



DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Chemoembolisation mit Irinotecan in der Therapie des
hepatozellulären Karzinoms im Rattenmodell: Ermittlung
der Transferrate in das Tumorgewebe“

verfasst von / submitted by

Lisa Wimmer

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:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für das Bereitstellen des Themas in einem so interessanten Bereich der Pharmazie und seine Unterstützung bei allen auftretenden Problemen.

Des Weiteren danke ich Mag. pharm. Andrea Gruber und Mag. pharm. Marie Kitzmüller für ihre Hilfsbereitschaft und ihr Engagement. Bei der Diplomandin Julia Brommer möchte ich mich ebenfalls für die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Großer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer liebevoll unterstützen und an mich glauben. Ohne euch wäre all dies nicht möglich gewesen.

Eine große Bereicherung während des Studiums waren auch meine Freunde und Studienkollegen. Ihr wart für mich da, sowohl in den harten Lernzeiten vor den Prüfungen, als auch bei den Feierlichkeiten danach.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, 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 nicht veröffentlicht.

Wien, im Mai 2017

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Tumor	1
1.1.1 Statistik	1
1.1.2 Merkmale	2
1.1.3 Therapie	3
1.2 Irinotecan	5
1.2.1 Metabolismus	5
1.3 Gewebekomogenisierung	9
2. Rationale	11
3. Methodik	12
3.1 Studienkonzept	12
3.2 Tiere	13
3.3 Analytik	15
3.3.1 Laborausstattung	15
3.3.2 Verwendete Software	18
3.3.3 Erstellung der Eichgeraden	19
3.3.4 Ergebnisse der Eichgeraden	22
3.3.5 Beispielchromatogramme	26
3.3.6 Vorbereitung und Aufarbeitung der Proben	27
3.4 Berechnungen	28
3.4.1 Deskriptive Statistik	28
3.4.2 Induktive Statistik	28
3.4.3 Metabolische Aktivierung	30
4. Ergebnisse	31
4.1 Chromatogramme	31
4.2 Konzentrationen	33
4.2.1 Konzentrationen von CPT-11 nach unterschiedlichen Arten der Applikation	34
4.2.2 Grafische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11	36
4.2.3 Konzentrationen von SN-38 nach unterschiedlichen Arten der Applikation	37
4.2.4 Grafische Darstellung der Konzentrationen von SN-38	39
4.3 Auswertung der metabolischen Aktivierung	40
4.3.1 Enzymaktivität nach systemischer Applikation	40
4.3.2 Enzymaktivität nach hepatoarterieller Applikation	41
4.3.3 Enzymaktivität nach Applikation mit EmboCept® S	41
4.3.4 Enzymaktivität nach Applikation mit Tandem®	42
4.3.5 Vergleich der R-Werte	43
4.4 Statistische Auswertung	44
4.4.1 T-Test über die Konzentrationen im Tumorgewebe	44
4.4.2 T-Test über die Konzentrationen im Tumor und der Leber	49
4.4.3 T-Test über die Konzentrationen im Tumor und im Plasma	52
4.4.4 ANOVA	55

5. Diskussion	57
5.1 Transfer in das Tumorgewebe	57
5.2 Statistische Ergebnisse	59
5.3 Conclusio	60
6. Zusammenfassung	63
7. Summary	64
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Literaturverzeichnis	VI
Anhang	IX

1. Einleitung

1.1 Tumor

1.1.1 Statistik

In Österreich sind etwa ein Viertel aller Todesfälle auf Krebserkrankungen zurückzuführen. Im Jahr 2014 wurden 38 908 Neuerkrankungen dokumentiert. Bei Männern stellt seit 1994 der Prostatakrebs die häufigste Form dar, wohingegen bei Frauen schon immer der Brustkrebs an erster Stelle liegt. Darmkrebs ist mit 13% (2 639 Fälle im Jahr 2014) bei Männern die dritthäufigste Lokalisation und bei Frauen mit 11% (1 982 Fälle im Jahr 2014) die zweithäufigste Krebserkrankung (Statistik Austria, 2017).

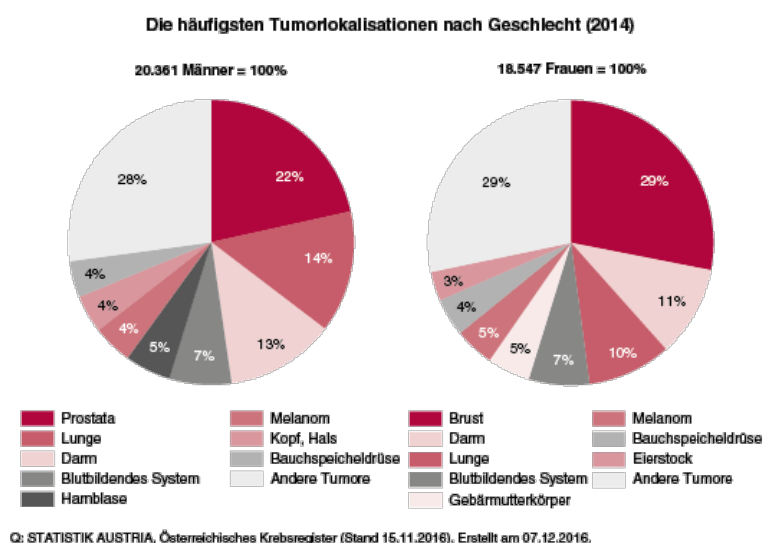
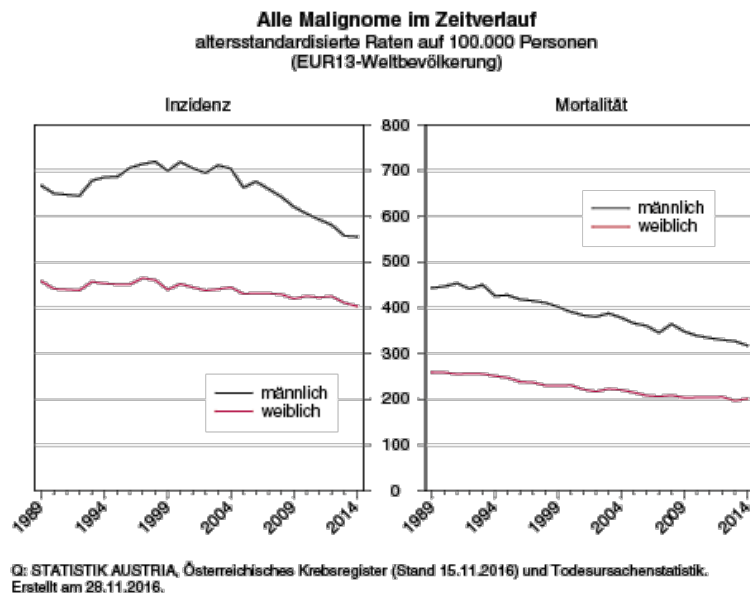


Abbildung 1: Tumorerkrankungen 2014 (Statistik Austria, 2017)

Im Allgemeinen liegt im Jahr 2014 das Risiko bis zum 75. Lebensjahr an Krebs zu erkranken bei Männern 1.3 Mal so hoch wie bei Frauen. Die Neuerkrankungsrate der bösartigen Tumore ging jedoch in den letzten zehn Jahren bei den Männern um 21% zurück (das entspricht 466.1 Fälle pro 100 000 Männer). Bei den Frauen ist der Rückgang weniger deutlich und beträgt 9%, was 403.3 Fälle pro 100 000 Frauen entspricht. Was die Mortalität betrifft, so sank diese bei den Männern um 16% und bei den Frauen um 9% in den vergangenen zehn Jahren (Statistik Austria, 2017).



**Abbildung 2: Inzidenz und Mortalität von malignen Tumoren
(Statistik Austria, 2017)**

1.1.2 Merkmale

Neben den charakteristischen Merkmalen von malignen Tumoren, wie zum Beispiel die zelluläre Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, die Umgehung und Vermeidung von Apoptose und die Induktion von Angiogenese und Metastasierung, unterscheidet sich das Tumorgewebe in weiteren Punkten von gesundem Gewebe (Aktories, Förstermann, Hofmann, & Starke, 2013).

Wie normale Zellen, regulieren auch Tumorzellen ihren cytoplasmatischen pH-Wert so, dass sie optimale Bedingungen für diverse intrazelluläre Vorgänge haben. So konnte mittels ^{31}P MRS (magnetic resonance spectroscopy) im Jahr 2000 festgestellt werden, dass der pH-Wert in Tumorzellen häufig höher ist als in gesunden Gewebezellen, was diesen einen Vorteil im Zellwachstum zu beschaffen scheint (Stubbs, McSheehy, Griffiths, & Bashford, 2000).

Extrazellulär ist bei malignen Tumorzellen der pH-Wert mit 6.5 – 6.9 leicht sauer. Dies ist das Ergebnis von erhöhtem Glucosemetabolismus, der eine erhöhte H^+ -Produktion und -Freisetzung zur Folge hat, und einer verschlechterten Durchblutung. Im gesunden Gewebe beträgt der extrazelluläre pH-Wert hingegen 7.2 – 7.4 und ist damit leicht

basisch. Das saure extrazelluläre Umfeld von malignen Tumoren führt zur Apoptose und Nekrose von gesunden Zellen, wohingegen Tumorzellen durch Entwicklung von adaptiven Mechanismen gelernt haben dort zu überleben und sich zu vermehren. Diese Anpassung wird auch als „niche engineering“ bezeichnet. Des Weiteren wird die Angiogenese durch Freisetzung von VEGF gefördert und die Immunantwort auf Tumorantigene geschwächt (Estrella u. a., 2013).

Was die Sauerstoffversorgung betrifft, so stellte der Biochemiker und Arzt Otto Warburg bereits 1924 fest, dass Krebszellen bevorzugt ihre Energie aus glykolytischen Stoffwechselwegen beziehen, auch wenn ausreichend Sauerstoff vorhanden ist. Genanntes Phänomen wird nach seinem Entdecker als Warburg-Hypothese bezeichnet (Matoba u. a., 2006). Dieser Glucosemetabolismus ist wiederum, wie oben bereits erwähnt, mitverantwortlich für den niedrigen extrazellulären pH-Wert von malignen Tumorzellen.

1.1.3 Therapie

Handelt es sich um einen lokalisierten Tumor so sind die operative Entfernung oder die Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen die bevorzugten Therapiemittel. Wenn der Tumor aber bereits disseminiert ist oder Metastasen gebildet hat, stellen Zytostatika das Mittel der Wahl dar. Ziel der Tumorchemotherapie ist eine möglichst vollständige Entfernung der Tumorzellen, meist durch Eingriff in Mechanismen der Zellteilung und dadurch ausgelöste Apoptose. Man unterscheidet dabei die kurative (Ziel ist eine vollständige Heilung), die adjuvante (um nach einer Strahlentherapie restliche Tumorzellen zu entfernen), die neoadjuvante (um vor einem chirurgischen Eingriff die Tumorgroße zu reduzieren) oder die palliative Chemotherapie (um eine begrenzte Verlängerung der Lebenszeit zu erreichen). Vor allem bei sehr schnell wachsenden Tumoren, also solchen mit kurzen Verdopplungszeiten, ist die Chemotherapie besonders gut wirksam (Aktories u. a., 2013).

Im Falle des kolorektalen Karzinoms, der dritthäufigsten Krebserkrankung weltweit, entstehen bei rund der Hälfte der Patienten im Laufe der Behandlung Metastasen in der Leber. Bei 15% - 20% kommen diese Metastasen bereits zur Zeit der Diagnose vor.

Eine chirurgische Entfernung der kolorektalen Lebermetastasen stellt nach wie vor die effizienteste Methode zur Heilung dar, ist jedoch nur bei in etwa 25% der Patienten möglich. Daher gibt es diverse andere Möglichkeiten der Behandlung, die aber meist lediglich eine beschränkte Verlängerung der Lebenszeit zum Ziel haben (Richardson, Laurence, & Lam, 2013).

Eine dieser Behandlungsmethoden stellt die intraarterielle Applikation des Chemotherapeutikums dar. Dabei wird sich das Prinzip zu Nutzen gemacht, dass Lebermetastasen ihren Blutbedarf aus Leberarterien abdecken. Mittels intra-abdominalen Kathetern oder Infusionspumpen wird das Chemotherapeutikum direkt in die Leber gebracht. Diese Vorgehensweise wird auch als HAI (engl. Hepatic Arterial Infusion) bezeichnet. Somit wird eine maximale lokale Tumorthherapie mit minimalen systemischen Konzentrationen des Chemotherapeutikums und somit auch deutlich weniger unerwünschten Nebenwirkungen erreicht (Macedo & Makarawo, 2014).

Bei der Chemoembolisation (TACE, engl. transcatheter arterial chemoembolization) wird eine lokale Verabreichung des Chemotherapeutikums mit einer selektiven Embolisation der Tumor-versorgenden Gefäße kombiniert. Eine Optimierung dieser Methode kann durch die Verwendung von Teilchen, die mit einem Chemotherapeutikum beladen sind, erreicht werden. Durch die Chemoembolisation kann, neben geringen systemischen Konzentrationen des Chemotherapeutikums, zusätzlich die Kontaktzeit zwischen Arzneistoff und Tumorzellen verlängert werden, indem der arterielle Durchfluss und somit die Ausschwemmung des Chemotherapeutikums vermindert wird (Aliberti, Tilli, Benea, & Fiorentini, 2006).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Chemoembolisation mit Irinotecan verwendet und im Rattenmodell verglichen. Zum einen wurde eine Behandlung mit EmboCept® S der PharmaCept GmbH durchgeführt. Dabei handelt es sich um abbaubare Stärkemikrosphären mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 50µm und einer Halbwertszeit von 35 – 40min. Die sterile Stärkesuspension wird mit dem Wirkstoff versetzt und anschließend intraarteriell verabreicht (Produktinformation EmboCept® S, 2013).

Zum anderen wurde die Chemoembolisation mit Embozene TANDEM® Mikrosphären der Firma CeloNova BioSciences untersucht. Diese Partikel bestehen aus einem Hydrogel Körper und einer Hülle aus Polyzene® F und sind somit im Gegensatz zu EmboCept® S nicht abbaubar. Die Partikel können mit dem Chemotherapeutikum beladen und anschließend intraarteriell appliziert werden (Produktinformation Embozene TANDEM®, 2013).

1.2 Irinotecan

Irinotecan (CPT-11, 7-Ethyl-10[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin) ist ein halbsynthetisches Derivat von Camptothecin, ein Chinolin-Alkaloid aus der Rinde des chinesischen Baums *Camptotheca acuminata* (übersetzt als „Tree of Joy“) und gehört zu Klasse der Topoisomerase-I-Inhibitoren. Die Topoisomerase-I ist ein Enzym, das die Torsionsspannung, welche bei der Replikation oder Transkription der DNA entsteht, vermindert. Dabei schneidet sie einen DNA-Strang und es kommt durch eine gegenläufige Rotation der Stränge zur Entspannung. Anschließend wird die geschnittene Stelle wieder verknüpft. Der sogenannte Spaltungskomplex („cleavable complex“), der dabei entsteht, wird durch CPT-11 stabilisiert und dadurch entstehen Einzelstrangbrüche. Diese wären noch möglich zu reparieren, doch wenn der Abschnitt repliziert werden soll, kommt es dann bei der Ausbildung der Replikationsgabel zu irreversiblen Doppelstrangbrüchen (Aktories u. a., 2013).

1.2.1 Metabolismus

Bei CPT-11 handelt es sich um ein Pro-drug, das vor allem in der Leber von hCES (humane Carboxylesterasen) durch eine Esterspaltung am C10 in seinen aktiven Metaboliten SN-38 (7-Ethyl-10-Hydroxy-Camptothecin) umgewandelt wird. Die Zytotoxizität von SN-38 ist dann 100-1000 mal so stark, verglichen mit CPT-11. Ex vivo Studien haben aber gezeigt, dass eine Aktivierung auch im Darm, im Plasma und im Tumorgewebe stattfindet. Auch ein weiteres Enzym, die Butyrylcholinesterase (BuChE) ist für die Umwandlung von Irinotecan verantwortlich, wobei die klinische Relevanz dafür noch nicht bestätigt wurde (Shingyoji u. a., 2004).

Sowohl CPT-11 als auch SN-38 können in einer aktiven Lakton-Form, die vor allem für die Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-I-Komplexes verantwortlich ist, und einer inaktiven Carboxylat-Form vorliegen. Zwischen beiden Formen herrscht ein Gleichgewicht, abhängig vom pH-Wert und dem Vorkommen von bindenden Proteinen. Bei einem pH-Wert von 6.0 und darunter ist die Lakton-Form stabiler. Eine Bildung der Carboxylat-Form erfolgt ab einem pH-Wert von 8.0. Obwohl die Lakton-Form bei pH 6.0 als stabil angesehen werden kann, erfolgt eine Umwandlung in geringem Maße bis zu einem pH-Wert von 3.0 (Mullangi, Ahlawat, & Srinivas, 2010).

Durch die unterschiedlichen vorherrschenden pH-Verhältnisse in den verschiedenen Geweben kommt es zu keiner gleichmäßigen Verteilung der Carboxylat- und Lakton-Form. Wie bereits in Punkt 1.1.2 angeführt, liegt im Tumorgewebe meist ein niedrigerer pH-Wert als im umliegenden Gewebe vor. Daher tritt dort eine höhere Konzentration der Lakton-Form, vor allem von SN-38 auf, was aus therapeutischer Sicht als sehr günstig angesehen werden kann (Mathijssen u. a., 2001).

Das pharmakologisch aktive SN-38 wird dann in der Leber durch Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase UGT1A1 und UGT1A7 in das inaktive SN-38 Glucuronid (SN-38G) umgewandelt. Über die Galle kommt es zur Ausscheidung des Metaboliten (Aktories u. a., 2013).

Einige Studien haben gezeigt, dass SN-38G im Darm durch β -Glucuronidase, ein von Darmbakterien produziertes Enzym, wieder in das giftige SN-38 zurückgewandelt werden kann. Somit kann es zur CPT-11 induzierten Diarrhöe, einer sehr häufigen Nebenwirkung bei der Behandlung mit Irinotecan, kommen (Mathijssen u. a., 2001).

Parallel dazu wird CPT-11 über das Cytochrom P-450 System (vorwiegend CYP 3A4) in der Leber in NPC (7-Ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) carbonyloxycamptothecin) und im Blut in APC (7-Ethyl-10 [4-N-(5-aminopentansäure)-1-piperidino] carbonylcamptothecin) abgebaut. Bei diesen Metaboliten handelt es sich um schwache Topoisomerase-I-Inhibitoren. Es entstehen auch noch weitere Abbauprodukte, deren biologische Aktivität jedoch noch nicht genau untersucht ist (Mullangi u. a., 2010).

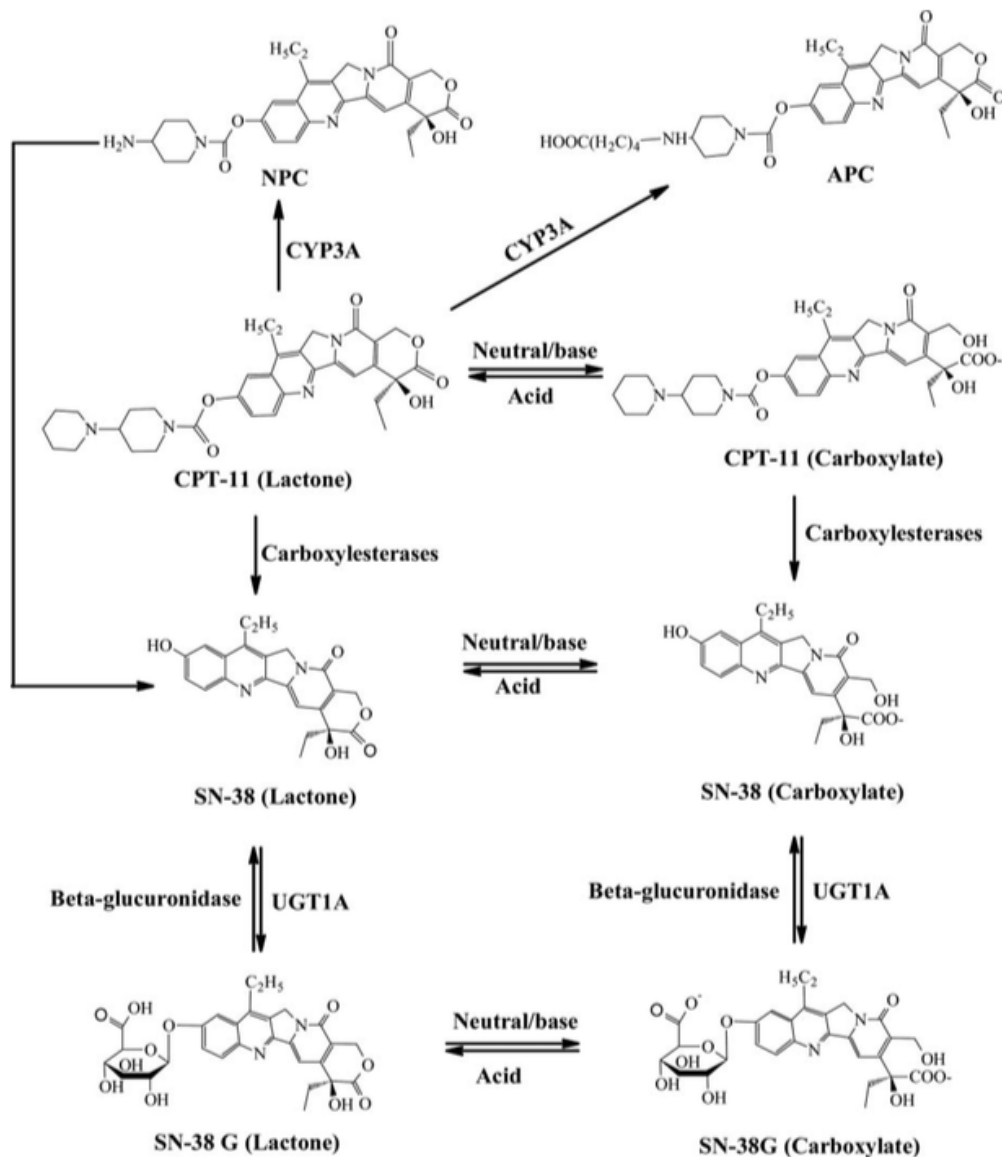


Abbildung 3: Schema des Metabolismus von CPT-11 (Yang, 2006)

In Abbildung 4 sind Chromatogramme von Plasmaproben vom Menschen und der Ratte nach systemischer Verabreichung von Irinotecan dargestellt. Beide Proben sind angesäuert, da so das gesamte CPT-11 in der Lakton-Form zu erkennen ist. Im neutralen Milieu würde, wie bereits erwähnt, neben dieser auch noch die Carboxylat-Form auftreten, deren Peak aber im Chromatogramm in einem Bereich vorkommt, wo er aufgrund von Überlagerungen schlecht zu erkennen wäre (Ettlinger, 2004).

Auffällig ist, dass im Chromatogramm der Ratte keine Peaks für die Metabolismus-Produkte APC und NPC zu sehen sind, da die Ratte kein Isoenzym CYP3A4 besitzt, sondern nur die Isoform CYP3A1. Eine Folge davon ist eine höhere Konzentration von CPT-11 im Plasma der Rattenprobe als im Plasma der humanen Probe, in welchem eine Umwandlung mittels CYP3A4 stattgefunden hat. (Martignoni, Groothuis, & de Kanter, 2006)

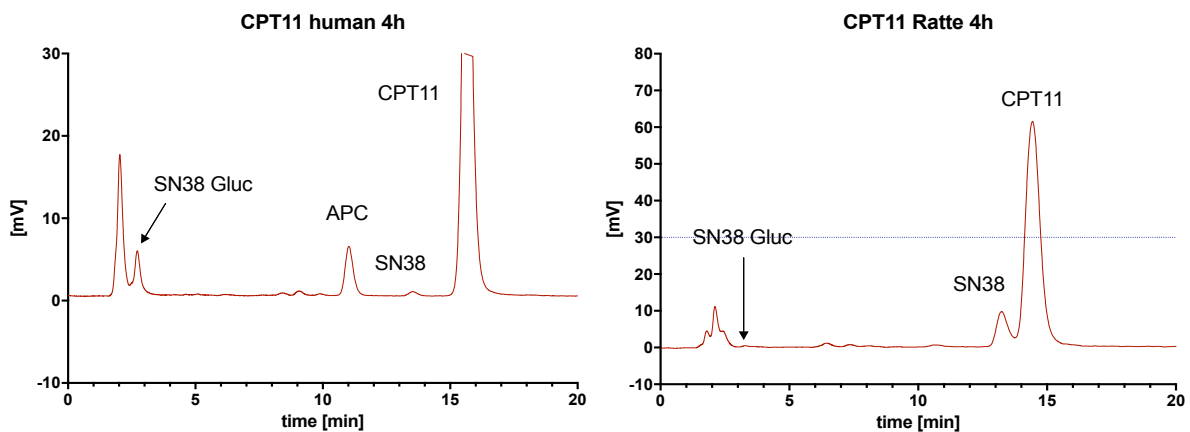


Abbildung 4: Beispielchromatogramme nach Irinotecan-Infusion beim Menschen (links) und bei der Ratte (rechts) im sauren Milieu (links: Rohdaten Ettlinger, rechts: Rohdaten Brommer & Wimmer)

1.3 Gewebehomogenisierung

Bei der Vorbereitung von Proben zur Analyse müssen diese häufig zerkleinert und homogenisiert werden. Um dabei für ein Experiment die passende Homogenisierungsmethode auszuwählen, ist es wichtig im Vorhinein zu wissen, in welcher Form die Probe für die Analyse dann vorliegen soll. Im Anschluss kann aus einer Vielzahl von Verfahren ausgewählt werden (Burden, 2008).

Im folgenden Abschnitt wird nur auf einige repräsentative Beispiele eingegangen, die vor allem die Weiterentwicklung der Methoden über die Jahre hinweg zeigen sollen.



Abbildung 5:
Schliffhomogenisatoren in
verschiedenen Größen (Foto
Brommer & Wimmer)

Eine der älteren Methoden zum Gewebeaufschluss stellen Schliffhomogenisatoren aus Glas dar. Diese sind in verschiedenen Größen in Abbildung 5 dargestellt. Sie bestehen aus einem Glasgefäß und einem Pistill, zwischen welchen sich ein Spielraum von 0.18 bis 0.23mm befindet. Gewebe kann somit manuell zerkleinert werden. Dies bringt jedoch den Nachteil mit sich, dass der Grad der Homogenisierung stark vom Anwender abhängig ist und die Methode somit nicht validierbar ist (Produktinformation Schliffhomogenisatoren, 2017).

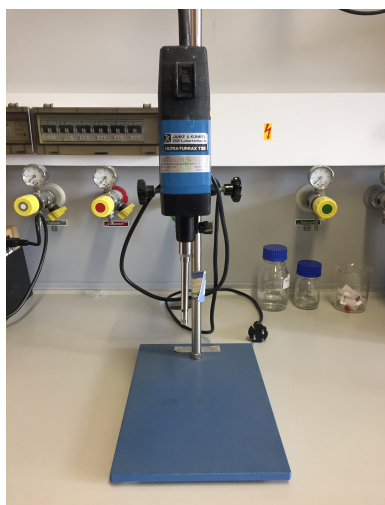


Abbildung 6: Ultra-Turrax T25
von IKA (Foto Brommer &
Wimmer)

Der in Abbildung 6 dargestellte Ultra-Turrax T25 von IKA gehört zur Gruppe der Dispergiergeräte und ist von der Homogenisierung bis zur Probenvorbereitung sehr vielseitig einsetzbar. Seine Funktionsweise beruht auf dem Rotor-Stator-Prinzip. Durch den Rotor wird das Medium axial in den Dispergierkopf gesaugt und anschließend umgelenkt und radial durch die Schlitze gepresst. Auf das Probenmaterial wirken also Scher- und Schubkräfte mit gleichzeitiger Durchmischung. Je nach Probe gibt es unterschiedliche Aufsätze und Geschwindigkeitsstufen (Platthaus, 2013).

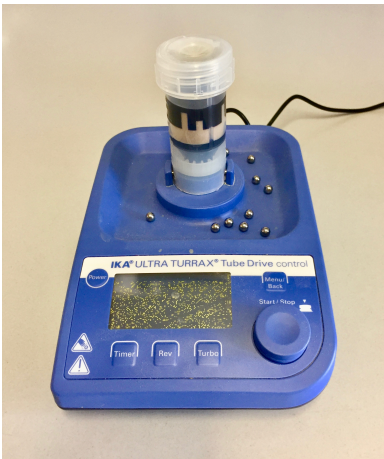


Abbildung 7: Ultra-Turrax Tube Drive (UTTD) von IKA (Foto Brommer & Wimmer)

Eine weitere Verbesserung im Bereich der Gewebehomogenisierung stellt der Ultra-Turrax Tube Drive (UTTD) von IKA dar. Dabei wird die Probe mit der Dispergierlösung in Einweggefäße, die in verschiedenen Größen von zwei bis zu 50ml Volumen erhältlich sind, gefüllt und Metallkugeln (ebenfalls in mehreren Größen erhältlich) werden hinzugegeben. Anschließend kann der Antrieb auf Drehzahlen zwischen 300 und 6000 Umdrehungen pro Minute eingestellt werden und die Homogenisierung somit durchgeführt werden. Durch die Einweggefäße kann die Gefahr der Cross-Kontaminierung

vermieden werden und der Anwender wird durch den hermetisch abgedichteten Verschluss vor Aerosolen geschützt. Des Weiteren entsteht durch die Bauart des UTDD bei der Zerkleinerung keine Hitze, die dem Probenmaterial schaden könnte (Platthaus, 2007).



Abbildung 8: Minilys der Firma Bertin Instruments (Foto Brommer & Wimmer)

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde der Minilys[®] personal homogenizer von Bertin Instruments zur Probenvorbereitung verwendet. Dieser stellt eine sehr einfache und effiziente Methode zur Gewebehomogenisierung im kleinen Maßstab dar. Das Gerät kann bis zu drei Proben in Einwegprobenröhrchen mit 0.5 bis 2ml Volumen gleichzeitig bearbeiten. Die Röhrchen gibt es von Precellys[®] in unterschiedlichen Ausführungen mit verschiedenen Größen von Kügelchen im Inneren. Die Zeit und die Geschwindigkeit (3000, 4000 oder 5000RPM) können manuell eingestellt werden.

Mehrere kurze Intervalle der Homogenisierung sind, um eine Überhitzung des Gerätes zu vermeiden, jedoch zu bevorzugen (MINILYS[®] Produktinformation, 2016).

2. Rationale

Die vorliegende Diplomarbeit befasst sich mit der hepatischen Subkompartimentierung von CPT-11 nach unterschiedlicher intravasaler Applikation.

Untersucht wird die Konzentration von Irinotecan und seinem aktiven Metaboliten SN-38 in Tumorgewebe im Vergleich zu Lebergewebe und Plasma. So soll ermittelt werden, in welchem Ausmaß das Zytostatikum an seinen Wirkort gelangt und ob durch neue Chemoembolisationsmethoden hierbei bessere Ergebnisse erhalten werden können.

Diese Untersuchungen sind von klinischem Interesse um für Patienten die effektivste Applikationsart zu finden und somit einen möglichst hohen Therapieerfolg zu erzielen.

3. Methodik

3.1 Studienkonzept

Bei den im Zuge dieser Diplomarbeit bearbeiteten Proben handelt es sich um Plasma-, Tumorgewebe- und Lebergewebeproben von Ratten, die von der Universität Göttingen bereitgestellt wurden. Die Analyse erfolgte am Department für klinische Pharmazie und chemische Diagnostik der Universität Wien.

Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt und erhielten entweder NaCl als Blindprobe oder Irinotecan auf eine der drei unterschiedlichen Applikationsarten: systemisch (SYS), hepatoarteriell (HAI), hepatoarteriell mit EmboCept[®] S der PharmaCept GmbH (EMBO) oder hepatoarteriell mit Tandem[®] der Firma CeloNova BioSciences (TAN). Die Ratten erhielten 4mg Irinotecan, was einer durchschnittlichen Dosierung von etwa 16mg pro kg Körpergewicht entspricht. Vier Stunden nach der Applikation wurden die Tiere getötet und jedem Tier wurden eine Plasmaprobe, ein Teil der Leber und jeweils zwei Tumore entnommen. Der Abnahmezeitpunkt nach vier Stunden wurde gewählt, da so beide Hauptanalyten CPT-11 und SN-38 gut quantifizierbar sind. Die Proben wurden eingefroren und alsbald bearbeitet.

3.2 Tiere

In nachstehender Tabelle sind die Daten der untersuchten Tiere im Detail dargestellt.

Tabelle 1: Profil der Tiere

Tiernummer	Alter (in Wochen)	Tag 0	Körpergewicht (an Tag 0)	Tag 10/11	Körpergewicht (an Tag 10/11)
NaCl 375	13	12.11.2016	240g	22.11.2016	260g
NaCl 376	13	12.11.2016	230g	22.11.2016	250g
NaCl 382	13	02.12.2016	285g	12.12.2016	300g
NaCl 383	13	02.12.2016	275g	13.12.2016	290g
NaCl 389	10	23.12.2016	210g	02.01.2017	230g
NaCl 394	9	11.12.2016	200g	21.12.2016	215g
NaCl 395	9	11.12.2016	200g	21.12.2016	220g
NaCl 396	9	11.12.2016	210g	21.12.2016	225g
SYS 377	14	18.11.2016	260g	28.11.2016	275g
SYS 378	14	18.11.2016	270g	28.11.2016	285g
SYS 379	14	18.11.2016	260g	29.11.2016	280g
SYS 384	13	02.12.2016	275g	13.12.2016	290g
SYS 385	13	25.11.2016	265g	05.12.2016	270g
SYS 386	13	25.11.2016	280g	05.12.2016	290g
SYS 387	13	25.11.2016	285g	06.12.2016	300g
SYS 388	13	25.11.2016	270g	06.12.2016	280g
SYS 416	8	29.01.2017	180g	08.02.2017	220g
SYS 419	9	03.02.2017	185g	13.02.2017	210g
SYS 420	9	03.02.2017	170g	13.02.2017	190g
SYS 423	9	03.02.2017	175g	13.02.2017	205g
HAI 390	10	23.12.2016	225g	02.01.2017	245g
HAI 391	10	23.12.2016	230g	03.01.2017	250g
HAI 392	10	23.12.2016	235g	03.01.2017	260g
HAI 393	9	11.12.2016	200g	22.12.2016	210g

Methodik

HAI 397	12	31.12.2016	210g	10.01.2017	220g
HAI 399	12	31.12.2016	225g	11.01.2017	240g
HAI 400	12	31.12.2016	210g	11.01.2017	230g
HAI 409	12	13.01.2017	240g	23.01.2017	265g
EMB 402	13	11.12.2016	235g	16.01.2017	245g
EMB 403	13	23.12.2016	230g	17.01.2017	245g
EMB 404	13	23.12.2016	230g	17.01.2017	250g
EMB 405	11	23.12.2016	245g	17.01.2017	270g
EMB 406	11	31.12.2016	200g	17.01.2017	220g
EMB 407	12	13.01.2016	255g	23.01.2017	270g
EMB 408	12	13.01.2016	225g	23.01.2017	245g
EMB 415	8	29.01.2016	150g	08.02.2017	185g
TAN 411	12	13.01.2017	245g	24.01.2017	265g
TAN 412	12	13.01.2017	230g	24.01.2017	250g
TAN 413	9	03.02.2017	175g	13.02.2017	210g
TAN 417	9	03.02.2017	185g	13.02.2017	220g
TAN 418	9	03.02.2017	150g	14.02.2017	190g
TAN 421	8	29.01.2017	170g	14.02.2017	220g
TAN 422	8	29.01.2017	160g	14.02.2017	210g
TAN 424	8	29.01.2017	165g	14.02.2017	220g

3.3 Analytik

3.3.1 Laborausstattung

Tabelle 2: Geräte und Materialien

Geräte & Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Sartorius handy H110	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Gewebehomogenisator	Minilys® personal homogenizer	BERTIN INSTRUMENTS
Homogenisationsröhrchen	Precellys Lysing Kit CK14	VWR® INTERNATIONAL
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mikropipetten	eppendorf Research	Eppendorf AG
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5ml	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Universal; gelb (2-200µl), blau (50-1000µl)	VWR® INTERNATIONAL
Schüttler	Vortex-Mischer	VELP® SCIENTIFICA
Ultraschallbad	BANDELIN SONOREX RK 510	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vials	2-SV(A)	CHROMACOL®
Zentrifuge	Galaxy 16DH	VWR® INTERNATIONAL

Tabelle 3: Chemikalien und Reagentien

Chemikalien & Reagentien		Hersteller
Acetonitril		Chem-Lab NV
Aqua bidest.		Department für Pharmakognosie, Universität Wien
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Sigma-Aldrich Handels GmbH
H ₃ PO ₄ (Phosphorsäure)		Merck KGaA
Irinotecan (20µg/ml)		Actavis GmbH
Kaliumphosphat monobasisch		Sigma-Aldrich Handels GmbH
Methanol		Merck KGaA
N-Heptansulfonsäure Na-Salz		Sigma-Aldrich Handels GmbH
PBS (Phosphate Buffered Saline)		Sigma-Aldrich Handels GmbH
Phosphorsäure		Merck KGaA
SN-38 Stammlösung 332µMol (1,3mg in 5ml PBS + 5ml DMSO)		Sigma-Aldrich Handels GmbH
Mischungen		
Eluent	in 1000ml: • 750ml Puffer (2.7g Kaliumphosphat monobasisch, 0.5g N-Heptasulfonsäure Na-Salz, 500µl Phosphorsäure 8.5%) • 200ml Acetonitril • 50ml Methanol	
Waschflüssigkeit AS 1	Aqua bidest./Acetonitril (20:80, v/v)	

Tabelle 4: Daten der HPLC-Anlage

VWR® HITACHI Chromaster HPLC-System	
isokratisch	
Vorsäule	LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)
Trennsäule	Waters Symmetry C8 3.5µm; 4.6 x 100mm Cartridge; Part No. WAT066215
Säulenofen	5310
Säulentemperatur	36°C
Eluent	siehe Tabelle 3: Chemikalien und Reagentien
Flussrate	0.8ml/min
Druck	80-100 bar
Injektionsvolumen	10µl oder 5µl
Wellenlänge	Exzitationswellenlänge: CPT-11: 360 SN-38: 376 Emissionswellenlänge: CPT-11: 500 SN-38: 534
Fluoreszenzdetektor	5440 (Sensitivität HIGH)
Analysezeit	20 Minuten
Retentionszeiten	SN-38: 13.9min CPT-11: 17.4min
Pumpe	5110
Auto Sampler	5210
Software	Chromaster

Die für die Analyse von SN-38 und CPT-11 verwendete Methode wurde bereits auf dieser HPLC-Anlage validiert und publiziert (Ettlinger, 2004).

Es handelt sich dabei um eine Ionenpaar-Chromatographie, bei der eine Symmetry C8 Säule verwendet wird. Als stationäre Phase dient in diesem Fall eine Silicageloberfläche, an die hydrophobe Alkylketten (C8) kovalent gebunden sind, wodurch die stationäre Phase apolar wird. Um ein Ionenpaar mit einer geladenen Probenkomponente zu bilden, wird der mobilen Phase ein entgegengesetzt geladener ionischer Stoff zugegeben. Dabei entsteht ein Salz, das in seinem chromatographischen Verhalten einem nicht-ionischen organischen Molekül gleicht. Dieses lässt sich dann mittels Umkehrphase trennen, wobei bei apolaren Strukturen längere Retentionszeiten auftreten als bei polaren. Mit beschriebener Art der HPLC lassen sich Säuren, Basen und Neutralstoffe gleichzeitig analysieren (Meyer, 2004).

Während der gesamten Zeit der Analyse wurde die Zusammensetzung des Eluenten gleich gehalten. Man spricht daher von einer isokratischen Elution.

Zur Detektion von CPT-11 und SN-38 kann aufgrund deren fluoreszierender Eigenschaften ein Fluoreszenzdetektor eingesetzt werden. Dabei wird die Probenzelle mit Licht bestimmter Wellenlänge (Exzitationswellenlänge siehe Tabelle 4) bestrahlt und das emittierte Licht aufgefangen (Meyer, 2004).

3.3.2 Verwendete Software

Tabelle 5: Software

Software	Verwendungszweck
GraphPad Molarity Calculator	Berechnung von Verdünnungen
GraphPad Prism® 7.0	Erstellung von Grafiken und Layouts, Berechnungen
Microsoft® Office Excel 2011	Auflistung der Daten, Statistik, Berechnungen
Microsoft® Office Word 2011	Niederschrift

3.3.3 Erstellung der Eichgeraden

Für die Quantifizierung von CPT-11 und SN-38 in den Proben ist es notwendig Eichgeraden für beide Substanzen jeweils sowohl im Plasma als auch im Lebergewebe zu erstellen. Was die Konzentrationen im Tumorgewebe betrifft, wird angenommen, dass eine Verteilung dorthin in gleichem Maße erfolgt wie in das Lebergewebe und somit diese Eichgerade verwendet. Es wird ein externer Standard verwendet.

3.3.3.1 CPT-11 im Plasma

Die hierbei verwendete Stammlösung von CPT-11 ist 34µM. Mit dem Molarity Calculator wird berechnet, wie viel von dieser für 2ml einer 3µM Verdünnung benötigt wird. Die genauen Mengen sind in Tabelle 6 angeführt. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe erstellt. Hierfür wird jeweils 1ml Plasma vorgelegt und dann 1ml der vorangegangenen Verdünnung hinzu pipettiert. Die Mischung muss am Vortex-Mischer gut homogenisiert werden bevor der nächste Verdünnungsschritt durchgeführt wird. Als Fällungsreagenz für die im Plasma vorhandenen Proteine kommt angesäuertes Acetonitril zum Einsatz. Dafür werden jeweils 300µl der Verdünnung mit der 2.5 fachen Menge Acetonitril (dies entspricht 750µl) versetzt. Nach dem Abzentrifugieren der gefällten Proteine bei 13 000 RPM für 5 Minuten werden 600µl des Überstandes in ein HPLC-Gefäß überführt und im Anschluss analysiert.

Tabelle 6: Verdünnungsreihe für die Erstellung der Eichgeraden von CPT-11 im Plasma

	Konzentration	Verdünnung
A	3µM	176µl Stammlösung + 1824µl Plasma
B	1.5µM	1ml Verdünnung A + 1ml Plasma
C	0.75µM	1ml Verdünnung B + 1ml Plasma
D	0.375µM	1ml Verdünnung C + 1ml Plasma
E	0.188µM	1ml Verdünnung D + 1ml Plasma
F	0.094µM	1ml Verdünnung E + 1ml Plasma

3.3.3.2 CPT-11 im Lebergewebe

Hierfür wird ebenfalls die in Punkt 3.3.3.1 angeführte 34µM Stammlösung von CPT-11 verwendet. Das Lebergewebe wird mit der in Tabelle 7 aufgelisteten Menge an PBS versetzt und anschließend die CPT-11 Stammlösung zugegeben. Die für die entsprechende Verdünnung benötigte Menge an CPT-11 wird mit dem Molarity Calculator ermittelt und ist ebenfalls untenstehender Tabelle 7 zu entnehmen. Mit dem MiniLys® wird das Lebergewebe drei Mal für jeweils 15 Sekunden homogenisiert. Um, wie auch bei den Plasmaproben, die enthaltenen Proteine zu fällen, werden 300µl des entstandenen Homogenisats mit der 2.5 fachen Menge an angesäuertem Acetonitril versetzt und die Proteine dann mittels Zentrifugation bei 13 000 RPM für 5 Minuten abgetrennt. 600µl des Überstands werden zur Analyse in HPLC-Gefäße überführt.

Tabelle 7: genaue Mengenangaben für die Erstellung der Eichgeraden von CPT-11 im Lebergewebe

Konzentration	Lebergewebe	CPT-11 (34µM)	PBS	Endvolumen
3.0µM	150mg	80µl	670µl	900µl
1.5µM	140mg	37µl	663µl	840µl
0.75µM	150mg	19.8µl	730µl	900µl
0.375µM	160mg	10.6µl	789µl	960µl
0.188µM	160mg	5.3µl	795µl	960µl

3.3.3.3 SN-38 im Plasma

Für die Erstellung der Eichgerade von SN-38 im Plasma wird eine 332µM Stammlösung in PBS/DMSO (1.3mg SN-38 in 5ml PBS + 5ml DMSO) verwendet. Die Vorgehensweise ist analog zu der in Punkt 3.3.3.1 angeführten Aufarbeitung von CPT-11, nur dass in diesem Fall für die Verdünnungsreihe eine Anfangskonzentration von 5µM gewählt wurde. Die genauen Mengenangaben können Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Verdünnungsreihe für die Erstellung der Eichgeraden von SN-38 im Plasma

	Konzentration	Verdünnung
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

3.3.3.4 SN-38 im Lebergewebe

Die 332µM Stammlösung von SN-38 wird 1:10 mit PBS und DMSO verdünnt (100µl Stammlösung + 450µl PBS + 450µl DMSO). Alle weiteren Schritte der Bearbeitung erfolgen in gleicher Weise wie bei der Erstellung der Eichgeraden von CPT-11 im Lebergewebe.

Tabelle 9: genaue Mengenangaben für die Erstellung der Eichgeraden von SN-38 im Lebergewebe

Konzentration	Lebergewebe	SN-38 (33.2µM)	PBS	Endvolumen
2.5µM	180mg	81µl	820µl	1080µl
1.25µM	180mg	40.6µl	860µl	1080µl
0.625µM	170mg	19.2µl	830µl	1020µl
0.315µM	180mg	10.1µl	890µl	1080µl
0.156µM	190mg	5.35µl	945µl	1140µl

3.3.4 Ergebnisse der Eichgeraden

In den folgenden Abbildungen und Tabellen sind die Eichgeraden von SN-38 und CPT-11 jeweils sowohl im Plasma als auch im Lebergewebe dargestellt. Für jedes Kompartiment wurden zwei Eichgeraden erstellt. Die Ergebnisse unterschieden sich nur geringfügig, sodass im Anschluss nur mit einer Eichgeraden weitergearbeitet wurde. Es sind nur diejenigen angegeben, die auch im weiteren Verlauf verwendet wurden.

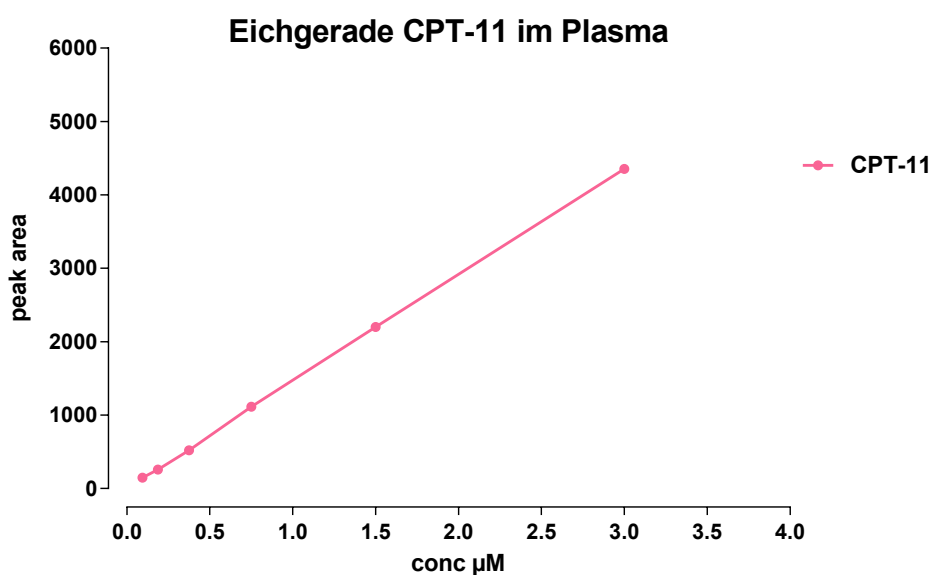


Abbildung 9: Eichgerade von CPT-11 im Plasma

Tabelle 10: Statistische Parameter der Eichgerade von CPT-11 im Plasma

Best fit Values	
Slope	$1455 \pm 8,721$
Y-intercept	1.03 ± 12.33
X-intercept	-0.0007082
95% Confidence Intervals	
Slope	1430 to 1479
Y-intercept	-33.21 to 35.27
X-intercept	-0.02453 to 0.02257
Goodness of Fit	
R square	0.9999
Data	
Number of X Values	6
Equation	
$Y = 1455 \cdot X + 1.03$	

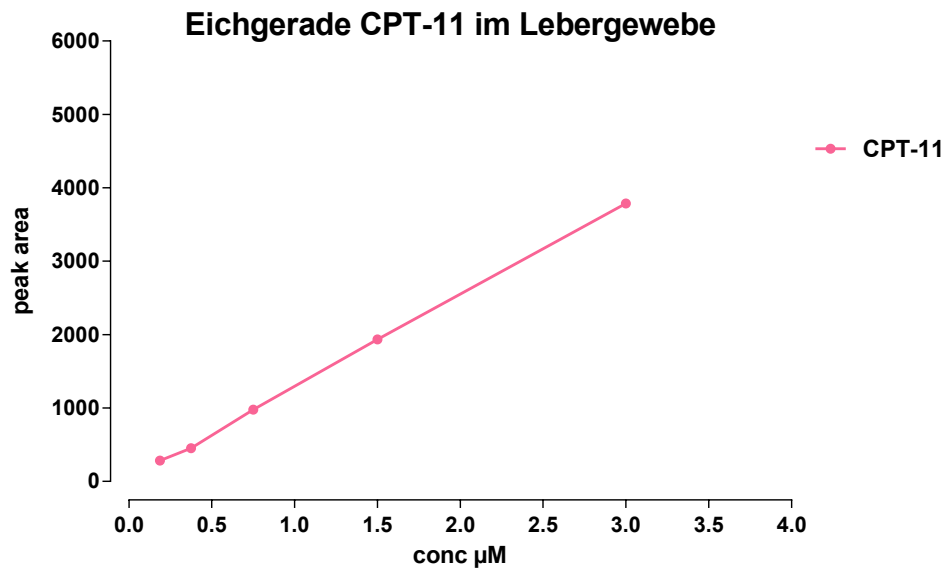


Abbildung 10: Eichgerade von CPT-11 im Lebergewebe

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

Best fit Values	
Slope	1256 ± 14.11
Y-intercept	27.01 ± 21.85
X-intercept	-0.0215
95% Confidence Intervals	
Slope	1211 to 1301
Y-intercept	-42.53 to 96.56
X-intercept	-0.07901 to 0.03297
Goodness of Fit	
R square	0.9996
Data	
Number of X Values	6
Equation	
$Y = 1256 \cdot X + 27.01$	

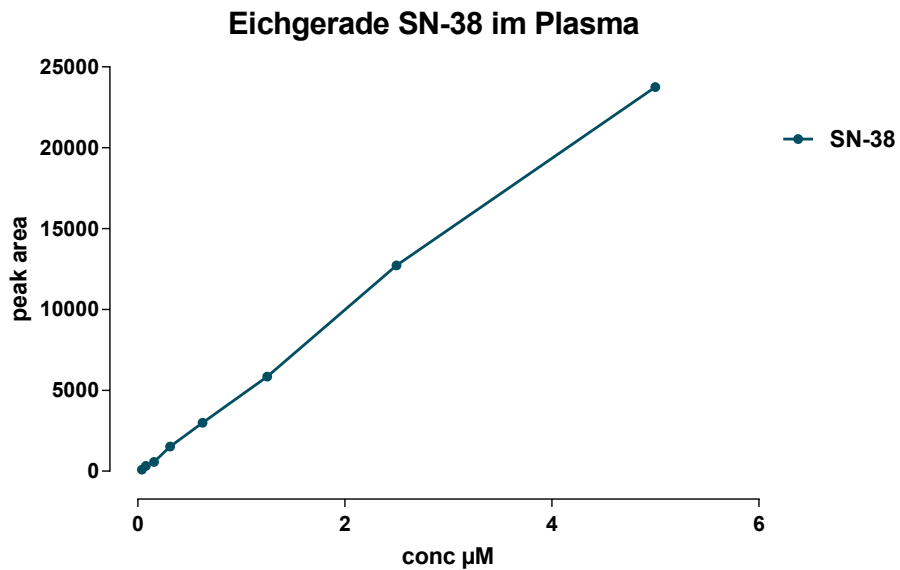


Abbildung 11: Eichgerade von SN-38 im Plasma

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

Best fit Values	
Slope	$4817 \pm 71,76$
Y-intercept	-20.39 ± 146.5
X-intercept	0,004232
95% Confidence Intervals	
Slope	4642 to 4993
Y-intercept	-378.8 to 338.1
X-intercept	-0.0718 to 0.07696
Goodness of Fit	
R square	0.9987
Data	
Number of X Values	8
Equation	
$Y = 4817 \cdot X - 20.39$	

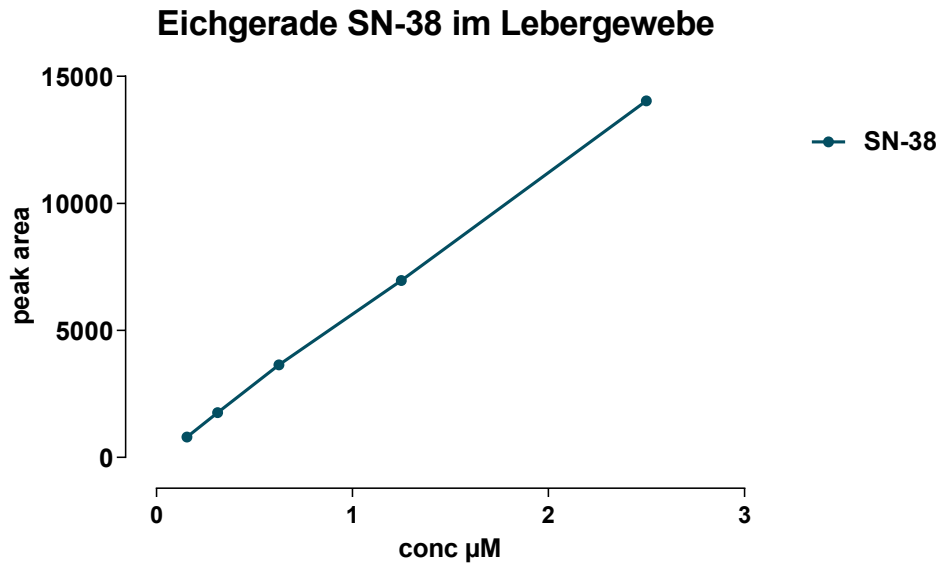


Abbildung 12: Eichgerade von SN-38 im Lebergewebe

Tabelle 13: Statistische Parameter der Eichgerade von SN-38 im Lebergewebe

Best fit Values	
Slope	5611 ± 48.38
Y-intercept	5.341 ± 62.42
X-intercept	-0.0009518
95% Confidence Intervals	
Slope	5457 to 5765
Y-intercept	-193.3 to 204
X-intercept	-0.03713 to 0.03376
Goodness of Fit	
R square	0.9998
Data	
Number of X Values	5
Equation	
$Y = 5611 \cdot X + 5.341$	

3.3.5 Beispielchromatogramme

Untenstehend sind charakteristische Chromatogramme der Analyse von CPT-11 und SN-38 in Plasma- und Gewebeproben dargestellt, die im Zuge der Erstellung der Eichgeraden entstanden sind. Der Peak von CPT-11 ist bei einer Retentionszeit von 17.4min zu sehen und der Peak von SN-38 ist bei 13.9min erkennbar.

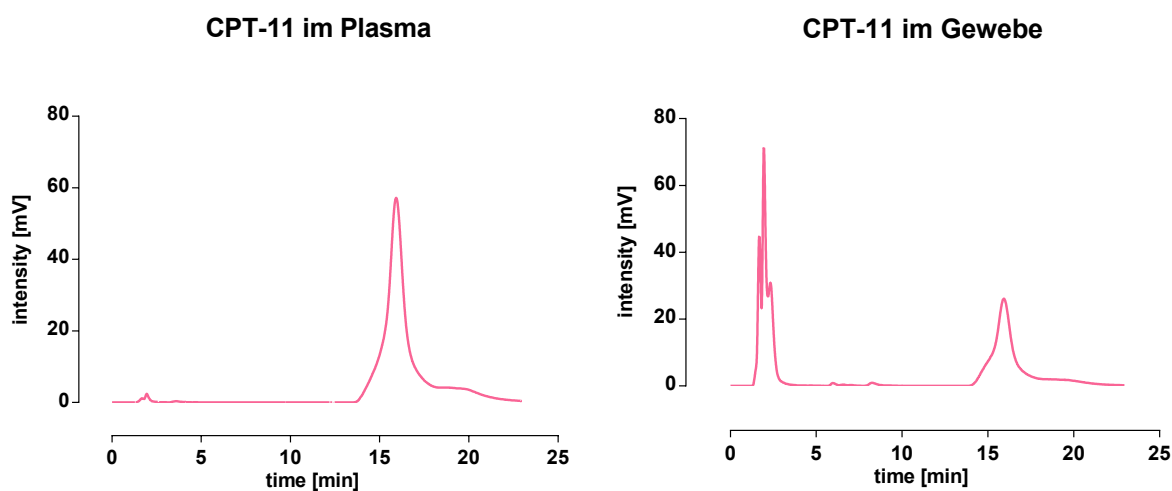


Abbildung 9: Beispielchromatogramme von CPT-11 im Plasma und im Gewebe

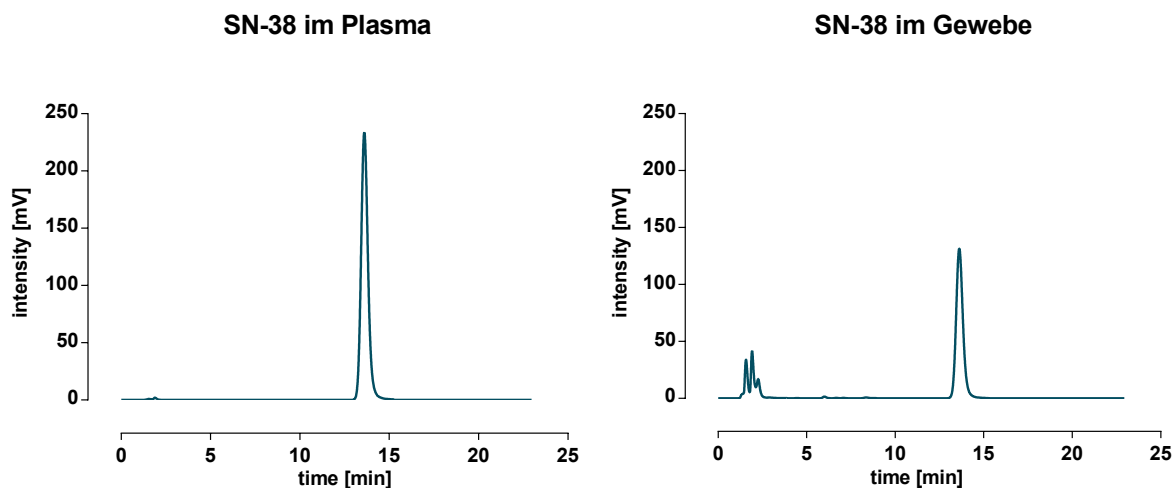


Abbildung 10: Beispielchromatogramme von SN-38 im Plasma und im Gewebe

3.3.6 Vorbereitung und Aufarbeitung der Proben

3.3.6.1 Plasmaproben

Die gefrorenen Proben der Universität Göttingen werden bei Zimmertemperatur aufgetaut und am Vortex-Mischer kurz durchmischt. Sofern ausreichend Plasma vorhanden ist, werden 200µl entnommen und anschließend mit der 2.5 fachen Menge angesäuertem Acetonitril versetzt. Nach kurzer (10 Sekunden) Durchmischung am Vortex-Mischer werden die gefällten Proteine bei 13 000RPM für 5 Minuten abzentrifugiert. 600µl des klaren Überstandes werden für die HPLC-Analyse in entsprechende Vials überführt.

3.3.6.2 Leberproben

Von den ebenfalls bei Zimmertemperatur aufgetauten Leberproben werden jeweils ungefähr 100mg Lebergewebe mit dem Sezierbesteck abgeschnitten und in Homogenisationsröhrchen CK14 gegeben. Die genauen Mengen sind in Anhang A angeführt. Im Anschluss wird die 10 fache Menge an mit H₃PO₄ angesäuertem Acetonitril zugegeben. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgt am MiniLys für jeweils dreimal 15 Sekunden auf der höchsten Stufe. Die festen Bestandteile und gefällten Proteine werden wieder bei 13 000RPM für 5 Minuten abzentrifugiert und 600µl des Überstandes, wie auch schon bei den Plasmaproben, in die HPLC-Vials pipettiert.

3.3.6.3 Tumorproben

Die Aufarbeitung der Tumorproben erfolgt sehr ähnlich zu der des Lebergewebes. In diesem Fall wird aber der gesamte Tumor in die Homogenisationsröhrchen überführt. Die genauen Massen können wieder der Tabelle in Anhang A entnommen werden. Auch hier wird anschließend die fünf bis 20 fache Menge an angesäuertem Acetonitril (je nach Gewicht des Tumors) zugegeben und mit Hilfe des MiniLys homogenisiert. Da es sich beim Tumor häufig um sehr hartes Gewebe handelt, erfolgt die Homogenisierung dreimal für 30 Sekunden auf der höchsten Stufe des Gerätes. Bei sehr harten und großen Stücken kann durch weitere 30 Sekunden mit dem MiniLys das Ergebnis verbessert werden. Auch hier werden die festen Bestandteile bei 13 000RPM für 5 Minuten abzentrifugiert und in diesem Fall nur 500µl des Überstandes für die HPLC-Analyse bereitgestellt.

3.4 Berechnungen

3.4.1 Deskriptive Statistik

Ziel der deskriptiven Statistik ist eine übersichtliche Darstellung und Ordnung empirischer Daten durch Grafiken und Tabellen. Des Weiteren soll durch geeignete grundlegende Kenngrößen eine zahlenmäßige Beschreibung erfolgen. Da diese Form der Statistik jedoch keine stochastischen Modelle verwendet, ist eine Absicherung der getroffenen Aussagen durch Fehlerwahrscheinlichkeiten nicht möglich (Steland, 2007).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) zur genaueren Beschreibung der Daten herangezogen. Der Mittelwert, genauer das arithmetische Mittel, berechnet sich durch das Teilen der Summe aller durchgeführten Messungen durch die Anzahl der Messungen. Die Standardabweichung ist die Quadratwurzel der Varianz, welche durch den Durchschnitt der quadrierten Abweichungen vom arithmetischen Mittel berechnet wird (Bärlocher, 1999).

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

Berechnet wurden diese Werte mit Hilfe von Microsoft® Office Excel 2011.

3.4.2 Induktive Statistik

Mit Methoden der induktiven Statistik werden Schlussfolgerungen, Prognosen oder Entscheide basierend auf der deskriptiven Statistik erarbeitet (Bärlocher, 1999).

Um zwei Proben miteinander zu vergleichen wird der T-Test angewendet. Im Falle dieser Diplomarbeit wurde der zweiseitige, ungepaarte, unabhängige T-Test durchgeführt. So konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Applikationsformen und Kompartimenten aufgezeigt werden.

Im Allgemeinen versucht der T-Test eine Nullhypothese H_0 zu widerlegen und somit zu belegen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben besteht.

Der α -Wert, der auch als Signifikanzniveau oder Irrtumswahrscheinlichkeit bezeichnet wird, gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine wahre Nullhypothese abgelehnt wird. Je niedriger dieses Signifikanzniveau ist, desto größer ist die Sicherheit, dass der beobachtete Effekt zuverlässig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde ein α -Wert von 0.05 gewählt. Der T-Test liefert als Ergebnis den Zahlenwert p . Wenn dieser Wert p unter dem festgelegten Signifikanzniveau von 5% ($\alpha = 0.05$) liegt, kann die Nullhypothese verworfen werden und das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen werden. Es besteht also ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Bei einem Wert über 0.05 handelt es sich um keinen signifikanten Unterschied, die Nullhypothese ist belegt und die beiden Gruppen unterscheiden sich somit nicht (Bärlocher, 1999).

Ein zweiseitiger T-Test wird angewendet, wenn die Richtung der Differenz nicht vorhergesagt werden kann und eine Untersuchung ohne eine bestimmte Erwartung durchgeführt wird. Ein unabhängiger Test wird herangezogen, wenn es sich um zwei völlig unabhängige Stichproben handelt (Phillips, 1997).

Die Varianzanalyse, aus dem Englischen von ANOVA (Analysis Of Variance), die von R.A. Fisher eingeführt wurde, dient zum Vergleich von mehreren Probengruppen. Das Grundprinzip ist ähnlich dem des T-Tests, denn auch hier wird durch Ermittlung eines p -Werts die Nullhypothese entweder belegt oder verworfen. Eine unabhängige Variable, die auch als Faktor bezeichnet wird, definiert die zu untersuchenden Gruppen. Genauer betrachtet untersucht also die ANOVA, ob sich die Mittelwerte dieser unabhängigen Variablen zwischen mehreren Gruppen unterscheiden und im Falle der einfaktoriellen Varianzanalyse wird nur der Einfluss eines einzigen Faktors beobachtet. Durch das Vorkommen einer großen Innergruppenvariation oder einem sehr kleinen Stichprobenumfang kann oftmals keine Aussage getroffen werden, ob der Unterschied zwischen den Gruppen echt oder durch Zufall entstanden ist (Rowe, 2012).

Die Berechnungen wurden mit GraphPad Prism[®] 7.0 durchgeführt.

3.4.3 Metabolische Aktivierung

Das Enzym Carboxylesterase (CES) ist hauptverantwortlich für die Umwandlung von CPT-11 in seinen aktiven Metaboliten SN-38. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivierung von Irinotecan wurde folgende Formel herangezogen:

$$R_{\text{CES}} = \frac{\text{AUC}_{\text{SN-38}}}{\text{AUC}_{\text{CPT-11}}}$$

Um die Enzymaktivität zu ermitteln wird die Fläche unter der Kurve (AUC) des Metaboliten SN-38 durch die des Vorläufers, in diesem Fall CPT-11, dividiert. Je größer der erhaltene Wert R, desto mehr aktiver Wirkstoff ist entstanden.

Für die Durchführung dieser Berechnung wurde Microsoft® Office Excel 2011 herangezogen.

4. Ergebnisse

4.1 Chromatogramme

In nachfolgenden Abbildungen sind charakteristische Beispielchromatogramme der im Zuge dieser Diplomarbeit analysierten Tumorproben dargestellt. Dabei werden die unterschiedlichen Arten der Applikation von Irinotecan jener Tiergruppe gegenübergestellt, die nur NaCl verabreicht bekommen hat. Bei dieser ist im Bereich der Retentionszeiten von CPT-11 und SN-38 kein Peak erkennbar und sie kann somit als Blindprobe verwendet werden.

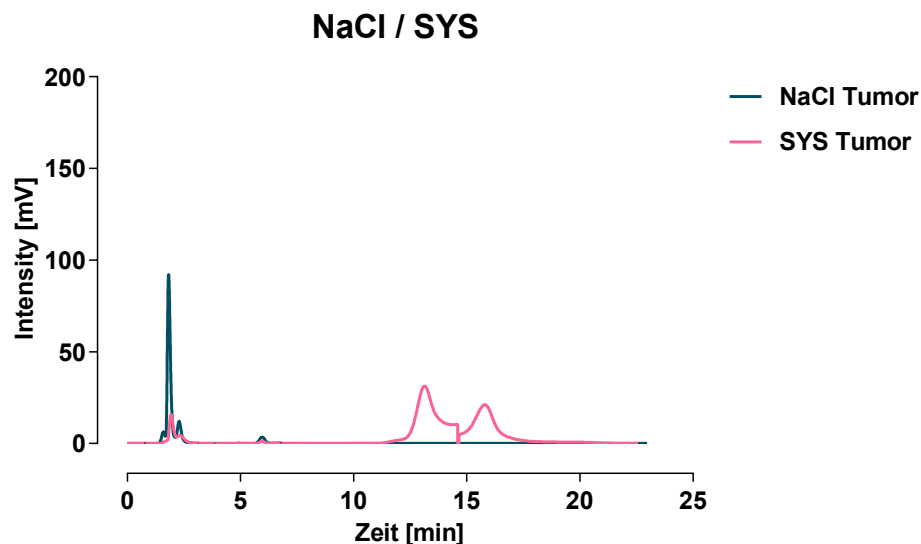


Abbildung 11: Beispielchromatogramm NaCl / Irinotecan systemisch im Tumor

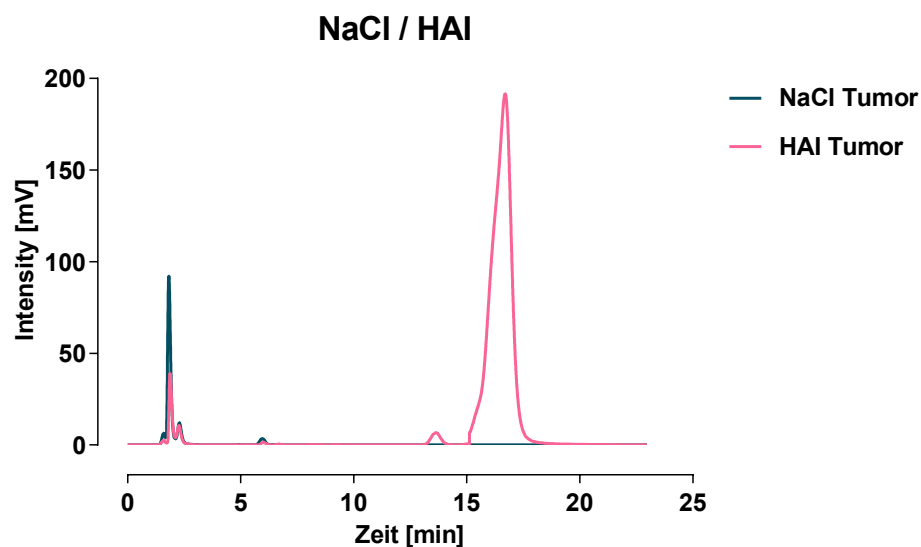


Abbildung 12: Beispielchromatogramm NaCl / Irinotecan hepatoarteriell im Tumor

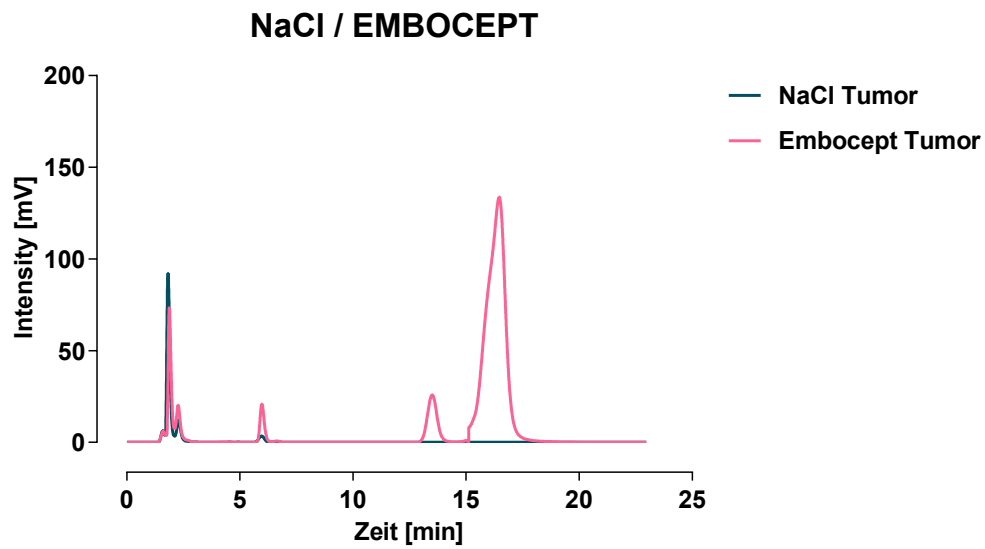


Abbildung 13: Beispielchromatogramm NaCl / Irinotecan mit Embocept im Tumor

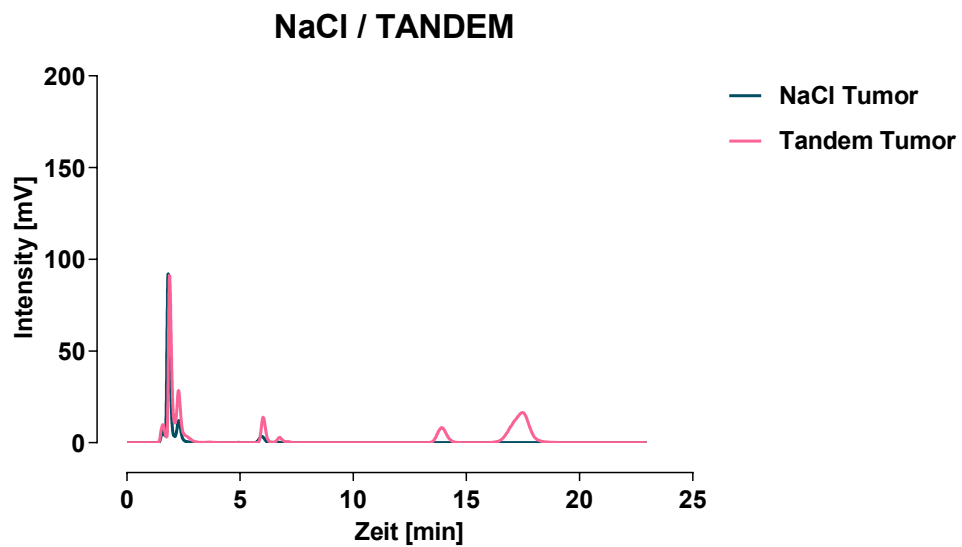


Abbildung 14: Beispielchromatogramm NaCl / Irinotecan mit Tandem im Tumor

4.2 Konzentrationen

Über die durch die HPLC-Analyse erhaltenen Peakflächen kann mit Hilfe der durch die Eichgerade in Abschnitt 3.3.4 ermittelten Formel $y=kx+d$ die Konzentration x von CPT-11 und SN-38 errechnet werden.

Anzumerken ist, dass bei den Proben NaCl 375, 376, 382, 383 und SYS 377, 378, 379, 384, 385, 386, 387, 388 für die Quantifizierung von SN-38 eine andere Einstellung des Fluoreszenzdetektors (SUPER HIGH) und somit eine andere Eichgerade (Plasma: $k=8240$, $d=250$ und Gewebe: $k=12971$) verwendet wurde.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen Plasmaproben und Gewebeproben von Leber und Tumor zu ermöglichen, wurde ein Faktor herangezogen. Dieser Faktor errechnet sich aus den unterschiedlichen Acetonitril-Volumina, die bei der Erstellung der Eichgeraden (2.5 fache Menge) und bei der Analyse der Rattenproben (5/10/20 fache Menge) verwendet wurden. Die genauen Mengen an Acetonitril und der verwendete Faktor sind Anhang A zu entnehmen.

Auf den nachfolgenden Seiten sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 in Tabellen dargestellt und anschließend die genauen Werte noch in Grafiken veranschaulicht. Die Tabellen mit den berechneten Konzentrationen aller Versuchstiere befinden sich in Anhang B bis E.

Zur besseren Veranschaulichung sind in den Grafiken die beiden Tumore zusammengefasst und um die Konzentrationen besser miteinander vergleichen zu können ist im Diagramm von CPT-11 auf Seite 36 bei $10\mu\text{mol/ml}$ bzw. $10\mu\text{mol/g}$ und im Diagramm von SN-38 auf Seite 39 bei $1\mu\text{mol/ml}$ bzw. $1\mu\text{mol/g}$ eine Hilfslinie eingezeichnet.

4.2.1 Konzentrationen von CPT-11 nach unterschiedlichen Arten der Applikation

Eine systemische Applikation von Irinotecan bringt eine gewünscht hohe Konzentration von CPT-11 im Tumorgewebe und sehr geringe Werte im Plasma. Auffällig ist auch eine sehr hohe Standardabweichung bei den Tumorproben.

Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung von CPT-11 nach systemischer Applikation

SYSTEMISCH				
		Plasma	Leber	Tumor
CPT-11	Mittelwert	0.745	14.96	33.98
	SD	0.7564	12.36	48.08
	Probenzahl	12	12	22

Nach hepatoarterieller Verabreichung von Irinotecan sind höhere Konzentrationen von CPT-11 in der Leber und im Tumor auffällig im Vergleich zu den Werten nach systemischer Applikation. Auch in diesem Fall wird das positive Ergebnis von hohen Tumorkonzentrationen und niedrigen Plasmakonzentrationen erreicht. Ebenso zeigt sich im Falle der Tumorproben wieder eine sehr hohe Standardabweichung.

Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung von CPT-11 nach hepatoarterieller Applikation

HEPATOARTERIELL				
		Plasma	Leber	Tumor
CPT-11	Mittelwert	2.84	46.73	325.50
	SD	1.901	16.25	259.10
	Probenzahl	8	8	16

Nach einer Applikation von Irinotecan mit EmboCept® S treten im Plasma ähnliche Konzentrationen von CPT-11 wie nach hepatoarterieller Verabreichung auf. Ebenso sind auch hier beim Vergleich der Kompartimente sehr hohe Konzentrationen im Leber- und Tumorgewebe auffällig. Jedoch sind diese Werte niedriger als nach der hepatoarteriellen Applikation, wodurch die EmboCept® S-Methode weniger vorteilhaft scheint.

Tabelle 16: Mittelwert und Standardabweichung von CPT-11 nach Applikation mit EmboCept® S

EMBOCEPT® S				
		Plasma	Leber	Tumor
CPT-11	Mittelwert	4.225	26.37	216.70
	SD	6.379	5.512	186.00
	Probenzahl	8	6	14

Nach der Applikation mit der Tandem®-Methode sind die Plasmakonzentrationen von CPT-11 am niedrigsten im Vergleich mit den anderen Applikationsformen. Es waren überhaupt nur zwei der Proben auswertbar, da die restlichen Werte unter der Nachweisgrenze des Analysensystems liegen (LOQ = limit of quantitation). Auch die Werte für den Tumor sind größtenteils um einiges niedriger als bei den anderen Darreichungsformen.

Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung von CPT-11 nach Applikation mit Tandem®

TANDEM®				
		Plasma	Leber	Tumor
CPT-11	Mittelwert	0.003	0.555	11.17
	SD	0.005	0.689	9.643
	Probenzahl	6	6	12

4.2.2 Grafische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11

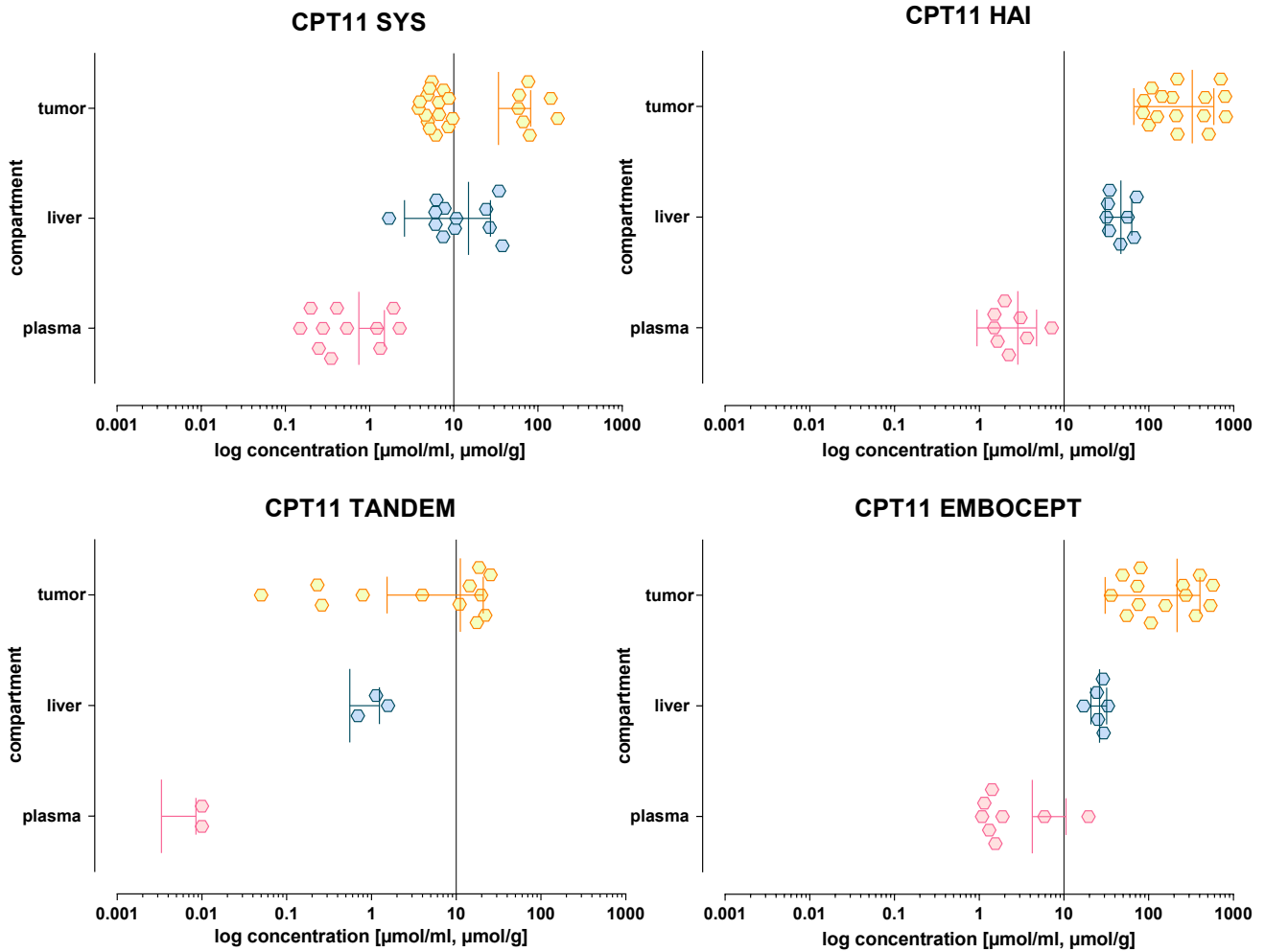


Abbildung 15: grafische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 nach unterschiedlichen Arten der Applikation

4.2.3 Konzentrationen von SN-38 nach unterschiedlichen Arten der Applikation

Nach systemischer Applikation von Irinotecan treten in der Leber höhere Konzentrationen von SN-38 als im Tumor auf. Dies deutet auf eine bessere enzymatische Umsetzungsrate im der Leber hin.

Tabelle 18: Mittelwert und Standardabweichung von SN-38 nach systemischer Applikation

SYSTEMISCH				
		Plasma	Leber	Tumor
SN-38	Mittelwert	0.22	1.093	0.5673
	SD	0.1251	0.4196	0.2766
	Probenzahl	12	12	22

Des Weiteren ist auffällig, dass die Gruppen der systemischen und der hepatoarteriellen Applikation für den Metaboliten SN-38 in allen Kompartimenten sehr ähnliche Werte aufweisen. Dieses Ergebnis lässt eine allgemein sehr niedrige enzymatische Umsetzung nach hepatoarterieller Applikation annehmen, da die Konzentration von CPT-11 nach dieser Darreichungsform in Leber und Tumor am höchsten war (siehe Seite 34).

Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung von SN-38 nach hepatoarterieller Applikation

HEPATOARTERIELL				
		Plasma	Leber	Tumor
SN-38	Mittelwert	0.2375	1.013	0.5775
	SD	0.06563	0.1589	0.1752
	Probenzahl	8	8	16

Im Vergleich zu den Werten der systemischen oder hepatoarteriellen Applikation liegen bei der Gruppe, die mit EmboCept® S behandelt wurde, im Tumorgewebe deutlich höhere Werte für SN-38 vor. Der Mittelwert im Tumor liegt deutlich über 1µmol/g, was bei keiner der anderen untersuchten Gruppen der Fall ist.

Tabelle 20: Mittelwert und Standardabweichung von SN-38 nach Applikation mit EmboCept® S

EMBOCEPT® S				
		Plasma	Leber	Tumor
SN-38	Mittelwert	0.2425	0.8657	1.601
	SD	0.1513	0.3492	1.938
	Probenzahl	8	7	14

Was die Konzentrationen von SN-38 nach der Applikation von Irinotecan mit Tandem® betrifft, so sind sehr niedrige Werte im Plasma und der Leber zu beobachten. Aber auch hier stehen beispielsweise, wie schon bei der Analyse von CPT-11 für die Plasmakonzentrationen nur drei Werte zur Verfügung, weil der Rest unter der Quantifizierungsgrenze des Analysensystems liegt. Bei einer alleinigen Betrachtung der Werte für die Tandem®-Applikation sieht man auch hier deutlich, wie auch schon nach der Applikation mit EmboCept® S, dass der aktive Metabolit SN-38 in der höchsten Konzentration im Tumorgewebe vorkommt.

Tabelle 21: Mittelwert und Standardabweichung von SN-38 nach Applikation mit Tandem®

TANDEM®				
		Plasma	Leber	Tumor
SN-38	Mittelwert	0.01167	0.04667	0.3267
	SD	0.01472	0.03011	0.3271
	Probenzahl	6	6	12

4.2.4 Grafische Darstellung der Konzentrationen von SN-38

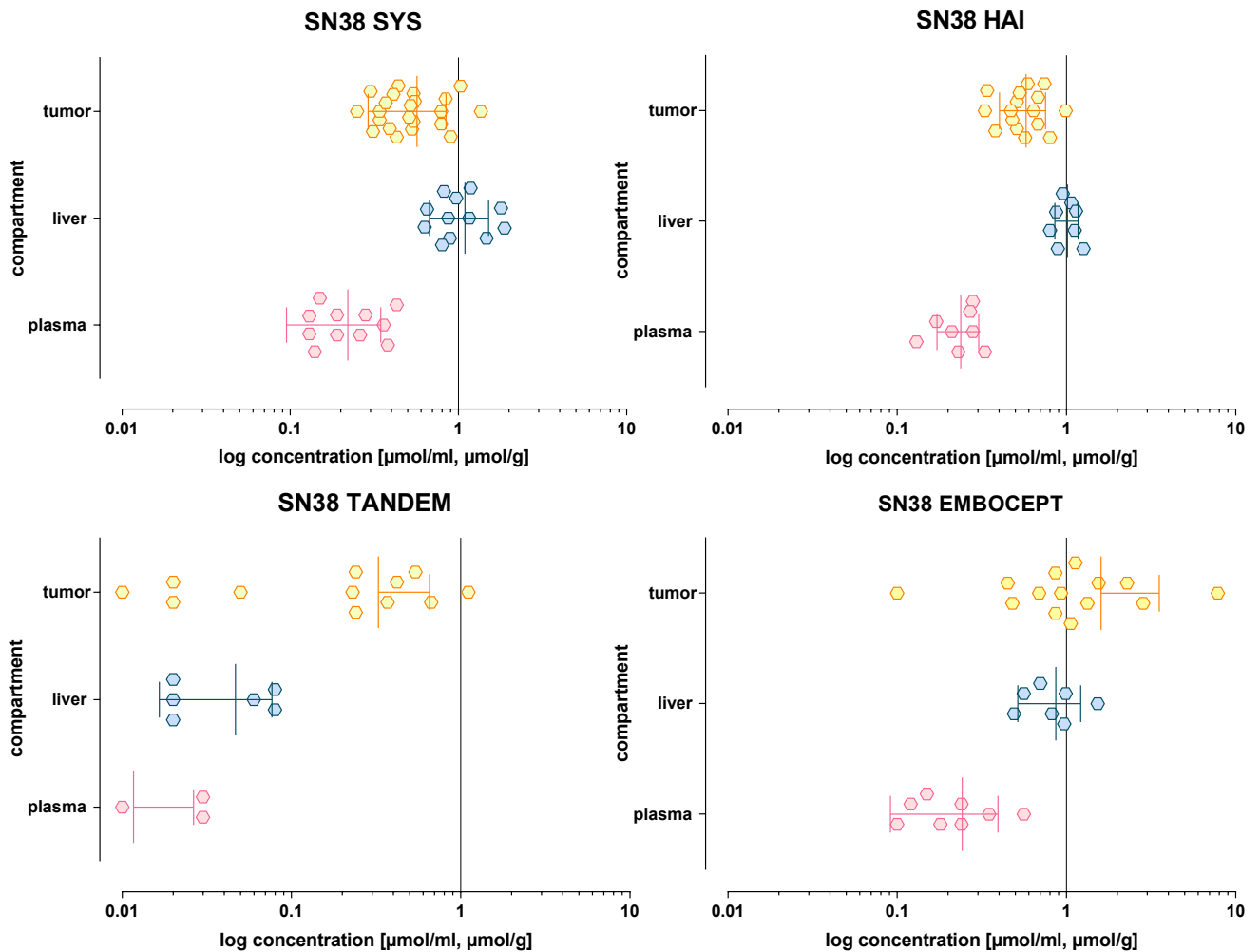


Abbildung 16: grafische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 nach unterschiedlichen Arten der Applikation

4.3 Auswertung der metabolischen Aktivierung

Wie bereits in Punkt 3.4.3 erwähnt, wandelt das Enzym Carboxylesterase (CES) CPT-11 in den aktiven Metaboliten SN-38 um. Zur Ermittlung der Aktivität dieses Enzyms wird der R-Wert herangezogen. Je größer dieser Wert, desto mehr Produkt entsteht nun also aus dem Precursor und in Folge kann von einer hohen Enzymaktivität ausgegangen werden.

Die Tabellen 22, 23, 24 und 25 auf den folgenden Seiten zeigen die berechneten R-Werte für jedes Versuchstier, unterteilt nach den verschiedenen Applikationsformen. In Abschnitt 4.5.5 werden die ermittelten Werte im Vergleich dargestellt und diskutiert.

4.3.1 Enzymaktivität nach systemischer Applikation

Tabelle 22: berechnete R-Werte nach systemischer Verabreichung

Tiere	R-Werte			
	Plasma	Leber	Tumor 1	Tumor 2
SYS 377	1.027	0.094	0.061	0.093
SYS 378	0.898	0.142	0.161	0.134
SYS 379	LOQ	0.368	0.066	n.v.
SYS 384	0.682	0.108	0.063	0.082
SYS 385	0.744	0.104	0.041	0.067
SYS 386	0.266	0.115	0.062	0.131
SYS 387	0.363	0.135	0.116	0.066
SYS 388	0.463	0.106	0.078	0.049
SYS 416	0.223	0.052	0.010	0.006
SYS 419	0.313	0.049	0.005	n.v.
SYS 420	0.212	0.055	0.010	0.007
SYS 423	0.158	0.050	0.014	0.006
Mittelwert	0.486	0.115	0.057	0.064
SD	0.302	0.086	0.047	0.048

4.3.2 Enzymaktivität nach hepatoarterieller Applikation

Tabelle 23: berechnete R-Werte nach hepatoarterieller Verabreichung

Tiere	R-Werte			
	Plasma	Leber	Tumor 1	Tumor 2
HAI 390	0.140	0.025	0.002	0.004
HAI 391	0.146	0.021	0.001	0.000
HAI 392	0.173	0.032	0.007	0.006
HAI 393	0.141	0.025	0.003	0.004
HAI 397	0.076	0.016	0.007	0.004
HAI 399	0.178	0.026	0.001	0.001
HAI 400	0.047	0.022	0.001	0.001
HAI 409	0.018	0.017	0.002	0.006
Mittelwert	0.115	0.023	0.003	0.003
SD	0.049	0.005	0.003	0.002

4.3.3 Enzymaktivität nach Applikation mit EmboCept® S

Tabelle 24: berechnete R-Werte nach Verabreichung mit EmboCept® S

Tiere	R-Werte			
	Plasma	Leber	Tumor 1	Tumor 2
EMB 402	0.13	0.04	0.01	0.01
EMB 403	0.22	0.04	0.00	0.01
EMB 404	0.06	0.03	0.01	0.01
EMB 405	0.08	0.02	0.01	0.00
EMB 406	0.04	0.01	0.01	n.v.
EMB 407	0.14	0.02	0.00	0.00
EMB 408	0.03	0.01	0.02	0.01
EMB 415	0.25	0.05	0.02	n.v.
Mittelwert	0.12	0.03	0.01	0.01
SD	0.08	0.01	0.01	0.00

4.3.4 Enzymaktivität nach Applikation mit Tandem®

Tabelle 25: berechnete R-Werte nach Verabreichung mit Tandem®

Tiere	R-Werte			
	Plasma	Leber	Tumor 1	Tumor 2
TAN 411	(0.33)	LOQ	LOQ	n.v.
TAN 412	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
TAN 413	LOQ	LOQ	0.01	0.01
TAN 417	1.96	0.12	0.02	0.03
TAN 418	LOQ	LOQ	0.03	0.20
TAN 421	LOQ	0.05	0.06	0.08
TAN 422	3.85	0.05	0.02	0.04
TAN 424	LOQ	LOQ	0.20	0.06
Mittelwert	2.91	0.07	0.06	0.07
SD	1.33	0.04	0.07	0.07

4.3.5 Vergleich der R-Werte

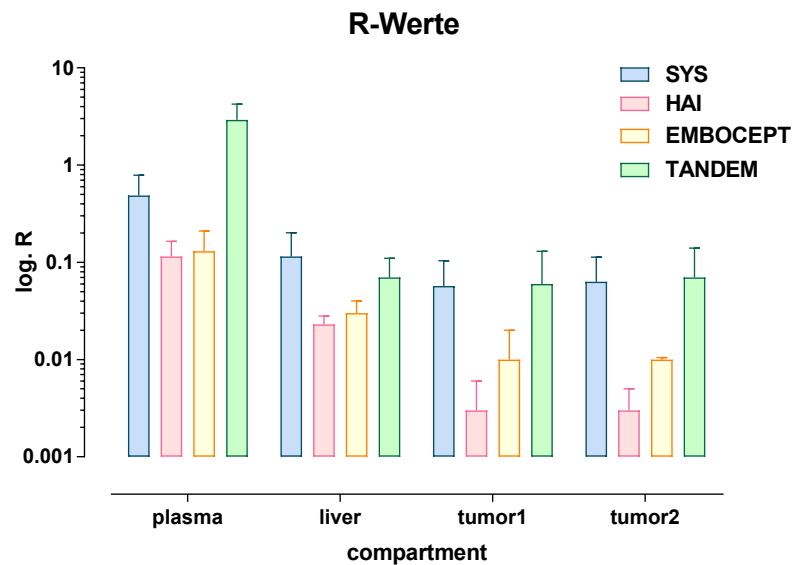


Abbildung 17: grafische Darstellung der R-Werte in den untersuchten Kompartimenten

Bei der Betrachtung der Enzymaktivität sind sehr hohe Werte nach einer Applikation mit der Tandem[®]-Methode auffällig. Im Plasma und im Tumor sind die R-Werte nach dieser Form der Verabreichung am größten. Nur in der Leber tritt nach systemischer Applikation eine höhere Aktivität der CES auf. Die R-Werte der hepatoarteriellen Gruppe sind in allen untersuchten Kompartimenten am niedrigsten. Des Weiteren ist zu sehen, dass im Plasma die Enzymaktivität nach allen Applikationsformen am größten ist.

4.4 Statistische Auswertung

4.4.1 T-Test über die Konzentrationen im Tumorgewebe

In den Tabellen auf den nachfolgenden Seiten werden die unterschiedlichen Applikationsformen mit Hilfe des T-Tests miteinander verglichen. Dabei werden die Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe herangezogen.

Tabelle 26: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach systemischer und hepatoarterieller Applikation

CPT-11		SN-38	
SYSTEMISCH	HEPATOARTERIELL	SYSTEMISCH	HEPATOARTERIELL
8.63	217.40	0.53	0.33
4.91	510.30	0.79	0.64
6.65	87.40	0.44	0.57
4.86	216.60	0.30	0.68
7.55	99.70	0.31	0.74
8.74	461.80	0.54	0.59
4.63	446.80	0.54	0.51
5.49	210.12	0.43	0.99
80.1	125.30	0.79	0.51
171.7	705.40	0.84	0.34
141.8	85.20	1.36	0.48
76.5	108.10	1.03	0.38
9.71	188.50	0.90	0.68
3.82	809.20	0.51	0.53
6.71	794.00	0.55	0.47
6.15	142.84	0.41	0.80
3.97		0.52	
5.17		0.34	
5.20		0.25	
59.8		0.97	
58.6		0.62	
67.0		0.74	
T-Test: $p < 0.0001$		T-Test: $p = 0.8974$	

Beim Vergleich der systemischen Applikation mit der hepatoarteriellen liegt für die Konzentration von CPT-11 im Tumor ein statistisch signifikanter Unterschied vor, da der Wert p deutlich unter maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0.05$ liegt. Die Nullhypothese H_0 kann somit verworfen werden. Bei Betrachtung von SN-38 ist mit einem Wert $p = 0.8974$ kein statistisch signifikanter Unterschied erkennbar.

Tabelle 27: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach systemischer Applikation und Verabreichung mit EmboCept® S

CPT-11		SN-38	
SYSTEMISCH	EMBOCEPT® S	SYSTEMISCH	EMBOCEPT® S
8.63	253.60	0.53	2.28
4.91	275.13	0.79	0.86
6.65	49.32	0.44	0.45
4.86	80.09	0.30	0.48
7.55	76.45	0.31	1.06
8.74	536.26	0.54	0.93
4.63	73.44	0.54	1.55
5.49	55.00	0.43	0.86
80.1	360.50	0.79	2.84
171.7	157.98	0.84	1.33
141.8	105.99	1.36	0.69
76.5	35.97	1.03	0.10
9.71	402.60	0.90	1.13
3.82	572.01	0.51	7.85
6.71		0.55	
6.15		0.41	
3.97		0.52	
5.17		0.34	
5.20		0.25	
59.8		0.97	
58.6		0.62	
67.0		0.74	
T-Test: $p < 0.0001$		T-Test: $p = 0.0182$	

In Tabelle 27 ist der Vergleich der systemischen Applikation mit EmboCept® S dargestellt. Sowohl für CPT-11 als auch für SN-38 liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor mit $p < 0.0001$ und $p = 0.0182$.

Tabelle 28: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach systemischer Applikation und Verabreichung mit Tandem®

CPT-11		SN-38	
SYSTEMISCH	TANDEM®	SYSTEMISCH	TANDEM®
8.63	19.66	0.53	0.24
4.91	18.67	0.79	0.42
6.65	0.79	0.44	0.02
4.86	3.98	0.30	0.23
7.55	25.43	0.31	0.54
8.74	0.05	0.54	0.01
4.63	22.06	0.54	0.24
5.49	10.99	0.43	0.37
80.1	0.23	0.79	0.05
171.7	14.45	0.84	1.11
141.8	17.5	1.36	0.67
76.5	0.26	1.03	0.02
9.71		0.90	
3.82		0.51	
6.71		0.55	
6.15		0.41	
3.97		0.52	
5.17		0.34	
5.20		0.25	
59.8		0.97	
58.6		0.62	
67.0		0.74	
T-Test: p=0.1161		T-Test: p=0.0299	

Der Vergleich von systemischer Applikation mit Tandem® zeigt für CPT-11 keinen signifikanten Unterschied mit einem Wert p deutlich über dem Signifikanzniveau von $\alpha=0.05$. Für SN-38 gibt es aber einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Applikationsformen

Tabelle 29: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach hepatoarterieller Applikation und Verabreichung mit EmboCept® S

CPT-11		SN-38	
HEPATOARTERIELL	EMBOCEPT® S	HEPATOARTERIELL	EMBOCEPT® S
217.40	253.60	0.33	2.28
510.30	275.13	0.64	0.86
87.40	49.32	0.57	0.45
216.60	80.09	0.68	0.48
99.70	76.45	0.74	1.06
461.80	536.26	0.59	0.93
446.80	73.44	0.51	1.55
210.12	55.00	0.99	0.86
125.30	360.50	0.51	2.84
705.40	157.98	0.34	1.33
85.20	105.99	0.48	0.69
108.10	35.97	0.38	0.10
188.50	402.60	0.68	1.13
809.20	572.01	0.53	7.85
794.00		0.47	
142.84		0.80	
T-Test: p=0.2030		T-Test: p=0.0442	

Für die Gruppen der hepatoarteriellen Applikation und EmboCept® S ergab der T-Test keinen signifikanten Unterschied für CPT-11. Beim Vergleich der Konzentrationen von SN-38 liegt mit einem p-Wert von 0.0442 ein statistisch signifikanter Unterschied vor.

Tabelle 30: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach hepatoarterieller Applikation und Verabreichung mit Tandem®

CPT-11		SN-38	
HEPATOARTERIELL	TANDEM®	HEPATOARTERIELL	TANDEM®
217.40	19.66	0.33	0.24
510.30	18.67	0.64	0.42
87.40	0.79	0.57	0.02
216.60	3.98	0.68	0.23
99.70	25.43	0.74	0.54
461.80	0.05	0.59	0.01
446.80	22.06	0.51	0.24
210.12	10.99	0.99	0.37
125.30	0.23	0.51	0.05
705.40	14.45	0.34	1.11
85.20	17.5	0.48	0.67
108.10	0.26	0.38	0.02
188.50		0.68	
809.20		0.53	
794.00		0.47	
142.84		0.80	
T-Test: p=0.0003		T-Test: p=0.0146	

Bei dem in Tabelle 30 dargestellten Vergleich von hepatoarterieller Verabreichung mit Tandem[®] besteht mit einem p-Wert deutlich unter 0.05 sowohl für CPT-11 als auch für SN-38 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 31: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach Applikation mit EmboCept[®] S und Tandem[®]

CPT-11		SN-38	
EMBOCEPT [®] S	TANDEM [®]	EMBOCEPT [®] S	TANDEM [®]
253.60	19.66	2.28	0.24
275.13	18.67	0.86	0.42
49.32	0.79	0.45	0.02
80.09	3.98	0.48	0.23
76.45	25.43	1.06	0.54
536.26	0.05	0.93	0.01
73.44	22.06	1.55	0.24
55.00	10.99	0.86	0.37
360.50	0.23	2.84	0.05
157.98	14.45	1.33	1.11
105.99	17.5	0.69	0.67
35.97	0.26	0.10	0.02
402.60		1.13	
572.01		7.85	
T-Test: p=0.0008		T-Test: p=0.034	

Wie in Tabelle 31 erkenntlich ist, liegt beim Vergleich der Tandem[®]- mit der Embocept[®] S -Methode ebenfalls sowohl für CPT-11 als auch SN-38 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor.

4.4.2 T-Test über die Konzentrationen im Tumor und der Leber

Auf den nachfolgenden Seiten ist in Tabellenform der Vergleich der Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 im Tumor mit den Konzentrationen in der Leber nach den unterschiedlichen Applikationsarten angeführt. Zur Darstellung der Unterschiede wurde ein T-Test mit einer maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0.05$ durchgeführt.

Tabelle 32: T-Test bezogen auf Tumor- und Leberkonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach systemischer Applikation

SYSTEMISCH			
CPT-11		SN-38	
TUMOR	LEBER	TUMOR	LEBER
8.63	10.30	0.53	0.97
4.91	6.08	0.79	0.87
6.65	1.70	0.44	0.63
4.86	10.76	0.30	1.16
7.55	6.22	0.31	0.65
8.74	7.74	0.54	0.89
4.63	6.05	0.54	0.82
5.49	7.49	0.43	0.80
80.1	34.4	0.79	1.79
171.7	24.3	0.84	1.18
141.8	26.7	1.36	1.47
76.5	37.7	1.03	1.88
9.71		0.90	
3.82		0.51	
6.71		0.55	
6.15		0.41	
3.97		0.52	
5.17		0.34	
5.20		0.25	
59.8		0.97	
58.6		0.62	
67.0		0.74	
T-Test: p=0.1903		T-Test: p=0.0001	

Beim Vergleich der Konzentrationen in Leber und Tumor nach systemischer Applikation gibt es, wie in Tabelle 32 dargestellt, für CPT-11 keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Für SN-38 liegt jedoch mit einem p-Wert von 0.0001 ein signifikanter Unterschied vor.

Tabelle 33: T-Test bezogen auf Tumor- und Leberkonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach hepatoarterieller Applikation

HEPATOARTERIELL			
CPT-11		SN-38	
TUMOR	LEBER	TUMOR	LEBER
217.40	34.00	0.33	0.87
510.30	46.10	0.64	0.95
87.40	33.00	0.57	1.07
216.60	31.70	0.68	0.80
99.70	71.90	0.74	1.14
461.80	34.40	0.59	0.89
446.80	56.10	0.51	1.26
210.12	66.67	0.99	1.12
125.30		0.51	
705.40		0.34	
85.20		0.48	
108.10		0.38	
188.50		0.68	
809.20		0.53	
794.00		0.47	
142.84		0.80	
T-Test: p=0.0065		T-Test: p<0.0001	

In obenstehender Tabelle 33 ist der Vergleich der Kompartimente nach hepatoarterieller Verabreichung veranschaulicht. Sowohl für CPT-11 als auch den aktiven Metaboliten SN-38 liegt ein statistisch signifikanter Unterschied vor.

Tabelle 34: T-Test bezogen auf Tumor- und Leberkonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Embocept® S

EMBOCEPT® S			
CPT-11		SN-38	
TUMOR	LEBER	TUMOR	LEBER
253.60	25.24	2.28	0.97
275.13	17.10	0.86	0.70
49.32	24.47	0.45	0.82
80.09	29.44	0.48	0.49
76.45	28.89	1.06	0.99
536.26	33.10	0.93	0.56
73.44		1.55	1.53
55.00		0.86	
360.50		2.84	
157.98		1.33	
105.99		0.69	
35.97		0.10	
402.60		1.13	
572.01		7.85	
T-Test: p=0.0239		T-Test: p=0.3380	

Nach der Applikation mit Embocept® S gibt es nur für CPT-11 einen statisch signifikanten Unterschied zwischen der Konzentration im Tumor und in der Leber. Für SN-38 besteht mit $p=0.3380$ kein Unterschied.

Tabelle 35: T-Test bezogen auf Tumor- und Leberkonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Tandem®

TANDEM®			
CPT-11		SN-38	
TUMOR	LEBER	TUMOR	LEBER
19.66	-0.03	0.24	0.02
18.67	0.69	0.42	0.08
0.79	-0.02	0.02	0.02
3.98	1.13	0.23	0.06
25.43	1.57	0.54	0.08
0.05	-0.01	0.01	0.02
22.06		0.24	
10.99		0.37	
0.23		0.05	
14.45		1.11	
17.5		0.67	
0.26		0.02	
T-Test: $p=0.0174$		T-Test: $p=0.0560$	

Beim Vergleich der Kompartimente Tumor und Leber nach einer Applikation mit Tandem® ergibt sich, wie in Tabelle 35 dargestellt, für CPT-11 ein signifikanter Unterschied. Für SN-38 liegt der Wert p knapp über der maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05 und somit ist kein statistisch signifikanter Unterschied gegeben.

4.4.3 T-Test über die Konzentrationen im Tumor und im Plasma

In den nachfolgenden Tabellen werden die Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach den unterschiedlichen Applikationsformen im Tumor mit denen im Plasma mittels T-Test miteinander verglichen.

Tabelle 36: T-Test bezogen auf Tumor- und Plasmakonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach systemischer Applikation

SYSTEMISCH			
CPT-11		SN-38	
TUMOR	PLAMSA	TUMOR	PLASMA
8.63	0.25	0.53	0.26
4.91	0.15	0.79	0.13
6.65	0.00	0.44	0.00
4.86	0.28	0.30	0.19
7.55	0.20	0.31	0.15
8.74	0.54	0.54	0.14
4.63	0.35	0.54	0.13
5.49	0.41	0.43	0.19
80.1	1.92	0.79	0.43
171.7	1.22	0.84	0.38
141.8	1.34	1.36	0.28
76.5	2.28	1.03	0.36
9.71		0.90	
3.82		0.51	
6.71		0.55	
6.15		0.41	
3.97		0.52	
5.17		0.34	
5.20		0.25	
59.8		0.97	
58.6		0.62	
67.0		0.74	
T-Test: p=0.0236		T-Test: p=0.0003	

Tabelle 36 zeigt den Vergleich nach systemischer Verabreichung. Dabei liegt sowohl für CPT-11 also auch für SN-38 ein statistisch signifikanter Unterschied mit p-Werten deutlich unter 0.05 vor.

Tabelle 37: T-Test bezogen auf Tumor- und Plasmakonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach hepatoarterieller Applikation

HEPATOARTERIELL			
CPT-11		SN-38	
TUMOR	PLASMA	TUMOR	PLASMA
217.40	1.50	0.33	0.21
510.30	2.23	0.64	0.33
87.40	1.64	0.57	0.28
216.60	1.99	0.68	0.28
99.70	3.05	0.74	0.23
461.80	1.51	0.59	0.27
446.80	3.66	0.51	0.17
210.12	7.14	0.99	0.13
125.30		0.51	
705.40		0.34	
85.20		0.48	
108.10		0.38	
188.50		0.68	
809.20		0.53	
794.00		0.47	
142.84		0.80	
T-Test: p=0.0021		T-Test: p<0.0001	

Auch nach hepatoarterieller Applikation gibt es für beide Analyten einen signifikanten Unterschied zwischen Tumor und Plasma.

Tabelle 38: T-Test bezogen auf Tumor- und Plasmakonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Embocept® S

EMBOCEPT® S			
CPT-11		SN-38	
TUMOR	PLASMA	TUMOR	PLASMA
253.60	1.15	2.28	0.15
275.13	1.08	0.86	0.24
49.32	1.88	0.45	0.10
80.09	1.55	0.48	0.12
76.45	5.90	1.06	0.24
536.26	1.31	0.93	0.18
73.44	19.51	1.55	0.56
55.00	1.42	0.86	0.35
360.50		2.84	
157.98		1.33	
105.99		0.69	
35.97		0.10	
402.60		1.13	
572.01		7.85	
T-Test: p=0.0045		T-Test: p=0.0644	

Wie Tabelle 38 zeigt, liegt in der Embocept® S-Gruppe nur für CPT-11 ein signifikanter Unterschied vor. Für SN-38 ist der Wert $p=0.0644$ knapp über $\alpha=0.05$. Somit kann die Nullhypothese H_0 nicht verworfen werden und es gibt keinen Unterschied zwischen den beiden Kompartimenten.

Tabelle 39: T-Test bezogen auf Tumor- und Plasmakonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Tandem®

TANDEM®			
CPT-11		SN-38	
TUMOR	PLASMA	TUMOR	PLASMA
19.66	0.00	0.24	0.00
18.67	0.01	0.42	0.03
0.79	0.00	0.02	0.00
3.98	0.00	0.23	0.01
25.43	0.01	0.54	0.03
0.05	0.00	0.01	0.00
22.06		0.24	
10.99		0.37	
0.23		0.05	
14.45		1.11	
17.5		0.67	
0.26		0.02	
T-Test: $p=0.0130$		T-Test: $p=0.0338$	

Nach der Applikation mit Tandem® ergibt der T-Test, dass ein signifikanter Unterschied sowohl für CPT-11 als auch SN-38 zwischen Tumor und Plasma besteht.

4.4.4 ANOVA

Die Tabellen auf den folgenden Seiten zeigen die Varianzanalyse (ANOVA), mit welcher die Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 im Tumor nach allen untersuchten Applikationsformen miteinander verglichen wurden.

Tabelle 40: ANOVA über die Konzentrationen von CPT-11 im Tumor

ANOVA summary CPT-11 Tumor					
F	14.33				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0.4174				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	8.666 (3, 60)				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	90.08				
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)	1079253	3	359751	F (3, 60) = 14.33	P<0.0001
Residual (within columns)	1506320	60	25105		
Total	2585573	63			
Data summary					
Number of treatments (columns)	4				
Number of values (total)	64				

Tabelle 41: ANOVA über die Konzentrationen von SN-38 im Tumor

ANOVA summary SN-38 Tumor					
F	5.18				
P value	0.0030				
P value summary	**				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0.2057				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	3.279 (3, 60)				
P value	0.0269				
P value summary	*				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	102.1				
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)	13.49	3	4.498	F (3, 60) = 5.18	P=0.0030
Residual (within columns)	52.09	60	0.8682		
Total	65.59	63			
Data summary					
Number of treatments (columns)	4				
Number of values (total)	64				

Das Ergebnis der ANOVA zeigt sowohl für CPT-11 als auch für SN-38 mit p-Werten unter 0.05 einen signifikanten Unterschied zwischen den vier untersuchten Formen der Applikation. Durch die sehr geringe Stichprobenzahl von nur 64 Proben ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses jedoch kritisch zu werten.

5. Diskussion

5.1 Transfer in das Tumorgewebe

Bei genauer Betrachtung des Transfers von CPT-11 und SN-38 in den Tumor, dem eigentlichen Wirkort, zeigt sich, dass CPT-11 nach allen Arten der Applikation im Tumor in der höchsten Konzentration vorkommt, im Vergleich zu den anderen untersuchten Kompartimenten. Abbildung 22 auf Seite 58 veranschaulicht dies sehr deutlich. Bei der Gruppe der hepatoarteriellen Verabreichung und der Embocept® S-Methode treten, wie auch vorangehende Ergebnisse zeigen, die größten Konzentrationen auf. Ein Transport in das Zielgewebe erfolgt also mit diesen Arten der Applikation am effizientesten, wenn man die Ergebnisse nach vier Stunden beurteilt.

Beim wirksamen Metaboliten SN-38 werden dagegen, wie in Abbildung 23 zu sehen ist, nur mit der EmboCept® S- oder der Tandem®-Methode im Tumor Konzentrationsspitzen erreicht. Nach systemischer Applikation oder hepatoarterieller Verabreichung befindet sich die größte Menge an SN-38 in der Leber und deutlich weniger im Tumor.

Des Weiteren zeigen diese Grafiken, dass die Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 bei allen Applikationsformen im Plasma deutlich niedriger sind als im Gewebe. Dies lässt eine hohe Gewebeaffinität des Arzneistoffes annehmen, was auch die statistischen Ergebnisse in Abschnitt 5.2 bestätigen werden.

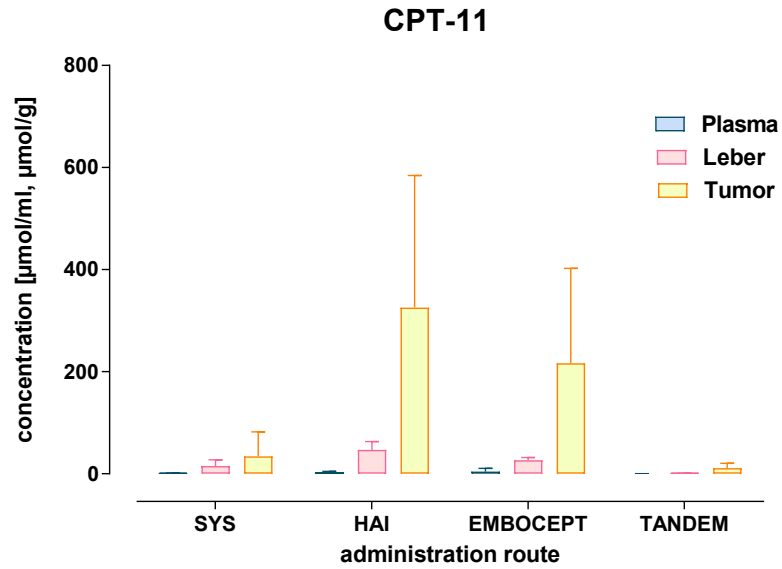


Abbildung 18: Vergleich der Konzentrationen von CPT-11 nach unterschiedlichen Arten der Applikation

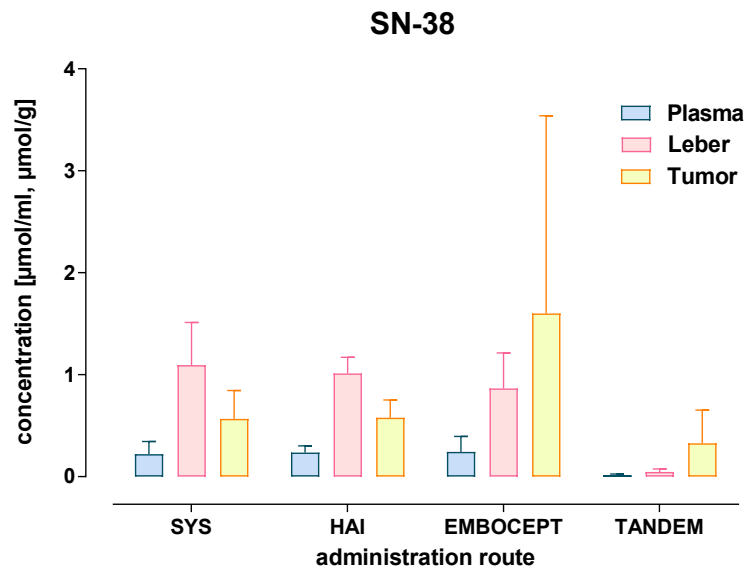


Abbildung 19: Vergleich der Konzentrationen von SN-38 nach unterschiedlichen Arten der Applikation

5.2 Statistische Ergebnisse

Die Durchführung der T-Tests liefert das Ergebnis, dass, betreffend die Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 im Tumor, größtenteils signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Applikationsformen bestehen. In Tabelle 42 sind die ermittelten p-Werte zum besseren Vergleich noch einmal zusammengefasst aufgelistet. Durch die rosarote Hinterlegung der statistisch signifikanten Unterschiede ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass bei CPT-11 nur für zwei Vergleiche (SYS-TAN und HAI-EMB) und bei SN-38 nur für den Vergleich von SYS mit HAI die Nullhypothese H_0 bewiesen ist und somit kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen besteht. Zusammenfassend lässt sich anmerken, dass vor allem bei dem aktiven Metaboliten SN-38 zwischen den Chemoembolisationsmethoden und einer systemischen oder hepatoarteriellen Applikation deutliche Unterschiede bei der Konzentration im Tumor auftreten.

Tabelle 42: T-Test über die Konzentrationen im Tumorgewebe nach unterschiedlichen Arten der Applikation - zusammengefasste Darstellung der p-Werte; die statistisch signifikanten sind rosarot unterlegt

CPT-11					SN-38				
	SYS	HAI	EMB	TAN		SYS	HAI	EMB	TAN
SYS		<0.0001	<0.0001	0.1161	SYS		0.8974	0.0182	0.0299
HAI	<0.0001		0.2030	0.0003	HAI	0.8974		0.0442	0.0146
EMB	<0.0001	0.2030		0.0008	EMB	0.0182	0.0442		0.034
TAN	0.1161	0.0003	0.0008		TAN	0.0299	0.0146	0.034	

Der Vergleich der Konzentrationen in Plasma und Tumor durch weitere T-Tests zeigt für CPT-11 nach allen Applikationsformen einen signifikanten Unterschied. Bei SN-38 liegt der p-Wert lediglich in der Embocept® S-Gruppe knapp über der maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05. Dieses Ergebnis und die in Abschnitt 5.1 angeführten hohen Konzentrationen im Tumor lassen auf eine hohe Gewebeaffinität von Irinotecan schließen. Unterstützt wird diese Aussage durch die Ergebnisse der Diplomarbeit von Julia Brommer, die sich mit dem Vergleich der Kompartimente Leber und Plasma beschäftigte und auch dort eine erhöhte Anreicherung von CPT-11 und SN-38 im Gewebe feststellen konnte (Brommer, 2017).

Auch bei Betrachtung der Kompartimente Leber und Tumor mittels statistischen Tests sind signifikante Unterschiede auffällig. Diese sind jedoch nicht so stark ausgeprägt. Vor allem bei SN-38 liegt der p-Wert bei der Embocept® S-Gruppe deutlich über der maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05. Bei der Applikation mit Tandem® könnte der p-Wert knapp über 0.05 auch aus der geringen Fallzahl in dieser Gruppe resultieren.

Die im Zuge dieser Diplomarbeit durchgeführte ANOVA liefert als Ergebnis zwar einen signifikanten Unterschied für die Konzentrationen im Tumor nach den verschiedenen Arten der Applikation, sollte aber aufgrund der geringen Fallzahl kritisch betrachtet werden.

5.3 Conclusio

Eine abschließende Betrachtung der gesamten Ergebnisse und eine erneute Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 im Tumor (siehe Abbildungen 24 und 25) zeigen, dass CPT-11 nach hepatoarterieller Applikation dort in der höchsten Konzentration vorkommt. Durch einen sehr niedrigen R-Wert wird jedoch nur eine geringe Menge dann in den aktiven Metaboliten SN-38 umgewandelt. Bei Gegenüberstellung mit den anderen in diesem Experiment untersuchten Darreichungsformen tritt bei dieser Gruppe in allen Kompartimenten der niedrigste Wert für die Enzymaktivität auf und im Tumor ist dieser sogar um das 10fache kleiner. Grund dafür könnte eine Sättigung der Carboxylesterase sein.

Was die Konzentration des aktiven Metaboliten SN-38 betrifft, ist in Abbildung 25 deutlich zu erkennen, dass diese im Tumor nach einer Applikation mit Embocept® S am größten ist. Diese hohe Konzentration direkt am eigentlichen Wirkort und die zusätzlichen niedrigen Konzentrationen des Arzneistoffes im Plasma und der Leber bieten einen deutlichen Vorteil gegenüber einer systemischen oder hepatoarteriellen Applikation. Denn somit können schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen, die aus einer hohen systemischen Konzentration von Irinotecan resultieren würden, vermindert werden. Durch die abbaubaren Stärkemikrosphären tritt nach vier Stunden ein Konzentrationsmaximum im Tumor auf, was vorliegendes Experiment aufzeigt.

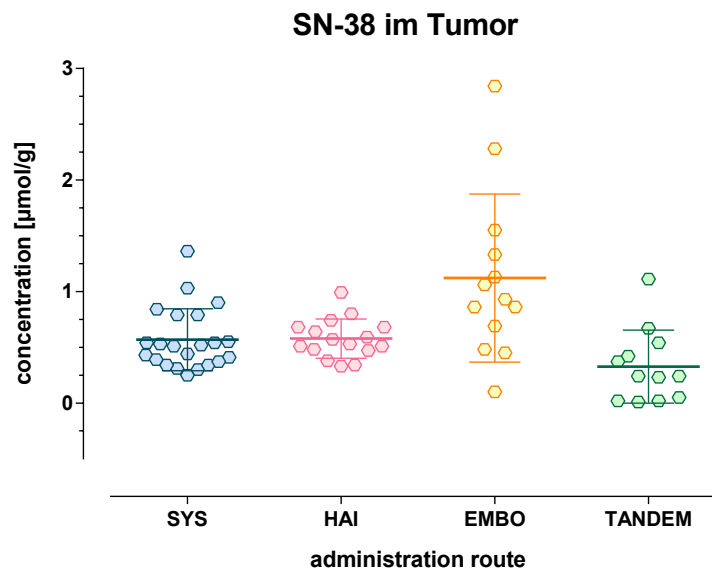


Abbildung 21: Konzentration von SN-38 im Tumor nach unterschiedlichen Arten der Applikation

Zusammenfassend betrachtet, bestätigt das vorliegende Experiment das Ergebnis vieler bereits veröffentlichter Publikationen, dass Chemoembolisationsmethoden vorteilhafte Arzneistoffkonzentrationen gegenüber systemischer oder hepatoarterieller Applikation erbringen. Somit können mit Sicherheit eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen vermieden werden, die mit einer hohen systemischen Konzentration des Chemotherapeutikums einhergehen. Der Vergleich der Embocept® S-Methode mit der Tandem®-Methode ergibt bei dieser Art des Versuchsaufbaus höhere Arzneistoffmengen im Tumor nach einer Behandlung mit Embocept® S. Um jedoch die Wirksamkeit der Chemoembolisation mit Tandem® zu bewerten, sind andere geeignete Untersuchungen durchzuführen.

6. Zusammenfassung

Zur Beurteilung der Verteilung und der Transferrate in das Tumorgewebe von Irinotecan nach unterschiedlichen Arten der Verabreichung wurden Plasma-, Leber- und Tumورproben von Ratten analysiert. Verglichen wurden die systemische Applikation, die hepatoarterielle Applikation, die hepatoarterielle Applikation mit Embocept® S und die hepatoarterielle Applikation mit Tandem®. Nach einer geeigneten Aufarbeitung und Verdünnung der Proben wurden mittels HPLC- Analyse und einer im Vorfeld erstellten Eichgerade die Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 bestimmt. Diese wurden mit statistischen Parametern wie Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Zur Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten wurden T-Tests und eine Varianzanalyse durchgeführt. Des Weiteren wurde zur Beurteilung der Enzymaktivität der Carboxylesterase, welche für die Umwandlung von CPT-11 in den aktiven Metaboliten verantwortlich ist, der R-Wert berechnet.

Nach einer hepatoarteriellen Applikation zeigten sich die höchsten Konzentrationen von CPT-11 im Tumorgewebe. Diese wurden aber vermutlich durch eine Sättigung der Carboxylesterase nur zu einem geringen Teil in SN-38 umgewandelt, was durch den niedrigen R-Wert bestätigt wird. Nach der Verabreichung von Irinotecan mit der Chemoembolisationsmethode Embocept® S konnten die höchsten Konzentrationen des zytostatisch wirksamen Metaboliten SN-38 im Tumor analysiert werden, was auf eine günstige Umsetzung von CPT-11 in SN-38 im Tumor hinweist. Die Gruppe der Tandem®-Applikation wies in allen Kompartimenten sowohl von CPT-11 als auch von SN-38 sehr niedrige Konzentrationen auf. Jedoch wurden die geringen Mengen von CPT-11 durch eine hohe Enzymaktivität zu einem großen Teil aktiviert.

Die durchgeführten statistischen Tests ergaben signifikante Unterschiede in den Irinotecan-Tumorkonzentrationen zwischen den neuen Chemoembolisationsmethoden und einer systemischen oder hepatoarteriellen Applikation. Weiters zeigten die vergleichsweise hohen Konzentrationen der Analyten im Leber- und Tumorgewebe und der durchgeführte T-Test, dass der Arzneistoff eine erhöhte Affinität zum Gewebe aufweist. Um eine Beurteilung des Vergleichs mit der Applikation mit Tandem® zu ermöglichen sind noch weitere geeignete Untersuchungen durchzuführen, die sich mit dem Konzentrationsverlauf des Arzneistoffes über einen längeren Zeitraum beschäftigen und noch weitere pharmakologische Parameter berücksichtigen.

7. Summary

Irinotecan concentrations in plasma, liver and tumour samples of rats were analysed to evaluate the distribution and transfer rate into tumour tissue after four different application ways, namely: systemic application, hepatoarterial application, hepatoarterial application with Embocept® S and hepatoarterial application with Tandem®. The samples were processed appropriately, before CPT-11 and its active metabolite SN-38 were analysed by a published HPLC method. Thereafter, they were quantified, using a straight calibration line, which has been generated in plasma and liver tissue with defined concentrations beforehand. The results were then described in mean concentrations including standard deviation. Additionally, the statistical methods t-test and variance analysis were performed to compare the obtained data. Another investigated aspect was the activity of the enzyme carboxylesterase, which transforms CPT-11 into its active metabolite SN-38. R-values, describing the extent of this conversion, were calculated and depicted.

The highest CPT-11 concentration was measured in tumour tissue after hepatoarterial application. Unfortunately, only small amounts were converted into SN-38, resulting in small R-values, probably due to a saturation of the performing enzyme. However, the administration of Irinotecan with the chemoembolization method Embocept® S lead to the highest amounts of the active metabolite SN-38 in tumour tissue, indicating a good conversion rate by the carboxylesterase. For the Tandem® group, relatively low concentrations of both CPT-11 and SN-38 were observed in all analysed compartments, however at the same time high R-values were obtained, indicating a favourable activation of CPT-11 to SN-38.

The statistical tests showed significant differences in the irinotecan tumour concentrations between the new chemoembolization methods and a conventional systemic or hepatoarterial application. In addition, the t-tests presented a higher concentration of CPT-11 and SN-38 in tumour and liver tissue than in plasma. For a complete evaluation of the results, notably concerning the concentrations after application with Tandem®, further assessments are necessary to measure the CPT-11 and SN-38 concentrations over a longer period as well as including pharmacological aspects.

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis Of Variance
APC	7-Ethyl-10[4-N-(5-aminopentansäure)-1-piperidino]carbonylcamptothecin
Aqua bidest	Aqua bidestillata
AUC	area under the curve
CES	Carboxylesterase
conc.	Konzentration
CPT-11	Irinotecan, 7-Ethyl-10[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin
CYP3A4	Cytochrom P ₄₅₀ 3A4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMB	EmboCept® S
HAI	hepatoarteriell
hCES	humane Carboxylesterase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LOQ	limit of quantitation
MeOH	Methanol
min	Minute
MW	Mittelwert
n.v.	nicht vorhanden
NPC	7-Ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) carbonyloxy-camptothecin
PBS	Phosphate Buffered Saline
RPM	revolutions per minute
SD	Standardabweichung
SN-38	7-Ethyl-10-Hydroxy-Camptothecin
SYS	systemisch
TAN	TANDEM®
UGT1A1/7	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase 1A1/7
VEGF	vascular endothelial growth factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorerkrankungen 2014 (Statistik Austria, 2017).....	1
Abbildung 2: Inzidenz und Mortalität von malignen Tumoren (Statistik Austria, 2017)..	2
Abbildung 3: Schema des Metabolismus von CPT-11 (Yang, 2006).....	7
Abbildung 4: Beispielchromatogramme nach Irinotecan-Infusion beim Menschen (links) und bei der Ratte (rechts) im sauren Milieu (links: Rohdaten Ettlinger, rechts: Rohdaten Brommer & Wimmer).....	8
Abbildung 5: Schliffhomogenisatoren in verschiedenen Größen (Foto Brommer & Wimmer).....	9
Abbildung 6: Ultra-Turrax T25 von IKA (Foto Brommer & Wimmer).....	9
Abbildung 7: Ultra-Turrax Tube Drive (UTTD) von IKA (Foto Brommer & Wimmer)....	10
Abbildung 8: Minilys der Firma Bertin Instruments (Foto Brommer & Wimmer)	10
Abbildung 9: Eichgerade von CPT-11 im Plasma	22
Abbildung 10: Eichgerade von CPT-11 im Lebergewebe	23
Abbildung 11: Eichgerade von SN-38 im Plasma	24
Abbildung 12: Eichgerade von SN-38 im Lebergewebe	25
Abbildung 13: Beispielchromatogramme von CPT-11 im Plasma und im Gewebe	26
Abbildung 14: Beispielchromatogramme von SN-38 im Plasma und im Gewebe	26
Abbildung 15: Beispielchromatogramm NaCl / Irinotecan systemisch im Tumor	31
Abbildung 16: Beispielchromatogramm NaCl / Irinotecan hepatoarteriell im Tumor	31
Abbildung 17: Beispielchromatogramm NaCl / Irinotecan mit Embocept im Tumor	32
Abbildung 18: Beispielchromatogramm NaCl / Irinotecan mit Tandem im Tumor	32
Abbildung 19: grafische Darstellung der Konzentrationen von CPT-11 nach unterschiedlichen Arten der Applikation.....	36
Abbildung 20: grafische Darstellung der Konzentrationen von SN-38 nach unterschiedlichen Arten der Applikation.....	39
Abbildung 21: grafische Darstellung der R-Werte in den untersuchten Kompartimenten	43
Abbildung 22: Vergleich der Konzentrationen von CPT-11 nach unterschiedlichen Arten der Applikation	59
Abbildung 23: Vergleich der Konzentrationen von SN-38 nach unterschiedlichen Arten der Applikation	59
Abbildung 24: Konzentration von CPT-11 im Tumor nach unterschiedlichen Arten der Applikation.....	62
Abbildung 25: Konzentration von SN-38 im Tumor nach unterschiedlichen Arten der Applikation.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Profil der Tiere	13
Tabelle 2: Geräte und Materialien	15
Tabelle 3: Chemikalien und Reagentien.....	16
Tabelle 4: Daten der HPLC-Anlage.....	17
Tabelle 5: Software.....	18
Tabelle 6: Verdünnungsreihe für die Erstellung der Eichgeraden von CPT-11 im Plasma.....	19
Tabelle 7: genaue Mengenangaben für die Erstellung der Eichgeraden von CPT-11 im Lebergewebe	20
Tabelle 8: Verdünnungsreihe für die Erstellung der Eichgeraden von SN-38 im Plasma.....	21
Tabelle 9: genaue Mengenangaben für die Erstellung der Eichgeraden von SN-38 im Lebergewebe	21
Tabelle 10: Statistische Parameter der Eichgerade von CPT-11 im Plasma	22
Tabelle 11: Statistische Parameter der Eichgerade von CPT-11 im Lebergewebe.....	23
Tabelle 12: Statistische Parameter der Eichgerade von SN-38 im Plasma.....	24
Tabelle 13: Statistische Parameter der Eichgerade von SN-38 im Lebergewebe	25
Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung von CPT-11 nach systemischer Applikation	34
Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung von CPT-11 nach hepatoarterieller Applikation	34
Tabelle 16: Mittelwert und Standardabweichung von CPT-11 nach Applikation mit EmboCept® S.....	35
Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung von CPT-11 nach Applikation mit Tandem®	35
Tabelle 18: Mittelwert und Standardabweichung von SN-38 nach systemischer Applikation	37
Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung von SN-38 nach hepatoarterieller Applikation	37
Tabelle 20: Mittelwert und Standardabweichung von SN-38 nach Applikation mit.....	38
Tabelle 21: Mittelwert und Standardabweichung von SN-38 nach Applikation mit Tandem®	38
Tabelle 22: berechnete R-Werte nach systemischer Verabreichung	40
Tabelle 23: berechnete R-Werte nach hepatoarterieller Verabreichung	41
Tabelle 24: berechnete R-Werte nach Verabreichung mit EmboCept® S	41
Tabelle 25: berechnete R-Werte nach Verabreichung mit Tandem®	42

Tabelle 26: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach systemischer und hepatoarterieller Applikation.....	44
Tabelle 27: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach systemischer Applikation und Verabreichung mit EmboCept® S.....	45
Tabelle 28: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach systemischer Applikation und Verabreichung mit Tandem®.....	46
Tabelle 29: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach hepatoarterieller Applikation und Verabreichung mit EmboCept® S.....	47
Tabelle 30: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach hepatoarterieller Applikation und Verabreichung mit Tandem®.....	47
Tabelle 31: T-Test bezogen auf die Konzentration von CPT-11 und SN-38 im Tumorgewebe nach Applikation mit EmboCept® S und Tandem®.....	48
Tabelle 32: T-Test bezogen auf Tumor- und Leberkonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach systemischer Applikation.....	49
Tabelle 33: T-Test bezogen auf Tumor- und Leberkonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach hepatoarterieller Applikation	50
Tabelle 34: T-Test bezogen auf Tumor- und Leberkonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Embocept® S	50
Tabelle 35: T-Test bezogen auf Tumor- und Leberkonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Tandem®	51
Tabelle 36: T-Test bezogen auf Tumor- und Plasmakonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach systemischer Applikation	52
Tabelle 37: T-Test bezogen auf Tumor- und Plasmakonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach hepatoarterieller Applikation	53
Tabelle 38: T-Test bezogen auf Tumor- und Plasmakonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Embocept® S	53
Tabelle 39: T-Test bezogen auf Tumor- und Plasmakonzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Tandem®.....	54
Tabelle 40: ANOVA über die Konzentrationen von CPT-11 im Tumor	55
Tabelle 41: ANOVA über die Konzentrationen von SN-38 im Tumor	56
Tabelle 42: T-Test über die Konzentrationen im Tumorgewebe nach unterschiedlichen Arten der Applikation - zusammengefasste Darstellung der p-Werte; die statistisch signifikanten sind rosarot unterlegt	59
Tabelle 43: Anhang A	IX
Tabelle 44: Anhang B	XII
Tabelle 45: Anhang C	XIII
Tabelle 46: Anhang D	XIII

Tabelle 47: Anhang E	XIV
----------------------------	-----

Literaturverzeichnis

- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., & Starke, K. (2013).** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel (S. 884–888, 918f.). München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Aliberti, C., Tilli, M., Benea, G., & Fiorentini, G. (2006).** Trans-arterial Chemoembolization (TACE) of Liver Metastases from Colorectal Cancer Using Irinotecan-Eluting Beads : Preliminary Results, 3796, 3793–3795.
- Bärlocher, F. (1999).** Biostatistik: praktische Einführung in Konzepte und Methoden ; 20 Tabellen (S. 9–11, 68–71). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Brommer, J. (2017).** *Plasma- und Leberkonzentration von CPT-11 in Ratten nach systemischer und intraarterieller Verabreichung: Vergleich mit neuen Chemoembolisationsmethoden.* Diplomarbeit, Universität Wien.
- Burden, D. (2008).** Guide to the homogenization of biological samples. *Random Primers*, (7), 1–14.
- Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornnell, H. H., Ibrahim-Hashim, A., Bailey, K., Balagurunathan, Y., Rothberg, J. M., Sloane, B. F., Johnson, J., Gatenby, R. A. Gillies, R. J. (2013).** Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Research*, 73(5), 1524–1535.
- Ettliger, D. (2004).** *In-vivo und in-vitro Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Metabolismus von Irinotecan in Kombination mit Cetuximab, Oxaliplatin oder Capecitabin.* Dissertation, Universität Wien.
- Macedo, F. I. B., & Makarawo, T. (2014).** Colorectal hepatic metastasis : Evolving therapies, 6(7), 453–463.
- Martignoni, M., Groothuis, G. M. M., & de Kanter, R. (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), 875–894.
- Mathijssen, R. H. J., Van Alphen, R. J., Verweij, J., Loos, W. J., Nooter, K., Stoter, G., & Sparreboom, A. (2001).** Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clinical Cancer Research*, 7(8), 2182–2194.

- Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F., Hwang, P. M. (2006).** P53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5780), 1650–3.
- Meyer, V. R. (2004).** Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie (S. 8, 94, 160). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- MINILYS® Produktinformation. (2016).** MINILYS® Flexible homogenizer for daily lab workflow. Abgerufen 6. September 2017, von <https://www.bertin-instruments.com/product/sample-preparation-homogenizers/minilys-tissue-homogenizer/#gallery>
- Mullangi, R., Ahlawat, P., & Srinivas, N. R. (2010).** Irinotecan and its active metabolite, SN-38: Review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomedical Chromatography*, 24(1), 104–123.
- Phillips, J. L. (1997).** Statistisch gesehen : grundlegende Ideen der Statistik leicht erklärt (S. 117f.). Basel: Birkhäuser Verlag.
- Platthaus, M. (2007).** Ultra-Turrax: Zerkleinern von Proben in nur vier Schritten. Abgerufen 7. September 2017, von <http://www.laborpraxis.vogel.de/labortechnik/articles/105545/>
- Platthaus, M. (2013).** Dispergiergeräte und -maschinen in Labor und Produktion. Abgerufen 7. September 2017, von <http://www.laborpraxis.vogel.de/dispergiergeraete-und-maschinen-in-labor-und-produktion-a-404981/>
- Produktinformation EmboCept® S (2013).** EmboCept® S Gebrauchsanweisung. Abgerufen 7. September 2017, von <http://pharmacept.com/produkte/embocept-s-ubersicht/>
- Produktinformation Embozene TANDEM® (2013).** Embozene TANDEM® Microspheres - Instructions for Use. Abgerufen 7. September 2017, von <http://celonova.com/wp-content/uploads/LAS0048-01-Artwork-08-02-2013.pdf.pdf>
- Produktinformation Feinschliffhomogenisatoren. (2017).** Homogenisator 15 ml mit Glas-Pistill. Abgerufen 7. September 2017, von http://www.mercateo.at/p/2843-9651866/Homogenisator_15_ml_mit_Glas_Pistill_konisch.html?chooseGeo=true
- Richardson, A. J., Laurence, J. M., & Lam, V. W. T. (2013).** Transarterial Chemoembolization with Irinotecan Beads in the Treatment of Colorectal Liver Metastases : Systematic Review. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 24(8), 1209–1217.

- Rowe, P. (2012).** Statistik für Mediziner und Pharmazeuten (S. 143–147, 165). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Shingyoji, M., Takiguchi, Y., Watanabe-Urma, R., Asaka-Amano, Y., Matsubara, H., Kurosu, K., Kasahara, Y., Tanabe, N., Tatsumi, K., Kuriyama, T. (2004).** In vitro conversion of irinotecan to SN-38 in human plasma. *Cancer Science*, 95(6), 537–540.
- Statistik Austria. (2017).** Krebs im Überblick. Abgerufen 11. September 2017, von https://www.statistik.at/web_de/statistiken/index.html
- Steland, P. D. A. (2007).** Deskriptive und explorative Statistik. In *Basiswissen Statistik: Kompaktkurs für Anwender aus Wirtschaft, Informatik und Technik* (S. 1). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stubbs, M., McSheehy, P. M. J., Griffiths, J. R., & Bashford, C. L. (2000).** Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular Medicine Today*, 6(1), 15–19.
- Yang, X.-X. (2006).** A Mechanistic Study on Reduced Toxicity of Irinotecan by Coadministered Thalidomide, a Tumor Necrosis Factor- Inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), 82–104.

Anhang

Anhang A: Einwaagen bei der Bearbeitung der Proben und Berechnung des Verdünnungsfaktors

Tabelle 43: Anhang A

Tiere	Blut (µl)	ACN (µl)	Leber (mg)	ACN (µl)	Faktor	Tumor 1 (mg)	ACN (µl)	Faktor	Tumor 2 (mg)	ACN (µl)	Faktor
NaCl 375	200	500	117	1170	3.14	199	995	1.71	n.v.	n.v.	n.v.
NaCl 376	200	500	146	1460	3.14	109	1090	3.14	n.v.	n.v.	n.v.
NaCl 382	200	500	119	1190	3.14	116	1160	3.14	48	960	6.00
NaCl 383	200	500	125	1250	3.14	142	1420	3.14	82	820	3.14
NaCl 389	200	500	104.5	1045	3.14	84.9	849	3.14	27.3	546	6.00
NaCl 394	200	500	107.1	1071	3.14	72.3	723	3.14	54.4	544	3.14
NaCl 395	200	500	102.5	1025	3.14	36.5	730	6.00	43.5	870	6.00
NaCl 396	200	500	113.8	1138	3.14	22.4	896	11.71	37.7	754	6.00
SYS 377	200	500	105	1050	3.14	70	700	3.14	126	1260	3.14
SYS 378	200	500	124	1240	3.14	129	1290	3.14	48	960	6.00
SYS 379	200	500	110	1100	3.14	36	720	6.00	n.v.	n.v.	n.v.
SYS 384	200	500	98	980	3.14	131	1310	3.14	80	800	3.14

Anhang

SYS 385	200	500	116	1160	3.14	53	530	3.14	27	540	6.00
SYS 386	200	500	99	990	3.14	88	880	3.14	118	1180	3.14
SYS 387	200	500	123	1230	3.14	32	640	6.00	66	660	3.14
SYS 388	200	500	129	1290	3.14	34	680	6.00	62	620	3.14
SYS 416	200	500	96.4	964	3.14	81.7	817	3.14	56.7	567	3.14
SYS 419	200	500	93.3	933	3.14	69.9	699	3.14	n.v.	n.v.	n.v.
SYS 420	200	500	101.7	1017	3.14	54.2	542	3.14	54.3	543	3.14
SYS 423	200	500	91.1	911	3.14	118.9	1189	3.14	27.2	544	6.00
HAI 390	200	500	98.9	989	3.14	50.4	504	3.14	36.4	728	6.00
HAI 391	200	500	102.6	1026	3.14	32.4	648	6.00	13.5	540	11.71
HAI 392	200	500	110	1100	3.14	67.1	671	3.14	39.6	792	6.00
HAI 393	200	500	103.9	1039	3.14	104.4	1044	3.14	28.4	568	6.00
HAI 397	200	500	92.6	926	3.14	34.7	694	6.00	32.8	656	6.00
HAI 399	200	500	98.8	988	3.14	79.5	795	3.14	35.9	718	6.00
HAI 400	200	500	90.3	903	3.14	40.4	808	6.00	56.9	569	3.14
HAI 409	200	500	99.8	998	3.14	21.7	868	11.71	12.7	508	11.71
EMB 402	200	500	99.8	998	3.14	18.7	748	11.71	6.4	512	23.14
EMB 403	200	500	98.8	988	3.14	75	750	3.14	50.9	509	3.14

Anhang

EMB 404	200	500	109.5	1095	3.14	26	520	6.00	46.6	932	6.00
EMB 405	200	500	107.2	1072	3.14	11.4	456	11.71	19.9	796	11.71
EMB 406	200	500	105.1	1051	3.14	18.5	740	11.71	n.v.	n.v.	n.v.
EMB 407	200	500	106.4	1064	3.14	18.4	736	11.71	30.5	610	6.00
EMB 408	200	500	93.5	935	3.14	28.3	566	6.00	23.2	928	11.71
EMB 415	200	500	102.5	1025	3.14	38.5	770	6.00	n.v.	n.v.	n.v.
TAN 411	200	500	95.4	954	3.14	7.9	632	23.14	n.v.	n.v.	n.v.
TAN 412	200	500	105.7	1057	3.14	1.7	510	86.00	5.9	472	23.14
TAN 413	200	500	99.3	993	3.14	151.1	756	1.72	174.8	874	1.71
TAN 417	200	500	101.6	1016	3.14	142.2	1422	3.14	177.5	888	1.72
TAN 418	200	500	102.9	1029	3.14	69	690	3.14	21.9	876	11.71
TAN 421	200	500	100.7	1007	3.14	57.3	573	3.14	20.1	804	11.71
TAN 422	200	500	105.3	1053	3.14	89.4	894	3.14	62.2	622	3.14
TAN 424	200	500	105.4	1054	3.14	34.5	690	6.00	60.6	606	3.14

Abkürzungen: n.v. = nicht vorhanden

Anhang B: Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach systemischer Verabreichungen in den untersuchten Kompartimenten

Tabelle 44: Anhang B

Tiere	Plasma		Leber		Tumor 1		Tumor 2	
	CPT-11 µmol/ml	SN-38 µmol/ml	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g
SYS 377	0.25	0.26	10.30	0.97	8.63	0.53	9.71	0.90
SYS 378	0.15	0.13	6.08	0.87	4.91	0.79	3.82	0.51
SYS 379	LOQ	LOQ	1.70	0.63	6.65	0.44	n.v.	n.v.
SYS 384	0.28	0.19	10.76	1.16	4.86	0.30	6.71	0.55
SYS 385	0.20	0.15	6.22	0.65	7.55	0.31	6.15	0.41
SYS 386	0.54	0.14	7.74	0.89	8.74	0.54	3.97	0.52
SYS 387	0.35	0.13	6.05	0.82	4.63	0.54	5.17	0.34
SYS 388	0.41	0.19	7.49	0.80	5.49	0.43	5.20	0.25
SYS 416	1.92	0.43	34.4	1.79	80.1	0.79	59.8	0.97
SYS 419	1.22	0.38	24.3	1.18	171.7	0.84	n.v.	n.v.
SYS 420	1.34	0.28	26.7	1.47	141.8	1.36	58.6	0.62
SYS 423	2.28	0.36	37.7	1.88	76.5	1.03	67.0	0.74

Abkürzungen: n.v. = nicht vorhanden, LOQ = limit of quantitation

Anhang C: Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach hepatoarterieller Verabreichungen in den untersuchten Kompartimenten

Tabelle 45: Anhang C

Tiere	Plasma		Leber		Tumor 1		Tumor 2	
	CPT-11 µmol/ml	SN-38 µmol/ml	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g
HAI 390	1.50	0.21	34.00	0.87	217.40	0.33	125.30	0.51
HAI 391	2.23	0.33	46.10	0.95	510.30	0.64	705.40	0.34
HAI 392	1.64	0.28	33.00	1.07	87.40	0.57	85.20	0.48
HAI 393	1.99	0.28	31.70	0.80	216.60	0.68	108.10	0.38
HAI 397	3.05	0.23	71.90	1.14	99.70	0.74	188.50	0.68
HAI 399	1.51	0.27	34.40	0.89	461.80	0.59	809.20	0.53
HAI 400	3.66	0.17	56.10	1.26	446.80	0.51	794.00	0.47
HAI 409	7.14	0.13	66.67	1.12	210.12	0.99	142.84	0.80

Abkürzungen: n.v. = nicht vorhanden, LOQ = limit of quantitation

Anhang D: Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit EmboCept® S in den untersuchten Kompartimenten

Tabelle 46: Anhang D

Tiere	Plasma		Leber		Tumor 1		Tumor 2	
	CPT-11 µmol/ml	SN-38 µmol/ml	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g
EMB 402	1.15	0.15	25.24	0.97	253.60	2.28	360.50	2.84
EMB 403	1.08	0.24	17.10	0.70	275.13	0.86	157.98	1.33
EMB 404	1.88	0.10	24.47	0.82	49.32	0.45	105.99	0.69
EMB 405	1.55	0.12	29.44	0.49	80.09	0.48	35.97	0.10
EMB 406	5.90	0.24	130.5	0.99	76.45	1.06	n.v.	n.v.
EMB 407	1.31	0.18	28.89	0.56	536.26	0.93	402.60	1.13
EMB 408	19.51	0.56	923.6	12.76	73.44	1.55	572.01	7.85
EMB 415	1.42	0.35	33.10	1.53	55.00	0.86	n.v.	n.v.

Abkürzungen: n.v. = nicht vorhanden, LOQ = limit of quantitation

Anhang E: Konzentrationen von CPT-11 und SN-38 nach Applikation mit Tandem™ in den untersuchten Kompartimenten

Tabelle 47: Anhang E

Tiere	Plasma		Leber		Tumor 1		Tumor 2	
	CPT-11 µmol/ml	SN-38 µmol/ml	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g	CPT-11 µmol/g	SN-38 µmol/g
TAN 411	0.03	0.01	1.9	LOQ	0.10	LOQ	n.v.	n.v.
TAN 412	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
TAN 413	LOQ	LOQ	LOQ	0.02	19.66	0.24	22.06	0.24
TAN 417	0.01	0.03	0.69	0.08	18.67	0.42	10.99	0.37
TAN 418	LOQ	LOQ	LOQ	0.02	0.79	0.02	0.23	0.05
TAN 421	LOQ	0.01	1.13	0.06	3.98	0.23	14.45	1.11
TAN 422	0.01	0.03	1.57	0.08	25.43	0.54	17.5	0.67
TAN 424	LOQ	LOQ	LOQ	0.02	0.05	0.01	0.26	0.02

Abkürzungen: n.v. = nicht vorhanden, LOQ = limit of quantitation