklischen und die andere am extrazyklischen Stickstoffatom sitzt. Der Ring mit einem Stickstoff-, einem Phosphor- und einem Sauerstoffatom wird Oxazaphosphorinring genannt.

Die alkylierenden Oxazaphosphorine gingen hervor aus dem im ersten Weltkrieg verwendeten Gelbkreuzkampfstoff, dem 2,2'-Dichloräthylsulfid, auch Senfgas genannt. Das zentrale Schwefelmolekül dieses Losts ist bei den Oxazaphosphorinen durch ein Stickstoffmolekül ersetzt. Der Name Lost stammt von den Herstellern Lommel und Steinkopf. Stickstofflostderivate sind Kerngifte und wirken durch Mitosehemmung auf Zellen. Es resultieren eine Hemmung der Zellteilung, Schädigung der Zellfunktion und eine Zytolyse. Der Effekt ist radiomimetisch, also auf die gleiche Art mitosehemmend wie ionisierende Strahlung. Hauptangriffspunkte sind hierbei die Phosphodiestergruppen in der DNA bzw. die Orthophosphatgruppen der freien Nucleotide (Lindemann und Harbers, 1980). Außerdem werden Enzym-SH-Gruppen blockiert. Die Alkylierung der DNA erfolgt an Position N-7 am Guaninstickstoff (Aktories und Unger, 2001).

Ifosfamid gehört wie das Cyclophosphamid zu den alkylierenden Substanzen. Es ist ein Analogon des Cyclophosphamids und unterscheidet sich von diesem durch die Verschiebung einer Seitenketten-Chloräthylgruppe auf das zyklisch gelegene Stickstoffmolekül. Ifosfamid wurde in den siebziger Jahren erstmals in der klinischen Behandlung zugelassen. Es hat eine größere zytostatische Aktivität als Cyclophosphamid, aber eine geringere myelosuppressive Wirkung (Loehrer, 1992; Dechant et al., 1991). Erfolgreich eingesetzt wird Ifosfamid z.B. bei Bronchial- und Ovarialkarzinomen, Weichteilsarkomen und Hodenkarzinomen. Es zeigt ebenfalls gute Wirkung bei Endometriumkarzinomen, kindlichen soliden Tumoren, Non-Hodgkin- und Hodgkin-

Lymphomen, und als neoadjuvante Chemotherapie bei Zervixkarzinomen (Dechant et al., 1991; Zalupski und Baker, 1988).

Ifosfamid selbst ist inaktiv und bedarf der Cytochrom P450-Oxygenase der Leber, insbesondere des Isoenzym 3A4, zur Verstoffwechslung in seine zytostatisch aktiven Metabolite (Brock et al., 1973). Durch die Cytochrom P450-Oxygenase wird Ifosfamid zum 4-OH-Ifosfamid reduziert. Der P450-Oxygenase kommt somit eine entscheidende Rolle im Metabolismus des Ifosfamid zu (Brain et al., 1998). Durch oxidative Desalkylierung von Ifosfamid entsteht zusätzlich Chloracetaldehyd. Durch die Molekülstruktur bedingt mit anderer Anordnung der Chlorethylgruppen entsteht beim Metabolismus des Ifosfamid mehr Chloracetaldehyd als beim Metabolismus von Cyclophosphamid. Die unterschiedlichen Nebenwirkungen der beiden Cytostatika und die verschieden starke Ausprägung der Nebenwirkungen kann durch diese Eigenschaft erklärt werden. Ein weiterer Metabolit des Ifosfamid ist das Acrolein, das auch im Rahmen der nephrotoxischen Nebenwirkungen diskutiert wurde (Zamlauski-Tacker et al., 1994). Durch die alkylierende Wirkung des Ifosfamid werden therapieinduzierte sekundäre Leukämien hervorgerufen, die vor allem auf Acrolein und Chloracetaldehyd zurückzuführen sind (Balu et al., 2002).

Ifosfamid ist nur parenteral einsetzbar, obwohl seine orale Bioverfügbarkeit bei 100% liegt. Exzessive ZNS-Toxizität nach oraler Aufnahme macht jedoch eine derartige Applikation unmöglich. Durch hepatische Enzyminduktion verändert sich die Pharmakokinetik bei mehrtägiger Anwendung in Form einer Selbstinduzierung des Metabolismus. Die Metabolisierung erfolgt rascher. So ist am fünften Tag einer Ifosfamidtherapie die AUC kleiner als am ersten Behandlungstag (Kurowski und Wagner, 1993). Allgemeine Nebenwirkungen des Ifosfamid sind Übelkeit, Erbrechen, Alopezie und Myelosuppression. Außerdem sind Fälle von ZNS-Nebenwirkungen beschrieben, die durchaus mit Chloracetaldehyd in Verbindung gebracht werden können. Diese reichen von leichter Somnolenz bis hin zu schwerer Enzephalopathie mit Koma (Dechant et al., 1991; Brade, 1985; Gonzalez-Angulo et al., 2002).

Hämorrhagische Cystitiden waren in den ersten Studien Anfang der siebziger Jahre der limitierende Faktor für den Einsatz von Oxazaphosphorinen. Als Auslöser der Urotoxizität konnte 1979 der Metabolit Acrolein sowohl bei Ifosfamid als auch bei Cyclophosphamid

identifiziert werden (Cox, 1979), wobei nach neueren Erkenntnissen auch Chloracetaldehyd eine Rolle spielt (Dubourg et al., 2002). Eine Detoxifizierung des Acroleins konnte durch verschiedene Thiolverbindungen erreicht werden. Als effektivste Verbindungen stellten sich N-Acetylcystein und Mesna heraus. Darüber hinaus wurden nephrotoxische Nebenwirkungen auch bei Gabe von Ifosfamid beobachtet, die sich in Form von dosisabhängiger Harnstoff-, Kreatinin- und Harnsäureerhöhung und Zylindern im Urin bemerkbar machen. Hierbei wurden Schäden in allen drei Segmenten des Nephrons (Glomerulum, distaler und proximaler Tubulus) beobachtet. Eine isolierte Schädigung des Glomerulums kommt nicht vor. Außerdem werden dem DeToni-Debre-Fanconi-Syndrom ähnliche Nebenwirkungen sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen beobachtet (Rossi, 1990; Woodland et al., 2000, Mohrmann et al., 1996). Die Nephrotoxizität ist in dieser Form bei Cyclophosphamid nicht gegeben (Skinner et al., 1993). Als weiterer Effekt wurde eine Verminderung der Thiolkonzentration nach Ifosfamidgabe in Lymphozyten im peripheren Blut und in Nierentubuluszellen beobachtet (Meier et al., 1994). Durch die Gabe von Mesna kann zwar eine ausreichende Protektion vor hämorrhagischen Cystitiden, nicht aber vor Nephrotoxizität gewährleistet werden, so daß diese Toxizität heutzutage neben der Myelosuppression den limitierenden Faktor der Ifosfamidgabe darstellt.

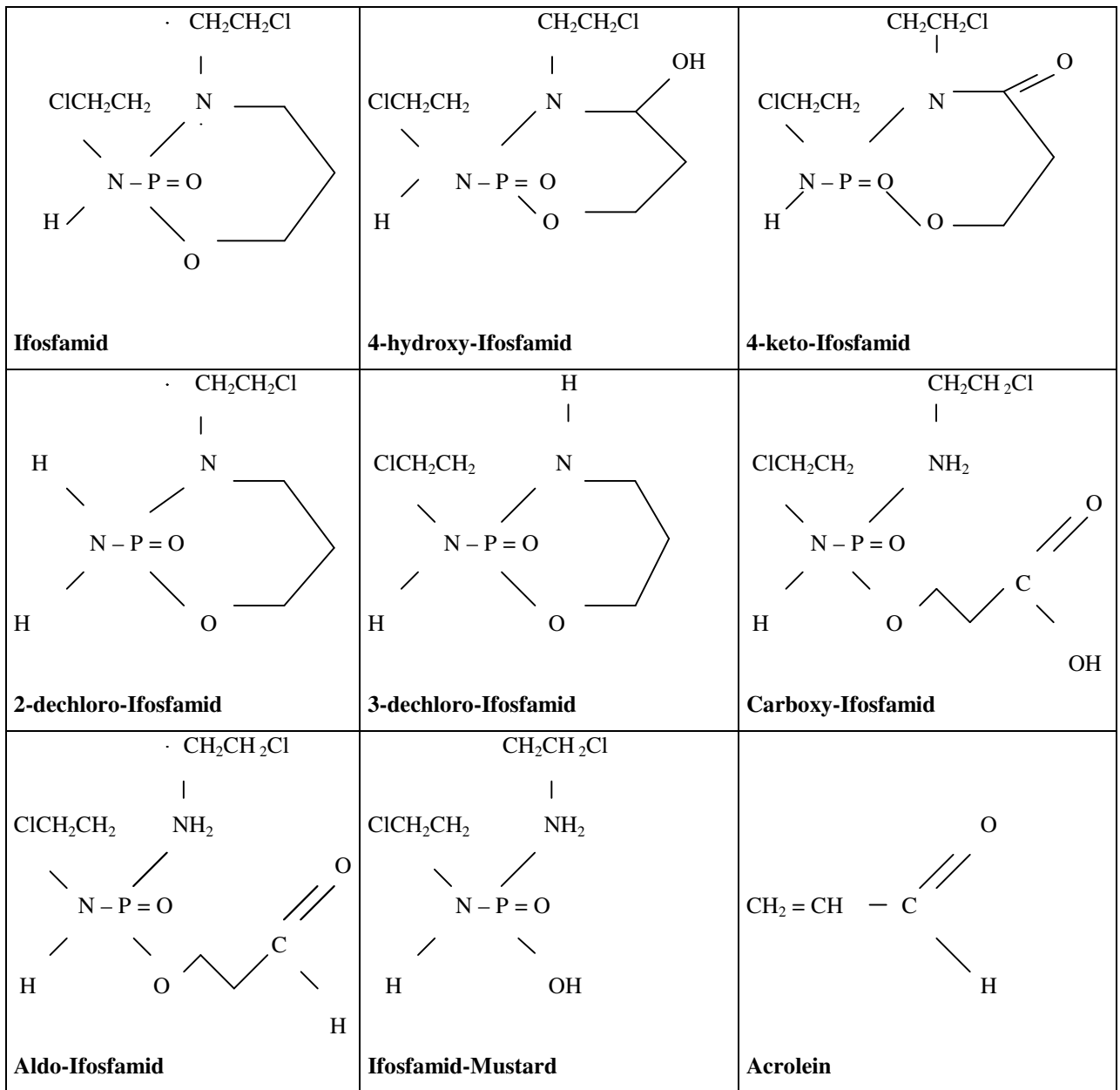
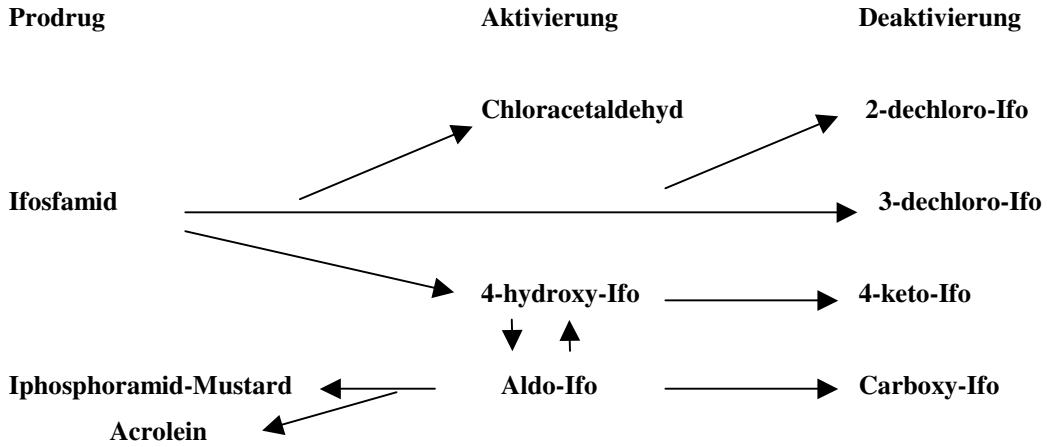


Abbildung 2: Metabolismus von Ifosfamid. Ifosfamid selbst ist nicht zytostatisch wirksam. Erst durch Metabolisierung wird es in aktive und toxische Stoffe umgewandelt. Durch Hydroxylierung entsteht als aktives Agens 4-hydroxy-Ifosfamid, das weitermetabolisiert wird zu dem aktiven

Metaboliten Aldo-Ifosamid. Dies spaltet sich in das stark urothelschädigende Acrolein und in den Iphosphoramid-Mustard. Die Deaktivierung läuft zu den Metaboliten 2-dechloro-Ifosamid, 3-dechloro-Ifosamid, 4-keto-Ifosamid und Carboxy-Ifosamid. Unten dargestellt sind die Strukturformeln von Ifosamid und seinen Metaboliten (Wagner, 1994; Kaijser et al., 1994).

1.2 Chloracetaldehyd

Chloracetaldehyd ist ein Metabolit sowohl von Ifosamid als auch von Cyclophosphamid. Bei der Metabolisierung des Ifosamid ist die anfallende Konzentration von Chloracetaldehyd weit höher als bei der Metabolisierung von Cyclophosphamid, bei der diese vernachlässigbar klein ist. Somit können auch die unterschiedlichen Nebenwirkungen wie etwa die bereits erwähnte Enzephalopathie dem Chloracetaldehyd zugeschrieben werden, die bei Cyclophosphamidgabe bisher nicht beschrieben wurde. Bereits Ende der siebziger Jahre wurde eine zellschädigende Wirkung von Chloracetaldehyd erkannt. Es wurde als bifunktionelles alkylierendes Agens gegenüber Deoxyadenosin- und Deoxycytidinresiduen bezeichnet (Green und Hathway , 1978). Diese Erkenntnisse beruhten nicht auf der Forschung im onkologischen Bereich, sondern wurden im Rahmen der Forschung über toxische Stoffe in der chemischen Industrie gewonnen. Ein zytostatischer Effekt und eine antineoplastische Wirkung als Metabolit von Ifosamid oder Cyclophosphamid wurde damals nicht erkannt.

Das Chloracetaldehyd hemmt die DNA-Synthese. Der Effekt scheint direkt bei der DNA-Synthese anzusetzen und nicht beispielsweise bei der Aufnahme von Thymidin. Bei Anwesenheit in Zellen während der DNA-Synthese können DNA-Bruchstücke mit Längen um 300 Nucleotiden nachgewiesen werden, während ohne Anwesenheit von Chloracetaldehyd die Länge einige tausend Nucleotide beträgt. Dieser Effekt ist reversibel, wenn Chloracetaldehyd nicht länger als zwei Stunden in der Zielzelle anwesend ist (Kandala et al., 1990). Die alkylierende Wirkung ist wohl beschränkt auf die Reaktion mit Adenin-Residuen in der DNA, während keine Reaktionen mit Cytosin-Residuen erfolgen (Vogt et al., 1988). Allerdings wurden in einer anderen Arbeit Reaktionen von Chloracetaldehyd mit 3-Methylcytidin in der Doppelstrang-DNA nachgewiesen (O'Neill et al., 1986). In vitro konnten in Mäuse- und Rattenleberzellen auch Strangbrüche nachgewiesen werden (Chang et al., 1992). Eine Mutagenität von Chloracetaldehyd als Metabolit des Vinylchlorids ist bewiesen (Chiang et al., 1997). Chloracetaldehyd hat also einen zytostatischen Einfluß in Form von Verhinderung von Strangneubildungen und

verursacht eine zytostatisch wirksame Alkylierung. Eine Mutagenität der Substanz ist bekannt. Nach Ansicht der Lübecker Arbeitsgruppe spielt Chloracetaldehyd eine Rolle für den therapeutischen Effekt von Ifosfamid. Dies stützt sich auf die zytotoxische Aktivität in vitro auf Tumorzellen (Brüggemann et al., 1997) und den Nachweis der Antitumorwirkung in vivo (Börner et al., 2000).

Trotz der ähnlichen Strukturen von Ifosfamid und Cyclophosphamid sind Unterschiede in der Pharmakokinetik der beiden Stoffe bekannt (Wagner et al., 1981). Dies ist wichtig im Hinblick auf die Entstehung von Chloracetaldehyd und die daraus zu schließende Kausalität der Nebenwirkungen. Unter diesem Aspekt kann Chloracetaldehyd für die zerebralen Nebenwirkungen des Ifosfamid verantwortlich gemacht werden. Diese treten dosisabhängig in 10 – 20% der Fälle auf. Die Enzephalopathie entwickelt sich innerhalb weniger Stunden bis Tage nach der Ifosfamidbehandlung. Nach fraktionierter Gabe sind Enzephalopathien weniger häufig. Nach der Gabe von Cyclophosphamid werden keine zerebralen Nebenwirkungen beobachtet, während nach Ifosfamidgabe sowohl zerebrale Nebenwirkungen bis hin zu Halluzinationen als auch neurotoxische Nebenwirkungen beobachtet werden konnten (DiMaggio et al., 1994). Diese Beobachtungen lassen Chloracetaldehyd als für diese Nebenwirkungen verantwortliches Agens erscheinen (Goren et al., 1986): Der Verlauf beginnt zeitlich mit dem Erscheinen der Ifosfamidmetabolite. Beim Metabolismus des Cyclophosphamid entsteht auf Grund der chemischen Struktur weit weniger Chloracetaldehyd, was diese Nebenwirkungen verhindert.

1.3 Mesna

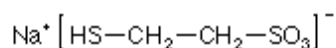


Abbildung 3: Strukturformel und Summenformel von Mesna.

Mesna ist ein Chemoprotektor, der vor hämorrhagischer Cystitis nach Gabe von Oxazaphosphorinen wie Ifosfamid oder Cyclophosphamid schützt. Mesna bindet an seiner Sulfhydrylgruppe die toxischen Metabolite der Oxazaphosphorine wie Acrolein, 4-OH-Ifosfamid und Chloracetaldehyd und bildet mit ihnen Thioetherverbindungen. Es bietet eine effektivere Prophylaxe des Harntraktes als die anderen Behandlungen wie Flüssigkeitsgabe, forcierte Diurese oder N-Acetylcystein tun (Munshi et al., 1992). Mesna reichert sich in der Blase an, befindet sich nach der Gabe hauptsächlich im Intravasalraum und wird nicht von Tumorzellen aufgenommen. Die angestrebten Ziele für einen protektiv wirkenden Stoff erfüllt Mesna besser als andere getestete Sulfhydrylverbindungen (Brock et al., 1979). Die nicht urotoxischen Nebenwirkungen, vor allem die Nephrotoxizität, werden nicht verhindert.

Mesna wird durch nicht-enzymatische Reaktionen zu Dimesna (2,2'-bis-Äthansulfonat) oxidiert. Dimesna verläßt nicht den Extrazellularraum und wird schnell renal ausgeschieden. Im renalen Tubulusepithel wird Dimesna durch die Thioltransferase und die Glutathionreduktase zu Mesna reduziert. Eine Reduktion von Dimesna zu Mesna in der Leber wirkt der schnellen Oxidation von Mesna entgegen (Goren et al., 1998). Mesna wird glomerulär filtriert, im proximalen Tubulus reabsorbiert und zurück in den Nierentubulus sezerniert. Es gibt keine hepatische Exkretion von Mesna. Mesna bildet mit den Protektothiolen Cystein und Glutathion Dimere.

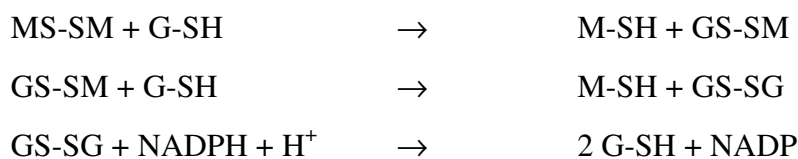


Abbildung 4: Dimerenbildung von Mesna. Mesna reagiert in der Nierentubuluszelle enzymatisch mit anderen Thiolen zu gemischten Disulfiden. Es entstehen Verbindungen von Glutathion und Mesna, von je zwei Glutathion- oder Mesnamolekülen und entsprechend auch von Cysteinmolekülen. Ein Glutathiondimer wird durch $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zu zwei Glutathionmonomeren rückgewandelt (Wagner, 1994).

Dimesna wird von den Tubuluszellen der Niere aufgenommen und reduziert. Das reduzierte Mesna wird in den Urin abgegeben, wo es mit den toxischen Metaboliten reagieren kann (Blomgren et al., 1990; Blomgren et al., 1991).

In vitro wurde Mesna eine wachstumshemmende Potenz zugesprochen. Diese ist jedoch erst bei einigen oberflächlich wachsenden Blasenkrebszellreihen festgestellt worden (Blomgren et al., 1991). Daß Mesna selbst nicht die Membranen der Tumorzellen passieren kann, ist nicht bestritten. Allerdings hat Mesna durch seine Wechselwirkungen mit anderen Protektorthiolen, die ebenfalls einen wirkungsmindernden Effekt bewirken, eventuell doch einen mindernden Einfluß auf die zytostatische Wirkung der Oxazaphosphorine. Dieser würde dann darin bestehen, daß Mesna nicht selbst in den Tumorzellen wirkt, sondern die Konzentration der körpereigenen Thiole auch intrazellulär erhöht.

1.4 Cystein, Glutathion

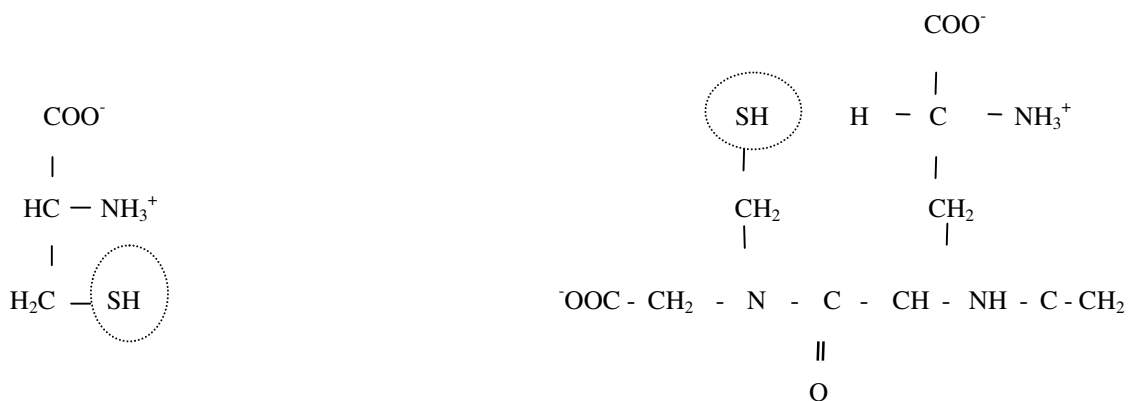


Abbildung 5: Strukturformeln von Cystein (links) und Glutathion (rechts). Mit einem Kreis markiert sind die SH-Gruppen, die durch Oxidation toxische Metabolite binden können.

Cystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure. Ein Großteil im menschlichen Organismus liegt in oxidierter Form als Cystin vor, das bei der Reaktion zweier Cysteinmoleküle unter Abspaltung von zwei Wasserstoffmolekülen entsteht. Glutathion ist ein Tripeptid aus Cystein, Glutaminsäure und Glykokoll. Reduziert liegt es in der Sulfhydrylform vor, oxidiert in der Disulfidform.

Cystein und Glutathion sind Katalysatoren des Redoxsystems des Körpers, das Glutathion dient als Coenzym z.B. der Glykoxalase. Therapeutisch wird Cystein als N-Acetylcystein in der antioxidativen Therapie vor allem bei Lungenerkrankungen zur Mukolyse eingesetzt (Gilissen und Nowak, 1998). N-Acetylcystein wird durch N-Deacetylierung in Cystein metabolisiert und ist in dieser Form im Redoxsystem des Körpers aktiv.

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob im Tumor Wirkspiegel von Chloracetaldehyd vorliegen. Dies ist bisher nicht nachgewiesen worden und durfte auf Grund der kurzen Halbwertszeit von Chloracetaldehyd in vivo, bedingt durch seine hohe Reaktivität, bezweifelt werden. Die zytotoxische Wirkung von Chloracetaldehyd konnte zuvor in vitro an Mammakarzinomzellen (MX1) und am Sarkom (S117) bewiesen werden (Brüggemann et al., 1997). Zum Zweiten wurde nach dem Nachweis von Chloracetaldehyd

im Tumor der Frage nachgegangen, wie das Konzentrationsverhältnis von Chloracetaldehyd zu den protektorisch wirkenden Thiolen ist und wie dieses Verhältnis durch Mesnagabe verändert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchen wurden nu-nu-Mäuse verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in Plastikschalenkäfigen mit der Größe 25 x 45 cm. Bis zu fünf Tiere lebten gemeinsam in einem Käfig. Als Futter bekamen sie Tierfutter der Firma Altromin, Nr. 1434 und Leitungswasser ad libidum. Der Licht- Dunkelrhythmus betrug 12 Stunden bei künstlichem Licht. Nach Abnahme der Tumoren wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Die Versuche waren genehmigt worden unter der Tierversuchsnummer X 330 a – 72241.122 – 4 (33-5/97). Bei den Versuchen „Ifosfamid“, Ifosfamid + Mesna“, „Mesna“ und „Cystein“ wurden zu den einzelnen Meßzeiten alle Substanzen (Cystein, Glutathion, Mesna, Chloracetaldehyd) aus denselben Tumoren gemessen. Die Thiol- und Chloracetaldehydkonzentrationen im Blut wurden an anderen Tieren gemessen, denen wiederholt zu den verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen wurde. Zum Zeitpunkt 0 wurden andere Tumoren gemessen als bei den Versuchen zur Bestimmung der nativen Thiolwerte. Die nativen Thiolwerte im Blut und im Tumor wurden an Mäusen gemessen, denen sowohl Blut als auch der Tumor abgenommen wurde. Insgesamt wurden 125 Tiere eingesetzt. Die gewonnenen Daten sind im Anhang dargestellt.

Nu-nu-Nacktmäuse tragen reinerbig die nude-Mutation, die dazu führt, daß sich bei den Mäusen nur ein Thymusrudiment bildet. Der Thymus ist für die Differenzierung der T-Zellen notwendig. In den Thymuszellen findet gewöhnlich die MHC-Erkennung (major histocompatibility complex) der Zellen statt. Durch das Fehlen der Oberflächenantigenerkennung wird ein Abstoßen körperfremder Gewebe verhindert. Die Ausschaltung der zellulären Abwehr ermöglicht eine Transplantation körperfremden Zellmaterials ohne Abstoßungsreaktion. Bei den nu-nu-Mäusen ist die Entwicklung der Thymusrinde gestört, daher können die gebildeten Lymphozyten nicht differenziert werden (Bevan et al., 1995). Die nude-Mutation ist rezessiv und führt bei Homozygotie neben der Fehlbildung des Thymus zur Haarlosigkeit.

2.2 Narkose

Zur Narkose der Tiere wurde ein Gemisch aus 1/10 Ketamin (Rompun[®]) 2%ige Lösung (1 ml = 20 mg), 1/10 Pentobarbital (1 ml = 50 mg) und 8/10 0,9% Natrium in H₂O verwendet (1 ml Narkosegemisch = 2 mg Ketamin + 5 mg Pentobarbital). Die initiale Dosierung war 0,45 ml für ein 28 g schweres Tier, entsprechend 16 ml/kg. Bei Nachlassen der Narkose wurden jeweils 0,15 ml des Gemisches nachinjiziert. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Das Pentobarbital wurde von der Apotheke der Medizinischen Universität Lübeck hergestellt. Ketamin wirkt sedativ, analgetisch, anästhetisch und muskelrelaxierend. Pentobarbital wirkt hauptsächlich narkotisch, wenig analgetisch und muskelrelaxierend.

2.3 Tumor, Transplantation, Tumorabnahme und Gefrierstop

Der verwendete Tumor war ein MX-1-Mammakarzinom des Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und wurde vom DKFZ in Heidelberg bezogen. Die Transplantation erfolgte durch Teilung des Tumors und subkutane Einpflanzung auf beide Hinterpfoten der Tiere (Wiedemann et al., 1993). Die etwa 1 mm messenden Tumorstücke wurden durch einen kleinen Hautschnitt oberhalb der Hinterpfote am Hinterbein unter die Haut geschoben. Die Schnittwunde wurde mit einem Pflasterstreifen verschlossen. Die Tumoren erreichten eine Größe von sechs bis neun Millimeter Durchmesser nach etwa 18 bis 21 Tagen Wachstum. Es wurden keine nekrotischen Tumoren verwendet.

Die Tumorabnahme erfolgte mit einer in flüssigem Stickstoff auf -196° C gekühlten Zange. Durch diese Methode konnte gewährleistet werden, daß innerhalb weniger Sekunden alle chemischen Reaktionen gestoppt wurden. Somit wurde es möglich, das stark stoffwechselaktive Chloracetaldehyd vor Metabolismus zu bewahren und eine Konzentration zum Zeitpunkt der Tumorabnahme zu bestimmen. Die hierzu benutzte Zange war eine im Handel erhältliche Heimwerkerzange mit einem rasierklingenähnlichen Aufsatz. Die Mäuse waren während der gesamten Behandlungszeit in Narkose. Der Tumor wurde ohne Hautschnitt in toto von der Hinterpfote abgetrennt. Anschließend wurde das Tumormaterial in einem ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser mit einem Pistill zermörsert. Das Material wurde in Kryocups der Firma Eppendorf gefüllt und in flüssigem Stickstoff bis zur Aufarbeitung gelagert.

2.4 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte mit einer heparinisierten 10 µl-Kapillare aus dem retrobulbären Venenplexus.

2.5 Therapie

Die Mäuse wurden im Versuch „Ifosfamid“ mit 250 mg/kg Körpergewicht Ifosfamid behandelt. Die Applikation erfolgte zum Zeitpunkt 0 als Bolus in die Schwanzvene.

Beim Versuch „Ifosfamid + Mesna“ wurden die Mäuse mit 250 mg/kg Körpergewicht Ifosfamid und 786 mg/kg Körpergewicht Mesna, entsprechend der fünffach molaren Menge von Ifosfamid, behandelt. Die Applikation erfolgte zum Zeitpunkt 0 als Bolus in die Schwanzvene. Es wurde erst Ifosfamid appliziert, unmittelbar danach Mesna.

Beim Kontrollversuch „Mesna“ wurden die Mäuse mit 786 mg/kg Körpergewicht Mesna behandelt. Die Applikation erfolgte zum Zeitpunkt 0 als Bolus in die Schwanzvene.

Beim Kontrollversuch „Cystein“ wurden die Mäuse mit 580,5 mg/kg Körpergewicht Cystein, entsprechend der equimolaren Menge Mesna behandelt. Die Applikation erfolgte zum Zeitpunkt 0 als Bolus in die Schwanzvene.

2.6 Thiolbestimmung mit der HPLC

Die High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) dient dazu, zwei oder mehr in einer Flüssigkeit gelöste Stoffe voneinander zu trennen. Die Methode hat eine besondere Stärke in der Trennung polarer, wasserlöslicher Moleküle. Bei der Bestimmung der Thiole nach der von Aebi beschriebenen Methode (Aebi et al.,1991) gehen die zu messenden Stoffe eine fluoreszierende Verbindung mit Monobrombiman ein. Diese Verbindungen werden mit Licht mit einer Wellenlänge von 385 nm erregt (Excitationsstrahlung), das eine Fluoreszenz der Verbindungen mit einer Wellenlänge von 490 nm hervorruft (Emission). Die das Brommolekül tragende Verbindung war in diesem Versuchsaufbau Monobrombiman (Thiolyte®).

Geräte:

	Hersteller / Fabrikat
Liquid Chromatograph (HPLC)	Hewlett Packard Series 1050
Detektor	PF-Detector, Hewlett Packard 1046 A
Verteiler	Hewlett Packard Multichannel interface 25900
Säule	Hewlett Packard HP ODS hypersil. 5 µm, 250 x 4,6 nm
Vorsäule	Hewlett Packard HP ODS hypersil (C18). 5µm, 20 x 4 mm
Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Biofuge A
Waage	Sartorius, Göttingen
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex, TK52

Reagenzien, Chemikalien:

Material	Hersteller
Cystein	Sigma, Deutschland. Nr. C-4022. MG 121,2.
Glutathion	Sigma, Deutschland. Nr. C-406529. MG 307,3.
Mesna	Uromitexan®. ASTA Medica AG. Deutschland.
Ifosfamid	Holoxan®. ASTA Medica AG. Deutschland.
CAA	Aldrich-Chemie. Steinheim, Deutschland. Reinheit > 99,5%.
Thiolylte 18,5 mM (mBrB)	Monobromobimane Reagent. Calbiochem-Novabiochem Corporation. La Jolla, USA.
Natronlauge	NaOH 0,1 M (4,2 g NaOH ad 1000 ml H ₂ O)
Phosphatpuffer	Na ₂ HPO ₄ 0,1 M, pH 8 (1,42 g Na ₂ HPO ₄ ad 100 ml H ₂ O)
DTT (1,4-Dithiotreitol) 12 mM 1,85 mg/ml a.d.	Calbiochem-Novabiochem Corporation. La Jolla, USA.

Fließmittel der HPLC:

A	B
7,03 g Na-Perchlorat	7,03 g Na-Perchlorat
50 ml Acetonitril (ACN)	200 ml aqua dest
2,5 ml Essigsäure	2,5 ml Essigsäure
Auf 1 l mit aqua dest aufgefüllt, mit NaOH 5M auf pH 3,7 eingestellt	Auf 1 l aufgefüllt mit Acetonitril (ACN)

Lösungsmittelgradient:

Minuten	%A	%B
0	98	2
15	87	13
18	0	100

2.7 Messung aus Blut

Aufarbeitung der Proben:

Das Blut wurde in 10 µl-Kapillaren aus dem retrobulbären Plexus der Maus abgenommen, die in 100 µl Phosphatpuffer und 10 µl Thiolyte ausgeschüttelt wurden. Die entstandene Lösung wurde fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend mit 20 µl 6% Perchlorsäure versetzt. Anschließend wurde 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Gefäße pipettiert. Die Messung erfolgte entweder sofort, oder die Proben wurden bei -70°C tiefgefroren.

2.8 Messung aus dem Tumor

Aufarbeitung der Proben:

Der Tumor wurde mit Hilfe einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Tumorfazange von der Hinterpfote abgeknipst und anschließend in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser mit einem vorgekühlten Pistill zermörsert. Das Material wurde in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Die zu messende Probe wurde mit einem gekühlten Spatel in 0,2ml Trichloressigsäure eingewogen. Die eingewogene Masse betrug jeweils etwa acht bis 15mg.

Das eingewogene Tumormaterial wurde fünf Minuten mittels Ultraschall homogenisiert und anschließend eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. 30 µl des Überstandes wurden mit 10 µl Natronlauge, 30 µl Phosphatpuffer und 10 µl Aqua destillata versetzt. Dazu wurden 10 µl Thiolyte gegeben. Dies wurde fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend mit 20 µl 6% Perchlorsäure neutralisiert, danach eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Gefäße pipettiert. Die Messung erfolgte entweder sofort, oder die Proben wurden bei -70°C tiefgefroren.

Für die Messung der Proben aus dem Xenograft wurden Eichreihen erstellt. Diese Eichreihen bestanden ebenfalls aus Messungen von 1 µmol/l bis 500 µmol/l. Diese Messungen wurden je Konzentration drei mal wiederholt. Aus den Mittelwerten wurde Ausgleichsgerade errechnet, die zur Bestimmung der Konzentrationen verwendet wurde. Die Erstellung der Ausgleichgeraden und die Integration der gemessenen Konzentrationen erfolgte mit dem Programm HPChemStation beziehungsweise wurde wegen Ersatzes der Software gemeinsam mit den Eichreihen wiederholt mit dem Programm HPLC[®].

2.9 Gesamtthiole

Für die Messung der Gesamtthiole wurde die gleiche Aufarbeitung durchgeführt, die Proben allerdings vor der Zugabe von Thiolyte 45 Minuten mit 10 µl Dithiotreitol-Lösung reduziert.

2.10 Chloracetaldehydbestimmung mit der Gaschromatographie

Die Gaschromatographie dient dazu, Substanzen voneinander zu trennen, die sich unzersetzt rückstandsfrei verdampfen oder zu stabilen Endprodukten reproduzierbar zersetzen lassen (Jentzsch, 1975). Bei der Gaschromatographie wird die aufzutrennende Lösung in einem Ofen vergast und in eine mit einem Trägergas durchströmte Trennsäule eingespeist. Durch die unterschiedliche Affinität der zu bestimmenden Stoffe zu dem Trägergas und der Säule wird die Lösung aufgetrennt und die verschiedenen Moleküle zeitlich versetzt an einem Detektor vorbeigeführt. Durch Integration der Meßkurven kann eine quantitative Bestimmung vorgenommen werden.

Es gibt verschiedene Methoden der Konzentrationsmessung am Detektor. Im vorliegenden Fall wurde ein Elektronen-Einfang-Detektor benutzt. Durch Beschuß der Meßkammer mit β -Strahlung entstehen durch Wechselwirkung mit dem Trägergas positive und negative Ladungsträger. Mit einer Elektrode wird so ein Nullstrom meßbar, der durch die verschiedenen durchlaufenden Moleküle beeinflusst wird. Diese Spannungsänderungen werden verstärkt und können registriert werden. Der Elektronen-Einfang-Detektor wurde gewählt, um gezielt das Chlor-Ion im Chloracetaldehyd zu messen. Da Aldehyde chemisch stark aktive Substanzen sind, ist Chloracetaldehyd schon nach kurzer Zeit nicht mehr in

einer Probe nachweisbar. Um die chemische Reaktion des Chloracetaldehyds gering zu halten, wurden die Proben mit Formaldehyd in stark überschüssiger Konzentration versetzt. Die Reaktionen mit Aldehyden gehen somit größtenteils vom Formaldehyd aus. Chloracetaldehyd bleibt in seiner Konzentration fast konstant. Bei der Messung des Aldehyds ist das Chlor-Ion signalgebend, das nur in Chloracetaldehyd, nicht aber in Formaldehyd enthalten ist. Somit ist gewährleistet, daß Chloracetaldehyd nicht vermindert wird und nicht fälschlicherweise die Konzentration des Formaldehyd gemessen wird. Es wurde zur Verbesserung der Meßgenauigkeit ein interner Standard verwendet. Hierzu diente Trichloressigsäure. Der Detektor erfaßte quantitativ die Chlorionen. Auf Grund der grundsätzlich anderen Durchlaufzeit durch die Säule als Chloracetaldehyd konnte Trichloressigsäure in bekannter Konzentration einen Bezugspik liefern.

Laborgeräte:

Material	Hersteller / Fabrikat
Gaschromatograph	Hewlett Packard Gaschromatograph HP 5890 Serie II
Säule	HP-5 Crosslinked 5%PhMeSilicone, 25 m x 0,32 mm x 1,05 µm
Detektor	ECD-Detektor HP

Einstellungen und verwendete Lösungen:

Bezeichnung	Material / Zeit
Trägergas	Helium
Purge	5,6
Make-Up-Gas	Stickstoff
Retentionszeit CAA	Ca. 2,3 min
Retentionszeit interner Standard	Ca. 3,6 min
Formaldehydlösung 3,7%	Formaldehyd 37% 1:10 in NaCl 0,9% in H ₂ O
Interner Standard	Trichloressigsäure (CCl ₃ COOH) 1:10 ⁵ in Methanol (CH ₃ OH)
Stammlösung CAA zur Kalibrierung	15,7µl CAA in 100 ml NaCl 0,9% in H ₂ O = 1 mM CAA

Meßbedingungen des Gaschromatographen:

Helium-flow	1,8 l/min bei 63kPa
Stickstoff-flow	60 ml/min
Injektionstemperatur	200°C
Ofentemperatur bei Einspeisung	35°C für 3 Minuten
Temperatursteigerung	45°C /min
Endtemperatur	120°C für 1 Minute

2.11 Messung aus Blut

Aufarbeitung der Proben:

Das Blut wurde in 10 µl-Kapillaren abgenommen, die in 100 µl Formaldehyd ausgeschüttelt wurden. Diese Lösung wurde eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. 80 µl des Überstandes wurden mit 8 µl internem Standard (Trichloressigsäure) versetzt. 2 µl hiervon wurden dann mit einer Injektionspipette in den Gaschromatographen injiziert. Die Proben wurden sofort nach der Aufarbeitung gemessen. Bei jeder Meßreihe wurde eine Kalibrierungsreihe 5, 10, 30, 50 µmol/l Chloracetaldehyd mitgemessen, die auf dieselbe Weise aufgearbeitet worden waren.

2.12 Messung aus dem Tumor

Aufarbeitung der Proben:

Die zu messende Probe wurde mit einem vorgekühlten Spatel in 150 µl 3,7 % Formaldehyd-Lösung eingewogen. Die eingewogene Masse betrug jeweils etwa acht bis 15 mg. Dieses eingewogene Tumormaterial wurde fünf Minuten im Ultraschall gelöst und anschließend eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. 2 µl des Überstandes wurden mit einer Injektionspipette in den Gaschromatographen injiziert. Die Proben wurden sofort nach der Aufarbeitung am Gaschromatographen gemessen. Ein interner Standard wurde nicht verwendet, da sich die Meßgenauigkeit ohne internen Standard als genauer herausstellte. Zur Kalibrierung der Methode wurden Standards mit Chloracetaldehydkonzentrationen von 0,1 µmol/l bis 1,0 µmol/l in Schritten von 0,1 µmol/l gemessen. Die Verdünnung erfolgte in 0,9% NaCl. Je Konzentration wurden zehn Werte bestimmt. Diese Mittelwerte wurden in einem Diagramm aufgetragen und eine Ausgleichsgerade gelegt. Es ergab sich eine lineare Steigung der Geraden in einem Bereich

von 0,1 bis 0,8 $\mu\text{mol/l}$. Die Gerade wurde durch den Nullpunkt gelegt, als untere Nachweisgrenze wurde 0,1 $\mu\text{mol/l}$ definiert.

Gleichung 1: Formel zur Berechnung der Chloracetaldehydkonzentration. $C_{(\text{Tu})}$ ist die Tumorkonzentration in $\mu\text{mol/kg}$, P die gemessene Peakhöhe, F der Faktor $0,1669754 \mu\text{mol} \times \mu\text{l/mm} \times \text{g}^2$, m die eingewogene Tumormasse in mg und 150 μl das Volumen, in das der Tumor eingewogen wurde.

$$C_{(\text{Tu})[\mu\text{mol/kg}] = P \times F \times m / 150\mu\text{l}}$$

2.13 Biometrische Auswertung

Bei der Bestimmung der Werte aus dem Xenograft wurden jeweils sechs Tumoren gemessen. Auf Grund einiger nicht verwertbarer Ergebnisse bei beispielsweise nekrotischen Tumoren wurden mindestens je vier Ergebnisse in die Auswertung einbezogen. Die meisten Tiere hatten an einer Hinterpfote einen Tumor eingepflanzt bekommen. Bei einigen waren auf beide Hinterpfoten Tumoren gepflanzt worden, die dann jeweils nach derselben Behandlung abgenommen worden waren. Die Aufarbeitung der Tumoren erfolgte in allen Fällen getrennt, das heißt daß kein Pooling stattfand. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism[®]. Die in der graphischen Darstellung gezeigten Standardabweichungen wurden mit demselben Programm berechnet. Bei der Bestimmung der Blutwerte wurden jeweils sechs Meßwerte zugrunde gelegt. Die Blutproben stammten von sechs verschiedenen Mäusen, denen zu den gegebenen Zeiten Blutproben entnommen wurden. Die Originaldaten sind im tabellarischen Anhang dargestellt.

Eine pharmakokinetische Auswertung mit Berechnung der AUC der verschiedenen Verläufe der untersuchten Substanzen wurde auf Grund der zu geringen Zahl an Meßpunkten nicht durchgeführt. Eine für eine statistische Aussage ausreichende Zahl an Messungen konnte aus Gründen des Tierschutzes nicht durchgeführt werden, da für jede Messung aus dem Tumor ein Tier getötet werden mußte. Die Ergebnisse sind deshalb als Säulendiagramme dargestellt und können den Trend eines pharmakokinetischen Verlaufs widerspiegeln.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenvalidierung

3.1.1 Cysteinmessung aus Blut

Bei allen Messungen, sowohl im Tumor als auch im Blut, mit der Gaschromatographie und der HPLC, konnten wegen der geringen Konzentrationen der zu messenden Metabolite und der extrem geringen Tumormasse bzw. Blutabnahmemenge die allgemein im Labor geltenden Qualitätskriterien für bioanalytische Meßverfahren nicht durchgehend eingehalten werden. Die Genauigkeit der Methoden sind in Tabellenform dargestellt, wobei die Richtigkeit der Messung (wird die vorgegebene Konzentration als die vorgegebene Konzentration gemessen?) als Mittelwerte der Messungen dargestellt sind. Die Präzision als zweites Qualitätsmerkmal wurde ebenfalls berechnet (Standardabweichung/Mittelwert) und als Variationskoeffizient in den Tabellen dargestellt.

Bei der Messung des Cysteins ergab sich ein linearer Meßbereich von 10 µmol/l bis 100 µmol/l. Der Korrelationskoeffizient lag bei dieser Messung bei 0,989. Für die Messung des Gesamtcysteins ergab sich der gleiche Linearitätsbereich. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,99896.

Tabelle 1: Mittelwerte der Kalibrierung. Die Anzahl der Messungen betrug n=4 an verschiedenen Tagen. Es wurden Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet.

Messung von Cystein im Blut			
Wert	Mittelwert der Messungen	Standardabweichung	Variationskoeffizient
100 µmol/l	110,52	10,956	9,9%
70 µmol/l	69,56	4,471	6,4%
50 µmol/l	46,303	8,617	18,6%
30 µmol/l	27,808	8,657	31,1%
10 µmol/l	16,875	0,148	0,9%

Für die zweite Kalibrierungsreihe ergab sich ein linearer Meßbereich von 3µmol/l bis 500µmol/l. Hierbei lag der Korrelationskoeffizient bei 0,99980.

3.1.2 Glutathionmessung aus Blut

Bei der Messung des Glutathions ergab sich ein linearer Meßbereich von 100µmol/l bis 10000µmol/l. Der Korrelationskoeffizient liegt bei dieser Messung bei 0,998. Für die Messung des Gesamtglutathions ergab sich der gleiche Linearitätsbereich. Der Korrelationskoeffizient lag hier bei 0,98711.

Tabelle 2: Mittelwerte der Kalibrierung. Die Anzahl der Messungen betrug n = 4. Es wurden Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet.

Messung von Glutathion aus Blut			
Wert	Mittelwert der Messungen	Standardabweichung	Variationskoeffizient
10000 µmol/l	9258,633	216,72	2,3%
7500 µmol/l	89737,55	221,23	0,2%
5000 µmol/l	5155,54	841,25	16,3%
2500 µmol/l	2907,1	344,82	11,9%
1000 µmol/l	1141,38	149,28	13,1%
500 µmol/l	509,65	41,49	8,1%
300 µmol/l	310,993	54,595	17,6%
100 µmol/l	98,836	13,94	14,1%

Für die zweite Kalibrierungsreihe ergab sich ein linearer Meßbereich von 100 µM bis 10000 µmol/l. Der Korrelationskoeffizient lag hier bei 0,99748.

3.1.3 Mesnamessung aus Blut

Bei der Messung des Mesnas ergab sich ein linearer Meßbereich von 10 µmol/l bis 500 µmol/l. Der Korrelationskoeffizient lag bei dieser Messung bei 0,973. Da auch Messungen in höheren Bereichen durchgeführt werden mußten, wurde für die Messung höherer Werte eine zweite Kalibrierungsreihe erstellt. Bei dieser Reihe lag der lineare Bereich zwischen 500 µmol/l und 10000 µmol/l. Der Korrelationskoeffizient betrug bei dieser Messung 0,959. Bei Messungen, die über diesen Meßbereich hinausgingen, wurde die Probe in einer Verdünnung von 1:10 erneut gemessen.

Tabelle 3: Mittelwerte der gemessenen Kalibrierung. Die Anzahl der Messungen war n = 4. Die Kalibrierung wurde für Werte von 30 µmol/l bis 500 µmol/l genutzt.

Messung von Mesna aus Blut --Kalibrierung 10 µmol/l - 500 µmol/l			
Wert	Mittelwert der Messungen	Standardabweichung	Variationskoeffizient
500 µmol/l	491,825	18,705	3,8%
300 µmol/l	313,117	38,8	12,4%
100 µmol/l	108,337	15,237	14,1%
70 µmol/l	63,321	2,152	3,4%
50 µmol/l	47,87	4,311	9,0%
30 µmol/l	28,896	1,98	6,9%

Tabelle 4: Mittelwerte der gemessenen Kalibrierung. Die Anzahl der Messungen war n = 4. Die Kalibrierung wurde für Werte von 1000 µmol/l bis 10000 µmol/l genutzt.

Messung von Mesna aus Blut -- Kalibrierung 1000 µmol/l- 10000µmol/l			
Wert	Mittelwert der Messungen	Standardabweichung	Variationskoeffizient
10000µmol/l	8906,27	705,31	7,9%
7500µmol/l	8511,16	628,31	7,4%
5000µmol/l	6038,276	488,39	8,1%
2500µmol/l	3224,47	662,45	20,5%
1000 µmol/l	1150,31	23,29	2,0%

Für die zweite Kalibrierungsreihe ergab sich ein linearer Meßbereich von 10µM bis 500µmol/l. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,99663. Eine weitere Meßreihe wurde nicht benötigt, da die Werte nach der Gabe von Mesna im Blut mit den ersten Meßreihen gemessen wurden. Bei Überschreitungen des Meßbereichs wurden die Proben weiter verdünnt.

3.1.4 Cysteinmessung aus dem Tumor

Bei der Messung des Cysteins ergab sich ein linearer Meßbereich von 3 µmol/l bis 100 µmol/l. Der Korrelationskoeffizient lag bei dieser Messung bei 0,934. Für die zweite Kalibrierungsreihe ergab sich der gleiche lineare Meßbereich. Der Korrelationskoeffizient betrug hier 0,98821.

3.1.5 Glutathionmessung aus dem Tumor

Bei der Messung des Glutathions ergab sich ein linear ansteigender Meßbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 500 $\mu\text{mol/l}$. Der Korrelationskoeffizient lag bei dieser Messung bei 0,998. Für die zweite Kalibrierungsreihe ergab sich der gleiche lineare Meßbereich. Der Korrelationskoeffizient betrug hier 0,98517.

3.1.6 Mesnamessung aus dem Tumor

Bei der Messung des Mesnas ergab sich ein linear ansteigender Meßbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 500 $\mu\text{mol/l}$. Der Korrelationskoeffizient lag bei dieser Messung bei 0,999. Für die zweite Kalibrierungsreihe ergab sich ein linearer Meßbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 300 $\mu\text{mol/l}$. Der Korrelationskoeffizient betrug hier 0,97339.

3.1.7 Chloracetaldehydmessung aus dem Tumor

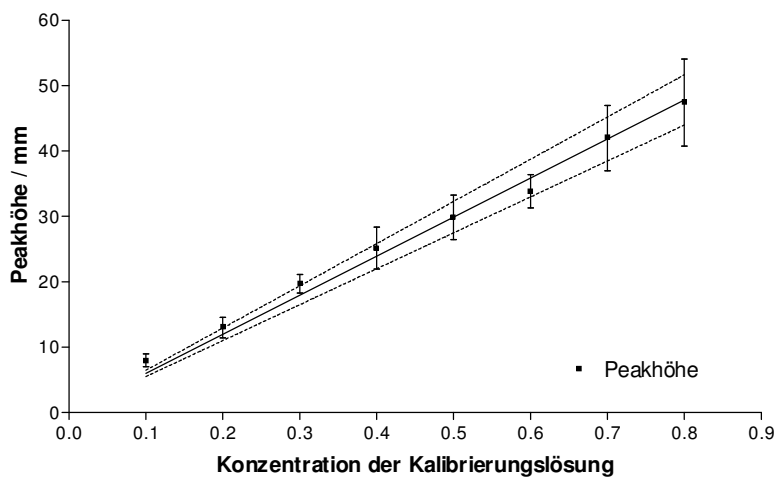


Abbildung 6: Kalibrierung der Chloracetaldehydmessung. Es wurden Konzentrationen von 0,1 bis 0,8 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Die Meßwerte wurden graphisch dargestellt und eine durch den Nullpunkt gehende Ausgleichsgerade gelegt. Dargestellt sind die Peakhöhen und die Standardabweichung der gemessenen Proben. Außerdem dargestellt ist das 95%-Konfidenzintervall.

Die graphische Auftragung der Ergebnisse ergab eine Steigung von 59,889 $\text{mm}/\mu\text{mol/l}$, was 0,1669754 $\mu\text{mol/l/mm}$ entspricht. Die eingewogene Tumormasse betrug acht bis 15 mg, was eine Nachweisgrenze für Chloracetaldehyd im Tumor von etwa 1,5 $\mu\text{mol/kg}$ ergibt.

3.2 Native Thiolwerte unbehandelter nu-nu-Mäuse

Es wurden die Anteile von reduziertem Glutathion und Cystein am Gesamtglutathion und Gesamtcystein gemessen. Die Anteile von reduziertem Cystein und Glutathion wurden berechnet. Das Cystein liegt überwiegend in oxidiertem Form als Cystin vor. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt. Die Absolutwerte der Konzentrationen sind in der Beschriftung der Graphiken aufgeführt. Der Anteil reduzierten Cysteins liegt im Tumor bei 64%, im Vollblut bei 71%. Glutathion im Tumor ist zu 57% reduziert, im Vollblut zu 90%.

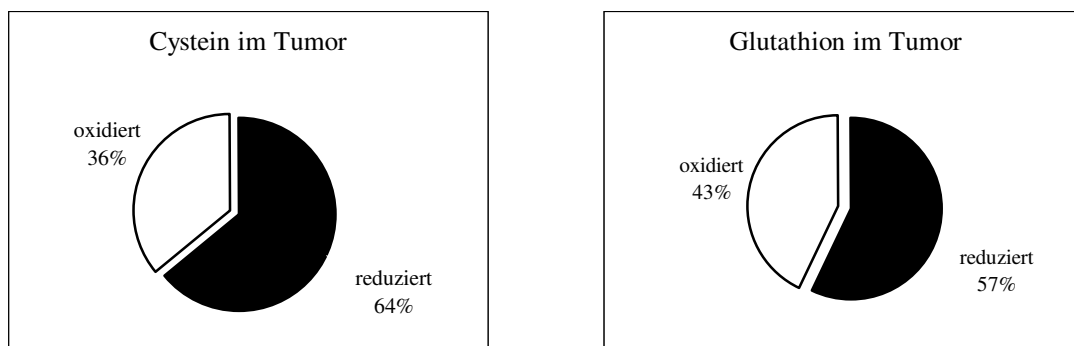


Abbildung 7: Anteile von reduziertem (605,16 $\mu\text{mol/kg}$) und oxidiertem (459,31 $\mu\text{mol/kg}$) Glutathion (rechts) des Gesamtglutathions und von als Cystein (107,09 $\mu\text{mol/kg}$) und als Cystin (60,24 $\mu\text{mol/kg}$) vorliegenden Gesamtcysteins (links) in auf nu-nu-Mäuse transplantierten MX1-Tumoren.

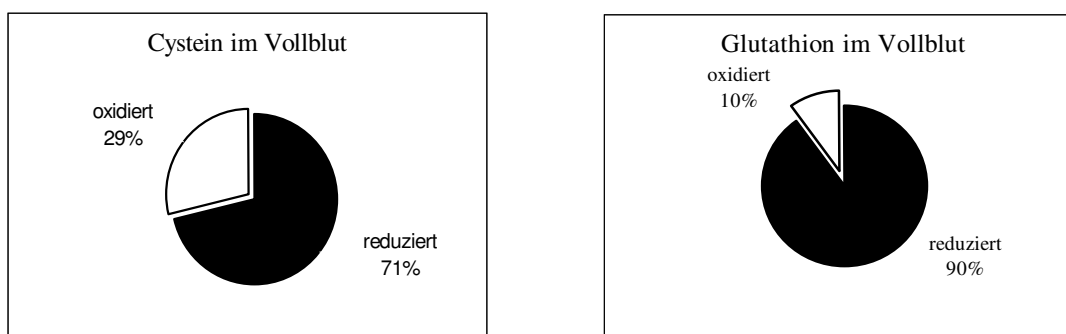


Abbildung 8: Anteile von reduziertem (1069,69 $\mu\text{mol/l}$) und oxidiertem (118,85 $\mu\text{mol/l}$) Glutathion (rechts) des Gesamtglutathions und von als Cystein (54,95 $\mu\text{mol/l}$) und als Cystin (22,44 $\mu\text{mol/l}$) vorliegenden Gesamtcysteins (links) im Vollblut von nu-nu-Mäusen.

3.3 Messungen nach der Gabe von Ifosfamid ohne Mesna

Die Cysteinkonzentration im nativen Vollblut beträgt etwa 20% der Cysteinkonzentration im MX1-Tumor. Die Cysteinkonzentration steigt nach der Gabe von Ifosfamid leicht an und bleibt auf einem leicht erhöhten Niveau in den ersten 120 Minuten nach der Ifosfamidgabe. Dieser Anstieg ist sehr gering. Die Cysteinkonzentration im Tumor fällt direkt nach der Ifosfamidgabe auf die Hälfte des ursprünglichen Spiegels und steigt 120 Minuten nach der Ifosfamidgabe wieder bis auf 80% des Ausgangsspiegels (Abb. 9).

Die Glutathionkonzentration im nativen Vollblut ist in etwa gleich der Glutathionkonzentration im MX1-Tumor. Die Glutathionkonzentration im Blut ist nach der Gabe von Ifosfamid nahezu unverändert, es läßt sich kein Einfluß durch die Ifosfamidmetaboliten erkennen. Die Glutathionkonzentration im Tumor steigt nach der Gabe von Ifosfamid auf mehr als das doppelte des Ausgangswertes nach 15 Minuten an, weiter bis nach 60 Minuten bei der 2,5fachen Konzentration ein Peak erreicht ist und zeigt dann nach 120 Minuten eine absteigende Tendenz (Abb. 10).

Chloracetaldehyd ist bereits 15 Minuten nach der Gabe von Ifosfamid im Blut nachweisbar in einer Konzentration von 32 $\mu\text{mol/l}$. Nach 60 Minuten ist die höchste Konzentration mit 44 $\mu\text{mol/l}$ erreicht, nach 120 Minuten ist es schon wieder auf 29 $\mu\text{mol/l}$ gefallen. Im Tumor ist die Chloracetaldehydkonzentration nach 15 Minuten bei 9 $\mu\text{mol/l}$, die höchste Konzentration ist nach 60 Minuten erreicht mit 19 $\mu\text{mol/l}$, nach 120 Minuten beträgt sie noch 12 $\mu\text{mol/l}$. Die Konzentration im Tumor erreicht nur ein Drittel der Konzentration im Vollblut (Abb. 11).

3.3.1 Cystein

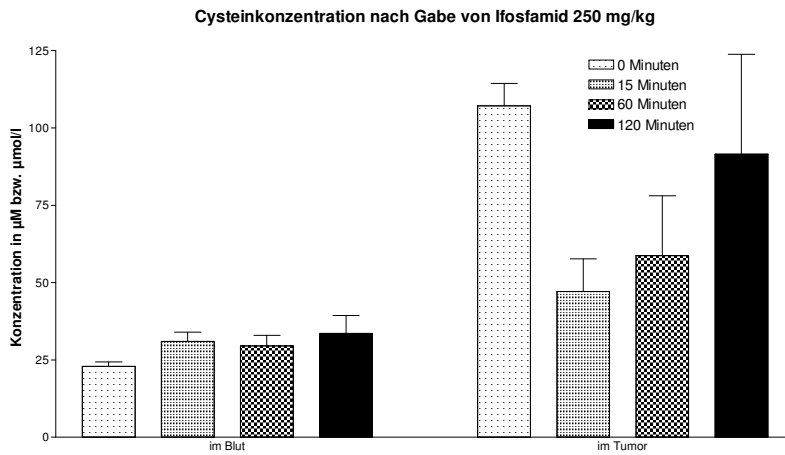


Abbildung 9: Cysteinkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid 250 mg/kg. Dargestellt ist der Mittelwert der Konzentration und die Standardabweichung in $\mu\text{mol/kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol/l}$ (Blut).

3.3.2 Glutathion

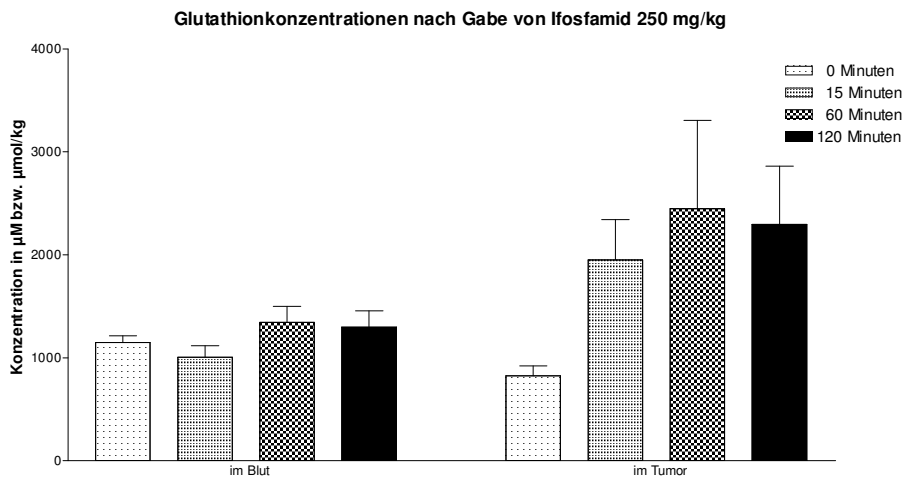


Abbildung 10: Glutathionkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid 250 mg/kg. Dargestellt ist der Mittelwert der Konzentration und die Standardabweichung in $\mu\text{mol/kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol/l}$ (Blut).

3.3.3 Chloracetaldehyd

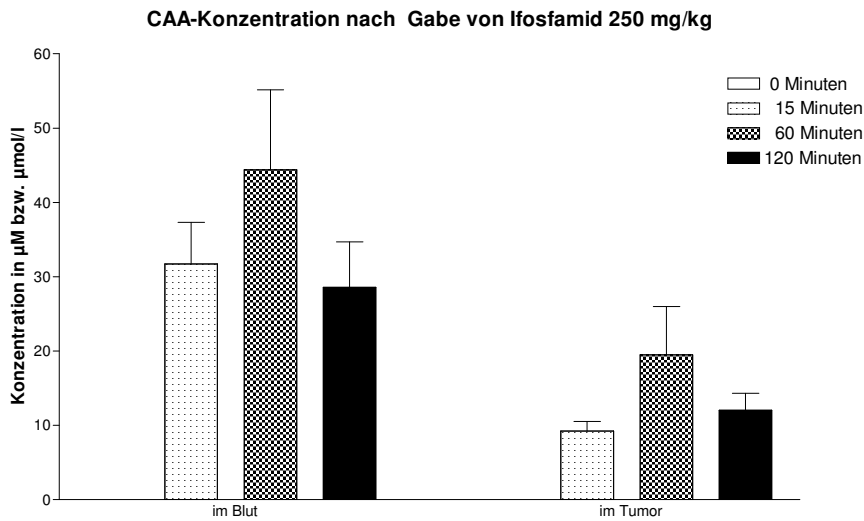


Abbildung 11: Konzentration von Chloracetaldehyd nach der Gabe von Ifosfamid. Dargestellt ist der Mittelwert der Konzentration und die Standardabweichung in $\mu\text{mol/kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol/l}$ (Blut).

3.4 Messungen nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna

Die Cysteinkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna im Blut zeigt nach 60 Minuten einen Anstieg und ist nach 120 Minuten bereits wieder gefallen. Nach 24 Stunden hat sich der Normalspiegel des Cysteins wieder eingestellt ($21\mu\text{mol/kg}$). Die Cysteinkonzentration im Tumor ist nach 15 Minuten auf etwa 75% des Ausgangswertes gefallen, nach 60 Minuten ist der Ausgangswert wieder erreicht, nach 120 Minuten allerdings ist er niedriger als nach 15 Minuten. Nach 24 Stunden hat sich die normale Cysteinkonzentration wieder eingestellt (Abb. 12). Der Verlauf der Glutathionkonzentration im Blut nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna zeigt einen dem Cysteinspiegel entsprechenden Verlauf. Nach 15 Minuten ist die Glutathionkonzentration leicht gestiegen, nach 60 Minuten ist das Maximum erreicht, nach 120 Minuten fällt die Glutathionkonzentration bereits wieder. Nach 24 Stunden ist der Grundwert mit $1056\mu\text{mol/l}$ wieder erreicht. Im Tumor steigt der Glutathionspiegel auf mehr als das Dreifache nach 15 Minuten, fällt dann wieder und erreicht nach 24 Stunden noch nicht ganz wieder den Grundwert (Abb. 13). Die Mesnakonzentration beträgt 15 Minuten nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna im Blut $4844\mu\text{mol/l}$ und sinkt dann exponentiell auf $807\mu\text{mol/l}$ nach 60 und auf $360\mu\text{mol/l}$ nach 120 Minuten ab (Abb. 14).

Im Tumor wurden ebenfalls Mesnakonzentrationen gemessen, obwohl Mesna nicht in Tumorzellen aufgenommen wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Tumorproben nicht nur intrazelluläres Material enthielten, sondern durch die Abnahmetechnik auch die Gefäße und der Extrazellularraum im Tumorkompartiment enthalten waren. Die Werte dort betragen nach 15 Minuten 751 $\mu\text{mol/l}$, nach 60 Minuten 1512 $\mu\text{mol/l}$ und nach 120 Minuten 936 $\mu\text{mol/l}$. Nach 24 Stunden war auch im Blut kein Mesna mehr nachweisbar. Chloracetaldehyd ist mit einer Konzentration von 14 $\mu\text{mol/l}$ 15 Minuten nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna im Blut nachweisbar. Nach 60 Minuten beträgt die Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$, nach 120 Minuten 9 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 15).

Im Tumor beträgt die Konzentration nach 15 und 60 Minuten 9 $\mu\text{mol/l}$ und nach 120 Minuten 17 $\mu\text{mol/l}$. Im Vergleich ist die Blutkonzentration von Chloracetaldehyd nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna niedriger als nach der Gabe von Ifosfamid, im Tumor hingegen werden gleiche Werte erreicht.

3.4.1 Cystein

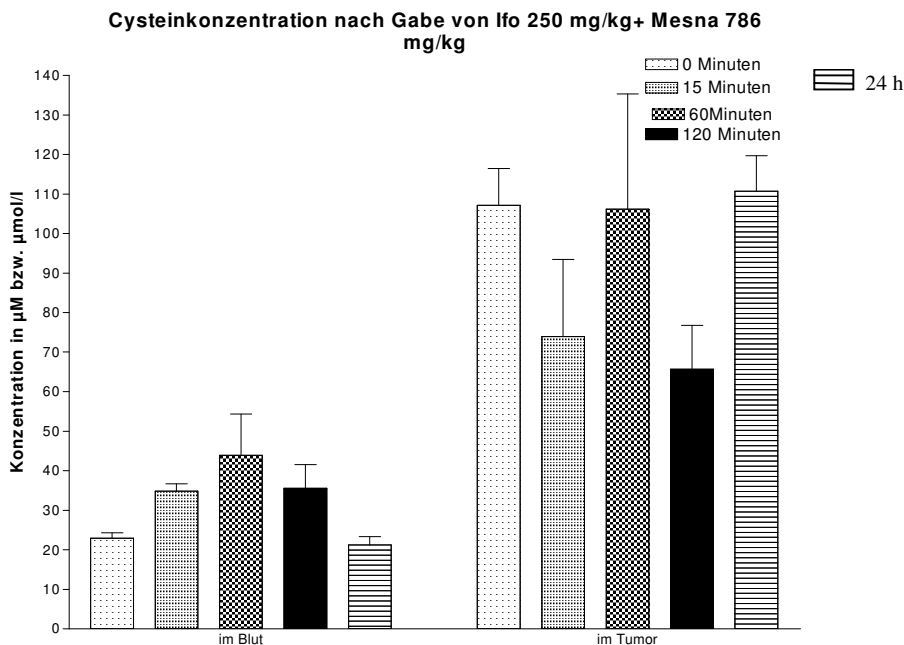


Abbildung 12: Cysteinkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna. Dargestellt ist die Konzentration in $\mu\text{mol/kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol/l}$ (Blut).

3.4.2 Glutathion

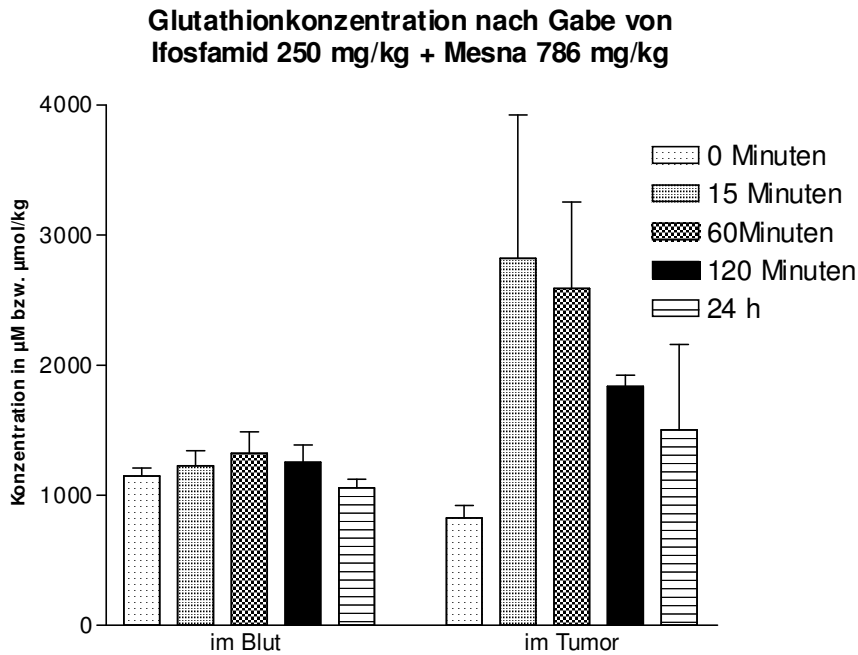


Abbildung 13: Glutathionkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna. Dargestellt ist die Konzentration in µmol/kg (Tumor) bzw. in µmol/l (Blut).

3.4.3 Mesna

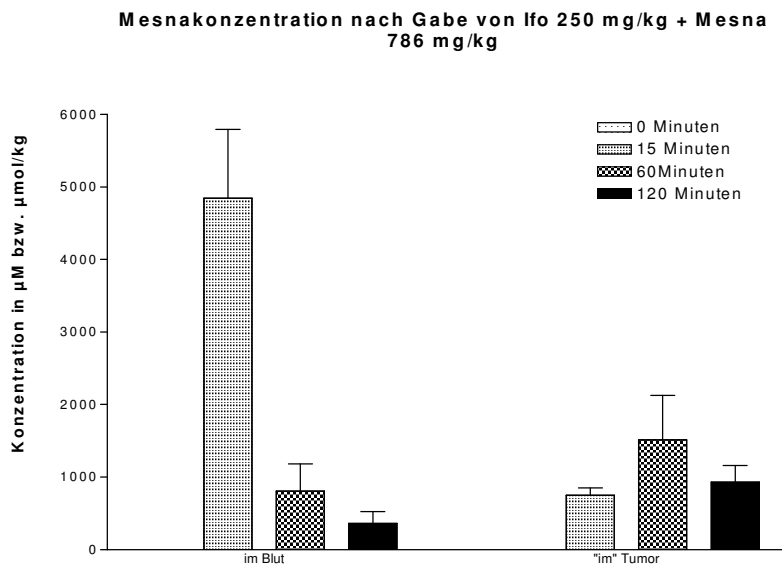


Abbildung 14: Mesnakkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna. Dargestellt ist die Konzentration in µmol/kg (Tumor) bzw. in µmol/l (Blut).

3.4.4 Chloracetaldehyd

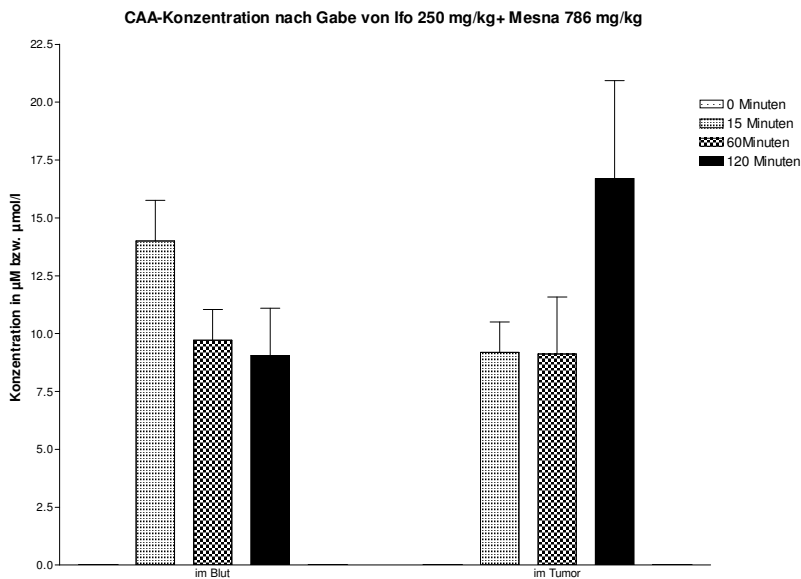


Abbildung 15: Chloracetaldehydkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna. Dargestellt ist die Konzentration in $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol}/\text{l}$ (Blut).

3.5 Messungen nach der Gabe von Mesna

Die Cysteinkonzentration im Blut beträgt 15 Minuten nach der Gabe von Mesna $14 \mu\text{mol}/\text{l}$, nach 60 Minuten $27 \mu\text{mol}/\text{l}$ und nach 120 Minuten $18 \mu\text{mol}/\text{l}$. Im Tumor bleibt die Cysteinkonzentration nach 15 Minuten fast gleich und steigt dann nach 60 Minuten stark auf das 1,5fache und nach 120 Minuten auf das Doppelte an (Abb. 16). Die Glutathionkonzentration im Blut steigt 15 Minuten nach Mesnagabe stark an auf das 1,6fache und bleibt dann auf einem konstanten Level nach 60 und 120 Minuten. Die Glutathionkonzentration im Tumor zeigt eine Abhängigkeit von den Blutglutathionwerten, sie steigt auf $1442 \mu\text{mol}/\text{l}$ nach 15 Minuten, auf $1590 \mu\text{mol}/\text{l}$ nach 60 Minuten und bleibt ebenfalls fast konstant bei $1580 \mu\text{mol}/\text{l}$ nach 120 Minuten (Abb. 17).

Die Mesnakonzentration zeigt sowohl im Blut als auch im Tumor einen exponentiell abnehmenden Verlauf. Die Mesnakonzentration zeigt im Blut nach 15 Minuten Werte von $10395 \mu\text{mol}/\text{l}$, nach 60 Minuten $4136 \mu\text{mol}/\text{l}$ und nach 120 Minuten $2577 \mu\text{mol}/\text{l}$. Im Tumor betragen die Werte nach 15 Minuten $2056 \mu\text{mol}/\text{l}$, nach 60 Minuten $1101 \mu\text{mol}/\text{l}$ und nach 120 Minuten $685 \mu\text{mol}/\text{l}$. Dies entspricht jeweils etwa 20% des Blutgehaltes an Mesna, also etwa dem Volumen, das den extrazellulären Anteil des Gewebes ausmacht.

3.5.1 Cystein

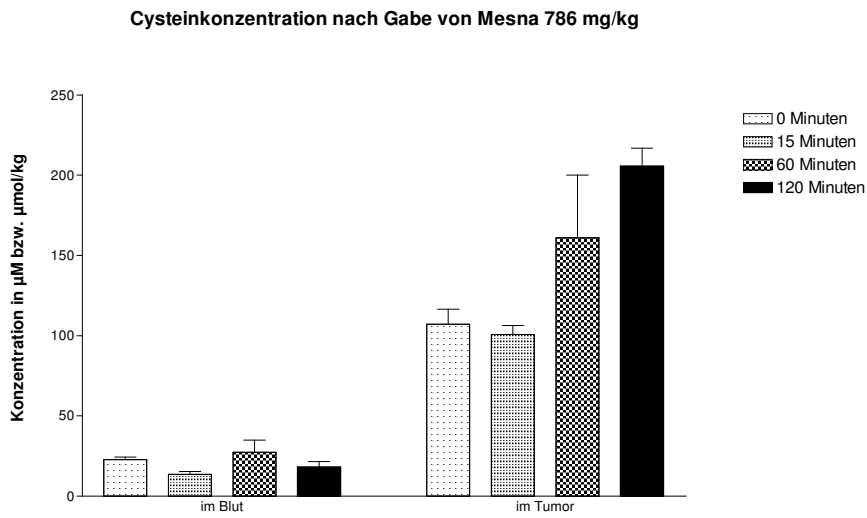


Abbildung 16: Cysteinkonzentration nach der Gabe von Mesna. Dargestellt ist die Konzentration in $\mu\text{mol/kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol/l}$ (Blut).

3.5.2 Glutathion

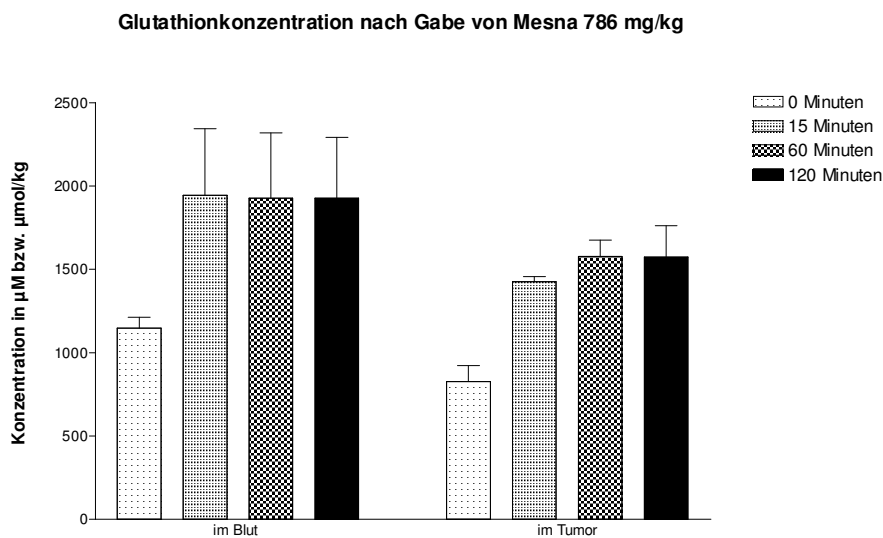


Abbildung 17: Glutathionkonzentration nach der Gabe von Mesna. Dargestellt ist die Konzentration in $\mu\text{mol/kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol/l}$ (Blut).

3.5.3 Mesna

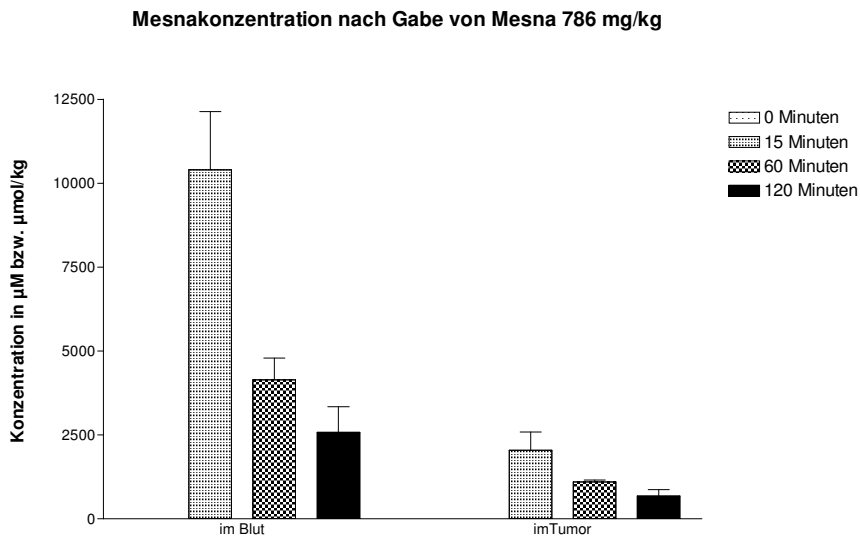


Abbildung 18: Mesnakonzentration nach der Gabe von Mesna. Dargestellt ist die Konzentration in $\mu\text{mol/kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol/l}$ (Blut).

3.6 Messungen nach der Gabe von Cystein

Die Cysteinkonzentration steigt nach der Gabe von Cystein im Blut auf $7174 \mu\text{mol/l}$ und fällt dann auf $2304 \mu\text{mol/l}$ nach 60 Minuten und auf $803 \mu\text{mol/l}$ nach 120 Minuten. Im Tumor steigt die Konzentration auf $567 \mu\text{mol/l}$ nach 15 Minuten und fällt dann auf $177 \mu\text{mol/l}$ nach 60 Minuten, steigt dann wieder etwas auf $252 \mu\text{mol/l}$ nach 120 Minuten (Abb. 19). Die Glutathionkonzentration im Blut steigt nach der Gabe von Cystein stark an auf $2785 \mu\text{mol/l}$ und bleibt dann auf einem hohen Niveau bei $2413 \mu\text{mol/l}$ nach 60 Minuten und $2628 \mu\text{mol/l}$ nach 120 Minuten (Abb. 20). Die Tumorkonzentrationen zeigen eine Korrelation zu den Blutwerten, befinden sich aber auf einem weit niedrigeren Niveau. Der Anstieg dort ist nicht so stark, der Verlauf an sich aber ähnlich. Die Konzentration beträgt nach 15 Minuten $584 \mu\text{mol/l}$, nach 60 Minuten $429 \mu\text{mol/l}$ und nach 120 Minuten $431 \mu\text{mol/l}$ (Abb. 20).

3.6.1 Cystein

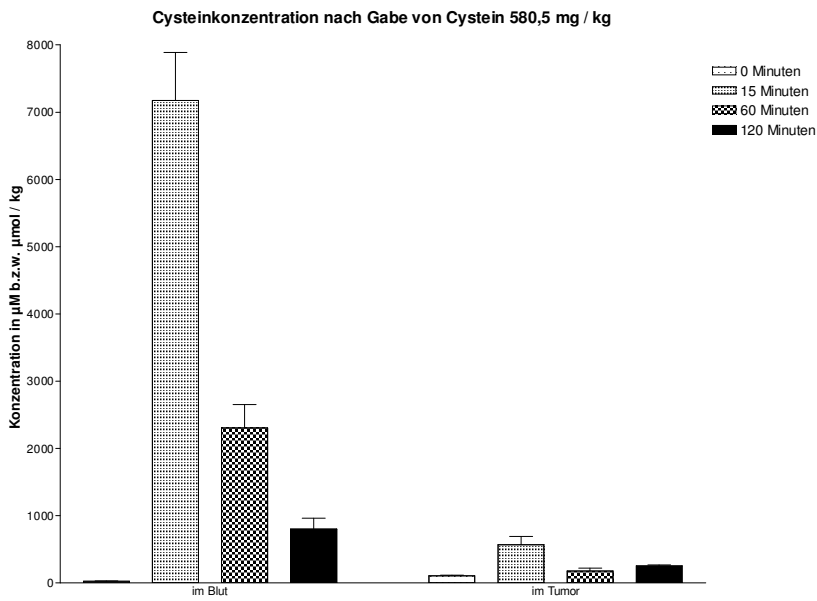


Abbildung 19: Cysteinkonzentration nach der Gabe von Cystein im Blut und im Tumor. Dargestellt sind die Konzentrationen in $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol}/\text{l}$ (Blut).

3.6.2 Glutathion

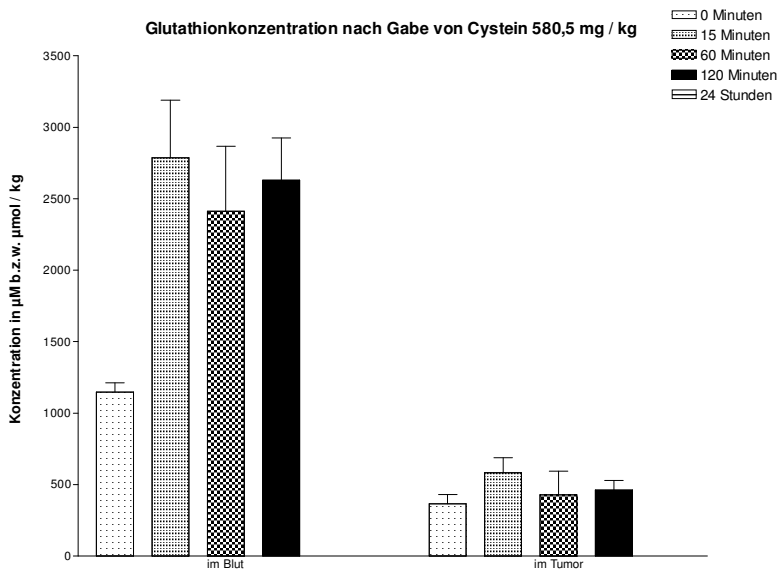


Abbildung 20: Glutathionkonzentration nach der Gabe von Cystein im Blut und im Tumor. Dargestellt sind die Konzentrationen in $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (Tumor) bzw. in $\mu\text{mol}/\text{l}$ (Blut).

3.7 Chloracetaldehyd-Vermindering nach Mesnagabe

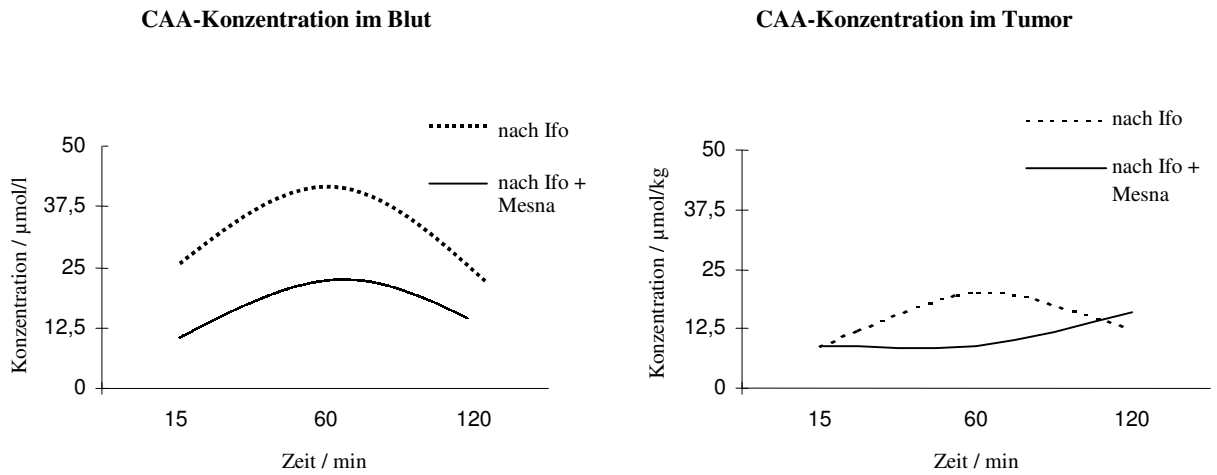


Abbildung 21: Chloracetaldehydkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid und der Gabe von Ifosfamid + Mesna.

Im direkten Vergleich wird ein Konzentrationsunterschied von Chloracetaldehyd nach der Gabe von Ifosfamid mit und ohne Mesna deutlich (Abb. 21). Der Unterschied ist im Blut deutlicher ausgeprägt als im Tumor, hier besteht ein Verhältnis von etwa 2 : 1 nach Ifosfamidgabe zur Applikation von Ifosfamid mit Mesna. Im Tumor besteht ebenfalls ein Konzentrationsgradient, dieser ist kleiner und beträgt etwa 1,25 : 1. Chloracetaldehyd ist nach der Gabe von Ifosfamid im Blut in einer maximalen Konzentration von 40 μmol/l vorhanden. Nach der Gabe von Ifosfamid in Kombination mit Mesna ist die maximale Konzentration bereits 15 Minuten nach der Gabe nachweisbar und beträgt lediglich 15 μmol/l. Dies entspricht etwa 35% der Maximalkonzentration nach der Ifosfamidgabe ohne Mesna. Die im Tumor gemessenen Konzentrationen sind um einen geringeren Teil vermindert, hier beträgt der Peak nach 60 Minuten bei Zugabe von Mesna 50% des Peaks ohne Mesna. Die nach 120 Minuten im Tumor gemessene Chloracetaldehydkonzentration zeigt eine hohe Standardabweichung und kann nicht als aussagekräftig bewertet werden.

3.8 Verhältnis von Cystein und Chloracetaldehyd im Blut

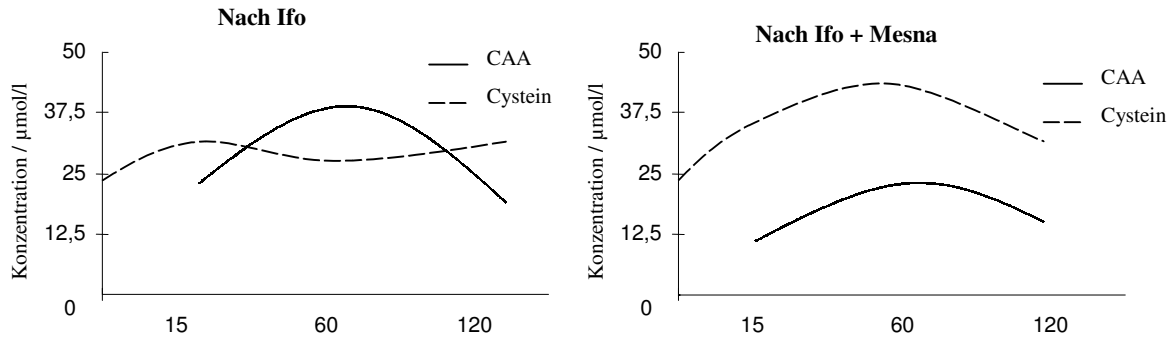


Abbildung 22: Verhältnis von Chloracetaldehyd und Cystein im Blut. Nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna ist das Verhältnis von Cystein zu Chloracetaldehyd deutlich größer als nach der Gabe von Ifosfamid allein, was zum einen auf die geringere Chloracetaldehydkonzentration, zum anderen auf das erhöhte Cysteinangebot zurückzuführen ist.

Das Verhältnis von Cystein zu Chloracetaldehyd im Vollblut beträgt bei Gabe von Ifosfamid etwa 1:1,2, bei Gabe von Ifosfamid mit Mesna liegt das Verhältnis bei etwa 1:2 (Abb. 22). Im Tumor wird das Verhältnis ebenfalls verschoben von etwa neunfachem Überschuß Cystein nach Ifosfamidgabe zu elffachem Überschuß nach der Gabe von Ifosfamid mit Mesna. Die Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses von Protektorthiol zu Chloracetaldehyd ist somit im Blut weit deutlicher ausgeprägt als im Tumor, er ist aber auch im Tumor nachweisbar.

4 Diskussion

In der Chemotherapie mit Oxazaphosphorinzytostatika wie Cyclo- und Ifosfamid besteht die Notwendigkeit einer effektiven Uroprotektion mit Protektorthiolen. Protektorthiole erfüllen diese Aufgabe durch Reaktion der Sulfhydrylgruppen mit den alkylierenden Substanzen unter Oxidation. Die Voraussetzung für den Einsatz eines Protektorthiols ist der Schutz der ableitenden Harnwege bei gleichzeitiger Konstanz der antitumoralen Wirkung des Alkylanz. Diese Bedingung erfüllen Protektorthiole wie Glutathion oder Cystein nicht, da bei beiden Substanzen der uroprotektive Effekt von einem tumorprotektiven Effekt begleitet wird. Mesna besitzt wie die anderen Protektorthiole durch seine Sulfhydrylgruppe einen protektiven Effekt, kann aber wegen seiner Polarität nur sehr begrenzt von Zellen aufgenommen werden (Shaw et al., 1986).

Acrolein galt ursprünglich als hauptverantwortlich für die urotoxischen Nebenwirkungen der Oxazaphosphorine wie hämorrhagische Zystitis, Hämaturie und Dysurie (Brock et al., 1979). Der Anfall von Acrolein im Urin stellte sich jedoch als relativ gering heraus, wobei aber der Anfall von 4-OH-Ifosfamid im Urin weit höher lag (Wagner et al., 1981). Hieraus ergab sich die Folgerung, daß 4-OH-Ifosfamid zellulär aufgenommen und später zu Acrolein metabolisiert freigesetzt urotoxische Wirkung zeigen könnte. Durch den Einsatz von Mesna wurden die urotoxischen Nebenwirkungen vermindert bei einer zunächst nicht offensichtlichen Beeinträchtigung der Antitumorwirkung.

4.1 Blutkonzentration der Protektorthiole

Um einen protektiven Effekt zu erzielen, soll Mesna extrazellulär als Protektorthiol mit toxischen Metaboliten reagieren. Die Beobachtung, daß die im Vollblut erreichte maximale Konzentration von Mesna bei der Behandlung mit Ifosfamid und Mesna im Vergleich zur Behandlung mit Mesna als Monosubstanz herabgesetzt ist, ist ein Ausdruck der Interaktion von Mesna mit den Ifosfamidmetaboliten. Dabei könnte auch der zytostatische Effekt verringert werden, wenn gleichzeitig die Konzentration antineoplastischer Metabolite vermindert wird. Das empirisch aufgestellte Modell wird hier bestätigt. Mesna interagiert *in vivo* mit Metaboliten des Ifosfamid und durch Austausch von Schwefelwasserstoffgruppen mit anderen Protektorthiolen. Dieser Effekt war bereits für zirkulierendes Cystein beschrieben worden (Stofer-Vogel et al., 1993), wo auf eine

Mesnagabe eine temporäre Cysteinerhöhung mit einem folgenden deutlichen Abfall folgte. Der Cysteinanstieg wird durch Aufspaltung der Disulfidbindung des Mesna und anschließende Bildung gemischter Disulfide erklärt. Aus Cystin (oxidiert) entsteht Cystein (reduziert), das fähig ist, die Zellmembran zu passieren, woraufhin ein Abfall des Cysteins extrazellulär folgt. Die Aussagefähigkeit der Glutathionmessung ist in dieser Arbeit als deutlich eingeschränkt zu betrachten. Da durch die Voraussetzungen bedingt die Messungen in Vollblut stattfinden mußten, sind kaum Rückschlüsse auf die Konzentration im Interzellularraum möglich. Es überwiegt aus Erythrozyten freigesetztes Glutathion, die eigentliche Plasmakonzentration ist gering. Variierende Glutathionkonzentrationen werden somit stärker und häufiger durch Hämolyse hervorgerufen als durch tatsächliche Konzentrationsveränderungen im Plasma.

Nach der Gabe von Cystein zeigte sich wie erwartet eine dosisabhängige Konzentrationserhöhung im Blut für Cystein mit einer maximalen Konzentration von sieben $\mu\text{mol/l}$. Diese Spitzenkonzentration entspricht dem 70fachen der normal vorliegenden Konzentration von Cystein. In früheren Untersuchungen zeigte sich der Verlauf der Mesnakonzentration nach Mesnagabe ebenfalls als Kinetik erster Ordnung bzw. als Bateman-Funktion bei verschiedenen Säugetieren (Meerschweinchen, Ratte und Hund) und beim Menschen (Pohl, 1980). Bei der Applikation von Mesna wird eine temporäre Erhöhung des Cysteins beobachtet, auf die ein Nadir von 50% des Ausgangswertes folgt (Stofer-Vogel et al., 1993).

4.2 Konzentration der Protektorthiole im Tumor

Die intrazelluläre Konzentration der Protektorthiole sollte im Idealfall nach einer Zugabe von Mesna zur chemotherapeutischen Therapie in Tumorzellen nicht erhöht werden, um die Antitumorwirkung nicht zu beeinträchtigen. Untersuchungen in unserem Labor zeigten jedoch, daß bei Inkubation von Zellen mit Chloracetaldehyd und 4-OH-Ifosfamid der Zusatz von Mesna einen schwächenden Einfluß auf die Antitumorwirkung ausübt. Dieser wurde sowohl an S117- als auch an MX1-Zellen deutlich (Kisro et al., 2000). Einerseits wurde nach Ifosfamidbehandlung in Leukozyten ein Glutathionabfall beobachtet, der auch durch 4-OH-Ifosfamid hervorgerufen werden konnte (Multhoff et al., 1995; Lind et al., 1989). Andererseits ist beschrieben, daß bei extrazellulärem Glutathionabfall nach kombinierter Ifosfamid- und Mesnabehandlung zwar die extrazellulären Glutathionspiegel sanken, intrazellulär in Leukozyten aber konstant blieben (Pendyala et al., 2000).

Der Abfall des Cysteinspiegels im Tumor nach Ifosfamid spiegelt den Verbrauch durch Reaktion mit aktiven Metaboliten wie 4-OH-Ifosfamid, Chloracetaldehyd und Acrolein wieder. Die deutlich geringere Reduzierung des Cysteins nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna zeigt den Einfluß von Mesna durch Cysteinfreisetzung aus Cystin auf die Protektorthiolerhöhung im Vergleich zum Cystein. Der Abfall des Cysteins nach der Gabe von Ifosfamid spiegelt die protektive Rolle des Cysteins wider. Die Wirkung von Ifosfamid könnte auf diesem Wege im Tumor durch die Gabe von Mesna beeinträchtigt werden.

Der Verlauf der Cysteinkonzentration nach der Gabe von Ifosfamid und Mesna ist nicht konstant, während sich nach reiner Ifosfamidgabe ein initialer Nadir zeigt. Die Erhöhung der Protektorthiole bei der zusätzlichen Behandlung mit Mesna zeigt die extrazelluläre Aufspaltung der Disulfidbrücken des Cystins durch Bildung gemischter Disulfide mit Mesna. Daraufhin erfolgt die Aufnahme des entstandenen Cysteins in die Zelle und die dortige Reaktion des Cysteins mit den Metaboliten des Ifosfamids. Entsprechend diesen Beeinflussungen der Protektorthiolspiegel wurden *in vitro* Abschwächungen der 4-OH-Wirkung in Form von verlängerter Überlebenszeiten der inkubierten Zellen beobachtet (Kisro et al., 2000). Eine Abschwächung der Wirkung in der Alkylantienbehandlung war zuvor nur nach Behandlung mit Cystein beschrieben worden (Connors, 1966). Die fast gleichgerichtete Wirkung des Mesna läßt sich nun durch eine Erhöhung der physiologischen Protektorthiole im Organismus erklären.

Die in dieser Arbeit gemessenen Mesnakonzentrationen im Tumor sind sicher als artifiziell anzusehen. Ein Passieren der Zellmembranen ist nicht möglich, daher sind die gemessenen Konzentrationen auf das intravasale und das extrazelluläre Mesna zurückzuführen. Die im Tumor gemessenen Konzentrationen nach alleiniger Mesnagabe betragen etwa 25% der Konzentrationen im Blut. Dies ist durchaus allein durch das intravasal vorhandene Mesna zu erklären. Widersprüchlich zeigt sich allerdings eine erhöhte Mesnakonzentration im Tumor nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna, die zumindest die Möglichkeit des Eintritts von Mesna in die Zelle unter bestimmten Bedingungen möglich erscheinen läßt.

Aus den im Tumor gemessenen Mesnakonzentrationen lassen sich Rückschlüsse auf die tatsächliche Konzentration von Chloracetaldehyd ziehen. So beträgt die

Chloracetaldehydkonzentration im Tumor deutlich mehr als 25%, was die Messung als Artefakt ausschließt. Dennoch muß insbesondere nach der Behandlung mit Ifosfamid die Konzentrationen des Chloracetaldehyd intrazellulär im Tumor niedriger liegen als die im gesamten Tumor gemessenen Konzentrationen.

4.3 Abhängigkeit der Konzentration der Protektorthiole im Gewebe von der Konzentration im Blut

Das Redoxsystem von Glutathion und Cystein untereinander und miteinander ist vor allem abhängig von der Cysteinaufnahme. Der Austausch der intra- und extrazellulären Protektorthiolspiegel wird hauptsächlich bestimmt durch zwei Na⁺-abhängige Cystin- und Cysteintransporter (XAG und SAG-Transporter) (Knickelbein et al., 1997) und zwei Na⁺-unabhängige Transporter (L- und xc-Transporter). Die Cysteinkonzentration im Blut einer nu-nu-Maus beträgt 25 µmol/l, in einem auf die Maus transplantierten MX1-Xenograft 110 µmol/kg. Das Verhältnis beträgt 1 : 4. Da eine Produktion von Cystein in der Zelle nicht möglich ist, findet offensichtlich ein aktiver Transport durch die beschriebenen Kanäle statt. Die intrazelluläre Cysteinkonzentration ist von der extrazellulären Cysteinkonzentration abhängig. Die transmembranösen Transporter sind nicht in der Lage, einen konstanten Cysteinspiegel im Tumor zu halten, sondern die Cysteinkonzentration im Tumor ist abhängig von der Konzentration der Thiole im Blut.

Für Messungen in der klinischen Behandlung von Patienten, bei denen nicht im Tumor die Thiolkonzentrationen bestimmt werden können, ist der gefundene Zusammenhang zwischen der intravasal gemessenen Thiolkonzentration und der Konzentration in der Tumorzelle wichtig. Es besteht eine Abhängigkeit der Thiole in diesen beiden Kompartimenten. Ein protektiver Einfluß von Mesna gegen Oxazaphosphorine intravasal kann eine Protektion im Gewebe bedingen.

4.4 Nachweis von Chloracetaldehyd im Tumor

Um als antineoplastisches Agens wirksam werden zu können, ist eine Anwesenheit des aktiven Metaboliten in der Zelle die unausweichliche Voraussetzung. Die kurze Halbwertszeit des Chloracetaldehyd wäre eine denkbare Ursache, daß dieses Agens nicht zytostatisch aktiv wirken könnte. Daher wurden parallel zu Untersuchungen über die zytostatische Aktivität in vivo in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen dieser Arbeit die

intrazellulären Chloracetaldehydspiegel bestimmt. Für Chloracetaldehyd ist eine proliferationshemmende Wirkung bewiesen (Börner et al., 2000; Brüggemann et al., 1997). Diese Wirkung ist mit der Wirkung des 4-OH-Ifosfamid vergleichbar (Börner et al., 2000).

Es zeigte sich ein deutliches Konzentrationsgefälle zwischen Blut- und Tumorkonzentrationen. Die Chloracetaldehydkonzentration im Tumor ist etwa um den Faktor 2,5 niedriger als die extrazelluläre Chloracetaldehydkonzentration. Bei der reinen Gabe von Ifosfamid wurde ein zeitlich enger Zusammenhang von intravasaler Konzentration von Chloracetaldehyd und der Tumorkonzentration deutlich, was bei weiteren Forschungen erlaubt, von intravasalen Chloracetaldehydmessungen auf die Konzentration am Wirkort im Tumor zu schließen.

4.5 Chloracetaldehyd-Verminderung nach Mesnagabe

Die Nebenwirkungen der Oxazaphosphorine werden durch Verminderung der Metabolitkonzentration im Blut abgeschwächt (Bryant et al., 1980). Die schädigende Wirkung des Chloracetaldehyd wurde ursprünglich nicht im Zusammenhang mit einer Chemotherapie erfaßt, sondern durch arbeitsmedizinische Untersuchungen in der chemischen Industrie im Metabolismus von Vinylchlorid und 2-Chloracetal (Kandala et al., 1990; Spengler et Singer, 1988). Hier wurden DNA-Schädigungen in Form von Cross-links und Verkürzung residualer DNA von 300 auf 100 Basenpaare festgestellt. Dieser schädigende Mechanismus ist aber in der antineoplastischen Therapie auch wirksam (Börner et al., 2000). Dies bedeutet, daß eine verminderte Konzentration des Chloracetaldehyd in einer Tumorzelle einen Wirkverlust des Ifosfamids bewirkt. Das Chloracetaldehyd ist als nephrotoxisches Agens identifiziert worden. In Kombination mit anderen Zytostatika wird der nephrotoxische Effekt sogar verstärkt (Lind et al., 1989; Rossi et al., 1993).

Beim Vergleich der Chloracetaldehydkonzentrationen bei der Behandlung mit Ifosfamid mit und ohne Zugabe von Mesna zeigt sich eine deutlich verminderte Chloracetaldehydkonzentration. Die Belastung mit dem urotoxischen Chloracetaldehyd ist intravasal auf ein Drittel gesenkt worden. Allerdings bleibt auch der Chloracetaldehydspiegel im Tumor auf Grund der Dosisabhängigkeit nicht unbeeinflußt. Der Anstieg des Chloracetaldehyd ist bei Zusatz von Mesna zu Ifosfamid verzögert. Die Konzentration im Tumor und somit wahrscheinlich auch in der Tumorzelle ist geringer als

ohne Mesna. Dieser therapiereduzierende Effekt muß durch die Notwendigkeit eines Mesnaeinsatzes in Kauf genommen werden. Er sollte aber durch dosierte Gaben des Uroprotektors niedrig gehalten werden.

Die Chloracetaldehydkonzentration wird intravasal stärker gesenkt als im Tumor. Die Konzentration von Chloracetaldehyd wurde intravasal auf die Hälfte bis ein Drittel gesenkt. Dies ist der bekannte und beabsichtigte Effekt einer Protektorthiolgabe. Die Chloracetaldehydkonzentration im Tumor wurde allerdings auch gesenkt. Das Maß der Verminderung ist gering, zeigte sich aber eindeutig.

4.6 Übertragbarkeit auf den Menschen

Alle im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten sind am Modell der nu-nu-Maus bestimmt worden. Die Vergleichbarkeit des nu-nu-Maus-Modells mit dem Menschen ist als eingeschränkt zu betrachten. Die Halbwertszeit des Mesna beim Menschen ist abhängig von der zytostatischen Behandlung und schwankt zwischen 0,12 und zwei Stunden (El-Yazigi et al., 1997). Speziesunterschiede zwischen Mensch, Meerschweinchen, Ratte und Hund zeigten sich nur nach der oralen Gabe von Mesna. Dies wurde durch die Aufnahme des Mesna im Dickdarm erklärt, wodurch Unterschiede in der biologischen Halbwertszeit nach oraler Gabe von bis zu vier Stunden beobachtet wurden. Diese Speziesunterschiede sind nur bei der oralen Gabe vorhanden und liegen bei der üblichen parenteralen Gabe nicht vor. Die Pharmakokinetik des Mesna ist bei verschiedenen Spezies nicht generell verschieden. So zeigte sich bei der intravenösen Verabreichung von Mesna ein fast identischer Verlauf der Plasmakonzentration des freien Mesna (Pohl, 1980). Dies trifft allerdings nicht für Ifosfamid zu, wo die Pharmakokinetik beim Menschen (Wagner, 1994) deutliche Unterschiede zu denen in dieser Arbeit beschriebenen Verläufen bei der nu-nu-Maus zeigt.

Die in den Versuchen ermittelte Halbwertszeit von Cystein liegt bei 45 Minuten. Die Konzentration des reduzierten Cysteins im Blut liegt beim Menschen bei 10,0 +/- 0,96 µmol/l (Tsikas et al., 1998), bei der Maus wurde ein Wert von 22,9 +/- 1,42 ermittelt. Somit liegen die Konzentrationen des Cysteins bei der Maus höher als beim Menschen. Eine Übertragung der Ergebnisse von der nu-nu-Maus auf den Menschen ist durchaus zulässig. Es ist anzunehmen, daß sich die Verläufe der gemessenen Thiole in ähnlicher

Weise verhalten. Neuere klinische Studien untermauern diese These, so werden auch beim Menschen durch Ifosfamid die Plasmathiolspiegel reduziert (Pendyala et al., 2000).

4.7 Schlußfolgerungen für den klinischen Einsatz von Mesna und Ifosfamid

Durch die Erhöhung der intrazellulären Protektorthiolkonzentrationen und dem damit verbundenen Wirkverlust der Oxazaphosphorine sollte der Einsatz des Mesna in der klinischen Praxis genau dosiert erfolgen. Die uroprotektive Behandlung sollte nach den bestehenden Richtlinien erfolgen (z.B. Hensley et al., 1999), wobei auch eine orale Gabe als wirksam betrachtet wird (Goren et al., 1998). Die empfohlene Dosierung von kumulativ 60% (mg/mg) Mesna (je 20% zu den Zeitpunkten 0, 4 und 8 Stunden) (Cohen et al., 2002), entsprechend einer equimolaren Menge, intravenös zur applizierten Oxazaphosphorindosis sollte nicht überschritten werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse wurden nach Ifosfamidgabe gemessen, sind aber wegen der ähnlichen Metabolisierungswege sicher auch auf Cyclophosphamid anwendbar.

5 Zusammenfassung

Mesna ist in der Therapie mit Oxazaphosphorinen wie Ifosfamid und Cyclophosphamid ein wichtiges Protektorthiol zur Vermeidung von therapielimitierenden Nebenwirkungen. Es ist ein standardmäßig verwendetes Protektorthiol, da es die Voraussetzung einer Gewährleistung der antineoplastischen Wirkung durch Oxazaphosphorine bei gleichzeitiger Protektion gegen Nebenwirkungen erfüllt. Ohne einen Einsatz von Protektorthiolen ist der Einsatz von Oxazaphosphorinen nicht möglich, da alternative Formen der Uroprotektion keine ausreichende Uroprotektion gewährleisten.

Beim Metabolismus von Ifosfamid werden verschiedene Metabolite gebildet. 4-Hydroxy-Ifosfamid gilt als Agens mit der stärksten zytotoxischen und antineoplastischen Wirkung. Auf einem anderen Stoffwechselweg entsteht Chloracetaldehyd. Dieses Agens wurde lange nicht als antineoplastische Substanz betrachtet. In unserem Labor durchgeführte Versuche zeigten jedoch eine zytostatische Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und somit einen Beitrag zur Antitumorwirkung des Ifosfamid. In dieser Arbeit wurde der Nachweis der Anwesenheit von Chloracetaldehyd in MX1-Tumoren (Mammakarzinom) nach der Gabe von Ifosfamid geführt, was eine Grundvoraussetzung der Wirkung an Tumorzellen darstellt. Die quantitative Auswertung ergab eine Korrelation der Konzentration von Chloracetaldehyd im Vollblut und im Tumor von etwa 2,5:1 nach der Gabe von Ifosfamid ohne Zusatz eines Protektorthiols.

Mesna ist als Protektorthiol in der antineoplastischen Therapie einsetzbar, weil es auf Grund seiner Polarität nur in sehr geringem Maße in Zellen aufgenommen werden kann. Im Gegensatz hierzu sind die natürlichen Protektorthiole auch intrazellulär präsent. Intravasal vorhandenes reduziertes Mesna kann durch Redoxreaktionen die Konzentrationen der natürlichen Protektorthiole und das Verhältnis von reduzierten und oxidierten Protektorthiolen verändern. Weiterhin gibt es einen Austausch von intra- und extrazellulärem Glutathion und Cystein, der durch Transporter in der Zellmembran geschieht. Außerdem wird durch Reduktion von intrazellulär oxidiert vorliegenden Protektorthiolen die Konzentration reduzierter Thiole erhöht. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Mechanismen einen Effekt von Mesna auf die intrazelluläre Konzentration reduzierten Glutathions und Cysteins bewirken.

Es wurde beobachtet, daß die alleinige Gabe von Mesna die extra- und intrazelluläre Konzentration von Glutathion vergrößert auf einen Wert, der der 1,8fachen natürlichen Konzentration entspricht. Die Cysteinkonzentration ist ebenfalls erhöht, intrazellulär auf das 1,5-fache und extrazellulär auf nur wenig über der normalen Konzentration. Bei der Kombination der Gabe von Ifosfamid mit Mesna im Vergleich zur alleinigen Ifosfamidgabe waren die Konzentrationen des intrazellulär gemessenen reduzierten Cysteins und Glutathions erhöht. Eine genaue Kinetik konnte auf Grund der durch den Tierschutz bedingten begrenzten Zahl der Versuche und Meßpunkte nicht erstellt werden. Die Cysteinkonzentration zeigte keinen so eindeutigen Verlauf. Der Anstieg des Chloracetaldehyd beim Vergleich von Ifo-Gabe und Ifo-Gabe in Kombination mit Mesna im Tumor war intrazellulär verspätet und abgeschwächt. Intravasal war der Chloracetaldehydspiegel durch Mesnazusatz auf weniger als ein Drittel vermindert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß durch Mesnagaben trotz der Unpassierbarkeit von Zellmembranen für dieses Protektorthiols die Konzentrationen anderer Protektorthiole im Tumor erhöht werden. Es gibt einen konzentrationsmindernden Einfluß von Mesna auf das intrazelluläre Chloracetaldehyd. Außerdem wurde der protektive Effekt von Mesna im Intravasalraum deutlich. Auch wurde eine Abhängigkeit der Protektorthiolkonzentration im Tumor von der intravasalen Konzentration deutlich. Bei Messungen im Blut am Menschen werden die dort zu messenden Blutkonzentrationen einen Rückschluß auf die dortigen Tumorkonzentrationen erlauben. Der aus in vitro-Beobachtungen erlaubte Rückschluß auf eine Wirkungsabschwächung der Oxazaphosphorine durch Mesna konnte in dieser Arbeit in vivo bekräftigt werden. Im menschlichen Organismus liegen die Protektorthiole Cystein und Glutathion in höherem Maße als bei der nu-nu-Maus in reduzierter Form vor. In vivo kann von Mesna eine tumorprotektive Wirkung ausgehen, die in dieser Arbeit im Modell eines auf die nu-nu-Maus transplantierten MX1-Tumors veranschaulicht wurde. Deshalb sollten beim Einsatz von Mesna strikt die Dosierrichtlinien eingehalten werden. Bei einer Überdosierung von Mesna zum Erreichen eines vermeintlich besseren Schutzes wird die Wirkung der Oxazaphosphorine beeinträchtigt.

6 Literaturverzeichnis

- *Aebi S, Assereto R, Lauterburg BH.* High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine. *Europ J Clin Invest* 1991, 21: 103-110.
- *Aktories K, Unger C.* Mittel zur Behandlung von Tumoren. In: Forth W, Henschler W, Rummel W, Förstermann U, Starke K: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 8. Auflage, 949-983. Urban & Fischer München 2001.
- *Assreuy AM, Martins GJ, Moreira ME, Brito GA, Cavada BS, Ribeiro RA, Flores CA.* Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *J Urol* 1999, 161 (6): 1988-93.
- *Bevan MJ, Jenkinson EJ, Malissen B, Raulet DH, Sprent J.* Der Thymus und die Entwicklung der Thymuszellen. In: *Janeway CA, Travers P.* *Immunologie.* 241-275. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995.
- *Börner K, Kisro J, Bruggemann SK, Hagenah G, Peters SO, Wagner T.* Metabolism of ifosfamide to chloroacetaldehyde contributes to antitumor activity in vivo. *Drug Metab Dispos* 2000, 28(5):573-6.
- *Balu N, Gamcsik MP, Colvin ME, Colvin OM, Dolan ME, Ludemann S:* Modified guanines represent O(6)-alkylation by the cyclophosphamide metabolites acrolein and chloroacetaldehyde: synthesis, stability, and ab initio studies. *Chem Res Toxicol* 2002, 15(3):380-7.
- *Brade WP, Herdrich K, Varini M.* Ifosfamide - pharmacology, safety and therapeutic potential. *Cancer Treat Rev* 1985, 12: 1-47
- *Brain EG, Yu LJ, Gustafsson K, Drewes P and Waxman DJ.* Modulation of P450-dependant ifosfamide pharmacokinetics: A better understanding of drug activation in vivo. *Br J Cancer* 1998, 77: 1768-1776.

- *Brandt EL, Griffin AC.* Reduction of toxicity of nitrogen mustard by cysteine. *Cancer* 1951, 4: 1030.
- *Brock N, Hoefler-Janker H, Hohorst HJ, Scheef W, Schneider B, Wolf HC.* Die Aktivierung von Ifosfamid an Mensch und Tier. *Arzneimittelforschung* 1973, 23(1): 1-14.
- *Brock N, Stekar J, Pohl J, Niemeyer U, Scheffler G.* Acrolein, the causative factor of urotoxic side-effects of cyclophosphamide, ifosfamide, trofosfamide and sufosfamide. *Arzneimittelforschung* 1979, 29 (4): 659-61.
- *Brock N, Stekar J, Pohl J, Scheef W.* Antidot gegen urotoxische Nebenwirkungen der Oxazaphosphorin-Derivate Cyclophosphamid, Ifosfamid und Trofosfamid. *Naturwissenschaften* 1979, 66: 60-61.
- *Brüggemann SK, Kisro J, Wagner T.* Ifosfamid Cytotoxicity on Human Tumor and Renal Cells: Role of Chloroacetaldehyde in Comparison to 4-Hydroxyifosfamide. *Cancer Research* 1997, 57: 2676-2680.
- *Bryant BM, Jarman M, Ford HAT, Smith IE.* Prevention of ifosfamide-induced urothelial toxicity with 2-mercaptoethane sulphonate sodium (mesnum) in patients with advanced carcinoma. *Lancet* 1980, 2(8196): 657-9.
- *Chang LW, Daniel FB, DeAngelo AB.* Analysis of DNA strand breaks induced in rodent liver in vivo, hepatocytes in primary culture, and a human cell line by chlorinated acetic acids and chlorinated acetaldehydes. *Environ Mol Mutagen* 1992, 20(4): 277-88.
- *Chiang SY, Swenberg JA, Weisman WH, Skopek TR.* Mutagenicity of vinyl chloride and its reactive metabolites, chloroethylene oxide and chloroacetaldehyde, in a metabolically competent human B-lymphoblastoid line. *Carcinogenesis* 1997, 18(1): 31-36.

- *Cohen MH, Dagher R, GriebelDJ, Ibrahim A, Martin A, Scher NS, Sokol GS, Williams GA, Pazdur R.* U.S. Food and Drug Administration Drug Approval Summaries: Imatinib Mesylate, Mesna Tablets, and Zoledronic Acid. *The Oncologist* 2002, 7 (5): 393–400.
- *Dechant KL, Brogden RN, Pilkington T, Faulds D.* Ifosfamide/mesna. A review of its antineoplastic activity pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. *Drugs* 1991, 42(3): 428-67.
- *Dubourg L, Michoudet C, Cochat M, Baverel G.* Human Kidney Tubules Detoxify Chloroacetaldehyde, a Presumed Nephrotoxic Metabolite of Ifosfamide. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12:1615-1623.
- *DiMaggio JR, Brown R, Baile WF, Schapira D.* Hallucinations and ifosfamide-induced neurotoxicity. *Cancer* 1994, 73: 1909-1914.
- *El-Yazigi A, Ernst P, AL-Rawithi S, Legayada E, Raines DA.* Pharmacokinetics of Mesna and Dimesna After Simultaneous Intravenous Bolus and Undergoing Bone Marrow Transplantation. *J Clin Pharmacol* 1997, 37: 618-624.
- *Gilissen A, Nowak D.* Characterisation of N-acetylcysteine and ambroxol in antioxidant therapy. *Resp Med* 1998, 92: 609-623.
- *Gonzalez-Angulo AM, Orzano JA, Davila E.* Ifosfamide-induced encephalopathy. *South Med J* 2002 Oct;95(10):1215-7.
- *Goren MP, Anthony LB, Hande KR, Johnson DH, Brade WP, Frazier MW, Bush DA, Li JT.* Pharmacokinetics of an intravenous-oral versus intravenous-mesna regimen in lung cancer patients receiving ifosfamide. *J Clin Onc* 1998, 16 (2): 616-21.
- *Goren MP, Hsu LC, Li JT.* Reduction of dimesna to mesna by the isolated perfused rat liver. *Cancer Res* 1998, 58 (19): 4358-62.

- *Green T, Hathway DE.* Interactions of vinyl chloride with rat-liver in vivo. *Chem Biol Interact* 1978, 22 (2-3): 211-24.
- *Hartwich G, Domschke W, Matzkies F.* Disaccharidasen der Dünndarmschleimhaut der Ratte unter zytostatischer Kombinationsbehandlung mit Vincristinsulfat und Ifosfamid. *Arzneim Forsch (Drug Res)* 1976, 26 (3): 350-52.
- *Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, Meropol NJ, Cohen GI, Broder G, Gradishar WJ, Green DM, Langdon RJ, Mitchell RB, Negrin R, Szatrowski TP, Thigpen JT, Von Hoff D, Wassermann TH, Winer EP, Pfister DG.* American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guidelines for the Use of Chemotherapy and Radiotherapy Protectants. *J Clin Oncol* 1999, 17 (10): 3333-3335.
- *Jacob N, Guillaume L, Garcon L, Foglietti MJ.* Determination of total plasma homocysteine and other aminothiols by liquid chromatography coupled to the detection by fluorescence. *Ann Biol Clin (Paris)* 1997, 55 (6): 583-91. Abstract.
- *Kaijser GP, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJM.* Ifosfamide Metabolism and Pharmacokinetics (Review). *Anticancer Research* 1994, 14: 517-32.
- *Kandala JC, Mrema JE, DeAngelo A, Guntaka RV.* 2-Chloroacetaldehyde and 2-chloroacetal are potent inhibitors of DANN synthesis in animal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 167(2): 457-63.
- *Kisro J.* Beeinflussung der Antitumorwirkung des Ifosfamidmetaboliten 4-Hydroxy-Ifosfamid durch verschiedene Protektorthiole. Medizinische Dissertation, Lübeck 1999.
- *Klein HO, Wickramanayake PD, Coerper C, Christian E.* Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Bedeutung des Uroprophylaktikums Natrium-2-mercaptoethansulfonat (Uromitexan®) für die zytostatische Therapie mit Oxazaphosphorinen. *Beiträge zur Onkologie* 1980, 5: 25-37.

- *Knickelbein RG, Seres T, Lam G, Johnston RB Jr., Warshaw JB.* Characterisation of multiple cysteine and cystine transporters in rat alveolar type II cells. *Am J Phys* 1997, 273 (6.1): 1147-55.
- *Kurowski V, Wagner T.* Comparative pharmacokinetics of ifosfamide, 4-hydroxyifosfamide, chloroacetaldehyde, and 2- and 3-dechloroethylifosfamide in patients on fractioned intravenous ifosfamide therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993, 33: 36-42.
- *Lind MJ, McGown T, Hadfield JA, Thatcher N, Crowther D, Fox BW.* The effect of ifosfamide and its metabolites on intracellular glutathione levels in vitro and in vivo. *Biochemichal Pharmacologie* 1989, 38 (11): 1835-1840.
- *Lindemann H, Harbers E.* In-vitro-Reaktion der drei alkylierenden Pharmaka Cyclophosphamid, Ifosfamid und Trofosfamid mit DNS und DNS-Bausteinen. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 1980, 30 (II) , Nr.12.
- *Loehrer PJ Sr.* The history of ifosfamide. *Semin Oncol* 1992, 19(6 Suppl 12): 2-6.
- *Malaveille C, Bartsch H, Barbin A, Camus AM, Montesarno R, Croisy A, Jacquignon P.* Mutagenicity of vinyl chloride, chloroethyleneoxide, chloroacetaldehyde and chloroethanol. *Biochem Biophys Res Commun* 1975, 63 (2): 363-70.
- *Meier T, Allenbacher A, Mueller E, Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Issels R.* Ifosfamide induced depletion of glutathione in human peripheral blood lymphocytes and protection by mesna. *Anti-Cancer Drugs* 1994, 5: 403-409.
- *Mohrmann M, Ansorge S, Schmich U, Schonfeld B, Brandis M.* Toxicity of ifosfamide, cyclophosphamide and their metabolites in renal tubular cells in culture. *Pediatr Nephrol* 1994, 8 (2): 157-63.

- *Morais MM, Belarmino-Filho JN, Brito GA, Ribeiro RA.* Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis – comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. *Braz J Med Biol Res* 1999, 32 (10): 1211-1215.
- *Multhoff G, Meier T, Botzler C, Wiesnet M, Allenbacher A, Wilmanns W, Issels RD.* Differential Effects of Ifosfamide on the Capacity of Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells to Lyse Their Target Cells Correlate With Intracellular Glutathione Levels. *Blood* 1995, 85 (8): 2124-213.
- *Munshi NC, Loehrer PJ, Williams SD, Langefeld C, Sledge G, Nichols CR, Roth BJ, Neumann A, Walsh WB, Einhorn LA.* Comparison of N-acetylcysteine and mesna as uroprotectors with ifosfamide combination chemotherapy in refractory germ cell tumors. *Invest New Drugs* 1992, 10 (3): 159-63.
- *O'Neill I, Barbin A, Friesen M, Bartsch H.* Reaction kinetics and cytosine adducts of chloroethylene oxide and chloroacetaldehyde: direct observation of intermediates by FTNMR and GC-MS. *IARC Sci Publ* 1986, (70):57-73.
- *Pendyala L, Creaven PJ, Schwartz G, Meropol NJ, Bolanowska-Higdon W, Zdanowicz J, Murphy M, Perez A.* Intravenous ifosfamide/mesna is associated with depletion of plasma thiols without depletion of leukocyte glutathione. *Clin Cancer Res* 2000, 6 (4): 1314-21.
- *Pochedly C.* The discovery of the first drug effective in treating acute lymphoid leukaemia in children. *N Y State J Med* 1987, 87 (9): 500-3.
- *Pohl J.* Toxikologie, Pharmakokinetik und Interaktionen von Uromitexan. *Beiträge Onkologie* 1980, 5: 12-19.
- *Revesz L, Modig H.* Cysteamine-induced increase of cellular glutathione-level: a new hypothesis of the radioprotective mechanism. *Nature* 1965, 207 (995): 430-1.

- *Rossi R, Rath B, Ullrich K, Ehrich JHH.* Ifosfamid-induzierte Nephrotoxizität. *Monatsschr Kinderheilk* 1993, 141: 594-601.
- *Rossi R.* Häufigkeit, Verlauf und Risikofaktoren der Ifosfamid-induzierten Nephropathie. *Aktuelle Onkologie* 90, ISBN 3-88603-562-X. Med. Habil. Schr. Münster, 1994.
- *Scheef W, Klein HO, Brock N, Burkert H, Gunther U, Hoefer-Janker H, Mitrenga D, Schnitker J, Voigtmann R.* Controlled clinical studies with an antidote against the urotoxicity of oxazaphosphorines: preliminary results. *Cancer Treat Rep* 1979, 63 (3): 501-5.
- *Skinner R, Sharkey IM, Pearson AD, Craft AW.* Ifosfamide, mesna and nephrotoxicity in children. *J Clin Oncol* 1993, 1(1):173-9.
- *Spengler SJ, Singer B.* Formation of interstrand cross-links in chloroacetaldehyde-treated DNA demonstrated by ethidium bromide fluorescence. *Cancer Res* 1988, 48(17): 4804-6.
- *Stofer-Vogel B, Cerny A, Küpfer A, Junker B, Lauterburg BH.* Depletion of circulating cyst(e)ine by oral and intravenous mesna. *Br J Cancer* 1993; 80: 590-93.
- *Tsikas D, Sandmann J, Ikic M, Fauler J, Stichtenoth DO, Frolich JC.* Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine. *J Chromatogr Biomed Sci Appl* 1998, 708 (1-2): 55-60.
- *Vogt N, Marrot L, Rousseau N, Malfoy B, Leng M.* Chloroacetaldehyde reacts with Z-DNA. *J Mol Biol* 1988, 201(4): 773-776.
- *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* 1981, 100: 95-104.

- *Wagner T.* Ifosfamide Clinical Pharmakokinetiks. *Clin. Pharmacokinet.* 1994, 26 (6):439-456.
- *Wiedemann GJ, Robins HI, Katschinski DM, Mentzel M, van Heek R, Touhidi RR, Bucsky P, Gillis W, Feyerabend T, d'Oleire F, Freund C, Eleftheriades S, Weiss C, Wagner T.* Klinische Studien zur Kombination von Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE) mit Ganzhyperthermie. *Medizinische Klinik* 1996, 91 (5): 279-283.
- *Wiedemann GJ, Siemens HJ, Mentzel M, Biersack A, Wössmann W, Knocks D, Weiss C, Wagner T.* Effects of Temperature on the Therapeutic Efficacy and Pharmacokinetics of Ifosfamide. *Cancer Research* 1993, 53: 4268-4272.
- *Woodland C, Ito S, Granvil CP, Wainer IW, Klein J, Koren G.* Evidence of renal metabolism of ifosfamide to nephrotoxic metabolites. *Life Sci* 2000, 68 (1): 109-17.
- *Zalupski M, Baker LH.* Ifosfamide. *J Natl Cancer Inst* 1988, 80 (8): 556-66.
- *Zamlauski MJ, Morris ME, Springate JE.* Ifosfamide Metabolite Chloroacetaldehyde Causes Fanconi Syndrome in the Perfused Rat Kidney. *Toxicology and applied Pharmacology* 1994, 129: 170-175.

7 Anhang

7.1 Grundwerte unbehandelter Mäuse

7.1.1 Thiolwerte im Tumor

	Cystein (reduziert)	Cystin (oxidiert)	Cystin + Cystein
	114,2 µmol/kg	49,2 µmol/kg	163,4 µmol/kg
	146,1 µmol/kg	57,4 µmol/kg	203,5 µmol/kg
	106,3 µmol/kg	63,36 µmol/kg	169,7 µmol/kg
	61,7 µmol/kg	71,00 µmol/kg	132,7 µmol/kg
Mittelwert	107,09 µmol/kg	60,24 µmol/kg	167,33 µmol/kg
n	4		4
Anteil	64%	36%	100%

	Glutathion reduziert	Glutathion oxidiert	Glutathion gesamt
	704,9 µmol/kg	304,2 µmol/kg	1009,1 µmol/kg
	698,8 µmol/kg	430,6 µmol/kg	1129,4 µmol/kg
	592,1 µmol/kg	314,1 µmol/kg	906,2 µmol/kg
	424,8 µmol/kg	788,3 µmol/kg	1213,2 µmol/kg
Mittelwert	605,16 µmol/kg	459,31 µmol/kg	1064,47 µmol/kg
n	4		4
Anteil	57%	43%	100%

7.1.2 Thiolwerte im Blut

	Cystein (reduziert)	Cystin (oxidiert)	Cystin + Cystein
	24,47 µmol/l	23,3 µmol/l	47,77 µmol/l
	29,59 µmol/l	19,22 µmol/l	48,81 µmol/l
	77,03 µmol/l	19,23 µmol/l	96,26 µmol/l
	88,72 µmol/l	28,63 µmol/l	117,35 µmol/l
Mittelwert	54,952 µmol/l	22,442 µmol/l	77,547 µmol/l
n	4		4
Anteil	71%	29%	100%

	Glutathion reduziert	Glutathion oxidiert	Glutathion gesamt
	1173,00 µmol/l	92,45 µmol/l	1265,45 µmol/l
	1063,80 µmol/l	91,30 µmol/l	1155,10 µmol/l
	933,47 µmol/l	208,28 µmol/l	1157,10 µmol/l
	1108,50 µmol/l	83,38 µmol/l	1189,88 µmol/l
Mittelwert	1069,692 µmol/l	118,854 µmol/l	1191,88 µmol/l
n	4		4
Anteil	90%	10%	100%

7.2 Konzentrationen zum Zeitpunkt 0:

7.2.1 Cysteinkonzentration

	C _{Blut}	C _{Tumor}
	23,29 µmol/l	81,92 µmol/kg
	19,22 µmol/l	119,04 µmol/kg
	19,22 µmol/l	104,31 µmol/kg
	28,63 µmol/l	123,25 µmol/kg
	23,937 µmol/l	106,92 µmol/kg
	23,14 µmol/l	108,63 µmol/kg
n	6	6
Mittelwert	22,905 µmol/l	107,346 µmol/kg
SEM	1,428 µmol/l	5,908 µmol/kg

7.2.2 Glutathionkonzentration

	C _{Blut}	C _{Tumor}
	1172,995 µmol/l	704,9 µmol/kg
	1063,881 µmol/l	698,80 µmol/kg
	933,417 µmol/l	826,92 µmol/kg
	1108,546 µmol/l	695,14 µmol/kg
	1400,998 µmol/l	1200,46 µmol/kg
	1207,274 µmol/l	821,73 µmol/kg
n	6	6
Mittelwert	1147,840 µmol/l	824,845 µmol/kg
SEM		79,393 µmol/kg

7.3 Messungen nach der Gabe von Ifosfamid ohne Mesna

7.3.1 Cysteinkonzentration

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	15 Minuten	24,112 µmol/l	38,78 µmol/kg
		23,893 µmol/l	34,6 µmol/kg
		38,766 µmol/l	47,17 µmol/kg
		34,460 µmol/l	68,49 µmol/kg
		33,920 µmol/l	
n		5	4
Mittelwert		31,03 µmol/l	47,65 µmol/kg
SEM		2,99 µmol/l	7,458 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	60 Minuten	31,32 µmol/l	12,88 µmol/kg
		24,15 µmol/l	102,67 µmol/kg
		38,46 µmol/l	74,66 µmol/kg
		24,06 µmol/l	44,65 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		29,497 µmol/l	58,71 µmol/kg
SEM		3,438 µmol/l	19,33 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	120 Minuten	31,57 µmol/l	29,11 µmol/kg
		27,03 µmol/l	130,47 µmol/kg
		50,33 µmol/l	161,78 µmol/kg
		25,31 µmol/l	44,65 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		33,56 µmol/l	91,502 µmol/kg
SEM		5,744 µmol/l	32,33 µmol/kg

7.3.2 Glutathionkonzentration

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	15 Minuten	909,931 µmol/l	2174,60 µmol/kg
		1008,1060 µmol/l	2811,50 µmol/kg
		1313,55 µmol/l	918,26 µmol/kg
		785,22 µmol/l	1893,60 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		1004,202 µmol/l	1949,49 µmol/kg
SEM		112,75 µmol/l	393,732 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	60 Minuten	881,89 µmol/l	1142,2 µmol/kg
		1559,65 µmol/l	4805,1 µmol/kg
		1496,61 µmol/l	1186,9 µmol/kg
		1438,17 µmol/l	2649,1 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		1344,08 µmol/l	2445,825 µmol/kg
SEM		156,047 µmol/l	860,805 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	120 Minuten	1302,837 µmol/l	716,98 µmol/kg
		1510,560 µmol/l	2997,90 µmol/kg
		1529,18 µmol/l	3217,30 µmol/kg
		851,55 µmol/l	2250,4 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		1298,532 µmol/l	2295,645 µmol/kg
SEM		157,578 µmol/l	565,453 µmol/kg

7.3.3 Chloracetaldehydkonzentration

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	15 Minuten	49,06 µmol/l	9,61 µmol/kg
		25,69 µmol/l	12,52 µmol/kg
		34,80 µmol/l	8,52 µmol/kg
		46,90 µmol/l	6,16 µmol/kg
		47,90 µmol/l	
		10,89 µmol/l	
		45,97 µmol/l	
		8,16 µmol/l	
		16,08 µmol/l	
n		9	4
Mittelwert		31,717 µmol/l	9,203 µmol/kg
SEM		5,622 µmol/l	1,32 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	60 Minuten	30,41 µmol/l	48,42 µmol/kg
		36,04 µmol/l	16,19 µmol/kg
		100,19 µmol/l	23,45 µmol/kg
		100,46 µmol/l	17,98 µmol/kg
		29,89 µmol/l	6,75 µmol/kg
		17,80 µmol/l	4,22 µmol/kg
		26,29 µmol/l	
		28,39 µmol/l	
		21,10 µmol/l	
n		9	6
Mittelwert		44,397 µmol/l	19,502 µmol/kg
SEM		10,9759 µmol/l	6,484 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	120 Minuten	25,48 µmol/l	16,79 µmol/kg
		56,06 µmol/l	6,42 µmol/kg
		50,22 µmol/l	14,48 µmol/kg
		33,65 µmol/l	10,42 µmol/kg
		8,68 µmol/l	
		23,40 µmol/l	
		21,80 µmol/l	

		9,33 µmol/l	
n		8	4
Mittelwert		28,579 µmol/l	12,028 µmol/kg
SEM		6,121 µmol/l	2,286 µmol/kg

7.4 Messungen nach der Gabe von Ifosfamid + Mesna

7.4.1 Cysteinkonzentration

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	15 Minuten	24,112 µM	38,78 µmol/kg
		23,893 µmol/l	34,6 µmol/kg
		38,766 µmol/l	47,17 µmol/kg
		34,460 µmol/l	68,49 µmol/kg
		33,920 µmol/l	
n		5	4
Mittelwert		31,03 µmol/l	47,65 µmol/kg
SEM		2,99 µmol/l	7,458 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	60 Minuten	31,32 µmol/l	12,88 µmol/kg
		24,15 µmol/l	102,67 µmol/kg
		38,46 µmol/l	74,66 µmol/kg
		24,06 µmol/l	44,65 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		29,497 µmol/l	58,71 µmol/kg
SEM		3,438 µmol/l	19,33 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	120 Minuten	31,57 µmol/l	29,11 µmol/kg
		27,03 µmol/l	130,47 µmol/kg
		50,33 µmol/l	161,78 µmol/kg
		25,31 µmol/l	44,65 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		33,56 µmol/l	91,502 µmol/kg
SEM		5,744 µmol/l	32,33 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	24 Stunden	23,288 µmol/l	119,72 µmol/kg
		19,219 µmol/l	101,72 µmol/kg
n			
Mittelwert		21,253 µmol/l	110,72 µmol/kg
SEM		2,035 µmol/l	9,0 µmol/kg

7.4.2 Glutathionkonzentration

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	15 Minuten	909,931 µmol/l	2174,60 µmol/kg
		1008,1060 µmol/l	2811,50 µmol/kg
		1313,55 µmol/l	918,26 µmol/kg
		785,22 µmol/l	1893,60 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		1004,202 µmol/l	1949,49 µmol/kg
SEM		112,75 µmol/l	393,732 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	60 Minuten	881,89 µmol/l	1142,2 µmol/kg
		1559,65 µmol/l	4805,1 µmol/kg
		1496,61 µmol/l	1186,9 µmol/kg
		1438,17 µmol/l	2649,1 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		1344,08 µmol/l	2445,825 µmol/kg
SEM		156,047 µmol/l	860,805 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	120 Minuten	1302,837 µmol/l	716,98 µmol/kg
		1510,560 µmol/l	2997,90 µmol/kg
		1529,18 µmol/l	3217,30 µmol/kg
		851,55 µmol/l	2250,4 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		1298,532 µmol/l	2295,645 µmol/kg
SEM		157,578 µmol/l	565,453 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	24 Stunden	1172,995 µmol/l	844,0 µmol/kg
		1063,811 µmol/l	2158,68 µmol/kg
		933,417 µmol/l	
n		3	2
Mittelwert		1056,741 µmol/l	1501,034 µmol/kg
SEM		69,25 µmol/l	657,34 µmol/kg

7.4.3 Mesnakonzentration

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	15 Minuten	8082,43 µmol/l	1229,49 µmol/kg
		5542,821 µmol/l	714,03 µmol/kg
		4467,874 µmol/l	622,31 µmol/kg
		1737,66 µmol/l	674,6 µmol/kg
		6369,365 µmol/l	719,42 µmol/kg
		2866,435 µmol/l	548,42 µmol/kg
n		6	6
Mittelwert		4844,598 µmol/l	751,44 µmol/kg
SEM		948,78 µmol/l	99,094 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	60 Minuten	142,01 µmol/l	569,110 µmol/kg
		625,422 µmol/l	832,05 µmol/kg
		1201,03 µmol/l	2120,79 µmol/kg
		6,401 µmol/l	4328,64 µmol/kg
		2058,03 µmol/l	646,18 µmol/kg
			580,78 µmol/kg
n		5	6
Mittelwert		806,58 µmol/l	1512,925 µmol/kg
SEM		376,595 µmol/l	612,978 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	120 Minuten	247,46 µmol/l	803,68 µmol/kg
		109,0 µmol/l	619,97 µmol/kg
		52,01 µmol/l	684,20 µmol/kg
		421,2 µmol/l	1611,33 µmol/kg
		972,6 µmol/l	964,37 µmol/kg
n		5	5
Mittelwert		360,208 µmol/l	936,71 µmol/kg
SEM		165,738 µmol/l	178,558 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	24 h	nicht nachweisbar	
		nicht nachweisbar	
n		2	2

7.4.4 Chloracetaldehydkonzentration

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	15 Minuten	12,2 µmol/l	9,40 µmol/kg
		13,6 µmol/l	5,53 µmol/kg
		17,34 µmol/l	7,32 µmol/kg
		8,6 µmol/l	10,54 µmol/kg
		18,26 µmol/l	13,17 µmol/kg
n		5	5
Mittelwert		14,0 µmol/l	9,192 µmol/kg
SEM		1,759 µmol/l	1,315 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	60 Minuten	5,86 µmol/l	16,93 µmol/kg
		11,12 µmol/l	5,77 µmol/kg
		10,54 µmol/l	16,12 µmol/kg
		7,68 µmol/l	12,71 µmol/kg
		13,38 µmol/l	9,51 µmol/kg
			1,32 µmol/kg
			1,48 µmol/kg
n		5	7
Mittelwert		9,716 µmol/l	9,120 µmol/kg
SEM		1,325 µmol/l	2,457 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	120 Minuten	14,06 µmol/l	4,09 µmol/kg
		13,6 µmol/l	29,66 µmol/kg
		7,64 µmol/l	20,37 µmol/kg
		6,14 µmol/l	16,82 µmol/kg
		3,84 µmol/l	12,57 µmol/kg
n		5	5
Mittelwert		9,056 µmol/l	16,702 µmol/kg
SEM		2,042 µmol/l	4,228 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	24 h	nicht nachweisbar	
		nicht nachweisbar	
n		2	2

7.5 Messungen nach der Gabe von Mesna

7.5.1 Cysteinkonzentration

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	15 Minuten	11,26 µmol/l	106,4 µmol/kg
		17,72 µmol/l	94,95 µmol/kg
		14,98 µmol/l	103,64 µmol/kg
		10,29 µmol/l	94,73 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		13,563 µmol/l	99,93 µmol/kg
SEM		1,715 µmol/l	2,993 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	60 Minuten	25,97 µmol/l	103,29 µmol/kg
		17,54 µmol/l	144,50 µmol/kg
		8,50 µmol/l	235,56 µmol/kg
		54,14 µmol/l	152,98 µmol/kg
		30,25 µmol/l	
n		5	4
Mittelwert		27,28 µmol/l	159,007 µmol/kg
SEM		7,68 µmol/l	27,637 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	120 Minuten	14,0 µmol/l	222,12 µmol/kg
		24,9 µmol/l	184,0 µmol/kg
		10,38 µmol/l	210,65 µmol/kg
		22,87 µmol/l	201,76 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		18,045 µmol/l	204,633 µmol/kg
SEM		3,486 µmol/l	8,041 µmol/kg

7.5.2 Glutathionkonzentration

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	15 Minuten	17222,02 µmol/l	1397,00 µmol/kg
		2721,00 µmol/l	1485,00 µmol/kg
		1392,06 µmol/l	1397,02 µmol/kg
		1733,05 µmol/l	1490,36 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		1892,345 µmol/l	1442,345 µmol/kg
SEM		287,39 µmol/l	26,197 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	60 Minuten	2581,46 µmol/l	1728,98 µmol/kg
		2299,55 µmol/l	1609,69 µmol/kg
		428,37 µmol/l	1391,39 µmol/kg
		1860,33 µmol/l	1632,56 µmol/kg
		2456,80 µmol/l	
n		5	4
Mittelwert		1925,302 µmol/l	1590,655 µmol/kg
SEM		393,581 µmol/l	71,273 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	120 Minuten	2344,7 µmol/l	1851,33 µmol/kg
		2445,19 µmol/l	1655,38 µmol/kg
		552,0 µmol/l	1214,81 µmol/kg
		1805,29 µmol/l	1580,53 µmol/kg
		2496,90 µmol/l	
n		5	4
Mittelwert		1926,856 µmol/l	1580,53 µmol/kg
SEM		364,786 µmol/l	133,257 µmol/kg

7.5.3 Mesnakonzentration

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	15 Minuten	9888,39 µmol/l	2249,00 µmol/kg
		4748,98 µmol/l	2860,1 µmol/kg
		15253,20 µmol/l	1004,9 µmol/kg
		12388,32 µmol/l	2110,7 µmol/kg
		9698,32 µmol/l	
n		5	4
Mittelwert		10395,44 µmol/l	2056,175 µmol/kg
SEM		1734,863 µmol/l	386,357 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	60 Minuten	2760,960 µmol/l	1046,0 µmol/kg
		3254,580 µmol/l	1153,1 µmol/kg
		5284,28 µmol/l	1201,8 µmol/kg
		3277,06 µmol/l	1004,3 µmol/kg
		6105,86 µmol/l	
n		5	4
Mittelwert		4136,548 µmol/l	1101,275 µmol/kg
SEM		655,908 µmol/l	45,862 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	120 Minuten	3400,01 µmol/l	887,14 µmol/kg
		1240,11 µmol/l	313,1 µmol/kg
		2919,89 µmol/l	838,43 µmol/kg
		4801,3 µmol/l	704,5 µmol/kg
		524,02 µmol/l	
n		5	4
Mittelwert		2577,07 µmol/l	685,792 µmol/kg
SEM		765,995 µmol/l	130,092 µmol/kg

7.6 Messungen nach der Gabe von Cystein

7.6.1 Cysteinkonzentration

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	15 Minuten	876,99 µmol/l	201,29 µmol/kg
		5592,13 µmol/l	664,87 µmol/kg
		7911,60 µmol/l	745,59 µmol/kg
		6433,85 µmol/l	659,66 µmol/kg
n		4	4
Mittelwert		7174,643µmol/l	567,852 µmol/kg
SEM		713,718 µmol/l	123,76 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	60 Minuten	2655,29 µmol/l	138,14 µmol/kg
		1587,93 µmol/l	135,43 µmol/kg
		1631,68 µmol/l	362,13 µmol/kg
		3417,55 µmol/l	111,06 µmol/kg
		2328,90 µmol/l	88,37 µmol/kg
			231,10 µmol/kg
n		5	6
Mittelwert		2304,270 µmol/l	177,705 µmol/kg
SEM		351,657 µmol/l	41,888 µmol/kg

	Zeitpunkt	c _{Blut}	c _{Tumor}
	120 Minuten	441,37 µmol/l	252,33 µmol/kg
		489,00µmol/l	251,73 µmol/kg
		1243,81 µmol/l	253,23 µmol/kg
		746,58 µmol/l	171,60 µmol/kg
		1095,53 µmol/l	290,66 µmol/kg
			292,78 µmol/kg
n		5	6
Mittelwert		803,258 µmol/l	252,055 µmol/kg
SEM		160,069 µmol/l	17,910 µmol/kg

7.6.2 Glutathionkonzentration

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	15 Minuten	4379,96 µmol/l	540,916 µmol/kg
		2546,31 µmol/l	568,916 µmol/kg
		2377,36 µmol/l	679,18 µmol/kg
		2166,85 µmol/l	244,00 µmol/kg
		2456,93 µmol/l	885,51 µmol/kg
n		5	5
Mittelwert		2785,482 µmol/l	583,557 µmol/kg
SEM		403,533 µmol/l	104,325

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	60 Minuten	3629,650 µmol/l	213,41 µmol/kg
		3032,67 µmol/l	18,92 µmol/kg
		981,29 µmol/l	262,43 µmol/kg
		1985,76 µmol/l	310,09 µmol/kg
		2434,14 µmol/l	623,110 µmol/kg
			1147,96 µmol/kg
n		5	6
Mittelwert		2412,702 µmol/l	429,32 µmol/kg
SEM		452,604 µmol/l	164,429 µmol/kg

	Zeitpunkt	C _{Blut}	C _{Tumor}
	120 Minuten	3600,90 µmol/l	637,42 µmol/kg
		3902,59 µmol/l	310,17 µmol/kg
		3404,74 µmol/l	468,01 µmol/kg
		1826,21 µmol/l	673,42 µmol/kg
		2405,89 µmol/l	416,76 µmol/kg
			265,17 µmol/kg
n		5	6
Mittelwert		2628,146 µmol/l	431,825 µmol/kg
SEM		296,939 µmol/l	68,154 µmol/kg

8 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Th. Wagner bedanke ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und seine Ratschläge. Ebenso danke ich Ihnen sehr herzlich für den Arbeitsplatz und die Überlassung des Materials.

Bei Heike Bahrs, Birgit Branke und Monika Vollmert bedanke ich mich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

9 Lebenslauf

Lars Petersen, geboren am 15.09.1974 in Berlin-Schöneberg

Schulbildung

1981 bis 1985	Grundschule an der Gete, Bremen
1985 bis 1994	Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Dortmund
1994	Abitur

Zivildienst

07/1994 bis 09/1995	Krankenpflege im St. Johannes-Hospital, Dortmund
---------------------	--

Studium der Medizin

	1995 - 2001 an der Medizinischen Universität Lübeck
09/1997	Ärztliche Vorprüfung
09/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Arzt im Praktikum

01/02 bis 06/03	Hämato-Onkologische Klinik des St. Johannes-Hospital Duisburg (Medizinische Klinik II, Prof. Dr. Aul)
-----------------	--

Assistenzarzt

07/03 bis 09/03	Hämato-Onkologische Klinik des St. Johannes-Hospital Duisburg (Medizinische Klinik II, Prof. Dr. Aul)
10/03 bis 09/04	Kardiologische Klinik des St. Johannes-Hospital Duisburg (Medizinische Klinik I, Prof. Dr. Neumann)

seit 10/04

Intensivstation der Medizinischen Klinik I des St. Johannes-Hospital Duisburg (Prof. Dr. Neumann)

Dissertation

10/97 bis 06/2000

Erstellung der Methoden und Ausführung der experimentellen Untersuchungen

13.10.2004

mündliche Prüfung

Lübeck, den 30. Oktober 2004