

Pharmakokinetik von Etoposidphosphat

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Axel Barth

aus Kassel

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität

Marburg als Dissertation angenommen am:

8.11.2003

Erstgutachter:

Prof. Dr. H. Jungclas

Zweitgutachter:

Prof. Dr. W. Ensinger

Tag der mündlichen Prüfung am:

20.2.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	3
2	Medizinische Grundlagen.....	6
2.1	Medikamentöse Tumorthapie	6
2.2	Einteilung der Zytostatika	8
2.3	Etoposidphosphat.....	8
2.3.1	Herkunft.....	8
2.3.2	Chemie.....	11
2.3.3	Pharmakodynamik	13
2.3.4	Pharmakokinetik.....	15
2.3.5	Klinische Anwendung.....	18
3	Probengewinnung	20
3.1	Patienten.....	20
3.2	Probenentnahme	20
4	Meßmethode.....	24
4.1	PDMS-Technik.....	24
4.1.1	Plasmadesorption	24
4.1.2	Massenspektrometrie	26
4.1.3	Interner Standard	27
4.1.4	Aufbereitung der Proben zur PDMS.....	28
4.2	Probengewinnung und Zusatz des internen Standards.....	29
4.3	Extraktion der Plasmaproben	30
4.4	DC-Reinigung	32
4.5	Matrixpräparation.....	35

4.6	Quantitative PDMS	36
4.7	Messung von Etoposidphosphat.....	39
5	Meßergebnisse und Berechnung der pharmakokinet-ischen Parameter ..	40
5.1	Gemessene Plasmakonzentrationen der Patienten	40
5.2	Berechnung der pharmakokinetischen Parameter	42
6	Limited Sampling Modell	49
6.1	Ziel des Modells	49
6.2	Mathematischer Ansatz	51
6.3	Statistische Voraussetzungen	53
6.3.1	Tests auf Normalverteilung	54
6.3.2	Test der Stichproben auf gleiche Herkunft.....	55
6.3.3	Repräsentation der Stichprobe	56
6.4	Modellentwicklung mit linearer und multipler Regression.....	56
6.5	Entwicklung und Validierung verschiedener LSM-Modelle.....	60
6.6	Berechnung des mittleren Schätzfehlers	71
7	Diskussion und Ausblick	73
7.1	Schätzgüte der Modelle	73
7.2	Vergleich mit anderen LSM	77
7.3	Ausblick	81
8	Zusammenfassung.....	83
9	Literaturverzeichnis	85
10	Danksagung	99

1 Einleitung und Zielsetzung

Etwa jeder fünfte Todesfall ist in den Industrieländern auf einen malignen Tumor zurückzuführen. Schon heute ist „Krebs“ somit zu einer der häufigsten Todesursachen geworden und die Anzahl der Krebsfälle nimmt ständig zu. Das beruht vor allem darauf, daß die malignen Tumoren Erkrankungen des höheren Lebensalters sind und dank der erfolgreichen Bekämpfung von Infektionskrankheiten jetzt mehr Menschen dieses Alter erreichen. Trotz aller Fortschritte auf diagnostischem und therapeutischem Gebiet liegen die Heilungsaussichten für die am häufigsten auftretenden Krebsformen der inneren Organe selten über 20 Prozent. Eine Krebsgeschwulst kann vernichtet oder in ihrem Wachstum gehindert werden. Die Rückbildung einer Tumorzelle in eine normale Gewebszelle läßt sich (noch?) nicht erreichen. Die wichtigsten therapeutischen Maßnahmen sind die Operation, die Bestrahlung und die Anwendung von Zytostatika. Die Behandlung maligner Erkrankungen mit Zytostatika hat in den letzten Jahrzehnten aufgrund von zahlreichen Neuentwicklungen eine große Bedeutung erreicht. Diese Substanzen greifen in unterschiedlichen Phasen in den Zellzyklus ein und führen so zu einer Zerstörung oder Schädigung der Tumorzelle. Die Wirkung ist in den meisten Fällen allerdings so unspezifisch, daß gleichzeitig schwere Schäden an gesunden Zellen auftreten können. Insbesondere sind Gewebe mit hohen Zellteilungsraten wie z.B. das Knochenmark, die Schleimhäute oder die Haarwurzeln betroffen. Die Schädigung des Knochenmarks und die daraus resultierende Immunsuppression ist die gravierendste Nebenwirkung, die als Folge einer Überdosierung von Zytostatika bis zum Tode des Patienten führen kann. Bei einer Unterdosierung besteht die Gefahr einer Resistenzbildung der Tumorzellen gegen das Zytostatikum (ähnlich wie bei der Anwendung von Antibiotika), was den Wirkverlust des Medikamentes zur Folge hat. Es wird somit deutlich, daß die Dosierung von Zytostatika im Gegensatz zu vielen anderen Arzneimitteln unter besonderer Sorgfalt und individuell an den Patienten angepaßt erfolgen muß. Eine solche Vorgehensweise ist immer dann notwendig, wenn die therapeutische Breite eines Pharmakons schmal ist, aber große individuelle Schwankungen in

der Pharmakokinetik beobachtet werden. Dies gilt im besonderen Maße für das hier untersuchte Zytostatikum Etoposid /Ben87/Ste85/Pfl87/Pfl93/, das in zahlreichen international anerkannten Behandlungsprotokollen zur Therapie von malignen Tumoren eingesetzt wird. Etoposid wird derzeit wie die meisten anderen Zytostatika nach der Körperoberfläche des Patienten dosiert, die anhand der Größe und des Gewichtes des Patienten mit Hilfe der Formel von Dubois /Dub16/ angenähert wird. Dadurch versucht man, eine gewisse Anpassung der Dosis an die individuellen Gegebenheiten des Patienten zu erreichen. Natürlich gelingt auf diesem Wege nur eine äußerst grobe Anpassung. Darauf deutet schon das Alter der Formel von Dubois hin, die im Jahr 1916 (!) veröffentlicht wurde. Weiterhin gehen zum Beispiel Stoffwechselfparameter wie die Nierenfunktion, die einen erheblichen Einfluß auf die Pharmakokinetik von Etoposid hat /Din86/Arb86/Pfl87/Pfl93/, nicht in die Dosisberechnung mit ein. Wünschenswert wäre statt dessen eine Überwachung der Dosierung im Sinne eines sogenannten „drug monitoring“. Hierbei wird nach Gabe des Medikamentes der zeitliche Verlauf des Blutspiegels des Wirkstoffs kontrolliert. So läßt sich individuell für jeden Patienten und jede Anwendung die Therapie überwachen, indem das zeitliche Integral des Wirkstoffspiegels, die sogenannte AUC (area under the curve), erfaßt wird. Für diese Größe konnte nämlich bei Anwendung der Substanz Etoposid eine Korrelation zu der Schwere der Knochenmarkstoxizität (Myelosuppression) und damit zur dosislimitierenden Toxizität aufgezeigt werden /Ben87/. Bei Etoposid erfordert die Aufnahme eines kompletten zeitlichen Blutspiegel-Verlaufs zur Berechnung der AUC jedoch mindestens 7 Blutabnahmen mit anschließender Bestimmung im Labor. Für die tägliche Routine in der Klinik ist dieser Aufwand weder zeitlich noch finanziell realisierbar. Wünschenswert ist also die Entwicklung einer Methode, mit Hilfe derer man die AUC anhand von wenigen (1-2) Blutspiegelbestimmungen abschätzen kann. Ein solches Rechenmodell nennt man „Limited Sampling Model“. Für die Therapie mit Etoposid wurden bereits Limited Sampling Modelle (LSM) veröffentlicht /Tra99/Hol95/.

In den 90er Jahren wurde die Applikation von Etoposid durch die Einführung des „Prodrugs“ Etoposid-Phosphat entscheidend verbessert. Das Phosphat von Etoposid ist im Gegensatz zur Originalsubstanz wasserlöslich, weshalb man bei der Infusion auf nebenwirkungsreiche Lösungsvermittler verzichten kann. Im Blut des Patienten wird nach kurzer Zeit das Phosphat durch im Blutplasma vorhandene Phosphatasen abgespalten, so daß der eigentliche Wirkstoff, das Etoposid, entsteht.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, ein Limited Sampling Modell zur einfachen Bestimmung der Etoposid-AUC bei Therapie mit Etoposid-Phosphat zu entwickeln. Mit dieser Methode stünde ein Verfahren zur Verfügung, welches den Onkologen in die Lage versetzt, mit geringem zeitlichen und materiellen Aufwand die Dosis-Wirkungs-Beziehung an großen Patientenkollektiven bestimmen zu können und den Wirkstoff für jeden Patienten individuell an seine Stoffwechselsituation angepaßt zu dosieren.

2 Medizinische Grundlagen

2.1 Medikamentöse Tumorthherapie

Zytostatika sind eine chemisch heterogene Gruppe von Substanzen, die zur Behandlung von malignen Erkrankungen („Krebs“) eingesetzt werden. Sie greifen unspezifisch über unterschiedliche Mechanismen in die Stoffwechselfvorgänge im Zellzyklus, vor allem in die DNA-Synthese und die Replikation, ein und können dadurch zum Tod der Zelle führen. Nur Zellen, die sich in einer aktiven Replikationsphase befinden, sind gegenüber einer Chemotherapie empfindlich. Selten wirken Zytostatika direkt nekroseinduzierend (unmittelbarer Tod der Zelle). In der Regel wird eine Kaskade zellzyklusregulierender Vorgänge eingeleitet, die in einen „programmierten Zelltod“ (sogenannte Apoptose) münden.

Da sich Tumorzellen in ihrem Stoffwechsel in vielen Punkten nicht von gesunden Zellen unterscheiden, ist ein selektiver Angriff auf malignes Gewebe leider zur Zeit kaum möglich /Est00/. Jedoch wird die zytotoxische Wirkung aufgrund der meist stark erhöhten Teilungsrates von Tumorzellen hier besonders stark ausgeprägt sein. Sie betrifft aber auch andere rasch proliferierende Gewebe, wie z.B. das blutbildende System im Knochenmark, die intestinale Schleimhaut und die Keimzellen. Daraus resultieren schwere Nebenwirkungen wie Hemmung der Hämatopoese (Blutbildung), Schwächung der Infektabwehr durch Immunsuppression, gastrointestinale Beschwerden und Störungen der Spermatogenese bzw. der Follikelreifung. Meist sind Leuko- und Thrombozytopenie (zu geringe Anzahl von weißen Blutkörperchen und Blutplättchen) mit ihren Komplikationen wie Infektionen bzw. Blutungen limitierende Faktoren der Therapie, während sich eine Anämie (zu geringe Anzahl roter Blutkörperchen) oft nur langsam entwickelt. Die immunsuppressive Wirkung zytostatischer Substanzen läßt sich bei Immunerkrankungen und anderen Indikationen nutzen, ist aber in der Tumorthherapie meist unerwünscht, da sie die körpereigene Tumorabwehr schwächt.

Die relative Selektivität der Zytostatikatherapie, die in der Bilanz eine überwiegende Schädigung von malignen Zellen zum Ziel hat, ist durch die erhöhte Empfindlichkeit des Tumorgewebes gegenüber zellschädigenden Einflüssen bedingt und kann durch den Einsatz einer Polychemotherapie verbessert werden. Durch Kombination mehrerer zytotoxischer Stoffe, die über verschiedene Angriffsmechanismen wirken, erreicht man eine größere Zellsterberate. Durch dieses Vorgehen wird der therapeutische Effekt fokussiert und das Ausmaß der Nebenwirkungen durch eine Dosisreduzierung der einzelnen Komponenten reduziert. Zahlreiche Therapieschemata wurden so auf empirischer Basis entwickelt.

Das Ansprechen auf ein bestimmtes Zytostatikum hängt einerseits von der unterschiedlichen Empfindlichkeit der einzelnen Tumorarten auf die verschiedenen Substanzen ab. Andererseits spielt auch die Phase des Zellteilungszyklus, in der sich die Zellen befinden, eine Rolle, da Zytostatika zum Teil phasenspezifisch wirken (s.o). Durch Einsatz einer Polychemotherapie wird versucht, möglichst viele verschiedene Zellphasen therapeutisch abzudecken. Der Therapieerfolg ist darüber hinaus in starkem Maße abhängig von der Art der Anwendung, z.B. dem Zeitpunkt des Therapiebeginns oder der Applikation als kontinuierliche oder fraktionierte Gabe.

Zusätzlich zu den unerwünschten Nebenwirkungen wird die Therapie durch eine Resistenzentwicklung von Tumorzellen erschwert. Eine verminderte Aufnahme der zytotoxischen Substanz in die Tumorzellen, eine verminderte Metabolisierung einer applizierten Substanz zum eigentlichen Wirkstoff, eine beschleunigte Inaktivierung des Wirkstoffs, eine veränderte Affinität zu den Zielmolekülen oder verbesserte DNA-Reparaturmechanismen können der Resistenzentwicklung zugrunde liegen. Der kombinierte Einsatz und die möglichst optimale Dosis können die Resistenzentwicklung verzögern oder verhindern. Primär resistente Zelllinien können mit einem nichtkreuzreaktiven Kombinationspartner abgetötet werden, die Entstehung von sekundär resistenten Zelllinien kann verzögert oder verhindert werden.

Folglich sollte es immer Ziel einer antineoplastischen Behandlung sein, eine möglichst hohe Toxizität gegenüber dem Tumor mit einer möglichst geringen Toxizität gegenüber gesundem Gewebe zu erreichen. Entscheidend hierfür ist eine optimale Dosierung des Zytostatikums, die individuell auf den einzelnen Patienten abgestimmt sein muß. Die Dosierung der Zytostatika ist in starkem Maße von der Art des zu behandelnden Tumors, der Begleitmedikation und dem physiologischen Zustand des Patienten abhängig.

2.2 Einteilung der Zytostatika

Man unterscheidet folgende antineoplastisch wirksame Substanzen (gemäß WHO):

- **Alkylantien:** Alkylsulfonate, Ethylenimine, Nitrosoharnstoffe, Stickstofflost-Derivate
- **Antimetabolite:** Folsäure-Analoga, Purin-Analoga, Pyrimidin-Analoga
- **Pflanzenalkaloide:** Podophyllin-Derivate, Taxane, Vinca-Alkaloide
- **Antitumorantibiotika:** Anthrazykline, Bleomycin, Dactinomycin, Mitomycin
- **Sonstige Zytostatika:** Platin-Verbindungen, Camptothecin-Derivate, L-Asparaginase, u.a.
- **Monoklonale Antikörper**
- **Hormone:** Antiandrogene, Antiöstrogene, Aromatasehemmer, Gestagene, GnRH-Analoga, Östrogene
- **Zytokine:** Wachstumsfaktoren, Interferone, Interleukine

2.3 Etoposidphosphat

2.3.1 Herkunft

Etoposidphosphat ist ein „Prodrug“ von Etoposid. Unter einem Prodrug versteht man einen Arzneistoff, der als Vorstufe appliziert wird und dann im

Organismus meist enzymatisch in die eigentliche Wirkform umgesetzt wird. Chemisch besteht der Unterschied zum Etoposid in einer Phosphatgruppe anstatt eines Wasserstoffrestes (siehe Kapitel 2.3.2). Hierdurch wird eine gute Wasserlöslichkeit erreicht, was den entscheidenden Vorteil gegenüber Etoposid darstellt. Die Phosphatgruppe wird im Plasma durch Phosphatasen (vor allem die alkalische Phosphatase) abgespalten (siehe Kapitel 2.3.3).

Das durch Abspaltung der Phosphatgruppe vom Etoposidphosphat entstehende Etoposid ist ein semisynthetisches Derivat des Pflanzenalkaloids Podophyllotoxin /Kel71/. Bereits vor mehreren hundert Jahren wurde von nordamerikanischen Indianern sowie Bewohnern des Himalayas ein wässriger Wurzelextrakt aus den Wurzeln und Wurzelstöcken *Podophyllum peltatum* und *Podophyllum emodi* als Laxans (Abführmittel) oder Antihelminthikum (Arzneimittel gegen Würmer) eingesetzt /Ach81/Ben61/Oss81/Iss79/. 1942 wurde ein öliger Extrakt aus diesen Pflanzen zur Behandlung von *Condylomata acuminata* (Warzen im Genitalbereich) und anderen gutartigen Hauterkrankungen verwendet /Kap42/. Wenig später folgte dann die Entdeckung der mitosehemmenden Wirkung dieses Extraktes /Sul47/Kel54/. Bei der Analyse der Podophyllinextrakte fand man die Substanzen Pelatin, Desoxypodophyllotoxin und Podophyllotoxin /Kel54//Ben61/Oss81/.

Die zytostatische Wirkung von Podophyllotoxin wird ähnlich wie die der Vinca-Alkaloide und des Colchizins über eine Hemmung der Mikrotubulusbildung durch Bindung an Tubulin während der Mitose vermittelt /Kel78/Arn79/Cre75/Loi76/loi78/. Dadurch wird der Aufbau des Spindelapparates verhindert, der Voraussetzung für die Teilung der Zelle ist (daher auch „Spindelgift“). Der therapeutische Index¹ des Podophyllotoxins als antineoplastische Substanz erwies sich jedoch bei ausgeprägter Toxizität als zu ge-

¹ Darunter versteht man das Verhältnis der auf die Tumorzellen toxisch wirkenden Konzentration eines Chemotherapeutikums zu der für den Wirt gerade noch verträglichen Konzentration.

ring /Gre54/Kel54/, so daß durch Modifikation des Ausgangsmoleküls nach einem nebenwirkungsärmeren Derivat gesucht wurde. Dies führte unter anderem durch Glucosidierung zur Entwicklung der semisynthetischen Podophyllo-toxin-Derivate Etoposid (VP16-213) und Teniposid (VM26), über deren anti-neoplastische Wirksamkeit Stähelin Anfang der siebziger Jahre berichtete /Stä73/Stä76/.

Etoposid zeichnet sich im Vergleich zur Muttersubstanz durch eine höhere antineoplastische Aktivität bei besserer Verträglichkeit aus /Stä73/Stä76/. Im Gegensatz zu Podophyllo-toxin als Spindelgift entfalten jedoch Etoposid, Etoposidphosphat (nach Dephosphorylierung) und Teniposid ihre zytostatische Wirkung u.a. durch eine Hemmung der Topoisomerase II /Han92/Lon84/Lon87/Lon92/. Dieses Enzym spielt bei der Replikation der DNA eine entscheidende Rolle.

In präklinischen Untersuchungen zeigten Etoposid und Teniposid eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung bei einer Vielzahl von Experimentaltumoren. Mit einer Reihe anderer Chemotherapeutika konnte ein therapeutischer Synergismus nachgewiesen werden /Ach81/. In klinischen Studien wurde die Wirksamkeit vor allem von Etoposid untersucht, da sich herausstellte, daß Etoposid gegenüber Teniposid aufgrund seiner unterschiedlichen Pharmakokinetik besser steuerbar ist /Iss82/Eva82/. Die ausgeprägte zytotoxische Wirksamkeit sowie der therapeutische Synergismus mit anderen Zytostatika bei einer relativ guten Verträglichkeit der Substanz haben dazu geführt, daß Etoposid zum festen Bestandteil vieler Therapieschemata geworden ist.

Etoposidphosphat zur Injektion ist der Phosphatester von Etoposid. Dieses gut wasserlösliche Prodrug von Etoposid wird im Blut durch die alkalische Phosphatase schnell in den eigentlichen Wirkstoff Etoposid umgewandelt (dephosphoryliert) /Sen88/Ros89/. Die Wasserlöslichkeit von Etoposidphosphat macht es möglich, die Substanz im Gegensatz zu Etoposid in höheren Konzentrationen über eine relativ kurze Zeit zu applizieren und auf unvoreilhaftige Lösungsvermittler, wie z.B. Polyethylenglykol und Polysorbat zu ver-

zichten. Hierdurch lassen sich einige unerwünschte Nebenwirkungen der Etoposidtherapie wie z.B. Hypotension (zu niedriger Blutdruck) reduzieren. Die Vorteile von Etoposidphosphat gegenüber Etoposid sind in Tabelle 1 dargestellt /BMS93/Sch94/Sch88/.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile bei der Applikation von Etoposid und Etoposidphosphat

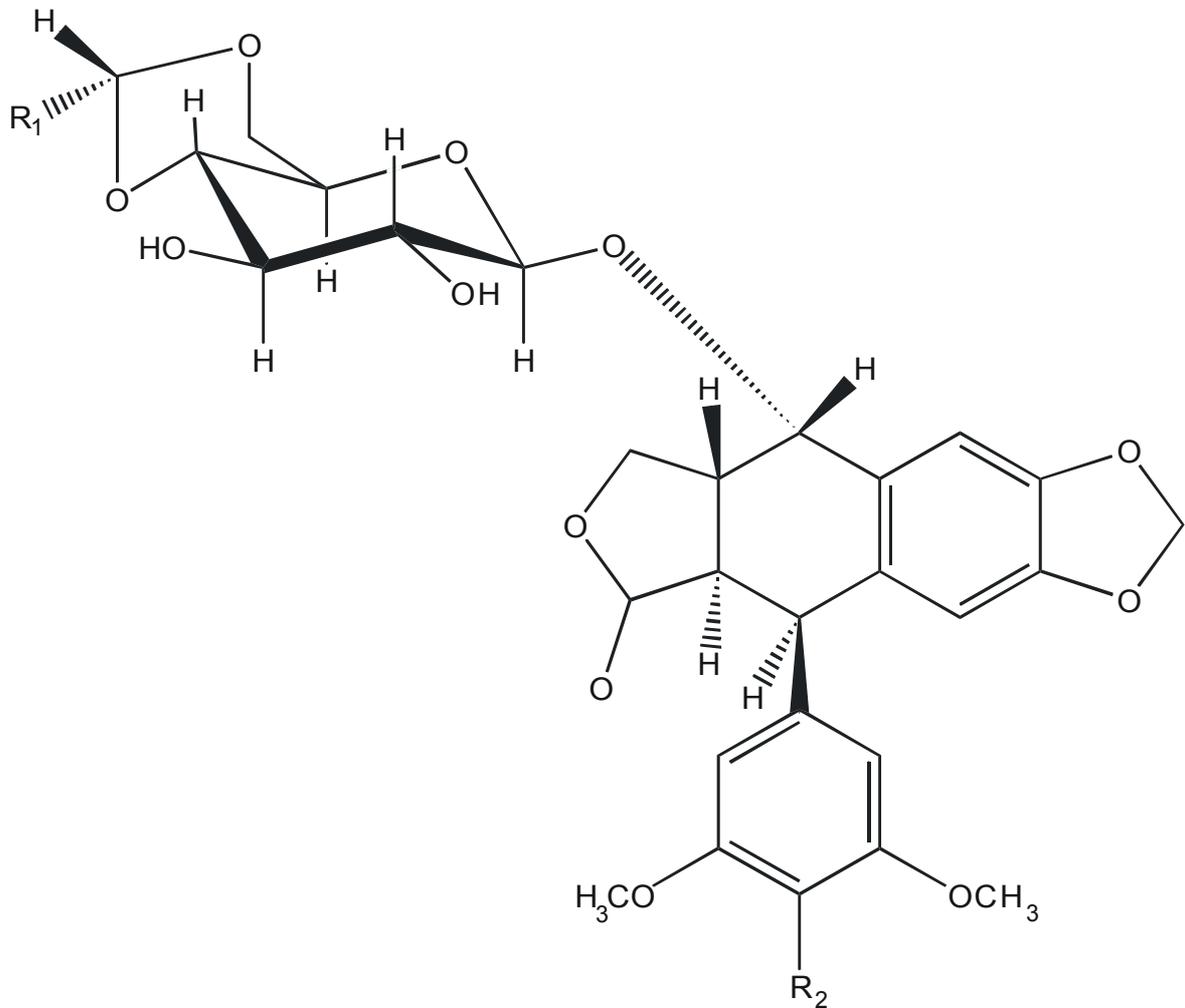
Etoposid	Etoposidphosphat
Wasserunlöslich	Wasserlöslich
Komplexes Lösungsvermittlersystem erforderlich	Lediglich Dextran 40 und Natriumcitrat erforderlich
Konzentration im Blutplasma bis 0,4 mg/ml möglich	Konzentration im Blutplasma bis 20 mg/ml möglich
Lange Infusionsdauer (30 bis 60 Minuten) erforderlich	Kurzzeitinfusion oder Bolusgabe möglich
Hypotensionsgefahr	Keine Hypotensionsgefahr
Großes Infusionsvolumen erforderlich	Stark reduziertes Infusionsvolumen möglich
Gefahr von Inkompatibilitäten mit Kunststoffen	Keine Inkompatibilitäten mit Kunststoffen bekannt

2.3.2 Chemie

Etoposidphosphat, makroskopisch ein weißliches, kristallines Pulver, ist eine wasserlösliche Phosphatesterverbindung des Etoposids.

Etoposid, ein halbsynthetisches Derivat des Podophyllotoxins, unterscheidet sich von seiner Muttersubstanz durch Epimerisierung am C9-Atom des C-Ringes, durch Substitution einer Ethylden- β -Glucopyranose sowie einer Demethylierung am C4-Atom des Phenyl(E)-Ringes /Ach81/. Das homologe Teniposid unterscheidet sich von Etoposid nur in einer Substitution an der Glycosidgruppe. Etoposidphosphat wurde aus Etoposid durch Veresterung einer Hydroxygruppe mit einer Phosphatgruppe synthetisiert (siehe Abbildung 1).

Die chemische Bezeichnung von Etoposidphosphat ist 4'-Demethyl-epipodophyllotoxin-9-[4,6-O-ethyliden- β -D-glucopyranosid],4'-(dihydrogenphosphat). Die Summenformel lautet $C_{29}H_{33}O_{16}P \cdot 2C_2H_6O$. Das Molekulargewicht des Diethanolats beträgt 760,69 g/mol.



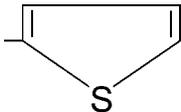
Substanz	R ₁	R ₂
Etoposid	-CH ₃	-OH
Etoposidphosphat	-CH ₃	-OPO ₃ H ₂ (Phosphat)
Teniposid		-OH

Abbildung 1: Molekülstruktur von Etoposid/ Etoposidphosphat und Teniposid

Etoposidphosphat ist in Wasser gut löslich (Löslichkeit größer 100 mg/ml), in Lösungsmitteln wie Chloroform, Ethanol und Methylenchlorid schwach löslich (ca. 10-20 mg/ml) und in Lösungsmitteln wie Aceton, Acetonitril, Glycerol, Methanol und Propylenglycol schwer löslich. Der pH-Wert einer Lösung in Wasser von 1 mg/ml liegt zwischen 4 und 5.

Sowohl Etoposid als auch Teniposid sind im Gegensatz dazu in Wasser nahezu unlöslich, in Ethanol schwach löslich und in Aceton, Methanol und Chloroform gut löslich. Da Etoposid und Teniposid sehr ähnliche physikochemische Eigenschaften besitzen (Masse, Lipophilie), läßt sich jede der beiden Substanzen als interner Standard beim quantitativen Nachweis der jeweils anderen Substanz verwenden /Jun83a/.

2.3.3 Pharmakodynamik

Zunächst werden einige genetische Grundlagen beleuchtet:

Bei der DNA-Replikation muß sich die ursprüngliche Doppelhelix auf je 10 Basenpaare frisch replizierter DNA einmal vollständig um die eigene Achse drehen. Damit beim Fortschreiten der Replikationsgabel das gesamte Chromosom nicht dauernd vor der Gabel rotieren muß, womit ein erheblicher Energieaufwand verbunden wäre, wird bei der DNA-Replikation ein „Drehgelenk“ in der DNA-Helix gebildet, und zwar aus Proteinen, den sogenannten DNA-Topoisomerasen. Man kann DNA-Topoisomerasen als Nukleasen betrachten, die kovalent an eine Phosphatgruppe in der DNA binden und auf diese Weise eine Phosphodiesterbindung in der DNA-Kette reversibel spalten. Man kennt verschiedene Typen von Topoisomerasen. Die Typ-I-Topoisomerasen erzeugen einen Einzelstrangbruch. Die Topoisomerase II bildet dagegen mit beiden Strängen der DNA-Helix gleichzeitig eine kovalente Bindung und spaltet sie, um ein benachbartes doppelsträngiges DNA-Segment durch die entstandene Lücke durchtreten zu lassen /Alb95/. Anschließend wird die Lücke durch die Topoisomerase II wieder geschlossen. Dafür ist die vorübergehende Bildung eines DNA-Enzym-Komplexes nötig, der auch als „cleavable complex“ bezeichnet wird /Hsi83/San83/.

Etoposidphosphat wird in vivo innerhalb von Minuten durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert und in die aktive Substanz Etoposid umgewandelt /BMS93/Kau95/Mil92/Mil95/Sen88/Ros90/. Etoposid wirkt zytotoxisch über die Hemmung der Topoisomerase II. Die katalytische Aktivität der Topoisomerase II wird gehemmt und damit der „cleavable complex“ (s.o.), also der eigentlich vorübergehende Komplex zwischen der DNA und der Topoisomerase II, stabilisiert. Durch diese Stabilisierung kann die DNA nicht mehr wieder zusammengeführt werden. Irreversible Strangbrüche der DNA sind die Folge, wodurch eine weitere Teilung der betroffenen Zelle gestört wird /Hua73/Woz83/Che84/Roo84/.

Etoposid wirkt in vitro bei niedrigen Plasmakonzentrationen² (0,01 µg/ml bis 1 µg/ml) phasenspezifisch zytozid. Es verursacht einen irreversiblen prämitotischen Block in der späten S- oder frühen G₂-Phase des Zellzyklus. Die Zellen akkumulieren vornehmlich in der G₂-Phase. In hohen Konzentrationen (>1 µg/ml) wirkt Etoposid phasenunspezifisch, d.h. auch auf ruhende Zellen zytozid /Kri75/Lon84/ /Lon87/Lon92/Cla92/Hai95/. Bei intrazellulären Etoposidkonzentrationen, die deutlich über dem zytotoxischen Wirkspiegel liegen, wird die Nukleosidaufnahme in die Zelle behindert. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Zytotoxizität von Etoposid in vitro wesentlich von der Dauer der Exposition der Zellen abhängig ist /Roe87/.

Etoposidphosphat zeigt im Vergleich zu Etoposid eine verminderte in-vitro-Aktivität gegenüber malignen Zelllinien. Dies läßt sich auf die fehlende Konversion von Etoposidphosphat zu Etoposid zurückführen. In vivo zeigen beide Substanzen eine äquivalente antineoplastische Wirksamkeit /Ros90/.

² Unter „Plasma“ versteht man in der Medizin den nichtzellulären (also flüssigen) Anteil des Blutes

2.3.4 Pharmakokinetik

Etoposid und Etoposidphosphat verhalten sich bioäquivalent. Das heißt, die Geschwindigkeit und das Ausmaß, in denen der therapeutisch wirksame Anteil (hier das Etoposid) am Wirkort verfügbar ist, sind weitestgehend identisch. Dies wurde in zwei randomisierten Cross-over-Studien /BMS93/Kau95/ an Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen durch Vergleich der pharmakokinetischen Parameter AUC („area under the curve“, Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve) sowie C_{\max} (maximale Plasmakonzentration) von Etoposid und Etoposidphosphat belegt. Bei der einen Studie wurden die Patienten mit jeweils 150 mg pro Quadratmeter Körperoberfläche (im folgenden mit 150 mg/m^2 bezeichnet) Etoposid und Etoposidphosphat therapiert, bei der anderen mit jeweils 100 mg/m^2 . Die Bioäquivalenz ergibt sich aus den gemessenen Bioverfügbarkeiten von Etoposid aus Etoposidphosphat im Vergleich zu Etoposid mit 107% bzw. 113% für die AUC und 103% bzw. 107% für C_{\max} . Aufgrund der Bioäquivalenz der beiden Substanzen lassen sich die nachfolgenden Aussagen über Etoposid auf Etoposidphosphat übertragen.

Die Konzentrationskurven des Plasmaspiegelverlaufs von Etoposid sind biphasisch, so daß für die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter meist ein Zwei-Kompartiment-Modell verwendet wird³: In der ersten Phase, der Verteilungsphase, sinkt die Plasmakonzentration zunächst relativ schnell ab mit einer Halbwertszeit t_{α} , die zwischen 0,2 und 1,2 Stunden liegt. Diese Phase entspricht der Verteilung der Substanz aus dem zentralen Kompartiment Blut in das periphere Kompartiment (verschiedene Gewebe). Zwischen zentralem und peripherem Kompartiment stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht ein. Anschließend fällt die Plasmakonzentration in der zweiten, der

³ Es wurden jedoch auch ein Drei-Kompartiment-Modell /Arn80/ und ein Multi-Kompartiment-Modell /Pel78/ als Grundlage für die Auswertung der pharmakokinetischen Parameter beschrieben.

Eliminationsphase, mit der Halbwertszeit t_{β} (zwischen 3,4 und 8,7 Stunden) langsamer ab. In dieser Phase wird die Substanz aus dem zentralen Kompartiment durch Metabolisierung abgebaut bzw. aus dem Körper ausgeschieden.

Ein linearer Zusammenhang besteht zwischen den maximalen Plasmaspiegeln C_{\max} bzw. den Steady-State-Konzentrationen und der applizierten Dosis. Ebenso konnte auch für die AUC („area under the curve“) ein lineares Anwachsen mit steigender Dosierung gezeigt werden /Edm83/Cro86/. Bedeutsam ist, daß eine an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen wiederholte Applikation von Etoposid nicht zu einer Akkumulation der Substanz im Organismus führt /Bri85/.

Im Blutplasma ist Etoposid zu 94 bis 99 Prozent an Proteine gebunden /All75/. Phenylbutazon, Natriumsalicylat und Acetylsalicylsäure können Etoposid aus der Plasmaproteinbindung verdrängen /BMS96b/.

Das Verteilungsvolumen V_{ss} nach Einstellung des Gleichgewichtes (ss = steady state) zwischen peripherem und zentralem Kompartiment wurde zwischen 4,8 und 20,8 l/m² gemessen. Meßbare Substanzkonzentrationen ergaben sich in Leber, Lunge, Knochen, Lymphknoten und im Myometrium /Din82/Cla87/, in der Pleuraflüssigkeit /Han84/ und in Hirntumoren /Luk82/Ste84/Zuc91/. Jedoch penetriert Etoposid die Blut-Hirn-Schranke nur schlecht. Die gemessenen Liquorkonzentrationen weisen erhebliche Schwankungen auf und liegen meist deutlich unter 10% des korrespondierenden Plasmaspiegels /Cre82/Ste84/. Allerdings konnten vor allem in intrazerebralen Metastasen kleinzelliger Bronchialkarzinome therapierelevante Konzentrationen von Etoposid nachgewiesen werden /Ste84/.

Etoposid wird zu etwa 40% unverändert und zu 5 bis 20% gebunden an Glucuronid ausgeschieden /Din82/Bri85/BMS96b/. Der Rest verteilt sich auf die weiter unten genannten Metabolisierungsprodukte. Hauptsächlich wird Etoposid renal eliminiert, die hepatobiliäre Elimination spielt eine geringere Rolle /Cre82/Arb86/. Dies erklärt auch, wieso bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion eine deutlich höhere AUC beobachtet werden konnte

/Arb86/Pfl87/Pfl93/. Für die Etoposid-Plasmaclearance wurden in den genannten Studien Werte zwischen 18 - 39,3 ml min⁻¹ m⁻² bestimmt, die Nieren-clearance beträgt ca. ein Drittel der Plasmaclearance.

Es wurden mehrere Metabolisierungsprodukte von Etoposid gefunden. Im Plasma fand sich die cis- und trans- Form der Hydroxysäure, das cis-Lakton, das trans- und cis-Isomer der 4-Demethylepipodophyllinsäure-9-(4,6-O-ethyliden-β-D-Glucopyranosid), das Aglycon (4' Demethylepipodophyllotoxin) und Etoposid an Glucuronsäure gebunden /All75/Str80/Eva82/. Im Urin fanden sich die Hydroxysäure und das Glucuronid /Eva82/Sin84/Din86/.

Verschiedene Faktoren können die Pharmakokinetik von Etoposid beeinflussen. Aufgrund der Bioäquivalenz von Etoposid und Etoposidphosphat lassen sich diese Aussagen auf Etoposidphosphat übertragen. Etoposid wird zum großen Teil renal ausgeschieden. Eine insuffiziente Eliminationsfähigkeit der Niere dürfte also die pharmakokinetischen Parameter von Etoposid beeinflussen. Tatsächlich wurden bei niereninsuffizienten Patienten eine signifikante Erniedrigung der Plasmaclearance und eine Verlängerung der Eliminations-Halbwertszeit /Din86/Arb86/Pfl87/Pfl93/ sowie eine signifikante Erhöhung des Verteilungsvolumens /Din86/Arb86/ beobachtet. Ebenfalls wurde zwischen der Plasmaclearance von Etoposid und der Kreatininclearance eine hohe Korrelation festgestellt /Des90/Hah93/. Daher wird bei einer Nierenfunktionsstörung mit Kreatininwerten > 2,0 mg/dl oder einer Kreatininclearance < 60 ml/min eine Dosisreduktion des Etoposids empfohlen /Pfl93/Hah93/.

Leberfunktionsstörungen wirken sich nicht so eindeutig auf die pharmakokinetischen Parameter aus. Während einige Studien keine Beeinflussung feststellen konnten /Arb86/Han87/, beobachteten andere eine Abnahme der Plasmaclearance /Sin84/ und einen Anstieg des Verteilungsvolumens bei reduzierter Leberfunktion /Din86/. Bei ikterischen Krankheitsbildern ist die ungebundene Plasmafraktion des Etoposids signifikant erhöht /Ste89/. Dies ist vermutlich durch eine Verdrängung durch Bilirubin aus der Plasmaproteinbindung erklärbar. Obwohl die Gesamtclearance (soweit beurteilbar) unverändert

bleibt, wird ebenfalls eine Dosisreduktion des Etoposids empfohlen /Rat90/Pf193/.

Da Etoposid Bestandteil etlicher Polychemotherapie-Protokolle ist, sollten auch Einflüsse anderer Kombinationspartner auf die Pharmakokinetik von Etoposid bedacht werden. Appliziert man z.B. Cisplatin ($90-120 \text{ mg/m}^2$) unmittelbar vor der Etoposidgabe, beobachtet man eine Erhöhung der AUC und eine Herabsetzung der Plasmaclearance und des Verteilungsvolumens /Pf193/; die terminale Halbwertszeit und die „mean residence time“ (MRT) verlängern sich /Sin84/. In der vorliegenden Arbeit wurden daher nur Daten von Patienten verwendet, die nicht mit Cisplatin therapiert wurden. Keine Beeinflussung der pharmakokinetischen Parameter wurde bei Kombination mit Doxorubicin (35 mg/m^2) und Cyclophosphamid (180 bzw. 80 mg/m^2) festgestellt /Hoa88/Cun88/.

Einige Substanzen wie Calcitonin, Calcitriol, Edetinsäure, Editronsäure, Isofluran und Levamisol können die Aktivität der alkalischen Phosphatase beeinträchtigen. Bei gleichzeitiger Anwendung dieser Präparate ist eine verminderte Wirksamkeit von Etoposidphosphat nicht auszuschließen, da nicht sicher ist, ob das Etoposidphosphat komplett in den aktiven Metaboliten Etoposid dephosphoryliert wird /BMS96a/Sen88/.

2.3.5 Klinische Anwendung

Etoposidphosphat ist (in Kombination mit anderen antineoplastisch wirksamen Präparaten) bei der Behandlung folgender bösartiger Neubildungen indiziert:

- Kleinzelliges Bronchialkarzinom
- Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphom
- Akute lymphatische Leukämie
- Chronische myeloische Leukämie
- Hodentumoren
- Chorionkarzinom
- Magenkarzinom

Kinder und Erwachsene erhalten Etoposidphosphat in Kombination mit anderen Zytostatika in Dosierungen von täglich 56,8 bis 113,6 mg Etoposidphosphat/m² Körperoberfläche (entsprechend 50 bis 100 mg Etoposid/m² Körperoberfläche) an den Tagen 1 bis 5 oder 136,2 bis 170,4mg Etoposidphosphat/m² Körperoberfläche (entsprechend 120 bis 150mg Etoposid/m² Körperoberfläche) an den Tagen 1, 3 und 5. Diese Therapie wird je nach Erkrankung und Therapieschema nach drei bis vier Wochen erneut bis zu insgesamt sechsmal durchgeführt.

Etoposidphosphat zeigt wie viele andere Zytostatika aufgrund seines Wirkmechanismus ein zum Teil sehr ausgeprägtes Toxizitätsspektrum. Die wichtigste und dosislimitierende Nebenwirkung ist die reversible Knochenmarksuppression, deren Schweregrad dosisabhängig ist⁴. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der hämatologischen Toxizität nach Behandlung mit Etoposidphosphat und Etoposid /BMS96b/.

Da die Myelosuppression in schweren Fällen bedrohliche Infektionen oder Blutungen zur Folge haben kann, ist sie der wichtigste dosislimitierende Faktor eines Therapiekurses mit Etoposidphosphat. Um das Auftreten einer Myelosuppression zu überwachen, sollte vor Therapiebeginn, während der Therapie und vor jedem Therapiezyklus das Blutbild (Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin) kontrolliert werden. Gleichzeitig sollten Leber- und Nierenwerte sowie die neurologischen Funktionen überprüft werden.

Zu den weiteren Nebenwirkungen zählen eine reversible Alopezie (Haarausfall) und gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen, Durchfall oder Mukositis (Entzündung der Schleimhäute). Auch Appetitlosigkeit, Obstipation (Verstopfung), abdominelle Schmerzen oder Geschmacksveränderungen können auftreten.

⁴ Wirksame Substanzen zum Schutz des Knochenmarks stehen zur Zeit leider noch nicht zur Verfügung. Lediglich eine Knochenmarkstransplantation kann eine wirksame Maßnahme sein.

3 Probengewinnung

3.1 Patienten

Die in dieser Studie untersuchten Patienten befanden sich in stationärer Behandlung in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg. Da aus vorherigen pharmakokinetischen Untersuchungen ein Einfluß von Cisplatin auf die Pharmakokinetik von Etoposid bekannt ist /Pfl93/, wurden nur Patienten berücksichtigt, deren Therapieprotokoll kein Cisplatin enthielt. Insgesamt wurden 30 Patienten aufgenommen, 6 weibliche und 24 männliche. Das Alter variierte zwischen 19 und 79 Jahren bei einem Median von 45,5 Jahren.

Die Indikationen für eine chemotherapeutische Behandlung waren: *Non-Hodgkin-Lymphom (13 Patienten)*, *Hodgkin-Lymphom (6 Patienten)*, *Kleinzelliges Bronchialkarzinom (5 Patienten)*, *Akute lymphatische Leukämie (3 Patienten)*, *Magenkarzinom (2 Patienten)* und *Chronische Myeloische Leukämie (1 Patient)*.

3.2 Probenentnahme

Die Applikation von Etoposidphosphat erfolgte an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen in der dem jeweiligen Therapieschema entsprechenden Dosierung. Einige Patienten wurden mit Etoposid therapiert, erhielten aber an dem Tag der Studie Etoposidphosphat. Zur Bestimmung der AUC wurde an jeweils einem Tag des Therapiezyklus eine 8-Stunden-Kinetik gesammelt. Die Kinetik konnte an einem beliebigen Tag innerhalb des mehrtägigen Zyklus bestimmt werden, da für die AUC von Etoposid und somit auch für Etoposidphosphat bei wiederholter Applikation keine kumulativen Effekte beobachtet wurden /Bri85/. An dem betreffenden Tag wurde nach Entnahme einer Blutprobe zur Leerwertbestimmung das Etoposidphosphat intravenös als Bolus über ca. zwei Minuten infundiert. Anschließend wurden 7 weitere Blutproben entnommen und zwar zu den Zeiten 2, 15, 30, 60, 120, 240 und 480 Minuten, jeweils auf das Ende der Infusion bezogen.

Tabelle 2: Daten zu den 30 behandelten Patienten

Pat.	Geschl.	Alter /a	Größe /cm	Gewicht /kg	KOF /m ²	Diagn.	Therapie-Schema	Etop. /mg·m ⁻²	Etop. /mg
1	m	70	178	75	1,9	SCLC	AIO-PE	125	230
2	m	19	186	62	1,83	NHL	CHOEP	100	180
3	m	25	184	90	2,1	NHL	CIVEP	100	210
4	m	64	177	64	1,8	SCLC	Topo+Eto	80	144
5	m	40	175	82	1,95	SCLC	Topo+Eto	80	160
6	w	67	149	50	1,42	ALL	CHOEP	70	100
7	m	33	176	66	1,8	MH	BEACOPP	100	180
8	m	46	185	115	2,0	NHL	CHOEP	100	200
9	m	35	178	69	1,83	MH	BEACOPP	200	360
10	m	33	193	92	2,22	MH	BEACOPP	180	400
11	w	60	160	57	1,6	NHL	CHOEP	100	160
12	m	79	177	82	2,0	SCLC	AIO-PE	150	300
13	m	73	178	90	2,0	SCLC	Topo+Eto	80	160
14	m	37	170	98	2,1	NHL	Dexa-BEAM	240	500
15	m	55	180	79	2,0	NHL	CHOEP	100	200
16	m	67	170	81	1,9	NHL	CHOEP	100	190
17	w	59	165	60	1,65	Ma-Ca*	ELF	75	120
18	m	60	169	60	1,68	Ma-Ca°	ELF	120	200
19	m	45	180	78	1,9	NHL	Dexa-BEAM	75	145
20	m	31	180	84	2,0	NHL	Dexa-BEAM	150	300
21	m	32	175	75	1,9	MH	Dexa-BEAM	100	190
22	m	35	182	87	2,1	ALL	AMV	100	210
23	w	34	172	51	1,6	ALL	DVMAE	250	400
24	m	36	186	66	1,9	MH	Dexa-BEAM	100	190
25	m	69	167	67	1,75	NHL	Topo+Eto	75	130
26	m	53	175	75	1,9	NHL	Dexa-BEAM	75	142
27	m	49	178	88	2,0	MH	Dexa-BEAM	75	150
28	w	61	165	92	2,0	CML	„mini-ICE“	150	300
29	w	42	160	61	1,65	NHL	CHOEP	100	165
30	m	41	176	94	2,0	NHL	CHOEP	100	200

Diagnosen:

ALL :	Akute lymphatische Leukämie
CML :	Chronische myeloische Leukämie
Ma-Ca*:	Siegelringkarzinom des Magens
Ma-Ca°:	Adenokarzinom des Magens
MH:	Morbus Hodgkin
NHL:	Non Hodgkin Lymphom
SCLC:	Kleinzelliger Lungenkrebs (Small cell lung cancer)

Therapie-Schemata:

AIO-PE:	Carboplatin, Etoposidphosphat
AMV:	Ara-C, Mitoxantron, VP16 (Etoposidphosphat)
BEACOPP:	Bleomycin, Etoposidphosphat, Adriamycin, Cyclophosphamid, Prednison, Procarbacin
CHOEP:	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Etoposidphosphat, Prednison
CIVEP:	Cyclophosphamid, Idarubicin, Etoposidphosphat
Dexa-BEAM:	Dexamethason, BCNU, Etoposidphosphat, Ara-C, Melphalan
DVMAE:	Dexamethason, Vindesin, MTX, Ara-C, Etoposidphosphat
ELF:	Etoposidphosphat, Folinsäure, 5-FU
„mini-ICE“:	Idarubicin, Cytarabin, Etoposidphosphat
Topo+Eto:	Topotecan, Etoposidphosphat

(Bezeichnungen in den Abkürzungen differieren teilweise aufgrund der bei Chemotherapie-Schemata üblichen Verwendung von US-amerikanischen Handelsnamen)

Pro Entnahme wurden ca. 9 ml Blut in ein mit EDTA präpariertes Röhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) asserviert, nachdem die ersten 5 ml des aspirierten Blutes bei jeder Entnahme verworfen wurden. Die Proben wurden nach Entnahme sofort in Eiswasser gekühlt und nach kurzer Zeit für 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma (also der nichtzelluläre, gelbliche Überstand) in einen verschraubbaren Plastikbehälter überführt und umgehend bis zur weiteren Verarbeitung bei einer Temperatur von -80°C eingefroren.

Eine Zusammenstellung der Patientendaten Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Körperoberfläche, Diagnose, Therapieschema und Etoposidphosphat-Dosierung findet sich in Tabelle 2.

4 Meßmethode

In Kapitel 4.1 wird die chemische Extraktion und Aufreinigung des Etoposids aus den Blutproben sowie die massenspektrometrische Messung (PDMS) gegen den internen Standard Teniposid beschrieben. Es sei hier nochmals erwähnt, daß in dieser Arbeit der onkologisch relevante aktive Metabolit von Etoposidphosphat, das Etoposid, im Blut bestimmt wurde. Zur Messung des Etoposidphosphates mithilfe der PDMS wurden vielversprechende Vorversuche in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn Diplom Chemiker M. Pütz durchgeführt. Mehr dazu in Kapitel 4.7.

4.1 PDMS-Technik

Die ^{252}Cf -PDMS (^{252}Cf -Californium-Plasma-Desorptions-Massen-Spektrometrie) basiert auf der Methode, die zu messende Substanz (insbesondere organische nichtflüchtige hochmolekulare Stoffe) innerhalb einer Hochvakuumapparatur mit schweren Ionen zu beschleunigen, so daß aus der Substanz Moleküle desorbiert werden. Handelt es sich dabei um Ionen, werden diese innerhalb eines von außen angelegten elektrischen Feldes beschleunigt und anschließend die Flugzeit auf einer bekannten Strecke bestimmt, aus der sich die Masse (korrekt: die Masse pro Ladung m/z) des desorbierten Moleküls ergibt. Ein Schema des Meßverfahrens ist in Abbildung 2 dargestellt.

4.1.1 Plasmadesorption

^{252}Cf ist ein relativ langlebiges Isotop (Halbwertszeit 2,65 a) des Transuranelementes Californium. Es zerfällt außer durch Alphazerfall (Energie 6,1 MeV) zu etwa 3 % auch über spontane Kernspaltung. Die dabei frei werdenden antiparallel emittierten Fragmente eines sich spaltenden Atomkernes haben eine asymmetrische Massenverteilung mit zwei Maxima bei 105 und 141 u mit entsprechenden wahrscheinlichsten kinetischen Energien von 104 bzw. 79 MeV /Sch65/. Beim Durchdringen eines Targets (hier die ca. 5 mm oberhalb der Cf-Quelle auf einer Folie aufgebraute Probensubstanz) geben die Spaltfragmente vor allem durch die Wechselwirkung mit den Targetelektronen etwa

1 keV Energie pro Å durchdrungener Materie ab. Dieser hohe Energieverlust versetzt über Sekundärelektronenemission ein kleines Volumen für sehr kurze Zeit in den Zustand eines Plasmas. Anschließend werden durch Elektron-Ion-Stöße ein Teil der Anregungsenergie auf Ionen übertragen. Der verbleibende Anteil geht in eine Phononenschwingung des Festkörpers über. Die Desorption von Molekülonen findet kurz vor Einstellung des thermischen Gleichgewichtes an der Grenzfläche der Probensubstanz zum Vakuum statt und wird durch die Relaxation der deponierten Energie ausgelöst.

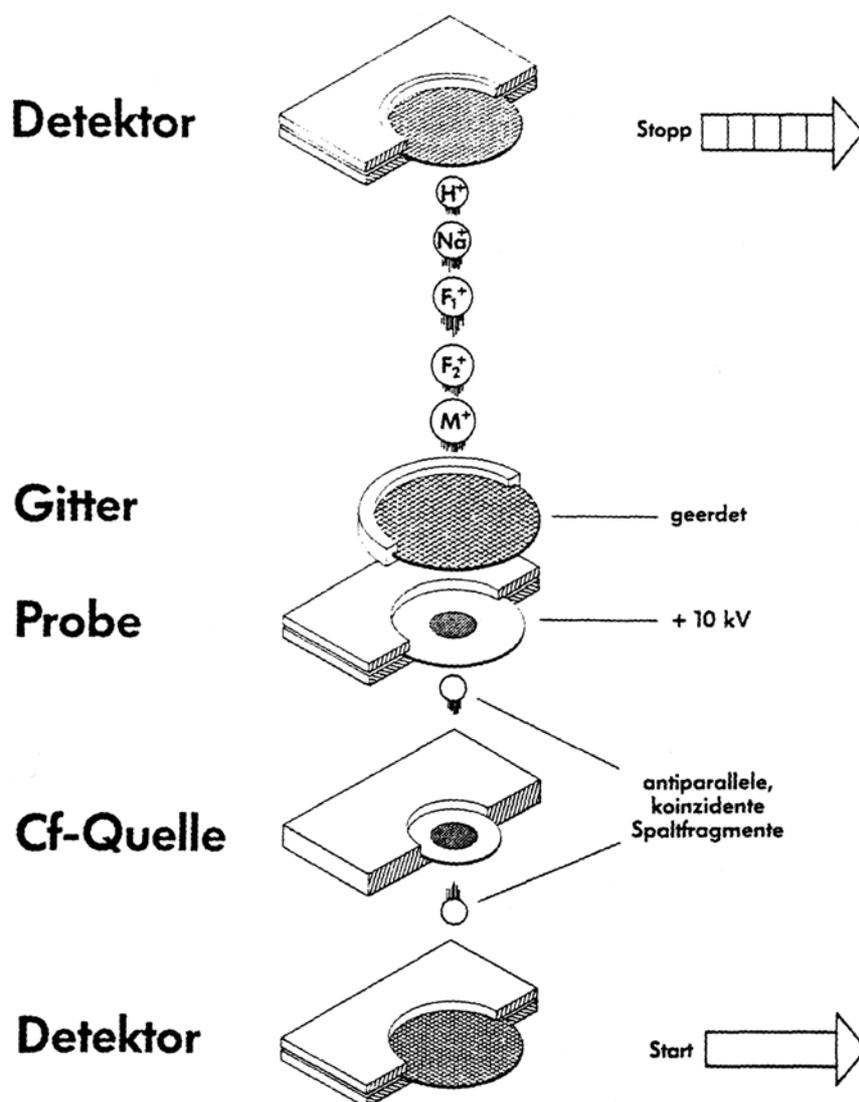


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des ^{252}Cf -PDMS-Meßverfahrens

Zu einem geringen Teil (< 0,1 %) befinden sich die so desorbierten Moleküle im ionisierten Zustand und sind dann (und nur dann) einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse zugänglich. Die Gesamtmenge der bei einer Messung aus der Probenoberfläche desorbierten Moleküle ist so gering (ca. 10^{10} Teilchen), daß die Ionisierungsmethode als zerstörungsfrei betrachtet werden kann. Das heißt, die Probe steht einer anschließenden Untersuchung prinzipiell weiter zur Verfügung.

Trotz der hohen primären Anregung können mit dieser Methode auch fragile organische Moleküle ($m > 1000$ u) noch mit hoher Ausbeute in stabiler Form desorbiert werden. Die zu messende Substanz Etoposid und der interne Standard Teniposid sind mit ihren Massen von 588,6 u bzw. 656,7 u somit für die ^{252}Cf -PDMS gut geeignet.

4.1.2 Massenspektrometrie

Die Probensubstanz wird auf eine dünne metallisch bedampfte (wegen des elektrischen Potentials) Kunststoffolie aufgebracht (näheres dazu in Kapitel 4.5), die auf einem Probenträgerring faltenfrei aufgespannt wird. Der Probenträger läßt sich über ein Schleusensystem in die Apparatur einbringen. Etwa fünf Millimeter oberhalb der Probe befindet sich ein geerdetes Gitter. Die Probe wird auf eine positive Spannung von 8 kV gelegt. Diese Spannung beschleunigt Kationen in Richtung auf das geerdete Gitter. Die Ionen passieren das Gitter und durchlaufen anschließend eine feldfreie Strecke von ca. 48 cm, bis sie auf ein im oberen Teil der Apparatur angebrachtes „Multi Channel Plate“ Paar („Stoppdetektor“) stoßen. Der dadurch ausgelöste elektrische Impuls dient als Stoppsignal.

Da Ionen innerhalb des elektrischen Feldes eine Beschleunigung entsprechend der Energie $E = U \cdot q$ (U : angelegte Spannung, q : Ladung der Ionen) erfahren und die potentielle Energie nach Beschleunigung $E = mv^2/2$ beträgt, läßt sich über die Flugzeit t das Verhältnis zwischen Masse m und Ladung q der desorbierten Ionen als $m/q \sim t^2$ bestimmen (unter der Voraussetzung einer Kalibrierung mit einer bekannten Substanz, z.B. Natriumionen).

Der Nullpunkt der Zeitmessung wird durch ein unterhalb der ^{252}Cf -Quelle angebrachtes „Multi Channel Plate“ Paar („Startdetektor“) ermittelt. Dabei macht man sich zunutze, daß die Quelle bei jeder spontanen Spaltung zwei antiparallel ausgerichtete Spaltfragmente emittiert. Jedem Ereignis, das eine Desorption in der Probensubstanz ausgelöst hat, kann ein elektrischer Impuls des jeweils antiparallel emittierten Spaltfragmentes aus dem Startdetektor zugeordnet werden, der als Start der Zeitmessung dient. Die Signale der beiden Detektorpaare werden verstärkt und über jeweils einen Diskriminator einem „time to digital converter“ zugeführt. Dieser mißt die Zeitunterschiede zwischen Start- und Stoppsignalen mit einer Genauigkeit von bis zu einer Nanosekunde und gibt die digitalisierten Daten an einen PC zur Auswertung weiter.

Die Aktivität der ^{252}Cf -Quelle sollte so dimensioniert sein, daß man idealerweise etwa 1000 Spaltfragmente pro Sekunde am Startdetektor registriert. Da die verwendete Quelle zum Zeitpunkt der Probenmessungen schon einige Jahre eingebaut war und eine neue Quelle nur mit erheblichem finanziellen und organisatorischen Aufwand zu beschaffen ist, sind die Messungen mit etwa 200 Spaltfragmenten pro Sekunde durchgeführt worden. Entsprechend länger sind die Akquisitionszeiten, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen des Etoposids (gegen Ende einer Patientenkinetik).

4.1.3 Interner Standard

Um aus dem rein qualitativen massenspektrometrischen Nachweis einer Substanz, bei der die Zählhäufigkeit und Masse bestimmt wird, zu einer quantitativen Nachweismethode zu gelangen, bedarf es eines internen Standards. Dieser wird der Patienten-Plasmaprobe in einer definierten Menge vor allen Aufbereitungsschritten zugesetzt. Ermittelt man das Verhältnis der Peakhöhe vom Analyten und internen Standard im Massenspektrum bzw. das Verhältnis der Peakflächen, läßt sich über die bekannte Menge an zugegebenen internen Standard die Menge des Analyten bestimmen.

Der interne Standard sollte gleiche chemische Eigenschaften wie der Analyt, aber eine im Massenspektrum deutlich unterscheidbare Masse besitzen. Als

ideal für quantitative Messungen von Etoposid hat sich die homologe Substanz Teniposid erwiesen. Diese unterscheidet sich vom Etoposid durch einen Substituenten am Zuckerring (siehe Kapitel 2.3.2), ist 68 u schwerer und verhält sich chemisch weitgehend identisch wie Etoposid, insbesondere was die im ersten Schritt der Probenaufbereitung durchgeführte Chloroformextraktion betrifft /Jun83b/.

4.1.4 Aufbereitung der Proben zur PDMS

Voraussetzung für eine erfolgreiche Messung mittels PDMS ist neben der Reinheit des Analyten und der möglichst guten Ionisationsausbeute vor allem die Probenpräparation. Schon kleine Inhomogenitäten beim Aufbringen der Substanz auf die Folie oder Verunreinigungen (z.B. aus den Plasmaproben der Patienten) können das gemessene Verhältnis zwischen Analyten und internen Standard empfindlich stören /Jun83a/.

Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, die zu analysierende Substanz nebst internem Standard als Target zu präparieren. Die einfachste und schnellste ist das direkte Eintrocknen einer Lösung des Analyten in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel. Die entstehenden Schichten sind allerdings zum Teil sehr inhomogen, unter anderem wegen des unterschiedlichen Kristallisationsverhalten von Analyt und internen Standard /Jun83a/. Andere Verfahren sind die Elektrospray-Methode /McN79/, das Vakuumspray-Verfahren /Jun83c/, die Spin-Coating-Technik /Säv87b/Säv87c/ oder die Präparation von Langmuir-Blodgett-Filmen /Säv87a/.

Als einfachste Methode hat sich im vorliegenden Fall ein modifiziertes Eintrocknen der in einem Lösungsmittelgemisch aufgenommenen Analyten bewährt. Die zu analysierenden Substanzen wurden in eine Matrix aus Sucrose-Octaacetat und Urotropin eingebracht /Köh92a/Jun83a/, wodurch störende Einflüsse von Verunreinigungen minimiert und eine gute Homogenität der eingetrockneten Schicht erreicht werden konnte. Ein vorher eingestelltes Verhältnis zwischen Etoposid und Teniposid ließ sich so gut reproduzieren /Jun89/.

Sucrose-Octaacetat wurde in einer Menge von 100 µg der Matrix hinzugefügt, besitzt eine Masse von $m = 678$ u und neigt zu einer schnellen Fragmentierung. Im Massenspektrum wurde es nur durch Anlagerung von anderen Ionen, z.B. Na^+ , nachgewiesen. Somit wurden kationische Verunreinigungen in der Probe abgefangen.

Urotropin ($m = 141$ u) ist ein kleines und relativ flüchtiges Molekül und wurde in einer Menge von 150 µg der Matrix hinzugefügt. Aufgrund seiner leichten Fragmentierbarkeit produzierte es nur eine geringe Molekülionenausbeute. Urotropin weist eine hohe Affinität zu den Stoffen Etoposid und Teniposid auf. Im Massenspektrum äußerte sich dies durch den Nachweis der Clusterionen $[\text{M} + \text{Urotropin}]^+$, (730 u für Etoposid und 797 u für Teniposid) sowie $[\text{M} + 2 \text{Urotropin}]^+$ (871 u für Etoposid und 938 u für Teniposid) (siehe auch Abbildung 3 auf Seite 37).

Die Gesamtmenge der Matrixsubstanzen betrug also 250 µg, während die Absolutmenge an Etoposid und Teniposid bei maximal 50 µg pro Substanz lag. Dieses Verhältnis garantierte eine gute Durchmischung der beiden Analyten und unterdrückte störende Einflüsse durch Verunreinigungen.

4.2 Probengewinnung und Zusatz des internen Standards

Wie schon in Kapitel 3.2 erwähnt, wurde den Patienten zu den Zeitpunkten 2 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Ende der Kurzinfusion ca. 9 ml Blut entnommen.

In Pharmakokinetikstudien, bei denen das nicht phosphorylierte Etoposid verabreicht wurde, wurde in der Regel Natriumcitrat als Antikoagulanzen im Blutabnahme-Röhrchen eingesetzt /Hol96/. Beim Einsatz von Etoposidphosphat hingegen muß EDTA verwendet werden, damit eine weitere Dephosphorylierung von Etoposidphosphat in die aktive Substanz Etoposid durch die alkalische Phosphatase im Röhrchen vermieden wird. Nur so lassen sich Etoposid und Etoposidphosphat unabhängig voneinander bestimmen. EDTA ist ein Inhibitor der alkalischen Phosphatase und wirkt über die Komple-

xierung der zweiwertigen Ionen Mg^{2+} und Zn^{2+} /Ber83/Bre84/. Diese Ionen sind Aktivatoren der alkalischen Phosphatase und für deren Funktion unerlässlich /Ber83/Bre84/. Neben Magnesium und Zink werden auch Calcium-Ionen (Ca^{2+}) komplexiert, wodurch die Gerinnung des Blutes im Röhrchen verhindert wird (analog zu Natriumcitrat-Röhrchen). Die verwendeten Röhrchen enthielten bei einem maximal asservierbarem Volumen von 9 ml Blut eine Menge von 14,4 mg Kalium-EDTA.

Der Einfluß der sauren Phosphatase auf die Dephosphorilierung des Etoposidphosphates läßt sich vernachlässigen, da deren pH-Optimum zwischen 5 und 6 ausreichend entfernt von dem des Plasmas ($pH \approx 7,4$) liegt /Ber84/Tie86/.

Die Proben wurden nach Entnahme in Eiswasser gekühlt und für 10 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert. Das Plasma wurde in einen verschraubbaren Plastikbehälter überführt, mit der Probennummer bezeichnet und umgehend bei einer Temperatur von $-80^{\circ}C$ eingefroren.

Die Messungen von Patientenproben wurden innerhalb eines Zeitraumes von vier Monaten durchgeführt, um eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Es wurden jeweils Proben von drei Patienten parallel bis zur PDMS-Messung bearbeitet. Diese Vorgehensweise erwies sich als günstig für die erforderlichen Arbeitsschritte, vor allem für die Dünnschichtchromatographie.

Die zu messenden Proben wurden aufgetaut und bei Zimmertemperatur mit einer Eppendorf-Pipette genau 1 ml des Plasmas entnommen und in ein Reagenzglas überführt. Sodann wurden 20 μg des internen Standards Teniposid hinzugefügt. Dazu wurde in einen 50 ml Meßkolben genau 50 mg Teniposid-Reinsubstanz mit Methanol p.a. gelöst und pro Probe 20 μl von dieser Lösung mit einer Eppendorf-Vollpipette entnommen und in das Reagenzglas der Probe überführt und durchmischt.

4.3 Extraktion der Plasmaproben

Die Extraktion des Plasmas dient einer ersten Vortrennung und Anreicherung der Substanzen Etoposid und Teniposid. Wegen der ausgeprägten Lipophilie

beider Substanzen bietet sich eine Extraktion mit Chloroform an, die in der Lage ist, beide Substanzen vollständig aus der Plasmaprobe herauszulösen. Dabei wird auch der an Plasmaproteine gebundene Anteil des Etoposids herausgelöst /Hol81/. Holthuis et al. fanden eine mittlere Ausbeute von $97 \pm 1 \%$ bei Etoposid. Dieser Wert konnte später bestätigt werden /Del83/. Da es sich bei Teniposid um eine homologe Substanz handelt, wird diese genau wie Etoposid fast vollständig aus dem Plasma abgetrennt. Das Etoposidphosphat sowie der Hauptmetabolit des Etoposids, die Hydroxysäure, verbleiben als polare Substanzen in der wässrigen Phase.

Die Proben wurden nach Zugabe des internen Standards mit jeweils 50 μl einer 10 prozentigen Essigsäure p.a. auf einen pH-Wert von ca. 4,5 angesäuert, um die Proteine zu fällen. Sodann wurden 2 ml Chloroform p.a. hinzugefügt. Das Gemisch wurde bis zur Bildung einer homogenen Emulsion geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei 5000 Upm für 10 min zentrifugiert und für eine Stunde bei -80°C eingefroren, aufgetaut und nochmals zentrifugiert. Dies bewirkte eine scharfe Trennung der wässrigen Phase (oben) von der organischen Phase (unten) mit einer dazwischenliegenden Bande aus präzipitiertem Peptid.

Die organische Phase wurde mittels einer Pasteurpipette und einer dazugehörigen Saugvorrichtung in ein Reagenzglas überführt. Hierbei wurde streng darauf geachtet, daß nur aus der organischen Phase Flüssigkeit entnommen wurde. Im Zweifelsfall wurde ein Rest der organischen Phase im Probengefäß belassen. Aufgrund der vorherigen Zugabe des internen Standards ist dies zulässig. Die organische Phase wurde sodann im Vakuumkonzentrator bei Raumtemperatur eingetrocknet. Aufgrund des niedrigen Siedepunktes mußte langsam evakuiert werden, da das Chloroform andernfalls siedete und die Flüssigkeit entgegen der Zentrifugalkräfte in den Vakuumkonzentrator und somit auch in andere Probenbehälter gelang.

4.4 DC-Reinigung

Eigentlich erfordert die quantitative PDMS aufgrund der hohen Spezifität der massenspektrometrischen Detektion keine weitere spezielle Auftrennung der zu untersuchenden Substanzen von etwaigen Verunreinigungen, sofern sich die Massen der anderen Stoffe ausreichend von dem Analyten unterscheiden. Doch selbst dann kann nur ein gewisser Grad an Verunreinigungen toleriert werden. Durch die Chloroformextraktion gelangen mehr oder weniger alle lipophilen Stoffe aus dem Patientenplasma in die organische Phase. Dazu zählen u.a. Fette, indirektes Bilirubin, manche Medikamente und lipophile Stoffe, die im Plasma von Proteinen transportiert werden (z.B. Lipoproteine). Diese Verunreinigungen machen eine direkte Messung der eingetrockneten organischen Phase mit der PDMS-Methode unmöglich. Bei der intravenösen Applikation von unphosphoryliertem Etoposid fallen außerdem noch Verunreinigungen in Form der Lösungsvermittler Polyethylenglykol 300 und Polysorbat 80 an, die bei Gabe von Etoposidphosphat entfallen. Auch ohne diese Verunreinigungen konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis ohne weitere Behandlung der Proben erreicht werden. Da keine spezifische Trennung, sondern nur eine Reinigung der Plasmaextrakte notwendig ist, stellt die technisch einfachste und zugleich kostengünstigste Methode die Dünnschichtchromatographie dar.

Für die stationäre Phase wurden Alufolien mit reversed-phase Beschichtung gewählt (Merck RP-18 F254 s). Hierbei sind die polaren Silanol-Gruppen auf der Folie mit unpolaren C18-Gruppen abgesättigt worden, so daß die stationäre Phase unpolar ist. Außerdem fluoresziert dieses Material bei UV-Beleuchtung mit 254 nm. Dies ist für die spätere Lokalisation der Etoposid bzw. Teniposidbanden von Bedeutung. Die polare mobile Phase besteht aus einem Gemisch aus 8 Teilen Methanol, 2 Teilen Acetonitril und einem Teil Wasser (aqua bidest).

Die aus der Plasmaextraktion (siehe Kapitel 4.3) gewonnene Probe wurde in 50 µl Chloroform gelöst und bandenförmig ca. 2 cm oberhalb des unteren

Randes der beschichteten Alufolie aufgetragen. Auf jeder Folie wurden insgesamt 5 Proben plaziert. Zur Kontrolle wurde außerdem eine Etoposid/Teniposid Mischung im Verhältnis 1:1 aufgetragen, um die Banden der 5 Proben nach dem Lauf des Fließmittels eindeutig identifizieren zu können. Nach Eintrocknung wurde zweimalig mit Methanol fokussiert, d.h. die DC-Folie wurde solange mit dem unteren Rand in ein Methanolbad getaucht, bis die Flüssigkeitsfront den oberen Rand der aufgetragenen Banden erreicht hatte. Da sich Etoposid und Teniposid gut in Methanol lösen, bewirkt dies eine scharf lokalisierte „Startlinie“ dieser zwei Substanzen vor dem eigentlichen Lauf. Da es bei hohen Konzentrationen von Etoposid zu Schweifbildungen kommen kann (das Elutionsmittel vermag nur eine begrenzte Substanzmenge zu „transportieren“), wurde von den ersten beiden Proben einer Kinetik lediglich die Hälfte des Probenvolumens aufgetragen.

Die Folien wurden in einer mit Fließmittelgemisch gesättigten Kammer für ca. eine Stunde entwickelt. Für die nahe beieinander liegenden Etoposid/Teniposid-Banden wurden für Etoposid ein R_f -Wert von 0,85 und für Teniposid ein R_f -Wert von 0,89 ermittelt. Die Banden lassen sich jederzeit eindeutig im UV-Licht über die Fluoreszenzlöschung detektieren. Mitunter waren auch andere fluoreszenzlöschende Banden zu erkennen, die wahrscheinlich durch anderweitige Medikamentengaben vor der Infusion zu erklären sind (z.B. Antiemetika, Arzneimittel gegen Erbrechen).

Die Etoposid- und Teniposidbande einer Probe wurde jeweils unter UV-Licht (zwecks besserer Orientierung) mit einer Schere ausgeschnitten. Dies ist ein großer Vorteil der verwendeten DC-Alufolien gegenüber DC-Glasplatten, bei denen man die Beschichtung mittels Skalpell o.ä. aufwendig abkratzen muß /Hol96/. Die ausgeschnittenen Folienstücke wurden in gläserne Petrischalen gelegt und konnten nun bequem mit Methanol eluiert werden. Dazu wurden jeweils 2 ml Methanol p.a. in jede Petrischale überführt, die Schalen abgedeckt und in einem Laborschüttelautomat für fünf Minuten sanft hin- und hergeschwenkt. Nach dieser Behandlung konnte auf den ausgeschnittenen Folienstücken keine Fluoreszenzlöschung mehr beobachtet werden, woraus

sich schließen läßt, daß sowohl Etoposid als auch Teniposid komplett aus der DC-Beschichtung herausgelöst wurden.

Das Eluat wurde im Vakuumkonzentrator eingetrocknet. Bei diesem Vorgang war unbedingt zu beachten, daß das eluierte Methanol nicht mit Plastikgefäßen oder –stopfen in Berührung kam. Für den Transport der mit dem eluierten Methanol gefüllten Reagenzgläser zum Vakkumkonzentrator wurden nämlich zunächst handelsübliche Stopfen aus low-density Polyethylen benutzt, um ein Überschwappen der Flüssigkeit zu verhindern. Bei einigen Proben passierte es, daß während des Transportes das Methanol mit dem Polyethylen in Berührung kam. Da in unserer Arbeitsgruppe nicht bekannt war, daß low-density PE nur bedingt methanolbeständig ist und selbst ein kurzer Kontakt zu einem zumindest für die PDMS-Methode beträchtlichen Anteil an Verunreinigungen führt, ergab sich das Phänomen, daß bei einigen Proben überhaupt keine Etoposid/Teniposid-Peaks mehr nachgewiesen werden konnten (aufgrund von PE-Verunreinigungen), bei anderen wiederum ein gutes Meßergebnis erzielt wurde. Erst durch zeitaufwendiges Suchen und Herumprobieren gelang es schließlich dieses Phänomen aufzuklären.

Beim Literaturstudium wird deutlich, daß low-density PE nur eine bedingte Beständigkeit gegenüber Alkoholen besitzt /Obe80/. Da PE prinzipiell ohne Weichmacher hergestellt wird /Bar99/, mußte es sich bei den Verunreinigungen um andere Stoffe handeln. Offenbar bewirkte Methanol eine Spaltung der Polymerketten, wodurch niedermolekulare Kettenbestandteile herausgelöst wurden. Diese beeinträchtigten die PDMS-Messung derart, daß keine Moleküle mehr desorbiert wurden und folglich kein Etoposid/Teniposid-Peak mehr beobachtet werden konnte. Stattdessen tauchten andere Massenpeaks auf, die von der Interaktion der Analyten mit den PE-Bestandteilen herrührten oder die PE-Kettenbruchstücke darstellten.

Anders verhält es sich mit high-density Polyethylen oder Polypropylen. Diese Materialien, aus denen zum Beispiel die verwendeten Spitzen für die „Eppendorf“-Pipetten hergestellt sind, sind beständig gegenüber Methanol

/Obe80/. Das erklärt, wieso der Umgang der mit Methanol eluierten Proben mit „Eppendorf“-Pipettenspitzen keinen störenden Einfluß auf die PDMS-Messung hatte.

4.5 Matrixpräparation

Die Entwicklung und der theoretische Hintergrund der matrixunterstützten Präparation der Proben für die PDMS wurde in Kapitel 4.1.4 bereits besprochen. Wie dort schon erwähnt, erfüllte eine Kombination aus Sucrose-Octaacetat und Urotropin, die im Überschuß zur Probe gegeben werden, die Anforderungen für eine optimale quantitative Bestimmung von Etoposid mit dem internen Standard Teniposid.

Die durch Vakuumkonzentration eingetrocknete Probe wurde in 50 µl einer isovolämischen Lösung aus Diethylether p.a. und Chloroform p.a. gelöst und tropfenweise auf der Targetfolie eingetrocknet. Warmluft aus einem Gebläse unterstützte den Eintrocknungsvorgang. Nach einer Versuchsphase wurde festgestellt, daß das beste Verfahren war, die Probe nur in kleinsten Tropfen einzutrocknen, da sonst die Probensubstanz in erster Linie an den Außenrändern der Targetfolie auskristallisierte. Die Ränder der Folie hatten nämlich Kontakt zum metallenen Folienträger, der durch seine deutlich höhere Wärmekapazität ein sehr schnelles Eintrocknen bewirkte. Die Folienränder wurden aber aufgrund der geometrischen Anordnung von Californium-Quelle und Folienträger in der Meßapparatur nicht von den Spaltfragmenten erreicht, so daß dort auch keine Desorption stattfinden konnte und die dort lokalisierten Analyten für die Messung folglich „verlorengingen“. Um dies zu verhindern, hat sich ein langsames Auftropfen mit einer 20 µl Pipette am besten bewährt.

Anschließend wurden 100 µg Sucrose-Octaacetat und 50 µg Urotropin in 30 µl einer isovolämischen Lösung aus Diethylether und Chloroform auf das Target getropft und eingetrocknet. Danach wurden auf gleiche Weise 100 µg Urotropin in 30 µl Chloroform auf das Target aufgebracht. Bei den beiden letzten Schritten erwies es sich als günstig, die Flüssigkeiten mit einer 100 µl Eppendorf-Pipette zügig auf die Targetfolie aufzutropfen, um eine gute

Durchmischung der Matrixsubstanzen mit den Analyten zu erreichen. Der weiter oben beschriebene Effekt der beschleunigten Eintrocknung der Flüssigkeit am Rand der Folie nahe des Trägerrings war hierbei nicht so gravierend, was am ehesten auf ein rascheres Kristallisationsverhalten der beiden Matrixsubstanzen zurückzuführen ist. Die wiederholten Lösungs- und Eintrocknungsvorgänge stellten insgesamt eine gute Durchmischung aller Substanzen sicher.

4.6 Quantitative PDMS

Die massenspektrometrischen Messungen wurden an der PDMS-Apparatur der Arbeitsgruppe Prof. Jungclas am Klinikum der Philipps-Universität Marburg im Forschungsbereich 3 durchgeführt.

Für die Beschleunigungsspannung wurde ein Wert von +8 kV (Probenträger gegenüber geerdetem Gitter) gewählt. Die Spannung am „Multi Channel Plate“ Paar, das die Startdetektion übernahm, betrug 2,7 kV. Am Stoppdetektor wurde eine Spannung von 3,3 kV angelegt. Mit diesen Einstellungen wurden etwa 200 Startereignisse und je nach Probe 1200-2000 Stoppereignisse pro Sekunde detektiert.

Für die Aufnahme und Auswertung der Spektren wurde ein von Herrn Diplom Physiker H.-W. Fritsch entwickeltes Programm („Winmate“) auf einem PC eingesetzt. Dieses Programm gestattet es, Flugzeitspektren aufzunehmen und diese über eine Kalibrierung in Massenspektren (genauer: Masse pro Ladung m/z) umzurechnen. Weiterhin lassen sich die Flächenintegrale im Bereich der Peaks berechnen, im nachfolgenden auch „Peakflächen“ genannt. Die linke und rechte Kanallage, die zur Begrenzung der Peakfläche herangezogen wird, läßt sich frei wählen. Die Peakfläche wird berechnet, indem die Inhalte der Kanäle, die innerhalb der gewählten Grenzen liegen, addiert werden und anschließend ein definierter Untergrund abgezogen wird.

Die Messungen wurden jeweils gestoppt, wenn sowohl der Etoposid- als auch der Teniposidpeak eine absolute Höhe von mindestens 800 Ereignissen

erreicht hatten. Das entsprach einer Peakfläche von etwa 10.000 Ereignissen. Bei n Ereignissen beträgt die statistische Unsicherheit $n^{1/2}$. Bei 10.000 Ereignissen beträgt die relative statistische Unsicherheit somit $n^{1/2}/n = 100/10.000 = 1\%$. Je nach Probe betrug die Meßzeit zwischen 30 min und mehreren Stunden. Insbesondere die beiden letzten Proben einer Kinetik mit geringer Etoposidmenge wurden meist über Nacht gemessen, um eine ausreichend hohe Zahl von Ereignissen zu akquirieren. In Abbildung 3 ist ein Massenspektrum als Beispiel dargestellt. Die den detektierten Massen zugeordneten Moleküle sind dort aufgeführt.

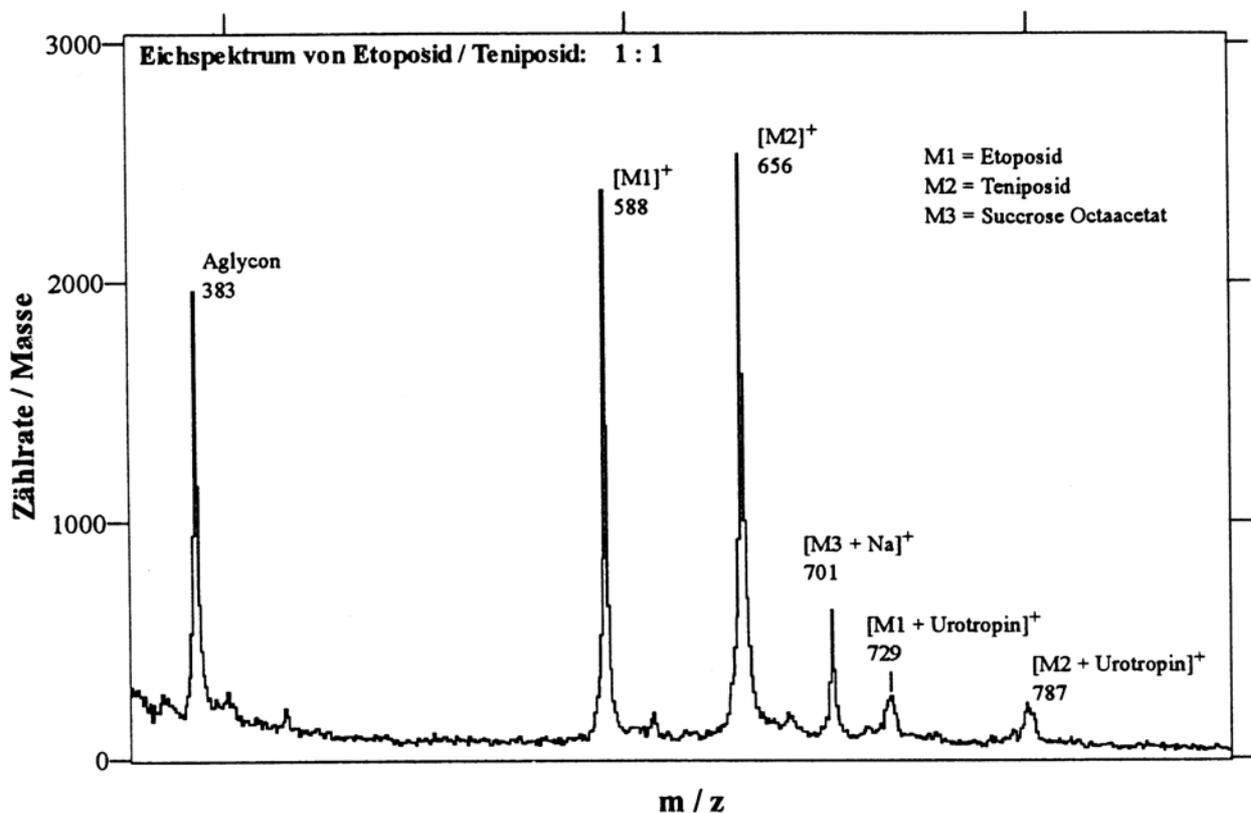


Abbildung 3: Beispielspektrum mit Etoposid und Teniposid

Für die Festsetzung der Grenzen bei der Peakflächenbestimmung gibt es unterschiedliche Verfahren. Zu beachten ist grundsätzlich, daß das gewählte Verfahren reproduzierbar sein muß und innerhalb der Meßreihe beibehalten wird. Folgendes Verfahren hat sich für die Berechnung der Peakflächen am besten bewährt: Zunächst wurde das Maximum des jeweiligen Peaks aufgesucht und dessen Kanalnummer bestimmt. Die rechte und linke Grenze der

Peakfläche wurde jeweils 20 Kanalnummern von der Peakspitze entfernt gesetzt. Für jeden Kanal innerhalb der Peakfläche wurde eine Untergrundkorrektur durch Subtraktion eines festen Wertes durchgeführt. Dieser ergab sich aus dem Inhalt des Kanals an der linken Grenze der Peakfläche. Dieses Verfahren war sehr gut reproduzierbar und wurde bei allen Proben angewandt. Eine Kalibrierkurve wurde vor Beginn der Patientenmessungen angefertigt. Definierte Mengen an Etoposid (1, 2, 5, 20, 50 und 100 µg) wurde dem Testplasma einer gesunden Person zugegeben und danach wie mit den Proben der Patienten verfahren. Jede dieser Messungen wurde dreimal durchgeführt und dann der Mittelwert gebildet. In Abbildung 4 wurde das gemessene Verhältnis von Etoposid- und Teniposidpeakflächen als Funktion des nominellen (molaren) Verhältnisses von Etoposid und Teniposid aufgetragen. Eine ideale Kalibriergerade ($y = ax + b$) hätte eine Steigung a von 1, einen y-Achsenabschnitt b von 0 und einen Regressionskoeffizienten R von 1. Die Ausgleichsgerade kommt an diese Vorgaben sehr gut heran ($a = 1,03$; $b = 0,03$; $R = 0,9998$).

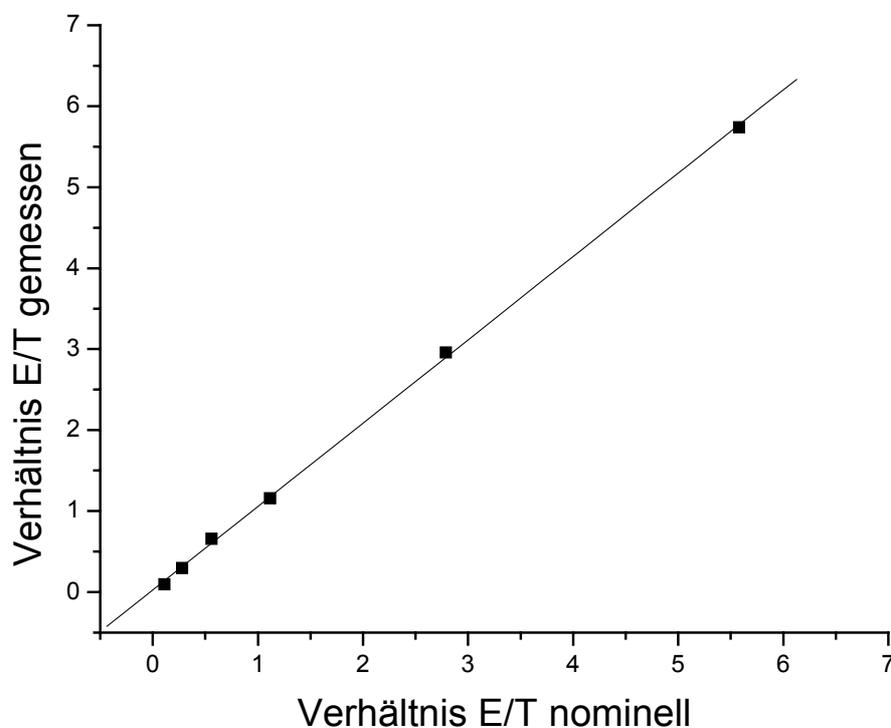


Abbildung 4: Kalibriergerade zwischen gemessenen und nominellen Verhältnissen von Etoposid und Teniposid

4.7 Messung von Etoposidphosphat

Prinzipiell läßt sich mit der PDMS-Methode auch Etoposidphosphat messen. Die Molekularmassen differieren im Vergleich zum Etoposid um die Masse des Phosphat-Restes. Da Etoposidphosphat aber völlig andere chemische Eigenschaften als Etoposid besitzt (z.B. Hydrophilie), müßte für eine direkte massenspektrometrische Detektion von Etoposidphosphat ein komplett neues Extraktions- und Aufreinigungsverfahren entwickelt werden. Außerdem müßte eine geeignete Substanz gefunden werden, die als interner Standard verwendet werden kann. Auch die in Kapitel 4.5 beschriebene Matrixpräparation könnte mit den genannten Matrixstoffen nicht ohne weiteres auf Etoposidphosphat übertragen werden.

Eine mit den bewährten Mitteln leicht durchzuführende Meßmethode wurde mit Herrn Diplom Chemiker M. Pütz entwickelt. Zunächst wird das aufgetaute und mit internem Standard versetzte Patientenplasma wie gewohnt einer Chloroformextraktion unterzogen. Danach sind sowohl Etoposid als auch der interne Standard Teniposid in der organischen Phase gelöst. Das Etoposidphosphat aber befindet sich aufgrund der hydrophilen Eigenschaften weiterhin in der wässrigen Phase. Die organische Phase wird, wie in Kapitel 4.4 bzw. 4.5 beschrieben, weiter aufbereitet. In die wässrige Phase wird nun ein im Verhältnis zum EDTA-Inhalt Überschuß Magnesium und Zink gegeben, um die im Plasma vorhandene alkalische Phosphatase wieder zu aktivieren. Zusätzlich wird künstlich hergestellte alkalische Phosphatase hinzugegeben. Um eine vollständige Dephosphorylierung des Etoposidphosphates zu erreichen, wird die Lösung für ca. eine halbe Stunde bei 37°C im Wasserbad temperiert. Im Rahmen von Vorversuchen wurde festgestellt, daß das vorhandene Etoposidphosphat danach vollständig metabolisiert ist. Nach diesem Vorgang kann wie gewohnt der interne Standard Teniposid hinzugegeben werden und die Messung nach dem bekannten Schema fortgesetzt werden. Die Vorversuche hierzu wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn Diplom Chemiker M. Pütz durchgeführt. Das Verfahren müßte vor einer routinemäßigen Anwendung noch kalibriert werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

5 Meßergebnisse und Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

5.1 Gemessene Plasmakonzentrationen der Patienten

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die gemessenen Etoposid-Plasmakonzentrationen der 30 Patienten. Auffallend ist, daß bei den Patienten Nr. 3, 4, 7 und 12 15 min nach der Infusion mehr Etoposid im Blut zu messen war als nach 2 min. Dies wird darauf zurückgeführt, daß das Etoposidphosphat bei der ersten Blutabnahme bei diesen Patienten noch nicht vollständig dephosphoryliert war, so daß trotz der Verteilungs- und Ausscheidungsvorgänge die Etoposid-Konzentration bei der zweiten Blutabnahme größer war als bei der ersten. Grundsätzlich muß man sich klar machen, daß ein Prodrug infundiert wird. Dieses wird zwar nach kurzer, aber doch endlicher Zeit in die Wirkform metabolisiert /Bro95/Kre96/. Die Plasmahalbwertszeit von Etoposidphosphat wird mit $T_{1/2} \leq 5$ min angegeben /Kre96/Bud94/Tho95/Ses95/. Gemessen wurde ausschließlich die Wirkform, also das Etoposid. Zu erwarten ist also eine zunächst ansteigende Etoposid-Wirkstoffspiegelkurve aufgrund der Dephosphorylierung des Etoposidphosphates. Mit der Zeit wird immer weniger Etoposid aus dem „Etoposidphosphat-Depot nachgeliefert“, bis Verteilungs- und Ausscheidungseffekte überwiegen, die einen Abfall der Kurve bewirken. Dieser setzt sich fort, bis alles Etoposid ausgeschieden bzw. verstoffwechselt ist.

Tabelle 3: Etoposid - Plasmakonzentrationswerte der Patienten in µg/ml zu verschiedenen Zeiten post iniectionem, **grau unterlegt:** Maximalwerte

Patient	2 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h
1	32,2	28,3	22,2	19,4	13,9	7,6	2,3
2	33,4	24,0	19,2	15,4	13,4	7,3	3,0
3	11,1	27,0	23,5	17,0	14,9	10,7	4,9
4	15,0	25,5	20,7	13,4	11,7	7,1	2,8
5	30,9	21,0	15,8	11,9	8,8	4,8	1,4
6	30,2	14,2	10,4	7,9	4,7	3,2	1,0
7	16,2	17,5	15,3	12,1	8,5	5,5	1,3
8	29,4	16,8	15,2	12,3	9,6	6,7	3,7
9	39,6	30,8	30,1	23,7	16,9	10,7	4,6
10	36,3	29,7	25,9	20,9	18,6	13	8,3
11	24,1	17,8	16,0	12,5	10,1	7,3	3,2
12	27,0	28,9	23,9	19,4	15,9	10,5	5,7
13	46,5	18,0	13,1	10,7	8,3	5,0	2,1
14	48,2	38,7	30,3	24,2	18,6	12,3	4,7
15	26,7	24,4	16,7	14,4	10,0	6,3	2,6
16	33,5	26,3	23,3	18,6	16,8	10,0	6,7
17	18,7	17,6	11,0	7,4	5,4	5,2	1,9
18	23,2	17,8	12,8	10,3	6,7	3,6	1,4
19	24,0	13,6	11,0	8,1	6,3	3,7	1,4
20	45,8	32,2	27,0	22,4	16,7	9,7	4,0
21	26,5	18,2	15,4	13,7	9,6	6,1	2,5
22	24,3	18,3	15,1	12,1	8,9	6,4	3,9
23	53,0	41,2	32,8	26,9	21,1	12,6	5,4
24	13,3	9,0	6,8	4,8	3,0	1,3	0,2
25	21,5	23,8	20,5	16,8	12,2	9,2	7,0
26	24,0	19,6	14,9	10,0	7,7	4,3	1,6
27	22,4	18,0	13,3	11,4	8,4	5,2	2,3
28	38,6	29,6	24,1	20,2	15,0	11,5	5,8
29	26,1	18,0	15,5	11,7	10,1	5,3	1,9
30	25,7	20,1	15,2	12,9	9,4	6,7	2,5

Über den Verlauf der Wirkstoffspiegelkurve des Etoposids bis zur zweiten Blutabnahme können unter Berücksichtigung dieser Überlegungen folgende Aussagen getroffen werden:

- Bei den Patienten Nr. 3, 4, 7 und 12, bei denen nach 15 min mehr Etoposid als 2 min nach Infusionsende im Blut gemessen wurde, wird das Maximum der Wirkstoffspiegelkurve zwischen diesen beiden Meßpunkten erreicht. Wann genau und wie hoch dieses ist, läßt sich nicht beurteilen. Diese Patienten verstoffwechseln das Etoposidphosphat langsamer, was mit interindividuellen Unterschieden in der Aktivität der alkalischen Phosphatase zu erklären ist /Kre96/.
- Bei den anderen Patienten liegt das Maximum der Wirkstoffspiegelkurve mit großer Wahrscheinlichkeit vor der ersten Blutabnahme. Es kann aber auch, je nach individueller Plasmahalbwertszeit für Etoposidphosphat, zwischen der ersten und zweiten Blutabnahme liegen.

Will man den genauen Verlauf der Etoposid-Wirkstoffspiegelkurve in den ersten 15 Minuten ermitteln, müssten innerhalb dieser Zeit alle ein bis zwei Minuten eine Blutabnahme erfolgen. Dies ist nicht praktikabel und wäre für den Patienten nicht zumutbar. Auch wäre der Zugewinn an Genauigkeit für die Bestimmung der AUC nur gering, da sich die Veränderungen auf ein im Vergleich zum Gesamtverlauf sehr kurzes Zeitintervall beziehen (siehe auch Kapitel 5.2).

5.2 Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Die Kinetik von intravenös appliziertem Etoposid kann mit einem Zwei-Kompartiment-Modell beschrieben werden. Dies beinhaltet ein zentrales und ein peripheres Kompartiment, die in Verbindung miteinander stehen. Das Pharmakon wird in das zentrale Kompartiment infundiert. Der Infusion folgt eine rasche Verteilungsphase in das periphere Kompartiment. Nach Erreichen des Gleichgewichtes zwischen zentralem und peripherem Kompartiment wird

die Konzentration des Pharmakons in erster Linie von dessen Abbau bestimmt (Eliminationsphase). Mathematisch folgt die Plasmakonzentration $c(t)$ einem biexponentiellen Verlauf:

$$c(t) = A \cdot \exp(-\alpha \cdot t) + B \cdot \exp(-\beta \cdot t)$$

Hierbei sind A und B die Ordinatenabschnitte der Exponentialfunktionen zum Zeitpunkt $t = 0$, α die Verteilungskonstante und β die Eliminationskonstante [Mut86]. In beide Konstanten gehen jeweils sowohl Verteilungs- als auch Eliminationsvorgänge ein. α charakterisiert jedoch vorwiegend die Verteilung (schneller Abfall zu Beginn der Infusion) und β vorwiegend die Elimination (langsamer Abfall nach Verteilung) [Mut86].

Die Parameter A, B, α , β wurden den gemessenen Plasmakonzentrationen mit Hilfe einer biexponentiellen Regression möglichst gut angepaßt. Hierfür wurde das Programm Origin® verwendet. Ein typischer Verlauf der Plasmakonzentration mit entsprechendem biexponentiellen Fit ist in Abbildung 5 dargestellt. Es handelt sich hierbei um Patient Nr. 5.

Ein Problem ergab sich für die vier Patienten, bei denen die Plasmakonzentration zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme unter der zweiten Abnahme lag (Patienten Nr. 3, 4, 7, 12). In diesen Fällen konnte der 2-Minuten-Wert (1. Blutabnahme) nicht zur Anpassung an den biexponentiellen Verlauf herangezogen werden, da die Verteilungsphase erst ab dem Zeitpunkt der nahezu vollständigen Dephosphorylierung des Etoposidphosphates als solche gewertet werden kann. Dieser Zeitpunkt liegt bei den genannten vier Patienten aber zwischen der ersten und zweiten Blutabnahme (siehe Kapitel 5.1). (Natürlich verteilt sich vorhandenes Etoposid im Plasma auch schon vorher, unabhängig vom Beginn der eigentlichen Verteilungsphase). Bei diesen vier Patienten konnte der Fit folglich statt mit sieben nur mit sechs Meßpunkten durchgeführt werden. Um dieses Problem bei künftigen

Studien zu umgehen sollte entweder das Pharmakon über eine längere Zeit infundiert werden (z.B. 5 Minuten statt 2) oder eine zusätzliche Blutabnahme nach z.B. 5 Minuten erfolgen.

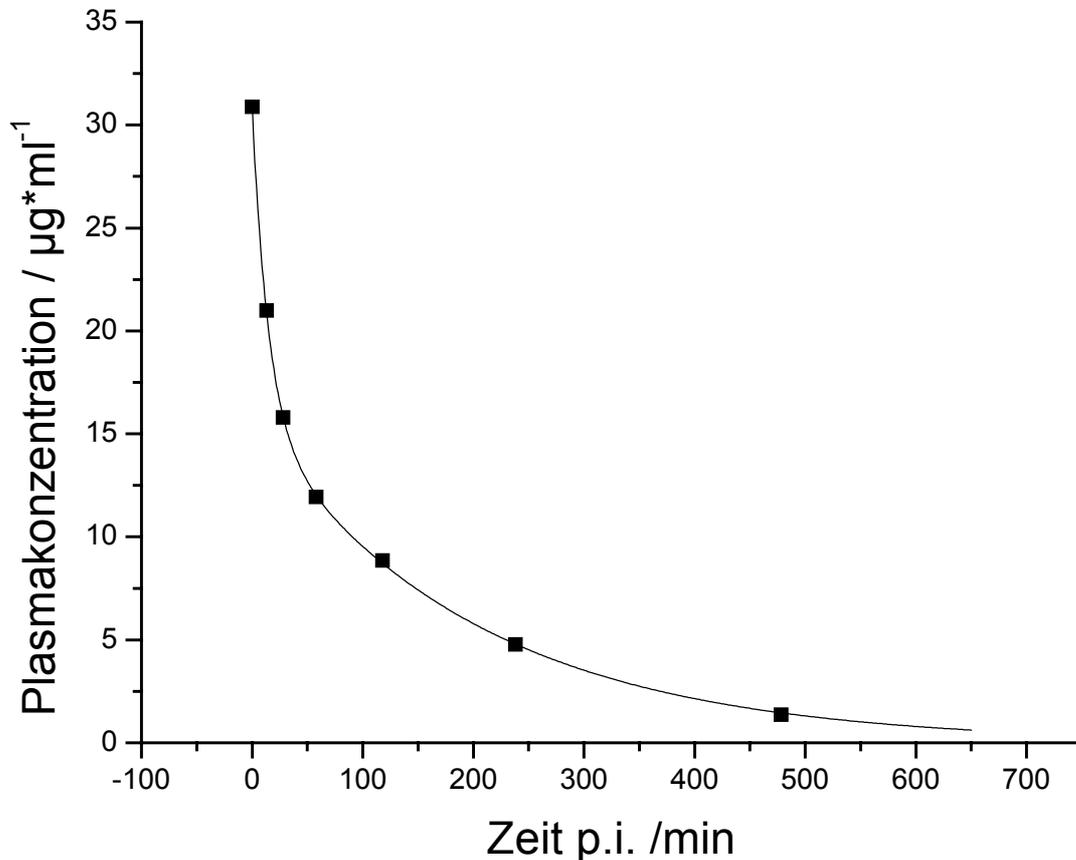


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Etoposid-Plasmakonzentration bei Patient 5

Die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve, AUC) entspricht dem zeitlichen Integral über die biexponentielle Funktion in den Grenzen von Null bis Unendlich:

$$AUC = \int_0^{\infty} c(t) dt = \int_0^{\infty} \{A \exp(-\alpha \cdot t) + B \exp(-\beta \cdot t)\} dt$$

Führt man die Integration aus und setzt die Grenzen ein, ergibt sich:

$$AUC = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta}$$

Mithilfe der durch das Programm Origin® ermittelten Parameter A, B, α und β läßt sich so die AUC berechnen.

Bei den Patienten Nr. 3, 4, 7, 12 konnte, wie oben beschrieben, der erste Meßpunkt nicht für den Fit herangezogen werden. Die Wirkstoffspiegelkurve zeigte hier erst ab der zweiten Blutabnahme einen biexponentiellen Abfall. Um aber den Beitrag zur AUC zwischen der ersten und zweiten Blutabnahme zu berücksichtigen, wurde näherungsweise ein linearer Anstieg zwischen den ersten beiden Meßpunkten zugrunde gelegt. Die Fläche AUC ($c_1 \leftrightarrow c_2$) unter der Geraden, die zwei Meßpunkte c_1 und c_2 verbindet, berechnet sich dann zu:

$$AUC(c_1 \leftrightarrow c_2) = \frac{c_1 + c_2}{2} \cdot T$$

Die Zeit T stellt hierbei den zeitlichen Abstand der beiden Meßpunkte dar. Die berechneten AUC-Werte für alle Patienten sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Aus den Fitparametern läßt sich auch die Fläche unter der ersten Momentkurve (area under the moment curve, AUMC) berechnen. Diese berechnet sich als Integral in den Grenzen von Null bis Unendlich über das Produkt aus Plasmaspiegelkurve $c(t)$ und Zeit t :

$$AUMC = \int_0^{\infty} c(t) \cdot t \, dt = \int_0^{\infty} \{A \cdot \exp(-\alpha \cdot t) + B \cdot \exp(-\beta \cdot t)\} \cdot t \, dt$$

Nach Ausführen der Integration und Einsetzen der Grenzen, ergibt sich:

$$\text{AUMC} = \frac{A}{\alpha^2} + \frac{B}{\beta^2}$$

Nun läßt sich die mittlere Verweildauer MRT (mean residence time) des Pharmakons berechnen:

$$\text{MRT} = \frac{\text{AUMC}}{\text{AUC}}$$

Die Gesamtkörperclearance CI als Maß für das pro Zeiteinheit von dem Pharmakon geklärten (virtuellen) Plasmavolumen berechnet sich aus der infundierten Dosis D des Pharmakons und der AUC zu:

$$\text{CI} = \frac{D}{\text{AUC}}$$

Das Verteilungsvolumen V_{ss} des Pharmakons im steady-state, also nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes ergibt sich aus der Clearance und der mittleren Verweildauer zu:

$$V_{ss} = \text{CI} \cdot \text{MRT}$$

Eine Übersicht über die berechneten Werte der pharmakokinetischen Größen gibt Tabelle 4. Um die Werte für die Clearance vergleichen zu können, wurden sie durch die Körperoberfläche der Patienten (KOF) dividiert. Es wurde zusätzlich eine Spalte mit den auf 100 mg/m^2 Dosierung normierten Werten der AUC eingefügt (AUC_n).

Tabelle 4: Pharmakokinetische Größen [A,B] = µg/ml, [α,β] = min⁻¹, [AUC] = min*µg/ml, [AUMC] = min²*µg/ml [MRT] = min, [Cl] = ml/min/m², [KOF] = m², [V_{ss}] = l

Pat.	A	α	B	β	AUC	AUC _n	AUMC	MRT	Cl/KOF	V _{ss}
1	7,85	0,0494	24,61	0,0049	5.177	4.276	1,03E+06	198	23,4	8,8
2	13,72	0,0770	19,76	0,0039	5.227	5.314	1,29E+06	247	18,8	8,5
3	8,17	0,0425	19,13	0,0028	7.374	7.374	2,52E+06	342	13,6	9,7
4	10,14	0,0458	15,59	0,0035	4.956	6.195	1,29E+06	260	16,1	7,5
5	15,25	0,0684	15,64	0,0050	3.369	4.107	6,36E+05	189	24,3	9,0
6	19,27	0,1163	10,93	0,0058	2.064	2.932	3,31E+05	161	34,1	7,8
7	3,76	0,0331	13,80	0,0045	3.398	3.399	6,85E+05	202	29,4	10,7
8	7,57	0,0457	13,69	0,0029	4.936	4.936	1,67E+06	337	20,3	13,7
9	11,19	0,0382	27,60	0,0039	7.359	3.741	1,82E+06	247	26,7	12,1
10	13,08	0,0444	23,19	0,0022	10.722	5.951	4,70E+06	438	16,8	16,3
11	8,90	0,0639	15,08	0,0032	4.856	4.857	1,48E+06	304	20,6	10,0
12	7,69	0,0504	21,23	0,0029	7.732	5.155	2,46E+06	318	19,4	12,3
13	32,88	0,1424	13,63	0,0042	3.474	4.343	7,73E+05	223	23,0	10,3
14	20,27	0,0462	28,10	0,0036	8.270	3.474	2,19E+06	265	28,8	16,0
15	12,94	0,0304	14,36	0,0035	4.559	4.560	1,20E+06	264	21,9	11,6
16	11,51	0,0568	21,93	0,0028	8.147	8.148	2,88E+06	354	12,3	8,2
17	13,30	0,0291	6,39	0,0019	3.777	5.194	1,74E+06	461	19,3	14,6
18	11,18	0,0483	12,13	0,0049	2.720	2.285	5,16E+05	190	43,8	13,9
19	13,03	0,1015	10,97	0,0046	2.504	3.281	5,16E+05	206	30,5	11,9
20	16,91	0,0911	28,82	0,0045	6.630	4.421	1,44E+06	218	22,6	9,8
21	9,47	0,1180	17,06	0,0044	3.999	3.999	9,01E+05	225	25,0	10,7
22	11,86	0,0437	12,37	0,0026	5.069	5.069	1,87E+06	368	19,7	15,3
23	20,54	0,0574	32,57	0,0038	8.829	3.532	2,21E+06	250	28,3	11,3
24	6,04	0,0683	7,20	0,0073	1.076	1.076	1,37E+05	127	92,9	22,4
25	15,58	0,0245	13,37	0,0014	10.182	13.707	6,84E+06	672	7,3	8,6
26	13,46	0,0336	10,82	0,0038	3.246	4.344	7,61E+05	234	23,0	10,3
27	9,64	0,0494	12,95	0,0037	3.695	4.928	9,50E+05	257	20,3	10,4
28	16,73	0,0504	21,83	0,0028	8.133	5.423	2,79E+06	344	18,4	12,7
29	9,99	0,0893	16,05	0,0045	3.713	3.713	8,09E+05	218	26,9	9,7
30	11,22	0,0522	14,59	0,0035	4.404	4.404	1,21E+06	274	22,7	12,4

Die Daten dieser Untersuchung werden im folgenden mit vorhandenen Daten aus derselben Arbeitsgruppe verglichen. Hierzu wird in Tabelle 5 ein Mittelwertvergleich mit drei Datensätzen von Etoposidkinetiken der Marburger Arbeitsgruppe Klinische Pharmakologie/ Massenspektrometrie durchgeführt. Bei diesen drei Studien /Ho196/Köh92/Pfl93/ wurde unphosphoriliertes Etoposid in Dosierungen zwischen 50 mg/m² und 800 mg/m² als Infusion über 30 - 90 Minuten appliziert. Die Voraussetzungen sind also, insbesondere was die Infusionszeiten angeht, nicht ganz vergleichbar. Wegen der identischen Bioverfügbarkeit von Etoposid und Etoposidphosphat /BMS93/ sollte jedoch die AUC vergleichbar sein. Verglichen wird hier die auf 100 mg/m² normierte AUC (AUC_n).

Tabelle 5: Vergleich der Mittelwerte pharamkoinetischer Daten dieser Studie mit früheren Veröffentlichungen. [AUC_n] = min*µg/ml, [MRT] = min, [Cl/KOF] = ml/min/m², [V_{ss}] = l

	hier	/Ho196/	/Köh92/	/Pfl93/
AUC_n	4805 ± 2176	4715 ± 782	4494 ± 1060	5430 ± 1740
MRT	280 ± 107	383 ± 34	372 ± 104	402 ± 84
Cl/KOF	25,0 ± 14,6	22 ± 3	23 ± 5	19 ± 5
V_{ss}	6,1 ± 1,6	7,8 ± 1,3	7,0 ± 1,3	6,8 ± 2,7

Es zeigt sich, daß die Werte für die AUC_n, die Clearance und das Verteilungsvolumen vergleichbar sind. Lediglich die hier gemessene mittlere Verweildauer MRT differiert etwas von den älteren Datensätzen. Der Grund dafür könnte die deutlich kürzere Infusionszeit bei Verwendung von Etoposidphosphat sein. Aufgrund der Ähnlichkeit der Daten, insbesondere was die AUC angeht, kann davon ausgegangen werden, daß die in dieser Arbeit gewonnenen Daten repräsentativ für ein großes Patientenkollektiv sind (siehe auch Kapitel 6.3.3).

6 Limited Sampling Modell

6.1 Ziel des Modells

Die Dosierung von Zytostatika, wie dem in dieser Studie verwendeten Etoposid, muß individuell an jeden Patienten angepasst werden, da Nebenwirkungen zu erwarten sind, die bei Überdosierung leicht bis zum Tode des Patienten z.B. durch Knochenmarkaplasie (totaler Ausfall der blutbildenden Zellen) führen können. In der Pharmakologie spricht man in diesem Zusammenhang von „therapeutischer Breite“ des Pharmakons. Diese Größe ist ein Maß für die Sicherheit zwischen therapeutischer und toxischer Wirkung /Mut86/. Zytostatika haben eine geringe therapeutische Breite, da der Wirkspiegel der Substanz aufgrund der Gefahr von gravierenden Nebenwirkungen nicht zu hoch sein darf. Auf der anderen Seite verbietet sich bei der Tumortherapie aber auch eine „sicherheitshalber“ zu geringe Dosierung, die zu einer Resistenzbildung der Tumorzellen gegenüber dem Medikament und damit zum Wirkverlust führen kann, was fatale Folgen für den Patienten hätte. Nicht nur Zytostatika, sondern z.B. auch herzwirksame Medikamente wie Glykoside oder Asthmamedikamente wie Theophyllin haben eine geringe therapeutische Breite. Eine Therapie mit diesen Medikamenten erfordert generell eine genaue Überwachung und Anpassung der Dosierung. Die für die Therapie von malignen Erkrankungen ausgearbeiteten, international verwendeten Behandlungsprotokolle sehen daher eine Berechnung der Zytostatikadosis nach der Körperoberfläche des Patienten vor. Die Oberfläche wird aus der Körperlänge und dem Körpergewicht anhand einer Formel bestimmt /Dub16/. Die alleinige Berücksichtigung der Körperoberfläche kommt dem Ziel einer genauen Kontrolle der Therapie zwar näher. Wünschenswert sind aber weitergehende Maßnahmen, um die individuell unterschiedlichen Bedingungen des Patienten wie z.B. die individuelle Stoffwechsellage oder Organfunktion besser zu berücksichtigen. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß eine verminderte Nierenfunktion die Pharmakokinetik von Etoposid stark beeinflusst /Pfl87/Pfl93/. Zu wünschen ist also ein individuelles „Drugmonitoring“ für jeden Patienten.

Für eine ganze Reihe von Medikamenten stehen in der klinischen Praxis Methoden zur Verfügung, die eine routinemäßige Kontrolle der Blutspiegel gestatten. Als Beispiel seien hier die oben erwähnten herzwirksamen Glykoside oder das Asthmamedikament Theophyllin erwähnt. Der prinzipielle Unterschied zu den Zytostatika besteht hierbei jedoch in der Dauer der Anwendung. Die genannten Arzneimittel werden in der Regel als Dauermedikation angesetzt, die zum Ziel hat, einen konstanten Wirkspiegel beim Patienten zu erreichen bzw. zu erhalten. Für eine Kontrolle der Dosierung reicht damit die Entnahme einer einzelnen Probe. Ein Zytostatikum hingegen wird innerhalb eines vorgeschriebenen Schemas in bis zu 6 aufeinanderfolgenden Zyklen an jeweils maximal 5 Tagen appliziert. In den behandlungsfreien Intervallen (zwischen den Zyklen), die u.a. für die Regeneration des Knochenmarks notwendig sind, wird die Therapie unterbrochen. Punktuelle Aussagen über einzelne Wirkspiegel sind in diesem Fall keinesfalls hinreichend, um die individuelle Dosierung einschätzen zu können bzw. Aussagen über das Ausmaß der Nebenwirkungen machen zu können /Eva82/Ben84/Ben87/Ste85/. Erst durch die Aufnahme des Wirkspiegels über einen längeren Zeitraum (z.B. 8 Stunden) kann abgeschätzt werden, ob die Dosierung im gewünschten Bereich liegt, d.h. maximal mögliche Menge an zytostatischer Substanz bei gerade noch tolerablen Nebenwirkungen. Für Etoposid konnte ein Zusammenhang zwischen der AUC und der Myelotoxizität (Knochenmarkschädigung) hergestellt werden /Ste85/. Da die Myelotoxizität mit ihren Folgen als die schwerste Nebenwirkung der Tumorthherapie durch Zytostatika betrachtet werden kann, eignet sich die AUC damit als prädiktiver Faktor, um erwünschte bzw. unerwünschte Wirkung einer Etoposidtherapie abschätzen zu können.

Die Bestimmung der AUC ist allerdings ein großer Aufwand. Neben den über 8 Stunden verteilten wiederkehrenden Blutabnahmen ist besonders der Aufwand an Laborarbeit durch die Aufreinigungsschritte und die Dünnschichtchromatographie beträchtlich. Nicht zuletzt erforderte die reine Meßzeit der bis zu 8 Proben in der PDMS-Apparatur, durch die geringe Aktivität der Californium-Quelle bedingt, einen immer größeren Zeitaufwand. Eine

komplette Patientenkinetik konnte in der Regel erst nach zwei Tagen fertiggestellt werden. Der aktuelle Therapiezyklus des Patienten war dann in der Regel schon beendet, so daß es nicht möglich war, die Ergebnisse der Messung für eine Präzisierung der Dosierung innerhalb des aktuellen Zyklus zu berücksichtigen. Das Verfahren ist somit aufgrund des materiellen und vor allem zeitlichen Aufwandes nicht als Routineverfahren in der Klinik einsetzbar. Wünschenswert ist eine Optimierung der Methode, so daß die Anzahl der Messungen pro Kinetik reduziert werden kann, ohne jedoch an Genauigkeit bei der Bestimmung der AUC zu verlieren. Dadurch könnten in Zukunft alle Patienten vom Vorteil einer individuellen Dosisüberwachung profitieren. Die Therapie würde bei vertretbarem personellen und materiellen Aufwand entscheidend verbessert werden

6.2 Mathematischer Ansatz

Wie oben beschrieben ist das Ziel des hier vorgestellten Limited Sampling Modells (im folgenden auch LSM bezeichnet), die Anzahl der Meßpunkte für die Bestimmung der AUC zu reduzieren. Man könnte also versuchen, einige der 8 Meßpunkte einfach wegfällen zu lassen in der Annahme, daß sie den biexponentiellen Fit der Wirkstoffspiegelkurve nur wenig beeinflussen und damit für die Bestimmung der AUC zu vernachlässigen sind. Dieses Verfahren erweist sich jedoch als schwierig, da nicht bekannt ist, welche der Meßpunkte zu vernachlässigen sind und welche für die Bestimmung der AUC besonders wichtig sind. Es stellt sich somit die Frage nach dem Einfluß der Meßpunkte einer jeweiligen Kinetik auf die Höhe der AUC. Dieser läßt sich berechnen, indem bei einer bereits bekannten Patientenkinetik eine statistische Korrelation zwischen den Meßpunkten, aus denen die AUC bestimmt wurde, und der AUC durchgeführt wird. Stellt sich dabei heraus, daß es Meßpunkte gibt, die allein oder in Kombination mit anderen die AUC hinreichend vorherzusagen, so läßt sich eine Formel entwickeln, mit deren Hilfe man die AUC anhand dieses einen Wertes bzw. der wenigen Werte abschätzen kann. Somit

wäre das Ziel einer Reduzierung der Meßpunkte und damit einer Verringerung der notwendigen Blutproben und deren Bestimmung erreicht.

Um die Vorhersagequalität bestimmter Meßzeitpunkte des Plasmaspiegels $c(t)$ in Hinblick auf die AUC zu bestimmen, bietet sich die lineare Regressionsanalyse als mathematisches Verfahren an. Diese Methode ist ein Standardverfahren in der Statistik, mit deren Hilfe man eine Gleichung aufstellen kann, die darüber Aussage gibt, welcher Anteil der Zielgröße durch die Einflußgrößen bestimmt wird. Numerisch drückt sich dieses Maß im Korrelationskoeffizienten (r bzw. r^2) aus, durch den der durch die Einflußgrößen erklärte Anteil der Varianz der Zielgröße angegeben wird. Im Idealfall (Zielgröße kann vollständig durch die Einflußgröße beschrieben werden) ist $r = 1$. Stehen Zielgröße und Einflußgröße in keinem Zusammenhang ist $r = 0$. Zwischen Einflußgröße $c(t)$ und Zielgröße AUC wird ein linearer Zusammenhang zugrunde gelegt, der sich im Falle einer Einflußgröße bzw. Prädiktorvariable in folgender Gleichung ausdrücken läßt:

$$\text{AUC} = a \cdot c(t) + b$$

Dabei sind a und b die zu berechnenden Regressionsparameter. In dieser Untersuchung ist die Zielgröße die AUC, der Prädiktor ist die Plasmakonzentration c zu einem festen gewählten Zeitpunkt t . Trägt man diese Werte für jeden Patienten graphisch gegeneinander auf, so entsteht eine Punktwolke. Die lineare Regression berechnet anhand der Methode der kleinsten Fehlerquadrate daraus die Gerade, die sich am besten an die Punktwolke anpaßt, also die beste lineare Beschreibung des Zusammenhangs der Variablen darstellt /Bor93/. Hierbei stellt b den Abschnitt auf der y -Achse und a die Steigung der Geraden dar. Der sich aus diesem Vorgehen ergebende Korrelationskoeffizient r wird Pearson's Produkt Moment Korrelationskoeffizient genannt.

Will man den Einfluß von mehreren Meßwerten, also die Plasmakonzentrationen von mehreren Zeitpunkten, auf die AUC berechnen, wird das Verfahren der multiplen linearen Regression angewendet. Hiermit läßt sich die Korrelation zwischen der Zielgröße AUC und mehreren Einflußgrößen (Plasmakonzentrationen einer Kinetik zu unterschiedlichen Zeitpunkten) ermitteln. Man erhält eine Schätzgleichung der Form

$$\text{AUC} = a_1 \cdot c(t_1) + a_2 \cdot c(t_2) + b$$

Hierin sind a_1 , a_2 und b die berechneten Regressionsparameter, $c(t_1)$ und $c(t_2)$ die Plasmakonzentrationen einer Kinetik zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Der sich ergebende Korrelationskoeffizient wird multipler Korrelationskoeffizient R genannt.

6.3 Statistische Voraussetzungen

Um ein statistisches Modell zu entwickeln, geht man in zwei Schritten vor. Im ersten Schritt wird die Behauptung aufgestellt, also das Limited Sampling Modell (LSM) anhand eines ersten Patientenkollektivs entwickelt. Im zweiten Schritt wird die Behauptung dann auf ihre Gültigkeit anhand eines weiteren Patientenkollektivs überprüft. Erst wenn das LSM am zweiten Patientenkollektiv validiert wird, ist die Gültigkeit bewiesen. Es werden also zwei voneinander unabhängige Versuchsgruppen benötigt. Mit der ersten Gruppe, der Trainingsgruppe, wird das LSM aufgestellt und anschließend an der zweiten Gruppe, der Testgruppe validiert. Eine Gruppengröße von jeweils 15 Patienten pro Gruppe hat sich bewährt /Eks90/Ili85/Lau89/. Insgesamt wurden also 30 Patienten in die Studie aufgenommen. Die Zuteilung zu der Trainings- bzw. Testgruppe erfolgte nach dem Zufallsprinzip, indem die ungeraden Patientennummern der Trainingsgruppe und die geraden der Testgruppe zugeordnet wurden. Damit ist gewährleistet, daß beide Gruppen statistisch unabhängig voneinander sind.

Für die Berechnung des LSM nach der oben beschriebenen Methodik (Produkt Moment Korrelation) ist es außerdem notwendig, daß die Variablen in den Stichproben einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Bei einer Pearson Produkt Moment Korrelation muß streng genommen von einer bivariaten Normalverteilung ausgegangen werden, die in der Praxis durch die Überprüfung der Normalverteilung der einzelnen Variablen getestet wird. Ferner muß gezeigt werden, daß beide Gruppen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen und daß das in dieser Studie verwendete Patientenkollektiv eine repräsentative Gruppe für die Gesamtheit der mit diesem Medikament behandelten Patienten ist. Damit ist gezeigt, daß die Daten tatsächlich der Grundgesamtheit (Patienten, die Etoposid erhalten) entstammen, über die eine Aussage gemacht werden soll.

6.3.1 Tests auf Normalverteilung

Voraussetzung für die Entwicklung eines LSM mit Hilfe eines Trainings- und eines Testdatensatzes ist, daß beide Datensätze normalverteilt sind. Die Prüfung erfolgte mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Anpassungstest, wobei das kritische Signifikanzniveau bei $p = 0,1$ festgesetzt wurde. Dieser Test deckt besonders bei kleinen Stichproben Abweichungen von der Normalverteilung eher auf als der sonst übliche χ^2 -Anpassungstest /Sac90/. Streng genommen setzt der Kolmogoroff-Smirnoff-Test stetige Verteilungen voraus. Er ist jedoch auch bei diskreten Verteilungen anwendbar /Con72/. Die Verteilung der Daten für die AUC und die Plasmakonzentrationen c zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden jeweils in der Trainings- und in der Testgruppe getestet. Hierfür wurde das Statistikprogramm SPSS[®] verwendet. Ist die asymptotische Signifikanz größer als 0,1, so ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% davon auszugehen, daß es sich um eine Normalverteilung handelt. Da alle Signifikanzniveaus größer als 0,1 waren, ist davon auszugehen, daß bei allen Daten eine Normalverteilung vorlag. In Tabelle 6 und 7 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 6: Kolmogoroff-Smirnoff-Anpassungstest auf Normalverteilung in der Trainingsgruppe (15 Patienten)

Meßgröße	AUC	C (15 min)	C (30 min)	C (1 h)	C (2 h)	C (4 h)	C (8 h)
Asympt. Signifikanz	0,479	0,291	0,286	0,731	0,311	0,542	0,277

Tabelle 7: Kolmogoroff-Smirnoff-Anpassungstest auf Normalverteilung in der Testgruppe (15 Patienten)

Meßgröße	AUC	C (15 min)	C (30 min)	C (1 h)	C (2 h)	C (4 h)	C (8 h)
Asympt. Signifikanz	0,895	0,963	0,716	0,920	0,941	0,959	0,992

6.3.2 Test der Stichproben auf gleiche Herkunft

Das am Trainingsdatensatz entwickelte LSM wurde anhand des Testdatensatzes validiert. Dies ist nur dann möglich, wenn vorher gezeigt wird, daß beide Datensätze der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Die beiden Stichproben wurden hierzu mit dem Vergleichstest für zwei unabhängige Stichproben nach Kolmogoroff und Smirnoff auf einem Signifikanzniveau von 10 % verglichen. Dieser Test gilt als schärfster Homogenitätstest. Er erfaßt Unterschiede der Verteilungsformen aller Art, insbesondere Unterschiede der zentralen Tendenz (Mittelwert, Median), der Streuung und der Schiefe /Sac90/. Da die Datensätze an verschiedenen Patienten gewonnen wurden, ist die statistische Unabhängigkeit als Voraussetzung für die Anwendung des Testes gegeben. Es ist anzunehmen, daß die Datensätze aus der gleichen Grundgesamtheit entstammen, wenn die asymptotische Signifikanz bei dem Test jeweils größer als 0,1 ist. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS[®] durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß alle

Datensätze der Trainings- und der Testgruppe der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Kolmogoroff-Smirnoff-Test für zwei unabhängige Stichproben

Meßgröße	AUC	C (15 min)	C (30 min)	C (1 h)	C (2 h)	C (4 h)	C (8 h)
Asympt. Signifikanz	0,375	0660	0,925	0,925	0,660	0,375	0,375

6.3.3 Repräsentation der Stichprobe

Die Ergebnisse des zu entwerfenden Limited-Sampling-Modells sollte auf alle Patienten, die Etoposidphosphat erhalten, übertragbar sein. Hierfür muß gezeigt werden, daß die ausgewählten Stichproben repräsentativ für die Gesamtheit der Patienten ist. Folgende Fakten belegen die Richtigkeit dieser Annahme:

- Die Patienten wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, indem alle verfügbaren Patienten, die mit Etoposidphosphat behandelt wurden, in einem Zeitraum von einigen Monaten in die Studie mit aufgenommen wurden. Es wurde nicht vorher selektiert. Weiterhin gibt es keinen Anhalt dafür, daß die in der Marburger Uniklinik behandelten Patienten aufgrund ihrer Krankheit oder sonstigen Merkmalen vorselektiert sind. Somit wurde die Stichprobe rein nach dem Zufallsprinzip erhoben und es besteht kein Anhalt dafür, daß die Stichprobe nicht die Grundgesamtheit repräsentiert.
- In Kapitel 5.2 wurden die pharmakokinetischen Daten dieser Untersuchung mit drei früheren veröffentlichten Studien verglichen. Hierbei ergab sich kein Anhalt für systematische Unterschiede, insbesondere im Hinblick auf die AUC.

6.4 Modellentwicklung mit linearer und multipler Regression

Es werden zunächst eine Regressions- und anschließend eine Korrelationsanalyse am Trainingsdatensatz durchgeführt. Hierdurch wird der lineare

Zusammenhang zwischen den gemessenen Plasmakonzentrationen und der AUC aufgezeigt. Dazu werden bei den 15 Patienten der Trainingsgruppe die Einflußgröße Plasmakonzentration zu einem Zeitpunkt $c(t)$ mit der jeweiligen Zielgröße AUC korreliert und eine univariate Regressionsgleichung errechnet. Je näher der Korrelationskoeffizient r zwischen Plasmakonzentration und AUC beim Wert 1 liegt, desto größer ist der lineare Zusammenhang zwischen beiden Größen und desto besser wird sich die Einflußgröße für die Vorhersage der AUC eignen. Es ergeben sich auf diese Weise 8 unterschiedliche univariate Regressionsgleichungen, die je nach Korrelationskoeffizient ein mehr oder weniger gutes Schätzmodell für die AUC erwarten lassen.

Dieses Vorgehen wird dann mit sukzessiv gesteigerter Prädiktorenanzahl durchgeführt, so daß sich ebenfalls die 2- und 3-faktoriellen Schätzmodelle für die Trainingsstichprobe vergleichen lassen. Die interessierende Größe ist bei mehreren Prädiktoren der multiple Korrelationskoeffizient R . Das Quadrat von R gibt den Anteil der Varianz der Zielvariable AUC an, die durch die Prädiktoren erklärt werden .

Es kann aufgrund von Interkorrelationen bzw. sog. Suppressionseffekten zu unerwarteten Veränderungen kommen, so daß nicht unbedingt die Prädiktoren mit der höchsten univariaten Korrelation als beste multivariate Prädiktorkombination angenommen werden dürfen. Es ist also erforderlich, bei jedem Schritt die Variablenkombinationen neu zu betrachten. Durch die sukzessive Erhöhung der Prädiktorenanzahl kann außerdem festgestellt werden, wie sich der erklärte Varianzanteil durch mehr Prädiktoren (also mehr Meßzeitpunkte) erhöht. Somit wird der Informationszugewinn durch Hinzunahme einer weiteren Messung numerisch abgebildet.

Die aus dem Trainingsdatensatz ermittelten Regressionsmodelle mit jeweils einer Einflußgröße werden sodann am Testdatensatz validiert. In der Testgruppe befinden sich ebenfalls 15 Patienten, deren AUC nach der „gewöhnlichen“ Methode mit jeweils 8 Plasmakonzentrationsmeßwerten bestimmt wurden. Zusätzlich wurde bei diesen Patienten die AUC nach den

mit Hilfe des Trainingsdatensatzes ermittelten Regressionsgleichungen geschätzt, indem jeweils ein Plasmakonzentrationswert der Testpatienten in die oben beschriebene Regressionsgleichung eingesetzt wurde. Die geschätzten AUC-Werte ließen sich dann mit den „wahren“, empirischen Daten für die AUC vergleichen. Die Schätzung ist als gut zu bewerten, wenn geschätzter und empirisch erhobener Wert nur wenig voneinander abweichen. Um ein Maß für die Übereinstimmung zu erhalten, wird eine Korrelationsanalyse zwischen geschätzten und der empirischen Wert durchgeführt. Der daraus resultierende Korrelationskoeffizient r stellt dann dar, wie gut der geschätzte Wert der AUC den empirischen voraussagen kann.

Um die stichprobenunabhängige Qualität dieser Schätzung zu verifizieren, wird die Übereinstimmung der Voraussagefähigkeit in der Trainingsstichprobe mit der Voraussagefähigkeit in der Teststichprobe mit Hilfe eines weiteren statistischen Tests verglichen. Die zu vergleichenden Werte sind der Korrelationskoeffizient r (bzw. bei mehreren Prädiktoren der multiple Korrelationskoeffizient R) der in der Trainingsgruppe aufgestellten Regressionsgleichungen und der Korrelationskoeffizient r' zwischen geschätzter und empirischer AUC in der Testgruppe. Unterscheiden sich beide Koeffizienten voneinander nicht, so kann von einem sehr stabilen Modell (stichprobenunabhängigen Modell) ausgegangen werden. Für die statistische Überprüfung dieser Frage ist nach Bortz folgende Gleichung anzuwenden /Bor93/:

$$z = \frac{Z_1 - Z_2}{\sqrt{\frac{1}{n_1 - 3} + \frac{1}{n_2 - 3}}}$$

Hierin sind n_1 bzw. n_2 die Anzahl der Patienten in den zwei Stichproben und Z_1 bzw. Z_2 die Fishers Z-Werte für den jeweiligen Korrelationskoeffizienten r bzw. r' , die aus Tabellen abgelesen werden können. Getestet wird die Null-

hypothese H_0 „Geschätzte und wahre AUC korrelieren im Trainingsdatensatz und Testdatensatz gleich“. Kann der Test zeigen, daß die Korrelationen auf einem hohen Signifikanzniveau gleich sind (hier ist wiederum das für die H_0 konservativere kritische Niveau von $p = 0,1$ anzuwenden), ist das mit Hilfe des Trainingsdatensatzes ermittelte Schätzmodell im gleichen Maße auch für die Gruppe der Testpatienten gültig. Das Schätzmodell ist dann am Testdatensatz validiert und somit die Gültigkeit verifiziert.

Eine andere Möglichkeit zur Bewertung der Güte des Schätzmodells bietet die Berechnung der prozentualen Abweichung zwischen geschätzten und berechneten AUC-Werten. Dieses Verfahren ist besonders im Hinblick auf die routinemäßige Verwendung der LSM-Modelle in der medizinischen Praxis hilfreich, da man den Fehler, den man durch die Schätzung der AUC mit Hilfe eines Modells macht, besser beurteilen kann. Vergleicht man die berechneten und die geschätzten Werte für die AUC, kann man daraus die mittlere absolute prozentuale Abweichung des Schätzmodells berechnen. Diese Abweichung sollte in der Trainingsgruppe ähnlich hoch sein wie in der Testgruppe. Das Problem bei diesem Vorgehen liegt in der nicht vorhandenen Objektivierbarkeit. Daher kann ein Vergleich dieser Daten lediglich als Veranschaulichung der Genauigkeit des Schätzmodells dienen und nicht als statistisch valider Test.

Die Entwicklung der LSM-Modelle wird in Kapitel 6.5 durchgeführt. Das Vorgehen wird hier nochmals zusammengefaßt:

- Korrelations- und Regressionsanalysen mit der Trainingsgruppe und einem Prädiktor werden durchgeführt und Schätzmodelle entwickelt.
- Die Modelle werden am Testdatensatz geprüft und auf Stichprobenunabhängigkeit getestet.
- Es werden Schätzmodelle mit mehr als einem Prädiktor entwickelt und am Testdatensatz validiert.

- Die Modelle werden gegeneinander verglichen, insbesondere auf die Frage hin, wie viele Prädiktoren sinnvoll sind.

6.5 Entwicklung und Validierung verschiedener LSM-Modelle

Um die besten Prädiktoren für das Schätzmodell zu entwickeln, wurde das im vorigen Abschnitt beschriebene schrittweise Vorgehen durchgeführt. D.h. zunächst wurde versucht die AUC (als Zielvariable) mit einem Prädiktor, das sind die Plasmakonzentrationswerte $c(t)$ zu einem Zeitpunkt, zu korrelieren. Im Folgenden werden dann sukzessive weitere Prädiktoren hinzugefügt. Ziel ist es, für die jeweilige Prädiktorenanzahl das beste Modell, also die bestmögliche multiple Korrelation herauszuarbeiten. Im weiteren wird dann entschieden, ob durch Hinzufügen weiterer Prädiktoren ein wesentlicher Zugewinn an Schätzgenauigkeit erreicht werden kann. Dabei kann die Erhöhung der multiplen Korrelation (R) als Maß gelten.

Tabelle 9: Ergebnisse für die Regressionsanalyse der AUC mit einem Prädiktor $c(t)$ in der Trainingsgruppe

Prädiktor $c(t)$	Regressionsparameter		Korrelationskoeffizient (Trainingsgruppe)		Signifikanz p
	a	b	r	r^2	
15 min	241	-308	0,755	0,570	<0,001
30 min	279	15	0,800	0,640	<0,001
1 h	326	349	0,780	0,609	<0,001
2 h	430	366	0,791	0,626	<0,001
4 h	782	-401	0,903	0,816	<0,001
8 h	1308	1177	0,979	0,959	<0,001

Also wurde zunächst eine lineare Regressionsanalyse mit jeweils einem Prädiktor durchgeführt. Die Plasmakonzentrationen des ersten Zeitpunktes (2 min nach Infusionsende) eignen sich nicht als Prädiktor, da bei einigen Patienten festgestellt wurde, daß zu diesem Zeitpunkt das Etoposidphosphat

zu einem erheblichen Anteil noch phosphoriliert, also nicht in der Wirkform, im Blut vorhanden war (siehe Kapitel 5.1). In Tabelle 9 sind die Regressionsparameter für die sich ergebende Geradengleichung $AUC = a \cdot c(t) + b$, die Korrelationskoeffizienten r und die zugehörigen Signifikanzen p aufgeführt.

Alle Schätzgleichungen sind auf einem Niveau von $p = 0,01$ hoch signifikant. D.h. die Irrtumswahrscheinlichkeit, daß r im statistischen Sinne tatsächlich verschieden von 0 ist, also eine Korrelation zwischen den untersuchten Daten vorliegt, beträgt maximal 1%. Die Korrelationskoeffizienten variieren zwischen 0,755 und 0,979, was auf einen prinzipiell engen Zusammenhang zwischen den Plasmakonzentrationen zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten und der AUC hindeutet. Der 8 h Prädiktor erwies sich mit Abstand als bester Vorhersagewert.

Bei der linearen Regression zeigt r^2 das Verhältnis von durch den Prädiktor erklärbaren zur tatsächlichen Varianz der Zielvariable AUC an. Das bedeutet, daß bei dem 8 h-Modell knapp 96% der Varianz der AUC Werte durch die Plasmakonzentration 8 h nach Infusion vorhergesagt werden können. Für eine Schätzgleichung ist dies ein ausgezeichnete Wert. Im nachfolgenden sind die Schätzgleichungen nochmals aufgeführt:

$$AUC_{(15 \text{ min})} = 241 \cdot c(15 \text{ min}) - 308 \quad [M1]$$

$$AUC_{(30 \text{ min})} = 279 \cdot c(30 \text{ min}) + 15 \quad [M2]$$

$$AUC_{(1 \text{ h})} = 326 \cdot c(1 \text{ h}) + 349 \quad [M3]$$

$$AUC_{(2 \text{ h})} = 430 \cdot c(2 \text{ h}) + 366 \quad [M4]$$

$$AUC_{(4 \text{ h})} = 782 \cdot c(4 \text{ h}) - 401 \quad [M5]$$

$$AUC_{(8 \text{ h})} = 1308 \cdot c(8 \text{ h}) + 1177 \quad [M6]$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, \quad [c] = \mu\text{g/ml}$$

Die Modelle wurden nun am Testdatensatz validiert. Hierzu wurden die jeweiligen Plasmakonzentrationen der Teststichprobe in die Schätzgleichungen eingesetzt. Die sich so ergebenden Werte und die empirisch er-

hobenen „wahren“ Werte wurden miteinander korreliert und der Pearson Produkt Moment Korrelationskoeffizient berechnet. Dadurch erhält man eine Aussage darüber, wie gut der geschätzte Wert der AUC den empirischen Voraussagen kann. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Regressionsanalyse zwischen errechneten und tatsächlichen (empirischen) Werten für die AUC in der Testgruppe bei einem Prädiktor $c(t)$

Prädiktor $c(t)$	Korrelation zwischen errechneten und empirischen AUC-Werten in der Testgruppe		Signifikanz
	r'	r'^2	p
15 min	0,848	0,719	<0,001
30 min	0,905	0,819	<0,001
1 h	0,916	0,839	<0,001
2 h	0,953	0,908	<0,001
4 h	0,983	0,966	<0,001
8 h	0,972	0,945	<0,001

Für alle Modelle ist ein enger Zusammenhang zwischen errechneten und empirischen Werten zu erkennen. Alle Testergebnisse sind hochsignifikant. Die Korrelationen zeigen, daß die Schätzmodelle auf die Patienten der Testgruppe übertragbar sind. Bei dem „schlechtesten“ Modell konnten immer noch knapp 72 % der Varianz der AUC durch den Prädiktor erklärt werden.

Ein „gutes“ Schätzmodell sollte sich in gleicher Weise, also mit gleich hoher Korrelation, sowohl auf die Patienten des Trainingsdatensatzes wie auf die Stichprobe der Testpatienten anwenden lassen. Dazu muß festgestellt werden, ob sich die Korrelationen in beiden Stichproben signifikant unterscheiden. Getestet wird die Nullhypothese H_0 „geschätzte und empirische AUC im Trainingsdatensatz und Testdatensatz unterscheiden sich nicht“. Der standardnormalverteilte Testwert z kann nach der in Kapitel 6.4 genannten

Formel als statistische Prüfgröße für die Differenz der beiden Korrelationen angesehen werden. Da die Nullhypothese bewiesen werden soll, wird das Signifikanzniveau der H_0 auf $p = 0,1$, also 10 %, festgelegt. Aufgrund der Ungerichtetheit der Unterschiedshypothese sind als kritische Werte $z = -1,64$ und $z = +1,64$ anzunehmen. Das heißt, wenn der nach der Formel errechnete Betrag von z größer als 1,64 ist, so ist die H_0 zu verwerfen. Die beiden Korrelationen unterscheiden sich dann im statistischen Sinne signifikant und die dazugehörigen Schätzgleichungen eignen sich nicht für die Entwicklung eines LSM. In Tabelle 11 sind die Korrelationen zwischen den geschätzten und empirischen Werten in der Trainingsgruppe und in der Testgruppe und die dazugehörigen z -Werte aufgeführt.

Tabelle 11: Vergleich der Korrelationen zwischen Schätzung und empirischen Werten in der Trainings- und der Testgruppe bei einem Prädiktor $c(t)$

Prädiktor $c(t)$	Korrelationskoeffizient (Trainingsgruppe)	Korrelationskoeffizient (Testgruppe)	z -Wert
t	r	r'	z
15 min	0,755	0,848	1,00
30 min	0,800	0,905	0,98
1 h	0,780	0,916	1,25
2 h	0,791	0,953	2,00
4 h	0,903	0,983	2,31
8 h	0,979	0,972	0,50

Bei den Modellen mit den Prädiktoren 15 min, 30 min, 1 h und 8 h kann die Nullhypothese nicht widerlegt werden. Das heißt, daß sich die Korrelationen nicht signifikant voneinander unterscheiden und damit für ein Schätzmodell eignen. Das Modell mit dem 8 h Prädiktor weist die größte Korrelation auf, so daß es den anderen zu bevorzugen ist. Die Modelle mit den Prädiktoren 2 h und 4 h weisen zwar hohe Korrelationen zwischen geschätzten und

empirischen AUC-Werten auf, jedoch unterscheiden sich die Korrelationen in beiden Datensätzen signifikant voneinander (H_0 abgelehnt). Dies kann mehrere Ursachen haben, über die man nur Vermutungen anstellen kann. Um zu überprüfen, ob der Grund in der Verteilung der beiden Stichproben bzw. deren Größe besteht, müßte man deutlich mehr Daten akquirieren. Mithilfe des vorliegenden Datensatzes läßt sich lediglich die Aussage treffen, daß der Zusammenhang zwischen den gemessenen Plasmakonzentrationen nach 2 h bzw. 4 h und der AUC in den beiden Stichproben zu unterschiedlich ausfällt und sich aus diesem Grund die Regressionsgleichungen [G4] und [G5] nicht für ein Schätzmodell eignen.

Für eine weitere Optimierung der Schätzung sucht man nun nach Modellen, bei denen nicht nur ein Prädiktor, sondern zusätzlich ein zweiter herangezogen wird. Der Aufwand in der medizinischen Praxis wird dadurch erhöht, da zwei Blutabnahmen und Laborbestimmungen statt einer durchgeführt werden müssen. Es ist aber zu erwarten, daß Modelle mit zwei Prädiktoren die AUC exakter vorhersagen können als solche mit nur einem. Die Frage ist, ob sich ein merklicher Unterschied in der Vorhersagegenauigkeit feststellen läßt. Quantitativ läßt sich das durch einen Vergleich der Korrelationskoeffizienten feststellen. Man kann aus den 6 möglichen Prädiktoren 15 Paare kombinieren, mit denen anhand des Trainingsdatensatzes jeweils eine multiple lineare Regression durchgeführt wurde. Die Ergebnisse gibt Tabelle 12 wieder.

Alle Schätzgleichungen sind auf einem Niveau von $p = 0,01$ hoch signifikant. Es fällt auf, daß lediglich 5 der Schätzgleichungen eine höhere Korrelation aufweisen als das Ein-Prädiktor-Modell mit der höchsten Korrelation und die Unterschiede nur gering sind. Die besten Vorhersagen mit einem Zwei-Prädiktor-Modell lassen sich mit solchen Modellen erreichen, die den Prädiktor 8 h enthalten. Dies kann man aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse über die Ein-Prädiktor-Modelle auch so erwarten, da der 8 h Wert dort die größte Vorhersagekraft hatte.

Tabelle 12: Ergebnisse für die Regressionsanalyse der AUC bei zwei Prädiktoren $c(t_i)$ in der Trainingsgruppe

Prädiktor $c(t_1)$	Prädiktor $c(t_2)$	Regressionsparameter			Korrelationskoeffizient		Signifikanz p
		a_1	a_2	b	R	R^2	
t_1	t_2	a_1	a_2	b	R	R^2	p
15 min	30 min	-13	293	60	0,800	0,640	0,002
15 min	1 h	45	270	153	0,781	0,611	0,003
15 min	2 h	16	404	290	0,791	0,626	0,002
15 min	4 h	-78	970	20	0,910	0,828	< 0,001
15 min	8 h	64	1133	269	0,991	0,982	< 0,001
30 min	1 h	348	-84	-18	0,801	0,641	0,002
30 min	2 h	240	62	46	0,800	0,640	0,002
30 min	4 h	-158	1150	-122	0,916	0,839	< 0,001
30 min	8 h	71	1115	475	0,989	0,979	< 0,001
1 h	2 h	61	352	331	0,792	0,627	0,002
1 h	4 h	-101	973	-269	0,909	0,826	< 0,001
1 h	8 h	81	1128	536	0,989	0,978	< 0,001
2 h	4 h	-272	1189	-274	0,919	0,845	< 0,001
2 h	8 h	100	1132	606	0,987	0,975	< 0,001
4 h	8 h	206	1036	549	0,987	0,973	< 0,001

Nachfolgend sind die 5 Modelle mit einer gegenüber den Ein-Prädiktor-Modellen höheren Korrelation nochmals aufgeführt.

$$AUC_{(15 \text{ min}, 8\text{h})} = 64 \cdot c(15 \text{ min}) + 1133 \cdot c(8\text{h}) + 269 \quad [\text{M7}]$$

$$AUC_{(30 \text{ min}, 8\text{h})} = 71 \cdot c(30 \text{ min}) + 1115 \cdot c(8\text{h}) + 475 \quad [\text{M8}]$$

$$AUC_{(1 \text{ h}, 8\text{h})} = 81 \cdot c(1 \text{ h}) + 1128 \cdot c(8\text{h}) + 536 \quad [\text{M9}]$$

$$AUC_{(2 \text{ h}, 8\text{h})} = 100 \cdot c(2 \text{ h}) + 1132 \cdot c(8\text{h}) + 606 \quad [\text{M10}]$$

$$AUC_{(4 \text{ h}, 8\text{h})} = 206 \cdot c(4 \text{ h}) + 1036 \cdot c(8\text{h}) + 549 \quad [\text{M11}]$$

[AUC] = min· $\mu\text{g/ml}$, [c] = $\mu\text{g/ml}$

Fünfzehn Zwei-Prädiktor-Modelle werden wie oben beschrieben am Testdatensatz validiert. In Tabelle 13 sind die sich ergebenden Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen aufgeführt.

Tabelle 13: Ergebnisse der Regressionsanalyse zwischen errechneten und tatsächlichen (empirischen) Werten für die AUC in der Testgruppe bei zwei Prädiktoren $c(t_i)$

Prädiktor $c(t_1)$	Prädiktor $c(t_2)$	Korrelation zwischen errechneten und empirischen AUC-Werten		Signifikanz p
		R'	R'^2	
t_1	t_2	R'	R'^2	p
15 min	30 min	0,907	0,823	< 0,001
15 min	1 h	0,908	0,824	< 0,001
15 min	2 h	0,950	0,902	< 0,001
15 min	4 h	0,989	0,978	< 0,001
15 min	8 h	0,992	0,984	< 0,001
30 min	1 h	0,897	0,805	< 0,001
30 min	2 h	0,916	0,839	< 0,001
30 min	4 h	0,986	0,972	< 0,001
30 min	8 h	0,989	0,978	< 0,001
1 h	2 h	0,950	0,903	< 0,001
1 h	4 h	0,987	0,974	< 0,001
1 h	8 h	0,987	0,974	< 0,001
2 h	4 h	0,976	0,953	< 0,001
2 h	8 h	0,986	0,972	< 0,001
4 h	8 h	0,989	0,978	< 0,001

Die Validierung an der Testgruppe ergibt für alle Modelle hochsignifikante Ergebnisse. Die Korrelationskoeffizienten sind mit einigen Ausnahmen ähnlich hoch wie in der Trainingsgruppe. Um statistisch zu überprüfen, ob sich die Korrelationen in beiden Datensätzen signifikant voneinander unterscheiden,

wird der weiter oben beschriebene z-Wert berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgeführt. Nicht signifikant voneinander ($p = 0,1$) unterscheiden sich die Korrelationen im Trainings- und Testdatensatz dann, wenn $|z| < 1,65$.

Tabelle 14: Vergleich der Korrelationen zwischen Schätzung und empirischen Werten in der Trainings- und der Testgruppe bei zwei Prädiktoren $c(t_i)$

Prädiktor $c(t_1)$	Prädiktor $c(t_2)$	Korrelationskoeffizient (Trainingsgruppe)	Korrelationskoeffizient (Testgruppe)	z-Wert
t_1	t_2	R	R'	z
15 min	30 min	0,907	0,800	0,98
15 min	1 h	0,908	0,781	1,18
15 min	2 h	0,950	0,791	1,86
15 min	4 h	0,989	0,910	2,74
15 min	8 h	0,992	0,991	0,14
30 min	1 h	0,897	0,801	0,85
30 min	2 h	0,916	0,800	1,12
30 min	4 h	0,986	0,916	2,17
30 min	8 h	0,989	0,989	0,00
1 h	2 h	0,950	0,792	1,86
1 h	4 h	0,987	0,909	2,24
1 h	8 h	0,987	0,989	0,50
2 h	4 h	0,976	0,919	1,46
2 h	8 h	0,986	0,987	0,09
4 h	8 h	0,989	0,987	0,50

Es zeigt sich, daß sich bei einigen Schätzmodellen die Korrelationen in beiden Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Dies sind die nicht fettgedruckten Modelle, die sich aufgrund dieser Eigenschaft nicht für die Entwicklung eines LSM eignen. Das Modell mit der höchsten und fast identischen

Korrelation in beiden Gruppen ist das mit den Prädiktoren 15 min und 8 h. Daher ist diesem Schätzmodell gegenüber den anderen der Vorzug zu geben. Vergleicht man die Korrelationen dieses Modells mit dem 8h-Ein-Prädiktor-Modell, so fällt auf, daß der Unterschied nur gering ist. In der Trainingsgruppe wächst die Korrelation von 0,979 auf 0,992, in der Testgruppe von 0,972 auf 0,987. Anschaulich bedeutet dies, daß man in der Testgruppe 95,8 % der Varianz der AUC Werte mit dem 8 h-Plasmawert vorhersagen kann und durch Hinzuziehen des 15 min Prädiktors sogar 98,4 %. In der Testgruppe ergibt sich ein Zuwachs von 94,5 % auf 98,2 %. Diese Zahlen verdeutlichen, daß der Zuwachs an Genauigkeit in den Vorhersagen zwar vorhanden und statistisch objektiviert ist, aber insgesamt nur ein sehr geringer Güteunterschied zwischen beiden Modellen besteht. Weitere Prädiktorkombinationen mit hoher Schätzgüte sind 30 min und 8 h bzw. 4 h und 8 h. Diese Modelle liegen bei der Korrelation nur knapp hinter dem „besten“ Modell mit 15 min und 8 h.

Es stellt sich die Frage, ob Schätzmodelle mit drei Prädiktoren nochmals einen Zugewinn an Genauigkeit bedeuten. Dazu werden die 6 Prädiktoren zu 20 möglichen Dreierkombinationen zusammengestellt. Die berechneten Regressionsparameter, zugehörigen Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

Alle Schätzgleichungen liegen auf einem hochsignifikanten Niveau ($p = 0,01$). Die Vorhersagen sind nicht wesentlich besser als bei den Zwei-Prädiktor-Modellen. Um die Frage beantworten zu können, ob man mit dem dritten Prädiktor tatsächlich eine höhere Güte der Schätzung erreicht, vergleicht man jeweils die Modelle mit den höchsten Korrelationskoeffizienten miteinander. Die vier „besten“ Modelle aus Tabelle 15 erreichen alle einen Wert von 0,991 und liegen somit auf dem gleichen Niveau wie das beste Zwei-Prädiktor-Modell. Daraus wird ersichtlich, daß ein dritter Prädiktor keinen weiteren Zuwachs an Schätzgüte bewirkt. Dafür spricht auch, daß in den „besten“ Drei-Prädiktor-Modellen immer die Prädiktoren 15 min und 8 h enthalten sind, die sich schon bei den Zwei-Prädiktor-Modellen als die besten Vorhersagewerte bewährt haben. Die Entwicklung der verschiedenen Limited Sampling Modelle

kann damit abgeschlossen werden, da nach den vorliegenden Ergebnissen ein weiterer Prädiktor die Schätzgüte auch nicht weiter verbessern wird.

Tabelle 15: Ergebnisse für die Regressionsanalyse der AUC bei drei Prädiktoren $c(t_i)$ in der Trainingsgruppe

Prä-diktor $c(t_1)$	Prä-diktor $c(t_2)$	Prä-diktor $c(t_3)$	Regressionsparameter				Korrelationskoeffizient		Signifi-kanz
			a_1	a_2	a_3	b	R	R^2	
t_1	t_2	t_3	a_1	a_2	a_3	b	R	R^2	p
15 min	30 min	1 h	-2	349	-82	-9	0,801	0,641	< 0,001
15 min	30 min	2 h	-19	251	77	120	0,800	0,641	< 0,001
15 min	30 min	4 h	-2	-155	1150	-114	0,916	0,839	< 0,001
15 min	30 min	8 h	57	9	1128	277	0,991	0,982	< 0,001
15 min	1 h	2 h	7	57	348	303	0,792	0,627	< 0,001
15 min	1 h	4 h	-56	-42	997	-42	0,911	0,829	< 0,001
15 min	1 h	8 h	60	6	1131	279	0,991	0,982	< 0,001
15 min	2 h	4 h	15	-296	1189	-344	0,919	0,845	< 0,001
15 min	2 h	8 h	84	-40	1150	218	0,991	0,982	< 0,001
15 min	4 h	8 h	74	-45	1167	271	0,991	0,982	< 0,001
30 min	1 h	2 h	300	-108	107	27	0,801	0,642	< 0,001
30 min	1 h	4 h	-356	212	1215	-47	0,920	0,847	< 0,001
30 min	1 h	8 h	44	32	1117	488	0,989	0,979	< 0,001
30 min	2 h	4 h	-17	-250	1195	-254	0,919	0,845	< 0,001
30 min	2 h	8 h	133	-101	1120	426	0,990	0,980	< 0,001
30 min	4 h	8 h	91	-74	1158	501	0,989	0,979	< 0,001
1 h	2 h	4 h	194	-539	1223	764	0,924	0,854	< 0,001
1 h	2 h	8 h	118	-51	1137	540	0,989	0,979	< 0,001
1 h	4 h	8 h	77	16	1118	524	0,989	0,978	< 0,001
2 h	4 h	8 h	80	47	1104	574	0,988	0,975	< 0,001

Die Drei-Prädiktor-Modelle werden am Testdatensatz validiert. Hierzu werden wieder die Plasmakonzentrationen des Testdatensatzes in die Schätzgleichungen eingesetzt und mit den wahren Werten für die AUC verglichen. Zur besseren Übersicht wurden in Tabelle 16 nur die vier besten Modelle einer Validierung unterzogen, da diese Modelle den restlichen aufgrund der höheren Vorhersagegenauigkeit vorzuziehen sind.

Tabelle 16: Ergebnisse der Regressionsanalyse zwischen errechneten und tatsächlichen (empirischen) Werten für die AUC in der Testgruppe bei drei Prädiktoren $c(t_i)$

Prädiktor $c(t_1)$	Prädiktor $c(t_2)$	Prädiktor $c(t_3)$	Korrelation zwischen errechneten und empirischen AUC- Werten		Signifikanz p
			R'	R'^2	
t_1	t_2	t_3			
15 min	30 min	8 h	0,992	0,984	< 0,001
15 min	1 h	8 h	0,992	0,984	< 0,001
15 min	2 h	8 h	0,992	0,984	< 0,001
15 min	4 h	8 h	0,991	0,982	< 0,001

Alle Modelle liegen auf einem hochsignifikanten Niveau und erreichen nahezu identische Korrelationen wie in der Trainingsgruppe. Trotz der nahezu identischen Ergebnisse wurden die Korrelationen auf die Frage hin untersucht, ob sie sich signifikant voneinander unterscheiden. Die z-Werte sind in Tabelle 17 aufgeführt. Alle z-Werte waren kleiner als 1,65. Daher konnte, wie erwartet, bei keinem der Modelle ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Korrelationen im Trainings- bzw. Testdatensatz gefunden werden.

Tabelle 17: Vergleich der Korrelationen zwischen Schätzung und empirischen Werten in der Trainings- und der Testgruppe bei drei Prädiktoren $c(t_i)$

Prädiktor $c(t_1)$	Prädiktor $c(t_2)$	Prädiktor $c(t_3)$	Korrelation (Trainingsgruppe)	Korrelation (Testgruppe)	z-Wert
t_1	t_2	t_3	R	R'	z
15 min	30 min	8 h	0,991	0,992	0,14
15 min	1 h	8 h	0,991	0,992	0,14
15 min	2 h	8 h	0,991	0,992	0,14
15 min	4 h	8 h	0,991	0,991	0

6.6 Berechnung des mittleren Schätzfehlers

In Kapitel 6.5 wurden die verschiedenen Limited Sampling Modelle entwickelt, statistisch validiert und auf Stabilität bei der Übertragung auf eine andere Stichprobe überprüft. Um eine Vorstellung davon zu vermitteln, wie hoch der Fehler bei der Anwendung eines LSM ist, soll nun der mittlere Schätzfehler berechnet werden. Dies ist insbesondere für die medizinische Praxis von Bedeutung, um dem behandelnden Arzt zu verdeutlichen, in welchem Ausmaß ein Fehler in Betracht gezogen werden muß. Dies kann bei Patienten in kritischem Zustand von erheblicher Bedeutung für die Behandlung sein, wenn es um die Frage geht, wie hoch ein Zytostatikum, in dem Falle Etoposid, dosiert werden soll bzw. wie verlässlich die Aussage eines LSM ist.

Der mittlere Schätzfehler berechnet sich für jedes Modell als arithmetisches Mittel aus den prozentualen Abweichungen zwischen den Schätzwerten und den wahren Werten für die AUC. Ob es sich dabei um eine Über- oder Unterschätzung handelt, spielt keine Rolle. Es soll also der Betrag der prozentualen Abweichung betrachtet werden. Von einem „guten“ LSM, d.h. einem Modell mit hoher Korrelation zwischen geschätzten und wahren Werten erwartet man folglich einen niedrigen Schätzfehler und umgekehrt. In Tabelle 18 sind die jeweils besten Ein-, Zwei-, und Drei-Prädiktor-Modelle mit ihren jeweiligen

mittleren Schätzfehlern aufgeführt. Bei der Berechnung wurden die Daten von allen 30 Patienten zugrunde gelegt, also nicht nur die der Trainingsgruppe. Dadurch ergibt sich ein realistischeres Bild als wenn man nur Daten nehmen würde anhand derer die Modelle entwickelt wurden.

Wie erwartet wird der mittlere Schätzfehler kleiner je mehr Prädiktoren berücksichtigt werden. Zwischen den Zwei- und Drei-Prädiktor-Modellen sind die Unterschiede aber nur sehr gering. Das Modell mit den Prädiktoren 15 min und 8 h hat den gleichen Schätzfehler wie das ‚beste‘ Drei-Prädiktor-Modell. Dadurch wird auch in dieser Betrachtung deutlich, daß die Berücksichtigung eines dritten Prädiktors keine verbesserte Vorhersagegenauigkeit bewirkt. Der kleinste mittlere Schätzfehler liegt bei 6,7 %.

Tabelle 18: Mittlere absolute Schätzfehler ausgewählter Modelle

Prädiktor c(t₁)	Prädiktor c(t₂)	Prädiktor c(t₃)	Mittlerer Fehler Training	Mittlerer Fehler Test	Mittlerer Fehler Gesamt
t₁	t₂	t₃	%	%	%
30 min			15,6	22,1	18,9
1 h			18,4	20,8	19,6
8 h			8,7	12,8	10,8
15 min	8 h		6,2	7,1	6,7
30 min	8 h		6,4	7,8	7,1
1 h	8 h		6,9	8,0	7,5
2 h	8 h		7,2	7,6	7,4
15 min	30 min	8 h	6,2	7,1	6,7
15 min	1 h	8 h	6,3	7,3	6,8
15 min	2 h	8 h	6,0	7,4	6,7
15 min	4 h	8 h	6,1	7,6	6,9

7 Diskussion und Ausblick

7.1 Schätzgüte der Modelle

In Kapitel 6.5 wurden mehrere Limited Sampling Modelle für die Schätzung der Fläche unter der Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) von Etoposid nach intravenöser Applikation von Etoposid-Phosphat entwickelt. Die Modelle unterscheiden sich in der Anzahl der für die Vorhersage verwendeten Meßwerte (Prädiktoren) und den Zeitpunkten, zu denen die jeweiligen Meßwerte erhoben wurden. Je nach Anzahl und Auswahl der Prädiktoren ergeben sich Modelle mit unterschiedlicher Schätzgüte. Mathematisch drückt sich die Güte der Schätzung in der Höhe des Korrelationskoeffizienten aus. Das gesuchte Schätzmodell soll in der klinischen Routine eingesetzt werden. Daher wird an ein optimales Modell die Anforderung gestellt, bei geringem zeitlichen Aufwand eine möglichst genaue Schätzung zu gewährleisten. Der zeitliche Aufwand wird in erster Linie durch die aufwendige Probenpräparation und die anschließende quantitative Messung im Massenspektrometer bestimmt (siehe Kapitel 4). Von daher wäre ein Modell mit wenigen Prädiktoren (am besten nur einem) wünschenswert. Der apparative und zeitliche Aufwand wäre dann am geringsten. Auf der anderen Seite muß ein optimales Modell für den klinischen Routinebetrieb eine ausreichende Schätzgenauigkeit haben, um sicherzustellen, daß die Dosierung des Zytostatikums an die individuellen Gegebenheiten des Patienten angepaßt sind, um die bestmögliche Therapie zu gewährleisten. Da anzunehmen ist, daß eine höhere Schätzgenauigkeit eines Modells eine Berücksichtigung von mehr Prädiktoren erfordert, muß man bei der Entwicklung eines „optimalen“ Modells einen geeigneten Mittelweg zwischen dem zeitlichen Aufwand (d.h. möglichst wenige Prädiktoren) und der Schätzgenauigkeit (d.h. möglichst viele Prädiktoren) wählen.

Wie oben erwähnt, ist der Korrelationskoeffizient eine geeignete mathematische Größe, um die in Kapitel 6.5 entwickelten Modelle hinsichtlich der Schätzgenauigkeit miteinander zu vergleichen. Bei Berücksichtigung eines Prädiktors ist der zeitliche Aufwand mit nur einer Messung pro Patient sehr

gering. Das beste Modell ist hierbei das mit dem 8 h-Prädiktor. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten beträgt 0,959. Das heißt ca. 96 % der Varianz des Zielwertes werden allein durch den Meßwert 8 Stunden nach Infusionsende bestimmt (siehe Kapitel 6.5). Dies ist ein sehr guter Wert für eine Schätzung und belegt die gute Vorhersagbarkeit der AUC auf der Basis eines einzelnen Meßpunktes. Das zweitbeste Modell mit einem Prädiktor basiert auf dem 4 h-Meßwert. Hierbei ergibt sich ein Wert für R^2 von 0,802, d.h. nur noch etwa 80 % der Varianz der Zielgröße AUC werden durch diesen Meßwert erklärt. Allerdings sind die Unterschiede der Vorhersagegenauigkeit im Trainings- und Testdatensatz so erheblich (siehe Kapitel 6.5), daß im Rahmen der vorliegenden Ergebnisse dieses Modell aus statistischen Gründen nicht als ein geeignetes Limited Sampling Modell angesehen werden kann. Das „nächstbeste“ Modell ist das mit dem Prädiktor 30 min. Hier beträgt R^2 0,64 und liegt damit deutlich unter dem des 8h-Modells. Will man in einem Schätzmodell also lediglich einen Meßwert berücksichtigen, ist auf jeden Fall das Modell mit dem 8 h-Prädiktor vorzuziehen. Der Vorteil des 30 min-Modells läge in der besseren zeitlichen Planbarkeit der Blutprobenanalysen. Am Tag 1 eines Zyklus könnte der Patient morgens die erste Infusion Etoposid-Phosphat erhalten, nach 30 Minuten würde lediglich eine Probe abgenommen werden und bis zum Abend könnte ein Meßergebnis vorliegen, so daß schon am nächsten Tag die Dosierung individuell an den Patienten angepaßt erfolgen könnte. Dies wäre bei dem 8 h-Modell schwieriger zu bewerkstelligen, da die 8h-Probe erst am späten Nachmittag dem Labor zur Analyse zur Verfügung stünde. Allenfalls müßte die Applikation des Etoposid-Phosphats am folgenden Tag erst spät gegen Abend erfolgen, um zunächst das Meßergebnis vom vorherigen Tag abzuwarten. Trotz der organisatorischen Vorteile bei Verwendung des 30 min-Modells kann es aufgrund der großen Ungenauigkeit nicht als ein klinisch praktizierbares Verfahren angesehen werden.

Berücksichtigt man einen weiteren Prädiktor, so erhöht sich die Schätzgenauigkeit. Das „beste“ Zwei-Prädiktor-Modell mit den Meßwerten 15 min und 8 h nach Infusionsende hat ein R^2 von 0,982. Das heißt, über 98 % der

Varianz der Zielvariable AUC wird durch diese zwei Prädiktoren erklärt. Der Zuwachs an Schätzgenauigkeit ist verglichen zu dem „besten“ Ein-Prädiktor-Modell gering. Für die klinische Routine würde eine weitere Blutabnahme 15 min nach Infusionsende einen kaum erhöhten Aufwand bedeuten. Allerdings wäre der Aufwand im Labor größer als bei nur einer Analyse pro Patient. Da es kaum ökonomisch wäre, beide Proben einzeln zu bestimmen, würde man mit der Analyse der 15 min Probe warten bis die 8 h Probe vorliegt. Das würde allerdings - wie schon oben erwähnt - bedeuten, daß die Ergebnisse für die folgende Infusion erst spät am darauffolgenden Tag zur Verfügung stünden.

Die Hinzunahme eines weiteren Prädiktors stellt hinsichtlich Schätzgenauigkeit keine weitere Verbesserung dar. Insgesamt vier Drei-Prädiktor-Modelle erreichen den gleichen Korrelationskoeffizienten wie das beste Zwei-Prädiktor-Modell mit den Meßwerten 15 min und 8 h. Beide Prädiktoren sind in den vier genannten Modellen enthalten, was auf die hohe Vorhersagekraft dieser beiden Parameter für die AUC deutet. Für die klinische Routine haben die Drei-Prädiktor-Modelle keine Bedeutung, da lediglich der Aufwand durch eine weitere Blutspiegelbestimmung erhöht wird, die Schätzgenauigkeit eines solchen Modells sich aber nicht verbessert.

In der Praxis würde man sich also entweder für das Modell mit einem 8 h-Prädiktor oder für das Modell mit zwei Prädiktoren (15 min und 8 h) entscheiden. Der Vorteil des ersten liegt in dem geringeren zeitlichen Aufwand für die Messungen bei einer guten Vorhersagbarkeit der AUC. Will man die AUC noch genauer vorhersagen, sollte das zweite Modell gewählt werden, was allerdings den Nachteil eines höheren Aufwandes für eine weitere Blutspiegelbestimmung pro Patient bedeutet. Letztlich muß der Arzt entscheiden, welcher Fehler toleriert werden kann. Im Vergleich zu einer Dosierung allein anhand der Körperoberfläche, wie sie heute gang und gäbe ist, bedeutet eine anhand der abgeschätzten AUC angepaßte Dosierung eine deutliche Verbesserung der Behandlung für den Patienten. Dies sollte bei den Überlegungen, welches Modell geeigneter ist, immer berücksichtigt werden. Ob die

AUC schließlich mit einem oder zwei Meßwerten abgeschätzt wird, ist verglichen mit dem grundlegenden Fortschritt schon fast zweitrangig. Um die gute Vorhersagegenauigkeit des Modells [M7] zu belegen, wurden die gemessene AUC als Funktion der geschätzten AUC in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt.

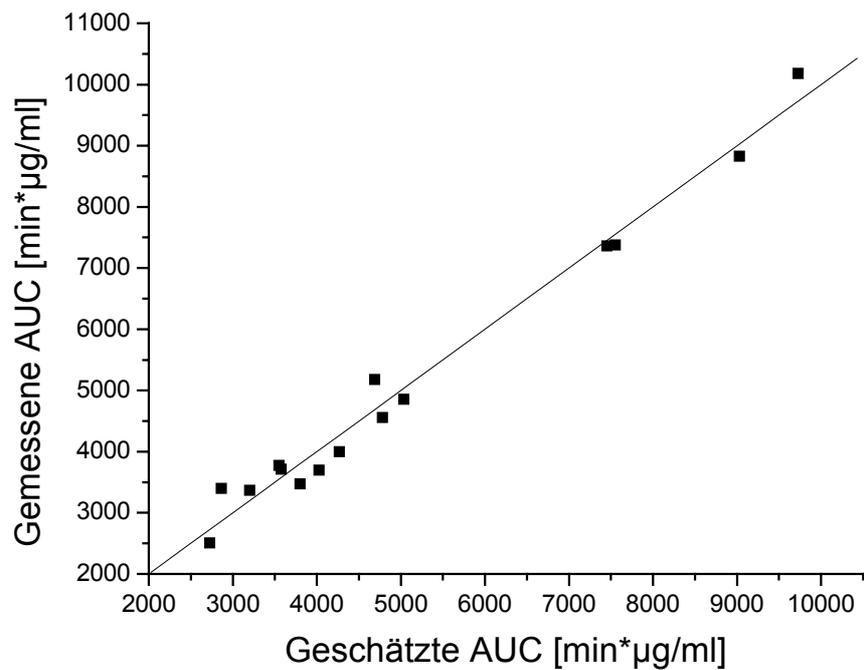


Abbildung 6: Korrelation der geschätzten und gemessenen AUC des Trainingsdatensatz für das Modell [M7]

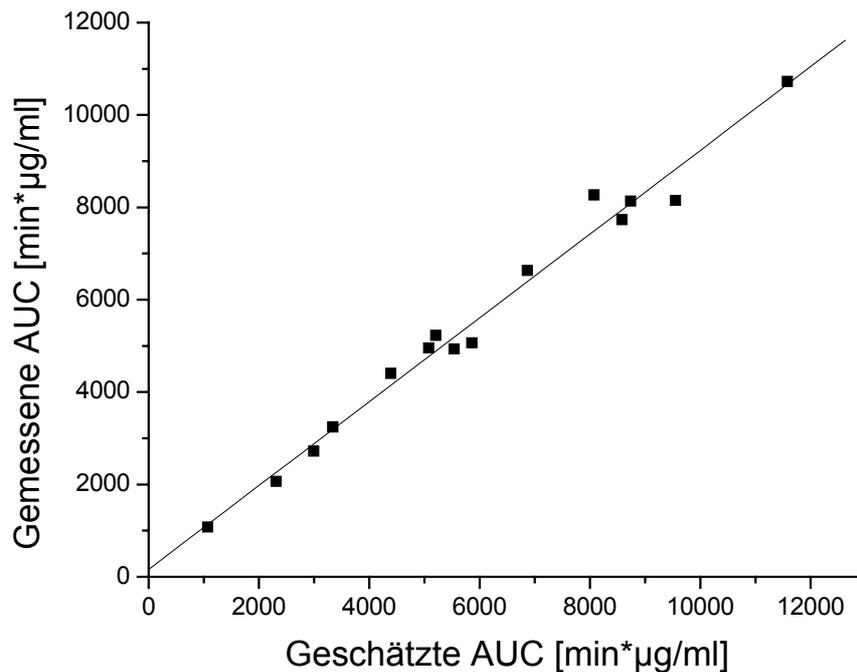


Abbildung 7: Korrelation der geschätzten und gemessenen AUC des Testdatensatz für das Modell [M7]

7.2 Vergleich mit anderen LSM

Sessa et al. publizierten 1995 eine Studie über die Pharmakokinetik von Etoposid nach oraler und intravenöser Applikation von Etoposid-Phosphat an 35 Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren und Lymphomen /Ses95/. Im Rahmen dieser Studie wurden auch Limited Sampling Modelle entwickelt. Es können nur LSM verglichen werden, bei denen das Etoposid-Phosphat auf dem gleichen Weg appliziert wurde wie in der vorliegenden Untersuchung, also als intravenöse Infusion. Die beste Schätzgleichung für Modelle mit einem Prädiktor lautete nach Sessa:

$$AUC_{(4h)} = 598 \cdot c(4h) + 2364$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, [c] = \mu\text{g/ml}$$

c(4h) ist die Etoposidplasmakonzentration vier Stunden nach Infusionsende. Die Dauer der Infusion betrug hierbei 30 Minuten. Im Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde als bester Prädiktor der Meßwert nach 4 Stunden bestimmt. Leider wurden keine näheren Angaben zu einem Modell mit dem Meßwert nach 8 Stunden gemacht, so daß man lediglich das Modell nach Sessa mit dem Modell M4 vergleichen kann. Dies ist untenstehend nochmals aufgeführt.

$$AUC_{(4h)} = 782 \cdot c(4h) - 401 \quad [M4]$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, \quad [c] = \mu\text{g/ml}$$

Es fällt auf, daß der Vorfaktor relativ gut übereinstimmt, während sich die zu addierende Konstante unterscheidet. Das kann mehrere Ursachen haben. Zum einen unterscheiden sich die Infusionszeiten in beiden Untersuchungen deutlich voneinander, was auch eine Veränderung des Limited Sampling Models nach sich ziehen wird. Das könnte auch eine Erklärung dafür sein, daß ein anderer Meßwert als der geeignetste für ein Ein-Prädiktor-Modell bestimmt wurde. Allerdings können diese Aussagen nicht statistisch belegt werden. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß es sich in beiden Studien um relativ kleine Stichproben handelte und schon kleine Unterschiede in der Zusammensetzung der Patienten (Art der Erkrankung, Alter, u.s.w.) Auswirkungen auf das LSM haben können. Um genauere Aussagen treffen zu können, müßten die Bedingungen identisch gewählt werden (Infusionszeit, Auswahl der Patienten) und evtl. noch die Stichprobe erhöht werden.

Als bestes Zwei-Prädiktor-Modell gibt Sessa ein Modell mit den Meßwerten nach 2h und 12h an, was wie folgt lautet:

$$AUC_{(2h, 12h)} = 326 \cdot c(2h) + 1167 \cdot c(12h) + 648$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, \quad [c] = \mu\text{g/ml}$$

Dieses Modell läßt sich nur schwer mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichen, da der letzte Meßpunkt in der vorliegenden Arbeit nach 8 h bestimmt wurde. Dies war zum einen durch die schlechtere Nachweisgrenze

der quantitativen Massenspektrometrie gegenüber der HPLC, die bei Sessa eingesetzt wurde, begründet. Zum anderen gab es organisatorische Schwierigkeiten (Kooperation der Patienten, stationäre Organisation), eine spätere Blutprobe mitten in der Nacht abzunehmen. Um die Ähnlichkeit der Modelle zu zeigen, wird das Modell M10 zum „Vergleich“ aufgeführt:

$$\text{AUC}_{(2\text{ h}, 8\text{ h})} = 100 \cdot c(2\text{ h}) + 1132 \cdot c(8\text{ h}) + 606 \quad [\text{M10}]$$

$$[\text{AUC}] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, \quad [c] = \mu\text{g/ml}$$

In anderen Untersuchungen wurden Limited Sampling Modelle nach Applikation von unphosphoriliertem Etoposid untersucht. Da die Randbedingungen im Vergleich zur Verwendung von Etoposid-Phosphat einige prinzipielle Unterschiede aufweisen, lassen sich diese Untersuchungen nur sehr bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichen. Zum Beispiel ist die erforderliche Infusionsdauer bei der Verwendung von unphosphoriliertem Etoposid deutlich länger, da es aufgrund von Nebenwirkungen (siehe Kapitel 2.1) nur sehr langsam appliziert werden darf. Die Dauer variiert je nach Studie zwischen 30 Minuten bei Normaldosisprotokollen und zwei Stunden bei Hochdosistherapien. Weiterhin kann sich ein prodrug hinsichtlich Pharmakokinetik deutlich von der „Muttersubstanz“ unterscheiden. Selbst wenn die AUC bei beiden Substanzen gleich ist (gleiche Bioverfügbarkeit), kann der Verlauf der Wirkstoffspiegel-Zeit-Kurve Unterschiede aufweisen. Limited Sampling Modelle von beiden Substanzen können daher nur sehr bedingt verglichen werden.

Holz et al. haben 1995 Limited Sampling Modelle für Therapien mit Etoposid entwickelt /Hol95/. Diese Arbeit wurde ebenfalls im massenspektrometrischen Labor bei Herrn Prof. Jungclas mit der PDMS durchgeführt. Der beste univariate Parameter acht Stunden nach Infusionsende konnte bestätigt werden mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,89$. Das zugehörige Modell wurde in der Veröffentlichung nicht explizit aufgeführt, so daß kein direkter Vergleich erfolgen kann. Das beste Zwei-Prädiktor-Modell mit einem

Korrelationskoeffizienten von 0,96 beinhaltet die Parameter 4 h und 8 h nach Infusionsende und lautete wie folgt:

$$AUC_{(4\text{ h}, 8\text{ h})} = 343 \cdot c(4\text{ h}) + 650 \cdot c(8\text{ h}) + 1252$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, [c] = \mu\text{g/ml}$$

Demgegenüber wird das Modell M11 gestellt:

$$AUC_{(4\text{ h}, 8\text{ h})} = 206 \cdot c(4\text{ h}) + 1036 \cdot c(8\text{ h}) + 549 \quad [M11]$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, [c] = \mu\text{g/ml}$$

Auch hier ist ein direkter Vergleich schwierig. Der Faktor vor dem 8 Stunden Wert ist gegenüber der vorliegenden Untersuchung kleiner, während der konstante Summand größer ist. Aufgrund der vorangegangenen Bemerkungen läßt sich lediglich schließen, daß ein LSM für Etoposid nicht ohne weiteres auf Etoposid-Phosphat übertragen werden kann.

Im Folgenden werden weitere Publikationen aufgeführt, in denen Schätzmodelle für unphosphoriliertes Etoposid entwickelt wurden.

Ein früheres Modell wurde von Miller et al. publiziert /Mil92/. Als beste Parameter für ein LSM wurden die beiden Meßwerte 2h und 4h nach Infusionsende bestimmt. Der Trainings- und Testdatensatz wurde von Patienten gebildet, die an einem fortgeschrittenen kleinzelligen Bronchialkarzinom erkrankt waren. Die Dosierung des Etoposid war einheitlich auf 150 mg/m² festgelegt und die Infusionsdauer betrug 1h. Die Schätzformel lautet.

$$AUC_{(2\text{ h}, 4\text{ h})} = 386 \cdot c(2\text{ h}) + 710 \cdot c(4\text{ h}) + 1545$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, [c] = \mu\text{g/ml}$$

Zu beachten ist bei diesem Modell, daß es anhand eines homogenen Datensatz mit einheitlicher Dosierung aufgestellt wurde. Daher kann es in Bezug auf Tumorerogenität und Dosierung lediglich auf vergleichbare Patientengruppen angewendet werden.

Strømgren et al. untersuchten 1993 ebenfalls Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom, die Etoposid als 90 minütige Infusion mit einer Dosierung

von 100 mg/m² erhielten /Str93/. Die Plasmakonzentrationswerte wurden über einen Zeitraum von 21h beobachtet. Als bester Parameter für ein univariates LSM wurde der Meßwert nach 4h bestimmt. Als Korrelationskoeffizient ergab sich hierbei ein Wert von 0,96. Die Schätzformel lautet:

$$AUC_{(4h)} = 1,01 \cdot (\text{peaklevel} / 100 \text{ mg m}^{-2}) + 799 \cdot c(4h)$$

Der peaklevel ist der Meßwert mit der höchsten Plasmakonzentration innerhalb einer Patientenkinetik. Es handelt sich also eigentlich um ein Zwei-Prädiktor-Modell. Das Problem bei diesem Vorgehen liegt darin, daß der Moment der größten Plasmakonzentration nicht immer mit dem Zeitpunkt einer Blutabnahme zusammenfällt. Zudem ist es in Anbetracht des steilen Abfalls der Plasmaspiegelkurve zu Beginn einer Kinetik möglich, daß kleinere Abweichungen des Zeitpunktes der Blutabnahme vom vorgeschriebenen Entnahmezeitpunkt große Auswirkungen auf den Plasmawert des peaklevel haben. Weiterhin ist zu beachten, daß die Anwendbarkeit des Modells auf solche Patienten beschränkt ist, die hinsichtlich Dosierung und Art der Erkrankung vergleichbar mit den Vorgaben der Studie ist. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Patienten mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Erkrankungen aufgenommen, die mit unterschiedlichen Dosierungen Etoposid behandelt wurden. Dies stellt die Anwendbarkeit der entwickelten Modelle auf eine breite Patientenschicht sicher.

7.3 Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell zur Abschätzung der pharmakokinetischen Größe AUC wäre hinsichtlich seiner Praktikabilität und Effizienz für den Einsatz in der klinischen Routine sehr gut geeignet. Mit der Schätzgleichung [M7] ist es möglich, mit nur zwei Messungen der Plasmakonzentration die AUC sehr genau zu bestimmen. Mithilfe dieses Modells könnten pharmakokinetische Daten über die Therapie mit Etoposidphosphat an großen Patientenkollektiven ermittelt werden. Diese Daten könnten dann

für ein genaues Studium der Dosis-Wirkungs-Beziehung herangezogen werden, um die Therapie mit Etoposid in Zukunft genauer und effektiver gestalten zu können. Besonders interessant wären die Ergebnisse im Hinblick auf Hochdosistherapien, bei denen man hohe Mengen Chemotherapeutika appliziert, die eine anschließende Transplantation von Knochenmark erforderlich macht. Wenn man in der Lage ist, die Wirkung einer Etoposid-Therapie genauer abschätzen zu können, könnte man unter Umständen viele Patienten mit dosisoptimierten Normaldosisprotokollen bei gleicher Effektivität behandeln und sie damit vor den gefährlichen Nebenwirkungen einer Hochdosistherapie mit anschließender Knochenmarkstransplantation bewahren.

Dieses Verfahren ließe sich analog auch auf andere Chemotherapeutika übertragen. Grundsätzlich besteht der Wunsch einer genaueren Dosierung bei allen Medikamenten, die die Zellteilung hemmen. da bei allen Substanzen dieser Gruppe bei Überdosierung eine Schädigung des Knochenmarks als Nebenwirkung mit ernsthaften Folgen für den Patienten auftreten kann. Die Frage ist natürlich, ob für die Messung der anderen Zytostatika die PDMS-Methode geeignet ist. Zur Zeit ist sie lediglich für die Substanzen Etoposid und Teniposid validiert, wobei auch schon Versuche mit Taxol (Paclitaxel®) durchgeführt wurden. Als alternative Methode für andere Substanzen bietet sich die HPLC an, die für viele Substanzen genaue Meßergebnisse liefert.

8 Zusammenfassung

Limited Sampling Modelle sollen die Fläche unter der Zeit-Wirkstoffspiegelkurve („area under the curve“, AUC) von Medikamenten anhand von wenigen Meßpunkten genau abschätzen. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein solches Schätzmodell für die AUC von Etoposid nach Infusion des prodrugs Etoposidphosphat zu entwickeln. Dieses Modell ist nicht auf bestimmte Therapieschemata, Dosierungen, Tumorarten oder Altersstufen der Patienten beschränkt.

Es wurden insgesamt 30 zufällig ausgewählte Patienten in die Studie aufgenommen, die in der onkologischen Abteilung der Universitätsklinik Marburg wegen unterschiedlicher Krebsleiden mit einer Chemotherapie, die Etoposidphosphat enthielt, behandelt wurden. Nach zweiminütiger Infusion des Etoposidphosphats wurden insgesamt sieben Blutproben zu festen Zeiten abgenommen und die Wirkstoffspiegel bestimmt. Die quantitative Analyse wurde mit der ²⁵²Californium Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie nach Chloroformextraktion und dünnschichtchromatographischer Aufreinigung der Proben durchgeführt. Aus diesen Daten wurde die AUC und weitere pharmakokinetische Daten bestimmt.

Von den 30 Patienten wurden nach dem Zufallsprinzip 15 ausgewählt, die den Trainingsdatensatz bildeten. Anhand dieser Stichprobe wurden Regressionsgleichungen zwischen der AUC und den Plasmakonzentrationswerten zu verschiedenen Zeitpunkten berechnet. Dabei wurden ein, zwei oder drei Meßwerte in die Regressionsberechnung einbezogen. Diese Regressionsgleichungen wurden am Testdatensatz der verbliebenen 15 Patienten validiert, indem ein statistischer Vergleich zwischen den Ergebnissen von Trainings- und Testpatientengruppe auf Konsistenz durchgeführt wurde. Insgesamt wurden 18 Modelle validiert.

- 4 Modelle mit einem Prädiktor
- 10 Modelle mit zwei Prädiktoren
- 4 Modelle mit drei Prädiktoren

Von den Gleichungen erwiesen sich zwei als geeignet, um die AUC abzuschätzen. Das beste Ein-Prädiktor-Modell war das Modell [M6]:

$$AUC_{(8\text{ h})} = 1308 \cdot c(8\text{ h}) + 1177 \quad [M6]$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, \quad [c] = \mu\text{g/ml}$$

$c(8\text{h})$ ist der gemessene Plasmakonzentrationswert 8h nach Infusionsende. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,959. Eine genauere Vorhersage ist mit dem Modell [M7] möglich, das zwei Meßwerte berücksichtigt:

$$AUC_{(15\text{ min}, 8\text{h})} = 64 \cdot c(15\text{ min}) + 1133 \cdot c(8\text{h}) + 269 \quad [M7]$$

$$[AUC] = \text{min} \cdot \mu\text{g/ml}, \quad [c] = \mu\text{g/ml}$$

Dabei gehen die Plasmakonzentrationswerte 15min und 8h nach Infusionsende in die Schätzung ein, der Korrelationskoeffizient beträgt 0,991, d.h. 98% der Varianz der AUC kann mit Hilfe dieser beiden Parameter erklärt werden. Regressionsgleichungen mit drei Prädiktoren konnten die Schätzgenauigkeit nicht weiter erhöhen.

Die vorgestellten Modelle stellen ein praktikables und effizientes Verfahren dar, um die AUC von Etoposid nach Infusion des prodrugs Etoposid-Phosphat mit geringem zeitlichen und materiellen Aufwand exakt bestimmen zu können. Für den Onkologen ergibt sich somit die Möglichkeit, die Zusammenhänge zwischen AUC und Wirkung an großen Patientenkollektiven genauer untersuchen zu können, um die Dosierung in Zukunft optimal an die individuellen Gegebenheiten des Patienten anpassen zu können.

Auch bei vielen anderen Zytostatika steht die AUC in einem engen Verhältnis zur Toxizität der Therapie. Somit ist auch hier eine genauere Dosierung als lediglich nach der Körperoberfläche wünschenswert. Analoge Entwicklungen für andere zellhemmende Substanzen könnten somit die zytostatische Krebstherapie grundlegend verbessern.

9 Literaturverzeichnis

- /Ach81/ Achterrath, W., Niederle, N., Raettig, R.: Aktuelle Onkologie 4 (Hrsg.: Nagel, G., Sauer, R., Schreiber, H.W.), Zuckschwerdt Verlag München (1981)
- /Alb95/ Alberts, B. et al.: Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH; Weinheim (1995)
- /All75/ Allen L.M., Creaven P.J.: Comparison of the human pharmacokinetics of VM-26 and VP-16, two antineoplastic epipodophyllotoxonderivates. Eur J Cancer 11, 697-707 (1975)
- /Arb86/ Arbuck, S.G., Douglass, H.O. et al.: Etoposide pharmacokinetics in patients with normal and abnormal organ functions. J Clin Oncol 4, 1690-1695 (1986)
- /Arn79/ Arnold, A.M.: Podophyllotoxin derivate VP-16-213. Cancer Chemother Pharmacol 3, 71-80 (1979)
- /Arn80/ Arnold, A.M., Dodson, M. et al.: Pharmacokinetic of VP-16-213 using an new HPLC assay, Cancer Chemother Pharmacol 5, 2 (1980)
- /Bar99/ Barth, C., Institut für Werkstofftechnik der Gesamthochschule Kassel, persönliche Mitteilung (1999)
- /Ben61/ Bentley, R.: New American remedies. 1: Podophyllum peltatum. Pharm J Trans 8, 456-464 (1961)
- /Ben84/ Bennett, J.M., Lyman, G.H. et al. : A phase II trial of VP16-213 in adults with refractory acute myeloid leukemia. Am J Clin Oncol 7, 471-473 (1984)

- /Ben87/ Bennett, C.L., Sinkule, J.A. et al.: Phase I clinical and pharmacology study of 72-hour continuous infusion of etoposide (VP16-213) in patients with advanced cancer. *Cancer Res* 47, 1952-1956 (1987)
- /Ber83/ Bergmeyer, H.U., Grassl, M., Walter, H.E.: *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Ed., VCH Weinheim (1983)
- /BMS93/ Data on file. Bristol-Myers Squibb Company (1993)
- /BMS96a/ Bristol Arzneimittel: Gebrauchsinformation und Fachinformation zu Etopophos®, Stand Dezember (1996)
- /BMS96b/ Bristol Arzneimittel: Produktmonographie zu Etopophos® (1996)
- /Bor93/ Bortz, J.: *Statistik*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1993)
- /Bre84/ Bretauiere, J.P., Spillman, T.: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol.4, 75-92, VCH Weinheim (1983)
- /Bri85/ Brindley C.J., Antoniw P., Newlands E.S., Bagshawe K.D.: Pharmacokinetics and toxicity of the epipodophyllotoxin derivate etoposide (VP16-213) in patients with gestational choriocarcinoma and malignant teratoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 15, 66 (1985)
- /Bro95/ Brooks, D.J., Srinivas, N.R., Alberts, D.S., Thomas, T., Igwemzie, L.M., Mc Kinney, L.M., Randolph, J., Schacter, L., Kaul, S., Barbhaiya, R.H.: Phase I and pharmacokinetic study of etoposide phosphate. *Anti Cancer Drugs* 6, 637-644 (1995)

- /Bud94/ Budman, D.R., Igwemezie, L.N., Kaul, S. et al.: Phase I evaluation of a water-soluble etoposide prodrug, etoposide phosphate. *J Clin Oncol* 12, 1902-1909 (1994)
- /Che84/ Chen, G.L. et al: Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 259, 13560-13566 (1984)
- /Cla87/ Clark, P.I., Slevin, M.L.: The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clin Pharmacokinet* 12, 223-252 (1987)
- /Cla92/ Clark, P.I.: Clinical pharmacology and schedule dependency of the podophyllotoxin derivatives. *Semin Oncol* 19, 20-27 (1992)
- /Col86/ Colombo, T., Broggin, M. et al.: Comparison between VP16 and VM26 in lewis lung carcinoma of the mouse. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22, 173-179 (1986)
- /Con72/ Conover, W.J.: A Kolmogorov goodness-of-fit test for discontinuous distributions. *J Am Stat Assoc* 67, 591-596 (1972)
- /Cre75/ Creasy, W.A.: Vincaalcaloids and Colchicine in: Sartorelli and Johns, *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents II*; p.670, Springer, Berlin/Heidelberg/New York (1975)
- /Cre82/ Creaven, P.J.: The clinical pharmacology of VM26 and VP16-213. A brief overview. *Cancer Chemother Pharmacol* 7, 133-140 (1982)
- /Cro86/ Crom, W.R., Kalwinsky, D. et al.: *Drug Intellig Clin Pharm* 20, 472 (1986)
- /Cun88/ Cunningham, D., Cummings, J. et al.: The pharmacokinetics of high dose cyclophosphamide and high dose etoposide. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 5, 117-123 (1988)

- /Del83/ Dellbrügge, J.: Bestimmung von Etoposid mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie/Flugzeit-Massenspektrometrie. Dissertation am Fachbereich Physikalische Chemie der Philipps-Universität Marburg (1983)
- /Des90/ Desoize, B., Marechal, F., Cattan, A.: Clinical pharmacokinetics of etoposide during 120 hours continuous infusion in solid tumors. Br J Cancer 62, 840-841 (1990)
- /Din82/ D'Incalci, M., Farina, P. et al.: Pharmacokinetics of VP16-213 given by different administration methods. Cancer Chemother Pharmacol 7, 141-145 (1982)
- /Din86/ D'Incalci, M., Rossi, C. et al.: Pharmacokinetics of etoposide in patients with abnormal renal and hepatic functions. Cancer Res 46, 2566-2571 (1986)
- /Dre76/ Drewinko, B., Barlogie, B.: Survival and cycle-progression delay of human lymphoma cells exposed to VP16-213. Cancer Treat Rev 60, 1295-1306 (1976)
- /Dub16/ Dubois, D., Dubois, E.F.: A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. Arch Intern Med 17, 863-871 (1916)
- /Edm83/ Edmundson, J., Thatcher, N. et al.: Pharmacokinetics of etoposide in patients with small cell lung cancer. Br J Cancer 48, 114 (1983)
- /Eks90/ Eksborg, S.: Anthracycline pharmacokinetics. Limited sampling model for plasma level monitoring with special reference to epirubicin (farmorubicin). Acta Oncol 29, 339-342 (1990)
- /Est00/ Estler, S. : Pharmakologie und Toxikologie. Schattauer Verlag 2000

- /Eva82/ Evans, W.E., Sinkule, J.A., Crom, W.R., Dow, L., Look, A.T., Rivera, G.: Pharmacokinetics of teniposid (VM26) and etoposid (VP16-213) in children with cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 7, 147 (1982)
- /Gre54/ Greenspan, J. et al.: Response of patients with advanced neoplasmas to the intravenous administration of alpha pelatum. *J Nat Center Inst* 14, 1257-1275 (1954)
- /Gre92/ Greco, F.A.: Etoposide: Seeking the best dose and schedule. *Semin Oncol* 19 (Suppl14), 59-63 (1992)
- /Hah93/ Hahn, M.: Pharmakokinetik von Etoposid (VP16-213): Optimierung der Nachweismethode sowie Korrelation mit klinischen Parametern. Dissertation am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg (1993)
- /Hai95/ Hainsworth, J.D., Greco, F.A.: Etoposide: Twenty years later. *Ann Oncol* 6, 325 –341 (1995)
- /Han84/ Hande K.R., Wedlund, P.J. et al.: Pharmacokinetics of high-dose etoposide (VP16-213) administered to cancer patients. *Cancer Res* 44, 379 (1984)
- /Han87/ Hande, K.R., Anthony, L.B. et al.: Etoposide clearance in patients with hepatic dysfunction. *Clin Pharmacol Ther* 41, 161 (1987)
- /Han92/ Hande, K.R.: Etoposide pharmacology. *Semin Oncol* 6 (Suppl 13): 3-9 (1992)
- /Hen90/ Henwood, J.M., Brodgen, R.N.: Etoposide: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in combination chemotherapy of cancer. *Drugs* 39, 438-490 (1990)

- /Hoa88/ Ho, A.D., Lipp, T.G. et al.: Combination of mitoxantrone and etoposide in refractory acute myelogenous leukemia – an active and well tolerated regimen. *J Clin Oncol* 6, 213-217 (1988)
- /Hol81/ Holthuis, J.J.M., Pinedo, H.M.: A sensitive high-performance liquid chromatographics method for determination of the anti-neoplastic agents VP16-213 and VM26 in biological fluids. *Anal Chim Acta* 130, 23-30 (1981)
- /Hol95/ Holz, J.B., Köppler, H., Schmidt, L., Fritsch, H.W., Pflüger, K.H., Jungclas, H.: Limited Sampling Models for Reliable Estimation of Etoposide Area under the Curve. *Eur J Cancer* 31A, 1794-1798 (1995)
- /Hol96/ Holz, J.B.: Entwicklung geeigneter Limited Sampling Modelle zum Drug Monitoring von Etoposid. Dissertation am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg (1996)
- /Hsi83/ Hsieh, T.S.: Purification and properties of type II DNA topoisomerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. *Methods Enzymol* 100, 161-170 (1983)
- /Hua73/ Huang, C.C., Hou, Y., Wong, J.J.: Effects of a new antitumor agent, epipodophyllotoxin, on growth and chromosomes in human hematopoietic cell lines. *Cancer Res* 33, 3123-3129 (1973)
- /Ili85/ Iliadis, A., Bachir-Raho, M. et al.: Bayesian estimation and prediction of clearance in high-dose methotrexate infusions. *J Pharmacokinet Biopharm* 13, 101-115 (1985)
- /Iss79/ Issell, B.F. and Crooke, S.T. : Etoposide (VP-16-213). *Cancer Treat Rev* 6, 107-124 (1979)

- /Iss82/ Issel, B.F.: The podophyllotoxin derivatives VP16-213 and VM26. *Cancer Chemother Pharmacol* 7, 73, (1982)
- /Iss84/ Issell, B.F. et al.: Etoposide (VP-16-213): an overview. In: Issell BF, Muggia FM, Carter SK (eds.): Etoposide (VP-16): Current Status and New Developments. Orlando. FL. Academic Press inc 1-13 (1984)
- /Jun75/ Jungi, W.F., Senn, H.J.: Clinical study of the new podophyllotoxin derivative 4'-demethylepipodophyllotoxin, 9-(4,6-O-ethylidene- β -D-glucopyranoside) (NSC 141540: VP 16-213), in solid tumors in man, *Cancer Chemother Pharmacol* 59, 737-742 (1975)
- /Jun83a/ Jungclas, H.: Habilitationsschrift, Fachbereich Physikalische Chemie der Philipps-Universität Marburg (1983)
- /Jun83b/ Jungclas, H., Danigel, H., Schmidt, L.: *Int J Mass Spectrom Ion Process* 46, 197 (1983)
- /Jun83c/ Jungclas, H., Danigel, H., Schmidt, L.: Fractional sampling interface for combined liquid chromatography-mass spectrometry with ^{252}Cf fission fragment-induced ionization. *J Chromatogr* 271, 35 (1983)
- /Jun89/ Jungclas, H., Pflüger, K.H., Schmidt, L., Hahn, M.: *Journal de Physique, Colloque C2, Supplement au n^o 2*, 50, 41 (1989)
- /Kap42/ Kaplan, I.W.: Condyloma acuminata. *N Orleans Med Surg J* 94, 388 (1942)
- /Kau95/ Kaul, S. et al.: Pharmacokinetics and bioequivalence of etoposide following intravenous administration of etoposide phosphate and etoposide in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 13, 11, 2835-2841 (1995)

- /Kel54/ Kelly, M.G. and Hartwell, J.C.: The biological effects and the chemical composition of podophyllin. A review. J Natl Cancer Inst 14, 967-1010 (1954)
- /Kel71/ Keller-Juslen, C., Kihn, M. et al.: Synthesis and antimetabolic activity of glycoside lignan derivatives related to podophyllotoxin. J Med Chem 14, 936-940 (1971)
- /Kel78/ Kelleher, J.K.: Correlation of tubulin-binding and anti-Tumor activities of podophyllotoxin analogs. Cancer Treat Rev 62, 1443 (1978)
- /Kin46/ King, L., Sullivan, M.: Similarity of effects of podophyllin and colchicine and news in treatment of condyloma acuminata. Science 104, 244-245 (1946)
- /Köh92a/ Köhl, P.: Weiterentwicklung und Anwendung der quantitativen ²⁵²Cf-PDMS für pharmakokinetische Untersuchungen ausgewählter Zytostatika. Dissertation am Fachbereich Physikalische Chemie der Philipps-Universität Marburg (1992)
- /Köh92b/ Köhl, P., Köppler, H., Schmidt, L.: Pharmacokinetics of high-dose etoposide after short-term infusion. Cancer Chemother Pharmacol 29, 316-320 (1992)
- /Kre96/ Kreis, W., Budman, D.R., Vinciguerra, V., Hock, K., Baer, J., Ingram, R., Schacter, L.P., Fields, S.Z.: Pharmacokinetic evaluation of high-dose etoposide phosphate after a 2-hour infusion in patients with solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol 38, 378-384 (1996)

- /Kri75/ Krishan, A. et al.: Cyclofluorometric studies on the action of podophyllotoxin and epipodophyllotoxins (VM-26, VP-16-213) on the cell cycle transverse of human lymphoblasts, *J Cell Biol* 66, 521-530 (1975)
- /Lau89/ Launay, M.C., Milano, G. et al.: A limited sampling procedure for estimating adriamycin pharmacokinetics in cancer patients. *Br J Cancer* 60, 89-92 (1989)
- /Loi76/ Loike, J.D. and Horwitz, S.B.: Effects of podophyllotoxin and VP 16-213 on microtubule assembly in vitro and nucleoside transport in Hela cells. *Biochem J* 15, 5435-5442 (1976)
- /Loi78/ Loike, J.D.; Brewer, C.F.; Sternlicht, H. ; Gensler, W.J.; and Horwitz, S.B.: Structure-activity study of the inhibition of microtubule assembly in vitro by podophyllotoxin and its congeners. *Cancer Res* 38, 2688-2693 (1978)
- /Lon84/ Long, B.H., Brattain, M.G.: The activity of etoposide (VP-16-213) and teniposide (VM-26) against human lung tumor cells in vitro: cytotoxicity and DNA-breakage. In: Issell BF, Muggia FM, Carter SK (eds.): *Etoposide (VP-16): Current Status and New Developments*. FL Academic Press inc., Orlando 63-86 (1984)
- /Lon87/ Long, B.H.: Structure activity relationships of podophyllin congeners that inhibit topoisomerase II. *NCI Monogr* 4, 123-127 (1987)
- /Lon92/ Long, B.H.: Mechanisms of action of teniposide (VM-26) and comparison with etoposide (VP-16). *Semin Oncol* 19 (Suppl 6), 3-19 (1992)

- /Luk82/ Lu, K., Savaraj, N., et al.: Clinical pharmacology and intracerebral tumor penetration of 4'-demethylepipodophyllotoxin.,9-(4,6-O-ethylidene- β -D-glucopyranoside) (VP16, NSC 141540). Clin Pharmacol Ther 31, 245 (1982)
- /Maa85/ van Maanen, J.M.S., de Ruiter, C. et al.: Inactivation of phi X174 DNA by the otho-quinone derivative or its reduction product of the antitumor agent VP16-213. Eur J Cancer Clin Oncol 21, 1215-1218 (1985)
- /McN79/ Mc Neal, C.J., Mc Farlane, R.D., Thurston, E.L.: Anal Chem 51, 2036 (1979)
- /Mil92/ Millward, M.J. et al.: Clinical and pharmacokinetic study of BMY40481 (etoposide phosphate) Proc Am Assoc Cancer Res 33, Abstract 3165 (1992)
- /Mil95/ Millward, M.J. et al.: Phase I and pharmacokinetic study of a water-soluble etoposide prodrug, etoposide phosphate (BMY-40481). Eur J Cancer 31A, 2409-2411 (1995)
- /Mut86/ Mutschler, E.: Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1986)
- /Obe80/ Oberbach, K.: Kunststoff-Kennwerte für Konstrukteure, Hanser Verlag (1980)
- /Oss81/ Osswald, H.: Antineoplastische Chemotherapeutika. In: Schmähl, Maligne Tumoren, 396, Editio Cantor, Aulendorf (1981)
- /Pel78/ Pelsor, F.R., Allen, L.M., Creaven, P.J.: Multikompartment pharmacokinetic model of 4'-demethylepipodophyllotoxin.,9-(4,6-O-ethylidene- β -D-glucopyranoside) in humans. J Pharm Sci 67, 1106-1108 (1978)

- /Pfl87/ Pflügler, K.H., Schmidt, L., Jungclas, H. et al.: Drug monitoring of etoposide (VP16-213). Correlation of pharmacokinetic parameters to clinical and biochemical data from patients receiving etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol* 20, 59-66 (1987)
- /Pfl93/ Pflügler, K.H., Hahn, M., Holz, J.B. et al.: Pharmacokinetics of etoposide: correlation of pharmacokinetic parameters with clinical conditions. *Cancer Chemother Pharmacol* 31, 350-356 (1993)
- /Pre00/ Preiß, J., Dornhoff, W., Hagmann, F.G., Schmieder, A.: *Onkologie 2000, Empfehlungen zur Therapie*, Zuckerschwerdt Verlag München (2000)
- /Rat90/ Ratain, M.J.: Dose reduction of etoposide in jaundiced patients (letter;comment). *J Clin Oncol* 8, 2088-2089 (1990)
- /Roe87/ Roed, H. et al.: The effect of the two epipodophyllotoxine derivatives etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26) on the cell lines established from patients with small-cell carcinoma of the lung. *Cancer Chemother Pharmacol* 19, 16-20 (1987)
- /Roo84/ Roos, W., Rowe, T. et al.: Role of Topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage. *Cancer Res* 44, 5857-5860 (1984)
- /Ros90/ Rose, W.C., Basler, G.A., Trail, P.A. et al.: Preclinical antitumor activity of a soluble etoposide analog, BMY-40481. *Invest New Drugs* 8, 25-32 (1990)
- /Sac90/ Sachs, L.: *Angewandte Statistik*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1990)

- /Säv87a/ Säve, G., Hakansson, P., Sundqvist, B.U.R., Söderström, E., Lindquist, S.E., Berg, J.: *Int J Mass Spectrom Ion Process* 78, 259 (1987)
- /Säv87b/ Säve, G., Hakansson, P., Sundqvist, B.U.R., Jönsson, U., Olofsson G., Malmquist, M.: *Anal Chem* 59, 2059 (1983)
- /Säv87c/ Säve, G., Hakansson, P., Sundqvist, B.U.R., Jönsson, U.: *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 26, 571 (1987)
- /San83/ Sander, M. et al.: Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 258, 8421-8428 (1983)
- /Sch65/ Schmitt, H. W., Kiker, W. E., Williams, C. F.: *Phys Rev B* 137, 837 (1965)
- /Sch88/ Schwinghammer, T.L. et al.: Cracking of ABS plastic devices used to infuse undiluted etoposide injection. *Am J Hosp Pharm* 45, 1277 (1988)
- /Sch94/ Schacter, L.P. et al.: Clinical and pharmacokinetic overview of parenteral etoposid phosphate. *Cancer Chemother Pharmacol* 34 (Suppl): S58-S63 (1994)
- /Sen88/ Senter, P.D., Saulnier, M.G., Schreiber, G.J. et al.: Antitumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugate in combination with etoposide phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (13), 4842-4846 (1988)
- /Ses95/ Sessa, C., Zucchetti, M., Cerny, T. Pagani, O., Cavalli, F.: Phase I and clinical pharmacokinetic study of oral etoposide phosphate. *J Clin Oncol* 13, 200-209

- /Sin84/ Sinkule, J.A., Hutson, P. et al.: Pharmacokinetics of etoposide (VP16) in children and adolescents with refractory solid tumors. *Cancer Res* 44, 3109-3113 (1984)
- /Stä73/ Stähelin, H.: Activity of new glycosidic lignan derivate (VP16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. *Eur J Cancer* 9, 215 (1973)
- /Stä76/ Stähelin, H.: Delayed toxicity of epipodophyllotoxin derivatives (VM26 and VP16-213), due to a local effect. *Eur J Cancer* 12, 925 (1976)
- /Ste84/ Steward, D.J., Richard, M.T., Hugenholtz, H., Dennerly, J.M., Belanger, R., Gerin-Lajoie, J., Montpetit, V., Nundy, D., Prior, J., Hopkins, H.S.: Penetration of VP16 (etoposide) into human intracerebral tumors. *J Neurooncol* 2, 133-139 (1984)
- /Ste85/ Stewart, D.J., Nundy, D. et al.: Bioavailability, pharmacokinetics and clinical effects of an oral preparation of etoposide. *Cancer Treat Rep* 69, 269-273 (1985)
- /Ste89/ Stewart, C.F., Pieper, J.A. et al.: Altered protein binding of etoposide in patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 45, 49-55 (1989)
- /Str93/ Strømgren, A.S., Sørensen, B.T., Jakobsen, P., Jakobsen A.: A limited sampling method for estimation of the etoposide area under the curve. *Cancer Chemother Pharmacol* 32, 3, 226-230 (1993)
- /Str80/ Strife, R.J., Jardin, I.: High Performance liquid chromatographic assay and structure-activity relationships of the epipodophyllotoxin anticancer drug VP16-213 (etoposide) and VM26 (teniposide). *J Chromatogr* 182, 211 (1980)

- /Sul47/ Sullivan, M.: Treatment of cutaneous carcinoma with podophyllin preliminary note. Bull Johns Hopkins Hosp 85, 200-203 (1947)
- /Tie86/ Tietz, N.W.: Textbook of clinical chemistry, W.B. Saunders Company, Philadelphia (1986)
- /Tra99/ Tranchand, B., Amsellem, C., Chatelut, E., Freyer, G. et al.: A limited-sampling strategy for estimation of etoposide pharmacokinetics in cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol 43, 316-322 (1999)
- /Tho95/ Thompson, D.S., Greco, F.A., Miller, A.A., Srinivas, N. et al.: A phase I study of etoposide phosphate administered as a daily 30 minute infusion for 5 days. Clin Pharmacol Ther 57, 499-507 (1995)
- /Wol87/ Wolf, M., Havemann, K. et al.: Cisplatin/etoposide versus ifosfamide/etoposide combination chemotherapy in small cell lung cancer: a multicenter German randomized trial. J Clin Oncol 5, 1880-1889 (1987)
- /Woz83/ Wozniak A.J, Ross, W.E. et al.: DNA-damage as a basis for 4'-demethylepipodophyllotoxin.,9-(4,6-O-ethylidene- β -D-glucopyranoside) (etoposide) cytotoxicity. Cancer Res 43, 120-124 (1983)
- /Zuc91/ Zucchetti, M., Rossi, C. et al.: Concentrations of VP16 and VM26 in human brain tumors. Ann Oncol 2, 63-66 (1991)

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jungclas für seine freundliche und fachlich kompetente Betreuung der Messungen im Massenspektrometrielabor und seine Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit. Er war stets ansprechbar und stand mir auch bei kniffligen Problemen immer zur Seite.

Frau Dr. Josefin-Beate Holz und der Firma Bristol Myers Squibb danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die finanzielle und inhaltliche Unterstützung des Projektes.

Frau Sarah Krämer danke ich für die Hilfe bei den Blutabnahmen und die gute Kooperation in der klinischen Arbeit.

Meinen Kollegen im Laborbereich 3 danke ich herzlich für die angenehme Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Besonders erwähnen möchte ich Petra Staats und Heike Priebe vom Labor Dr. Wagner, die mich im Laboralltag in vielen Situationen tatkräftig unterstützt haben. Nicht zuletzt die gemeinsamen Mittagspausen in der Mensa habe ich in sehr guter Erinnerung.

Herrn Dipl. Chem. Michael Pütz danke ich für seine Anregungen zum Analyseverfahren von Etoposid-Phosphat.

Herrn Dipl. Psych. Oliver Ungerer möchte ich für seine Hilfe bei Fragen zur statistischen Auswertung besonders danken.

Herrn Dr. Andre Goerisch danke ich für seine freundliche Hilfe beim Formatieren der Texte.

Ich danke allen Mitarbeitern der Klinik für Nuklearmedizin und der Station Strahlenapplikation für die angenehme Arbeitsatmosphäre während der Durchführung dieser Arbeit und meiner Zeit als Arzt im Praktikum.

Meiner Mutter danke ich für Ihre tatkräftige Unterstützung während des Studiums.

Besonders möchte ich auch Herrn Armin Hofmaier für die sehr gute Zusammenarbeit und seine Hilfe während des medizinischen Grundstudiums danken. Ohne ihn hätte ich vermutlich noch immer keinen Chemieschein 😊.

Frau Anja Evers danke ich herzlich für ihre aufmunternden Worte, nicht nur während des Praktischen Jahres.

Ruben Stachowitz, Alexander Sturm und Jan Schimanski danke ich für zahlreiche Anregungen.

Bei meiner ehemaligen WG möchte ich mich für die herzliche Atmosphäre in all den Jahren bedanken, vor allem bei Annette Müller, Gunter Urbasch, Kilian Heck, Astrid Cibusch und Michael Kraus.