

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Messung des oxidativen Stresses und der antioxidativen Kapazität bei
der Chemotherapie solider Tumore mit Docetaxel

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Tamara Brumnik
Matrikel-Nummer:	0105960
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	a. o. Univ.Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

Wien, im Februar 2009

Danksagung

Diese Diplomarbeit entstand am Department für klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien (Leitung: a. o. Univ.Prof. Mag. Dr. Walter Jäger) unter der Anleitung von a. o. Univ.Prof. Mag. Dr. Martin Czejka.

Bei ihm möchte ich mich für die spontane Bereitstellung dieses Themas bedanken, für die geduldigen Erklärungen vor Allem bei der statistischen Auswertung der Daten und dafür, dass er sich immer Zeit für meine Fragen genommen hat.

Meinen lieben Eltern danke ich, dass sie mir das Studium finanziert und ermöglicht haben und mich dabei auch immer unterstützten.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Barbara. Sie war wohl meine größte Hilfe bei Motivationsproblemen und wir haben die Höhen und Tiefen des Studiums gemeinsam durchgestanden.

INHALT

1) EINLEITUNG	7
1.1 Oxidativer Stress	7
1.1.1 Freie Radikale.....	7
1.1.2 Entstehung von ROS und ihre wichtigsten Vertreter.....	8
1.1.3 Radikalquellen des menschlichen Organismus	10
1.1.4 Schädigende Wirkung der ROS.....	12
1.1.5 Physiologische Aspekte	13
1.2 Antioxidative Kapazität	15
1.3 Oxidativer Stress und Chemotherapie.....	17
1.4 Docetaxel	18
1.4.1 Beschreibung und physikalische Eigenschaften	18
1.4.2 Wirkmechanismus	18
1.4.3 Indikation und Dosierung	19
1.4.4 Pharmakokinetik	19
1.4.5 Nebenwirkungen und Interaktionen	19
2) RATIONALE	21
3) EXPERIMENTELLER TEIL	22
3.1 In vivo Untersuchung.....	22
3.2 In vitro Untersuchung	25
3.3 Quantifizierung von Docetaxel und Epidocetaxel	26
3.3.1 Festphasenextraktion	26
3.3.2 HPLC	27
3.3.3 Eichgerade	28
3.4 Messung des oxidativen Stresses und der antioxidativen Kapazität	31
3.4.1 Verwendete Geräte.....	31
3.4.2 Durchgeführte Tests:	33
3.5 Biometrische Berechnungen	37
4) ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	38
4.1 Untersuchung der Abbaus von Docetaxel sowie dessen Epimerisierung zu Epidocetaxel	38
4.1.1 In vitro Untersuchungen.....	38
4.1.2 In vivo Untersuchungen-Docetaxel	46

4.1.3	In vivo-Untersuchungen-Epidocetaxel	73
4.2	Messung des oxidativen Stresses	77
4.2.1	In vitro Messung.....	77
4.2.2	In vivo Messungen	79
4.3	Messung der antioxidativen Kapazität.....	91
5)	CONCLUSIO.....	96
6)	LITERATURVERZEICHNIS	99
7)	ABSTRACT.....	102
8)	LEBENS LAUF	103

1) EINLEITUNG

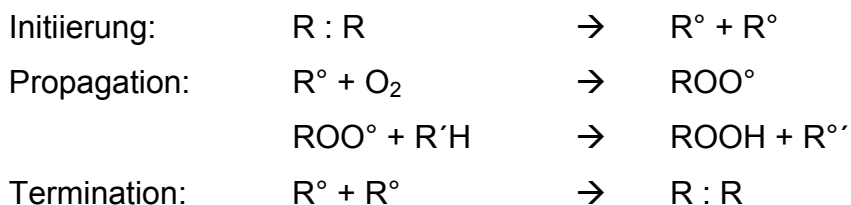
1.1 Oxidativer Stress

Sauerstoffradikale und weitere Oxidantien werden ständig bei verschiedenen Stoffwechselvorgängen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle freigesetzt. Neben einer zell- und gewebsschädigenden Wirkung besitzen sie im Organismus physiologische Funktionen und nehmen an einer Vielzahl biologischer Prozesse teil. Intakte Zellen verfügen über differenzierte Mechanismen um diese potenziell schädlichen Oxidantien zu entgiften, es herrscht ein Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Systemen. Eine Imbalance zu Gunsten der prooxidativen Seite resultiert in oxidativem Stress, der erwiesenermaßen bei einer Reihe von Erkrankungen als begleitender pathogenetischer Faktor eine Rolle spielt. [1]

1.1.1 Freie Radikale

Ein freies Radikal ist definiert als ein Atom, eine Atomgruppe oder ein Molekül, das ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in einem äußeren Orbital enthält. Diese führen zu typischen Eigenschaften wie Paramagnetismus und hohe Reaktivität, was geringe Halbwertszeiten sowie niedrige intra- und extrazelluläre Konzentrationen zur Folge hat. Ein weiteres Charakteristikum stellt die relativ geringe Diffusionsbereitschaft dar.

Das Prinzip der Radikalreaktion besteht darin, dass ein freies Radikal mit einem nichtradikalischen Molekül reagiert und somit ein weiteres Radikal produziert. Im Allgemeinen handelt es sich bei Radikalreaktionen um Kettenreaktionen mit Initiierung, Propagation und Termination. [2]



1.1.2 Entstehung von ROS und ihre wichtigsten Vertreter

Zur reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zählen sowohl Sauerstoff-freie Radikale (zum Beispiel reaktive Stickstoffspezies, RNS), als auch nichtradikalische Sauerstoffderivate (zum Beispiel H_2O_2). Die relevantesten freien Radikale in biologischen Systemen sind jedoch die radikalischen Derivate des Sauerstoffes. [5]

Molekularer Sauerstoff (O_2), ein Biradikal mit je einem ungepaarten Elektron in den zwei äußeren Orbitalen, stellt das wichtigste biologische Oxidans dar. [2] Aufgrund seiner Elektronenkonstellation ist molekularer Sauerstoff jedoch reaktionsträge und daher für Lebewesen unschädlich. [6] Durch sequenzielle monovalente Reduktion können freie Sauerstoffradikale aus molekularem Sauerstoff gebildet werden. [2] Die Aktivierung des Sauerstoffs durch Redoxreaktionen, enzymatische Aktivierung, Absorption von Strahlung oder Reduktion durch bestehende organische Radikale ist also die Voraussetzung für weitere Reaktionsschritte.

Tabelle1: Potentiell cytotoxische Sauerstoffspezies in der Reihenfolge abnehmender Reaktivität. [2]

Formel	Bezeichnung
$\text{OH}^\bullet$	Hydroxyl-Radikal
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
$\text{HO}_2^\bullet$	Hydroperoxyl_Radikal
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superoxid-Radikal
$\text{RO}^\bullet$	Alkoxy-Radikal
$\text{ROO}^\bullet$	Peroxy-Radikal
H_2O_2	Wasserstoffperoxid

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ist kein Radikal, stellt aber einen elektronisch angeregten Zustand des Sauerstoffs dar. Die Spins der beiden Radikalelektronen sind antiparallel ausgerichtet und kompensieren sich, dadurch ist $^1\text{O}_2$ sehr reaktionsfreudig und reagiert mit organischen Molekülen. [7]

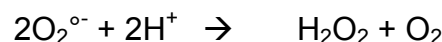
Durch einen monovalenten Elektronentransfer auf das Sauerstoffmolekül entsteht zunächst das Superoxid-Radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$).



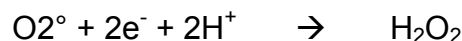
$O_2^{\circ-}$ ist in nahezu allen aeroben Zellen präsent. Es wird durch intrazelluläre Enzyme, die in Oxidationsreaktionen involviert sind, als intermediärer Metabolit gebildet. Zu den wichtigsten Enzymen zählen Oxidasen, Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen und Flavin-Dehydrogenasen. Autoxidations-Reaktionen wie von Flavin, Catecholamin, reduzierten Hämproteinen und Glutathion, Hydrochinonen sowie von Ferridoxin stellen ebenfalls eine endogene Quelle für $O_2^{\circ-}$ dar. Ein weiterer Bildungsort ist die mitochondriale Atmung. [2]

$O_2^{\circ-}$ stellt ein wichtiges Reduktionsmittel in biologischen Systemen dar und hat keine schädigende Wirkung auf Biomoleküle, es dient jedoch als Ausgangsstoff für schädigende ROS. [5]

$O_2^{\circ-}$ wird in wässriger Lösung bei physiologischem pH sowohl spontan als auch durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff umgewandelt. [2]

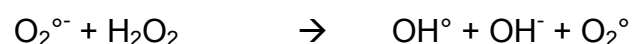


H_2O_2 wird weiters durch peroxisomal lokalisierte Oxidasen aus molekularem Sauerstoff gebildet. [2]

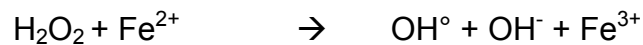


H_2O_2 ist zwar kein freies Radikal, zählt aber zur ROS und spielt vor allem als Quelle für das Hydroxyl-Radikal eine wesentliche Rolle. [5]

Das Hydroxyl-Radikal (OH°) stellt das reaktionsfreudigste Sauerstoffradikal im biologischen System dar. Es kann mit nahezu allen biologischen Molekülen (Lipide, Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate) im lebenden Organismus reagieren und somit erheblichen Schaden an seinem Entstehungsort anrichten. Endogen entsteht das OH° -Radikal über die Haber-Weiss-Reaktion infolge der Eisen-, aber auch Kupfer-katalysierten Reaktion des $O_2^{\circ-}$ -Radikals mit H_2O_2 . [2]



Die Elektronenübertragung von Fe^{2+} , Cu^{2+} oder Semiquinon auf H_2O_2 führt über die so genannte Fenton-Reaktion ebenfalls zur Bildung des OH° -Radikals. [2]



Weiters ist das OH° -Radikal ein Reaktionsprodukt der homolytischen Spaltung von Wasser durch ionisierende Strahlen. [2]

1.1.3 Radikalquellen des menschlichen Organismus

Endogene Quellen:

- Die mitochondriale Atmungskette:

Die Atmungskette, die in fast allen Zelltypen des Menschen vorhanden ist, ist durch ein permanentes „Leck“ von Superoxidradikalen aus der Elektronentransportkette der Mitochondrien gekennzeichnet, das heißt, durch eine ständig ablaufende anteilige Superoxidradikal-Freisetzung. Zusammen mit dem Superoxid-Leck des endoplasmatischen Retikulums (mikrosomaler Elektronentransport), dessen Anteil vom Durchsatz durch das Cytochrom-P450-System abhängt, soll das Superoxid-Leck der mitochondrialen Atmungskette zirka zwei Prozent des Gesamt-Sauerstoff-Verbrauchs betragen. Das würde im Gesamtorganismus einer täglichen Bildung von 360-400 mMol $\text{O}_2^{\circ-}$ entsprechen.

- Der Purinabbau:

Die Xanthinoxidoreduktase, die die Umwandlung von Hypoxanthin zu Xanthin und nachfolgend zu Harnsäure katalysiert, existiert in zwei Formen: einer Dehydrogenase-Form und einer Oxidase-Form, wobei die Reaktionen der Oxidase-Form unmittelbar mit der Umwandlung von Sauerstoff zu Superoxidradikalen oder H_2O_2 verbunden sind.

- Der Stoffwechsel der Katecholamine:

Die Oxidation von Adrenalin und Analoga ist aufgrund der vielen möglichen freien Radikale und Metaboliten, die durch die sequenziellen Ein-Elektronen-Oxidationen der jeweiligen Verbindungen gebildet werden können, außergewöhnlich komplex. Die Toxizität von Katecholaminen wird generell mit der

Produktion freier Radikale und toxischer molekularer Produkte während der einzelnen Reaktionsschritte in Beziehung gebracht.

- Weitere wichtige Substratautoxidationen:

Eine Reihe von endogenen Verbindungen des menschlichen Körpers unterliegt permanent Autoxidationsprozessen, bei denen Sauerstoffradikale freigesetzt werden können. Von besonderer quantitativer Bedeutung ist die Autoxidation von Hämoglobin und anderen Metalloproteiden.

- Reaktionsschritte der neutrophilen Granulozyten:

Die aktivierte NADPH-Oxidase der Membran von Phagozyten ist eine bedeutsame Quelle freier Radikale. Wenn neutrophile Granulozyten und Makrophagen durch inflammatorische Mediatoren stimuliert werden, kommt es zum so genannten Respiratory burst, der durch einen aktiven Pentosephosphatweg sowie einen erhöhten Verbrauch von Sauerstoff und Glucose charakterisiert ist. Mehr als neunzig Prozent des Sauerstoffverbrauchs führen zu Superoxidradikalen.

- Der Arachidonsäuremetabolismus:

Bei der Metabolisierung von Arachidonsäure über die Cyclooxygenase und die Lipoxygenase werden Peroxy-Verbindungen und Hydroxylradikale gebildet.

Exogene Quellen:

- Detoxifikation von Xenobiotika:

Arzneimittel und andere Xenobiotika wie Umwelttoxene können auf vielfältige Weise die Bildung und Beseitigung von freien Radikalen beeinflussen. Von besonderer quantitativer Bedeutung sollte aber die Metabolisierung der meisten Pharmaka und vieler Umwelttoxene in Cytochrom-P450-abhängigen Reaktionen, vor allem der Leber, sein. Das Cytochrom-P450-System wird als bedeutendste Quelle für die Bildung von Sauerstoffradikalen beim Einsatz zahlreicher Medikamente betrachtet.

- Einwirkung von Strahlung:

Es ist seit langem bekannt, dass ionisierende Strahlung, Röntgenstrahlen, kosmische Strahlung und UV-Strahlung zur Radikalbildung in biologischen

Gewebe führt. Eine Exposition ist mit einem erhöhten Risiko gesundheitlicher Schäden verbunden.

- Einfluss von Metallionen:

Eine besondere Rolle kommt hierbei den Eisenverbindungen zu. Vor allem niedermolekulare Verknüpfungen von Eisenionen mit organischen Liganden, zum Beispiel Citrat, ATP, ADP oder Kohlenhydratresten sind Katalysatoren der Fenton-Reaktion.

- Stickoxide, Ozon, Rauchen und Alkohol führen ebenfalls zur vermehrten Bildung von freien Radikalen [3]

1.1.4 Schädigende Wirkung der ROS

Die empfindlichsten Biomoleküle gegen ROS sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen (PUFAs). [5] Ihre oxidative Zerstörung durch ROS wird Lipidperoxidation genannt und führt zu einer radikalischen Kettenreaktion, deren Hauptprodukt das Lipidhydroperoxid ist. Lipidperoxidation führt zu strukturellen und funktionalen Veränderungen in den Membranen, spielt eine Rolle bei verschiedenen degenerativen Krankheiten und wird für Alterungsprozesse verantwortlich gemacht. Lipidhydroperoxide, sowie anfallende Alkoxylradikale und weitere Abbauprodukte können außerdem DNA-Schäden induzieren. [7]

Auch Proteine werden durch Radikaleinwirkung oxidiert, die entstehenden Produkte enthalten eine Bandbreite von modifizierten und degradierten Aminosäuren. Diese haben durch die Radikalreaktion neue funktionelle Gruppen wie Hydroxyl- und Carbonylgruppen erhalten. Als Folgereaktionen können Proteinfragmentierung, Crosslinks und Zerstörung der Tertiärstruktur und damit der Verlust der Funktionalität auftreten. [7] Diese Proteinschäden beeinflussen erst bei Akkumulation die Lebensfähigkeit der Zelle. [5]

DNA ist anfällig für freie Radikale, die in ihrer Nähe gebildet werden. Die für die Fenton-Reaktion notwendigen Metallionen liegen an der DNA komplexiert vor oder können bei oxidativem Stress aus Transportproteinen freigesetzt werden. Die bei

der Reduktion von Wasserstoffperoxid entstehenden Hydroxylradikale können somit direkt an der DNA entstehen. Es kommt zur Modifizierung der DNA-Basen sowie zu Schäden am Zucker-Phosphat-Gerüst und dadurch zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. [7] Eines der Hauptprodukte der oxidierten DNA-Basen ist 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-desoxyguanosin (8-OH-dG), dessen Nachweis im humanen Urin ein Hinweis auf eine kontinuierliche oxidative Schädigung der DNA ist, die auf Dauer zu Mutationen und schließlich zu Krebs führt. [5]

Tabelle 2: Durch oxidativen Stress bedingte Organerkrankungen [4]

Organ oder Organsystem	Erkrankung
Gehirn und ZNS	Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, subarachnoidale Blutung, post-traumatische Ereignisse
Auge	Katarakt, Photo-Schädigung der Retina, angioproliferative Retinopathie
Respiratorisches System	Asbestosis, Speiseröhren-, Bronchial- und Lungenkrebs
Kardiovaskuläres System	Atherosklerose, Myokardinfarkt
Gastrointestinales System	Leber- und Dickdarmkrebs, Leberzirrhose, Ulcus
Endokrine Pankreas-Anteile	Diabetes mellitus
Urogenitalsystem	Nieren- und Blasenkrebs, Sterilität
Knochenmark und Blut	Leukämie
Haut	Hautkrebs
Bewegungsapparat	gestörte Knochenheilung, Knochenresorption, muskuläre Hypoxie (Überanstrengung)

1.1.5 Physiologische Aspekte

Freie Radikale besitzen im Organismus neben pathophysiologischen auch physiologische Funktionen und nehmen an einer Vielzahl biologischer Prozesse teil.

- Aktivierte phagozytäre Zellen (Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie die meisten Makrophagen-Typen) produzieren $O_2^{\bullet-}$

Radikale via NADPH-Oxidase im Rahmen der bakteriellen Abwehr („Respiratory burst“)

- Stickstoffmonoxid (NO) aus Endothelzellen wird als so genannter Endothelialer-Relaxing-Faktor (EDRF) diskutiert, der durch Aktivierung der Guanylatcyclase eine Relaxierung der glatten Muskulatur induziert. Weiterhin wird postuliert, dass $O_2^{\cdot-}$ ebenfalls aus dem Endothelium freigesetzt wird, mit NO reagiert und die entstehenden Produkte bei der Regulation des vaskulären Tonus mitwirken
- Freie Radikale besitzen Kontrollfunktionen bei Enzymreaktionen, zum Beispiel der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase, Cytochrom-P450 und den Cyclooxygenasen
- Der Einfluss freier Sauerstoffradikale auf die Proliferationsrate kultivierter Fibroblasten wird beschrieben
- H_2O_2 stimuliert in hohen Konzentrationen als thrombozytäres Intermediat Aggregationsprozesse
- Auch Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B, AP-1) werden durch ROS, wie H_2O_2 aktiviert. Das Wachstum von Zellen wird somit stimuliert oder gehemmt und der Zelltod als Apoptose oder Nekrose ausgelöst. [2]

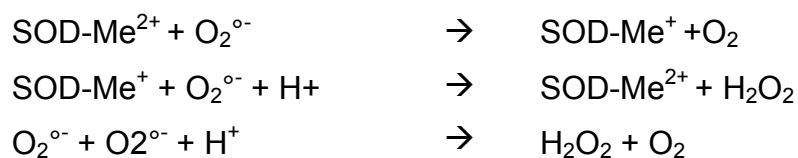
1.2 Antioxidative Kapazität

Die antioxidative Kapazität des Organismus wird durch diverse Systeme sichergestellt. Neben enzymatischen antioxidativen Mechanismen wirken auch Verbindungen mit geringem Molekulargewicht entgiftend auf ROS. Sie haben unterschiedliche chemische Strukturen, sind entweder hydrophil oder lipophil und werden im menschlichen Körper synthetisiert oder mit der Nahrung aufgenommen. Zu den wichtigsten Mechanismen der Antioxidantien gehören Abfangen radikalischer Spezies, Bindung prooxidativ wirkender Übergangsmetalle, Eliminierung von Peroxiden, Unterbrechung bereits ablaufender Kettenreaktionen sowie Herabsetzen der lokalen O_2 -Konzentrationen. Produkte der primären Entgiftung sind Sauerstoff, Wasser und zum Teil relativ inerte Oxidationsprodukte.

Intrazelluläre enzymatische Mechanismen:

- Superoxid-Dismutase (SOD)

Die SOD katalysiert die Entgiftung des $O_2^{\circ-}$ -Radikals. In einem zweistufigen Prozess entsteht dabei Wasserstoffperoxid und Sauerstoff.



- Glutathion-Peroxidase (GSH-Px)

Die GSH-Px tritt als Selenoprotein auf und katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxiden und Lipidhydroperoxiden zu Wasser und dem korrespondierenden Alkohol. Das dabei oxidierte Glutathion wird durch die Glutathion-Reduktase mittels NADPH regeneriert, NADPH wird von der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bereitgestellt. Durch die Akzeptanz zahlreicher Substrate gewinnt die GSH-Px eine zentrale Bedeutung bei oxidativem Stress.

- Katalase

Die Katalase liegt meist partikelgebunden in den Peroxisomen vor. Ihre physiologische Bedeutung liegt in der Entgiftung hoher H_2O_2 -Konzentrationen, die insbesondere beim Metabolisieren von Medikamenten entstehen.

Intrazelluläre nicht enzymatische, hydrophobe Mechanismen:

- Tocopherole sind Bestandteile der Lipidfraktion und stellen effektive Inhibitoren der Propagation der Lipidperoxidation dar. Sie werden effizient durch Ubiquinol, Ascorbinsäure und Glutathion regeneriert.
- Carotinoide zeichnen sich durch Abfangen von Singulett-Sauerstoff, Inhibierung von Radikalreaktionen und Inaktivierung der Lipoxygenasen aus.
- Ubiquinon ist in seiner reduzierten Form ein potenter Inhibitor der Lipidperoxidation.

Intrazelluläre nicht enzymatische, hydrophile Mechanismen:

- Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid aus Glycin, Cystein und Glutamat. Die SH-Gruppe des Cysteinyrestes wirkt als Elektronendonator und kann somit Radikale, Peroxide und potentiell kanzerogene Moleküle abfangen.

Extrazelluläre hydrophile Mechanismen:

- Ascorbinsäure (Vitamin C) kann auf zwei Wegen als Antioxidans wirken. Zum einen reagiert sie mit ROS, vor allem mit Peroxyl-Radikalen, zum anderen dient sie als indirektes Antioxidans zur Regenerierung des Tocopherols.
- Harnsäure kann $\text{OH}^\bullet$, radikalische Fe-Häm-Protein-Spezies sowie $^1\text{O}_2$ abfangen. Weiterhin konnte eine Stabilisierung der Ascorbinsäure durch Harnsäure festgestellt werden.

Weitere Antioxidantien:

Als nicht essentielle Antioxidantien gelten pflanzliche Phenole wie Catechine, Anthocyane, Flavone, Tannine und Cumarinderivate sowie polyfunktionelle organische Säuren. Die antioxidative Funktion ist auf die Existenz labiler Protonen der Hydroxylgruppen zurückzuführen, die stabile Phenoxylradikale bilden können.

[2]

1.3 Oxidativer Stress und Chemotherapie

Wie bereits erwähnt, spielen ROS eine duale Rolle im menschlichen Organismus. Als second messenger steuern sie Signalkaskaden und sind essentiell für viele biologische Prozesse. Feinste Änderungen im Redoxgleichgewicht der Zelle können jedoch Kettenreaktionen auslösen, die zur Zerstörung von lebenswichtigen Funktionen führen und zur Krankheitsentstehung beitragen. Unter anderem kann es durch erhöhte ROS-Konzentrationen zur Entstehung von Krebs kommen. [23]

Umgekehrt finden sich in einigen Krebsgeweben erhöhte Konzentrationen an 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-desoxyguanosin, was auf eine ständige Belastung der DNA maligner Zellen durch oxidativen Stress hinweist. Vermutlich kommen diese erhöhten Konzentrationen an ROS sowohl durch vermehrte Bildung, als auch durch eine Unterdrückung des antioxidativen Systems zustande. [4]

Ironischerweise beruht die Wirkung der nicht-chirurgischen Behandlungsmethoden von Krebs (Chemotherapie, Radiotherapie und Photodynamische Therapie) auf der Bildung von ROS, die in den Krebszellen Apoptose bzw. Nekrose auslösen. [23] Der durch ROS ausgelöste Zelltod ist abhängig vom Tumorsuppressorgen p53. [25]

Durch anhaltenden oxidativen Stress im Tumorgewebe kann es jedoch auch zur Entwicklung von Apoptose-resistenten Phenotypen kommen, indem die Funktion von p53 durch Mutationen im Gen aufgehoben wird. Außerdem kommt es zu einer verstärkten Aktivität des antioxidativen Systems. Tumorzelllinien in vitro zeigen daher eine extrem hohe Widerstandsfähigkeit gegen die Cytolyse durch H_2O_2 . [25] Einige Cytostatika, die aufgrund der Bildung von ROS wirken sind: Anthracycline, Bleomycin, Procarbazin, Etoposid, Mitomycin, Mitoxanthron, Cyclophosphamid. [2]

Im Wesentlichen kann der erhöhte oxidative Stress durch zwei Mechanismen erzeugt werden: einerseits durch die Bildung von ROS in den Tumorzellen, andererseits durch Hemmung des antioxidativen Systems der Tumorzellen. In beiden Fällen mangelt es an der Selektivität fürs Tumorgewebe und die Therapie stellt eine enorme Belastung des gesamten Organismus dar. [24]

1.4 Docetaxel

Docetaxel ist ein zytostatisch wirksamer Arzneistoff und gehört zur Gruppe der Taxane.

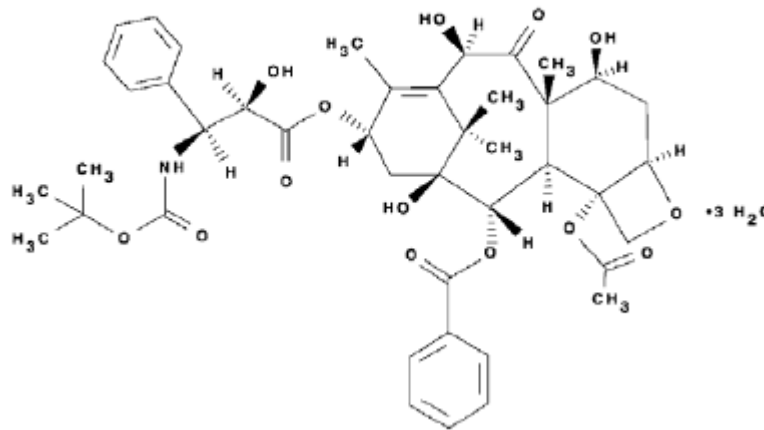


Abb. 1: Chemische Struktur von Docetaxel [8]

1.4.1 Beschreibung und physikalische Eigenschaften

Docetaxel ist ein semisynthetisches Derivat von 10-Desacetyl-Baccatin III, ein Inhaltsstoff der Nadeln der europäischen Eibe. Der chemische Name ist (2R, 3S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-2-hydroxy-3-phenyl-β-alanin-4-acetoxy-2α-benzyloxy-5β,20-epoxy-1,7β,10β-trihydroxy-9-oxo-11-taxen-13α-ylester. Die Summenformel lautet $C_{43}H_{53}NO_{14}$. Docetaxel ist ein weißes, lipophiles Pulver mit einem Molekulargewicht von 807,877 und einen Schmelzpunkt von 232°C. [8, 9]

1.4.2 Wirkmechanismus

Taxane sind Mitosehemmstoffe. Sie binden an β-Tubulin und stabilisieren dadurch die Mikrotubuli, was eine entartete Dynamik ihres Auf- und Abbaus bewirkt. Ihre Polymerisation wird erhöht und die Depolymerisation und Desaggregation des Spindelapparats verhindert, was an Kontrollstellen zur Apoptose der Zellen führt. [10]

1.4.3 Indikation und Dosierung

Tabelle 3: Dosierung von Docetaxel bei unterschiedlicher Indikation

Indikation	Dosierung
Mammakarzinom	60-100 mg/m ²
Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom	75 mg/m ²
Prostatakarzinom	75 mg/m ²
Gastrales Adenokarzinom	75 mg/m ²
Head and Neck Cancer	75 mg/m ²

Die Verabreichung erfolgt als einstündige i. v. Infusion alle drei Wochen. Docetaxel ist dabei gelöst in 13% Ethanol in Wasser (w/w). [8]

1.4.4 Pharmakokinetik

Das kinetische Profil von Docetaxel ist dosisunabhängig. Der Verlauf der Plasmaspiegel folgt einer dreiphasigen Kinetik mit folgenden Halbwertszeiten: $t_{1/2\alpha} = 4,5$ Minuten, $t_{1/2\beta} = 38,3$ Minuten und $t_{1/2\gamma} = 12,2$ Stunden. Der anfängliche starke Abfall resultiert aus der Verteilung in periphere Bereiche und die späte Phase kommt teilweise durch den relativ langsamen Rückfluss aus den peripheren Bereichen zustande. Docetaxel ist zu mehr als 90 % an Plasmaproteine gebunden und wird durch Leberenzyme, vor allem CYP3A4, metabolisiert. Fünf inaktive Metabolite wurden bereits gefunden, wobei einer davon das 7'-Epimer von Docetaxel (7-Epidocetaxel) darstellt, ein charakteristisches Abbau- und Umwandlungsprodukt, das auch bei der Lagerung von Docetaxel entsteht. Die Elimination erfolgt zu etwa 80 % über Galle und Stuhl und zu etwa 6 % über den Urin. [11, 13]

1.4.5 Nebenwirkungen und Interaktionen

Die häufigste dosislimitierende Nebenwirkung von Docetaxel ist eine nicht kumulative und reversible Neutropenie. Seltener treten Thrombozytopenie und Anämie auf.

Sehr häufig kommt es wenige Minuten nach Beginn der Infusion zu Überempfindlichkeitsreaktionen (Ausschläge, Fieber, Atembeschwerden) sowie im Verlauf der Therapie zu toxischen Wirkungen auf Haut, Haare und Nägel (Juckreiz, Alopezie, Nagelveränderungen).

Bei mehr als der Hälfte der Patienten entwickelt sich eine deutliche Flüssigkeitsretention, es kommt zu Ödemen und Gewichtszunahme und weniger häufig zu Pleuraergüssen, Perikardergüssen, Ascites und Tränenfluß.

Häufig treten auch periphere Neuropathien (vor allem Sensibilitätsstörungen), sowie gastrointestinale Beschwerden auf.

Um das Risiko der Flüssigkeitsretention und das Auftreten der peripheren Neuropathien zu vermindern, sollte bei allen Patienten eine Prämedikation mit oralen Corticosteroiden erfolgen. [8]

Aufgrund der Metabolisierung von Docetaxel durch Enzyme der CYP3A-Subfamilie ist der Einfluss von Induktoren bzw. Inhibitoren dieser Enzyme zu beachten. [12]

2) RATIONALE

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob eine antineoplastische Chemotherapie mit Docetaxel einen Einfluss auf den oxidativen Stress und die antioxidative Kapazität der behandelten Patienten besitzt.

Dazu wurden sowohl die Konzentration von Docetaxel im Blutplasma, als auch der oxidative Stress und die antioxidative Kapazität der Patienten in unterschiedlichen Phasen der Therapie gemessen und miteinander in Zusammenhang gebracht.

Des Weiteren wurde die Epimerisierung von Docetaxel zum 7'-Epimer, Epidocetaxel, bestimmt, sowohl in den Patientenproben, als auch in vitro und die entsprechenden Radikalmessungen vorgenommen.

3) EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 In vivo Untersuchung

Tabelle 4: Patientendaten

Probe	Eingang	Pat-ID	Geschlecht	Körpergewicht [kg]	Therapieschema	Begleitmedikation
1	Juli 2008	28.08.1957	w	fehlt	Epirubicin/ Taxotere	Dexamethason Diphenhydramin
2	Juli 2008	10.07.1951	w	fehlt	Epirubicin/ Taxotere	Dexamethason Diphenhydramin
3	Juli 2008	11.08.1965	w	fehlt	Taxotere Mono	Aprepitant Fortecortin Kytril (Granisetron)
4	Juli 2008	13.04.1934	w	fehlt	Taxotere Mono	Diphenhydramin
5	Juli 2008	18.08.1959	w	fehlt	Epirubicin/ Taxotere	Dexamethason
6	Sep 08	fehlt	w	fehlt	Epirubicin/ Taxotere	Dexamethason
7	Sep 08	fehlt	w	fehlt	Herceptin/ Taxotere	Diphenhydramin Dexamethason
8	Sep 08	fehlt	w	fehlt	Taxotere	Granisetron Diphenhydramin
9	Sep 08	fehlt	w	fehlt	Epirubicin/ Taxotere	Granisetron Diphenhydramin
10	Sep 08	fehlt	w	fehlt	Taxotere Mono	Dexamethason Granisetron Diphenhydramin
11	Mai 08	A.D. 1930	m	70	Taxotere/ Bicalutamid 150	Furosemid Pamidronat
12	Mai 08	H.S. 1940	w	53	Taxotere	Dexamethason Hydromorphon Metamizol Pamidronat
13	Mai 08	J.K. 1957	m	90	Taxotere/ Bicalutamid 150	Mefenaminsäure Furosemid Pantoprazol
14	Mai und Okt 2008	M.D. 1959	w	62	Taxotere	Pamidronat Diclofenac Dexamethason Pantoprazol

15	Okt 2008	I.H. 1952	m	65	Taxotere	Metamizol Pregabalin Dexamethason Pantoprazol Metamizol
16	Dez 08	27.03.1949	w	71	Epirubicin/ Taxotere	Granisetron Dexamethason
17	Dez 08	31.12.1953	w	57	Taxotere	Granisetron Diphenhydramin
18	Dez 08	13.06.1965	w	70	Taxotere	Granisetron Diphenhydramin
19	Dez 08	18.06.1970	w	65	Taxotere	Granisetron Diphenhydramin
20	Dez 08	29.10.1941	w	47	Taxotere	Granisetron Dexamethason Diphenhydramin

Tabelle 5: Patientendaten

Probe	Datum der Docetaxelgabe	verabreichte Dosis [mg/m ²]	Infusionsbeginn	Infusionsende	Abnahme Probe 1	Abnahme Probe 2	Abnahme Probe 3	Urin Volumen [ml]
1	fehlt	fehlt	10:40	12:10	fehlt	12:10	12:30	150
2	fehlt	fehlt	10:00	11:30	fehlt	11:30	11:50	160
3	fehlt	fehlt	08:30	10:00	fehlt	10:00	10:20	210
4	fehlt	fehlt	10:20	11:50	fehlt	11:50	12:10	270
5	fehlt	fehlt	14.35	16:05	fehlt	16:05	16.25	150
6	fehlt	fehlt	09:00	10:00	fehlt	10:00	10:20	160
7	fehlt	fehlt	08:35	09:40	fehlt	09:40	10:00	210
8	fehlt	fehlt	08:45	09:45	fehlt	09:45	10:05	250
9	fehlt	fehlt	10:45	11:45	fehlt	11:45	12:05	150
10	fehlt	fehlt	09:30	10:30	fehlt	10:30	10:50	fehlt
11	Mai 08	70,00	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
12	Mai 08	35,00	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
13	Mai 08	33,35	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
14	Mai 08	35,00	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
15	Mai 08	80,00	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
16	fehlt	fehlt	09:40	10:40	09:40	10:40	10:50	300
17	fehlt	fehlt	10:50	11:50	10:50	11:50	12:10	1400
18	fehlt	fehlt	09:15	10:45	09:15	10:45	11:05	600
19	fehlt	fehlt	10:20	11:20	10:20	11:20	11:40	100
20	fehlt	fehlt	11:30	12:30	11:30	12:30	12:50	150

Untersucht wurden Blutplasma- und Urinproben von 20 Patienten/ -innen, die mit Docetaxel behandelt werden. Es handelt sich vorwiegend um Proben von Mammakarzinom-Patientinnen, aber auch Werte von Prostata- und Bronchialkarzinom-Patienten wurden ermittelt.

Der Zeitpunkt der Abnahme des Blutes orientierte sich an der Kinetik von Docetaxel. Aus entsprechenden Untersuchungen weiß man, dass die Docetaxelkonzentration im Blut nach Infusionsende sehr rasch abfällt. Die nachstehende Abbildung zeigt die mittlere Konzentration-Zeit-Kurve von Docetaxel (Daten von 69 Patienten). [14] Es ist ersichtlich, dass die Infusion 60 Minuten dauerte. Im Durchschnitt wurden zu diesem Zeitpunkt 1,823 μg /ml Blut erreicht. Fünf Minuten später fällt die Konzentration auf 0,723 μg /ml, nach weiteren zehn Minuten werden nur noch 0,242 μg /ml nachgewiesen, also etwas über 10% der Ausgangskonzentration.

Die Abnahme des Blutes erfolgte also vor der Therapie (0h), unmittelbar nach der Infusion (post), wo die Konzentration von Docetaxel im Blut am höchsten ist und 20 Minuten nach der Infusion (20 min), wo der Wirkstoff unter 10% gesunken ist.

Die Proben wurden bis zur Analyse tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

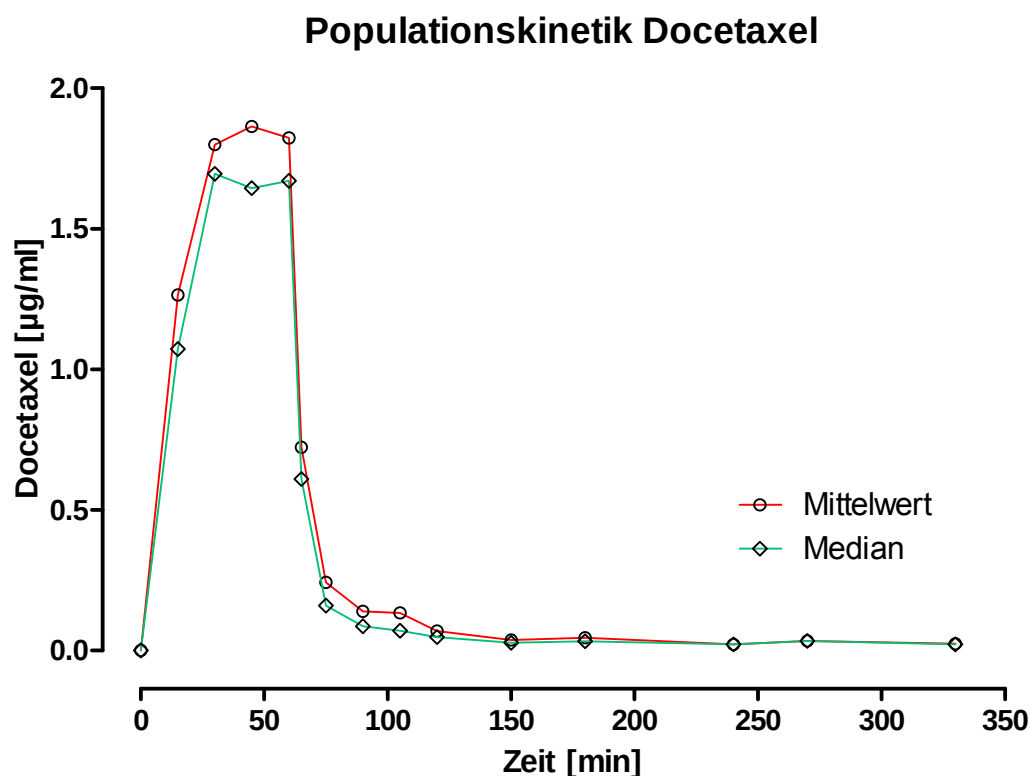


Abb. 2: Mittlere Konzentration-Zeit-Kurve von Docetaxel

3.2 In vitro Untersuchung

Um den Abbau von Docetaxel sowie dessen Epimerisierung zu Epidocetaxel in vitro zu beobachten, wurden Vollblut, Plasma sowie eine künstlich hergestellte Proteinlösung mit Docetaxel inkubiert und die Änderung der Konzentration in verschiedenen zeitlichen Abständen gemessen.

Beim Vollblut handelte es sich einerseits um Blut für Forschungszwecke (VB F), andererseits um gewöhnliches Spenderblut (VB S).

Das Plasma wurde durch Zentrifugation des Vollblutes (PI F bzw. PI S) gewonnen.

Bei der künstlich hergestellten Proteinlösung handelt es sich um Precinorm U.

Beim Wirkstoff handelt es sich um das Originalprodukt Taxotere® der Firma Sanofi-Synthelabo GmbH, sowie um Docetaxel C und Docetaxel P der Firma EBEWE Pharma GesmbH Nfg KG.

Die Konzentrationen der einzelnen Ansätze wurden willkürlich gewählt und aus Stammlösungen von Docetaxel in Methanol (1 mg/ml) hergestellt.

Die Messung wurde jeweils unmittelbar nach der Inkubation (0h), sowie 1, 2, 3, 4, 6, 24 und 26 Stunden nach der Inkubation durchgeführt. Die Ansätze wurden zwischen den Messungen bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gelagert.

Tabelle 6: In vitro-Ansätze von Docetaxel

Probe	Matrix	Volumen [ml]	Konzentration [µg/ml]	Substanz
A	Precinorm	10	4	Taxotere®
B	Precinorm	7	3	Taxotere®
C	Precinorm	7	5	Taxotere®
D	Vollblut F	10	4	Taxotere®
E	Vollblut F	10	4	Docetaxel C
F	Vollblut F	10	4	Docetaxel P
G	Vollblut F	10	1	Taxotere®
H	Vollblut F	10	1	Docetaxel C
I	Vollblut F	10	1	Docetaxel P
J	Plasma F	10	4	Taxotere®
K	Plasma F	10	4	Docetaxel C
L	Plasma F	10	4	Docetaxel P
M	Plasma F	10	1	Taxotere®
N	Plasma F	10	1	Docetaxel C
O	Plasma F	10	1	Docetaxel P
P	Vollblut S	40	3,4	Taxotere®
Q	Vollblut S	40	12,75	Taxotere®
R	Plasma S	40	3,4	Taxotere®
S	Plasma S	40	17	Taxotere®

3.3 Quantifizierung von Docetaxel und Epidocetaxel

3.3.1 Festphasenextraktion

Um die Konzentrationen von Docetaxel und Epidocetaxel in den Patientenproben sowie in den in vitro-Ansätzen nachweisen zu können, wurde zunächst eine Festphasenextraktion (engl. Solid Phase Extraction, SPE) durchgeführt. Hierbei wird der Analyt an einem festen Sorbens angereichert, störendes Matrixmaterial wird entfernt und schließlich der Analyt isoliert.



Abb. 3: Festphasenextraktionseinheit

Verwendete Geräte und Chemikalien:

Kartusche: SPE cartridges Oasis, HLB 1 ml 30 mg Füllung, 1 ml Volumen (Waters)

Vakuum-Festphasen-Extraktionseinheit (Analytichem International, USA)

Zentrifuge: Labofuge 400 (SN 5100 2175, Heraeus), Rotor für Teströhrchen (dickwandig, 100 x 12 mm ID)

Schüttler: Heidolph Polymax 2040

Methanol (J. T. Baker)

Aqua bidestillata

Praktische Vorgehensweise:

- 1) Festphasenkartusche auf die Deckplatte der Vakuumwanne stecken
- 2) ein Vakuum von -200 mbar anlegen
- 3) das Sorbens mit 1 ml Methanol aktivieren

- 4) Vorkonditionierung mit 1 ml bidestilliertem Wasser
- 5) Aufbringen von 1 ml Probe
- 6) Auswaschen der Matrixkomponenten mit 1 ml Wasser- Methanol (95 + 5%, v/v)
- 7) Elution mit 1ml Methanol, das Eluat wird in einer Eprovette aufgefangen, 1 ml bidestilliertes Wasser ist in der Eprovette vorgelegt
- 8) Zentrifugation (700 rpm, 1 min) um das Eluat aus der Kartusche zu entfernen
- 9) Einige Sekunden am Vortex mischen
- 10) 1 ml in ein HPLC-Fläschchen pipettieren
- 11) Fläschchen in den HPLC- Autosampler stellen

3.3.2 HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie ist ein Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen, sowie zu deren quantitativen und qualitativen Analyse. Die Trennung basiert auf der unterschiedlichen Verteilung der Substanzen in zwei Phasen, wobei eine mobile Phase (Elutionsmittel) das Substanzgemisch über eine stationäre Phase transportiert. Die stationäre Phase besteht aus kleinen, gleichmäßig geformten Teilchen und befindet sich dicht gepackt in einer Stahlsäule. Das Substanzgemisch wird in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und gemeinsam mit dem Elutionsmittel mithilfe von Pumpen durch die Trennsäule gedrückt. Es kommt zur Adsorption der Substanzen an die stationäre Phase und anschließend zur Desorption der Substanzen durch ein Lösungsmittelgemisch (Elutionsmittel). Da unterschiedliche Stoffe je nach Polarität und Löslichkeit meist unterschiedlich stark adsorbiert und desorbiert werden, kann ein Stoffgemisch durch aufeinanderfolgende Adsorption und Desorption in die Einzelkomponenten getrennt werden. Nach dem Verlassen der Säule werden die Substanzen einzeln detektiert. Die Messwerte werden in einem Chromatogramm als Peaks dargestellt, deren Retentionszeiten qualitative Aussagen über den Analyten zulassen und deren Fläche proportional zur Konzentration der detektierten Substanz ist. Die Peakflächen erhält man durch Integration, quantifiziert wird mithilfe einer Eichgerade. [15]

Verwendetes Gerät:

Tabelle 7: Analytische Bedingungen des HPLC- Systems

Merck-Hitachi D7000 high performance liquid chromatography system	
Vorsäule	Symmetry C8 (Waters), 10 µm, 20 x 4.6 mm ID
Trennsäule	Symmetry C8 (Waters), 3.5 µm, 100 x 4.6 mm ID (11000 plates)
Kartuschensystem	Edelstahl- Kartuschensystem für Vor- und Trennsäule ohne Totvolumen
Säulentemperatur	36°C
Eluent	Methanol – Acetonitril - Wasser (16 + 40 + 44 %, v/v/v), vor der HPLC wird der Eluent 2 Stunden im Ultraschallbad entgast
Flussrate	0.8 ml / min
Druck	120 bar
Injektionsvolumen	30 µl
Detektion	229 nm
Retentionszeit	9 min Docetaxel, 13 min Epidocetaxel
Analysenzeit	25 min
Pumpe	L-7100
UV-Detektor	L-7400
Interface	D-7000
Autosampler	L-7200
Säulenofen	Jetstream 2
Hardware	Compaq Deskpro XL 5100 (32 MB RAM, 2 GB Harddisk, Windows NT) Monitor 171FS Drucker: Hewlett Packard Deskjet 600
Software	Windows NT "HSM D-7000" Software zur Kontrolle und Integration

3.3.3 Eichgerade

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Verdünnungsreihe von Docetaxel in Blutplasma hergestellt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie sowohl über als auch unter den Konzentrationen der Proben liegen. Nun wurde analog zu den Patientenproben eine Festphasenextraktion durchgeführt und mittels HPLC analysiert. Die erhaltenen Peakflächen wurden den bekannten Konzentrationen zugeordnet und graphisch dargestellt. Aufgrund der linearen Beziehung zwischen Konzentration und Peakfläche entsteht der Funktionsverlauf einer Geraden, die der Gleichung $y = k \cdot x + d$ folgt. Anhand dieser Gleichung können nun die Docetaxel- und die Epidocetaxelkonzentrationen ermittelt werden.

y ist die Peakfläche, k ist die Steigung der Geraden (slope=11,13), x ist die Konzentration und d ist der Ordinaten-Abschnitt der Funktion. d wird gleich 0 gesetzt, da die Gerade durch den Nullpunkt verläuft. Somit ergibt sich für die Berechnung der Konzentration folgende Formel: **Konz = Peakfläche / 11**.

Tabelle 8: Konzentration und erhaltene Peakflächen der Verdünnungsreihe von Docetaxel

Konzentration [µg/ml]	0	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4
Peakfläche	0	1,1	1,6	2,9	4,4	11,2	25,7	43,4

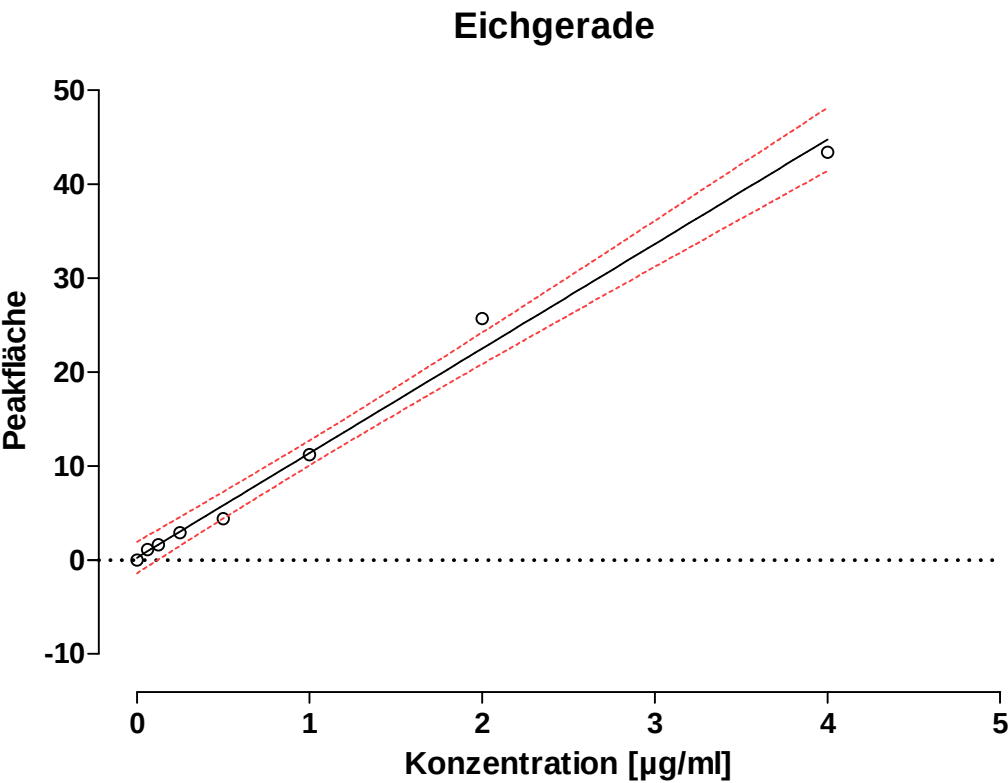


Abb. 4: Eichgerade

Tabelle 9: Statistische Parameter der Eichgerade

Best-fit values		Intervals	
Slope	11.13 ± 0.4193	Slope	10.11 to 12.16
Y-intercept when X=0.0	0.2424 ± 0.6846	Y-intercept when X=0.0	-1.433 to 1.918
X-intercept when Y=0.0	-0,02177	X-intercept when Y=0.0	-0.1831 to 0.1222
1/slope	0,08983	Goodness of Fit	
95% Confidence		r ²	0,9916

Sy.x	1,538
Is slope significantly non-zero?	
F	705
DFn, DFd	1.000, 6.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	

Number of X values	8
Maximum number of	1
Total number of values	8
Number of missing values	0

3.4 Messung des oxidativen Stresses und der antioxidativen Kapazität

3.4.1 Verwendete Geräte

- FORMplus Messgerät



Abb. 5: FORMplus Messgerät

Tabelle 10: Produktbeschreibung FORMplus - Free Oxygen Radicals Monitor-plus
[16]

Produktname:	FORM-plus - Free Oxygen Radicals Monitor-plus
Vertrieb:	Incomat Medizinische Geräte GmbH
Tests:	FORT (Free Oxygen Radicals Test) FORD (Free Oxygen Radicals Defence) Harnsäure Hämatokrit Hämoglobin
Probenmaterial:	Kapillarblut

Tabelle 11: Technische Daten des FORM-plus - Free Oxygen Radicals Monitor-plus [17]

Messprinzip	Lambert-Beer-Gesetz
Temperatur Lesefach	37 +/- 0,2°C
Lichtquelle	LED, Light Emitting Diode, 505nm
Optischer Weg	1 cm
Display	Touch Screen, 128 x 128 Pixel
Testanzahl	5
PC Software	Easy Store
Interface	USB
Drucker	Thermografisch

Gewicht	ca. 1,1 kg
Maße	255(B) x 237(L) x 24(H) mm
Strom	90 – 260 V, AC 50 – 60 Hz
Energieabsorption	max. 45 Watt
Arbeitsbedingungen	15 - 34°C (max. 90% Rh)
Zertifizierung	CE - Zeichen

- Mini-Zentrifuge Modell 6000



Abb. 6: Mini-Zentrifuge Modell 6000

Tabelle 12: Technische Daten der Mini-Zentrifuge Modell 6000 [18]

Durchmesser	16 cm
Höhe	20 cm
Gewicht	ca. 1700 g
Durchmesser des Rotors	68 mm
Max. Umdrehungen	6000 rpm
Laufzeiten	Voreinstellungen von 1, 2, 3 Minuten oder ununterbrochenes Laufen
Arbeitsbedingungen	15 - 34°C (max. 90% Rh)
Zertifizierung	CE

3.4.2 Durchgeführte Tests:

- **FORT-Test (Free Oxygen Radicals Test)**

Mit Hilfe des FORM Diagnostik Systems kann man die Hydroperoxidspiegel (ROOH) in biologischen Proben (z. B. Blut) ermitteln. Das Testprinzip beruht auf der Fähigkeit von Übergangsmetallen (z. B. Eisen) die Bildung von freien Radikalen aus Hydroperoxiden zu katalysieren. Im Plasma vorhandenes, an Protein gebundenes Eisen wird freigesetzt und dient als Katalysator für die genannte Reaktion.

Dem Testprinzip liegt die Fenton-Reaktion zugrunde. Aus Hydroperoxiden werden Alkoxy- und Peroxylradikale (RO° und ROO°) freigesetzt, deren Quantität direkt proportional zur Menge an vorhandenen Hydroperoxiden im Blut ist. RO° und ROO° reagieren mit N, N-diethyl-para-phenylendiamin (ANH_2) zu einem stabilen, gefärbten Komplex, der mit Hilfe des Photometers detektiert wird. [19]

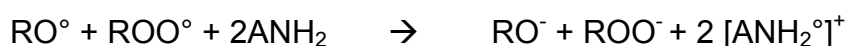


Tabelle 13: Testbedingungen FORT Test [21]

Referenzwerte	bis 310 FORT U. (1 FORT = 0,26 mg/l H_2O_2)
Testbedingungen:	
Wellenlänge	505 nm
Strahlengang	1 cm
Arbeitstemperatur	37°C
Reaktionstyp	kinetische Reaktion
Linearität	160 – 600 Fort U.
Wiederholbarkeit	CV < 5 %
Genauigkeit	CV < 5 %

Zusammensetzung des Testkits:

- **R1 Reagenz:** lyophilisiertes, in quadratischen Messküvetten vorbereitetes Chromogen
- **R2 Reagenz:** Puffer (pH-Wert 4,8). Die Mikrovetten sind bereits mit Konservierungsmitteln und Stabilisatoren versehen und fertig vorbereitet.
- **Kapillaren,** 20 µl [21]

Durchführung der Messung

- 1) 20 µl der Probe mit einer Mikropipette in die mit Reagenz gefüllte Mikrovette (FORT R2) pipettieren und diese fest verschließen
- 2) Mikrovette vorsichtig hin und her schwenken
- 3) Mikrovette öffnen und den gesamten Inhalt in die quadratische Küvette gießen, die das Chromogenlyophilisat enthält (FORT R1)
- 4) Küvette verschließen und vorsichtig schwenken, bis sich das Reagenzlyophilisat vollständig aufgelöst hat
- 5) Küvette mit einer der gerippten Seiten nach oben in die Zentrifuge geben und eine Minute lang zentrifugieren, Ausgleichsküvette gegenüber einsetzen
- 6) Nach der Zentrifugation die Küvette ohne zu Schütteln in den Küvettenschacht des FORMplus-Messgerätes einsetzen, Barcode-Etikett zeigt nach vorne. Darauf achten, dass die glatten Ränder der Küvette ganz sauber sind (gegebenenfalls mit einem Tupfer säubern)
- 7) Das Testen beginnt automatisch, nachdem die Küvette in die Messzelle gesetzt wurde. Das Gerät führt eine Messung nach drei Minuten und erneut nach weiteren drei Minuten durch; nach deren Ablauf wird das Ergebnis angezeigt bzw. ausgedruckt. Nach der Messung wird die Küvette entnommen und entsorgt. [21]

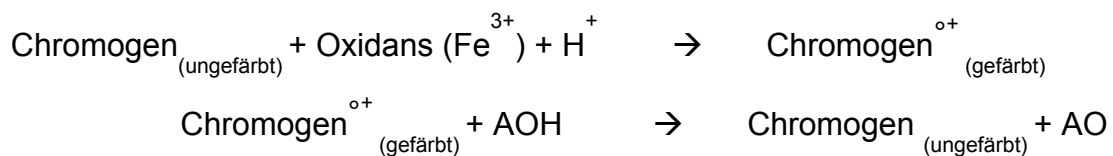
Tabelle 14: Beurteilung der FORT-Werte [21]

Beurteilung	Messeinheit (FORT U.)
Gut	bis 230
Grenzbereich	230 – 310
Oxidativer Stress	310 – 400
Starker oxidativer Stress	über 400

- **FORD-Test (Free Oxygen Radicals Defense)**

Der FORD-Test stellt ein schnelles und einfaches Testverfahren für die Bestimmung des kombinierten Effekts der Antioxidantien im Blut dar. Das Messprinzip beruht auf der Reduktion eines stabilen, gefärbten Radikalkations. Dieses wird vorab in saurer Umgebung (pH 5,2) in Anwesenheit eines geeigneten

Oxidationsmittels (FeCl_3) aus einem farblosen Chromogen (enthält 4- Amino- N, N- Diethylanilinsulfate) gebildet und wird photometrisch bei 505 nm erfasst. Durch antioxidative Substanzen in der Probe wird es reduziert, die Farbintensität der Lösung nimmt ab und wird ebenfalls photometrisch erfasst. Die Abnahme der Farbe der Lösung ist proportional zur Konzentration der Antioxidantien. Die antioxidative Kapazität der Probe wird nun durch den Vergleich der Absorptionswerte der Probe mit einer entsprechenden Standardkurve in Einheiten Trolox (6- Hydroxy- 2, 5, 7, 8- Tetramethylchroman- 2- Carboxylsäure) bestimmt.



Trolox ist ein permeables Zellderivat des Vitamin E, welches üblicherweise zur Antioxidantienbewertung herangezogen wird. [20]

Tabelle 15: Testbedingungen FORD Test [22]

Referenzwerte	1,07 – 1,53 mmol/l Trolox-Äquivalente
Testbedingungen:	
Wellenlänge	505 nm
Strahlengang	1 cm
Arbeitstemperatur	37°C
Linearität	0,25 – 3,0 mmol/l Trolox
Wiederholbarkeit	CV < 5 %
Genauigkeit	CV < 8,5 %

Zusammensetzung des Testkits:

- **S1 Reagenz:** Hyperosmolarpuffer
- **S2 Reagenz:** Acetatpuffer pH 5,2
- **S3 Reagenz:** Eisenlösung
- **C1 Reagenz:** Chromogen
- Einwegpipettenspitzen
- Einwegkapillaren, 50µl [22]

Durchführung der Messung

- 1) Den Inhalt der farbigen Mikrovette S2 in die quadratische Küvette C1 geben
- 2) 50 µl des Reagenz S3 hinzupipettieren und einige Sekunden schwenken, um das Chromogen aufzulösen
- 3) Die Küvette in den Küvettenschacht des Gerätes setzen, Barcode-etikett zeigt nach vorne. Darauf achten, dass die glatten Ränder der Küvette ganz sauber sind (gegebenenfalls mit einem Tupfer säubern). Die erste Messung (Absorption des Chromogens) dauert vier Minuten
- 4) Während der ersten Messung 50 µl der Probe mit einer Mikropipette in die weiße Mikrovette S1 pipettieren, verschließen und vorsichtig schwenken
- 5) Anschließend in die Zentrifuge setzen und eine Minute zentrifugieren, Ausgleichsmikrovette gegenüber einsetzen
- 6) Wenn die erste Messung beendet ist, wird die Küvette aus dem Gerät genommen, geöffnet und 100 µl aus der weißen Mikrovette hinzupipettiert
- 7) Die Küvette wird verschlossen, geschwenkt und unverzüglich wieder in den Küvettenschacht eingesetzt. Barcode-etikett zeigt nach vorne. Darauf achten, dass die glatten Ränder der Küvette ganz sauber sind
- 8) Das Ergebnis wird nach zwei Minuten angezeigt bzw. ausgedruckt [20]

3.5 Biometrische Berechnungen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit folgenden Computerprogrammen:

- Microsoft Office Excel® 2003 wurde zum erstellen von Tabellen sowie deren Kalkulation und Auswertung verwendet
- GraphPad Prism® 5 wurde zum Erstellen von Grafiken sowie zur statistischen Berechnung der Daten verwendet

Berechnet wurden:

- Lagemaße: arithmetisches Mittel, Median, Quantile, Konfidenzintervall, Minimum, Maximum
- Streuungsmaße: Varianz, Standardabweichung, mittlere absolute Abweichung, Interquartilbereich
- Statistische Tests: Ungepaarter t-Test, Ausreißertest nach Grubbs, lineare Regression

4) ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Untersuchung der Abbaus von Docetaxel sowie dessen Epimerisierung zu Epidocetaxel

4.1.1 In vitro Untersuchungen

Zunächst wurde der Abbau von Docetaxel in vitro bestimmt. Die drei verschiedenen Zubereitungen des Wirkstoffes (Doce T, C, P) wurden miteinander verglichen. Vollblut für Forschungszwecke (VB F) und das daraus gewonnene Plasma (PI F) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 bzw. 4 µg/ml) der jeweiligen Zubereitung inkubiert.

Tabelle 16: Konzentration und Prozent von Docetaxel im Zeitverlauf

VB F1

Zeit [h]	Doce C	%	Doce P	%	Doce T	%
0	1,04	100	1,25	100	1,04	100
1	1,04	95	1,17	90	1,01	89
2	0,98	89	1,11	83	0,98	88
4	0,93	80	1,10	79	0,91	76
6	0,85	100	0,91	78	0,75	81
24	1,00	100	1,06	100	0,99	100

VB F4

Zeit [h]	Doce C	%	Doce P	%	Doce T	%
0	3,94	100	3,83	100	3,61	100
1	3,89	98	3,46	95	3,21	91
2	3,76	94	3,42	82	3,10	77
4	3,56	82	3,39	75	3,01	76
6	3,38	88	3,35	82	3,00	77
24	2,68	99	4,54	99	3,69	98

PI F1

Zeit [h]	Doce C	%	Doce P	%	Doce T	%
0	1,17	100	1,40	100	1,52	100
1	1,12	96	1,30	94	1,40	91
2	1,05	91	1,15	91	1,36	89
3	1,02	90	1,12	89	1,31	88
4	0,99	85	1,11	82	1,27	86
6	0,94	81	1,02	78	1,18	78
24	0,98	92	1,11	95	1,23	88

PI F4

Zeit [h]	Doce C	%	Doce P	%	Doce T	%
0	4,16	100	4,68	100	3,76	100
1	3,97	93	4,27	92	3,29	89
2	3,55	86	4,26	92	3,23	88
3	3,55	85	4,19	89	3,15	86
4	3,53	83	4,00	83	3,11	81
6	3,23	75	3,75	76	3,06	82
24	3,56	93	4,08	91	3,25	91

*Tabelle 17: Konzentration und Prozent von Epidocetaxel im Zeitverlauf***VB F1**

Zeit [h]	Epi C	%	Epi P	%	Epi T	%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,05	4,59	0,12	9,30	0,12	10,62
2	0,12	10,91	0,23	17,16	0,14	12,50
4	0,23	19,83	0,29	20,86	0,29	24,17
6	0,00	0,00	0,26	22,22	0,18	19,35
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

VB F4

Zeit [h]	Epi C	%	Epi P	%	Epi T	%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,08	2,02	0,19	5,21	0,30	8,55
2	0,25	6,23	0,75	17,99	0,94	23,27
4	0,79	18,16	1,12	24,83	0,95	23,99
6	0,45	11,75	0,76	18,49	0,91	23,27
24	0,03	1,11	0,05	1,09	0,09	2,38

PI F1

Zeit [h]	Epi C	%	Epi P	%	Epi T	%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,05	4,27	0,09	6,47	0,14	9,09
2	0,11	9,48	0,11	8,73	0,16	10,53
3	0,11	9,73	0,14	11,11	0,18	12,08
4	0,17	14,66	0,25	18,38	0,20	13,61
6	0,22	18,97	0,28	21,54	0,34	22,37
24	0,08	7,55	0,06	5,13	0,17	12,14

PL F4

Zeit [h]	Epi C	%	Epi P	%	Epi T	%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,32	7,46	0,38	8,17	0,4	10,84
2	0,56	13,63	0,38	8,19	0,45	12,23
3	0,65	15,48	0,51	10,85	0,52	14,17
4	0,73	17,14	0,82	17,01	0,71	18,59
6	1,05	24,53	1,16	23,63	0,69	18,4
24	0,27	7,05	0,40	8,93	0,32	8,96

Die Kinetik von Docetaxel unterscheidet sich nicht. In allen Ansätzen konnte zunächst eine Abnahme der Konzentration festgestellt werden. Die geringste Konzentration wird nach sechs Stunden erreicht. Zeitgleich nimmt die Konzentration von Epidocetaxel zu, Docetaxel epimerisiert also zu Epidocetaxel. Nach sechs Stunden nimmt die Konzentration von Docetaxel wieder zu und von Epidocetaxel ab. Es kommt also zu einer Umwandlung von Epidocetaxel zurück zu Docetaxel. Die Epimerisierung läuft demnach in beide Richtungen ab. In der graphischen Darstellung der Konzentration gegen die Zeit ist dieser Zusammenhang deutlich zu erkennen.

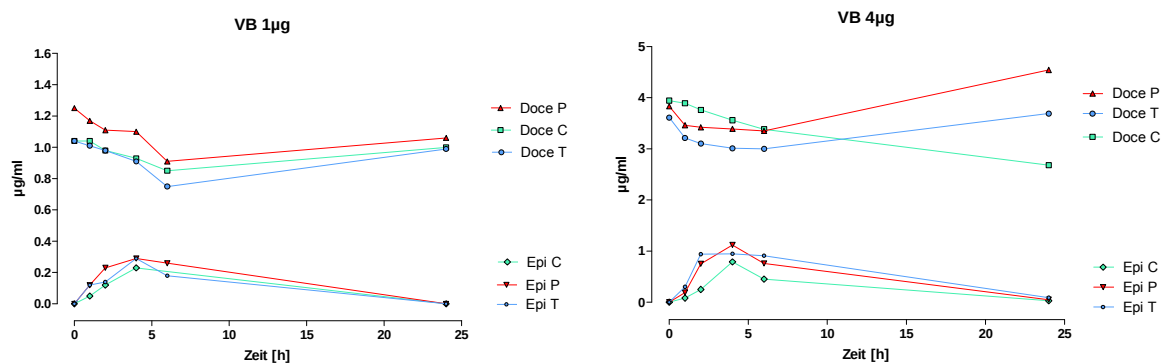


Abb. 7: Konzentration-Zeit-Kurve von Docetaxel und Epidocetaxel in vitro (Vollblut)

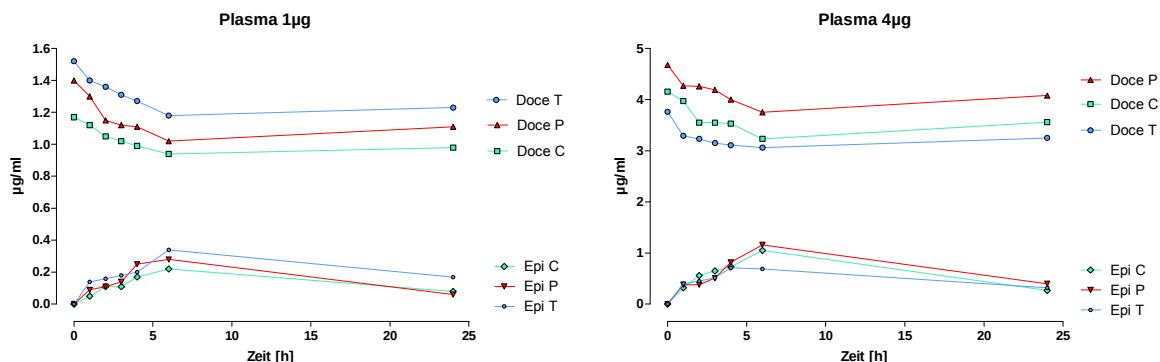


Abb. 8: Konzentration-Zeit-Kurve von Docetaxel und Epidocetaxel in vitro
(Plasma)

Tabelle 18: Kinetikberechnungen für Epidocetaxel

PI 1µg	Epi C	Epi P	Epi T
cmax	0,22	0,28	0,34
tmax	6,00	6,00	6,00
k	0,20	0,21	0,20
t1/2	3,52	3,38	3,55

VB 1µg	Epi C	Epi P	Epi T
cmax	0,23	0,29	0,29
tmax	4,00	4,00	4,00
k	0,32	0,19	0,17
t1/2	2,16	3,73	4,13

PI 4µg	Epi C	Epi P	Epi T
cmax	1,05	1,16	0,71
tmax	6,00	6,00	5,00
k	0,26	0,27	0,23
t1/2	2,63	2,56	3,00

VB 4µg	Epi C	Epi P	Epi T
cmax	0,79	1,12	0,95
tmax	4,00	4,00	4,00
k	0,26	0,26	0,25
t1/2	2,69	2,63	2,73

Die Konzentration von Epidocetaxel erreicht im Vollblut allerdings bereits nach vier Stunden ihr Maximum und nimmt danach wieder ab, während die Konzentration von Docetaxel nach vier Stunden weiterhin abnimmt. Hier dürfte keine Epimerisierung mehr erfolgen, sondern andere Umlagerungsprodukte entstehen. In der folgenden Darstellung werden die Chromatogramme von Docetaxel C im Vollblut nach einer Stunde und nach sechs Stunden miteinander verglichen. Man erkennt, dass die vorhergehenden Peaks der Matrix tatsächlich ansteigen.

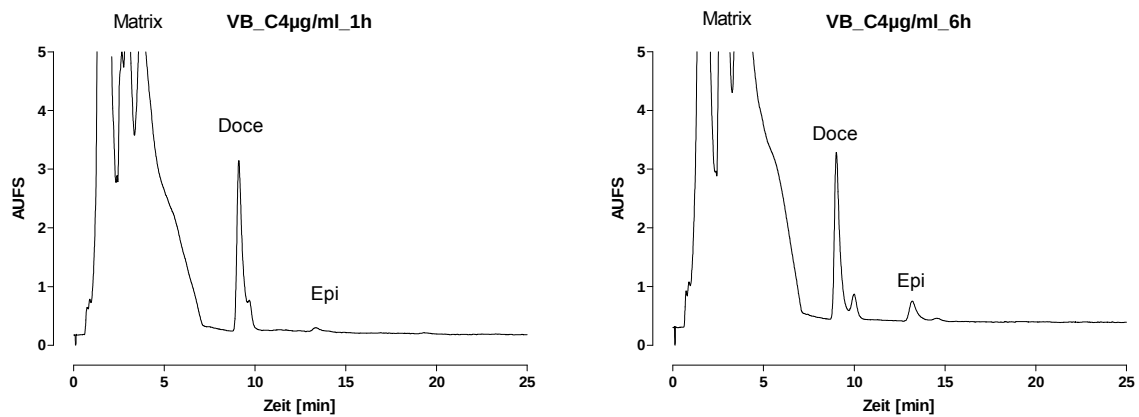


Abb. 9: Chromatogramm von Docetaxel C im Vollblut nach einer Stunde und nach sechs Stunden

Betrachtet man den prozentuellen Anteil von Epidocetaxel, so ergeben sich die höchsten Werte im Vollblut wiederum nach vier Stunden und im Plasma nach sechs Stunden. Der höchste Wert beträgt im Vollblut 24,83% (Epidocetaxel P), im Plasma 24,53% (Epidocetaxel C).

Nach 24 Stunden ist im Vollblut mit der Ausgangskonzentration 1 µg/ml kein Epidocetaxel mehr nachzuweisen, im Vollblut mit der Ausgangskonzentration 4 µg/ml können maximal 2,38% nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt sind die Werte im Plasma deutlich höher. Im Plasma mit der Ausgangskonzentration 1 µg/ml können noch 7,55% (Epi C), 5,13% (Epi P) und 12,14% (Epi T) nachgewiesen werden, im Plasma mit der Ausgangskonzentration 4 µg/ml werden 7,05% (Epi C), 8,93% (Epi P) und 8,96% (Epi T) nachgewiesen.

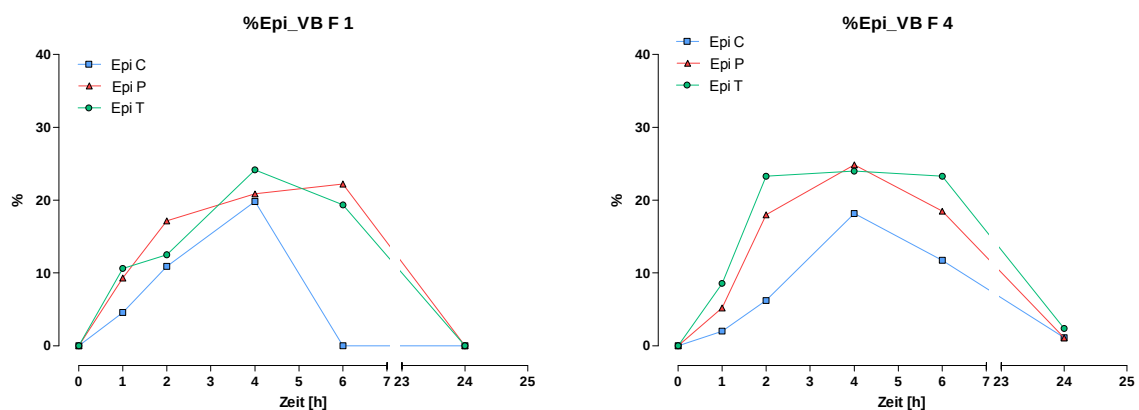


Abb. 10: Prozentuelle Darstellung der Epidocetaxelbildung in vitro (Vollblut) im Zeitverlauf

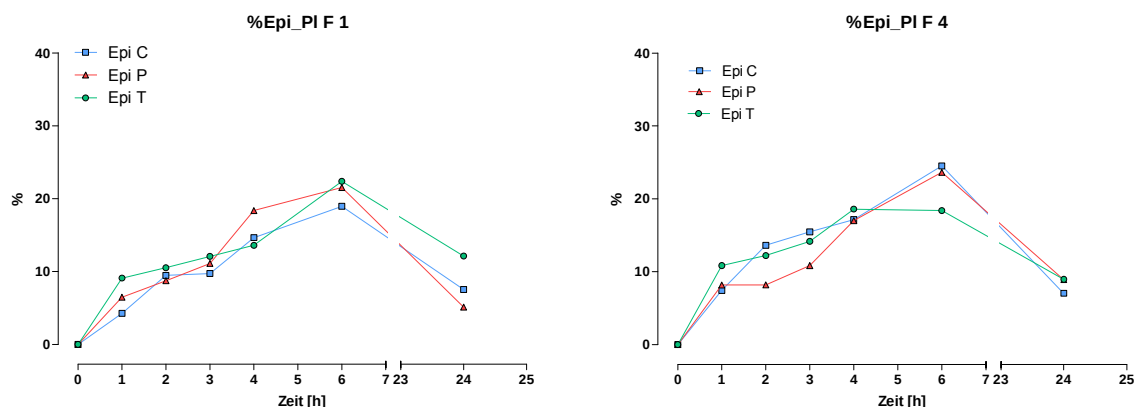


Abb. 11: Prozentuelle Darstellung der Epidocetaxelbildung in vitro (Plasma) im Zeitverlauf

Dieser Versuchsansatz wurde auch in anderen Medien durchgeführt, als Wirkstoff wurde jedoch nur Docetaxel T in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Ermittelt wurde die Epimerisierung in Spenderblut (VB S), dem daraus gewonnenen Plasma (PI S) und in Precinorm.

Die Konzentration von Epidocetaxel steigt wieder in allen drei Medien an, allerdings zu einem deutlich geringeren Prozentsatz als im ersten Versuchsansatz. Weiters setzt sich der Anstieg nach vier bzw. sechs Stunden auch noch fort, der höchste Wert wird also erst nach 24 bzw. 26 Stunden erreicht.

Es ist zu erkennen, dass in Precinorm am wenigsten Epidocetaxel gebildet wird. Nach 24 Stunden werden hier im Durchschnitt 1,86% erreicht, im Plasma sind es nach 24 Stunden durchschnittlich 4,8% und im Vollblut etwas über 7,4%.

Der Wert von Epidocetaxel in Precinorm mit der Ausgangskonzentration 3 und 5 µg/ml wurde auch nach 26 Stunden ermittelt. Die Konzentration erreicht im Durchschnitt 2,73%, steigt also um 50% des 24-Stundenwertes an.

Tabelle 19: Prozent von Epidocetaxel im Zeitverlauf (x=keine Messung)

Zeit [h]	VB S 3.4	VB S 12.75	MW	PI S 3.4	PI S 17	MW	Preci 4.0	Preci 3.0	Preci 5.0	MW
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	2,4	1,9	2,2	0,5	1,1	0,8	loq	loq	loq	loq
2	3,2	4,8	4,0	1,1	1,6	1,4	loq	1,0	0,6	0,8
4	4,3	6,2	5,3	1,8	3,6	2,7	loq	loq	loq	loq
6	6,2	6,9	6,6	2,3	4,2	3,3	loq	loq	loq	loq
24	7,2	7,6	7,4	4,4	5,2	4,8	1,6	1,9	2,1	1,9
26	x	x	x	x	x	x	x	2,5	2,9	2,7

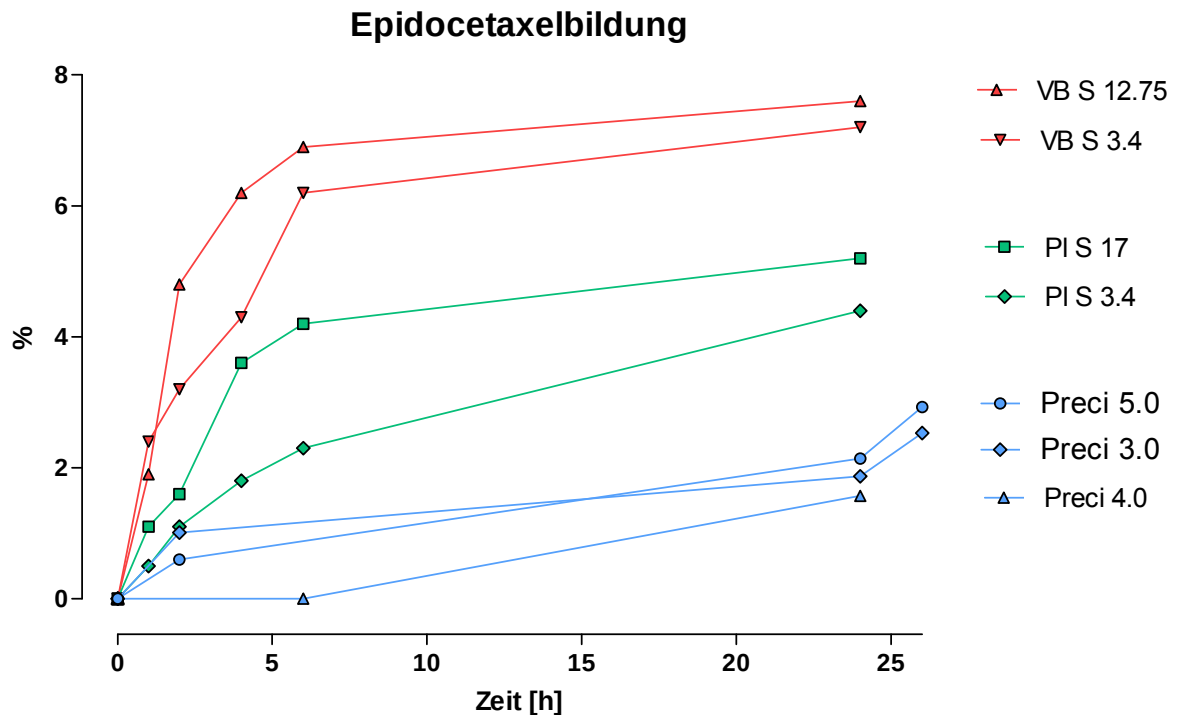


Abb. 12: Prozentuelle Darstellung der Epidocetaxelbildung in vitro im Zeitverlauf

Jedes Medium wurde mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Docetaxel (teilweise in unterschiedlicher Zubereitung) inkubiert. Der Abbau von Docetaxel sowie die Bildung von Epidocetaxel verhalten sich bei unterschiedlicher Ausgangskonzentration im selben Medium ähnlich, die Unterschiede der Kinetik ergeben sich also durch die verschiedenen Medien. Zur besseren Übersicht werden in folgender Graphik alle Mittelwerte der beiden Konzentrationen im selben Medium dargestellt. Betrachtet wird die Bildung von Epidocetaxel in Prozent.

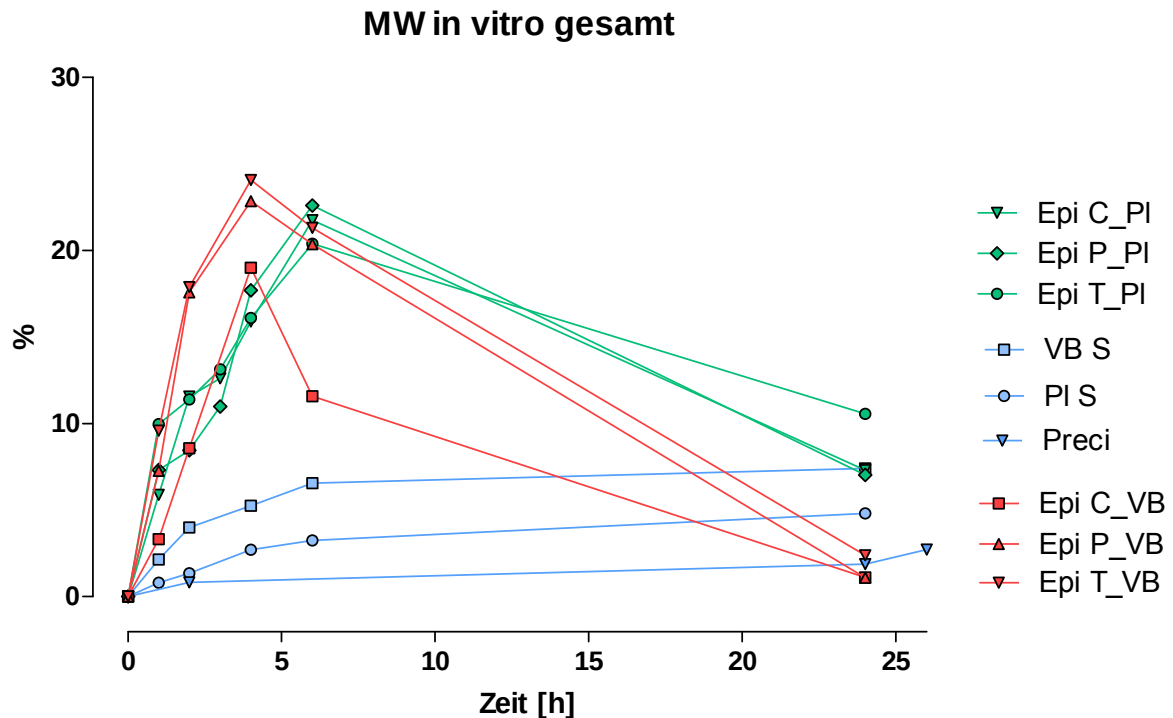


Abb. 13: Prozentuelle Darstellung der mittleren Epidocetaxelbildung in vitro in unterschiedlichen Medien im Zeitverlauf

Es ist hier deutlich zu erkennen, dass die Ansätze im Vollblut für Forschungszwecke die höchsten Konzentrationen an Epidocetaxel aufweisen. Diese nehmen aber nach vier Stunden wieder ab, während die Bildung in allen anderen Ansätzen weiterhin stattfindet. Auch im daraus gewonnenen Plasma finden sich sehr hohe Werte. Das Maximum wird aber erst nach sechs Stunden erreicht. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Werte von Vollblut und Plasma für Forschungszwecke ungefähr auf dem gleichen Niveau.

Im Spenderblut, dem daraus gewonnenen Plasma und in Precinorm verläuft die Bildung von Epidocetaxel kontinuierlich über 24 Stunden. Die Konzentration bleibt trotzdem geringer als in den ersten Ansätzen, jedoch der 26-Stunden-Wert von Precinorm lässt darauf schließen, dass die Bildung noch nicht abgeschlossen ist. Leider konnte nicht herausgefunden werden, inwieweit sich das Blut für Forschungszwecke von gewöhnlichem Spenderblut unterscheidet. Die Zusammensetzung der Matrix muss aber deutlich anders sein, da die Epimerisierung von Docetaxel zu Epidocetaxel wesentlich schneller und in höherem Ausmaß erfolgt.

4.1.2 In vivo Untersuchungen-Docetaxel

Tabelle 20: Konzentration und Prozent von Docetaxel in den Patientenproben

Probe	post Doce [µg/ml]	%	nach 20min Doce [µg/ml]	%	Urin Doce [µg/ml]	%
1	0,15	100	0,05	100	6,49	100
2	0,14	100	0,10	100	6,27	100
3	1,57	100	0,27	100	16,35	99
4	0,14	100	0,00	0	8,62	100
5	0,32	100	0,20	100	13,42	100
6	0,50	68	0,00	0	8,29	96
7	0,04	100	0,00	0	5,61	100
8	0,41	67	0,15	100	17,73	100
9	1,89	100	0,20	100	20,13	99
10	1,79	100	0,24	100	37,65	99
11	3,32	93	1,74	100	9,05	100
12	3,32	87	0,82	88	18,09	98
13	4,22	87	0,79	89	9,05	99
14	2,03	83	0,95	78	6,09	99
15	2,26	77	2,25	97	2,65	100
16	2,28	82	0,16	67	17,94	100
17	0,98	70	0,10	56	3,48	100
18	1,52	86	0,23	72	21,09	100
19	1,07	78	0,08	61	29,61	100
20	0,24	100	0,15	100	2,92	100

Docetaxelkonzentrationen unmittelbar nach der Infusion (post)

In den Patientenproben variierten die Konzentrationen von Docetaxel sehr stark. Unmittelbar nach der Infusion (post) liegen sie zwischen 0,04 µg/ml und 4,22 µg/ml.

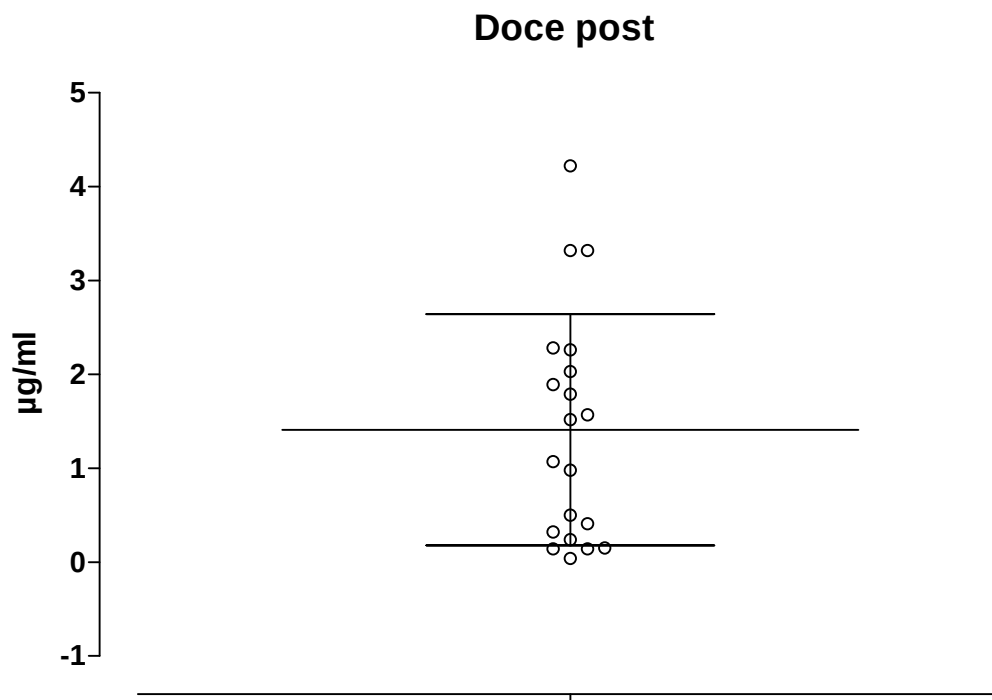


Abb. 14: Docetaxelkonzentrationen in den Patientenproben unmittelbar nach der Infusion

Tabelle 21: Statistische Parameter der Docetaxelkonzentrationen in den Patientenproben unmittelbar nach der Infusion

Number of values	20
Minimum	0,0400
25% Percentile	0,2600
Median	1,295
75% Percentile	2,203
Maximum	4,220

Mean	1,410
Std. Deviation	1,232
Std. Error	0,2755
Lower 95% CI of mean	0,8328
Upper 95% CI of mean	1,986
Sum	28,19

Sie werden zunächst der verabreichten Dosis gegenübergestellt, um zu erkennen, ob ein Zusammenhang besteht. Die verabreichte Dosis ist nur von zehn Patienten bekannt.

Tabelle 22: Gegenüberstellung der verabreichten Dosis und der gemessenen Konzentration Docetaxel

Probe	verabreichte Dosis [mg]	gemessene Konzentration [µg/ml]	%
11	119,00	3,32	2,79
12	56,00	3,32	5,93
13	70,00	4,22	6,03

14	57,75	2,03	3,52
15	140,80	2,26	1,61
16	135,00	2,28	1,69
17	160,00	0,98	0,61
18	180,00	1,52	0,84
19	180,00	1,07	0,59
20	50,00	0,24	0,48

In folgender Graphik wurde die Dosis gegen die Konzentration (c_max) aufgetragen und eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Man erkennt, dass bei zunehmender Dosis die Plasmakonzentration von Docetaxel nicht ansteigt. Weiters erhält man einen Korrelationskoeffizienten von 0,319, der Konfidenzintervall (95%) ist sehr breit, drei Werte liegen außerhalb davon. Die Werte korrelieren nicht miteinander.

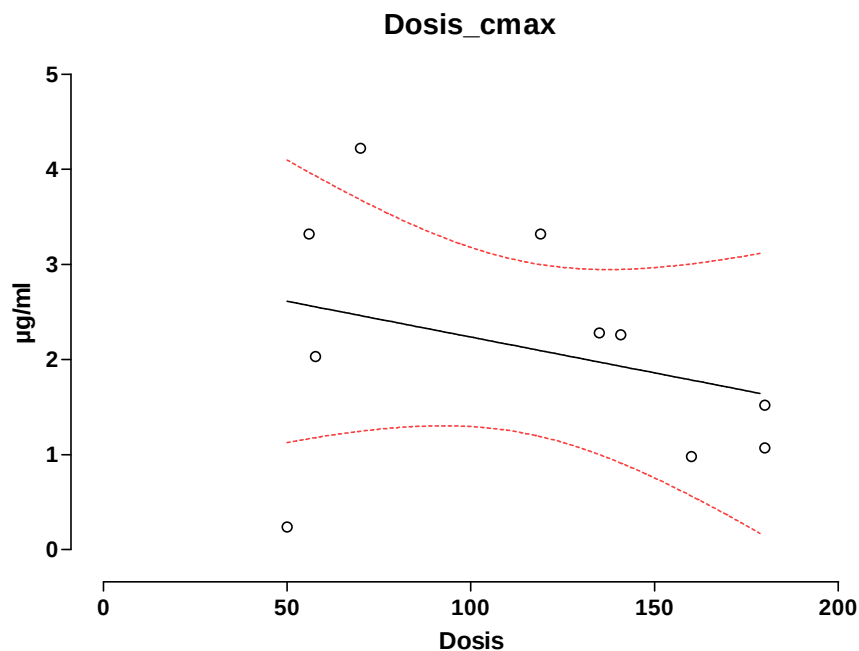


Abb. 15: Lineare Regression der verabreichten Dosis mit der Plasmakonzentration von Docetaxel

Tabelle 23: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von der Dosis mit der Konzentration

Best-fit values	
Slope	-0.007526 ± 0.007895
Y-intercept when X=0.0	2.988 ± 0.9876
X-intercept when Y=0.0	397,1
1/slope	-132,9

95% Confidence Intervals	
Slope	-0.02573 to 0.01068
Y-intercept when X=0.0	0.7111 to 5.266
X-intercept when Y=0.0	186.4 to +infinity
Goodness of Fit	

r^2	0,1020
Sy.x	1,237
Is slope significantly non-zero?	
F	0,9088
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,3683

Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

Es werden nun weitere Faktoren in die Betrachtung miteinbezogen. Die verabreichte Dosis wird mit dem Körpergewicht dividiert, die Infusionsrate (verabreichte Dosis/Dauer der Infusion in Minuten) wird berechnet und ebenfalls mit dem Körpergewicht dividiert. Alle drei Betrachtungen ergeben keinen positiven Zusammenhang mit der ermittelten Konzentration im Plasma.

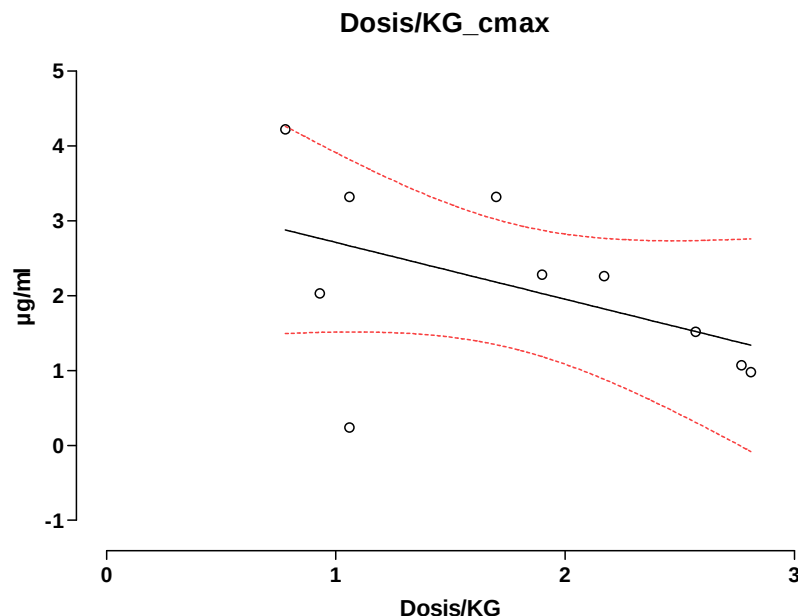


Abb. 16: Lineare Regression der verabreichten Dosis dividiert durchs Körpergewicht mit der Plasmakonzentration von Docetaxel

Tabelle 24: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von der Dosis/Körpergewicht mit der Konzentration

Best-fit values	
Slope	-0.7582 ± 0.4825
Y-intercept when X=0.0	3.470 ± 0.9293
X-intercept when Y=0.0	4,576
1/slope	-1,319
95% Confidence Intervals	
Slope	-1.871 to

	0.3544
Y-intercept when X=0.0	1.327 to 5.613
X-intercept when Y=0.0	2.761 to +infinity
Goodness of Fit	
r^2	0,2359
Sy.x	1,141
Is slope significantly non-zero?	

F	2,470
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,1547
Deviation from zero?	Not Significant
Data	

Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

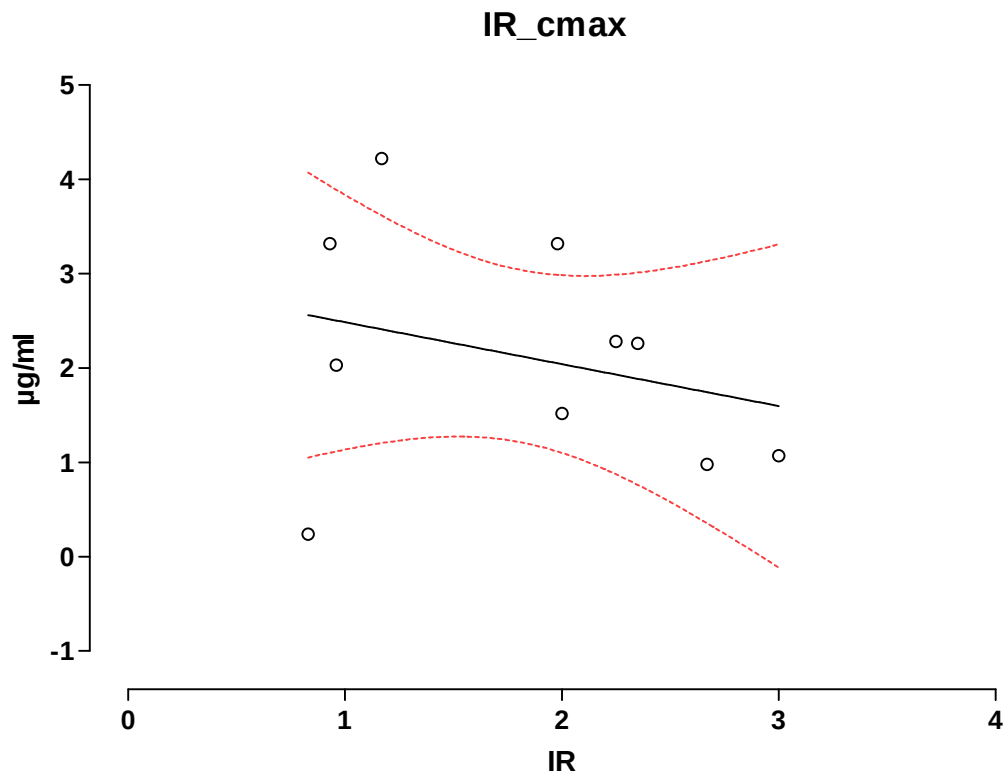


Abb. 17: Lineare Regression der Infusionsrate mit der Plasmakonzentration von Docetaxel

Tabelle 25: Statistische Parameter der Regressionsanalyse der Infusionsrate mit der Konzentration

Best-fit values	
Slope	-0.4442 ± 0.5304
Y-intercept when X=0.0	2.930 ± 1.040
X-intercept when Y=0.0	6,596
1/slope	-2,251
95% Confidence Intervals	
Slope	-1.667 to 0.7789
Y-intercept when X=0.0	0.5306 to 5.329
X-intercept when Y=0.0	2.921 to +infinity

Goodness of Fit	
r ²	0,0806
Sy.x	1,252
Is slope significantly non-zero?	
F	0,7013
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,4266
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1

Total number of values	10
Number of missing values	0

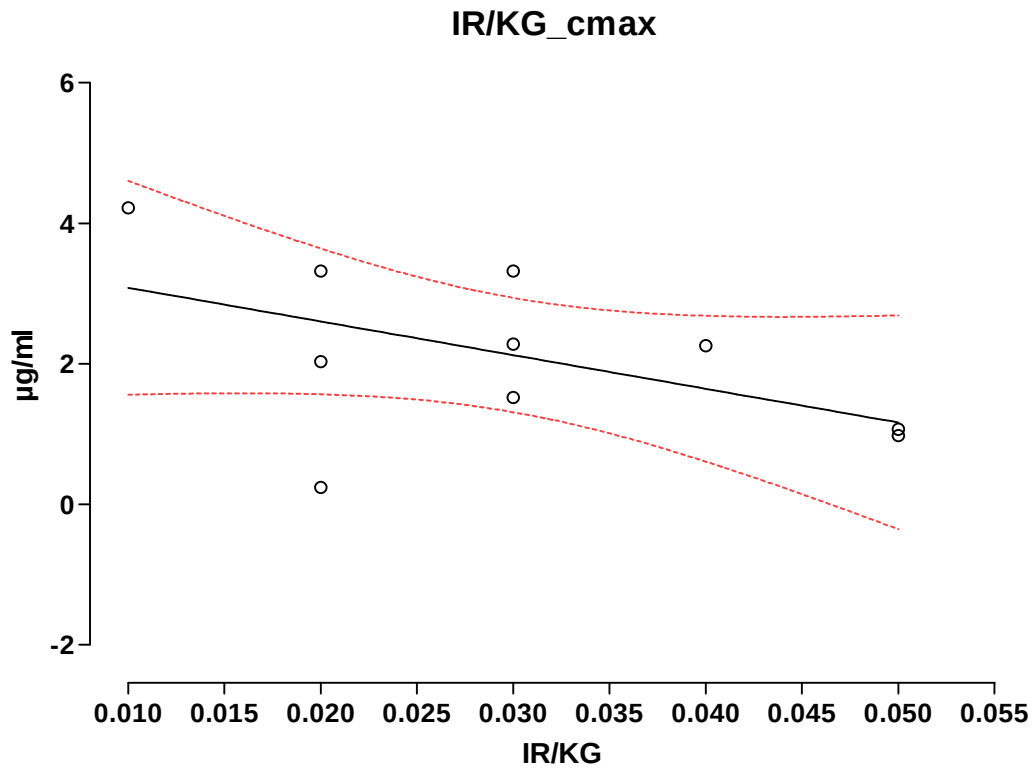


Abb. 18: Lineare Regression der Infusionsrate dividiert durchs Körpergewicht mit der Plasmakonzentration von Docetaxel

Tabelle 26: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von der Infusionsrate/Körpergewicht mit der Konzentration

Best-fit values	
Slope	-47.94 ± 27.90
Y-intercept when X=0.0	3.562 ± 0.9083
X-intercept when Y=0.0	0,07431
1/slope	-0,02086
95% Confidence Intervals	
Slope	-112.3 to 16.40
Y-intercept when X=0.0	1.468 to 5.657
X-intercept when Y=0.0	0.04645 to +infinity
Goodness of Fit	
r ²	0,2696

Sy.x	1,116
Is slope significantly non-zero?	
F	2,952
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,1241
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

Wenn man nun die verabreichte Dosis mit der ermittelten Konzentration dividiert und gegen diese aufträgt, erhält man eine lineare Regression, deren Konfidenzintervall (95%) schon wesentlich schmaler ist. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,909. Bei dieser Betrachtung gibt es also eine Korrelation, allerdings nimmt die Plasmakonzentration bei steigender Dosis ab.

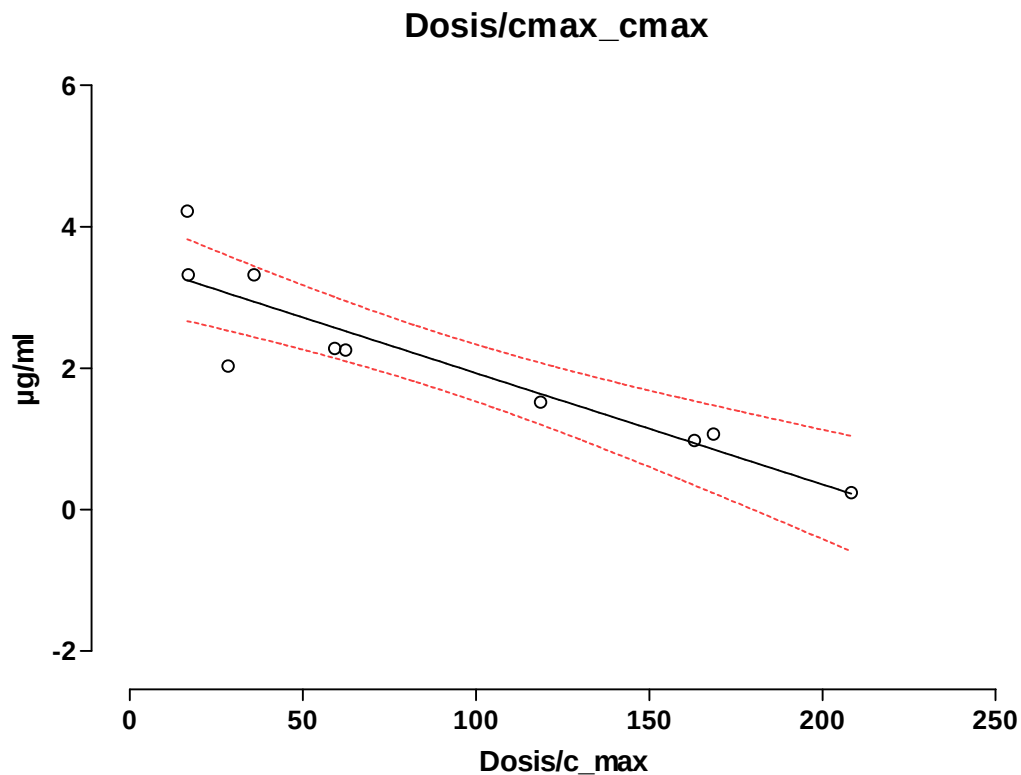


Abb. 19: Lineare Regression der Dosis dividiert durch die Konzentration von Docetaxel mit der Plasmakonzentration von Docetaxel

Tabelle 27: Statistische Parameter der Regressionsanalyse der Dosis/Konzentration mit der Konzentration

Best-fit values	
Slope	-0.01575 ± 0.002557
Y-intercept when X=0.0	3.506 ± 0.2830
X-intercept when Y=0.0	222,7
1/slope	-63,51
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.02164 to -0.009848
Y-intercept when X=0.0	2.853 to 4.158

X-intercept when Y=0.0	179.9 to 309.5
Goodness of Fit	
r ²	0,8257
Sy.x	0,5451
Is slope significantly non-zero?	
F	37,90
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,0003
Deviation from zero?	Significant
Data	

Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1

Total number of values	10
Number of missing values	0

In keiner der durchgeführten Analysen steigt die Plasmakonzentration bei erhöhter Dosis an. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass die Proben nicht unmittelbar nach der Infusion abgenommen wurden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, verteilt sich Docetaxel sehr rasch in periphere Gewebe. Eine Verzögerung der Blutabnahme um wenige Minuten kann das Ergebnis der Konzentrationsermittlung also wesentlich beeinflussen.

Im Folgenden soll auf das unterschiedliche Therapieschema der Patienten eingegangen werden, da der Metabolismus auch durch andere Arzneistoffe beeinflusst werden kann.

Tabelle 28: Erkrankung und Therapieschema der untersuchten Patienten

Patient	Grunderkrankung	Therapieschema
1	Mammakarzinom	Epirubicin/ Taxotere®
2	Mammakarzinom	Epirubicin/Taxotere®
3	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie
4	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie
5	Mammakarzinom	Epirubicin/Taxotere®
6	Mammakarzinom	Epirubicin/Taxotere®
7	Mammakarzinom	Herceptin/Taxotere®
8	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie
9	Mammakarzinom	Epirubicin/Taxotere®
10	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie
11	Prostatakarzinom	Taxotere®/ Bicalutamid
12	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie
13	Prostatakarzinom	Taxotere®/ Bicalutamid
14	Bronchialkarzinom	Taxotere® Monotherapie
15	Bronchialkarzinom	Taxotere® Monotherapie
16	Mammakarzinom	Epirubicin/Taxotere®
17	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie
18	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie
19	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie
20	Mammakarzinom	Taxotere® Monotherapie

Elf Patienten erhalten eine Monotherapie mit Docetaxel (Mono), neun bekommen zusätzlich ein anderes Chemotherapeutikum (Kombi). Stellt man die Plasmakonzentrationen unmittelbar nach der Infusion von diesen beiden Gruppen gegenüber und führt einen ungepaarten t-Test durch, so erhält man einen P-Wert

von 0,9513, die Konzentrationen der beiden Gruppen im Mittel unterscheiden sich nicht.

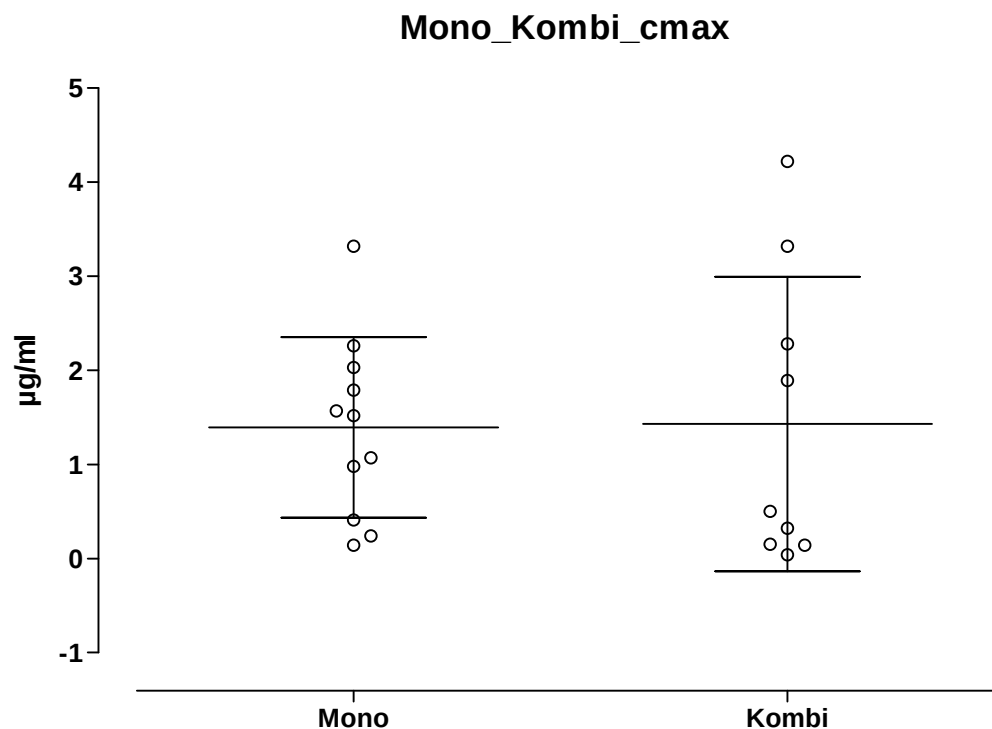


Abb. 20: Docetaxelkonzentration in den Plasmaproben der Patienten bei Mono- und Kombinationstherapie

Tabelle 29: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Mono- und Kombinationstherapie

Table Analyzed	Mono_Kombi vs cmax
Column A	Mono
vs	vs
Column B	Kombi
Unpaired t test	
P value	0,9513
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.06196 df=18
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	1.394 ± 0.2895

	N=11
Mean ± SEM of column B	1.429 ± 0.5220 N=9
Difference between means	-0.03525 ± 0.5689
95% confidence interval	-1.231 to 1.160
R squared	0,0002133
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.661, 8, 10
P value	0,1492
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Die Patienten, die eine Kombinationstherapie erhalten, werden nach ihrer Medikation noch einmal in Gruppen geteilt. Sechs Patienten erhalten zusätzlich zu Docetaxel Epirubicin, zwei Bicalutamid und ein Patient bekommt Herceptin. Wieder werden jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen, indem ein ungepaarter t-Test durchgeführt wird.

Die Monotherapie-Gruppe und die Epirubicin-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant ($P=0,307$). Die mittleren Konzentrationen betragen $1,39 \mu\text{g/ml}$ (Mono) bzw. $0,88 \mu\text{g/ml}$ (Epirubicin).

Die Herceptin-Gruppe enthält die niedrigste Docetaxelkonzentration ($0,04 \mu\text{g/ml}$). Sie lässt sich allerdings nicht aussagekräftig mit den anderen Gruppen vergleichen, da nur ein Patient diese Therapie erhält.

Die Bicalutamid-Gruppe unterscheidet sich signifikant von den anderen ($P=0,0079$ bzw. $0,007$). Hier finden sich im Mittel die höchsten Docetaxelkonzentrationen ($3,77 \mu\text{g/ml}$). Dieses Therapieschema bewirkt also einen verminderten Abbau von Docetaxel. Zurückzuführen ist dies auf die Inhibition des Cytochrom P 450-Systems durch Bicalutamid.

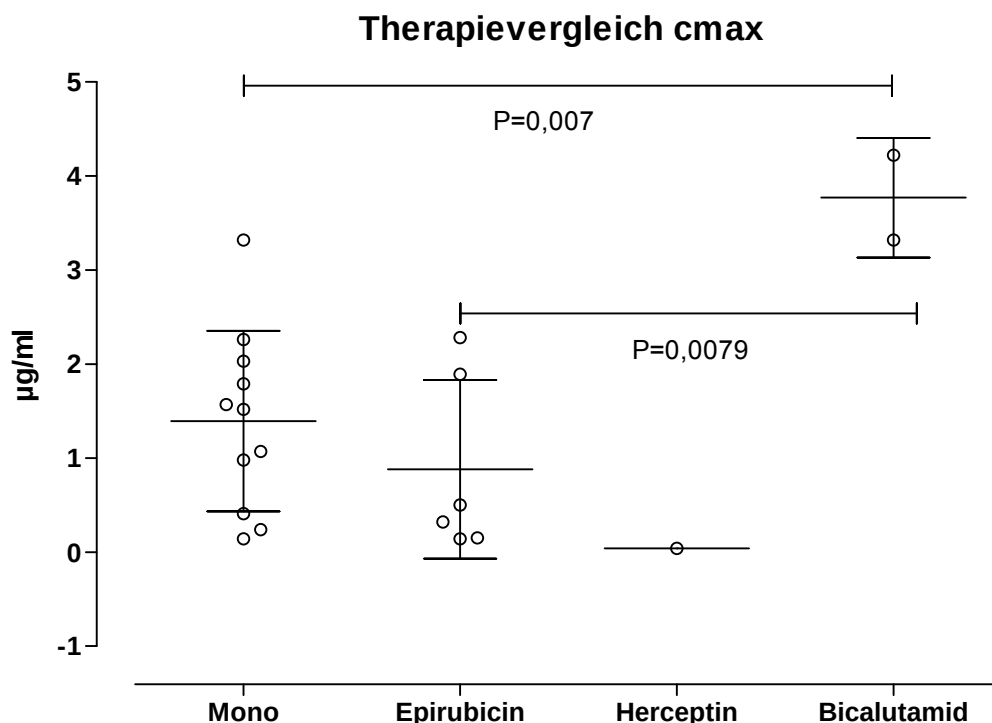


Abb. 21: Docetaxelkonzentration in den Plasmaproben der Patienten bei unterschiedlichem Therapieschema

Tabelle 30: Statistik der Konzentrationsverteilung von Docetaxel bei unterschiedlichem Therapieschema

	Mono	Epirubicin	Herceptin	Bicalutamid
Number of values	11	6	1	2
Minimum	0,1400	0,1400	0,0400	3,320
25% Percentile	0,4100	0,1475	0,0400	3,320
Median	1,520	0,4100	0,0400	3,770
75% Percentile	2,030	1,988	0,0400	4,220
Maximum	3,320	2,280	0,0400	4,220
Mean	1,394	0,8800	0,0400	3,770
Std. Deviation	0,9600	0,9506	0,0	0,6364
Std. Error	0,2895	0,3881	0,0	0,4500
Lower 95% CI of mean	0,7487	-0,1176	0,0000e+000	-1,948
Upper 95% CI of mean	2,039	1,878	0,0000e+000	9,488
Sum	15,33	5,280	0,0400	7,540

Tabelle 31: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Monotherapie und Kombinationstherapie mit Epirubicin

Table Analyzed	Therapievergleich cmax
Column A	Mono
vs	vs
Column B	Epirubicin
Unpaired t test	
P value	0,3070
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.06 df=15
How big is the difference?	

Mean ± SEM of column A	1.39 ± 0.289 N=11
Mean ± SEM of column B	0.880 ± 0.388 N=6
Difference between means	0.514 ± 0.486
95% confidence interval	-0.521 to 1.55
R squared	0,0694
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.02, 10, 5
P value	1,0000
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabelle 32: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Kombinationstherapie mit Epirubicin und mit Bicalutamid

Table Analyzed	Therapievergleich cmax
Column B	Epirubicin
vs	vs
Column D	Bicalutamid

Unpaired t test	
P value	0,0079
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

t, df	t=3.907 df=6
How big is the difference?	
Mean $\pm$ SEM of column B	0.8800 $\pm$ 0.3881 N=6
Mean $\pm$ SEM of column D	3.770 $\pm$ 0.4500 N=2
Difference between means	-2.890 $\pm$ 0.7396
95% confidence	-4.700 to -1.080

interval	
R squared	0,7179
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.231, 5, 1
P value	0,9342
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabelle 33: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Monotherapie und Kombinationstherapie mit Bicalutamid

Table Analyzed	Therapievergleich cmax
Column A	Mono
vs	vs
Column D	Bicalutamid
Unpaired t test	
P value	0,007
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.305 df=11
How big is the difference?	

Mean $\pm$ SEM of column A	1.394 $\pm$ 0.2895 N=11
Mean $\pm$ SEM of column D	3.770 $\pm$ 0.4500 N=2
Difference between means	-2.376 $\pm$ 0.7189
95% confidence interval	-3.959 to -0.7940
R squared	0,4983
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.276, 10, 1
P value	0,9552
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Nun soll noch auf die Grunderkrankung eingegangen werden, da auch die Art des Tumors einen Einfluss auf die Kinetik von Docetaxel nehmen kann. 16 Patientinnen leiden an Mammakarzinom, zwei Patienten an Bronchialkarzinom und zwei an Prostatakarzinom.

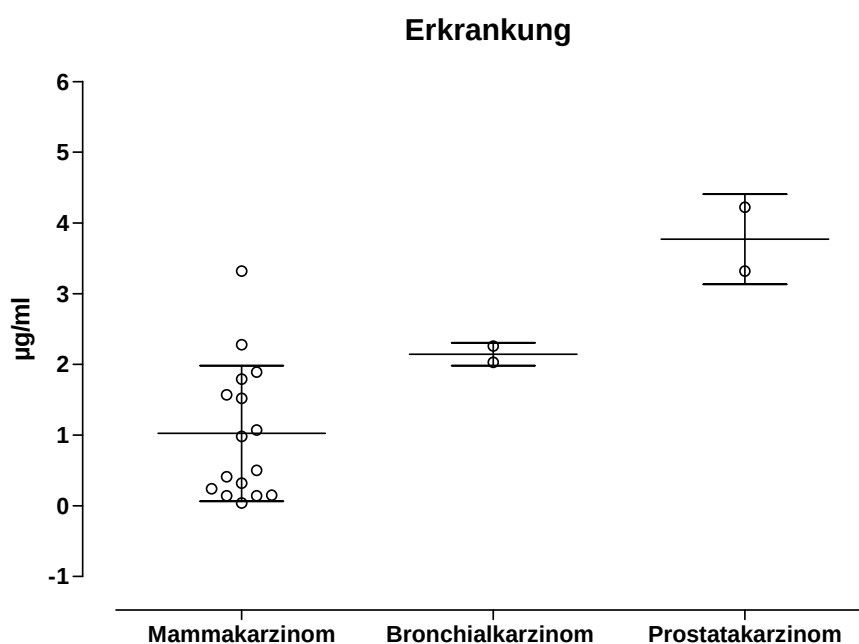
Führt man einen ungepaarten t-Test durch, so unterscheiden sich im Mittel nur die Konzentrationen der Mammakarzinompatientinnen von denen der Prostatakarzinompatienten signifikant.

Die Konzentrationen der Mammakarzinompatientinnen sind im Durchschnitt am niedrigsten (1,023 $\mu\text{g/ml}$), das Minimum liegt bei 0,04 $\mu\text{g/ml}$, das Maximum wird bei 3,32 $\mu\text{g/ml}$ erreicht.

Die Bronchialkarzinompatienten erreichen durchschnittlich 2,145 $\mu\text{g/ml}$.

Die Konzentrationen der Prostatapatienten sind am höchsten und betragen im Durchschnitt 3,77 µg/ml. Es ist davon auszugehen, dass diese hohen Konzentrationen hier durch Bicalutamid verursacht werden.

Aufgrund der geringen Patientenanzahl in der Bronchial- und Prostatakarzinomgruppe und der nicht einheitlichen Medikation lässt sich bei diesem Vergleich keine Aussage darüber treffen, ob die Art des Tumors einen Einfluss auf die Kinetik von Docetaxel nimmt.



Lower 95% CI of mean	0,5116	0,6838	-1,948
Upper 95% CI of mean	1,533	3,606	9,488
Sum	16,36	4,290	7,540

Tabelle 35: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Mammakarzinom und Prostatakarzinom

Table Analyzed	Erkrankung
Column A	Mammakarzinom
vs	vs
Column C	Prostatakarzinom
Unpaired t test	
P value	0,0013
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.889 df=16
How big is the difference?	

Mean ± SEM of column A	1.023 ± 0.2397 N=16
Mean ± SEM of column C	3.770 ± 0.4500 N=2
Difference between means	-2.748 ± 0.7065
95% confidence interval	-4.245 to -1.250
R squared	0,486
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.270, 15, 1
P value	0,9661
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabelle 36: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Bronchialkarzinom und Prostatakarzinom

Table Analyzed	Erkrankung
Column B	Bronchialkarzinom
vs	vs
Column C	Prostatakarzinom
Unpaired t test	
P value	0,0729
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.499 df=2
How big is the difference?	
Mean ± SEM of	2.145 ± 0.1150

column B	N=2
Mean ± SEM of column C	3.770 ± 0.4500 N=2
Difference between means	-1.625 ± 0.4645
95% confidence interval	-3.624 to 0.3736
R squared	0,8596
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	15.31, 1, 1
P value	0,3186
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabelle 37: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Mammakarzinom und Bronchialkarzinom

Table Analyzed	Erkrankung	Mean ± SEM of column A	1.02 ± 0.240 N=16
Column A	Mammakarzinom	Mean ± SEM of column B	2.15 ± 0.115 N=2
vs	vs	Difference between means	-1.12 ± 0.697
Column B	Bronchialkarzinom	95% confidence interval	-2.60 to 0.355
		R squared	0,140
Unpaired t test			
P value	0,1268	F test to compare variances	
P value summary	ns	F,DFn, Dfd	34.8, 15, 1
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	P value	0,2648
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	P value summary	ns
t, df	t=1.61 df=16	Are variances significantly different?	No
How big is the difference?			

Docetaxelkonzentrationen 20 Minuten nach der Infusion (20 min)

20 Minuten nach der Infusion streuen die Docetaxelkonzentrationen wieder sehr stark. Pharmakokinetisch gesehen befindet sich der Wirkstoff hier in der zweiten Phase. Die Halbwertszeit beträgt 36 Minuten. Der Abbau sollte demnach bei allen Patienten annähernd gleich weit fortgeschritten sein.

Prozentuell betrachtet finden sich jedoch Werte zwischen 0 und 99,56% von der Ausgangskonzentration.

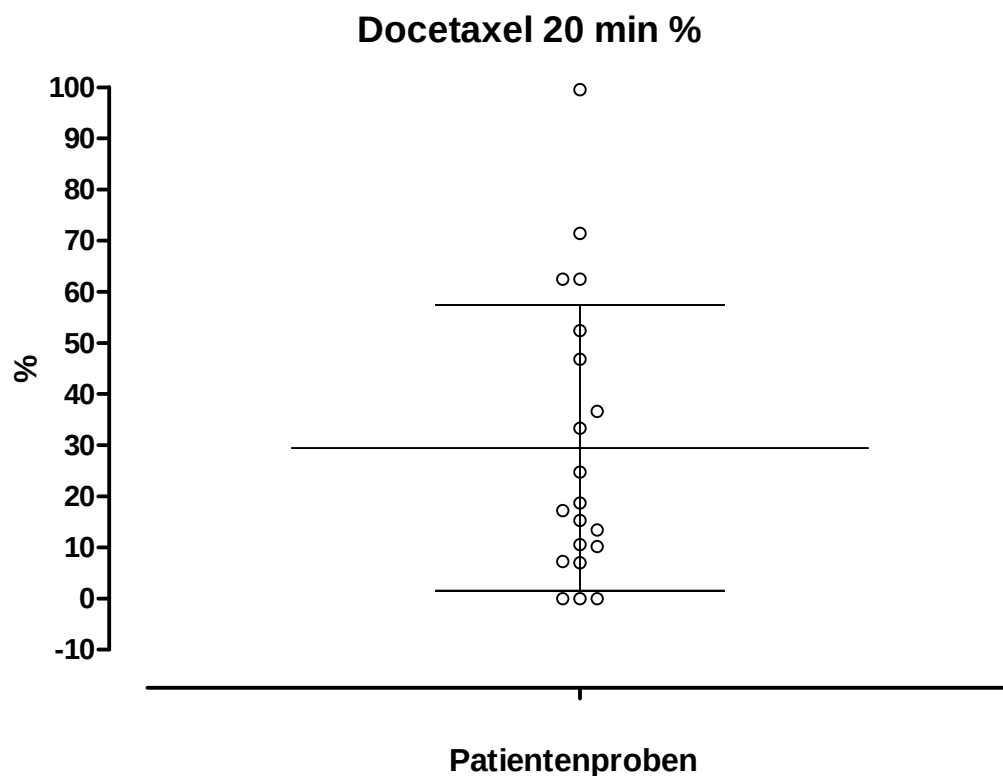


Abb. 23: Docetaxelkonzentration 20 Minuten nach der Infusion in Prozent bezogen auf die Konzentration unmittelbar nach der Infusion

Tabelle 38: Gegenüberstellung der Docetaxelkonzentration nach der Infusion sowie 20 Minuten später

Probe	post [µg/ml]	20 min [µg/ml]	%
1	0,15	0,05	33,33
2	0,14	0,10	71,43
3	1,57	0,27	17,20
4	0,14	0,00	0,00
5	0,32	0,20	62,50
6	0,50	0,00	0,00
7	0,04	0,00	0,00
8	0,41	0,15	36,59
9	1,89	0,20	10,58
10	1,79	0,24	13,41
11	3,32	1,74	52,41
12	3,32	0,82	24,70
13	4,22	0,79	18,72
14	2,03	0,95	46,80
15	2,26	2,25	99,56
16	2,28	0,16	7,02
17	0,98	0,10	10,19
18	1,52	0,23	15,27

19	1,07	0,08	7,23
20	0,24	0,15	62,50

Bezieht man wieder das unterschiedliche Therapieschema der Patienten in die Betrachtung mit ein, so ergeben sich im Mittel kaum Unterschiede beim Metabolismus von Docetaxel. Der Durchschnitt liegt in der Monotherapie-Gruppe bei 30,31%, in der Epirubicin-Gruppe bei 30,81% und in der Bicalutamid-Gruppe bei 35,75%. Die Herceptin-Gruppe wird wieder vernachlässigt, da bei diesem Patienten kein Docetaxel mehr nachgewiesen werden konnte.

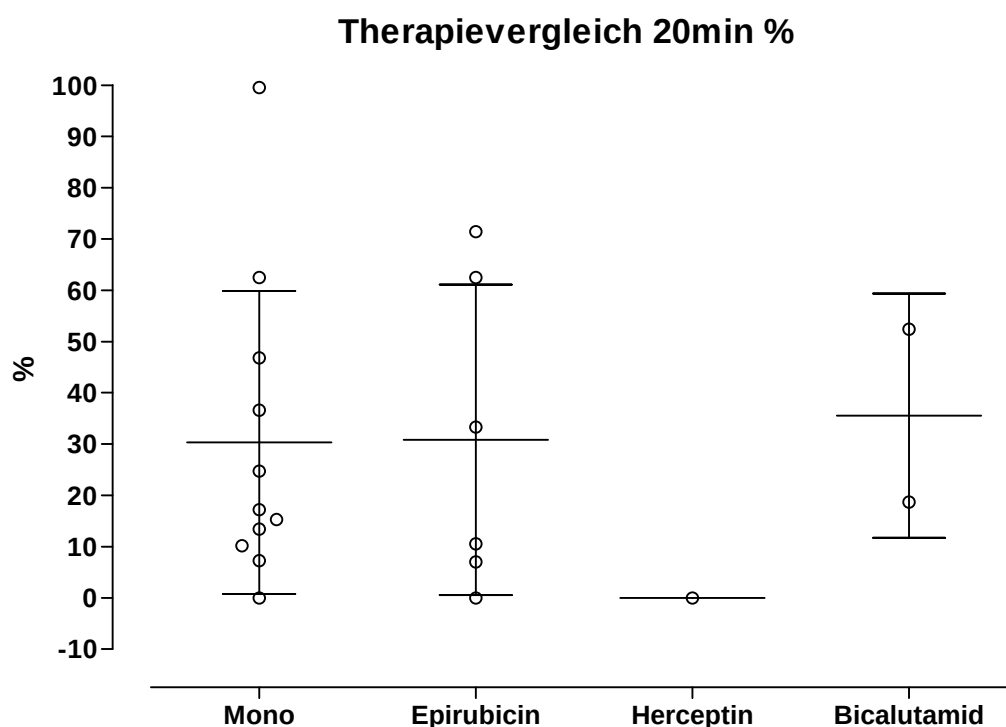


Abb. 24: Docetaxelkonzentration in den Plasmaproben der Patienten 20 Minuten nach der Therapie bei unterschiedlichem Therapieschema

Tabelle 39: Statistische Parameter der Docetaxelkonzentrationen im Plasma der Patienten 20 Minuten nach der Infusion bei unterschiedlicher Therapie

	Mono	Epirubicin	Herceptin	Bicalutamid
Number of values	11	6	1	2
Minimum	0,0	0,0	0,0	18,72
25% Percentile	10,19	5,265	0,0	18,72
Median	17,20	21,96	0,0	35,57

75% Percentile	46,80	64,73	0,0	52,41
Maximum	99,56	71,43	0,0	52,41
Mean	30,31	30,81	0,0	35,57
Std. Deviation	29,52	30,28	0,0	23,82
Std. Error	8,901	12,36	0,0	16,85
Lower 95% CI of mean	10,48	-0,9693	0,0000e+000	-178,5
Upper 95% CI of mean	50,15	62,59	0,0000e+000	249,6
Sum	333,5	184,9	0,0	71,13

Tabelle 40: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Monotherapie und Kombinationstherapie mit Epirubicin

Table Analyzed	Therapievergleich 20min %
Column A	Mono
vs	vs
Column B	Epirubicin
Unpaired t test	
P value	0,9742
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.0328 df=15

How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	30.3 ± 8.90 N=11
Mean ± SEM of column B	30.8 ± 12.4 N=6
Difference between means	-0.496 ± 15.1
95% confidence interval	-32.7 to 31.7
R squared	0,0000719
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.05, 5, 10
P value	0,8798
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabelle 41: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests der Kombinationstherapie mit Epirubicin und mit Bicalutamid

Table Analyzed	Therapievergleich 20min %
Column B	Epirubicin
vs	vs
Column D	Bicalutamid
Unpaired t test	
P value	0,8490
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.1987 df=6
How big is the difference?	

Mean ± SEM of column B	30.81 ± 12.36 N=6
Mean ± SEM of column D	35.57 ± 16.85 N=2
Difference between means	-4.755 ± 23.93
95% confidence interval	-63.30 to 53.79
R squared	0,006539
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.616, 5, 1
P value	1,0000
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabelle 42: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von Monotherapie und Kombinationstherapie mit Bicalutamid

Table Analyzed	Therapievergleich	How big is the difference?	
Column A	20min %	Mean ± SEM of column A	30.31 ± 8.901 N=11
vs	Mono	Mean ± SEM of column D	35.57 ± 16.85 N=2
Column D	vs	Difference between means	-5.251 ± 22.33
	Bicalutamid	95% confidence interval	-54.40 to 43.90
Unpaired t test		R squared	0,005003
P value	0,8184		
P value summary	ns	F test to compare variances	
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	F,DFn, Dfd	1.536, 10, 1
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	P value	1,0000
t, df	t=0.2352 df=11	P value summary	ns
		Are variances significantly different?	No

Diese starken Unterschiede beim Abbau von Docetaxel lassen sich darauf zurückführen, dass der Metabolismus von Arzneistoffen starken Schwankungen unterliegt. Alter und Geschlecht spielen eine Rolle und wurden in der Betrachtung nicht berücksichtigt.

Docetaxelkonzentrationen im Urin der Patienten

In den Urinproben konnte am meisten Docetaxel nachgewiesen werden. Die niedrigste Konzentration beträgt 2,65 µg/ml, die höchste 37,65 µg/ml. Der Durchschnitt liegt bei 13,03 µg/ml.

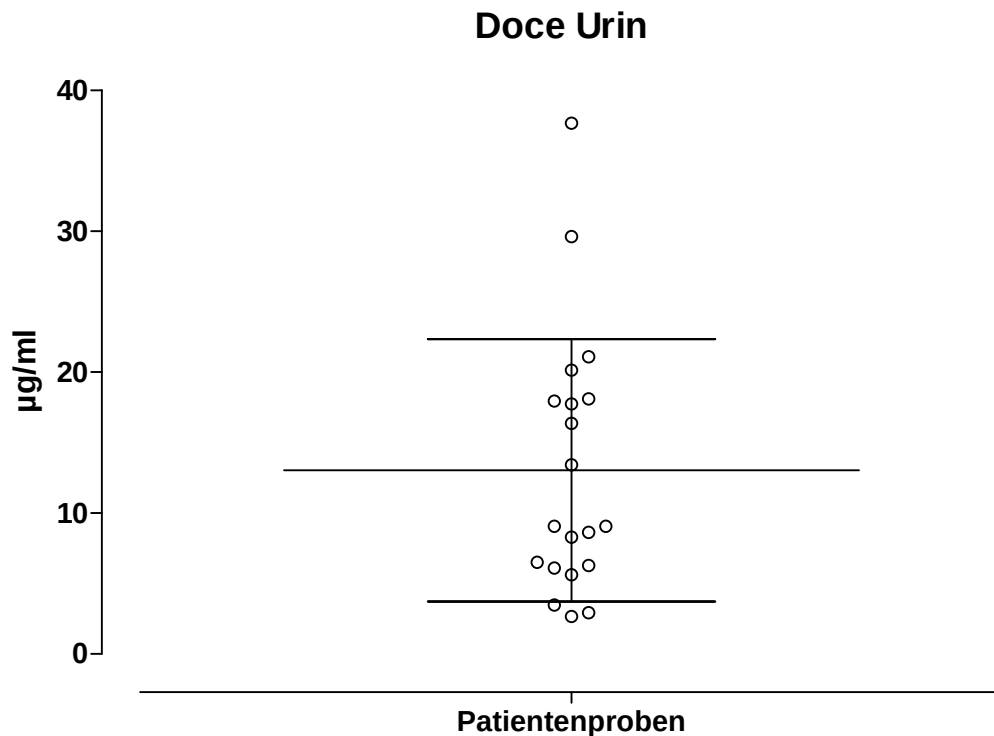


Abb. 25: Docetaxelkonzentrationen in den Urinproben der Patienten

Tabelle 43: Statistische Parameter der Docetaxelkonzentration im Urin der Patienten

Number of values	20
Minimum	2,650
25% Percentile	6,135
Median	9,050
75% Percentile	18,05
Maximum	37,65

Mean	13,03
Std. Deviation	9,307
Std. Error	2,081
Lower 95% CI of mean	8,671
Upper 95% CI of mean	17,38
Sum	260,5

Stellt man die gemessene Konzentration wieder der verabreichten Dosis gegenüber und führt eine lineare Regressionsanalyse durch, so erkennt man, dass die Konzentration im Urin bei höherer Dosis zunimmt. Der Korrelationskoeffizient beträgt allerdings 0,44, der Konfidenzintervall (95%) ist wieder sehr breit.

Tabelle 44: Gegenüberstellung der gemessenen Docetaxelkonzentration im Urin der Patienten, der verabreichten Dosis und der berechneten Prozent

Probe	verabreichte Dosis [mg]	gemessene Konzentration [µg/ml]	%
11	119,00	9,05	7,61
12	56,00	18,09	32,30
13	70,00	9,05	12,93
14	57,75	6,09	10,55
15	140,80	2,65	1,88
16	135,00	17,94	13,29
17	160,00	3,48	2,18
18	180,00	21,09	11,72
19	180,00	29,61	16,45
20	50,00	2,92	5,84

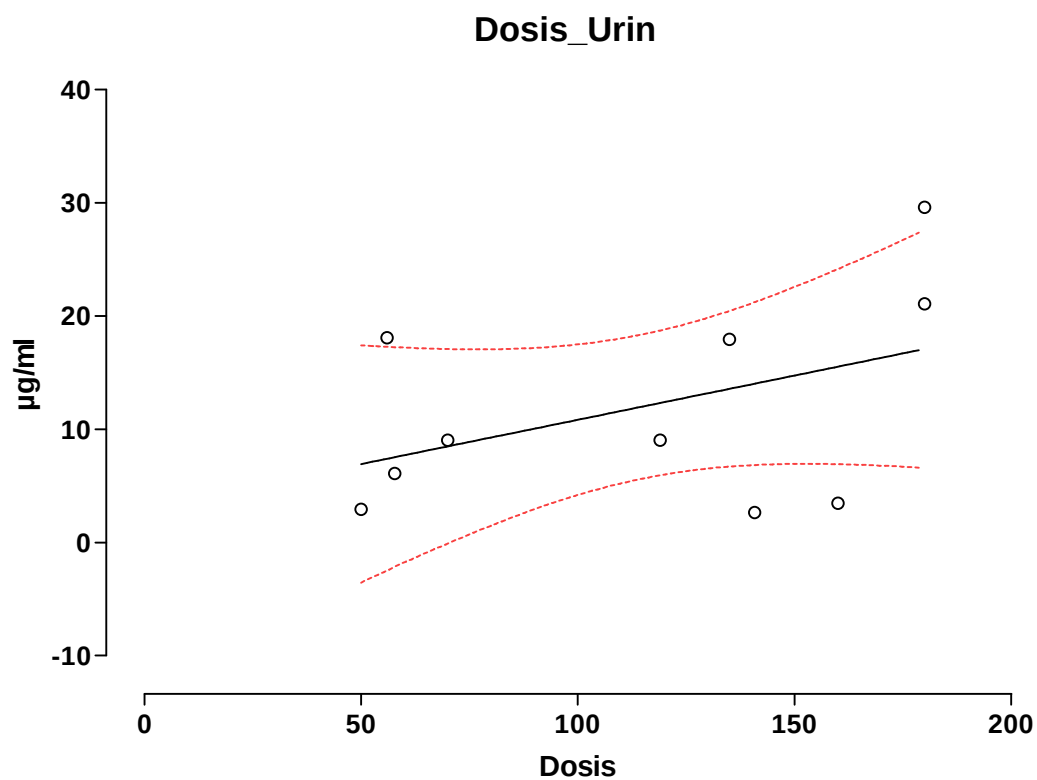


Abb. 26: Lineare Regression der verabreichten Dosis mit der Docetaxelkonzentration im Urin

Tabelle 45: Statistische Parameter der linearen Regressionsanalyse der verabreichten Dosis mit der Konzentration im Urin

Best-fit values	
Slope	0.07815 ± 0.05571
Y-intercept when X=0.0	3.021 ± 6.969
X-intercept when Y=0.0	-38,65
1/slope	12,80
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.05031 to 0.2066
Y-intercept when X=0.0	-13.05 to 19.09
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 70.58
Goodness of Fit	
r ²	0,1975

Sy.x	8,731
Is slope significantly non-zero?	
F	1,968
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,1982
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

Nun wird wieder die Infusionsrate in die Betrachtung miteinbezogen und weiters die verabreichte Dosis und die Infusionsrate durchs Körpergewicht dividiert und ebenfalls der gemessenen Konzentration gegenübergestellt.

Führt man eine lineare Regressionsanalyse durch, so erkennt man auch hier bei allen drei Betrachtungen, dass bei steigender Dosis die Ausscheidung von Docetaxel ebenfalls steigt. Die Korrelationskoeffizienten sind sehr niedrig (0,36, 0,05 und 0,35) und die Konfidenzintervalle (95%) sehr breit.

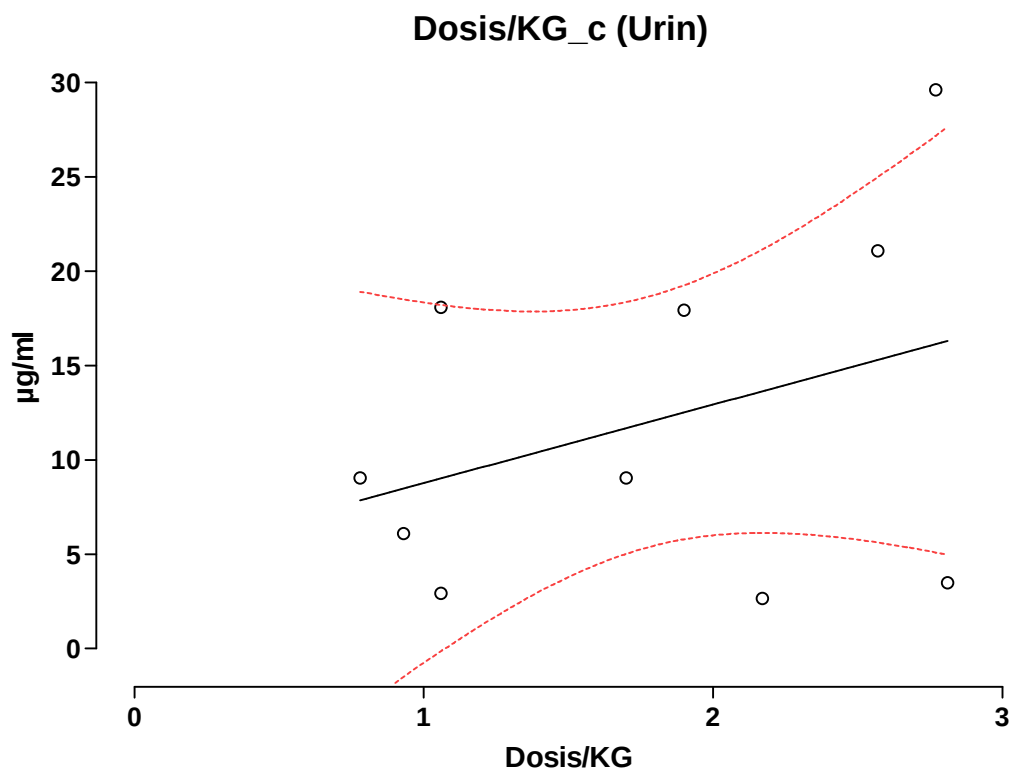


Abb. 27: Lineare Regression der verabreichten Dosis dividiert durchs Körpergewicht mit der Docetaxelkonzentration im Urin

Tabelle 46: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von Dosis/Körpergewicht mit der Konzentration im Urin

Best-fit values	
Slope	4.157 ± 3.848
Y-intercept when X=0.0	4.618 ± 7.413
X-intercept when Y=0.0	-1,111
1/slope	0,2405
95% Confidence Intervals	
Slope	-4.717 to 13.03
Y-intercept when X=0.0	-12.48 to 21.71
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 1.076
Goodness of Fit	
r ²	0,1273

Sy.x	9,105
Is slope significantly non-zero?	
F	1,167
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,3115
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

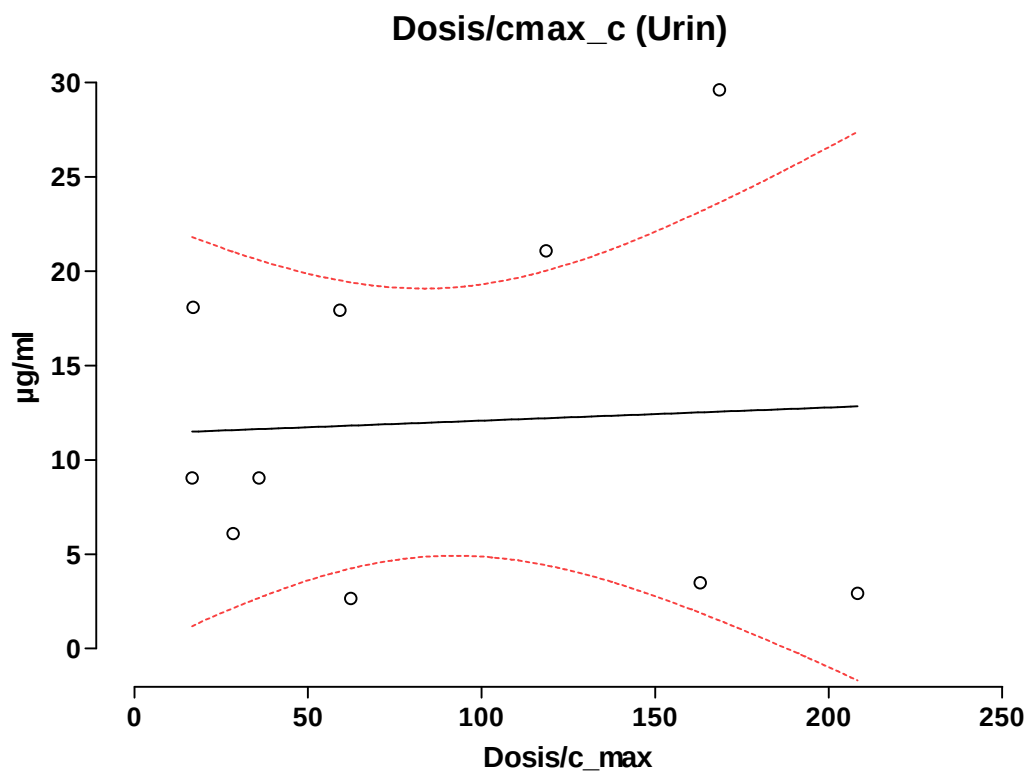


Abb. 28: Lineare Regression von der Dosis dividiert durch die Konzentration mit der Konzentration im Urin

Tabelle 47: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von Dosis/Konzentration mit der Konzentration im Urin

Best-fit values	
Slope	0.006975 ± 0.04566
Y-intercept when $X=0.0$	11.38 ± 5.053
X-intercept when $Y=0.0$	-1632
1/slope	143,4
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.09832 to 0.1123
Y-intercept when $X=0.0$	-0.2664 to 23.04
X-intercept when $Y=0.0$	-infinity to 2.961
Goodness of Fit	
r^2	0,002908
Sy.x	9,732

Is slope significantly non-zero?	
F	0,02333
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,8824
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

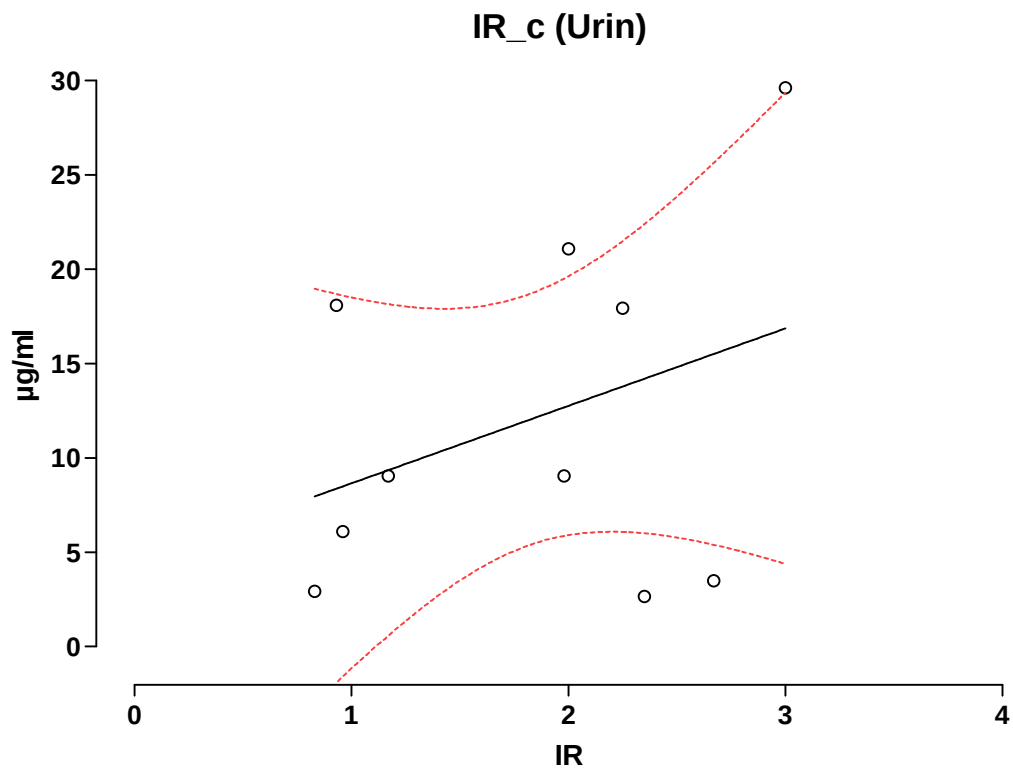


Abb. 29: Lineare Regression der Infusionsrate mit der Konzentration im Urin

Tabelle 48: Statistische Parameter der Regressionsanalyse der Infusionsrate mit der Konzentration im Urin

Best-fit values	
Slope	4.104 ± 3.865
Y-intercept when X=0.0	4.552 ± 7.582
X-intercept when Y=0.0	-1,109
1/slope	0,2437
95% Confidence Intervals	
Slope	-4.809 to 13.02
Y-intercept when X=0.0	-12.93 to 22.04
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 1.114
Goodness of Fit	
r ²	0,1235
Sy.x	9,124

Is slope significantly non-zero?	
F	1,127
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,3193
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

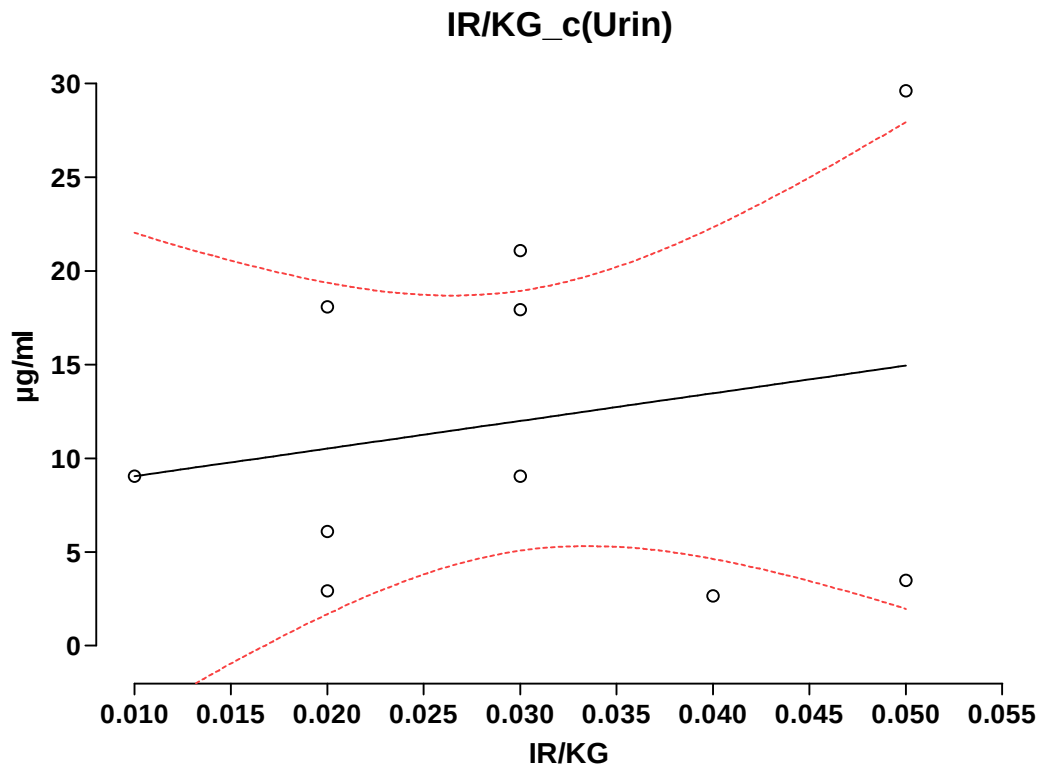


Abb. 30: Lineare Regression der Infusionsrate dividiert durchs Körpergewicht mit der Konzentration im Urin

Tabelle 49: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von IR/Körpergewicht mit der Konzentration im Urin

Best-fit values	
Slope	147.7 ± 238.0
Y-intercept when X=0.0	7.566 ± 7.749
X-intercept when Y=0.0	-0,05123
1/slope	0,006771
95% Confidence Intervals	
Slope	-401.1 to 696.5
Y-intercept when X=0.0	-10.30 to 25.43
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 0.01677
Goodness of Fit	
r ²	0,04592
Sy.x	9,520

Is slope significantly non-zero?	
F	0,3851
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	0,5522
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

Berechnet man nun die Prozentwerte bezogen auf die verabreichte Dosis, erhält man ebenfalls Werte zwischen ungefähr 2% und 30%. Laut Literatur beträgt die Ausscheidung von Docetaxel im Urin ungefähr 6%. [13, 15]

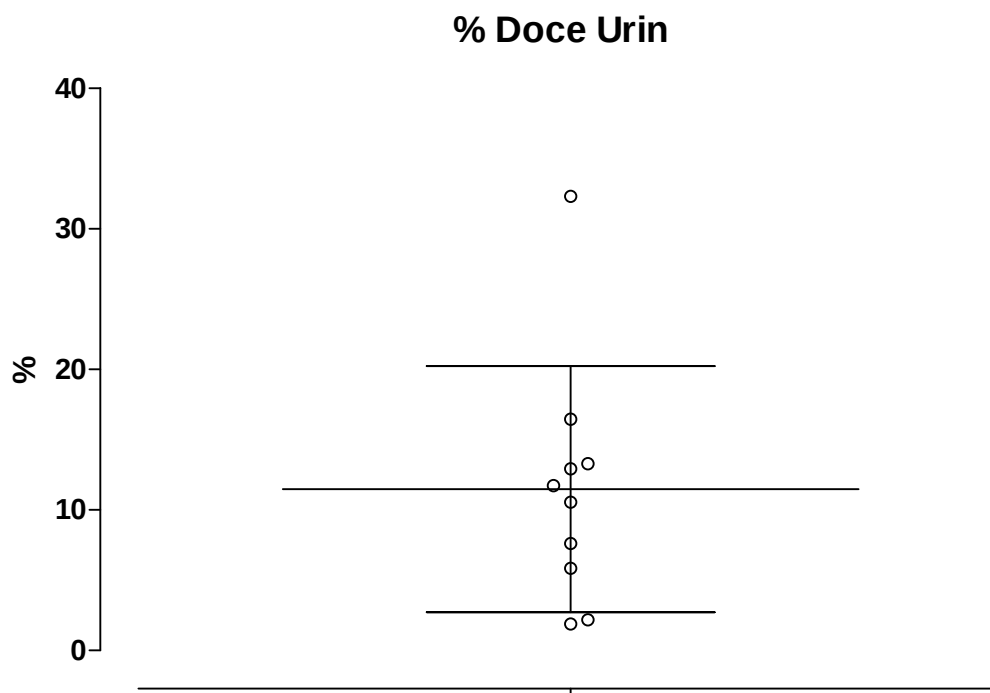


Abb. 31: Docetaxelkonzentration in Prozent bezogen auf die verabreichte Dosis im Urin der Patienten

Tabelle 50: Statistische Parameter der Prozentwerte von Docetaxel im Urin bezogen auf die verabreichte Dosis

Number of values	10
Minimum	1,880
25% Percentile	4,925
Median	11,14
75% Percentile	14,08
Maximum	32,30

Mean	11,48
Std. Deviation	8,755
Std. Error	2,769
Lower 95% CI of mean	5,212
Upper 95% CI of mean	17,74
Sum	114,8

Diese großen Unterschiede bei der Ausscheidung von Docetaxel können einerseits auf individuelle Schwankungen im Metabolismus zurückgeführt werden, andererseits ist das Urinvolumen der einzelnen Patienten nicht bekannt. Die tatsächliche Gesamtkonzentration konnte daher nicht berechnet werden.

Stellt man die Prozentwerte bezogen auf die Dosis von Urin und Plasma (unmittelbar nach der Infusion) gegenüber, so erkennt man auch hier keinen Zusammenhang. Die Differenzen liegen zwischen 0,27% und 26,37%.

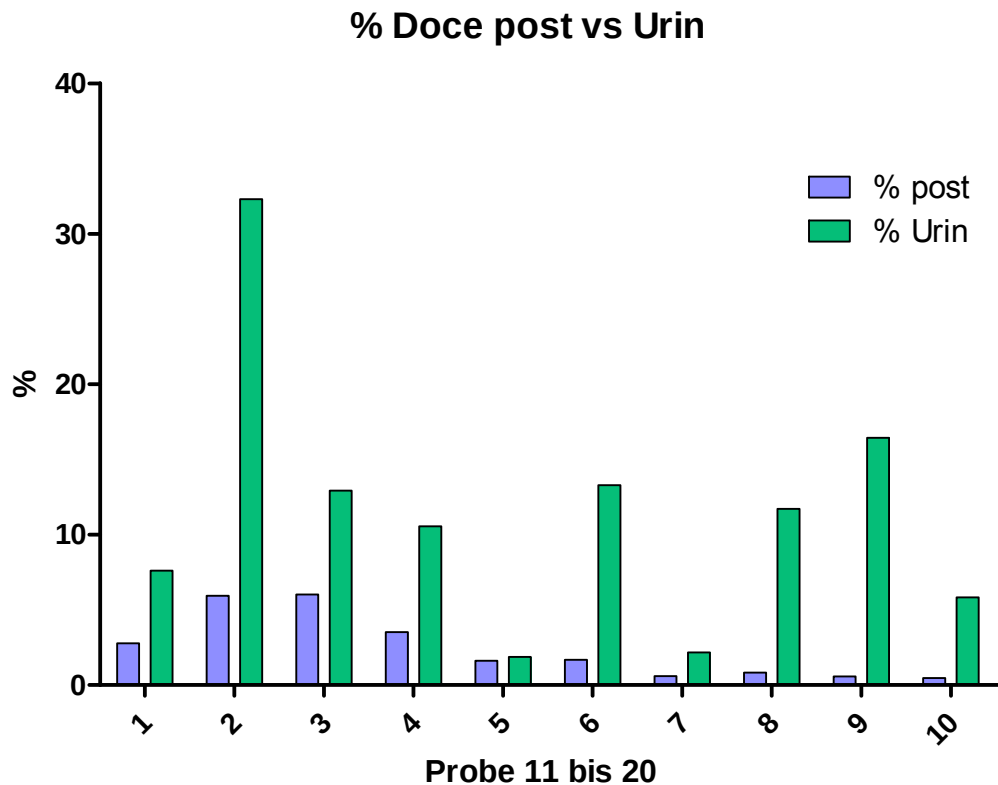


Abb. 32: Gegenüberstellung der Prozentwerte von Docetaxel im Plasma und im Urin einzelner Patienten

4.1.3 In vivo-Untersuchungen-Epidocetaxel

Tabelle 51: Konzentration und Prozent von Epidocetaxel in den Patientenproben

Nr.	post		nach 20min		Urin	
	Epi [µg/ml]	% Epi	Epi [µg/ml]	% Epi	Epi [µg/ml]	% Epi
1	0,00	0	0,00	0	0,00	0,0
2	0,00	0	0,00	0	0,00	0,0
3	0,00	0	0,00	0	0,24	1,0
4	0,00	0	0,00	0	0,00	0,0
5	0,00	0	0,00	0	0,00	0,0
6	0,23	32	0,00	0	0,37	4,0
7	0,29	0	0,00	0	0,00	0,0
8	0,20	33	0,00	0	0,00	0,0
9	0,00	0	0,00	0	0,14	0,7
10	0,00	0	0,00	0	0,40	1,1

11	0,25	7	0,00	0	0,00	0,0
12	0,50	13	0,11	12	0,37	2,0
13	0,61	13	0,10	11	0,05	0,6
14	0,41	17	0,27	22	0,09	1,5
15	0,69	23	0,08	3	0,00	0,0
16	0,49	18	0,08	33	0,00	0,0
17	0,42	30	0,08	44	0,00	0,0
18	0,25	14	0,09	28	0,00	0,0
19	0,30	22	0,05	39	0,00	0,0
20	0,00	0	0,00	0	0,00	0,0

Epidocetaxelkonzentrationen unmittelbar nach der Infusion

Epidocetaxel konnte unmittelbar nach der Infusion in den Plasmaproben von zwölf Patienten nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration zu diesem Zeitpunkt beträgt 0,69 µg/ml (23,39% bezogen auf die Docetaxelkonzentration). Prozentuell betrachtet liegen die Werte zwischen 7% und 33% der Docetaxelkonzentration.

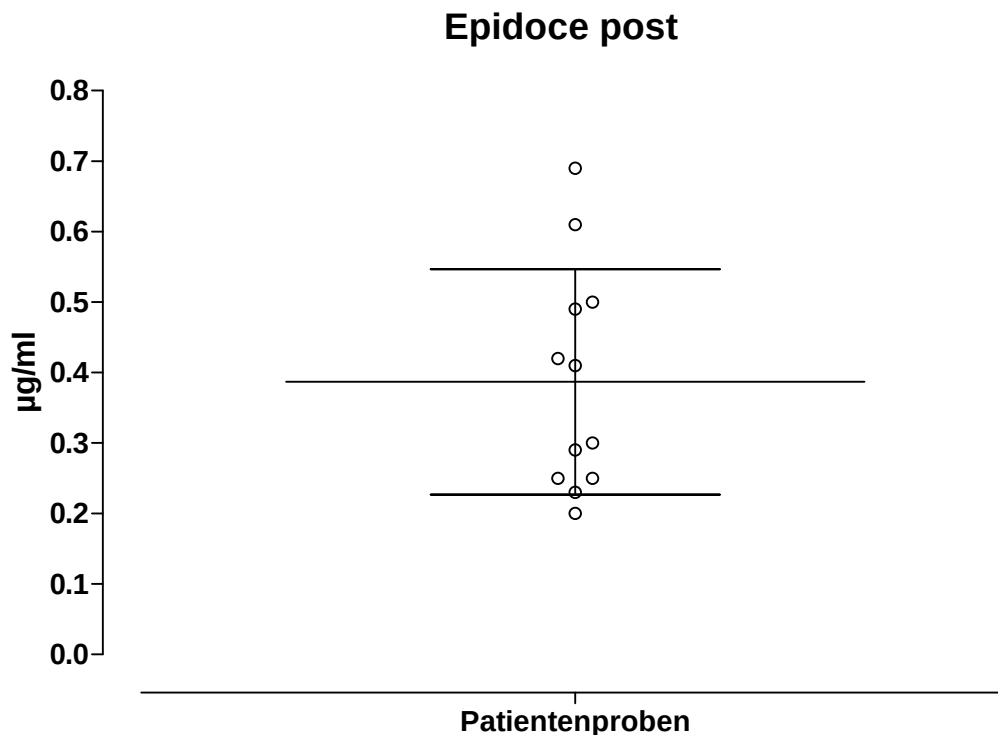


Abb. 33: Epidocetaxelkonzentration in den Plasmaproben der Patienten unmittelbar nach der Infusion

Tabelle 52: Statistische Parameter der Epidocetaxelkonzentrationen in den Plasmaproben der Patienten unmittelbar nach der Infusion

Number of values	12
Minimum	0,2000
25% Percentile	0,2500
Median	0,3550
75% Percentile	0,4975
Maximum	0,6900

Mean	0,3867
Std. Deviation	0,1597
Std. Error	0,04611
Lower 95% CI of mean	0,2852
Upper 95% CI of mean	0,4882
Sum	4,640

Epidocetaxelkonzentrationen 20 Minuten nach der Infusion

20 Minuten nach der Infusion konnte Epidocetaxel nur noch in acht der zwölf Proben nachgewiesen werden. Die Konzentrationen liegen zwischen 0,05 µg/ml und 0,27 µg/ml. In allen zwölf Proben nimmt die Konzentration von Epidocetaxel ab, bezogen auf die Docetaxelkonzentration erhöht sie sich jedoch bei fünf Patienten. Die prozentuellen Werte liegen zwischen 3,43% und 44,44% der Docetaxelkonzentration.

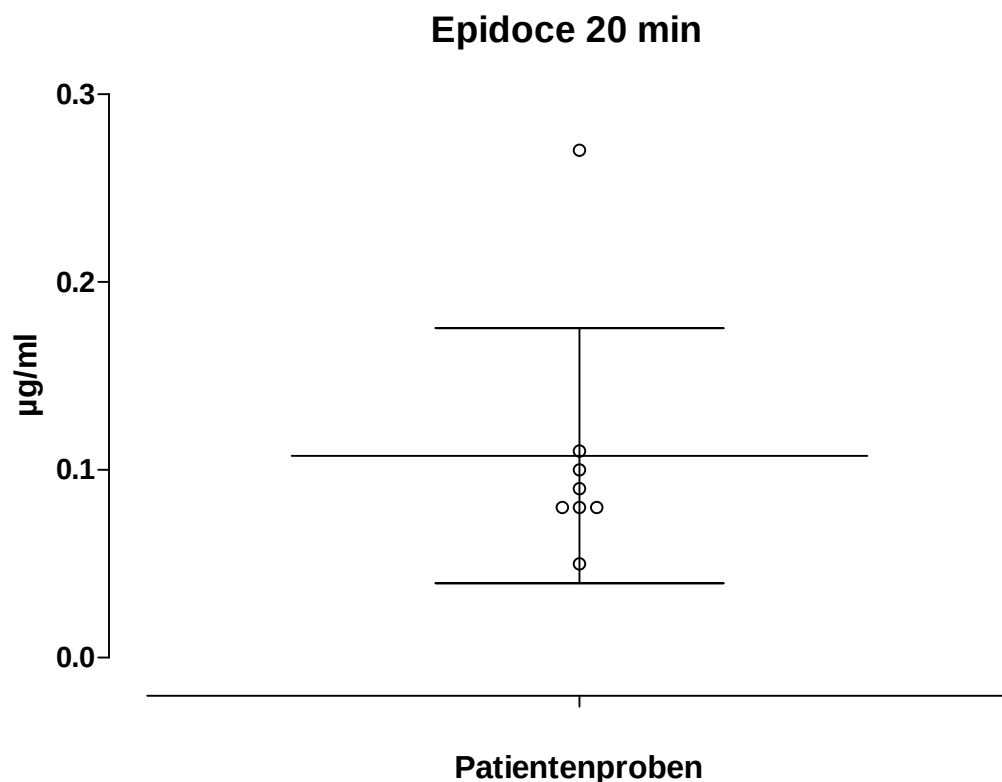


Abb. 34: Epidocetaxelkonzentration in den Plasmaproben der Patienten 20 Minuten nach der Infusion

Tabelle 53: Statistische Parameter der Epidocetaxelkonzentrationen in den Plasmaproben der Patienten 20 Minuten nach der Infusion

Number of values	8
Minimum	0,0500
25% Percentile	0,0800
Median	0,0850
75% Percentile	0,1075
Maximum	0,2700

Mean	0,1075
Std. Deviation	0,06798
Std. Error	0,02403
Lower 95% CI of mean	0,05067
Upper 95% CI of mean	0,1643
Sum	0,8600

Epidocetaxelkonzentrationen im Urin der Patienten

Im Urin lässt sich Epidocetaxel nur in sieben Proben nachweisen. Die Konzentrationen betragen zwischen 0,05 µg/ml (0,55%) und 0,4 µg/ml (1,05%). Prozentuell betrachtet beträgt der höchste Wert 4,27%.

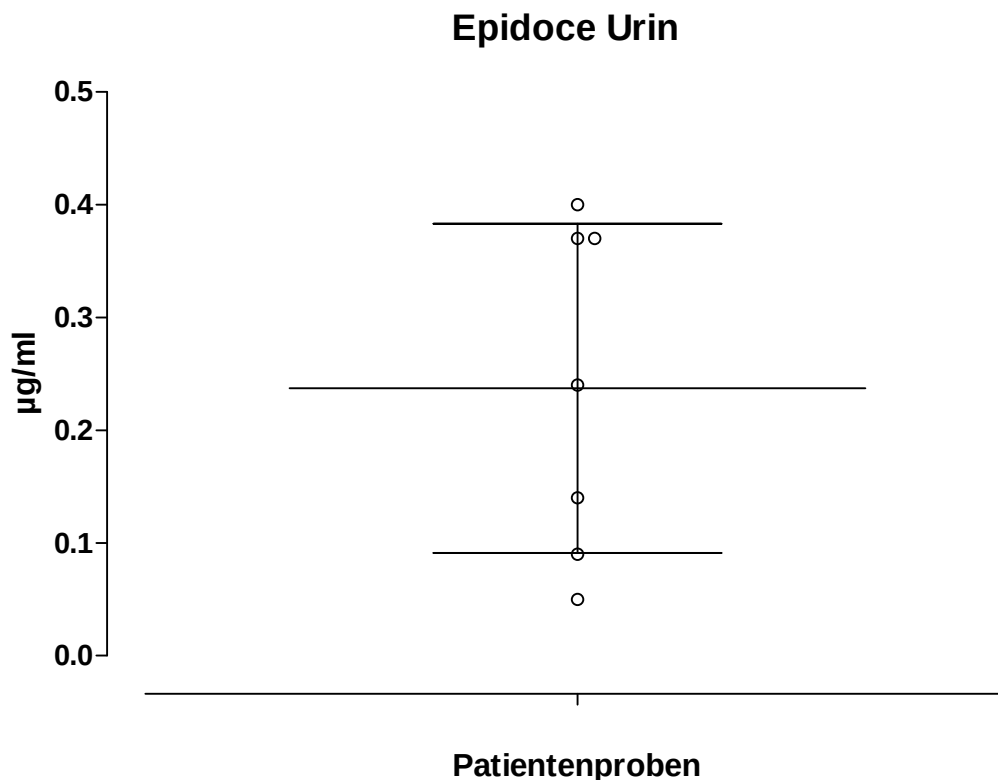


Abb. 35: Epidocetaxelkonzentration im Urin der Patienten

Tabelle 54: Statistische Parameter der Epidocetaxelkonzentrationen in den Urinproben der Patienten

Number of values	7
Minimum	0,0500
25% Percentile	0,0900
Median	0,2400
75% Percentile	0,3700
Maximum	0,4000

Mean	0,2371
Std. Deviation	0,1460
Std. Error	0,05519
Lower 95% CI of mean	0,1021
Upper 95% CI of mean	0,3722
Sum	1,660

4.2 Messung des oxidativen Stresses

4.2.1 In vitro Messung

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um eine mögliche Änderung des oxidativen Stresses durch die Zugabe von Docetaxel zu einer Probe zu beurteilen. Dazu wurde zunächst der FORT-Wert von Precinorm ermittelt (0h). Anschließend wurde Precinorm mit unterschiedlichen Docetaxel-Konzentrationen inkubiert (3 und 5 µg

Docetaxel / ml Precinorm). Durch die Messung des oxidativen Stresses in verschiedenen zeitlichen Abständen (nach 1, 2, 3 und 24 Stunden) konnte zusätzlich ermittelt werden, ob sich der FORT-Wert durch die Lagerung der Probe bei Raumtemperatur ändert.

Tabelle 55: FORT-Werte von Precinorm und Docetaxel in Precinorm gemessen in verschiedenen zeitlichen Abständen

Zeit [h]	Precinorm	3µg/ml Doce	5µg/ml Doce
0	418		
1		395	395
2		386	409
3		386	413
24		404	422

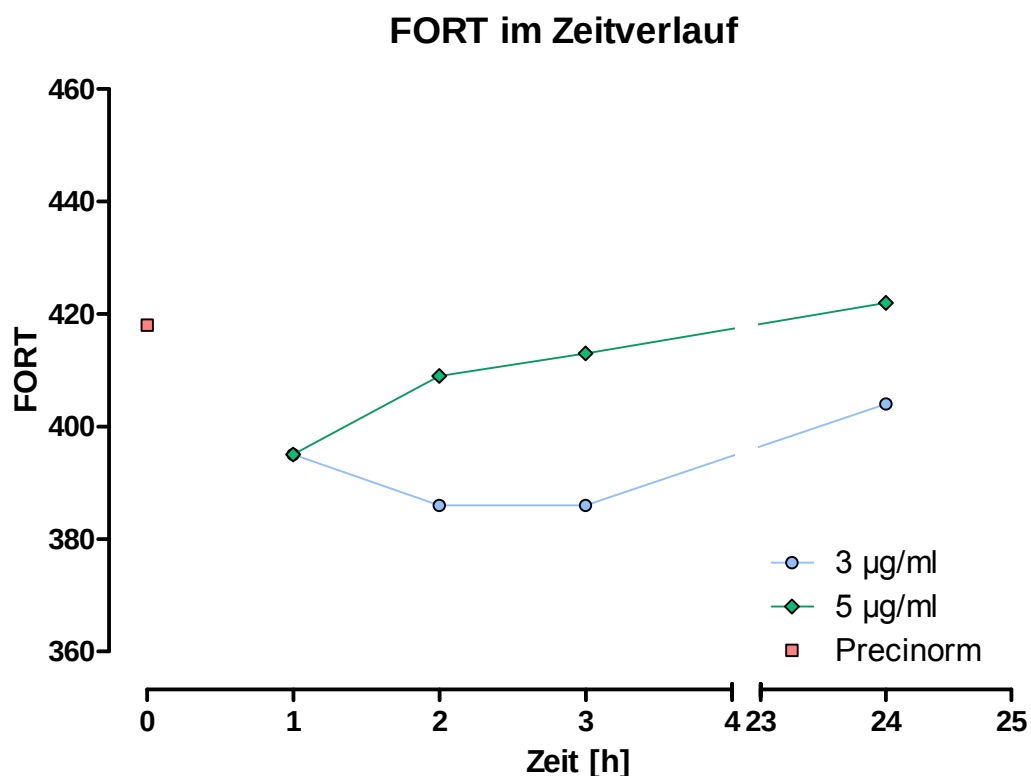


Abb. 36: FORT-Werte in vitro im Zeitverlauf

Der oxidative Stress von Precinorm ohne Docetaxel beträgt 418 FORT. Die Werte von Precinorm mit Docetaxel liegen knapp darunter und steigen im zeitlichen Verlauf leicht an. Die Werte der höher konzentrierten Stammlösung steigen schneller an als die der niedriger konzentrierten Stammlösung. Erst nach 24 Stunden wird bei der Stammlösung mit 5 µg/ml ein Wert erreicht, der knapp über den Wert von Precinorm

liegt (422 FORT). Die Unterschiede der ermittelten FORT-Werte sind insgesamt so gering, dass man davon ausgehen kann, dass weder die Zugabe von Docetaxel, noch die Lagerung über 24 Stunden bei Raumtemperatur eine nennenswerte Änderung der FORT-Werte einer Probe verursacht.

4.2.2 In vivo Messungen

Durch die Ermittlung der FORT-Werte der Patientenproben sollte festgestellt werden, ob eine Chemotherapie mit Docetaxel den oxidativen Stress der Patienten beeinflusst. Gemessen wurden die FORT-Werte von Plasmaproben der Patienten vor der Chemotherapie, unmittelbar nach der Infusion von Docetaxel und 20 Minuten nach der Infusion. Durch den Vergleich der FORT-Werte der einzelnen Patienten konnte festgestellt werden, inwieweit sich der oxidative Stress im Verlauf der Therapie ändert. Die Daten sind unvollständig, da einige Proben fehlten oder nicht in ausreichender Menge vorhanden waren.

Die Werte der Patienten liegen im Allgemeinen über 600 FORT, also über der Nachweisgrenze des Testgerätes. Die Proben wurden daher mit bidestilliertem Wasser 1:2 bzw. 1:3 verdünnt und die gemessenen FORT-Werte anschließend mit 3 bzw. 4 multipliziert. Laut Literatur stimmen diese berechneten Ergebnisse im Groben mit den Ergebnissen der unverdünnten Proben überein. [26]

Da es sich bei den Patientenproben um Blutplasma handelt, sind die FORT-Werte höher als sie es im Vollblut wären. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Plasma nicht durch zelluläre Bestandteile verdünnt wird. Die berechneten FORT-Werte wurden daher durch den Faktor 1,25 dividiert. Dieser Faktor ist in der Literatur als Faktor Plasma zu Vollblut beschrieben. [26]

Tabelle 56: Berechnete FORT-Werte der Patienten vor der Docetaxeltherapie, nach der Infusion und 20 Minuten nach der Infusion, teilweise doppelt bestimmt (x=keine Messung)

Probe	Vor Therapie	Post 1. Messung	post 2. Messung	20min 1. Messung	20min 2. Messung
1	x	646	646	675	675
2	x	630	601	630	646
3	x	574	516	524	516
4	x	574	545	x	x

5	x	517	510	496	488
11	969	1099	x	1033	976
12	747	718	x	704	688
13	747	675	x	745	704
14	755	755	x	716	688
15	657	494	x	x	x
16	683	617	x	640	x
17	689	660	x	588	x
18	553	516	x	539	x
19	401	352	x	401	x
20	329	257	x	292	x

Die Patienten haben zum gleichen Zeitpunkt der Therapie sehr unterschiedliche FORT-Werte, es wird daher für jeden Zeitpunkt der Therapie ein Ausreißertest nach Grubbs durchgeführt. In den Graphiken werden jeweils die FORT-Werte mit und ohne ermittelten Ausreißer dargestellt.

Vor der Therapie konnte der Stresswert von zehn Patienten bestimmt werden. Neun Patienten davon leiden an starkem oxidativen Stress, die FORT-Werte liegen zwischen 401 FORT und 969 FORT, der Durchschnitt dieser neun Patienten liegt bei 689 FORT. Diese hohen Werte sind bei Krebspatienten vorhersehbar. Der FORT-Wert von einem Patienten beträgt 329 FORT. Dieser Wert spricht zwar für oxidativen Stress, ist aber den Umständen entsprechend niedrig. Laut Ausreißertest nach Grubbs ist dieser Wert kein signifikanter Ausreißer.

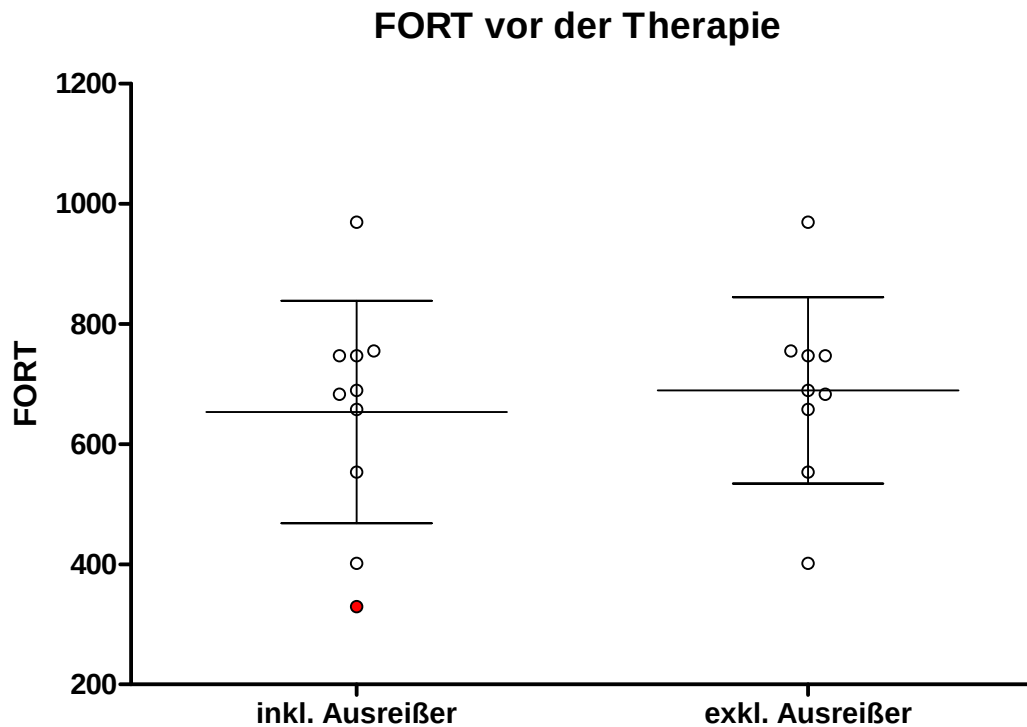


Abb. 37: FORT-Werte der Patientenproben vor der Therapie; Gegenüberstellung mit und ohne Ausreißer

Tabelle 57: Statistische Daten der FORT-Werte der Patienten vor der Therapie

	inkl. Ausreißer	exkl. Ausreißer
Number of values	10	9
Minimum	329,6	401,6
25% Percentile	515,6	605,6
Median	686,4	689,6
75% Percentile	749,2	751,2
Maximum	969,6	969,6
Mean	653,4	689,4
Std. Deviation	185,1	154,9
Std. Error	58,53	51,62
Lower 95% CI of mean	521,0	570,4
Upper 95% CI of mean	785,9	808,5
Sum	6534	6205

Tabelle 58: Statistische Parameter des Ausreißertests nach Grubbs für die FORT-Werte der Patienten vor der Therapie

Descriptive Statistics: FORT vor Therapie		# of values:		10
Mean:	653.440	Outlier detected?	No	
SD:	185.103	Significance level:	0.05 (two-sided)	

Critical value of Z:	2.29
----------------------	------

Row	Value	Z	Significant Outlier?
1	969.6	1.708	
2	747.2	0.507	
3	747.2	0.507	
4	755.2	0.550	
5	657.6	0.022	
6	683.2	0.161	
7	689.6	0.195	
8	553.6	0.539	
9	401.6	1.361	
10	329.6	1.750	Furthest from the rest, but not a significant outlier ($P > 0.05$).

Nach der Docetaxelinfusion liegen die FORT-Werte zwischen 257 FORT und 1099 FORT, wobei es sich beim höchsten Wert um einen signifikanten Ausreißer handelt.

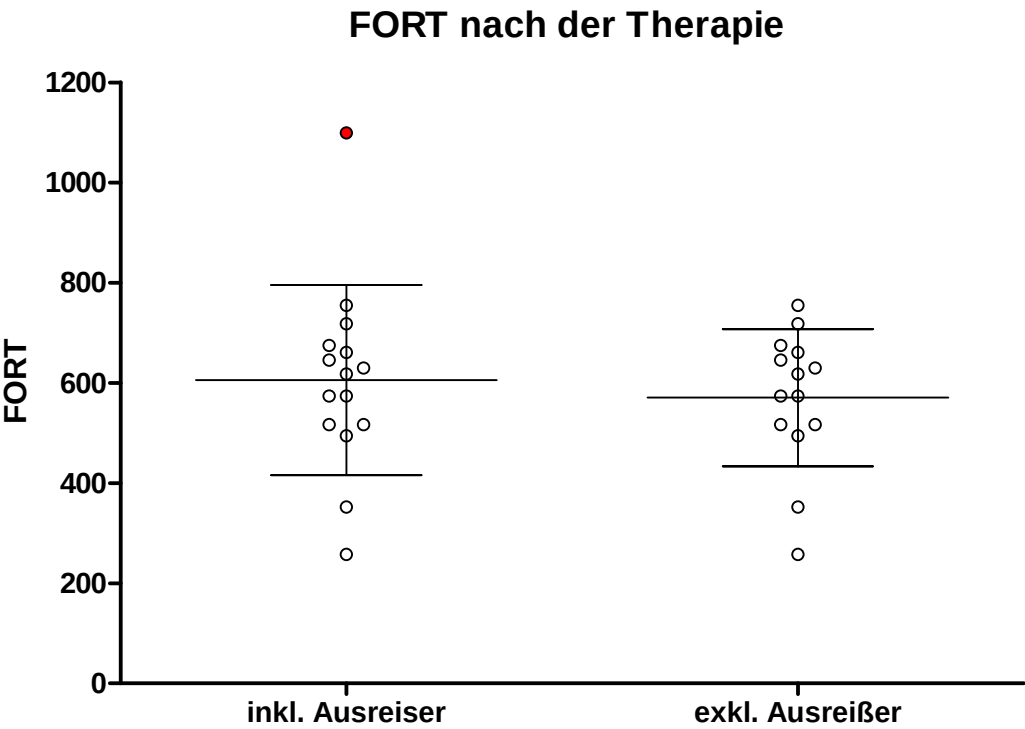


Abb. 38: FORT-Werte der Patientenproben unmittelbar nach der Infusion;
Gegenüberstellung mit und ohne Ausreißer

Tabelle 59: Statistische Parameter der FORT-Werte der Patienten unmittelbar
nach der Docetaxelinfusion

	inkl. Ausreißer	exkl. Ausreißer
Number of values	15	14

Minimum	257,6	257,6
25% Percentile	516,8	511,2
Median	617,6	595,8
75% Percentile	675,2	664,4
Maximum	1099	755,2
Mean	605,9	570,6
Std. Deviation	189,8	136,9
Std. Error	49,02	36,60
Lower 95% CI of mean	500,8	491,6
Upper 95% CI of mean	711,0	649,7
Sum	9088	7989

Tabelle 60: Statistische Parameter des Ausreißertests nach Grubbs für die FORT-Werte der Patienten unmittelbar nach der Docetaxelinfusion

Descriptive Statistics: FORT post		Row	Value	Z	Significant Outlier?
Mean:	605.880	1	646.0	0.211	
SD:	189.835	2	630.0	0.127	
# of values:	15	3	574.0	0.168	
Outlier detected?	Yes	4	574.0	0.168	
Significance level:	0.05 (two-sided)	5	517.0	0.468	
Critical value of Z:	2.54830838584	6	1099.2	2.599	
			Significant outlier. P < 0.05		
		7	718.4	0.593	
		8	675.2	0.365	
		9	755.2	0.787	
		10	494.4	0.587	
		11	617.6	0.062	
		12	660.8	0.289	
		13	516.8	0.469	
		14	352.0	1.337	
		15	257.6	1.835	

20 Minuten nach der Infusion liegen die Werte zwischen 292 FORT und 1033 FORT. Der Ausreißertest nach Grubbs bezeichnet den höchsten Wert als nicht signifikanten Ausreißer.

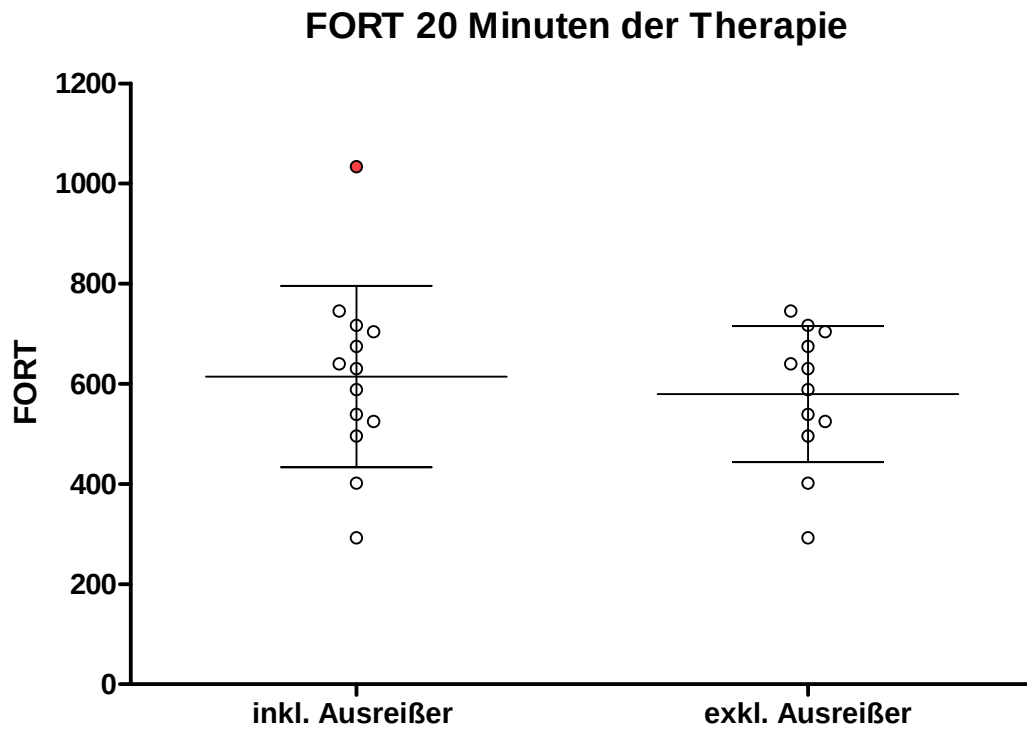


Abb. 39: FORT-Werte der Patientenproben 20 Minuten nach der Therapie;
Gegenüberstellung mit und ohne Ausreißer

Tabelle 61: Statistische Parameter der FORT-Werte 20 Minuten nach der Therapie

	inkl. Ausreißer	exkl. Ausreißer
Number of values	13	12
Minimum	292,8	292,8
25% Percentile	510,4	503,2
Median	630,4	609,6
75% Percentile	710,4	696,8
Maximum	1034	745,6
Mean	614,5	579,6
Std. Deviation	181,0	135,8
Std. Error	50,20	39,20
Lower 95% CI of mean	505,1	493,3
Upper 95% CI of mean	723,9	665,9
Sum	7989	6955

Tabelle 62: Statistische Parameter des Ausreißertests nach Grubbs für die FORT-Werte der Patienten 20 Minuten nach der Docetaxelinfusion

Descriptive Statistics: FORT 20 min		Row	Value	Z	Significant Outlier?
Mean:	614.523	1	675.2	0.335	
SD:	181.000	2	630.4	0.088	
# of values:	13	3	524.8	0.496	
Outlier detected?	No	4	496.0	0.655	
Significance level:	0.05 (two-sided)	5	1033.6	2.315	Furthest from the rest, but not a significant outlier ($P > 0.05$).
Critical value of Z:	2.46203329248	6	704.0	0.494	
		7	745.6	0.724	
		8	716.8	0.565	
		9	640.0	0.141	
		10	588.8	0.142	
		11	539.2	0.416	
		12	401.6	1.176	
		13	292.8	1.777	

Teilweise wurden die Proben doppelt vermessen. Der zweite Wert unterscheidet sich dabei bei keinem Patienten erheblich vom ersten Wert. Es sollen nun noch einmal alle FORT-Werte der Patienten inklusive Ausreißer und zweitem Messwert zu den drei Zeitpunkten der Therapie miteinander verglichen werden. Führt man einen ungepaarten t-Test durch, so unterscheiden sich die FORT-Werte im Mittel nicht signifikant voneinander. Die P-Werte sind in der Graphik angegeben. Der Mittelwert liegt vor der Therapie bei 653 FORT, nach der Infusion sinkt er auf 596 FORT, 20 Minuten später steigt er wieder auf 637 FORT. Die Unterschiede sind sehr gering und lassen darauf schließen, dass eine Therapie mit Docetaxel den oxidativen Stress nicht erhöht.

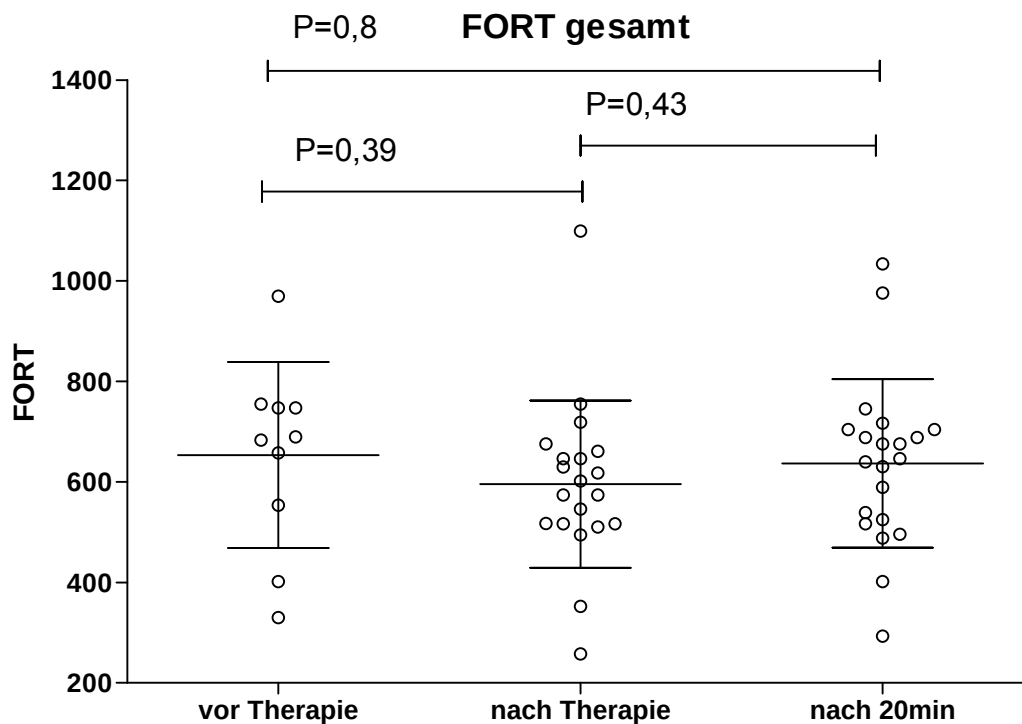


Abb. 40: Gegenüberstellung der FORT-Werte der Patientenproben im Therapieverlauf

Tabelle 63: Statistische Parameter der FORT-Werte der Patienten vor der Therapie, unmittelbar nach der Infusion sowie 20 Minuten nach der Infusion

	vor Therapie	nach Therapie	nach 20min
Number of values	10	20	21
Minimum	329,6	257,6	292,8
25% Percentile	515,6	516,8	520,8
Median	686,4	587,8	646,4
75% Percentile	749,2	657,2	704,0
Maximum	969,6	1099	1034
Mean	653,4	595,5	636,7
Std. Deviation	185,1	166,2	167,7
Std. Error	58,53	37,16	36,60
Lower 95% CI of mean	521,0	517,7	560,4
Upper 95% CI of mean	785,9	673,2	713,1
Sum	6534	11909	13371

Tabelle 64: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von

Table Analyzed	FORT Doppel
Column A	vor Therapie
vs	vs

Column B	nach Therapie
Unpaired t test	

P value	0,3927
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.8681 df=28
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	653.4 ± 58.53 N=10
Mean ± SEM of column B	595.5 ± 37.16 N=20

Difference between means	57.99 ± 66.80
95% confidence interval	-78.83 to 194.8
R squared	0,02621
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.241, 9, 19
P value	0,6577
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabelle 65: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von

Table Analyzed	FORT Doppel
Column A	vor Therapie
vs	vs
Column C	nach 20min
Unpaired t test	
P value	0,8035
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.2511 df=29
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	653.4 ± 58.53

	N=10
Mean ± SEM of column C	636.7 ± 36.60 N=21
Difference between means	16.72 ± 66.58
95% confidence interval	-119.4 to 152.9
R squared	0,002169
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.218, 9, 20
P value	0,6760
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Tabelle 66: Statistische Parameter des ungepaarten t-Tests von

Table Analyzed	FORT Doppel
Column B	nach Therapie
vs	vs
Column C	nach 20min
Unpaired t test	
P value	0,4336
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.7912 df=39
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column B	595.5 ± 37.16

	N=10
Mean ± SEM of column C	636.7 ± 36.60 N=21
Difference between means	-41.27 ± 52.17
95% confidence interval	-146.8 to 64.26
R squared	0,01580
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.018, 20, 19
P value	0,9713
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Für eine genauere Aussage werden nun die Werte der einzelnen Patienten im Therapieverlauf dargestellt. Von neun Patienten sind alle drei Werte bekannt. In der Graphik ist zu erkennen, dass der FORT-Wert nach der Infusion bei nur einem

Patienten ansteigt. Der Wert steigt von 970 FORT auf 1099 FORT, der Unterschied beträgt 129 FORT-Einheiten. Nach 20 Minuten ist der Wert auf 1034 FORT abgesunken.

Bei den anderen acht Patienten kommt es nach der Infusion zu einer leichten Abnahme der FORT-Werte. 20 Minuten nach der Infusion sinken sie bei drei Patienten weiter, bei fünf Patienten steigen sie wieder.

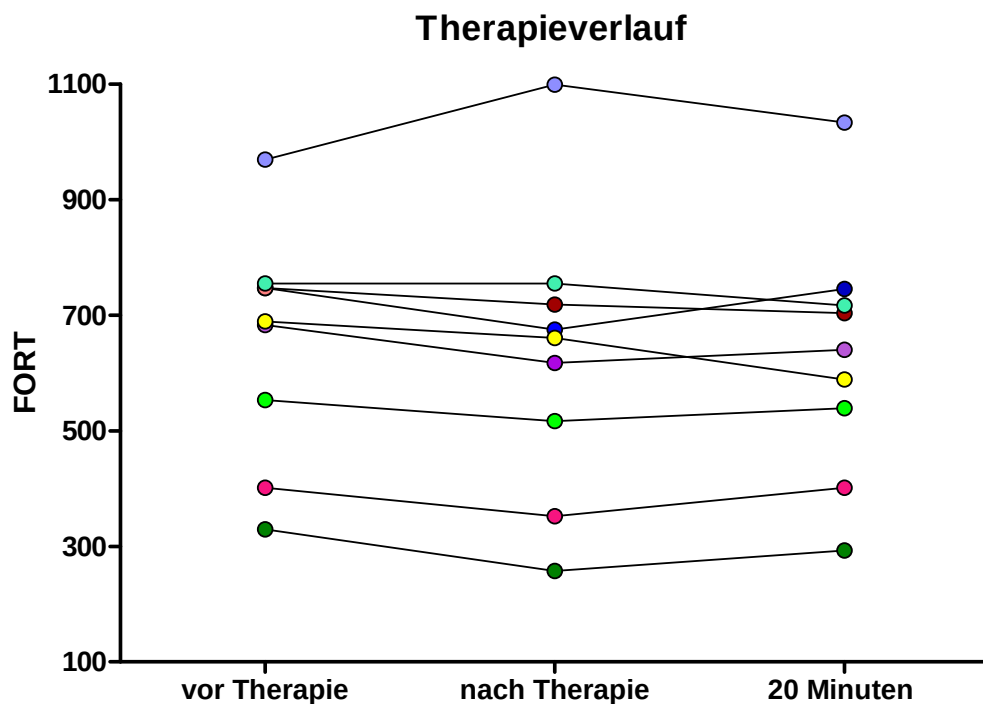


Abb. 41: FORT-Werte einzelner Patienten im Therapieverlauf

In folgender Graphik sind die FORT-Werte der Plasmaproben unmittelbar nach der Infusion und 20 Minuten nach der Infusion gegen die entsprechenden Docetaxelkonzentrationen aufgetragen. Die Datenpunkte scheinen bei erster Betrachtung sehr verstreut zu liegen, führt man jedoch eine lineare Regressionanalyse durch, so erkennt man, dass bei zunehmender Docetaxelkonzentration im Plasma die FORT-Werte steigen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,47, der Konfidenzintervall ist relativ schmal, es liegen jedoch sehr viele Werte außerhalb davon.

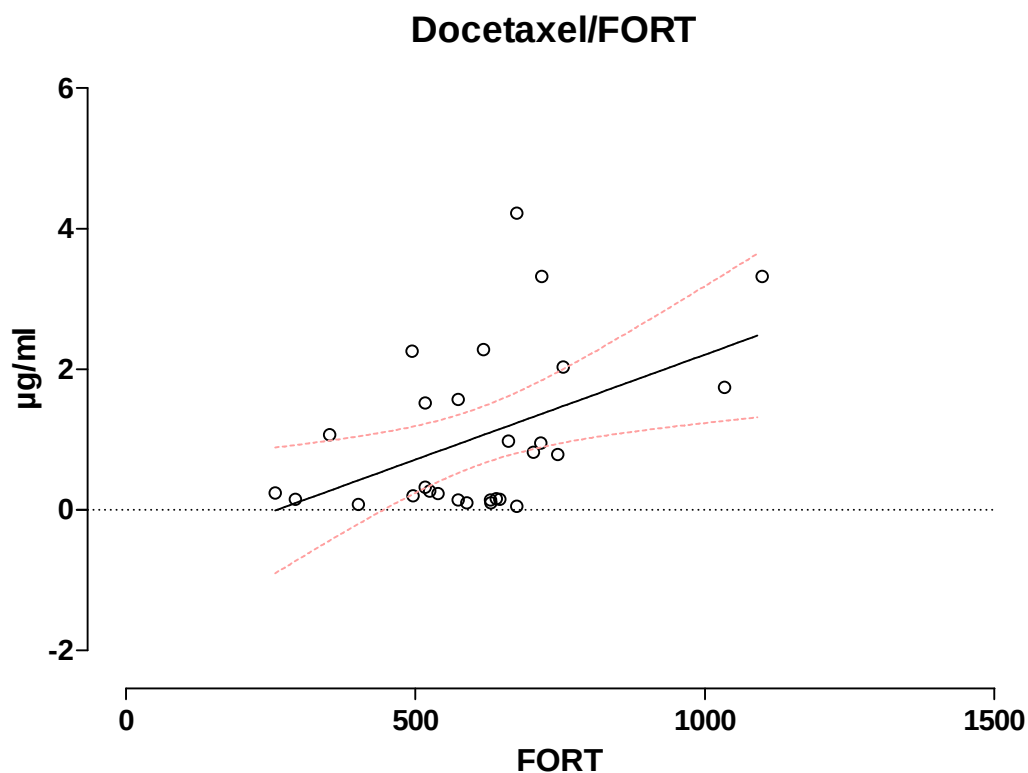


Abb. 42: Lineare Regression der FORT-Werte der Patientenproben unmittelbar nach der Infusion und 20 Minuten nach der Infusion mit der entsprechenden Docetaxelkonzentration

Tabelle 67: Statistische Parameter der linearen Regressionsanalyse der FORT-Werte mit der Docetaxelkonzentration im Plasma unmittelbar nach der Infusion und 20 Minuten nach der Infusion

Best-fit values	
Slope	0.002986 ± 0.001103
Y-intercept when X=0.0	-0.7782 ± 0.7009
X-intercept when Y=0.0	260,6
1/slope	334,9
95% Confidence Intervals	
Slope	0.0007189 to 0.005253
Y-intercept when X=0.0	-2.219 to 0.6628
X-intercept when Y=0.0	-874.7 to 445.3
Goodness of Fit	
r^2	0,2200
Sy.x	1,045
Is slope significantly non-zero?	
F	7,333
DFn, DFd	1.000, 26.00
P value	0,0118
Deviation from zero?	Significant
Data	

Number of X values	28
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	28
Number of missing values	0

Vernachlässigt man die Werte der Proben 20 Minuten nach der Infusion, so erhält man zwar einen breiteren Konfidenzintervall, es liegen jedoch weniger Datenpunkte außerhalb davon. Der Korrelationskoeffizient ist etwas höher und beträgt 0,53.

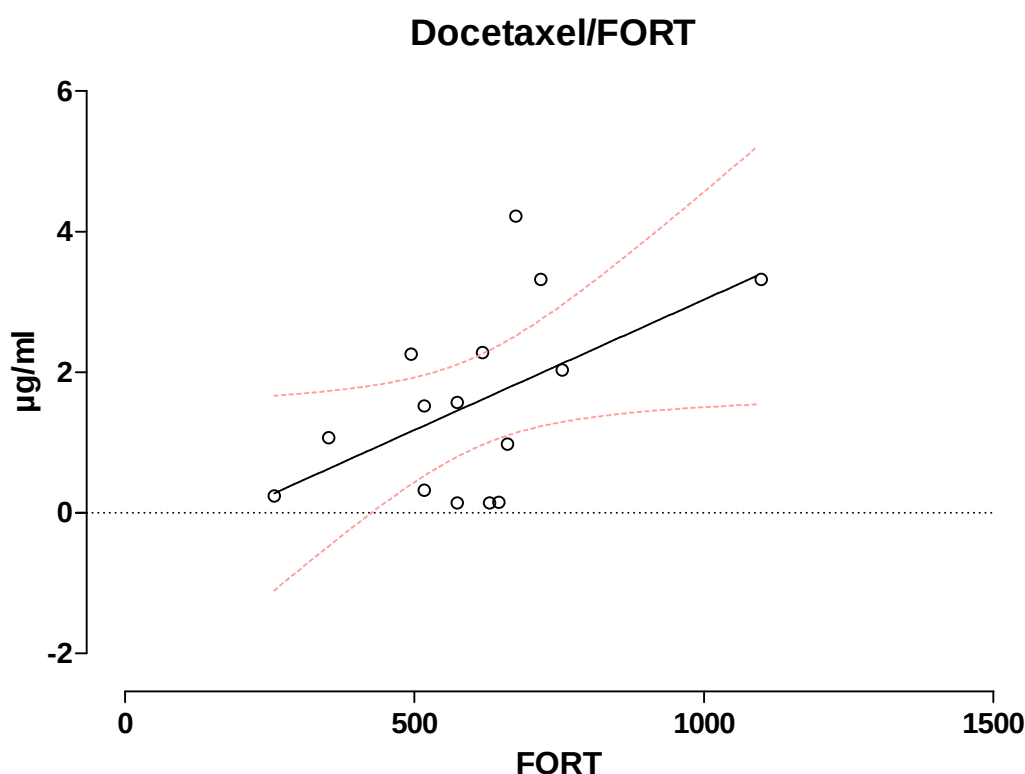


Abb. 43: Lineare Regression der FORT-Werte der Patientenproben unmittelbar nach der Infusion mit der entsprechenden Docetaxelkonzentration

Tabelle 68: Statistische Parameter der linearen Regressionsanalyse der FORT-Werte mit der Docetaxelkonzentration im Plasma unmittelbar nach der Infusion

Best-fit values	
Slope	0.003709 ± 0.001630
Y-intercept when X=0.0	-0.6767 ± 1.032
X-intercept when Y=0.0	182,4
1/slope	269,6
95% Confidence Intervals	
Slope	0.0001875 to

	0.007231
Y-intercept when X=0.0	-2.906 to 1.553
X-intercept when Y=0.0	-7806 to 426.2
Goodness of Fit	
r^2	0,2848
Sy.x	1,158
Is slope significantly non-zero?	

F	5,176
DFn, DFd	1.000, 13.00
P value	0,0405
Deviation from zero?	Significant
Data	

Number of X values	15
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	15
Number of missing values	0

4.3 Messung der antioxidativen Kapazität

Tabelle 69: FORD-Werte der Patienten (x=keine Messung)

Probe	Vor Therapie	post 1. Messung	post 2. Messung	20min 1. Messung	20min 2. Messung
1	x	1,54	1,29	1,12	1,13
2	x	0,92	0,88	0,86	0,80
3	x	1,23	1,19	1,14	1,20
4	x	0,98	x	x	x
5	x	1,30	x	1,30	x
11	x	x	x	0,36	0,41
12	x	x	x	1,28	1,25
13	x	x	x	1,42	1,50
14	x	x	x	1,03	1,06
15	0,53	0,53	x	x	x
16	0,90	0,90	x	0,90	x
17	x	0,70	x	x	x
18	x	0,91	x	x	x
19	x	1,25	x	x	x
20	x	x	x	1,21	x

Auch hier sind die Daten nicht vollständig. Vor der Therapie konnten die Werte von zwei Patienten ermittelt werden. Sie betragen 0,53 und 0,9 FORD und liegen somit im unteren Bereich der antioxidativen Kapazität. Der Mittelwert beträgt 0,73 FORD. Unmittelbar nach der Docetaxelinfusion wurden zehn Werte erfasst. Sie liegen zwischen 0,9 FORD und 1,54 FORD. Der Mittelwert beträgt 1,03 FORD, also um 0,4 FORD-Einheiten mehr als vor der Infusion. 20 Minuten nach der Infusion wurden wieder zehn Proben vermessen, allerdings nicht ausschließlich von den gleichen Patienten wie unmittelbar nach der Infusion. Die Werte liegen zwischen 0,3 FORD und 1,42 FORD. Der Mittelwert beträgt hier 1,06 FORD und entspricht somit dem Mittelwert unmittelbar nach der Infusion.

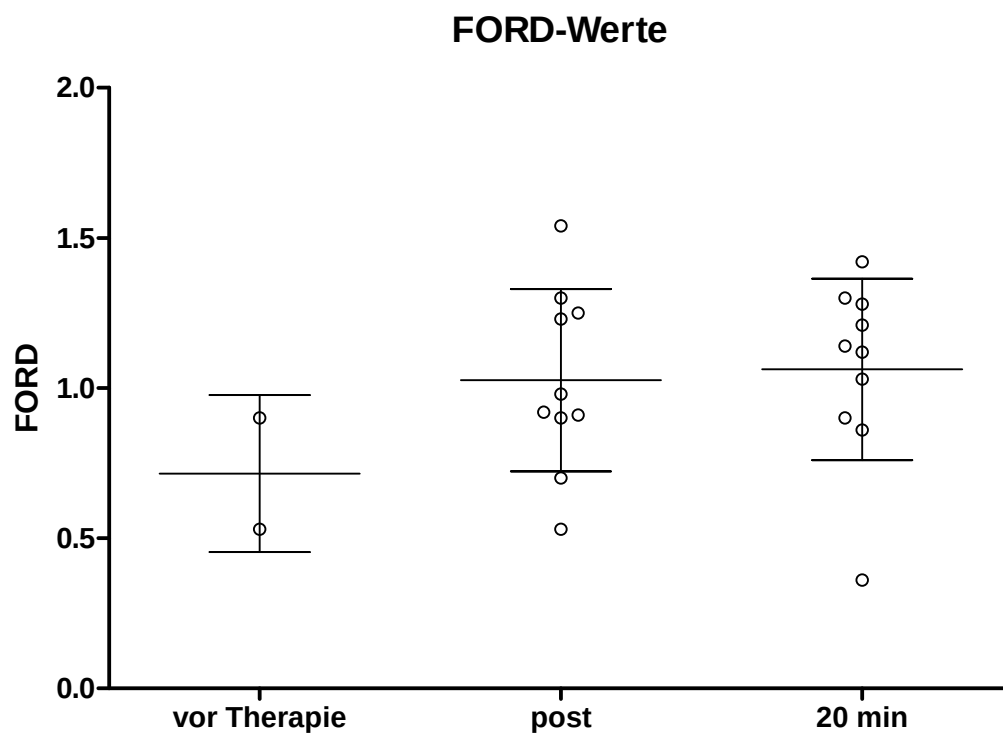


Abb. 44: Gegenüberstellung der FORD-Werte der Patientenproben im Therapieverlauf

Tabelle 70: Statistische Parameter der FORD-Werte der Patienten vor der Therapie, unmittelbar nach der Infusion sowie 20 Minuten nach der Infusion

	vor Therapie	post	20 min
Number of values	2	10	10
Minimum	0,5300	0,5300	0,3600
25% Percentile	0,5300	0,8500	0,8900
Median	0,7150	0,9500	1,130
75% Percentile	0,9000	1,263	1,285
Maximum	0,9000	1,540	1,420
Mean	0,7150	1,026	1,062
Std. Deviation	0,2616	0,3030	0,3027
Std. Error	0,1850	0,09580	0,09572
Lower 95% CI of mean	-1,636	0,8093	0,8455
Upper 95% CI of mean	3,066	1,243	1,279
Sum	1,430	10,26	10,62

Sieht man sich also nur die FORD-Werte im Verlauf der Therapie an, so macht es den Anschein, als würde die antioxidative Kapazität der Patienten durch die Gabe von Docetaxel zunehmen. Es wird daher jeder FORD-Wert der entsprechenden

Docetaxelkonzentration im Plasma zugeordnet und eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und man erkennt, dass mit steigender Docetaxelkonzentration die FORD-Werte abnehmen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,49.

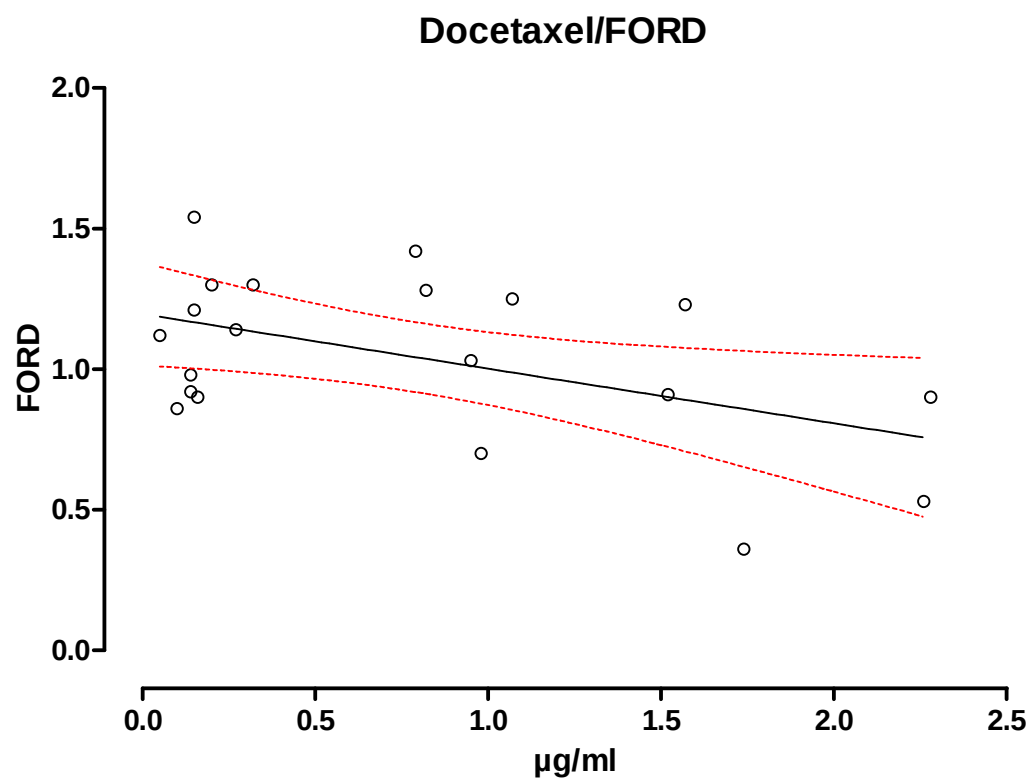


Abb. 45: Lineare Regression der FORD-Werte mit der entsprechenden Docetaxelkonzentration

Tabelle 71: Statistische Parameter der linearen Regressionsanalyse der Docetaxelkonzentration mit den FORD-Werten

Best-fit values		Sy.x	0,2647
Slope	-0.1942 ± 0.08174	Is slope significantly non-zero?	
Y-intercept when X=0.0	1.196 ± 0.08718	F	5,643
X-intercept when Y=0.0	6,159	DFn, DFd	1.000, 18.00
1/slope	-5,150	P value	0,0288
95% Confidence Intervals		Deviation from zero?	Significant
Slope	-0.3659 to -0.02245	Data	
Y-intercept when X=0.0	1.013 to 1.379	Number of X values	20
X-intercept when Y=0.0	3.593 to 47.34	Maximum number of Y replicates	1
Goodness of Fit		Total number of values	20
r ²	0,2387	Number of missing values	17

Nun sollen auch die FORT-Werte mit den FORD-Werten korreliert werden. Hier werden auch die Werte von doppelt vermessenen Proben miteinbezogen. Die lineare Regressionsanalyse zeigt, dass FORD- und FORT-Werte negativ miteinander zusammenhängen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,41. Bei höherem oxidativen Stress ist die antioxidative Kapazität vermindert. Dieser Zusammenhang wurde in der Literatur auch bei gesunden Probanden beschrieben und lässt sich darauf zurückführen, dass bei hohem FORT- und gleichzeitig niedrigem FORD-Wert einerseits eine erhöhte Produktion an freien Radikalen die antioxidative Kapazität zu erschöpfen scheint, andererseits der Körper durch eine verminderte Effizienz des antioxidativen Systems die gebildete ROS-Menge nicht mehr entgiften kann. [26]

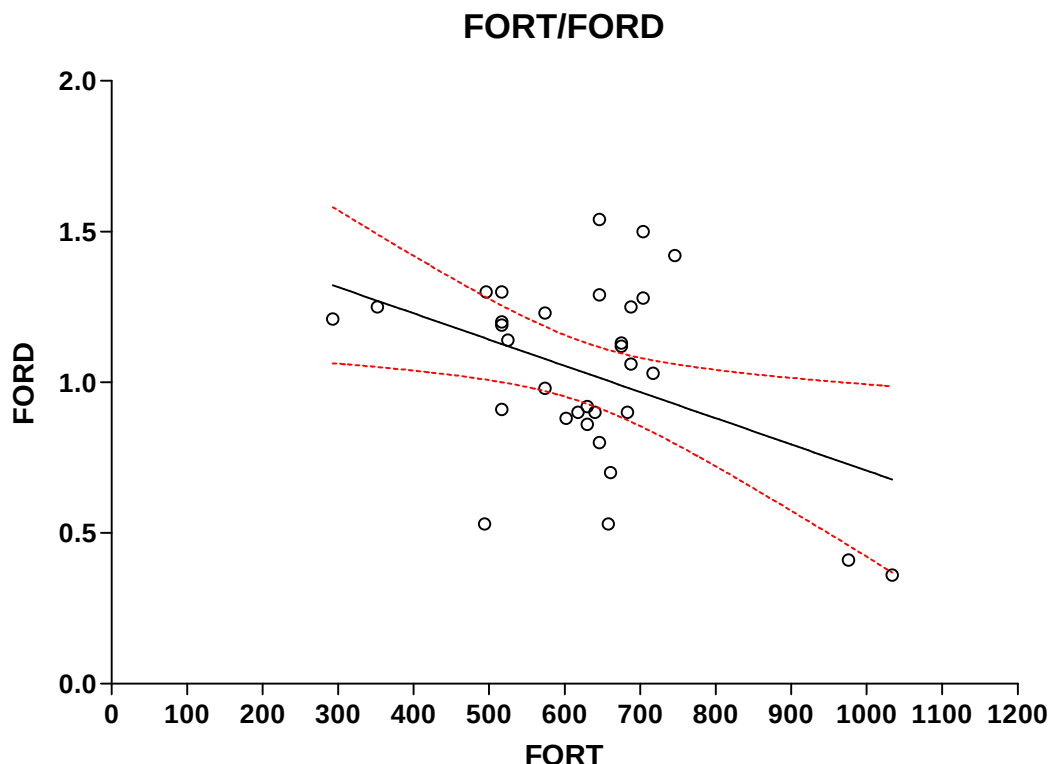


Abb. 46: Lineare Regression der FORD-Werte mit den entsprechenden FORT-Werten der Patientenproben

Tabelle 72: Statistische Parameter der linearen Regressionsanalyse der FORT-Werte mit den FORD-Werten

Best-fit values	
Slope	-0.0008695 ± 0.0003508

Y-intercept when X=0.0	1.576 ± 0.2251
X-intercept when Y=0.0	1813

1/slope	-1150
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.001586 to - 0.0001533
Y-intercept when X=0.0	1.117 to 2.036
X-intercept when Y=0.0	1270 to 7366
Goodness of Fit	
r^2	0,17
Sy.x	0,2778
Is slope significantly non-zero?	

F	6,145
DFn, DFd	1.000, 30.00
P value	0,019
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	32
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	32
Number of missing values	0

5) CONCLUSIO

Epidocetaxel

Diese Arbeit untersuchte erstmals die Epimerisierung von Docetaxel zu Epidocetaxel, einem inaktiven Umlagerungsprodukt, das typischerweise bei der Lagerung von Docetaxellösungen auftritt und als Verunreinigung gilt.

Zunächst erfolgten in vitro-Untersuchungen. Dabei wurde die Bildung von Epidocetaxel in unterschiedlichen Medien und aus unterschiedlichen Formulierungen von Docetaxel untersucht und miteinander verglichen.

Die drei verschiedenen Formulierungen von Docetaxel zeigen keinen Unterschied bei der Epimerisierung. Im selben Medium werden gleiche Konzentrationen von Epidocetaxel erreicht. Sie betragen jeweils rund 20% der Docetaxelkonzentration. Man kann davon ausgehen, dass die Zubereitung der Docetaxellösung keinen Einfluss auf die Epimerisierung besitzt.

Der Vergleich von verschiedenen Medien liefert jedoch abweichende Ergebnisse. Im Vollblut für Forschungszwecke und dem daraus gewonnenen Plasma erreichte die Epidocetaxelkonzentration rund 20%. Im Spenderblut beträgt die höchste Konzentration im Mittel 7,4%, im daraus gewonnenen Plasma 4,8% und in Precinorm nur 2,7% der Docetaxelkonzentration.

Ein weiterer Unterschied besteht in der Geschwindigkeit der Epimerisierung: im Plasma für Forschungszwecke wird die maximale Konzentration nach sechs Stunden, im entsprechenden Vollblut bereits nach vier Stunden erreicht. Danach kommt es zu einer Umkehrung der Epimerisierung, aus Epidocetaxel wird wieder Docetaxel. Im Spenderblut, dem daraus gewonnenen Plasma und in Precinorm verläuft die Epimerisierung kontinuierlich über 24 Stunden. In Precinorm erfolgte die Messung auch nach 26 Stunden und zeigte einen weiteren Anstieg von Epidocetaxel. Es ist anzunehmen, dass die Epimerisierung hier noch nicht abgeschlossen ist und es wäre interessant zu klären, wie lange sie sich noch fortsetzt und welche maximale Konzentration an Epidocetaxel erreicht wird.

Diese deutlichen Geschwindigkeitsunterschiede in der Bildung von Epidocetaxel sind vermutlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Matrix der verschiedenen Medien zurückzuführen. Es ist nicht bekannt, inwieweit sich Vollblut für Forschungszwecke von gewöhnlichem Spenderblut unterscheidet.

In den Patientenproben liegen die Epidocetaxelkonzentrationen unmittelbar nach der Infusion zwischen 7% und 33%, 20 Minuten nach der Infusion liegen sie zwischen 3% und 44% der Docetaxelkonzentration. Bei fünf von zwölf Patienten kommt es zu einer relativen Erhöhung der Epidocetaxelkonzentration bezogen auf die Docetaxelkonzentration. Ein Grund dafür können individuelle Unterschiede bei der Metabolisierung von Arzneistoffen sein, die auch von der Begleitmedikation beeinflusst werden.

Die Konzentrationen im Urin sind am niedrigsten und betragen zwischen 0,05 µg/ml (0,55%) und 0,4 µg/ml (1,05%). Prozentuell betrachtet beträgt der höchste Wert 4,27%. Da das Volumen des Urins nicht von allen Patienten bekannt ist, lassen sich hier keine aussagekräftigen Vergleiche zwischen den einzelnen Patienten aufstellen. Die Epimerisierung kann auch durch den pH-Wert des Urins beeinflusst werden, der ebenfalls nicht bekannt ist.

Oxidativer Stress und antioxidative kapazität

Die Stresswerte der Patienten befinden sich, bis auf eine Ausnahme, schon vor der Docetaxelinfusion im Bereich von hohem oxidativen Stress. Einerseits kann dies durch die Krankheit selbst bedingt sein, andererseits ist nicht geklärt, in welchem Zyklus der Chemotherapie sich die Patienten befinden. Es besteht die Möglichkeit, dass diese hohe Radikalbelastung durch eine vorhergehende Infusion von Docetaxel hervorgerufen wurde und der Körper keine Zeit hatte, sich zwischen den einzelnen Zyklen davon zu erholen.

Die Betrachtung der Stresswerte der einzelnen Patienten im Therapieverlauf zeigt keinen Anstieg durch die Gabe von Docetaxel. Die Korrelation der Stresswerte mit der Docetaxelkonzentration im Plasma ist positiv, der Korrelationskoeffizient beträgt jedoch nur 0,53.

Die antioxidative Kapazität vor und unmittelbar nach der Infusion konnte nur von zwei Patienten bestimmt werden. Bei beiden Patienten ändert sich der Wert durch die Docetaxelgabe nicht.

Eine Korrelation der Stresswerte mit den Werten der antioxidativen Kapazität zeigt, dass die antioxidative Kapazität bei steigendem oxidativen Stress leicht abnimmt. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,41.

Korreliert man die antioxidative Kapazität mit der Docetaxelkonzentration, so sieht man auch hier einen negativen Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,49.

Insgesamt kommt es weder beim oxidativen Stress, noch bei der antioxidativen Kapazität zu deutlichen Änderungen im Verlauf der Therapie. Möglicherweise ist die Zeitspanne, in der die Abnahme des Blutes erfolgte zu gering um einen Einfluss der Chemotherapie mit Docetaxel auf den pro- und antioxidativen Status der Patienten zu beurteilen.

6) LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Siems W, Krämer K, Grune T; Oxidativer Stress und Pharmaka.
Pharmazeutische Zeitung-Schriftenreihe, Band 15, Seiten 11-12; 2005;
- [2] ibidem Seiten 17-35
- [3] ibidem Seiten 43-59
- [4] ibidem Seiten 150-153
- [5] Palmieri B, Sblendorio V; Oxidative stress detection: what for? Part I.
European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 10; Seiten
291-317; 2006
- [6] Fischer B, Eggen R; Abwehrgene als Schadstoffindikatoren.
Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und
Gewässerschutz; EAWAG news; 56; Seiten 15-17; 2003
- [7] Dennog C; Untersuchungen zur biologischen Bedeutung von oxidativem
Stress für den Menschen am Modell der hyperbaren Sauerstoffbehandlung.
Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm; 1999
- [8] Homepage: RxList Inc. – The Internet Drug Index; Monographie Taxotere;
Chapter 1-8; 2009
<http://www.rxlist.com/taxotere-drug.htm>; 23.01.2009, 15:00
- [9] Homepage: PharmXplorer Academic – Lernplattform für
Pharmaziestudenten
<http://www.pharmxplorer.at/pharmxp/px/index1.php?>; 23.01.2009, 15:00

- [10]** Noguchi S; Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers.
Cancer Science, 97; Seiten 813-820; 2006
- [11]** Clarke SJ, Rivory LP; Clinical pharmacokinetics of Docetaxel.
Clinical Pharmacokinetics, 36; Seiten 99-114
- [12]** Simons S, Jaehde U; Pharmakokinetik und Interaktionspotenzial der Taxane: Paclitaxel und Docetaxel sicher anwenden.
Pharmazie in unserer Zeit, 34; Seiten 122-127; 2005
- [13]** Bruno R, Hille D, Riva A, Vivier N, ten Bokkel Huinnink WW, van Oosterom AT, Kaye SB, Verweij J, Fossella FV, Valero V, Rigas JR, Seidman AD, Chevallier B, Fumoleau P, Burris HA, Ravdin PM, Sheiner LB; Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with cancer.
Journal of Clinical Oncology, 16; Seiten 187-96; 1998
- [14]** Czejka M; eigene Daten; 2008
- [15]** Rücker G, Neugebauer M, Willems GG; Instrumentelle pharmazeutische Analytik; 3. Auflage.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; Seiten 385- 390, 440-467; 2001
- [16]** Firma Incomat Medizinische Geräte GmbH; FORMplus
Bedienungshandbuch; Version 1.0; Seiten 4 und 16; 2006
- [17]** ibidem; Seite 7
- [18]** ibidem; Seite 31
- [19]** ibidem; Seite 18-20

- [20] ibidem; Seite 21-23
- [21] Firma Incomat Medizinische Geräte GmbH; Packungsbeilage FORT
Reagenz für FORMplus; 2006
- [22] Firma Incomat Medizinische Geräte GmbH; Packungsbeilage FORD
Reagenz für FORMplus; 2006
- [23] Wang J, Yi J; Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the
question.
Cancer biology and therapy; 7; Seiten 1875-1884; 2008
- [24] Fang J, Nakamura H, Iyer AK; Tumor-targeted induction of oxystress for
cancer therapy.
Journal of drug targeting; 15; Seiten 475-486; 2007
- [25] Brown N, Bicknell R; Hypoxia and oxidative stress in breast cancer:
Oxidative stress - its effects on the growth, metastatic potential and
response to therapy of breast cancer.
Breast Cancer Research; 3; Seiten 323-327; 2001
- [26] Eisl M; Oxidative Stressmessung und antioxidative Kapazität:
Untersuchungen an speziellen Kollektiven.
Diplomarbeit Universität Wien; 2007

7) ABSTRACT

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob eine antineoplastische Chemotherapie mit Docetaxel einen Einfluss auf den oxidativen Stress und die antioxidative Kapazität der behandelten Patienten besitzt.

Dazu wurden sowohl die Konzentration von Docetaxel im Blutplasma, als auch der oxidative Stress und die antioxidative Kapazität der Patienten in unterschiedlichen Phasen der Therapie gemessen und miteinander in Zusammenhang gebracht.

Des Weiteren wurde die Epimerisierung von Docetaxel zum 7'-Epimer, Epidocetaxel, bestimmt, sowohl in den Patientenproben, als auch in vitro und die entsprechenden Radikalmessungen vorgenommen.

8) LEBENSLAUF

Name: Tamara Brumnik

Geburtsdatum: 16.01.1983

Geburtsort: 9020 Klagenfurt

Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung:	1989-1993	Volksschule Bad Eisenkappel
	1993-1997	BG und BRG für Slowenen in Klagenfurt
	1997-2001	BORG Klagenfurt mit Schwerpunkt der Naturwissenschaften
	2001	Matura
	seit März 2002	Studium Pharmazie an der Universität Wien

Berufsbezogene Tätigkeiten:

August 2002	Firma Baxter AG, Wien
Jänner-Mai 2004	Apotheke Winkler Alt Hietzing, Wien
August 2006- Dezember 2007	Maria Treu-Apotheke, Wien