

gleich der Spektrogramme der Extrakte untereinander fällt auf, daß diejenigen sich mehr entsprechen, die nach gleicher Arbeitsweise gewonnen wurden (siehe Abb. 2, 4, 6 und 3, 5, 7), als jene, die aus demselben Ausgangsmaterial aufbereitet wurden.

Vergleicht man die Spektrogramme mit den entsprechenden quantitativen Werten (s. Tabelle), so kann angenommen werden, daß die Differenz zwischen beiden Methoden wahrscheinlich auf einer zusätzlichen Abtrennung gewisser Begleitsubstanzen durch die Methode von LIPP (l. c.) beruht. Ein zusätzlicher Substanzverlust läßt sich jedoch nicht sicher ausschließen.

Die Zusatzchromatographie nach LIPP (1960) bietet also die Möglichkeit, den nach der Methode von KLOPPER et al. (1955) gewonnenen Extrakt zu reinigen. Dies erfordert jedoch eine besonders sorgfältige und schonende Arbeitsweise und ist langwieriger. Wir werden demnächst über eine Methode berichten, die weniger Arbeitsaufwand erfordert und die für die Bestimmung des Residualpregnandiols geeignet ist.

Zusammenfassung. Es werden die Pregnandiolbestimmungsmethoden von KLOPPER et al. und LIPP mit Hilfe der Infrarotspektrographie verglichen. Als Vergleichsgrundlage dienten ein Pregnandiol-diacetat-Standard sowie Urinextrakte aus der 1. und 2. Cyclushälfte. Die nach gleicher Arbeitsweise gewonnenen Extrakte ähnelten sich mehr als die vom gleichen Ausgangsmaterial stammenden. Die quantitative Be-

stimmung des entsprechenden Ausgangsmaterials zeigt, daß die Werte nach LIPP deutlich unter denen nach KLOPPER liegen. Es kann angenommen werden, daß diese Unterschiede im wesentlichen auf einem Reinigungseffekt durch die Methode von LIPP beruhen.

Summary. To carry out a comparison between the methods for pregnanediol-determination given by KLOPPER et al. and by LIPP we made infrared spectra with a Leitz infrared spectrophotograph. The pregnanediol-diacetate standard and crystalline samples from different urinary extracts of the follicle and luteal phase of the cycle prepared by both methods are compared.

Extracts obtained by the same method are less different than those received by the same urine. The lower values of the LIPP method seem to be caused by further purification steps. This is suggested by lower losses working with the standard.

Literatur. KLOPPER, A., E. A. MICHIE, and J. B. BROWN: A method for the determination of urinary pregnanediol. *J. Endocr.* **12**, 209—219 (1955). — LIPP, G.: Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung von Pregnandiol im Urin. *Acta endocr. (Kbh.)* **33**, 501—510 (1960). — NAKAJIMA, T., H.-J. STAEMMLER u. G. LIPP: Untersuchungen über die Pregnandiol-Ausscheidung neugeborener Knaben. *Klin. Wschr.* **38**, 389 (1960). — SCHNEIDER, H. P. G.: Pregnandiol-Analysen in der 1. Hälfte des mensuellen Zyklus. *Diss. Univ. Kiel* 1961. — SEYDEL, J., E. KRÜGER-THIEMER u. E. WEMPE: Jahresbericht Borstel **5**, 706—708 (1961). — STAEMMLER, H. J.: Die gestörte Regelung der Ovarialfunktion. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.

Anschrift: Dr. HERMANN P.-G. SCHNEIDER
2300 Kiel
Universitäts-Frauenklinik

Die Hemmung der Serumcholinesterase durch Cyclophosphamid (Endoxan®)

Von
H. WOLFF

Aus der Chirurgischen Klinik der Karl-Marx-Universität Leipzig (Direktor: Prof. Dr. H. UEBERMUTH)

Von den zahlreichen bekannten Inhibitoren der Cholinesterase (ChE) zeichnen sich besonders die Alkylphosphate durch ihre spezifische Hemmung des Enzyms aus. Unbekannt ist der Einfluß des Cyclophosphamid (Endoxan, N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N,O-propylenphosphorsäureesterdiamid) auf die Cholinesterase. Bei diesem Cytostaticum ist die N-Lostgruppe mit der Phosphorsäure gekoppelt und damit die Bedingung des sog. „Transport-Prinzips“ geschaffen¹. Dadurch ist eine reversible Inaktivierung der N-Lostgruppe erreicht. Erst im Körper erfolgt die Umwandlung der Transportform in die eigentliche Wirkform.

Die Aktivierung des Endoxans geschieht wahrscheinlich in der Leber, die Umwandlungsreaktion ist an die Lebermikrosomen gebunden^{2,3}. Das cytotatisch wirksame Agens kann infolge verschiedener struktureller Veränderungen des Endoxanmoleküls entstehen. Am wahrscheinlichsten ist eine selektive Sprengung des hexacyclischen Esteramids. Das entstehende Zwitterion gibt dann sekundär die cytotatisch wirksame N-Lostgruppe ab⁴.

Da es sich bei diesen Verbindungen um sehr aktive Phosphorsäureester handelt, lag es nahe, die Wirkung auf die Serumcholinesterase (SChE) zu prüfen.

Methodik

Die Bestimmung der SChE-Aktivität erfolgte spektrometrisch nach KALOW^{5,6}. Als Substrat wurde Benzoylcholin verwendet und die Abnahme der Extinktion bei 240nm über

3 min bei 26° C verfolgt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungs-, Temperatur- und Zeitfaktors wurde die SChE-Aktivität in $\mu\text{M/ml/h}$ bei 37° C errechnet.

Außerdem führten wir zum Teil vergleichende Bestimmungen der SChE nach der manometrischen Methode von AMMON⁷ aus, als Substrat diente Acetylcholin.

Die Untersuchungen wurden bei 15 Carcinomkranken ausgeführt, die im Durchschnitt 5 Endoxaninjektionen von jeweils 20 mg/kg i.v. bekamen. Zwischen den einzelnen Cytostaticagaben wurde eine Zeitspanne von mindestens 10 Tagen eingehalten. Insgesamt konnte das Verhalten der SChE bei 74 Endoxangaben verfolgt werden. Die Messung erfolgte unmittelbar vor und in bestimmten Zeitabständen nach den einzelnen Endoxanapplikationen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Testes. Eine Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte wird bei $p < 0,05$ angenommen⁸.

Ergebnisse

1. Die ermittelten SChE-Werte bei Applikation der ersten Dosis von 20 mg/kg Endoxan sind von 15 Carcinompatienten in der Tabelle 1 eingezeichnet.

Das Verhalten der SChE bei den insgesamt 74 Endoxaninjektionen wird als Kurve auf der Abb. 1 zur Darstellung gebracht. Es sind die prozentualen Restaktivitäten (Mittelwerte) der vor den Endoxangaben gemessenen SChE-Werte aufgezeichnet. Demzufolge bewirkte Endoxan eine statistisch signifikante Hemmung der SChE, die bis zum 4. Tag nach der Endoxanapplikation nachzuweisen war. Die niedrigsten Werte wurden nach 6, 12 und 24 Std gemessen. Im Durchschnitt betrug die Restaktivität der SChE

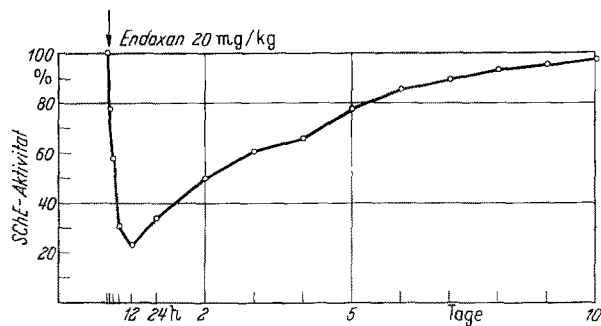


Abb. 1. Restaktivität der SChE nach Endoxangaben

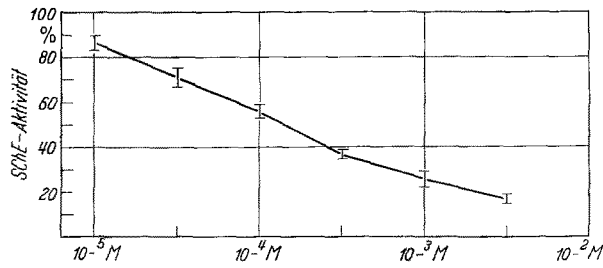


Abb. 2. Restaktivität der SChE bei verschiedenen Endoxankonzentrationen

Tabelle 1. SChE-Aktivitäten nach Endoxanapplikation (Einheiten nach KALOW)

Name	Vor	Nach der Endoxangabe 20 mg/kg												
		2 Std	6 Std	12 Std	24 Std	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
O. I.	108	84	48	32	24	38	46	54	70	76	88	86	102	104
S. M.	120	65	22	18	24	48	65	63	70	70	85	110	122	118
H. E.	68	38	23	28	40	45	50	50	58	60	58	55	65	65
V. M.	72	40	30	20	22	36	38	40	44	55	60	70	66	68
P. W.	164	80	50	41	80	90	88	110	121	122	150	148	156	160
G. M.	131	72	36	28	38	52	64	76	96	88	118	128	122	128
U. A.	144	70	40	36	70	106	111	118	120	126	118	114	131	140
G. M.	126	86	55	41	44	76	80	82	84	83	98	97	101	119
K. A.	70	40	18	23	24	34	46	45	44	56	57	66	74	76
K. H.	68	44	23	18	20	26	39	48	48	49	50	49	48	64
S. K.	48	20	18	20	25	30	36	40	42	48	48	41	45	46
D. A.	49	28	22	19	24	36	40	43	41	44	46	43	46	48
N. E.	107	77	35	22	18	41	54	65	67	80	81	95	94	102
S. E.	61	36	18	20	16	24	31	42	42	54	49	48	55	58
G. O.	78	36	18	16	30	56	62	58	68	67	68	70	72	75
Mittelwert S	94,2 ±36,6	54,4 ±22,5	30,4 ±11,7	25,4 ±8,5	33,2 ±18,8	49,2 ±23,9	56,6 ±22,1	62,2 ±24,6	67,6 ±27,1	71,8 ±25,1	78,2 ±31,3	81,3 ±10,5	86,6 ±34,8	91,4 ±35,6

während dieser Zeit nur noch 30%. In den darauffolgenden Tagen erhöhte sich der Enzymspiegel und erreichte nach 8–10 Tagen annähernd den Ausgangswert. Der prozentuale Abfall der SChE-Aktivität war bei den gleichen Patienten bei wiederholten Endoxan-Injektionen reproduzierbar, doch nach Verabreichung von mehr als zwei Injektionen wurde nach zehntägiger Pause der vor Beginn der Endoxanbehandlung ermittelte Wert in den meisten Fällen nicht mehr erreicht.

2. Nach Feststellung der relativ starken Hemmwirkung der SChE durch Endoxan in vivo galt es zu prüfen, inwieweit und in welchen Konzentrationen auch eine Hemmung der SChE in vitro zu verzeichnen ist. Die diesbezüglichen Untersuchungen bestätigten die in vivo erhobenen Ergebnisse. Endoxan hemmt auch in vitro in relativ starkem Ausmaße die im Serum gesunder Personen vorhandene ChE.

Auf der Abb. 2 ist die in vitro gemessene Inaktivierung der SChE aufgezeichnet, die in fünf Serien

gesunder Personen ermittelt wurde. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

Die SChE-Inaktivierung ist der Endoxankonzentration direkt proportional, während bei einer Testansatzkonzentration des Endoxans von 10^{-5} M eine Hemmung der SChE um 14% festzustellen ist, findet man bei Erhöhung der Endoxanmenge auf 10^{-3} M eine Inaktivierung des Enzyms von 74%.

Die Inkubationsdauer des Serums mit Endoxan betrug bis zur Messung der SChE im Durchschnitt 30 min. Die nach KALOW ermittelten Ergebnisse konnten ebenfalls mit der manometrischen Methode von AMMON bei Verwendung von Acetylcholin als Substrat bestätigt werden.

3. Da die N-Lostderivate im allgemeinen eine leichte SChE-Depression verursachen⁹, prüften wir in vitro unter gleichen Bedingungen auch die Wirkung von Mitomen (N-Oxyd-Lost) auf die SChE. In der Tabelle 2 wird die Wirkung beider Cytostatica bei den entsprechenden Konzentrationen angegeben. Dabei zeigt sich, daß das Mitomen nur einen geringen Abfall der SChE-Aktivität bewirkt. Erst bei 10^{-2} M Mitomen im Testansatz ist die Enzymaktivität etwa um die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes gesenkt,

Tabelle 2. Prozentuale Restaktivitäten der SChE nach Endoxan- und Mitomenzusatz

M	Endoxan	Mitomen
10^{-2}	nicht nachweisbar	53,1 ± 5,1
10^{-3}	25,6 ± 3,8	92,4 ± 4,3
10^{-4}	55,8 ± 3,0	96,0 ± 4,6
10^{-5}	85,6 ± 3,2	97,5 ± 3,9

dagegen findet man annähernd diese Inaktivierungsgröße schon bei 10^{-4} M Endoxan.

Diskussion

Der Erfolg der cytostatischen Therapie ist weitgehendst von der verabreichten Dosis abhängig. Es besteht daher das Bestreben, mit der Applikationsmenge bis an die Grenze des Verträglichkeit zu gehen¹⁰. Dabei werden die durch Cytostatica allgemein bedingten Schädigungen, besonders der stoffwechselaktiven Gewebe (Blutbild etc.), beim Endoxan gut

toleriert⁽¹¹⁻¹³⁾ und wurden auch von uns selten beobachtet.

Im Vordergrund bei der oben angegebenen Dosierung standen vielmehr akute Nebenwirkungen, die wenige Stunden nach den Endoxangaben auftraten. Sie äußerten sich in Inappetenz, Übelkeit, Erbrechen und Durchfällen. Diese Symptome waren ausschließlich am Injektionstag und einem Tag danach zu beobachten. Nach rascher Erholung waren die Patienten am 3. Tag nach der Endoxangabe meist beschwerdefrei. Diese durch das Endoxan bedingten Nebenwirkungen sind aus der Literatur bekannt. Sie traten bei einem Teil der Patienten schon bei einer geringeren Dosierung auf^(14-17 u.a.), doch blieben die ätiologischen Faktoren bisher ungeklärt. Obwohl diese Erscheinungen nur kurze Zeit andauerten, wurden sie doch als sehr belästigend empfunden und nahmen oft bedrohliche Ausmaße an, sie waren in einem gewissen Umfang durch hohe Dosen Atropin zu beherrschen. Als Ursache dieser akuten Nebenwirkungen nehmen wir die starke Hemmung der ChE durch Endoxan an. Die Symptome ähneln auffällig denen, die durch Vergiftungen mit Alkylphosphaten (z.B. Parathion, Fluostigmin u.a.) zu beobachten sind. Diese Substanzen sind als Inhibitoren der ChE bekannt.

Die oben beschriebenen Erscheinungen kommen wahrscheinlich durch eine „endogene Acetylcholinintoxikation“ zustande. Die unterschiedliche Wirkung von Endoxan und Mitomen, beides N-Lost-derivate, auf die SChE-Aktivität zeigt, daß die Inaktivierung wahrscheinlich durch die Phosphorsäurekomponente des Endoxanmoleküls bedingt wird.

Da die Spaltung des Endoxanmoleküls sehr rasch, etwa innerhalb 15 min erfolgt¹⁹, ist anzunehmen, daß die Wirkung nicht durch die Endoxanmoleküle selbst, sondern durch die Umwandlungsprodukte zustande kommt. Erhärtet wird diese Annahme auch dadurch, daß die Inaktivierung der SChE erst nach 6 Std am ausgeprägtesten war.

Die Wirkung dieser Phosphorsäureester auf die ChE erfolgt wahrscheinlich auf die gleiche Weise wie der angenommene Vergiftungsmechanismus durch die Alkylphosphate²⁰. Zur Zeit finden Untersuchungen über die Möglichkeit einer Reaktivierung der durch Endoxan blockierten ChE statt. Damit ließe sich die Verträglichkeit des Endoxans auch bei höherer Dosierung verbessern.

Zusammenfassung: Bei der cytostatischen Behandlung kommt es in den ersten Tagen nach der Applikation von 20 mg/kg Endoxan i.v. zu einer starken Inaktivierung der Serumcholinesterase. Auch in vitro hemmt Endoxan die im Serum gesunder Personen vorhandene Cholinesterase, Mitomen zeigt dagegen nur eine geringe Wirkung.

Demzufolge werden die akuten Nebenwirkungen durch Endoxan als Ausdruck einer „endogenen Acetylcholinintoxikation“ angesehen.

Summary. In the first days of treatment with Endoxan® (20 mg/kg i.v.) we observed a marked inhibition of plasma cholinesterase. With healthy persons the enzyme activity is — as shown by in vitro experiments — also considerably reduced. However, Mitomen causes only a weak inhibition. The acute side effects of Endoxan are considered to be a consequence of a “endogene acetyl choline intoxication”.

Literatur. ¹ARNOLD, H., F. BOURSEAUX u. N. BROCK: Über Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und cancerotoxischer Wirkung in der Reihe der Phosphamidester des Bis-(β -chloräthyl)-amins. *Naturwissenschaften* **45**, 64 (1958); — Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester. *Arzneimittel-Forsch.* **11**, 143 (1961). — ²FOLEY, C.E., O.M. FRIEDMAN, and B.P. DROLET: Studies on the mechanism of action of cytoxan. Evidence of activation in vivo and in vitro. *Cancer Res.* **21**, 57 (1961). — ³BROCK, N., u. H.J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus. *Naturwissenschaften* **49**, 610 (1962). — ⁴ARNOLD, H.: Diskussion über Antibiotika, Zytostatika und Antimetaboliten in der Nachbehandlung von Krebskranken auf der Arbeitstagung über Ärztliche Nachsorgeprobleme bei Krebskranken am 1. und 2. Dezember 1962 in Düsseldorf. *Mitteilungsdienst GBK Nordrhein-Westfalen* **2**, 739 (1963). — ⁵KALOW, W., and H.A. LINDSAY: A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase. *Canad. J. Biochem.* **33**, 568 (1955). — ⁶KALOW, W., K. GENEST, and N. STARON: Kinetic studies on the hydrolysis of benzoylcholine by human serum cholinesterase. *Canad. J. Biochem.* **34**, 637 (1956). — ⁷AMMON, R.: Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **233**, 486 (1934). — ⁸WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik, S. 136. Jena: VEB Gustav Fischer-Verlag 1961. — ⁹HAUSCHILD, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie, S. 393. Leipzig: VEB Georg Thieme-Verlag 1961. — ¹⁰DRUCKREY, H., D. STEINHOFF, M. NAKAYAMA, R. PREUSSMANN u. K. ANGER: Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan. *Dtsch. med. Wschr.* **88**, 651, 715 (1963). — ¹¹BROCK, N.: Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika. *Arzneimittel-Forsch.* **8**, 1 (1958). — ¹²WILMANS, H.: Klinische Grundlagen der Chemotherapie maligner Tumoren. *Oncologia (Basel)* **14**, 232 (1961). — ¹³GEBHARTZ, H.: Vergleichende Untersuchungen zur Toxizität und Seitenwirkung moderner Zytostatika. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **68**, 251 (1962). — ¹⁴DITTRICH, H.: Klinische Erfahrungen mit dem Cytostaticum Endoxan. *Arzneimittel-Forsch.* **11**, 207 (1961). — ¹⁵WIELAND, C., u. S. WIELAND: Erfahrungen mit Endoxan-Behandlung. *Münch. med. Wschr.* **103**, 2160 (1961). — ¹⁶SOLOMON, J., M. J. ALEXANDER, and J. L. STEINFELD: Cyclophosphamide. *J. Amer. med. Ass.* **183**, 165 (1963). — ¹⁷SCHULTE-BRINKMANN, W., u. M. HOHN: Über Erfahrungen mit dem Zytostatikum „Endoxan“. *Strahlentherapie* **121**, 625 (1963). — ¹⁸SCHUMACHER, K.: Diskussion über Antibiotika, Zytostatika und Antimetaboliten in der Nachbehandlung von Krebskranken auf der Arbeitstagung über Ärztliche Nachsorgeprobleme bei Krebskranken am 1. und 2. Dezember 1962 in Düsseldorf. *Mitteilungsdienst GBK Nordrhein-Westfalen* **2**, 786 (1963). — ¹⁹HOHORST, H.J.: Diskussion über Antibiotika, Zytostatika und Antimetaboliten in der Nachbehandlung von Krebskranken auf der Arbeitstagung über Ärztliche Nachsorgeprobleme bei Krebskranken am 1. und 2. Dezember 1962 in Düsseldorf. *Mitteilungsdienst GBK Nordrhein-Westfalen* **2**, 737 (1963). — ²⁰NACHMANSOHN, D.: Die Rolle des Acetylcholins in den Elementarvorgängen der Nervenleitung. *Der Mechanismus der hydrolytischen Prozesse. Ergebn. Physiol.* **48**, 654 (1956).

Anschrift: Doz. Dr. med. habil. H. WOLFF
Chirurgische Klinik der Karl Marx-Universität
701 Leipzig, Liebigstr. 20