

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Ghadimi)  
im Zentrum Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**5-Fluorouracil-Spiegelbestimmung unter neoadjuvanter  
Radiochemotherapie und adjuvanter Chemotherapie beim  
lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom**

**Analyse der pharmakologischen Variabilität von 5-Fluorouracil mittels  
Nanopartikelimmunoassays**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Henriette Quack  
aus  
Hamburg  
Göttingen 2014

**D e k a n:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med T. Liersch

II. Berichterstatter/in: PD Dr. Hendrik Wolff

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Martin Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung 19. Mai 2015

## Publikationsliste

### Teile dieser Dissertation wurden bereits publiziert in:

*Henriette Quack, Luise Erpenbeck, Hendrik A. Wolff, Thilo Sprenger, Cornelia S. Seitz, Michael P. Schön, Steffen Neumann, Kathrin Stanek, B. Michael Ghadimi, Beate Michels, Peter Middel, Inga-Marie Schaefer, Torsten Liersch, Lena-Christin Conradi*

Oxaliplatin-induced leukocytoclastic vasculitis under adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: Two cases of a rare adverse event, *Case Reports in Oncology*, 2013 Dec 11, 6, 609-15.

### Teile dieser Arbeit wurden als wissenschaftliches Poster vorgestellt:

*Conradi L.-C., Quack H., Sprenger T., Wolff H.A., Binder L., Ghadimi B.M., Homayounfar K., Bleckmann A., Lorenzen S., Nietert M., Beissbarth T., Liersch T.*

5-FU Spiegelbestimmung während neoadjuvanter Radiochemo- und adjuvanter Chemotherapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms, DGHO 2013, Wien

*Conradi LC, Quack H, Sprenger T, Wolff H, Schirmer M, Binder L, Ghadimi B, Homayounfar K, Bleckmann A, Nietert M, Lorenzen S, Beissbarth T, Liersch T*

5-FU dose monitoring under neoadjuvant radiochemotherapy and adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer, 2nd International Meeting on Molecular-Based Treatment of GI Cancer, Göttingen, 2013

# Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste.....	III
<b>I. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ätiologie des Rektumkarzinoms .....	1
1.2 Klinik und Diagnostik des Rektumkarzinoms.....	3
1.3 Einteilung des Rektumkarzinoms nach UICC .....	4
1.4 Stadien-adaptierte Therapieleitlinien .....	6
1.4.1 Chirurgische Therapie.....	6
1.4.2 Perioperative Therapie .....	7
1.5 Bedeutung der 5-FU-Therapie beim Rektumkarzinom.....	8
1.6 Aktuelle Dosierung von 5-FU .....	10
1.7 Genpolymorphismen der Dihydropyrimidindehydrogenase und Thymidylatsynthase .....	12
1.8 Therapeutisches Drugmonitoring unter 5-FU-Applikation .....	13
1.9 Zielsetzung und Fragestellung .....	14
<b>2 Patientenkollektiv und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Untersuchtes Patientenkollektiv .....	15
2.2 Blutprobengewinnung und Aufarbeitung.....	17
2.2.1 Blutentnahmezeitpunkte.....	17
2.2.2 Gewinnung der Blutproben .....	19

2.2.3	Asservierung der Blutproben.....	20
2.2.4	Verwendete Materialien .....	21
2.2.5	Messung der Proben.....	22
<b>2.3</b>	<b>Der Nanopartikelimmunoassay .....</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>AUC-Berechnung.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Dokumentation der therapieassoziierten Nebenwirkungen .....</b>	<b>27</b>
2.5.1	Akute Organtoxizität.....	27
2.5.2	Hämatologische Toxizität .....	28
2.5.3	Toxizität im Verlauf der Therapiezyklen.....	28
<b>2.6</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Bestimmung der 5-FU-AUC-Blutspiegel.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Die 5-FU-AUC-Spiegel des gesamten Patientenkollektivs .....</b>	<b>31</b>
3.2.1	Korrelation der 5-FU-AUC-Blutplasmaspiegel aus Stabilisator-versetzten EDTA-Monovetten mit den gekühlten EDTA-Monovetten .....	34
3.2.2	Korrelation der 5-FU-AUC-Blutplasmaspiegel von entnommenen EDTA- mit den Heparin-Blutproben.....	35
<b>3.3</b>	<b>Geschlechtsspezifische Analyse .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Altersspezifische Analyse .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Korrelation der 5-FU-AUC-Plasmaspiegel mit dem Body-Mass-Index.....</b>	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>Analyse der 5-FU-AUC-Blutplasmawerte im zeitlichen Verlauf .....</b>	<b>40</b>
<b>3.7</b>	<b>Abhängigkeit der Toxizität von den 5-FU-AUC-Spiegeln.....</b>	<b>42</b>
3.7.1	Hämatotoxizität unter der neoadjuvanten Therapie .....	42
3.7.2	Strahlentherapie-induzierte Organtoxizität .....	47
3.7.3	Hämatotoxizität unter der adjuvanten Therapie .....	48

3.7.4	Therapieassoziierte Organtoxizität unter der adjuvanten Therapie.....	50
<b>3.8</b>	<b>Korrelation der neoadjuvant gemessenen 5-FU-AUC-Spiegel mit dem Tumorrespons.....</b>	<b>53</b>
<b>3.9</b>	<b>Das Operationsverfahren .....</b>	<b>58</b>
<b>3.10</b>	<b>Das krankheitsfreie Überleben in Abhängigkeit der erzielten 5-FU-Spiegel in der multimodalen Therapie des Rektumkarzinoms .....</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>5-FU-Blutplasmaspiegel.....</b>	<b>61</b>
4.1.1	Der therapeutische AUC-Bereich .....	61
4.1.2	Analyse der Methodik .....	61
4.1.3	Interpretation der gemessenen AUC-Werte .....	63
4.1.4	Analyse der Körperoberfläche als Dosierungsgrundlage .....	66
4.1.5	Geschlechtsspezifische Analyse der AUC-Werte.....	67
<b>4.2</b>	<b>Korrelation der 5-FU-AUC-Werte mit der Therapie-assoziierten Toxizität .....</b>	<b>68</b>
4.2.1	Hämatotoxizität .....	68
4.2.2	Strahlentherapie-induzierte Toxizität .....	69
4.2.3	Organtoxizität unter der adjuvanten Therapie .....	70
4.2.4	Geschlechtsspezifische Toxizität .....	71
4.2.5	Applikation-bedingte Toxizität .....	72
4.2.6	Bedeutung des therapeutischen Drugmonitoring für Toxizität .....	73
<b>4.3</b>	<b>Zusammenhang zwischen den neoadjuvanten 5-FU-AUC-Spiegeln und dem Tumorrespons.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4</b>	<b>Vor- und Nachteile des therapeutischen Drugmonitoring mit 5-FU in aktuellen Therapiekonzepten .....</b>	<b>76</b>
4.4.1	Vorteile des Therapeutischen Drugmonitorings von 5-FU.....	76
4.4.2	Nachteile des Therapeutischen Drugmonitorings von 5-FU .....	78

<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerungen für die 5-FU-basierte Chemotherapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom.....</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

AE	<i>adverse Event</i>
AIO	Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie
APC	adenomatöse Polyposis Coli (Tumorsuppressorgen)
APR	abdominoperineale Rektumexstirpation
ARO	Arbeitsgemeinschaft Radiologische Onkologie
AUC	<i>area under the curve</i>
BMI	Body-Mass-Index
CAO	Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie
cm	Zentimeter
CSS	<i>cancer specific survival</i>
Css	stationäre Konzentration oder <i>steady state</i>
CTC	Common Toxicity Criteria
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
cTNM	TNM-Klassifikation nach klinischen Stagingergebnissen
CT	Computertomographie
DFS	<i>disease free survival</i>
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
5-FU	5-Fluorouracil
5-FU+Ox.	kombinierte 5-Fluorouracil- und Oxaliplatin-Chemotherapie
F-dUMP	Fluordesoxyuridylat
FOLFOX	siehe 5-FU+Ox. und Folinsäure
GRCSG	German Rectal Cancer Study Group
Hb	Hämoglobin
HLPC	Hochdruckflüssigchromatographie
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie
LV	Leukovorin/ Folinsäure
KOF	körperoberflächenbasierte Dosierung ( <i>body surface area</i> )



KRK	kolorektales Karzinom
mA	Milli-Absorption
ml	Milliliter
min	Minuten
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OS	<i>overall survival</i>
Ox.	Oxaliplatin
pCR	<i>pathohistological confirmed complete remission</i>
PME	partielle mesorektale Exzision
pTNM	TNM-Klassifikation nach histopathologischem Befund
SPE	Stabilisator-Plasma-EDTA-Monovetten
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
TARR	tiefe anteriore Rektumresektion
TDM	therapeutisches Drugmonitoring
TEM	transanale endoskopische Mikrochirurgie
THF	Tetrahydrofolatsäure
TME	totale mesorektale Exzision
TNM	Klassifikationssystem maligner Tumoren
TP	Thymidinphosphorylase
TS	Thymidylatsynthase
TRG	Tumorregressionsgrad ( <i>tumor regression grading</i> )
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
UTP	Uridintriphosphat
ypTNM	TNM-Klassifikation nach histopathologischem Befund nach neoadjuvanter Therapie

## 1 Einleitung und Fragestellung

In Deutschland stellt das kolorektale Karzinom (KRK) die zweithäufigste Tumorerkrankung mit über 60.000 Neuerkrankungen im Jahr und mit 12-14 % die zweithäufigste Todesursache dar. Niedersachsen ist innerhalb Deutschlands das Bundesland mit den meisten KRK-Neuerkrankungen im Jahr (Robert Koch-Institut 2012).

Derzeit werden bei erheblich niedrigerer Sterblichkeit pro Jahr doppelt so viele KRK diagnostiziert, wie zu Beginn der 1980er-Jahre (Robert Koch-Institut 2012).

Der Erkrankungsgipfel liegt bei Frauen und Männern durchschnittlich bei 65 Jahren (Robert Koch-Institut 2012). Das KRK ist, resultierend aus der hohen Inzidenz, eine Krankheit von großer gesundheitspolitischer und sozioökonomischer Bedeutung (Migdley und Kerr 1999). Bestandteil aktueller Forschung ist die Optimierung und Individualisierung der Therapie mit dem Ziel, die Überlebensrate zu verbessern. Die Entwicklung „molekularer Marker“ zielt auf die Prädiktion des Ansprechens auf eine multimodale Therapie und die Abschätzung des Rezidiv-Risikos im weiteren Krankheitsverlauf ab.

5-Fluorouracil (5-FU) stellt seit mehr als 50 Jahren die Basis der polymodalen Chemotherapie gastrointestinaler Tumoren dar (Hillcoat et al. 1978; Tebutt et al. 2002; Monga und O'Connell 2006). Die pharmakologische Wirksamkeit von 5-FU ist individuell sehr unterschiedlich. Eine Ursache liegt an genetischen Enzym polymorphismen zur Verstoffwechslung der Substanz und ebenso an unterschiedlichen Dosierungsmöglichkeiten von 5-FU (Gamelin et al. 1999). Seit Langem wird nach einem klinisch praktikablen Verfahren gesucht, das die individuelle Wirkung von 5-FU auf den Organismus in Form des *area under the curve*-Spiegels (AUC-Spiegel) erfasst. Basierend auf der Messung kann die Chemotherapie im Verlauf adaptiert werden mit dem Ziel, den optimalen Wirkungsbereich zu erreichen.

Ein innovatives Verfahren zur Optimierung der individuellen Dosierung von 5-FU stellt das therapeutische Drugmonitoring (TDM) dar. TDM wird routinemäßig in der Therapie mit Immunsuppressiva, Antiepileptika und Antibiotika eingesetzt und ist in den klinischen Alltag integriert (Salamone et al. 2007).

### 1.1 Ätiologie des Rektumkarzinoms

Das Rektumkarzinom kann sowohl sporadisch als auch hereditär entstehen. Sporadische Karzinome entstehen aus tubulösen, tubulo-villösen oder villösen Adenomen. Die maligne

Entartung erfolgt über sukzessive Mutationen, die konsekutiv Protoonkogene aktivieren und Tumorsuppressorgene inaktivieren (Fearon und Vogelstein 1990). Dieses Modell der Karzinogenese von Rektumkarzinomen basiert auf der Theorie der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ nach Vogelstein et al. (1975) (siehe Abbildung 1). Dabei wird für die Dauer der Entartung vom Adenom bis zur Karzinomentstehung ein Zeitraum von 10 bis zu 20 Jahren angenommen (Geißler und Graeven 2005).

Im sporadischen Fall beeinflussen Umweltfaktoren wie Ernährung und Bewegung die Karzinomentstehung. Mangelnde Bewegung, fettreiche und ballaststoffarme Kost und der häufige Verzehr von rotem Fleisch werden als Risikofaktoren zur Begünstigung eines KRK angesehen (Liersch et al. 2007, Robert Koch-Institut 2012). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn erhöhen das Entartungsrisiko zusätzlich (Liersch et al. 2007).

Im Rahmen der gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogramme können in Deutschland gesetzlich Krankenversicherte ab dem 55. Lebensjahr alle 10 Jahre eine Koloskopie zum Tumorscreening durchführen lassen und nach Adenomentfernung risikoadaptiert alle 2 Jahre erneut koloskopiert werden (Robert Koch-Institut 2012).

Genetisch vererbte Formen des KRK sind beispielsweise die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC). Das HNPCC ist die häufigste vererbte Kolonkarzinomform, die sich schon im jungen Alter zeigt. Die autosomal-dominant vererbte Mutation führt in 80 % zu einem KRK und ist mit dem Endometriumkarzinom und anderen gastrointestinalen Tumoren, zum Beispiel in Form eines Lynch-Syndroms, assoziiert (Al-Taie et al. 2001).

Der FAP liegt eine Mutation im Tumorsuppressorgen APC zugrunde, die zu einem massenhaften Befall des Dickdarms mit Polypen im Jugendalter führt. Das Entartungsrisiko der Adenome, die identisch mit den Tumoren sporadischer Genese sind, liegt bei nahezu 100 % (Midgley und Kerr 1999).

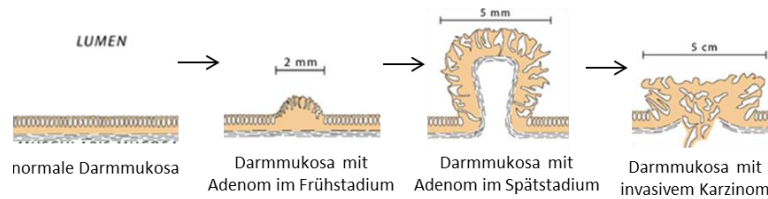


Abbildung 1: **Adenom-Karzinom-Sequenz**

Die Theorie nach Vogelstein et al. (1988) beschreibt die Entartung der Dickdarmschleimhaut von einem Adenom (nichtmaligner Polyp) bis hin zum invasiven Tumor (Karzinom) über die Ansammlung von Mutationen in Tumorsuppressor- und Protoonkogenen (modifiziert nach Hanski 2012).

## 1.2 Klinik und Diagnostik des Rektumkarzinoms

Symptome des Rektumkarzinoms fehlen häufig und variieren in ihrer Intensität. Veränderungen der Stuhlgewohnheiten von paradoxen Diarrhöen bis zur Obstipation, Flatulenzen und sogenannte Bleistiftstühle und intermittierende Blutauflagerungen können auf einen Darmtumor hinweisen (Liersch et al. 2007).

Des Weiteren sind eine Ileussyptomatik, Schmerzempfindungen und eine chronische Blutungsanämie sowie ein möglicherweise tastbarer Tumor im Rahmen einer digital-rektalen Untersuchung Befunde, die den Verdacht auf das Vorliegen eines Dickdarmtumors erhärten (Speights et al. 1991). Bei Vorliegen einer B-Symptomatik mit Gewichtsverlust um mehr als 15 % in einem halben Jahr, Nachtschweiß und Abgeschlagenheit sollte ebenso ein Rektumkarzinom diagnostisch ausgeschlossen werden (Herold 2011).

Im Rahmen der Erstdiagnose erfolgt obligat neben einer vollständigen Anamnese und klinischen Untersuchung inklusive digital-rektaler Untersuchung eine weitere Umfelddiagnostik zum kompletten Tumorstaging (Liersch et al. 2005).

Unter Einsatz des starren Rektoskopes wird der Tumor lokalisiert und in der Folge durch eine Probeexzision histopathologisch gesichert (Charnley et al. 1991). Die rektale Endosonographie ist zur Abschätzung der Infiltrationstiefe des Tumors (cT-Status), des lokoregionalen Lymphknotenbefalls (cN-Status) und einer möglichen Tumordinfiltration des Sphinkters von Bedeutung (Liersch et al. 2005). Eine Koloskopie des gesamten Dickdarmes ist obligat, um mögliche Zweitkarzinome auszuschließen (Schmiegel et al. 2013). Bei endoskopisch nicht passierbarem subtotal oder total stenosierendem Karzinomwachstum muss die endoskopische Untersuchung nach erfolgter Tumorresektion innerhalb von sechs Monaten nachgeholt werden. Die prätherapeutische Probeexzision des Tumors wird histopathologisch auf Tumortyp, Differenzierungsgrad und mögliche Lymphgefäßinvasionen untersucht (Fuchs et al. 2011)

Beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom wird vor Einleitung der multimodalen Therapie ein MRT des kleinen Beckens gefordert. Neben der Beurteilung der exakten longitudinalen Tumorausdehnung kann die Tumordinfiltrationstiefe innerhalb der mesorektalen Faszie sowie ein Mesorektum-überschreitendes Tumorwachstum mit einer möglichen Infiltration von Nachbarorganen wie Harnblase, Prostata, Vagina oder Uterus frühzeitig beurteilt werden (Schmiegel et al. 2013). Parallel lässt sich in bildgebenden Untersuchungsverfahren auch ein lokoregionaler Lymphknotenbefall umfangreicher darstellen (Krasna et al. 1988). Ergänzend werden im Rahmen des primären Stagings mittels Abdomensonographie und Röntgenthorax oder CT-Thorax prätherapeutisch bei jedem Patienten die bevorzugten hämatogenen Metastasierungsorte Leber und Lunge untersucht (Bujko und Bujko 2010).

### 1.3 Einteilung des Rektumkarzinoms nach UICC

Die Untersuchungsbefunde des prätherapeutischen Stagings werden mit einem „c“, die Histologiebefunde nach initial multimodaler Therapie (neoadjuvanter Vorbehandlung) mit einem „(y)p“ und die Resektatbefunde ohne neoadjuvante Vorbehandlung mit einem „p-“ gekennzeichnet, um die präzise Klassifikation eines Befundes in der jeweiligen UICC-Einteilung zu gewährleisten (Wittekind und Meyer 2010).

<b>TNM Klassifikation</b>	
<b>T – Primärtumor</b>	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis /T1	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch Muscularis propria: in Subserosa oder perikolisches / perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
T4a	Perforation ins viszerale Peritoneum
T4b	Tumordinfiltration in andere Organe oder Strukturen
<b>N - Regionäre Lymphknoten</b>	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N1a	Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2 bis 3 regionären Lymphknoten
N1c	Satellitenmetastasen im Fettgewebe der Subserosa oder im perikolisches/perirektalem Gewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M - Fernmetastasen</b>	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Metastasen auf ein Organ beschränkt (z.B. Leber, Lunge, Ovar)
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Tabelle 1: Tumorklassifikation nach TNM

T charakterisiert die Tumordinfiltrationstiefe, N den Lymphknotenbefall und M die Fernmetastasierung (nach Wittekind und Meyer, 2010, Seite 96-97).

Basierend auf der Grundlage des aus dem prätherapeutischen Staging resultierenden cUICC-Stadiums wird das multimodale Therapieverfahren festgelegt.

Bei der anatomiegerechten standardisierten Tumorresektion erfolgt immer eine systematische Lymphknotendisektion. Histologisch wird die Untersuchung von mindestens 12-14 Lymphknoten (UICC/TNM-Klassifikation: mindestens 12 Lymphknoten; AJCC-Klassifikation: mindestens 14 Lymphknoten) zum Nachweis/Ausschluß einer Metastasierung gefordert (Gehoff et al. 2012; Wittekind und Meyer 2010; Edge und Compton 2010).

Das intraoperativ entnommene Resektat des tumortragenden Darmabschnittes mit dem entsprechenden lymphatischen Abflussgebiet wird histopathologisch aufgearbeitet. Tumorinfiltrationstiefe, Nodalstatus und Fernmetastasierung charakterisieren die (y)pUICC-Stadieneinteilung und sind prognoserelevant (siehe Tabelle 2).

UICC	T	N	M
<b>Stadium O</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadium I</b>	T1, T2	N0	M0
<b>Stadium II a</b>	T3	N0	M0
<b>Stadium II b</b>	T4a	N0	M0
<b>Stadium II c</b>	T4b	N0	M0
<b>Stadium III</b>	Jedes T	N1, N2	M0
<b>Stadium III a</b>	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
<b>Stadium III b</b>	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
<b>Stadium III c</b>	T4a	N2a	M0
	T3, T4b	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
<b>Stadium IV a</b>	Jedes T	Jedes N	M1a

Tabelle 2: Stadiengruppierung nach UICC

Das UICC 0-Stadium ist durch das Carcinoma in situ oder eine histopathologische komplette Tumorregression (ypT0) nach präoperativer (y) multimodaler Therapie gekennzeichnet. Im UICC I-Stadium ist die Tumorinfiltration bis auf die Muscularis propria ohne Metastasierung fortgeschritten. Das UICC II-Stadium ist durch die tiefe Tumorinfiltration bis auf die Muscularis propria ohne Nodal- und Fernmetastasierung charakterisiert, während im UICC III-Stadium unabhängig vom T-Stadium ein Lymphknotenbefall vorliegt. Im UICC IV-Stadium liegt immer eine Fernmetastasierung vor (nach Wittekind und Meyer, 2010. Seite 98-99).

## 1.4 Stadien-adaptierte Therapieleitlinien

### 1.4.1 Chirurgische Therapie

Die anatomische Einteilung des Rektums erfolgt in ein unteres (< 6 cm), mittleres (6 bis < 12 cm) und oberes Drittel (12 bis < 16 cm) ab Anokutanlinie (siehe Abbildung 2). Die Lokalisationshöhe des Tumors ist ausschlaggebend für die Wahl des Operationsverfahrens (Midgley und Kerr 1999).

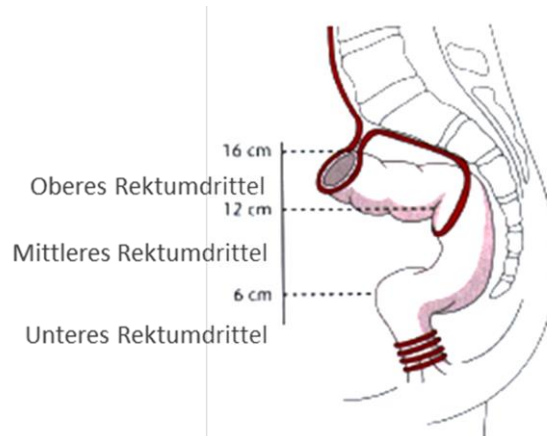


Abbildung 2: **Anatomische Einteilung des Rektums**

Die Einteilung der Rektumdrittel erfolgt mittels starren Rektoskop. Mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Dr. med. H. Becker (angelehnt an Becker, 2006. Seite 603).

Bei Vorliegen eines Carcinoma in situ (UICC 0), bei dem die Basalmembran nicht durchbrochen ist, wird eine transanale endoskopische mikrochirurgische Vollwandexzision (TEM) zum Abtragen des Tumors empfohlen. Gleiches kann bei Vorliegen eines T1-Tumors mit einem Biopsiegrading G1 erfolgen (Gaedcke et al. 2011). Im Stadium UICC 0 und I werden nach einer lokalen Tumorexzision engmaschige Nachsorge-Rektoskopien über zwei Jahren postoperativ empfohlen (Fuchs et al. 2011).

Ansonsten werden die Tumoren des UICC I- Stadium (T1 mit Grading G3-4, sogenannte *high-risk*-Tumoren und T2-Tumoren) primär mit einer transabdominellen Rektumresektion einschließlich totaler mesorektaler Exzision (TME) entfernt (Liersch et al. 2005). Eine kontinenserhaltende onkologische Rektumresektion lässt sich durchführen, wenn der Tumor im oberen, mittleren oder unteren Drittel des Rektums lokalisiert ist und ein aboraler Sicherheitsabstand von mindestens 2 cm Abstand zum Schließmuskel eingehalten werden kann. Bei der TME wird durch Entfernung des kompletten mesorektalen Fettkörpers das gesamte lokoregionäre Lymphabflussgebiet unter Schonung des Plexus hypogastricus superior, der Plexus hypogastrici inferiores und der Nn. hypogastricii bis zum Beckenboden

exzidiert (Bruch und Schwandner 2002). Karzinome, die nahe am Sphinkter lokalisiert sind und diesen oder die Levatormuskulatur infiltrieren, werden mittels abdominoperinealer Rektumexstirpation (APR) operiert.

Die APR umfasst neben der TME auch die komplette Resektion des Sphinkterapparates, die partielle beziehungsweise sogar komplette Resektion der Levatormuskulatur, des perinealen/perianalen Fettkörpers und das Anlegen eines endständigen Kolostomas (Liersch et al. 2005; Palmer et al. 2014).

Die Qualität der chirurgischen Resektion wird perioperativ mit einer Injektion von Methylenblau-Lösung in die abgesetzte Arteria mesenterica inferior überprüft, um die Unversehrtheit der mesorektalen Faszie zu beurteilen. Zudem wird die TME-Qualität makroskopisch durch den befundenen Pathologen anhand der MERCURY-Kriterien beurteilt (Liersch et al. 2005).

Rektumkarzinome des oberen Drittels können mit einem Sicherheitsabstand von 5 cm mittels partieller mesorektaler Exzision (PME) exzidiert werden (Liersch et al. 2005). Ob die PME hinsichtlich des onkologischen Outcomes unter der Hypothese eines größeren Funktionserhaltes tatsächlich der üblichen TME überlegen ist, klärt derzeit die laufende GAST-05-Studie (ISRCTN35198481).

#### **1.4.2 Perioperative Therapie**

Die Lokalrezidivrate des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms (UICC-II/-III Stadien) im mittleren und unteren Rektumdrittel ist aufgrund der anatomischen Lage gegenüber Kolonkarzinomen deutlich erhöht, so dass eine multimodale Therapie aus kombinierter Radio- und Chemotherapie (prä- oder postoperativ) sinnvoll ist (Monga und O'Connell 2006). Im Fall einer präoperativen (neoadjuvanten) Radiochemotherapie erfolgt nach einer Therapiepause von vier bis sechs Wochen üblicherweise die onkologische Rektumresektion (Gaedcke et al. 2011; Bujko und Bujko 2010). Bei Karzinomen im unteren Rektumdrittel entscheidet der Operateur anhand der Radiochemotherapie-induzierten Tumorregression über das jeweilige Resektionsverfahren (tiefe anteriore Rektumresektion (TARR) mit koloanaler Anastomose oder APR). Nach maximal acht Wochen postoperativer Regenerationszeit wird die multimodale Behandlung mit einer adjuvanten Chemotherapie abgeschlossen (siehe Abbildung 3).



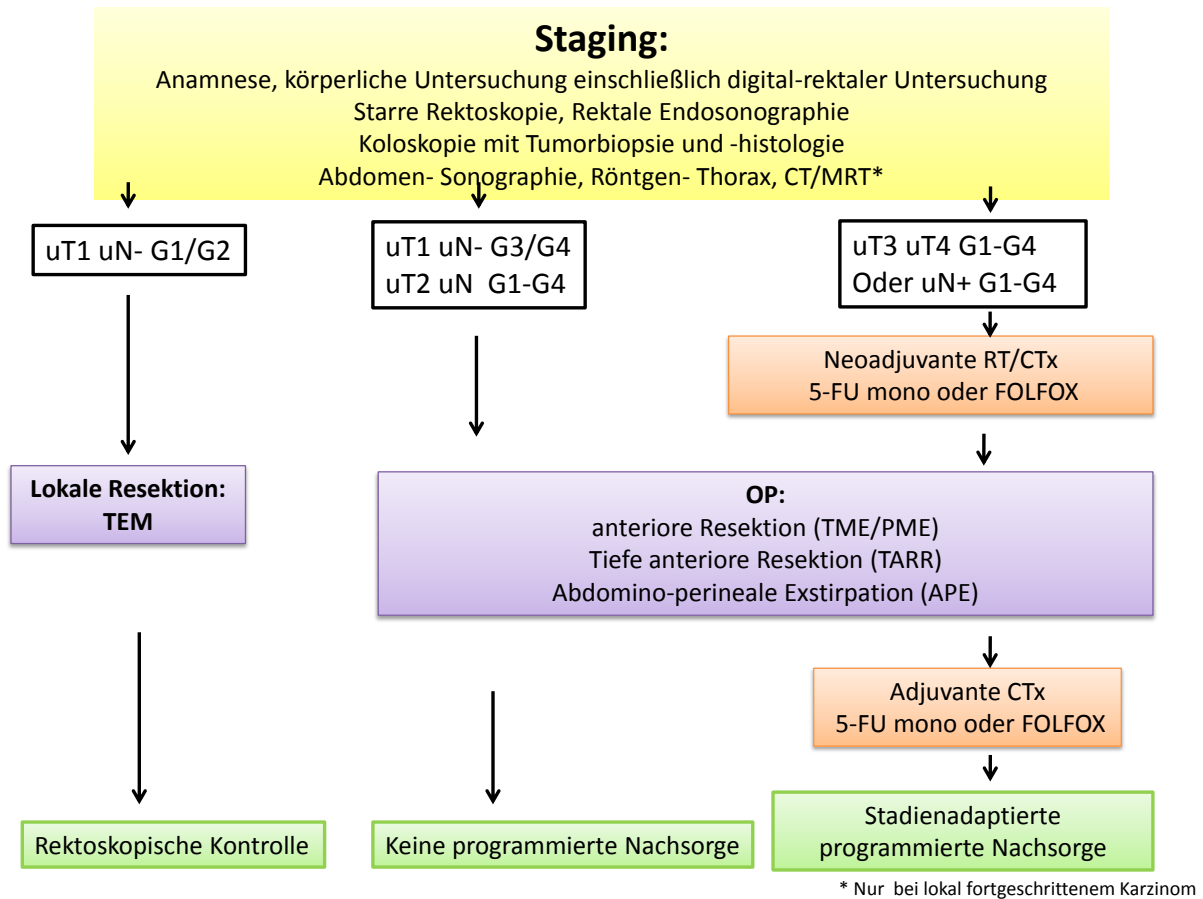


Abbildung 3: **Übersicht der Stadien-adaptierten Therapie**

Eigene Abbildung vom Autor dieser Arbeit. (Orientiert an: Liersch 2005, Seite 312).

Zurzeit ist es üblich, 5-FU per intravenöser Infusion allein oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika (z.B. Oxaliplatin oder Irinotecan) bei der Behandlung des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms einzusetzen (Bertino et al. 2007).

### 1.5 Bedeutung der 5-FU-Therapie beim Rektumkarzinom

Karzinomzellen haben einen hohen Stoffwechsel und benötigen vermehrt Nukleotide (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin), um DNA-Synthese betreiben und sich teilen zu können (Berg 2010). Medikamente, die direkt den DNA-Stoffwechsel hemmen, werden gezielt in der Therapie von Tumoren eingesetzt.

Das Fluoropyrimidin 5-FU (siehe Abbildung 4) wird seit mehr als 60 Jahren in der Tumorthherapie von Kolon- und Rektumkarzinomen, Mammakarzinomen, Kopf-Hals-Tumoren und dem Ovarialkarzinom eingesetzt und ist die Grundlage von Polychemotherapie-Regimen beim Rektumkarzinom (Midgley und Kerr 1999; Pinedo und Peters 1988; Beumer et.al 2009).

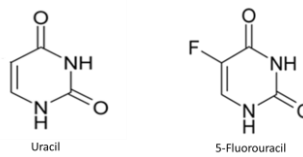


Abbildung 4: **Strukturformel von Uracil und 5-FU**

5-FU ist aufgebaut wie das Nukleotid Uracil und enthält zusätzlich eine kovalente Bindung zu Fluor (F) am C5-Atom des Pyrimidinringes von Uracil. Eigene Abbildung vom Autor dieser Arbeit.

Als Pyrimidinanalogon greift 5-FU mit seinem ähnlichen Aufbau zu der Base Uracil (siehe Abbildung 4) gleichzeitig in die RNA- und DNA-Synthese ein (Mandel 1981; Lönn und Lönn 1984). Dieser „Fehleinbau“ führt zu Einzelstrangbrüchen in der DNA und stoppt die Proteinbiosynthese der betroffenen Zellen (siehe Abbildung 5) (Mandel 1981; Lönn und Lönn 1984; Liao et al. 2005)

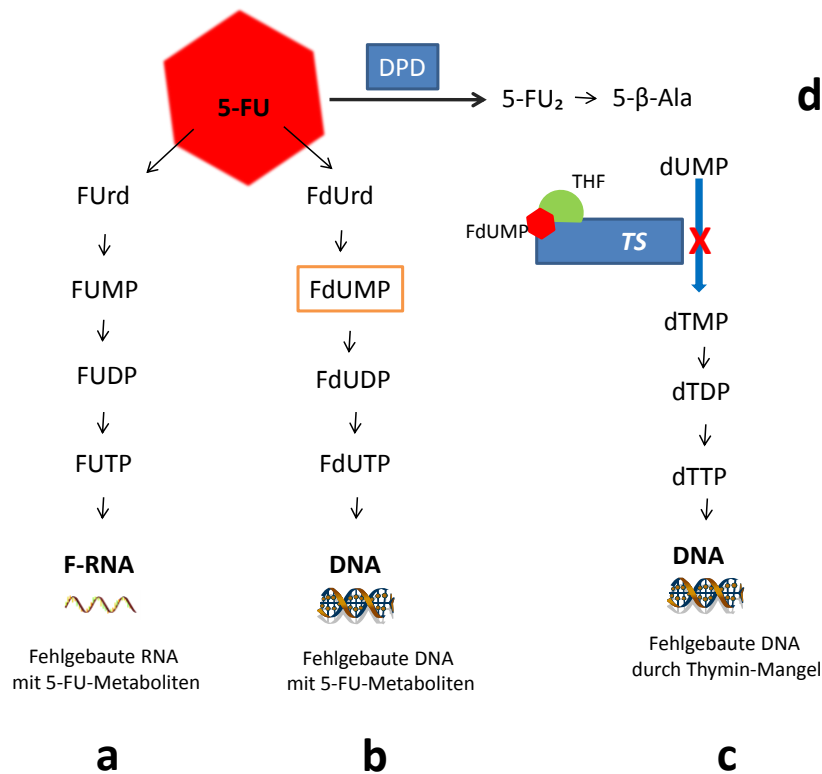


Abbildung 5: **5-FU Metabolismus**

5a, 5b: 5-FU wird zunächst in die aktiven Nukleotide FUDP und FdUDP umgebaut, welche als fehlerhafte Basen anstelle von UTP und dTDP in RNA und DNA eingebaut werden.

5c: Die intrazelluläre Thymin-de-novo-Synthese kommt durch die Ausbildung eines starken Komplexes (THF - F-dUMP - TS-Komplex) zum Erliegen.

5d: Der Abbau des 5-FUs wird über die DPD katalysiert. Eigene Abbildung vom Autor dieser Arbeit. (Orientiert an: Pinedo und Peters, 1988, Seite 1654).

Welcher dieser Pathomechanismen in Tumorzellen dominiert, ist nicht genau bekannt. Wahrscheinlich spielen sowohl die Art des Tumors als auch die Art der Applikation von 5-FU

eine wesentliche Rolle. In Zellen mit einer geringeren Stoffwechselaktivität wirkt 5-FU weniger stark als in Tumorgewebe mit hohem Zellstoffwechsel (Pinedo und Peters 1988).

Die enzymatische Elimination findet schnell und vorwiegend in der Leber statt, nur 20 % des intravenös applizierten 5-FU werden unverändert renal ausgeschieden. (Pinedo und Peters 1988; Mutschler E 2008).

Genetische Enzym polymorphismen können die Metabolisierungszeit des 5-FUs erheblich beeinflussen (siehe Kapitel 1.7). Die Wirkung des Pyrimidin analogums ist meist stärker bei Zellen des Organismus wie Epithelzellen, Blutbildungszellen und auch Tumorzellen, die eine hohe Mitoserate haben.

Typische toxische Auswirkungen der absterbenden Epithelzellen des Körpers unter 5-FU-Applikation sind Mukositis, Stomatitis, Diarrhöen und Alopezie.

Die Nebenwirkungen von 5-FU auf das blutbildende System machen sich durch Knochenmarksdepression (Myelosuppression), einem Mangel an Erythrozyten (Anämie), Leukozyten (Leukopenie oder Neutropenie) und Thrombozyten (Thrombozytopenie) bemerkbar (The Meta-analysis group in cancer 1998). Eine typische Nebenwirkung, die besonders durch die orale 5-FU-Chemotherapie oder unter Dauerinfusion auftritt, ist das Hand-Fuß-Syndrom, bei dem es zu erythematösen Hautveränderungen in den Handinnenflächen und an den Fußsohlen kommt (Salzberg und Herrmann 2000). Koronargefäßspasmen mit Angina-Pectoris-Symptomatik stellen eine seltene, gefürchtete Komplikation dar, die meist zum Therapieabbruch führt (Scheffold et al. 2005).

Die klinische Manifestation von 5-FU-Toxizität ist momentan entscheidend für eine Reduktion der Chemotherapie oder sogar einem vorzeitigen Therapieabbruch.

## 1.6 Aktuelle Dosierung von 5-FU

Aktuell wird die Dosierung von 5-FU, wie bei vielen anderen Chemotherapeutika, über die Berechnung der Körperoberfläche ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) (siehe Abbildung 6) des Patienten ermittelt (Saif et al. 2009).

$$A = 0,007184\text{m}^2 \times \left(\frac{h}{\text{cm}}\right)^{0,725} \times \left(\frac{m}{\text{kg}}\right)^{0,425}$$

### Abbildung 6: Formel zur Berechnung der KOF-basierten Dosierung

Die „DuBois-Formel“ dient zur Abschätzung der Körperoberfläche A aus der Körpergröße h und dem Körpergewicht m beim Menschen (Du Bois und Du Bois, 1989. Seite 312-313).

Vorreiter in der Körperoberflächen-basierten (KOF) Dosierung ist Dr. Pinkel, der 1958 eine Formel zur Dosierung der Chemotherapie für Kinder entwickelte (Sparreboom 2005). Die Grundlage der individuellen 5-FU-Dosierung ist die gezielte optimale therapeutische Breite, die in frühen klinischen Studien in den 1980er Jahren ermittelt und in einem Schema zur Dosisanpassung festgelegt wurde. Diese ermittelte Menge wird mit der individuellen Körperoberfläche des Patienten verrechnet (Saif et al. 2009). Die zurzeit gängige KOF-basierte 5-FU-Dosierung ist nachweislich mit erheblicher Variabilität bis um das hundertfache der 5-FU-Blutplasmaspiegel bei den Patienten verbunden. Diese pharmakokinetische Variabilität, entsteht durch individuelle Medikamenten-Adsorption, -Distribution, -Verstoffwechslung und auch -Exkretion. Sie führt zu Behandlungsfehlern und ist häufig Grund für Nebenwirkungen unter der Therapie (Saif et al. 2009). Die KOF-orientierte Dosierung erreicht ihre Grenzen, wenn die Therapie von den Patienten nicht vertragen wird und deshalb die Dosis reduziert werden muss (Saif et al. 2009).

Die Therapieschemata mit dem Antimetaboliten 5-FU haben sich über die Jahre verändert. Ursprünglich wurde 5-FU als alleinige Bolusinfusion über wenige Minuten gegeben. Aufgrund der präklinischen Evidenz, dass unter der 5-FU-Bolus-Gabe die Zytotoxizität auf die Tumorzellen niedrig ist und mithin die Plasmahalbwertszeit von 5-FU mit 10-20 Minuten kurz ist, wurden Dauerinfusionsschemata entwickelt mit dem Ziel, die Zytotoxizität zu erhöhen. Der Wirkungszeitraum auf die Tumorzellen kann dadurch erhöht werden. Es wurde gezeigt, dass die Dauerinfusionstherapie eine höhere Ansprechrate hat, das mittlere Überleben von 22 % auf 27 % steigert und für den Patienten mehr Lebensqualität erzielt wird (Lokich et al. 1989; Gramont et al. 1997). Das Auftreten und der Grad von Toxizität sind unter den schnell applizierten 5-FU-Bolusregimen stärker als unter den Dauerinfusionsregimen (The Meta-analysis group in cancer 1998). Ungeachtet dessen sind intra- und interindividuelle pharmakokinetische 5-FU-Spiegel-Schwankungen unter der Dauerinfusionstherapie eine Ursache für das Auftreten von Toxizität. In den ersten Stunden nach Dauerinfusionsgabe treten 5-FU-Spiegelschwankungen auf, die ungefähr 18 Stunden nach Beginn der Dauerinfusionstherapie mit einer Ausbildung einer *steady state*-Konzentration ( $C_{ss}$ ) von 5-FU enden (Adjei et al. 2002).

Die zurzeit üblicherweise verabreichten Kombinationstherapien mit 5-FU und Folinsäure (LV) haben eindeutig höhere Tumoransprechraten und ein besseres progressionsfreies

Überleben im Intervall, als die alleinige Therapie mit 5-FU (Poon et al. 1989; Minsky et al. 1992; O'Connell et al. 1997).

## **1.7 Genpolymorphismen der Dihydropyrimidindehydrogenase und Thymidylatsynthase**

Die individuelle Pharmakokinetik von 5-FU wird durch Alter, Geschlecht, Organfunktionen, Gesamtmorbidität, Medikamenteninteraktionen und vom Genotyp beeinflusst (Kaldate et al. 2012; Extermann 2007; Milano et al. 1992).

Mehr als 80 % des applizierten 5-FUs wird von der Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) verstoffwechselt. Dabei variiert die DPD-Aktivität interindividuell: 3-5 % der Bevölkerung haben ein partielles und 0,2 % der Bevölkerung ein komplettes DPD-Defizit (Walther et al. 2009; Saif et al. 2009). Es sind mehr als 30 autosomal vererbare Genpolymorphismen identifiziert, die zu einer leicht bis stark reduzierten DPD-Aktivität führen (Saif et al. 2009). Das Vorliegen eines DPD-Defizits führt zu der reduzierten Fähigkeit, 5-FU abzubauen und auszuscheiden. Die Halbwertszeit des Medikaments kann sich von normalerweise 10-15 Minuten bis auf 159 Minuten verlängern (Saif et al. 2009). Die normaldosierte Chemotherapie mit 5-FU wirkt bei einem DPD-defizienten Menschen stark toxisch und kann sich in lebensbedrohlichen myelosuppressiven, neurologischen und gastrointestinalen Nebenwirkungen manifestieren (siehe Kapitel 1.5) (Locker et al. 2006; Capitain et al. 2008a; Wei et al. 1996).

Bei Nachweis einer heterozygoten Genmutation muss schon vor Chemotherapiegabe die Dosis von 5-FU reduziert werden (Diasio und Johnson 1998). Die einzige uneingeschränkte Kontraindikation für die Therapie mit 5-FU besteht im Fall eines kompletten homozygoten DPD-Defizits, das mit weniger als < 0,1 % in der Bevölkerung auftritt (Gamelin 2007a).

Ein möglicher Ansatz zur Bestimmung der unterschiedlichen Phänotypen der DPD wurde mit Messungen der Dihydrouracil/Uracil-Ratio und der Plasmaclearance von 5-FU entwickelt. Dieses Verfahren kann Risikopatienten identifizieren, aber nicht alle Patienten mit einer niedrigen 5-FU-Clearance erfassen (Gamelin 2007a). Tatsächlich haben nur 17 % der Patienten mit reduzierter DPD-Aktivität eine molekulare Ursache für ihr phänotypisches Defizit, die über molekulargenetische Untersuchungen ermittelt werden können (Gamelin 2007a).

Ergänzend dazu variiert die DPD stark mit der zirkadianen Rhythmik des menschlichen Körpers, die sich reziprok in der Plasmakonzentration von 5-FU zeigt (Adjei et al. 2002).

Ein weiteres wichtiges Schlüsselenzym in der Metabolisierung von 5-FU ist die Thymidylat-synthase (TS) (siehe Abbildung 5). Die Umwandlung von 5-FU in seinen aktiven Metaboliten F-dUMP wird durch die TS katalysiert (Walther et al. 2009; Locker et al. 2006). Vorangegangene Studien zeigten, dass eine reduzierte Expression der TS eine unzureichende Umwandlung von 5-FU zu F-dUMP bedingt und die ternäre Komplexbildung (THF - F-dUMP - TS-Komplex) limitiert wird. Im Zuge dessen wird die TS nicht vollständig inaktiviert und gleichzeitig ist die Wirkung von 5-FU abgeschwächt (Walther et al. 2009).

Aus klinischer Sicht werden aufgrund der bekannten und schwer erfassbaren Variabilität der Enzyme DPD und TS ein Verfahren zur frühzeitigen Detektion eines erhöhten Toxizitätsrisikos sowie eine besser kontrollierbare Steuerung der 5-FU-Therapie gefordert.

## 1.8 Therapeutisches Drugmonitoring unter 5-FU-Applikation

Bei gleicher KOF-Dosierung von 5-FU werden individuelle Unterschiede in der systemischen 5-FU-Exposition gemessen (Gamelin 2007b). Mehrere Studien haben mittels pharmakokinetischer Blutplasmaspiegelmessungen gezeigt, dass 25-30 % der Patienten unter der KOF-adaptierten 5-FU-Therapie optimal dosiert, 40-60 % der Patienten unterdosiert und 10-20 % überdosiert sind (Saif et al. 2009; Capitain et al. 2012).

Zur Optimierung der individuellen Dosierung von 5-FU stellt das TDM, basierend auf einem homogenen Nanopartikel-Agglutination-Immunoassay zur Bestimmung von 5-FU-Konzentrationen in humanem Blutplasma, ein innovatives Verfahren dar (Salamone et al. 2007). Mit Hilfe der gemessenen Konzentration lässt sich der 5-FU-AUC-Spiegel über die Konzentration/Zeit-Kurve eines Stoffes ( $\text{mg} \times \text{h/l}$ ) berechnen. Die AUC zeichnet die Bioverfügbarkeit des Pharmakons in dem gemessenen Organismus ab. Die Größe des AUC-Spiegels hängt von der Eliminationskonstanten (Abbauenzyme), dem Verteilungsvolumen (Blutvolumen) und der resorbierten Menge (applizierte Dosis) ab (Saif et al. 2009).

Der Zielbereich der 5-FU-AUC-Spiegel ist unabhängig vom Tumortyp und der Behandlungsstrategie. Mehrere Forschungsteams in den 1980er Jahren konnten einen Zielbereich von 20-30 AUC-Units ( $\text{mg} \times \text{h/l}$ ) ermitteln (Kaldate et al. 2012; Gamelin et al. 1996). Basierend auf der Infusionsdauer kann die AUC aus der Blutplasmakonzentration errechnet werden (siehe Abbildung 16) (Gamelin 2007b). Anhand des gemessenen AUC-Spiegels im Blut nach der 5-FU-Applikation lässt sich abschätzen, ob der ermittelte AUC-Wert für den einzelnen Patienten im optimalen Wirkungsbereich liegt. Patienten mit viel zu niedrigen 5-FU-Blutplas-

maspiegeln können frühzeitig während der Behandlung identifiziert werden, und ein Dosisangepasstes Behandlungskonzept kann ausgewählt werden (Gamelin 2007a).

Die pharmakokinetisch orientierte Dosisanpassung über TDM kann in Zukunft helfen, die optimale 5-FU-Dosis individuell zu ermitteln. Klinisches Ziel ist es die Wirksamkeit der Chemotherapie mit der Folge eines verlängerten *disease free survival* (DFS) zu erhöhen und eine Reduktion der Nebenwirkungen mit der Vermeidung von Grad 3-4 Toxizität zu erreichen (Saif et al. 2009).

## 1.9 Zielsetzung und Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit werden die 5-FU-Blutplasmaspiegel bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom unter 5-FU-basierter Chemotherapie gemessen. Dabei wird die individuelle heterogene Pharmakokinetik des Antimetaboliten 5-FU unter der KOF-adaptierten Dosierung untersucht. Nach Etablierung eines Nanopartikelimmunoassays im Institut für Klinische Chemie der UMG werden die Blutplasmaprobe analysiert und der 5-FU-AUC-Spiegel errechnet. Parallel werden die Nebenwirkungen unter der applizierten Chemotherapie und die klinischen Daten der Patienten im Langzeitverlauf in der Studien-datenbank der KFO 179-2 dokumentiert.

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Welche AUC-Blutplasmaspiegel werden bei den Patienten unter der 5-FU-basierten Therapie gemessen?
2. Wie viele Patienten haben AUC-Werte, die niedriger als 20 mg/l unter der 5-FU-Therapie sind?
3. Hat ein erhöhter 5-FU-AUC-Plasmaspiegel für den Patienten Auswirkungen in Form von gastrointestinaler oder hämatologischer Toxizität?
4. Gibt es geschlechtsspezifische oder altersspezifische Unterschiede in der Höhe des AUC-Wertes?
5. Können Schlussfolgerungen für die 5-FU-basierte Chemotherapie der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom gezogen werden? Wie ist die Tumorrespons im neoadjuvanten Therapieabschnitt unter Betrachtung des 5-FU-AUC-Spiegels zu bewerten?
6. Inwieweit lässt sich die 5-FU-AUC-Spiegelmessung in den klinischen Alltag praktisch integrieren? Welche Vorteile bringt das TDM für den Patienten?

## 2 Patientenkollektiv und Methoden

### 2.1 Untersuchtetes Patientenkollektiv

In der vorliegenden Dissertation wurden Blutplasmaproben unter 5-FU-Chemotherapie und klinische Daten von insgesamt 82 Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (cUICC-II/-III) untersucht.

Die Diagnose der untersuchten Patienten wurde zwischen April 2009 und April 2012 gestellt. Die anschließende multimodale Therapie erfolgte in enger Kooperation zwischen der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Direktor: Prof. Dr. Dr. Hess), der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. M. Ghadimi, ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. H. Becker), dem Institut für Gastroenteropathologie (Direktoren: Prof. Dr. med. Ströbel, Prof. Dr. med. H.-J. Radzun) sowie in der Interdisziplinären Kurzzeitonkologie (IKO) (Direktor der Abteilung für Hämatologie und Medizinische Onkologie und Leiter der IKO: Prof. Dr. med. L. Trümper) im IKO-Teilbereich der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie (Verantwortlicher Leiter dieses IKO-Teilbereiches: Prof. Dr. med. T. Liersch) der UMG.

Die 5-FU-Blutplasmaspiegelmessungen erfolgten im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie (komm. Leiter: Prof. Dr. L. Binder, Direktor zum Zeitpunkt der Untersuchungen: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich) nach einem CE-zertifizierten Verfahren der Firma Saladax auf dem „COBAS INTEGRA® 800“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland).

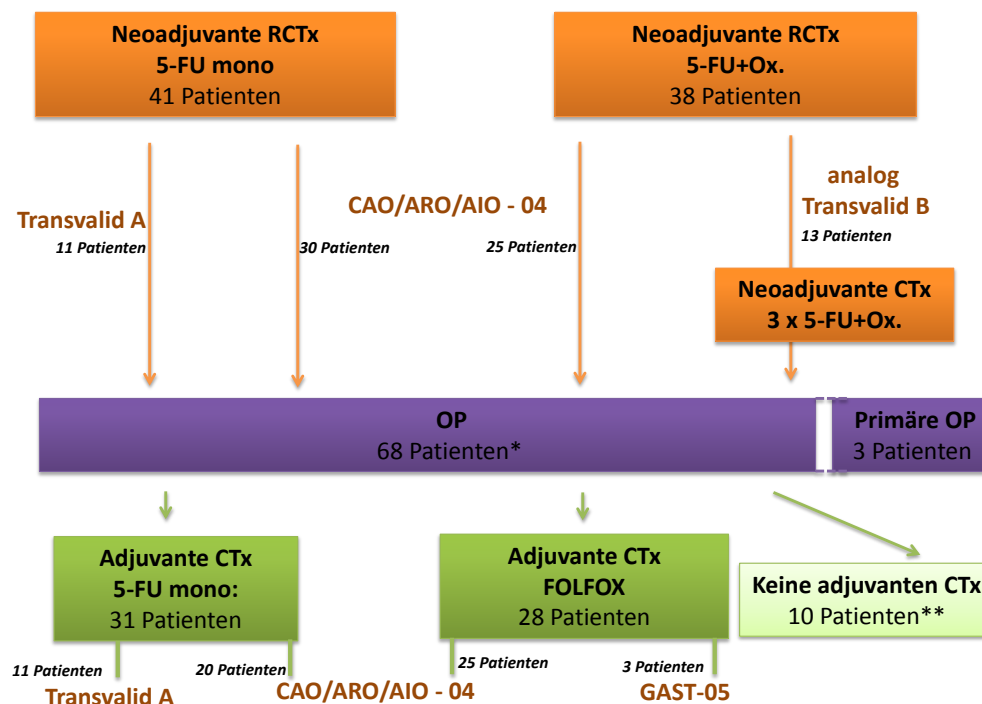
In die klinische Untersuchung wurden 26 weibliche (32 %; median: 61 Jahre) und 56 männliche (68 %; median: 65 Jahre) Patienten mit einem mittleren Alter von 64 Jahren (21-84 Jahren) eingeschlossen.

Die untersuchten Patienten wurden in oder analog klinischer, prospektiv randomisierter Phase-II- und -III-Studien (z.B. der „German Rectal Cancer Study Group“ (GRCSG), CAO/AIO/ARO-04, GAST-05, TransValid-A und TransValid-B; Studienprotokolle siehe Anhang S.84) therapiert, für die jeweils ein positives Votum der Ethikkommission der UMG vorlag. Von allen in die Analysen einbezogenen Patienten lag vor Einleitung der Therapie eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Durchführung der multimodalen Therapie und der Begleituntersuchungen mit Erhebung von Patienten-bezogenen Follow-Up-Daten (durch die KFO 179-2) vor.



Von den 82 Patienten erhielten n=66 (80 %) eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit begleitender 5-FU-mono-Therapie (n=41) oder eine durch Oxaliplatin intensivierte FOLFOX-Chemotherapie (n=25) (siehe Abbildung 7). Die übrigen 16 % (n=13) erhielten eine Radiochemotherapie mit 5-FU+Oxaliplatin gefolgt von drei Zyklen 5-FU+Oxaliplatin (5-FU+Ox.) im Rahmen einer Pilotphase (individuelle Heilversuche) der TransValid-B.

Eine adjuvante Chemotherapie nach Tumorresektion erhielten bis zum Zeitpunkt April 2012 n=59 (72 %) Patienten, wobei 31 (52 %) Patienten mit alleiniger 5-FU-Therapie und 28 (47 %) Patienten mit FOLFOX therapiert wurden. Die zwei Patienten (0,02 %) mit Rektumkarzinomen des oberen Drittels wurden innerhalb der GAST-05-Studie (ISRCTN35198481) mit einer adjuvanten Chemotherapie nach dem FOLFOX-Schema (n=2) nach primärer Tumorresektion behandelt. Ein weiterer Patient wurde bei Vorliegen eines Zweittumors analog der GAST-05-Studie therapiert.



\*11 Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch nicht operiert worden.

\*\* 5 Patienten lehnten die adjuvante Chemotherapie ab

/5 Patienten erhielten noch keine adjuvante Chemotherapie zum Auswertungszeitpunkt.

**Abbildung 7: Patientenübersicht mit durchgeführten Therapien**

Das Schema zeigt alle untersuchten Patienten in Bezug auf die verschiedenen Studien-Therapieschemata zum Auswertungszeitpunkt.

Alle Patientendaten, Studienschemata, Protokolle und Analysen wurden im Teilprojekt 5 „TP 5: Prädiktive und prognostische Biomarker im lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom“ der

DFG-geförderten klinischen Forschergruppe KFO 179-2 „Biological Basis of Individual Tumor Response in Patients with Rectal Cancer“ ([www.kfo179.de](http://www.kfo179.de)) - erhoben und durchgeführt.

## **2.2 Blutprobengewinnung und Aufarbeitung**

### **2.2.1 Blutentnahmezeitpunkte**

Die neoadjuvante Radiochemotherapie wurde gemäß den Studienprotokollvorgaben werktags durch die täglichen Bestrahlungen des kleinen Beckens (28 d x 1,8 Gy) in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie durchgeführt. Die Blutentnahme für die Auswertung der individuellen AUC-Spiegel des 5-FUs unter der konkomitanten Radiochemotherapie erfolgte frühestens 2 h nach Start der 5-FU-Dauerinfusion.

Die Firma Saladax, die den Immunoassay My5-FU entwickelte, empfiehlt die Abnahme der Blutprobe frühestens zwei Stunden nach Infusionsbeginn, da bei kontinuierlicher Infusion 5-FU den C<sub>ss</sub> innerhalb einer Stunde erreicht (Saladax Biomedical 2010).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sah das Studienprotokoll die erste venöse Blutentnahme im Zyklus zwei Stunden nach Anhängen der 5-FU-Infusionspumpe (Abbildung 8) vor. Unter dem 5-FU-mono-Regime erhielten die Patienten in der ersten und fünften Therapiewoche die Infusionspumpe über jeweils fünf Tage. Zunächst wurden an je fünf aufeinanderfolgenden Tagen je eine 24-h-Infusionspumpe verwendet. Mit der Umstellung auf eine 5-Tages-Infusionspumpe konnten Materialkosten gesenkt und die Praktikabilität verbessert werden. Die 5-FU-Blutspiegel wurden vom ersten und dritten Tag nach Pumpenstart in den jeweiligen Chemotherapiewochen ausgewertet.

Die Patienten, die nach dem 5-Fluorouracil und Oxaliplatin-Schema (5-FU+Ox.) behandelt wurden, bekamen zunächst LV und Ox. infundiert. Erst nach den beiden Infusionen wurde die 5-FU-Pumpe, die über 14 Tage läuft, angehängt. Um die Entwicklung des AUC-Spiegels über die Dauer der 5-FU-Pumpe bewerten zu können, wurde Blut für die Spiegelbestimmung 3 h und 24 h nach Ox.-Gabe, an Tag 8 und Tag 22 und einen Tag nach Beginn des zweiten Pumpenzyklus, entnommen (siehe Abbildung 8).

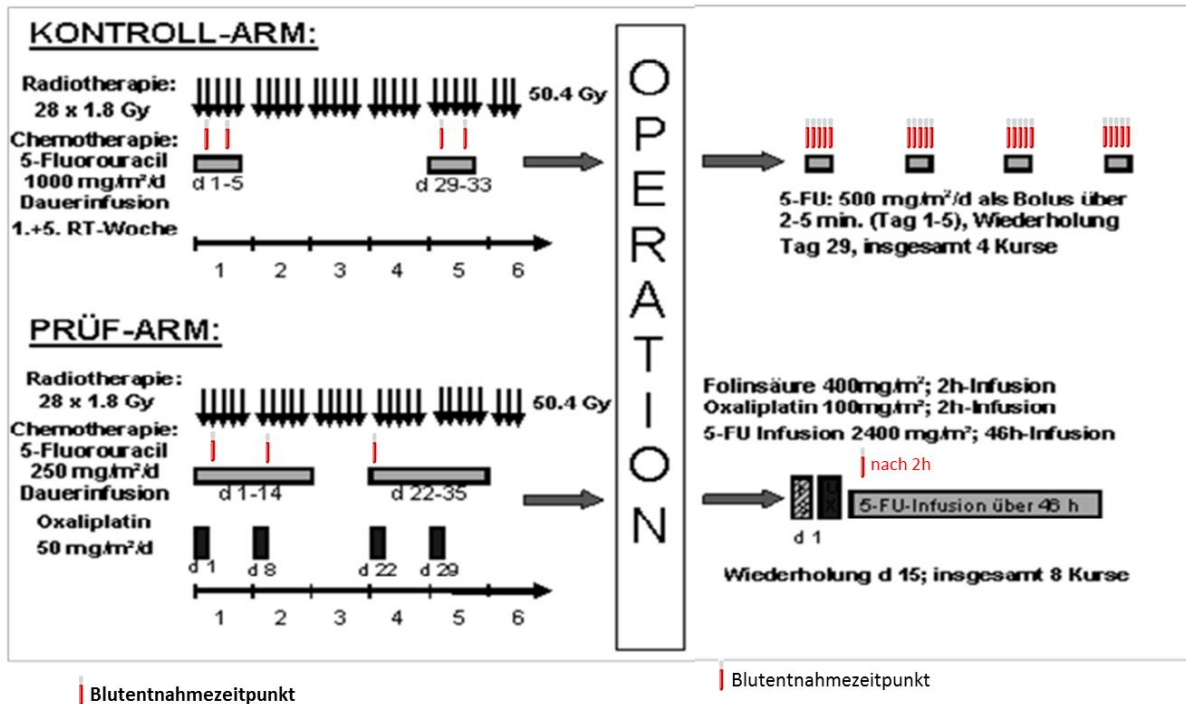


Abbildung 8: **Blutentnahmeschema während der neoadjuvanten und adjuvanten Therapiephasen**  
 Links: Blutentnahmen unter 5-FU-Chemotherapie in der neoadjuvanten Behandlungsphase entweder als Monotherapie mit 5-FU-Dauerinfusion oder in Kombination mit Ox. über eine 14-tägige Baxterpumpe. Rechts: Blutentnahmen unter 5-FU-Chemotherapie in der adjuvanten Behandlungsphase für eine 5-FU-mono-Therapie (Bolusinfusion) und die Kombinationstherapie mit Ox.(als Dauerinfusion über 48 h via Baxterpumpe). Die Abbildung wurde vom Autor nach dem Studienprotokoll der CAO/ARO/AIO-04-Studie modifiziert.

Ein Vorteil und Gewinn an Lebensqualität bestand für die Patienten darin, dass die adjuvante Chemotherapie in der Regel ambulant durchgeführt wurde. Die Patienten kamen für die Verlaufsgespräche und Therapieapplikation in die Chirurgische Sektion der Interdisziplinären Kurzzeitonkologie der UMG. Die Patienten, welche mit 5-FU-mono-Therapie behandelt wurden, bekamen 5-FU als Kurzinfusion verabreicht (siehe Abbildung 8). Da die Halbwertszeit von 5-FU nur 10-20 Minuten beträgt, erfolgte die Blutentnahme für die 5-FU-Spiegelbestimmung direkt im Anschluss an die Infusion (Mutschler 2008). Die Blutproben wurden eine Woche lang täglich 30-45 Minuten nach Therapiebeginn entnommen.

Nach dem „FOLFOX“-Schema behandelte Patienten erhielten alle zwei Wochen über acht Zyklen eine Infusion mit LV und Ox. (siehe Abbildung 8). Im Anschluss wurde eine 48-h-5-FU-Baxter-Pumpe (siehe Abbildung 9) angeschlossen. Der Blutentnahmeszeitpunkt war auf zwei Stunden nach 5-FU-Baxter-Pumpenbeginn festgelegt.

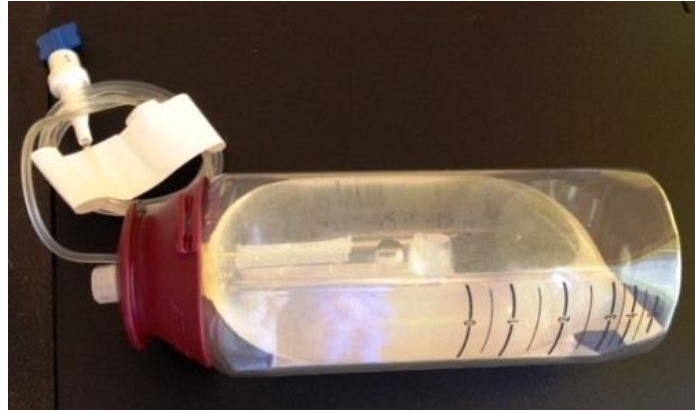


Abbildung 9: **Baxter-Infusionspumpe für die 5-FU-Applikation**

Das elastische Material eines Elastomer-Ballons dehnt sich durch die Auffüllung mit 5-FU-Infusionsflüssigkeit aus und baut einen Druck auf, der die Pumparbeit leistet. Ein Flussbegrenzer, zumeist eine feine Glaskapillare, bestimmt die Infusionsgeschwindigkeit, so dass keine manuellen Einstellungen notwendig sind. Da die Infusionsrate durch äußere Faktoren wie Temperatur oder körperliche Bewegung verändert werden kann, ist die Infundierungsrate interindividuell unterschiedlich (Ackermann et al. 2007). Eigene Abbildung vom Autor dieser Arbeit.

Eine Vorgabe der Studienprotokolle stellte das „Dosekapping“ für die Chemotherapiedosierung ab einer KOF von 1,8 m<sup>2</sup> neoadjuvant und größer einer KOF von 2,0 m<sup>2</sup> adjuvant dar.

### 2.2.2 Gewinnung der Blutproben

Die Blutentnahme musste durch eine Venenpunktion erfolgen. Nur wenn der Patient in diese nicht einwilligte oder keine Möglichkeit zur venösen Punktion bestand, wurde das Blut aus dem Port (nach vorab Aspiration von mindestens 10 ml Blut) abgenommen. Die Blutentnahmeröhrchen waren EDTA-Monovetten und/oder Lithium-Heparin-Monovetten, die jeweils maximal 8 ml Blut aufnehmen konnten. Durch die Abnahme in EDTA- und Heparinmonovetten wurde untersucht, inwieweit beide Monovettenarten für die Plasmaspiegelmessungen geeignet sind.

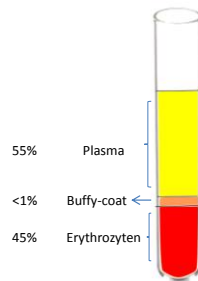
Nach der Entnahme wurde die Blutprobe direkt auf Eis gekühlt, damit die DPD-Aktivität im Patientenblut gestoppt wurde (Beumer et al. 2009). Die Blutproben lagen in einer Eisbox und wurden innerhalb von weniger als zehn Minuten in das Labor transportiert, wo die Blutproben aufbereitet wurden.

Einige Blutproben wurden vergleichsweise mit dem „My5-FU-Sample Stabilizer Kit“ der Firma Saladax Biomedical versehen. Die Stabilisatorlösung, bestehend aus 0,1 ml Stabilisatorlösung mit 0,12 mg/ml Gimeracil in einer 30 %-igen Methanollösung, wurde direkt nach der Blutentnahme in die blutgefüllte 3 ml EDTA-Monovette überführt. Der

Stabilisator inaktivierte die DPD in der Blutprobe direkt. Innerhalb von 24 Stunden sollten die Blutproben, nach Angaben des Herstellers, aufbereitet worden sein (Saam et al. 2011).

### 2.2.3 Asservierung der Blutproben

Innerhalb von 30 Minuten nach Abnahme der Blutproben wurden diese bei 4° Celsius (bzw. bei 22° Celsius bei einer mit Stabilisator versetzten Blutprobe) bei 2200 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand der Probe (siehe Abbildung 10), das Plasma, wurde abpipettiert und in 2 ml-Eppendorf-Cups gegeben. Diese wurden bei -80° Celsius bis zur 5-FU-Plasmaspiegelmessung mittels Immunoassay konserviert.



#### Abbildung 10: Aufbereitung und Asservierung des Blutplasmas

Nach Zentrifugation der Blutprobe wird das zellfreie Plasma im oberen Bereich der Blutprobe abpipettiert. Der *buffy coat* ist die schmale Grenzschicht zwischen Plasma und Erythrozyten. Sie enthält Leukozyten, die das 5-FU abbauende Enzym DPD enthalten und darf nicht mit abgetragen werden. Das Sediment bilden zu ca. 45 % Erythrozyten. Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Salamone. (Die Abbildung wurde angelehnt an Saladax Biomedical, 2011, Seite 16 erstellt.)

Bevor die eingefrorenen 5-FU-Plasma-Eppendorf-Cups gemessen werden konnten, wurden sie über 60 Minuten bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und für eine Minute bei 10.800U/min zentrifugiert. Die erforderliche Menge von 100 µl Plasma wurde in je eine von 15 vorhandenen Messküvetten pro Messrack für das „Roche COBAS INTEGRA® 800“ Analysesystem pipettiert und die jeweilige Position im Messrack (1-15) im Programm eingegeben. Die Proben wurden durch den Biomaterial-Barcode jeder Plasmaprobe im INTEGRA-Programm benannt und waren damit gleichzeitig verschlüsselt.

Plasmaproben, die sehr hohe 5-FU-Konzentrationen enthielten, wie bei einer Port-Blutentnahme oder einer Blutentnahme nach Bolusinfusion, wurden erneut verdünnt gemessen. Die Verdünnung der Plasmaproben wurde mit destilliertem Wasser und im Verhältnis 1/50 durchgeführt. Führt dieses Verdünnungsverhältnis zu einem nicht im messbaren Bereich liegenden Ergebnis, wurde entweder auf 1/10 oder 1/100 verdünnt und

erneut gemessen. Der Verdünnungsfaktor wurde durch „–Verdünnungsfaktor“ wie zum Beispiel „-50“ im Messprogramm dokumentiert.

## 2.2.4 Verwendete Materialien

Beschreibung	Bezeichnung/Hersteller/Mengenangaben
Blutmonovetten EDTA	SARSTEDT Monovette <sup>®</sup> EDTA K , Nümbrecht, Deutschland; 2,6 oder 4,7 ml
Blutmonovette Heparin	SARSTEDT Monovette <sup>®</sup> Hep-Gel, Nümbrecht, Deutschland; 4,7 ml
Stabilisator-Röhrchen	My5-FU-Sample Stabilizer Kit, Saladax, Bethlehem, USA; 0,1 ml
Pipetten	eppendorf Reference, Physio Care concept, Hamburg, Deutschland; 10-100µl eppendorf Research plus, Physio Care concept, Hamburg, Deutschland; 100-1000µl
Zentrifuge zur Blutasservation	Labofuge400R, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge für Plasmareinigung	ABBOTT ZENTRIFUGE, Wiesbaden, Deutschland
Immunoanalyzer	COBAS INTEGRA <sup>®</sup> 800, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Messküvetten	für COBAS INTEGRA <sup>®</sup> 800, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Probenrack	sample COBAS 17/ sample COBAS 18/sample COBAS 19, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Reagenz-Kassette	DEV04, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Cleaner-Kassette	CLEAN-Kassette, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Cleaner-Waschlösung	Cleaner COBAS INTEGRA, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Immunoassay	My5-FU-Assay (REF728-FNP), Saladax, Bethlehem, USA Reaktionspuffer R1, Saladax, Bethlehem, USA Nanopartikelreagenz R2, Saladax, Bethlehem, USA
Kalibration-Kit	My5-FU-Kalibrator-Kit, Saladax, Bethlehem, USA
Kontroll-Kit	My5-FU-Kontroll-Kits, Saladax, Bethlehem, USA
Verdünnungslösung	H <sub>2</sub> O destilliert

Tabelle 3: **Materialien**

Verwendete Materialien und Geräte für die Messungen

## 2.2.5 Messung der Proben

Der Nanopartikel-basierte Immunoassay „My5-FU-Assay“ der Firma Saladax Biomedical, Bethlehem, Pennsylvania in Nordamerika, Inc. 2010 (US-Patent-Nr. 7,205,116), wurde auf klinischen Analysegeräten, in dieser Studie auf dem „COBAS INTEGRA<sup>®</sup> 800“ der Firma Roche Diagnostics aus Mannheim, Deutschland, durchgeführt (Abbildung 11). Der „COBAS INTEGRA<sup>®</sup> 800“ ist ein offenes benutzerprogrammierbares Analysegerät.



Abbildung 11: **COBAS INTEGRA<sup>®</sup> 800**

Das Immunoassay-Analysegerät Roche „COBAS INTEGRA<sup>®</sup> 800“ des Institutes für Klinische Chemie der UMG. Eigene Abbildung vom Autor dieser Arbeit.

Nach Installation des 5-FU-Immunoassays auf dem „COBAS INTEGRA<sup>®</sup> 800“ wurde das 30 Tage haltbare Kalibration-Kit „My5-FU-Kalibrator-Kit“ installiert. Es wurden Kalibrationskurven mithilfe sechs verschiedener Kalibrator-Konzentrationen für den Bereich 0 bis 1800 ng/ml (0, 150, 300, 600, 1200 und 1800 ng/ml) erstellt, wobei das in der vorliegenden Arbeit benutzte INTEGRA-Analysegerät nur einen Messbereich bis 999 ng/ml im Zahlenwert angab. Werte, die oberhalb von 999 ng/ml lagen wurden als „\* > 10<sup>3</sup>“ angezeigt. Die untere messbare Nachweisgrenze von 5-FU lag bei 52 ng/ml (Saladax Biomedical 2010; Saladax Biomedical 2011; Salamone et al. 2007).

Mithilfe des My5-FU-Kontroll-Kits (bestehend aus drei Kontrollreagenzien jeweils für eine niedrige, mittlere und hohe 5-FU-Konzentration) ließ sich der kalibrierte Immunoassay abgleichen. Regelmäßige Kontrolltests wurden bei jedem Wechsel der Kalibrations- oder Reagenz-Kit-Charge nach der Durchführung der sechsmonatlichen Wartung durch die Firma



Roche und entsprechend den Anforderungen der Qualitätskontrollverfahren durchgeführt (Saladax Biomedical 2010; Saladax Biomedical 2011).

Vor den Analysen wurden je drei Kontrollmessungen mit den Kontroll-Kit-Reagenzien My5-FU-Kontroll-Kit durchgeführt. Nur wenn die Kontrollmessungen in den festgelegten Konzentrationsbereichen (niedriger, mittlerer und hoher Konzentrationswert) lagen, konnte mit den Plasmaprobenmessungen begonnen werden.

Nach 70 Messungen musste die Cleaner-Lösung des COBAS INTEGRA® 800 gewechselt werden. Jede Nacht um 2:00 Uhr erfolgte eine automatische Reinigung des Analysegerätes. Das Auffüllen von Cleaner und Reinigungslösung sowie der Wechsel der 5-FU-Kassetten My5-FU-Assay wurden nach Meldung durch das Analysegerät vollzogen.

Pro Reagenzkassette konnten 120 5-FU-Konzentrations-Messungen durchgeführt werden. Nach jedem Kassettenwechsel wurden routinemäßig die drei My5-FU-Kontrollen durchgeführt.

Das „COBAS INTEGRA® 800“ pipettierte nach 30 Sekunden/5 Zyklen erst 65 µl von Reagenz R1, nach 108 Sekunden /18 Zyklen 6 µl der Patientenprobe und nach 625 Sekunden 70 µl der Reagenz R2. Die Absorptionsberechnung erfolgte nach dem Endpunktmodell, bei dem der erste Messzeitpunkt bei Zyklus 109 (in Sekunde 654) und der zweite Messpunkt bei Zyklus 197 (in Sekunde 1182) lag. Die Messergebnisse wurden nach ungefähr 20 Minuten auf dem Monitor angezeigt und für jedes gemessene Messrack mit seinen 15 gemessenen Plasmaproben in den Messküvetten ausgedruckt.



Abbildung 12: **Messrack des Cobas Integra**  
Eigene Abbildung vom Autor dieser Arbeit.

### 2.3 Der Nanopartikelimmunoassay

Das in der vorliegenden Arbeit getestete neuartige Verfahren zur 5-FU-Messung basierte auf einem homogenen Nanopartikel-Agglutination-Immunoassay, der zur Bestimmung von 5-FU-Konzentrationen in humanem Blutplasma eingesetzt wurde. Der My5-FU-Assay enthielt einen Reaktionspuffer R1 und die Nanopartikelreagenz R2, bestehend aus an Nanopartikel gebundenen Antikörpern in einer Pufferlösung. Monoklonale Antikörper, die kovalent an der



Oberfläche von 200 nm großen Nanopartikeln verbunden sind, binden als Antigen freies 5-FU im Blutplasma. Die Aggregation von Antikörper und Antigen (5-FU) bewirkte eine Veränderung in der Absorption bei 652 nm über Polymerausbildung. Dabei war das Absorptionsmaß umgekehrt proportional zu der Menge an freiem 5-FU im Plasma. Bei Abwesenheit von freiem 5-FU in der Probe erzeugten die Nanopartikelaggregate eine große Auflichtstreuung, was sich in einer Zunahme der Absorptionskurve widerspiegelte. Enthielt die zu messende Probe viel freies 5-FU, wurde die Agglutinationsreaktion durch die Bindung der Nanopartikelantikörper an das 5-FU teilweise verhindert. Resultierend daraus nahm die Streuung des Auflichts ab und die Absorptionskurve wurde kleiner (siehe Abbildung 14) (Saladax Biomedical 2010; Saladax Biomedical 2011).

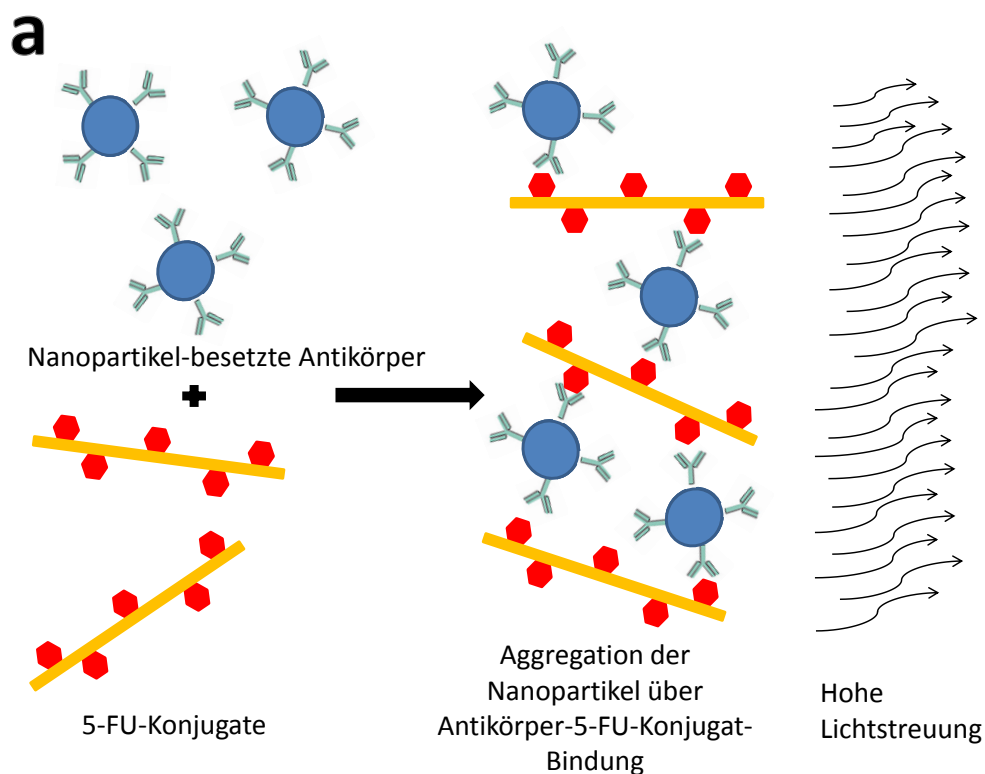


Abbildung 13: **Prinzip des Nanopartikelimmunoassays**

Abbildung 13 zeigt, dass sich bei Fehlen von 5-FU in der Probe die in den Reagenzien befindliche 5-FU-Konjugate an die Antikörperbeschichteten Nanopartikel binden. Durch diese Aggregation kommt es zu einer hohen Lichtstreuung in der Absorptionsmessung.

Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Salamone. (Die Abbildung wurde angelehnt an Saladax Biomedical, 2011, S.4 erstellt.)

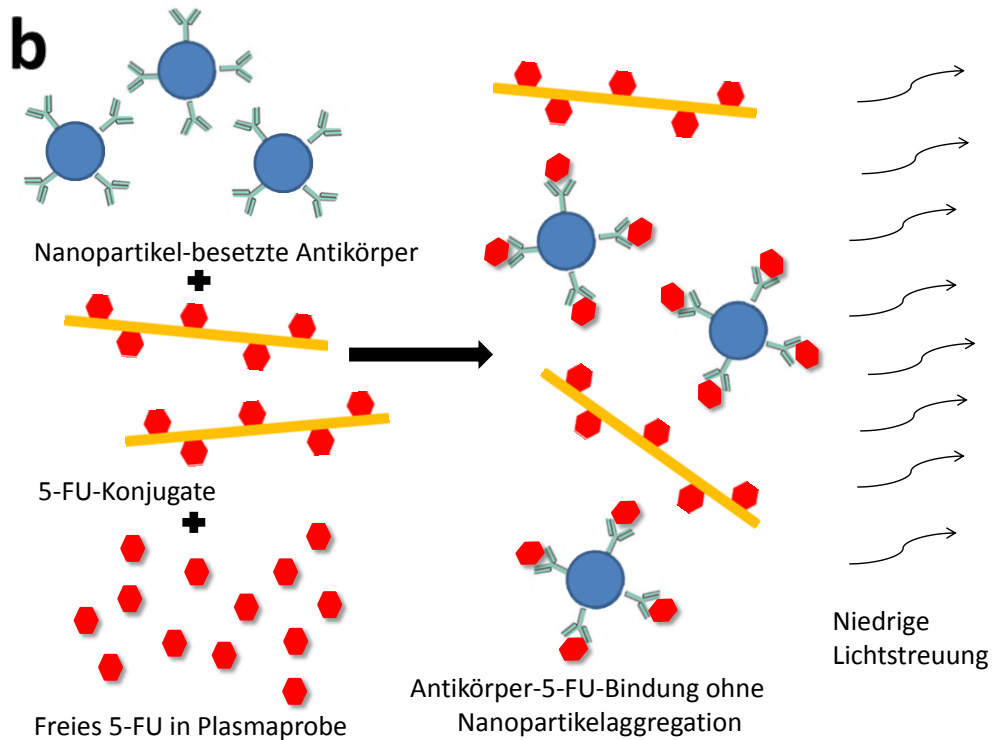


Abbildung 14: **Prinzip des Nanopartikelimmunoassays**

Bei Vorhandensein von 5-FU in der Probe, wie in Abbildung 14 beschrieben, binden die Nanopartikelantikörper kompetitiv an das freie 5-FU. Die 5-FU-Konjugate bilden nur wenige Komplexe mit den Antikörpern aus. Resultierend aus der marginalen Aggregation ist die gemessene Absorption im Licht geringer. Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Salamone. (Die Abbildung wurde angelehnt an Saladax Biomedical, 2011, S.5 erstellt.)

Anhand einer standardisierten Absorptionskurve gegenüber klinisch getesteten 5-FU-Mengen, konnte auf die 5-FU-Menge in der Patientenprobe geschlossen werden (Saladax Biomedical 2010; Saladax Biomedical 2011).

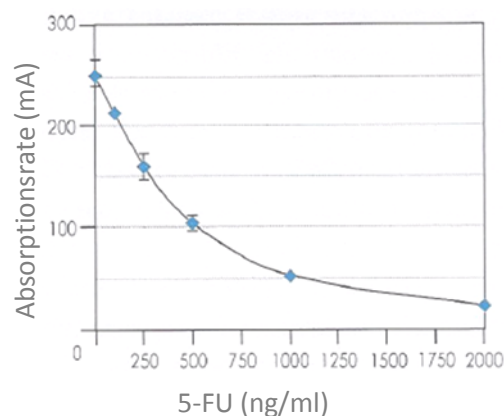


Abbildung 15: **Standardisierte Kalibrations-Absorptionskurve von 5-FU**

Die Lichtabsorptionsrate ist gegen unterschiedliche 5-FU-Dosierungen (0, 150, 300, 600, 1200, 1800 ng/ml) aufgetragen, gemessen auf einem Olympus AU400-Analyzer. Die Balken repräsentieren zwei Standardabweichungen (n=4). Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Salamone. (Nach Salamone et al. 2007, Seite 420).

## 2.4 AUC-Berechnung

Die Plasmakonzentration im  $C_{ss}$  entspricht der Exposition von 5-FU. Die  $C_{ss}$ -Plasmakonzentration während einer bestimmten Applikationsdauer entspricht dem AUC-Wert, der Konzentration-Zeit-Kurve (siehe Kap. 1.9).

$$\text{AUC (mg x h/l)} = C_{ss} \text{ (mg/l)} \times \text{Infusionsdauer (h)}$$

Der quantitative Zielbereich für die 5-FU-Exposition, durch den AUC-Wert dargestellt, wurde mithilfe der Menge des gemessenen applizierten 5-FU und der Infusionsdauer nach standardisierten Methoden berechnet (siehe Abbildung 16) (Kaldate et al. 2012).

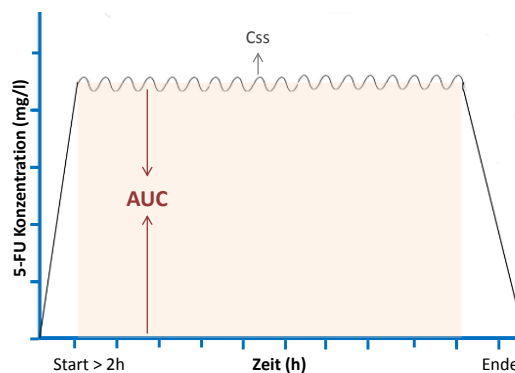


Abbildung 16: **Beispiel der AUC-Berechnung:**

Basierend auf der Infusionsdauer kann die AUC aus der Blutplasmakonzentration errechnet werden. Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Salamone. (Die Abbildung wurde nach Saladax Biomedical, 2011, Seite 12 erstellt.)

Die 5-FU-Konzentration der Patientenprobe wurde durch den Immunoassay gemessen und in ng/ml berechnet. Für die AUC-Bestimmung wurde der 5-FU-Probenwert (ng/ml) mit  $10^{-3}$  multipliziert (mg/l), um die AUC berechnen zu können.

Die Infusionsdauer der untersuchten Patientenproben variierte aufgrund unterschiedlicher Applikationsart und Therapieregime (siehe Tabelle 4).

Neoadjuvant 5-FU-mono		Neoadjuvant FOLFOX		Adjuvant 5-FU-mono		Adjuvant FOLFOX	
<u>Vor 06/2011:</u> 24 h	1440 min	168 h	10080 min	0,5-0,7 h	30-45 min	48 h	2880 min
<u>Seit 06/2011:</u> 150 h	9000 min						

Tabelle 4: **5-FU Infusionsdauer in der neoadjuvanten und adjuvanten Therapie**  
Die Infusionslängen sind jeweils in Stunden (h) und Minuten (min) angegeben.

Für 5-FU lag aktuell der klinisch ermittelte Ziel-AUC-Spiegel im Bereich von 20-30 AUC-Units (mg x h/l) (Kaldate et al. 2012).

## 2.5 Dokumentation der therapieassoziierten Nebenwirkungen

Durch die applizierte Chemotherapie kam es, abhängig von der Chemotherapie-Substanz, der jeweiligen Metabolisierung und dem klinischen Zustand des Patienten, zu unterschiedlichen therapieassoziierten Toxizitäten.

Die Nebenwirkungen der neoadjuvanten und adjuvanten Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms unterschieden sich hinsichtlich der Therapiephase. Akutnebenwirkungen traten in den ersten 90 Tagen während und nach der Therapie auf, während Langzeit-/ Spät-Toxizitäten 90 Tage nach Abschluss der Behandlung bezeichnet wurden (Dörr et al. 2000). Zur Untersuchung, Einteilung und Bewertung der Radiochemotherapie- und Chemotherapie-Effekte des Patientenkollektivs wurden die CTCAE 4.03-Kriterien verwendet (siehe Anhang S.84).

### 2.5.1 Akute Organtoxizität

Unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie wurde Toxizität, die durch die Bestrahlung auftrat, sowie die allgemeinen Nebenwirkungen unter Chemotherapie erfasst. Für die Akuttoxizitäten unter Radiotherapie standen die Organsysteme Haut, Blase und Enddarm im Fokus der Anamnese, klinischen Untersuchung und Dokumentation. Typischerweise verursacht eine primäre Radiotherapie im Beckenbereich häufig lokale Toxizität, wie zum Beispiel in Form einer Zystitis, einer Proktitis, einer Radiodermatitis und einer Enteritis (Hendry et al. 2006).

In Bezug auf die 5-FU-basierte Chemotherapie wurden neoadjuvant die Organtoxizitäten erfasst, dokumentiert und ausgewertet. Zu den Blasentoxizitäten zählten zum Beispiel Harnwegsinfekt, Nierenbeckenentzündung und akutes Nierenversagen. Als Darmtoxizitäten wurden die Symptome Diarrhöen, Durchwanderungsperitonitis und Obstipation erfasst. Eine Reizung des Enddarmes wurde unter Proktitis dokumentiert. Die Symptome Mukositis, Stomatitis, Strahlendermatitis und Hand-Fuß-Syndrom wurden als Hauttoxizitäten erfasst.

Die Toxizitätserfassung für die adjuvante Chemotherapie umfasste als „Adverse Event“ (AE) neben Schleimhaut, Haut, und Darm, Alopezie, Geschmack, Angina-Pectoris-Beschwerden, Fieber, Schmerzen, Übelkeit, Nieren- und Neurotoxizität (siehe Anhang S.84). Die

Organtoxizitäten wurden nach der jeweiligen Gradeinteilung, unter jedem Zyklus untersucht und dokumentiert.

### **2.5.2 Hämatologische Toxizität**

In dieser Auswertung wurde unter neoadjuvanter und adjuvanter Therapie der Hämoglobinwert für die Einschätzung der Erythrozytenzahl, die Leukozytenzahl und die Thrombozytenzahl erfasst und nach CTCAE 4.03 eingeteilt (siehe Anhang S. 84). Gleichzeitig wurde unter der neoadjuvanten CTCAE-Dokumentation der Nadir, der niedrigste Wert von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten während der gesamten Radiochemotherapie festgehalten.

### **2.5.3 Toxizität im Verlauf der Therapiezyklen**

Die CTCAE-Dokumentation für Organ- und Hämatotoxizität wurde unter der neoadjuvanten Therapie wöchentlich und jede zweite Woche bis zur kompletten Remission der Akuttoxizitäten untersucht und dokumentiert. Für die Analysen wurde der höchste gemessene Grad an aufgetretener Toxizität verwendet.

Unter der adjuvanten Chemotherapie wurden die Patienten zu Beginn jedes Zyklus über das Auftreten von Toxizität befragt und ihr aktuelles Befinden dokumentiert.

## **2.6 Statistische Analysen**

Alle statistischen Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Tim Beissbarth und Dr. Stephan Lorenzen, Institut für Medizinische Statistik der UMG (Leiter Univ.-Prof. Dr. Tim Friede) durchgeführt. Bei der Erstellung der Graphiken und für die statistischen Berechnungen wurde das Statistikprogramm „R“ (URL <http://www.r-project.org>, Version 2.15.1) verwendet (R Development Core Team).

Die statistischen Korrelationsanalysen wurden mit dem Kendalls-Tau-Rangkorrelationskoeffizienten berechnet und auf Signifikanz untersucht. Diese Korrelationsanalyse diente der Überprüfung des statistischen Zusammenhangs zweier Merkmale (Kendall 1938). Das Signifikanzniveau aller Analysen wurde mit  $p < 0,05$  festgesetzt.

Um alle AUC-Messwerte eines Patienten miteinander übersichtlich und vergleichbar darzustellen, wurden „Jittered scatter plots“ (<http://www.inside-r.org/packages/cran/car/docs/scatterplot>) mit dem Statistikprogramm „R“ erstellt.

Als Gesamt-AUC-Wert für einen Patienten wurde bei Vorhandensein von mehr als einem Messwert unter Therapie der Mittelwert aller gemessenen AUC-Werte gebildet. Bei Vorliegen von mehr als zwei Messwerten wurden jeweils der größte und der kleinste 5-FU-AUC-Messwert vor Ermittlung des Mittelwertes entfernt und aus den anderen Werten der Mittelwert gebildet.

Zur einfachen Visualisierung der neoadjuvanten Therapieregime wurden Symbole (Kreuz=5-FU-mono; Kreis=5-FU+Oxaliplatin) eingeführt. Für die adjuvant ermittelten AUC-Werte wurden ausschließlich Kreise benutzt. Je mehr Messwerte ( $n=1-9$ ) zu einem Patienten vorlagen, umso größer wurde das Symbol abgebildet. Die Abbildung der 5-FU-AUC-Werte erfolgte mit logarithmischer Skalierung. Der „Cut-Off“ für die gemessenen 5-FU-AUC-Spiegels lag bei  $\leq 0 \text{ mg} \times \text{h/l}$  und  $\geq 100 \text{ mg} \times \text{h/l}$ . Für die Tumorrespons-Analysen und die einzelne Darstellung des neoadjuvanten 5-FU-mono-therapierten Patienten lag der „Cut-Off“  $\geq 50 \text{ mg} \times \text{h/l}$  für den 5-FU-AUC. Für die adjuvanten Analysen wurden AUC-Werte  $\leq 20 \text{ mg} \times \text{h/l}$  berücksichtigt.

Portproben, die während der neoadjuvanten Therapiephase gewonnen wurden, wurden aufgrund der großen Streuung der gemessenen AUC-Werte in den Berechnungen nicht berücksichtigt.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutplasmaspiegel von insgesamt 82 Patienten mit lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen unter multimodaler 5-FU-basierter Therapie in kurativer Intention untersucht. Insgesamt erhielten 79 Patienten eine neoadjuvante Radiochemotherapie, bestehend aus einer Radiatio (mit 50,4 Gy) kombiniert mit 5-FU-mono oder mit 5-FU+Oxaliplatin. Nach erfolgter Tumorresektion wurden alle Patienten mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt. Zwei Patienten wurden aufgrund einer Tumorklassifikation im oberen Rektumdrittel primär operiert und anschließend mit adjuvanter Chemotherapie behandelt. Ein weiterer Patient wurde bei Vorliegen eines Zweittumors analog der GAST-05-Studie therapiert.

#### 3.1 Bestimmung der 5-FU-AUC-Blutspiegel

In den durchgeführten Absorptionsmessungen des Nanopartikelimmunoassays wurden 5-FU-Konzentrationen von 0,00021 ng/ml bis 95490,0 ng/ml gemessen. Abhängig vom Messwert unter der Infusionsdauer ergaben sich AUC-Blutplasmawerte bis zu 11458,8 mg x h/l (siehe Kapitel 2.2.5).

Die Blutplasmaproben wurden durch eine Venenpunktion und nur in Ausnahmefällen aus dem Port des Patienten gewonnen. Insgesamt wurden neoadjuvant 257 venöse Plasmaproben und 111 Portproben ausgewertet. Unter der adjuvanten Therapiephase wurden 108 Venenproben und 40 Portproben gemessen (siehe Abbildung 17).

76 Blutproben sind doppelt als EDTA- und Heparin-Monovette abgenommen und ausgewertet worden (siehe Abbildung 17). Zusätzlich wurden acht EDTA-Blutproben mit der Stabilisatorlösung (SPE) versehen und parallel auch auf Eis gekühlte EDTA-Blutproben für 5-FU-Vergleichsmessungen entnommen (siehe Abbildung 17).

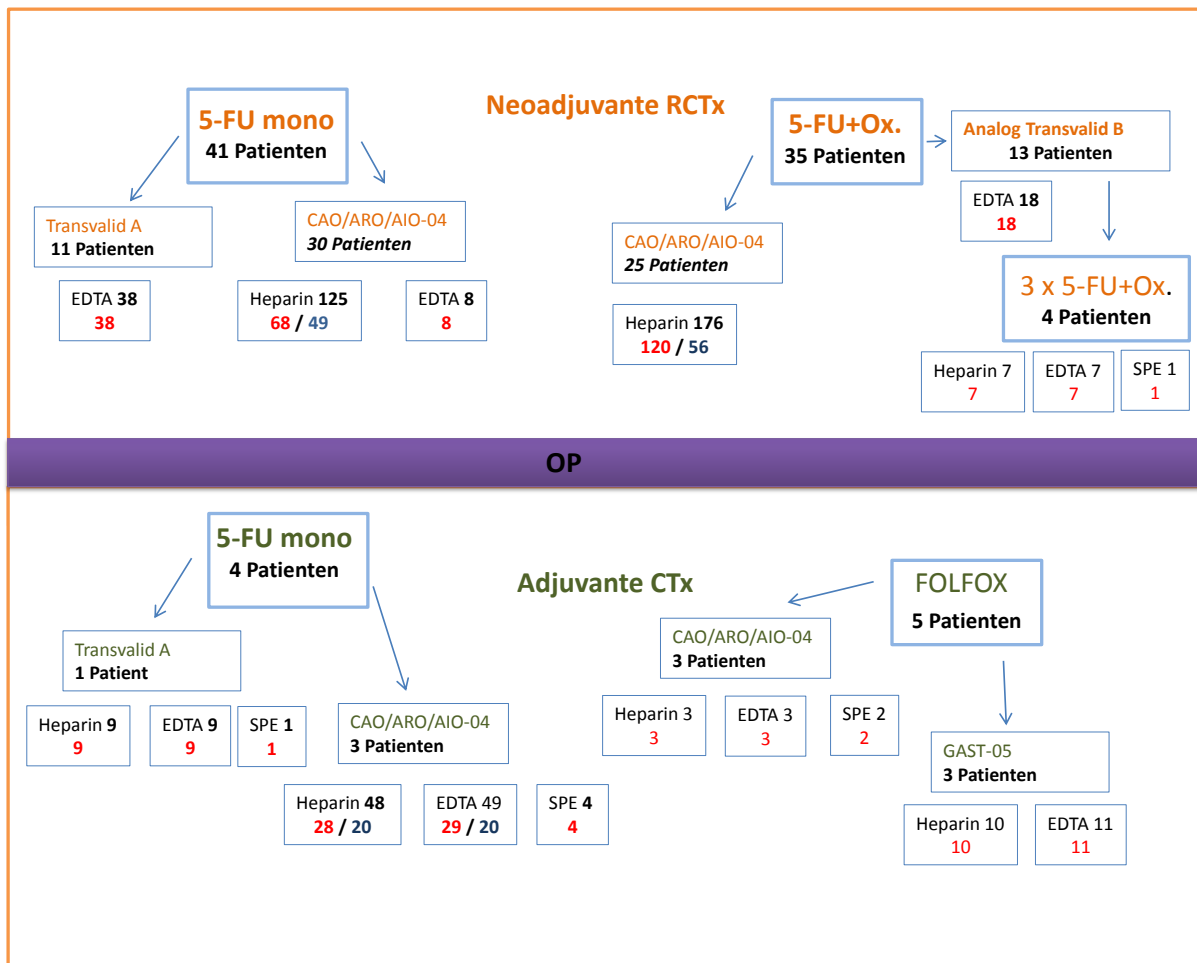


Abbildung 17: Flussdiagramm über die Herkunft der untersuchten Blutproben

Das Patientenschema bildet die gemessenen Blutproben aus Heparin- oder EDTA-Monovetten sowie Venen (rot)- oder Port (schwarz)-Blutentnahmen in Bezug auf die verschiedenen Studien-Therapieschemata ab. Die Abbildung ist durch den Autor dieser Arbeit selbst erstellt.

### 3.2 Die 5-FU-AUC-Spiegel des gesamten Patientenkollektivs

Unter der neoadjuvanten Therapiephase wurden 69,9 % (5-FU-mono) und 69,7 % (5-FU+Ox.) der Patientenproben venös entnommen und 30,1 % (5-FU-mono) sowie 30,2 % (5-FU+Ox.) der Blutproben stammten aus Portentnahmen. Die Blutplasmaproben der adjuvanten Therapiephase sind zu 66,4 % (5-FU-mono) und 100 % (FOLFOX) durch periphere Venenpunktionen entnommen worden. Aus einem Port wurden 33,6 % der Blutentnahmen unter der adjuvanten 5-FU-mono-Therapie gewonnen.



Therapieregime	Venöse Blutproben/ in %	Port-Blutproben/ in %
Neoadjuvant: 5-FU-mono	n=114 / 69,9 %	n=49 / 30,1 %
Neoadjuvant: 5-FU+Ox.	n=143 / 69,7 %	n=62 / 30,2 %
<b>Neoadjuvant Gesamt: 368 Proben</b>	<b>n=257 / 69,8 %</b>	<b>n=111 / 30,2 %</b>
Adjuvant: 5-FU-mono	n=79 / 66,4 %	n=40 / 33,6 %
Adjuvant: FOLFOX	n=44 / 100 %	n=0 / 0 %
<b>Adjuvant Gesamt: 163 Proben</b>	<b>n=123 / 75,5 %</b>	<b>n=40 / 24,5 %</b>

Tabelle 5: **Prozentuale Verteilung der Blutentnahmen**

Die Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung der untersuchten Blutproben, aufgeteilt nach Therapiephase, Chemotherapiekombination und Blutentnahmeorten.

In der neoadjuvanten Therapiephase hatten die meisten Blutproben (59 %) im Median 5-FU-Blutplasmaspiegel unterhalb des angestrebten therapeutischen Bereiches von 20-30 mg x h/l und nur 13 % der Proben lagen im Ziel-AUC-Bereich (siehe Abbildung 18).

#### neoadjuvante 5-FU-Blutplasmaproben

N=224

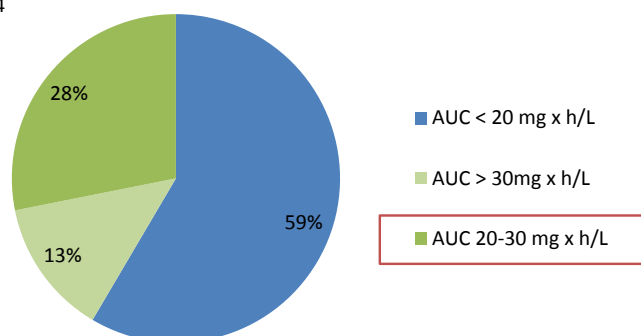


Abbildung 18: **Verteilung der neoadjuvant gemessenen AUC-Spiegel**

Die Abbildung zeigt alle venös entnommenen und gemessenen 5-FU-Spiegel unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie.

Im Gegensatz dazu lagen mit wenigen Ausnahmen die AUC-Blutspiegel der 5-FU-mono-EDTA-Proben (medianer AUC-Spiegel 39,6 mg x h/l) und der 5-FU+Ox.-Port-Proben (medianer AUC-Spiegel 53,8 mg x h/l) über dem angestrebten 5-FU-AUC-Zielbereich.

Die mit 5-FU-mono-Infusion (39,6 mg x h/l) über fünf Tage behandelten Patienten hatten einen im Median vielfach höheren 5-FU-Blutplasmaspiegel, als vergleichsweise die 5-FU+Ox.-behandelten Patienten (0,1 mg x h/l), welche über sieben Tage eine Dauerinfusion verabreicht bekamen (siehe Abbildung 19). Die gemessenen AUC-Blutplasmaspiegel aus

Heparinmonovetten der unterschiedlichen Therapieregime wiesen beide ähnlich niedrige AUC-Werte auf (HVB 7,01 mg x h/l und HVA 10,45 mg x h/l). Portproben zeigten insgesamt die höchsten medianen 5-FU-Blutplasmaspiegel mit 53,8 mg x h/l. Auffallend war die sehr große Streuung der Portproben mit maximalen AUC-Werten von 11458,8 mg x h/l. Aus diesem Grund wurden die Portproben, die während der neoadjuvanten Therapiephase gewonnen wurden, in den anschließenden Berechnungen nicht mitberücksichtigt.

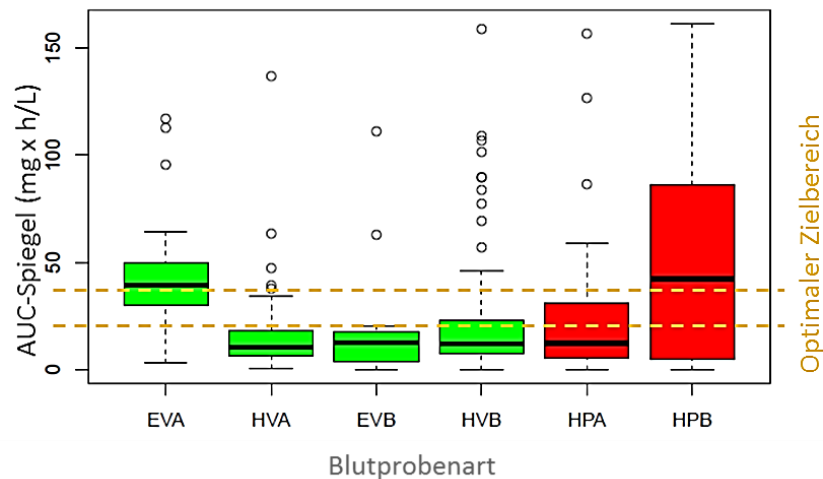


Abbildung 19: **5-FU-AUC-Blutplasmaspiegel der verschiedenen Blutplasmaproben in der neoadjuvanten Therapiephase**

Es wurden die 5-FU-AUC-Werte aller neoadjuvanten Blutproben, unterteilt nach Entnahmeort, Monovettenart und Studienarm, dargestellt: H: Heparin-Monovetten, E: EDTA-Monovetten, V: venöse Blutentnahme, P: Portentnahmen, A: 5-FU-mono- Therapie, B: 5-FU+Ox.-Therapieregime, Grün: venöse Blutproben, Rot: Port-Blutproben.

Die unter der adjuvanten Therapie bestimmten AUC-Werte lagen mit 93 % größtenteils unter dem therapeutischen AUC-Bereich (siehe Abbildung 20). Nur 5 % der Proben zeigten AUC-Spiegel im Zielbereich unter der KOF-dosierten Therapie.

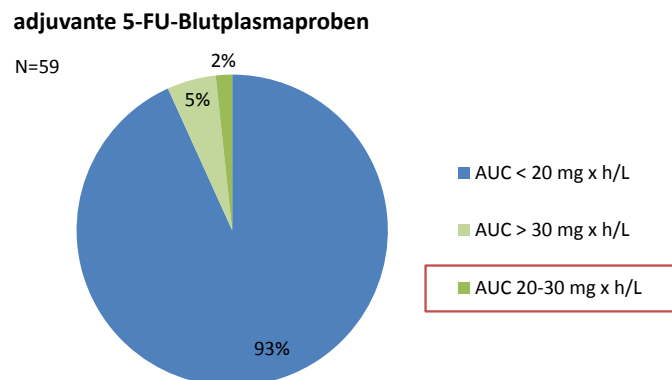


Abbildung 20: **Verteilung der adjuvant gemessenen AUC-Spiegel**

Die Abbildung zeigt alle venös entnommenen und gemessenen 5-FU-Spiegel unter der adjuvanten Chemotherapie.

Die gemessenen 5-FU-Blutplasmawerte aus der adjuvanten Therapiephase unterschieden sich hinsichtlich der Applikationsform des 5-FUs. Die AUC-Blutspiegel lagen nach 5-FU-Bolusinfusion deutlich unterhalb des AUC-Zielbereiches mit einem medianen AUC-Spiegel von 7 mg x h/l. Im Unterschied dazu hatten die untersuchten Blutproben unter der 48-h-5-FU-Infusionspumpe je nach Monovettenart im Median Blutplasmaspiegel zwischen 14,1 mg x h/l und 17,1 mg x h/l. Diese AUC-Werte lagen nahe dem angestrebten Zielbereich (20-30 mg x h/l) für die optimale 5-FU-Wirksamkeit. Die niedrigsten 5-FU-AUC-Spiegel hatten die Portproben, die nach der Bolusinfusion abgenommen wurden (Median von 2,8 mg x h/l). Die Streuung dieser Port-AUC-Werte war gering bei maximalen Werten von 13,1 mg x h/l und wurden in die anschließenden Berechnungen mit einbezogen.

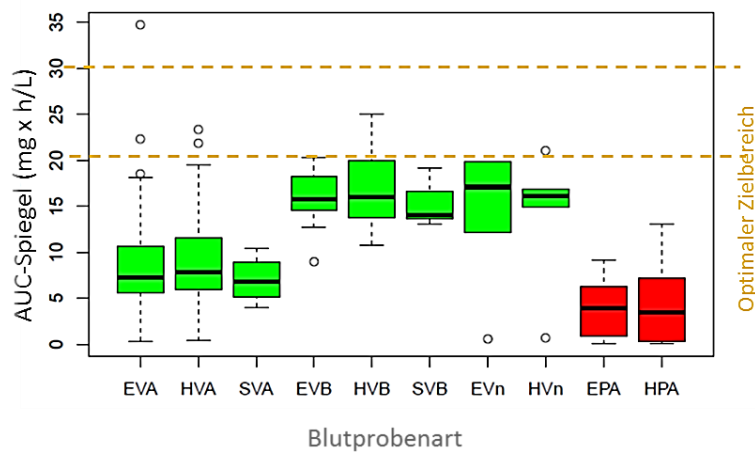


Abbildung 21: **5-FU-AUC-Blutplasmaspiegel der verschiedenen Blutplasmaproben in der adjuvanten Therapiephase**

Die Abbildung zeigt die medianen AUC-Werte aller adjuvanten Blutproben unterteilt nach Entnahmeort, Monovettenart, Probenstabilisierung und Studienarm. E: EDTA-Monovetten, H: Heparin-Monovetten S: mit Stabilisator versetzten EDTA-Monovetten V: venöse Blutentnahme, P: Portentnahmen, A: 5-FU-mono-Therapie, B: FOLFOX-Therapie regime, Grün: venöse Blutproben, Rot: Portprobe.

### 3.2.1 Korrelation der 5-FU-AUC-Blutplasmaspiegel aus Stabilisator-versetzten EDTA-Monovetten mit den gekühlten EDTA-Monovetten

Nach erfolgter Blutentnahme war die Stabilisierung des 5-FUs auf Eis durch die zwingend notwendige konstante Aufrechterhaltung der Kühlkette fehleranfällig. Deshalb wurde der von Saladax Biomedica angebotene Stabilisator test „My5-FU-Sample Stabilizer Kit“, bei dem die Blutprobe bei Raumtemperatur gelagert werden konnte getestet (siehe Kap. 2.2.2). Die 5-FU-Blutplasmaspiegel von adjuvanten Blutproben (n=8) aus den mit Stabilisator versetzten EDTA-Monovetten und den zeitgleich entnommenen gekühlten EDTA-5-FU-Plasmaproben korrelierten stark ( $p=0,0007$ ).

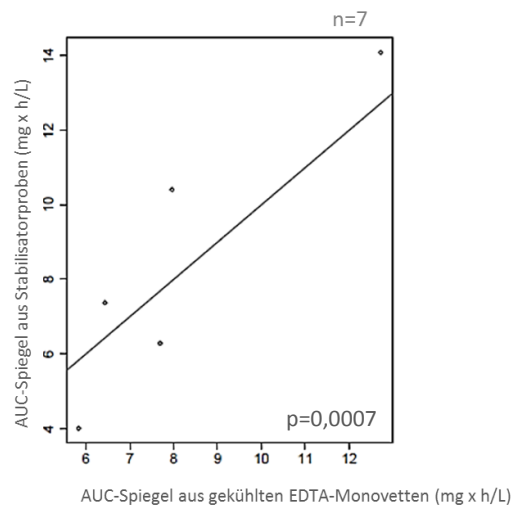


Abbildung 22: **Korrelation der gemessenen AUC-Werte von gekühlten EDTA-Proben und mit Stabilisator versetzten EDTA-Proben**

Die 5-FU-AUC-Blutspiegel parallel entnommener mit Stabilisator versetzter EDTA-Monovetten (SPE) sind gegenüber den gekühlten EDTA-Blutproben (PE) abgebildet. Die acht gemessenen AUC-Werte der gekühlten EDTA-Monovetten und der mit dem Stabilisator versetzten EDTA-Monovetten korrelierten stark ( $cor=0,9570863$ ).

### 3.2.2 Korrelation der 5-FU-AUC-Blutplasmaspiegel von entnommenen EDTA-mit den Heparin-Blutproben

Unter der adjuvanten Therapie wurden die Blutentnahmen ( $n=76$ ) mit unterschiedlichen Monovettenarten zeitgleich durchgeführt und miteinander verglichen (siehe Kap. 2.2.2). Die 5-FU-AUC-Spiegel der parallel entnommenen Heparin-Monovetten waren gegenüber EDTA-Blutproben signifikant vergleichbar ( $p < 2.2e-16$ ).

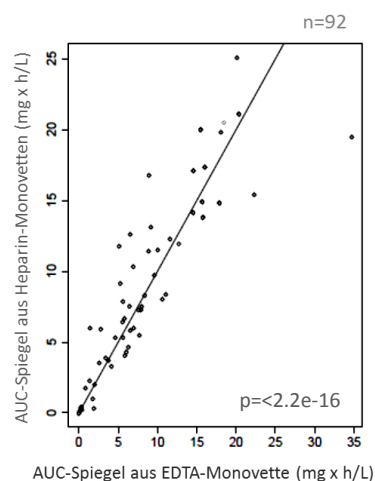


Abbildung 23: **Korrelation der gemessenen AUC-Werte von Heparin-Proben und EDTA-Proben**  
Die AUC-Spiegel von Blut, das in einer Heparinmonovette (PH) und in einer EDTA-Monovette (PE) konserviert wurde, sind gegeneinander dargestellt ( $cor\ 0.8969663$ ).

### 3.3 Geschlechtsspezifische Analyse

Bei der geschlechterspezifischen Auswertung der neoadjuvant gemessenen 5-FU-AUC-Spiegel fiel auf, dass Frauen höhere AUC-Spiegel erreichten als Männer.

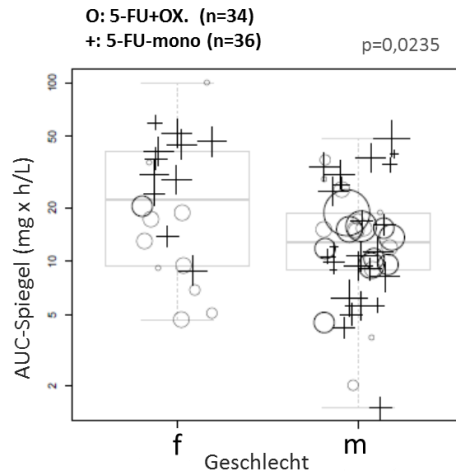


Abbildung 24: **Geschlechtsspezifische Korrelation der 5-FU-AUC-Spiegel in der neoadjuvanten Therapie**

Die 5-FU-AUC-Werte sind nach Geschlecht (f= Frauen, m= Männer) aufgeteilt. (Legende siehe Kap.2.6). Dabei zeigte sich eine signifikante negative Korrelation ( $\tau = -0,022$ ). Frauen zeigten höhere AUC-Werte mit einem Median-Wert von 22,07 mg x h/l, während Männer einen Median-Wert von 12,85 mg x h/l hatten.

Deutlich wurde dies insbesondere bei Betrachtung der 5-FU-mono-Therapie (siehe Abbildung 25) ( $p = 0,00371$ ). Während 23 % der Männer einen AUC-Wert über 26 AUC-Units hatten, galt dies für 72 % der Frauen unter Monotherapie. Dieses Phänomen zeigte sich nicht unter der 5-FU+Ox.-Therapie.

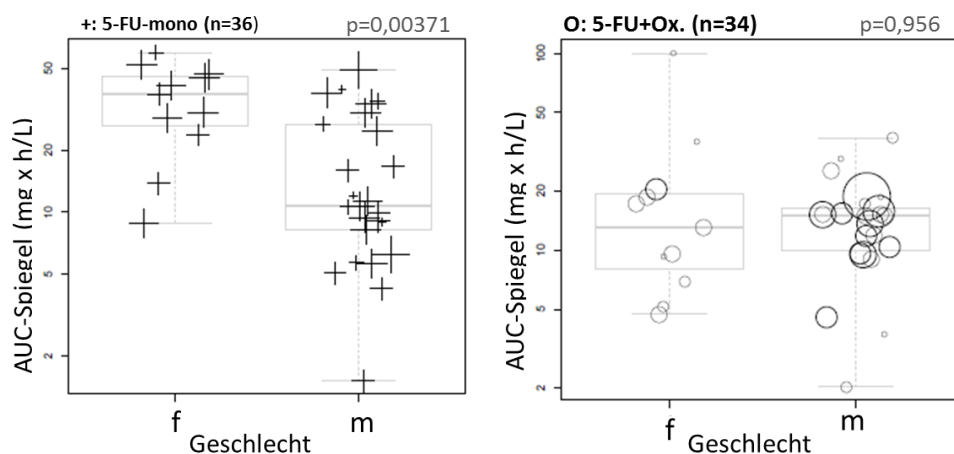


Abbildung 25: **Geschlechtsspezifische Korrelation der 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanten Chemotherapieregimen**

Links: AUC-Werte unter 5-FU-mono (n=36) nach Geschlecht aufgeteilt. Rechts: AUC-Werte unter 5-FU+Ox.-Therapie (n=34) nach Geschlecht dargestellt. Während Frauen unter der 5-FU-mono-Therapie signifikant höhere AUC-Blutspiegel, als die Männer hatten ( $\tau = -0,41$ ), gab es unter der 5-FU+Ox.-Therapie keine geschlechtsspezifische Korrelation im Patientenkollektiv ( $\tau = -0,01$ ).

### 3.4 Altersspezifische Analyse

Das Alter der Patienten am OP-Tag lag zwischen 21 und 84 Jahren. Die Untersuchung vom Patientenalter zum Therapiezeitpunkt und der gemessenen 5-FU-AUC-Spiegel unter der neoadjuvanten Therapie zeigte keinen signifikanten Zusammenhang. Bei einem mittleren Alter von 64 Jahren im Patientenkollektiv traten AUC-Spiegel zwischen 1- 100 mg x h/l auf.

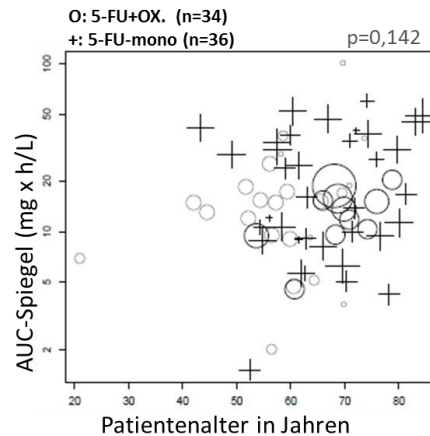


Abbildung 26: **Altersspezifische Korrelation der 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanten Chemotherapieregimen**

(Legende siehe Kap.2.6). Das Patientenalter lag zwischen 21 und 84 Jahren und korrelierte nicht mit der Höhe der gemessenen 5-FU-Spiegel ( $\tau=0,12$ ).

### 3.5 Korrelation der 5-FU-AUC-Plasmaspiegel mit dem Body-Mass-Index

Der vor Therapiebeginn ermittelte Body-Mass-Index (BMI) lag zwischen 18,22 und 39,02. Der BMI der Patienten und die neoadjuvant gemessenen AUC-Werte waren nicht voneinander abhängig. In Abbildung 28 zeigte sich unter der 5-FU-mono-Therapie tendenziell eine umgekehrte Abhängigkeit zu der Höhe des 5-FU-Blutplasmaspiegels.

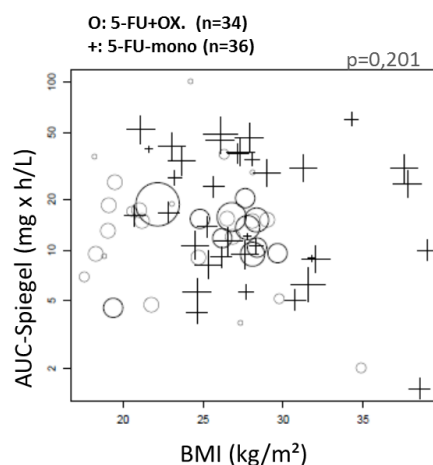


Abbildung 27: **Korrelation der 5-FU-AUC-Plasmaspiegel mit dem BMI der Patienten**

(Legende siehe Kap.2.6). Die bei Therapiebeginn ermittelten BMI-Werte der Patienten korrelierten nicht mit den gemessenen 5-FU-AUC-Werten ( $\tau=-0,1$ ).

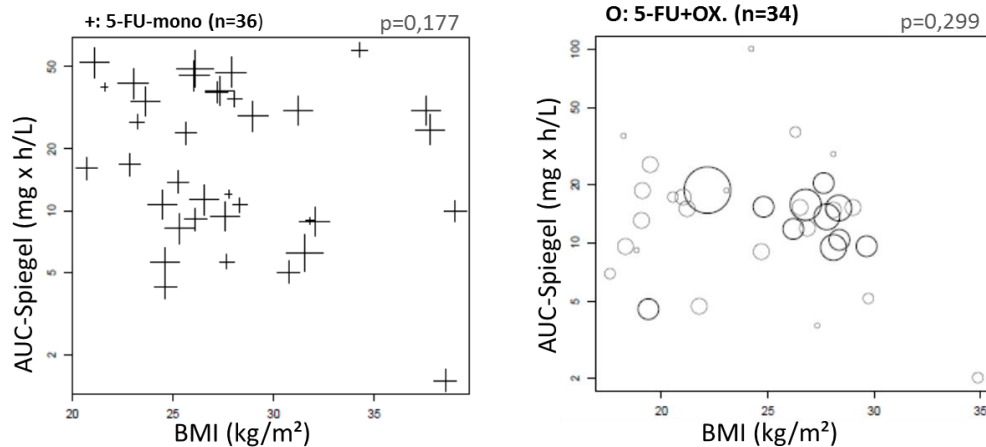


Abbildung 28: **Korrelation der 5-FU-AUC-Plasmaspiegel mit dem BMI der Patienten unter den beiden neoadjuvanten Chemotherapieregimen**

In der linken Abbildung, in der ausschließlich der BMI des 5-FU-mono-Kollektivs dargestellt ist, korrelierte der BMI der Patienten nicht mit der Höhe der AUC-Spiegel ( $\tau=-0,16$ ). Auch in der rechten Abbildung 28 wird gezeigt, dass bei niedrigem BMI, der AUC-Wert des 5-FU tendenziell höher war ( $\tau=0,12$ ).

Die verabreichte Chemotherapiedosis unter der neoadjuvanten Therapie von 5-FU und Oxaliplatin ist in Abbildung 29 separat dargestellt. Bis auf eine Ausnahme wurde bei Patienten ab einer KOF von  $1,8 \text{ m}^2/2,0 \text{ m}^2$  neoadjuvant und beziehungsweise  $2,0 \text{ m}^2$  adjuvant ein „Dosekapping“ durchgeführt.

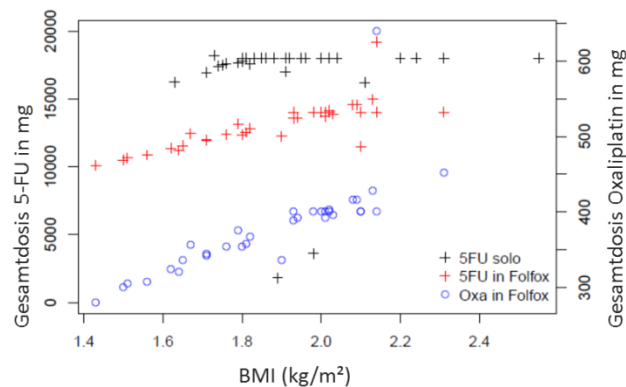


Abbildung 29: **Korrelation der kumulativen Gesamtdosis der beiden neoadjuvanten 5-FU-Therapieregime mit der KOF der Patienten**

Die Abbildung zeigt die verabreichte Gesamtdosis der Chemotherapie aufgeteilt nach den beiden Regimen (links 5-FU-mono und rechts FOLFOX) und der Höhe des BMIs der Patienten.

Bei einer KOF von mehr als  $1,8 \text{ m}^2/2,0 \text{ m}^2$  wurde die Gesamtmaximaldosis von  $18.000 \text{ mg}$  5-FU bei Monotherapie und  $14.400 \text{ mg}$  5-FU im 5-FU+Ox.-Regime verabreicht und die 5-FU-Dosierung nicht mehr an die KOF des Patienten angepasst. Insgesamt hatten 70 % des Patientenkollektivs eine KOF größer  $1,8 \text{ m}^2/2,0 \text{ m}^2$ . Fünf Patienten unter 5-FU-mono-Therapie und ein Patient unter der 5-FU+Ox.-Kombinationstherapie bekamen neoadjuvant eine Dosisreduktion.

Die KOF der Patienten war umgekehrt proportional zu den neoadjuvant gemessenen Blutplasmaspiegeln (siehe Abbildung 30). Je kleiner die KOF unter der 5-FU-mono-Therapie war, umso höhere AUC-Werte wurden gemessen (wie in Abbildung 31 dargestellt). Dieser Zusammenhang ließ sich für die mit 5-FU+Ox. therapierten Patienten nicht zeigen.

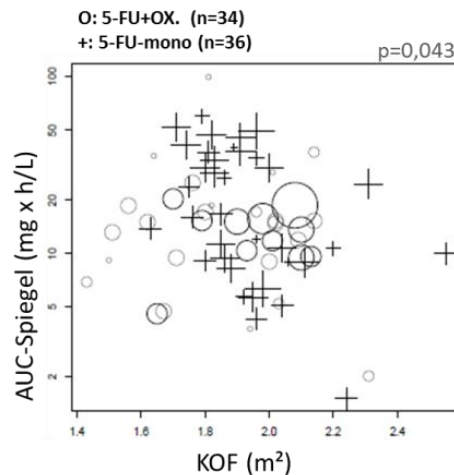


Abbildung 30: **Korrelation der 5-FU-AUC-Werte mit der KOF des Patienten in der neoadjuvanten Therapiephase**

(Legende siehe Kap.2.6). Die 5-FU-AUC-Blutplasmawerte sind reziprok proportional mit der KOF der Patienten. Mit zunehmender KOF werden niedrigere 5-FU-AUC-Blutplasmaspiegel gemessen.

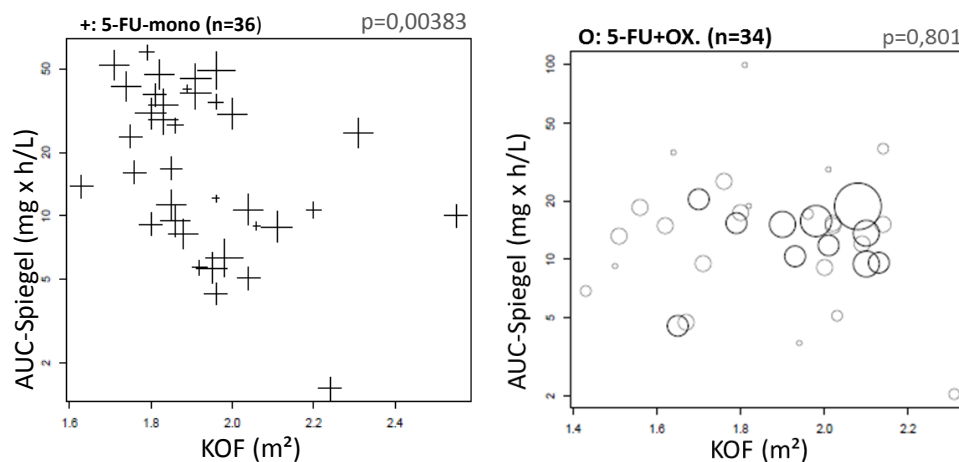


Abbildung 31: **Korrelation der 5-FU-AUC-Werte mit der KOF der Patienten in der neoadjuvanten Therapiephase aufgeteilt nach den unterschiedlichen 5-FU-Therapieregimen**

Auffallend ist, dass die KOF signifikant unter 5-FU-mono-Gabe mit dem AUC-Wert invers korrelierte. Unter FOLFOX-Therapie war die Korrelation zwischen KOF und AUC-Wert nicht signifikant.

In der neoadjuvanten Therapiephase unter der vielfach höher dosierten 5-FU-mono-Therapie korrelierten die KOF der Patienten mit den gemessenen 5-FU-AUC-Spiegeln umgekehrt proportional. Bei Betrachtung der KOF des unter adjuvanter Therapie untersuchten Kollektivs (n=13) und der 5-FU-AUC-Spiegel zeigte sich kein Zusammenhang ( $p=0,391$ ).



### 3.6 Analyse der 5-FU-AUC-Blutplasmawerte im zeitlichen Verlauf

Die gemessenen 5-FU-Plasmaspiegel jedes Patienten variierten um maximal 10 AUC-Units über die Zyklustage der neoadjuvanten Radiochemotherapie. Unter der 5-FU-mono-Therapie (siehe Abbildung 32) waren die AUC-Spiegel eines Patienten innerhalb des ersten (Woche 1) und zweiten (Woche 5) Zyklus ähnlich und ließen sich zwischen den beiden Chemotherapiezyklen mit Abweichungen bis ca. 10 AUC-Units vergleichen. Ähnliche intraindividuelle Schwankungen zeigten sich im 5-FU+Ox.-Patientenkollektiv (siehe Abbildung 33). Ein Therapiezyklus dauerte je zwei Wochen (Woche 1+2 und Woche 4+5) und enthielt im Normalfall drei Blutentnahmen. Innerhalb des ersten Zyklus war ein Anstieg des 5-FU-AUC-Wertes tendenziell erkennbar. Gegen Ende der Infusion sanken die 5-FU-Spiegel ab. Aufgrund dieser biologischen AUC-Schwankungen wurde aus den einzelnen Messwerten eines Patienten über die Zyklen der Median gebildet, um die Messwerte mit den anderen Patienten unter dem gesamten Therapieverlauf vergleichen zu können.

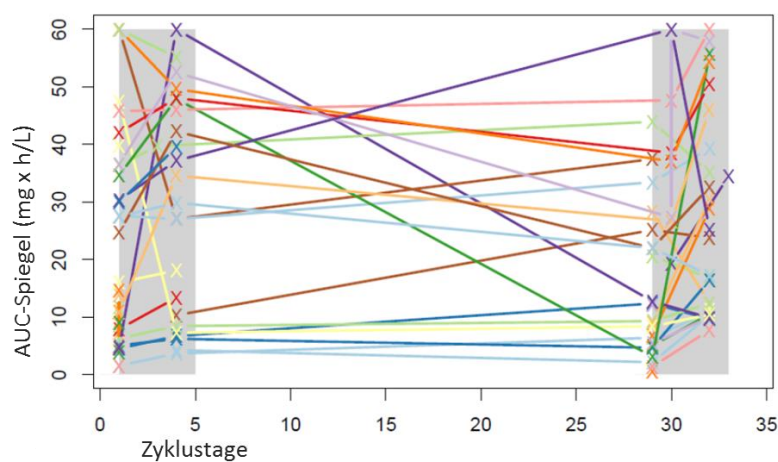


Abbildung 32: Darstellung der 5-FU-AUC-Blutplasmawerte über die gesamte neoadjuvante 5-FU-mono-Therapie

Jede Linie bildet die 5-FU-Messwerte eines Patienten über die gesamte Chemotherapie ab. Portproben und AUC-Spiegel oberhalb 60 mg x h/l wurden nicht berücksichtigt. Die meisten Patienten hatten Schwankungstendenzen im 5-FU-Blutplasmaspiegel um 10 mg x h/l während der gesamten Therapiedauer.

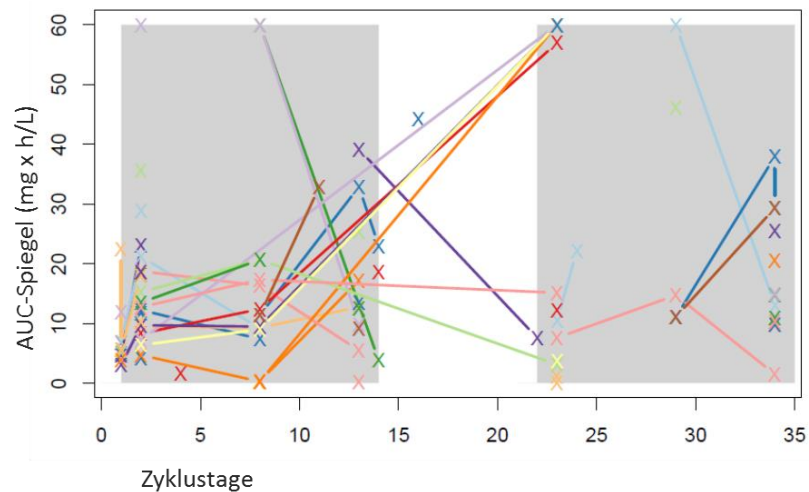


Abbildung 33: **Darstellung der 5-FU-AUC-Blutplasmawerte über die neoadjuvante 5-FU+Ox.-Therapie**

Die Farbverläufe der Linien, die jeweils einen Patienten darstellen, zeigten keine konstante Entwicklung der 5-FU-Blutplasmawerte. Während in der ersten Zyklushälfte tendenziell viele Patienten AUC-Werte auf einem Niveau blieben, traten gegen Ende der Therapie AUC-Wertschwankungen größer 10 mg x h/l auf. Über die gesamte Therapiedauer zeigten die meisten Patienten stabile 5-FU-Blutplasmawerte mit Schwankungen von 5-10 mg x h/l.

Unter der 5-tägigen Bolusinfusion erfolgte die Blutentnahme immer mit Ende der Infusion. Es zeigten sich starke 5-FU-Spiegel-Fluktuationen innerhalb der Zyklustage und innerhalb der vier Zyklen (siehe Abbildung 34). Insgesamt lag die Mehrzahl der AUC-Werte unter der 5-FU-mono-Therapie kleiner 10 mg x h/l. Im Gegensatz dazu waren die gemessenen 5-FU-AUC-Spiegel unter der FOLFOX-Therapie, mit Blutabnahme zwei Stunden nach Pumpenbeginn mit einer Ausnahme über 10 mg x h/l (siehe Abbildung 35). Ein Patient, der über die gesamten acht Zyklen gemessen wurde, zeigte im zeitlichen Verlauf AUC-Spiegel auf einem konstanten Niveau zwischen 14 und 21 mg x h/l.

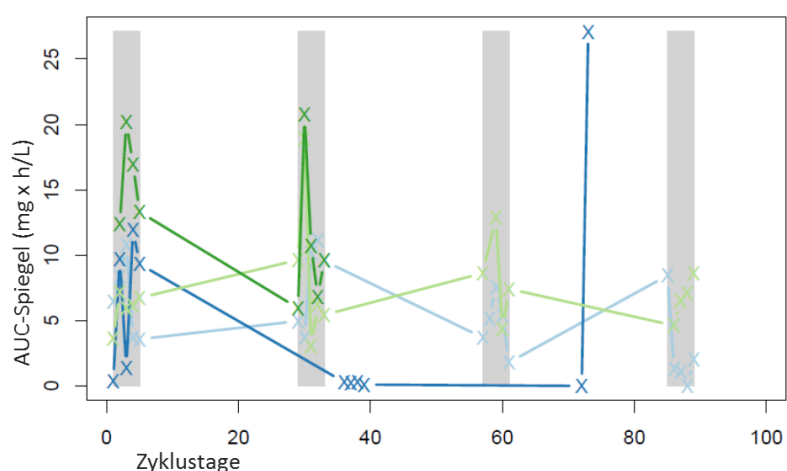


Abbildung 34: **Darstellung der 5-FU-AUC-Blutplasmawerte über die gesamte adjuvante 5-FU-mono-Therapie**

Es wurden die 5-FU-Blutplasmawerte von vier Patienten nach der täglichen Bolusinfusion gemessen. Die Auswertung der Blutproben über die gesamte Chemotherapiezeit konnte bei zwei der vier

Patienten durchgeführt werden. Ein Patient (blau) erhielt seine Therapie aufgrund von Hämatotoxizitäten ab dem zweiten Zyklus um eine Woche verzögert. Es bestehen 5-FU-AUC-Wert-Schwankungen größer 10 mg x h/l innerhalb eines Zyklus und auch über die Therapiezyklen. Stabile Blutplasmaspiegel bestanden bei einem niedrigen AUC-Niveau.

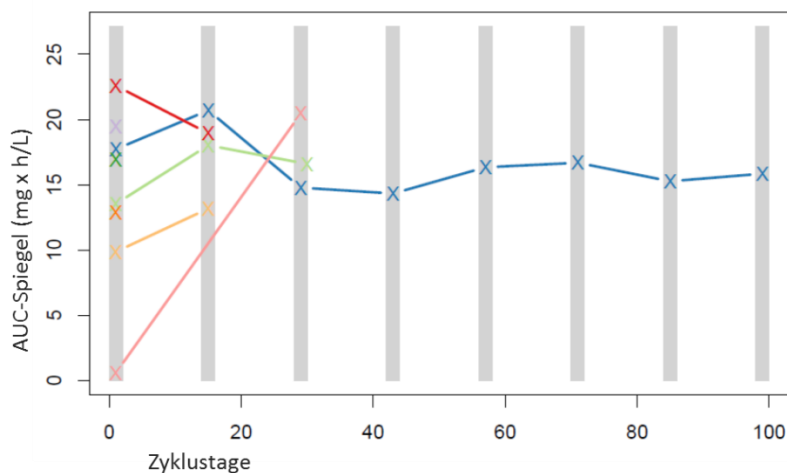


Abbildung 35: **Darstellung der 5-FU-AUC-Blutplasmawerte während der adjuvanten FOLFOX-Therapie**

Die 5-FU-Plasmaspiegel eines Patienten (n=7) wurde über die insgesamt erhaltenen acht Zyklen gemessen. Bei vier Patienten lagen maximal 5-FU-AUC-Spiegel von drei Therapiezyklen zum Messzeitpunkt vor. Tendenziell stiegen die Blutplasmaspiegel der untersuchten Patienten mit einer Ausnahme vom ersten auf den zweiten Zyklus an. Die Entwicklung der AUC-Spiegel in den anschließenden Zyklen wurde nicht dargestellt. Von sechs Patienten konnten ausschließlich die Blutproben der ersten Zyklen gemessen werden, da die adjuvante FOLFOX-Therapie zum Messzeitpunkt noch nicht abgeschlossen war.

### 3.7 Abhängigkeit der Toxizität von den 5-FU-AUC-Spiegeln

#### 3.7.1 Hämatotoxizität unter der neoadjuvanten Therapie

Die Nadir-Werte des Blutbildes wurden unter der neoadjuvanten Therapie erfasst und nach den CTC-Kriterien eingeteilt (siehe Abbildung 36). Mit wenigen Ausnahmen zeigten die Patienten einen Hämatotoxizitätsgrad 0 und 1. Zwei Patienten hatten eine Grad 3- und nur ein Patient eine Grad 4-Toxizität. Die 5-FU-Werte korrelierten mit dem Toxizitätsgrad (siehe Abbildung 37).

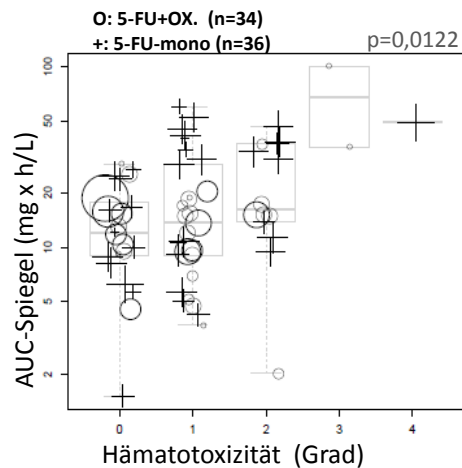


Abbildung 36: **Korrelation der gesamten Hämatotoxizität mit den 5-FU-AUC-Werten der neoadjuvanten Therapie**

(Legende siehe Kap. 2.6). Die 5-FU-AUC-Werte unter der 5-FU-basierten Chemotherapie waren signifikant zur gemessenen Hämatotoxizität.

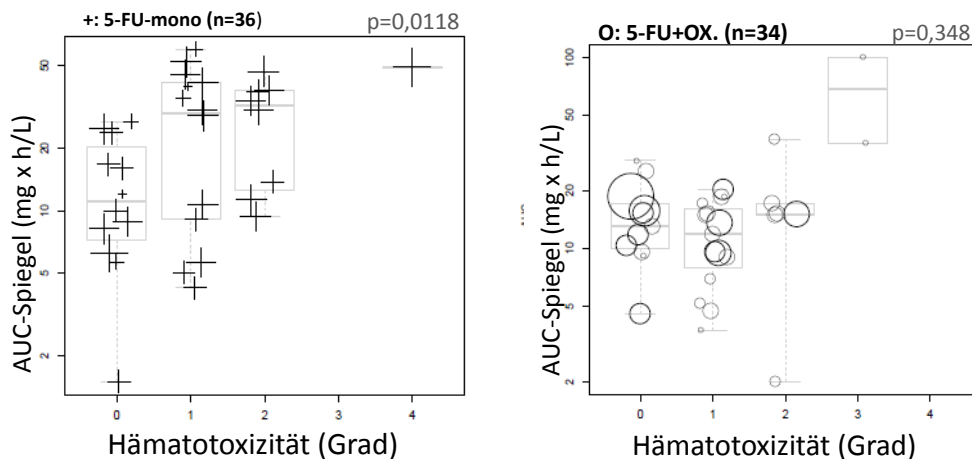


Abbildung 37: **Korrelation der gesamten Hämatotoxizität unter neoadjuvanter Therapie aufgeteilt in die beiden 5-FU-Therapieregime mit den 5-FU-AUC-Werten**

Links: Positive Korrelation der hämatologischen Toxizität mit dem 5-FU-AUC-Wert unter neoadjuvanter 5-FU-mono-Therapie ( $\tau=0,34$ ). Rechts: Korrelation der hämatologischen Toxizität nach CTC unter neoadjuvanter FOLFOX-Therapie ( $\tau=0,13$ ).

Die Höhe des 5-FU-AUC wirkte sich nur gering auf den Hämoglobingehalt aus (siehe Abbildung 38). So hatten nur acht Patienten eine Grad 2 Toxizität unter der Therapie. Der 5-FU-Blutspiegel korrelierte nicht mit einem therapieassoziierten Hämoglobin-Abfall (Hb-Abfall) ( $p=0,162$ ).

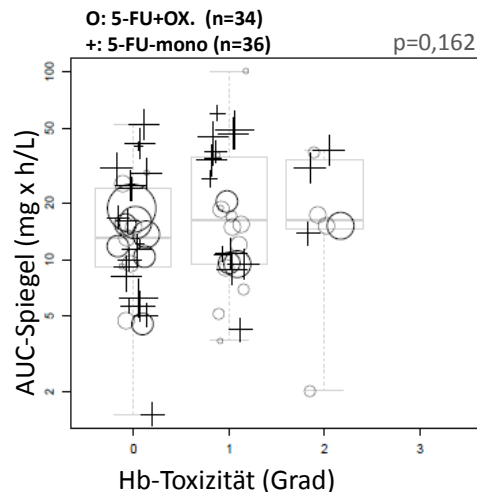


Abbildung 38: **Korrelation des Hämoglobin-Wertes mit dem 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanter Therapie**

Die Abbildung zeigt den Einfluss des 5-FU-AUC-Wertes auf die Erythropoese klassifiziert nach dem CTC-Score: CTC 0= Hb > 13,5g/L, CTC 1= Hb < 13,5-10,0 g/L, CTC 2= Hb < 10,0-8,0 g/L. (Legende siehe Kap.2.6) (tau=0,13).

Das Auftreten von Grad 1 und Grad 2 Toxizität unter den jeweiligen Therapieregimen zeigte eine vergleichbare Häufigkeit. Unter der 5-FU-mono-Therapie gab es 13 und unter der 5-FU+Ox.-Therapie 14 Patienten mit Grad 1 Hb-Toxizität. Drei Patienten zeigten einen zweitgradigen Hb-Abfall bei Monotherapie und 3 Patienten unter der kombinierten zytostatischen Therapie.

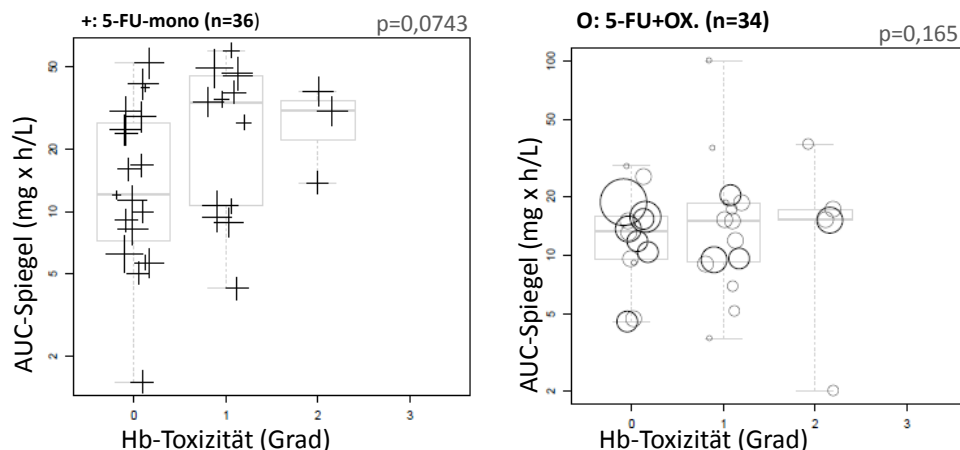


Abbildung 39: **Korrelation des Hämoglobin-Wertes mit dem 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanter 5-FU-mono- und FOLFOX-Therapie**

Links: Keine Korrelation des Hämoglobin-Wertes mit dem 5-FU-AUC-Wert unter neoadjuvanter 5-FU-mono-Therapie (tau= 0,25). Rechts: Keine Korrelation des Hämoglobin-Wertes mit dem 5-FU-AUC-Wert unter neoadjuvanter FOLFOX-Therapie (tau= 0,07).

Bei Betrachtung der einzelnen Blutwerte fiel auf, dass die Leukozyten (siehe Abbildung 40) und Thrombozyten (siehe Abbildung 42) signifikant mit der Höhe des 5-FU-Blutplasmawertes korrelierten. Es trat Leukozyten-Toxizität Grad 1 (n=10), Grad 2 (n=6) und Grad 4 (n=1) auf.

Über die Hälfte der Patienten wiesen keinen pathologischen Leukozytenabfall unter der neoadjuvanten Therapie auf.

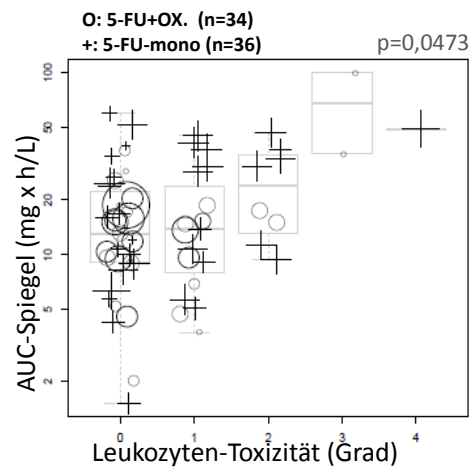


Abbildung 40: **Korrelation der Leukozytenzahl mit dem 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanter Therapie**

(Legende siehe Kap. 2.6). Die Abbildung zeigt den signifikanten Einfluss des 5-FU-AUC-Wertes auf die Granulopoese klassifiziert nach dem CTC-Score: CTC 0= Leukozyten  $> 4.0-3.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , CTC 1= Leukozyten  $< 4.0-3.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , CTC 2= Leukozyten  $< 3.0-2.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , CTC 3= Leukozyten  $< 2.0-1.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , CTC 4= Leukozyten  $< 1.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $\tau=0,19$ ).

Unter der neoadjuvanten 5-FU-mono-Therapie wurden im Median höhere AUC-Werte gemessen (siehe Abbildung 41). Bei separater Betrachtung der beiden Therapieregime fiel auf, dass sechs Patienten Grad 1-Toxizität und ein Patient Grad 4-Toxizität unter der Monotherapie hatten. Unter der Kombinationschemotherapie zeigten drei Patienten Grad 2- und zwei Patienten Grad 3-Toxizität der Leukozyten.

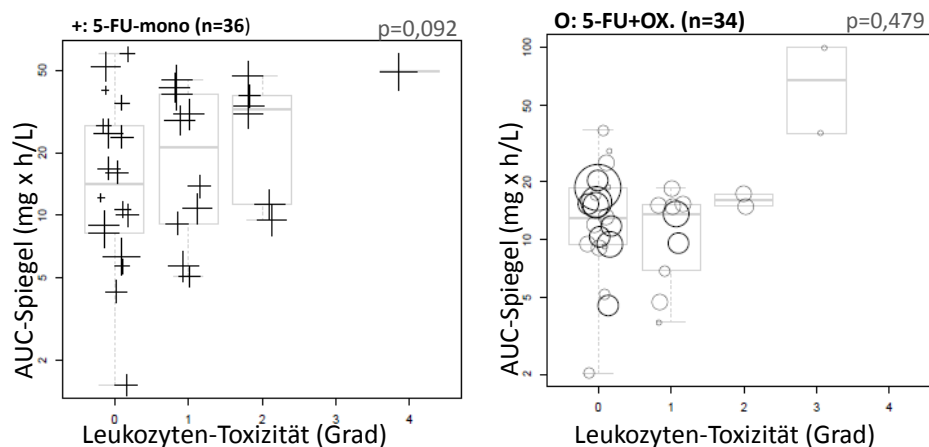


Abbildung 41: **Korrelation der Leukozytenzahl mit dem 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanter 5-FU-mono- und 5-FU+Ox.-Therapie**

Links: Korrelation der Leukozytenzahl mit dem 5-FU-AUC-Wert unter neoadjuvanter 5-FU-mono-Therapie ( $\tau=0,23$ ). Rechts: Korrelation der Leukozytenzahl mit dem 5-FU-AUC-Wert unter neoadjuvanter FOLFOX-Therapie ( $\tau=0,1$ ).

Die Thrombozyten zeigten maximal einen Toxizitätsgrad 1 unter der Radiochemotherapie bei einem Median von 39,83 mg x h/l (siehe Abbildung 43). Die Höhe der 5-FU-AUC-Spiegel ging signifikant mit dem Auftreten einer Thrombozyten-Toxizität einher ( $p=0,00392$ ).

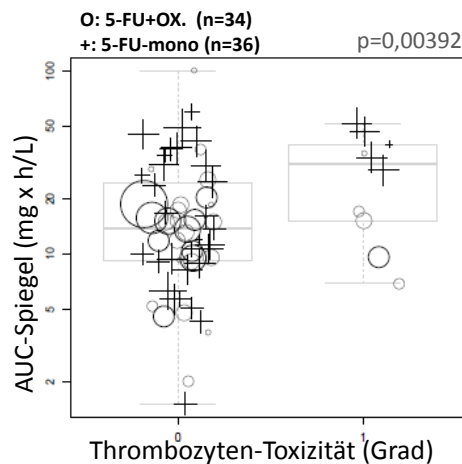


Abbildung 42: **Korrelation der Thrombozytenzahl mit dem 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanter Therapie**

Die Abbildung zeigt den signifikanten Einfluss des 5-FU-AUC-Wertes auf die Megakaryopoese klassifiziert nach dem CTC-Score: CTC 0= Thrombozyten  $> 150,0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , CTC 1= Thrombozyten  $< 150,0-75,0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ . (Legende siehe Kap.2.6) ( $\tau=0,21$ ).

Unter der 5-FU-mono-Therapie korrelierte der therapieassoziierte Thrombozytenabfall mit der Höhe der gemessenen 5-FU-Blutspiegel ( $p=0,0142$ ). Die FOLFOX-Therapie verursachte bei vier Patienten Grad 1-Toxizität.

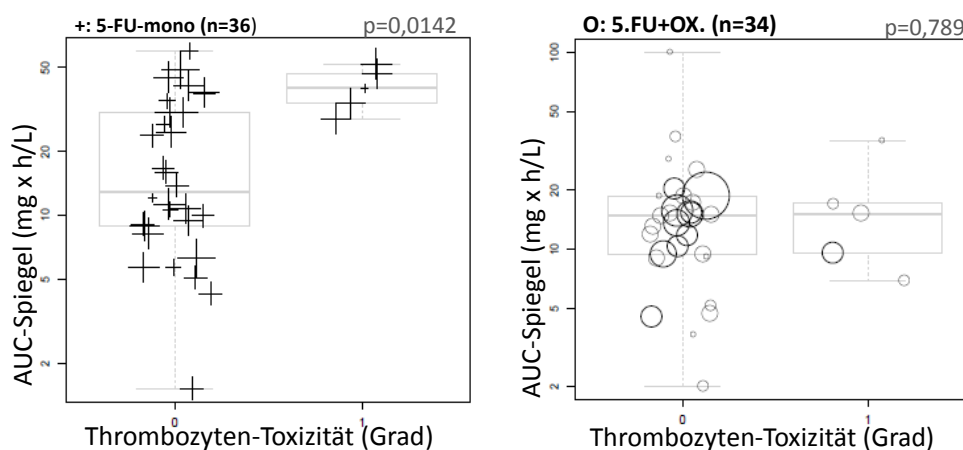


Abbildung 43: **Korrelation der Thrombozytenzahl mit dem 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanter 5-FU-mono- und 5-FU+Ox.-Therapie**

Links: Korrelation der Thrombozytenzahl mit dem 5-FU-AUC-Wert unter neoadjuvanter 5-FU-mono-Therapie ( $\tau=0,35$ ). Rechts: Keine Korrelation der Thrombozytenzahl mit dem 5-FU-AUC-Wert unter neoadjuvanter FOLFOX-Therapie ( $\tau=0,04$ ).

### 3.7.2 Strahlentherapie-induzierte Organtoxizität

Unter der konkomitanten Radiochemotherapie traten verschiedene Toxizitätsgrade an Organen auf.

Die meisten Patienten zeigten Proktitis-Symptome Grad 1, wobei drei Patienten schwere Proktitiszeichen (Grad 3 oder 4) hatten. Gleichzeitig trat häufig die Grad 1-Zystitis unter der Radiochemotherapie auf. Insgesamt entwickelten sechs Patienten eine höhergradige Zystitis Grad 2 und 3. Ein Viertel der Patienten entwickelte leichte Diarrhoen, während schwerer Durchfall (Grad 3 und 4) nur selten vorkam. Bei sieben Patienten wurde vorübergehend ein Toxizitätsgrad 3 oder 4 klassifiziert. Eine stärkere Dermatitis im Bestrahlungsfeld (> als Grad 2) trat nur selten auf, während die Hälfte der Patienten eine niedriggradige Strahlen-dermatitis entwickelten.

Insgesamt korrelierte die Toxizität der untersuchten Organsysteme nicht mit der Höhe der gemessenen 5-AUC-Blutplasmaspiegel.

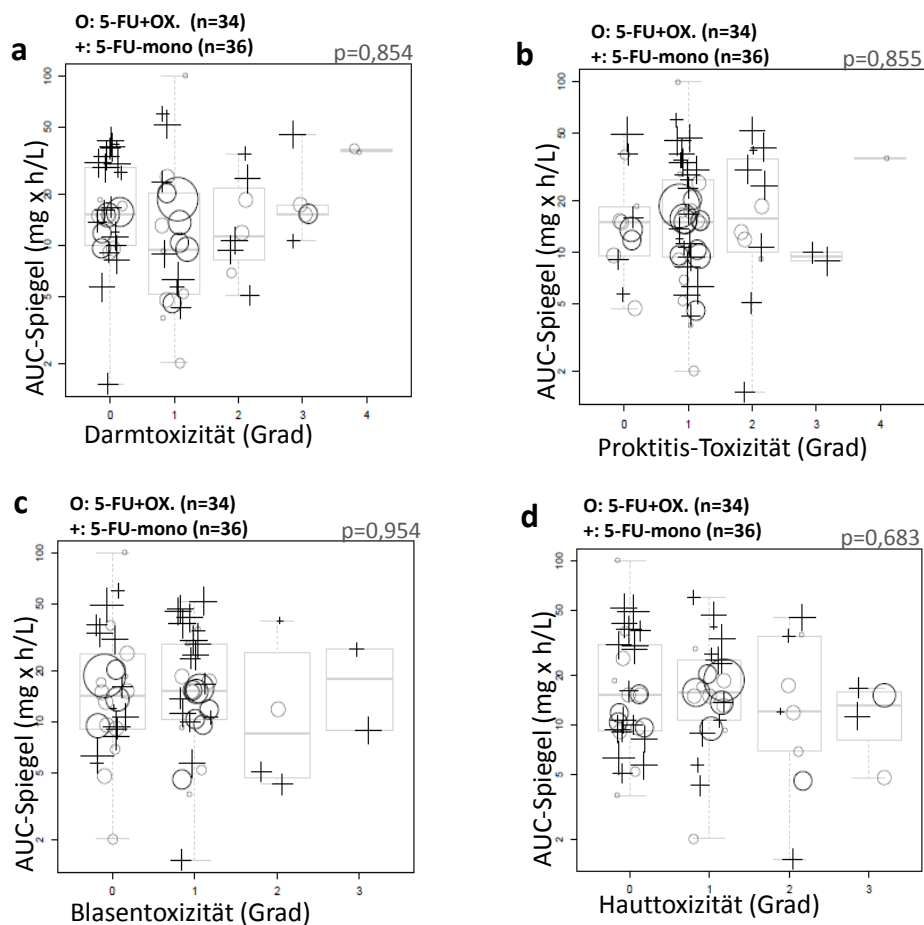


Abbildung 44: **Korrelation der Strahlentherapie-induzierten Organtoxizität mit dem 5-FU-AUC-Spiegel unter neoadjuvanter Radiochemotherapie**

Die Nebenwirkungen der Radiochemotherapie, klassifiziert nach dem CTC-Score, sind gegenüber dem 5-AUC-Spiegel dargestellt (Legende siehe Kap.2.6).

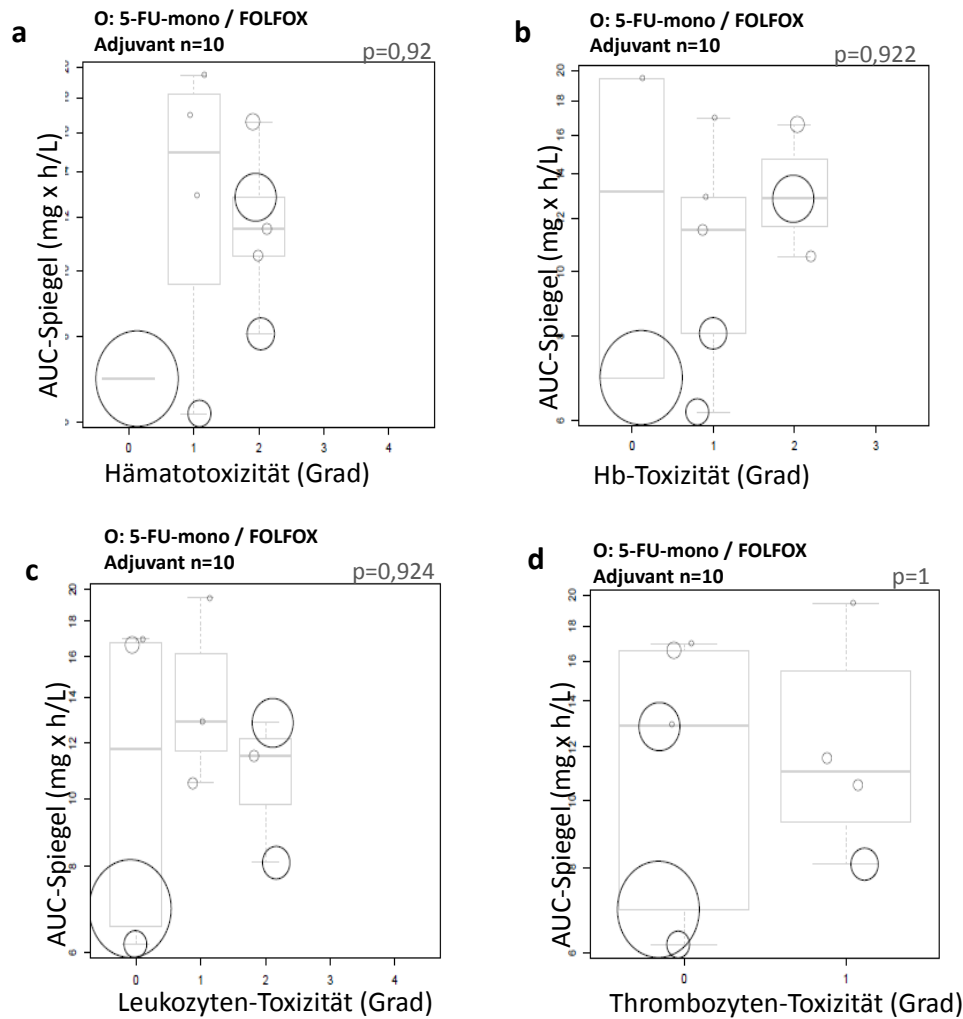


Abbildung 44a zeigt die Darmtoxizität gegenüber den gemessenen AUC-Blutspiegeln ( $\tau=0,02$ ); Abbildung 44b bildet die Proktitis unter neoadjuvanter Radiatio auf das Rektum gegenüber den 5-AUC-Spiegel ab ( $\tau=0,02$ ); Abbildung 44c vergleicht die Nebenwirkungen der Radiochemotherapie auf das Urogenitalsystem mit der Höhe der AUC-Werte ( $\tau=-0,01$ ); Abbildung 44d stellt die Radiatio-Nebenwirkungen der Haut mit den 5-FU-AUC-Spiegeln dar ( $\tau=-0,04$ ).

In der separaten Darstellung beider Therapieregime war die Darmtoxizität mit Grad 2 und 3 bei drei Patienten und als Grad 4-Toxizität bei zwei Patienten unter der FOLFOX-Therapie höher, als unter der Monotherapie (fünf Patienten Grad 2 und zwei Patienten eine Grad 3 Toxizität). Mit gleicher Inzidenz von sechs Fällen traten eine Strahlenzystitis Grad 2 und Grad 3 Toxizität auf. Eine strahleninduzierte Begleitproktitis trat bei fast allen Patienten ( $n=58$ ) auf. Dermatologische Toxizität Grad 1 wiesen ein Drittel aller Patienten auf. Grad 2- und 3-Toxizität der Haut trat selten und für beide Therapieregime gleich häufig auf.

### **3.7.3 Hämatotoxizität unter der adjuvanten Therapie**

Unter der adjuvanten Chemotherapie wurden ebenso die Blutbildveränderungen erfasst und nach dem CTC-Score eingeteilt. Vier Patienten zeigten Grad 1 und fünf eine Grad 2 Hämatotoxizität unter der adjuvanten Chemotherapie, wobei diese nicht im Zusammenhang mit der Höhe der 5-FU-AUC-Werte standen (siehe Abbildung 45).



**Abbildung 45: Korrelation der gesamten Hämatotoxizität mit den 5-FU-AUC-Werten der adjuvanten Therapie**

Die Abbildung zeigt den Einfluss des 5-FU-AUC-Wertes auf die peripheren Blutzellen. Die Ausprägung der Nebenwirkungen ist nach CTC-Score erfasst (siehe Anhang S.84). (Legende siehe Kap.2.6). Abbildung 45a zeigt die gesamte Hämatotoxizität gegenüber der gemessenen AUC-Werte ( $\tau=0,03$ ); Abbildung 45b zeigt den Einfluss des 5-FU-AUC-Wertes auf die Erythrozytenzahl ( $\tau=0,03$ ); Abbildung 45c zeigt den Einfluss des 5-FU-AUC-Wertes auf die Leukozytenzahl ( $\tau=0,03$ ); Abbildung 45d stellt den Einfluss des 5-FU-AUC-Wertes auf die Thrombozytenzahl dar ( $\tau=0$ ).

Der Hämoglobinwert sank bei fast allen Patienten im Verlauf der adjuvanten Chemotherapie ab. Obwohl 50 % der Patienten eine Hb-Toxizität Grad 1 und 33 % eine Grad 2-Toxizität erhielten, zeigte sich keine Abhängigkeit zu der Höhe der 5-FU-AUC-Werte ( $p=0,922$ ). Unter der adjuvanten Chemotherapie fielen die Leukozyten ab, sodass es Grad 1- ( $n=3$ ) und Grad 2- ( $n=3$ ) Toxizitäten gab. Die Leukozytenzahl stand nicht in Zusammenhang mit der Höhe des AUC-Wertes ( $p=0,924$ ). Die Thrombozyten sanken leicht unter der adjuvanten Therapie bis auf maximal  $75.000 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (Grad 1) ab. Die Höhe des 5-FU-AUC-Wertes korrelierte nicht mit dem Abfall der Thrombozyten ( $p=1$ ).

Die 5-FU-Blutplasmaproben korrelierten nicht mit den nach den CTC-Kriterien eingeteilten Blutbildveränderungen unter der adjuvanten Chemotherapie.

### 3.7.4 Therapieassoziierte Organtoxizität unter der adjuvanten Therapie

Die untersuchten Patienten hatten während der adjuvanten Chemotherapie Beschwerden an unterschiedlichen Organsystemen gezeigt, die nach dem CTC-Score dokumentiert wurden. Insgesamt sieben Patienten wurden nach dem FOLFOX-, und sechs Patienten nach den 5-FU-mono-Regimen behandelt. Im weiteren wurden die Beschwerden der Patienten beider Regime zusammengefasst, um eine größere Patientenkohorte zu untersuchen. Nur bei sieben Patienten (3 Patienten 5-FU-mono; 4 Patienten FOLFOX) konnte die Auskunft zu der therapieassoziierten Toxizität zum Auswertungszeitpunkt erfasst werden. Anderenfalls wären die Patienten nicht nochmal vorstellig geworden.

Dermatologische Auswirkungen auf die Therapie in Form eines Hand-Fuß-Syndroms kamen als Grad 1- und 2-Toxizität sowie als leichtgradige Alopezie vor (siehe Abbildung 46). Die eine Hälfte der Patienten zeigten eine intermittierende Grad 1- und 2-Stomatitis sowie eine Grad 1 Mukositis (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7). Neurotoxizität in Form einer leichten Polyneuropathie wurde von vier Patienten beschrieben (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7). Unter Ausnahme von einem Patienten, der unter schwerer Diarrhoe litt, traten ansonsten bei den Patienten nur gering erhöhte Stuhlfrequenzen von maximal 4 Stuhlgängen am Tag auf (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7). Zu leichtem Temperaturanstieg kam es selten nach der Therapieapplikation. Es wurde kein Anstieg der Nierenretentionsparameter, Geschmacksveränderungen sowie urogenitale und kardiologische Beschwerden verzeichnet.

	CTC 0	CTC 1	CTC 2	CTC 3	CTC 4	P-Wert
Mukositis <i>medianer AUC-Wert</i>	4 16,19	3 8,08	-	-	-	0,48
Haut <i>medianer AUC-Wert</i>	5 16,1	1 8,08	1 6,94	-	-	0,18
Darm (Colon) <i>medianer AUC-Wert</i>	4 14,5	1 7,12	-	-	1 20,76	1,0
Magen (Übelkeit) <i>medianer AUC-Wert</i>	5 12,91	1 8,08	1 16,11	-	-	0,85
Niere <i>medianer AUC-Wert</i>	7 12,91	-	-	-	-	na
Neurotoxizität <i>medianer AUC-Wert</i>	3 19,47	4 10,50	-	-	-	0,48

Herz <i>medianer AUC-Wert</i>	7 <i>12,91</i>	-	-	-	-	na
Fieber <i>medianer AUC-Wert</i>	6 <i>10,49</i>	1 <i>19,47</i>	-	-	-	0,32
Haarausfall <i>medianer AUC-Wert</i>	4 <i>16,19</i>	3 <i>8,08</i>	-	-	-	0,48
Geschmack <i>medianer AUC-Wert</i>	7 <i>12,91</i>	-	-	-	-	na

Tabelle 6: **Tabellarische Aufstellung der Organtoxizität unter der adjuvanten Chemotherapie**

Die Organmanifestationen der 5-FU-Toxizität werden nach CTC-Score und Patientenzahl dargestellt. Ergänzend sind der mediane 5-FU-AUC-Wert und Korrelationen von 5-FU-Spiegel und Organtoxizität berechnet. Dabei bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen den 5-FU-Spiegel und dem Toxizitätsgrad.

	CTC 1	CTC 2	CTC 3	CTC 4
<b>Mukositis</b> <i>5-FU-mono</i> <i>FOLFOX</i>	<b>3</b> 2 1	-	-	-
<b>Haut</b> <i>5-FU-mono</i> <i>FOLFOX</i>	<b>1</b> 1 0	<b>1</b> 1 0	-	-
<b>Darm (Colon)</b> <i>5-FU-mono</i> <i>FOLFOX</i>	<b>1</b> 0 1	-	-	<b>1</b> 1 0
<b>Magen (Übelkeit) Stomatitis</b> <i>5-FU-mono</i> <i>FOLFOX</i>	<b>1</b> 1 0	<b>1</b> 0 1	-	-
<b>Neurotoxizität</b> <i>5-FU-mono</i> <i>FOLFOX</i>	<b>4</b> 2 2	-	-	-
<b>Fieber</b> <i>5-FU-mono</i> <i>FOLFOX</i>	<b>1</b> 0 1	-	-	-
<b>Haarausfall</b> <i>5-FU-mono</i> <i>FOLFOX</i>	<b>3</b> 2 1	-	-	-

Tabelle 7: **Tabellarische Aufstellung der Organtoxizität unter der adjuvanten Chemotherapie nach Therapieregimen**

Die Organmanifestationen der 5-FU-Toxizitäten werden nach CTC-Score, Patientenzahl und Therapieregime aufgeführt.

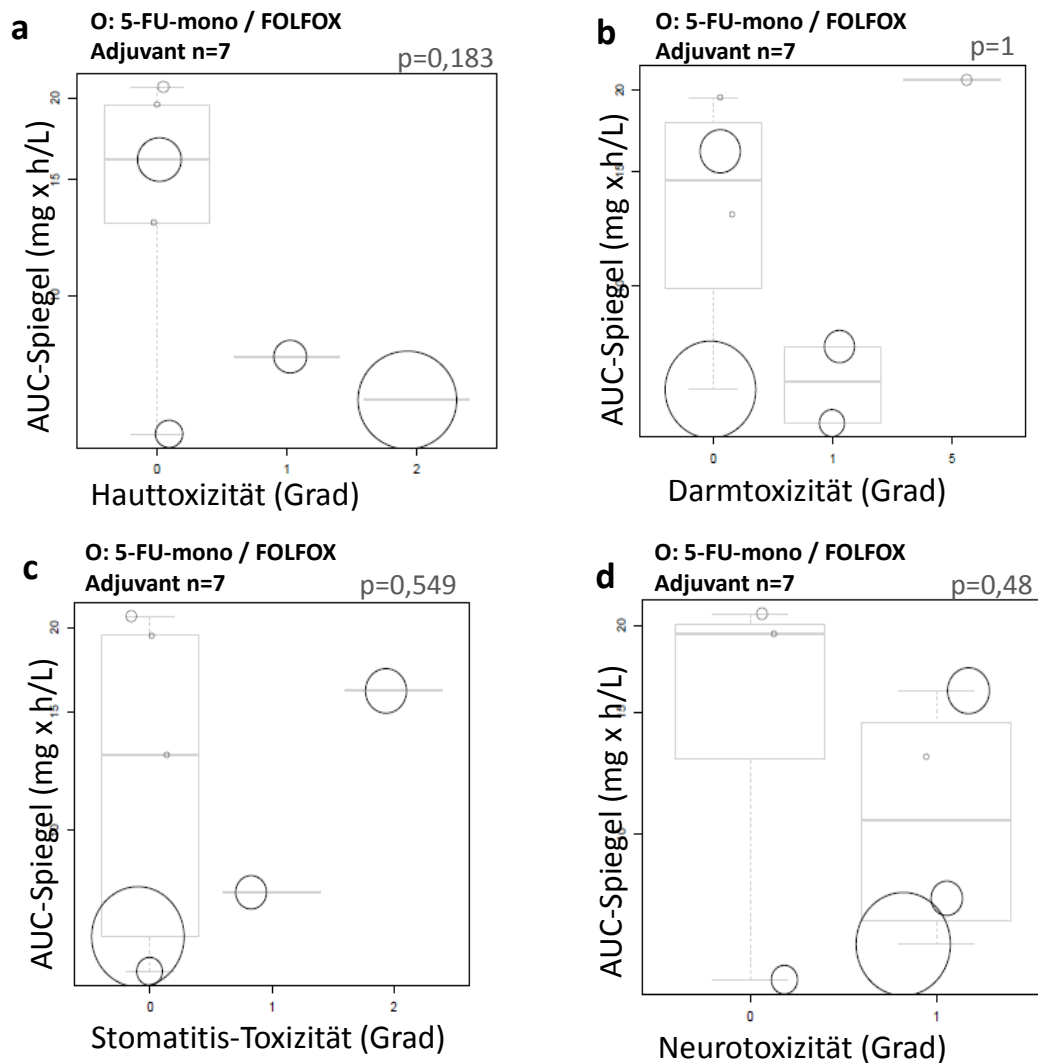


Abbildung 46: **Korrelation der Organtoxizität mit den 5-FU-AUC-Spiegeln unter adjuvanter Chemotherapie**

Ringe symbolisieren die gemessenen AUC-Werte im gebildeten Mittelwert zusammengefasst unter der adjuvanter Chemotherapie mit 5-FU-mono oder FOLFOX (n=7) (Legende siehe Kap.2.6).

Abbildung 46a zeigt die Hauttoxizität gegenüber den AUC-Blutspiegeln ( $\tau=-0,46$ );

Abbildung 46b bildet die Darmtoxizität gegenüber den 5-AUC-Spiegel ab ( $\tau=0$ );

Abbildung 46c zeigt Stomatitis in Assoziation mit der Höhe der AUC-Werte auf ( $\tau=0,07$ );

Abbildung 46d stellt die Neurotoxizität in Bezug auf die 5-FU-AUC-Spiegel dar ( $\tau=-0,25$ ).

Die Organtoxizitäten in Form von Diarrhöen, Stomatitis, Neurotoxizität und Hand-Fuß-Syndrom unter der adjuvanter Therapie zeigten keine Korrelation mit den gemessenen 5-FU-AUC-Blutplasmaspiegeln.

### 3.8 Korrelation der neoadjuvant gemessenen 5-FU-AUC-Spiegel mit dem Tumorrespons

Die gemessenen 5-FU-Blutplasmaspiegel unter der neoadjuvanten Chemotherapie sollten auch im Kontext der histopathologischen Aufarbeitung der Rektumresektate betrachtet werden, um das Therapieansprechen in Abhängigkeit der erreichten 5-FU-Dosis beurteilen zu können. Tabelle 8 fasst die Tumorresektate nach histologischer Beurteilung zusammen, wobei alle Patienten nach onkologischen Prinzipien reseziert wurden und eine TME erhielten. Nach der neoadjuvanten Radiochemotherapie konnte in 86 % der 5-FU-monotherapierten Patienten ein R0-Status erzielt werden. Jeweils bei zwei Patienten lag ein R1- und R2-Status vor. Bei mit 5-FU+Ox.-vorbehandelten Patienten konnte in 96,5 % ein R0-Resektionsstatus nach TME diagnostiziert werden. In einem Fall wurde unter der Kombinationschemotherapie R1 reseziert (siehe Tabelle 8).

Neoadjuvante Therapie	RCT (5-FU-mono)		Intensivierte RCT (5-FU +Ox.)		p-Wert*
Patientenzahl (N=70**)	41	%	29	%	
<b>R-Status</b>					<b>0,46*</b>
<b>R0</b>	37	90,0	28	96,5	
<b>R1</b>	2	4,9	1	3,5	
<b>R2</b>	2	4,9	0	-	
<b>(y)pTNM-Status</b>					
<b>(y)pT-Status</b>					<b>0,22*</b>
<b>0</b>	6	14,6	7	24,1	
<b>1</b>	3	7,3	3	10,3	
<b>2</b>	14	34,1	4	19,0	
<b>3</b>	16	39,0	15	51,7	
<b>4</b>	2	4,9	0	-	
<b>(y)pN-Status</b>					<b>0,42*</b>
<b>0</b>	26	63,4	22	75,8	
<b>1</b>	11	26,8	4	19,0	
<b>2</b>	4	9,8	3	10,3	
<b>(y)pM-Status</b>					<b>0,55*</b>
<b>0</b>	36	87,8	24	82,7	
<b>1</b>	5	12,2	5	17,2	
<b>(y)pUICC-Stadium</b>					<b>0,66*</b>
<b>0</b>	6	14,6	6	20,7	
<b>I</b>	10	24,4	6	20,7	
<b>II</b>	7	17,1	6	20,7	
<b>III</b>	14	34,1	6	20,7	
<b>IV</b>	4	9,8	5	17,2	

Tumorregressionsgrad (n. Dworak)					0,05*
<b>0 (keine Regression)</b>	0	-	1	1,7	
<b>1 (&lt; 25 %)</b>	6	14,6	0	-	
<b>2 (&lt; 50 %)</b>	15	36,5	6	20,7	
<b>3 (&gt; 50 %)</b>	12	29,3	15	51,7	
<b>4 (komplette Repr.)</b>	8	19,5	7	24,1	

Tabelle 8: **Übersicht über die klinikopathologischen Parameter der Patienten aufgeteilt nach Therapieschema**

Der R-Status, TNM-Status sowie der Tumorregressionsgrad (TRG) wurden histopathologisch erhoben. Aufgrund von Auf- und Abrunden ergibt die Summe in % nicht zwingend 100 %. \*p-Wert-Berechnung mit Chi-Quadrat Test \*\* Zum Zeitpunkt der Auswertungen war noch **keine Operation** erfolgt (n=9 Patienten) und nicht neoadjuvant vorbehandelte Patienten wurden nicht berücksichtigt (n=3 Patienten).

Postoperativ konnten bei 13 Patienten nach der neoadjuvanten Vorbehandlung histopathologisch keine vitalen Tumoranteile (ypT0) mehr nachgewiesen werden. Sechs Patienten, je drei 5-FU-mono- und drei 5-FU+Ox.-therapierte Patienten, zeigten eine residuelle Tumordinfiltration, die auf die Lamina propria (ypT1) begrenzt war. Eine verbleibende Karzinomausbreitung bis in die Muscularis propria (ypT2) lag postoperativ bei 14 Patienten unter der Monotherapie und vier Patienten unter der neoadjuvanten Kombinationschemotherapie vor. Nach neoadjuvanter Radiochemotherapie wiesen 16 5-FU-mono- und 15 5-FU+Ox.-behandelte Patienten einen ypT3-Tumor im Resektat auf. Drei Patienten zeigten trotz neoadjuvanter Vorbehandlung eine organübergreifende Tumordinfiltration (ypT4) direkt in andere Organe oder Umgebungsstrukturen (siehe Tabelle 8).

Die 5-FU-AUC-Spiegel von 70 Patienten unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie wurden auf das Korrelat des Tumoransprechens untersucht.

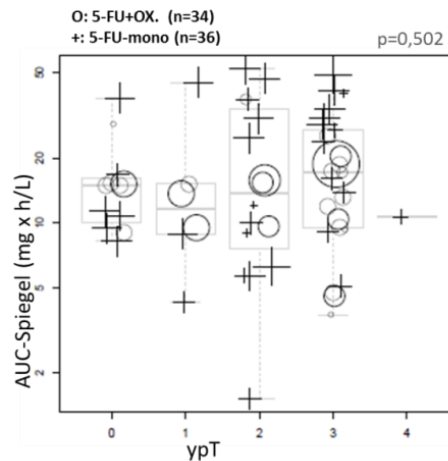


Abbildung 47: **Korrelation der neoadjuvant gemessenen 5-FU-AUC-Plasmaspiegel mit der Tumordinfiltrationstiefe (ypT) der Patienten**

(Legende siehe Kap.2.6). Korrelation der 5-FU-AUC-Werte mit der histopathologisch ermittelten lokalen Tumortiefe (ypT) nach neoadjuvanter Therapie ( $\tau=0,07$ ).

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der histopathologischen Tumordinfiltrationstiefe aus dem Tumorsektat und den neoadjuvant gemessenen 5-FU-Blutplasmaspiegeln.

Tumorfremige Lymphknoten zeigten postoperativ 26 Patienten nach neoadjuvanter 5-FU-mono-Therapie (60,4 %) und 22 Patienten (61 %) nach neoadjuvanter Kombinationstherapie und bildeten damit mehr als 60 % des untersuchten Patientenkollektivs ab. Es konnte bei elf 5-FU-mono-therapierten Patienten und nur bei vier 5-FU+Ox.-Behandelten ein ypN1-Status ermittelt werden. Insgesamt zeigten nur sieben der 82 untersuchten Patienten noch mehr als drei positive Lymphknoten (ypN2) auf (siehe Tabelle 8).

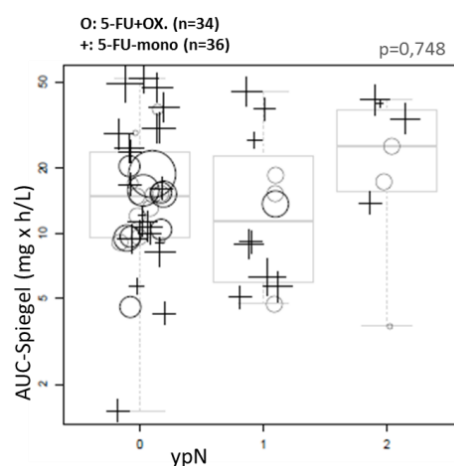


Abbildung 48: **Korrelation der neoadjuvant gemessenen 5-FU-AUC-Plasmaspiegel mit dem Lymphknotenstatus (ypN) der Patienten**

(Legende siehe Kap.2.6). Korrelation der 5-FU-AUC-Werte mit dem histopathologisch ermittelten Lymphknotenstatus (ypN) nach der neoadjuvanter Therapie ( $\tau=0,03$ ).



Es bestand kein statistisch signifikantes Korrelat zwischen dem AUC-Wert und dem klinisch determinierten und pathologischen diagnostizierten postoperativen Nodalstatus.

Eine Fernmetastasierung zum Operationszeitpunkt konnte bei allen primär operierten und bei allen 36 5-FU-mono-behandelten (100 %) und 24 5-FU+Ox.-therapierten Patienten (71 %) ausgeschlossen werden. Jeweils fünf Patienten beider vorbehandelter Patientengruppen (5-FU-mono: 14 %; 5-FU+Ox.:15 %) hatten eine zuvor okkulte hepatische oder pulmonale Metastasierung zum Zeitpunkt der Tumorresektion (M1) (siehe Tabelle 8).

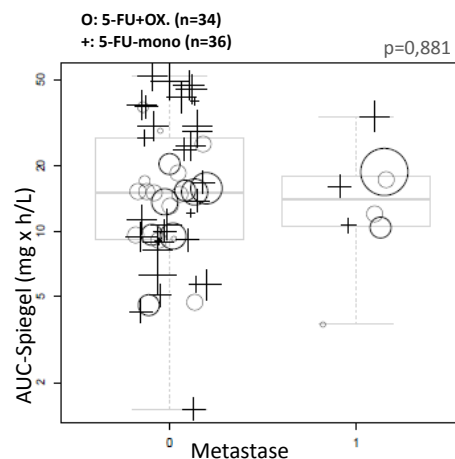


Abbildung 49: **Korrelation der neoadjuvant gemessenen 5-FU-AUC-Plasmaspiegel mit dem Metastasierungsverhalten der Patienten**

(Legende siehe Kap.2.6). Dargestellt ist die Korrelation der 5-FU-AUC-Werte mit dem klinisch gesicherten Metastasierungsstatus des Patienten nach der Operation (tau=-0,02).

Das Vorliegen einer Metastasierung korrelierte nicht mit der Höhe der gemessenen 5-FU-Blutplasmaspiegel unter der neoadjuvanten Therapie.

Nach der neoadjuvanten Radiochemotherapie waren jeweils sechs Patienten (5-FU-mono: 16 %; 5-FU+Ox.:17 %) beider neoadjuvanter Regime histopathologisch tumorfrei (ypUICC 0). Ein ypUICC I-Stadium zeigten zehn Patienten nach 5-FU-mono- (28 %) und sechs nach 5-FU+Ox.-Therapie (17 %). Zugleich wiesen zehn 5-FU-mono-therapierte (16 %) und sechs vorbehandelte Patienten unter Kombinationschemotherapie (17 %) ein ypUICC II-Stadium auf. Ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium ypUICC III zeigten 14 5-FU-mono-vorbehandelte Patienten (39 %) und sechs Patienten (17 %), die eine intensiviertere Radiochemotherapie mit 5-FU+Ox. erhielten. Demgegenüber zeigten jeweils vier (5-FU-mono:11 %) und fünf (5-FU+Ox.:15 %) Patienten nach der Operation eine fortgeschrittene Erkrankung im Stadium ypUICC IV (siehe Tabelle 8).

Aus dem residuellen Tumorgewebe des Resektates wurde histopathologisch der Tumorregressionsgrad (TRG) bestimmt. Eine histopathologisch bestätigte komplette Tumorremission (TRG 4) zeigten insgesamt acht 5-FU-mono-therapierte Patienten (19,5 %) und sieben intensiviert vorbehandelte Patienten (24,1 %). Über die Hälfte der 5-FU+Ox.-therapierten Patienten (n= 15) und zwölf 5-FU-mono-therapierte Patienten hatten eine Regression des Tumorgewebes von mehr als 50 % (TRG 3). Eine Regression von weniger als 50 % (TRG 2) konnte bei 15 Patienten 5-FU-mono- und sechs intensiviert vorbehandelten Patienten festgestellt werden. Sechs Patienten zeigten einen Rückgang von Tumorgewebe nach der Radiochemotherapie um weniger als 25 % (TRG 1) unter der Monotherapie. Unter der mit 5-FU+Ox.-intensivierten Radiochemotherapie war in einem Fall gar keine Tumoregression (TRG 0) erkennbar (siehe Tabelle 8).

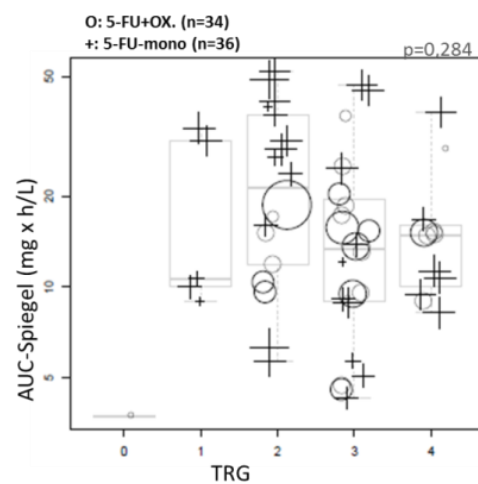


Abbildung 50: **Korrelation der neoadjuvant gemessenen 5-FU-AUC-Plasmaspiegel mit dem TRG nach primärer neoadjuvanter Radiochemotherapie**

(Legende siehe Kap.2.6). Die Abbildung zeigt den TRG nach neoadjuvanter Radiochemotherapie in Zusammenhang mit den präoperativ gemessenen 5-FU-AUC-Blutplasmaspiegeln ( $\tau=0,11$ ).

Der histopathologisch gesicherte TRG zeigte keine signifikante Korrelation mit den präoperativ gemessenen 5-FU-Blutplasmaspiegeln.

### 3.9 Das Operationsverfahren

Neoadjuvante Therapie	RCT (5-FU-mono)		Intensivierte RCT (5-FU+Ox.)		p-Wert*
<b>Patientenzahl (N=70) **</b>	41	%	29	%	
<b>Operationsverfahren</b>					0,92*
TARR	29	70,1	20	69,0	
APE	10	24,4	8	27,6	
andere	2	4,9	1	3,4	
<b>Höhenlokalisierung d. Tumors</b>					0,32*
unteres Rektumdrittel	14	34,1	14	48,3	
mittleres Rektumdrittel	27	65,8	13	44,8	
oberes Rektumdrittel	2	4,9	2	6,9	

Tabelle 9: Übersicht über das Operationsverfahren und die jeweiligen Höhenlokalisationen des Karzinoms

Bei allen drei Behandlungsgruppen stellte die am häufigsten angewendete OP-Technik die TARR dar. Über die Hälfte aller Rektumkarzinome (57,3 %, n=47) zeigten eine Lokalisation im mittleren Rektumdrittel. \*p-Wert-Berechnung mit Chi-Quadrat Test \*\* weitere 9 Patienten waren zum Auswertungszeitpunkt noch nicht operiert und primär operierte Patienten wurden nicht berücksichtigt (n=3 Patienten).

Bei allen Patienten erfolgte die totale Entfernung des Tumorgewebes in kurativer Intention. Dabei stellte die TARR mittels TME bei allen untersuchten Patienten das häufigste Operationsverfahren dar. Insgesamt wurde bei 29 5-FU-mono-vorbehandelten (70,1 %) und 20 5-FU+Ox.-therapierten Patienten (69 %) diese Operationstechnik durchgeführt. Mittels abdominoperinealer Rektumexstirpation (APR) wurden zehn Patienten nach 5-FU-mono-Therapie (24,4 %) und acht nach 5-FU+Ox.-Vorbehandlung (27,6 %) operiert. Bei drei Patienten wurde eine alternative Diskontinuitätsresektion mit TME wie zum Beispiel einer Diskontinuitätsoperation nach Hartmann durchgeführt.

### 3.10 Das krankheitsfreie Überleben in Abhängigkeit der erzielten 5-FU-Spiegel in der multimodalen Therapie des Rektumkarzinoms

Nach Abschluss der adjuvanten Therapie begann der Nachsorgezeitraum ein halbes Jahr nach Therapieabschluss. Insgesamt lagen uns Nachsorgedaten von allen Patienten bis zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung im Januar 2014 vor.

Während der Radiochemotherapie verstarb ein Patient an nicht tumorbedingten Ursachen und ein Patient nach der Operation. An Folgen der Tumorerkrankung verstarben elf Patienten im Zeitraum nach Abschluss der adjuvanten Therapie.

Das DFS war signifikant länger bei Patienten, die nach der neoadjuvanten Radiochemotherapie als Therapieresponder (TRG 4 und TRG 3, N0) angesprochen hatten, im Unterschied zu den Patienten, die nur einen sehr geringen bis gar keinen Tumorregress (TRG 0 und TRG 1) zeigten ( $p=0,00356$ ).

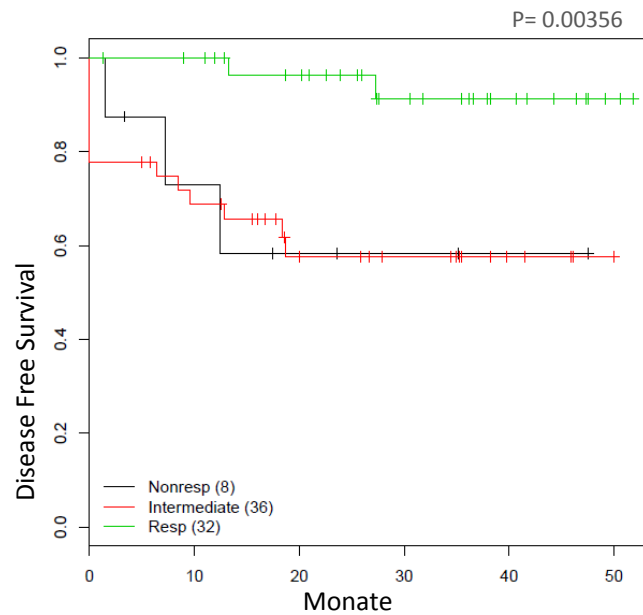


Abbildung 51: **TRG mit DFS**

*Disease free survival* (DFS) gruppiert nach TRG: Nonresp = TRG 0 und TRG 1, Intermediate = TRG 2 und TRG 3 N+, Resp = TRG 3 N-, TRG 4 (Chisq= 11.3 on 2 degrees of freedom).

Die Patientenzahl, die operiert wurde (und initial noch nicht operiert war), hat sich durch den späteren Auswertungszeitraum um sechs Patienten erhöht.

Bei Betrachtung der Tumorrespons nach der neoadjuvanten Therapie im Hinblick auf das *cancer specific survival* (CSS), hatten die „Responder“ (TRG 4 und TRG 3, N0) das längste Überleben. Demgegenüber zeigten die „Nonresponder (TRG 0 und TRG 1) ein deutlich kürzeres Tumor-spezifisches Überleben ( $p=0,233$ ).

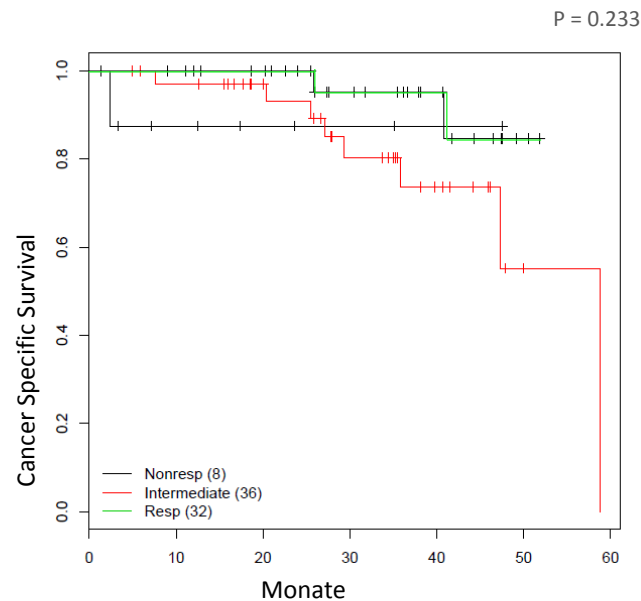


Abbildung 52: **CSS nach TRG**

Die Abbildung zeigt das *cancer specific survival* (CSS) aufgeteilt nach TRG: Nonresp = TRG 0 und TRG 1, Intermediate = TRG 2 und TRG 3 N+, Resp = TRG 3 N-, TRG 4 (Chisq= 2.9 on 2 degrees of freedom).

Die Patientenzahl, die operiert wurde (und initial noch nicht operiert war), hat sich durch den späteren Auswertungszeitraum um sechs Patienten erhöht.

Nach Abschluss der adjuvanten Therapie traten im Nachbeobachtungszeitraum bis Januar 2014 bei zwei Patienten, die mit 5-FU-mono behandelt wurden, bei zwei Patienten, die sich einer intensivierten Radiochemotherapie unterzogen und einem primär adjuvant behandelten Patienten, ein Lokalrezidiv auf. Eine Fernmetastasierung wurde im Verlauf bei 14 Patienten erfasst. Am häufigsten fanden sich Tumorabsiedlungen mit Kombination einer pulmonalen und hepatischen Metastasierung. Unter dem neoadjuvanten Kombinationsregime entwickelten neun Patienten (28 %) eine Fernmetastasierung. Fünf Patienten nach der neoadjuvanten 5-FU-mono-Therapie (14 %) zeigten im Nachbeobachtungszeitraum eine Fernmetastasierung in umliegende Organe.

## 4 Diskussion

### 4.1 5-FU-Blutplasmaspiegel

#### 4.1.1 Der therapeutische AUC-Bereich

Für die 5-FU-Blutplasmaspiegelmessungen ist der AUC-Wert der pharmakokinetische Parameter, der in vorangegangenen Arbeiten (Kaldate et al. 2012; Gamelin 2007b; Gamelin und Boisdron-Celle 1998; Milano et al. 2005; Hillcoat et al. 1978) für die Einschätzung von Therapieeffizienz und Toxizität unter einer 5-FU-Therapie benutzt wurde. Der AUC-Zielbereich wurde für ein longitudinales pharmakokinetisches Monitoring mit 20-30 AUC-Units unabhängig von Tumortyp und der Behandlungsstrategie etabliert (Kaldate et al. 2012; Gamelin 2007b; Gamelin und Boisdron-Celle 1998; Milano et al. 2005; Hillcoat et al. 1978). Das empfohlene therapeutische Fenster schützt vor Veränderungen, die einerseits schwere und lebensbedrohliche Toxizität für einige Individuen z.B. mit DPD-Defizit auslösen können, und andererseits vor reduzierter antitumoraler Wirksamkeit bei Patienten, die eine starke 5-FU-Clearance haben (Sparreboom 2005). Der bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschriebene und durch die Firma Saladax empfohlene AUC-Zielbereich stellt die Grundlage für die vorliegenden Auswertungen und die Interpretation der Ergebnisse dar (Kaldate et al. 2012; Gamelin 2007b; Gamelin und Boisdron-Celle 1998; Milano et al. 2005; Hillcoat et al. 1978).

#### 4.1.2 Analyse der Methodik

Aus methodischem Interesse wurden unter der neoadjuvanten Therapie sowohl peripher-venöse als auch Port- Blutentnahmen durchgeführt. Dabei fielen die entnommenen Portproben mit maximalen AUC-Werten von 11458,8 mg x h/l auf. Eine Erklärung für die extremen Ausreißer können Konglomerate von 5-FU-Kristallen sein, die im Portsystem- oder im zentralvenösen intrakorporalen Schlauchsystem haften bleiben. Bei Blutentnahme werden diese aspiriert und erzeugen falsch hohe 5-FU-Spiegel in der Plasmaprobe. Aufgrund der extrem hohen AUC-Werte und deren Inkonsistenz sind die Port-Entnahmewerte nicht zuverlässig und wurden von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen. Seither werden an der UMG keine Port-Blutproben mehr für die 5-FU-Spiegelbestimmung entnommen. Zu dem gleichen Ergebnis, dass 5-FU-Blutplasmaspiegel sowohl aus Port-

Blutentnahmen als auch Blutproben zentralvenöser Katheter nicht valide interpretierbar sind, kamen auch andere Arbeitsgruppen, die 5-FU-AUC-Messungen beim metastasierten KRK durchführten (Kaldate et al. 2012).

Für methodische Analysen wurden Blutproben sowohl in EDTA als auch in Heparin-Monovetten abgenommen. In einer vergleichenden Untersuchung korrelierten die gemessenen 5-FU-Spiegel in EDTA- und Heparin-Monovetten signifikant (siehe Abbildung 23). Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen sind beide Abnahme-Monovetten für das 5-FU-Monitoring geeignet und stellen auch keine potentielle Ursache für fehlerhafte 5-FU-Spiegelmessungen dar.

Dessen ungeachtet ist die adäquate Asservation der Blutprobe von großer Bedeutung. Analysen von Beumer et al. (2007) hatten gezeigt, dass die Stabilität von 5-FU in Blutzellen und Blutplasma bei 4°C gewährleistet war, während bei Raumtemperatur nach 72h der 5-FU-Wert um mehr als 94 % des initial gemessenen 5-FU-Wertes abfiel. Es gibt zwei Möglichkeiten den initialen 5-FU-Plasmaspiegel in der Patientenprobe durch die Inaktivierung der DPD in-vitro aufrechtzuerhalten. Einerseits kann die DPD über die Kühlung der Blutprobe durch Lagerung auf Eis und andererseits über das Hinzugeben des Glimeracil-Stabilisators inaktiviert werden. In der Gegenüberstellung von mit Stabilisator-versetzten Proben und den gekühlten EDTA-Blutproben, stimmten die gemessenen AUC-Werte mit signifikanter Korrelation überein (siehe Abbildung 22). Beide Verfahren scheinen zu funktionieren, wobei sie unterschiedlich aufwändig sind. Bei der Blutproben-Kühlung muss die Kühlkette konstant aufrecht gehalten werden und dementsprechend die Probenaufbereitung zeitnah stattfinden. Demgegenüber kann die Blutprobe nach Hinzugabe des Stabilisators bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden und wird zudem unter Raumtemperatur aufbereitet. Damit ist der Glimeracilstabilisator das für die klinische Routinediagnostik praktikablere und flexiblere Verfahren. Mit Erhalt dieser Ergebnisse wurden im seither in der Versuchsdurchführung und in der klinischen Routine EDTA-Monovetten für die Blutentnahmen verwendet. Diese sind ausschließlich mit dem Glimeracil-Stabilisator kompatibel sind.

Diese methodischen Vergleichsmessungen von verschiedenen Blutabnahme-Monovetten und zwischen zwei unterschiedlichen Aufbewahrungsverfahren (siehe Abbildung 22), demonstrieren, dass von Probenabnahme bis zur Probenasservierung sehr präzise gearbeitet wurde.

### 4.1.3 Interpretation der gemessenen AUC-Werte

Die 5-FU-AUC-Werte stammen aus venösen peripheren Blutproben, unterschiedlichen Dosisregimen (neoadjuvant: 5-FU-mono, 5-FU+Ox., adjuvant: 5-FU-mono, FOLFOX) und divergieren in Applikationsform und -längen (Infusionspumpen à 24 h, 48 h, 5 Tage und 7 Tage, Kurzinfusion). Im Folgenden wurden die Werte im Hinblick auf diese Unterschiede analysiert. Die meisten gemessenen Blutproben unter der KOF-adaptierten neoadjuvanten Radiochemotherapie und adjuvanten Chemotherapie zeigten AUC-Werte unterhalb des angestrebten Zielbereiches von 20-30 AUC-Units (siehe Kapitel 3.6). Unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie mit der Kombinationstherapie 5-FU+Ox. sind mediane AUC-Werte kleiner 10 AUC-Units gemessen worden. Die 5-FU-Dosis unter der neoadjuvanten Kombinationstherapie ist mit  $250 \text{ mg/kg/m}^2$ , im Vergleich zu der 5-FU-mono-Therapie, relativ niedrig und erklärt die niedrig gemessenen 5-FU-Spiegel. Ziel der intensivierten neoadjuvanten Chemotherapie-Kombination ist die Steigerung der Radiosensitivität der Tumorzellen gegenüber der konkordanten Radiatio. Die gemessenen 5-FU-Spiegel lagen im Median bei 5-FU-AUC-Werten kleiner  $20 \text{ mg} \times \text{h/l}$ , während die gemessene Toxizität gegenüber der 5-FU-Monotherapie niedriger war. In den durchgeführten Analysen führte die zeitgleiche Applikation von 5-FU mit einem anderen Chemotherapeutikum nicht zu einem frühzeitigen Auftreten von Toxizität.

Dem gegenüber zeigten sich unter der vierfach höher dosierten neoadjuvanten 5-FU-mono-Chemotherapie höhere AUC-Spiegel mit medianen AUC-Werten größer 30 AUC-Units unter dem 24-h-Infusionsregime. Seit der Umstellung auf eine 5-Tages-Infusionstherapie, unter gleicher 5-FU-Dosierung, wurden im Median niedrigere AUC-Spiegel von  $10,45 \text{ mg} \times \text{h/l}$  bestimmt (siehe Kap.2.2.1). Die AUC-Werte unter der 5-FU-mono-Therapie waren bei gleicher Dosierung unter einer 24-h-Infusion höher als unter einer 5-Tagesinfusion (siehe Abbildung 19). Diese Ergebnisse deuten an, dass die Infusionsdauer die Einstellung des C<sub>ss</sub> und damit auch die Höhe des AUCs beeinflusst. Möglicherweise führte eine längere Applikationsdauer zu einem C<sub>ss</sub>, der mit niedrigeren 5-FU-AUC-Spiegeln einhergeht. Andererseits könnte unter dem 24-h-Infusionsregime der Applikationszeitraum von nur 24 Stunden für das Ausbilden eines C<sub>ss</sub> zu kurz sein. Dabei sind ohne die Ausbildung des C<sub>ss</sub> die AUC-Spiegel höher. Diese Beobachtung stimmen mit den Arbeiten von Gamelin et al. (1999) überein, die einen Anstieg der Dosisintensität des 5-FUs bei verlängerter Infusionsdauer nachweisen konnten.



Die durchgeführten Analysen unter der neoadjuvanten Infusionspumpentherapie zeigten zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb eines Zyklus und zwischen den beiden Therapiezyklen Schwankungen der AUC-Werte um maximal 10 AUC-Units (siehe Abbildung 32; Abbildung 35). Interessanterweise kamen auch über die Blutentnahmezeitpunkte innerhalb eines Therapiezyklus gering-gradige AUC-Schwankungen vor. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass es bei der Einstellung des C<sub>ss</sub> zu intraindividuellen Schwankungen von bis zu 10 AUC-Units kommt, die sich über den Nanopartikelimmunoassay monitoren lassen. Die intraindividuellen Schwankungen lassen sich besser unter einer Infusionspumpe nach Einstellung des C<sub>ss</sub> wie unter einer 24-h-Infusion beurteilen. Ein weiterer Vorteil der Infusionspumpe liegt in dem messbaren Anstieg der Dosisintensität des 5-FUs. Eine Spiegelbestimmung in der Mitte des Zyklus ist sinnvoll um sehr hohe AUC-Werte zu erfassen. Auf diese Weise könnte man eine Überdosierung frühzeitig zum Zeitpunkt des wahrscheinlich maximalen AUC-Spiegels diagnostizieren und im weiteren Therapieverlauf Toxizität vermeiden.

Ähnliche Ergebnisse von inter- und intraindividuelle Inkonsistenz von 5-FU-AUC-Werten demonstrierten Saam et al. (2011), Gamelin et al. (2008) und Jodrell et al. (2001) in klinisch durchgeführten Dosisanpassungsstudien im metastasierten Erkrankungsstadium. Kaldate et al. (2012) zeigten in einer großen Studie (n=589), dass zu Beginn der 5-FU-Infusion die gemessenen AUC-Werte deutlich niedriger waren als im späteren Verlauf. Es wurde auf eine breite pharmakokinetische Variabilität in der ersten Stunde nach Applikationsbeginn geschlossen, da sich die niedrigsten AUC-Werte zu Beginn der Infusion zeigten (Kaldate et al. 2012). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die 5-FU-Konzentrationen nicht vor 18h nach Infusionsbeginn den C<sub>ss</sub> erreichten (Kaldate et al. 2012).

Schlussfolgernd aus diesen Resultaten sollte ein möglichst später Blutentnahmezeitpunkt gewählt werden, um den 5-FU-AUC sicher nach Ausbildung des C<sub>ss</sub> messen zu können.

Anschließend an die bisherigen Ergebnisse lagen auch die adjuvant gemessenen 5-FU-AUC-Spiegel im suboptimalen therapeutischen Bereich. Während die FOLFOX-Proben unter 48-h-Infusion im Median zwischen 14,1 mg x h/l und 17,1 mg x h/l waren, zeigten die 5-FU-mono-Therapie-Proben nach 5-FU-Bolusinfusion AUC-Werte kleiner 7 mg x h/l. Unter der Bolustherapie sind starke 5-FU-Spiegel-Fluktuationen innerhalb der Zyklustage und innerhalb der vier Zyklen (siehe Abbildung 34, Abbildung 35) gemessen worden. Offenbar kam es nicht

zu einer C<sub>ss</sub>-Ausbildung unter der 5-FU-Bolusgabe. Niedrige Messwerte könnten durch die kurze Halbwertszeit von 10 bis 20 Minuten verursacht sein. Sehr hohe 5-FU-Spiegel könnten Ausdruck einer hohen Medikamentenanflutung sein. Ein schneller 5-FU-Spiegelabfall kann durch die kurze Halbwertszeit ausgelöst worden sein.

Ähnlich zu den hier vorgestellten Ergebnissen stellten Gamelin et al. (2005) in einer Toxizitätsstudie unter 5-FU-AUC-Spiegelmessung bei Patienten mit metastasiertem KRK fest, dass eine 5-FU-Bolustherapie in-vivo 5-FU-Plasmaspiegelspitzen verursachte, die akut Toxizität auslösen kann.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten durch pharmakokinetische Analysen zeigen, dass die Abbaurate unter dem Infusionsregime viel höher ist, als unter Bolusgabe von 5-FU (Milano et al. 2005; Gamelin und Boisdron-Celle 1998).

Abschließend ist festzustellen, dass für die Erfassung der inkonstanten Kinetik die 5-FU-Blutplasma Spiegelbestimmung unter der Bolustherapie ungeeignet ist. Die Dauerinfusionstherapie hingegen bietet durch die Ausbildung des C<sub>ss</sub> über die Zeit eine gute Möglichkeit die 5-FU-Spiegel zu bestimmen.

Die 5-FU-Messungen unter der adjuvanten FOLFOX-Therapie mittels 48-h-Pumpe zeigten letztendlich die höchsten 5-FU-Spiegel von allen Therapieregimen. Die 5-FU-Dosis war mit 2400mg/m<sup>2</sup> am höchsten dosiert unter den untersuchten Therapieregimen. Im Hinblick auf den Infusionsbeginn waren die AUC-Spiegel bei gleichem Abnahmezeitpunkt und gleicher Dosierung auf einem konstanten AUC-Niveau miteinander vergleichbar. Allerdings ist die Aussagekraft aufgrund der geringen Fallzahl (n=4) eingeschränkt. Möglicherweise sind individuell gleichbleibende Medikamentenanflutung und auch konstante Metabolisierungs-Mechanismen Gründe für die konstanten Werte. Das Entnehmen der Blutprobe zu einem festgesetzten Zeitpunkt in Bezug auf den Infusionsbeginn ist wichtig, um die gemessenen 5-FU-AUC-Werte miteinander vergleichen und individuell während der verschiedenen Zyklen interpretieren zu können. Letztendlich gewährleistet diese Applikationsform konstante AUC-Spiegel und bietet sich zum gleichen Blutentnahmezeitpunkt für eine Dosisanpassung nach 5-FU-Spiegelbestimmung an.

Unter der Prämisse, dass die 5-FU-AUC-Werte intra- und interindividuellen Schwankungen unterliegen, ist der Immunoassay eine sinnvolle Möglichkeit, die 5-FU-Werte eines Patienten

zu monitoren, um eine Unterdosierung oder auch Überdosierung zu erkennen. Hinsichtlich des 5-FU-Spiegels beeinflussen Applikationsart, -dauer und die 5-FU-Dosierung die 5-FU-AUC-Werte.

#### **4.1.4 Analyse der Körperoberfläche als Dosierungsgrundlage**

Die KOF-Berechnung zur 5-FU-Dosierung basiert auf dem BMI des Patienten (siehe Kap.1.6) und stellt den aktuellen Therapiestandard dar. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen BMI und gemessenen neoadjuvanten 5-FU-AUC-Spiegeln wurde jedoch nicht gezeigt (siehe Kap.3.5). Die Studienprotokolle der hier durchgeführten Therapieregime gaben ein „Dosekapping“ ab einer KOF von 1,8 m<sup>2</sup> neoadjuvant und größer einer KOF von 2,0 m<sup>2</sup> adjuvant vor. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit waren einerseits 70 % der Patienten dem „Dosekapping“ unterlegen. In 64 % aller Patientenproben wurden andererseits AUC-Spiegel (siehe Abbildung 18) unterhalb des therapeutischen Zielbereiches bestimmt. Offensichtlich ist die Dosis des 5-FUs unter dem „Dosekapping“ für einzelne Individuen des untersuchten Patientenkollektivs zu niedrig gewesen und bildet nicht die Dosis ab, die nach KFO für den Patienten geeignet ist.

Es scheint daher zwingend notwendig zu sein, die KOF-adaptierte Therapie ohne „Dosekapping“ durchzuführen, um die tatsächliche 5-FU-Dosis des Patienten adaptiert an die KOF und den BMI zu erfassen.

Die 5-FU-Spiegelmessungen bei Patienten mit metastasiertem Rektumkarzinom durch Gamelin et al. (1999) traten bei gleicher KOF-Dosierung große Unterschiede in der systemischen Exposition auf. Unabhängig von der individuellen Variabilität unter der KOF-Dosierung ist zu diskutieren, inwieweit die KOF-Formel, die individuellen Einflussfaktoren für die KOF und Wirkung des 5-FUs eines Patienten aufgreift. Die Entwicklung der KOF-Formel wurde anhand einer Population mit mittlerer KOF erstellt ohne Tumorpatienten, Schwergewichtige oder Menschen mit Begleiterkrankungen zu berücksichtigen (Sparreboom 2005). Zugleich lag der BMI im Bevölkerungsdurchschnitt deutlich niedriger (Sparreboom 2005).

Ein weiterer Grund für die individuell unterschiedlichen AUC-Werte könnte das Patientenalter sein. Das mittlere Alter des Patientenkollektivs beträgt 64 Jahre. Tendenziell sind mit zunehmendem Patientenalter die 5-FU-AUC-Spiegel im Median höher (siehe Abbildung 26). Diese Ergebnisse wurden zuvor in anderen pharmakokinetischen Studien

gezeigt und konstatierten darüber hinaus eine sowohl hämatologisch als auch organbezogene stärkere ausgeprägte Toxizität bei älteren Patienten (Extermann 2007). In Kap.4.2 werden diese Aspekte an den durchgeführten Analysen erörtert.

Diese Resultate fordern ein Dosierungsverfahren, welches unabhängig von Einflussgrößen wie Begleiterkrankungen, Patientenalter, BMI und dem Metabolisierungsstatus (Genotyp der DPD und TS) die individuelle optimale Dosis für den Patienten erfassen kann. Eine mögliche Alternative dafür stellt der Immunoassay mittels TDM dar.

#### **4.1.5 Geschlechtsspezifische Analyse der AUC-Werte**

Die geschlechtsspezifische Analyse der neoadjuvanten AUC-Spiegel zeigte, dass Frauen im Median signifikant ( $p=0,0235$ ) höhere 5-FU-Plasmaspiegel haben als Männer (siehe Kap. 3.3). Unter der viermal höher dosierten 5-FU-mono-Therapie wird dieser Umstand noch deutlicher ( $p=0,00371$ ). Die durchgeführten Analysen stellten einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang unter der neoadjuvanten 5-FU-mono-Therapie zwischen KOF und 5-FU-Spiegel ( $p=0,00383$ ) fest. Frauen erhielten aufgrund kleinerer Körpergröße und einem relativen geringeren Gewicht seltener ein "Dosekapping". Mögliche Ursachen für die geschlechtsspezifischen AUC-Niveaus wurden in einer niedrigen Clearance-Kapazität und einer reduzierten Aktivität der Metabolisierungsenzyme DPD in mehreren Studien diskutiert (Gamelin 2007b; Sloan et al. 2002). Wolff et al. (2011) stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Geschlecht und Toxizität unter der Radiochemotherapie dar. Frauen, die einen niedrigen BMI ( $22 \text{ m}^2/\text{kg}$ ) hatten, zeigten in dieser retrospektiven Studie das höchste Risiko für eine akute Organtoxizität (Wolff et al. 2011). Der BMI hatte bei männlichen Patienten keinen Einfluss auf die beobachtete Toxizität (Wolff et al. 2011).

Unseren Ergebnissen nach hatten Frauen deutlich höhere 5-FU-AUC-Spiegel, die teilweise im Ziel-AUC-Bereich bei beiden neoadjuvanten Therapieregimen lagen. Inwieweit die Höhe des 5-FU-Blutspiegels mit der Toxizität unter der Therapie korrelierte oder ob die Patientinnen einen höheren Tumorrespons erfuhren, sollte zukünftig untersucht werden.

## 4.2 Korrelation der 5-FU-AUC-Werte mit der Therapie-assoziierten Toxizität

### 4.2.1 Hämatotoxizität

Wie aus Kap. 3.7.1 ersichtlich wird, stand unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie das Auftreten von Grad 1- und 2-Hämatotoxizität im Vordergrund. Während der 5-FU-AUC-Wert nicht mit der Höhe des Hb-Wertes korrelierte, zeigte sich signifikant, dass Leukozyten- und Thrombozytenabfall mit der Höhe des 5-FU-Blutspiegels oberhalb des AUC-Bereiches einhergingen. In der hochdosierten 5-FU-mono-Therapie mit 1000 mg/m<sup>2</sup>/d war eine 5-FU-Toxizität signifikant in Form einer Leuko- und Thrombozytopenie (siehe Abbildung 40 bis Abbildung 43) assoziiert. Im Median waren die AUC-Werte unter der 5-FU-mono-Therapie unter der 24-h-Infusionspumpe bei 39,6 AUC-Units und damit über dem angestrebten AUC-Bereich. Vorausgehende Arbeiten von Findlay et al. zeigten, dass hohe 5-FU-Plasmaspiegel mit einer höheren Toxizität vergesellschaftet waren (Findlay et al. 2005). Damit stieg das Risiko Therapie-assoziiertes Toxizität zu entwickeln mit der Höhe der AUC-Spiegel. Problematisch war hierbei, dass der Chemotherapie-induzierte Abfall der Blutzellen im Patientenblut erst Tage nach der Chemotherapie-Infusion sichtbar wurde. Die Arbeitsgruppe von Saif stellte in einer klinischen 5-FU-AUC-Anpassungsstudie fest, dass eine passagere Neutropenie die häufigste hämatologische Toxizität beim metastasierten KHK war (Saif et al. 2009; Patel et al. 2013). Zukünftig sollten Verfahren entwickelt werden, die die Chemotherapie-assoziierte Toxizität vor der klinischen Manifestation detektieren können, um das Risiko für Begleitkomplikationen, wie zum Beispiel Infektionen oder Blutungen für den Patienten zu minimieren. Der Immunoassay bietet eine Möglichkeit zukünftig die Toxizität vor der klinischen Manifestation unabhängig von der Infusionsdauer und der Dosierung zu erkennen.

In unseren Analysen gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den gemessenen 5-FU-AUCs unter dem FOLFOX-Regime und der beobachteten Hämatotoxizität (siehe Abbildung 38-39 und Abbildung 42-43). Das geringere Auftreten von Toxizität könnte auf die im Median gemessenen AUC-Werte von kleiner als 10 AUC-Units beruhen. Indessen ist der isolierte Einfluss von 5-FU auf die Toxizität unter einer Kombinationstherapie schwierig zu diskriminieren.

Diese Messergebnisse fordern auf, einerseits eine Dosiserhöhung von 5-FU in den Kombinationsregimen unter AUC-Wert-Kontrollen durchzuführen und andererseits gleichzeitig eine Überdosierung frühzeitig abzuwenden. Dabei ist es fraglich, inwieweit der Ziel-AUC-Bereich durch die Kombinationschemotherapie verändert wird (siehe Kapitel 4.1.3) und ob darüber hinaus über eine 5-FU-Dosisanpassung eine Effektivitätssteigerung unter der Kombinations-therapie möglich ist. Dieser Zusammenhang sollte zukünftig untersucht werden.

Unter den 13 adjuvant untersuchten Patienten trat vergleichsweise eine niedrige Hämatotoxizität auf gegenüber den neoadjuvanten Regimen auf. In allen untersuchten Fällen korrelierten die gemessene Toxizität und die Höhe des 5-FU-Spiegels nicht (siehe Kap.3.7.3). Bei den Analysen galt es zu berücksichtigen, dass das untersuchte Kollektiv vergleichsweise klein war (n=13) und die meisten AUC-Spiegel unterhalb des Zielbereichs lagen. In Zukunft sollte der Zusammenhang erneut unter den AUC-Werten im therapeutischen Bereich und anhand einer größeren Patientenzahl ausgewertet werden.

Diese Ergebnisse aus den verschiedenen Infusionstherapien und Dosierungsschemata zeigten die Diversität der AUC-Werte und des Auftretens von Toxizität auf. Der Immunoassay ermöglicht, die AUC-Spiegel unter der Therapie zu ermitteln. Darüber hinaus sollten konsequenterweise die AUC-Werte angepasst werden. Damit ließe sich die Toxizität frühzeitig über eine Dosisreduktion vermeiden und zu niedrige Dosierungen zeitnah anpassen.

#### **4.2.2 Strahlentherapie-induzierte Toxizität**

Die dokumentierte Organtoxizität unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit den gemessenen 5-FU-Blutplasmaspiegeln. Dabei unterschied sich das Auftreten der Toxizität nicht maßgeblich unter den beiden Regimen (siehe Kap. 3.7.2). Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass keine 5-FU-assoziierte Toxizität vorlag, sondern die Strahlentherapie für die beschriebene Toxizität verantwortlich war, da die meisten neoadjuvant gemessenen AUC-Spiegel unter dem therapeutischen Bereich lagen. Interessanterweise waren die Grad 3- und 4-Diarrhoen doppelt so häufig unter 5-FU+Ox. (61 %), wie unter der Monotherapie (38 %). Aufgrund der Tatsache, dass die 5-FU-Dosis unter der Kombinationstherapie viermal niedriger war, könnte die Oxaliplatin-gabe oder die Radiatio Ursache für die Diarrhoen gewesen sein. Vorausgehende Untersuchungen zeigten, dass individuelle Einflussfaktoren wie Bestrahlungsvolumen, Operationsart, Geschlecht und Therapiesequenz die Akuttoxizität unter der Radiochemotherapie be-

einflussen (Rödel et al. 1997). Es ist somit von Bedeutung, diese Einflussgrößen frühzeitig zu erkennen, um die durch die multimodale Therapie induzierte individuelle Toxizität am Patienten auch steuern zu können.

Der 5-FU-Immunoassay bildet aktuell nicht unmittelbar die Organtoxizität unter der Radiochemotherapie ab. Trotzdem bietet er die Möglichkeit die 5-FU-Dosis in den therapeutischen Bereich mittels TDM anzupassen und damit die neoadjuvante Therapie zu optimieren.

### **4.2.3 Organtoxizität unter der adjuvanten Therapie**

In den Analysen aus der adjuvanten Therapiephase wurden Organtoxizitäten Grad 1 und 2 in Form von Hand-Fuß-Syndrom, Alopezie und Neurotoxizität beobachtet. Die Hälfte der Patienten unter der FOLFOX-Therapie entwickelte eine Grad 1-Polyneuropathie, die klassischerweise durch das Platinderivat Oxaliplatin verursacht wird (Monga und O'Connell 2006). Interessanterweise konnten Gamelin et al. in einer TDM-Studie von 5-FU unter dem FOLFOX-Regime mit Hilfe von Kalzium- und Magnesiuminfusionen das Auftreten von Neurotoxizität signifikant reduzieren (Gamelin et al. 2008a). In Zukunft könnte durch den gezielten oder prophylaktischen Zusatz von Magnesium und Kalzium-Infusionen das Auftreten einer Polyneuropathie verringert werden.

Andere Organnebenwirkungen wie Diarrhoen, Mukositis und Stomatitis wurden in Form von leichter gastrointestinaler Toxizität als Organtoxizität Grad 1 und 2 dokumentiert (siehe Tabelle 7). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten der verschiedenen Toxizitäten und den beiden unterschiedlichen Therapieregimen gezeigt werden. Ein Grund dafür liegt möglicherweise in den niedrigen AUC-Spiegeln unterhalb des angestrebten therapeutischen Bereiches von 20-30 AUC Units unter der adjuvanten Therapie. Dass ein Auftreten von Diarrhoen, Stomatitis und Hand-Fuß-Syndrom mit einem hohen 5-FU-AUC-Wert assoziiert ist, veranschaulichten Saif et al. in einer klinischen Dosisanpassungsstudie beim metastasierten KRK (Saif et al. 2009).

Schlussfolgernd erklären die 5-FU-Spiegel unter der KOF-adaptierten Dosierung unter der adjuvanten FOLFOX-Therapie das geringe Vorkommen von Organtoxizität (siehe Kap. 4.1.4). Im Gegensatz dazu standen die inkohärenten AUC-Werte, unter der 5-FU-mono-Bolustherapie, teilweise in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten von Nebenwirkungen. Im Einzelnen könnten die sehr hohen 5-FU-Spiegel der Grund für aufgetretene Toxizität sein. Zwei unterschiedliche Studien zeigten, dass unter einer monatlichen 5-FU-Bolustherapie

Grad 3-4 Toxizitäten von Neutropenie, Diarrhoe und Mukositis signifikant häufiger auftraten (Gramont et al. 1997; The Meta-analysis group in cancer 1998). Wie in Kapitel 4.1.3 erläutert, ist die Pharmakokinetik unter den Bolusregimen für die 5-FU-Spiegelmessungen ungeeignet, sodass die Toxizität durch die Bolusinfusion nicht über die 5-FU-Spiegelbestimmung erfasst werden kann.

Abschließend ist festzustellen, dass die gemessenen AUC-Werte im suboptimalen Bereich lagen und sich nur geringfügige Toxizität zeigte. In Zukunft sollte unter optimal eingestellten AUC-Plasmaspiegeln die mit der Infusionstherapie-assoziierte Toxizität an größeren Patientenkollektiven ermittelt werden.

#### **4.2.4 Geschlechtsspezifische Toxizität**

In den vorliegenden Analysen hatten Frauen unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie signifikant höhere AUC-Werte, aber nicht mehr Toxizität als Männer (siehe Anhang). Diese Ergebnisse demonstrieren die Dringlichkeit, 5-FU-Spiegel unter der Therapie zu bestimmen, um das erhöhte Risiko für Toxizität des weiblichen Geschlechtes frühzeitig zu detektieren und durch Dosisreduktion abwenden zu können. In einer geschlechtsspezifischen Analyse durch Chansky et al. (2005) zeigten Frauen eine ausgeprägtere Leukopenie, Übelkeit und Erbrechen, mehr Alopezie und schwerere Mukositis als Männer (Chansky et al. 2005).

Die Bedeutung des „Dosekapping“ ist in den geschlechtsspezifischen Analysen nicht unerheblich, da insbesondere Männer von einer KOF größer  $1,8\text{m}^2$  bzw.  $2,0\text{m}^2$  in dem untersuchten Patientenkollektiv betroffen waren (Kap. 4.1.4). Interessanterweise führten verschiedene Studien vor, dass geriatrische Patienten und besonders ältere Frauen eine reduzierte 5-FU-Plasmaclearance und damit ein höheres Risiko für Toxizität haben (Gamelin 2007b). Möglicherweise stellte die Exkretionsrate neben der geschlechtsspezifischen Dosierung einen Grund für die unterschiedlichen AUC-Spiegel dar.

Ergänzend dazu zeigten Untersuchungen von Wolff et al. (2011), dass unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie höhere Akuttoxizitätsleveln bei Frauen auftraten, die einen niedrigen BMI hatten (Wolff et al. 2011). Darüber hinaus ging das geschlechtsspezifische Vorkommen von Toxizität mit einem besseren Langzeitüberleben der Frauen in der CAO/ARO/AIO-94-Studie einher (Wolff et al. 2013).

Entscheidend aus klinisch therapeutischer Sicht ist jedoch, inwieweit Toxizität mit möglichen direkten Therapiekonsequenzen (z.B. Transfusionen, Infekten, Wundheilungsstörungen)



akzeptiert werden können, um langfristig prognostisch das OS und DFS zu erhöhen. Diese Frage sollte geklärt werden, wenn erstens, eine KOF-adaptierte 5-FU-Dosierung ohne „Dosekapping“ durchgeführt wird, um insbesondere den männlichen Patienten keine zu niedrige 5-FU-Dosis zu applizieren. Und zweitens, wenn durch TDM das individuelle Risiko für das Auftreten von Toxizität bei Frauen nach KOF-dosierter 5-FU-Gabe frühzeitig identifiziert wurde.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie, konnte unter der adjuvanten Therapiephase keine Korrelation zwischen dem AUC-Wert und dem Auftreten von geschlechterspezifischer Toxizität aufgezeigt werden. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass statistisch gesicherte Aussagen über das Untersuchungskollektiv aus der adjuvanten Therapiephase mit 13 Patienten nicht möglich sind.

#### **4.2.5 Applikation-bedingte Toxizität**

Die vorliegenden Ergebnisse stellten Unterschiede in den gemessenen 5-FU-Spiegeln abhängig von der Applikationsart fest. In den durchgeführten Untersuchungen wurde nicht mehr Toxizität unter der Bolustherapie gemessen als unter der Infusionstherapie (siehe Tabelle 7).

Gleichzeitig ist seit langem bekannt, dass es unter der Bolusinfusion häufiger zum Auftreten einer Myelosuppression kommen kann (Lokich et al. 1989; Schmiegel et al. 2013; The Meta-analysis group in cancer 1998). Insbesondere nach dem Auftreten von 5-FU-Spiegel-Spitzen führte eine hohe 5-FU-Konzentration im Knochenmark zu vermehrter Toxizität (The Meta-analysis group in cancer 1998 ; Gamelin et al. 2005). Diese Tatsachen konnten in den durchgeführten 5-FU-Spiegelmessungen unter der Bolusinfusion nicht bestätigt werden. Eine auffällige Einschränkung der Proliferationskapazität des Knochenmarks in Form einer Leukopenie, Thrombozytopenie oder Anämie wurde nicht festgestellt. Wenngleich eine spezifische Aussage zu Störungen der Hämatopoese nicht möglich war, da bei dem untersuchten Patientenkollektiv keine Knochenmarkspunktionen durchgeführt wurden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die individuelle Pharmakokinetik und die Toxizität unter der 5-FU-Bolustherapie nur schwer zu erfassen sind. Aus klinischer Sicht resultiert die Frage, inwieweit eine derart schlecht steuerbare Applikationsform in Zukunft eingesetzt werden sollte.

Es konnte gezeigt werden, dass der Immunoassay für AUC-Messungen unter einer protrahierten Infusionstherapie sehr geeignet ist. Wie in Kap. 4.1.3 diskutiert, beeinflusst die Infusionsdauer die Einstellung des  $C_{ss}$  maßgeblich und ist darüber hinaus auch für das Auftreten von Toxizität verantwortlich. Über dem therapeutisch empfohlenen Bereich liegende AUC-Spiegel, die fast ausschließlich unter der neoadjuvanten 24-h-5-FU-Infusionstherapie auftraten, gingen mit vermehrter Hämatoxizität (siehe Kap. 4.2.1) und Organtoxizität (siehe Kap.4.2.3) einher. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse aus den Dauerinfusionsregimen (5-Tagespumpe und 7-Tagespumpe) wiesen insgesamt niedrige 5-FU-Spiegel und wenig Toxizität auf, wobei auch hier die Hämatoxizität führend war (siehe Kap.3.7.1). Inwiefern, ohne die KOF-gekapselte Dosierung unter TDM mehr Toxizität auftritt sollte im nächsten Schritt untersucht werden.

Im Übrigen stellten auch Gamelin et al. fest, dass unter der protrahierten Infusionstherapie weniger Grad 3- und 4-Toxizitäten in Form einer asymptomatischen Grad 3 Neutropenie oder Alopezie im Vergleich zum 5-FU-Bolusregimen auftraten (Gramont et al. 1997). Ergänzend dazu zeigte die Meta-Analysis-Group, dass hämatologische Nebenwirkungen nach 5-FU-Infusionstherapie seltener auftraten, während das Hand-Fuß-Syndrom dominierte (The Meta-analysis group in cancer 1998). Abschließend wurde demonstriert, dass das Dauerinfusionsregime durch weniger Toxizität verträglicher war als eine 5-FU-Bolustherapie. Letzendlich kann es unter jeglicher 5-FU-Therapie zum Auftreten von Toxizität kommen, die mithilfe der 5-FU-AUC-Spiegelmessung frühzeitig detektiert werden sollte, um akute und letztlich auch chronische Nebenwirkungen einer Chemotherapie für den Patienten zu minimieren.

#### **4.2.6 Bedeutung des therapeutischen Drugmonitoring für Toxizität**

Die durchgeführten Analysen zeigten auf, dass die AUC-Spiegel innerhalb eines Therapiezyklus, abhängig von Applikationsart, Infusionsdauer und Dosierung variierten. Dementsprechend ist, abgesehen von der Erfassung der individuellen AUC-Spiegel-Schwankungen, eine Aussage zum Auftreten von Toxizität mit der 5-FU-Spiegelmessung unter laufender Chemotherapie möglich.

Wie die durchgeführten Untersuchungen zeigten, erlaubt der Immunoassay 5-FU-Level unter der laufenden Therapie zu ermitteln und ermöglicht darüber hinaus die Dosisintensität im nächsten Zyklus zu optimieren. Insgesamt lagen die meisten 5-FU-AUC-Werte der untersuchten neoadjuvanten und adjuvanten Patientenproben unterhalb des angestrebten

therapeutischen AUC-Bereiches. Vorrangiges Ziel unter den 5-FU-Spiegelmessungen sollte die Dosisanpassung mit Erreichen des Therapeutischen sein. Gleichzeitig stellt die Dosisanpassung durch TDM eine sinnvolle Strategie zur Toxizitätsvermeidung dar.

Nicht zu vernachlässigen ist, dass gerade metastasierte Patienten mit der Reduktion von Therapie-assoziiertes Toxizität von besserer Lebensqualität profitieren (Chansky et al. 2005). Inwieweit diese Ergebnisse auch für eine Dosisanpassung bei Patienten mit einem kurativen Therapieziel zutrifft, sollte zeitnah in einer klinischen Studie unter 5-FU-TDM untersucht werden.

TDM erfasst darüber hinaus unerkannte genetische „Non- und High-Responder“, bevor es zu einer unerwarteten, teilweise lebensbedrohlichen Toxizität wie zum Beispiel Koronargefäßspasmen oder schweren Knochenmarksdepressionen kommen kann (Gamelin et al. 2005). Ohne aufwändige und teurere Genanalysen können betroffene Patienten vor schwerer Toxizität bewahrt werden. Resultierend aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist der 5-FU-Immunoassay mittlerweile in der Routinediagnostik der Universitätsmedizin in Göttingen etabliert und steht der täglichen Analytik zur Verfügung.

### **4.3 Zusammenhang zwischen den neoadjuvanten 5-FU-AUC-Spiegeln und dem Tumorrespons**

Das primäre Ziel der neoadjuvanten Radiochemotherapie ist die Induktion eines Tumordownstaging (möglichst einer kompletten Tumorrgression), um sowohl das DFS wie auch das OS der Patienten zu verbessern (Sauer et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass es unter der durchgeführten neoadjuvanten Radiochemotherapie zu einem heterogenen Therapieansprechen kam, gemessen am Tumorregressionsgrad und dem histopathologisch ermittelten residuellen Lymphknotenstatus. Bei separater Betrachtung der beiden Chemotherapieregime fiel auf, dass unter dem neoadjuvanten 5-FU+Ox.-Regime der initial diagnostizierte metastatische Lymphknotenbefall stärker regredient war. Die 5-FU-Messungen unter der 5-FU+Ox.-Kombinationstherapie ergaben im Median niedrigere 5-FU-AUC-Werte als unter der 5-FU-mono-Therapie. Resultierend aus den Messergebnissen scheint die Kombination von 5-FU und Oxaliplatin oder die alleinige Wirkung des Platinderivates entscheidend für das Tumoransprechen und den Rückgang der Lymphknotenmetastasen zu sein.

Unsere Auswertungen zur Tumorregression unter Radiochemotherapie waren unter beiden Therapieregimen vergleichbar, und es wurde zu 21,8 % eine pCR (pathological complete remission) erreicht (siehe Tabelle 8). Dabei korrelierten der Grad der lokalen Tumorregression (TRG) und lymphogenen Metastasierung unseres Patientenkollektivs nicht mit der Höhe der gemessenen AUC-Werte. Patienten, bei denen eine maximale Tumorregression (TRG 4 oder TRG 3 N0) auftrat, hatten ein signifikant längeres DFS (siehe Abbildung 51). Basierend auf dieser Tatsache sollten, bei einer pCR von 21,8 % zukünftig Therapiestrategien ermittelt werden, die die komplette Tumorregression-Rate erhöhen. Eine Möglichkeit ein besseres Therapieansprechen mit pCR zu erzielen, stellt das 5-FU-TDM mit der Anpassung der AUC-Werte in den therapeutischen Bereich dar. Die pCR könnte hierbei ein Endpunkt für eine klinische Studie zur 5-FU-Dosisanpassung sein. In einer Langzeitanalyse über 132 Monate von neoadjuvant therapierten Patienten aus dem CAO-94-Patientenkollektiv, konnten Fokas et al. (2014) zeigen, dass das TRG bei gleicher Behandlung unterschiedliche prognostische Gruppen in Bezug auf DFS und OS identifiziert (Fokas et al. 2014). Patienten, die eine pCR (TRG4) erfuhrten hatten eine signifikant geringere 10-Jahres-Inzidenz für Fernmetastasierung (10,5 %) und DFS (89,5 %) gegenüber den Patienten mit einer geringen Tumorregression (TRG 0 und 1; Fernmetastasierung: 39,6 %; DFS: 63 %) (Fokas et al. 2014).

Das Gesamtüberleben der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom wird neben dem Auftreten eines lokoregionalen Tumorrezidivs vor allem von der Fernmetastasierung bestimmt (Sauer et al. 2012). In den durchgeführten Analysen mit einer geringen Patientenzahl konnte der Einfluss der 5-FU-Spiegel unter der adjuvanten Therapie auf die Fernmetastasierungsrate nicht gezeigt werden. Allerdings ist anzumerken, dass der Nachbeobachtungszeitraum für alle Patienten unter drei Jahren lag und damit die Aussagekraft dieser Auswertungen limitiert ist.

Die 5-FU-Blutplasmaspiegelanalysen von verschiedenen Arbeitsgruppen zeigten auf, dass Patienten mit metastasiertem KRK ein verlängertes DFS und einen kompletten oder Teil-Respons erzielten, wenn sie AUC-Werte im Grenzbereich mit 29 mg x h/l hatten (Gamelin und Boisdron-Celle 1998; Di Paolo et al. 2008; Gamelin et al. 2005). Der Einfluss der 5-FU-AUC-Spiegel scheint zumindest in der adjuvanten Therapiephase nicht unerheblich für das DFS zu sein. Bisher liegen mehrere Studien beim KRK in der metastasierten Situation vor, die vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf 5-FU-mono-TDM und ein signifikant verbessertes DFS und CSS aufzeigten (Di Paolo et al. 2008; Gamelin und Boisdron-Celle 1998; Jodrell et al.

2001). Darüber hinaus führte TDM unter dem FOLFOX-IV-Regime zu einer Responstrate von 70 % und das progressionsfreie Überleben im fortgeschrittenen Stadium stieg im Median auf 16 Monate an (Gamelin et al. 2008b). Folglich ist die frühzeitige Anpassung der 5-FU-AUC-Spiegel auch in einem primär kurativen Therapiekonzept notwendig, um das bestmögliche lokoregionäre Therapieansprechen unter größtmöglicher Vermeidung von sekundär auftretenden Fernmetastasen zu erreichen.

Basierend auf diesen Ergebnissen, sollte in Zukunft untersucht werden, inwieweit eine optimierte 5-FU-Therapie mittels TDM Auswirkungen auf das DFS beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom hat.

#### **4.4 Vor- und Nachteile des therapeutischen Drugmonitoring mit 5-FU in aktuellen Therapiekonzepten**

##### **4.4.1 Vorteile des Therapeutischen Drugmonitorings von 5-FU**

Mit der Entwicklung des Nanopartikelimmunoassay ist es gelungen, im Vergleich zu bisher üblichen Messmethoden wie HPLC und LC-MS/MS, ein praktikableres und kosteneffizientes Verfahren für die individuelle Dosierung von 5-FU als Behandlungsstandard zu etablieren (Bertino et al. 2007). Der Assay kann innerhalb einer Stunde bis zu 400 Tests mit minimalem technischen Aufwand auf labormedizinischen Routineanalysegeräten auswerten und ist deshalb auch in der klinischen Routinediagnostik einsetzbar. Zudem reichten für die AUC-Bestimmung 6 µl der Patientenprobe aus einer kliniküblichen EDTA-Monovette aus, die jederzeit nach Erreichen des C<sub>ss</sub> unter der Dauerinfusionstherapie entnommen werden kann. Sowohl für den Patienten, als auch für den behandelnden Arzt sind die Blutgewinnung und die Messanforderung in dem Routinelabor mit keiner neuartigen oder zeitaufwändigen Prozedur verbunden. Dies ist ein bedeutender Aspekt, um einerseits das neuartige Verfahren in den klinischen Alltag etablieren zu können und um andererseits die Fehlerquote unter der Probengewinnung gering zu halten.

Die Kreuzreaktionen der Nanopartikelantikörper mit ähnlich aufgebauten Strukturen wie Abbauprodukten oder Bestandteilen von 5-FU sind nach den Herstellerangaben gering. Bekannt waren < 0,1 % Kreuzreaktionen für Dihydro-5-FU, 11,1 % für Uracil, < 0,1 % für Thymidin, 0,026 % für Tegafur (Prodrug von 5-FU) und < 0,01 % für Capecitabin (Salamone et al. 2007; Beumer et al. 2009). Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Arzneimitteln

lagen unter 1 % (Saladax Biomedical 2010; Saladax Biomedical 2011; Beumer et al. 2009). Theophyllin stellte mit einer Kreuzreaktivität von 4,6 % eine Ausnahme dar (Saladax Biomedical 2010; Saladax Biomedical 2011; Beumer et al. 2009). Damit ist die 5-FU-Spiegelbestimmung auch bei Patienten einsetzbar, die multimorbide sind und viele Medikamente einnehmen müssen.

Von Vorteil ist, wie die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Immunoassay die Auswirkungen der individuellen Pharmakokinetik über jeden Zyklus messen kann. Gegenüber der herkömmlichen Praxis, die 5-FU-Dosis nach KOF zu berechnen und bei der klinischen Manifestation von Toxizität gegebenenfalls die Dosis anzupassen, bietet der Immunoassay die Möglichkeit Risikopatienten, mit einem nicht determinierten DPD-Defizit zu identifizieren und dies in der Therapiedosierung zu berücksichtigen. Gleichzeitig werden auch die Patienten erfasst, die unter normaler DPD-Aktivität nur reduziert 5-FU metabolisieren, wie es zum Beispiel bei Frauen häufiger beobachtet wurde (Gamelin 2007b). Zukünftig können diese Patienten durch TDM individuell angepasst an die metabolischen Kapazitäten für 5-FU therapiert werden.

Bisherige Studien zum TDM bei Patienten mit metastasiertem KRK legten dar, dass einerseits die 5-FU-assoziierte Toxizität gesenkt und durch AUC-Anpassung in den therapeutischen Bereich das Gesamtüberleben verlängert wurde (siehe Kap. 4.2.6). Hierdurch hatte der neuartige Immunoassay auch Auswirkungen auf die Therapiekosten. Die Arbeitsgruppe von Gamelin konnte zeigen, dass durch die Vermeidung von Toxizität die Zahl der Krankenhausaufenthalte, der unterstützenden Betreuung und der Behandlungspausen bei Patienten mit einem UICC IV-Karzinom reduziert werden konnten (Gamelin 2007b). Gleichzeitig berechneten Saif et al. 2009, dass die Therapieausgaben unter einer TDM-basierten 5-FU-Therapie bis zu 70 % niedriger waren. Hauptsächlich wurden das reduzierte Vorkommen von Nebenwirkungen und die damit verbundenen geringeren Therapiekosten genannt (Capitain et al. 2012).

Es stellt sich allerdings die Frage, inwieweit diese Kostenaufstellungen auch für das 5-FU-TDM unter einer kurativen Therapie zu einer Kostenreduktion führen. Es ist anzunehmen, dass in einem palliativen Erkrankungsstadium eher ein niedriger Karnofsky-Index vorkommt und häufiger Komplikationen auftreten, die behandlungsbedürftig und damit kostenintensiver sind gegenüber einem primär kurativem Erkrankungsstadium.

#### 4.4.2 Nachteile des Therapeutischen Drugmonitorings von 5-FU

Grundsätzlich verursacht das TDM unter 5-FU-basierter Chemotherapie gegenüber der gebräuchlichen KOF-adaptierten 5-FU-Dosierung zusätzliche Personal-, Betriebs- und Instandhaltungskosten. Es erfordert die Koordination für die Blutentnahmezeitpunkte und zusätzliche Arbeit mit den Blutentnahmen und Probenanalysen. Die einzelnen Prozesse des TDMs mit der Blutentnahme, der Laboranforderung, der Versendung der Probe und der Probenaufarbeitung und Messung im Labor sind per se alltägliche Routineabläufe und sollten deshalb nur einen unbedeutenden Mehraufwand für das betroffene Personal darstellen.

Allerdings kann die Blutentnahme erst nach Erreichen des C<sub>ss</sub> erfolgen, um aussagekräftige AUC-Werte messen zu können. Alle Patienten, die die Dauerinfusionschemotherapie ambulant über eine Baxterpumpe erhalten, müssen bis zu der Blutentnahme in der Klinik verbleiben. Das TDM setzt die Bereitschaft des Patienten voraus, längere Wartezeiten von zwei Stunden auf sich zu nehmen. In der Abwägung, dass die Reduktion von Toxizität und die individuelle Dosisanpassung durch TDM erzielt werden können, sollte die Wartezeit von zwei Stunden für den Patienten vertretbar sein.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zu TDM von 5-FU schilderten die Schwierigkeit, dass die Dosisanpassung in dem therapeutischen Bereich meistens über mehrere (ein bis drei) Chemotherapiezyklen lief (Kaldate et al. 2012; Patel et al. 2013). Aktuell vergeht verzichtbare Therapiezeit für die Optimierung der 5-FU-Dosierung. Es bedarf weiterer Erfahrungswerte die Interpretation und Einstellung der AUC-Spiegel innerhalb eines Zyklus mit Hilfe von Dosisanpassungstabellen vorzunehmen (Bertino et al. 2007). Je mehr Erfahrungswerte durch klinische Studien zu der Dosisanpassung gesammelt werden, umso besser wird zukünftig die 5-FU-AUC-Einstellung realisierbar sein.

Darüber hinaus ist es von Bedeutung, die 5-FU-Dosisanpassung unter den etablierten Kombinationstherapien zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe von Gamelin führte TDM mit 5-FU in Kombinationsregimen wie zum Beispiel FOLFOX und FOLFIRI durch und erzielte mit der 5-FU-Dosisanpassung ein verbessertes Gesamtüberleben in der palliativen Situation (Gamelin et al. 2008b). Zusätzlich fanden sie heraus, dass unter einem mit Oxaliplatin intensivierten 5-FU-Regime unter TDM die Verträglichkeit deutlich höher war (Gamelin et al. 2008a). Ob die Kombinationstherapie oder die individuelle 5-FU-Anpassung für diese Ergebnisse ursächlich waren, sollte in nächster Zeit untersucht werden. Basierend auf diesen Ergebnissen durch

die Arbeitsgruppe von Gamelin könnte durch TDM unter einem 5-FU-Kombinationsregime die Therapie zusätzlich optimiert werden. Ob der therapeutische Zielbereich unter Kombinationstherapie gleich dem der Monotherapie ist, sollte weiterhin klinisch getestet werden.

Unter TDM steigt der individuelle Bedarf an der 5-FU-Dosis gegenüber der KOF-dosierten Chemotherapie (Sparreboom 2005). Diese Kosten, die über die Dosissteigerung entstehen, können jedoch vernachlässigt werden, weil 5-FU eine sehr günstige Chemotherapiesubstanz ist. Insgesamt könnte die Reduzierung von Toxizität und erhöhter Tumorrespons durch eine TDM-geführte Therapie die Langzeit- und Folgekosten senken.

Der Immunoassay wird auf gängigen Laborgeräten kompatibel eingesetzt. Es ist fraglich, inwieweit jede Klinik flächendeckenden Zugang zu dem Immunoassay haben kann, um TDM durchzuführen. Ohne die örtliche Gegebenheit den Immunoassay einzusetzen, ist ein TDM schwierig durchführbar, da die Probenasservation deutlich erschwert und fehleranfälliger wird.

Abschließend ist TDM in seiner Durchführung aufwändiger und kostenträchtiger gegenüber der gebräuchlichen KOF-5-FU-Dosierung. Dennoch scheint es nach der aktuellen klinischen Studienlage eine vielversprechende Option zur Verbesserung der 5-FU-Therapie darzustellen. Das 5-FU TDM bietet das Potential die lokale Tumorkontrolle unter der neoadjuvanten Therapie zu erhöhen und die Fernmetastasierungsrate im Krankheitsverlauf zu reduzieren. Damit könnte eine langfristige Therapiekostenreduktion dem Gesundheitssystem und der Gesellschaft zugutekommen.

#### **4.5 Schlussfolgerungen für die 5-FU-basierte Chemotherapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom**

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Möglichkeit die 5-FU-Blutplasmaspiegel unter der 5-FU-basierten Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom zu messen.

Die Methodik des Nanopartikelimmunoassay stellt ein klinisch praktikables und methodisch geeignetes Verfahren dar, um die individuelle 5-FU-Metabolisierung, unabhängig von individuellen Einflussgrößen wie Geschlecht, Alter und DPD-Defizit bestimmen zu können. Die AUC-Spiegelmessungen konnten methodisch einfach unter der Dauerinfusionstherapie, nach der Ausbildung des  $C_{ss}$ , durchgeführt werden. Im Unterschied dazu waren die 5-FU-Plasmaspiegelmessungen bei der adjuvanten 5-FU-mono-Bolustherapie aufgrund der Pharmakokinetik ungeeignet. Eine Verbesserungsmöglichkeit stellt die Umstellung von der Bolusinfusion



auf eine 48-h-5-FU-mono-Infusionpumpe dar, unter der es durch die längere Infusionszeit zur C<sub>ss</sub>-Ausbildung kommt.

Die meisten untersuchten Patientenproben hatten unter der neoadjuvanten und adjuvanten KOF-dosierten Zytostatikatherapie AUC-Spiegel unterhalb des therapeutischen Zielbereiches. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, die Chemotherapie nicht nur nach den KOF-basierten Protokollen zu dosieren, sondern über die 5-FU-AUC-Spiegelbestimmung zukünftig die individuelle Aktivität des 5-FUs und die Toxizität in jedem Zyklus zu messen und gegebenenfalls anzupassen.

Gleichzeitig trat, resultierend aus den vielen gemessenen AUC-Spiegeln unterhalb des therapeutischen Zielbereiches, nur geringfügig Toxizität unter der Therapie auf. Lediglich unter der neoadjuvanten 5-FU-mono-Therapie wurden hohe AUC-Spiegel und das Auftreten von Hämatoxizität beobachtet. Inwieweit nach AUC-Spiegelmessung und Dosisanpassung vermehrt Toxizität auftreten wird, sollte zukünftig untersucht werden.

In Analogie zu den Toxizitätsanalysen zeigte sich weder ein Zusammenhang zwischen den neoadjuvant gemessenen AUC-Spiegeln und dem TRG, noch zwischen den adjuvant erhobenen AUC-Werten und dem DFS. Bei den vornehmlich unterhalb des Ziel-AUC-Bereiches liegenden AUC-Spiegeln ist kein Zusammenhang zu erwarten. In letzter Konsequenz sollten nach Dosisanpassung in den Zielbereich erneute Untersuchungen zu der neoadjuvanten Therapierespons und dem adjuvanten Therapieansprechen durchgeführt werden.

Abschließend fordern die Ergebnisse der Arbeit, eine Dosisanpassung nach 5-FU-Blutspiegelmessungen in einer klinischen Studie vorzunehmen. Der Stellenwert des Immunoassays sollte dabei in Hinblick auf die Reduzierung von Toxizität und Erhöhung des DFS über die Reduktion der Lokalrezidiv- und Fernmetastasierungsrate an einem Patientenkollektiv mit primär kurativem Therapiekonzept untersucht werden. Die vorliegenden Daten zeigen den großen klinischen Nutzen einer 5-FU-Spiegelanpassung in Hinblick auf die Individualisierung und Optimierung der aktuellen 5-FU-basierten Therapiekonzepte beim Rektumkarzinom.

## 5 Zusammenfassung

Die 5-FU-basierte, neoadjuvante Radiochemotherapie (RCT) gefolgt von qualitätskontrollierter TME und adjuvanter Chemotherapie ist derzeit Standard bei lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen (cUICC-II und -III Stadien) der unteren und mittleren Rektumdrittel. Basierend auf den exzellenten Langzeitergebnissen (z.B. 10-Jahres Lokalrezidivrate <7 %, CSS und OS bei kompletter CRT-induzierter Regression >85 %) aus multizentrischen Phase-II und -III Studien der German Rectal Cancer Study Group steht derzeit sowohl die Optimierung von Biomarker-assoziierten multimodalen Therapieregimen als auch die Entwicklung einer an das individuelle Rezidiv-Risikoadaptierten Behandlung im Fokus der klinischen Forschung. Dabei stellt das Pyrimidinanalogon 5-FU als bewährter Radiosensitizer weiterhin die systemtherapeutische Grundlage auch innerhalb von Kombinationschemotherapien dar. Obwohl die Dosis- und Applikationsform-/dauer- abhängige Effektivität von 5-FU wie auch das Nebenwirkungsprofil gut erforscht sind, führt die individuelle heterogene Pharmakokinetik dieses Antimetaboliten 5-FU zum Teil zu sehr unterschiedlicher Verträglichkeit. Aus klinischer Erfahrung ist eine 5-FU-Chemotherapie mit Hilfe der üblichen Körperoberflächen (KOF)-adaptierten Dosisberechnung nach DuBois nur unzureichend dosierbar. Folglich wird die Etablierung eines in der klinischen Routine einfach nutzbaren Verfahrens zur individuell angepassten 5-FU-Chemotherapie gefordert.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, nach Etablierung des anerkannten Nanopartikelimmunoassay My5-FU-Assay der Firma Saladax bei 82 Patienten mit einem cUICC-II/-III Rektumkarzinom 5-FU-Blutplasmaspiegel unter neoadjuvanter und adjuvanter 5-FU-basierter und KOF-adaptierter Multimodaltherapie zu messen. Zudem wurden die Nebenwirkungen unter der applizierten Chemotherapie und die klinischen Daten der Patienten im Langzeitverlauf dokumentiert. Die gemessenen 5-FU-AUC-Spiegel wurden mit der unter der Systemtherapie auftretenden Hämatotoxizität und Organtoxizität verglichen. Außerdem wurden die RCT-induzierte Tumorregression und das Therapieansprechen (Auftreten von lokalen und fernmetastatischen Rezidiven) mit den gemessenen 5-FU-Plasmaspiegeln korreliert.

Während der neoadjuvanten und adjuvanten 5-FU-Dauerinfusionstherapie war es jederzeit möglich, den AUC-Spiegel mittels Immunoassay zu bestimmen. Demgegenüber zeigte sich unter einer adjuvanten 5-FU-Bolusinfusion kein *steady state*, sodass keine aussagekräftigen

AUC-Spiegel gemessen werden konnten. Somit ist bei 5-FU-Bolus-Applikation ein 5-AUC-Monitoring nicht möglich.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit zeigte, dass die allgemein akzeptierte 5-FU-KOF-Dosierung sowie ein in Therapiestudien häufig durchgeführtes „Dosekapping“ bei 64 % der Patienten zu 5-FU-AUC-Werten unterhalb des eigentlich angestrebten Zielbereiches führten. Diese Tatsache erklärt neben einer reduzierten Therapieeffizienz auch das relativ geringe Auftreten von Hämato- und Organtoxizität unter den jeweiligen Therapieregimen. Lediglich im Rahmen der neoadjuvanten 5-FU-mono-Therapie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen hohen AUC-Spiegeln und dem gehäuften Auftreten von Hämatoxizität aufgezeigt werden ( $p=0,0118$ ). In weiteren geschlechtsspezifischen Analysen hatten Frauen höhere AUC-Spiegel als Männer ( $p=0,0235$ ) und entwickelten häufiger eine Hämatoxizität.

Diese Ergebnisse fordern die Durchführung einer klinischen Studie mit einer Dosisanpassung, unabhängig von einer KOF-adaptierten Dosierung und „Dosekapping“, in der mit Hilfe von Dosisanpassungstabellen die Dosismodifikation evaluiert und individuell das Auftreten von Toxizität und Therapieansprechen nach AUC-Anpassung analysiert werden können.

Die Analysen zur RCT-induzierten Tumorrespons konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den gemessenen 5-FU-AUC-Spiegeln, die größtenteils unterhalb des Zielbereiches lagen, und dem Tumorregressionsgrad abbilden ( $p=0,284$ ). Allerdings korrelierte eine komplette Tumorregression (TRG4 bzw. pCR) mit einem signifikant verlängerten DFS ( $p=0,00356$ ). Somit sollte in zukünftigen Studien unbedingt eine 5-FU-Dosisanpassung in den AUC-Zielbereich stattfinden, um die Zahl der pCR (TRG 4 und TRG 3 mit ypN 0-Status) nach der neoadjuvanten Therapie prognoserelevant zu steigern.

Methodisch stellte der Nanopartikelimmunoassay ein sehr geeignetes Verfahren dar, um die individuellen 5-FU-AUC-Spiegel schnell, einfach und kostengünstig zu messen. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation erfolgte die Implementierung des Nanopartikelimmunoassay in die klinische Routinediagnostik an der Universitätsmedizin Göttingen und steht nun der täglichen Analytik zur Verfügung.

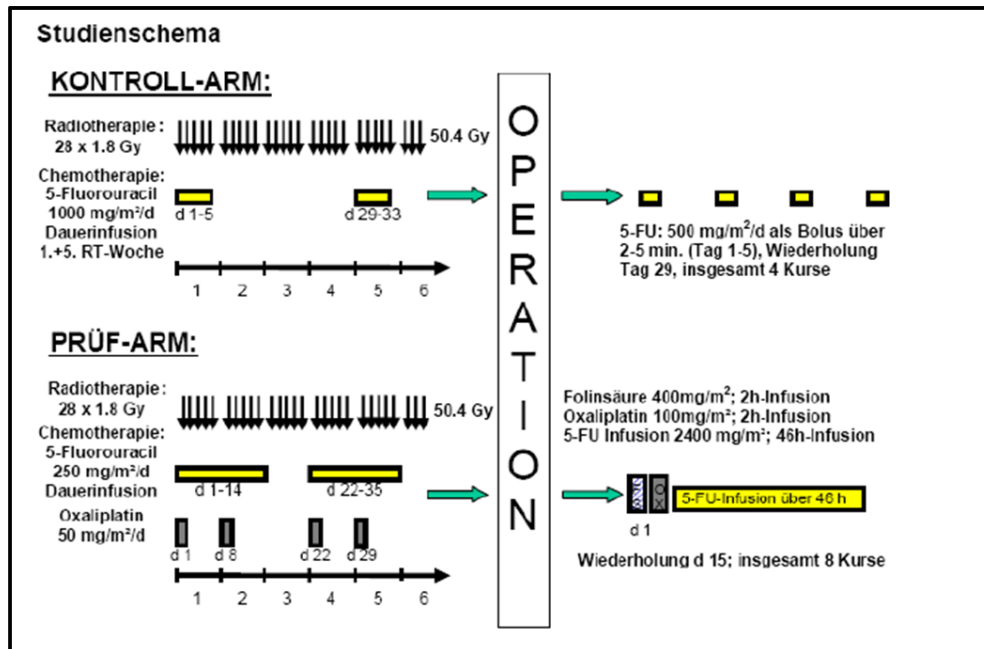
Die in dieser Arbeit erhobenen Daten leisten somit einen wichtigen Beitrag: durch den Einsatz des Immunoassays können die aktuellen Möglichkeiten der 5-FU-basierten Therapie beim Rektumkarzinom über die Einstellung der biologischen individuellen 5-FU-Wirksamkeit optimiert werden. Das therapeutische Drugmonitoring (TDM) für 5-FU könnte zukünftig über

eine individuelle Dosisoptimierung die pCR-rate und die Therapieeffizienz steigern und gleichzeitig das Auftreten von Toxizität senken. Somit stellt die 5-FU-Dosisoptimierung mittels Nanopartikelimmunoassay eine klinisch relevante Methode dar, die Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom Rezidiv-Risikos zu verbessern und zu individualisieren.

## 6 Anhang

### Behandlungsregime:

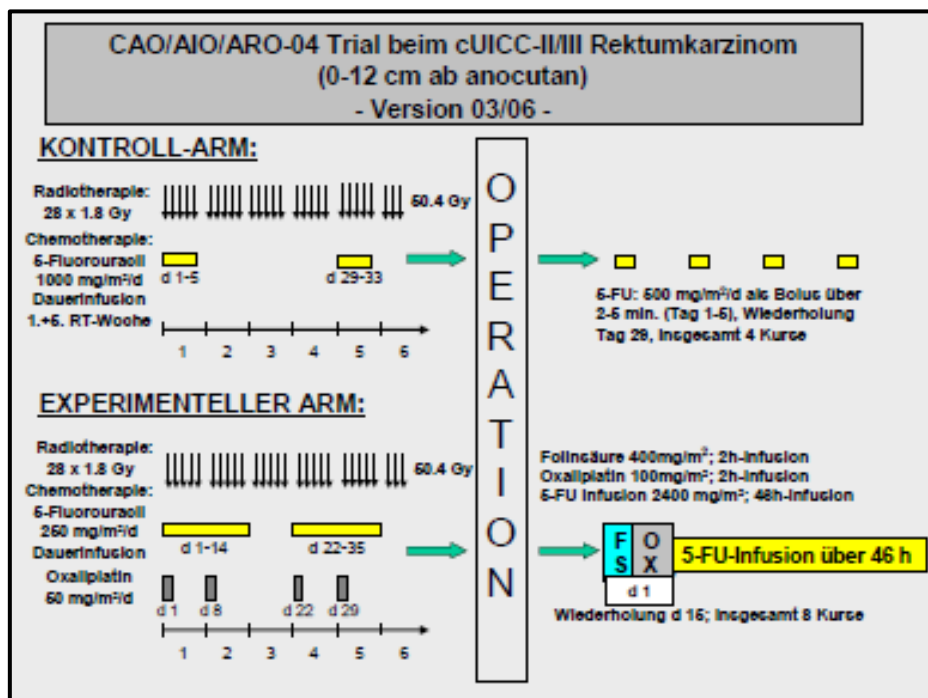
#### CAO/ARO/AIO-04:



Die CAO/ARO/AIO-04-Studie verglich die neoadjuvante und adjuvante Standardradiochemotherapie (5-FU-mono als Radiosensitizer, Kontrollarm) mit einer intensivierten Radiochemotherapie (50,4 Gy mit 5-FU +Ox sowie postoperativ 5-FU, LV und Ox, Prüfarm) mit dem primären Endpunkt das 3-Jahres DFS zu verbessern. In beiden Studienarmen erhielten die Patienten in der neoadjuvanten Therapiephase eine Bestrahlung des kleinen Beckens mit einer kumulativen Dosis von 50,4 Gray aufgeteilt in 28 Fraktionen. In der adjuvanten Phase basierte die 5-FU-mono-Therapie auf 500 mg/m<sup>2</sup> 5-FU als Bolusgabe über fünf Tage in vier Zyklen (alle vier Wochen) oder alternativ auf LV, Ox i.v. und einer anschließenden 5-FU-Dauerinfusion mit einer Dosierung von 2400 mg/m<sup>2</sup> verabreicht über 48 h per Pumpe (acht Mal alle 15 Tage).

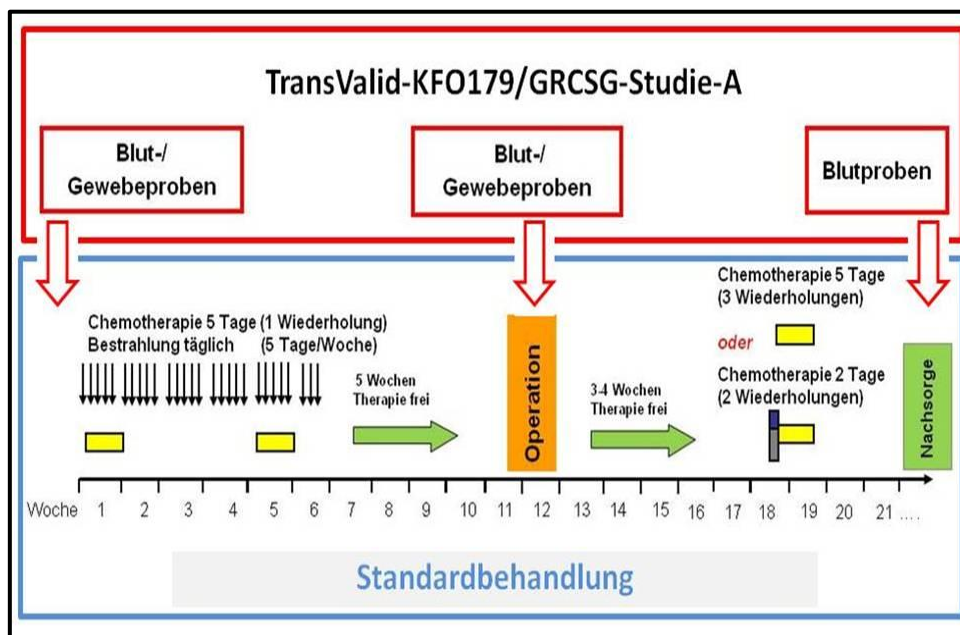
Ethikvotum: 07\_2006 (Bearbeitungs-Nr. der EK der Medizinischen Fakultät Uni Erlangen)

## GAST-05:



Die Patienten erhielten LV, Ox. und anschließend eine 5-FU-Dauerinfusion mit einer Dosierung von 2400 mg/m<sup>2</sup> verabreicht über 48 h per Pumpe. Dieser Zyklus wurde acht Mal alle 15 Tage wiederholt.

## TransValid-A:

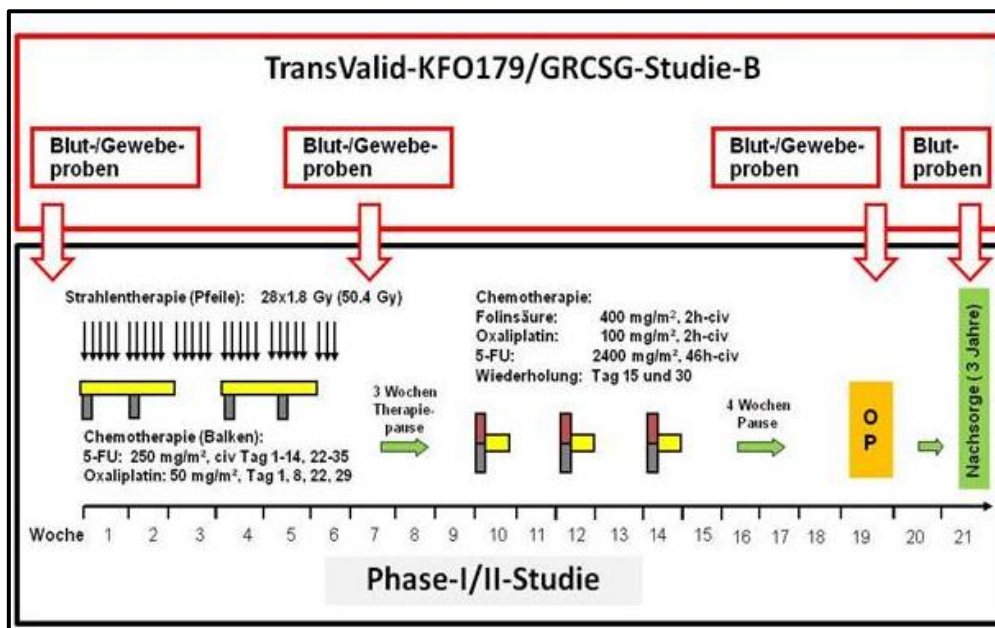


Basierend auf den Ergebnissen der CAO/ARO/AIO-04-Studie werden in den TransValid-Studien A und B (translationale Validierungsstudien) verschiedene Biomarker validiert.

Das Kollektiv der TransValid-A-Studie (n=200 Patienten) wird analog der CAO/ARO/AIO-04-Studie mit dem Kontrollarm 5-FU-mono behandelt.

Ethikvotum: TransValid-A: 15/7/11 (EK der Medizinischen Fakultät Uni Göttingen)

### TransValid-B:



In der TransValid-B-Studie (n=50 Patienten) erhalten die Patienten zunächst die neoadjuvante intensiviertere Radiochemotherapie mit 5-FU+Ox. (konkomitant 5-FU und Oxaliplatin) und 50,4 Gy Bestrahlung über 6 Wochen und darauffolgend präoperativ 3 weitere Zyklen 5-FU+Ox.+LV. Der Zeitraum bis zur Tumorresektion verlängerte sich für diese Studienpatienten um sechs Wochen gegenüber dem derzeitigen Therapiestandard. Die TransValid-B-Studie ist eine „feasibility study“. Nach Evaluation der Tauglichkeitsprüfung soll aus dieser die geplante nächste CAO/ARO/AIO-12-Studie der GRCSG resultieren. Ihr Konzept wird sein, die intensiviertere Radiochemotherapie mit drei Zyklen 5-FU+Ox.-Chemotherapie nach der Radiochemotherapie mit dem Konzept einer Induktionschemotherapie (drei Zyklen 5-FU+Ox., gefolgt von intensivierter Radiochemotherapie und OP) gegenüberzustellen. Die Therapie wird in diesem Studiendesign durch die onkologische Tumorresektion abgeschlossen. Sekundärer Endpunkt dieser Studie wird auch die Toxizität unter Chemotherapie sein.

Ethikvotum: TransValid-B: 23/10/11 (EK der Medizinischen Fakultät der Uni Göttingen)

**CTCAE-Score für Organtoxizität:**

Adverse Event	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	Grad 5
<b>Stomatitis<sup>1</sup></b>	keine Symptome	asymptomatisch oder milde Symptome	moderate Schmerzen, leichte Diät induziert	starke Schmerzen, medikamentöse Therapie	lebensbedrohliche Konsequenz, dringende Intervention indiziert	----- -----
<b>gastrointestinale Mukositis<sup>1</sup></b>	keine Symptome	asymptomatisch oder milde Symptome	moderate Schmerzen, medizinische Intervention	starke Schmerzen, medizinische Intervention	lebensbedrohliche Konsequenz, dringende Intervention indiziert	Tod
<b>Radiodermatitis<sup>2</sup></b>	keine Symptome	geringes Erythem: Epilation, trockene Desquamation, reduzierte Schweißsekretion	feuchte Epitheliolysen (<50 %) mit mäßigem Ödem und mäßigem Erythem, lokale Therapie	konfluierende feuchte Epitheliolysen (>50 %) mit ausgeprägtem Ödem und ausgeprägtem Erythem, intensive lokale Therapie	tiefe Ulzera, Hämorrhagien, Nekrose, chirurgische Intervention indiziert	Tod
<b>Hand-Fuss-Syndrom<sup>2</sup></b>	keine Symptome	minimale Hautveränderungen oder Dermatitis	schmerzhafte Hautveränderungen (Blasen, Bläschen, Ödeme, Hyperkeratose)	schwere schmerzhafte Hautveränderungen (Blasen, Bläschen, Ödeme, Hyperkeratose)	-----	----- -----
<b>Dysurie<sup>2</sup></b>	keine Symptome	Dysurie, geringe Schmerzen	Dysurie, mäßige Schmerzen, Orale Medikation indiziert	starke Dysurie, i.v.-Medikation und evtl. intervention indiziert	lebensbedrohliche Konsequenz, dringende Intervention indiziert	Tod
<b>Nierenbeckenentzündung<sup>1</sup></b>	keine Symptome	-----	-----	i.v.-Medikation und evtl. Intervention indiziert	lebensbedrohliche Konsequenz, dringende Intervention indiziert	Tod
<b>akutes Nierenversagen<sup>1</sup></b>	keine Symptome	Kreatinin 1,5-2,0 x über Normalwerte	Kreatinin 2,0-3,0 x über Normalwerte	Kreatinin >3,0 x über Normalwerte, oder >4,0 mg/dl, stationäre Aufnahme	lebensbedrohliche Konsequenz, dringende Intervention indiziert	Tod
<b>Diarrhoe<sup>1</sup></b>	keine Symptome	bis zu < 4 Stuhlgängen am Tag, mehr als normale Menge	> 4 - 6 Stuhlgängen am Tag, mehr als normale Menge	> 7 Stuhlgängen am Tag, Inkontinenz, stationäre Aufnahme indiziert	lebensbedrohliche Konsequenz, dringende Intervention indiziert	----- -----
<b>Proktitis<sup>2</sup></b>	keine Symptome	rektaler Diskomfort: erhöhter Stuhldrang, blutige Stühle, nicht interventionsbedürftig	mit Symptomen: blutdurchsetzter Stuhlgang, Schleimauflagerung, mit Schmerzen, die interventionsbedürftig sind	schwere Symptome: erhöhter Stuhldrang und Durchfälle, die parenterale Ernährung bedürfen, Inkontinenz	lebensbedrohliche Konsequenz: Perforation, Blutung, Nekrosen, dringende Intervention indiziert	Tod
<b>Obstipation<sup>1</sup></b>	keine Symptome	vereinzelte Symptome, gelegentlicher Gebrauch von Weichmachern oder Laxantien	persistierende Symptome, dauerhafter Gebrauch von Weichmachern oder Laxantien	Verstopfung mit der Indikation zur manueller Entleerung	lebensbedrohliche Konsequenz, dringende Intervention indiziert	Tod



Adverse Event	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	Grad 5
<b>Übelkeit<sup>1</sup></b>	keine Symptome	etwas, Nahrungsaufnahme nicht eingeschränkt	mäßig, Nahrungsaufnahme eingeschränkt	stark, keine Nahrungsaufnahme	-	-
<b>Erbrechen<sup>1</sup></b>	keine Symptome	1x/d	(2 - 5)x/d	(6 - 10)x/d	> 10x/d	-
<b>Geschmack<sup>1</sup></b>	keine Symptome	Geschmacksveränderung	Geschmacksveränderung mit Appetitsverlust, unangenehmer Geschmacksveränderung, Geschmacksverlust	-----	-----	----- -----
<b>Alopezie<sup>1</sup></b>	keine Symptome	milder Haarausfall	ausgeprägter Haarausfall	-	-	
<b>Fieber<sup>1</sup></b>	keine Symptome	>38,0-39,0 °C	39,0-40,0 °C	> 40 °C für <24h	> 40°C für > 24h	Tod
<b>Müdigkeit<sup>1</sup></b>	keine Symptome	verschwindet von selbst nach Erholung	bleibt auch nach Erholung, Einschränkung im täglichen Leben	bleibt auch nach Erholung, starke Einschränkung im täglichen Leben	-----	----- -----
<b>Parästhesien<sup>1</sup></b>	keine Symptome	milde Parästhesien	moderate Parästhesien Einschränkung im täglichen Leben	starke Parästhesien, starke Einschränkung im täglichen Leben	-----	----- -----
<b>akutes Koronar-Syndrom<sup>1</sup></b>	keine Symptome	keine Symptome	symptomatische progressive Angina: Herzenzyme normal, Kreislauf stabil	symptomatische instabile Angina und/oder Myokardinfarkt: Herzenzyme erhöht, Kreislauf stabil	<b>Grad 3 und Kreislauf instabil</b>	Tod
<b>Angina pectoris<sup>1</sup></b>	keine Symptome	geringe Schmerzen	Intermittierende Schmerzen, Einschränkung im täglichen Leben	persistierende Schmerzen, starke Einschränkung im täglichen Leben	-----	----- -----
<b>Schmerzen<sup>1</sup>/ rektale Schmerzen<sup>1</sup>/ Tumorschmerzen<sup>1</sup></b>	keine Symptome	milde Schmerzen	moderate Schmerzen, Einschränkung im täglichen Leben	starke Schmerzen, starke Einschränkung im täglichen Leben	-----	----- -----

Tabelle 10: **Organtoxizität**

Die Tabelle zeigt die häufigsten und wichtigsten *adverse events* (AE), die unter Radiochemotherapie und oder Chemotherapie des Rektumkarzinoms anhand <sup>1</sup> der CTCAE 4.03 (2010) und <sup>2</sup> der CTC für die Bewertung von Nebenwirkungen (1992).

Die CTCAE unterteilen ein AE in sechs Schweregrade. Grad 0 bedeutet einen nebenwirkungsfreien Verlauf, bei Grad 1 AE zeigen sich milde Symptome und bei Grad 2 sind die Symptome moderat ausgeprägt. Ab Grad 3 wird von einem schwerwiegenden toxischen Ereignis gesprochen, Grad 4 spiegelt lebensbedrohliche Nebenwirkungen wider und Grad 5 sind nicht mit dem Leben vereinbare Nebenwirkungen (National Cancer Institute 2010).

## CTCAE-Score für Hämatotoxizitäten:

Adverse Event	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	Grad 5
<b>Hämoglobin (Hb)</b> g/L	> 13,5 g/L	< 13,5-10,0 g/L	< 10,0-8,0 g/L	< 8,0-4,9 g/L	Lebensbedrohliche Konsequenz, dringende Intervention indiziert	Tod
<b>Leukozyten</b> 10 <sup>3</sup> /μl	> 4.0 *10 <sup>3</sup> /μl	< 4.0-3.0 *10 <sup>3</sup> /μl	< 3.0-2.0 *10 <sup>3</sup> /μl	< 2.0-1.0 *10 <sup>3</sup> /μl <sup>3</sup>	< 1.0 *10 <sup>3</sup> /μl	----- -----
<b>Thrombozyten</b> 10 <sup>3</sup> /μl	> 150.0*10 <sup>3</sup> /μl	<150.0-75.0 *10 <sup>3</sup> /μl	< 75.0-50.0 *10 <sup>3</sup> /μl	< 50.0-25.0 *10 <sup>3</sup> /μl	< 25.0 *10 <sup>3</sup> /μl	----- -----

Tabelle 11: **Hämatotoxizität**

Anämie (Hb < 13,5), Leukopenie (Leukozyten < 4, \*10<sup>3</sup>/μl) und Thrombozytopenie (Thrombozyten < 150.0 \*10<sup>3</sup>/μl) sind gefährliche Nebenwirkungen einer Chemotherapie. Die Gradeinteilung erfolgt anhand der CTCAE 4.03 (2010).

Die CTCAE unterteilen ein AE in sechs Schweregrade. Grad 0 bedeutet einen nebenwirkungsfreien Verlauf, bei Grad 1 AE zeigen sich milde Symptome und bei Grad 2 sind die Symptome moderat ausgeprägt. Ab Grad 3 wird von einem schwerwiegenden toxischen Ereignis gesprochen, Grad 4 spiegelt lebensbedrohliche Nebenwirkungen wider und Grad 5 sind nicht mit dem Leben vereinbare Nebenwirkungen (National Cancer Institute 2010).

## Geschlechtsspezifische Hämatotoxizität unter der neoadjuvanten Therapie:

Geschlecht	Frauen		Männer		p-Wert*
<b>Patientenzahl (N=)70</b>	22	46 %	48	54 %	
<b>Neoadjuvante 5-FU-mono-Therapie</b>	<b>11</b>	<b>50 %</b>	<b>24</b>	<b>50 %</b>	
<b><u>Hämatotoxizität</u></b>					0,174*
<b>Grad 0</b>	2	18 %	10	42 %	
<b>Grad &gt; 1</b>	9	82 %	14	58 %	
<b><u>Hb-Toxizität</u></b>					0,149*
<b>Grad 0</b>	4	36 %	15	63 %	
<b>Grad &gt; 1</b>	7	64 %	9	37 %	
<b><u>Leukozytentoxizität</u></b>					0,767*
<b>Grad 0</b>	4	36 %	10	42 %	
<b>Grad &gt; 1</b>	7	64 %	14	58 %	
<b><u>Thrombozytentoxizität</u></b>					0,137*
<b>Grad 0</b>	8	73 %	22	92 %	
<b>Grad &gt; 1</b>	3	27 %	2	8 %	
<b>Neoadjuvante 5-FU+Ox.-Therapie</b>	<b>11</b>	<b>50 %</b>	<b>23</b>	<b>50 %</b>	
<b><u>Hämatotoxizität</u></b>					0,554*
<b>Grad 0</b>	3	27 %	9	37 %	
<b>Grad &gt; 1</b>	8	73 %	15	63 %	
<b><u>Hb-Toxizität</u></b>					0,599*
<b>Grad 0</b>	4	36 %	11	46 %	
<b>Grad &gt; 1</b>	7	64 %	13	54 %	
<b><u>Leukozytentoxizität</u></b>					0,149*
<b>Grad 0</b>	5	45 %	17	71 %	
<b>Grad &gt; 1</b>	6	55 %	7	29 %	
<b><u>Thrombozytentoxizität</u></b>					0,655*
<b>Grad 0</b>	9	82 %	21	88 %	
<b>Grad &gt; 1</b>	2	18 %	3	22 %	

Tabelle 12: **Geschlechtsspezifische Hämatotoxizität**

Die Tabelle bildet die Hämatotoxizität aufgeteilt nach Frauen und Männern ab. Frauen zeigen in beiden Regimen in Bezug auf alle Blutzellen mehr Grad 1-Toxizität als Männer. \*p-Wert-Berechnung mit Chi-Quadrat-Test.

## 7 Literaturverzeichnis

Ackermann M, Maier S, Ing H, Bonnabry P (2007): Evaluation of the design and reliability of three elastomeric and one mechanical infusers. *J Oncol Pharm Pract* 13, 77-84

Adjei A, Reid J, Diasio RB, Sloan J, Smith D, Rubin J, Pitot H, Alberts S, Goldberg R, Hanson L et al. (2002): Comparative pharmacokinetic study of continuous venous infusion fluorouracil and oral fluorouracil with eniluracil in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 20, 1683–1691

Al-Taie O, Mörk H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheurlen M (2001): Hereditäres Non-Polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC: ) Aktuelle Übersicht zur Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie. *Medizinische Klinik* 96, 529–538

Becker H, Encke A, Röher HD: *Viszeralchirurgie*. 2. Auflage, Elsevier, Urban und Fischer, München 2006

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Stryer Biochemie*, 6. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010

Bertino J, Gamelin E, Milano G: 5-Fluorouracil Drug Management: Pharmacokinetics and pharmacogenomics workshop meeting summary: highlights from: 5-fluorouracil drug management pharmacokinetics and pharmacogenomics workshop. in *Clinical Colorectal Cancer*; Elsevier Health Sciences Division, USA-Maryland Heights 2007

Beumer J, Courtney J, Stocker D, Parise A, Ramanathan R, Salamone S, Egorin M: 5-fluorouracil measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry and stability in human blood and plasma: highlights from: 5-fluorouracil drug management pharmacokinetics and pharmacogenomics workshop. in *Clinical Colorectal Cancer*; Elsevier Health Sciences Division, USA-Maryland Heights 2007

Beumer J, Boisdron-Celle M, Clarke W, Courtney J, Egorin M, Gamelin E, Harney R, Hammett-Stabler C, Lepp S, Li Y et al. (2009): Multicenter evaluation of a novel nanoparticle immunoassay for 5-fluorouracil on the Olympus AU400 analyzer. *Therapeutic Drug Monitoring* 31, 688–694

Bruch HP, Schwandner O (2002): Die totale mesorektale Exzision beim Rektumkarzinom- das Dissektionsprinzip ohne kontrollierte Daten. *Viszeralchirurgie* 37, 6–11

Bujko GR, Bujko M (2010): Does adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy provide a benefit for patients with resected rectal cancer who have already received neoadjuvant radiochemotherapy? A systematic review of randomised trials. *Annals of Oncology* 21, 1743–1750

Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier A, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A, Gamelin E (2008a): The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *The Pharmacogenomics Journal* 18, 161–168

Capitain O, Asevoaia A, Boisdron-Celle M, Poirier A, Maillart P, Morel A, Gamelin E (2008b): Influence of pharmacogenetic polymorphisms on fluorouracil and irinotecan efficacy and tolerance in patients treated for advanced colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Symposium 2008*, Abstract-No: 429

Capitain O, Asevoaia A, Boisdron-Celle M, Poirier A, Morel A, Gamelin E (2012): Individual fluorouracil dose adjustment in FOLFOX based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional body-area-surface dosing: a phase II, proof-of-concept study. *Clinical Colorectal Cancer* 4, 263–267

Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS (2005): Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer* 103, 1165–1171

Charnley RM, Morris DL, Dennison AR, Amar SS, Hardcastle JD. (1991): Detection of colorectal liver metastases using intraoperative ultrasonography. *British Journal of Surgery* 78, 45–48

Diasio RB, Johnson M (1998): The role of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) modulation in 5-FU pharmacology. *Oncology* 12, 23–27

Di Paolo A, Lencioni M, Amatori S, Bocci G, Orlandini C, Lastelle M, Federici F, Iannopollo M, Falcone A, Ricci S et al. (2008): 5-fluoruracil pharmacokinetics predicts disease-free survival in patients administered adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 14, 2749–2755

Dörr W, Dörschel B, Sprinz H (2000): Report on the third annual meeting of the Society for Biological Radiation Research, GBS '99. *Radiat Environ Biophys* 39,147-52

Du Bois D, Du Bois EF (1989): A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Nutrition* 5, 312-313

Edge SB, Compton CC (2010): The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 17, 1471-4

Extermann M: The MAX2 concept and 5-fluorouracil-based regimens: Highlights from: 5-Fluorouracil drug management pharmacokinetics and pharmacogenomics workshop: in Clinical Colorectal Cancer; Elsevier Health Sciences Division, USA-Maryland Heights 2007

Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61,759–767

Findlay M, Raynaud F, Cunningham D, Iveson A, Collins DJ, Leach MO (1996): Measurement of plasma 5-fluorouracil by high-performance liquid chromatography with comparison of results to tissue drug levels observed using in-vivo <sup>19</sup>F magnetic resonance spectroscopy in patients on a protracted venous infusion with or without interferon- $\alpha$ . *Annals of Oncology* 7, 47–53

Fokas E, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Beissbarth T, Hess C, Becker H, Ghadimi M, Mrak K, Merkel S, Raab HR, Sauer R, Wittekind C, Rödel C (2014): Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Carcinoma Revisited: Updated Results of the CAO/ARO/AIO-94 Trial. ePub ahead doi 10.1200/JCO.2013.54.3769., *J Clin Oncol.* 15, 1554-62

Fuchs R, Guggenberger D, Trautwein C: *Gastrointestinale Tumore 2011/2012*. 20. Auflage; Nora-Verlag, Stolberg 2011

Gaedcke J, Liersch T, Hess C, Becker H, Rödel C, Ghadimi BM (2011): Rektumkarzinom: Aktueller Stand der multimodalen Therapie- wann und wie? *Zentralbibliothek Chirurgie* 136, 334–342

Gamelin E: 5-Fluorouracil dose management in special cases: Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and dose management: Highlights from: 5-Fluorouracil drug management pharmacokinetics and pharmacogenomics workshop: in Clinical Colorectal Cancer; Elsevier Health Sciences Division, USA-Maryland Heights 2007

Gamelin E: 5-Fluorouracil Dose Management: Highlights from: 5-Fluorouracil drug management pharmacokinetics and pharmacogenomics workshop: in Clinical Colorectal Cancer; Elsevier Health Sciences Division, USA-Maryland Heights 2007

Gamelin E, Boisdron-Celle M (1998): Dose monitoring of 5-fluorouracil in patients with colorectal or head and neck cancer—status of the art. *Oncology Hematology* 16, 71–79

Gamelin E, Danquochin-Dorval E, Dumesnil Y, Maillart P, Goudier M, Burtin P, Delva R, Lortholary A, Gesta P, Larra F (1996): Relationship between 5-fluorouracil (5-FU) dose intensity and therapeutic response in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer* 77, 441-451

Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ifrah N, Robert J (1999): Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol* 17, 1105–1110

Gamelin E, Boisdron-Celle M, Delva R, Regimbeau C, Cailleux PE, Alleaume C, Maillet ML, Goudier MJ, Sire M, Person-Joly MM et al. (2005): Long-Term Weekly Treatment of Colorectal Metastatic Cancer With Fluorouracil and Leucovorin: Results of a multicentric prospective trial of fluorouracil dosage optimization by pharmacokinetic monitoring in 152 patients. *J Clin Oncol* 16, 1470–1478

Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guerin-Meyer V, Berger V., Morel A (2008a): 5-FU dose monitoring and prevention of oxaliplatin-induced neurotoxicity in FOLFOX 4 regimen: Results of a phase II study. *Gastrointestinal Cancer Symposium, 2008, Abstract No: 431*

Gamelin E, Delva R, Jacob J, Merrouche Y, Raoul J, Pezert D, Dorval E, Piot G, Morel A, Boisdron-Celle M (2008b): Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic

follow-up compared with conventional dosage: Results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26, 2099–2105

Gehoff A, Basten O, Sprenger T, Conradi LC, Bismarck C, Bandorski D, Merkelbach-Bruse S, Schneider-Stock R, Stoehr R, Wirtz RM et al. (2012): Optimal lymph node harvest in rectal cancer (UICC stages II and III) after preoperative 5-FU-based radiochemotherapy. Acetone compression is a new and highly efficient method. *Am J Surg Pathol.* 36, 202-13

Geißler M und Graeven U: Das kolorektale Karzinom: Evidenzbasierte Leitlinien, 1. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Glimelius B, Pahlman L, Cervantes A (2010): Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 21, 82–86

Gramont A de, Bosset J, Milan C, Rougier P, Bouché O, Etienne P, Morvan F, Louvet C, Guillot T, Francois E et al. (1997): Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and Fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a french intergroup study. *J Clin Oncol.* 15, 808–815

Hanski (2012): [www.charite.de/idz/ag\\_hanski/hintergrund.htm](http://www.charite.de/idz/ag_hanski/hintergrund.htm) (Stand 1.3.2012)

Hendry J, Jeremić B, Zubizarreta E (2008): Normal tissue complications after radiation therapy. *Revista panamericana de salud pública* 20, 151–160

Herold G: Innere Medizin 2012; 1. Auflage; Herold, G., Köln 2011

Hillcoat BL, McCulloch PB, Figuerdo AT, Ehsan MH, Rosenfald JM (1978): Clinical response and plasma levels of 5-Fluoruracil in patients with colonic cancer treated by drug infusion. *Br J Cancer* 38, 719–724

Jodrell DI, Stewart M, Aird R, Knowles G, Bowman A, Wall L, Cummings J, McLean C (2001): 5-fluorouracil steady state pharmacokinetics and outcome in patients receiving protracted venous infusion for advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 84, 600–603

Kaldate R, Haregewoin A, Grier CE, Hamilton SA, McLeod HL (2012): modeling the 5-fluorouracil area under the curve versus dose relationship to develop a pharmacokinetic



dosing algorithm for colorectal cancer patients receiving FOLFOX6. *The Oncologist* 17, 296–302

Kendall MG (1938): A New Measure of Rank Correlation. *Biometrika* 30, 81–93

Krasna MJ, Flancbaum L, Cody RP, Shneibaum S, Ben Ari G (1988): Vascular and neural invasion in colorectal carcinoma. Incidence and prognostic significance. *Cancer* 61, 1018–1023

Liao FT, Sordet O, Zhang HL, Kohlhagen G, Antony S, Gmeiner WPY (2005): A novel polypyrimidine antitumor agent FdUMP[10] induces thymineless death with topoisomerase I-DNA complexes. *Cancer research* 65, 4844–4851

Liersch T, Langer C, Ghadimi BM, Becker H (2005): Aktuelle Behandlungsstrategien beim Rektumkarzinom. (Present treatment strategies for rectal carcinoma). *Chirurg* 76, 309–334

Liersch T, Becker H, Langer C (2007): Rektumkarzinom. *Allgemein- und Viszeralchirurgie, up2date* 1, 41–72

Locker GY, Stanley H, Jules H, Jessup JM, Kemeny N, Macdonal JS, Sommerfield, Hayes DF, Bast RC, ASCO (2006): ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol.* 24, 5313–5327

Lokich J, Ahlgren J, Gullo J, Philips J, Fryer J. (1989): A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study. *J Clin Oncol.* 7, 425–432

Lönn U, Lönn S. (1984): Interaction between 5-fluorouracil and DNA of human colon adenocarcinoma. *Cancer research* 44, 3414–3418

Mandel HG (1981): The target cell determinants of the antitumor actions of 5-FU: does FU incorporation into RNA play a role? *Cancer treatment reports* 65, 63–71

Midgley R, Kerr D (1999): Colorectal Cancer. *Lancet* 353, 391–399

Milano G, Etienne MC, Cassuto-Viquier E, Thyss A, Santini J, Frenay M, Renee N, Schneider M, Demard F (1992): Influence of sex and age on fluorouracil clearance. *J Clin Oncol* 10, 1171–1175

Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, Enker WE, Kelsen DP, Reichman B, Saltz L, Sigurdson ER, Frankel J. (1992): Enhancement of radiation-induced downstaging of rectal cancer by fluorouracil and high-dose leucovorin chemotherapy. AD-Department of Radiation Oncology, Memorial Sloan-Kettering. *J Clin Oncol* 10, 79–84

Monga K, O'Connell M (2006): Surgical adjuvant therapy for colorectal cancer current approaches and future directions. *Ann Surg Oncol*. 13, 1021–1034

Mutschler E.: Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2008

National Cancer Institute (2010): Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), 1–196, [http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_5x7.pdf](http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf)

O'Connell M, Mailliard J, Kahn M, Macdonald J, Haller D, Mayer R, Wieand H (1997): Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 15, 246–250

Palmer G, Anderin C, Martling A, Holm T (2014): Local control and survival after Extra-Levator Abdomino-Perineal Excision (ELAPE) for locally advanced or low rectal cancer. *Colorectal Dis*. ePub ahead doi: 10.1111/codi.12610

Patel J, Deal A, O'Neil B, Ibrahim J, Sherill G, Davies J, Bernard S, Bernaud S, Goldberg R, Olajide O et al. (2013): Application of pharmacokinetic (PK)-guided 5-fluorouracil (5-FU) in clinical practice. ASCO Annual Meeting, 2013, General Poster Session, Developmental Therapeutics - Clinical Pharmacology and Experimental Therapeutics, Abstract Number: 2595

Pinedo H, Peters GF (1988): Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6, 1653–1664

Poon M, O'Connell M, Moertel C, Wieand H, Cullinan S, Everson L, Krook J, Mailliard J, Laurie J, Tschetter L (1989): Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant

improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 7, 1407–1418

R Development Core Team (2014): R: Language and environment for statistical computing. URL: <http://www.r-project.org/> (Stand 08.03.2014)

Robert Koch-Institut (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008 Häufigkeiten und Trends. 8. Auflage, Robert Koch-Institut, Berlin 2012, 36–39

Rödel C, Fietkau R, Keilholz L, Grabenbauer GG, Kessler H, Martus P, Sauer R (1997): Akuttoxizität der simultanen Radiochemotherapie des Rektumkarzinoms. (The acute toxicity of the simultaneous radiochemotherapy of rectal carcinoma) *Strahlenther Onkol.* 173, 415–421

Saam J, Critchfield GC, Hamilton SA, Roa BB, Wenstrup RJ, Kaldate RR (2011): Body surface area–based dosing of 5-fluorouracil results in extensive interindividual variability in 5-fluorouracil exposure in colorectal cancer patients on FOLFOX regimens. *Clin Colorectal Cancer* 10, 203–206

Saif M, Choma A, Salamone S, Chu E (2009): Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes. *J Natl Cancer Inst.* 101, 1543–1552

Saladax Biomedical, (2010): 5-Fluorouracil (My5-FU TM)- Assay: Beipackzettel 2010

Saladax Biomedical, (2011): My 5FU Technische Daten. LIT 728-FNP-011, rev.00

Salamone S, Li Y, Courtney J, Harney R, Lundell G, Stocker D (2007): 5-fluorouracil determination in plasma by rapid nanopartikel Immunoassay. *Clin Colorectal Cancer* 10, 419–420

Salzberg M, Herrmann R (2000): Das Hand-Fuss Syndrom (palmar-plantare Erythrodysesthesie). Hand-foot syndrome (palmar-plantar erythrodysesthesia). *Schweizer Med Wochenschr* 130, 1413–1416

Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab HR, Villanueva MT, Witzigmann H et al. (2012): preoperative versus postoperative

chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 30, 1926-33

Scheffold N, Sucker C, Stockschröder M, Cyran J (2005): Cardiotoxicity of 5-fluorouracil: *DER ONKOLOGE* 11, 223-230

Schmiegel W., Pox C., Aretz S, Bischoff U, Graeven M, Hass P, Heußner W, Hohenberger W, Holstege J, Hübner F et al. (2013): (S3-guideline colorectal cancer version 1.0). *Z Gastroenterol* 51:753-854

Sloan J, Goldberg R, Sargent D, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha S, Novotny P, Poon M, O'Connell M, Loprinzi C (2002): Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 15, 1491–1498

Sparreboom (2005): BSA-based dosing and alternative approaches. *Clin Adv Hematol Oncol.* 3, 448-50

Speights V, Johnson M, Stoltenberg P, Rappaport E, Helbert B, Riggs M (1991): Colorectal cancer: Current trends in initial clinical manifestations. *South Med J* 84, 575-8

Tebbutt N, Cattell E, Midgley R, Cunningham D, Kerr D (2002): Systemic treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 38, 1000–1015

The Meta-analysis group in cancer (1998): Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 16, 301–308

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-32

Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D (2009): genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 489–499

Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P (1996): Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest.* 98, 610–615

Wittekind CM, Meyer H-J: TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage; Wiley Blackwell, Weinheim 2010, 94-99

Wolff HA, Conradi LC, Schirmer M, Beissbarth T, Sprenger T, Rave-Fränk M, Hennies S, Hess CF, Becker H, Christiansen H et al. (2011): Gender-specific acute organ toxicity during intensified preoperative radiochemotherapy for rectal cancer. *Oncologist* 16, 621–631

Wolff HA, Conradi LC, Beissbarth T, Leha A, Hohenberger W, Merkel S, Fietkau R, Raab HR, Tschmelitsch J, Hess CF, et al.; German Rectal Cancer Study Group (2013): Gender affects acute organ toxicity during radiochemotherapy for rectal cancer: long-term results of the German CAO/ARO/AIO-94 phase III trial. *Radiother Oncol.* 108, 48-54

## Danksagung

Ich bedanke mich zu allererst bei Frau **Dr. Lena-Christin Conradi**. Sie hat mich vom ersten Tag in dem Projekt begleitet und mit ihrer uneingeschränkten und stetigen Unterstützung und der intensiven persönlichen Betreuung wurde die Arbeit entscheidend vorangetrieben. Ich danke ihr für das große Vertrauen, das sie in mich und meine Arbeit gesetzt hat.

Herrn **Prof. Dr. Torsten Liersch** bin ich zu großem Dank verpflichtet. Er lieferte die Idee zu dem Thema meiner Dissertation und ermöglichte mir die Promotion. Ich danke ihm für seine motivierende Art, die stets konstruktive Kritik und vielen Anregungen beim Schreiben der Arbeit. Vielen Dank an **Prof. Dr. Michael Ghadimi** für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertationsarbeit in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie.

**Birgit Jünemann** möchte ich dafür danken, dass ich sie stets um Rat fragen konnte und insbesondere für die unablässige Unterstützung bei der Probenaufarbeitung und den Messungen.

Für die intensive Zusammenarbeit mit der „Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie“ möchte ich **PD Dr. Hendrik Wolff** und **Dr. Hendrik Dröge** für die Unterstützung bei der Aufarbeitung der klinischen Patientendaten danken. Des Weiteren danke ich **Alexandra Bitter**, die einen großen Teil der Patientenproben asserviert und koordiniert hat.

Für die Ermöglichung der Immunoassay-Messungen im Labor des „Institutes für Klinische Chemie“ gilt mein großer Dank **Herrn Prof. Dr. Binder** und **Herrn Dr. Streit**.

Schließlich möchte ich mich für die Zusammenarbeit auf der „Interdisziplinären Kurzzeitonkologie“ bei allen MitarbeiterInnen der Pflege, den dort tätigen Ärzten **Beate Michels** und **Martin Niessner** für Ihre Unterstützung bei der Probengewinnung bedanken.

Ohne die Unterstützung von **Dr. Stephan Lorenzen** und **Dr. Manuel Nietert** hätten die statistische Analysen nicht in diesem Ausmaß vorliegen können.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung der *Promotionsworkshop's*, die das Fertigstellen der Arbeit maßgeblich vorangetrieben haben, danke ich **Herrn Prof. Gisbert Vogt**.

Die Erstellung dieser Arbeit wurde durch das Stipendium A des Stipendienprogramm innerhalb der "Gö4med" des Universitätsklinikums Göttingen gefördert.