



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Plasma- und Leberkonzentration von CPT-11 in Ratten
nach systemischer und intraarterieller Verabreichung:
Vergleich mit neuen Chemoembolisationsmethoden“

verfasst von / submitted by

Julia Brommer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

Danksagung

Meine Diplomarbeit ist im Zeitraum von Jänner 2017 bis Juli 2017 am Institut für Pharmazeutische Chemie an der Division für Klinische Pharmazie und Chemische Diagnostik entstanden.

Ich möchte mich bei Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka bedanken, der mir ein sehr spannendes Diplomarbeitsthema bereitgestellt hat und auch stets gerne mit Ratschlägen und Ideen weitergeholfen hat.

Ich danke auch den beiden Dissertantinnen Mag. pharm. Andrea Gruber und Mag. pharm. Marie Kathrin Kitzmüller, sowie der Diplomandin Lisa Wimmer für ihre Hilfsbereitschaft und ein sehr angenehmes Arbeitsklima.

Ein ganz besonders großer Dank richtet sich an meine Eltern Birgit und Martin, meine Geschwister Ines, Marlies und Benjamin, sowie meinen Freund Luis. Sie waren während meines Studiums eine große Stütze für mich.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Wien, Juli 2017

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Pharmakokinetik von Irinotecan	1
1.2	Arten der Wirkstoffapplikation	4
2.	Zielsetzung	6
3.	Methoden.....	7
3.1	Klinisches Setting	7
3.2	Studiendesign	7
3.3	Tierdaten	7
3.4	Analytik.....	9
3.4.1	LaboraAusstattung	9
3.4.2	Erstellung der Eichgeraden.....	13
3.4.3	Beispielchromatogramme von der Erstellung der Eichgerade	22
3.4.4	Vorbereitung und Aufarbeitung der Proben.....	24
3.4.5	Quantifizierung von CPT-11/ SN-38.....	24
3.4.6	Beispielchromatogramme	26
4.	Berechnungen	30
4.1	Biometrie	30
4.2	Beschreibende (deskriptive) Statistik	30
4.3	Schließende (induktive) Statistik	30
4.3.1	t-Test	30
4.3.2	ANOVA (Analysis of Variance) = Varianzanalyse.....	31
4.4	Verwendete Software.....	32
5.	Ergebnisse und Diskussion	33
5.1	Chromatogramme – Konzentrationsverläufe	33
5.3.	Biometrische Auswertung	37
5.2	Deskriptive Statistik.....	39
5.3	Induktive Statistik.....	45
5.3.1	T-Tests Konzentrationen SN-38/CPT-11.....	45
5.3.2	ANOVA Konzentrationen SN-38/ CPT-11	47
5.4	Diskussion	50
6.	Zusammenfassung	52
7.	Abstract	53

Abkürzungsverzeichnis

CPT-11	Irinotecan bzw. Camptothecin-11
CES	Carboxylesterase
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin
UGT1A1	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase 1A1
CYP3A4	Cytochrom P ₄₅₀ 3A4
APC	7-Ethyl-10-[(4-N-(5-aminopentansäure)-1-piperidino) carbonyloxycamptothecin
NPC	7-Ethyl-10-[(4-amino-1-piperidino) carbonyloxycamptothecin
MDR	Multidrug resistance
NaCl	Natriumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
ACN	Acetonitril
MeOH	Methanol
HPLC	High performance liquid chromatography
PBS	Phosphate Buffered Saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
Aqua bidest.	Destilliertes Wasser
RPM	Revolutions per minute
EMBO	EmboCept S®
TAN	TANDEM®
SYS	Systemisch
HAI	Hepatoarteriell
AUC	Area under the curve
ANOVA	Analysis of Variance

1. Einleitung

Irinotecan ist ein Zytostatikum aus der Klasse der Topoisomerase I- Hemmstoffe. Es wird in fortgeschrittenen Stadien des Kolorektalkarzinoms eingesetzt, welche durch Metastasenbildung gekennzeichnet sind.

(Mutschler 2013)

1.1 Pharmakokinetik von Irinotecan

Irinotecan (CPT-11) ist ein Prodrug, welches mittels Carboxylesterase (CES) in den aktiven Metaboliten 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) umgewandelt wird. Dies passiert hauptsächlich in der Leber, da vor allem dort Carboxylesterasen vorhanden sind. Ebenso kann jedoch eine Umwandlung in Tumorgewebe und Plasma stattfinden.

(Shingyoji 2004)

Der Abbau von SN-38 in eine inaktive Form erfolgt mittels Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) durch Glucuronidierung. Das entstehende Glucuronid kann dann über die Galle ausgeschieden werden. Weiters erfolgt mittels Leberenzym Cytochrom P4503A4 (CYP3A4) eine Oxidation von CPT-11, wobei der endständige der beiden Piperidinringe geöffnet wird und die Produkte 7-ethyl-10-[(4-N-(5-aminopentansäure)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin (APC) und 7-ethyl-10-[(4-amino-1-piperidino)] carbonyloxycamptothecin (NPC) ohne relevante Zytotoxizität entstehen.

(Kimie 2001)

CPT-11, SN-38 sowie deren Metabolite können je nach pH- Wert entweder in der Lacton- Form oder in der Carboxylat- Form vorliegen. Bei physiologischem humanem Blut pH- Wert (7,4) ist das Gleichgewicht zwischen den beiden Formen in Richtung Carboxylat- Form verschoben. Die wirksame Form ist jedoch die Lacton- Form.

(Itagaki 2004)

Da im Zuge der Diplomarbeit am Rattenmodell gearbeitet wurde, ist es zu erwähnen, dass Ratten nicht mit CYP3A4 ausgestattet sind und somit die Metabolite APC und NPC von Ratten nicht gebildet werden. Die CPT-11 Konzentrationen im Plasma der Rattenproben sind somit höher als in humanen Proben.

(Martignoni 2006)

In den folgenden Abbildungen sind Chromatogramme, die nach einer Applikation von CPT-11 bei Ratten, beziehungsweise beim Menschen resultieren, zu sehen:

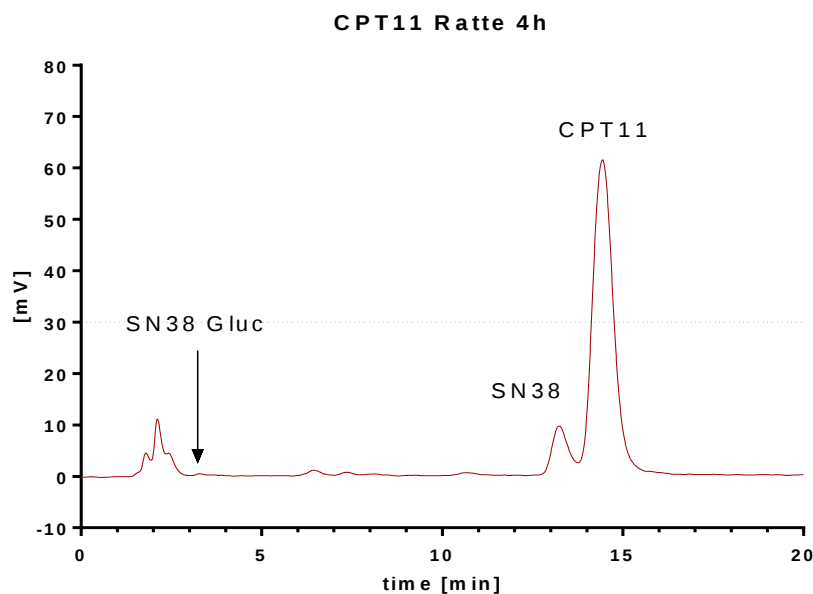


Abbildung 1: Konzentrationsverlauf bei Ratten (Rohdaten Wimmer& Brommer)

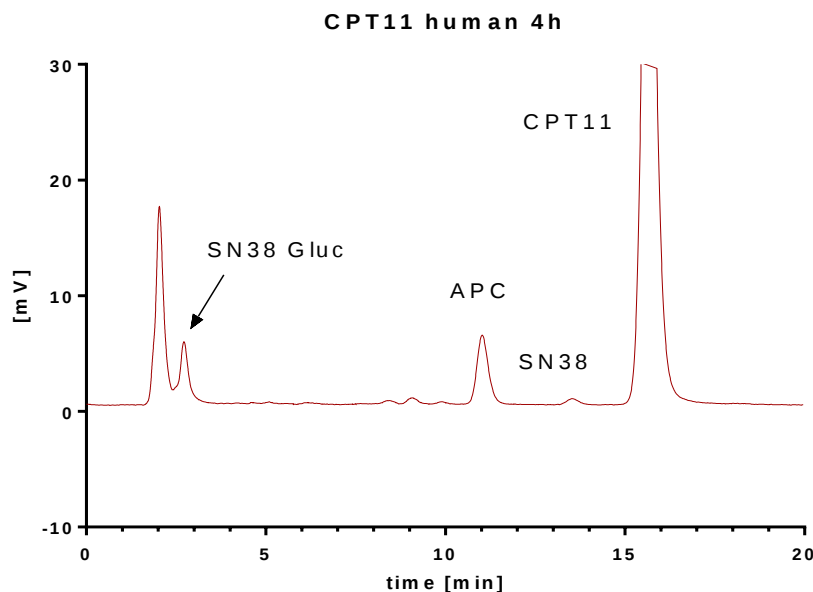


Abbildung 2: Konzentrationsverlauf beim Menschen (Rohdaten Ettlinger)

80% von CPT-11 sind im Blut an Erythrozyten gebunden, beziehungsweise liegt es auch in den Erythrozyten vor. SN-38 liegt zu 99% an Albumin und Lymphozyten, sowie zu einem geringen Anteil auch an Erythrozyten gebunden vor. Die Proteinbindung des Carboxylats ist geringer als die des Laktons. Aufgrund der hohen Plasmaproteinbindung von SN-38 ist es in vivo auch stabiler als CPT-11.

(Mathijssen 2001)

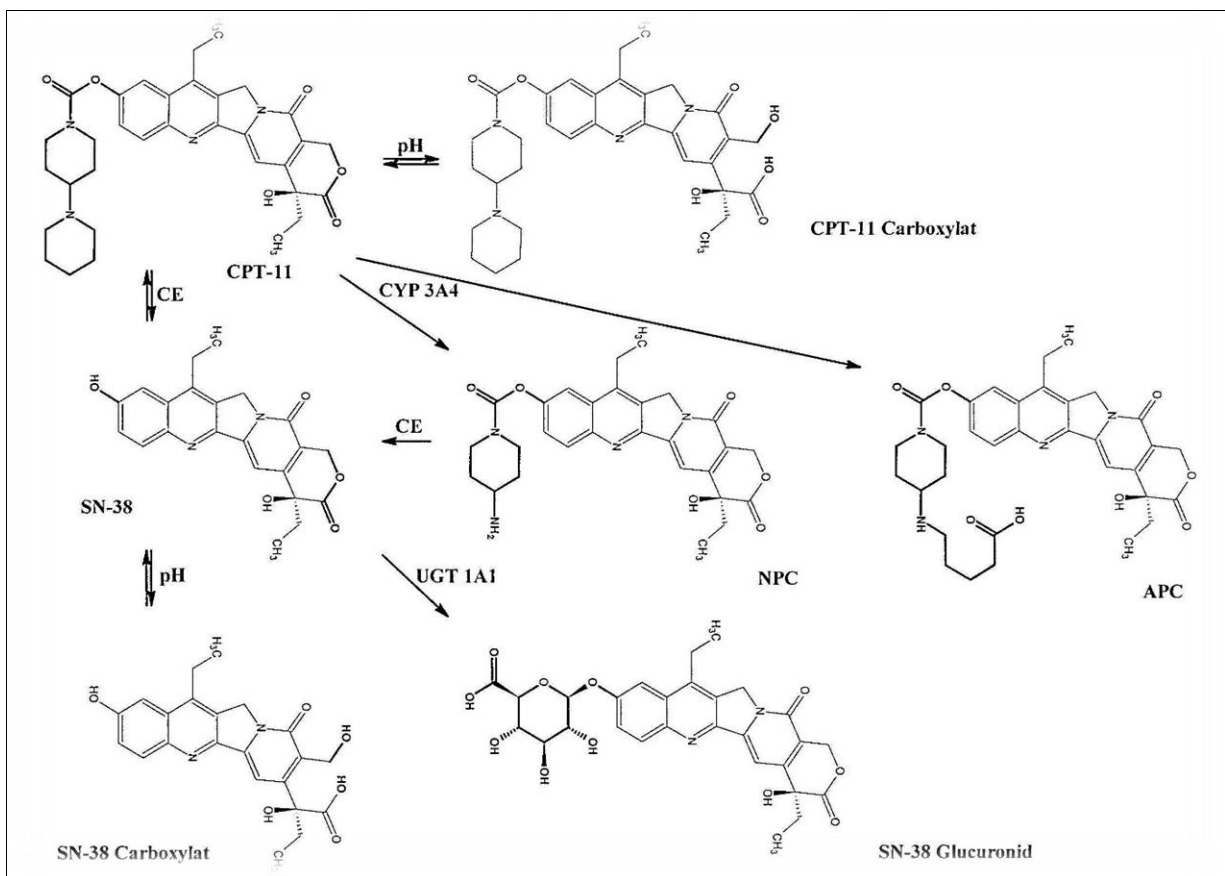


Abbildung 3: Metabolismus von Irinotecan (Ettlinger 2004)

Genetische Variationen der UGT1A1 sowie CYP3A4 führen zu veränderten Wirkstoffspiegeln von CPT-11 beziehungsweise SN-38. Außerdem kann es mit weiteren über CYP3A4 metabolisierten Arzneimitteln zu Interaktionen kommen.

22% des Wirkstoffes werden unverändert renal eliminiert und die Halbwertszeit beträgt etwa 6 Stunden, sofern keine genetischen Variationen der Enzyme vorliegen.

Nebenwirkungen: Bei 20% der PatientInnen kommt es zu einer Diarrhoe mit einer Latenzzeit von einigen Tagen nach erstmaliger Verabreichung. Es kann jedoch auch bereits innerhalb der ersten 24 Stunden zu unerwünschten cholinergen Wirkungen wie

Diarrhoe, Rhinitis, Konjunktivitis, Schwitzen, Miosis, sowie erhöhtem Tränen- und Speichelfluss kommen. Diese Symptome sind mit Atropin behandelbar.

(Mutschler 2013)

Das Auftreten von Diarrhoe steht in Zusammenhang mit dem Ausmaß der Glucuronidierung (umgekehrt proportional). Das akute cholinerge Fröhlsyndrom ist durch eine Hemmung der Acetylcholinesterase bedingt.

(Aktories 2009)

Weiters wird die Elimination von Irinotecan zu einem gewissen Grad durch membranständige Arzneistoffpumpen bewerkstelligt, die einen aktiven Efflux von Arzneistoffen bewirken. Sie zählen zu der Familie der ABC-Transporter. Dazu zählen zum Beispiel das Glykoprotein multidrug resistance-associated protein 1 und 2 (*MDR1* & 2). Genetische Variationen dieser Transporter führen zu unterschiedlichen Plasmakonzentrationen von CPT-11.

(Mathijssen 2003)

Die Vielzahl an interindividuellen Unterschieden in Metabolismus und Elimination machen eine individualisierte Behandlung der Patienten mit Irinotecan sinnvoll.

1.2 Arten der Wirkstoffapplikation

Etwa die Hälfte der Patienten mit Kolorektalkarzinom entwickeln im Laufe ihres Lebens Fernmetastasen an der Leber.

(Misiakos 2011)

Für die Therapie dieser Lebermetastasen bieten sich für Irinotecan folgende Applikationsarten an:

Systemische Applikation

Bei der systemischen Applikation wird der Arzneistoff intravenös appliziert und wird anschließend über das venöse System an den Zielort transportiert.

(Bley 2015)

Hepatoarterielle Applikation

Mithilfe von abdominalen Kathetern oder Pumpen kann der Wirkstoff im Zuge einer hepatoarteriellen Applikation direkt in die Leberarterie verabreicht werden.

Zusätzlich gibt es auch die Möglichkeit ein gefäßverschließendes Material an den Wirkstoff zu koppeln und in die Leberarterie zu applizieren. Man spricht hierbei von Chemoembolisation. Dabei wird einerseits der Wirkstoff in das Leber- und Tumorgewebe transportiert und andererseits die Blutversorgung des Tumors unterbunden und somit auch die Sauerstoffversorgung reduziert. Das gewebsverschließende Material löst sich entweder von selbst auf, oder bleibt bestehen.

(Macedo 2014)

Im Zuge der praktischen Arbeiten für die Diplomarbeit wurden zwei unterschiedliche Produkte zur Chemoembolisation angewendet und miteinander verglichen:

- EmboCept S® ist eine Injektionssuspension mit Mikrosphären aus Stärke, welche durch α -Amylase abbaubar sind. Sie werden mit dem Chemotherapeutikum beladen und sind dann in der Lage einen Gefäßverschluss zu erzielen.

(„Produktinformation EmboCept S®, PharmaCept“ 2017)

- TANDEM® ist ein ähnliches Produkt, allerdings sind die Mikrosphären aus einem Polymer beschaffen und damit nicht abbaubar.

(„Produktinformation TANDEM®, CeloNova“ 2017)

2. Zielsetzung

Im Zuge der Diplomarbeit wurde die Kompartimentverteilung von CPT-11 und dessen Metaboliten SN-38 zwischen Plasma (zentrales Kompartiment) und Lebergewebe (tiefes Kompartiment) nach unterschiedlichen Arten der intravasalen Applikation beobachtet.

Es wurde anhand pharmakokinetischer Gesichtspunkten untersucht, ob neue Chemoembolisationsmethoden Vorteile in der Therapie des kolorektalen Karzinoms bringen könnten.

Im Mittelpunkt steht immer eine sichere und effiziente Chemotherapie für die PatientInnen zu gewährleisten.

3. Methoden

3.1 Klinisches Setting

Die Therapie mit verschiedenen Applikationsmethoden von Irinotecan und der Blindprobe Natriumchlorid- Lösung, sowie die Entnahme des Probematerials erfolgten an der Universität Göttingen. Die Analyse der Proben wurde an der Division für Klinische Pharmazie und Chemische Diagnostik der Universität Wien durchgeführt.

3.2 Studiendesign

Den Ratten wurde im Alter von 8-14 Wochen der Wirkstoff CPT-11 beziehungsweise physiologische Natriumchlorid (NaCl)- Lösung verabreicht. Die NaCl- Lösung diente dazu, Blindproben zu generieren und mögliche Störfaktoren der teilweise parallel verabreichten Co-Medikation auszuschließen.

Wirkstoff: 4mg Irinotecan (entspricht etwa 16mg /kg Körpergewicht)

- Irinotecan
- Irinotecan + EmboCept S®
- Irinotecan + TANDEM®

Es wurde auf zwei verschiedene Arten appliziert:

- systemisch
 - Irinotecan
 - NaCl- Lösung
- hepatoarteriell
 - Irinotecan
 - Irinotecan + EmboCept S®
 - Irinotecan + TANDEM®

Vier Stunden nach der Applikation wurden die Tiere getötet und Plasma sowie Leberproben entnommen.

3.3 Tierdaten

Insgesamt wurden Proben von 44 Tieren analysiert. Davon erhielten acht Tiere systemisch NaCl-Lösung und zwölf Tiere systemisch Irinotecan.

Jeweils acht Tiere erhielten hepatoarteriell Irinotecan, Irinotecan+ EmboCept S® beziehungsweise Irinotecan+ TANDEM®.

Abkürzungen in den folgenden Tabellen: Wo = Wochen, KG= Körpergewicht

Tabelle 1: NaCl systemisch

NaCl systemisch					
Tiernummer	Alter (Wo)	Tag 0	KG (g) 0	Tag 10/11	KG (g) 10/11
375	13	12.11.2016	240	22.11.2016	260
376	13	12.11.2016	230	22.11.2016	250
382	13	02.12.2016	285	12.12.2016	300
383	13	02.12.2016	275	12.12.2016	290
389	10	23.01.2017	210	02.01.2017	230
394	9	11.12.2016	200	21.12.2016	215
395	9	11.12.2016	200	21.12.2016	220
396	9	11.12.2016	210	21.12.2016	225

Tabelle 2: Irinotecan systemisch

Irinotecan systemisch					
Tiernummer	Alter (Wo)	Tag 0	KG (g) 0	Tag 10/11	KG (g) 10/11
377	14	18.11.2016	260	28.11.2016	275
378	14	18.11.2016	270	28.11.2016	285
379	14	18.11.2016	260	29.11.2016	280
384	13	25.11.2016	265	05.12.2016	270
385	13	25.11.2016	280	05.12.2016	290
386	13	25.11.2016	285	06.12.2016	300
387	13	25.11.2016	270	06.12.2016	280
388	13	02.12.2016	275	13.12.2016	290
416	8	29.01.2017	180	08.02.2017	220
419	9	03.02.2017	185	13.02.2017	210
420	9	03.02.2017	170	13.02.2017	190
423	9	03.02.2017	175	13.02.2017	205

Tabelle 3: Irinotecan hepatoarteriell

Irinotecan hepatoarteriell					
Tiernummer	Alter (Wo)	Tag 0	KG (g) 0	Tag 10/11	KG (g) 10/11
393	9	11.12.2016	200	22.12.2016	220
390	10	23.12.2016	225	02.01.2017	225
391	10	23.12.2016	230	03.01.2017	215
392	10	23.12.2016	235	03.01.2017	230
397	12	31.12.2016	210	10.01.2017	220
399	12	31.12.2016	225	11.01.2017	225
400	12	31.12.2016	210	11.01.2017	215
409	12	13.01.2017	240	23.01.2017	265

Tabelle 4: Irinotecan + EmboCept S® hepatoarteriell

Irinotecan+ EmboCept S® hepatoarteriell					
Tiernummer	Alter (Wo)	Tag 0	KG (g) 0	Tag 10/11	KG (g) 10/11
402	13	11.12.2016	235	16.01.2017	245
403	13	23.12.2016	230	17.01.2017	245
404	13	23.12.2016	230	17.01.2017	250
405	11	23.12.2016	245	17.01.2017	270
406	11	31.12.2016	200	17.01.2017	220
407	12	13.01.2017	255	23.01.2017	270
408	12	13.01.2017	225	23.01.2017	245
415	8	29.01.2017	150	08.02.2017	185

Tabelle 5: Irinotecan + TANDEM® hepatoarteriell

Irinotecan+ TANDEM® hepatoarteriell					
Tiernummer	Alter (Wo)	Tag 0	KG (g) 0	Tag 10/11	KG (g) 10/11
411	12	13.01.2017	245	24.01.2017	265
412	12	13.01.2017	230	24.01.2017	250
421	9	03.02.2017	175	13.02.2017	210
422	9	03.02.2017	185	13.02.2017	220
424	9	03.02.2017	150	14.02.2017	190
413	8	29.01.2017	170	14.02.2017	220
417	8	29.01.2017	160	14.02.2017	210
418	8	29.01.2017	165	14.02.2017	220

3.4 Analytik

3.4.1 Laborausstattung

Tabelle 6: Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes® 1.5 ml	Eppendorf AG
Schüttler	Vortex Mixer	VELP® SCIENTIFICA
Mikropipetten	Eppendorf Research; 2- 20µl, 100-1000µl	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Universal; gelb (2-200µl), blau (50-1000µl)	VWR® INTERNATIONAL
Zentrifuge	Galaxy 16DH	VWR® INTERNATIONAL
Analysenwaage	Sartorius handy H110	Sartorius Mechatronics Austria GmbH

Homogenisiergerät	MiniLys®	Bertin TECHNOLOGIES
Lysier- Kit	Precellys Lysing Kit- Soft tissue homogenizing CK14	Precellys
Präparierbesteck	Präparierbesteck	LABOR SIEBERT
Vials	2-SV(A)	CHROMACOL®
Ultraschallbad	BANDELIN SONOREX RK 510	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG

Tabelle 7: HPLC-Anlage

VWR® HITACHI Chromaster HPLC-System	
Isokratische Trennung, Symmetry C8, Ionenpaar, HIGH	
Vorsäule	LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)
Trennsäule	Symmetry®C8 3,5µm, 4,6x100mm, Waters GesmbH.
Säulenofen	5310
Säulentemperatur	36°C
Eluent	KH ₂ PO ₄ / N-Heptansulfonsäure-Na-Salz/ H ₃ PO ₄ / ACN/ MeOH
Flussrate	0.8 ml/min
Druck	80-100bar
Injektionsvolumen	10 µl
Wellenlänge	Exzitationswellenlänge CPT-11: 360, SN-38: 376 Emissionswellenlänge CPT-11: 500, SN-38: 534
Fluoreszenzdetektor	5440 (Sensitivität HIGH)
Analysenzeit	20min
Retentionszeiten	CPT-11: 17,4; SN-38: 13,9
Pumpe	5110
Auto Sampler	5210
Software	Chromaster

Zusammensetzung Eluent:

- 2,7g KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)
- 0,5g N-Heptansulfonsäure-Natriumsalz
- 500µl H₃PO₄ (8,5%) (Phosphorsäure)
- 200µl ACN (Acetonitril)
- 50ml MeOH (Methanol)

Waschflüssigkeit: Wasser/ Acetonitril (20/80%, V/V)

Die verwendeten Analysenbedingungen wurden bereits erfolgreich zur Analyse von CPT-11 angewendet (Ettlinger 2004) und mussten nur noch um die Exzitations- sowie Emissionswellenlänge von SN-38 sowie die Retentionszeit von SN-38 ergänzt werden.

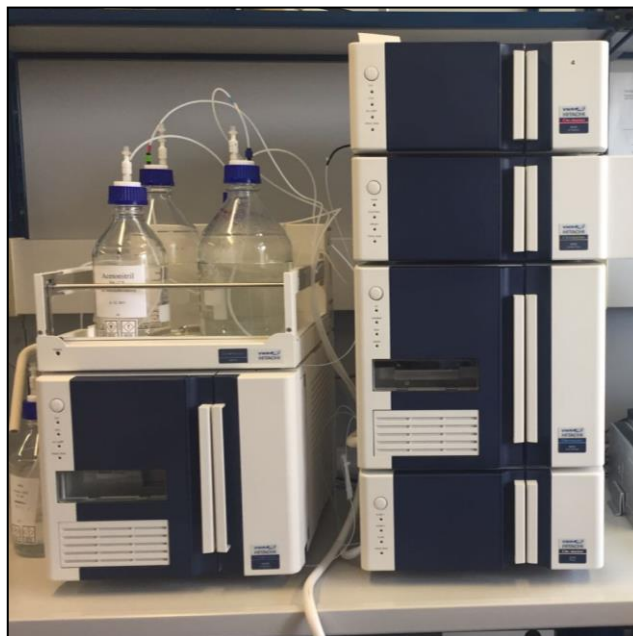


Abbildung 4: HPLC-Anlage (Fotos Wimmer& Brommer)

Die HPLC- (high performance liquid chromatography) Analyse wurde mittels Ionenpaar-Chromatographie durchgeführt. Dabei wurde eine Symmetry C8 – Säule verwendet.

Diese Säule besitzt als stationäre Phase eine polare Silikageloberfläche, die durch daran gekoppelte Octylreste (C8) jedoch apolar ist (Umkehrphase).

Der mobilen Phase wurde ein organischer ionischer Stoff hinzugefügt, der mit der gegensinnig geladenen Komponente der Probe ein Ionenpaar ergibt. Das gebildete Salz ergibt ein nicht-ionisches, organisches Molekül und erhält somit eine gewisse Affinität zur Umkehrphase, sodass eine chromatographische Trennung durchgeführt werden kann. Die Ionenbildung wird durch Pufferung unterdrückt. Bei apolaren Komponenten resultieren längere Retentionszeiten als bei polaren Strukturen.

Mithilfe dieser Art der Chromatographie lassen sich Säuren, Basen und Neutralstoffe, welche in einem Gemisch vorliegen, trennen.

Während des gesamten Trennvorganges war die Zusammensetzung der mobilen Phase gleichbleibend (isokratische Trennung).

(Meyer 2009)

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von Irinotecan/ SN-38 wurde bei der Detektion ein Fluoreszenzdetektor eingesetzt.

Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
ACN (Acetonitril)	Chem-Lab NV
PBS (Phosphate Buffered Saline)	SIGMA
SN38 Stammlösung 332µMol (1,3mg in 5ml PBS + 5ml DMSO)	SIGMA®
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA
Irinotecan 20µg/ml	Actavis®
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	SIGMA®
N-Heptansulfonsäure-Natriumsalz	SIGMA®
H ₃ PO ₄ (Phosphorsäure)	Merck KG®
MeOH (Methanol)	LiChrosolv®
Aqua bidest. (Destilliertes Wasser)	Department für Pharmakognosie, Universität Wien

3.4.2 Erstellung der Eichgeraden

Für CPT-11 und SN-38 wurden mit bekannten Konzentrationen Eichgeraden in den Medien Plasma und Lebergewebe erstellt. Ausgehend von diesen Eichgeraden ließen sich bei den folgenden Analysen unbekannte Konzentrationen aus den bei der HPLC- Analyse ermittelten Peakflächen errechnen.

SN-38 im Plasma

Um verschiedene Konzentrationen für die Erstellung der Eichgerade herzustellen, wurde die für die gewünschte Ausgangskonzentration erforderliche Menge einer Stammlösung von SN-38 (332 μM in PBS/ DMSO) mit Plasma versetzt. Dann wurden durch einfache Verdünnungsschritte die weiteren gewünschten Konzentrationen hergestellt. Zur Berechnung der erforderlichen Menge an Stammlösung für die Ausgangskonzentration wurde der Molarity Calculator (©2017 GraphPad Software) als Hilfe verwendet.

Dilute a stock solution

Stock concentration:	332	micromolar
Desired concentration:	5	micromolar
Desired volume:	2	milliliter
Required volume =		30.1205 microliter

©2017 GraphPad Software, Inc. All rights reserved.

Abbildung 5: Screenshot: Rechner zur Berechnung des benötigten Volumens an Stammlösung (©2017 GraphPad Software)

Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der Proben:

Das gefrorene Plasma wurde aufgetaut, in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und die entsprechende Menge der Stammlösung beziehungsweise der Verdünnung zugegeben. Nach der Zugabe wurde die Probe am Schüttler homogenisiert. Um die Proteine zu fällen wurden jeweils 300 μl jeder Verdünnung in Reaktionsgefäße übergeführt und die 2,5 fache Menge angesäuertes ACN (750 μl) zugegeben. Zur Herstellung des angesäuerten ACN wurden pro ml ACN 20 μl H_3PO_4 (8,5%) versetzt. Für den Leerwert wurden 300 μl Plasma mit 750 μl angesäuertem ACN versetzt.



Abbildung 6: Schüttler Vortex® (Fotos Wimmer& Brommer)

Nach der Homogenisierung für 10 Sekunden am Schüttler wurde bei 13000 RPM (revolutions per minute) 5 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden 600µl des Überstandes in HPLC Gefäße übergeführt.

Folgende Konzentrationen wurden hergestellt:

Tabelle 9: Konzentrationen SN-38 im Plasma

	Konzentration	Verdünnungsschritte
A	5µM	30µl Stammlösung + 1970µl Plasma
B	2,5µM	1ml Verdünnung A + 1ml Plasma
C	1,25µM	1ml Verdünnung B + 1ml Plasma
D	0,625µM	1ml Verdünnung C + 1ml Plasma
E	0,3125µM	1ml Verdünnung D + 1ml Plasma
F	0,156µM	1ml Verdünnung E + 1ml Plasma
G	0,078µM	1ml Verdünnung F + 1ml Plasma
H	0,039µM	1ml Verdünnung G + 1ml Plasma

Nach der Vermessung der Konzentrationen in der HPLC-Anlage, wurden die zur Retentionszeit von 13,9min erhaltenen Peakflächen zu den verschiedenen Konzentrationen im Programm Graph Pad Prisma® eingetragen, eine Eichgerade erstellt, sowie deren statistische Parameter ermittelt:

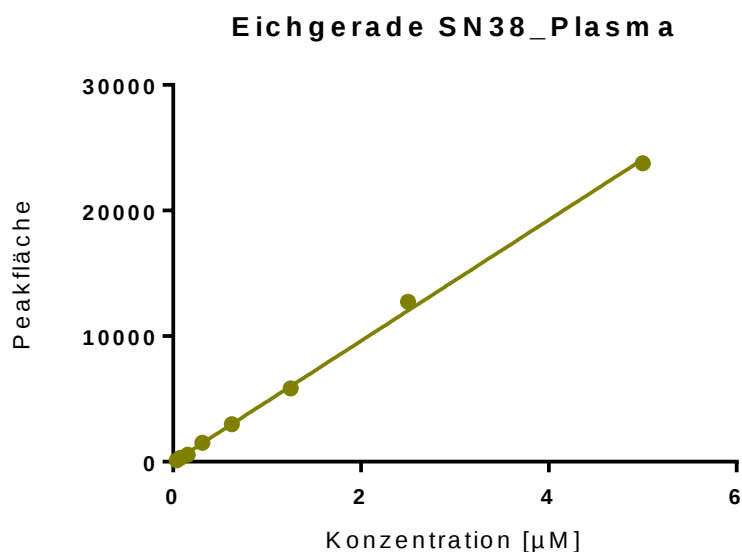


Abbildung 7: Eichgerade SN-38 im Plasma

Tabelle 10: Statistische Parameter der Eichgerade von SN-38 im Plasma

Best-fit values $\pm$ SE	
Slope	$4817 \pm 71,76$
Y-intercept when Y = 0	$-20,39 \pm 146,5$
X-intercept when X = 0	0,004232
95% Confidence Intervals	
Slope	4642 to 4993
Y-intercept when Y = 0	-378,8 to 338,1
X-intercept when X = 0	-0,0718 to 0,07696
Goodness of Fit	
R square	0,9987
Data	
Number of X values	8

SN-38 im Lebergewebe

Vorerst wurde eine 1:10 Verdünnung der 332µM Stammlösung von SN-38 hergestellt (100µl 332µM SN-38 Stammlösung, 450µl PBS und 450µl DMSO). Die Verdünnung auf 33,2µM ermöglichte größere Volumina für die weitere Arbeit, um mit den zur Verfügung stehenden Mikropipetten pipettieren zu können. In den entsprechenden Verdünnungsschritten mit PBS wurden verschiedene Konzentrationen hergestellt. Das schließlich erhaltene Endvolumen ergab sich, indem man die Einwaage der Lebergewebeprobe mit dem Faktor 5 multiplizierte und diese Menge an verdünntem SN-38 zugab.

Um das Verhältnis an SN-38 Stammlösung und PBS zur Verdünnung zu berechnen, wurde der Molarity Calculator (©2017 GraphPad Software) angewendet:

[Dilute a stock solution](#)

Stock concentration:	33.2	micromolar
Desired concentration:	2.5	micromolar
Desired volume:	1080	microliter
Required volume =		81.3253 microliter

Abbildung 8: Screenshot: Rechner zur Berechnung des benötigten Volumens an Stammlösung (©2017 GraphPad Software)

Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der Proben:

Die Leberproben wurden aufgetaut, mittels Sezierbesteckes und Analysenwaage zu etwa gleich großen Stücken zerschnitten, die genaue Einwaage ermittelt und mit der entsprechenden Menge PBS versetzt. Anschließend wurde die SN-38 Stammlösung zugegeben. Für den Leerwert wurden die Leberproben mit PBS auf das benötigte Endvolumen aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung mittels MiniLys® für je 3x 15sec. 300µl des gewonnenen Homogenisats wurden in ein Reaktionsgefäß übergeführt und mit der 2,5-fachen Menge angesäuertem ACN (750µl) wurden die Proteine gefällt. Nach 10 Sekunden Homogenisierung am Schüttler erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 RPM für 5 Minuten. Schließlich wurden jeweils 600µl in HPLC Gefäße übergeführt.



**Abbildung 9: Zuschneiden der Leberproben mittels Sezierbesteck
(Fotos Wimmer& Brommer)**

Folgende Konzentrationen wurden hergestellt:

Tabelle 11: Konzentrationen SN-38 im Lebergewebe

	Konzentration	Lebergewebe	x5	SN38/ 33,2µM	PBS	Endvolumen (Gewebe+ PBS+ SN-38 Stammlsg.)
A	2,5µM	180mg	900µl	81µl	820µl	1080µl
B	1,25µM	180mg	900µl	40,6µl	860µl	1080µl
C	0,625µM	170mg	850µl	19,2µl	830µl	1020µl
D	0,315µM	180mg	900µl	10,1µl	890µl	1080µl
E	0,156µM	190mg	950µl	5,35µl	945µl	1140µl

Nach der Vermessung der Konzentrationen in der HPLC-Anlage, wurden die bei Retentionszeit von 13,9min erhaltenen Peakflächen zu den verschiedenen Konzentrationen im Programm Graph Pad Prisma® eingetragen, eine Eichgerade erstellt, sowie deren statistische Parameter ermittelt:

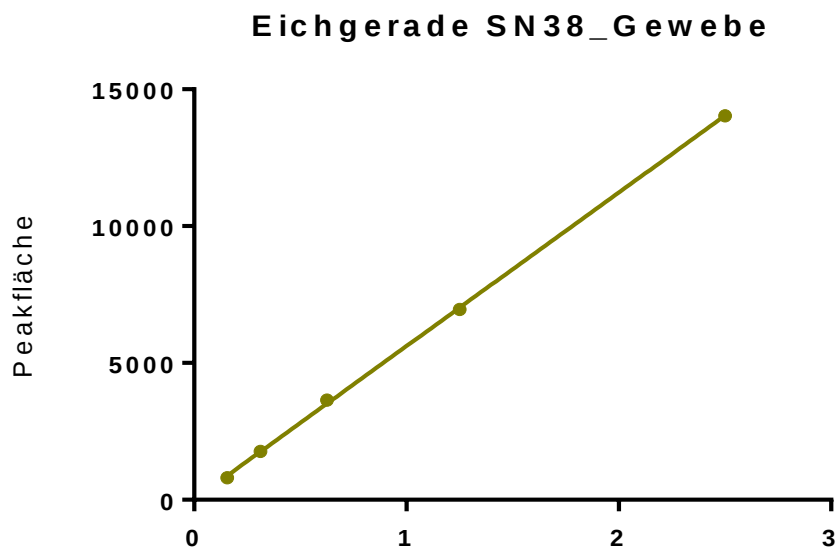


Abbildung 10: Eichgerade SN-38 im Lebergewebe

Tabelle 12: Statistische Parameter der Eichgerade von SN-38 im Lebergewebe

Best-fit values $\pm$ SE	
Slope	5611 $\pm$ 48,38
Y-intercept when Y = 0	5,341 $\pm$ 62,42
X-intercept when X = 0	-0,0009518
95% Confidence Intervals	
Slope	5457 to 5765
Y-intercept when Y = 0	-193,3 to 204
X-intercept when X = 0	-0,03713 to 0,03376
Goodness of Fit	
R square	0,9998
Data	
Number of X values	5

CPT-11 im Plasma

Ausgehend von einer Stammlösung von CPT-11 (34 μ mol), die mit Plasma auf 3 μ M verdünnt wurde, erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe. Zur Errechnung des erforderlichen Verhältnisses Stammlösung zu Plasma für die Ausgangskonzentration wurde der Molarity Calculator (©2017 GraphPad Software) zur Hilfe herangezogen.

Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der Proben

Die Aufarbeitung der Proben mit CPT-11 erfolgte analog zur Vorgehensweise bei SN-38 im Plasma.

Folgende Konzentrationen wurden hergestellt:

Tabelle 13: Konzentrationen CPT-11 im Plasma

	Konzentration	Verdünnungsschritte
A	3 μ M	176 μ l Stammlösung + 1824 μ l Plasma
B	1,5 μ M	1ml Verdünnung A + 1ml Plasma
C	0,75 μ M	1ml Verdünnung B + 1ml Plasma
D	0,375 μ M	1ml Verdünnung C + 1ml Plasma
E	0,188 μ M	1ml Verdünnung D + 1ml Plasma
F	0,094 μ M	1ml Verdünnung E + 1ml Plasma

Die statistischen Parameter sowie die Eichgerade wurden im Anschluss an die HPLC-Analyse mithilfe der bei der Retentionszeit 17,4min resultierenden Peakflächen im Programm Graph Pad Prisma® ermittelt.

Tabelle 14: Statistische Parameter der Eichgerade von CPT-11 im Plasma

Best-fit values $\pm$ SE	
Slope	1455 $\pm$ 8,721
Y-intercept when Y = 0	1,030 $\pm$ 12,33
X-intercept when X = 0	-0,0007082
95% Confidence Intervals	
Slope	1430 to 1479
Y-intercept when Y = 0	-33,20 to 35,26
X-intercept when X = 0	-0,02453 to 0,02257
Goodness of Fit	
R square	0,9999
Data	
Number of X values	6

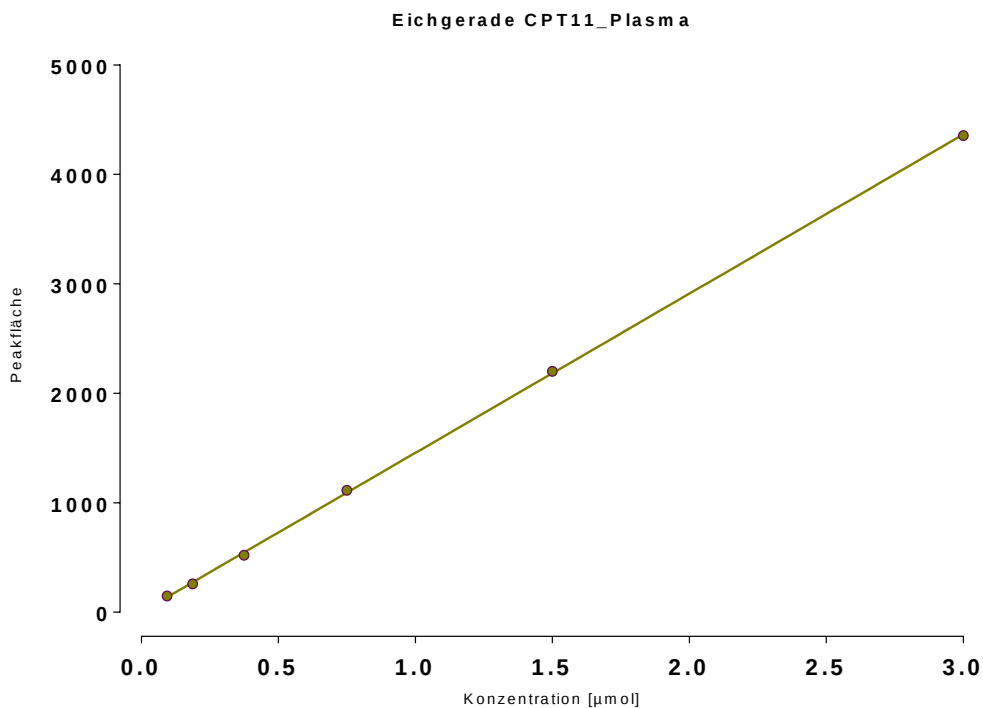


Abbildung 11: Eichgerade CPT-11 im Plasma

CPT-11 im Lebergewebe

Mit einer 34µM Stammlösung wurde eine Ausgangskonzentration von 3µM hergestellt und mit den entsprechenden Volumina an PBS eine Verdünnungsreihe hergestellt.



Abbildung 12: MiniLys® zur Homogenisierung (Fotos Wimmer& Brommer)

Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der Proben

Analog zur Aufarbeitung bei SN-38 im Lebergewebe

Folgende Konzentrationen wurden hergestellt:

Tabelle 15: Konzentrationen CPT-11 im Lebergewebe

	Konzentration	Lebergewebe	x5	CPT-11/ 34µM	PBS	Endvolumen (Gewebe+ PBS+ CPT-11 Stammlsg.)
A	3,0 µM	150mg	750µl	80µl	670µl	900µl
B	1,5 µM	140mg	700µl	37µl	663µl	840µl
C	0,75 µM	150mg	750µl	19,8µl	730,2µl	900µl
D	0,375 µM	160mg	800µl	10,6µl	789,4µl	960µl
E	0,188 µM	160mg	800µl	5,3µl	794,7µl	960µl

Nach der Vermessung der Konzentrationen in der HPLC-Anlage, wurden die bei der Retentionszeit von 17,4 min erhaltenen Peakflächen zu verschiedenen Konzentrationen im Programm Graph Pad Prisma® eingetragen, eine Eichgerade erstellt, sowie deren statistische Parameter ermittelt:

Tabelle 16: Statistische Parameter der Eichgerade von CPT-11 im Lebergewebe

Best-fit values $\pm$ SE	
Slope	1256 $\pm$ 14,11
Y-intercept when Y= 0	27,01 $\pm$ 21,85
X-intercept when X= 0	-0,02150
95% Confidence Intervals	
Slope	1211 to 1301
Y-intercept when Y = 0	-42,52 to 96,55
X-intercept when X = 0	-0,07900 to 0,03297
Goodness of Fit	
R square	0,9996
Data	
Number of X values	5

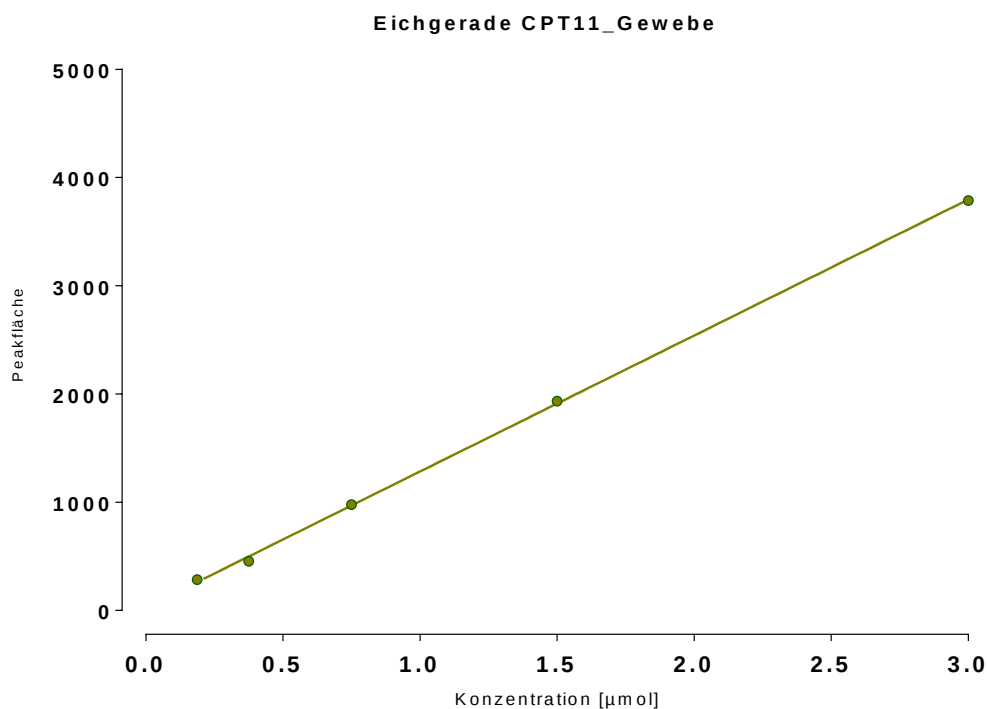


Abbildung 13: Eichgerade CPT-11 im Lebergewebe

3.4.3 Beispielchromatogramme von der Erstellung der Eichgerade

Die Peaks von CPT-11 beziehungsweise SN-38 sind im Chromatogramm zu den passenden Retentionszeiten zu finden:

SN-38: 13,9 min , CPT-11: 17,4 min

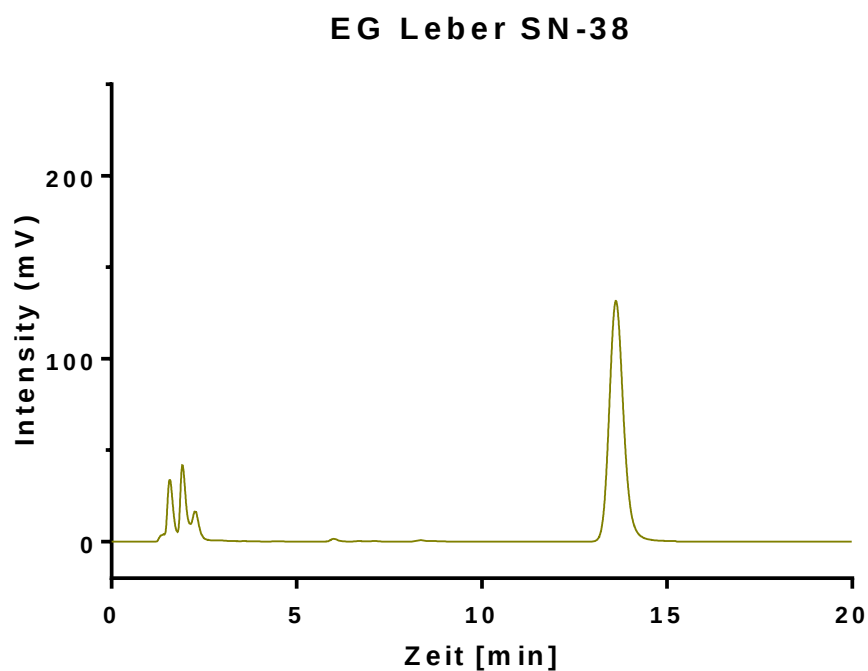
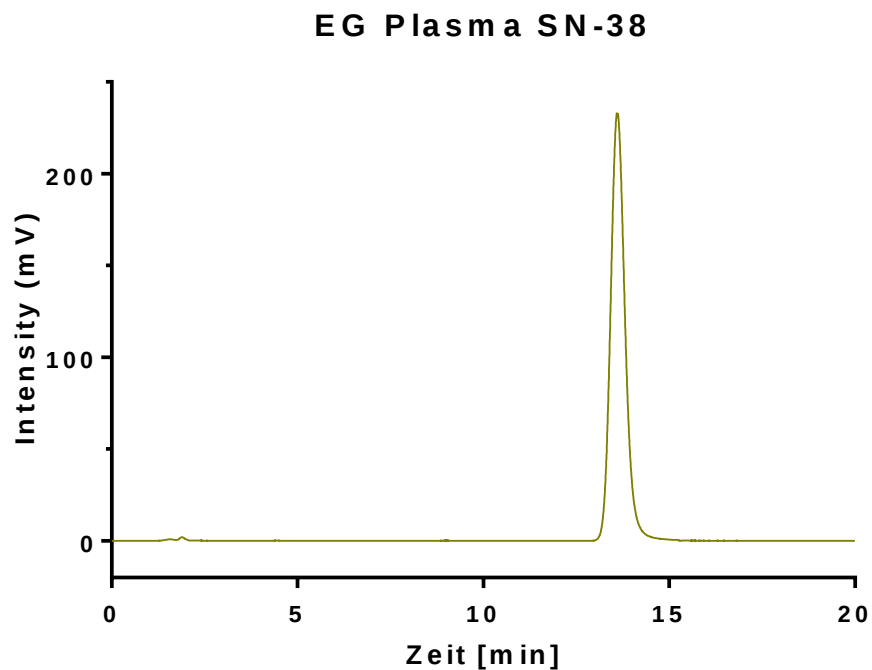


Abbildung 14: Beispielchromatogramme: Eichgerade SN-38 im Plasma und im Lebergewebe

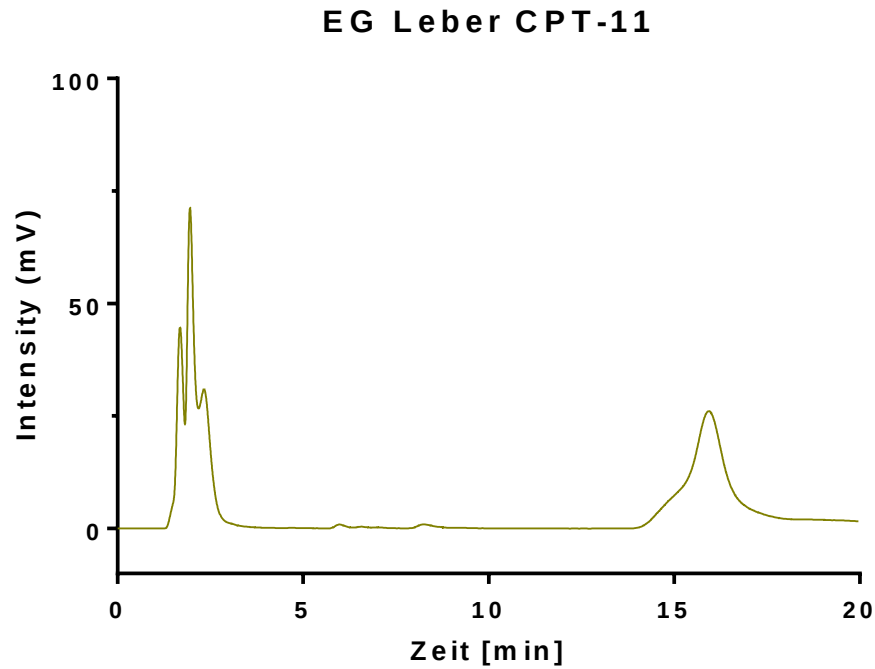
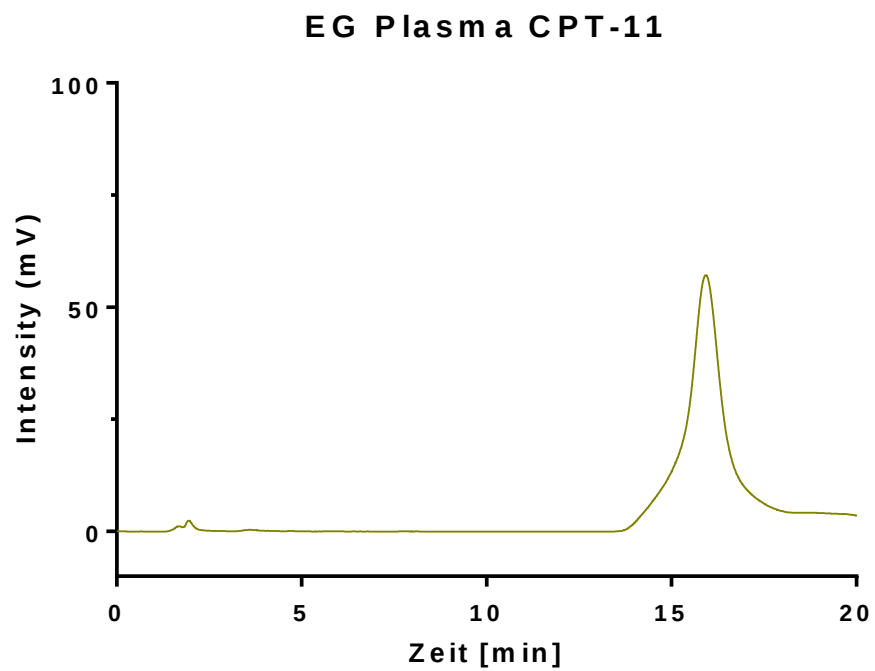


Abbildung 15: Beispielchromatogramme: Eichgerade CPT-11 im Plasma und im Lebergewebe

3.4.4 Vorbereitung und Aufarbeitung der Proben



Abbildung 16: Proben (Fotos Wimmer& Brommer)

Die zu untersuchenden Plasma- und Leberproben wurden analog zu den Proben zur Erstellung der Eichgerade aufgearbeitet, nur dass der Wirkstoff bereits in den Proben enthalten war und nicht mehr zugegeben werden musste. Bei den Plasmaproben wurden jeweils 200µl entnommen und mit 500µl angesäuertem ACN zur Proteinfällung und Freisetzung von CPT-11 und SN-38 versetzt. Bei den Leberproben erfolgte der Homogenisierungsschritt nach Zugabe der 10 fachen Menge (in µl) angesäuertem ACN, bezogen auf die Einwaage der Leberprobe, (ca.100mg)

(Siehe Abschnitt 3.4.)

3.4.5 Quantifizierung von CPT-11/ SN-38

Die Konzentrationen (x) von CPT-11 sowie SN-38 können mithilfe der linearen Funktion $y = kx + d$ errechnet werden.

y = Peakfläche bei Einspritzvolumen von 10µl

k = Steigung der Eichgerade

d = Abstand auf der y-Achse

Die Peakfläche wurde durch die HPLC-Analyse erhalten. Die Berechnung von k erfolgte durch das Auftragen mehrerer Peakflächen und ihren dazu passenden Konzentrationen auf einer Eichgerade. Die erhaltene Gerade hat eine bestimmte Steigung, die als k bezeichnet wird. Wenn die Eichgerade nicht genau durch den Nullpunkt der x- und y-Achse geht, so gibt d den Abstand der Gerade auf der y-Achse zum Nullpunkt an. Die Konzentration ist proportional zur Peakfläche.

Ermittelte k-Werte:

SN-38: Gewebe k= 5611, Plasma k= 4817

CPT-11: Gewebe k= 1256, d= 27, Plasma k= 1455

Bei den ersten Proben (NaCl 375-383 sowie Irinotecan systemisch 377-388) wurde für SN-38 aufgrund unterschiedlicher HPLC-Einstellungen eine andere Eichgerade: k= 8240, d= 250 (Plasma) / k=12971 (Leber) zur Auswertung herangezogen.

Plasmaproben: Konzentration (x) = y / k

Peakfläche/ k = Konzentration [$\mu\text{mol/ml}$]

Leberproben: Konzentration (x) = (y – d) x Faktor (3,14)/ k

Peakfläche – d / k = Konzentration [$\mu\text{mol/g}$]

Bei den Lebergewebeproben wurde die erhaltene Konzentration in $\mu\text{mol/ml}$ mit dem Faktor 3,14 multipliziert. Der Faktor kommt durch die Umrechnung aus der mit Lebergewebeproben erstellten Eichgerade zustande und erleichtert die Vergleichbarkeit von Plasma und Leberproben.

3.4.6 Beispielchromatogramme

In den folgenden Abbildungen sind Beispielchromatogramme der Rattenproben nach unterschiedlichen Applikationsarten von CPT-11 beziehungsweise NaCl-Lösung zu sehen. Die Blindprobe mit NaCl-Lösung weist im Chromatogramm keine Peaks im Bereich der Retentionszeiten von CPT-11 und SN-38 auf.

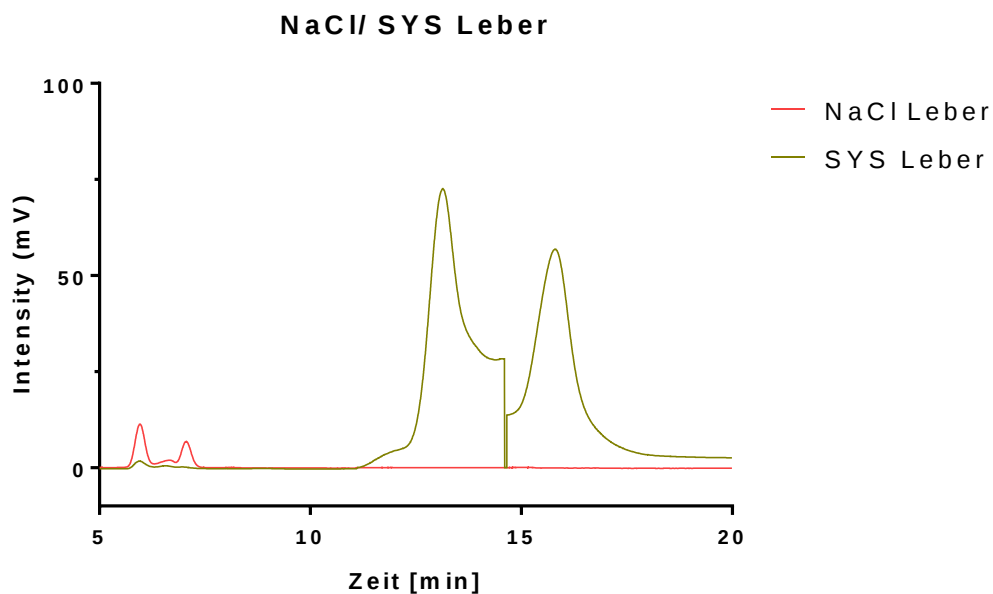
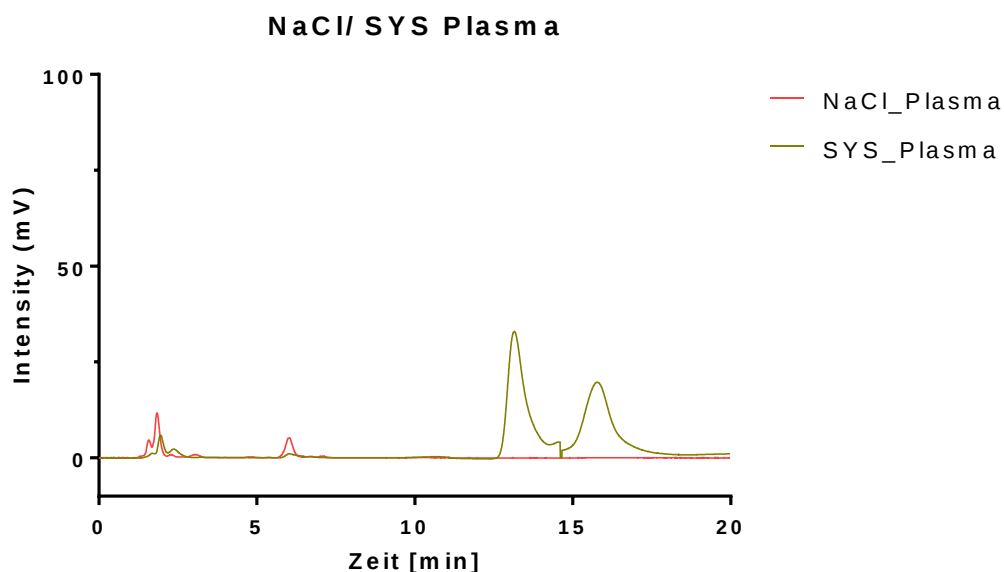


Abbildung 17: Beispielchromatogramm NaCl/ Irinotecan systemisch Plasma & Lebergewebe

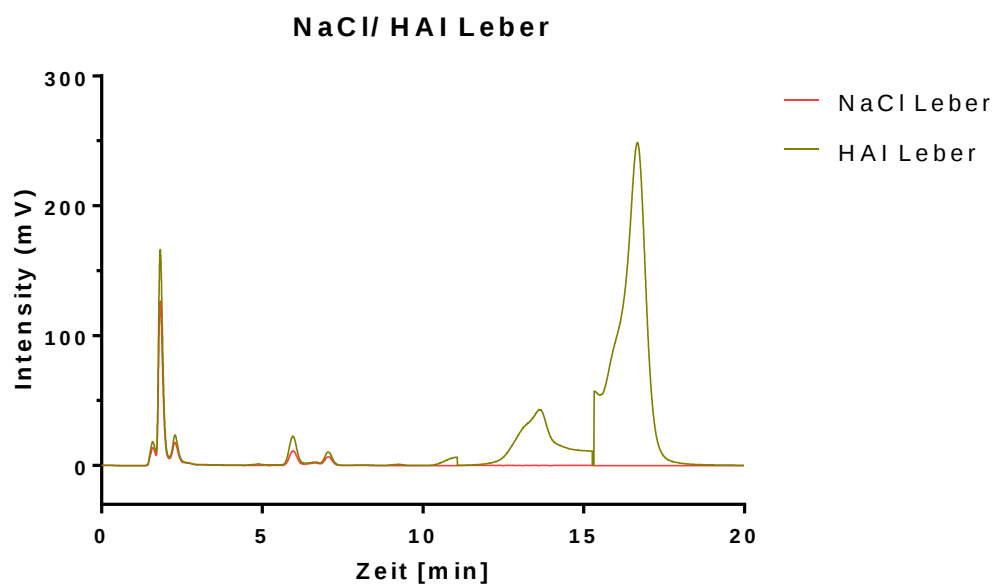
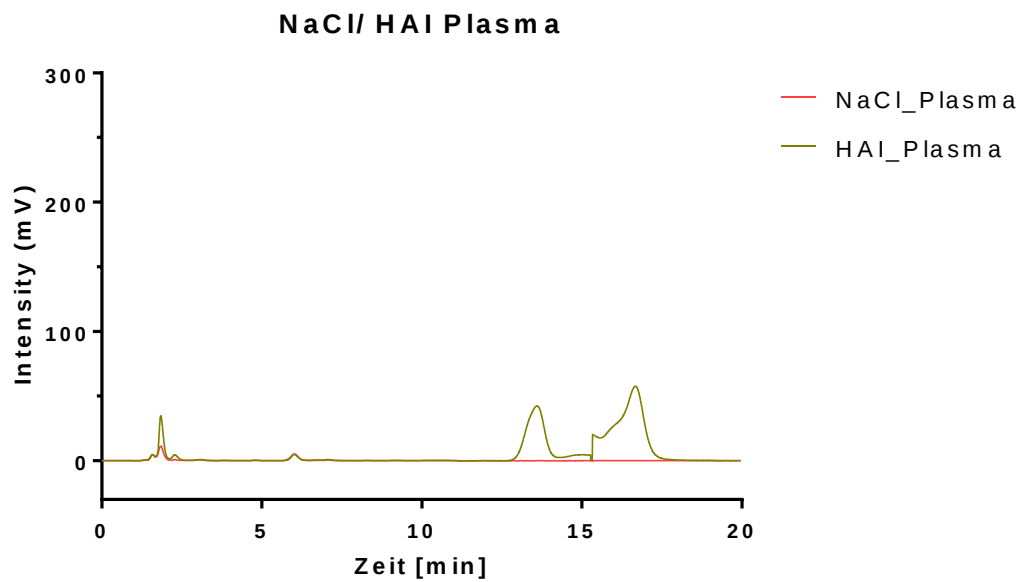
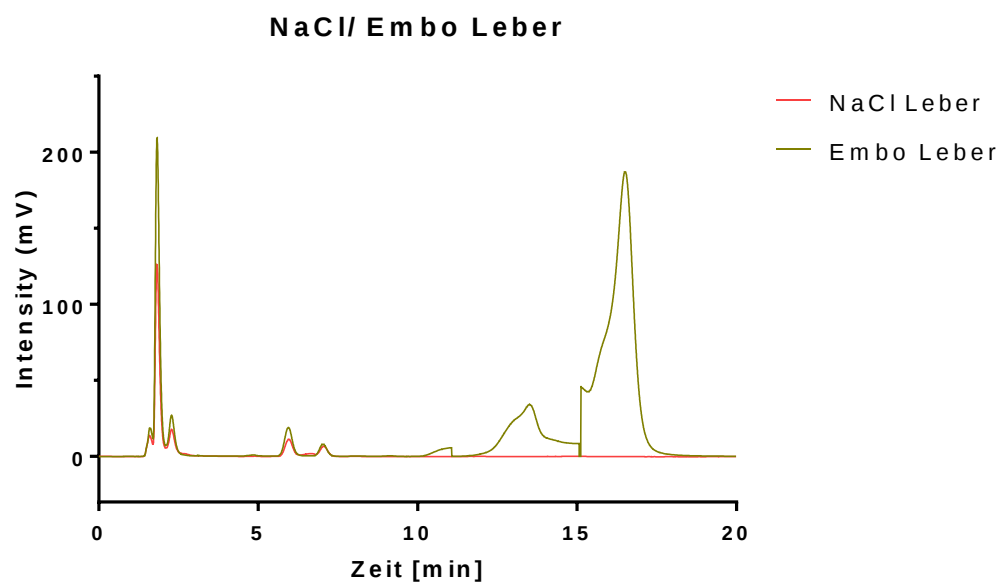
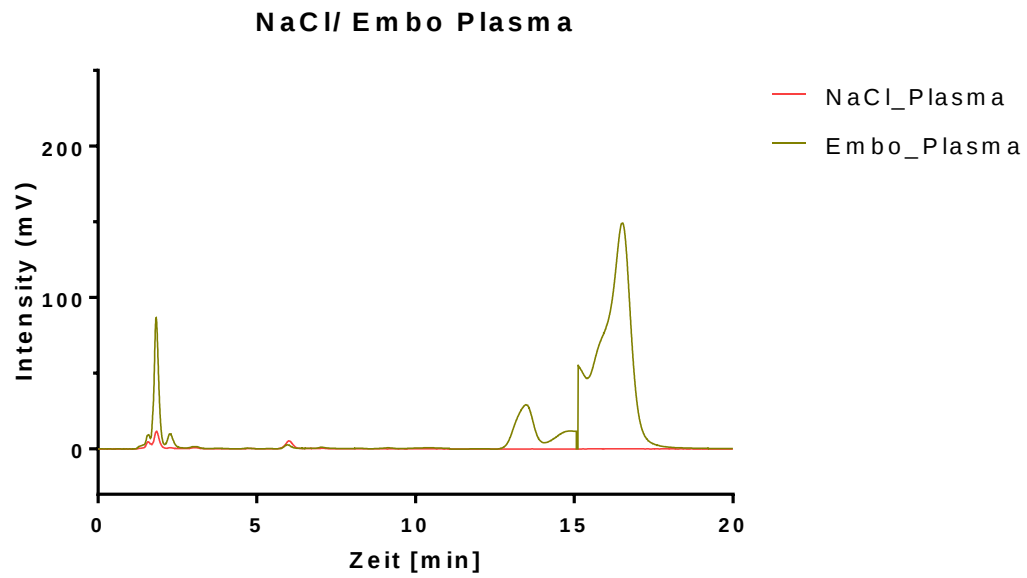
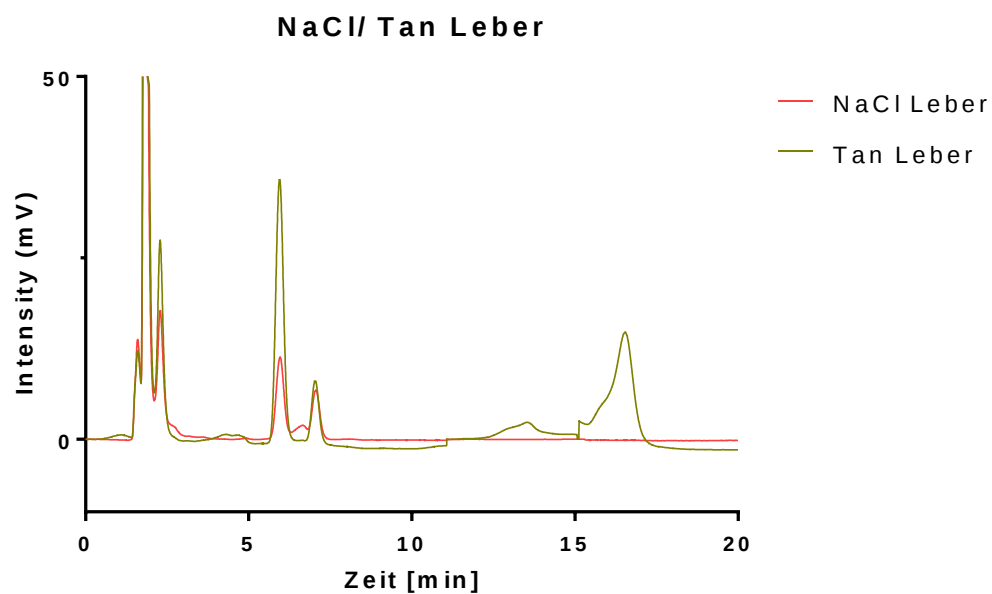
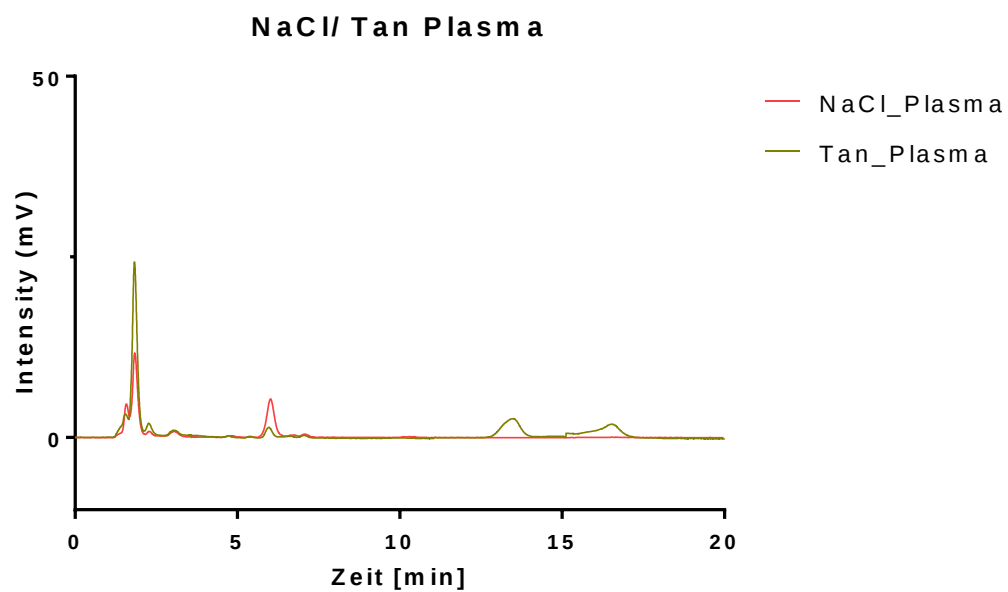


Abbildung 18: Beispielchromatogramm NaCl/ Irinotecan hepatoarteriell Plasma & Lebergewebe



**Abbildung 19: Beispielchromatogramm NaCl/ Irinotecan + EmboCept S® hepatoarteriell
Plasma & Lebergewebe**



**Abbildung 20: Beispielchromatogramm NaCl/ Irinotecan + TANDEM® hepatoarteriell
Plasma & Lebergewebe**

4. Berechnungen

4.1 Biometrie

Die Carboxylesterase (CES) ist für die Umwandlung von CPT-11 zu SN-38 verantwortlich. Mittels biometrischer Berechnungen kann eine Aussage über die Enzymaktivität der CES gemacht werden. Der Quotient aus CPT-11 und SN-38 ergibt R. Je höher R ist, desto aktiver ist die CES und desto mehr Wirkstoff ist entstanden:

$$R = \text{AUC}_{\text{SN-38}} / \text{AUC}_{\text{CPT-11}}$$

AUC= area under the curve (Peakfläche)

(Kim 2007)

Die Berechnungen wurden mittels Microsoft® Excel durchgeführt.

4.2 Beschreibende (deskriptive) Statistik

Es wurden Mittelwert (MW) sowie Standardabweichung (SD) sowohl der R- Werte, als auch der ermittelten Konzentrationen von SN-38 und CPT-11 berechnet.

Die Berechnungen wurden mittels Microsoft® Excel durchgeführt.

$$\text{Mittelwert: } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Standardabweichung: } \sigma^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2$$

4.3 Schließende (induktive) Statistik

Mittels t-Test und Varianzanalyse (ANOVA) wurden die Proben auf Unterschiede bezüglich der Mittelwerte verglichen. Hierbei wurden einerseits die R-Werte über die Enzymaktivität und andererseits die im Probenmaterial ermittelten Konzentrationen von SN-38 und CPT-11 herangezogen.

4.3.1 t-Test

Aufgrund der kleinen Anzahl an Proben liegt es nahe, den t-Test zur Interpretation der Daten anzuwenden, da in diesem Fall keine Normalverteilung sondern die t-Verteilung zugrunde liegt. Je weniger Stichproben analysiert werden, desto flacher ist die Verteilung, je mehr analysiert werden, desto mehr nähert sie sich einer Normalverteilung.

Der t-Test kann dazu verwendet werden, zwei Sätze an Proben miteinander zu vergleichen.

(Bärlocher 1999)

Um die Ergebnisse auszuwerten eignet sich ein zweiseitiger, ungepaarter, unabhängiger t-Test.

Zweiseitig bedeutet, dass der Wahrscheinlichkeitsverteilung sowohl nach oben hin, als auch nach unten hin Grenzen gesetzt werden, da Ergebnisse in beide Richtungen als etwa gleich wahrscheinlich angenommen werden.

(John 1997)

Die Anwendung eines ungepaarten beziehungsweise unabhängigen t-Tests erfolgt aufgrund der zufälligen Probenentnahme.

(Bärlocher 1999)

Ist der aus dem t-Test resultierende p-Wert kleiner als 0,05, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass man eine Nullhypothese irrtümlicherweise verwirft, kleiner als 5%. Ist er jedoch größer als 0,05, so kann man die Nullhypothese, dass zwischen zwei Proben kein signifikanter Unterschied besteht, verwerfen und sie als signifikant unterschiedlich einordnen.

(John 1997)

Die Berechnungen wurden mittels GraphPad Prism® 6.0 durchgeführt.

4.3.2 ANOVA (Analysis of Variance) = Varianzanalyse

Um drei oder mehr Proben miteinander zu vergleichen, kann auch die Varianzanalyse (ANOVA) angewandt werden.

(Bärlocher 1999)

Die Varianzanalyse ermittelt, ob Mittelwerte aus Stichproben aus Verteilungen mit demselben Mittelwert stammen. Treten Streuungen zwischen den Mittelwerten auf, die größer sind als die Streuungen der Einzelwerte in den Gruppen, so schließt man auf einen signifikanten Unterschied.

(Bultmann 2012)

Die Berechnungen wurden mittels GraphPad Prism® 6.0 durchgeführt.

4.4 Verwendete Software

Microsoft® Office Excel 2007

Microsoft® Office Word 2007

GraphPad Prism® 6.0

Chromaster HPLC System Manager®

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Chromatogramme – Konzentrationsverläufe

In der HPLC-Analyse kann man die Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 sowie anderen Metaboliten nebeneinander aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten erkennen. Die Peakfläche gibt Aufschluss über die Konzentration.

Datenmaterial

Einwaagen der Proben/ berechnetes Volumen an ACN zur Proteinfällung:

Zur systemischen Applikation von NaCl in Plasma und Lebergewebe sind keine Konzentrationsangaben angeführt, da es sich hierbei um Blindproben handelt. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu den Proben mit Wirkstoff.

Abkürzungen Tabelle:

Probe = Probenbezeichnung

Vol [ml] = Volumen der Probe in ml

EW [mg] = Einwaage der Probe in mg

F= Faktor zur Berechnung der nötigen Menge an Acetonitril

ACN [ml] = Volumen Acetonitril in ml

F EG= Faktor Eichgerade

PF SN-38= Peakfläche SN-38 bei 10µl Einspritzvolumen

PF CPT-11= Peakfläche CPT-11 bei 10µl Einspritzvolumen

µmol/ml SN-38 = ermittelte Konzentration SN-38

µmol/ml CPT-11 = ermittelte Konzentration CPT-11

Tabelle 17: Systemische Applikation – Volumina - Plasma / NaCl

Probe	Vol [ml]	F	ACN [ml]
NaCl 375	200	2,5	500
NaCl 376	200	2,5	500
NaCl 382	200	2,5	500
NaCl 383	200	2,5	500
NaCl 389	200	2,5	500
NaCl 394	200	2,5	500
NaCl 395	200	2,5	500
NaCl 396	200	2,5	500

Tabelle 18: Systemische Applikation – Konzentrationen im Plasma / Irinotecan

Probe	Vol [ml]	F	ACN [ml]	F EG	PF SN-38	PF CPT-11	µmol/ml SN-38	µmol/ml CPT-11
SYS 377	200	2,5	500	1	2128	366	0,26	0,25
SYS 378	200	2,5	500	1	1099	216	0,13	0,15
SYS 379	200	2,5	500	1	0	0	0,00	0,00
SYS 384	200	2,5	500	1	1556	403	0,19	0,28
SYS 385	200	2,5	500	1	1251	297	0,15	0,20
SYS 386	200	2,5	500	1	1178	781	0,14	0,54
SYS 387	200	2,5	500	1	1040	506	0,13	0,35
SYS 388	200	2,5	500	1	1564	597	0,19	0,41
SYS 416	200	2,5	500	1	2060	2789	0,43	1,92
SYS 419	200	2,5	500	1	1840	1773	0,38	1,22
SYS 420	200	2,5	500	1	1370	1948	0,28	1,34
SYS 423	200	2,5	500	1	1730	3312	0,36	2,28

Tabelle 19: Systemische Applikation – Einwaagen/ Volumina - Lebergewebe/ NaCl

Proben	EW [mg]	F	ACN [ml]
NaCl 375	117	10	1170
NaCl 376	146	10	1460
NaCl 382	119	10	1190
NaCl 383	125	10	1250
NaCl 389	104,5	10	1045
NaCl 394	119	10	1190
NaCl 395	125	10	1250
NaCl 396	113,8	10	1138

Tabelle 20: Systemische Applikation – Konzentrationen im Lebergewebe/ Irinotecan

Probe	EW [ml]	F	ACN [ml]	F EG	PF SN-38	PF CPT-11	µmol/ml SN-38	µmol/ml CPT-11	µmol/g SN-38	µmol/g CPT-11
SYS 377	105	10	1050	3,14	4005	4145	0,31	3,28	0,97	10,30
SYS 378	124	10	1240	3,14	3574	2458	0,28	1,94	0,87	6,08
SYS 379	110	10	1100	3,14	2587	707	0,20	0,54	0,63	1,70
SYS 384	98	10	980	3,14	4801	4328	0,37	3,42	1,16	10,76
SYS 385	116	10	1160	3,14	2675	2514	0,21	1,98	0,65	6,22
SYS 386	99	10	990	3,14	3662	3119	0,28	2,46	0,89	7,74
SYS 387	123	10	1230	3,14	3369	2443	0,26	1,92	0,82	6,05
SYS 388	129	10	1290	3,14	3291	3021	0,25	2,38	0,80	7,49

Tabelle 21: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Plasma/ Irinotecan

Probe	Vol [ml]	F	ACN [ml]	F EG	PF SN-38	PF CPT-11	µmol/ml SN-38	µmol/ml CPT-11
HAI 390	200	2,5	500	1	1009	2176	0,21	1,50
HAI 391	200	2,5	500	1	1568	3246	0,33	2,23
HAI 392	200	2,5	500	1	1372	2390	0,28	1,64
HAI 393	200	2,5	500	1	1353	2896	0,28	1,99
HAI 397	200	2,5	500	1	1123	4436	0,23	3,05
HAI 399	200	2,5	500	1	1293	2196	0,27	1,51
HAI 400	200	2,5	500	1	824	5330	0,17	3,66
HAI 409	200	2,5	500	1	612	10391	0,13	7,14

Tabelle 22: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Lebergewebe/ Irinotecan

Probe	EW [mg]	F	ACN [ml]	F EG	PF SN-38	PF CPT-11	µmol/ml SN-38	µmol/ml CPT-11	µmol/g SN-38	µmol/g CPT-11
HAI 390	98,9	10	989	3,14	1546	13622	0,28	10,82	0,87	34,0
HAI 391	102,6	10	1026	3,14	1698	18459	0,30	14,68	0,95	46,1
HAI 392	110	10	1100	3,14	1907	13210	0,34	10,50	1,07	33,0
HAI 393	103,9	10	1039	3,14	1431	12705	0,26	10,09	0,80	31,7
HAI 397	92,6	10	926	3,14	2043	28752	0,36	22,87	1,14	71,9
HAI 399	98,8	10	988	3,14	1583	13783	0,28	10,95	0,89	34,4
HAI 400	90,3	10	903	3,14	2252	22445	0,40	17,85	1,26	56,1
HAI 409	99,8	10	998	3,14	2008	26669	0,36	21,21	1,12	66,67

Tabelle 23: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Plasma/ Irinotecan + EmboCept S®

Probe	Vol [ml]	F	ACN [ml]	F EG	PF SN-38	PF CPT-11	µmol/ml SN-38	µmol/ml CPT-11
E 402	200	2,5	500	1	728	1674	0,15	1,15
E 403	200	2,5	500	1	1159	1569	0,24	1,08
E 404	200	2,5	500	1	499	2736	0,10	1,88
E 405	200	2,5	500	1	577	2260	0,12	1,55
E 406	200	2,5	500	1	1169	8589	0,24	5,90
E 407	200	2,5	500	1	886	1904	0,18	1,31
E 408	200	2,5	500	1	2677	41964	0,56	28,84
E 415	200	2,5	500	1	1682	2066	0,35	1,42

Tabelle 24: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Lebergewebe/ Irinotecan + EmboCept S®

Probe	EW [mg]	F	ACN [ml]	F EG	PF SN-38	PF CPT-11	µmol/ml SN-38	µmol/ml CPT-11	µmol/g SN-38	µmol/g CPT-11
E 402	99,8	10	998	3,14	1730	10114	0,31	8,03	0,97	25,2
E 403	98,8	10	988	3,14	1246	6861	0,22	5,44	0,70	17,1
E 404	109,5	10	1095	3,14	1456	9806	0,26	7,79	0,82	24,5
E 405	107,2	10	1072	3,14	868	11793	0,15	9,37	0,49	29,4
E 406	105,1	10	1051	3,14	1772	52194	0,32	41,53	0,99	130,5
E 407	106,4	10	1064	3,14	1008	11573	0,18	9,19	0,56	28,9
E 408	93,5	10	935	3,14	22776	369120	4,06	293,86	12,76	923,6
E 415	102,5	10	1025	3,14	2737	13246	0,49	10,52	1,53	33,1

Tabelle 25: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Plasma/ Irinotecan TANDEM®

Probe	Vol [ml]	F	ACN [ml]	F EG	PF SN-38	PF CPT-11	µmol/ml SN-38	µmol/ml CPT-11
T 411	200	2,5	500	1	728	1674	0,15	1,15
T 412	200	2,5	500	1	1159	1569	0,24	1,08
T 413	200	2,5	500	1	499	2736	0,10	1,88
T 417	200	2,5	500	1	577	2260	0,12	1,55
T 418	200	2,5	500	1	1169	8589	0,24	5,90
T 421	200	2,5	500	1	886	1904	0,18	1,31
T 422	200	2,5	500	1	2677	41964	0,56	28,84
T 424	200	2,5	500	1	1682	2066	0,35	1,42

Tabelle 26: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Lebergewebe/ Irinotecan TANDEM®

Probe	EW [mg]	F	ACN [ml]	F EG	PF SN-38	PF CPT-11	µmol/ml SN-38	µmol/ml CPT-11	µmol/g SN-38	µmol/g CPT-11
T 411	95,4	10	954	3,14	1730	10114	0,31	8,03	0,97	25,2
T 412	105,7	10	1057	3,14	1246	6861	0,22	5,44	0,70	17,1
T 413	99,3	10	993	3,14	1456	9806	0,26	7,79	0,82	24,5
T 417	101,6	10	1016	3,14	868	11793	0,15	9,37	0,49	29,4
T 418	102,9	10	1029	3,14	1772	52194	0,32	41,53	0,99	130,5
T 421	100,7	10	1007	3,14	1008	11573	0,18	9,19	0,56	28,9
T 422	105,3	10	1053	3,14	22776	369120	4,06	293,86	12,76	923,6
T 424	105,4	10	1054	3,14	2737	13246	0,49	10,52	1,53	33,1

5.3. Biometrische Auswertung

$$R = \text{AUC}_{\text{SN-38}} / \text{AUC}_{\text{CPT-11}}$$

Tabelle 27: R- Werte bei unterschiedlicher Applikation in verschiedenen Kompartimenten

R-Werte systemische Applikation		
	Plasma	Leber
SYS 377	1,027	0,094
SYS 378	0,898	0,142
SYS 379		0,368
SYS 384	0,682	0,108
SYS 385	0,744	0,104
SYS 386	0,266	0,115
SYS 387	0,363	0,135
SYS 388	0,463	0,106
SYS 416	0,223	0,052
SYS 419	0,313	0,049
SYS 420	0,212	0,055
SYS 423	0,158	0,050
Mittelwert	0,486	0,115
SD	0,302	0,086

R-Werte EmboCept S®		
	Plasma	Leber
E 402	0,13	0,04
E 403	0,22	0,04
E 404	0,06	0,03
E 405	0,08	0,02
E 406	0,04	
E 407	0,14	0,02
E 408		
E 415	0,25	0,05
Mittelwert	0,13	0,03
SD	0,08	0,01

R-Werte hepatoarterielle Applikation		
	Plasma	Leber
HAI 390	0,140	0,025
HAI 391	0,146	0,021
HAI 392	0,173	0,032
HAI 393	0,141	0,025
HAI 397	0,076	0,016
HAI 399	0,178	0,026
HAI 400	0,047	0,022
HAI 409	0,018	0,017
Mittelwert	0,115	0,023
SD	0,049	0,005

R-Werte TANDEM®		
	Plasma	Leber
T 413		
T 417	1,96	0,12
T 418		
T 421		0,05
T 422	3,85	0,05
T 424		
Mittelwert	2,91	0,07
SD	1,33	0,04

Tabelle 28: T-Test R-Werte Lebergewebe

R-Werte Leber							
SYS	HAI		SYS	TAN		SYS	Embo
0,094	0,025		0,094	0,025		0,094	0,04
0,142	0,021		0,142	0,021		0,142	0,04
0,368	0,032		0,368	0,032		0,368	0,03
0,108	0,025		0,108	0,025		0,108	0,02
0,104	0,016		0,104	0,016		0,104	
0,115	0,026		0,115	0,026		0,115	0,02
0,135	0,022		0,135	0,022		0,135	
0,106	0,017		0,106	0,018		0,106	0,05
0,052			0,052			0,052	
0,049			0,049			0,049	
0,055			0,055			0,055	
0,050			0,050			0,050	
p= 0,0081			p= 0,4415			p= 0,0376	

Tabelle 29: T-Test R-Werte Plasma

R-Werte Plasma							
SYS	HAI		SYS	TAN		SYS	Embo
1,027	0,14		1,027			1,027	0,14
0,898	0,146		0,898			0,898	0,146
	0,173			1,96			0,173
0,682	0,141		0,682			0,682	0,141
0,744	0,076		0,744			0,744	0,076
0,266	0,178		0,266	3,85		0,266	0,178
0,363	0,047		0,363			0,363	0,047
0,463	0,018		0,463			0,463	0,018
0,223			0,223			0,223	
0,313			0,313			0,313	
0,212			0,212			0,212	
0,158			0,158			0,158	
p=0,0034			p <0,0001			p= 0,0083	

5.2 Deskriptive Statistik

In den folgenden Tabellen sind die Mittelwerte sowie Standardabweichungen von CPT-11 und SN-38 in Plasma und Lebergewebe angeführt:

Tabelle 30: Mittelwerte CPT-11& SN-38

CPT-11	Plasma	Leber
SYS 377	0,25	10,30
SYS 378	0,15	6,08
SYS 379	0,00	1,70
SYS 384	0,28	10,76
SYS 385	0,20	6,22
SYS 386	0,54	7,74
SYS 387	0,35	6,05
SYS 388	0,41	7,49
SYS 416	1,92	34,44
SYS 419	1,22	24,30
SYS 420	1,34	26,67
SYS 423	2,28	37,75
Mittelwert	0,75	14,96
Standard-abweichung	0,76	12,36

HAI 390	1,50	34,02
HAI 391	2,23	46,12
HAI 392	1,64	32,99
HAI 393	1,99	31,72
HAI 397	3,05	71,88
HAI 399	1,51	34,42
HAI 400	3,66	56,10
HAI 409	7,14	66,67
Mittelwert	2,84	46,74
Standard-abweichung	1,90	16,25

E 402	1,15	25,20
E 403	1,08	17,10
E 404	1,88	24,47
E 405	1,55	29,44
E 406	5,90	
E 407	1,31	28,89
E 408	19,51	
E 415	1,42	33,10
Mittelwert	4,23	26,37
Standard-abweichung	6,379	5,51

SN-38	Plasma	Leber
SYS 377	0,26	0,97
SYS 378	0,13	0,87
SYS 379	0,00	0,63
SYS 384	0,19	1,16
SYS 385	0,15	0,65
SYS 386	0,14	0,89
SYS 387	0,13	0,82
SYS 388	0,19	0,80
SYS 416	0,43	1,79
SYS 419	0,38	1,18
SYS 420	0,28	1,47
SYS 423	0,36	1,88
Mittelwert	0,22	1,09
Standard-abweichung	0,13	0,42

HAI 390	0,21	0,87
HAI 391	0,33	0,95
HAI 392	0,28	1,07
HAI 393	0,28	0,80
HAI 397	0,23	1,14
HAI 399	0,27	0,89
HAI 400	0,17	1,26
HAI 409	0,13	1,12
Mittelwert	0,24	1,01
Standard-abweichung	0,07	0,16

E 402	0,15	0,97
E 403	0,24	0,70
E 404	0,10	0,82
E 405	0,12	0,49
E 406	0,24	0,99
E 407	0,18	0,56
E 408	0,56	
E 415	0,35	1,53
Mittelwert	0,24	0,86
Standard-abweichung	0,15	0,35

CPT-11	Plasma	Leber
--------	--------	-------

T 413	0,00	0,0
T 417	0,01	0,7
T 418	0,00	0,0
T 421	0,00	1,1
T 422	0,01	1,6
T 424	0,00	0,0
Mittelwert	0,00	0,56
Standard-abweichung	0,01	0,69

SN-38	Plasma	Leber
-------	--------	-------

T 413	0,00	0,02
T 417	0,03	0,08
T 418	0,00	0,02
T 421	0,01	0,06
T 422	0,03	0,08
T 424	0,00	0,02
Mittelwert	0,01	0,05
Standard-abweichung	0,01	0,03

Es folgen einige Abbildungen der ermittelten Konzentrationen von SN-38 und CPT-11 nach unterschiedlichen Applikationsarten in logarithmischer Darstellung:

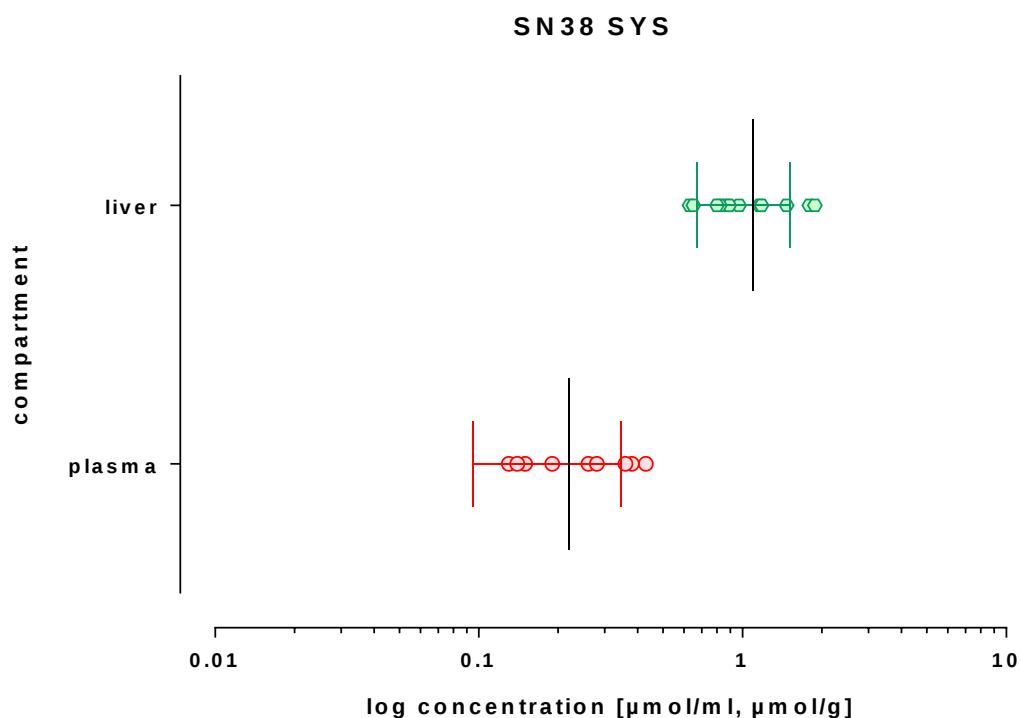


Abbildung 6: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 bei systemischer Applikation

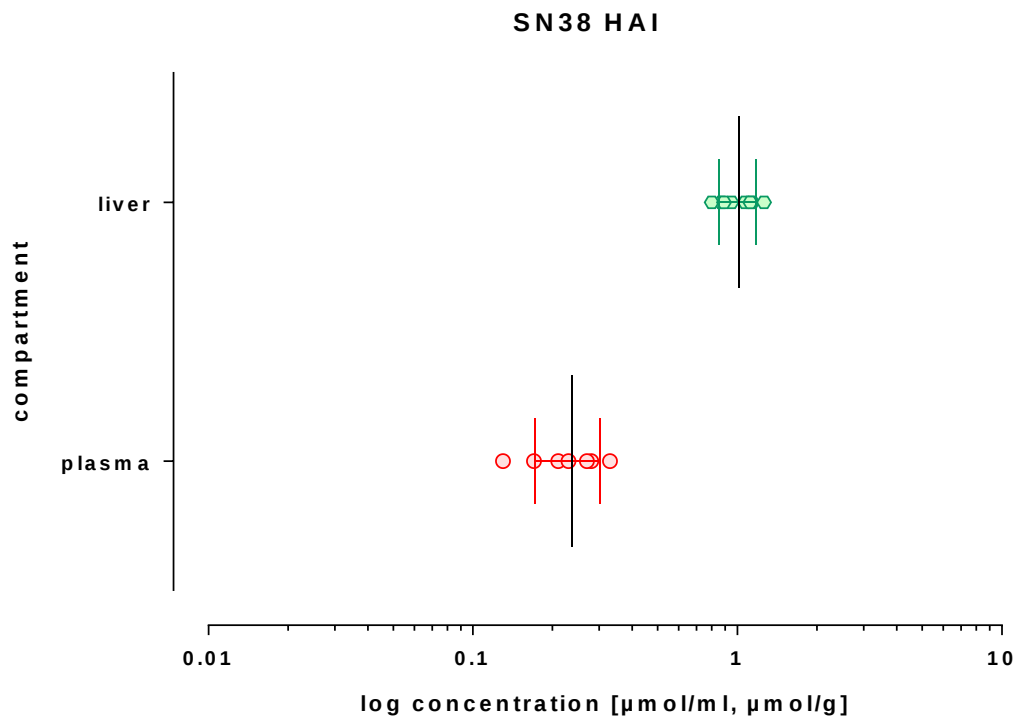


Abbildung 72: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 bei hepatoarterieller Applikation

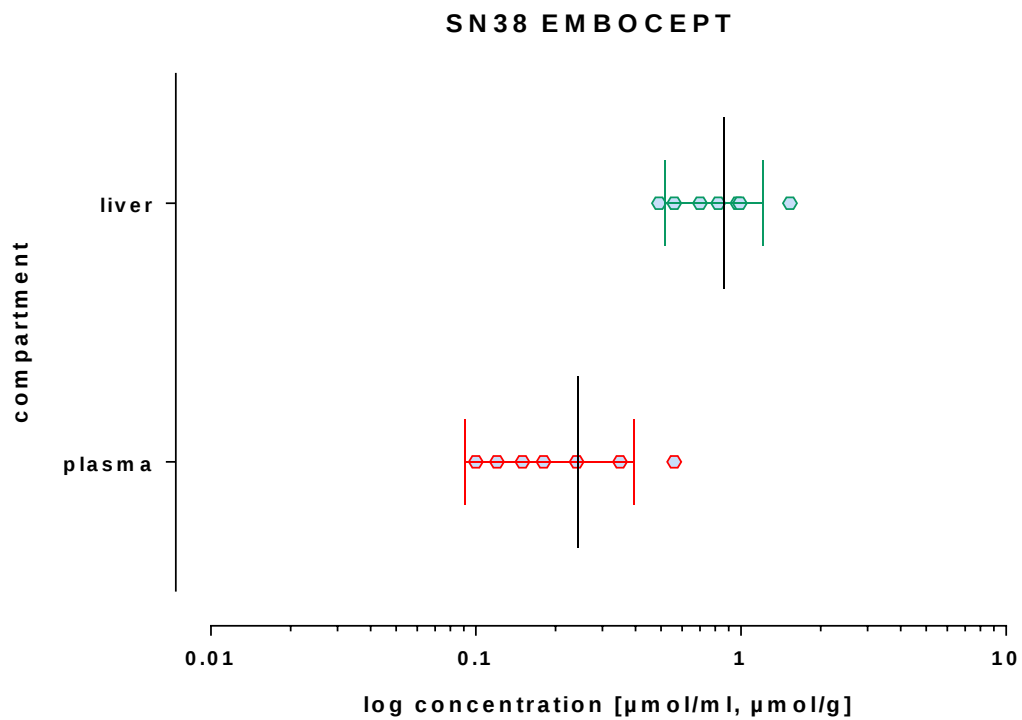


Abbildung 23: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 bei hepatoarterieller Applikation mit EmboCept S®

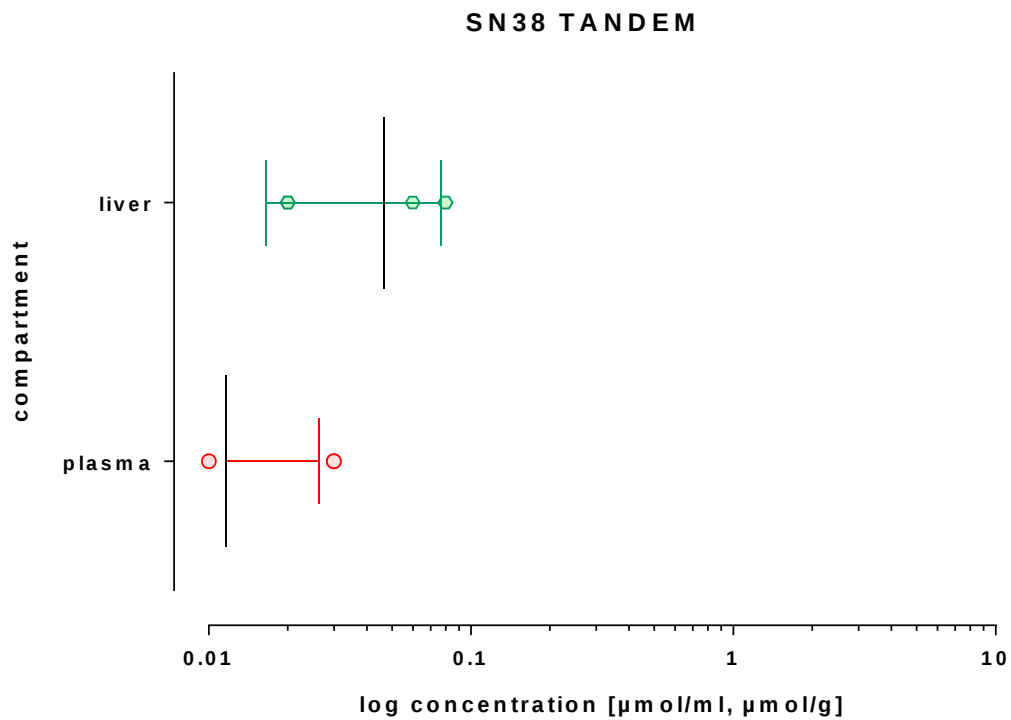


Abbildung 24: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 bei hepatoarterieller Applikation mit TANDEM®

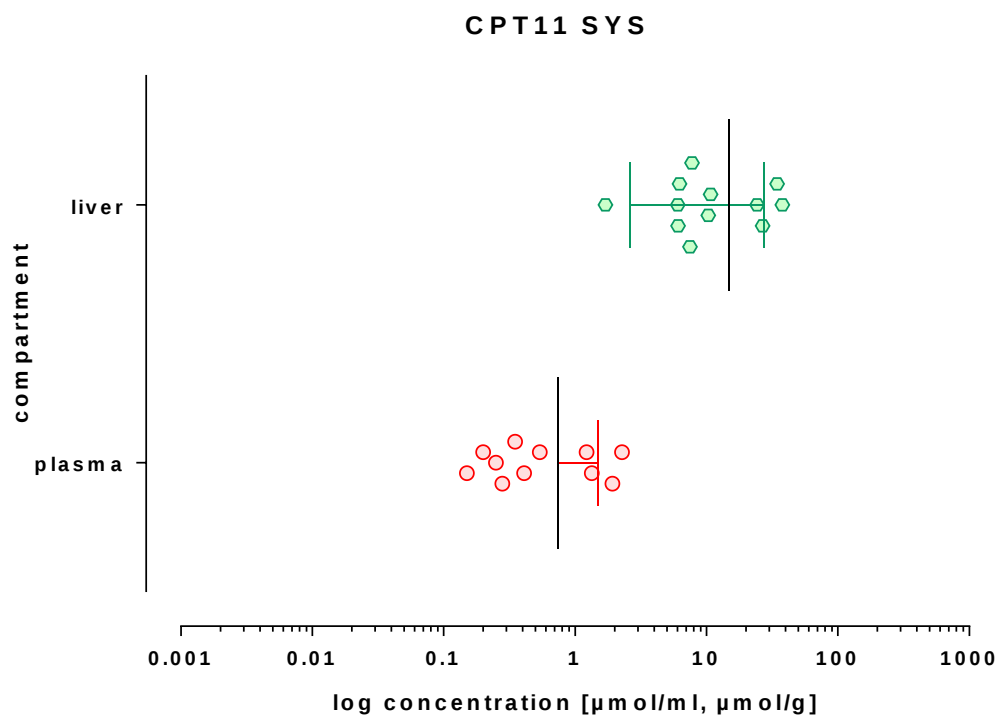


Abbildung 25: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 bei systemischer Applikation

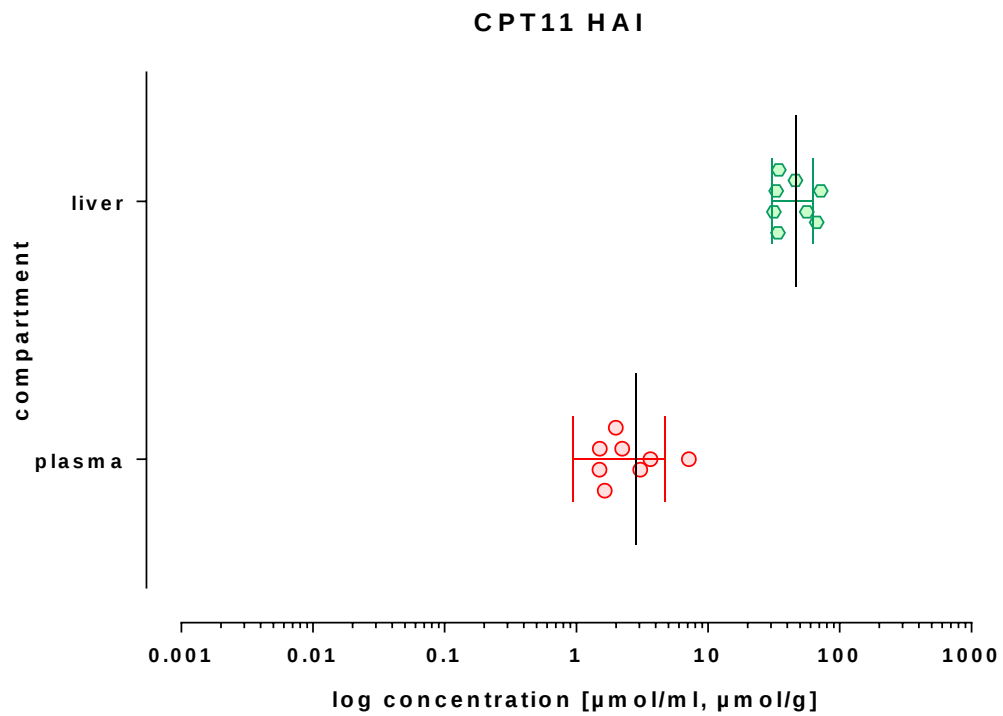


Abbildung 26: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 bei hepatoarterieller Applikation

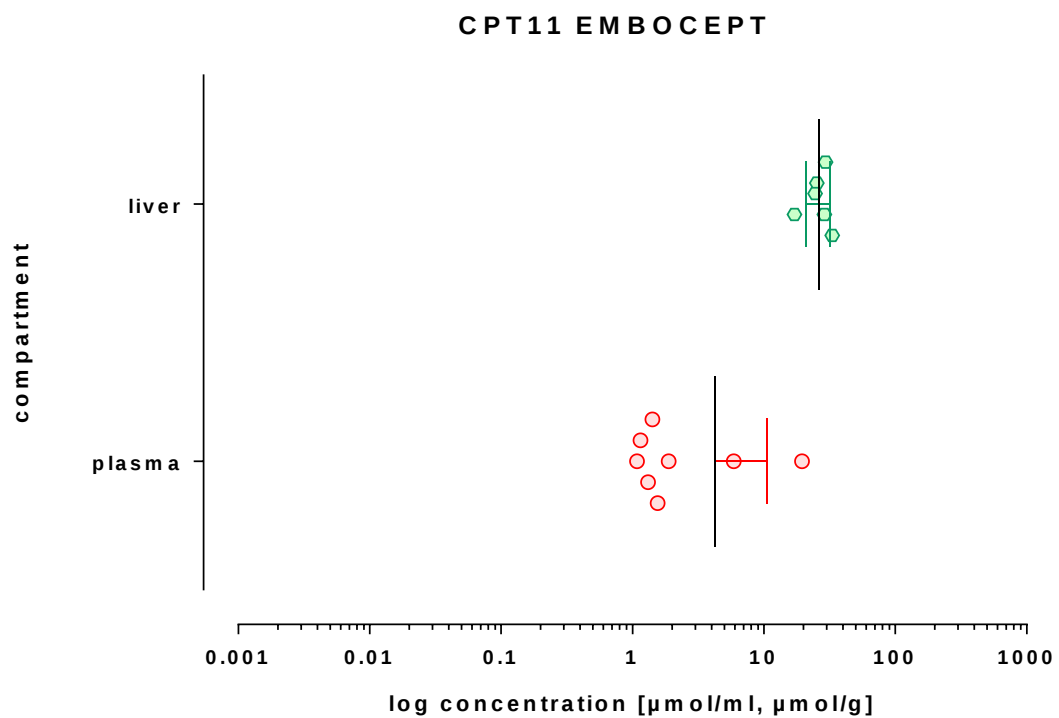


Abbildung 27: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 bei hepatoarterieller Applikation mit EmboCept S®

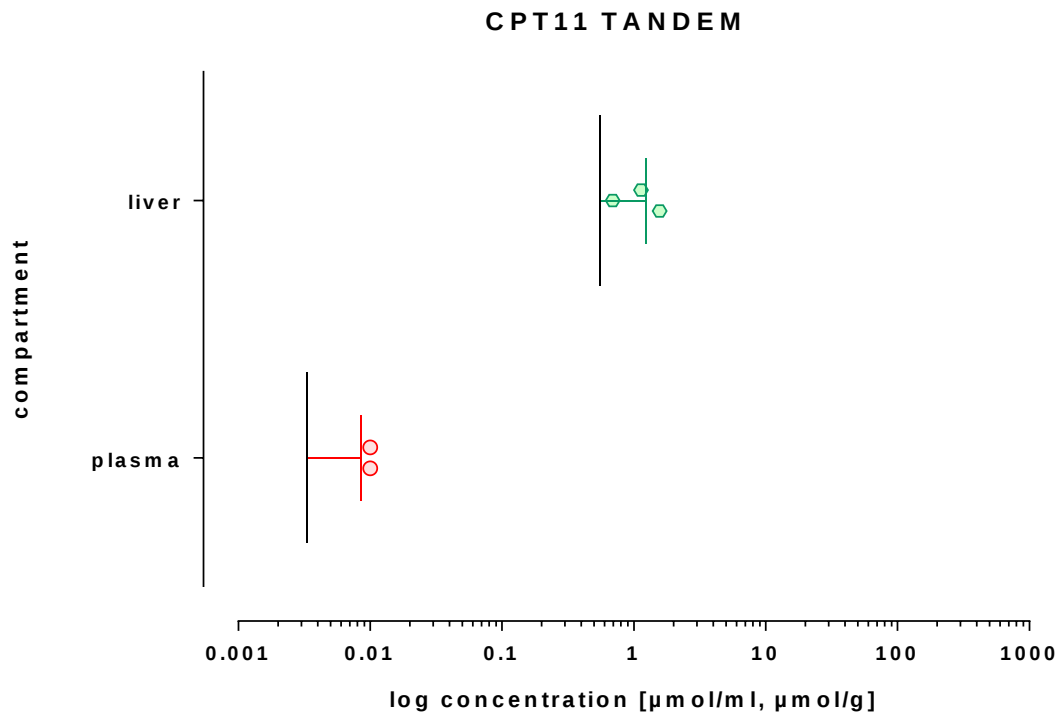


Abbildung 28: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 bei hepatoarterieller Applikation mit TANDEM®

5.3 Induktive Statistik

5.3.1 T-Tests Konzentrationen SN-38/CPT-11

Tabelle 31: T-Test Konzentrationen SN-38 Plasma

SN-38 Plasma							
SYS	HAI		SYS	TAN		SYS	Embo
0,26	0,21		0,26	0,00		0,26	0,15
0,13	0,33		0,13	0,03		0,13	0,24
0,00	0,28		0,00	0,00		0,00	0,10
0,19	0,28		0,19	0,01		0,19	0,12
0,15	0,23		0,15	0,03		0,15	0,24
0,14	0,27		0,14	0,00		0,14	0,18
0,13	0,17		0,13			0,13	0,56
0,19	0,13		0,19			0,19	0,35
0,43			0,43			0,43	
0,38			0,38			0,38	
0,28			0,28			0,28	
0,36			0,36			0,36	
p= 0,7219			p= 0,0010			p= 0,7210	

Tabelle 32: T-Test Konzentrationen SN-38 Lebergewebe

SN-38 Lebergewebe							
SYS	HAI		SYS	TAN		SYS	Embo
0,97	0,87		0,97	0,02		0,97	0,97
0,87	0,95		0,87	0,08		0,87	0,70
0,63	1,07		0,63	0,02		0,63	0,82
1,16	0,80		1,16	0,06		1,16	0,49
0,65	1,14		0,65	0,08		0,65	0,99
0,89	0,89		0,89	0,02		0,89	0,56
0,82	1,26		0,82			0,82	1,53
0,80	1,12		0,80			0,80	
1,79			1,79			1,79	
1,18			1,18			1,18	
1,47			1,47			1,47	
1,88			1,88			1,88	
p=0,6152			p <0,0001			p= 0,2452	

Tabelle 33: T-Test Konzentrationen CPT-11 Plasma

CPT-11 Plasma							
SYS	HAI		SYS	TAN		SYS	Embo
0,25	1,50		0,25	0,00		0,25	1,15
0,15	2,23		0,15	0,01		0,15	1,08
0,00	1,64		0,00	0,00		0,00	1,88
0,28	1,99		0,28	0,00		0,28	1,55
0,20	3,05		0,20	0,01		0,20	5,9
0,54	1,51		0,54	0,00		0,54	1,31
0,35	3,66		0,35			0,35	19,51
0,41	7,14		0,41			0,41	1,42
1,92			1,92			1,92	
1,22			1,22			1,22	
1,34			1,34			1,34	
2,28			2,28			2,28	
p= 0,0028			p= 0,0310			p= 0,0741	

Tabelle 34: T-Test Konzentrationen CPT-11 Lebergewebe

CPT-11 Lebergewebe							
SYS	HAI		SYS	TAN		SYS	Embo
10,30	34,00		10,30	0,00		10,30	25,24
6,08	46,10		6,08	0,69		6,08	17,10
1,70	33,00		1,70	0,00		1,70	24,47
10,76	31,70		10,76	1,13		10,76	29,44
6,22	71,90		6,22	1,57		6,22	28,89
7,74	34,40		7,74	0,01		7,74	33,10
6,05	56,10		6,05			6,05	
7,49	66,67		7,49			7,49	
34,44			34,44			34,44	
24,3			24,3			24,3	
26,67			26,67			26,67	
37,75			37,75			37,75	
p <0,0001			p <0,0126			p= 0,0488	

5.3.2 ANOVA Konzentrationen SN-38/ CPT-11

Tabelle 35: ANOVA SN-38 Plasma

SN38_Plasma $\mu\text{M/ml}$					
Data sets analyzed	A : SYS	B : HAI	C : EmboCept	D : Tandem	
F	6,642				
P value	0,0014				
P value summary	**				
Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes				
R square	0,3991				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	2,535 (3, 30)				
P value	0,0756				
P value summary	Ns				
Are SDs significantly different ($P < 0.05$)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	18,96				
P value	0,0003				
P value summary	***				
Are SDs significantly different ($P < 0.05$)?	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,2415	3	0,08049	F (3, 30) = 6,642	P=0,001 4
Residual (within columns)	0,3636	30	0,01212		
Total	0,6051	33			
Data summary					
Number of treatments (columns)	4				
Number of values (total)	34				

Tabelle 36: ANOVA SN-38 Lebergewebe

SN38_Lebergewebe $\mu\text{M/g}$					
Data sets analyzed	A : SYS	B : HAI	C : EmboCept	D : Tandem	
F	16,23				
P value	<0,0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes				
R square	0,6267				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	2,694 (3, 29)				
P value	0,0644				
P value summary	Ns				

Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	23,74				
P value	<0,0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	4,783	3	1,594	F (3, 29) = 16,23	P<0,0001
Residual (within columns)	2,849	29	0,09826		
Total	7,633	32			
Data summary					
Number of treatments (columns)	4				
Number of values (total)	33				

Tabelle 37: ANOVA CPT-11 Plasma

CPT11_Plasma $\mu\text{M/ml}$					
Data sets analyzed	A : SYS	B : HAI	C : EmboCept	D : Tandem	
F	2,778				
P value	0,0583				
P value summary	Ns				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
R square	0,2174				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	1,325 (3, 30)				
P value	0,2845				
P value summary	Ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	89,16				
P value	<0,0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	87,88	3	29,29	F (3, 30) = 2,778	P=0,0583
Residual (within columns)	316,4	30	10,55		
Total	404,3	33			
Data summary					
Number of treatments (columns)	4				
Number of values (total)	34				

Tabelle 38: ANOVA CPT-11 Lebergewebe

CPT11 Lebergewebe $\mu\text{M/g}$					
Data sets analyzed	A : SYS	B : HAI	C : EmboCept	D : Tandem	
F	21,18				
P value	<0,0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes				
R square	0,6942				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	3,284 (3, 28)				
P value	0,0353				
P value summary	*				
Are SDs significantly different ($P < 0.05$)?	Yes				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	27,13				
P value	<0,0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different ($P < 0.05$)?	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	8359	3	2786	F (3, 28) = 21,18	P<0,000 1
Residual (within columns)	3683	28	131,5		
Total	12042	31			
Data summary					
Number of treatments (columns)	4				
Number of values (total)	32				

5.4 Diskussion

Grundsätzlich sind bei allen Arten der Applikation die Konzentrationen von SN-38 und CPT-11 in der Leber höher als im Plasma, was für eine Anreicherung des Wirkstoffes in der Leber spricht. Bei hepatoarterieller Applikation mit und ohne EmboCept S® sind die CPT-11 Konzentrationen in beiden Kompartimenten höher als bei systemischer Applikation. Bei SN-38 ist der Unterschied zwischen systemischer und hepatoarterieller Applikation nicht so stark ausgeprägt. Bei steigender Konzentration an CPT-11 steigt jedoch die Konzentration von SN-38 nicht mehr weiter an. Dies ist vermutlich auf eine Sättigung der Carboxylesterase zurückzuführen. TANDEM® lieferte vergleichsweise nur sehr geringe Konzentrationen in allen analysierten Proben.

Signifikante Unterschiede im t-test sind somit bei der Konzentration von SN-38 in Plasma und in der Leber im Vergleich von systemischer und hepatoarterieller mit und ohne EmboCept S® Applikation nicht gegeben; nur der Vergleich von systemischer Applikation vs TANDEM® ergab hingegen eine statistisch signifikante Differenz. Bei CPT-11 ist im Plasma ein signifikanter Unterschied zwischen systemischer und hepatoarterieller Applikation ohne EmboCept S® sowie mit TANDEM® gegeben. In der Leber gibt es bei CPT-11 bei hepatoarterieller Applikation ohne und mit EmboCept S® sowie mit TANDEM® einen signifikanten Unterschied zur systemischen Applikation.

Ein signifikanter Unterschied im t-Test besteht bei den R-Werten beim Vergleich der systemischen Applikation mit der hepatoarteriellen Applikation von TANDEM®. Bei der TANDEM® Gruppe war jedoch die Zahl tatsächlich quantifizierbarer Proben sehr gering und die Streuung der Daten auch sehr groß. Da sowohl CPT-11 als auch SN-38 in sehr geringen Konzentrationen in den Proben zu finden waren, liegt die Vermutung nahe, dass der Zeitraum von 4h von der Applikation bis zur Probenentnahme nicht lange genug ist, damit sich der Wirkstoff ausreichend von den TANDEM® Mikrosphären lösen kann.

Aufgrund der geringen Stichprobenzahl ist der t-Test aussagekräftiger als die ANOVA.

SN-38 und CPT-11 haben eine höhere Affinität zu Lebergewebe als zu Plasma. Die hepatoarterielle Applikation bietet einen Vorteil gegenüber systemischer

Applikation, da sie zu höheren Konzentrationsspiegel des Wirkstoffes in der Leber führt. Die Chemoembolisation mit EmboCept S® ist der systemischen Applikation überlegen, aber etwa gleichwertig mit der hepatoarteriellen Applikation ohne Chemoembolisation was die Anreicherung in der Leber betrifft. Weiters wäre es von Interesse, die Anreicherung im Plasma und Lebergewebe mit einer Anreicherung direkt im Tumorgewebe zu vergleichen sowie TANDEM® mithilfe einer geeigneten Methode neu zu bewerten.

6. Zusammenfassung

Nach unterschiedlichen Arten der Applikation von Irinotecan wurden Leber- und Plasmaproben von Ratten analysiert, um die Verteilung von Irinotecan und dessen Metaboliten SN-38 je nach Applikationsmethode und Kompartiment zu vergleichen. Dazu wurden die Proben in einem definierten Verhältnis verdünnt, die Proteine gefällt, bei den Leberproben zusätzlich noch ein Homogenisierungsschritt durchgeführt, danach zentrifugiert und der klare Überstand mittels HPLC analysiert. Im Vorfeld wurde eine Eichgerade mit unterschiedlichen Konzentrationen erstellt um später die HPLC Ergebnisse auswerten zu können.

Weiters wurde mittels Berechnungen die Enzymaktivität der Carboxylesterase untersucht. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der aus der Enzymaktivität resultierenden R-Werte sowie der in der HPLC ermittelten Konzentrationen von SN-38 und CPT-11 wurden ermittelt. Als statistische Methoden zur Bewertung der Ergebnisse dienten der t-Test sowie die Varianzanalyse.

Insgesamt zeigt sich bei allen Applikationsarten eindeutig eine höhere Affinität sowohl von CPT-11 als auch von SN-38 zum Lebergewebe, verglichen mit dem Plasma. Sowohl die hepatoarterielle Applikation als auch die Chemoembolisation mit EmboCept S® führen zu höheren Konzentrationen von CPT-11 als die systemische Applikation. Bei SN-38 ist dies vermutlich aufgrund einer Sättigung der Carboxylesterase jedoch nicht der Fall.

Die Bewertung der Proben mit TANDEM® ist nicht eindeutig. Die Konzentrationen von CPT-11 als auch von SN-38 sind erstaunlich gering. Möglicherweise reichen 4h nicht aus, damit der Wirkstoff sich von den Mikrosphären löst.

Insgesamt sprechen die Analysen für eine hepatoarterielle Applikation. Dass Chemoembolisation einen Vorteil gegenüber der hepatoarteriellen Applikation bringt, ist in diesen Analysen nicht hervorgegangen, jedoch wäre noch die Affinität zum Tumorgewebe selbst sowie eine neue Bewertung der Chemoembolisation mittels TANDEM® Mikrosphären interessant.

7. Abstract

Plasma and liver samples of rats have been analysed after the treatment with the chemotherapeutic agent irinotecan in four different ways. The samples have been investigated in order to identify the distribution of the compound CPT-11 and its metabolite SN-38 in liver tissue and plasma.

The samples have been diluted in a defined ratio, the proteins have been precipitated and the liver tissue samples have been homogenized before being centrifuged. The clear supernatant was then analysed by HPLC. Previously, a straight calibration line of CPT-11 and SN-38 in liver tissue and plasma was generated with various concentrations, to ensure the correct calculation of the results from the HPLC analysis. Additionally, the enzyme activity of carboxylesterase has been determined. The midpoints and standard deviations of the R-values to measure the enzyme activity, as well as the plasma and tissue concentrations of CPT-11 and SN-38 from the HPLC analysis have been calculated. The statistical methods used for the assessment of the samples have been t-test and variance analysis. Altogether, a higher affinity of CPT-11 and SN-38 to liver tissue compared to plasma is shown. Hepatoarterial application and hepatoarterial application with EmboCept S® led to higher concentrations of CPT-11 in comparison to systemic application. This is not the case for SN-38, which is probably due to a saturation of carboxylesterase, the enzyme converting CPT-11 to SN-38. The interpretation of TANDEM® samples was more difficult. The concentrations of CPT-11 and SN-38 in liver tissue and plasma after hepatoarterial application with TANDEM® are very low. One possible explanation is that irinotecan is not able to dissolve from the plastic microspheres within the first 4 hours after the application. In conclusion, the analyses of all the samples suggest an advantage of hepatoarterial application regarding to CPT-11 and SN-38 concentrations in the liver tissue. Hepatoarterial chemoembolisation doesn't show an additional advantage, compared to simple hepatoarterial application. A further assessment of chemoembolisation with TANDEM® microspheres, as well as the affinity of the compounds to tumor tissue after hepatoarterial application would be interesting.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: NaCl systemisch.....	8
Tabelle 2: Irinotecan systemisch.....	8
Tabelle 3: Irinotecan hepatoarteriell.....	8
Tabelle 4: Irinotecan + EmboCept S® hepatoarteriell	9
Tabelle 5: Irinotecan + TANDEM® hepatoarteriell	9
Tabelle 6: Geräte und Materialien.....	9
Tabelle 7: HPLC-Anlage	10
Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien.....	12
Tabelle 9: Konzentrationen SN-38 im Plasma.....	14
Tabelle 10: Statistische Parameter der Eichgerade von SN-38 im Plasma	15
Tabelle 11: Konzentrationen SN-38 im Lebergewebe	17
Tabelle 12: Statistische Parameter der Eichgerade von SN-38 im Lebergewebe.....	18
Tabelle 13: Konzentrationen CPT-11 im Plasma.....	18
Tabelle 14: Statistische Parameter der Eichgerade von CPT-11 im Plasma	19
Tabelle 15: Konzentrationen CPT-11 im Lebergewebe	20
Tabelle 16: Statistische Parameter der Eichgerade von CPT-11 im Lebergewebe.....	21
Tabelle 17: Systemische Applikation – Volumina - Plasma / NaCl	33
Tabelle 18: Systemische Applikation – Konzentrationen im Plasma / Irinotecan	34
Tabelle 19: Systemische Applikation – Einwaagen/ Volumina - Lebergewebe/ NaCl	34
Tabelle 20: Systemische Applikation – Konzentrationen im Lebergewebe/ Irinotecan.....	34
Tabelle 21: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Plasma/ Irinotecan	35
Tabelle 22: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Lebergewebe/ Irinotecan.....	35
Tabelle 23: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Plasma/ Irinotecan	
+ EmboCept S®.....	35
Tabelle 24: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Lebergewebe/ Irinotecan	
+ EmboCept S®.....	36
Tabelle 25: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Plasma/ Irinotecan	
TANDEM®	36
Tabelle 26: Hepatoarterielle Applikation – Konzentrationen im Lebergewebe/ Irinotecan	
TANDEM®.....	36
Tabelle 27: R- Werte bei unterschiedlicher Applikation in verschiedenen Kompartimenten	
.....	37
Tabelle 28: T-Test R-Werte Lebergewebe	38
Tabelle 29: T-Test R-Werte Plasma.....	38
Tabelle 30: Mittelwerte CPT-11& SN-38	39
Tabelle 31: T-Test Konzentrationen SN-38 Plasma.....	45

Tabelle 32: T-Test Konzentrationen SN-38 Lebergewebe.....	45
Tabelle 33: T-Test Konzentrationen CPT-11 Plasma	456
Tabelle 34: T-Test Konzentrationen CPT-11 Lebergewebe.....	46
Tabelle 35: ANOVA SN-38 Plasma.....	46
Tabelle 36: ANOVA SN-38 Lebergewebe	47
Tabelle 37: ANOVA CPT-11 Plasma.....	47
Tabelle 38: ANOVA CPT-11 Lebergewebe	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konzentrationsverlauf bei Ratten (Rohdaten Wimmer& Brommer)	2
Abbildung 2: Konzentrationsverlauf beim Menschen (Rohdaten Ettlinger)	2
Abbildung 3: Metabolismus von Irinotecan (Ettlinger 2004).....	3
Abbildung 4: HPLC-Anlage (Fotos Wimmer& Brommer)	11
Abbildung 5: Screenshot: Rechner zur Berechnung des benötigten Volumens an Stammlösung (©2017 GraphPad Software)	13
Abbildung 6: Schüttler Vortex® (Fotos Wimmer& Brommer)	14
Abbildung 7: Eichgerade SN-38 im Plasma	15
Abbildung 8: Screenshot: Rechner zur Berechnung des benötigten Volumens an Stammlösung (©2017 GraphPad Software)	16
Abbildung 9: Zuschneiden der Leberproben mittels Sezierbesteck (Fotos Wimmer&Brommer)	16
Abbildung 10: Eichgerade SN-38 im Lebergewebe	19
Abbildung 11: Eichgerade CPT-11 im Plasma	19
Abbildung 12: MiniLys® zur Homogenisierung (Fotos Wimmer& Brommer).....	20
Abbildung 13: Eichgerade CPT-11 im Lebergewebe.....	21
Abbildung 14: Beispielchromatogramme: Eichgerade SN-38 im Plasma und im Lebergewebe	22
Abbildung 15: Beispielchromatogramme: Eichgerade CPT-11 im Plasma und im Lebergewebe	23
Abbildung 16: Proben (Fotos Wimmer& Brommer)	24
Abbildung 17: Beispielchromatogramm NaCl/ Irinotecan systemisch Plasma & Lebergewebe	26
Abbildung 18: Beispielchromatogramm NaCl/ Irinotecan hepatoarteriell Plasma & Lebergewebe	27
Abbildung 19: Beispielchromatogramm NaCl/ Irinotecan + EmboCept S® hepatoarteriell Plasma & Lebergewebe	28
Abbildung 20: Beispielchromatogramm NaCl/ Irinotecan + TANDEM® hepatoarteriell Plasma & Lebergewebe	29
Abbildung 21: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 bei systemischer Applikation.....	40
Abbildung 22: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 bei hepatoarterieller Applikation	41
Abbildung 23: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 bei hepatoarterieller Applikation mit EmboCept S®.....	41

Abbildung 24: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 bei hepatoarterieller Applikation mit TANDEM®.....	42
Abbildung 25: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 bei systemischer Applikation.....	42
Abbildung 26: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 bei hepatoarterieller Applikation.....	43
Abbildung 27: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 bei hepatoarterieller Applikation mit EmboCept S®.....	43
Abbildung 28: Logarithmische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 bei hepatoarterieller Applikation mit TANDEM®.....	44

Literaturverzeichnis

- Mutschler, E. et. al. 2013. Mutschler Arzneimittelwirkungen. 10. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. S.891-92, 916-18
- Shingyoji, M. et. al. 2004. „In Vitro Conversion of Irinotecan to SN-38 in Human Plasma“. *Cancer Science* 95 (6): S.537–40.
- Kimie, S. et. al. 2001. „A New Metabolite of Irinotecan in Which Formation is Mediated by Human Hepatic Cytochrome P-450 3A4“. *Drug Metabolism and Disposition* 29 (11): S.1505–13.
- Itagaki, S. et. al. 2004. „Biliary excretion of irinotecan and its metabolites“. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 7 (1): S.13–18.
- Martignoni, M. et. al. 2006. „Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction“. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2 (6) S.875–94
- Mathijssen, RH. et. al. 2001. „Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11)“. *Clinical Cancer Research* 7 (8): S.2182–94.
- Ettlinger, D. 2004. In-vivo und in-vitro Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Metabolismus von Irinotecan in Kombination mit Cetuximab, Oxaliplatin oder Capecitabin. S.11/ Abb.3
- Aktories, K. 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer. S.957-58
- Mathijssen, Ron H. J. 2003. „Irinotecan Pathway Genotype Analysis to Predict Pharmacokinetics“. *Clinical Cancer Research* 9 (9): S.3246–53.
- Misiakos, E. et. al. 2011. „Current treatment for colorectal liver metastases“. *World Journal of Gastroenterology* 17 (36): S.4067–75.
- Bley, C.H., et. al. 2015. I care Krankheitslehre. 1.Aufl. Stuttgart. Thieme Verlag. S.62
- Macedo, F. et. al. 2014. „Colorectal hepatic metastasis: Evolving therapies“. *World Journal of Hepatology* 6 (7): S.453–63.
- „Produktinformation EmboCept S®, PharmaCept“. 2017. Zugriffen Juni 26. <http://pharmacept.com/produkte/EmboCept-s-ubersicht/>.
- „Produktinformation TANDEM®, CeloNova“. 2017. Zugriffen Juni 26. <http://celonova.com/wp-content/uploads/APM0016-06-TANDEM-Brochure-CE-Mark-Information-Rev-A.pdf>.
- Ettlinger, D. 2004. In-vivo und in-vitro Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Metabolismus von Irinotecan in Kombination mit Cetuximab, Oxaliplatin oder Capecitabin. S.36
- Meyer, V. 2009. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 10. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH Verlag. S.8, 121, 202-3, 237
- Kim, SR. et. al. 2007. „ Haplotypes and a novel defective allele of CES2 found in a Japanese population“. *Drug Metabolism and Disposition* 35 (10): S.1865-72.
- Bärlocher, F. 1999. Biostatistik. Stuttgart: Thieme Verlag. S.44, 70-71, 82
- John, L. 1997. Statistisch gesehen. Basel: Birkhäuser Verlag. S.116-17
- Bultmann, M. 2012. Mathematik und Statistik für Pharmazeuten. 2. Aufl., Eschborn, Govi- Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH S.317-18