

# **Pharmakokinetik und Platin-DNA-Adduktbildung von Oxaliplatin**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

ANNE CHRISTIN PIECK

aus Siegen

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. U. Jaehde
2. Referent: Prof. Dr. M. Wiese

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Jaehde angefertigt.

Meinem Doktorvater danke ich herzlichst für die Überlassung des interessanten Themas und seine volle und fördernde Unterstützung in allen Phasen der Arbeit. Während meiner Promotion konnte ich wertvolle Einblicke in das selbständige wissenschaftliche Arbeiten gewinnen und wichtige Erfahrungen sammeln.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. M. Wiese für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. H. Bönisch danke ich für die Möglichkeit, während meiner Promotion die Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation zu absolvieren.

Den Kooperationspartnern in verschiedenen Kliniken Prof. Dr. H.J. Schmoll, Dr. W. Voigt, Prof. Dr. Y. Ko, Prof. Dr. A. Wehmeier, Prof. Dr. M.E. Scheulen, PD Dr. D. Strumberg, Dr. R.A. Hilger, Prof. Dr. S. Hegewisch-Becker und Dr. A. Bakhshandeh-Bath sowie allen beteiligten Ärzten und technischen Assistenten danke ich für Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Projekten. Insbesondere danke ich Frau Junker für ihr Engagement und die gute Zusammenarbeit. Allen Patienten, die sich trotz ihrer nicht einfachen Situation zur Teilnahme an den pharmakokinetischen Untersuchungen bereit erklärten und damit zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, gilt mein besonderer Dank.

Besonders herzlich möchte ich Herrn J. Messerschmidt und Herrn Dr. G. Weber für ihr Engagement und ihre Kooperation bei der Analytik der Platin-DNA-Addukte danken.

Frau Hanfland, Herrn Dr. Hoch und Prof. Dr. Hanfland danke ich für die Bereitstellung von Buffy Coat und Leerplasma.

Mein besonderer Dank gilt Frau Katrin Wiesmann und Frau Anne Drescher für ihre tatkräftige und zuverlässige Unterstützung und die überaus gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Eberhard Scheuch möchte ich für seine stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen analytischen Fragestellungen und bei Problemen während der praktischen Arbeit an diversen *Apparaten* danken.

Herrn Jochen Zisowsky, Frau Martina Westfeld und meiner Schwester Almut danke ich für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit. Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich mich für die gute und freundschaftliche Atmosphäre, die über die

Arbeit an der Universität hinausging, die Hilfsbereitschaft in jeder Situation und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ursula Tammler für ihre Freundschaft, das Korrekturlesen meiner Arbeit und die konstruktiven Diskussionen zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine Familie, dafür, dass ich mir meine Ziele selbst setzen konnte und auf dem Weg dahin immer unterstützt wurde.

---

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1 Therapie von Krebserkrankungen .....	3
1.2 Platinkomplexe in der Therapie maligner Erkrankungen .....	3
1.3 Oxaliplatin.....	3
1.3.1 Synthese und präklinische Entwicklung.....	3
1.3.2 Wirkungsmechanismus .....	3
1.3.3 Reparatur- und Resistenzmechanismen .....	3
1.3.4 Wirkungsspektrum und klinische Bedeutung .....	3
1.3.5 Toxizität.....	3
1.3.6 Pharmakokinetische Eigenschaften.....	3
1.4 Konzepte zur Therapieindividualisierung in der Onkologie .....	3
1.4.1 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter.....	3
1.4.2 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakodynamischer Parameter.....	3
1.5 Bioanalytik von Platinkomplexen .....	3
1.5.1 Analyse von Oxaliplatin .....	3
1.5.2 Analyse von Platin .....	3
1.5.3 Bestimmung von Platin-DNA-Addukten.....	3
1.6 Zielsetzung .....	3
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>3</b>
2.1 Material .....	3
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	3
2.1.2 Hergestellte Puffer und Lösungen .....	3
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	3
2.1.4 Geräte .....	3

---

<b>2.2 Analytik von Platin in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut mittels</b>	
<b>Atomabsorptionsspektrometrie</b> .....	<b>3</b>
2.2.1 Messbedingungen .....	3
2.2.2 Probenaufarbeitung .....	3
2.2.3 Kalibrierung .....	3
2.2.4 Validierung.....	3
2.2.5 Qualitätssicherung während der Messung.....	3
<b>2.3 Quantifizierung der Platin-DNA-Adduktbildung</b> .....	<b>3</b>
2.3.1 Isolierung der Leukozyten.....	3
2.3.2 Inkubation der Lymphozyten mit Oxaliplatin .....	3
2.3.3 Isolierung der DNA .....	3
2.3.4 Quantifizierung des DNA-Gehalts.....	3
2.3.5 Quantifizierung des Platingehalts .....	3
2.3.6 Berechnung des Platin-Nukleotid-Verhältnisses .....	3
2.3.7 Präzision der Bestimmung der Platin-Nukleotid-Verhältnisse.....	3
<b>2.4 Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik</b>	
<b>von Oxaliplatin</b> .....	<b>3</b>
2.4.1 Wöchentliche Applikation von 60 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin .....	3
2.4.2 Wöchentliche Applikation von 50 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin .....	3
2.4.3 Applikation von 130 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen .....	3
2.4.4 Applikation von 85 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin alle zwei Wochen.....	3
<b>2.5 Probengewinnung, -aufarbeitung und -lagerung</b> .....	<b>3</b>
2.5.1 Vollblut, Plasma und Ultrafiltrat.....	3
2.5.2 Leukozyten .....	3
<b>2.6 Klinische Dokumentation</b> .....	<b>3</b>
2.6.1 Demographische Daten .....	3
2.6.2 Laborparameter .....	3
2.6.3 Charakterisierung der Nierenfunktion .....	3
2.6.4 Therapieassoziierte Toxizität .....	3
2.6.5 Tumoransprechen.....	3

---

<b>2.7</b>	<b>Pharmakokinetische Datenanalyse .....</b>	<b>3</b>
2.7.1	Modellunabhängige Datenanalyse .....	3
2.7.2	Modellabhängige Datenanalyse .....	3
<b>2.8</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>3</b>
2.8.1	Deskriptive Statistik .....	3
2.8.2	Beurteilende Statistik.....	3
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Quantifizierung von Platin in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut .....</b>	<b>3</b>
3.1.1	Messbedingungen und Temperaturprogramme .....	3
3.1.2	Probenaufarbeitung .....	3
3.1.3	Validierung .....	3
3.1.4	Qualitätssicherung während der Messung .....	3
<b>3.2</b>	<b>Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte .....</b>	<b>3</b>
3.2.1	Isolierung der DNA aus Leukozyten .....	3
3.2.2	Quantifizierung der DNA.....	3
3.2.3	Quantifizierung des Plattingehalts in DNA-Adduktproben .....	3
3.2.4	Präzision der Platin-DNA-Adduktbestimmung .....	3
<b>3.3</b>	<b>Individuelle Pharmakokinetik von Oxaliplatin .....</b>	<b>3</b>
3.3.1	Wöchentliche Applikation von 60 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin .....	3
3.3.2	Applikation von 130 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen.....	3
3.3.3	Applikation von 85 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin alle zwei Wochen.....	3
3.3.4	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter für die verschiedenen Applikationsschemata.....	3
3.3.5	Individuelle Einflussfaktoren auf die Platin-Pharmakokinetik.....	3
<b>3.4</b>	<b>Platin-DNA-Adduktbildung .....</b>	<b>3</b>
3.4.1	Wöchentliche Applikation von 50 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin .....	3
3.4.2	Applikation von 130 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen.....	3
3.4.3	Applikation von 85 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin alle zwei Wochen.....	3
3.4.4	Vergleich der Platin-DNA-Adduktbildung für die verschiedenen Dosierungsschemata.....	3

---

3.4.5	Individuelle Einflussfaktoren auf die Platin-DNA-Adduktbildung .....	3
<b>3.5</b>	<b>Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern.....</b>	<b>3</b>
<b>3.6</b>	<b>Toxizität.....</b>	<b>3</b>
3.6.1	Wöchentliche Applikation von 60 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin .....	3
3.6.2	Wöchentliche Applikation von 50 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin .....	3
3.6.3	Applikation von 130 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen .....	3
<b>3.7</b>	<b>Tumoransprechen .....</b>	<b>3</b>
3.7.1	Wöchentliche Applikation von 60 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin .....	3
3.7.2	Wöchentliche Applikation von 50 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin .....	3
3.7.3	Applikation von 130 mg/m <sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen .....	3
<b>3.8</b>	<b>Zusammenhänge von pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern mit klinischen Effekten.....</b>	<b>3</b>
3.8.1	Unerwünschte Wirkungen.....	3
3.8.2	Tumoransprechen.....	3
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>3</b>
<b>4.1</b>	<b>Bioanalytische Quantifizierungsmethoden für Oxaliplatin.....</b>	<b>3</b>
4.1.1	Quantifizierung von Platin in Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten mittels GF-AAS .....	3
4.1.2	Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte .....	3
<b>4.2</b>	<b>Individuelle Pharmakokinetik nach Gabe von Oxaliplatin .....</b>	<b>3</b>
<b>4.3</b>	<b>Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik .....</b>	<b>3</b>
<b>4.4</b>	<b>Platin-DNA-Addukte nach Gabe von Oxaliplatin .....</b>	<b>3</b>
<b>4.5</b>	<b>Einflussfaktoren auf die Platin-DNA-Adduktbildung.....</b>	<b>3</b>
<b>4.6</b>	<b>Toxizität.....</b>	<b>3</b>
4.6.1	Hämato-, Hepato- und Nephrotoxizität .....	3
4.6.2	Neurotoxizität.....	3



---

<b>4.7 Tumoransprechen.....</b>	<b>3</b>
<b>4.8 Zusammenhänge von pharmakokinetischen und –dynamischen Parametern mit klinischen Effekten .....</b>	<b>3</b>
<b>4.9 Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>3</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>3</b>

## Abkürzungen

A	Absorption
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AIC	Akaike-Informationskriterium
AL	Arbeitslösung
$A_0$ h/4 h/24 h/48 h	Platin-Nukleotid-Verhältnis 0, 4, 24 oder 48 h nach Infusionsbeginn
$A_{\max}$	Maximales Platin-Nukleotid-Verhältnis
AP	Alkalische Phosphatase
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the curve)
$AUC_{\infty}$	Gesamtfläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
$AUC_{0-24\text{ h}/0-48\text{ h}}$	Mit Hilfe der Trapezregel berechnete AUC von 0-24 h bzw. 0-48 h nach Infusionsbeginn
AUA	Fläche unter der Addukt-Zeit-Kurve
AV	Adsorptive Voltammetrie
C	Arzneistoffkonzentration
CA	Karzinom
$C_{\max}$	Maximalkonzentration
$C_{\text{nom}}$	Nominalkonzentration
CE	Kapillarelektrophorese
CL	Gesamtclearance
$CL_{\text{CR}}$	Kreatininclearance
$CL_{\text{Cr,CG}}$	Kreatininclearance berechnet nach Cockcroft und Gault
$CL_{\text{Pt,PL}}$	Platinclearance aus dem Plasma
$CL_{\text{Pt,UF}}$	Platinclearance aus dem Ultrafiltrat
CR	Komplette Remission
Cys	L-Cystein
D	Dosis
DACH	Diaminocyclohexan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
ERY	Erythrozyten
EU	Europäische Union

---

FAAS	Flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie
5-FU	Fluorouracil
f <sub>UF</sub>	Ultrafiltrierbare Fraktion
G	Guanin
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GF-AAS	Graphitrohrfen-Atomabsorptionsspektrometrie
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glu	Glutaminsäure
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
GSH	Reduziertes Glutathion
Hb	Hämoglobin
HMDE	Hängende Quecksilbertropfenelektrode
Hkt	Hämatokrit
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale, inhibitorische Konzentration
ICP-AES	Induktiv-gekoppelte-Plasma-Atomemissionsspektrometrie
ICP-MS	Induktiv-gekoppelte-Plasma-Massenspektrometrie
IKG	Ideales Körpergewicht
i.v.	intravenös
k <sub>e</sub>	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (1. Ordnung)
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
LC	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)
LEU	Leukozyten
LS	Abweichungsquadrate (Least squares)
$\lambda_i$	Exponent des i-ten Exponentialterms einer Polyexponentialgleichung
$\lambda_z$	Terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
Met	L-Methionin
MMR	Mismatch-Repair
MR	Minor Response
MRT	Mean Residence Time
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NC	No Change

---

NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NSCLC	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
OXA	Oxaliplatin
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.o.	per os
PK	Pharmakokinetik
PL	Plasma
PNP	Polyneuropathie
PQC	Processed Quality Control
PR	Partielle Remission
Pt	Platin
QC	Quality Controls
r	Korrelationskoeffizient
RE	Relativer Fehler
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
(r)RNA	(Ribosomale) Ribonukleinsäure
RSD	Relative Standardabweichung
SD	Stable disease
SD	Standardabweichung
SL	Stammlösung
S <sub>N</sub>	Nukleophile Substitution
SQC	Spiked Quality Control
t	Zeit nach Verabreichung eines Arzneistoffs
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
t <sub>inf</sub>	Infusionsdauer
t <sub>max</sub>	Zeit bis zur maximalen Konzentration
TS	Thymidilatsynthase
UF	Ultrafiltrat
UV	Ultraviolett
VB	Vollblut
VF	Verdünnungsfaktor
V <sub>ss</sub>	Verteilungsvolumen im Steady-State
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
WLS	Gewichtete Summe der Abweichungsquadrate

# 1 Einleitung

## 1.1 Therapie von Krebserkrankungen

Krebserkrankungen gehören heute zu den häufigsten Todesursachen in den Industrieländern; etwa jeder vierte bis fünfte stirbt dort an einem malignen Tumor. Im Jahr 2001 sind allein in Deutschland insgesamt 213.058 Personen an malignen Tumoren verstorben; damit sind die Krebserkrankungen nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Diese Zahlen werden in Zukunft vermutlich weiter ansteigen, was zum einen auf der höheren Umweltbelastung mit Kanzerogenen beruht. Zum anderen trägt auch die höhere Lebenserwartung heutzutage dazu bei, da viele maligne Tumoren Erkrankungen des höheren Lebensalters darstellen<sup>1,2</sup>.

Kennzeichen von bösartigen Tumoren ist ein unkontrolliertes, infiltrierendes, destruierendes und metastasierendes Wachstum. Letztlich ist jede Tumorerkrankung auf eine einzelne, nicht eliminierte, genomgeschädigte Tumorzelle zurückzuführen. Die Tumoriologie ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Neben endogenen Ursachen, durch die auf genetischer Ebene das Gleichgewicht zwischen Zellreplikation einerseits und programmiertem Zelltod andererseits gestört wird, werden auch exogene Noxen als Ursachen diskutiert. Dazu gehören ionisierende Strahlen und UV-Licht, chemische Karzinogene, lokal reizende Stoffe oder auch onkogene Viren<sup>3</sup>.

Die drei Säulen der Krebsbehandlung bestehen aus Chirurgie, Strahlentherapie und antineoplastischer Chemotherapie. Strahlen- und Chemotherapie sind aufgrund ihrer geringen Selektivität und der damit verbundenen hohen Rate an unerwünschten Wirkungen für die Patienten sehr belastend. Daher wird intensiv nach spezifischeren Verfahren gesucht, die Tumorzellen selektiver als bisher ausschalten, indem sie gezielt in molekularbiologische Mechanismen eingreifen, die maßgeblich an der Karzinogenese beteiligt sind. Dazu gehört beispielsweise die Entwicklung von Antikörpern gegen tumoreigene Strukturen, der Einsatz von Zytokinen oder Eingriffe in Signaltransduktions-Prozesse. Diese Ansätze werden zum Teil bereits in der klinischen Praxis eingesetzt; ein wirklicher Durchbruch bei der Behandlung von Krebserkrankungen konnte aber bisher nur sehr vereinzelt erzielt werden<sup>4</sup>.

Daher wird die Mehrzahl aller Krebspatienten mit den herkömmlichen Chemotherapeutika behandelt, die auf alle proliferierenden Zellen wirken und daher neben den erwünschten Wirkungen an den sich gerade teilenden Tumorzellen auch unerwünschte Wirkungen an sich ständig erneuernden Geweben, wie z.B. Knochenmark, intestinaler Schleimhaut und Haarzellen, aufweisen. Man teilt die Chemotherapeutika gemäß ihrem Angriffspunkt während der Zellteilung in Antimetaboliten, Alkylantien, Topoisomerase-Hemmstoffe sowie Mitosehemmstoffe ein<sup>3</sup>.

Seit den siebziger Jahren wird aufgrund des zunehmenden Verständnisses der pharmakologischen Grundlagen und des Zellzyklusses eine gezielte Kombinationschemotherapie eingesetzt. Dieses Vorgehen erlaubt es, die heterogenen, oft teilweise resistenten Tumorzellpopulationen effektiver zu bekämpfen als mit den zuvor angewandten empirischen Monotherapien. Die Kombinationspartner, die als Monotherapeutika eine Wirksamkeit bei dem zu behandelnden Tumor aufweisen sollten, werden dabei in möglichst hoher Dosierung gegeben. Die Wirkung der einzelnen Arzneistoffe beruht auf möglichst unterschiedlichen Mechanismen, um synergistische Wirkungen zu erzielen. Auch das Toxizitätsprofil, sowie die Resistenzmechanismen, mit denen Tumorzellen auf die Arzneistoffe reagieren, sollten sich unterscheiden, damit additive Toxizität ebenso wie eine schnelle Resistenz gegenüber den Therapeutika vermieden wird<sup>5</sup>.

Je nach Tumorart und -stadium und der daraus abzuleitenden Prognose werden bei der Chemotherapie unterschiedliche Behandlungsansätze verfolgt. Die kurative Therapie hat die Heilung zum Ziel; eine wirkliche Heilung, d.h. das Abtöten aller entarteten Zellen, ist aber nur bei wenigen bösartigen Geschwülsten, wie z.B. bei kindlichen embryonalen Tumoren oder Hodentumoren, möglich. Die Mehrzahl der Tumoren ist daher nur einer palliativen Therapie zugänglich. Diese verfolgt die Linderung der Beschwerden und eine Lebensverlängerung bei adäquater Lebensqualität.

Die Dosierung der eingesetzten Zytostatika spielt bei der Therapie eine zentrale Rolle. Insbesondere bei kurativer Intention strebt man eine hohe Dosisintensität an, um eine maximale Schädigung des Tumorgewebes bei gerade noch akzeptabler Toxizität zu erzielen. Bei manchen Tumorentitäten lässt sich eine hohe Exposition des Tumors gegenüber dem Zytostatikum durch regionale arterielle Perfusion erreichen<sup>3</sup>. In den meisten Fällen wird aber eine systemische Therapie gegeben mit allen Risiken der unerwünschten Wirkungen.

Um möglichst wenig Toxizität bei maximalem Therapieerfolg zu erzielen, existieren diverse Ansätze zur Therapieverbesserung. Neben der Entwicklung neuer Zytostatika, der Optimierung der Schemata für die Kombinationschemotherapie und der Verbesserung der Supportivtherapie haben diese die Optimierung der Dosierung für den einzelnen Patienten zum Inhalt. Die Intensität der erwünschten wie auch der unerwünschten Wirkungen hängt nicht nur von der verabreichten absoluten Dosis ab, sondern auch von pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Prozessen, die eine hohe interindividuelle Variabilität aufweisen<sup>6</sup>.

Es wäre daher wünschenswert, die antineoplastischen Therapien mit Hilfe geeigneter pharmakokinetischer oder pharmakodynamischer Parameter zu individualisieren.

## 1.2 Platinkomplexe in der Therapie maligner Erkrankungen

Platinkomplexe stellen als Metallkoordinationsverbindungen eine Besonderheit in der Arzneistoffgruppe der Zytostatika dar. Sie enthalten Platin als Zentralatom in der Oxidationsstufe +2 oder +4. Dabei weisen die  $d^8$ -Pt(II)-Komplexe eine quadratisch planare, die  $d^6$ -Pt(IV)-Verbindungen eine oktaedrische Geometrie auf.

Als Liganden kommen in den therapeutisch verwendeten Komplexen zwei Am(m)inliganden und zwei (für Pt(II)-Komplexe) bzw. vier (für Pt(IV)-Komplexe) Halogene oder sauerstoffhaltige Gruppen vor.

Bereits in der Therapie etablierte Platinkomplexe sind Cisplatin [cis-Diammindichloroplatin(II)], Carboplatin [cis-Diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platin(II)] und Oxaliplatin [[(1*R*, 2*R*)-1,2-Cyclohexandiamin-*N,N'*][oxalato(2-)-O,O']platin(II)], deren Strukturformeln in Abb. 1.1 dargestellt sind.

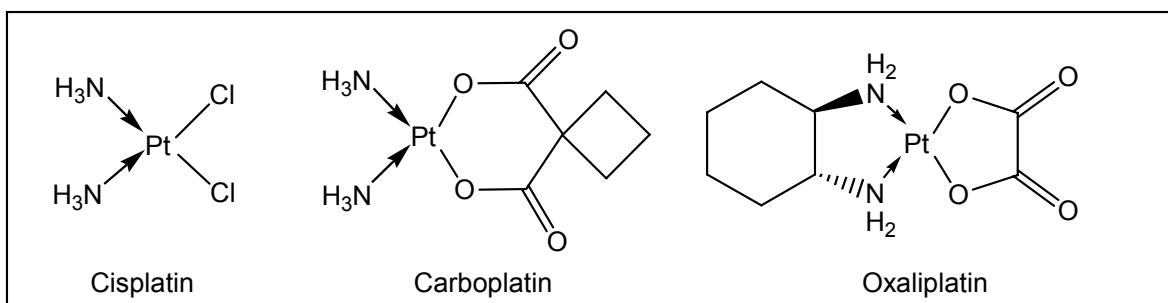


Abb. 1.1 Chemische Struktur von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin

Die zytotoxische Wirkung der Platinkomplexe wurde 1965 durch Zufall entdeckt. Während der Untersuchung des Einflusses eines elektrischen Felds auf das Wachstumsverhalten von *Escherichia coli* beobachteten *Rosenberg et al.*, dass durch Anlegen einer Spannung an zwei "inerte" Platinelektroden, die in wässrige Ammoniumchloridlösung eintauchten, ein stark filamentöses Wachstum der Bakterien aber keine Zellteilung stattfand. Dieses Phänomen konnte nicht auf das elektrische Feld zurückgeführt werden, sondern auf die Wirkung des unter Lichteinfluss gebildeten Elektrolyseprodukts cis-Diamminetrachloroplatin(IV)<sup>7</sup>. In weiteren Untersuchungen stellte sich cis-Diammin-dichloroplatin(II), das schon 1844 durch *Peyrone* dargestellt worden war<sup>8</sup>, als die eigentlich wirksame Substanz heraus.

1971 wurden die ersten klinischen Untersuchungen mit der Substanz, die heute als Cisplatin bekannt ist, durchgeführt. Sie zeigte neben einer hohen antitumoralen Wirkung bei verschiedenen Tumoren, die Cisplatin zum Bestandteil vieler Chemotherapieschemata werden ließ<sup>9</sup>, auch zum Teil schwere unerwünschte Wirkungen, die die breite Anwendung limitierten<sup>10</sup>. Dazu gehören schwere nephro- und ototoxische Effekte sowie Neurotoxizität. Primäre Resistenz einiger Tumoren, wie z.B. des Mammakarzinoms oder kolorektaler Karzinome, bedeuten ebenfalls eine Einschränkung der Anwendung von Cisplatin<sup>11</sup>.

Diese Probleme führten zur Suche nach weiteren Platinkomplexen, die eine geringe Toxizität bei verbesserter Wirksamkeit und breiterem Wirkungsspektrum aufweisen sollten. Auch Aspekte wie eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit und Stabilität, eine verbesserte Gewebespezifität und die Möglichkeit der peroralen Applikation spielten eine wichtige Rolle<sup>12</sup>. Von einigen tausend Platinanaloga, die mit diesen Zielen synthetisiert und auf ihre antitumorale Wirkung untersucht wurden, gelangten bisher nur zwei Substanzen zur Zulassung.

Carboplatin, ein Platinkomplex der zweiten Generation, besitzt dieselben Amminliganden wie Cisplatin; die Chloridliganden wurden jedoch durch eine Cyclobutandicarboxylato-Abgangsgruppe ersetzt, die als Chelatligand wesentlich stabiler gebunden ist und zu einer 17-fach höheren Wasserlöslichkeit des Komplexes führt<sup>13</sup>. Carboplatin zeigt bei deutlich höheren Dosen eine dem Cisplatin vergleichbare antitumorale Wirkung und ein ähnliches Wirkungsspektrum, dafür aber weniger unerwünschte Effekte. Die therapie-limitierende Toxizität, besonders in Kombination mit anderen myelosuppressiven Zytostatika, besteht in einer Knochenmarkschädigung<sup>9</sup>.



Aufgrund der besseren Verträglichkeit ist Carboplatin seit seiner Zulassung 1986 fester Bestandteil vieler Behandlungsregime.

Mit Carboplatin konnten zwar einige der angestrebten Ziele bei der Entwicklung neuer Substanzen erreicht werden, jedoch wurde das Wirkungsspektrum der Platinkomplexe nicht erweitert. Außerdem besteht eine Kreuzresistenz zu Cisplatin, so dass weiter an der Entwicklung von neuen Platinkomplexen gearbeitet wurde.

Der Ersatz der Amminliganden durch einen Diaminocyclohexanring (DACH) führte zu einer Reihe von Zytostatika, die eine Wirkung gegenüber cisplatinresistenten Zelllinien aufweisen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die DACH-Verbindungen von *Burchenal et al.* präklinisch an murinen Modellen untersucht und die Ergebnisse aus den Zelllinienexperimenten bestätigt<sup>14,15</sup>.

Ein wesentliches Kriterium für die antitumorale Potenz ist die absolute Konfiguration des DACH-Liganden. Man unterscheidet einen Cis-Komplex, bei dem die beiden Aminogruppen auf einer Seite der Cyclohexan-Ringebene angeordnet sind, von der Trans-Form. Die Trans-Form kann weiterhin in Enantiomere unterteilt werden, da die Symmetrieebene (gestrichelte Linie), die die Cis-Form aufweist, fehlt (s. Abb. 1.2).

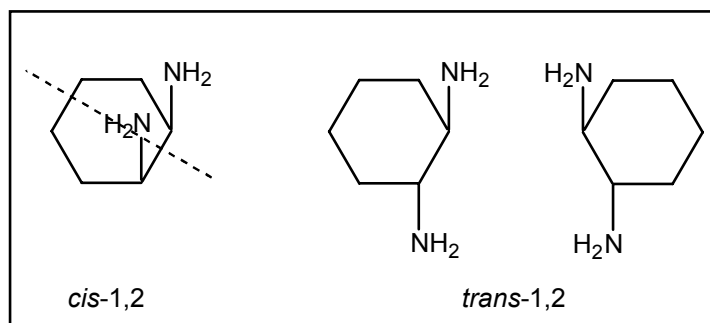


Abb. 1.2 Konfigurationen der 1,2-Diaminocyclohexanderivate

Es zeigte sich bei den untersuchten DACH-Komplexen, dass der Cis-Komplex eine geringere antitumorale Aktivität als die Trans-Form aufweist. Dabei ist das Trans-R,R-Isomer (L-Form) dem Trans-S,S-Isomer überlegen<sup>16,13</sup>.

Neben der Überwindung der Kreuzresistenz zu Cisplatin konnte auch die Wasserlöslichkeit der Komplexe gegenüber Cisplatin verbessert werden, indem die Chloridliganden durch anionische Abgangsgruppen ersetzt wurden. Dies führte unter anderem zu Oxaliplatin, das neben der Diaminocyclohexangruppierung einen Oxalatliganden als Abgangsgruppe aufweist. Neben der guten Wasserlöslichkeit (ca. 8-fach löslicher als

Cisplatin) und der vielversprechenden antitumoralen Wirkung ohne Kreuzresistenz zu Cisplatin zeigte die Substanz aufgrund der fehlenden Nephro- und Ototoxizität eine gute Verträglichkeit. Daher wurde die klinische Entwicklung vorangetrieben und führte 1996 zur Zulassung für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms in Frankreich und 1999 zur Zulassung in der EU<sup>17</sup>.

Die Entwicklung neuer Platinkomplexe wurde auch nach der Zulassung von Oxaliplatin weiter fortgesetzt. Derzeit befinden sich weitere Platinkomplexe in der klinischen Prüfung, deren Strukturen in Abb. 1.3 dargestellt sind.

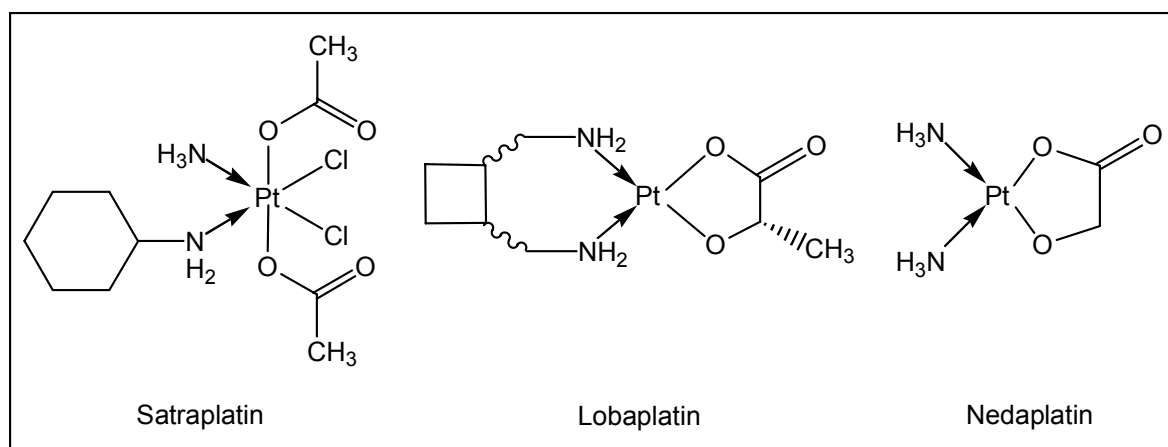


Abb. 1.3 Chemische Struktur von Satraplatin, Lobaplatin und Nedaplatin

Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung von Satraplatin [[Bis(acetato)amminchloro(cyclohexylamin)platin(IV)]; JM-216]. Es handelt sich um ein Pt(IV)-Derivat, das neben einer ausreichenden Wasserlöslichkeit (0,3 mg/mL) und Stabilität lipophile Eigenschaften aufweist, so dass eine perorale Applikation möglich ist. Es zeigt Wirksamkeit bei hormonrefraktärem Prostatakarzinom, kleinzelligem Bronchiakarzinom und Ovarialkarzinom; die therapielimitierende Toxizität besteht in Thrombozytopenie und Leukopenie. Die Substanz befindet sich im Moment in der Phase III der klinischen Prüfung<sup>18,19</sup>.

Lobaplatin [*trans*-[1,2-Diaminomethylcyclobutan]lactatoplatin(II)] weist im Vergleich zu Cisplatin eine wesentlich höhere Wasserlöslichkeit und Stabilität auf. Die Substanz wird als Diastereomerenmisch mit SSS- bzw. RRS-Konfiguration eingesetzt; sie zeigte in verschiedenen Studien Wirksamkeit gegenüber Mamma-, Ösophagus- und Ovarialkarzinomen. Als dosislimitierende Toxizität wurde Thrombozytopenie festgestellt<sup>12</sup>.

Nedaplatin [cis-Diammin(glycolato)platin(II)] zeigte in klinischen Studien Wirksamkeit gegenüber Cervix-, Ösophagus- und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen; die therapielimitierende Toxizität ist ähnlich wie bei Carboplatin die Myelosuppression. Die Substanz wird derzeit in klinischen Prüfungen der Phasen I und II weiter untersucht<sup>20,21,22</sup>.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf Oxaliplatin, das im Folgenden vorgestellt wird.

## 1.3 Oxaliplatin

### 1.3.1 Synthese und präklinische Entwicklung

Wie bereits in Kap. 1.2 beschrieben, wurden nach der Etablierung von Cisplatin und Carboplatin in der Tumorthherapie zahlreiche Platinkomplexe synthetisiert, um das Wirkungsspektrum der Platinkomplexe bei verbesserter Verträglichkeit zu erweitern.

Mit der Gruppe der DACH-Pt-Komplexe gelang die Erweiterung des Wirkungsspektrums, da die erhaltenen Derivate keine Kreuzresistenz zu Cisplatin aufwiesen. Der bislang wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Oxaliplatin, das 1978 von *Kidani et al.* nach folgendem Schema synthetisiert wurde:

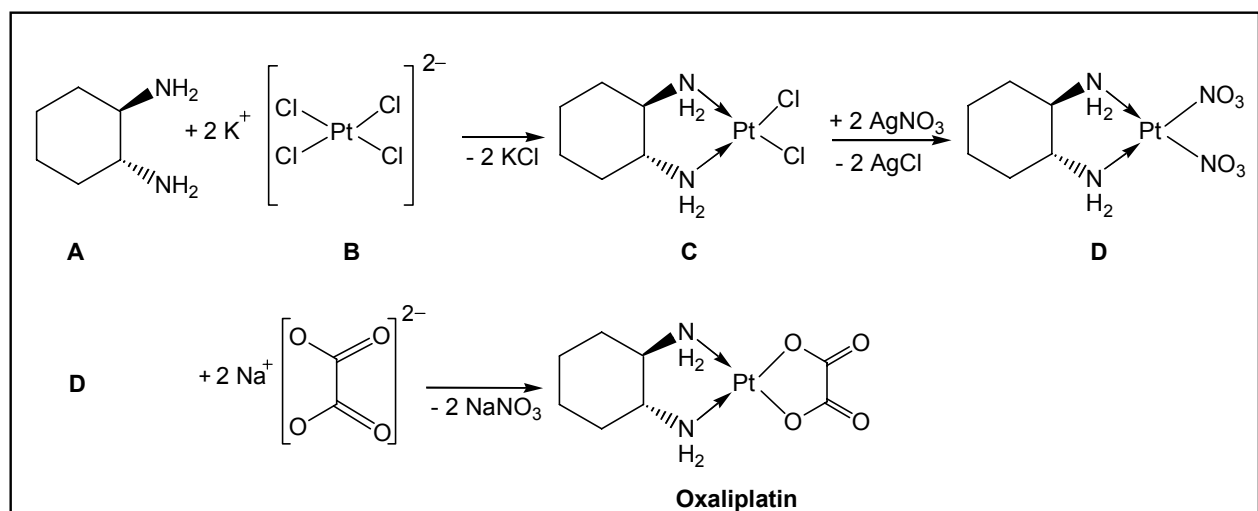


Abb. 1.4 Synthese von Oxaliplatin

Aus äquivalenten Mengen (1R, 2R)-Cyclohexandiamin (A) und Kaliumtetrachloroplatinat (B) entsteht [(1R, 2R)-1,2-Cyclohexandiamin-N,N']dichloroplatin (C), das mit Silbernitrat umgesetzt wird. Es bilden sich [(1R, 2R)-1,2-Cyclohexandiamin-N,N']dinitratoplatin (D) und Silberchlorid. D reagiert mit Natriumoxalat weiter zu Oxaliplatin<sup>23,24,25,26</sup>.

Wie bei allen DACH-Derivaten, bei denen die beiden Aminogruppen am Cyclohexanring *trans*-konfiguriert sind, existieren die beiden Enantiomere (1*R*, 2*R*-DACH)Pt und (1*S*, 2*S*-DACH)Pt, die sich in ihrer antitumoralen Wirkung unterscheiden. Oxaliplatin liegt enantiomerenrein als (1*R*, 2*R*-DACH)Pt vor<sup>27</sup>.

Die antitumorale Wirkung von Oxaliplatin wurde *in vitro* an zahlreichen murinen und humanen Zelllinien untersucht. In diesen Studien zeigte sich eine antiproliferative Wirkung an zum Teil gegen Cisplatin resistenten Leukämie-, Kolonkarzinom-, Ovarialkarzinom-, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-, Mammakarzinom-, Neuroblastom- und nicht-seminomatösen Keimzelltumorzellen<sup>28,29</sup>. Auch im Tierversuch konnten diese Ergebnisse für Leukämie, Kolonkarzinom, Fibrosarkom, Lungen- und Mammakarzinom jeweils in murinen Tumormodellen bestätigt werden<sup>28,30</sup>.

### 1.3.2 Wirkungsmechanismus

Der genaue Wirkungsmechanismus von Oxaliplatin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Man geht davon aus, dass ähnlich wie Cisplatin und Carboplatin die zytotoxische Wirkung auf der Bildung von Platin-DNA-Addukten beruht. Durch die Bildung von Intra- und Interstrang-Vernetzungen kommt es zum Abbruch der DNA-Replikation und letztendlich zu Zelltod und antitumoraler Wirkung. Die Vorgänge werden im Folgenden dargestellt.

#### **Biotransformation**

Oxaliplatin erfährt eine Reihe von spontanen, nicht-enzymatischen Reaktionen in biologischen Flüssigkeiten. Diese Biotransformation bzw. Bioaktivierung findet in ähnlicher Weise auch bei Cisplatin oder Carboplatin statt. Zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung der Biotransformationsprodukte wurden sowohl *in vitro*<sup>31,32</sup> als auch *in vivo* innerhalb klinischer Studien durchgeführt<sup>33,34,35</sup>; in allen Untersuchungen wurden dieselben Biotransformationsprodukte detektiert und zum großen Teil identifiziert.

Im Rahmen der Biotransformation kommt es zunächst zu einer Abspaltung der Oxalatgruppe und deren Ersatz durch Chloridionen nach dem Mechanismus einer S<sub>N</sub>2-Reaktion; der DACH-Ligand bleibt dabei unverändert an Platin gebunden<sup>28</sup>. Als Dichlorokomplex, dem DACH-Analogon des Cisplatins, wird die Verbindung in das Zellinnere aufgenommen. Der Mechanismus dieser Aufnahme von Platinkomplexen ist bis heute nicht vollständig geklärt; es werden sowohl passive Diffusion als auch aktiver Transport, z.B. durch den Kupfertransporter vermutet<sup>37,36</sup>. Aufgrund des beträchtlichen Konzentrations-

unterschieds von Chloridionen zwischen Plasma (ca. 140 mM) und Intrazellulär-  
raum (ca. 4 mM) erfolgt im Zellinneren ein Ligandenaustausch von Chlorid gegen  
Phosphat oder Hydrogencarbonat; die dadurch entstehenden Komplexe sind äußerst  
instabil, so dass daraus sehr schnell Mono- und Diaquakomplexe gebildet werden<sup>37</sup>.

Diese reaktiven Spezies interagieren mit nukleophilen Verbindungen, wobei als Reak-  
tionspartner neben den Nukleinsäuren schwefelhaltige Aminosäuren, Peptide und  
Proteine in Frage kommen.

Die gebildeten Komplexe mit Cystein [Pt(DACH)(Cys)<sub>2</sub>], Methionin [Pt(DACH)(Met)]  
oder Glutathion [Pt(DACH)(GSH), Pt(DACH)(GSH)<sub>2</sub>] zeigen keine biologische Aktivität.  
Die wichtigsten Biotransformationsprodukte von Oxaliplatin sind in Abb. 1.5 dargestellt.

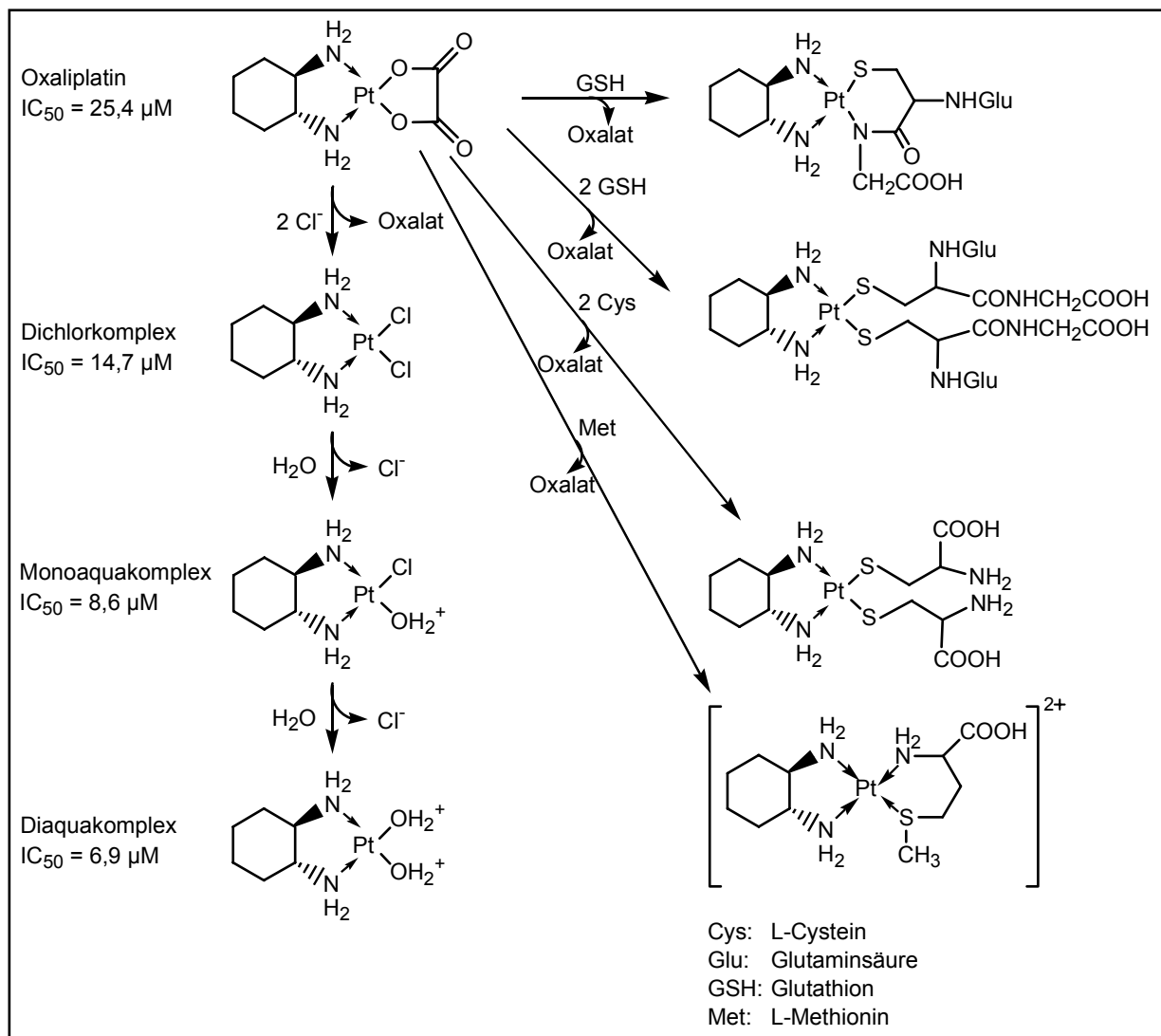


Abb. 1.5 Biotransformation von Oxaliplatin [Die angegebenen  $IC_{50}$ -Werte wurden in humanen Kolonkarzinomzellen bestimmt.]<sup>13,31,37,38</sup>

## Platin-DNA-Adduktbildung

Die durch die Bioaktivierung gebildeten aktiven Spezies reagieren mit nukleophilen Verbindungen, zu denen auch die Nukleotide der DNA gehören. Bevorzugt kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem *N7* des Guanins oder Adenins aufgrund der hohen Nucleophilie des Imidazolrings. Eine Reaktion an *N1* von Adenin oder *N3* von Cytosin ist ebenfalls möglich (Strukturformeln s. Abb. 1.6).

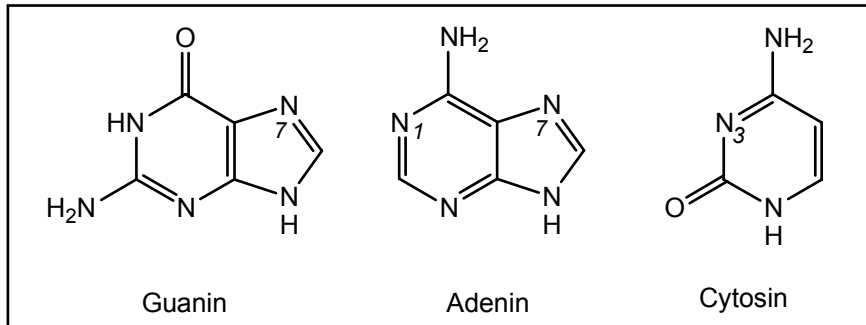


Abb. 1.6 Chemische Struktur von Guanin, Adenin und Cytosin

Aufgrund der bifunktionalen Struktur der Mono- und Diaquakomplexe sind diese in der Lage, zwei Nukleotide auf einem oder zwei DNA-Strängen miteinander zu vernetzen, wie in Abb. 1.7 dargestellt. Überwiegend werden Vernetzungen zwischen zwei benachbarten Guaninbasen innerhalb eines Stranges (Pt-GG) (*Intrastrand*) induziert. Ein geringerer Teil der DNA-Platinierung entfällt auf Addukte zwischen Guanin und Adenin (Pt-AG), noch weniger häufig werden Guaninbasen, die durch ein oder mehrere Nukleotide voneinander getrennt auf einem Strang (G-Pt-G) oder auf komplementären Strängen liegen (*Interstrand*), miteinander verknüpft.

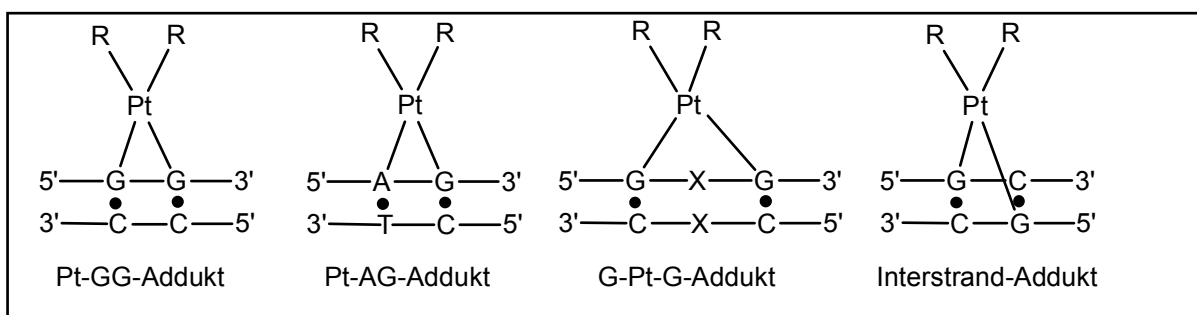


Abb. 1.7 Schematische Struktur der verschiedenen Platin-DNA-Addukte<sup>39</sup>

Zudem findet man Monoaddukte als Vorstufen zu den bifunktionalen Addukten sowie Quervernetzungen zwischen DNA und Proteinen<sup>28,39</sup>.

Eine Folge der ausgebildeten Quervernetzungen ist eine Änderung der räumlichen Struktur der DNA. Die DNA entwindet sich und knickt dabei um 39 - 78° in Richtung der großen Furche, während sich gleichzeitig die kleine Furche abflacht und verbreitert<sup>40</sup>. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen werden aufgrund der Konformationsänderungen abgeschwächt und die thermische Stabilität der DNA verringert sich. Es kommt infolge der Adduktbildung zur Induktion von DNA-Strangbrüchen und zur Verhinderung der Replikation und Transkription; dies führt schließlich zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose.

Die Bindungsstellen der Platinkomplexe an der DNA sind bei Oxaliplatin und Cisplatin identisch<sup>41</sup>. Auch die sterischen Veränderungen an der DNA nach der Adduktbildung sind ähnlich; Unterschiede bestehen lediglich in einer stärkeren Verengung der großen DNA-Furche durch den in der Sesselkonformation vorliegenden Diaminocyclohexanring. Dies wird in Abb. 1.8, die Modelle der Pt-GG-Addukte von Cisplatin (links) und Oxaliplatin (rechts) zeigt, veranschaulicht<sup>40</sup>.

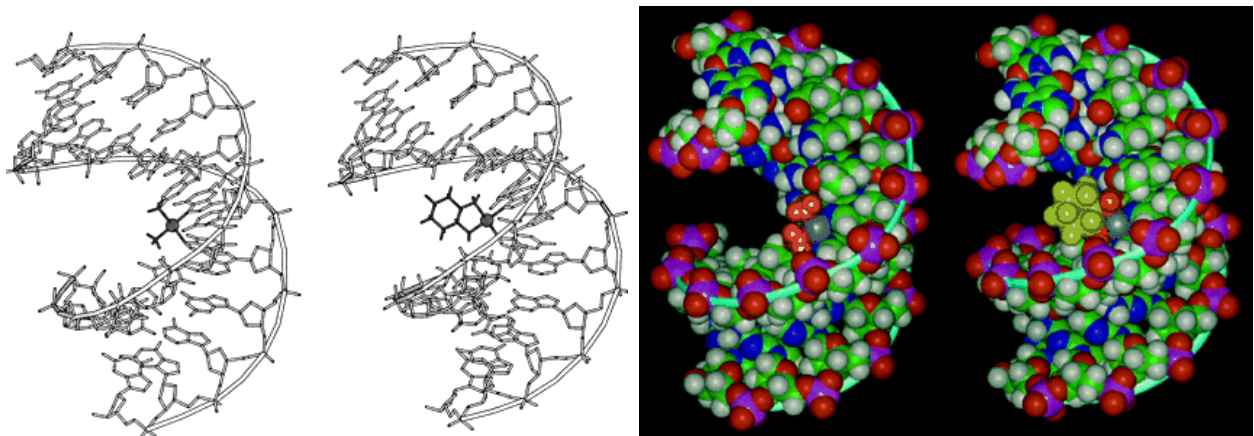


Abb. 1.8 Modelle von Cisplatin- und Oxaliplatin-GG-Addukten (Cisplatin: jeweils links, Oxaliplatin: jeweils rechts) [Grün: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, weiß: Wasserstoff, magenta: Phosphor, grau: Platin, orange: Amin- bzw. Amin-Stickstoffe mit den zugehörigen Wasserstoffen, gelbgrün: Cyclohexanring von Oxaliplatin]<sup>40</sup>

Aufgrund der zahlreichen Parallelen hinsichtlich der Biotransformation und der Adduktbildung, könnte man davon ausgehen, dass Oxaliplatin, das eine mit Cisplatin vergleichbare und zum Teil sogar höhere antitumorale Potenz aufweist, mindestens ge-

nauso viele Addukte bildet wie Cisplatin. In verschiedenen Experimenten mit nackter sowie zellulärer DNA, in denen sowohl äquimolare als auch äquitoxische Mengen beider Komplexe eingesetzt wurden, konnte jedoch gezeigt werden, dass das Ausmaß der DNA-Platinierung bei Oxaliplatin wesentlich geringer ist als bei Cisplatin. Dagegen war der Anteil an Einzelstrangbrüchen im Vergleich zu Cisplatin deutlich höher<sup>39,42</sup>.

Diese Befunde erscheinen zunächst paradox. Sie zeigen aber, dass es für die antitumorale Wirkung von Oxaliplatin nicht nur auf die Anzahl der gebildeten Addukte ankommt, sondern andere Mechanismen eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehört die Reaktion der Tumorzellen mit ihren Reparatur- und Resistenzmechanismen auf die durch den DACH-Liganden sperrigen Addukte des Oxaliplatins. Es wird vermutet, dass bei diesen Addukten die Anlagerung von Reparaturenzymen aufgrund des unpolaren DACH-Liganden durch sterische Hinderung erschwert ist. Einige Faktoren, die eine Resistenz gegenüber Cisplatin hervorrufen und auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird, verursachen keine Resistenz gegenüber Oxaliplatin<sup>40</sup>. Darin ist u.a. auch eine Ursache für das veränderte Wirkungsspektrum des Oxaliplatins zu sehen.

### 1.3.3 Reparatur- und Resistenzmechanismen

Neben dem günstigeren Toxizitätsprofil bietet Oxaliplatin als entscheidenden Vorteil gegenüber Cisplatin oder Carboplatin eine Wirksamkeit bei Tumoren, die eine intrinsische oder erworbene Resistenz gegenüber Cisplatin aufweisen. Generell werden sechs Mechanismen diskutiert, durch die eine Zelle gegenüber Platinkomplexen resistent werden kann. Dazu gehören

- die verringerte Aufnahme der Platinkomplexe in die Zelle und
- gesteigerter Efflux, die beide zu niedrigen intrazellulären Wirkstoffkonzentrationen und somit weniger zytotoxisch aktiver Substanz in der Zelle führen;
- die Inaktivierung der aktiven Verbindung (z.B. durch die Reaktion mit der Thiol-Gruppierung von Glutathion) bevor eine zytotoxische Wirkung ausgelöst wird;
- das Abfangen von DNA-Mono-Addukten durch Glutathion oder Metallothionein, was die Bildung von Quervernetzungen verhindert;
- eine gesteigerte Reparatur der DNA durch Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)
- und/ oder eine gesteigerte Toleranz gegenüber platinierter DNA. Diese kann z.B. durch einen gesteigerten „Replikativen Bypass“ und/oder durch ein defektes Mismatch-Repair-System hervorgerufen werden<sup>13</sup>.



In verschiedenen Studien wurden die potentiellen Resistenzmechanismen für Cisplatin und Oxaliplatin untersucht, um die fehlende Kreuzresistenz und das geringere Ausmaß an Platin-DNA-Addukten bei gleicher oder besserer zytotoxischer Aktivität zu erklären.

Dabei wurde zunächst festgestellt, dass eine unterschiedliche Aufnahme der Substanzen in die Zelle keine Erklärungsmöglichkeit für die Befunde darstellt, da nach Inkubation von intakten Nuclei mit Cisplatin und Oxaliplatin diesselben Unterschiede in der DNA-Platinierung erhalten wurden wie nach Inkubation von intakten Zellen<sup>39</sup>. Auch die Untersuchung des Efflux und des Ausmaßes der Inaktivierung der Substanzen oder der Monoaddukte ergaben keine evidenten Unterschiede zwischen Cisplatin und Oxaliplatin. Daher wird der Grund für die Differenzen zwischen den beiden Substanzen in den Reparaturmechanismen bzw. in einer unterschiedlichen Toleranz gegenüber den gebildeten Addukten vermutet<sup>13</sup>.

Ein wesentlicher Mechanismus für die Resistenz gegenüber Cisplatin ist die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER). Die menschliche NER besteht aus sechs Reparaturfaktoren, die Schäden der DNA erkennen und diese durch Herausschneiden von Oligonucleotidsträngen von 22 - 32 Nukleotiden Länge entfernen. Anschließend werden die Lücken durch Neusynthese der DNA gefüllt und die Enden durch Ligasen verbunden.

Zellen mit einem defekten NER-System zeigen eine Hypersensitivität gegenüber Cisplatin, während sich cisplatinresistente Zellen durch eine verstärkte Expression von NER-Proteinen auszeichnen<sup>13</sup>. Allerdings ist das Ausmaß der Reparatur von Platin-DNA-Addukten durch das NER-System bei Oxaliplatin in etwa mit dem bei Cisplatin vergleichbar<sup>43</sup>. Außerdem besitzt das NER-System eine geringe Spezifität und ein breites Aktivitätsspektrum, so dass Addukte von Cisplatin und Oxaliplatin nicht unterschieden, sondern gleichermaßen repariert werden<sup>39,44</sup>.

Erklärungsansätze für die Differenzen zwischen den beiden Substanzen ergaben sich aus Untersuchungen zum replikativen Bypass und dem Mismatch-Repair (MMR).

Der replikative Bypass stellt keinen echten Reparaturmechanismus dar, sondern ermöglicht es den Zellen auch in Anwesenheit von DNA-Schäden, z.B. hervorgerufen durch Platin-DNA-Addukte, eine DNA-Replikation ohne "Lücken" im neuen DNA-Strang durchzuführen oder eventuell aufgetretene Lücken zu schließen. Damit haben die Zellen, die dann in der Lage sind, die Platin-DNA-Addukte zu tolerieren, einen Überlebensvorteil, da "Lücken" im DNA-Strang oftmals letal wirken. Die Enzyme, die an der Erken-

nung der Läsion und Replikation über sie hinweg beteiligt sind, weisen eine Selektivität hinsichtlich der Adduktspezies auf. Cisplatinresistente Zelllinien zeigten in Studien einen verstärkten replikativen Bypass über Cisplatin-Addukte hinweg, während über Addukte durch Oxaliplatin nicht oder nur in geringem Ausmaß repliziert wurde<sup>44</sup>. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Substanzen ist die Mutagenität im Bakterien-Modell; diese war bei Cisplatin wesentlich höher als bei Oxaliplatin, was sich mit der hohen Fehlerrate des replikativen Bypass erklären lässt<sup>45</sup>.

Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass die Enzyme des replikativen Bypass zwischen Addukten mit verschiedenen Aminliganden unterscheiden können und so zur fehlenden Kreuzresistenz von Oxaliplatin beitragen.

Ein weiterer Mechanismus, der die Toleranz der Zellen gegenüber DNA-Schädigungen erhöht, ist der Mismatch-Repair-Mechanismus. Die Mismatch-Reparatur findet direkt nach der Replikation statt und korrigiert Basenfehlpaarungen. Dabei dient der elterliche Strang, der an seinem Methylierungsmuster erkannt wird, als Matrize für die Reparatur des neu synthetisierten Strangs. Verlust oder Defekt des MMR-Systems resultiert in einer hohen Rate an spontanen Mutationen und Mikrosatelliteninstabilität und steht damit in Zusammenhang mit der Karzinogenese. Defekte in den MMR-Genen MSH2 und MLH1 werden häufig bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen gefunden<sup>46</sup>; auch bei der Entstehung anderer Krebsarten wie Mamma-, Ovarial- oder Prostatakarzinom scheint der Defekt im Gen für MLH1 eine wichtige Rolle zu spielen<sup>39</sup>. Für die Zytotoxizität von Cisplatin ist das Vorhandensein dieses Mechanismus essentiell<sup>47</sup>; fehlt er oder ist er defekt, kommt es zur Resistenz gegenüber der Substanz. Diese ungewöhnliche Tatsache, dass der Defekt eines Reparaturmechanismus und nicht seine verstärkte Aktivität die Toleranz gegenüber einem Zytostatikum erhöht, kann mit dem Teufelskreismodell nach *Goldmacher et al.* erklärt werden<sup>44</sup>.

Befindet sich ein Platin-DNA-Addukt auf dem elterlichen Strang, so kommt es bei der DNA-Synthese durch den replikativen Bypass zu einer Basenfehlpaarung. Anschließend wird durch den MMR der neu synthetisierte DNA-Strang herausgeschnitten, während der Schaden auf dem elterlichen DNA-Strang erhalten bleibt. Das DNA-Addukt wird erneut „überrepliziert“, die Lücke wird wieder geschlossen, und der Kreislauf beginnt von vorn. Die Reparaturversuche sind somit nutzlos und generieren durch den fortlaufenden Teufelskreis DNA-Lücken und Strangbrüche, die schließlich zum Zelltod führen. Der Verlust oder Defekte des MMR-Systems, die bei cisplatinresistenten Zell-

linien beschrieben wurden, führen zu einer besseren Toleranz gegenüber DNA-Addukten, da der replikative Bypass nicht mehr behindert wird.

Die Zelle entgeht so dem Zelltod, „erkauft“ sich dies jedoch durch einen hohen Mutationsstatus. Daneben spielt das MMR-System vermutlich auch eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion und der Zellzyklusregulierung. Zwischen der MMR-Expression und der Aktivierung verschiedener Kinasen, die an der Induktion der Apoptose beteiligt sind, konnte ein Zusammenhang gezeigt werden<sup>48</sup>.

Im Gegensatz zu Cisplatin hängt die zytotoxische Wirkung von Oxaliplatin nicht von einem intakten MMR-System ab. In-vitro- und präklinische Untersuchungen zeigten, dass MMR-defekte Zellen gegenüber Oxaliplatin empfindlich sind. Das MMR-System erkennt selektiv die Addukte des Cisplatins; aufgrund des sperrigen, unpolaren Diaminocyclohexanrings erfolgt aber keine Bindung der MMR-Enzyme an Oxaliplatin-Addukte<sup>40</sup>.

#### **1.3.4 Wirkungsspektrum und klinische Bedeutung**

Sowohl in vitro als auch in vivo zeigte Oxaliplatin Wirksamkeit gegen diverse Tumor-entitäten (s. Kap. 1.3.1). Die Hauptindikation, bei der die Substanz klinisch eingesetzt wird, ist das metastasierte kolorektale Karzinom, für dessen First-line-Behandlung Oxaliplatin in Kombination mit Fluorouracil und Calciumfolinat zugelassen ist<sup>17</sup>.

Das kolorektale Karzinom ist mit über 650.000 Neuerkrankungen und fast 400.000 Sterbefällen pro Jahr der vierthäufigste solide Tumor weltweit. Allein in Deutschland schätzt man die Zahl der Neuerkrankungen auf 55.000 jährlich; über 30.000 Menschen sterben an den Folgen eines kolorektalen Karzinoms<sup>49,50</sup>. Bei ca. 50 % aller Patienten kommt es zur Metastasierung<sup>51</sup>; ein ebenso hoher Prozentsatz der Patienten verstirbt an den Folgen der Tumorerkrankung<sup>52</sup>. Das therapeutische Vorgehen wird ebenso wie die Prognose vom Ausbreitungsstadium der Erkrankung bestimmt. Bei frühzeitiger Erkennung des Tumors und erfolgreicher chirurgischer Entfernung folgt eine adjuvante Therapie zur Verhinderung der Metastasierung. Patienten, bei denen sich bereits Metastasen gebildet haben, werden palliativ behandelt<sup>51</sup>.

Wesentlicher Bestandteil aller Chemotherapieprotokolle in der adjuvanten und der palliativen Situation war in den letzten 50 Jahren Fluorouracil, das innerhalb der Zytostatika zur Klasse der Antimetaboliten gehört.

Bei Fluorouracil handelt es sich um ein Prodrug, das zunächst in die entsprechenden Nukleotide, z.B. Fluorouridinmonophosphat, umgewandelt werden muss, um anschließend als falscher Baustein in die RNA eingebaut werden zu können. Als Desoxyfluorouridinmonophosphat hemmt Fluorouracil die Thymidilatsynthase (TS), die die Umwandlung von Uridin in Thymidin katalysiert. Während der Einbau in die RNA von weiteren Cofaktoren unabhängig ist, wird die TS dann effektiver gehemmt, wenn eine hohe intrazelluläre Konzentration von 5-Formyltetrahydrofolat oder dessen Polyglutamaten vorliegt. Dann kann sich ein ternärer Komplex aus Enzym, Inhibitor und Cofaktor bilden, der schließlich die intrazelluläre Thymidinsynthese blockiert<sup>53</sup>. Daher wird Fluorouracil in der Regel zusammen mit Calciumfolinat als Modulator eingesetzt.

Mit Fluorouracil als einzigem Bestandteil der Kolonkarzinom-Therapie wurden v.a. bei Vorliegen von Metastasen nur geringe Ansprechraten (ca. 20 %) und Überlebenszeiten (ca. 1 Jahr) erreicht. Nach Einführung der Kombination mit Calciumfolinat konnten die Remissionsraten gesteigert werden; eine Verlängerung des Überlebens ergab sich jedoch nicht<sup>51,52</sup>. Variationen der Applikationsart zeigten ebenfalls nur geringe Auswirkungen auf Ansprechen und Überleben: so konnten durch Dauerinfusion nach dem *Arda-lan*-Schema<sup>54</sup> statt der Bolusgabe (Mayo-Clinic-Protokoll<sup>55</sup>) die Remissionsraten und auch die mediane Überlebenszeit signifikant verbessert werden; jedoch war der Unterschied hinsichtlich der Lebensverlängerung von ein bis zwei Monaten durch das Infusionsprotokoll klinisch nicht relevant<sup>52,56</sup>.

In den letzten sechs Jahren wurden die bis dahin durch die Resistenz gegenüber zahlreichen Chemotherapeutika begrenzten Möglichkeiten der Behandlung des kolorektalen Karzinoms durch die Einführung neuer Substanzen deutlich erweitert. Hierzu gehören peroral applizierbare Fluorouracil-Analoga wie Uracil/Tegafur und Capecitabin, Thymidilatsynthasehemmer wie Raltitrexed und Dihydropyrimidindehydrogenasehemmer, z.B. Eniluracil. Wie auch Oxaliplatin wirkt der Topoisomerasehemmer Irinotecan unabhängig vom Thymidilatsynthesystem<sup>51</sup>.

Oxaliplatin wurde sowohl als Monotherapeutikum als auch in Kombination mit Fluorouracil bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom untersucht.

In der Monotherapie konnte die präklinisch gezeigte Wirksamkeit bestätigt werden; bei mit Fluorouracil vorbehandelten Patienten konnte eine Ansprechrate von 10 %, bei unbehandelten Patienten von 23 % erzielt werden<sup>57,58,59</sup>.

Aufgrund des ausgeprägten Synergismus zwischen Fluorouracil und Oxaliplatin, der bereits in der präklinischen Phase an fluorouracilresistenten Zelllinien beobachtet wer-

den konnte<sup>30</sup>, liegt der Anwendungsschwerpunkt von Oxaliplatin auf der Kombination mit Calciumfolinat und Fluorouracil.

Durch die Kombination der drei Substanzen konnten sowohl die Ansprechraten als auch das progressionsfreie Überleben gegenüber der Therapie mit Fluorouracil/Calciumfolinat deutlich gesteigert werden, wie in drei großen Phase-III-Studien gezeigt werden konnte<sup>60,61,62</sup>. Es wurden Ansprechraten von bis zu 50 % und ein medianes progressionsfreies Überleben von 21 Monaten beobachtet. Neben diesen Erfolgen in der First-line-Therapie führte die zusätzliche Gabe von Oxaliplatin zur Standardtherapie bei Patienten, die bereits eine Progression unter der Standardtherapie gezeigt hatten, ebenfalls zu einer Verbesserung der Remissionsraten<sup>63,64</sup>.

In einer Subgruppe von Patienten mit primär nicht resektablen Leber- und Lungenmetastasen konnte nach einer Chemotherapie mit Oxaliplatin eine Resektion durchgeführt und eine Überlebenszeit von 48 Monaten erzielt werden<sup>65</sup>.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in einer multizentrischen Phase-III-Vergleichsstudie der Einsatz von Oxaliplatin in der adjuvanten Therapie untersucht (European multicenter international study of oxaliplatin/5-FU/LV in the adjuvant treatment of colon cancer trial; MOSAIC). Die Standardtherapie aus Fluorouracil und Calciumfolinat wurde mit der oxaliplatinhaltigen Kombinationstherapie verglichen; nach dreijähriger Beobachtungszeit konnte durch die zusätzliche Gabe von Oxaliplatin die Rückfallrate um 23 % gegenüber der Standardtherapie signifikant reduziert werden<sup>66,67</sup>.

Somit hat die Kombinationstherapie mit Oxaliplatin neben der Erst- und Zweitlinientherapie auch in der adjuvanten Situation eine Überlegenheit gegenüber der alleinigen Gabe der Standardtherapie gezeigt.

In der Praxis wird Oxaliplatin innerhalb verschiedener Therapieschemata eingesetzt, die sich in der applizierten Dosis, dem Applikationsintervall und der Infusionsdauer von Oxaliplatin und seinen Kombinationspartnern unterscheiden. Neben der Kombination mit Fluorouracil und Calciumfolinat werden innerhalb klinischer Studien auch vermehrt neuere Substanzen mit Oxaliplatin kombiniert, wie z.B. Capecitabin (Xeloda<sup>®</sup>) oder Irinotecan (Campto<sup>®</sup>). Einige der am häufigsten eingesetzten Therapieprotokolle, sind in Tab. 1.1 zusammengefasst.

Neben dem kolorektalen Karzinom wird Oxaliplatin innerhalb von klinischen Studien auch bei anderen Tumorentitäten eingesetzt.

Einen Schwerpunkt bildet die Behandlung des Ovarialkarzinoms, da diese durch die vermehrte Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin und Carboplatin ebenfalls starken

Therapieeinschränkungen unterliegt. In dieser Indikation wurde neben der Oxaliplatin-Monotherapie auch die Kombination mit Cisplatin oder Carboplatin, Paclitaxel, Cyclophosphamid und Epirubicin / Ifosfamid untersucht<sup>12,68</sup>. Die Ergebnisse dieser Studien waren viel versprechend, so dass die Substanz in dieser Indikation weiter geprüft wird.

Tab. 1.1 Oxaliplatinhaltige First-Line-Therapieschemata beim metastasierten kolorektalen Karzinom<sup>63,69,70</sup>

	Substanzen	Dosierung [mg/m <sup>2</sup> ]	Applikations- art / -dauer	Therapie- tag(e)	Therapieintervall
<b>FUFOX</b>	<b>Oxaliplatin</b>	50	Infusion / 2 h		Wiederholung an Tag 36, ab dem 5. Zyklus Oxaliplatingabe alle 2 Wochen
	Folinat	500	Infusion / 2 h	1, 8, 15, 22	
	Fluorouracil	2000	Infusion / 24 h		
<b>FOLFOX 4</b>	<b>Oxaliplatin</b>	85	Infusion / 2 h	1	Alle 2 Wochen
	Folinat	200	Infusion / 2 h	1, 2	
	Fluorouracil	400	Bolusinjektion	1, 2	
	Fluorouracil	600	Infusion / 22 h	1, 2	
<b>FOLFOX 6</b>	<b>Oxaliplatin</b>	100	Infusion / 2 h	1	Alle 2 Wochen
	Folinat	400	Infusion / 2 h	1	
	Fluorouracil	400	Bolusinjektion	1	
	Fluorouracil	2400 - 3000	Infusion / 46 h	1	
<b>FOLFOX 7</b>	<b>Oxaliplatin</b>	130	Infusion / 2 h	1	Alle 2 Wochen
	Folinat	400	Infusion / 2 h	1	
	Fluorouracil	400	Bolusinjektion	1	
	Fluorouracil	2400	Infusion / 46 h	1	
<b>OXIRI</b>	<b>Oxaliplatin</b>	85	Infusion / 2 h	1, 15	Alle 4 Wochen
	Irinotecan	80	Infusion / 0,5 h	1, 8, 15	
<b>XELOX I</b>	<b>Oxaliplatin</b>	70	Infusion / 2 h	1, 8	Alle 3 Wochen, nach 3 Zyklen 2 Wochen Pause, ab dem 7. Zyklus Oxaliplatin nur an Tag 1
	Capecitabin	2000	auf 2 Gaben täglich verteilt	1 - 14	
<b>XELOX II</b>	<b>Oxaliplatin</b>	130	Infusion / 2 h	1	Alle 3 Wochen
	Capecitabin	2000	auf 2 Gaben täglich verteilt	1 - 14	

Für andere Indikationen existieren bisher nur wenige Untersuchungen. Es wurden Studien zur Wirksamkeit von Oxaliplatin bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom<sup>71</sup>, anthrazyklinresistentem Mammakarzinom<sup>72</sup>, refraktärem Non-Hodgkin-Lymphom<sup>73</sup> und refraktärem Keimzellkarzinom<sup>74</sup> durchgeführt, in denen ein Tumorsprechen gezeigt werden konnte. Für diese und andere Tumorentitäten werden daher zahlreiche weitere Studien durchgeführt. Daneben werden auch weitere Kombinationschemotherapien untersucht, da präklinische Versuche die synergistische und zum Teil supraadditive antitumorale Wirkung der Kombinationen mit Irinotecan, Raltitrexed oder Gemcitabin demonstrierten<sup>12,75</sup>.

### **Kombination mit Hyperthermie**

Neben der Untersuchung von unterschiedlichen oxaliplatinhaltigen Zytostatika-Kombinationen und deren Dosierung bzw. Applikation wird innerhalb klinischer Studien auch versucht, die Effektivität der verabreichten Arzneistoffe mittels Hyperthermie zu verstärken. Die Hyperthermie, die lokal, regional, interstitiell oder als Ganzkörperhyperthermie angewendet werden kann, hat in Deutschland im Vergleich zu anderen europäischen Ländern einen hohen Verbreitungsgrad<sup>76</sup>.

Bei der Ganzkörperhyperthermie wird der Körper des Patienten, der vor der Behandlung in Narkose oder tiefe Analgo-Sedierung versetzt wird, innerhalb von 90 - 100 Minuten auf Temperaturen von 41 - 42 °C unter intensivmedizinischer Betreuung erwärmt. Durch die Entwicklung von Geräten, die die Aufwärmung des Körpers durch strahlende Wärme in einer wasserdampfgesättigten Kammer ermöglichen, ist die Applikation der Ganzkörper-Hyperthermie nebenwirkungsarm möglich geworden<sup>76</sup>.

Unter Hyperthermiebedingungen wird die Durchblutung des Tumorgewebes verbessert und somit die Tumoroxygenierung erhöht<sup>77</sup>. Durch eine gleichzeitige Steigerung der metabolischen Aktivität der Tumorzelle resultiert daraus eine erhöhte Anflutung der Zytostatika. Auch eine Immunmodulation durch die Induktion von verschiedenen Zytokinen wie Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, Interleukin-8 und Interleukin-10 sowie dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  wird diskutiert. Während durch die Induktion dieser Zytokine eine Immunstimulation ausgelöst wird, hat die Induktion des Granulozyten-koloniestimulierenden Faktors (G-CSF), die ebenfalls nach Hyperthermiebehandlung beobachtet wurde, einen positiven Einfluss auf die Erholung der Granulopoese nach der Chemotherapie. Außerdem kommt es unter Hyperthermie zur Induktion von Hitzeschockproteinen auf

Tumorzellen. Die Induktion dieser Proteine erhöht die Antigenität eines Tumors und löst eine spezifische Immunantwort aus<sup>76,78</sup>.

In In-vitro-Untersuchungen und Phase-I-Studien konnte gezeigt werden, dass Hyperthermie bei 41 - 43 °C den therapeutischen Index für Alkylantien und Platin-Analoga deutlich steigert, wobei der so genannte "Thermal Enhancement Factor" mit 2 - 7 angegeben wurde. Für Platin-Derivate wurden unter Hyperthermiebedingungen eine deutliche Zunahme der DNA-Addukt-Bildung sowie eine Zunahme der Platin-Akkumulation in resistenten Zelllinien beobachtet<sup>79,80</sup>.

Für Oxaliplatin wurde in In-vitro-Versuchen ebenfalls ein positiver Effekt durch die gleichzeitige Anwendung von Hyperthermie festgestellt. An Lungentumorzellen konnte eine Wirkungsverstärkung um den Faktor 2 gezeigt werden<sup>81</sup>.

### 1.3.5 Toxizität

Oxaliplatin ist ein vergleichsweise gut verträgliches Zytostatikum, dessen Toxizitätsprofil sich von dem anderer Platinkomplexe deutlich unterscheidet. Die am häufigsten genannten unerwünschten Wirkungen unter einer Oxaliplatintherapie sind gastrointestinale Wirkungen, wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöe oder Mukositis, Hämatotoxizität und Neurotoxizität<sup>10,82,83</sup>.

Im Vergleich zu Cisplatin ist das emetogene Potential wesentlich moderater ausgeprägt und kann durch eine antiemetische Prophylaxe und/oder Behandlung mit stark wirksamen Antiemetika gut kontrolliert werden. Diarrhöen sind nicht ganz so häufig und weisen einen geringen Schweregrad auf. In klinischen Studien zeigte sich, dass unter einer Monotherapie mit Oxaliplatin nur sehr selten von leichter Diarrhö berichtet wurde, während bei einer Kombinationstherapie mit Fluorouracil diese unerwünschte Wirkung aufgrund der gastrointestinalen Toxizität des Fluorouracils in etwas stärkerem Maße auftrat. Jedoch auch dann kann diese unerwünschte Wirkung gut mittels Antidiarrhoika kontrolliert werden<sup>82</sup>.

Die Hämatotoxizität, die sich in Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie äußert, tritt selten in hohem Schweregrad auf. Auch bei dieser unerwünschten Wirkung ist die Inzidenz und Schwere bei Kombinationstherapien stärker ausgeprägt als unter einer Monotherapie mit Oxaliplatin. Die Knochenmarkschädigung und die daraus resultierende Hämatotoxizität ist aber im Vergleich zu Carboplatin eher schwach ausgeprägt und stellt keine dosis- oder therapielimitierende Toxizität dar<sup>83,82</sup>.



Oto- und Nephrotoxizität, die für Cisplatin therapieeinschränkend sind, werden bei Oxaliplatin nicht beobachtet. Das Fehlen der Nephrotoxizität, das in Phase-I-Studien auch in der höchsten Dosisstufe beobachtet wurde<sup>84,85</sup>, wurde auch in den nachfolgenden klinischen Studien bestätigt. Sogar in einer Studie, in der Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion mit Oxaliplatin behandelt wurden, kam es weder zu einer Verstärkung der renalen Dysfunktion noch anderer unerwünschter Wirkungen<sup>86</sup>. Auch die Ototoxizität, die bei Therapien mit Cisplatin und in geringerem Maße mit Carboplatin auftritt, wird unter einer Oxaliplatintherapie nur selten mit geringem Schweregrad beobachtet<sup>87</sup>.

Mukositis, Dermatotoxizität und Alopezie sind bei einer Oxaliplatin-Therapie selten; v.a. die geringe Inzidenz der Alopezie auch in Kombination mit Fluorouracil ist ein großer Vorteil, da diese unerwünschte Wirkung aufgrund der stigmatisierenden Wirkung die Patienten sehr belastet<sup>82</sup>.

Andere unerwünschte Wirkungen, die im Rahmen von klinischen Studien berichtet wurden, waren allergische Reaktionen. Diese traten selten auf (ca. 5 % aller Patienten oder weniger) und waren besonders dann anzutreffen, wenn die Patienten bereits mit Cisplatin vorbehandelt waren<sup>82</sup>. Durch den verstärkten Einsatz von Oxaliplatin in der klinischen Routine außerhalb von Studien werden häufiger Überempfindlichkeitsreaktionen beobachtet, die mit Broncho- und Laryngospasmen und Erythembildung einhergehen<sup>88</sup>. In zwei kleineren retrospektiven Untersuchungen mit 20 bzw. 25 Patienten wurden Überempfindlichkeitsreaktionen in etwa 13 % der Fälle beobachtet<sup>88,89</sup>.

Die entscheidende und dosislimitierende Toxizität von Oxaliplatin ist eine periphere sensorische Neuropathie<sup>83,90</sup>. Auf Symptomatik, Inzidenz, mögliche Ursachen und Therapieoptionen wird im Folgenden näher eingegangen.

### **Neurotoxizität**

Neurotoxische Wirkungen werden durch alle Platinkomplexe und auch andere Zytostatika, wie z.B. Taxane oder Vincaalkaloide, hervorgerufen.

Während bei Taxanen und Vincaalkaloiden sowohl sensorische als auch motorische Nerven betroffen sind, handelt es sich bei den Platinkomplexen um eine rein periphere sensorische Neuropathie<sup>91</sup>, deren Schwere bei den verschiedenen Vertretern der Substanzklasse unterschiedlich ausgeprägt ist.

Bei Cisplatin ist diese unerwünschte Wirkung aufgrund der guten Kontrolle renaler und gastrointestinaler Toxizität durch geeignete supportivtherapeutische Maßnahmen zur dosislimitierenden Toxizität geworden<sup>90</sup>. Die cisplatininduzierte Neurotoxizität tritt nach Applikation von kumulativen Dosen in Höhe von ca. 300 mg/m<sup>2</sup> auf; die Symptome, wie z.B. Dys- und Parästhesien und Verlust von Reflexen, bessern sich häufig erst nach Jahren und sind in der Regel nicht komplett reversibel<sup>90,92</sup>.

Carboplatin zeigt nur in hohen Dosen, die aufgrund der dosislimitierenden Myelosuppression selten eingesetzt werden, Neurotoxizität, die hinsichtlich der Symptome der des Cisplatins entspricht<sup>90,93</sup>.

Oxaliplatin zeigt zwei verschiedene Formen der Neuropathie:

- Eine *akute*, bei 85 - 95 % aller Patienten auftretende Neuropathie, die meist mild ausgeprägt ist, sich während oder innerhalb weniger Stunden nach der Infusion entwickelt und spätestens nach wenigen Tagen vollständig reversibel ist.
- Eine sich graduell entwickelnde, von der kumulativen Dosis abhängige Neuropathie, die bei ca. 10 - 15 % der Patienten in schwerer Ausprägung zusätzlich zu den akuten neurotoxischen Effekten auftritt und in ihrer Art der Neurotoxizität des Cisplatins ähnelt<sup>83,90</sup>.

Die *akute* Form der Neuropathie, äußert sich in Symptomen wie Parästhesien (Fehlempfindungen wie Kribbeln, „Ameisenlaufen“ oder „Pelzigsein“) oder Dysästhesien (unangenehme bis schmerzhaft Missemmpfindung der Haut v.a. bei Berührung; Taubheitsgefühle). Eine charakteristische Eigenschaft für diese Missemmpfindungen ist, dass sie durch Kälteexposition induziert bzw. verschlimmert werden können. Typisch ist das Auftreten der Beschwerden in Fingern, Händen, Zehen und Lippen, häufig sind auch die Unterarme, der Mund und der Hals-Rachen-Bereich involviert. In selteneren Fällen (ca. 1 - 2 %) kann es zu Kiefergelenkkontraktionen und vorübergehenden Laryngospasmen mit Gefühlen von akuter Atemnot und Schluckbeschwerden kommen<sup>83,90</sup>.

Die *chronische, kumulative* Form der Neurotoxizität, die zugleich die Dosis bzw. die Therapie mit Oxaliplatin limitiert, ist durch nicht-kälteassoziierte Missemmpfindungen, Sensibilitätsverlust und sensorische Ataxie mit funktionellen Beeinträchtigungen gekennzeichnet. Häufig wird die Fähigkeit zu feinmotorischen Tätigkeiten beeinträchtigt, wie z.B. Schreiben, Knöpfe schließen oder es kommt zu Gehschwierigkeiten.

Die Dauer und die Intensität der Beschwerden verstärken sich mit der kumulativ applizierten Dosis. Nach einer Dosis von 780 - 850 mg/m<sup>2</sup> wurden in klinischen Studien bei ca. 15 % der Patienten neuropathische Symptome mit Funktionseinschränkungen festgestellt; nach einer kumulativen Dosis von 1.170 mg/m<sup>2</sup> war dies bereits bei 50 % der Patienten der Fall. Im Vergleich dazu tritt das Ansprechen des Tumors in der Regel nach Dosen von 700 mg/m<sup>2</sup>, also vor dem Beginn der chronischen Form der Neurotoxizität, auf<sup>83</sup>.

Im Gegensatz zur Cisplatin-Neurotoxizität ist die chronische Form der Neurotoxizität nach Oxaliplatingabe wie auch die akute Form fast immer vollständig reversibel; die Dauer bis zur deutlichen Besserung bzw. bis zum Verschwinden der Symptome betrug bei 75 % der untersuchten Patienten drei bis fünf Monate nach Absetzen der Therapie<sup>60,94</sup>.

Nach besonders hohen kumulativen Dosen von Oxaliplatin (> 1000 mg/m<sup>2</sup>) tritt in seltenen Fällen eine *atypische* Neurotoxizität auf, die sich in Form von Lhermitte's Zeichen und Miktionsstörungen äußert. Bei Lhermitte's Nackenbeuge-Zeichen handelt es sich um starke Missempfindungen in den oberen Extremitäten und im Rücken, die nach einem starken Vorbeugen des Kopfes auftreten<sup>83,95</sup>. Diese Symptome werden unabhängig von einer Zytostatikabehandlung im Zusammenhang mit Rückenmarksverletzungen beobachtet. Man vermutet, dass diese Symptomatik nach Oxaliplatingabe durch eine Übererregbarkeit der langen aufsteigenden sensorischen Fasern, deren Zellkörper in den Spinalganglien liegen, hervorgerufen wird<sup>95</sup>.

### *Pathogenese der Oxaliplatin-Neurotoxizität*

Die Ursachen und Mechanismen, die zur Ausbildung der oxaliplatininduzierten Neurotoxizität führen, sind bisher noch nicht vollständig geklärt und viele verschiedene Erklärungsansätze werden diskutiert.

Die *akute* Form der Neurotoxizität wird durch eine Beeinflussung von spannungsabhängigen Natriumkanälen, die zu einer Übererregbarkeit der Neuronen führt, erklärt<sup>96</sup>. Neben einer direkten Schädigung wird die Calciumdepletion durch Oxalat, das bei der Biotransformation von Oxaliplatin freigesetzt werden kann, und die daraus resultierende Beeinträchtigung von calciumsensitiven Natriumkanälen sowie calciumabhängigen intrazellulären Regulationsmechanismen diskutiert<sup>97</sup>. Gestützt wird diese Hypothese durch die Abschwächung der akuten neurotoxischen Symptome durch eine Vor- und

Nachbehandlung mit Calcium- und Magnesiuminfusionen oder die Gabe des Natriumkanalblockers Carbamazepin.

Hinsichtlich der *chronischen* Neurotoxizität zeigten eine Vielzahl von Untersuchungen verschiedene Erklärungsansätze.

Eine mögliche Ursache der neurotoxischen Effekte ist die direkte Schädigung somatischer sensorischer Nerven. Diese bestehen aus myelinisierten Fasern und ihre Zellkörper befinden sich in den sensorischen Spinalganglien. Die Schädigung durch Oxaliplatin betrifft sowohl die Myelinscheiden der Axone<sup>98</sup>, deren Zerstörung zur Unterbrechung oder Verzögerung der Signalleitung führen kann, als auch die Zellkörper innerhalb der Spinalganglien. Dort wurden nach Exposition gegenüber Oxaliplatin im Rattenmodell Schrumpfung und Zerfall der Nucleoli (Kernkörperchen) beobachtet, die mit funktionellen Veränderungen hinsichtlich der sensorischen Leitungsgeschwindigkeit einhergingen<sup>99</sup>. Auch die Beeinflussung von intrazellulären Signaltransduktionswegen könnte von Bedeutung sein. So konnte im Rattenmodell eine von der Oxaliplatinkonzentration abhängige Abnahme des zirkulierenden Nervenwachstumsfaktors (Nerve growth factor, NGF) beobachtet werden, die mit den neurotoxischen Symptomen korrelierte<sup>100</sup>.

Eine Voraussetzung für die Schädigung des Nervengewebes ist die Aufnahme von Oxaliplatin in diese Gewebe. In verschiedenen Untersuchungen konnte die Anreicherung von Platinkomplexen (Cisplatin, Oxaliplatin), die mit der Lipophilie der Verbindungen in Zusammenhang steht, in neurologischem Gewebe (Spinalganglien, Ischiasnerv und Gehirn) gezeigt werden<sup>101,102,103,104</sup>.

Auch die Anreicherung in nicht-neurologischen Gewebestrukturen könnte zur Neurotoxizität beitragen. Nach Applikation von Oxaliplatin wird eine Kumulation von Platinpezies in Erythrozyten beobachtet (s. Kap. 1.3.6). Werden diese nach einer Hämolyse, wie sie während eines chirurgischen Eingriffs stattfinden kann, freigesetzt, so können diese wieder verstärkt neurosensorische Symptome hervorrufen<sup>105</sup>.

Neben Oxaliplatin selbst spielen auch die Biotransformationsprodukte eine wichtige Rolle. In verschiedenen Untersuchungen wurde das neurotoxische Potential der Oxaliplatin-Metaboliten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass v.a.  $\text{Pt}(\text{DACH})\text{Cl}_2$  und auch  $\text{Pt}(\text{DACH})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}$  und  $\text{Pt}(\text{DACH})(\text{H}_2\text{O})_2$  wesentlich neurotoxischer sind als die Ausgangssubstanz<sup>106,28</sup>.

### *Strategien für Prophylaxe und Behandlung der oxaliplatininduzierten Neurotoxizität*

Bisher werden verschiedene Strategien zur Prophylaxe bzw. Behandlung der oxaliplatininduzierten Neurotoxizität innerhalb klinischer Studien getestet; die bislang veröffentlichten Untersuchungen stellen aber aufgrund der relativ kleinen Patientenzahlen nur vorläufige Ergebnisse dar. Für Therapieempfehlungen sollten größere, kontrollierte Studien abgewartet werden.

Vor einer möglichen Therapie mit Oxaliplatin sollte beachtet werden, dass Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus, ererbte Neuropathien, Alkoholkonsum, bestimmte Arzneimittel oder eine intensive Vorbehandlung mit anderen neurotoxischen Chemotherapeutika, die Oxaliplatin-Neurotoxizität verstärken können. Daher ist Oxaliplatin bei bestehender Polyneuropathie mit Funktionseinschränkungen kontraindiziert bzw. darf nur nach eingehender Nutzen-Risiko-Abwägung gegeben werden<sup>107</sup>.

Ein wichtiger Ansatz zur Vermeidung der neurosensorischen Symptome ist das verwendete Applikationsschema. In klinischen Studien stellte sich heraus, dass nach Gabe von 85 mg/m<sup>2</sup> alle zwei Wochen weniger Neurotoxizität auftrat als nach einer Oxaliplatingabe von 130 mg/m<sup>2</sup>, die alle drei Wochen verabreicht wurde. Eine weitere Strategie zur Reduktion des Risikos der akuten Neurotoxizität ist die Verlängerung der Infusionsdauer von zwei auf vier oder sechs Stunden; dadurch konnten v.a. die für den Patienten besonders unangenehmen pharyngo-laryngealen Missempfindungen vermieden werden<sup>82,108</sup>.

Vor dem Beginn der Therapie sollten die Patienten umfassend über diese unerwünschte Wirkung des Oxaliplatins informiert werden; Kälteexpositionen sollten sie vermeiden, während Wärmeeinwirkung die Symptome oft lindern kann.

Aufgrund der Reversibilität der neurotoxischen Symptome nach Absetzen von Oxaliplatin entwickelten *De Gramont et al.* eine Stop-and-Go-Strategie (OPTIMOX-Konzept)<sup>83</sup>. Dieses Konzept beinhaltet eine dosisintensive Behandlung nach dem FOLFOX-7-Protokoll (s. Tab. 1.1), bis eine kumulative Oxaliplatindosis von 780 mg/m<sup>2</sup> erreicht ist. Danach wird die Behandlung ohne Oxaliplatin nur mit Fluorouracil und Calciumfolinat fortgesetzt; erst nach sechs Monaten wird wieder das komplette FOLFOX-7-Schema verabreicht. Dieser Ansatz verfolgt das Ziel einer möglichst hohen kumulativen Dosis für jeden Patienten bei einem geringen Risiko der Neurotoxizität<sup>109</sup>. Diese Strategie wurde in einer Phase-III-Studie mit 608 Patienten mit der ununterbrochenen

Applikation von Oxaliplatin nach dem FOLFOX-4-Schema verglichen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass das OPTIMOX-Schema deutlich seltener schwerwiegende Neurotoxizität und Neutropenien bei gleicher Effektivität hervorruft als das FOLFOX-4-Protokoll<sup>110</sup>.

Die chronomodulierte Gabe von Oxaliplatin und Fluorouracil konnte die Inzidenz oxaliplatininduzierter Neurotoxizität ebenfalls verringern. Es zeigte sich, dass nach einer 12-stündigen Oxaliplatininfusion mit einer Spitzenkonzentration um 16:00 Uhr und Spitzenkonzentrationen der anderen Substanzen (Fluorouracil und Folinat) um 4:00 Uhr sowohl neurotoxische Symptome als auch Mukositis signifikant weniger häufig auftraten als nach konventioneller Gabe<sup>111,112,113</sup>.

Neben der Modifikation des Applikationsschemas werden diverse Arzneistoffe hinsichtlich ihres neuroprotektiven Effekts geprüft. Ihr Einsatz lässt sich aus den Befunden von In-vitro-Untersuchungen zum Mechanismus der Neurotoxizität ableiten.

Calcium- und Magnesiumionen-haltige Infusionen, Carbamazepin und der Einsatz von Glutathion wurden bisher in kontrollierten Studien geprüft; mit allen konnten Inzidenz und Schweregrad der Neurotoxizität verringert werden. In nicht-kontrollierten Studien wurden bisher der protektive Effekt von Gabapentin, Amifostin und  $\alpha$ -Liponsäure untersucht; auch diese Arzneistoffe lassen positive Ergebnisse von entsprechenden kontrollierten Studien erwarten. Venlafaxin und das ACTH-Analogon ORG 2766 zeigten ebenfalls eine Abschwächung neurologischer Symptome<sup>82,83</sup>.

### 1.3.6 Pharmakokinetische Eigenschaften

Oxaliplatin erfährt sehr schnell nach Beendigung der Applikation, die in der Regel als Infusion über zwei Stunden erfolgt, eine nicht-enzymatische Biotransformation (s. Kap. 1.3.2). Bereits zwei Stunden nach Infusionsende ist die Ausgangssubstanz nicht mehr im ultrafiltrierten Plasma nachweisbar. Es bilden sich u.a. verschiedene reaktive Intermediate, die mit Nukleinsäuren, Plasmaproteinen, Erythrozyten oder Aminosäuren interagieren. 33 % der verabreichten Dosis werden direkt nach Infusionsende an Erythrozyten, 40 % an Plasmaproteine gebunden<sup>10</sup>. In den zwei bisher veröffentlichten humanpharmakokinetischen Untersuchungen von Oxaliplatin im Ultrafiltrat<sup>114,115</sup> wurden nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> an jeweils 10 Patienten eine Halbwertszeit von 14 - 19 min und eine hohe Clearance (bis zu 200 L/h) beobachtet.

Da Oxaliplatin schnell zu anderen Verbindungen umgesetzt bzw. an Makromoleküle gebunden wird, ist die Analyse der Ausgangssubstanz in biologischen Matrices sehr schwierig und die meisten Untersuchungen beschränken sich auf die Analyse der Kinetik von Platin. Dabei werden sowohl pharmakologisch aktive als auch inaktive Spezies erfasst.

Die Bindung von Platin an Erythrozyten und Plasmaproteine ist irreversibel; daher wird dieser Platinanteil generell als pharmakologisch inaktiv erachtet. In-vitro-Experimente ergaben, dass das einmal in die Erythrozyten aufgenommene Platin sich nicht wieder zurück in das Plasma verteilen kann und somit nicht als zirkulierendes Platinreservoir anzusehen ist<sup>116</sup>. Allerdings sollte bei diesen Überlegungen eine mögliche Hämolyse der Erythrozyten, durch die eine Freisetzung von Platinspezies erfolgen kann (s. Kap. 1.3.5, Lit.<sup>105</sup>), nicht außer Acht gelassen werden. Das ultrafiltrierbare Platin, das die ungebundene Fraktion des Platins enthält, repräsentiert die antitumoral und toxisch wirksame Fraktion. Allerdings sind auch im Ultrafiltrat Platinspezies enthalten, die an kleine und somit ultrafiltrierbare Moleküle wie Aminosäuren gebunden und daher unwirksam sind, wie zum Beispiel Pt(DACH)(Met)<sup>117</sup>.

Die Elimination der platinhaltigen Biotransformationsprodukte erfolgt überwiegend renal. Nach einer Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin konnten nach 72 h ca. 50 % der Platindosis im Urin vorwiegend als freies DACH und Pt(DACH)(GSH)<sup>113</sup> wiedergefunden werden; nach 11 Tagen waren insgesamt 57 % der Dosis renal eliminiert<sup>118</sup>. Die fäkale Ausscheidung stellt mit 5 % der Ausscheidung nach 11 Tagen nur einen unwesentlichen Beitrag zur Elimination dar<sup>118</sup>.

Aufgrund der überwiegend renalen Elimination wurde die Applikation von Oxaliplatin an Patienten untersucht, die eine leichte bis moderate Form einer renalen Dysfunktion (Kreatininclearance: 20 - 60 mL/min) aufwiesen. Dabei zeigte sich zwar eine starke Korrelation zwischen der Kreatinin- und der Platinclearance aus dem Ultrafiltrat. Es konnte aber kein Zusammenhang zwischen der renalen Dysfunktion und der Zunahme der Toxizität durch Oxaliplatin festgestellt werden, so dass eine Dosismodifikation nicht notwendig erscheint<sup>86,119</sup>.

Da Oxaliplatin vorwiegend nicht-enzymatisch biotransformiert wird, ist eine Verringerung der Clearance bei hepatischer Dysfunktion eher unwahrscheinlich. Diese Hypothese konnte durch *Doroshov et al.* bestätigt werden, die bei Patienten mit hepatischer Dysfunktion keine verringerte Platinclearance beobachteten<sup>120</sup>.

Die Kinetik von Platin wird je nach Beobachtungsdauer und analytischer Methode zur Bestimmung der Platinkonzentrationen mit Hilfe eines Zwei- oder Drei-Kompartiment-Modells beschrieben<sup>10,38</sup>. In den Verteilungsräumen Ultrafiltrat, Plasma und Erythrozyten (bzw. Vollblut) verhalten sich die Platinkonzentrationen am Ende einer zweistündigen Infusion 1 : 4 : 3<sup>113</sup>.

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe von Platin in Plasma und Ultrafiltrat sind durch eine kurze Verteilungs- und eine lange Eliminationsphase gekennzeichnet. Die Elimination von Platin aus dem Ultrafiltrat erfolgt sehr rasch, so dass auch nach mehreren Behandlungszyklen keine Platinkumulation erfolgt. Im Plasma ist die Platinclearance aufgrund der irreversiblen Bindung an Proteine wesentlich geringer, aber auch dort konnte durch *Gamelin et al.* keine nennenswerte Platinkumulation nach bis zu 7 Behandlungszyklen mit 130 mg/m<sup>2</sup> alle 3 Wochen festgestellt werden<sup>35</sup>.

In den Erythrozyten wurden eine lange Halbwertszeit und eine geringe Clearance beobachtet. Vor Applikation des jeweils nächsten Behandlungszyklus' wurden noch vergleichsweise hohe Platinkonzentrationen gemessen und es kam es zu einer signifikanten Kumulation von Platin. Die relativ lange terminale Halbwertszeit von ca. 50 Tagen ist vermutlich durch die natürliche Lebensdauer der Erythrozyten (100 - 120 Tage) bedingt<sup>35</sup>.

In der Regel wird Oxaliplatin immer in Kombination mit anderen Zytostatika verabreicht. Daher wurden einzelne Untersuchungen hinsichtlich pharmakokinetischer Interaktionen durchgeführt. Für die Kombinationen von Oxaliplatin mit Topotecan<sup>121</sup>, Irinotecan<sup>113</sup> oder Gemcitabin<sup>122</sup> lagen die abgeschätzten pharmakokinetischen Parameter sowohl für Oxaliplatin als auch für den jeweiligen Kombinationspartner in der gleichen Größenordnung wie nach einer Monotherapie mit dem jeweiligen Arzneistoff. Mit Paclitaxel wurde eine leicht erhöhte nicht-renale Clearance und eine somit verringerte terminale Halbwertszeit beobachtet; der Mechanismus einer möglichen Interaktion ist noch nicht geklärt<sup>123</sup>. Hinsichtlich der am häufigsten eingesetzten Kombination mit Fluorouracil existieren widersprüchliche Ergebnisse. *Gamelin et al.* fanden eine verringerte Clearance von Fluorouracil bei Kombination mit Oxaliplatin, während *Papamichael et al.* keinen Unterschied in der Clearance gegenüber der Monotherapie feststellen konnten. Eine Beeinflussung der Platinkinetik durch Fluorouracil wurde jedoch nicht beobachtet<sup>38,113</sup>.



## 1.4 Konzepte zur Therapieindividualisierung in der Onkologie

Für jede Arzneimitteltherapie wird ein möglichst günstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis angestrebt; d.h. die Behandlung soll möglichst effektiv und nur von geringen bzw. tolerablen unerwünschten Wirkungen begleitet sein. Dieses Ziel ist besonders für die Tumorthherapie anzustreben, da die verwendeten Zytostatika, für die keine therapeutische Breite definiert werden kann, immer unerwünschte Wirkungen hervorrufen, die letztendlich therapielimitierend sein können.

Die Wirkung eines Arzneimittels hängt nicht nur von der absoluten Dosis ab, sondern wird durch verschiedene individuelle Charakteristika der Patienten beeinflusst. Daher ist eine Standarddosierung gerade bei Zytostatika nicht optimal. Einige Patienten erhalten eine zu geringe Dosis und erfahren so keinen Behandlungserfolg, während bei anderen zwar vielleicht ein Tumoransprechen festgestellt werden kann, die Therapie aber aufgrund der Toxizität abgebrochen werden muss. Diese interindividuelle Variabilität zwischen den Patienten kann zum Teil durch Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpermaße, Gesundheitszustand, Vorbehandlung, Organfunktion und genetische Polymorphismen erklärt werden.

Für die Effektivität einer Oxaliplatintherapie konnten die Faktoren Allgemeinzustand, Ausmaß der Erkrankung (Anzahl der betroffenen Organe) und die Anzahl im Vorfeld verabreichter Chemotherapieprotokolle als prädiktiv für das Ansprechen ermittelt werden. Schlechter Allgemeinzustand, mehr als drei durch das fortgeschrittene Kolorektalkarzinom betroffene Organe und mehr als drei verschiedene Chemotherapien als Vorbehandlung waren verbunden mit einem signifikant geringeren Gesamtüberleben bzw. einer kurzen Zeit bis zur Tumorprogression<sup>124</sup>. Auch genetische Dispositionen wie z.B. Polymorphismen des Xeroderma pigmentosum group D(XPD)-<sup>125</sup> oder des XRCC1-Gens<sup>126</sup> sowie das Ausmaß der Expression von ERCC1 erwiesen sich als bedeutsam für eine mögliche Vorhersage des Ansprechens<sup>127</sup>.

Neben den Unterschieden zwischen verschiedenen Patienten können sich auch bei *einem* Patienten im Laufe einer Therapie Veränderungen ergeben, wie z.B. eine erworbene Resistenz des Tumors oder eine Veränderung des Allgemeinzustands; diese Veränderungen verursachen eine intra-individuelle Variabilität<sup>6</sup>.

Die *intra-* bzw. *interindividuellen* Unterschiede zeigen sich zum einen als Variabilität der pharmakokinetischen Prozesse wie Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination, die letztendlich die Menge des Arzneistoffs bestimmen, die am Wirkort ankommt. Neben anderen Faktoren bedingen diese aber auch eine Variabilität der Pharmakodynamik der Arzneistoffe, deren Wirksamkeit und somit auch den Erfolg einer Zytostatika-Therapie.

Es wäre daher wünschenswert, die Dosierung der Zytostatika individuell für jeden Patienten unter Berücksichtigung der individuellen Einflussfaktoren anzupassen.

Derzeit werden in der Onkologie Zytostatikadosen appliziert, die auf die Körperoberfläche (KOF) der Patienten normiert werden. Auch Oxaliplatin wird nach dieser Strategie dosiert. Diese Vorgehensweise basiert auf der empirischen Beobachtung, dass die KOF mit physiologischen Parametern wie Organgröße und Organleistung korreliert. Die KOF wird in der Regel aus Körpergewicht (KG) und Körpergröße nach der Formel von *Du Bois* und *Du Bois*<sup>128</sup> berechnet, die auf einer Untersuchung von lediglich neun Erwachsenen zu Beginn des 20. Jahrhunderts basiert:

$$\text{KOF [m}^2\text{]} = \text{KG [kg]}^{0,425} \cdot \text{Körpergröße [cm]}^{0,725} \cdot 0,007184 \text{ [m}^2\text{/kg/cm]} \quad \text{Gl. 1.1}$$

Ein Zusammenhang zwischen KOF und der Pharmakokinetik ist für die meisten Zytostatika nicht gegeben, so dass die hohe interindividuelle Variabilität bzgl. Antitumorwirkung und Toxizität mit dieser Strategie nicht verringert wird. Eine individuelle Dosisanpassung wäre v.a. in der Zytostatikatherapie ausgesprochen sinnvoll. Diese Strategie wird allenfalls in Ansätzen verfolgt, indem die Dosis empirisch modifiziert wird, wenn beispielsweise vorwiegend hepatisch eliminierte Zytostatika an leberinsuffiziente Patienten verabreicht werden.

Oft existiert keine direkte oder direkt messbare Korrelation zwischen der Dosis und dem auftretenden Effekt, so dass eine Anpassung der Dosis basierend auf den Effekten meist nicht machbar ist (s. Kap. 1.4.2). Besteht aber ein Zusammenhang zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, so können die angestrebten Effekte über pharmakokinetische Zielgrößen gesteuert werden.

### 1.4.1 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter

Eine Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter ist derzeit in der onkologischen Praxis kaum etabliert.

Im Rahmen klinischer Studien hat sich eine Dosierung unter Beachtung der individuellen Pharmakokinetik aber als praktisch durchführbar und z.T. erfolgreich erwiesen. Als Zielgröße diente in der Mehrzahl der Studien die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the curve, AUC), aber auch die Plasmakonzentration des Arzneistoffs im Steady state ( $C_{ss}$ ), die erreichte Maximalkonzentration ( $C_{max}$ ) oder die Zeit, die die Konzentration der Substanz einen bestimmten Grenzwert überschritt, waren zur Optimierung der Dosierung und Verringerung der Variabilität geeignete Parameter<sup>129</sup>.

Der einzige Arzneistoff, der auch in der klinischen Routine nicht mehr konventionell nach KOF dosiert wird, ist Carboplatin. So zeigte sich für diesen Arzneistoff ein Zusammenhang zwischen der AUC und pharmakodynamischen Effekten wie der Myelosuppression (insbesondere Thrombozytopenie) sowie der Wirksamkeit.

Außerdem wurde eine Korrelation zwischen der Nierenfunktion und der AUC gefunden, da der Arzneistoff überwiegend renal eliminiert wird. Die Vorbehandlung der Patienten mit myelosuppressiven Zytostatika und die Kombination von Carboplatin mit weiteren Zytostatika erhöhen das Risiko für eine Thrombozytopenie. Basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelten *Calvert et al.* eine Formel (s. Gl. 1.2), die die Berechnung der individuellen Carboplatindosis (D) auf Basis einer Ziel-AUC und der individuellen glomerulären Filtrationsrate (GFR) ermöglicht. Die Ziel-AUC wird in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und dem angestrebten Chemotherapieprotokoll (Mono- oder Kombinationstherapie) gewählt. Mit Hilfe dieser Strategie können hohe Dosierungen für einen maximalen antitumoralen Effekt bei gleichzeitig akzeptabler Hämatotoxizität eingesetzt werden<sup>6,130</sup>:

$$D \text{ [mg]} = \text{Ziel-AUC [mg} \cdot \text{min/mL]} \cdot (\text{GFR [mL/min]} + 25) \quad \text{Gl. 1.2}$$

Auch für eine Reihe anderer Arzneistoffe konnte der positive Nutzen einer individuellen Dosisanpassung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter gezeigt werden.

So wurde durch *Evans et al.* bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) mit einer Dosierung von Methotrexat, die an die individuelle Clearance der Patienten angepasst wurde, ein signifikant besseres klinisches Ergebnis erreicht als mit konventioneller Dosierung<sup>131</sup>.

Für Fluorouracil, das häufig zusammen mit Oxaliplatin kombiniert wird, zeigten *Gamelin et al.* zum einen einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Plasmakonzentrationen und der Inzidenz akuter Toxizität. Zum anderen wurde festgestellt, dass Patienten mit überdurchschnittlich hohen Plasmakonzentrationen häufiger ein Ansprechen auf die Therapie zeigten. Daraus wurde ein "optimaler" Konzentrations- und AUC-Bereich, der in einer Folgeuntersuchung angestrebt wurde, abgeleitet. Dies resultierte in einer vergleichsweise hohen Ansprechrate bei akzeptabler Toxizität<sup>129,132</sup>.

#### **1.4.2 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakodynamischer Parameter**

Während eine Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter, die letztendlich Surrogatparameter darstellen, für eine Reihe von Arzneistoffen untersucht wurde, ist die Dosierung mit Hilfe pharmakodynamischer Parameter zumindest im Bereich der Onkologie nur sehr schwer zu realisieren. In der Therapie anderer Erkrankungen existieren leicht messbare pharmakodynamische Größen, wie z.B. die Blutglucosekonzentration oder der Blutdruck, nach denen die Dosierung der verabreichten Arzneistoffe eingestellt werden kann<sup>6</sup>.

Im Hinblick auf die Therapie mit Platin-Komplexen wäre die Messung der gebildeten Platin-DNA-Addukte am Wirkort, dem Tumorgewebe, für die Optimierung der Therapie wünschenswert. Aufgrund der schlechten Zugänglichkeit ist die Umsetzung dieser Strategie in der Praxis kaum möglich.

Daher wurde intensiv nach leichter verfügbaren Zellen gesucht, in denen die Menge der Platin-DNA-Addukte mit der im Tumorgewebe korreliert. Autopsiestudien ergaben, dass das Ausmaß der Adduktbildung im Knochenmark mit dem im Tumor vergleichbar ist<sup>133,134</sup>. Die wiederholte Gewinnung von Knochenmark ist aber ebenfalls nicht praktikabel. Leukozyten, die im Knochenmark gebildet werden, stehen jedoch als leicht verfügbare Surrogatzellen für wiederholte Adduktbestimmungen zur Verfügung. Die gemessenen Platin-Nukleotid-Verhältnisse sind unabhängig vom relativen Anteil an Lympho-

zyten, Granulozyten und Monozyten<sup>135</sup>; daher ist es nicht nötig, eine Trennung nach Art der weißen Blutkörperchen durchzuführen.

Verschiedene Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang zwischen der Adduktbildung in Leukozyten und dem Ansprechen auf eine Therapie mit Cisplatin; dabei zeigte die Gruppe der Responder eine deutlich höhere DNA-Platinierung als die der Non-Responder<sup>134,135,136,137</sup>. Auf der Basis dieser Befunde dosierten *Schellens et al.* Cisplatin bei der Behandlung von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom nach der Fläche unter der Adduktcurve (Area under the adduct curve, AUA). Dabei wurden hohe Ansprechraten bei akzeptabler Toxizität erhalten<sup>138</sup>.

In zwei Untersuchungen wies die Platin-DNA-Adduktbildung einen hohen prognostischen Wert für das Therapieansprechen auf und übertraf eine Vielzahl anderer Variablen; daher ist die Kenntnis dieses Parameters von großem Interesse, insbesondere auch schon vor dem Beginn einer platinhaltigen Chemotherapie<sup>139,140</sup>.

Es existieren aber auch Untersuchungen, die keinen oder sogar einen gegenläufigen Zusammenhang zwischen der Menge der gebildeten Addukte und dem Ansprechen zeigen. Wichtige Faktoren, die die Autoren zur Erklärung der Gegensätze zu den vorherigen Studien in Betracht ziehen, sind die Art der Quantifizierung der Addukte (s. Kap. 1.5.3), die Tumorentitäten der behandelten Patienten und die Komedikation<sup>141,142</sup>.

Für Oxaliplatin existieren bisher nur die Arbeiten von *Allain et al.* und *Liu et al.*, die in vorläufigen Untersuchungen Platin-DNA-Addukte bei jeweils 6 Patienten quantifizierten. Eine weiterführende Auswertung im Hinblick auf Zusammenhänge mit dem Ansprechen oder der Toxizität fand bisher noch nicht statt<sup>123,143</sup>.

## 1.5 Bioanalytik von Platinkomplexen

Um pharmakokinetische Parameter oder auch pharmakodynamische Größen von Oxaliplatin zu ermitteln, werden bioanalytische Verfahren benötigt, die eine Quantifizierung der Ausgangssubstanz bzw. von Platin (Oxaliplatin + Biotransformationsprodukte) in Körperflüssigkeiten, Geweben bzw. gebunden an die DNA ermöglichen. Die analytischen Möglichkeiten werden im Folgenden dargestellt.

### 1.5.1 Analyse von Oxaliplatin

Für die getrennte Quantifizierung von Oxaliplatin und einem Teil seiner Metaboliten werden in der Literatur diverse HPLC-Methoden beschrieben, mit denen Oxaliplatin in biologischen Matrices quantifiziert werden kann<sup>34,114,144,145,146</sup>.

Die HPLC-Analytik von Oxaliplatin und seinen Biotransformationsprodukten ist sehr zeitaufwändig. Für die Quantifizierung der Ausgangssubstanz nach der Methode von *Kizu et al.* ist eine komplexe chromatographische Probenvorbereitung notwendig; danach erfolgt die eigentliche Bestimmung mittels Reversed-Phase-Chromatographie und UV-Detektion bei 210 nm. Unter diesen Bedingungen kann Oxaliplatin bis zu einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  (198,7 ng/mL) mit einer Wiederfindungsrate von 80 % quantifiziert werden<sup>144</sup>.

Eine niedrigere Bestimmungsgrenze weist die Methode von *Ehrson et al.* auf, nach der im Anschluss an die chromatographische Trennung eine Derivatisierung mit Diethyldithiocarbamat erfolgt. Der Komplex, der mit Platinionen gebildet wird (s. Abb. 1.9), kann photometrisch bei 344 nm detektiert werden; die Bestimmungsgrenze dieser Methode liegt bei 40 ng/mL<sup>114,147</sup>.

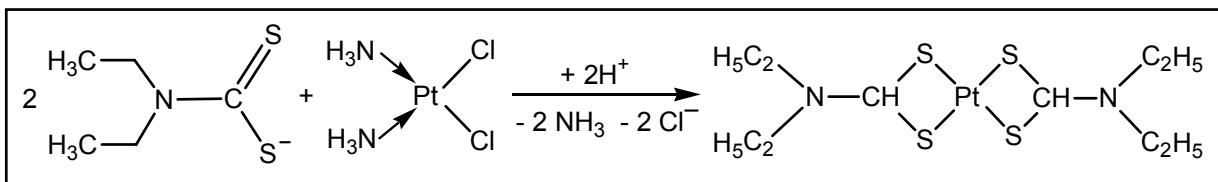


Abb. 1.9: Komplexbildung von Cisplatin mit Diethyldithiocarbamat<sup>148</sup>

Sollen neben Oxaliplatin auch seine Biotransformationsprodukte bestimmt werden, so ist es sehr schwierig, diese Substanzen unterschiedlicher Ladung mit *einem* chromatographischen System zu erfassen.

Dieses Problem wurde von *Mauldin et al.* durch die Verwendung eines gekoppelten Säulensystems aus Reversed-phase- und Kationenaustauscher-Säule gelöst<sup>145</sup>. Wird auf das Säulensystem verzichtet, so wird eine komplexe Gradientenelution notwendig, mit der die Trennung einer Vielzahl von Metaboliten gelingt. Der Zeitbedarf von mehr als 1 Stunde ist allerdings vergleichsweise hoch<sup>146</sup>.

Zur Untersuchung der Oxaliplatin- und Pt(DACH)Cl<sub>2</sub>-Kinetik wendeten *Shord et al.* die letztgenannte Methode an. Da die Analyse einer Probe sehr viel Zeit in Anspruch genommen hätte, brachen sie die Chromatographie nach jeweils 20 Minuten ab, da bis zu diesem Zeitpunkt sowohl Oxaliplatin als auch Pt(DACH)Cl<sub>2</sub> eluiert waren. Für die eigentliche Quantifizierung wurden die entsprechenden Fraktionen off-line mittels Atomabsorptionsspektrometrie (s. Kap. 1.5.2) analysiert<sup>115</sup>.

Ähnlich wie *Shord et al.* versuchte die Arbeitsgruppe um *Allain* eine möglichst platin-spezifische Detektion einzuführen, jedoch sollte die Detektion on-line erfolgen. Dazu koppelten sie ein HPLC-System mit induktiv-gekoppelter-Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) (s. Kap. 1.5.2). Für die Identifizierung von Biotransformationsprodukten setzten sie eine Kopplung mit Massenspektrometrie ein (LC-MS).

Neben dem hohen Zeitbedarf fällt auch ein Mangel an einfachen Detektionsmöglichkeiten auf. Für eine UV-Detektion ohne vorherige Derivatisierung muss bei niedrigen Wellenlängen gearbeitet werden (210 nm), wodurch eine Selektivität für die platinhaltigen Spezies nicht gegeben ist. Andere Möglichkeiten wie eine nachfolgende AAS-Bestimmung erhöhen wiederum den Zeitbedarf. Bei einer Online-Kopplung mit ICP-MS oder MS wird der apparative Aufwand sehr hoch.

Neben der Analyse mit HPLC eignet sich auch die Kapillarelektrophorese (CE) für die Untersuchung von Oxaliplatin und seinen Biotransformationsprodukten. So setzten *Strickmann et al.* eine CE-Methode für die Analyse von Oxaliplatin und Pt(DACH)(Met) ein. Für eine Quantifizierung in biologischen Matrices ist jedoch häufig die Bestimmungsgrenze von CE-Systemen nicht ausreichend niedrig und daher für Routineuntersuchungen weniger geeignet<sup>117</sup>.

### 1.5.2 Analyse von Platin

Wegen der schwierigen Analytik der Ausgangssubstanz in biologischen Matrices wird vielfach auf deren Quantifizierung verzichtet und stattdessen alle Platinspezies mittels platinspezifischer Methoden erfasst. Zu diesen Verfahren, die sich gleichermaßen für alle Platinkomplexe eignen, gehören die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)<sup>149,150</sup>, die induktiv-gekoppelte-Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS)<sup>151</sup> und elektrochemische Methoden wie z.B. die adsorptive Voltammetrie (AV)<sup>152</sup>.

Die Prinzipien dieser z.T. auch in dieser Arbeit eingesetzten Methoden werden im Folgenden dargestellt.

Die ICP-MS ist eine Analysenmethode, die die Bestimmung einer Vielzahl von Elementen in kurzer Zeit ermöglicht. Dazu kommt eine niedrige Bestimmungsgrenze, die diese Technik zu einem der meist genutzten Verfahren in der Spurenelementanalytik werden ließ. Die Methode beruht auf der Ionisierung des zu analysierenden Materials in einem Argon-Plasma, das Temperaturen zwischen 5.000 und 10.000 °C aufweist. Zur Erzeugung dieses Plasmas wird ein hochfrequenter Strom in ionisiertem Argon induziert. Unter diesen Bedingungen liegen die meisten Elemente einer Probe, die zerstäubt und mittels eines Argonträgergasstroms in das Plasma eingebracht werden, zum Teil in kationischer Form vor. Die Ionen werden in das Vakuumsystem eines Massenspektrometers überführt und nach ihren Massen getrennt<sup>153</sup>.

Eine verwandte Technik, die induktiv-gekoppelte-Plasma-Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES) nutzt das Vorhandensein von Platinatomen in einem Argonplasma bei Temperaturen von ca. 9.500 °C. Unter diesen Bedingungen emittieren Platinatome ein charakteristisches Spektrum; die Intensität des emittierten Lichts bei einer bestimmten Wellenlänge kann zur Quantifizierung ausgenutzt werden<sup>154</sup>.

*Morrison et al.* validierten eine ICP-MS-Methode für die Bestimmung von Platin in Körperflüssigkeiten und wandten sie erfolgreich im Rahmen einer klinischen Studie zur Platin-Pharmakokinetik nach Gabe von Oxaliplatin an<sup>151</sup>. Die Methode weist eine hohe Richtigkeit und Präzision auf; die Bestimmungsgrenze für die Quantifizierung in Ultrafiltrat liegt bei 1 ng/mL. Die Probenaufarbeitung für Ultrafiltrat besteht lediglich aus einer Verdünnung mit dem internen Standard; für die Messung von Plasma- oder Vollblutproben war ein einstündiger Aufschluss mit konzentrierter Salpetersäure (70 %) bei 100 °C erforderlich<sup>151</sup>, um störende Matrixbestandteile zu entfernen.

Die AAS-Technik ist aufgrund ihrer Spezifität, vergleichsweise geringer Kosten, kurzer Analysenzeiten und für die meisten bioanalytischen Fragestellungen ausreichend niedrigen Bestimmungsgrenzen die Methode der Wahl zur Quantifizierung aller Platinspezies<sup>149,150</sup>.

Bei der Atomabsorptionsspektrometrie handelt es sich um ein spektralanalytisches Verfahren, mit dem sowohl der qualitative Nachweis als auch die quantitative Bestimmung von Metallatomen, wie z.B. Platin, durchgeführt werden kann. Eine Voraussetzung dafür ist, dass die Metallatome in den gasförmigen Zustand überführt werden, in dem sie in der Lage sind, bestimmte Energiebeträge in Form von Licht einer bestimm-



ten Wellenlänge aufzunehmen und nach einer kurzen Anregungszeit wieder zu emittieren. Für die Erzeugung von Platinatomen im Grundzustand existieren zwei Möglichkeiten. Zum einen kann die Probe in einer Flamme, deren Temperatur und reduzierende Eigenschaften durch Verwendung unterschiedlicher Gase bzw. Gasgemische variiert werden können, zerstäubt und die enthaltenen Ionen in den atomaren Zustand überführt werden. Die zweite Möglichkeit, die auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurde, besteht in der Graphitrohrentechnik, die 1961 von L'vov entwickelt wurde (GF-AAS)<sup>155</sup>. Dabei wird die Probe in ein elektrisch beheizbares Graphitrohr injiziert und dieses durch Anlegen hoher Stromstärken nach einem bestimmten Temperaturprogramm aufgeheizt. Bei Temperaturen zwischen 2500 und 2700 °C kommt es zur Atomisierung der Platinionen und Überführung in den gasförmigen Zustand. Vorteilhaft gegenüber der Flammentechnik ist die deutlich niedrigere Bestimmungsgrenze. Diese wird dadurch erreicht, dass die Platinionen in der Probe nahezu quantitativ atomisiert werden und die Atome für einen längeren Zeitraum im Strahlengang verweilen. Dies ist für die Analytik in biologischen Flüssigkeiten, die oft nur geringe Konzentrationen des Analyten enthalten, von besonderer Bedeutung.

Die Platinatome sind in der Lage, eingestrahktes Licht zu absorbieren, welches dieselbe Wellenlänge aufweist, wie das Licht, das von den so angeregten Platinatomen bei ihrer Rückkehr in den Grundzustand wieder abgegeben wird. Daher wird zur Anregung die von einer Hohlkathodenlampe des zu analysierenden Elements erzeugte Emissionswellenlänge eingesetzt.

Der Zusammenhang zwischen der Absorption des Lichts durch die Platinatome der Probe und deren Konzentration wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben, wonach die Abnahme der Lichtintensität durch Absorption der Konzentration der zu bestimmenden Substanz proportional ist.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot d \cdot c \quad \text{Gl. 1.3}$$

A: Absorption

$I_0$ : Lichtintensität des eingestrahkten Lichtes

I: Lichtintensität nach Durchgang durch die Probe

k: Absorptionskoeffizient

d: Schichtdicke

c: Konzentration in der Probe

Das Gesetz gilt nur bei Messungen im linearen Bereich und bei einer definierten Schichtdicke; diese Voraussetzungen, v.a. eine definierte Schichtdicke, die bei der AAS-Technik der Länge der Atomwolke entspricht, sind kaum zu realisieren. Daher werden zur Quantifizierung die Kalibrierfunktionsmethode oder das Standardadditionsverfahren eingesetzt.

Die GF-AAS-Technik wird erfolgreich in der Bioanalytik von Platinkomplexen eingesetzt. Der Aufwand für die Probenaufarbeitung ist in der Regel sehr gering, da häufig nur ein einzelner Verdünnungsschritt durchgeführt wird oder die Probe sogar ohne weitere Vorbereitung direkt analysiert werden kann. Richtigkeit und Präzision werden von verschiedenen Autoren mit Werten für den relativen Fehler bzw. die relative Standardabweichung deutlich unter 15 % angegeben. Die Bestimmungsgrenzen liegen je nach Technik und untersuchter Matrix zwischen 5 und 50 ng/mL<sup>149,150,156</sup> und ermöglichen so die zuverlässige Analyse in Körperflüssigkeiten nach Applikation von Platinkomplexen.

Für einzelne analytische Fragestellungen werden jedoch Techniken benötigt, die noch niedrigere Bestimmungsgrenzen ermöglichen als die bisher genannten Verfahren. Diese bieten spezielle elektrochemische Verfahren, insbesondere die adsorptive Voltammetrie (AV). Die Voltammetrie ist ein elektrolytisches Verfahren, bei dem an eine elektrochemische Zelle von außen eine Spannung, die kontinuierlich verändert wird, angelegt und der bei der elektrochemischen Umsetzung resultierende Strom gemessen wird. Das Elektrodenpaar der Zelle besteht bei der in dieser Arbeit verwendeten Variante des Verfahrens aus einer stationären, hängenden Quecksilbertropfenelektrode (Hanging mercury drop electrode; HMDE) und einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode. Tauchen diese Elektroden in eine Lösung ein, die die zu analysierende Substanz enthält, so wird bei Erreichen der Spannung, bei der die Substanz reduziert oder oxidiert wird, ein Strom (Faraday'scher Strom) fließen. Dieser wird in der aufgenommenen Strom-Spannungskurve (Voltammogramm) an einer stationären Arbeitselektrode als eine Stromspitze registriert. Die Höhe dieses Stroms ist abhängig von der Konzentration der untersuchten Substanz in der Lösung; die Spannung, bei der der Spitzenstrom erhalten wird (Spitzenpotential), hängt jedoch nur von der Art der Substanz, nicht aber von ihrer Konzentration ab<sup>157</sup>.

Bei der adsorptiven Voltammetrie ist der eigentlichen voltammetrischen Bestimmung eine adsorptive Anreicherung des Analyten an der Oberfläche der Arbeitselektrode vorgeschaltet. In einem zweiten Schritt wird dieser dann durch Oxidation oder Reduktion

voltammetrisch bestimmt. Dazu müssen die zu quantifizierenden Metallkationen zunächst in adsorbierfähige Komplexe überführt werden. Der eigentlichen Bestimmung liegt dann die Reduktion des Zentralatoms, eine katalytische Wasserstoffentwicklung oder die Reduktion (in seltenen Fällen Oxidation) des Liganden in der Komplexverbindung zugrunde.

Für die Bestimmung von Platin wird die Probelösung mit Formaldehyd und Hydrazin versetzt. Diese reagieren unter Bildung von Formazon, welches mit zweiwertigem Platin einen Komplex bildet. Eventuell vorhandenes vierwertiges Platin wird durch Hydrazin zu Platin(II) reduziert. Das Reaktionsschema der Umsetzung ist in Abb. 1.10 dargestellt.

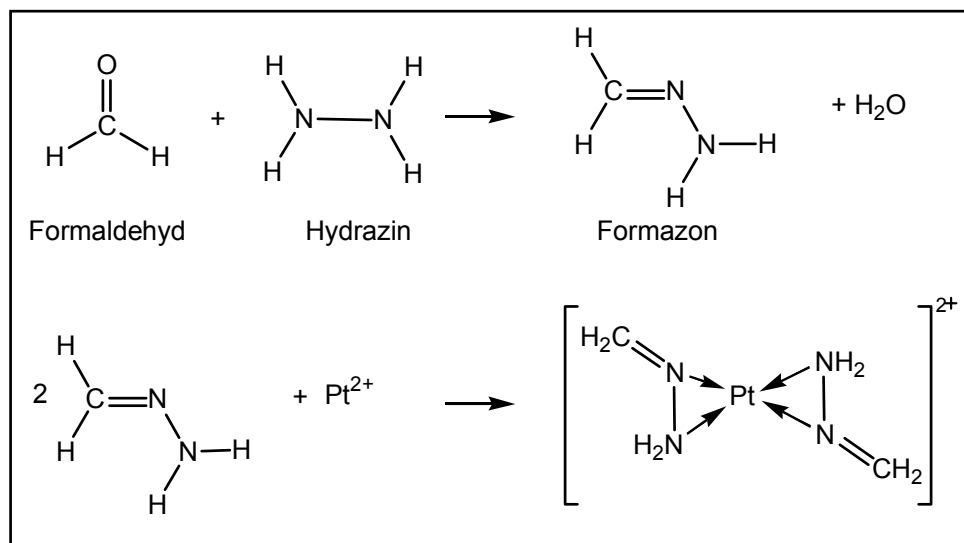


Abb. 1.10 Bildung des Platin-Formazon-Komplexes<sup>158</sup>

In Form des Formazon-Komplexes wird Platin an der HMDE adsorbiert und katalysiert die Wasserstoffentwicklung. Diese erfolgt dabei vermutlich aus einem protonierten Stickstoff des Platin-Formazon-Komplexes. Der genaue Mechanismus dieser Reaktion und die Regeneration des als Katalysator wirksamen Komplexes sind bisher nicht geklärt. Die Reduktion der Protonen zu Wasserstoff führt zu einem Strompeak, dessen Höhe von der Platinkonzentration abhängig ist<sup>158,159</sup>.

Für die Analyse ist es notwendig, die Proben durch einen Aufschluss vollständig zu mineralisieren, da organische Matrixbestandteile den Adsorptionsvorgang stören können. Damit ist das Verfahren zwar relativ zeitaufwändig, es ermöglicht aber die Quantifizierung von Platin mit einer außerordentlich niedrigen Bestimmungsgrenze von 6 pg/mL<sup>160</sup>. Mit dieser Methode gelang es, Platin im Plasma von Patienten, die vor bis zu 20 Jahren mit Cisplatin behandelt worden waren, zu quantifizieren<sup>152</sup>.

### 1.5.3 Bestimmung von Platin-DNA-Addukten

Für die Quantifizierung von Platin-DNA-Addukten nach der Isolierung der DNA aus Tumorzellen oder Leukozyten der Patienten eignen sich grundsätzlich alle für die Platinbestimmung genannten Methoden. Je nach Ausmaß der Adduktbildung der eingesetzten Platinkomplexe ist es oft nötig, Verfahren mit besonders niedriger Bestimmungsgrenze einzusetzen, um die Gesamtplatinierung der DNA zuverlässig bestimmen zu können. V.a. in In-vivo-Untersuchungen, wo die resultierenden Platinkonzentrationen nicht wie bei In-vitro-Versuchen gesteuert werden können, ist dies von besonderer Bedeutung.

So wird für die Quantifizierung des an die DNA gebundenen Platins häufig die GF-AAS eingesetzt<sup>161,136</sup>. Auch mittels ICP-MS wurde die Quantifizierung von Platin-DNA-Addukten beschrieben<sup>143,123</sup>. Mit diesen Verfahren wird die Gesamtplatinierung der DNA durch alle gebildeten Addukte bestimmt, während mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) nur bestimmte Spezies (meist Pt-GG-Addukte) erfasst werden. Mit Hilfe dieser Methode, für die die Generierung spezifischer Antikörper<sup>162,163</sup> gegen die Addukte eine Voraussetzung ist, gelingt die Quantifizierung mit sehr hoher Spezifität und bietet außerdem die Möglichkeit, auch niedrige Konzentrationen korrekt zu bestimmen<sup>135,142</sup>. Eine hohe Spezifität für einzelne Platin-DNA-Addukte besitzt auch die <sup>32</sup>P-Postlabelling-Methode; nach komplexer Aufarbeitung werden die platinieren Nukleotide radioaktiv markiert<sup>164,165</sup>. Für die Trennung und Quantifizierung unterschiedlicher Adduktspezies werden HPLC<sup>166</sup>- oder CE-Methoden<sup>117,167</sup> eingesetzt, die den Nachweis und die Quantifizierung der einzelnen Addukte zumindest nach In-vitro-Experimenten mit DNA oder Zellen erlauben. Für die Quantifizierung der Addukte in klinischen Proben sind die Bestimmungsgrenzen dieser Methoden jedoch in der Regel zu hoch.

## 1.6 Zielsetzung

Oxaliplatin ist eine gegen verschiedene Tumorentitäten wirksame Substanz, die häufig zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Die Wirkung wird ähnlich wie bei anderen Platinkomplexen über die Bildung von Platin-DNA-Addukten vermittelt.

Das Ausmaß der Adduktbildung hat v.a. bei Cisplatin einen hohen prädiktiven Wert im Hinblick auf das Tumoransprechen gezeigt. Für Oxaliplatin wurden Zusammenhänge zwischen Adduktbildung und klinischen Parametern bis jetzt noch nicht untersucht.

Das empirische Vorgehen, die Dosis anhand der Körperoberfläche der Patienten zu berechnen, führt zu einer hohen Variabilität der pharmakologischen Wirkungen bei den einzelnen Patienten. Da pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter sowie individuelle Patientenfaktoren die Wirksamkeit oder Toxizität eines Zytostatikums entscheidend beeinflussen, sollten diese im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Die Ergebnisse sollten dann auf Zusammenhänge mit den beobachteten klinischen Effekten geprüft und gegebenenfalls als Grundlage für die Entwicklung von Dosierungsrichtlinien dienen.

Dieses Ziel sollte durch folgendes Vorgehen erreicht werden:

- Untersuchung der pharmakokinetischen Parameter von Oxaliplatin in verschiedenen Körperflüssigkeiten
- Untersuchung der Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten als pharmakodynamischen Parameter
- Ermittlung der intra- und interindividuellen Variabilität und Identifizierung patientenspezifischer Einflussfaktoren auf pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter
- Untersuchungen zur Korrelation zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern
- Charakterisierung von Tumoransprechen und Toxizität nach Applikation von Oxaliplatin
- Untersuchungen zur Korrelation zwischen Pharmakokinetik bzw. -dynamik und klinischen Effekten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Oxaliplatin	Sanofi-Synthelabo, Gentilly, Frankreich
Salpetersäure 65 % (V/V)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie , Steinheim
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	USF Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach
Argon 4.6	Air Product, Hattingen
Polymorphprep <sup>®</sup>	Axis-Schild, Oslo, Norwegen
Ficoll-Paque <sup>®</sup>	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Protease, lyophilisiert	Qiagen, Hilden
Proteinase-K	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ribonuclease A (69 Kunitz units/mg)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ethanol 96-100 % (V/V)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Phenol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Chloroform-Isoamylalkohol (24 : 1 V/V)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tris (= 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol) eingesetzt als Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie , Steinheim
AL-Puffer (Lyse-Puffer)	Qiagen, Hilden
AW 1-Puffer (Wasch-Puffer)-Konzentrat	Qiagen, Hilden
AW 2-Puffer (Wasch-Puffer)-Konzentrat	Qiagen, Hilden
AE-Puffer (Elutions-Puffer)	Qiagen, Hilden
Kalbsthymus-DNA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Puffer C1*	Qiagen, Hilden
Puffer G2*	Qiagen, Hilden
Puffer QBT*	Qiagen, Hilden
Puffer QF*	Qiagen, Hilden
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Isopropanol 100 % (V/V)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, eingesetzt als Dinatriumsalz, Na <sub>2</sub> [EDTA]	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Boehringer Mannheim, Mannheim
Penicillin G	Boehringer Mannheim, Mannheim
Streptomycin	Boehringer Mannheim, Mannheim
RPMI 1640-Medium <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

\* Die genaue Zusammensetzung wird von der Fa. Qiagen nicht mitgeteilt.

### 2.1.2 Hergestellte Puffer und Lösungen

PBS-Lösung (Phosphate buffered saline):

Natriumchlorid	8,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H <sub>2</sub> O	1,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 1000,0 mL

Salpetersäure 6,5 % (V/V)

Salpetersäure 65 % (V/V)	100 mL
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 1000,0 mL

## AW 1-Puffer (Wasch-Puffer)

AW 1-Konzentrat*	95 mL
Ethanol 96 % (V/V)	ad 220 mL

## AW 2-Puffer (Wasch-Puffer)

AW 2-Konzentrat*	66 mL
Ethanol 96 % (V/V)	ad 226 mL

## AE-Puffer (Elutions-Puffer)

Tris-HCl	10 mmol/L
EDTA	0,5 mol/L
pH > 9	

## Protease-Lösung

Protease, lyophilisiert	≥ 7,5 AU/vial**
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	5,5 mL

## Proteinase-K-Lösung

Proteinase K, lyophilisiert	200 mg
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 10 mL

## RNAse-Lösung

Ribonuclease A	50 mg
Tris-HCl-Lösung (10 mM, pH = 7,5)	ad 10 mL

## Isopropanol 70 % (V/V)

Isopropanol 100 % (V/V)	70 mL
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 100 ml

## Ethanol 70 % (V/V)

Ethanol 96-100 % (V/V)	70 mL
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 100 ml

---

\* Die genaue Zusammensetzung wird von der Fa. Qiagen nicht mitgeteilt.

\*\* 1 mAU bedeutet eine Aktivität der Protease, durch die 1 µmol Thyrosin aus denaturiertem Hämoglobin in einer Minute bei 50 °C freigesetzt wird.



## Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25 : 24 : 1)

Phenol	100 mL
Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1, V/V)	100 mL

Lyse-Puffer für "*Phenolmethode*"

Natriumdodecylsulfat	1 %
Tris-HCl	20 mmol/L
EDTA	20 mmol/L
Natriumchlorid	200 mmol/L

## Triton-Lösung 1% (V/V)

Triton-X	2,5 mL
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 250,0 mL

## Oxaliplatin-Stammlösung (SL) [1 mg/mL Platin]

Oxaliplatin	20,4 mg
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 10,0 mL

## Oxaliplatin-Arbeitslösung 1 (AL-1) [10 µg/mL Platin]

Oxaliplatin-Stammlösung	100 µL
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 10,0 mL

## Oxaliplatin-Arbeitslösung 2 (AL-2) [1 µg/mL Platin]

Oxaliplatin-Arbeitslösung (AL-1)	100 µL
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 10,0 mL

## Penicillin-Streptomycin-Lösung

Penicillin G	50000 I.E./mL
Streptomycin	0,05 g/mL

## DNA-Stammlösung [80 µg/mL]

Kalbsthymus-DNA	8,0 mg
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 100,0 mL

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

S-Monovetten <sup>®</sup> 2,7mL KE (1,6 mg K <sub>2</sub> [EDTA]/mL Blut)	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten <sup>®</sup> 9 mL KE (1,6 mg K <sub>2</sub> [EDTA]/mL Blut)	Sarstedt, Nümbrecht
Venofix <sup>®</sup> (steril)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Multi-Adapter (steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Primo <sup>®</sup> -Alkoholtupfer	Büttner-Frank GmbH, Erlangen
Cellstar <sup>®</sup> -Röhrchen (15 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> -Röhrchen (50 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
PP-Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Centrisart <sup>®</sup> I, Cut-Off 10.000	Sartorius AG, Göttingen
Centrifree <sup>®</sup> , Cut-Off 30.000	Millipore, Eschborn
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
QIAamp <sup>®</sup> DNA-Blood-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp <sup>®</sup> DNA-Blood-Midi-Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN <sup>®</sup> Genomic-Tip-Kit	Qiagen, Hilden
Graphitrohre, pyrolytisch beschichtet	Varian, Darmstadt
Platin Hohlkathodenlampe (UltrAA <sup>®</sup> -Lampe)	Varian, Darmstadt
Probengefäße für AAS (2 ml, konisch)	Varian, Darmstadt
Cellstar <sup>®</sup> -Gewebekulturflaschen (125 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Sterilfilter (0,2 µm, Celluloseacetat)	Sartorius AG, Göttingen

### 2.1.4 Geräte

Purelab Plus <sup>®</sup> - Wasseraufbereitungsanlage	USF Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach
Begasungsbrutschrank WTC Binder	WTC Labortechnik, Tuttlingen
Laminar-Air-Flow-Werkbank	Heraeus, Hanau
VoluMate <sup>®</sup> Pipetten	Mettler-Toledo GmbH & Co, Gießen
Fisherbrand <sup>®</sup> -Einkanal-Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Beckman Microfuge <sup>®</sup> Lite Centrifuge	Beckman Instruments, California, USA
Zentrifuge Allegra <sup>®</sup> 21 R	Beckman Instruments, California, USA
Elektronische Präzisionswaage Kern 770	Gottl. Kern & Sohn, Albstadt
Wasserbad Büchi 461	Büchi, Schweiz
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Vakuumkonzentrator Speed-Vac <sup>®</sup> SC 110	Savant, Egelsbach
Atomabsorptionsspektrometer Spektrometer SpectrAA <sup>®</sup> Zeeman 220 Graphitrohratomisator GTA 100 Autosampler PSD 100 Dell Computer: Software SpectrAA <sup>®</sup> 220, Version 2.20	Varian, Darmstadt
UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec <sup>®</sup> 2100 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Präzisionsküvetten Quarzglas Suprasil <sup>®</sup>	Hellma, Müllheim

## 2.2 Analytik von Platin in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Die Quantifizierung von Platin in Plasma (PL), Ultrafiltrat (UF) und Vollblut (VB) wurde mittels einer flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie-Methode mit Graphitrohr-Ofentechnik (GF-AAS) durchgeführt. Dabei wurde eine von *Kloft et al.*<sup>149</sup> entwickelte Methode in modifizierter Form angewandt.

### 2.2.1 Messbedingungen

#### Geräteeinstellungen

Für die Bestimmung von Platin in den verschiedenen Matrices erwiesen sich folgende Messbedingungen des GF-AAS-Systems am geeignetsten.

#### Lichtquelle

Als Lichtquelle wurde eine UltrAA<sup>®</sup>-Lampe (s. Abb. 2.1) verwendet, die neben dem in allen Hohlkathodenlampen vorhandenen Elektrodenpaar aus Hohlkathode plus zugehöriger Anode ein weiteres Elektrodenpaar enthielt. Mit Hilfe dieser „Boost“-Elektroden wurde die Eigenabsorption der in der Hohlkathode entstehenden Platin-Atome vermindert. Dadurch resultierten eine höhere Intensität des emittierten Lichts und gleichzeitig ein geringeres Grundrauschen. Somit wurden Bestimmungen im unteren Konzentrationsbereich erleichtert. Die Messwellenlänge betrug 265,9 nm; die Lampe wurde mit einem Lampenstrom von 10 mA betrieben.

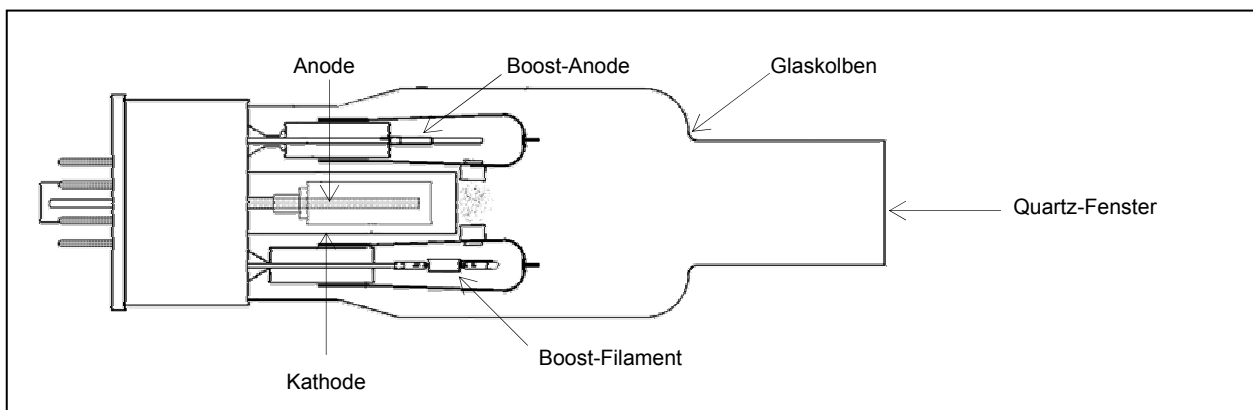


Abb. 2.1 Schematische Darstellung einer UltrAA<sup>®</sup>-Lampe

### Untergrundkorrektur

Zur Korrektur der Untergrundabsorption, die durch Streuung an Partikeln und Absorption durch organische Moleküle verursacht wird, wurde der Zeeman-Effekt ausgenutzt. P. Zeeman entdeckte das Phänomen, dass Emissionslinien von Atomen unter dem Einfluss eines Magnetfelds aufgespalten werden. Dieser Effekt entsteht durch die Wechselwirkungen eines äußeren Magnetfelds mit dem magnetischen Moment von emittierenden ("direkter" Zeeman-Effekt) oder absorbierenden ("inverser" Zeeman-Effekt) Atomen. Die Energieniveaus der Atomlinien werden in einem senkrecht zur optischen Achse angelegten Magnetfeld aufgrund des Zeeman-Effekts, in eine oder mehrere  $\pi$ - und eine oder mehrere  $\sigma$ -Komponenten aufgespalten. Die  $\pi$ -Komponenten sind parallel zum angelegten Magnetfeld polarisiert und weisen dieselbe Wellenlänge auf wie ohne Magnetfeld. Die  $\sigma$ -Komponenten sind senkrecht zur Richtung des äußeren Felds polarisiert; ihre Wellenlängen sind um einen bestimmten Betrag, der von der Stärke des angelegten Magnetfelds  $B$  abhängt, von der ursprünglichen Wellenlänge nach oben und unten verschoben (s. Abb. 2.2). Der Untergrund selbst weist keine Zeeman-Aufspaltung auf.

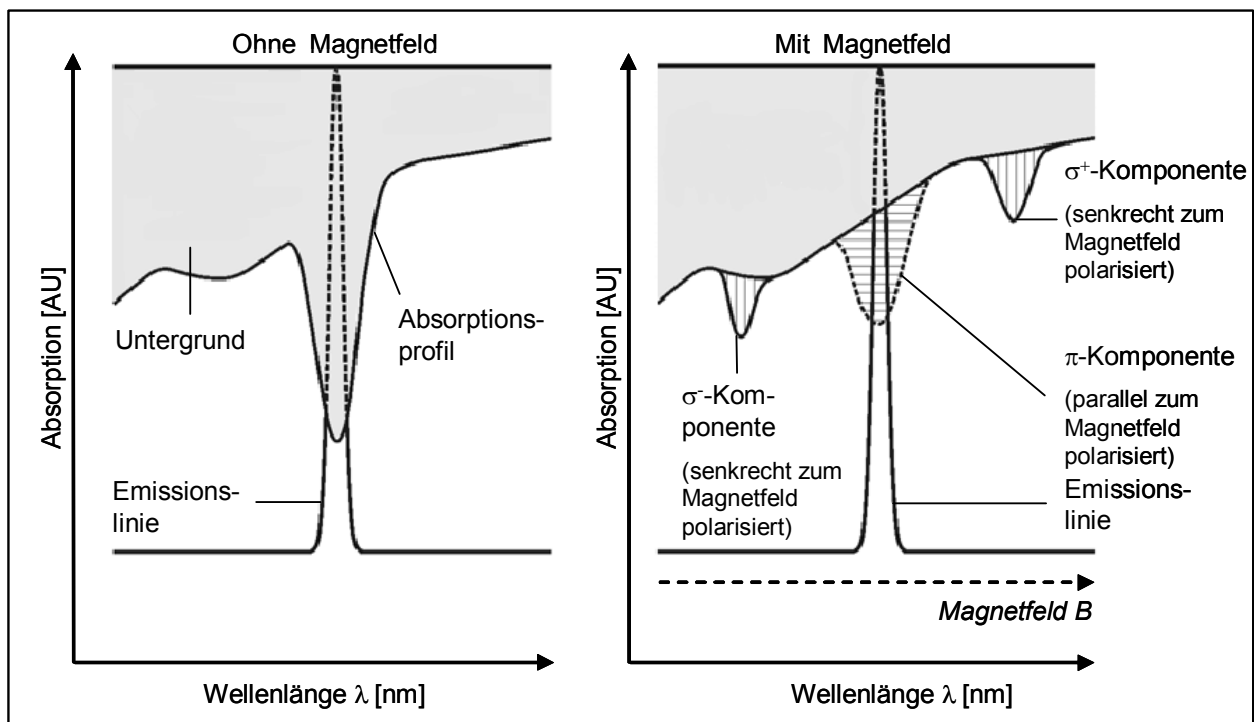


Abb. 2.2 Untergrundkorrektur durch Ausnutzung des Zeeman-Effekts<sup>168</sup>

Alle Messungen wurden sowohl bei angeschaltetem (0,8 Tesla) als auch bei abgeschaltetem Magnetfeld durchgeführt; zwischen diesen beiden Zuständen lagen 4,8 ms. Bei abgeschaltetem Magnetfeld wurden die Absorptionen des Elements und die des Hintergrunds gemessen. Bei angeschaltetem Magnetfeld wurde nur die Absorption des Hintergrunds erfasst, da die  $\sigma$ -Komponenten der Elementlinie durch das angelegte Magnetfeld verschoben wurden und die parallel polarisierten  $\pi$ -Komponenten durch einen Prismen-Polarisator zwischen Graphitrohrfen und Monochromator herausgefiltert wurde. Die Differenz aus diesen beiden Messungen ergab dann die Intensität des Elementsignals<sup>169</sup>.

### Temperaturprogramm

Abhängig von der Probenmatrix wurden Temperaturprogramme verwendet, die sich in der Veraschungstemperatur und -dauer unterschieden. Das Temperaturprogramm durchlief fünf Phasen.

Bei der Trocknung, die zur Vermeidung von Siedeverzügen möglichst lange und mit langsamen Temperatursteigerungen durchgeführt wurde, wurde das Lösungsmittel der Proben verdampft.

Anschließend wurden während der Vorveraschungs- und Veraschungsphase Matrixbestandteile, wie zum Beispiel Proteine, entfernt. Ausgehend von einem Temperaturprogramm, das für die Bestimmung von Platin in Plasmaproben entwickelt worden war<sup>170</sup>, wurden die Veraschungstemperaturen und -dauern an die jeweilige Matrix angepasst. Proben, die einen größeren Anteil an potentiell störenden Begleitsubstanzen enthielten, wurden bei höheren Temperaturen bzw. für längere Zeit verascht.

Die sich anschließende Atomisierungsphase, in der Platin in die Gasphase und damit in den atomaren Zustand überführt wurde, war gleichzeitig die Messphase.

Abschließend wurden in der Reinigungsphase Probenreste entfernt, der Graphitrohrfen gekühlt und die nächste Messung gestartet.

Während der Messung wurde kontinuierlich Argon durch das Graphitrohr geleitet. Argon verhinderte als Inertgas die Selbstentzündung des Graphitrohrs; außerdem unterstützte der Argonstrom den Trocknungs- und Veraschungsprozess. Der Argonstrom wurde während der Atomisierungsphase unterbrochen, um Störungen während der Signalaufnahme zu vermeiden.

Tab. 2.1 gibt einen Überblick über das verwendete Temperaturprogramm.

Tab. 2.1 Temperaturprogramm der GF-AAS

Schritt	Phasen	Temperatur [°C]	Dauer* [s]	Argonstrom [L/min]	Signal- aufnahme
1	Trocknung	95	5,0	3	nein
2		110	60,0	3	nein
3		120	10,0	3	nein
4	Vorveraschung	650	15,0	3	nein
5		650	20,0	3	nein
6	Veraschung	1300 - 1700	10,0	3	nein
7		1300 - 1700	2,0 - 5,0	3	nein
8		1300 - 1700	2,0	0	nein
9	Atomisierung	2700	0,7	0	ja
10		2700	2,0	0	ja
11	Reinigung	2700	2,0	3	nein

\* Unter "Dauer" wurden die Zeitspannen angegeben, nach deren Ablauf die zugehörige Temperatur erreicht war. Wiederholung einer Temperaturstufe (z.B. 650 °C) bedeutet, dass diese Temperatur für die angegebene Dauer gehalten wurde.

Die Veraschungstemperaturen (Schritte 6 - 8) und -dauern (Schritt 7) wurden je nach Matrix variiert (s. Tab. 2.2). Die Entwicklung der Temperaturprogramme wird in Kap. 3.1.1 näher erläutert.

Tab. 2.2 Variation von Veraschungstemperatur und -dauer

	Konzentrations- bereich [ng/mL]	Veraschungs- temperatur [°C]	Veraschungs- dauer [s]
<b>Ultrafiltrat</b>	5,0 - 50,0	1300	4
	50,0 - 500,0	1300	4
<b>Plasma</b>	20,0 - 200,0	1700	7
	200,0 - 2000,0	1300	4
<b>Vollblut</b>	50,0 - 500,0	1700	7
	200,0 - 2000,0	1500	4

## 2.2.2 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung erfolgte analog zu der Methode von *Kloft et al.*<sup>149</sup> durch einen bzw. zwei (bei Vollblutproben) Verdünnungsschritte. Je nach Abnahmezeitpunkt und daher erwarteter Konzentration sowie Probenmatrix wurden unterschiedliche Verdünnungen hergestellt, deren Endkonzentrationen innerhalb des Kalibrierbereichs lagen. Ultrafiltratproben wurden durch Verdünnung mit 6,5 %-iger Salpetersäure zur Messung vorbereitet. Bei Plasmaproben wurde 1 %-ige Triton-Lösung zur Aufarbeitung verwendet. Vollblutproben wurden in zwei Schritten aufgearbeitet. Zunächst wurden sie mit konzentrierter Salpetersäure versetzt und bei 60 °C für 20 min auf dem Wasserbad lysiert, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach dem Abkühlen wurde das Lysat mit 1 %-iger Triton-Lösung verdünnt. In der folgenden Tab. 2.3 sind die einzelnen Volumenanteile aufgeführt.

Tab. 2.3 Probenaufarbeitungsprotokoll für Ultrafiltrat-, Plasma- und Vollblutproben

	Konzentrationsbereich [ng/mL]	Probe [ $\mu$ L]	HNO <sub>3</sub> 65 % [ $\mu$ L]	HNO <sub>3</sub> 6,5 % [ $\mu$ L]	Triton-Lsg. [ $\mu$ L]	Verdünnungsfaktor
<b>Ultrafiltrat</b>	50,0 - 500,0	25	n.e.	225	n.e.	10
	5,0 - 50,0	100	n.e.	n.e.	n.e.	1
<b>Plasma</b>	200,0 - 2000,0	25	n.e.	n.e.	975	40
	20,0 - 200,0	25	n.e.	n.e.	75	4
<b>Vollblut</b>	200,0 - 2000,0	25	225	n.e.	750	40
	50,0 - 500,0	25	125	n.e.	100	10

n.e. nicht eingesetzt

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des Kalibrierbereichs lagen, wurden durch den Autosampler des Geräts mit platinfreier, aufgearbeiteter Matrix verdünnt. Wenn nach Verdünnung im Verhältnis 1 : 10 die Probenkonzentration nicht innerhalb des Kalibrierbereichs lag, wurde die Probe erneut mit entsprechend höherem Verdünnungsfaktor aufgearbeitet und vermessen.



### 2.2.3 Kalibrierung

Für die Bestimmung der Platinkonzentrationen in Ultrafiltrat-, Plasma- und Vollblutproben wurde vor jeder Messung eine matrixadaptierte Kalibrierung durchgeführt.

#### Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen

Zur Herstellung einer wässrigen Oxaliplatinstammlösung (SL) wurden 20,4 mg Oxaliplatin-Reinsubstanz auf der Analysenwaage eingewogen und auf 10,0 mL mit Purelab Plus®-Wasser aufgefüllt. Es resultierte somit eine Oxaliplatinkonzentration von 2,04 mg/mL, die unter Berücksichtigung der molaren Masse von Oxaliplatin [ $M_r$  (OXA) = 397,3] und der atomaren Masse von Platin [ $A_r$  (Pt) = 195,1] eine Platinkonzentration von 1,0 mg/mL entsprach. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -24 °C gelagert.

Ausgehend von der Stammlösung wurden zwei Arbeitslösungen hergestellt, die Platinkonzentrationen von 10,0 und 1,0 µg/mL aufwiesen. Auch diese Lösungen wurden aliquotiert und bei -24 °C gelagert.

#### Herstellung der Kalibratorlösungen

Für die matrixadaptierte Kalibrierung wurde jeweils der Standard, der die höchste Konzentration einer Kalibrierreihe besaß, aus AL-1 und aufgearbeiteter platinfreier Matrix hergestellt.

Die Aufarbeitung der platinfreien Matrizes Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut, die von gesunden Probanden gewonnen wurden, entsprach der in Kap. 2.2.2 beschriebenen Probenaufarbeitung durch Verdünnung mit Triton-Lösung bzw. Salpetersäure. Der Verdünnungsfaktor bei der Aufarbeitung der Matrix war somit derselbe wie der der zu vermessenden Proben. Dadurch wurde eine größtmögliche Übereinstimmung zwischen den zu vermessenden Patientenproben und den Kalibratoren hinsichtlich des Verhältnisses von Platin zu den Begleitstoffen in einer Probe erreicht.

Die platinfreie, aufgearbeitete Matrix und AL-1 wurden für die Herstellung des am höchsten konzentrierten Standards gemischt, so dass Lösungen mit einer Konzentration von 50 ng/mL Platin entstanden. Bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren der jeweiligen Matrizes (VF 1 bis VF 40) (s. Tab. 2.3) entsprach

diese somit Konzentrationen von 50,0 bis 2000,0 ng/mL für den Standard mit der höchsten Konzentration einer Kalibrierreihe.

Die übrigen fünf Kalibratoren wurden aus aufgearbeiteter, platinfreier Matrix und dem höchsten Kalibrator durch den Autosampler des Geräts nach folgendem Schema (s. Tab. 2.4) hergestellt; das Injektionsvolumen betrug sowohl für die Standards als auch für die Proben immer 20 µL. Angegeben wurden die Platinkonzentrationen ohne Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren.

Tab. 2.4 Herstellung der Kalibratoren durch den Autosampler des AAS-Systems

Standard	Platin- konzentration [ng/mL]	Volumen (Standard mit der höchsten Konzentration) [µL]	Volumen (aufgearbeitete, platinfreie Matrix) [µL]
1	5,0	2	18
2	10,0	4	16
3	20,0	8	12
4	30,0	12	8
5	40,0	16	4
6	50,0	20	0

### Konzentrationsberechnung

Die Kalibratorreihen wurden mittels GF-AAS analysiert; dabei wurde das Absorptionssignal über die Peakhöhe ausgewertet. Das Grundrauschen der Hohlkathodenlampe entsprach dem Nullwert der aufgearbeiteten, platinfreien Matrix, der vom Probenmesssignal subtrahiert wurde.

Aus den bei der Mehrfachbestimmung (s. Kap. 2.2.5) erhaltenen Mittelwerten wurde mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt, die dann zur Berechnung der Platinkonzentrationen der vermessenen Proben diente.

Die Bestimmung der Platinkonzentrationen in den Erythrozyten ( $C_{ERY}$ ) erfolgte indirekt aus den gemessenen Konzentrationen in Vollblut ( $C_{VB}$ ) und Plasma ( $C_{PL}$ ) und dem Hämatokrit (Hkt) nach folgender Gleichung<sup>171</sup>:

$$C_{ERY} = \frac{C_{VB} - [C_{PL} \cdot (1 - Hkt)]}{Hkt} \quad \text{Gl. 2.1}$$

## 2.2.4 Validierung

Die Validierung erfolgte auf der Grundlage internationaler Anforderungen an bioanalytische Verfahren<sup>172,173,174</sup> mit Hilfe der Software MVA<sup>®</sup>, Version 2.0 (Novia GmbH, Saarbrücken). Die analytischen Methoden wurden hinsichtlich Selektivität, Messbereich, Bestimmungsgrenze, Linearität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision validiert.

### 2.2.4.1 Selektivität

Die Selektivität der Methode wurde durch Vergleich von Spektrogrammen der aufgearbeiteten Leermatrizes Ultrafiltrat, Plasma und Vollblut mit Spektrogrammen ermittelt, die vom Kalibrator mit der niedrigsten Platinkonzentration erhalten wurden. Die Leermatrizes wurden von mindestens sechs verschiedenen Spendern gewonnen, gemischt und untersucht.

### 2.2.4.2 Messbereich und Bestimmungsgrenze

Die zu bestimmenden Konzentrationen umfassten insgesamt einen Bereich von 5 - 2000 ng/mL. Da innerhalb derartiger Konzentrationsunterschiede keine proportionalen Beziehungen zwischen Absorption und Konzentration zu erwarten sind, wurde für jede Matrix der Messbereich in zwei Konzentrationsbereiche unterteilt und diese getrennt untersucht.

Die unterste Bestimmungsgrenze ist definiert als diejenige Platinkonzentration, für die folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Das Signal für die entsprechende Konzentration sollte etwa fünfmal so hoch sein wie das der platinfreien Matrix.
- Außerdem sollte die Konzentration mit einem relativen Fehler von höchstens 20 % und einer relativen Standardabweichung (s. Kap. 2.2.4.5) von höchstens 20 % bestimmt werden können.

Für jede Matrix wurden die Absorptionen der platinfreien Matrix und die Signale der untersten Kalibratoren aus sechs verschiedenen Kalibrierungen miteinander verglichen. Außerdem wurden für jede Matrix Proben hergestellt, die der Konzentration des untersten Kalibrators entsprachen. Diese wurden sechsmal unabhängig voneinander vermessen und die Richtigkeit und Präzision der Bestimmung überprüft.

### 2.2.4.3 Linearität

Die Linearität der erhaltenen Kalibrierfunktionen wurde anhand folgender Kriterien überprüft:

- Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgerade sollte  $\geq 0,99$  sein.
- Die erhaltenen Absorptionen wurden in die korrespondierenden Konzentrationen umgerechnet. Dabei sollten die Konzentrationen nicht mehr als 15 % von ihren Nominalwerten abweichen. Im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden bis zu 20 % Abweichung akzeptiert. Vier von insgesamt sechs Kalibratoren sollten diese Kriterien erfüllen; dazu sollten in jedem Fall die Kalibratoren mit der niedrigsten und der höchsten Konzentration gehören.
- Für jede Kalibrierung wurde der Test nach *Mandel* durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob eine quadratische Regression im Vergleich zur linearen Regression eine signifikant bessere Anpassung ergab. Es wurde die Prüfgröße PG nach folgender Formel berechnet:

$$PG = \frac{(n-2) \cdot s_{y1}^2 - (n-3) \cdot s_{y2}^2}{s_{y2}^2} \quad \text{Gl. 2.2}$$

$s_{y1}^2$	Restvarianz bei linearer Regression
$s_{y2}^2$	Restvarianz bei quadratischer Regression
n	Anzahl der Messungen

Die berechnete Prüfgröße wurde mit dem Tabellenwert aus der *F*-Tabelle (Freiheitsgrad  $f_1 = 1$ ,  $f_2 = n-3$ ,  $p = 0,01$ ) verglichen. War die Prüfgröße  $> F$ , so wurde durch die quadratische Regression eine bessere Anpassung erreicht; eine lineare Regression war in diesem Fall nicht zulässig. Es handelt sich bei diesem Test um einen modifizierten *F*-Test, der von *Mandel* für die Entscheidung zwischen linearer und quadratischer Regression entwickelt wurde<sup>175</sup>.

### 2.2.4.4 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate bezeichnet den Platinanteil, der nach Aufarbeitung einer Probe im Vergleich zu einer wässrigen, nicht aufgearbeiteten Probe gleicher Konzentration quantifiziert wird. Pro Matrix wurden jeweils vier Proben unterschiedlicher Konzen-

trationen, die den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich der jeweiligen Matrix umfassten, hergestellt und aufgearbeitet.

Außerdem wurden Lösungen in Wasser hergestellt, deren Konzentrationen den Sollkonzentrationen nach der Aufarbeitung entsprachen und die ohne weitere Vorbereitung gemessen wurden. Alle Lösungen wurden jeweils sechsmal vermessen. Das Verhältnis der erhaltenen Absorptionen für die matrixhaltigen ( $A_{\text{Matrix, aufgearbeitet}}$ ) und die wässrigen Proben ( $A_{\text{Wasser}}$ ) ergab die Wiederfindungsrate.

$$\text{Wiederfindungsrate [\%]} = \frac{A_{\text{Matrix, aufgearbeitet}}}{A_{\text{Wasser}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 2.3}$$

Aus den Einzelwerten wurden die mittlere Wiederfindungsrate (Gl. 2.22) und ihre Standardabweichung (G. 2.23) berechnet.

Durch diese Untersuchung wurde der Einfluss der Matrix und ihrer Aufarbeitung auf die Höhe des Absorptionssignals charakterisiert.

Um die Einflüsse von Matrix und Aufarbeitung getrennt zu untersuchen, wurden neben den o.g. Lösungen auch noch Lösungen in Wasser hergestellt, die hinsichtlich ihrer Konzentrationen den matrixhaltigen Proben entsprachen und die ebenso wie diese gemäß dem Probenaufarbeitungsprotokoll zur Messung vorbereitet wurden. Deren Absorptionen ( $A_{\text{Wasser, aufgearbeitet}}$ ) wurden sowohl mit den Absorptionen der rein wässrigen Proben als auch mit denen der matrixhaltigen Proben verglichen.

#### 2.2.4.5 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Übereinstimmung einer gemessenen Konzentration ( $C_{\text{gem}}$ ) mit der nominalen Konzentration ( $C_{\text{nom}}$ ). Nach Analyse von vier Konzentrationen pro Konzentrationsbereich (nähere Erläuterung hinsichtlich der vermessenen Proben s. Kap. 2.2.5), die sowohl sechsmal an einem Tag bzw. an sechs unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurde, wurde der Mittelwert ( $\bar{C}_{\text{gem}}$ ) berechnet und dessen Abweichung von der Nominalkonzentration als relativer Fehler (Relative Error, RE) ausgedrückt:

$$\text{RE [\%]} = \frac{(\bar{C}_{\text{gem}} - C_{\text{nom}})}{C_{\text{nom}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 2.4}$$

Der relative Fehler des Mittelwerts sollte 15 % (bzw. 20 % im Bereich der Bestimmungsgrenze) nicht überschreiten.

Die Präzision einer Methode beschreibt die Übereinstimmung der Messwerte bei wiederholter Bestimmung. Für jeden Konzentrationsbereich wurden vier Proben (s. Kap. 2.2.5) wiederholt analysiert. Für die Bestimmung der sog. *Intraday*-Präzision wurde die Analyse in einem Analysenlauf sechsmal wiederholt; für die *Interday*-Präzision wurden die Proben an sechs unterschiedlichen Tagen analysiert. Zur Charakterisierung der Präzision wurde die relative Standardabweichung (Relative Standard Deviation, RSD) herangezogen (s. Gl. 2.25).

Die relative Standardabweichung sollte 15 % nicht übersteigen; im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden bis zu 20 % toleriert.

Die Injektionspräzision des programmierbaren Probengebers wurde durch zehnmahlige Injektion von vier unterschiedlich konzentrierten Proben pro Matrix überprüft.

### **2.2.5 Qualitätssicherung während der Messung**

Die Qualität der durchgeführten Platinquantifizierung wurde mit Hilfe von Qualitätskontrollproben (Quality Controls, QC) gesichert. Insgesamt sollten 10 % aller Proben aber mindestens sechs Proben eines Analysenlaufs QC-Proben sein. Pro Konzentrationsbereich jeder Matrix wurden vier Proben unterschiedlicher Konzentrationen durch Mischen von platinfreier Matrix mit AL-1 hergestellt. Diese Proben (Spiked Quality Controls, SQC) wurden nach der Herstellung aliquotiert und bei -24 °C gelagert. Über den gesamten Messzeitraum der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde vor jeder Messung ein Aliquot aufgetaut und wie die zu vermessenden Patientenproben nach Probenaufarbeitungsprotokoll aufgearbeitet. Dadurch wurden die Aufarbeitung sowie die anschließende Messung hinsichtlich ihrer Richtigkeit und Präzision untersucht. Eine der vier Proben besaß eine Konzentration oberhalb des Kalibrierbereichs; diese wurde, wie in Kap. 2.2.2, beschrieben durch den Autosampler des Geräts in den Kalibrierbereich verdünnt. Dieses Verfahren wurde somit ebenfalls bei jeder Messung überprüft.

Neben den SQC-Proben wurden weitere QC-Lösungen hergestellt, die aber direkt nach der Herstellung als Ganzes aufgearbeitet und in Aliquoten bei -24 °C eingefroren wurden (Processed Quality Controls, PQC). Die Absorptionen dieser Proben erlaubten eine Aussage über die Höhe des Messsignals und den Zustand der Graphitrohre während des Analysenlaufs. Mit zunehmender Anzahl an Messungen nahmen die Signalhöhen ab bzw. die Höhe der Untergrundabsorption zu. Um eine korrekte Messung zu gewährleisten, erfolgte nach 50 Proben eine Rekalibrierung.

Ein Analysenlauf wurde akzeptiert und zur Auswertung herangezogen, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Die relativen Fehler sollten 15 % (20 % im Bereich der Bestimmungsgrenze) nicht überschreiten.
- 67 % aller QC-Proben sollten diese Bedingung erfüllen; bei 33 % waren auch größere Abweichungen erlaubt. Allerdings sollte dies nicht bei allen Replikaten einer Konzentration vorkommen.

Für die Kalibratoren wurden während des gesamten Messzeitraums die gleichen Qualitätskriterien angesetzt wie während der Validierung (s. 2.2.4.3).

Jeder Kalibrator und jede Probe wurde im PROMT (Precision optimized measurement time)-Modus vermessen, d.h. es wurden mindestens zwei Injektionen durchgeführt. Bei einer Abweichung der Messsignale um mehr als 5 % folgte eine dritte Bestimmung und nötigenfalls noch eine vierte Messung. Lag die Standardabweichung dann nicht unter 15 % bzw. im Bereich der Bestimmungsgrenze unter 20 %, wurde die entsprechende Probe im folgenden Analysenlauf erneut vermessen.

### **2.3 Quantifizierung der Platin-DNA-Adduktbildung**

Zur Bestimmung der Bindung von Platin an die DNA wurden Untersuchungen an Leukozyten von Patienten durchgeführt. Während und nach oxaliplatinhaltiger Therapie wurde die Adduktbildung durch die Bestimmung des Platin-Nukleotid-Verhältnisses charakterisiert.

Die Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte gliederte sich in vier Schritte. Nach Isolierung der Leukozyten aus dem Vollblut und der Isolierung der DNA aus den Leukozyten erfolgte eine Doppelbestimmung derselben Probe zur Quantifizierung der DNA sowie des an die DNA gebundenen Platins.

Für die Teilvalidierung dieses Verfahrens und Qualitätssicherung während der Messung wurden auch Untersuchungen an Leukozyten gesunder Spender durchgeführt. Diese Leukozyten wurden aus Buffy Coat, einem Leukozytenkonzentrat, gewonnen. Nach der Isolierung wurden die Leukozyten mit Oxaliplatin inkubiert und die anschließend erhaltenen Proben genauso aufgearbeitet wie die Patientenproben.

Das Aufarbeitungsprotokoll ist im Folgenden dargestellt.

### 2.3.1 Isolierung der Leukozyten

Für die Gewinnung von Leukozyten von Patienten unter oxaliplatinhaltiger Chemotherapie wurden innerhalb von 2 h nach der Blutabnahme die Leukozyten aus 15 mL Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Jeweils 4 mL des Dichtegradientenmediums Polymorphprep<sup>®</sup> wurden in drei 15-mL-Blue Caps vorgelegt und vorsichtig mit je 5 mL Blut überschichtet. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Diese Zentrifugation wurde am Ende nicht abgebremst, um eine Durchmischung der erhaltenen Banden zu vermeiden. Die Leukozyten trennten sich aufgrund ihrer spezifischen Dichte von den übrigen Blutbestandteilen und waren in zwei Banden zu erkennen, von denen eine die Granulozyten, die andere die Lymphozyten enthielt. Da die Platin-DNA-Adduktbildung in den Leukozyten nicht vom Typ der weißen Blutkörperchen abhängt<sup>135</sup>, wurden beide Schichten mit einer Pasteurpipette geerntet und in einem weiteren Blue Cap vereinigt. Die Leukozyten wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, um Reste des Gradientenmediums oder andere Vollblutbestandteile abzutrennen. Nach der Suspendierung der Leukozyten im Puffer wurde jeweils für 10 min bei 400 g zentrifugiert. Nach dem Abdekantieren der Waschflüssigkeit wurden die Leukozyten in 0,5 mL PBS-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -24 °C gelagert.

Für die Gewinnung von Leukozyten aus Buffy Coat für nachfolgende Inkubationsversuche war es wichtig, Leukozyten mit möglichst hoher Viabilität und Lebensdauer zu isolieren. Daher wurden mit Hilfe des Dichtegradientenmediums Ficoll-Paque<sup>®</sup> mononukleäre Lymphozyten gewonnen, die mit mindestens sieben Tagen die längste Lebensdauer unter den Leukozyten aufwiesen. Der Ablauf der Isolierung entsprach der mit Polymorphprep<sup>®</sup> beschriebenen Vorgehensweise. Allerdings wurde mit Ficoll-Paque<sup>®</sup> nur eine Bande mit Lymphozyten erhalten, die nach ihrer Reinigung mit Oxaliplatin inkubiert wurden (s. Kap. 2.3.2).

### 2.3.2 Inkubation der Lymphozyten mit Oxaliplatin

Buffy Coat, der für diese Versuche vom INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE HÄMATOLOGIE UND TRANSFUSIONSMEDIZIN der UNIVERSITÄT BONN (PROF. DR. MED. P. HANFLAND) zur Verfügung gestellt wurde, ist ein Leukozytenkonzentrat, aus dem bei einer Isolierung der DNA etwa sechsmal so viel DNA erhalten werden kann wie bei Aufarbeitung desselben



Volumen Vollbluts (200  $\mu\text{L}$  Vollblut: 8  $\mu\text{g}$  DNA; 200  $\mu\text{L}$  Buffy Coat: 50  $\mu\text{g}$  DNA)<sup>176</sup>. Eine Patientenprobe, wie sie im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, hatte ein Volumen von 15 mL Vollblut; eine äquivalente Menge Buffy Coat hatte demnach ein Volumen von ca. 2 mL. Die Mengen an eingesetztem Buffy Coat in den Inkubationsversuchen wurden so berechnet, dass Proben entstanden, die hinsichtlich ihrer DNA-Menge einer Patientenprobe entsprachen.

Es wurden die aus 250 mL Buffy Coat erhaltenen Lymphozyten in eine 125 mL-Gewebekulturflasche eingebracht und in 72 mL RPMI-1640-Kulturmedium, das 10 % fetales Kälberserum und 0,2 % Penicillin-Streptomycin-Lösung enthielt, suspendiert. Anschließend wurde eine wässrige Oxaliplatin-Lösung zugesetzt, so dass die Platinkonzentration im Inkubationsansatz 200  $\mu\text{M}$  betrug. Die Oxaliplatin-Lösung wurde dafür frisch in Purelab<sup>®</sup>-Wasser hergestellt, sofort aliquotiert und bei  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um die Bildung von Aqua- und Hydroxokomplexen zu vermeiden.

Die Lymphozyten wurden über 2 h im Brutschrank bei 5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einer Luftfeuchtigkeit von fast 100 % inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen aus dem Nährmedium isoliert, indem die Suspension 3 min bei 2000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert wurde. Das Medium wurde abdekantiert und das Pellet wurde dreimal in jeweils 20 mL PBS-Puffer ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) suspendiert und gewaschen. Nach dem Waschen und Abdekantieren des Puffers wurden die Pellets in 24 mL PBS-Puffer resuspendiert. Die Ansätze wurden vor dem Einfrieren à 200  $\mu\text{L}$  aliquotiert und bei  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.3.3 Isolierung der DNA

Für die Untersuchung der Platinierung zellulärer DNA werden unterschiedliche DNA-Isolierungstechniken verwendet, die zum Teil sehr aufwändig sind; z.B. die Caesiumchlorid-Gradientenzentrifugation<sup>177</sup>, Phenolextraktion<sup>136</sup> oder Anionenaustauscherchromatographie<sup>178</sup>. Daneben werden von diversen Herstellern, Kits angeboten, mit denen die Lyse der Zellen und die DNA-Isolierung mittels Festphasenextraktion in relativ kurzer Zeit und guter Reinheit gelingen.

Um auch bei geringem Ausmaß der DNA-Platinierung eine korrekte Quantifizierung des an die DNA gebundenen Platins durchführen zu können, ist es wichtig, dass mit dem verwendeten Verfahren eine hohe DNA-Ausbeute erhalten wird. Außerdem sollte die DNA aus der proteinhaltigen Matrix in ausreichender Reinheit isoliert werden können. Weitere wichtige Aspekte für die Aufarbeitung vieler Proben in der Routine sind die benötigte Zeit und die entstehenden Kosten.

Um Vor- und Nachteile verschiedener Methoden der DNA-Isolierung zu untersuchen, wurden neben der Festphasenextraktion mittels QIAamp<sup>®</sup> DNA-Blood-Kit (Qiagen, Hilden) noch zwei Verfahren geprüft:

- Extraktion der Proteine mit einem Phenol-/Chloroform-Gemisch und anschließende Fällung der DNA mit Isopropanol (*Phenolmethode*<sup>179</sup>)
- Extraktion mittels QIAGEN<sup>®</sup> Genomic-Tip-System (Qiagen, Hilden)

Für die DNA-Isolierung mittels *Phenolmethode* wurden die Zellen zunächst lysiert. Dazu wurde die Probe (200 µL Lymphozytensuspension) mit demselben Volumen Lyse-Puffer versetzt, der 1 % Natriumdodecylsulfat, je 20 mmol/L Tris-HCl und EDTA und 0,2 mol/L Natriumchlorid enthielt. Nach Zugabe von 20 µL Proteinase-K-Lösung (20 mg/mL in Wasser) wurde der Ansatz 15 min bei 56 °C im Ultraschallbad inkubiert.

Anschließend erfolgte die Extraktion der zellulären Proteine. Dazu wurden zum Lysat 200 µL eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs [25 : 24 : 1, V/V/V] gegeben und kräftig gemischt. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die Wasserphase abgenommen; dabei musste darauf geachtet werden, die Interphase zwischen organischer und wässriger Phase nicht zu berühren, um eine Kontamination mit proteinhaltiger Lösung zu vermeiden. Die Wasserphase wurde noch zweimal mit dem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch extrahiert. Die danach erhaltene Wasserphase wurde dann mit 200 µL eines Gemischs aus Chloroform und Isoamylalkohol (24 : 1, V/V) versetzt. Nach gründlichem Mischen und Zentrifugieren wurde die Wasserphase, die die DNA enthielt, abgenommen. Dieser zusätzliche Extraktionsschritt war notwendig, um eventuell vorhandenes Phenol vollständig aus der wässrigen Phase zu entfernen.

Die Wasserphase wurde mit 4 °C kaltem, 100 %-igem Isopropanol versetzt, um die DNA zu fällen. Für die Vervollständigung der Fällung wurden die Proben für 15 min bei -20 °C gekühlt. Danach wurden sie 10 min lang bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand über dem erhaltenen DNA-Pellet wurde abgenommen und das Pellet mit 400 µL 70 %-igem Isopropanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 300 µL Puffer AE aufgenommen.

Für die DNA-Isolierung mittels QIAGEN<sup>®</sup> *Genomic-Tip-System* wurde das Aufarbeitungsprotokoll der Fa. Qiagen eingehalten; die Zusammensetzung der verwendeten Puffer wurden von der Firma nicht mitgeteilt.

Zunächst wurden die Proben, die 200  $\mu\text{L}$  Lymphozytensuspension enthielten, mit 5 mL PBS-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde dann mit 5 mL Puffer C1 und 15 mL Wasser bei 4 °C gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden dann bei 4 °C und 1300 g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstands wurden die Lyse und die nachfolgende Zentrifugation wiederholt.

Anschließend wurden zu dem erhaltenen Zellkernpellet 5 mL Puffer G2 gegeben und 10 - 30 s kräftig gemischt, bis das Pellet komplett resuspendiert war. Nach Zugabe von 95  $\mu\text{L}$  Proteinase-K-Lösung (20 mg/mL in Wasser) wurde der Ansatz für 15 min bei 56 °C im Ultraschallbad inkubiert. Nach gründlichem Mischen wurde das Lysat auf die mit 4 mL Puffer QBT equilibrierte Säule gegeben. Diese enthält ein Anionenaustauscherharz, an das die DNA unter diesen Bedingungen (niedrige Salzkonzentration und pH-Wert) adsorbiert. Der Durchfluss von Lysat und dem im Anschluss zum Waschen verwendeten Puffer (zweimal je 7,5 mL Puffer QC) erfolgte ohne Zentrifugation allein durch die Schwerkraft. Die DNA wurde mit 5 mL des auf 50 °C erwärmten Puffers QF, der eine hohe Ionenstärke aufwies, eluiert.

Im Eluat wurde die DNA durch Zugabe von 3,5 mL 100 %-igem Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Das DNA-Pellet, das nach Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 6000 g erhalten wurde, wurde mit 2 mL 4 °C kaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut wie nach der Isopropanolfällung zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde die DNA in 300  $\mu\text{L}$  Puffer AE aufgenommen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Platin-DNA-Adduktbildung nach Applikation von Oxaliplatin und die Teilvalidierung des Quantifizierungsverfahrens erfolgte die Isolierung der DNA mit Hilfe des QIAamp<sup>®</sup> DNA-Blood-Kits. Je nach Volumen und Zellzahl der erhaltenen Leukozytenproben wurde wahlweise der DNA-Blood-Mini-Kit (Probenvolumina bis 400  $\mu\text{L}$ ; bis zu  $5 \cdot 10^6$  Zellen) oder der Midi-Kit (Probenvolumina bis 2 mL; bis zu  $2 \cdot 10^7$  Zellen) eingesetzt. Im Folgenden wird die DNA-Isolierung Probe mit dem Mini-Kit beschrieben; hinsichtlich der Volumina der zugesetzten Reagenzien und Puffer wurde das Probenaufarbeitungsprotokoll der Fa. Qiagen eingehalten.

Im ersten Schritt der Aufarbeitung, die schematisch in Abb. 2.3 dargestellt ist, wurde die Leukozytenprobe mit 20  $\mu\text{L}$  Protease und 200  $\mu\text{L}$  Lysepuffer (Puffer AL) versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde der Ansatz für 15 min im Ultraschallbad bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu\text{L}$  96 %-iger Ethanol (V/V) zugesetzt. Nachdem

der Ansatz wiederum kräftig gemischt worden war, wurde das Lysat auf eine Silikasäule aufgegeben und eine Festphasenextraktion der DNA durchgeführt. Unter diesen Bedingungen (hohe Salzkonzentration, Ethanol,  $\text{pH} < 9$ ) adsorbierte die DNA an die Silikamembran, so dass in zwei Waschschrritten Zellbestandteile von der Säule gewaschen und die DNA aufgereinigt werden konnte. Dazu wurden jeweils 500  $\mu\text{L}$  der Waschpuffer AW-1 und AW-2 auf die Säule gegeben und bei 6000 g für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA in zwei Schritten mit jeweils 200 bzw. 100  $\mu\text{L}$  des Elutionspuffers (Puffer AE;  $\text{pH} > 9$ ) durch Zentrifugation bei 6000 g für 5 min von der Säule eluiert.

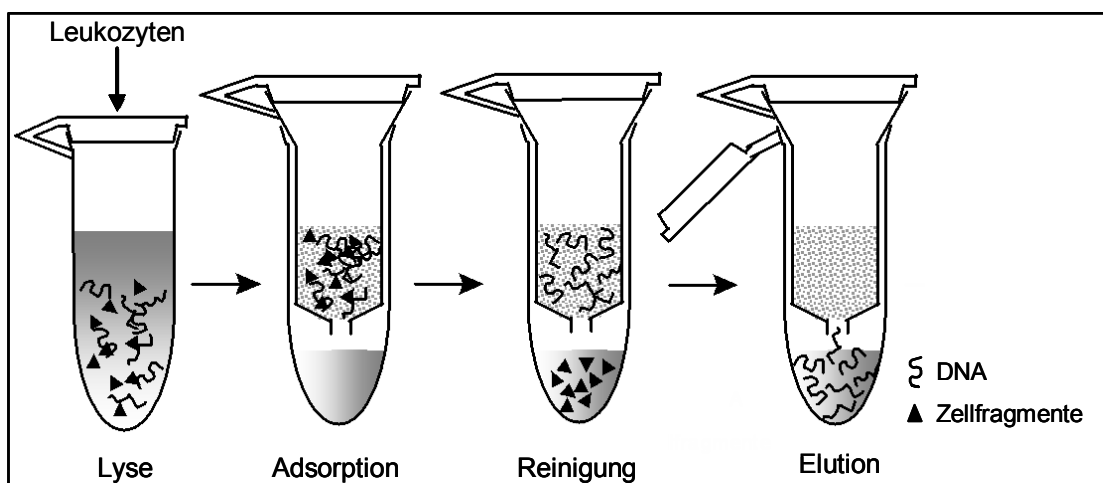


Abb. 2.3 DNA-Isolierung aus Leukozyten durch Festphasenextraktion<sup>161</sup>

Alle DNA-Proben wurden bei  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Analyse gelagert.

### 2.3.4 Quantifizierung des DNA-Gehalts

Die DNA-Konzentration und die Reinheit der isolierten DNA wurden mittels UV-Spektrometrie ermittelt. Dafür wurden die Proben mit Puffer AE auf eine Konzentration von ca. 10 bis 50  $\mu\text{g DNA/mL}$  verdünnt und die Absorptionen bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm ( $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{320}$ ) gegen Puffer AE als Referenz gemessen.

Eine Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Ergebnisse war eine Absorption bei 320 nm von  $< \pm 0,010$ . Dieser Wert diente als Nullwert und wurde von den Absorptionen bei 260 bzw. 280 nm abgezogen. Das Verhältnis dieser korrigierten Absorptionen ( $A_{260}^*$ ,  $A_{280}^*$ ) sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Dadurch konnte eine vollständige Ab-

trennung der Proteine aus den Proben angenommen werden. Die Reinheitskriterien sind im Folgenden nochmals dargestellt.

$$A_{320} \leq 0,010 \text{ und}$$

$$\frac{A_{260}^*}{A_{280}^*} = 1,7 - 1,9 \quad \text{Gl. 2.5}$$

Der DNA-Gehalt [ $\mu\text{g/mL}$ ] wurde aufgrund des linearen Zusammenhangs der korrigierten Absorption bei 260 nm und der DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{DNA}} [\mu\text{g/mL}] = 50 \cdot A_{260}^* \quad \text{Gl. 2.6}$$

Aus der erhaltenen Konzentration und dem Volumen des Eluats wurde die absolute Menge an DNA ermittelt; daraus wurde mit Hilfe der durchschnittlichen relativen molaren Masse [ $M_r$  (Nukleotid) = 330] die Stoffmenge an Nukleotiden berechnet.

Die gesamte aus dem Elutionsschritt erhaltene DNA-Lösung (incl. des für die UV-Messung verwendeten Anteils) wurde in der Speed-Vac<sup>®</sup> bis zur Trockene eingedampft.

#### 2.3.4.1 Richtigkeit und Präzision der DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung wurde hinsichtlich Richtigkeit und Präzision validiert.

Es wurde zunächst eine DNA-Stammlösung in Puffer AE hergestellt, die eine Konzentration von 80  $\mu\text{g/mL}$  aufwies. Diese Lösung wurde aliquotiert und bei  $-24^\circ\text{C}$  gelagert. Ausgehend von dieser Lösung wurden bei jeder Messung drei Verdünnungen hergestellt, die Konzentrationen von 10,0, 20,0 und 40,0  $\mu\text{g/mL}$  (QC<sub>10</sub>, QC<sub>20</sub>, QC<sub>40</sub>) besaßen. Diese Lösungen wurden sowohl sechsmal an einem Tag bzw. über den gesamten Messzeitraum vermessen. Die Richtigkeit und Präzision der Methode (sowohl *Intraday* wie auch *Interday*) wurden, wie in Kap. 2.2.4.5 beschrieben, bestimmt.

#### 2.3.5 Quantifizierung des Plattingehalts

Die Platinkonzentrationen in den Adduktproben, wurden je nach ihrer Herkunft (*in-vitro* oder *in-vivo*) auf unterschiedliche Weise bestimmt.

Oxaliplatin bildet im Vergleich zu Cisplatin deutlich weniger Platin-DNA-Addukte<sup>39</sup>. Daher sind die Platinkonzentrationen in Adduktproben, die während einer oxaliplatin-

haltigen Chemotherapie gewonnen worden waren, so gering, dass eine Quantifizierung mittels GF-AAS nicht möglich war.

Aus diesem Grund wurde für diese Untersuchung der *In-vivo*-Proben das an die DNA gebundene Platin mittels adsorptiver Voltammetrie (AV) bestimmt. Diese Methode weist gegenüber der AAS eine wesentlich niedrigere Bestimmungsgrenze von 6 pg/mL (bzw. 3 pg absolut) auf und eignet sich daher gut für die Quantifizierung von Platinspuren<sup>180</sup>.

Nach *In-vitro*-Inkubation von Lymphozyten aus Buffy Coat mit Oxaliplatin waren die erhaltenen Platinkonzentrationen hoch genug, um sie mittels GF-AAS bestimmen zu können.

Die beiden verwendeten Methoden zur Quantifizierung des Platingehalts in Adduktproben werden im Folgenden näher erläutert.

### **2.3.5.1 Quantifizierung des Platingehalts mittels GF-AAS**

Die Bestimmung der Platinkonzentrationen erfolgte in ähnlicher Weise, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben. Das Temperaturprogramm für die Adduktproben entsprach dem Programm, das für Ultrafiltratproben im Konzentrationsbereich von 5,0 - 50,0 ng/mL verwendet wurde (s. Kap. 2.2.1). Wie in Kap. 2.3.4 beschrieben, wurden die nach der DNA-Isolierung erhaltenen Eluate incl. des Anteils, der bei der UV-Messung verwendet worden war, in der Speed-Vac<sup>®</sup> bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden in 100 µL Wasser aufgenommen und gründlich gemischt. Die erhaltenen Lösungen wurden ohne weitere Vorbereitung zur Messung eingesetzt.

Für die Messung dieser Proben wurde eine Kalibrierung in Wasser durchgeführt. Eine matrixadaptierte Kalibrierung wie bei den anderen Matrices war in diesem Fall nicht möglich, da für jeden einzelnen Kalibrierpunkt ein Volumen an Buffy Coat benötigt worden wäre, das 15 mL Vollblut entsprach. Da solch große Mengen an Blut bzw. Buffy Coat gesunder Probanden nicht vorhanden war, wurde für die Kalibrierung eine wässrige Lösung mit einer Platinkonzentration von 50,0 ng/mL durch Verdünnung der AL-1 hergestellt. Aus dieser wurden die übrigen Kalibrierpunkte durch den Autosampler des AAS-Geräts gemischt (s. Kap. 2.2.3). Für Proben, deren Konzentrationen unter 5,0 ng/mL lagen, wurde eine Kalibrierung im Bereich von 1,0 - 10,0 ng/mL durchgeführt. Um diesen Konzentrationsbereich sicher vermessen zu können, wurde die Dreifachinjektionstechnik angewandt. Dazu wurden jeweils dreimal 20 µL der jeweiligen Lösung injiziert. Zwischen den Wiederholinjektionen fand eine Vorveraschung bis zum Schritt 5

des Temperaturprogramms (s. Tab. 2.1) statt. Die Herstellung der Kalibratorlösungen in diesem Konzentrationsbereich durch den automatischen Probengeber des Geräts ist in Tab. 2.5 dargestellt.

Tab. 2.5 *Herstellung der Kalibratoren durch den Autosampler der AAS für den Kalibrierbereich von 1,0 - 10,0 ng/ml*

Kalibrator	Platinkonzentration [ng/mL]	Volumen (höchster Kalibrator) [ $\mu$ L]	Volumen (Wasser) [ $\mu$ L]
1	1,0	2	18
2	2,0	4	16
3	3,0	6	14
4	4,0	8	12
5	5,0	10	10
6	7,5	15	5
7	10,0	20	0

Die Konzentrationsberechnung erfolgte (wie bei den anderen Matrices) nach linearer Regression. Die Bestimmung von Platin in den Adduktproben mittels GF-AAS wurde hinsichtlich *Selektivität*, *Bestimmungsgrenze*, *Linearität*, *Wiederfindung*, *Richtigkeit* und *Präzision* validiert. Die Vorgehensweise bei der Validierung wurde zum Teil bereits im Kap. 2.2.4 erläutert.

### Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindung von Platin in der nach der DNA-Isolierung erhaltenen Matrix wurden zunächst Leukozyten von gesunden Spendern ohne Platin-Vorbehandlung aufgearbeitet und die DNA isoliert. Das Eluat wurde in der Speed-Vac<sup>®</sup> bis zur Trockene eingengt und der Rückstand wurde in einer Lösung aufgenommen, die eine definierte Platinkonzentration aufwies. Dabei wurden die Konzentrationen 10,0, 20,0, 40,0, und 50,0 ng/mL untersucht. Die gemessene Konzentration wurde mit dem experimentell bestimmten Gehalt einer wässrigen Probe gleicher Konzentration verglichen und die Wiederfindung gemäß Gl. 2.3 berechnet.

### Richtigkeit und Präzision

Für die Überprüfung von Richtigkeit und Präzision wurden wässrige QC-Proben hergestellt, die Konzentrationen von 5,0, 10,0, 20,0 und 40,0 ng/mL (Konzentrations-

bereich 5,0 - 50,0 ng/mL) bzw. 1,0, 2,0, 5,0 und 10,0 ng/mL (Konzentrationsbereich 1,0 - 10,0 ng/mL) enthielten.

Die *Sicherung der Qualität* der Messungen wurde anhand der o.g. QC-Proben, wie in Kap. 2.2.5 beschrieben, durchgeführt.

### 2.3.5.2 Quantifizierung des Platingehalts mittels adsorptiver Voltammetrie

Die quantitative Bestimmung des Platins erfolgte in Zusammenarbeit mit DR. G. WEBER und J. MESSERSCHMIDT mittels einer validierten Methode der adsorptiven Voltammetrie im INSTITUT FÜR SPEKTROCHEMIE UND ANGEWANDTE SPEKTROSKOPIE in Dortmund.

Der nach dem Einrotieren der Eluate erhaltene Rückstand wurde in 3 mL 65 %-iger Salpetersäure gelöst. Nach Überführung der Lösung in ein Quarzgefäß wurden 0,5 mL Salzsäure (12 mol/L) hinzugefügt. Die Probe wurde dann 50 min bei 280 °C und 130 bar in einem "High Pressure Asher" (HPA, Kürner, Rosenheim) mineralisiert. Nach vollständigem Aufschluss wurde 96 %-ige Schwefelsäure zugefügt und die Probe erhitzt, um die Salpetersäure zu entfernen, da diese die voltammetrische Bestimmung stören würde. Der Rückstand wurde in 15 mL 0,36 M Schwefelsäure, die 0,24 mL Hydrazinlösung (10 mM) und 0,01 mL Formaldehyd (37 %-ige wässrige Lösung) enthielt, gelöst. Die Voltammetrie wurde an einem "Polarecord 626" (Metrohm, Herisau, Schweiz) mit "VA Stand 663" und "Timer E608" durchgeführt. Nachdem die Probe 5 min entgast worden war, wurde der Platin(II)-Formazon-Komplex, der *in situ* in der Elektrolytlösung gebildet wurde, für 30 - 60 s an der hängenden Quecksilbertropfenelektrode (Hanging Mercury drop electrode, HMDE) angereichert; die angelegte Spannung betrug -0,6 V (gemessen gegen eine Silber/Silberchlorid-elektrode). Danach wurde die Spannung kontinuierlich verändert (-0,6 bis -1,0 V; 10 mV/s) und der resultierende Strom gemessen. Durch den Platin-Formazon-Komplex wurde die Wasserstoffentwicklung an der HMDE katalysiert; es resultierte daher ein Strompeak im erhaltenen Voltammogramm bei -0,85 V, dessen Höhe proportional der Platinkonzentration war. Für die Konzentrationsbestimmung wurde das Standardadditionsverfahren angewandt; zu der Lösung wurden Standards mit drei unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und die Konzentration mittels linearer Regression berechnet<sup>160</sup>.

Die Platin-Bestimmung in Adduktproben mittels adsorptiver Voltammetrie wurde hinsichtlich *Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision* validiert.



## Wiederfindung

Zur Überprüfung der Wiederfindung von Platin in der Matrix, die nach der DNA-Isolierung erhalten wurde, wurden Leukozyten von gesunden Spendern ohne Platin-Vorbehandlung aufgearbeitet. Die erhaltenen Eluate nach der DNA-Isolierung wurden mit einer platinhaltigen Lösung gespikt und anschließend in der Speed-Vac<sup>®</sup> bis zur Trockene eingedampft. Es wurden den Proben folgende Platinmengen zugesetzt: 0,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0 und 100,0 pg.

Neben diesen Leukozytenmatrix enthaltenden Proben wurden auch solche in wässriger Lösung hergestellt. Der Platin-Gehalt wurde mittels adsorptiver Voltammetrie bestimmt und die Wiederfindung nach Gl. 2.3 berechnet.

## Richtigkeit und Präzision

Wie bereits dargestellt, wurden Eluate nach der DNA-Isolierung aus Leukozyten gesunder Spender mit platinhaltiger Lösung gespikt. Folgende Platin-Mengen wurden den Proben zugesetzt: 20,0, 200,0 und 400,0 pg. Diese Ansätze wurden in der Speed-Vac<sup>®</sup> bis zur Trockene eingedampft und der Platin-Gehalt mittels adsorptiver Voltammetrie bestimmt. Richtigkeit und Präzision über den gesamten Messzeitraum wurden mit Hilfe der in Kap. 2.2.4.5 dargestellten Gleichungen berechnet.

### 2.3.6 Berechnung des Platin-Nukleotid-Verhältnisses

Aus den Ergebnissen der DNA- und Platinbestimmung konnte das Platin-Nukleotid-Verhältnis berechnet werden. Zunächst wurden die Konzentrationen mit Hilfe der Proben volumina in absolute Mengen umgerechnet. Aus diesen wurden mittels der relativen molaren bzw. atomaren Massen [ $M_r$  (Nukleotid) = 330;  $A_r$  (Pt) = 195,1] die Stoffmenge an Nukleotiden und Platin in der Probe berechnet und zueinander in's Verhältnis gesetzt.

### 2.3.7 Präzision der Bestimmung der Platin-Nukleotid-Verhältnisse

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Methode bestehend aus DNA-Isolierung, DNA-Quantifizierung und Platin-Quantifizierung wurden die *Intraday*- und *Interday*-Präzision ermittelt. Dazu wurden Leukozyten gesunder Spender aus Buffy Coat isoliert und mit Oxaliplatin inkubiert (s. Kap. 2.3.1 und 2.3.2). Zur Bestimmung der *Intraday*-Präzi-

sion wurden sechs Aliquote des Inkubationsansatzes an einem Tag aufgearbeitet und vermessen. Für die *Interday*-Präzision wurden fünf weitere Aliquote an unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet und gemessen. Die Zeitspanne, während der die Proben bei -24 °C gelagert wurden, umfasste 15 Monate. Die Proben wurden sowohl mit GF-AAS als auch mit adsorptiver Voltammetrie vermessen. Wie in Kap. 2.3.6 beschrieben, wurde das Platin-Nukleotid-Verhältnis berechnet und die Präzision anhand der relativen Standardabweichung (s. Gl. 2.25) charakterisiert.

## 2.4 Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Oxaliplatin

Die klinisch-pharmazeutischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit sechs klinischen Zentren durchgeführt:

- Klinik für Innere Medizin (Hämatologie/Onkologie), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. H.J. Schmoll, Dr. T. Büchele, Dr. W. Voigt)
- Medizinische Poliklinik der Universität Bonn (Prof. Dr. Y. Ko)
- Klinikum Remscheid GmbH (Prof. Dr. A. Wehmeier)
- Universitätsklinikum Essen, Innere Klinik (Tumorforschung), Westdeutsches Tumorzentrum (Prof. Dr. M.E. Scheulen, PD Dr. D. Strumberg, Dr. R.A. Hilger)
- Klinik und Poliklinik für Innere Medizin (Abt. Onkologie-Hämatologie), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Prof. Dr. S. Hegewisch-Becker)
- Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Dr. A. Bakhshandeh-Bath).

Innerhalb von klinischen Studien, für die Ethikvoten der jeweiligen Ethikkommissionen, die Einwilligung der Patienten in die Untersuchungen sowie Patientenversicherungen vorlagen, wurden insgesamt 52 Patienten mit Oxaliplatin behandelt. Zusätzlich erhielten die Patienten eine auf die jeweilige Therapie abgestimmte Supportivtherapie, z.B. intravenöse Hydratation und Nausea- und Emesis-Prophylaxe.

Die verwendeten Therapieschemata in den 6 Zentren zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich Dosierung bzw. Applikationsintervall der verabreichten Substanzen.

Die Inhalte und Ziele der verschiedenen Studien sowie die Therapiepläne werden im Folgenden dargestellt.

### 2.4.1 Wöchentliche Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

In Zusammenarbeit mit der KLINIK FÜR INNERE MEDIZIN DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG (PROF. DR. H.J. SCHMOLL, DR. T. BÜCHELE, DR. W. VOIGT) wurden im Rahmen verschiedener klinischer Studien 6 Patienten untersucht. Die Patienten, die an unterschiedlichen Tumorerkrankungen litten, wurden mit verschiedenen oxaliplatinhaltigen Chemotherapieprotokollen behandelt. Eine dieser Studien war eine Untersuchung zur "Wöchentlichen 24-Stunden Dauerinfusion von hochdosiertem 5-Fluorouracil mit Folinsäure plus Oxaliplatin bei Patienten mit 5-FU/FA-refraktärem metastasiertem kolorektalen Karzinom"<sup>181</sup> mit dem Ziel, die Ansprechrate, die Überlebenszeit und die Toxizität der Kombinationstherapie aus Fluorouracil und Oxaliplatin, das zu Beginn der Studie noch nicht in Deutschland zugelassen war, zu untersuchen.

In der MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT BONN (PROF. DR. Y. KO) wurden Patienten nach demselben Therapieschema behandelt. Dort wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Patienten untersucht.

Neben der Kombination von Oxaliplatin mit Fluorouracil wurden in der Universitätsklinik Halle auch Kombinationen mit Gemcitabin (Pat. 4, 5 und 6) und Irinotecan (Pat. 3) eingesetzt.

#### Patientenkollektiv

Die Patienten, die an den Studien teilnahmen, litten an verschiedenen Tumorerkrankungen. Neben Adenokarzinomen des Kolons bzw. Rektums wurden auch Patienten mit Magen-, Hoden- und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) behandelt. Die Patienten mussten Einschlusskriterien, wie zum Beispiel Alter zwischen 18 und 75 Jahren, einen ECOG-(Eastern Cooperative Oncology Group)-Performance Status von 0, 1 oder 2 und eine durch entsprechende Laboruntersuchungen dokumentierte Leber- und Nierenfunktion erfüllen. Zwischen der letzten Chemotherapie und dem Beginn der Studientherapie sollten mindestens drei Wochen liegen.

Die Charakteristika der Patienten aus Halle (Pat. 1 - 6) und Bonn (Pat. 7 - 8) sind in Tab. 2.6 aufgeführt.

Tab. 2.6 Charakteristika der Patienten (Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin wöchentlich) [MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung]

Patient	Geschlecht [F/M]	Alter [Jahre]	Körper- größe [cm]	Körper- gewicht [kg]	KOF [m <sup>2</sup> ]	Anzahl vorheriger Chemo- therapien	Platin- haltige Vorbeh.	Oxali- platin- haltige Vorbeh.	Tumor- entität
1	M	61	167	80	1,9	0	Nein	Nein	Magen- karzinom
2	M	32	k.A.	k.A.	1,8	k.A.	k.A.	k.A.	Krebs unbekannter Primärursache
3	M	63	175	71	1,8	1	Nein	Nein	Kolon- karzinom
4	M	33	183	75	1,8	1	Ja	Nein	NSCLC
5	F	47	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Mamma- karzinom
6	M	47	k.A.	k.A.	k.A.	1	Ja	Nein	Hoden- karzinom
7	M	58	185	70	1,9	0	Nein	Nein	Kolon- karzinom
8	M	30	183	50	1,6	0	Nein	Nein	Kolon- karzinom
<b>MW</b>		47	177	69	1,8				
<b>SD</b>		13	8	13	0,1				
<b>Median</b>		47	179	73	1,8				

k.A. = keine Angabe

KOF = Körperoberfläche

### Therapieplan und Studiendesign

Die Patienten wurden mit verschiedenen oxaliplatinhaltigen Kombinationstherapien behandelt, bei denen Oxaliplatin mit einer Regeldosis von 60 mg/m<sup>2</sup> dosiert wurde. Die Hälfte der Patienten (Pat. 1, 2, 7 und 8) wurde mit einer Kombination aus Oxaliplatin, Calciumfolinat und hochdosiertem Fluorouracil behandelt. Ein Zyklus bestand aus vier wöchentlichen Applikationen gefolgt von einer 14-tägigen Pause. Bei Auftreten von schwerwiegender Toxizität wurde die Applikation von weiteren Kursen verschoben bzw. wurden die Dosen von Fluorouracil und Oxaliplatin für alle nachfolgenden Applikationen um 20 % reduziert.

Das Therapieschema für die Kombination von Oxaliplatin mit Fluorouracil ist in Tab. 2.7 dargestellt.

Tab. 2.7 *Therapieschema mit wöchentlicher Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin*

<b>Arzneistoff</b>	<b>Dosis [mg/m<sup>2</sup>]</b>	<b>Infusionsdauer [h]</b>	<b>Applikation</b>
Oxaliplatin	60	2	Tag 1, 8, 15, 22
Calciumfolinat	500	2	Tag 1, 8, 15, 22
Fluorouracil	2600	22	Tag 1, 8, 15, 22

Bei den anderen Applikationsschemata wurde Oxaliplatin ebenfalls als zweistündige Applikation vor den anderen Zytostatika verabreicht. Die Regeldosis betrug immer 60 mg/m<sup>2</sup> und wurde in wöchentlichem Abstand gegeben.

### **Probenentnahmen**

Den Patienten wurden in einem Behandlungszyklus jeweils sechs Blutproben mit einem Volumen von je ca. 5 mL entnommen. Diese Proben dienten zur Untersuchung der Platin-Pharmakokinetik in Plasma (PL), Ultrafiltrat (UF) und Vollblut (VB) und wurden

- unmittelbar vor Infusionsbeginn und
- 2, 2,5, 3, 4 und 24 h nach Infusionsbeginn entnommen.

Weiterhin wurden drei Proben zur Bestimmung der Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten (LEU) gewonnen:

- vor Infusionsbeginn sowie
- 4 und 24 h nach Infusionsbeginn.

Die zeitliche Abfolge der Zytostatikaapplikationen und der Probenentnahmen werden in Abb. 2.4 veranschaulicht.

Zeit nach Infusionsbeginn [h]	0	2	4	24
<b>Applikation</b>				
Oxaliplatin		■		
Calciumfolinat			■	
Fluorouracil				■
<b>Probenentnahme</b>				
VB, PL, UF				
LEU				

Abb. 2.4 Schematische Darstellung der Zytostatikaapplikationen und der Probenentnahmen

## 2.4.2 Wöchentliche Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

In Zusammenarbeit mit PROF. DR. A. WEHMEIER und FRAU A. JUNKER wurden im SANA KLINIKUM REMSCHEID 16 Patienten untersucht.

Ziel der durchgeführten klinischen Studie "Pharmakologische Untersuchung zu pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Unterschieden von Oxaliplatin in der First- und Second-Line-Therapie" war es, pharmakokinetische Parameter und die Platin-DNA-Adduktbildung als pharmakodynamischen Parameter nach einer Oxaliplatinbehandlung in der Erst- und Zweitlinien-Therapie zu vergleichen<sup>182</sup>. Dabei sollte v.a. die interindividuelle Variabilität hinsichtlich der Pharmakokinetik von Oxaliplatin untersucht werden mit dem Ziel, patientenspezifische Einflussfaktoren zu ermitteln, mit deren Hilfe die Dosierung von Oxaliplatin möglicherweise individualisiert werden kann.

### Patientenkollektiv

In diese Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die im Rahmen ihrer Therapie auch ohne Aufnahme in diese Studie mit Oxaliplatin behandelt worden wären.

Alle Patienten waren an einem metastasierten kolorektalen Karzinom erkrankt. Neben der schriftlichen Einwilligung in die Teilnahme an dieser Studie mussten die Patienten

Kriterien, wie zum Beispiel Alter  $\geq 18$  Jahre, einen Karnofsky-Index von  $\geq 70$  % und eine adäquate, durch Labortests bestätigte Knochenmark-, Leber- und Nierenfunktion erfüllen.

Die Patientencharakteristika der in die Studie aufgenommenen Patienten sind in Tab. 2.8 dargestellt.

Tab. 2.8 Charakteristika der Patienten (Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin wöchentlich) [MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung]

Patient	Ge- schlecht [F/M]	Alter [Jahre]	Körper- größe [cm]	Körper- gewicht [kg]	Körper- oberfläche [m <sup>2</sup> ]	Anzahl vorheriger Chemo- therapien	Platin- haltig	Oxali- platin- haltig
01	M	53	181	63	1,8	0	Nein	Nein
02	F	77	163	73	1,8	1	Nein	Nein
03	M	82	166	86	1,9	2	Nein	Nein
04	M	71	176	87	2,1	0	Nein	Nein
05	F	60	158	58	1,6	4	Ja	Ja
06	F	45	172	49	1,6	1	Nein	Nein
07	M	64	165	60	1,7	0	Nein	Nein
08	M	69	k. A.	k. A.	k. A.	1	Nein	Nein
09	M	60	168	83	1,9	0	Nein	Nein
10	F	63	165	134	2,3	1	Nein	Nein
11	M	67	178	93	2,1	1	Nein	Nein
12	M	62	183	111	2,3	1	Nein	Nein
13	M	66	181	75	2,0	1	Nein	Nein
14	M	76	175	76	1,9	1	Nein	nein
15	F	55	168	62	1,7	3	Nein	Nein
16	M	60	185	61	1,8	0	Nein	Nein
<b>MW</b>		64	172	77	1,9	1		
<b>SD</b>		9	8	23	0,2	1		
<b>Median</b>		64	172	74	1,9	1		

k. A. = keine Angabe

### Studiendesign und Therapieplan

Die Patienten wurden mit einer Kombinationstherapie bestehend aus Oxaliplatin, Calciumfolinat und Fluorouracil behandelt. Die Substanzen wurden nach dem *Büchele*-Schema<sup>183</sup> verabreicht, wie in Tab. 2.9 dargestellt. Nach den vier wöchentlichen Gaben schloss sich ein zweiwöchiges therapiefreies Intervall an; die Behandlung wurde an Tag 36 fortgesetzt. Alle Patienten wurden an einem Tag im ersten und einem Tag im zweiten Behandlungszyklus untersucht.

Tab. 2.9 *Therapieschema mit wöchentlicher Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (sog. Büchele-Schema<sup>183</sup>)*

Arzneistoff	Dosis [mg/m <sup>2</sup> ]	Infusionsdauer [h]	Applikation
Oxaliplatin	50	2	Tag 1, 8, 15, 22
Calciumfolinat	500	2	Tag 1, 8, 15, 22
Fluorouracil	2000	22	Tag 1, 8, 15, 22

### Probenentnahmen

Zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Platin wurden den Patienten innerhalb von 26 h nach Infusionsbeginn in den beiden ersten Behandlungszyklen jeweils 6 Vollblutproben mit einem Volumen von ca. 5 mL entnommen:

- unmittelbar vor Infusionsbeginn,
- 2, 2,5, 3, 4 und 24 h nach Infusionsbeginn.

Weiterhin wurden drei Proben zur Bestimmung der Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten gewonnen:

- vor Infusionsbeginn,
- 4 und 24 h nach Infusionsbeginn.



Eine schematische Übersicht über die Zytostatikaapplikationen und die Probenentnahmen zeigt Abb. 2.5.

Zeit nach Infusionsbeginn [h]	0	2	4	24
<b>Applikation</b>				
Oxaliplatin		■		
Calciumfolinat			■	
Fluorouracil				■
<b>Probenentnahme</b>				
VB, PL, UF				
LEU				

Abb. 2.5 Schematische Darstellung der Zytostatikaapplikationen und Probenentnahmen

### 2.4.3 Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen

In Kooperation mit dem TUMORZENTRUM DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS ESSEN wurden im Rahmen einer klinischen Studie Blutproben von insgesamt 24 Patienten gesammelt und analysiert. Bei dieser Studie handelte es sich um eine monozentrische, nicht-verblindete, nicht-kontrollierte und nicht-randomisierte Phase-I-Studie, bei der als Primärziel das Sicherheitsprofil einer neuen Prüfsubstanz in Kombination mit Oxaliplatin untersucht werden sollte<sup>184</sup>.

#### Patientenkollektiv

Die Patienten, die in diese Untersuchung eingeschlossen wurden, litten an fortgeschrittenen, histologisch gesicherten, soliden Tumoren, für die keine Standardtherapie vorhanden war und für die eine Behandlung mit Oxaliplatin als medizinisch akzeptabel betrachtet wurde.

Für die Aufnahme in die Studie waren ein Alter von mindestens 18 Jahren, eine adäquate, durch Labortests bestätigte Knochenmark-, Leber- und Nierenfunktion, ein ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)-Performance Status von 0, 1 oder 2 und eine Lebenserwartung von mindestens 12 Wochen Voraussetzung. Außerdem mussten

bestimmte Zeitabstände bzw. Auswaschphasen zu vorherigen Therapien vorhanden sein. Für den Fall einer früheren Chemotherapie mit Oxaliplatin betrug der geforderte Abstand drei Monate vor Aufnahme in die Prüfung. Auch Patienten, die während oder innerhalb von drei Monaten nach der Oxaliplatin-Therapie eine Tumorprogression gezeigt hatten, konnten in die Prüfung eingeschlossen werden, wenn der Prüfarzt der Meinung war, dass sie von der Kombinationstherapie Oxaliplatin plus Prüfsubstanz profitieren könnten. Die Charakteristika der in die Studie aufgenommenen Patienten sind in Tab. 2.10 dargestellt.

*Tab. 2.10 Charakteristika der Patienten (Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen) [MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung]*

Patient	Geschlecht [F/M]	Alter [Jahre]	Körpergröße [cm]	Körpergewicht [kg]	KOF [m <sup>2</sup> ]	Anzahl vorheriger Chemo- therapien	Platin- haltige Vorbeh.	Oxali- platin- Vorbeh.	Tumor- entität
01	F	54	168	58	1,7	3	Ja	Ja	Kolorektales Karzinom
02	M	67	175	90	1,9	2	Ja	Nein	Krebs unbekannter Primärursache
03	M	49	186	70	1,9	2	Ja	Nein	Kardia- karzinom
04	M	58	174	62	1,8	4	Ja	Ja	Kolorektales Karzinom
05	M	65	161	71	1,8	1	Ja	Ja	Kolorektales Karzinom
06	M	33	190	84	2,1	3	Ja	Ja	Krebs unbekannter Primärursache
07	M	63	180	80	2,0	5	Ja	Nein	Aderhaut- melanom
08	M	73	170	72	1,8	3	Nein	Nein	Aderhaut- melanom
09	F	54	160	65	1,7	2	Nein	Nein	Aderhaut- melanom
10	M	42	183	78	2,0	1	Nein	Nein	Nieren- karzinom
11	M	66	183	97	2,0	1	Nein	Nein	Nieren- karzinom
12	M	66	167	89	2,0	0	Nein	Nein	Krebs unbekannter Primärursache
13	F	63	159	69	1,7	1	Ja	Nein	Kardia- karzinom
14	M	32	178	67	1,8	3	Ja	Nein	Hodenmisch- tumor

Tab. 2.10 Charakteristika der Patienten; Fortsetzung

Patient	Geschlecht [F/M]	Alter [Jahre]	Körper- größe [cm]	Körper- gewicht [kg]	KOF [m <sup>2</sup> ]	Anzahl vorheriger Chemo- therapien	Platin- haltige Vorbeh.	Oxali- platin- Vorbeh.	Tumor- entität
15	M	64	178	80	2,0	1	Ja	Nein	Oesophagus- karzinom
16	F	68	159	58	1,6	5	Nein	Nein	Kolorektales Karzinom
17	M	70	181	82	2,0	5	Ja	Nein	Plattenepithel- karzinom
18	M	65	176	74	1,8	2	Ja	Nein	Pleura- mesotheliom
19	M	53	169	89	2,0	1	Nein	Nein	Aderhaut- melanom
20	F	46	168	55	1,6	1	Nein	Nein	Nieren- karzinom
21	F	42	166	71	1,8	0	Nein	Nein	Aderhaut- melanom
22	M	40	173	65	1,8	1	Ja	Nein	Aderhaut- melanom
23	F	71	162	80	1,9	4	Ja	Ja	Magen- karzinom
24	F	56	176	106	> 2,0	3	Ja	Ja	Kolorektales Karzinom
<b>MW</b>		57	173	75	1,9	2			
<b>SD</b>		12	9	12	0,2	1			
<b>Median</b>		61	174	72	1,9	2			

KOF = Körperoberfläche

### Therapieplan und Studiendesign

Die Patienten erhielten im Rahmen dieser Studie verschiedene Dosen der peroral applizierbaren Prüfsubstanz und jeweils zwei Zyklen Oxaliplatin (130 mg/m<sup>2</sup>) in Form einer zweistündigen, intravenösen Infusion. Der Zeitabstand zwischen den beiden Oxaliplatin-Zyklen betrug drei Wochen, die Prüfsubstanz wurde ab Tag vier des ersten Zyklus zweimal täglich verabreicht.

### Probenentnahmen

Zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Platin wurden den Patienten innerhalb von 48 h nach Beginn der Oxaliplatininfusion in beiden Behandlungszyklen jeweils 13 Blutproben mit einem Volumen von je ca. 3 mL entnommen:

- vor Beginn,
- 1 h nach Infusionsbeginn (= während der Infusion),
- 2 h nach Infusionsbeginn (= direkt nach Infusionsende) und
- 2,25, 2,5, 2,75, 3, 4, 6, 8, 12, 24 und 48 h nach Beginn der Oxaliplatininfusion.

Bei einigen Patienten fanden weitere Abnahmen einige Tage oder Wochen nach der Oxaliplatininfusion statt, die ebenfalls in die Untersuchung einfließen.

Außerdem wurden für die Untersuchung der Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten 4 Proben mit einem Volumen von je 15 mL zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

- vor Beginn,
- 4, 24 und 48 h nach Infusionsbeginn.

Abb. 2.6 veranschaulicht die Applikation von Oxaliplatin und die Probenentnahmen.

Zeit nach Infusionsbeginn [h]	0	2	4	12	24	48
<b>Applikation</b>						
Oxaliplatin		■				
<b>Probenentnahme</b>						
VB, PL, UF	■	■	■	■	■	■
LEU	■	■	■	■	■	■

Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Oxaliplatinapplikation und der Probenentnahmen

#### 2.4.4 Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle zwei Wochen

Zusammen mit FRAU PROF. DR. S. HEGEWISCH-BECKER aus der KLINIK FÜR INNERE MEDIZIN (ABT. ONKOLOGIE-HÄMATOLOGIE) des UNIVERSITÄTSKLINIKUMS HAMBURG-EPPENDORF wurden innerhalb der Studie "Offene, randomisierte, multizentrische Phase III-Studie: "Alleinige Chemotherapie mit L-OHP und 5-FU/FA versus einer identischen Chemotherapie in Kombination mit Ganzkörper-Hyperthermie bei jedem zweiten Zyklus

(14-tägiges Intervall)<sup>185</sup> 4 Patienten untersucht. Das Ziel dieser Studie, die multizentrisch durchgeführt wurde, war es, den Einfluss der Ganzkörper-Hyperthermie auf eine oxaliplatinhaltige Chemotherapie zu untersuchen. Begleitend dazu wurden die Pharmakokinetik und die Platin-DNA-Adduktbildung untersucht.

### Patientenkollektiv

Es wurden Patienten mit inoperablen (lokal fortgeschrittenen oder metastasierten) kolorektalen Karzinomen aufgenommen, die eine dokumentierte Progression unter oder innerhalb von drei Monaten nach einer hochdosierten Kombinationschemotherapie aus Fluorouracil und Calciumfolinat (*Ardalan*-Schema<sup>54</sup>) oder einer irinotecanhaltigen Chemotherapie gezeigt hatten.

Das Alter der Patienten sollte zwischen 18 und 70 Jahren liegen; ihre Lebenserwartung sollte 12 Wochen übersteigen. Ähnlich wie in den zuvor beschriebenen Studien waren ein ECOG-Status von 0, 1, oder 2, eine adäquate und durch entsprechende Untersuchungen dokumentierte Herz-, Lungen-, Nieren-, Leber- und Knochenmarkfunktion Voraussetzungen für die Aufnahme in diese Studie.

Bei vier Patienten, deren Charakteristika in Tab. 2.11 dargestellt sind, wurden begleitende pharmakokinetische und -dynamische Untersuchungen durchgeführt.

Tab. 2.11 Charakteristika der Patienten (Behandlung mit 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle 2 Wochen) [MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung]

Patient	Geschlecht [F/M]	Alter [Jahre]	Körpergröße [cm]	Körpergewicht [kg]	Körperoberfläche [m <sup>2</sup> ]
01	M	62	167	62	1,7
02	M	61	171	61	1,7
03	M	k.A.	173	90	2,0
04	M	k.A.	190	90	2,2
<b>MW</b>			176	69	1,9
<b>SD</b>			8	9	0,2
<b>Median</b>			176	69	1,9

k.A. = keine Angabe

### Therapieplan und Studiendesign

Die Patienten erhielten eine Kombinationschemotherapie bestehend aus Oxaliplatin, Calciumfolinat und Fluorouracil. Dabei wurden 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin als zweistündige Infusion alle zwei Wochen an den Tagen 1, 15, 29 und 43 appliziert. An den Tagen 15 und 43 wurde die medikamentöse Chemotherapie mit einer Ganzkörperhyperthermie-Behandlung (41 °C, 80 Minuten) kombiniert. Nach Tag 43 schloss sich ein therapiefreies Intervall von drei Wochen an. Das Therapieschema ist in Tab. 2.12 dargestellt.

Tab. 2.12 *Therapieschema mit Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle 2 Wochen*

Arzneistoff	Dosis [mg/m <sup>2</sup> ]	Infusionsdauer [h]	Applikation
Oxaliplatin	85	2	Tag 1, 15, 29, 43
Calciumfolinat	200	1	Tag 1, 15, 29, 43
Fluorouracil	3000	46	Tag 1, 15, 29, 43
in Kombination mit Ganzkörperhyperthermie (41 °C, 80 Minuten)			Tag 15, 43

Die angegebenen Dosierungen wurden bei Auftreten schwerwiegender Toxizitäten (Grad 3 oder 4) reduziert; dabei wurden die Dosen von Fluorouracil um 33 % und von Oxaliplatin um 25 % herabgesetzt. Traten schwere neuropathische Toxizitäten auf, wie zum Beispiel Schmerzen bzw. Funktionseinschränkungen, so wurde die Oxaliplatin-dosis um 25 % bzw. um 50 % herabgesetzt.

### Probenentnahmen

Den Patienten wurden an zwei Behandlungstagen innerhalb eines Zyklus sechs Blutproben entnommen; für die Untersuchung der Pharmakokinetik wurden jeweils 5 mL Vollblut abgenommen und aufgearbeitet. Die Abnahmen erfolgten:

- vor Beginn,
- 2 h nach Infusionsbeginn (= direkt nach Infusionsende) und
- 2,5, 3, 4, und 24 bzw. 48 h nach Beginn der Oxaliplatininfusion.

Die Untersuchungen wurden außer im UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF auch in der MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄTSKLINIK LÜBECK (FRAU DR. A. BAKH-

SHANDEH-BATH) durchgeführt; daher wurden bei den Patienten unterschiedliche "Spätwerte" abgenommen: entweder 24 oder 48 h nach Infusionsbeginn.

Für die Bestimmung der Platin-DNA-Addukte in Leukozyten wurden je 3 Proben zu jeweils 15 mL Vollblut entnommen:

- vor Beginn,
- 4 und 24 bzw. 48 h nach Beginn der Oxaliplatininfusion.

Abb. 2.7 veranschaulicht den Ablauf der Zytostatikaapplikationen und die Probenentnahmen.

Zeit nach Infusionsbeginn [h]	0	2	3	4	24	48
<b>Applikation</b>						
Oxaliplatin		■				
Calciumfolinat			■			
Fluorouracil					■	■
Ganzkörperhyperthermie		■				
<b>Probenentnahme</b>						
VB, PL, UF	■	■	■	■	■	■
LEU	■			■		■

Abb. 2.7 Schematische Darstellung der Zytostatikaapplikationen und der Probenentnahmen

## 2.5 Probengewinnung, -aufarbeitung und -lagerung

Die Blutabnahmen wurden in allen Kliniken aus einem peripheren Zugang oder aus einem doppellumigen zentralen Zugang vorgenommen, um eine Kontamination der Proben mit Oxaliplatin direkt aus der Infusion zu vermeiden. Zusätzlich wurden vor der eigentlichen Probenentnahme jeweils 1 - 2 mL Blut aufgezogen und verworfen. Zur Abnahme wurden Monovetten<sup>®</sup> mit EDTA als Antikoagulans verwendet. Alle Blutproben wurden direkt nach der Abnahme kühl gelagert und innerhalb einer Stunde aufgear-

beitet, um Umverteilungsvorgänge zwischen verschiedenen Blutbestandteilen und das Fortschreiten der Proteinbindung zu unterbinden. Die zur Aufarbeitung erforderlichen Zentrifugationsschritte wurden aus demselben Grund bei 4 °C durchgeführt.

### **2.5.1 Vollblut, Plasma und Ultrafiltrat**

Aus den Blutproben wurden zunächst für die pharmakokinetischen Untersuchungen in Vollblut (VB) bzw. Erythrozyten (ERY), Plasma (PL) und Ultrafiltrat (UF) die entsprechenden Matrices generiert.

- Für Vollblutproben, deren Platinkonzentration auch zur Berechnung der Platin-konzentration in den Erythrozyten benötigt wurde, wurden 2 x 200 µL der Blutprobe aliquotiert.
- Plasma wurde durch Zentrifugation der verbleibenden Blutmenge in der Mono-vette<sup>®</sup> (5 min, 3200 g, 4 °C) erhalten. Es wurden 2 x 200 µL des gewonnenen Plasmas aliquotiert.
- Zur Gewinnung des Ultrafiltrats, wurde ca. 1 mL des zuvor gewonnenen Plasmas in ein Centrisart<sup>®</sup>-Ultrafiltrationssystem (Cut-off 10.000) oder ein Centrifree<sup>®</sup>-Ultrafiltrationssystem (Cut-off 30.000) gegeben und für 20 Minuten bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert. Mindestens 2 x 50 µL des Ultrafiltrats wurden aliquotiert.

Direkt nach der Aufarbeitung wurden die erhaltenen Proben eingefroren und bei -24 °C gelagert.

Der Probentransport von den Kliniken zum Pharmazeutischen Institut in Bonn, wo die weitere Aufarbeitung und quantitative Bestimmung stattfand, erfolgte auf Trockeneis.

### **2.5.2 Leukozyten**

Die Gewinnung von Leukozyten aus den Vollblutproben wurde bereits in Kap. 2.3.1 erläutert.



## 2.6 Klinische Dokumentation

### 2.6.1 Demographische Daten

Individuelle Parameter, wie zum Beispiel Alter, Körperoberfläche (KOF) oder Geschlecht können die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneistoffen beeinflussen. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die untersuchten Parameter charakterisieren zu können, wurden bei allen Patienten das Alter bei Aufnahme in die Studie, die Körpergröße, das Körpergewicht, die Körperoberfläche und das Geschlecht dokumentiert. Außerdem wurden die vorliegende Tumorerkrankung, die Patientenhistorie und dort v.a. das Ausmaß der Vorbehandlung, charakterisiert durch die Anzahl im Vorfeld verabreichter Chemotherapieprotokolle, aufgenommen.

### 2.6.2 Laborparameter

Im Verlauf der Therapie wurde bei den Patienten eine Reihe von Laborwerten routinemäßig überwacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Parameter dokumentiert:

- Hämoglobin [g/dL], Leukozytenzahl [ $\times 10^9/L$ ], Granulozytenzahl [ $\times 10^9/L$ ] und Thrombozytenzahl [ $\times 10^9/L$ ]
- Hämatokrit (Hkt) [%]
- Serumkreatininkonzentration [mg/dL]
- GOT [U/L]; GPT [U/L]; AP [U/L] und Bilirubin [mg/dL].

### 2.6.3 Charakterisierung der Nierenfunktion

Die Nierenfunktion der Patienten wurde anhand der Kreatininclearance ( $Cl_{CR}$ ) [mL/min], die aus der Serumkreatininkonzentration mit Hilfe der Formel nach *Cockcroft und Gault*<sup>186</sup> abgeschätzt wurde, charakterisiert.

$$Cl_{CR,CG} = \frac{(140 - \text{Alter}) \cdot \text{Körpergewicht}}{\text{Serumkreatininkonzentration} \cdot 72} \quad \text{Gl. 2.7}$$

In die Gleichung von *Cockcroft und Gault* (s. Gl. 2.7) geht das Alter [Jahre], das Körpergewicht [kg] und die Serumkreatininkonzentration [mg/dL] ein. Für weibliche Patienten wurde das Ergebnis der Berechnung mit dem Faktor 0,85 multipliziert.

#### 2.6.4 Therapieassoziierte Toxizität

Die therapieassoziierte Toxizität wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand der Common-Toxicity-Criteria (CTC) des National Cancer Institute (NCI) beurteilt. Die unerwünschten Wirkungen der Therapie wurden dabei in 5 Schweregrade unterteilt: 0 = keine, 1 = mild, 2 = mäßig, 3 = ausgeprägt, 4 = lebensbedrohlich.

Hämato-, nephro- und hepatotoxische Effekte wurden mit Hilfe der dokumentierten Laborparameter erfasst und beurteilt. Die Einteilung bzw. die Grenzbereiche dieser Skala wurden an die Normbereiche des jeweiligen Labors angepasst (s. Anhang A).

Neben diesen bei fast allen antineoplastischen Therapien auftretenden unerwünschten Wirkungen zeigen sich bei oxaliplatinhaltigen Chemotherapien sensorische Neuropathien. Diese äußern sich in Form von Dysästhesien oder Beeinträchtigung der feinmotorischen Fähigkeiten und sind häufig dosislimitierend.

Art, Schwere und Dauer der Beschwerden wurden in den verschiedenen klinischen Zentren durch eine Patientenbefragung erfasst. Zusätzlich wurde die Einschätzung über Dauer und Grad der neurotoxischen Effekte seitens der Onkologen dokumentiert und in die Bewertung einbezogen. Folgende Parameter wurden evaluiert:

- Art und Schweregrad der Symptome (Parästhesien, Dysästhesien, laryngopharyngeale Dysästhesien)
- Dauer der Beschwerden
- Einfluss von Kälteexposition auf Art und Schweregrad der Beschwerden
- Beeinflussung von Körperfunktionen/feinmotorischen Tätigkeiten (z.B. Schreiben)

Die CTC-Kriterien und auch die WHO-Skala für Neurotoxizität sind für die Bewertung der oxaliplatininduzierten Neuropathie nur wenig geeignet, da sie sich an den Sehnenreflexen und der zunehmenden motorischen Schwäche bis hin zur Paralyse orientieren. Zudem wird keine Aussage über die Dauer der Beschwerden getroffen.

Daher wurde von *Lévi et al.*<sup>187</sup> die WHO-Skala zur Charakterisierung der oxaliplatin-spezifischen Neuropathie modifiziert. Diese Einteilung wurde im Rahmen dieser Arbeit herangezogen:

- Grad 0: Keinerlei Beschwerden
- Grad 1: Periphere Parästhesien und/oder Dysästhesien (durch Kälte induziert oder verstärkt), Dauer weniger als sieben Tage
- Grad 2: Periphere Parästhesien und/oder Dysästhesien, Dauer 8 - 14 Tage
- Grad 3: Parästhesien und/oder Dysästhesien mit unvollständiger Erholung zwischen den Zyklen bzw. innerhalb von 21 Tagen
- Grad 4: Parästhesien und/oder Dysästhesien mit beginnender Funktionseinschränkung

Die Einteilung von *Levi et al.* wurde im Rahmen einer Studie entwickelt, in der die Patienten alle 3 Wochen mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt wurden. Für die Evaluation der in dieser Arbeit untersuchten Patienten, die wöchentliche Gaben von Oxaliplatin erhielten, wurde die Einteilung daher leicht modifiziert:

- Grad 0: Keinerlei Beschwerden
- Grad 1: Periphere Parästhesien und/oder Dysästhesien, die durch Kälte induziert oder verstärkt wurden
- Grad 2: Periphere Parästhesien und/oder Dysästhesien, ohne Kälte
- Grad 3: Schwere Parästhesien und/oder Dysästhesien
- Grad 4: Parästhesien und/oder Dysästhesien mit beginnender Funktionseinschränkung

### 2.6.5 Tumoransprechen

Die Beurteilung des Ansprechens auf die verabreichte Therapie wurde durch die behandelnden Onkologen in der Regel nach dem zweiten Behandlungszyklus vorgenommen; die Bewertung erfolgte nach WHO- bzw. RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)-Kriterien. Beide Einteilungen teilen den Behandlungserfolg in verschiedene Kategorien ein, wobei sie sich an Parametern wie dem Ausmaß der Tumorrückbildung und der Remissionsdauer orientieren.

Folgende Kategorien werden unterschieden<sup>188</sup>:

*Komplette Remission (CR)*

Vollständige Rückbildung aller messbaren bzw. nicht messbaren, aber evaluablen Tumorbefunde, die durch zwei mindestens vier Wochen auseinander liegende Kontrolluntersuchungen dokumentiert werden.

*Partielle Remission (PR)*

Größenabnahme sämtlicher evaluablen Tumorbefunde um  $\geq 50\%$  für mindestens vier Wochen, ohne dass neue Tumormanifestationen auftreten und ohne dass irgendein Tumorbefund eine Progression zeigt.

*"No Change" (NC)*

Keine Größenänderung der Tumorparameter für mindestens vier Wochen oder Tumorreduktion um weniger als 50% oder Größenzunahme um  $\leq 25\%$ .

Der „No Change“ (NC)-Status wird unterteilt in:

*"Minor Response" (MR)*

Tumorrückbildung  $> 25\%$  und  $< 50\%$  des Ausgangsbefundes, d.h. die Kriterien einer partiellen Remission nicht erfüllend, und

*"Stable disease" (SD)*

Tumorrückbildung  $< 25\%$ , gleich bleibender Befund oder Progression  $\leq 25\%$ .

*"Progressive Disease" (PD)*

Auftreten neuer Tumorstellen oder mehr als 25 %-ige Größenzunahme der Tumorstellen in einem oder mehreren Herden.

## 2.7 Pharmakokinetische Datenanalyse

Aus den erhaltenen Konzentrations-Zeit-Verläufen in Vollblut, Erythrozyten, Plasma und Ultrafiltrat wurden für jeden Patienten die individuellen pharmakokinetischen Parameter (Fläche unter der Kurve, Clearance, Verteilungsvolumen und Halbwertszeit) berechnet. Auch der zeitliche Verlauf der Platin-Nukleotid-Verhältnisse in Leukozyten wurde anhand der erhaltenen Fläche unter der Kurve charakterisiert.

Für die Abschätzung der Parameter wurden sowohl modellunabhängige als auch modellabhängige Datenanalysen durchgeführt<sup>189</sup>.

### 2.7.1 Modellunabhängige Datenanalyse

Aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen wurden zunächst die maximalen Konzentrationen ( $C_{\max}$ ) und die Zeitspanne, bis diese auftraten ( $t_{\max}$ ), abgelesen.

Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ( $AUC_{0-24\text{ h}}$ ,  $AUC_{0-48\text{ h}}$ ) vom Infusionsbeginn bis zu 24 bzw. 48 h nach Infusionsbeginn sowie die Fläche unter der Addukt-kurve (AUA) wurden mit Hilfe der linearen Trapezregel bestimmt.

Die Fläche unter der Kurve wird dazu in einzelne Trapeze eingeteilt, deren Flächen berechnet und diese schließlich addiert. Die AUC vom ersten ( $C_0$ ,  $t_0$ ) bis zum letzten Messwert ( $C_z$ ,  $t_z$ ) kann über die einzelnen Trapezflächen nach folgender Formel ermittelt werden:

$$AUC_{0-t_z} = \sum_{i=1}^z \frac{(C_{i-1} + C_i)}{2} \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad \text{Gl. 2.8}$$

### 2.7.2 Modellabhängige Datenanalyse

Die Abschätzung der individuellen pharmakokinetischen Parameter erfolgte anhand von Kompartiment-Modellen. Kompartimente sind definiert als fiktive Verteilungsräume im Körper, in denen sich ein Arzneistoff spontan und homogen verteilt. Man unterscheidet das *zentrale* Kompartiment (z.B. Blut und stark perfundierte Areale), in das der Arzneistoff aufgenommen und aus dem er eliminiert wird, von den *peripheren* Kompartimenten (z.B. weniger gut durchblutete Körperareale wie Fettgewebe oder Haut), in die der Arzneistoff aus dem zentralen Kompartiment aufgenommen werden kann.

Der Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten sowie die Aufnahme bzw. Elimination aus dem zentralen Kompartiment werden durch Geschwindigkeitskonstanten  $k_x$  charakterisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Analyse das Ein-, Zwei- und das Drei-Kompartiment-Modell (s. Abb. 2.8) verwendet.

Für die Invasionskinetik wurde eine Kinetik 0. Ordnung angenommen, da die Applikation als Infusion mit konstanter Infusionsgeschwindigkeit  $r_0$  erfolgte. Für Verteilung und Elimination wurde eine Kinetik 1. Ordnung angenommen.

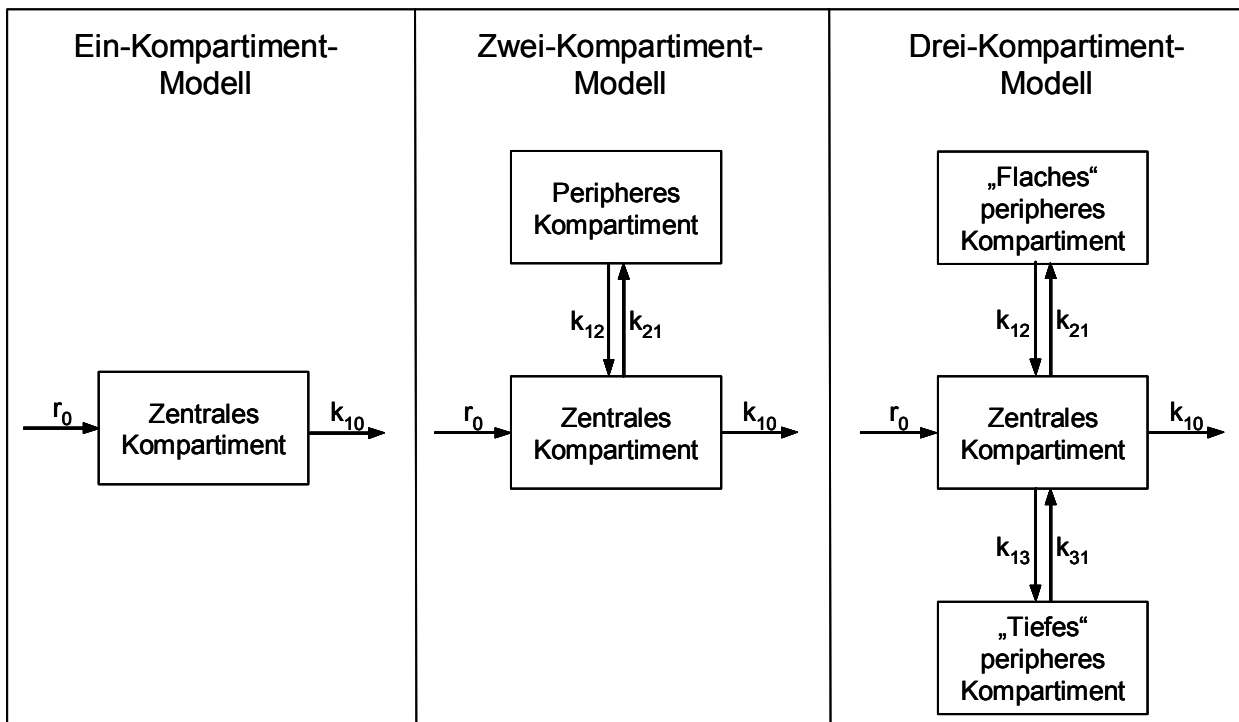


Abb. 2.8 Schematische Darstellung des Ein-, Zwei- und Dreikompartiment-Modells nach Gabe einer Kurzinfusion

Für alle Patienten lagen genügend Messpunkte vor, so dass die pharmakokinetischen Parameter nur aufgrund der eigenen Messwerte des jeweiligen Patienten bestimmt werden konnten. Die Berechnungen wurden mit Hilfe der validierten Software WinNonlin<sup>®</sup>, Version 4.0 (Pharsight Corporation, Kalifornien) durchgeführt. Die modellabhängige Auswertung umfasste folgende Schritte:

- Auswahl der adäquaten pharmakokinetischen Kompartiment-Modelle
- Abschätzung von Initialwerten
- Kurvenanpassung (Curve Fitting)
- Modellvergleich
- Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

### Auswahl der adäquaten pharmakokinetischen Kompartiment-Modelle

Zunächst wurden die Konzentrations-Zeit-Profile für jede untersuchte Matrix im halb-logarithmischen Maßstab aufgetragen, um den Phasenverlauf visuell zu beurteilen. Nach Auswahl eines Modells wurde eine Kurvenanpassung durchgeführt. Wenn mehrere Modelle in Frage kamen, wurde nach Berechnung der Modellparameter die Güte der Anpassung mit dem alternativen Modell verglichen (s. Modellvergleich) und das am

besten geeignete Modell für die weitere Auswertung verwendet. Es zeigte sich, dass je nach Matrix und Probensammeldauer ein offenes Ein-, Zwei- oder Drei-Kompartiment-Modell zugrunde gelegt werden konnte. Die Modellgleichungen zur Beschreibung der Konzentrationen (C) in Abhängigkeit von der Zeit (t) nach Gabe einer Infusion für diese drei Modelle lauten<sup>190</sup>:

$$C = \frac{r_0}{CL} \cdot (1 - e^{-\lambda_1 \cdot T}) \cdot e^{-\lambda_1 \cdot (t-T)} \quad \text{Gl. 2.9}$$

$$C = \frac{r_0}{V_c} \cdot \left( \frac{(1 - e^{-\lambda_1 \cdot T}) \cdot (k_{21} - \lambda_1)}{\lambda_1 \cdot (\lambda_1 - \lambda_2)} \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + \frac{(1 - e^{-\lambda_2 \cdot T}) \cdot (k_{21} - \lambda_2)}{\lambda_2 \cdot (\lambda_2 - \lambda_1)} \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \right) \quad \text{Gl. 2.10}$$

$$C = \frac{r_0}{V_c} \cdot \left( \frac{(1 - e^{-\lambda_1 \cdot T}) \cdot (k_{21} - \lambda_1) \cdot (k_{31} - \lambda_1)}{-\lambda_1 \cdot (\lambda_2 - \lambda_1) \cdot (\lambda_3 - \lambda_1)} \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} \right. \\ \left. + \frac{(1 - e^{-\lambda_2 \cdot T}) \cdot (k_{21} - \lambda_2) \cdot (k_{31} - \lambda_2)}{-\lambda_2 \cdot (\lambda_1 - \lambda_2) \cdot (\lambda_3 - \lambda_2)} \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \right. \\ \left. + \frac{(1 - e^{-\lambda_3 \cdot T}) \cdot (k_{21} - \lambda_3) \cdot (k_{31} - \lambda_3)}{-\lambda_3 \cdot (\lambda_1 - \lambda_3) \cdot (\lambda_2 - \lambda_3)} \cdot e^{-\lambda_3 \cdot t} \right) \quad \text{Gl. 2.11}$$

T: Infusionsdauer

t: Zeit, die seit Infusionsbeginn vergangen ist

r<sub>0</sub>: Infusionsgeschwindigkeit (Arzneistoffmenge pro Zeit)

CL: Clearance

k<sub>x</sub>: Mikrokonstanten

λ<sub>i</sub>: Hybridkonstanten

V<sub>c</sub>: Volumen im zentralen Kompartiment

### Abschätzung von Initialwerten und Kurvenanpassung (Curve Fitting)

Für die Anpassung der o.g. Modellgleichungen an den experimentell ermittelten Konzentrations-Zeit-Verlauf wurde eine Kurvenanpassung (Curve Fitting) durchgeführt, bei dem es sich mathematisch um eine nicht-lineare Regression handelt. Für das Curve Fitting müssen Initialparameter für die Modellparameter (C<sub>i</sub>, λ<sub>i</sub>) abgeschätzt werden. Das Programm WinNonlin<sup>®</sup> ermöglicht die Optimierung der Modellgleichung mit Initialwerten, die durch den Anwender vorgegeben werden, kann die nötigen Initialwerte aber auch eigenständig mit Hilfe des Abschälverfahrens (Curve Stripping) berechnen. Für diese Untersuchung wurden die durch WinNonlin<sup>®</sup> berechneten Initialwerte eingesetzt und dann schrittweise optimiert, bis eine minimale Abweichung zwischen gemessenen

Konzentrationen ( $C_i$ ) und den über die Modellgleichung berechneten Konzentrationen ( $\hat{C}_i$ ) erreicht wurde. Dieser Optimierungsprozess wurde in einzelnen Iterationen nach dem Algorithmus von Gauss-Newton (mod. nach Levenberg und Hartley) fortgesetzt, bis das Konvergenzkriterium (relative Veränderungen zwischen den einzelnen Schritten  $< 0,01\%$ ) erfüllt war. Die Güte der Kurvenanpassung wurde über die Summe der Abweichungsquadrate (least squares, LS) beurteilt, die minimal werden sollte:

$$LS = \sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2 \quad \text{Gl. 2.12}$$

n: Anzahl der Messwerte

Um die Abhängigkeit des absoluten analytischen Fehlers von unterschiedlich hohen Konzentrationen zu berücksichtigen, wurde eine Wichtung vorgenommen. Es wurden die Wichtungsfaktoren  $W_i = 1/C_i$  und  $W_i = 1/C_i^2$  geprüft. Unter Berücksichtigung der Wichtungsfaktoren ergibt sich für die Beurteilung der Güte der Anpassung somit folgende Gleichung (WLS = Weighted least squares):

$$WLS = \sum_{i=1}^n W_i (C_i - \hat{C}_i)^2 \quad \text{Gl. 2.13}$$

n: Anzahl der Messwerte

### Modellvergleich

Die vorhandenen Datensätze wurden mit verschiedenen Modellen und Wichtungsfaktoren analysiert. Als objektive Kriterien für die Güte der einzelnen durchgeführten Kurvenanpassungen wurden das Akaike- (AIC) Informationskriterium<sup>191</sup> und das Schwarz-Kriterium (SC)<sup>192</sup> herangezogen. Diese Kriterien berücksichtigen die Güte der Anpassung (WLS) und die Anzahl der Parameter des verwendeten Kompartiment-Modells. Je kleiner der AIC- bzw. der SC-Wert, desto besser eignet sich das Modell zur mathematischen Beschreibung des Datensatzes.

$$AIC = n \cdot \ln WLS + 2k \quad \text{Gl. 2.14}$$

$$SC = n \cdot \ln WLS + \ln(n \cdot k) \quad \text{Gl. 2.15}$$

n: Anzahl der Messwerte

k: Anzahl der Modellparameter



### Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Im letzten Schritt wurden auf der Basis der abgeschätzten Modellparameter  $C_i$  und  $\lambda_i$  und der verabreichten Platindosis, die nach Gl. 2.16 bestimmt wurde, die Sekundärparameter berechnet.

$$\text{Platindosis [mg]} = \frac{\text{Oxaliplatindosis [mg]}}{M_r(\text{Oxaliplatin})} \cdot A_r(\text{Platin}) \quad \text{Gl. 2.16}$$

$$M_r(\text{Oxaliplatin}) = 397,3$$

$$A_r(\text{Pt}) = 195,1$$

Die Arzneistoffexposition wurde durch die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the curve, AUC) charakterisiert.

Als Maß für die Eliminationsleistung des Körpers wurde die Clearance (CL) herangezogen. Sie beschreibt das Volumen, das in einer bestimmten Zeiteinheit vom Arzneistoff befreit wird. Die Gesamtkörperclearance, setzt sich additiv aus den Clearances der einzelnen Eliminationsorgane zusammen. Die Eliminationsgeschwindigkeit wurde durch die Bestimmung der Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ), der Zeitspanne, innerhalb der die Konzentration auf die Hälfte des Ausgangswerts abnimmt, charakterisiert.

Das Verteilungsvolumen ( $V$ ) ist eine fiktive Größe, die in den seltensten Fällen mit dem tatsächlichen Volumen übereinstimmt. In dieser Arbeit wurde das Verteilungsvolumen im Steady-State ( $V_{ss}$ ) berechnet; dieses beschreibt die Verteilung des Arzneistoffs, wenn sich die Konzentrationen zwischen den betrachteten Kompartimenten im Gleichgewichtszustand (Steady state, ss) befinden.

In die Berechnung des  $V_{ss}$  geht die mittlere Verweildauer (Mean residence time, MRT) eines intakten Arzneistoffmoleküls im Organismus ein.

Die Formeln zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter sind Tab. 2.13 in zusammengefasst.

Tab. 2.13 Formeln zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Parameter	Abkürzung	Gleichung	
Fläche unter der Kurve	AUC	$AUC_{\infty} = \sum_{i=1}^z \frac{C_i}{\lambda_i}$	Gl. 2.17
Clearance	CL	$CL = \frac{D}{AUC_{\infty}}$	Gl. 2.18
Mittlere Verweildauer	MRT	$MRT = \frac{\sum_{i=1}^z \frac{C_i}{\lambda_i^2}}{AUC_{\infty}}$	Gl. 2.19
Verteilungsvolumen im Steady-State	$V_{ss}$	$V_{ss} = CL \cdot MRT$	Gl. 2.20
Halbwertszeit	$t_{1/2}$	$t_{1/2_i} = \frac{\ln 2}{\lambda_i}$	Gl. 2.21

## 2.8 Statistik

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Excel<sup>®</sup> 2002 und SPSS<sup>®</sup> 11.0 für Windows<sup>193</sup>.

### 2.8.1 Deskriptive Statistik

Zur zusammenfassenden Darstellung der Daten wurden folgende Lokalisations- und Dispersionsmaße herangezogen:

Median ( $\tilde{x}$ ):

Der Median ist derjenige Wert einer Verteilung unter- und oberhalb dessen 50 % der Messwerte liegen.

Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ ):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Gl. 2.22

$$\text{Standardabweichung (SD):} \quad \text{SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Gl. 2.23}$$

$$\text{Varianz (V):} \quad V = \text{SD}^2 \quad \text{Gl. 2.24}$$

$$\text{Relative Standardabweichung (RSD):} \quad \text{RSD [\%]} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 2.25}$$

$x_i$ : Messwert

$n$ : Anzahl der Messungen

## 2.8.2 Beurteilende Statistik

Mit Hilfe der Teststatistik wird beurteilt, welche von zwei gegensätzlichen Hypothesen (Nullhypothese oder Alternativhypothese) über die Grundgesamtheit von Messwerten angenommen werden kann. Je nach Fragestellung und Beschaffenheit der Messwerte wurde ein entsprechender statistischer Test ausgewählt und die jeweilige Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) berechnet, mit der die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird. Das Ergebnis wurde als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag ( $p < 0,05$ ). Bei Irrtumswahrscheinlichkeiten  $p < 0,01$  lag ein hoch signifikantes, bei  $p < 0,001$  ein höchst signifikantes Ergebnis vor. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tests werden im Folgenden kurz erläutert.

### Prüfung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität

Zunächst wurden die zu untersuchenden Variablen auf Normalverteilung geprüft. Dazu wurde bei einem Stichprobenumfang von unter 50 Werten der *Shapiro-Wilk*-Test angewandt. Bei größerem Stichprobenumfang wurde der *Kolmogorov-Smirnov*-Test durchgeführt. Ein weiteres wichtiges Merkmal einer Verteilung im Hinblick auf die Auswahl eines statistischen Tests für den Gruppenvergleich ist die Varianzhomogenität; diese wurde mit Hilfe des *Levene*-Tests überprüft.

## Gruppenvergleich

Zur Beurteilung, ob sich Gruppen hinsichtlich bestimmter Merkmale signifikant unterscheiden, wurden verschiedene statistische Tests herangezogen. Der jeweilige Test wurde in Abhängigkeit von der Skalierung und Verteilung der zu untersuchenden Parameter ausgewählt. Dabei wurde weiterhin unterschieden, ob es sich um abhängige oder unabhängige Variablen handelte, und wie viele Gruppen miteinander verglichen werden sollten.

Die für intervallskalierte und normalverteilte Variablen durchgeführten parametrischen Tests sind in Tab. 2.14 aufgeführt.

Tab. 2.14 Testverfahren für intervallskalierte und normalverteilte Variablen

Anzahl der Stichproben	Abhängigkeit	Test
2	unabhängig	t-Test nach Student
2	abhängig	t-Test für abhängige Stichproben
> 2	unabhängig	einfache Varianzanalyse
> 2	abhängig	einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen

Bei ordinalskalierten Werten bzw. nicht-normalverteilten intervallskalierten Variablen wurden die in Tab. 2.15 genannten nicht-parametrischen Tests durchgeführt. Bei diesen wurden nicht die Messwerte selbst, sondern deren Rangplätze für die Berechnung herangezogen.

Tab. 2.15 Testverfahren für ordinalskalierte oder nicht-normalverteilte intervallskalierte Variablen

Anzahl der Stichproben	Abhängigkeit	Test
2	unabhängig	U-Test nach Mann und Whitney
2	abhängig	Wilcoxon-Test
> 2	unabhängig	H-Test nach Kruskal und Wallis
> 2	abhängig	Friedman-Test

## Korrelationsanalyse

Bei einer Korrelationsanalyse wird die Existenz, Stärke und Richtung eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen untersucht. Die Berechnung gründet sich auf Wertepaare, die aus den zugrunde liegenden abhängigen Stichproben gebildet werden. Die Stärke des Zusammenhangs wird mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten  $r$  charakterisiert, der Werte zwischen  $-1$  und  $+1$  annehmen kann. Liegt ein starker Zusammenhang vor, so ist  $r = 1$ ; existiert gar kein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen, so ist  $r = 0$ . Negative Korrelationskoeffizienten deuten auf einen gegenläufigen Zusammenhang hin.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten hängt vom Skalenniveau und der Verteilung der zu untersuchenden Variablen ab. Bei intervallskalierten und normalverteilten Variablen wurde die Korrelation nach *Pearson*, bei mindestens einer ordinalskalierten oder nicht-normalverteilten Variable wurde die Rangkorrelation nach *Kendall* berechnet.

## Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse quantifiziert den Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variablen. Sie dient dazu, Zusammenhänge zu erkennen und die Art des Zusammenhangs zu erklären sowie den Wert der abhängigen aus den Werten der unabhängigen Variablen vorherzusagen. Mit Hilfe einer einfachen linearen Regressionsanalyse wird eine Gleichung ermittelt, die den linearen Zusammenhang der unabhängigen Variablen  $x$  und dem abhängigen Parameter  $y$  beschreibt.

$$y = a \cdot x + b$$

Gl. 2.26

- a: Steigung der Regressionsgleichung
- b: Ordinatenabschnitt der Regressionsgleichung

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Quantifizierung von Platin in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut

Zur Quantifizierung von Platin wurde eine atomabsorptionsspektrometrische Methode etabliert, mit der die Bestimmung in unterschiedlichen Matrices (Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten) möglich ist. Es wurde die Graphitrohrfentechnik verwendet, die im Vergleich zur Flammentechnik niedrigere Bestimmungsgrenzen erlaubt, da sie eine quantitative Ausnutzung des Probenvolumens sowie längere Verweilzeiten der Atome im Strahlengang gewährleistet. Bei der Methodenetablierung wurden in der Literatur beschriebene Methoden<sup>149,170</sup> modifiziert und an die Aufgabenstellung dieser Arbeit angepasst sowie gemäß internationaler Richtlinien<sup>172,174</sup> validiert.

#### 3.1.1 Messbedingungen und Temperaturprogramme

Ausgehend von dem in Tab. 3.1 beschriebenen Temperaturprogramm wurden die Veraschungstemperaturen und -dauern für die zu vermessenden Matrices hinsichtlich der Höhe des Grundrauschens für die platinfreie, aufgearbeitete Matrix optimiert. Außerdem wurde eine möglichst vollständige Abtrennung von Matrixbestandteilen vor der Messphase angestrebt.

Für jede Matrix wurden zwei Konzentrationsbereiche getrennt betrachtet; diese unterschieden sich nicht nur in den Platinkonzentrationen, sondern auch im Anteil an potenziell störenden Matrixbestandteilen. Besonders die Proben des niedrigen Konzentrationsbereichs jeder Matrix besaßen ein ungünstiges Element-Matrix-Verhältnis.

Das Temperaturprogramm nach *Lange und Projahn*<sup>170</sup> war für die Messung von Ultrafiltratproben aller untersuchten Konzentrationsbereiche und für Plasmaproben des hohen Konzentrationsbereichs geeignet. Es wurden für diese Matrices Spektrogramme erhalten, die keine störenden Peaks in der Messphase zeigten. Dies geht aus den Abbildungen 3.5 - 3.7 Teil A hervor, die repräsentative Spektrogramme von platinfreiem, aufgearbeitetem Plasma bzw. Ultrafiltrat zeigen.

Tab. 3.1 Temperaturprogramm nach Lange und Projahn<sup>170</sup>

Schritt	Phasen	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Argonstrom [L/min]	Signal- aufnahme
1	Trocknung	95	5,0	3	nein
2		110	60,0	3	nein
3		120	10,0	3	nein
4	Vorveraschung	650	15,0	3	nein
5		650	20,0	3	nein
6	Veraschung	1300	10,0	3	nein
7		1300	2,0	3	nein
8		1300	2,0	0	nein
9	Atomisierung	2700	0,7	0	ja
10		2700	2,0	0	ja
11	Reinigung	2700	2,0	3	nein

\* Unter "Dauer" wurden die Zeitspannen angegeben, nach deren Ablauf die zugehörige Temperatur erreicht war. Wiederholung einer Temperaturstufe (z.B. 650 °C) bedeutet, dass diese Temperatur für die angegebene Dauer gehalten wurde.

Für eine Plasmaprobe der Konzentration 1200 ng/mL, die vor ihrer Messung mit Triton-Lösung im Verhältnis 1 : 40 auf eine Platinendkonzentration von 30 ng/mL verdünnt wurde, wurde das Spektrogramm aus Abb. 3.1 erhalten. Dargestellt sind der letzte Teil der Veraschungsphase (1300 °C) und die Atomisierungsphase (2700 °C), die 124 s nach Beginn der Messung einsetzt.

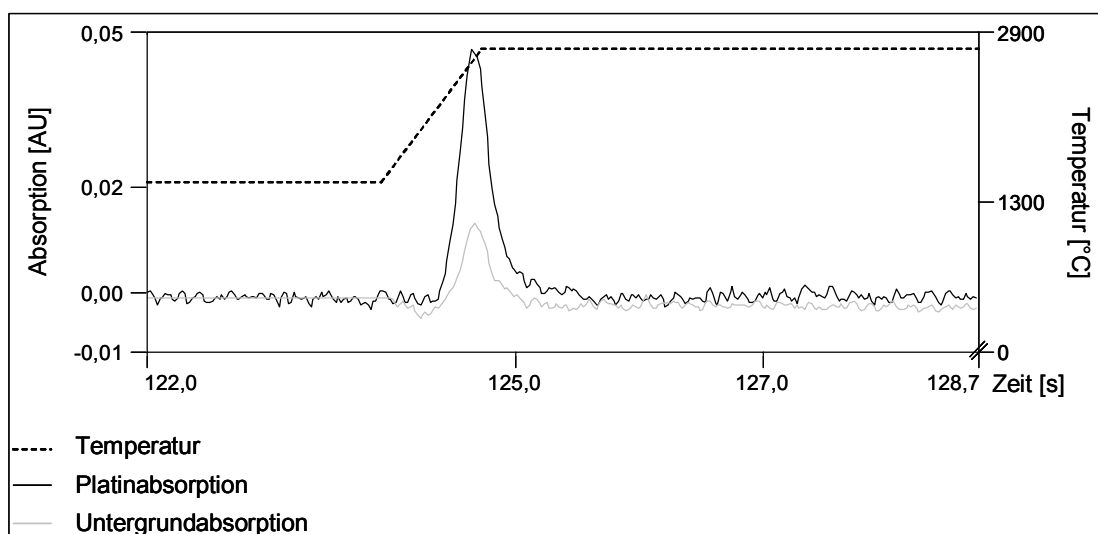


Abb. 3.1 Repräsentatives Spektrogramm einer Plasmaprobe der Konzentration 1200 ng/mL (30 ng/mL nach Aufarbeitung s. Text)

Man kann davon ausgehen, dass Matrixbestandteile vor der Atomisierungsphase nahezu vollständig entfernt wurden. Noch vorhandene Störelemente wurden durch die Untergrundkorrektur unter Ausnutzung des Zeeman-Effekts (s. Kap. 2.2.1; hellgraue Linie) eliminiert. Die schwarze Linie stellt somit die um die unspezifische Absorption korrigierte Platinabsorption dar.

Für Ultrafiltratproben der beiden Konzentrationsbereiche wurden entsprechende Spektrogramme erhalten.

Für Matrices mit höherem Anteil an Begleitstoffen, wie zum Beispiel Vollblut- oder Plasmaproben mit niedrigen Platinkonzentrationen, war das Programm nicht geeignet. Es wurden hohe Untergrundabsorptionen und hohe Absorptionen der Leerwerte erhalten, die darauf hinwiesen, dass die Begleitstoffe der Matrix nicht vollständig abgetrennt wurden. Wie in Abb. 3.2 deutlich wird, zeigte sich beim Übergang in die Atomisierungsphase ein deutliches Untergrundsignal. Dies deutet darauf hin, dass während der Vorveraschung und dem ersten Teil der Veraschungsphase Matrixbestandteile nicht vollständig entfernt werden konnten und diese erst beim Übergang zu den höheren Atomisierungstemperaturen verascht wurden.

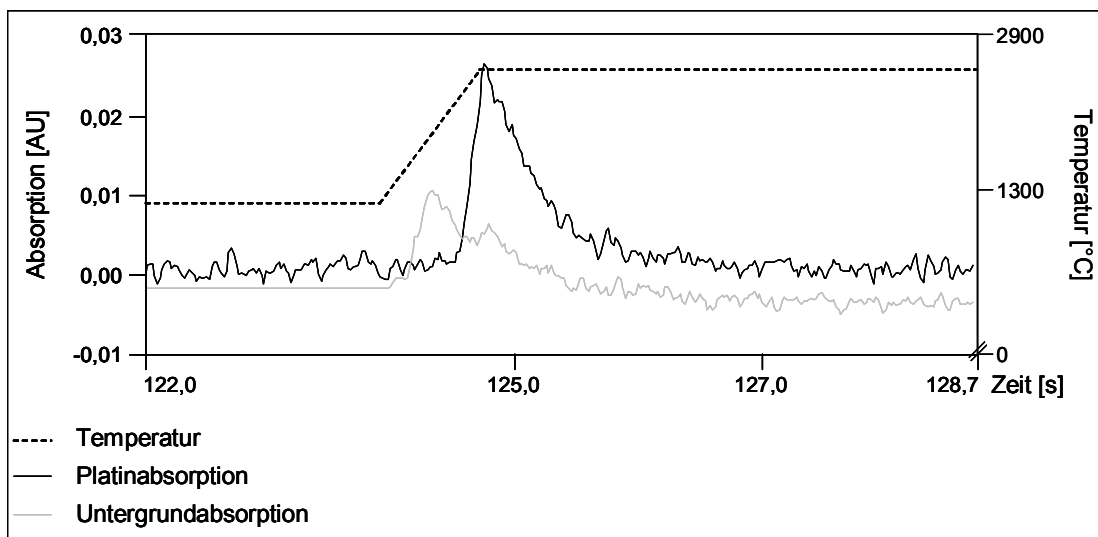


Abb. 3.2 Repräsentatives Spektrogramm einer Plasmaprobe der Konzentration 120 ng/mL (30 ng/mL nach Aufarbeitung)

Vergleicht man die erhaltenen Signalhöhen beider Proben (1200 bzw. 120 ng/mL) miteinander, muss beachtet werden, dass die Proben nach ihrer Aufarbeitung dieselbe Endkonzentration von 30 ng/mL aufwiesen. Es fällt auf, dass für die Probe des niedri-



gen Plasmakonzentrationsbereichs ein vergleichsweise flacher und breiter Peak erhalten wurde.

Das Signal-Rausch-Verhältnis war für diese Matrix sehr ungünstig, so dass eine zuverlässige Quantifizierung v.a. im Bereich der Bestimmungsgrenze mit diesem Programm mit der erforderlichen Richtigkeit und Präzision nicht möglich gewesen wäre.

Daher wurden für die Bestimmung in den Matrizes mit hohem Anteil an Begleitstoffen die Veraschungstemperatur und zum Teil auch die Veraschungsdauer erhöht. Für Vollblutproben im hohen Konzentrationsbereich reichte eine Steigerung der Temperatur um 200 °C aus, um Leerwerte zu erhalten, deren Absorptionen im Bereich der Ultrafiltratproben bzw. der Plasmaproben des hohen Konzentrationsbereichs lagen. Bei den niedrig konzentrierten Plasma- und Vollblutproben war der Einfluss auf die Signalhöhen durch die Begleitstoffe am stärksten ausgeprägt. Um dort die Absorptionen der Leerwerte und des Untergrunds abzusenken und die Höhe der Untergrundsignale während der Messphase möglichst gering zu halten, wurde die Veraschungstemperatur auf 1700 °C und die Veraschungsdauer auf 7 s erhöht. Daraufhin wurden schmale hohe Signale erhalten, wie aus Abb. 3.3 ersichtlich ist, die das Spektrogramm derselben Probe aus Abb. 3.2 mit optimiertem Temperaturprogramm zeigt.

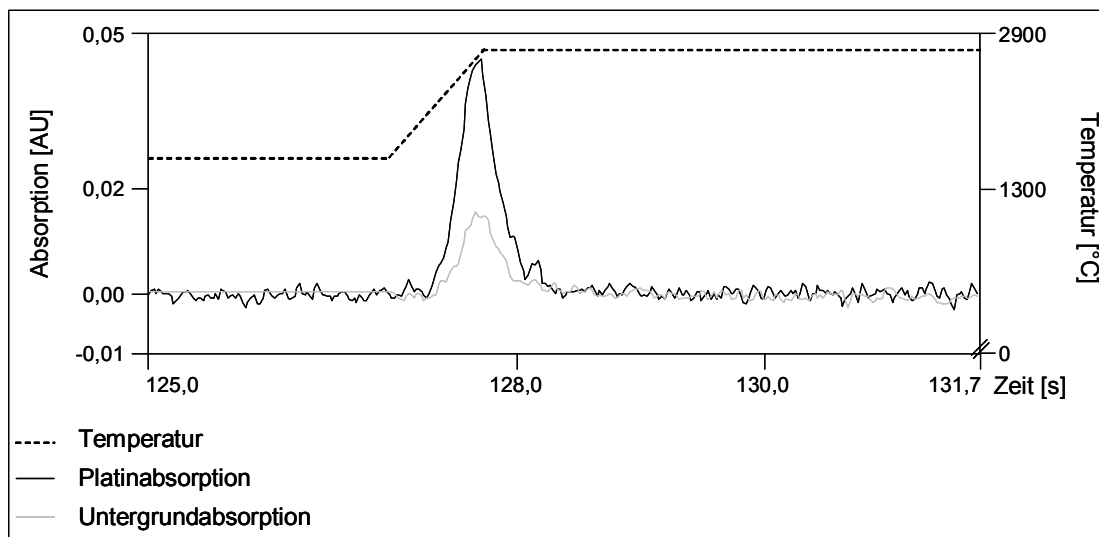


Abb. 3.3 Repräsentatives Spektrogramm einer Plasmaprobe der Konzentration 120 ng/mL (30 ng/mL nach Aufarbeitung) nach Anwendung des optimierten Temperaturprogramms

Bei noch stärkerer Erhöhung der Temperaturen ließen sich zwar störende Matrixbestandteile noch effektiver abtrennen, allerdings wirkte sich die weitere Temperatur-

erhöhung ungünstig auf die Platinabsorptionen aus, da diese bei Veraschungstemperaturen oberhalb 1700 °C eine deutliche Abnahme zeigten. Außerdem wurde die Lebensdauer der Graphitrohre durch Anwendung noch höherer Temperaturen stark herabgesetzt.

Die gewählten Temperaturprogramme stellen somit einen Kompromiss zwischen möglichst vollständiger Abtrennung der Matrix einerseits und möglichst geringem Verlust von Platin durch Verdampfen vor der Messphase andererseits dar.

### 3.1.2 Probenaufarbeitung

Aufgrund der Selektivität der Atomabsorptionsspektrometrie ist es nicht notwendig, eine Extraktion des Analyten durchzuführen. Wie in Kap. 3.1.1 dargestellt, können störende Begleitstoffe durch geeignete Temperaturprogramme entfernt und Störungen bzw. Interferenzen bei der Analyse vermieden werden. Allerdings können biologische Flüssigkeiten aufgrund ihrer Viskosität und Oberflächenspannung nur mit geringer Präzision von der Injektionskapillare des Probengebers pipettiert werden. Auch das Trocknungsverhalten von solchen Flüssigkeiten ist nicht optimal, da sie sich im Graphitrohr nicht gleichmäßig ausbreiten.

Plasmaproben wurde daher Triton-Lösung als Injektions- und Trocknungshilfe zugesetzt. Aufgrund von Literaturdaten<sup>148</sup> und eigenen Versuchsergebnissen bewährte sich eine 1 %-ige Lösung von Triton X-100 in Wasser.

Bei Vollblutproben war ein Aufschluss der Proben notwendig, da mit einer Verdünnung durch Triton-Lösung allein zwar eine Lyse der Zellen stattfand, aber noch keine reproduzierbar pipettierbare und analysierbare Lösung erhalten wurde. Daher wurde ein Aufschluss mit 65 %-iger Salpetersäure bei 60 °C durchgeführt. Die erhaltene klare Lösung wurde dann mit Triton-Lösung verdünnt. Organische höhermolekulare Bestandteile, deren Konzentration in Vollblutproben im Vergleich zu den anderen Matrices am höchsten war, wurden so vorab oxidiert und ihr Anteil in der Probe reduziert.

Ultrafiltratproben wurden lediglich mit 6,5 %-iger Salpetersäure<sup>148</sup> verdünnt, um die Konzentrationen in den Kalibrierbereich abzusenken. Es war aber auch möglich, Ultrafiltratproben, die ja nur geringe Mengen an sehr kleinen Proteinbestandteilen bzw. Aminosäuren enthalten, ohne weitere Verdünnung direkt zu analysieren.

### 3.1.3 Validierung

Die Validierung umfasste die Parameter Selektivität, Messbereich, Bestimmungsgrenze, Linearität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision, die gemäß den Anforderungen an bioanalytische Verfahren überprüft wurden.

#### 3.1.3.1 Selektivität

Die Selektivität konnte durch das Fehlen elementspezifischer Absorptionen während der Messphase in den untersuchten platinfreien, aufgearbeiteten Matrices gezeigt werden. Die Spektrogramme der Leermatrizes (Abbildungsteil A) wurden mit den jeweils niedrigsten Kalibratoren (Abbildungsteil B) verglichen.

Wie die Abbildungen 3.4 - 3.9 zeigen, erfolgte die Messung in der Zeitspanne von 124 - 126 s (Atomisierungsphase für Ultrafiltratproben beider Konzentrationsbereiche sowie Plasma- und Vollblutproben des hohen Konzentrationsbereichs, s. Tab. 2.2) bzw. 127 - 129 s (Atomisierungsphase für Plasma- und Vollblutproben des niedrigen Konzentrationsbereichs; s. Tab. 2.2) störungsfrei. Dargestellt sind jeweils der letzte Teil der Veraschungsphase und die sich anschließende Atomisierungsphase. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Untergrundabsorption verzichtet.

Die um den Betrag der Signalhöhe der Leermatrizes korrigierte Absorption für die am niedrigsten konzentrierten Standards war deutlich von den Absorptionen der Nullwerte zu unterscheiden; die Signalhöhen waren im Mittel fünfmal so hoch wie die Absorptionen des Nullwerts (s. Kap. 3.1.3.2).

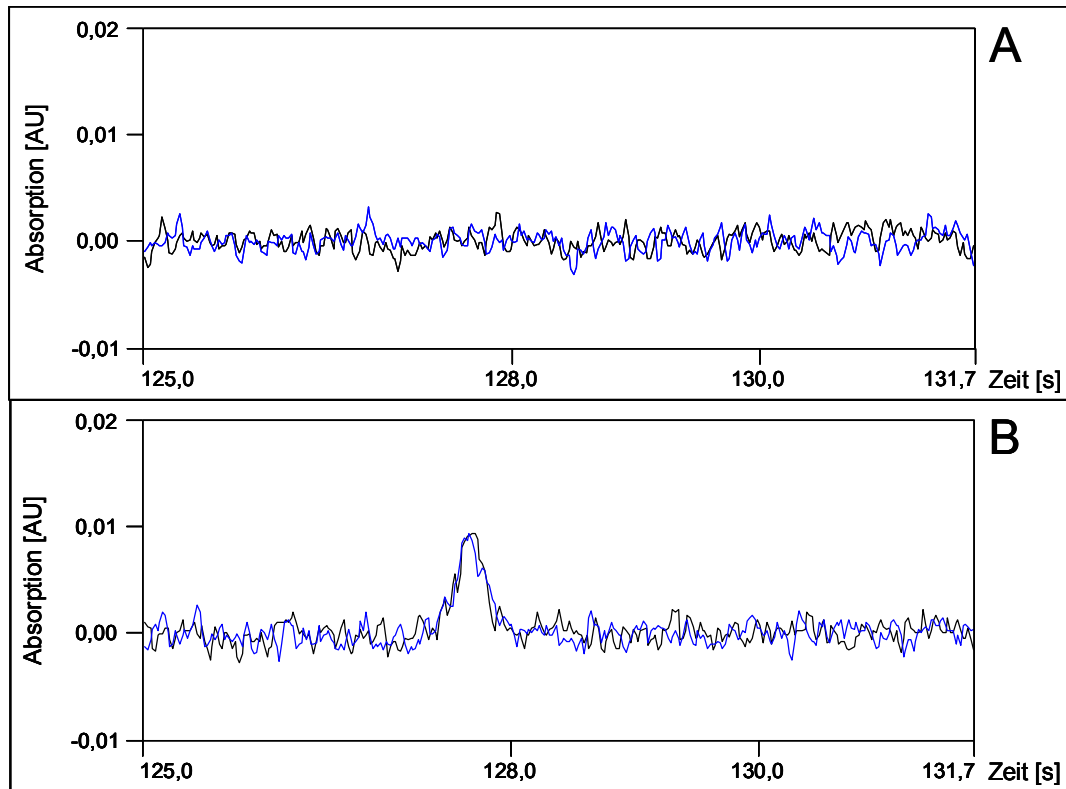


Abb. 3.4 Spektrogramme **Plasma** für den Kalibrierbereich 20 - 200 ng/mL:  
**A** Platinfreie Matrix, **B** Kalibrator 20 ng/mL

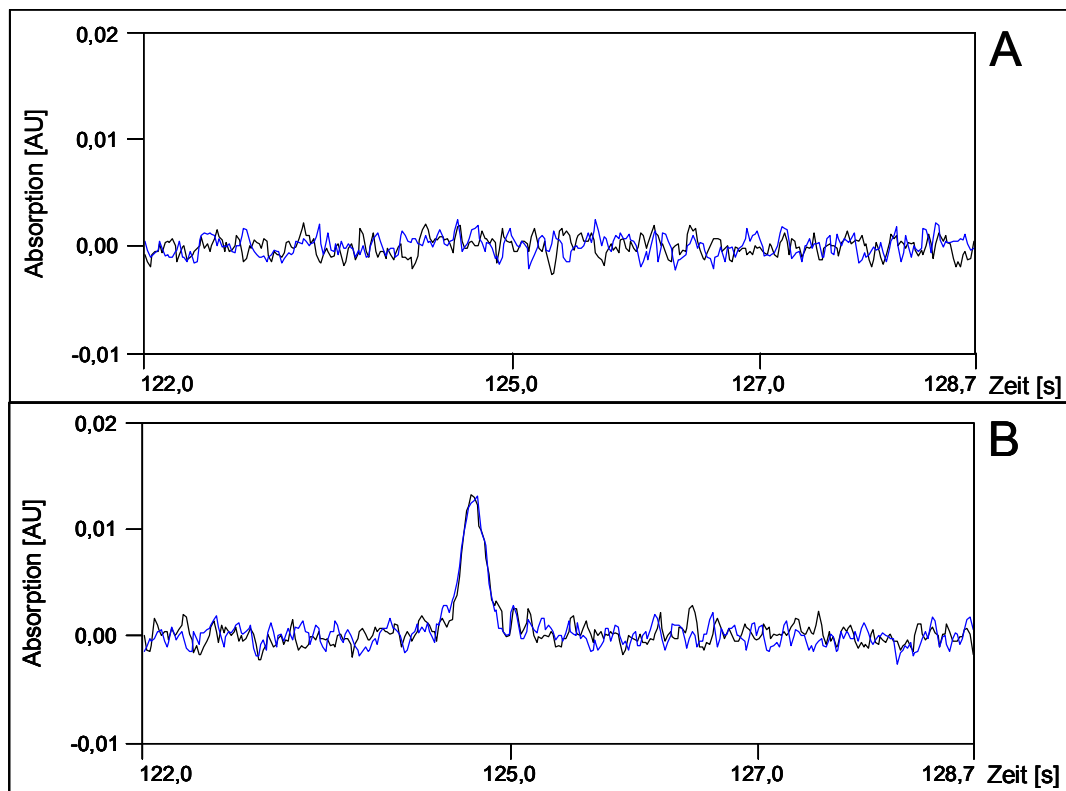


Abb. 3.5 Spektrogramme **Plasma** für den Kalibrierbereich 200 - 2000 ng/mL:  
**A** Platinfreie Matrix, **B** Kalibrator 200 ng/mL

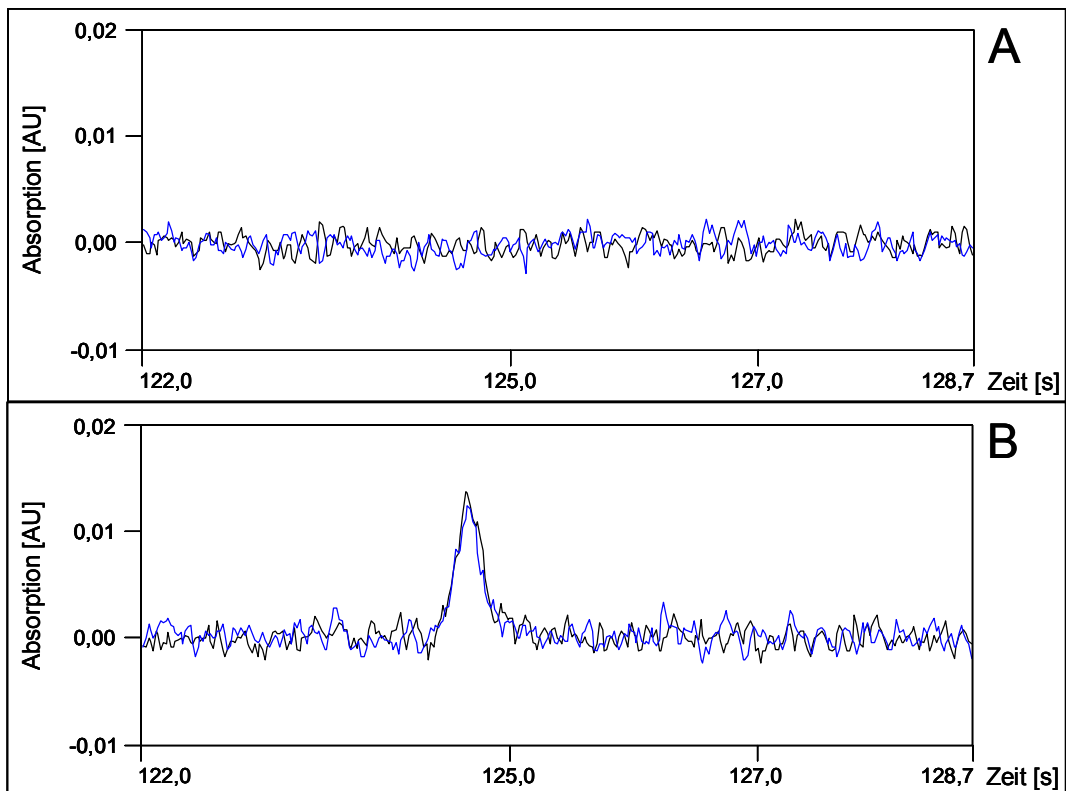


Abb. 3.6 Spektrogramme **Ultrafiltrat** für den Kalibrierbereich 5 - 50 ng/mL:  
**A** Platinfreie Matrix, **B** Kalibrator 5 ng/mL

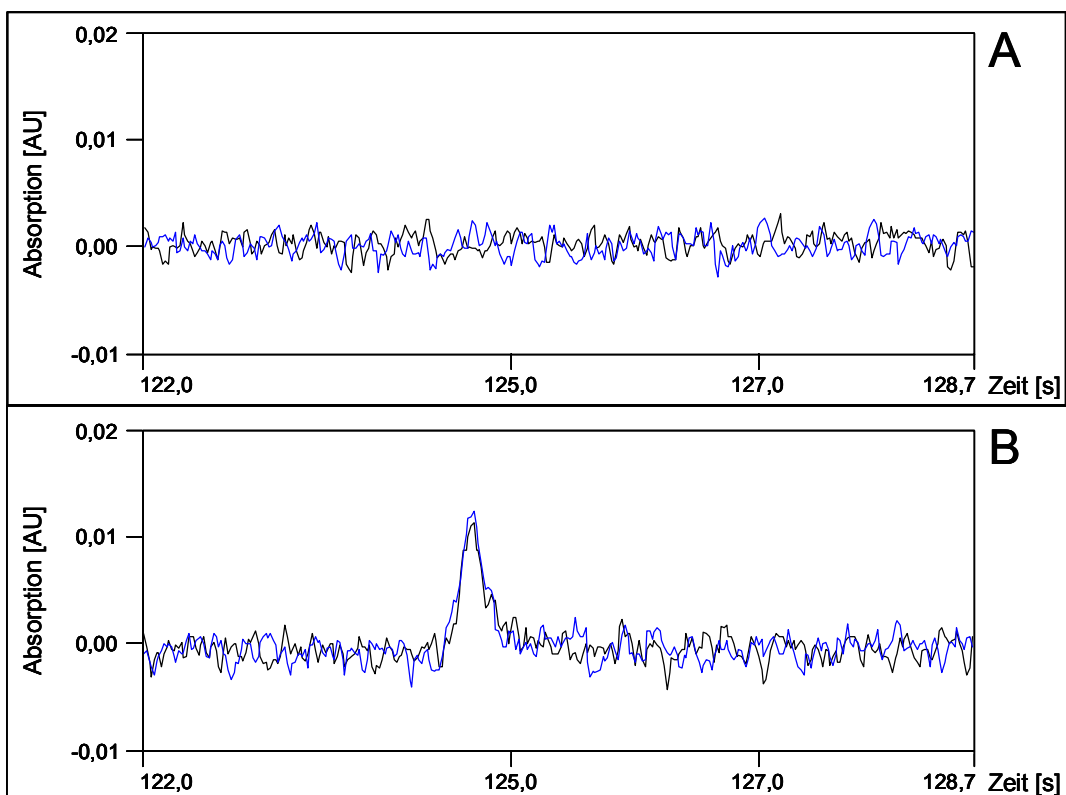


Abb. 3.7 Spektrogramme **Ultrafiltrat** für den Kalibrierbereich 50 - 500 ng/mL:  
**A** Platinfreie Matrix, **B** Kalibrator 50 ng/mL

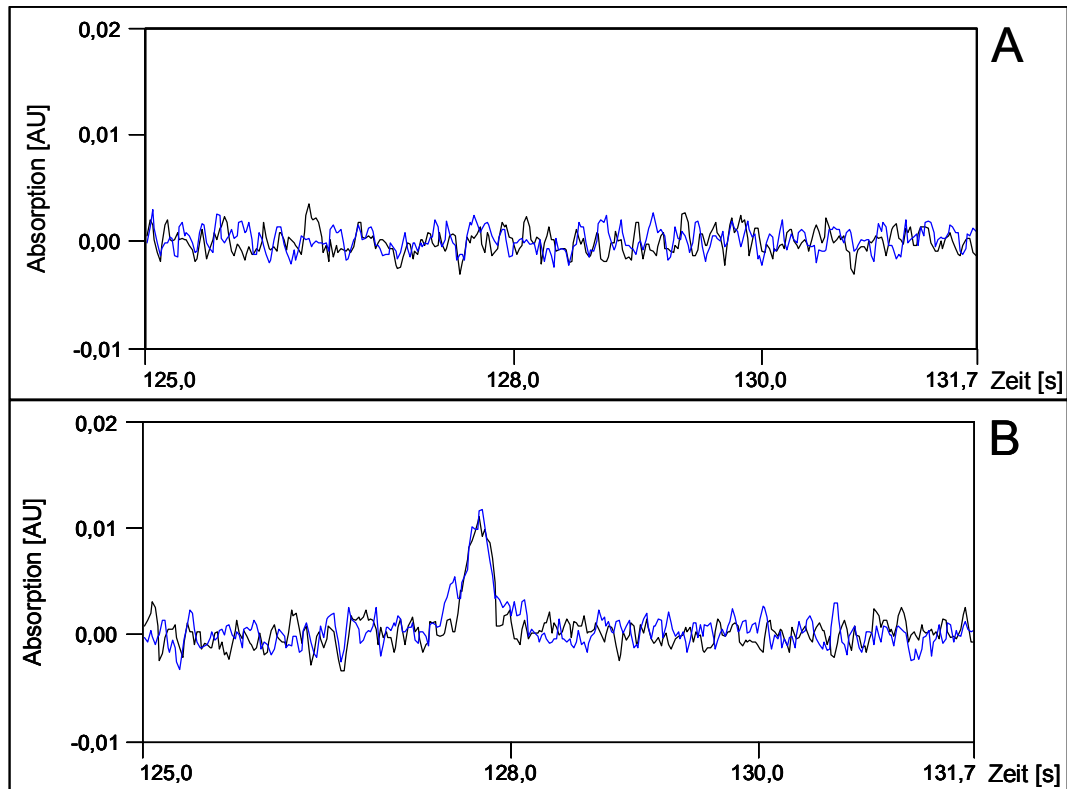


Abb. 3.8 Spektrogramme **Vollblut** für den Kalibrierbereich 50 - 500 ng/mL:  
**A** Platinfreie Matrix, **B** Kalibrator 50 ng/mL

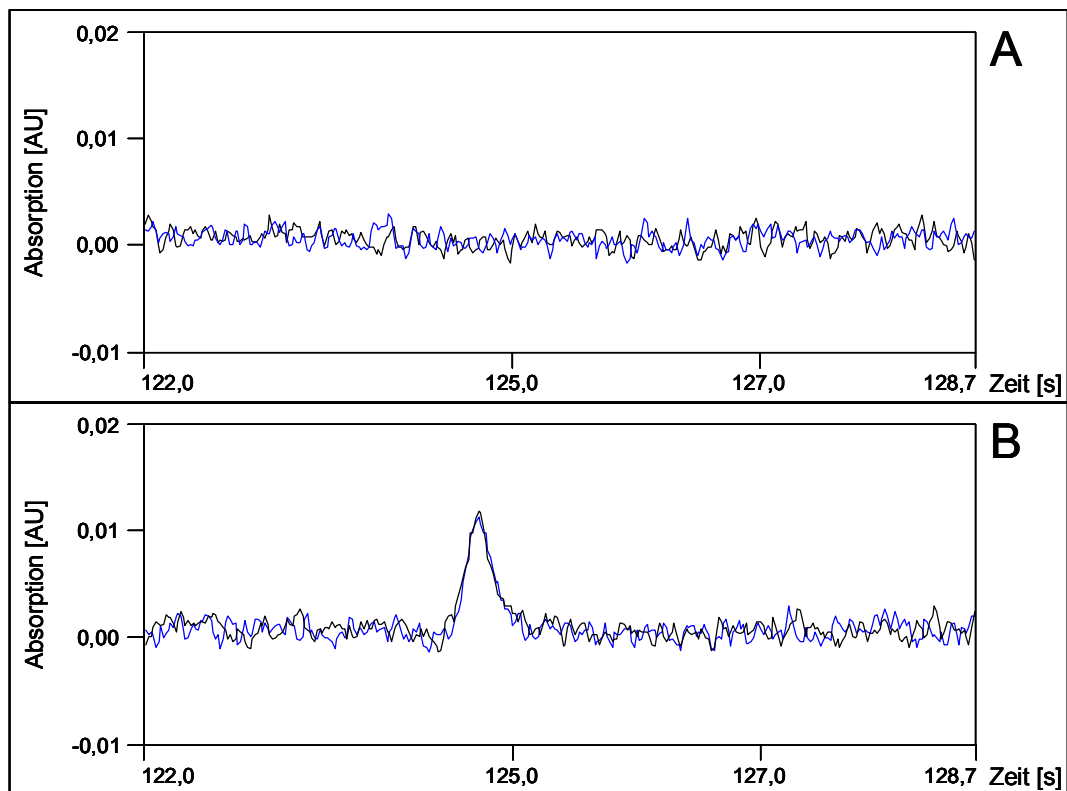


Abb. 3.9 Spektrogramme **Vollblut** für den Kalibrierbereich 200 - 2000 ng/mL:  
**A** Platinfreie Matrix, **B** Kalibrator 200 ng/mL

### 3.1.3.2 Messbereich und Bestimmungsgrenze

Für die pharmakokinetischen Untersuchungen war es notwendig, Platin in den drei Matrices Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut in einem Bereich von insgesamt 5 - 2000 ng/mL zu quantifizieren. Da innerhalb derartiger Konzentrationsunterschiede keine proportionalen Beziehungen zwischen Absorption und Konzentration zu erwarten waren, wurden in jeder Matrix zwei Kalibrierbereiche (s. Tab. 2.3) definiert, die getrennt voneinander untersucht wurden.

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des Kalibrierbereichs lagen, wurden durch den automatischen Probengeber mit platinfreier, aufgearbeiteter Matrix verdünnt und vermessen. Dies war mit der entsprechenden Richtigkeit und Präzision möglich (s. Kap. 3.1.3.5), so dass auch Proben, die im Rahmen der klinischen Untersuchungen nach Gabe vergleichsweise hoher Dosen Oxaliplatin erhalten wurden und oft höhere Konzentrationen als 2000 ng/mL aufwiesen, gemessen werden konnten.

Für die Bestimmungsgrenze wurde überprüft, ob die Signalhöhe fünfmal so hoch war wie das Signal der platinfreien Matrix und ob die entsprechende Konzentration mit einem relativen Fehler und einer relativen Standardabweichung von höchstens 20 % bestimmt werden konnte.

Dazu wurden zunächst von sechs Kalibrierreihen jeder Matrix die Mittelwerte der Absorptionen für die platinfreie Matrix ( $\bar{A}_{\text{Matrix}}$ ) berechnet und mit der mittleren Absorption des Standards, der die niedrigste Konzentration einer Kalibrierreihe aufwies ( $\bar{A}_{\text{Standard}_{\text{min}}}$ ), verglichen. In Tab. 3.2 werden sowohl die unkorrigierten Absorptionen als auch in Klammern die um den Betrag der Signalhöhe des Leerwerts korrigierten Absorptionen und die sich daraus ergebenden Verhältnisse angegeben.

Die berechneten Verhältnisse von  $\bar{A}_{\text{Standard}_{\text{min}}}$  zu  $\bar{A}_{\text{Matrix}}$  lagen für alle Matrices und Konzentrationsbereiche zwischen 5 und 7.

Weiterhin wurde bei sechs Kalibrierreihen, die an unterschiedlichen Tagen aufgenommen wurden, die Richtigkeit und Präzision der Bestimmung einer von der Kalibrierung unabhängigen QC-Probe (sowohl PQC als auch SQC; s. Kap. 2.2.5) kontrolliert, die dieselbe Konzentration aufwies wie der am niedrigsten konzentrierte Standard und die damit postulierte Bestimmungsgrenze. Die Ultrafiltratprobe der Konzentration 5,0 ng/mL wurde ohne weitere Aufarbeitung vermessen; daher wurde sie im Folgenden lediglich mit "QC" bezeichnet.

Tab. 3.2 Vergleich der mittleren Absorption von Leermatrix und Standard der niedrigsten Konzentration einer Kalibrierreihe (jeweils  $n = 6$ )

	Konzentrationsbereich [ng/mL]	$\bar{A}_{\text{Matrix}}$ [AU]	$\bar{A}_{\text{Standard}_{\text{min}}^*}$ [AU]	$\bar{A}_{\text{Standard}_{\text{min}}} / \bar{A}_{\text{Matrix}}^*$
<b>Plasma</b>	20,0 - 200,0	0,0022	0,0127 (0,0105)	6 (5)
	200,0 - 2000,0	0,0021	0,0133 (0,0112)	6 (5)
<b>Ultrafiltrat</b>	5,0 - 50,0	0,0021	0,0132 (0,0111)	6 (5)
	50,0 - 500,0	0,0018	0,0132 (0,0114)	8 (7)
<b>Vollblut</b>	50,0 - 500,0	0,0028	0,0141 (0,0113)	5 (5)
	200,0 - 2000,0	0,0023	0,0126 (0,0103)	6 (5)

\* In Klammern sind die um den Betrag der Signalthöhe des Leerwerts korrigierten Absorptionen und die sich daraus ergebenden Verhältnisse angegeben

Wie Tab. 3.3 zu entnehmen ist, konnten diese Proben in allen Matrices und Konzentrationsbereichen mit der erforderlichen Richtigkeit und Präzision quantifiziert werden.

Tab. 3.3 Überprüfung der Bestimmungsgrenze anhand von Richtigkeit und Präzision (für alle QC-Proben:  $n = 6$ )

	Konzentration [ng/mL]	QC-Probe	RE [%]	RSD [%]
<b>Plasma</b>	20,0	PQC	-5,6	13,6
		SQC	-9,0	3,6
	200,0	PQC	-0,8	7,1
		SQC	+1,0	8,0
<b>Ultrafiltrat</b>	5,0	QC*	+0,9	10,6
	50,0	PQC	-1,0	6,7
		SQC	+1,0	9,4
	<b>Vollblut</b>	50,0	PQC	-7,6
SQC			-1,5	11,7
200,0		PQC	+0,2	11,0
		SQC	-1,5	5,9

\* Diese Probe wurde ohne Aufarbeitung direkt vermessen. Daher wurde nicht zwischen SQC und PQC unterschieden.



Somit wurden als Bestimmungsgrenzen in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut 20,0, 5,0 bzw. 50,0 ng/mL ermittelt.

Die Endkonzentrationen dieser Proben nach ihrer Aufarbeitung betragen für alle Matrices 5,0 ng/mL.

### 3.1.3.3 Linearität

Der lineare Zusammenhang zwischen der Signalhöhe und der zugehörigen Konzentration wurde auf drei Arten überprüft.

Zunächst wurde der Korrelationskoeffizient überprüft; er sollte  $> 0,99$  sein. Für sechs Kalibriergeraden, die in jeder Matrix und jedem Konzentrationsbereich an sechs Tagen aufgenommen wurden, war dieses Kriterium erfüllt; Tab. 3.4 zeigt jeweils den kleinsten und größten Korrelationskoeffizienten.

Zur quantitativen Beurteilung der Linearität ist der Korrelationskoeffizient jedoch nicht ausreichend. Daher wurde außerdem der Test nach *Mandel* durchgeführt, einem F-Test, bei dem die Güte der Anpassung nach linearer Regression mit der nach quadratischer Regression verglichen wurde. War die erhaltene Prüfgröße größer als der kritische Wert, so wurde in diesem Fall durch quadratische Regression eine signifikant bessere Anpassung erhalten und eine lineare Regression war nicht zulässig.

Für sechs Kalibriergeraden jeder Matrix und jedes Konzentrationsbereichs wurde der Test nach *Mandel* durchgeführt. Die jeweils kleinste und größte der erhaltenen Prüfgrößen sind in Tab. 3.4 angegeben; für alle Matrices wurden F-Werte unter dem kritischen Wert 34,12 (Freiheitsgrad  $f_1 = 1$ ,  $f_2 = n-3 = 3$ ,  $p = 0,01$ ) erhalten.

Tab. 3.4 *F-Werte und Korrelationskoeffizienten (jeweils  $n = 6$ )*

	Konzentrationsbereich [ng/mL]	F-Wert	Korrelationskoeffizient $r$
<b>Plasma</b>	20,0 - 200,0	0,3 - 19,7	0,9979 - 0,9988
	200,0 - 2000,0	0,1 - 26,0	0,9958 - 0,9999
<b>Ultrafiltrat</b>	5,0 - 50,0	0,3 - 17,9	0,9961 - 0,9999
	50,0 - 500,0	0,5 - 5,2	0,9995 - 0,9998
<b>Vollblut</b>	50,0 - 500,0	2,7 - 31,6	0,9976 - 0,9999
	200,0 - 2000,0	0,5 - 16,6	0,9964 - 0,9998

Außerdem wurden die erhaltenen Absorptionen mittels Steigung und Achsenabschnitt der erhaltenen Kalibriergeraden in die korrespondierenden Konzentrationen umgerechnet. Die relativen Abweichungen der gemessenen Konzentration vom Nominalwert (s. Kap. 2.2.3, Tab. 2.4) und die relativen Standardabweichungen lagen für alle Kalibratoren unterhalb der geforderten 15 %. Im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden Werte deutlich unter 20 % erhalten.

Tab. 3.5 *Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) der Kalibratoren (jeweils n = 6)*

	Konzentrationsbereich [ng/mL]	Parameter	Standards					
			1	2	3	4	5	6
Plasma	20,0 - 200,0	RE [%]	-13,2	-4,8	+5,4	+1,6	+1,8	-2,2
		RSD [%]	6,8	2,9	2,5	2,9	1,6	0,6
	200,0 - 2000,0	RE [%]	-5,6	-1,1	+1,7	+1,3	-0,4	-0,4
		RSD [%]	3,5	3,7	4,0	2,6	2,3	1,8
Ultrafiltrat	5,0 - 50,0	RE [%]	-1,3	-0,1	+0,1	-1,0	+0,8	-0,2
		RSD [%]	10,9	6,3	1,7	4,4	1,1	1,9
	50,0 - 500,0	RE [%]	-1,1	-2,4	-0,1	+1,2	+1,4	-1,2
		RSD [%]	4,0	1,8	1,0	0,5	0,5	0,3
Vollblut	50,0 - 500,0	RE [%]	-11,7	-2,3	+1,5	+3,2	+1,8	-2,3
		RSD [%]	7,5	4,6	2,9	2,3	0,7	0,9
	200,0 - 2000,0	RE [%]	-6,9	-3,8	+1,8	+2,8	+0,7	-1,5
		RSD [%]	5,4	4,6	3,3	2,4	1,0	1,1

### 3.1.3.4 Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate (WFR) wurden pro Matrix jeweils vier Proben unterschiedlicher Konzentrationen, die den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich der jeweiligen Matrix abdeckten, hergestellt und aufgearbeitet. Die Absorptionen dieser Proben wurden mit denen wässriger Proben gleicher Konzentration verglichen, die ohne weitere Vorbereitung gemessen wurden. Alle Lösungen wurden jeweils sechsmal vermessen. Das Verhältnis der erhaltenen Absorptionen für die matrix-

haltigen Proben ( $A_{\text{Matrix}}$ ) und die wässrigen Proben ( $A_{\text{Wasser}}$ ) ergab die WFR 1, die in Tab. 3.6 als mittlere Wiederfindungsrate dargestellt ist.

Durch diese Untersuchung wurde der Einfluss der Matrix und ihrer Aufarbeitung auf die Höhe des Absorptionssignals charakterisiert. Die erhaltenen Werte zeigen deutlich, dass die Matrixbestandteile einen großen Einfluss auf die Höhe der Absorptionen hatten. Die Streuung der Werte entsprach in etwa der Interday-Präzision bei der Bestimmung von PQC-Proben (s. Tab. 3.7).

Tab. 3.6 *Mittlere Wiederfindungsrate (WFR [%]; MW  $\pm$  SD; jeweils n = 6)*

	Konzentration [ng/mL]	WFR 1	WFR 2	WFR 3
<b>Plasma</b>	20,0	156,5 $\pm$ 12,5	134,8 $\pm$ 14,9	123,8 $\pm$ 6,0
	100,0	157,0 $\pm$ 23,0	125,1 $\pm$ 6,1	132,7 $\pm$ 5,7
	1000,0	101,0 $\pm$ 3,6	102,4 $\pm$ 3,0	99,8 $\pm$ 2,8
	4000,0	115,0 $\pm$ 6,7	106,7 $\pm$ 6,1	109,0 $\pm$ 13,1
<b>Ultra- filtrat</b>	5,0	103,0 $\pm$ 10,2	n.b.	n.b.
	25,0	90,6 $\pm$ 8,3	n.b.	n.b.
	250,0	75,1 $\pm$ 2,1	85,6 $\pm$ 6,5	88,0 $\pm$ 5,6
	1000,0	110,5 $\pm$ 10,5	103,9 $\pm$ 5,4	106,1 $\pm$ 5,3
<b>Vollblut</b>	50,0	134,6 $\pm$ 11,1	145,8 $\pm$ 13,2	90,5 $\pm$ 11,4
	250,0	115,6 $\pm$ 17,6	143,0 $\pm$ 14,4	91,0 $\pm$ 10,8
	1000,0	89,1 $\pm$ 4,9	128,0 $\pm$ 10,6	67,1 $\pm$ 3,8
	4000,0	93,7 $\pm$ 10,7	104,7 $\pm$ 8,4	89,6 $\pm$ 7,8

n.b. = nicht bestimmbar, da UF-Proben des niedrigen Konzentrationsbereichs ohne Aufarbeitung vermessen wurden.

Proben, die einen hohen Anteil an Matrixbestandteilen aufwiesen, wie z.B. niedrig konzentrierte Plasma- oder Vollblutproben, zeigten gegenüber einer wässrigen Probe gleicher Konzentration eine wesentlich höhere Absorption und damit eine WFR 1 deutlich über 100 %. Bei Proben, bei denen die Konzentration der Matrixbestandteile durch eine stärkere Verdünnung bei der Probenvorbereitung deutlich reduziert wurde, oder die einen geringen Anteil an Matrixbestandteilen enthielten, wie z.B. Ultrafiltratproben, wiesen dagegen eine WFR auf, die nahe bei 100 % lag. Da so deutliche Matrixeffekte vorlagen, war es notwendig, eine matrixadaptierte Kalibrierung durchzuführen, um für

Kalibratoren wie auch für die zu vermessenden Proben einen ähnlichen Anteil an Matrixbestandteilen und somit ein ähnliches Element-Matrix-Verhältnis zu erhalten.

Um die Einflüsse von Matrix und Aufarbeitung getrennt zu untersuchen, wurden neben den o.g. Lösungen auch noch Lösungen in Wasser hergestellt, die hinsichtlich ihrer Konzentrationen den matrixhaltigen Proben entsprachen und die ebenso wie diese gemäß dem Probenaufarbeitungsprotokoll zur Messung vorbereitet wurden. Deren Absorptionen ( $A_{\text{Wasser, aufgearbeitet}}$ ) wurden sowohl mit den Absorptionen der rein wässrigen Proben als auch mit denen der matrixhaltigen Proben verglichen (WFR 2 und 3).

WFR 2 und WFR 3 wurden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$\text{WFR 2 [\%]} = \frac{A_{\text{Matrix, aufgearbeitet}}}{A_{\text{Wasser, aufgearbeitet}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.1}$$

$$\text{WFR 3 [\%]} = \frac{A_{\text{Wasser, aufgearbeitet}}}{A_{\text{Wasser}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.2}$$

WFR 2, die insbesondere für die niedrigen Konzentrationen einer Matrix über 100 % lag, zeigte, dass die Matrixbestandteile die Absorption erhöhten. Die Aufarbeitung hingegen hatte v.a. bei Vollblutproben eher einen gegenteiligen Effekt. Die WFR 3, die diesen Einfluss quantifizierte, war für die meisten Proben geringer als die WFR 2; dies deutete darauf hin, dass durch die Aufarbeitung die Signale eher verringert wurden.

### 3.1.3.5 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit und Präzision der Methode wurde anhand der relativen Fehler und der relativen Standardabweichungen charakterisiert. Dafür wurden sowohl PQC- als auch SQC-Proben vermessen, die den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich umfassten. Eine QC-Probe lag jeweils außerhalb des Kalibrierbereichs; sie hatte eine Konzentration, die doppelt so hoch war wie die des obersten Kalibrators.

Richtigkeit und Präzision wurden sowohl nach sechs Wiederholmessungen an einem Tag (*Intraday*) als auch nach sechs Messungen an verschiedenen Tagen (*Interday*) berechnet.

In den folgenden Tabellen (Tab. 3.7 bis 3.9) werden die Ergebnisse für Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut zusammengefasst.

Die mittleren Konzentrationen zeigten in allen Matrizes geringere relative Fehler als  $\pm 15$  %. Eine Ausnahme war die Plasma-PQC-Probe mit einer Konzentration von

20,0 ng/mL; dort wurde ein relativer Fehler des Mittelwerts von 16,6 % festgestellt. Dies war aber im Bereich der Bestimmungsgrenze, in dem Fehler von bis zu 20 % zulässig sind, akzeptabel.

Für die Präzision ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Die relativen Standardabweichungen unterschritten für alle Matrices und Konzentrationsbereiche 15 %. Auch im Bereich der Bestimmungsgrenzen wurden in den drei Matrices keine Standardabweichungen > 15 % erhalten.

Tab. 3.7 *Intraday- und Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) für die Platinbestimmung im Plasma (für jede Konzentration: n = 6)*

			Konzentration [ng/mL]			
			20,0	100,0	200,0	400,0*
<i>Intraday</i>	PQC	RE [%]	-16,6	+11,5	+3,3	-6,0
		RSD [%]	5,7	6,4	4,5	4,4
	SQC	RE [%]	-13,2	-5,0	+4,7	-1,9
		RSD [%]	9,4	3,3	5,2	2,4
<i>Interday</i>	PQC	RE [%]	-5,6	+1,3	+0,3	-4,5
		RSD [%]	13,6	10,1	5,1	8,4
	SQC	RE [%]	-9,0	-1,5	-0,7	-7,3
		RSD [%]	3,6	7,0	7,5	5,9

			Konzentration [ng/mL]			
			200,0	1000,0	2000,0	4000,0*
<i>Intraday</i>	PQC	RE [%]	-0,2	-1,4	+4,0	+8,6
		RSD [%]	8,5	7,4	3,4	7,3
	SQC	RE [%]	+3,3	+7,7	+6,9	-3,3
		RSD [%]	7,7	4,7	3,9	4,0
<i>Interday</i>	PQC	RE [%]	-0,8	-0,6	-0,5	-2,1
		RSD [%]	7,1	6,9	5,3	6,5
	SQC	RE [%]	+1,0	+2,1	+3,3	+0,3
		RSD [%]	8,0	7,5	8,2	7,9

\* Vermessung nach Verdünnung durch den Autosampler des GF-AAS-Systems

Für alle vermessenen Konzentrationen wurden die internationalen Anforderungen<sup>172,174</sup> an Richtigkeit und Präzision erfüllt. Es fällt aber auf, dass sowohl Fehler als auch Standardabweichungen bei den niedrigen Konzentrationen höher waren. Dies zeigte sich besonders in den niedrigen Konzentrationsbereichen (20,0 - 500,0 ng/mL) für die Matrices Plasma und Vollblut. Im Ultrafiltrat dagegen wurde sowohl in den verdünnten als auch in den ohne Aufarbeitung vermessenen Proben ein hohes Maß an Richtigkeit erhalten. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Ultrafiltratproben hinsichtlich ihrer Matrix am ehesten wässrigen Proben ähneln und die Bestimmung nicht durch einen hohen Anteil an organischen Bestandteilen der Matrix beeinflusst wird.

Tab. 3.8 *Intraday- und Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) für die Platinbestimmung im Ultrafiltrat (für jede Konzentration: n = 6)*

			Konzentration [ng/mL]			
			5,0	25,0	50,0	100,0*
<i>Intraday</i>	QC**	RE [%]	-7,5	-2,0	+3,5	-2,2
		RSD [%]	4,0	3,4	3,4	2,6
<i>Interday</i>	QC**	RE [%]	+0,9	+2,1	+0,7	-1,1
		RSD [%]	10,6	5,5	4,4	9,9

			Konzentration [ng/mL]			
			50,0	250,0	500,0	1000,0*
<i>Intraday</i>	PQC	RE [%]	0,9	1,1	-7,2	0,3
		RSD [%]	1,7	3,5	3,4	4,0
	SQC	RE [%]	-0,2	-7,3	-6,6	-3,3
		RSD [%]	3,1	5,1	2,6	3,6
<i>Interday</i>	PQC	RE [%]	-1,0	+2,0	+1,8	+3,5
		RSD [%]	6,7	4,0	4,0	3,7
	SQC	RE [%]	+1,0	+3,1	+2,9	+1,7
		RSD [%]	9,4	7,7	6,3	5,4

\* Vermessung nach Verdünnung durch den Autosampler des GF-AAS-Systems

\*\* Aufgrund der Messung ohne Aufarbeitung wurde nicht zwischen SQC- und PQC unterschieden.

Bei den Proben, die die doppelte Konzentration des höchsten Kalibrators aufwiesen, wurden nach Verdünnung durch den Autosampler des AAS-Geräts mit platinfreier, aufgearbeiteter Matrix ebenfalls richtige und präzise Ergebnisse erhalten.

Zwischen den Ergebnissen für PQC- und SQC-Proben bestanden keine gravierenden Unterschiede; dies deutet darauf hin, dass die wiederholte Aufarbeitung an einem bzw. an sechs verschiedenen Tagen genauso zu richtigen Ergebnissen führte wie die wiederholte Messung derselben, an einem Tag aufgearbeiteten Lösung.

Beim Vergleich von Inter- und Intraday-Richtigkeit fällt auf, dass für einige QC-Proben eine bessere Richtigkeit bei der Bestimmung an verschiedenen Tagen erreicht wurde. Dies ging aber mit einer höheren Standardabweichung im Vergleich zur Intraday-Betrachtung einher.

Tab. 3.9 *Intraday- und Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) für die Platinbestimmung im Vollblut (für jede Konzentration: n = 6)*

			Konzentration [ng/mL]			
			50,0	250,0	500,0	1000,0*
<i>Intraday</i>	PQC	RE [%]	-2,2	-8,4	-5,0	-3,8
		RSD [%]	8,4	8,3	5,2	7,9
	SQC	RE [%]	-4,3	-10,2	-7,2	-3,5
		RSD [%]	7,9	1,6	4,9	4,4
<i>Interday</i>	PQC	RE [%]	-7,6	-8,3	+0,6	+5,1
		RSD [%]	11,9	3,5	2,4	5,0
	SQC	RE [%]	-1,5	-10,0	-1,9	+1,9
		RSD [%]	11,7	1,6	1,7	6,1

			Konzentration [ng/mL]			
			200,0	1000,0	2000,0	4000,0*
<i>Intraday</i>	PQC	RE [%]	+7,5	6,2	-0,5	-7,3
		RSD [%]	4,5	8,9	5,8	4,7
	SQC	RE [%]	+4,9	+1,7	+0,1	-5,9
		RSD [%]	8,9	6,4	6,4	4,0
<i>Interday</i>	PQC	RE [%]	+0,2	+2,6	+0,8	-1,1
		RSD [%]	11,0	3,9	5,4	4,1
	SQC	RE [%]	-1,5	+3,9	+2,6	+3,9
		RSD [%]	5,9	4,6	6,5	4,7

\* Vermessung nach Verdünnung durch den Autosampler des GF-AAS-Systems

Die *Injektionspräzision* wurde durch zehnmahlige Injektion von je vier PQC-Proben einer Matrix überprüft. Von den erhaltenen Absorptionen wurde die relative Standardabweichung berechnet, die für alle vermessenen Proben unter 11 % lag. Die höchste Impräzision wurde für die niedrig konzentrierten Proben in allen drei Matrices beobachtet; dort lagen die Standardabweichungen bei ca. 10 %. Bei allen anderen Konzentrationen wurden Werte  $\leq 5,5$  % erhalten, die in etwa im Bereich der Intraday-Präzision lagen. Dies war auch bei den Proben der Fall, deren Konzentration oberhalb des Kalibrierbereichs lag und die durch den Autosampler mit aufgearbeiteter, platinfreier Matrix verdünnt wurden.

Tab. 3.10 *Injektionspräzision (RSD [%]; für jede Konzentration: n = 10)*

	Konzentration [ng/mL]	Mittlere Absorption [AU]	RSD [%]
<b>Plasma</b>	20,0	0,0098	9,7
	100,0	0,0334	5,4
	1000,0	0,0516	5,5
	4000,0	0,0542*	5,1
<b>Ultrafiltrat</b>	5,0	0,0118	10,7
	25,0	0,0499	2,1
	250,0	0,0512	2,2
	1000,0	0,0516*	5,5
<b>Vollblut</b>	50,0	0,0090	10,8
	250,0	0,0274	4,2
	1000,0	0,0772	4,0
	4000,0	0,0652**	2,9

\* Die Probe wurde durch den Autosampler des AAS-Systems im Verhältnis 1 : 4 mit platinfreier, aufgearbeiteter Matrix verdünnt.

\*\* Die Probe wurde ebenfalls im Verhältnis 1 : 4 mit platinfreier, aufgearbeiteter Matrix verdünnt. Die Messung erfolgte in einem anderen Analysenlauf als die der Probe mit 1000 ng/mL; aufgrund eines höheren Graphitrohralters war die Absorption vergleichsweise gering.

Eine Kontrolle der Injektion und Korrektur der Injektionsungenauigkeit mit Hilfe eines zugefügten internen Standards ist bei atomabsorptionsspektrometrischen Methoden nicht möglich. Daher wurden die in dieser Arbeit untersuchten Proben mindestens in Doppelbestimmung vermessen.



### 3.1.4 Qualitätssicherung während der Messung

Die Qualitätssicherung während der Messungen wurde mit Hilfe von PQC- und SQC-Proben durchgeführt. Wie während der Validierungsphase wurden Richtigkeit und Präzision in allen Matrices und Konzentrationsbereichen untersucht. Die Ergebnisse für Interday-Richtigkeit und -Präzision sind in Tab. 3.11 zusammengefasst.

Die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen zeigten für alle QC-Proben einen geringeren relativen Fehler als in der Validierungsphase. Dies ist auf die höhere Anzahl an Messungen zurückzuführen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Aus demselben Grund waren die relativen Standardabweichungen bei allen vermessenen QC-Proben höher als während der Validierung. Beide Parameter lagen aber immer noch deutlich unter 15 %.

Wie in der Validierung wurde auch während der Routinemessungen jeweils eine QC-Probe vermessen, die durch den Autosampler des Geräts in den Kalibrierbereich hinein verdünnt werden musste. Die Verdünnung durch das Gerät erfolgte richtig und präzise. Dieses Verfahren war besonders für die Messung der Proben von Patienten, die mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt worden waren, von Bedeutung, da die Konzentrationen im Plasma, Vollblut und auch im Ultrafiltrat besonders kurz nach Infusionsende höher waren als die des höchsten Kalibrators.

Da im Ultrafiltrat häufig Konzentrationen auftraten, die auch die dieser QC-Probe übertrafen, wurde dort eine weitere Probe vermessen, die eine vierfach höhere Konzentration (2000 ng/mL) aufwies als der am höchsten konzentrierte Standard. Diese konnte mit einem relativen Fehler von +3,7 % und einer relativen Standardabweichung von 7,0 % bestimmt werden (n = 46).

Tab. 3.11 Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) über den gesamten Messzeitraum (n = 16 - 72)

		Konzentration [ng/mL]				
<b>Plasma</b>		[n = 16]	<b>20,0</b>	<b>100,0</b>	<b>200,0</b>	<b>400,0*</b>
	PQC	RE [%]	-6,8	-3,4	-1,3	-4,9
		RSD [%]	11,9	9,2	5,8	7,1
	SQC	RE [%]	-13,2	-4,5	-1,6	-7,3
		RSD [%]	8,0	8,5	6,7	6,3
		[n = 76]	<b>200,0</b>	<b>1000,0</b>	<b>2000,0</b>	<b>4000,0*</b>
	PQC	RE [%]	-1,9	-2,5	-1,4	+1,4
		RSD [%]	11,8	7,7	8,8	7,3
SQC	RE [%]	-4,8	+4,2	-0,1	+0,2	
	RSD [%]	13,3	10,8	9,3	6,4	
<b>Ultrafiltrat</b>		[n = 40]	<b>5,0</b>	<b>25,0</b>	<b>50,0</b>	<b>100,0*</b>
	QC**	RE [%]	-5,3	-0,03	-0,02	-3,3
		RSD [%]	12,8	9,2	6,7	8,9
		[n = 56]	<b>50,0</b>	<b>250,0</b>	<b>500,0</b>	<b>1000,0*</b>
	PQC	RE [%]	-8,4	+0,9	-0,9	+1,0
		RSD [%]	11,0	6,3	5,7	6,5
SQC	RE [%]	-7,5	-1,1	-0,5	+1,6	
	RSD [%]	11,3	7,4	7,2	6,8	
<b>Vollblut</b>		[n = 16]	<b>20,0</b>	<b>100,0</b>	<b>200,0</b>	<b>400,0*</b>
	PQC	RE [%]	-4,9	-8,4	-3,0	+1,1
		RSD [%]	10,2	6,1	6,3	7,6
	SQC	RE [%]	-1,5	-10,1	-3,3	-2,7
		RSD [%]	11,7	1,5	8,0	9,2
		[n = 72]	<b>200,0</b>	<b>1000,0</b>	<b>2000,0</b>	<b>4000,0*</b>
	PQC	RE [%]	-1,5	-1,9	-0,2	-1,4
		RSD [%]	11,7	5,1	5,6	4,0
	SQC	RE [%]	-4,0	-4,1	-4,3	-2,1
		RSD [%]	11,5	8,7	7,6	12,4

\* Vermessung nach Verdünnung durch den Autosampler des GF-AAS-Systems

\*\* Aufgrund der Messung ohne Aufarbeitung wurde nicht zwischen SQC- und PQC unterschieden.

Neben der Kontrolle der Qualität hinsichtlich Richtigkeit und Präzision anhand von QC-Proben wurde während der Routinemessungen auch die Linearität jeder Kalibrierung dadurch geprüft, dass die Absorptionen für die einzelnen Kalibratoren in die korrespondierenden Konzentrationen (Kalibratorkonzentrationen s. Kap. 2.2.3, Tab. 2.4) umgerechnet und davon über den gesamten Messzeitraum die relative Abweichung vom Sollwert und die relative Standardabweichung bestimmt wurden. Diese Werte, die in Tab. 3.12 zusammengefasst sind, lagen für alle Matrices im Bereich der oben angegebenen Qualitätskontrollproben.

Tab. 3.12 *Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) der Kalibratoren (n = 8 - 38)*

	Konzentrationsbereich [ng/mL]	Parameter	Standards					
			1	2	3	4	5	6
Plasma	20,0 - 200,0 [n = 8]	RE [%]	-11,5	-4,5	+4,9	+1,8	+1,0	-2,0
		RSD [%]	4,0	3,1	2,3	2,5	1,8	0,7
	200,0 - 2000,0 [n = 38]	RE [%]	-7,8	-1,9	+1,7	+2,1	+0,7	-1,3
		RSD [%]	4,7	2,6	2,0	1,6	1,4	1,1
Ultrafiltrat	5,0 - 50,0 [n = 20]	RE [%]	+1,3	+0,2	+0,1	-1,4	+0,3	+0,3
		RSD [%]	7,7	4,4	1,6	3,5	1,1	1,5
	50,0 - 500,0 [n = 28]	RE [%]	-2,6	-1,6	+0,3	+1,0	+1,1	-1,0
		RSD [%]	4,2	2,3	1,1	0,9	0,5	0,5
Vollblut	50,0 - 500,0 [n = 8]	RE [%]	-11,7	-2,3	+1,5	+3,2	+1,8	-2,3
		RSD [%]	6,8	4,2	2,7	2,1	0,9	0,9
	200,0 - 2000,0 [n = 36]	RE [%]	-6,5	-3,4	+0,5	+2,5	+2,3	-2,3
		RSD [%]	7,4	3,3	3,1	1,9	1,6	1,1

## 3.2 Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte

Die Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte in Leukozytenproben erfolgte in mehreren Schritten. Nach der Isolierung der Leukozyten aus Vollblut wurde aus den gewonnenen Zellen die DNA extrahiert. Diese wurde anschließend mittels UV-Spektrometrie quantifiziert. Die Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins erfolgte mittels GF-AAS oder adsorptiver Voltammetrie. Aus den so bestimmten DNA- und Platinkonzentrationen wurde dann das Platin-Nukleotid-Verhältnis berechnet als ein Maß für die Platin-DNA-Adduktbildung.

Sowohl die UV-spektrometrische Bestimmung als auch die Platinquantifizierung wurden hinsichtlich Richtigkeit und Präzision überprüft. Die Platinbestimmung wurde, ähnlich wie in den anderen Matrices, auch bezüglich der Selektivität, Bestimmungsgrenze, Linearität und Wiederfindung validiert.

### 3.2.1 Isolierung der DNA aus Leukozyten

#### Vergleich verschiedener DNA-Isolierungsverfahren

Zunächst wurden in einem Vorversuch drei verschiedene Methoden zur DNA-Isolierung untersucht. Dazu wurden Lymphozyten (Kap. 2.3.1) aus Buffy Coat isoliert und anschließend unter den in Kap. 2.3.2 beschriebenen Bedingungen mit Oxaliplatin inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz in Aliquote mit einem Volumen von je 200  $\mu\text{L}$  aufgeteilt. Aus jeweils 6 Aliquoten wurde dann mit den unterschiedlichen Verfahren die DNA isoliert (s. Kap. 2.3.3).

Anschließend erfolgte die Quantifizierung der DNA, deren Ausbeute und Reinheit nach Anwendung der unterschiedlichen Verfahren miteinander verglichen wurde.

Die Reinheit der DNA war in allen Fällen gegeben; eine vollständige Abtrennung der Proteine war offenbar möglich, so dass die Reinheitskriterien (s. Kap. 2.3.4) für alle Proben erfüllt wurden.

Beim Vergleich der erhaltenen Nukleotidstoffmengen (s. Abb. 3.10) stellte sich heraus, dass die größte Menge an DNA mit der Phenolmethode erhalten wurde. Im Mittel konnten mit dieser Methode  $151,8 \pm 21,4$  nmol Nukleotide isoliert werden, während mit den anderen Verfahren deutlich geringere Ausbeuten erhalten wurden.

Besonders mit dem QIAGEN® Genomic-Tip-Kit war die erhaltene Stoffmenge an Nucleotiden mit  $37,4 \pm 8,2$  nmol besonders niedrig. Das QIAamp®-System lag mit  $112,3 \pm 14,2$  nmol zwischen den beiden anderen Methoden.

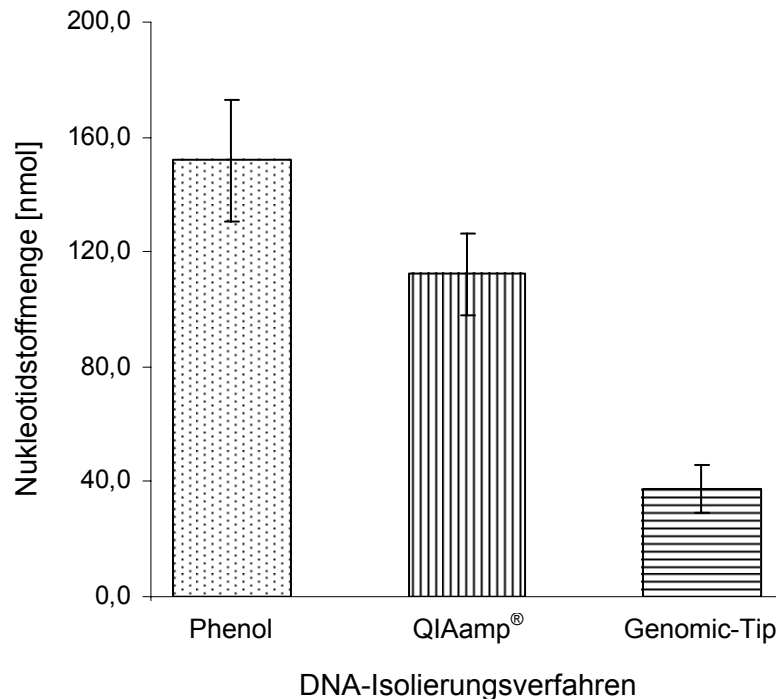


Abb. 3.10 Nucleotidstoffmengen nach Anwendung unterschiedlicher DNA-Isolierungsverfahren (jeweils  $n = 6$ )

Im Anschluss an die Quantifizierung wurden die Proben in der Speed-Vac® bis zur Trockene einrotiert. Die Rückstände der platinhaltigen Proben wurden in Wasser aufgenommen und mittels GF-AAS das an die DNA gebundene Platin quantifiziert.

Eine hohe DNA-Ausbeute ist die Grundlage für die Quantifizierbarkeit des an die DNA gebundenen Platins. Ein identisches Platin-Nucleotid-Verhältnis vorausgesetzt, werden bei hoher DNA-Ausbeute entsprechend hohe Platinkonzentrationen erreicht. Dies war auch in diesem Experiment der Fall: in den Proben, die nach der Phenolmethode bearbeitet worden waren, waren die Konzentrationen am höchsten und konnten sicher quantifiziert werden. Auch die DNA-Menge der QIAamp®-Proben ermöglichte eine sichere Platin-Bestimmung, während der Platingehalt in den Proben des Genomic-Tip-Kits z.T. schon unter  $5,0$  ng/mL lag und daher nur noch durch Dreifachinjektion quantifiziert werden konnte.

Die Platin-Nukleotid-Verhältnisse sollten bis auf akzeptable Schwankungen, die durch mögliche Inhomogenitäten der aufgearbeiteten Lymphozytensuspension und durch die Streuung des Aufarbeitungs- und Quantifizierungsverfahrens bedingt sind, theoretisch gleich sein. Praktisch zeigte sich jedoch (s. Abb. 3.11), dass die Menge der Addukte in den Proben, die nach der Phenolmethode bearbeitet worden waren, mit  $12,3 \pm 1,5$  Pt-Atomen pro  $10^5$  Nukleotide höher waren als nach den beiden anderen Methoden [ $9,8 \pm 1,5$  (QIAamp<sup>®</sup>) bzw.  $9,0 \pm 2,2$  (Genomic-Tip)].

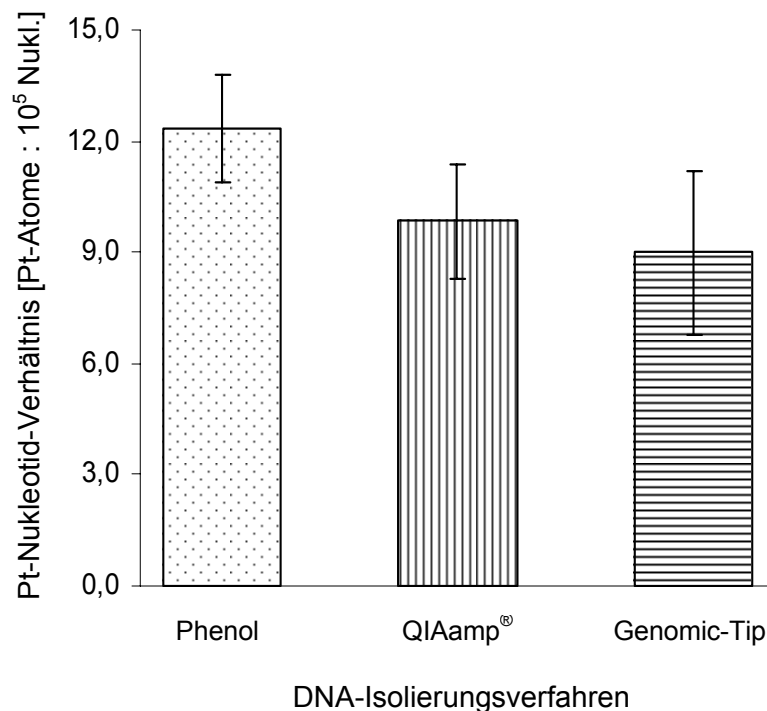


Abb. 3.11 Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Anwendung unterschiedlicher DNA-Isolierungsverfahren (jeweils  $n = 6$ )

Die durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ergab, dass sich die Werte signifikant voneinander unterschieden ( $p = 0,004$ ); der paarweise Vergleich der drei Gruppen nach *Scheffé* zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Platin-Nukleotid-Verhältnissen nach Phenolextraktion und QIAamp<sup>®</sup>- bzw. Genomic-Tip-Verfahren ( $p = 0,027$  bzw.  $p = 0,01$ ). Die Addukt mengen nach Durchführung der QIAamp<sup>®</sup>- und Genomic-Tip-Methode unterschieden sich nicht signifikant.

Für diesen Befund kommen verschiedene Erklärungsansätze in Betracht.

Da nach den Qiagen-Methoden, sowohl nach dem QIAamp<sup>®</sup>-Verfahren als auch nach Anwendung des Genomic-Tip-Kit, weniger Addukte gefunden wurden als nach Isolierung

rung der DNA mittels Phenolmethode, wäre es denkbar, dass während der Aufarbeitung mit Hilfe der Kits Addukte zerstört wurden und so die erhaltenen Platin-Nukleotid-Verhältnisse geringer ausfielen. Diese Hypothese zu überprüfen, gestaltet sich sehr schwierig, da man Adduktproben mit definiertem, bekanntem Platin-Nukleotid-Verhältnis generieren und untersuchen müsste.

Ein anderer Aspekt ist die Wiederfindungsrate von Platin in der Matrix, die nach den unterschiedlichen DNA-Isolierungsverfahren erhalten wird. Neben DNA enthält diese die Salze des Puffers AE, mit Hilfe dessen die DNA von den QIAamp<sup>®</sup>-Säulen isoliert bzw. in dem die gefällte DNA gelöst wurde. Außerdem könnten Reste der bei den Festphasenextraktionen benutzten Puffer unbekannter Zusammensetzung und möglicherweise auch Säulenmaterial bei der DNA-Elution mit in die Probe gelangt sein.

Um die Wiederfindung von Platin in den drei unterschiedlichen Matrices zu überprüfen, wurde das oben beschriebene Experiment wiederholt. Der einzige Unterschied zur vorherigen Durchführung bestand darin, dass die Lymphozyten diesmal nicht mit Platin inkubiert worden waren. Die DNA-Isolierungen wurden wie beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen DNA-Pufferlösungen, die ähnliche Nukleotidstoffmengen aufwiesen wie im ersten Experiment [ $130,6 \pm 11,6$  nmol (Phenol),  $110,4 \pm 6,0$  nmol (QIAamp<sup>®</sup>),  $30,4 \pm 3,6$  nmol (Genomic-Tip-Kit)] wurden in der Speed-Vac<sup>®</sup> zur Trockene eingengt und anschließend in Lösungen mit 20,0 bzw. 40,0 ng/mL Platin aufgenommen. Danach wurden die Lösungen, die somit eine definierte Platinmenge in derselben Matrix enthielten wie die Adduktproben, mittels GF-AAS vermessen.

Dabei zeigte sich eine höhere mittlere Wiederfindungsrate bei den Proben, die mit der Phenolmethode bearbeitet worden waren. Die Werte lagen für diese Proben mit 88,5 % noch im akzeptierten 15 %-Bereich, während die WFR nach Durchführung der anderen beiden Verfahren durchschnittlich nur bei etwa 64 % lag.

Eine Beeinflussung durch die DNA selbst konnte durch Spiken und Vermessen von jeweils 6 Kalbsthymus-DNA-Lösungen mit Platin ausgeschlossen werden. Diese Lösungen zeigten im Vergleich zu wässrigen Platinlösungen keine geringeren Konzentrationen. Für Sollkonzentrationen von 20,0 und 40,0 ng/mL wurden Wiederfindungsraten von 104 bzw. 97 % ermittelt.

Tab. 3.13 *Mittlere Wiederfindungsraten von Platin in den Matrizes, die nach Anwendung der Phenolmethode, des QIAamp<sup>®</sup>-Systems und des Genomic-Tip-Kits erhalten wurden (MW  $\pm$  SD; jeweils n = 6)*

		Platinkonzentration [ng/mL]	
		20,0	40,0
WFR [%]	Phenol	86,6 $\pm$ 4,5	84,5 $\pm$ 5,7
	QIAamp <sup>®</sup>	64,2 $\pm$ 7,8	67,5 $\pm$ 7,3
	Genomic-Tip	66,5 $\pm$ 3,0	59,0 $\pm$ 7,8

Offenbar beeinflussten Matrixbestandteile, die durch die Extraktion der DNA in die Proben gelangten, die AAS-Bestimmung so, dass bis zu 40 % Platin zu wenig gefunden wurde. Korrigiert man die Platin-Nukleotid-Verhältnisse des ersten Experiments, dessen Ergebnisse in Abb. 3.11 dargestellt sind, mit denen sich aus der Wiederfindungsrate ergebenden Korrekturfaktoren für die jeweiligen Verfahren, so erhält man Adduktverhältnisse, die zwischen 14,3 und 14,8 Platin-Atomen pro 10<sup>5</sup> Nukleotiden liegen und sich nicht mehr signifikant voneinander unterscheiden.

Alle Verfahren eignen sich grundsätzlich für eine DNA-Isolierung und anschließende Platin-DNA-Addukt-Quantifizierung. Allerdings weist die Genomic-Tip-Methode einige Nachteile auf: neben einer vergleichsweise geringen DNA-Ausbeute ist auch die Wiederfindungsrate in der erhaltenen Matrix sehr gering. Dies kann dazu führen, dass eine korrekte Quantifizierung, besonders bei geringem Ausmaß der Platinierung in klinischen Proben, nicht mehr möglich ist.

Hinsichtlich dieses Gesichtspunkts ist die Phenolmethode sehr vorteilhaft. Sie bietet eine hohe DNA-Ausbeute und beeinflusst die Wiederfindungsrate am wenigsten. Allerdings weist sie eine Reihe von Nachteilen auf, die eine Bearbeitung klinischer Proben sehr schwierig werden lässt. Sie ist sehr zeitaufwändig und erlaubt es nicht, viele Proben gleichzeitig zu bearbeiten, da die Extraktionen und anschließenden Phasentrennungen nur für jede Probe einzeln durchgeführt werden können. Um eine gute Abtrennung der Zellproteine und damit ausreichende DNA-Reinheit zu gewährleisten, ist es notwendig, die Phenol-Extraktion insgesamt dreimal durchzuführen. Somit ist der Zeitbedarf für jede Probe sehr hoch.

Eine weitere Schwierigkeit der Phenolmethode besteht darin, die Phasen, die DNA bzw. abzutrennende Proteine enthalten, vollständig zu trennen. Die Phasengrenze ist oft nur



schwer zu erkennen und Kontaminationen können sehr leicht erfolgen. Hat man nach der Abtrennung der Proteine die DNA mit Hilfe von Isopropanol gefällt, so ist es schwierig, den Überstand über dem DNA-Pellet, der ja eventuell ungebundenes Platin enthält, quantitativ abzutrennen, ohne wieder DNA mitzuentfernen.

Demgegenüber zeigt die QIAamp<sup>®</sup>-Methode für den Einsatz in der Routine die besten Voraussetzungen. Die DNA-Ausbeute ist zwar etwas geringer als bei der Phenolmethode und außerdem ist die Wiederfindungsrate von Platin bei der GF-AAS-Bestimmung in der erhaltenen Matrix relativ niedrig. Jedoch ist die Handhabbarkeit für eine hohe Anzahl an Proben, die mit QIAamp<sup>®</sup> in kurzer Zeit bearbeitet werden können, wesentlich besser als bei der Phenolmethode. Durch eine kurze Bearbeitungszeit werden Prozesse, die während dieser Zeit ablaufen könnten und die Höhe der Platin-Nukleotid-Verhältnisse eventuell beeinflussen könnten, vermieden.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die QIAamp<sup>®</sup>-Methode eingesetzt. Die Platinkonzentrationen, die danach erhalten wurden, wurden mit einem Korrekturfaktor multipliziert (s. Kap. 3.2.3.1: "Wiederfindung"), da die Wiederfindungsrate konstant über alle untersuchten Konzentrationen war.

Um die geringe Wiederfindungsrate näher zu charakterisieren, wurden alle bei der QIAamp<sup>®</sup>-Isolierung verwendeten Puffer mit Platin gespikt und vermessen. Da die Platinquantifizierung in diesen Lösungen richtig und präzise möglich war, schienen die Inhaltsstoffe der Puffer die Platinbestimmung nicht negativ zu beeinflussen. Daher wurden durch jeweils 6 QIAamp<sup>®</sup>-Säulen, ähnlich wie bei der Elution aufgereinigter DNA, einmal 200 und einmal 100 µL Wasser zentrifugiert. Dieses Wasser wurde getrocknet und der Rückstand in platinhaltiger Lösung aufgenommen. Dabei zeigte sich derselbe Effekt wie zuvor bei den DNA-haltigen Proben. Die Wiederfindungsrate lag durchschnittlich nur bei  $71,6 \pm 7,2$  % und war somit in demselben Bereich wie im Experiment zuvor. Daher kann man davon ausgehen, dass Bestandteile des Säulenmaterials die Bestimmung mittels GF-AAS beeinträchtigen und der Grund für die geringe Wiederfindungsrate sind.

### Einfluss von Ribonuclease auf die Bestimmung von Platin-DNA-Addukten

Mit allen untersuchten DNA-Isolierungsverfahren und damit auch mit dem für die klinischen Proben verwendeten QIAamp®-System ist eine Differenzierung zwischen RNA und DNA nicht möglich. Da die untersuchten Zellen sowohl DNA als auch RNA enthalten, ist es denkbar, dass bei der Isolierung der DNA auch RNA miterfasst wird und die enthaltenen Platin-RNA-Addukte das Ergebnis für die Platin-DNA-Addukte eventuell verfälschen.

Um den Anteil von RNA-Addukten in den Proben zu charakterisieren, wurde in einem weiteren Vorversuch das Probenaufarbeitungsprotokoll in einem Punkt geändert und zusätzlich während der Lyse der Zellen ein Abbau der RNA durch Ribonuclease (RNase) durchgeführt. Diese wurde im Überschuss zugegeben, um zu vermeiden, dass sie durch die für die Lyse der Zellen eingesetzte Protease sofort abgebaut und so inaktiviert wurde. In einer vergleichenden Untersuchung wurden 6 Aliquote des Inkubationsansatzes des vorherigen Versuchs zur DNA-Isolierung *mit* und weitere 6 Aliquote *ohne* den Zusatz von RNase bearbeitet. Die erhaltenen Platin-Nukleotid-Verhältnisse sind in Abb. 3.12 dargestellt.

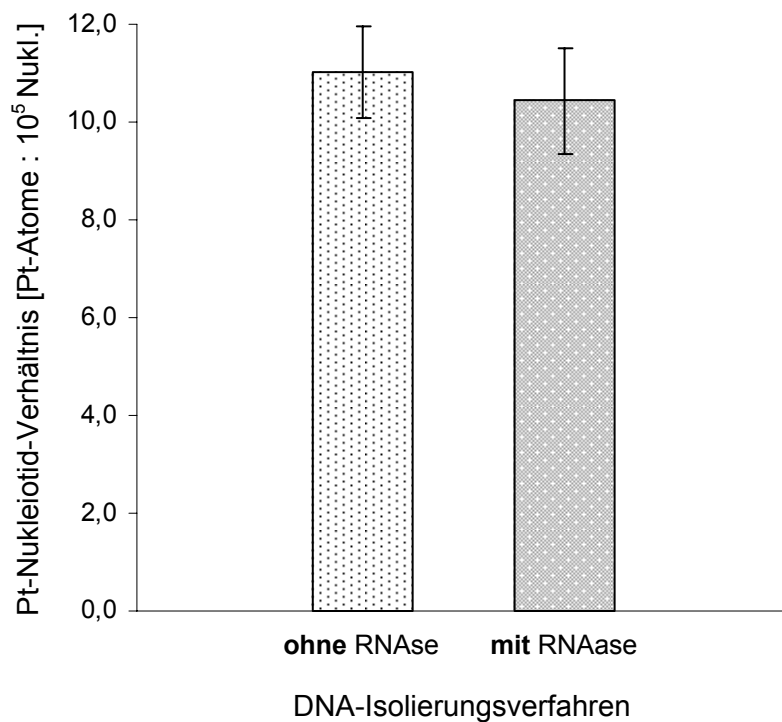


Abb. 3.12 Einfluss von RNase auf die Platin-Nukleotid-Verhältnisse (jeweils  $n = 6$ )

Die Menge der Addukte, die mit *mit* ( $10,4 \pm 1,1$  Pt-Atome :  $10^5$  Nukl.) und *ohne* RNase ( $11,0 \pm 0,9$  Pt-Atome :  $10^5$  Nukl.) erhalten wurde, waren nicht signifikant verschieden ( $p = 0,440$  nach t-Test). Da die Abbau-Produkte der RNase-Reaktion nicht an die Silikamembran adsorbiert werden<sup>176</sup>, konnte man annehmen, dass die Platinierung von RNA und DNA in gleichem Ausmaß erfolgte. Da die RNase das Ergebnis hinsichtlich der Platin-DNA-Addukte offenbar nicht beeinflusste, wurde in den weiteren Untersuchungen auf ihre Zugabe verzichtet.

Alle nachfolgenden Bestimmungen, sowohl die Validierung des Verfahrens als auch die klinischen Untersuchungen, wurden mittels QIAamp<sup>®</sup>-System durchgeführt.

### 3.2.2 Quantifizierung der DNA

Ein weiterer Teilschritt bei der Bestimmung des Platin-Nukleotid-Verhältnisses ist die DNA-Quantifizierung mittels UV-Spektrometrie. Zur Überprüfung dieses Teils der Analyse wurden ähnlich wie bei der Platinbestimmung QC-Proben mit drei verschiedenen Konzentrationen (10,0, 20,0 und 40,0  $\mu\text{g/mL}$  DNA in Wasser) hergestellt und über den gesamten Zeitraum der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen vermessen. Die Richtigkeit und Präzision der DNA-Quantifizierung wurde wie bei der GF-AAS durch den relativen Fehler und die relative Standardabweichung ausgedrückt. Daneben wurde auch eine Intraday-Bestimmung der beiden Parameter durchgeführt.

Tab. 3.14 *Intraday- und Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) der DNA-Quantifizierung (n = 6 - 31)*

		Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]		
		10,0	20,0	40,0
<i>Intraday</i> [n = 6]	RE [%]	+1,5	+0,8	+1,1
	RSD [%]	0,6	0,9	0,1
<i>Interday</i> [n = 31]	RE [%]	-5,2	+1,7	-2,1
	RSD [%]	5,5	4,9	3,5

Relative Fehler und relative Standardabweichungen waren für alle Konzentrationen bei Messungen an verschiedenen Tagen  $\leq 5,5$  %. Die Intraday-Fehler und -Impräzision sind mit Werten von  $\leq 1,5$  % wie erwartet deutlich geringer. Neben der Beurteilung der

Richtigkeit und Präzision der Bestimmung wurde auch die Reinheit der erhaltenen DNA geprüft. Dort konnten bei allen Proben die Reinheitskriterien (s. Gl. 2.5) erfüllt werden.

### **3.2.3 Quantifizierung des Platingehalts in DNA-Adduktproben**

Die Quantifizierung des an die DNA gebundenen Platins erfolgte je nach Herkunft der Proben (in vitro bzw. in vivo) mittels GF-AAS bzw. adsorptiver Voltammetrie.

#### **3.2.3.1 Validierung der Quantifizierung des Platingehalts in DNA-Adduktproben mittels GF-AAS**

Für die Quantifizierung von Platin in In-vitro-Adduktproben wurde eine Kalibrierung in Wasser durchgeführt. Eine matrixadaptierte Kalibrierung wie bei den anderen Matrices war nicht möglich. Damit die Matrix der Kalibratoren der der Proben entsprach, wäre für jeden einzelnen Kalibrierpunkt eine Buffy-Coat-Menge benötigt worden, die 15 mL Vollblut entsprach. Da solch große Mengen an Blut bzw. Buffy Coat gesunder Probanden allein für die Kalibrierung nicht vorhanden waren, wurde stattdessen in Wasser kalibriert und die Wiederfindung von Platin in Proben, die hinsichtlich ihrer Matrix den Patientenproben entsprachen (s. Kap. 2.3.5.1), bestimmt.

Zunächst wurde die Bestimmung in Wasser in ähnlicher Weise validiert wie in den anderen Matrices. Es wurden zwei Konzentrationsbereiche abgedeckt: 5 - 50 ng/mL und 1 - 10 ng/mL. Für den unteren Bereich wurde die Dreifachinjektionstechnik verwendet.

#### **Selektivität**

Die Selektivität der Bestimmung von Platin in Wasser wurde durch Vergleich der Spektrogramme von reinem Wasser mit denen des am niedrigsten konzentrierten Kalibrators verglichen. Wie bei den zuvor untersuchten Matrices konnte durch das Fehlen element-spezifischer Absorptionen während der Messphase die Selektivität gezeigt werden. Sowohl beim Vergleich der Spektrogramme von Wasser nach Einfach- als auch nach Dreifachinjektion mit dem jeweiligen untersten Standard (5,0 bzw. 1,0 ng/mL) wurde deutlich, dass das Signal dieses Kalibrators, das um den Betrag des Grundrauschens korrigiert wurde, sich deutlich von der Absorption des platinfreien Wassers unterschied. In den beiden folgenden Abbildungen 3.13 und 3.14 werden die Spektrogramme von platinfreiem Wasser (Teil A) und des niedrigsten Standards einer Kalibrierreihe (Teil B) gezeigt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Untergrundabsorption verzichtet.

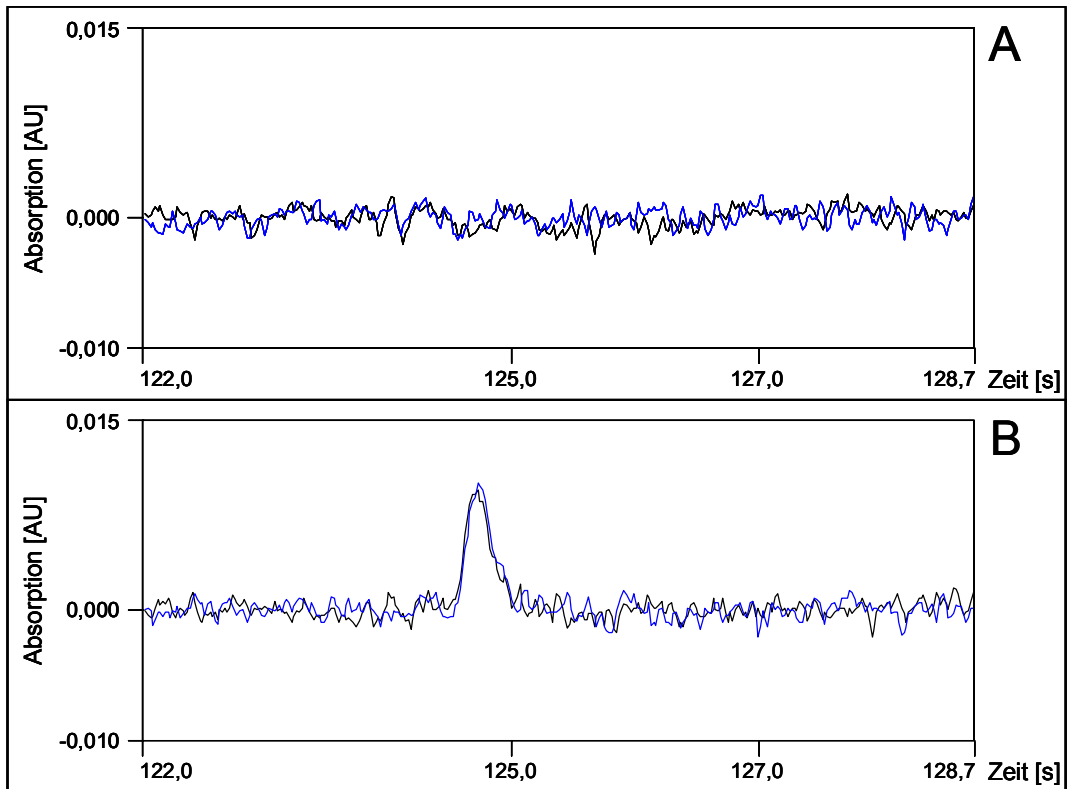


Abb. 3.13 Spektrogramme **Wasser** für den Kalibrierbereich 5 - 50 ng/mL nach Einfachinjektion: **A** Platinfreies Wasser, **B** Kalibrator 5 ng/mL

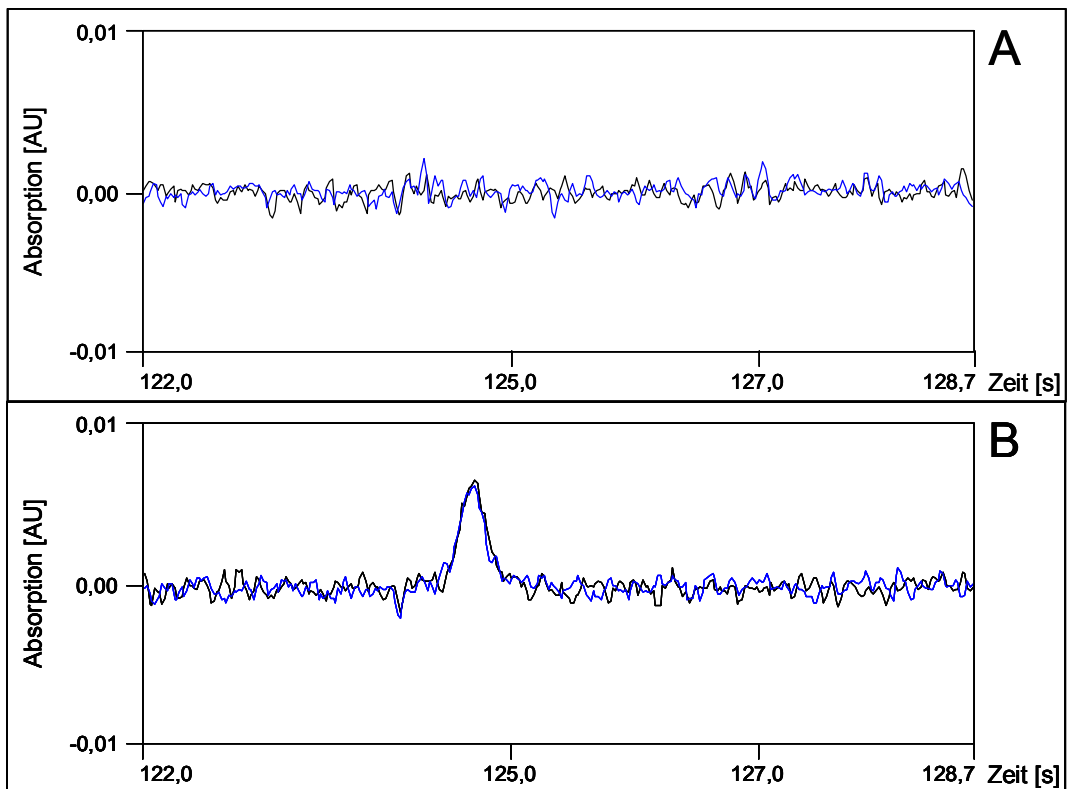


Abb. 3.14 Spektrogramme **Wasser** für den Kalibrierbereich 1 - 10 ng/mL nach Dreifachinjektion: **A** Platinfreies Wasser, **B** Kalibrator 1 ng/mL

### Messbereich und Bestimmungsgrenze

Für die Quantifizierung der Platinkonzentrationen in Adduktproben war es notwendig, den Messbereich im Vergleich zu den übrigen Matrices nach unten zu erweitern. In den Matrices Plasma, Vollblut und Ultrafiltrat wurde eine Bestimmungsgrenze von 5,0 ng/mL ohne Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren festgestellt.

Mit Hilfe der Dreifachinjektionstechnik konnte eine Bestimmungsgrenze von 1 ng/mL erreicht werden, die es erlaubte, alle Proben nach Inkubation zuverlässig zu vermessen. Eine Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins in Patientenproben war jedoch auch mit diesem Verfahren nicht möglich.

Für die Bestimmungsgrenze in Wasser wurde überprüft, ob die Signalhöhen, die nach Injektion von Standards der Konzentrationen 5,0 bzw. 1,0 ng/mL erhalten wurden, fünfmal so hoch waren wie das Grundrauschen nach Injektion von Wasser. Außerdem wurde geprüft, ob die o.g. Konzentrationen mit einem relativen Fehler und einer relativen Standardabweichung von höchstens 20 % bestimmt werden konnten.

Zunächst wurden von sechs Kalibrierreihen die Mittelwerte der Absorptionen für die platinfreie Matrix ( $\bar{A}_{\text{Wasser}}$ ) berechnet und mit der mittleren Absorption des jeweils niedrigsten Kalibrators ( $\bar{A}_{\text{Standard}_{\text{min}}}$ ), verglichen. In Tab. 3.15, in der die Ergebnisse zusammengefasst sind, werden sowohl die unkorrigierten Absorptionen als auch in Klammern die um den Betrag der Signalhöhe des Leerwerts korrigierten Absorptionen und die sich daraus ergebenden Verhältnisse angegeben.

Tab. 3.15 Vergleich der mittleren Absorption von platinfreiem Wasser und dem Standard mit der niedrigsten Konzentration (jeweils  $n = 6$ )

Konzentrationsbereich [ng/mL]	Injektionstechnik	$\bar{A}_{\text{Wasser}}$ [AU]	$\bar{A}_{\text{Standard}_{\text{min}}}$ * [AU]	$\bar{A}_{\text{Standard}_{\text{min}}} / \bar{A}_{\text{Wasser}}$ *
1,0 - 10,0	Dreifachinjektion	0,0017	0,0094 (0,0077)	5,5 (4,6)
5,0 - 50,0	Einfachinjektion	0,0017	0,0119 (0,0102)	7,0 (6,0)

\* In Klammern sind die um den Betrag der Signalhöhe des Leerwerts korrigierten Absorptionen und die sich daraus ergebenden Verhältnisse angegeben

Sowohl für 5,0 ng/mL als auch für 1,0 ng/mL waren die Signalhöhen deutlich vom Grundrauschen verschieden. Die unkorrigierten Absorptionen waren mehr als fünfmal so hoch wie die Absorptionen nach Injektion von reinem Wasser.

Bei sechs Kalibrierreihen, die an unterschiedlichen Tagen aufgenommen wurden, wurden die Richtigkeit und Präzision der Bestimmung einer von der Kalibrierung unabhängigen QC-Probe kontrolliert, die dieselbe Konzentration aufwies wie der am niedrigsten konzentrierte Standard.

Tab. 3.16 Überprüfung der Bestimmungsgrenze (jeweils  $n = 6$ )

Konzentration [ng/mL]	Injektionstechnik	RE [%]	RSD [%]
1,0	Dreifachinjektion	+2,6	5,5
5,0	Einfachinjektion	-0,3	6,7

Wie aus Tab. 3.16 ersichtlich ist, wurden sowohl die Richtigkeits- als auch die Präzisionskriterien mit Werten zwischen 2,6 und 6,7 % erfüllt. Es konnten somit Lösungen der Konzentration 1,0 ng/mL sicher bestimmt werden.

### Linearität

Wie bei den anderen Matrices wurde für die Überprüfung der Linearität der Kalibrierreihen in Wasser neben dem Korrelationskoeffizienten, der  $> 0,99$  sein sollte, der Test nach *Mandel* durchgeführt. Außerdem wurden die mittleren Absorptionen jedes Standards nach sechs Kalibrierungen in die korrespondierenden Konzentrationen umgerechnet und der relative Fehler und die relative Standardabweichung des erhaltenen Mittelwerts bestimmt. Die Ergebnisse dieser Prüfungen sind in den beiden folgenden Tabellen 3.17 und 3.18 dargestellt.

Tab. 3.17 F-Werte und Korrelationskoeffizienten (jeweils  $n = 6$ )

Konzentrationsbereich [ng/mL]	F-Wert	Korrelationskoeffizient $r$
1,0 - 10,0	0,1 - 2,3	0,9987 - 0,9999
5,0 - 50,0	0,0 - 8,8	0,9994 - 0,9999

Die Korrelationskoeffizienten aller untersuchten Kalibriergeraden waren größer als 0,99. Für den *Mandel*-Test betrug der kritische Wert für 5,0 - 50,0 ng/mL 34,12 [6 Kalibratoren; ( $f_1 = 1$ ,  $f_2 = 3$ ,  $p = 0,01$ )], für 1,0 - 10,0 ng/mL 21,20 [7 Kalibratoren; ( $f_1 = 1$ ,  $f_2 = 4$ ,  $p = 0,01$ )]. Diese Werte wurden in allen untersuchten Reihen deutlich unterschritten.

Die Anforderungen an die relativen Fehler und Standardabweichungen für die aus Absorption sowie Steigung und Achsenabschnitt der Kalibriergeraden berechneten Konzentrationen der Standards (s. Kap. 2.3.5.1) wurden ebenfalls erfüllt. Alle Abweichungen lagen unter 6 %; die relativen Standardabweichungen erreichten nur im Bereich der Bestimmungsgrenze einen Wert von 17,1 %; ansonsten lagen die Werte unter 5,5 %.

Tab. 3.18 *Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) der Kalibratoren in Wasser; jeweils n = 6*

Konzentrationsbereich [ng/mL]	Parameter	Standards						
		1	2	3	4	5	6	7
1,0 - 10,0	RE [%]	-5,1	+0,3	+1,9	+1,1	-0,8	+0,4	-0,2
	RSD [%]	17,1	4,6	0,5	2,0	1,2	2,1	1,3
5,0 - 50,0	RE [%]	-1,7	+0,4	+0,1	+0,5	-0,4	+0,0	n.b.
	RSD [%]	5,1	2,4	1,3	1,4	1,0	0,9	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

### Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindung von Platin in der nach der DNA-Isolierung erhaltenen Matrix wurde zunächst aus Lymphozyten, die nicht mit Platin inkubiert worden waren, die DNA isoliert. Nach Trocknen der Eluate in der Speed-Vac<sup>®</sup> wurden die erhaltenen Rückstände in Platinlösungen mit definierter Konzentration aufgenommen. Diese Proben wurden an mindestens zwei Tagen zusammen mit wässrigen Proben derselben Konzentrationen vermessen; dabei wurden insgesamt vier Konzentrationen im Bereich von 5,0 - 50,0 ng/mL untersucht.

Die Wiederfindung in den Adduktproben verglichen mit einer wässrigen Lösung gleicher Konzentration war für alle untersuchten Konzentrationen vergleichbar und lag im Mittel bei nur 66,3 % (s. Tab. 3.19). Dieser Wert war mit dem Vorversuch, dessen Ergebnisse in Tab. 3.13 dargestellt sind, vergleichbar. Da diese Wiederfindungsrate reproduzierbar bestimmt werden konnte, wurden die mit der GF-AAS erhaltenen Ergebnisse jeweils mit dem Faktor 1,34 multipliziert.



Tab. 3.19 Mittlere Wiederfindungsrate von Platin in DNA-Adduktproben (MW  $\pm$  SD; n = 8 - 28)

	Konzentration [ng/mL]			
	10,0 [n = 8]	20,0 [n = 28]	40,0 [n = 8]	50,0 [n = 12]
WFR [%]	65,9 $\pm$ 8,2	64,3 $\pm$ 4,9	64,6 $\pm$ 10,2	70,4 $\pm$ 3,8

Auf die Untersuchung der Wiederfindungsrate im Bereich von 1,0 - 10,0 ng/mL wurde verzichtet, da in Vorversuchen deutlich wurde, dass mittels GF-AAS eine Quantifizierung in Adduktproben nach Gabe von Oxaliplatin aufgrund der geringen DNA-Platinierung nicht möglich war. Die Platinkonzentrationen in In-vitro-Proben lagen dagegen in der überwiegenden Zahl der Fälle im Bereich von 5,0 - 50,0 ng/mL.

### Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit und Präzision der Platinbestimmung in Wasser wurde anhand von Qualitätskontrollproben, die für jeden Konzentrationsbereich vier verschiedene Konzentrationen aufwiesen, überprüft.

Die relativen Fehler und Standardabweichungen, die nach Durchführung von sechs Messungen pro Konzentration an einem bzw. an verschiedenen Tagen berechnet wurden, lagen, wie Tab. 3.20 entnommen werden kann, deutlich unter 15 %. Dies galt auch für die Werte im Bereich der Bestimmungsgrenze.

Die *Interday*-Impräzisionen waren wie bei den zuvor untersuchten Matrices etwas höher als die entsprechenden *Intraday*-Werte. Die Richtigkeit zeigte die gegenläufige Tendenz.

Tab. 3.20 *Intraday- sowie Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) für die Platinbestimmung in Wasser (jeweils n = 6)*

		Konzentration [ng/mL]			
		1,0	2,0	5,0	10,0
<i>Intraday</i>	RE [%]	8,3	11,7	-0,5	-3,1
	RSD [%]	10,1	3,9	4,9	3,0
<i>Interday</i>	RE [%]	+2,6	-1,7	-0,1	-1,1
	RSD [%]	5,5	10,1	8,5	9,7

		Konzentration [ng/mL]			
		5,0	10,0	20,0	40,0
<i>Intraday</i>	RE [%]	-1,0	n.b	6,7	5,0
	RSD [%]	3,3	n.b	3,8	1,9
<i>Interday</i>	RE [%]	-0,3	-0,3	-0,5	+0,5
	RSD [%]	6,7	6,2	3,2	3,4

n.b. = nicht bestimmt

Für die Injektionspräzision wurden die gleichen QC-Lösungen sechsmal nacheinander in das GF-AAS-System injiziert und die relative Standardabweichung der gemessenen Absorptionen bestimmt. Für alle Konzentrationen wurden Werte  $\leq 10\%$  erhalten; wie zu erwarten war, nahm die Präzision mit sinkender Konzentration ab.

Tab. 3.21 *Injektionspräzision der Platinbestimmung in Wasser (RSD [%]); jeweils n = 6)*

Injektions-technik	Konzentration [ng/mL]	Mittlere Absorption [AU]	RSD [%]
Dreifach-injektion	1,0	0,0090	8,2
	2,0	0,0152	9,9
	5,0	0,0299	5,1
	10,0	0,0529	3,3
Einfach-injektion	5,0	0,0095	5,0
	20,0	0,0360	1,6
	40,0	0,0682	1,0

### 3.2.3.2 Validierung der Quantifizierung des Platingehalts in DNA-Adduktproben mittels adsorptiver Voltammetrie

Für die Quantifizierung des an die DNA gebundenen Platins in In-vivo-Proben, die während einer oxaliplatinhaltigen Therapie gewonnen wurden, wurde ausschließlich die adsorptive Voltammetrie eingesetzt. Nur mit diesem Verfahren, das eine vergleichsweise niedrige Bestimmungsgrenze aufweist, konnte eine sichere Quantifizierung durchgeführt werden. Das Verfahren wurde im INSTITUT FÜR SPEKTROCHEMIE UND ANGEWANDTE SPEKTROSKOPIE in Dortmund für die Messung von Platin in diversen Matrizes etabliert und validiert. Es ermöglicht eine Bestimmung von Platin bis zu einer Konzentration von 6 pg/mL bei einem benötigten Probenvolumen von 0,5 mL<sup>152</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision der Platinbestimmung in Leukozytenmatrix untersucht.

#### Wiederfindung

Für die Bestimmung der Platin-Wiederfindung in der Matrix, die nach der DNA-Isolierung aus Leukozyten erhalten wurde, wurde zunächst aus Leukozyten die DNA isoliert; anschließend wurden definierte Mengen Platin zugesetzt und die Ansätze bis zur Trockene einrotiert. Die Proben wurden dann wie in Kap. 2.3.5.2 beschrieben für die elektrochemische Bestimmung vorbereitet und vermessen. Neben diesen DNA-haltigen Proben wurden Proben in Wasser mit denselben Konzentrationen hergestellt und in derselben Weise bearbeitet. Die erhaltenen Wiederfindungsraten sind in Tab. 3.22 zusammengefasst.

Tab. 3.22 Wiederfindungsrate von Platin DNA-Adduktproben ( $n = 6$ )

	Platinmenge [pg]					
	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	100,0
<b>WFR [%]</b>	104,7	95,7	89,9	100,4	97,2	105,5

Die Wiederfindungsrate betrug im Mittel 98,9 %. Platin konnte somit ohne Verluste in der Matrix der Adduktproben quantifiziert werden, ohne dass die Bestimmung mittels adsorptiver Voltammetrie durch Matrixbestandteile beeinträchtigt wurde. Eine Korrektur der gemessenen Konzentrationen war somit nicht notwendig.

### Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit und Präzision wurden für die adsorptive Voltammetrie mittels QC-Proben beurteilt, die eine vergleichbare Matrixzusammensetzung aufwiesen wie die zu vermessenden Proben. Wie für die Bestimmung der Wiederfindung wurde die nach der DNA-Isolierung aus Leukozyten erhaltene Matrix mit Platin gespikt und vermessen. Die Platinmengen, die diese Proben enthielten, deckten den Bereich ab, in dem auch die Konzentrationen der Patientenproben lagen. Die Ergebnisse hinsichtlich Interday-Richtigkeit und -Präzision sind in Tab. 3.23 zusammengefasst.

Tab. 3.23 *Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) der Platinbestimmung mittels adsorptiver Voltammetrie (jeweils n = 6)*

	Platinmenge [pg]		
	20,0	200,0	400,0
RE [%]	+0,3	+8,7	+9,8
RSD [%]	7,0	8,0	7,4

Für alle drei Konzentrationen lagen sowohl die relativen Fehler als auch die relativen Standardabweichungen unter 15 %. Die Bestimmung von Platin in der DNA-haltigen Matrix war somit richtig und präzise über den gesamten Konzentrationsbereich möglich.

### 3.2.4 Präzision der Platin-DNA-Adduktbestimmung

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Methode bestehend aus DNA-Isolierung, DNA-Quantifizierung und Platin-Quantifizierung wurden die Intraday- und Interday-Präzision ermittelt. Dazu wurden Leukozyten gesunder Spender aus Buffy Coat isoliert und über 2 h mit 200 µM Oxaliplatin inkubiert (s. Kap. 2.3.1 und 2.3.2). Zur Bestimmung der Intraday-Präzision wurden sechs Aliquote des Inkubationsansatzes an einem Tag aufgearbeitet und vermessen. Für die Interday-Präzision wurden fünf weitere Aliquote an unterschiedlichen Tagen bearbeitet. Die Zeitspanne, während der die Proben bei -24 °C gelagert wurden, umfasste 15 Monate. Die Interday-Proben wurden sowohl mit GF-AAS als auch mit adsorptiver Voltammetrie vermessen. Wie in Kap. 2.3.6 beschrieben, wurde das Platin-Nukleotid-Verhältnis berechnet und die Präzision anhand der relativen Standardabweichung (s. Gl. 2.25) charakterisiert. Die Werte für die Platin-

Nukleotid-Verhältnisse, die mittels GF-AAS erhalten wurden, wurden aufgrund der reproduzierbaren Wiederfindungsrate von 66,3 % mit dem Faktor 1,34 multipliziert.

*Tab. 3.24 Inter- und Intraday-Präzision der Bestimmung von Platin-Nukleotid-Verhältnissen mittels GF-AAS bzw. adsorptiver Voltammetrie (Platin) und UV-Spektrometrie (DNA) (n = 5 - 6)*

	Platin-Nukleotid-Verhältnis [Pt-Atome : 10 <sup>5</sup> Nukleotide]		RSD [%]	
	GF-AAS	Voltammetrie	GF-AAS	Voltammetrie
<i>Intraday-Präzision</i>	14,0	n.b.	10,4	n.b.
<i>Interday-Präzision</i>	13,6	13,2	7,4	11,8

n.b. = nicht bestimmt

Mit beiden Verfahren der Platinbestimmung konnten hinsichtlich der Platin-Nukleotid-Verhältnisse vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Die Streuung war nach Anwendung der adsorptiven Voltammetrie mit 12 % etwas höher als nach Bestimmung mittels GF-AAS. Dies war wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Probenaufarbeitung für die elektrochemische Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins mehrere Schritte umfasste (vollständige Mineralisierung, Umsetzung zum Formazonkomplex), während für die GF-AAS-Bestimmung die getrockneten Eluate lediglich in Wasser aufgenommen und ohne weitere Vorbereitung vermessen wurden.

Die Interday-Präzision dieses komplexen, aus mehreren Teilschritten zusammengesetzten Verfahrens ist mit 7 - 12 % insgesamt als gut zu bewerten. Die Methode ist demnach geeignet, die Variabilität der Adduktbildung in Leukozyten zu charakterisieren.

### 3.3 Individuelle Pharmakokinetik von Oxaliplatin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pharmakokinetik von Platin nach Applikation drei verschiedener Dosierungen von Oxaliplatin untersucht. Dazu wurden zwischen 6 und 16 Blutproben pro Patient und Zyklus gesammelt und mittels einer validierten GF-AAS-Methode die Platinkonzentrationen in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut bestimmt. Die Platinkonzentration in den Erythrozyten wurde nach Gl. 2.1 berechnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pharmakokinetik von 26 der insgesamt 52 in Kap. 2.4 vorgestellten Patienten untersucht. Die Kinetik der übrigen 26 Patienten wird im Rahmen der Dissertation von *Frau A. Junker* beschrieben; dazu gehören die

Patienten, die im Sana Klinikum Remscheid mit  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin behandelt wurden und die Patienten mit gastrointestinalen Tumoren, die im Universitätsklinikum Essen  $130 \text{ mg/m}^2$  appliziert bekamen<sup>194</sup>.

In den folgenden Kapiteln sind die Konzentrations-Zeit-Profile für Platin in den Matrices Plasma (PL), Ultrafiltrat (UF), Vollblut (VB) und Erythrozyten (ERY) dargestellt. Für die Erstellung der Mittelwertskurven wurden die im Abnahmeprotokoll vorgesehenen theoretischen Entnahmezeitpunkte zugrunde gelegt. Zu der Standardabweichung der eingezeichneten Kurvenpunkte trägt also neben den interindividuellen Unterschieden auch die Variation der tatsächlichen Abnahmezeitpunkte bei. Die relative Standardabweichung für die Abnahmezeiten betrug in den Studien, in denen  $50 - 85 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin appliziert und nur bis zu 6 Proben entnommen wurden zwischen 10 und 20 %; in der Studie, in der die Patienten  $130 \text{ mg/m}^2$  erhielten variierten die Entnahmezeitpunkte mit Werten für die RSD zwischen 3 und 10 % deutlich weniger.

Außerdem wurden die ermittelten Daten pharmakokinetisch ausgewertet. Dazu dienten je nach Beobachtungszeitraum im Anschluss an die Infusion und untersuchter Matrix unterschiedliche Kompartiment-Modelle. Für eine Beobachtung über 24 bzw. 48 h nach Infusionsbeginn in Plasma und Ultrafiltrat wurde einheitlich ein Zwei-Kompartiment-Modell zu Grunde gelegt. Vollblutdaten, die über 48 h erhoben wurden, konnten ebenfalls mit diesem Modell ausgewertet werden. War die Sammlungsdauer jedoch nur 24 h, so wurde eine bessere Modellanpassung mit einem Ein-Kompartiment-Modell erreicht. Bei einzelnen Patienten wurden zusätzlich weitere Blutproben über 48 h nach Infusionsbeginn hinaus gesammelt. Diese Daten, die z.T. bis zu 400 h nach Infusionsende erhoben wurden, wurden mit einem Drei-Kompartiment-Modell ausgewertet.

Für die Modellanpassung an die Konzentrations-Zeit-Verläufe des Ultrafiltrats wurde der Wichtungsfaktor  $1/C_i^2$ , für Plasma- und Vollblut der Wichtungsfaktor  $1/C_i$  gewählt. Zur Modellauswahl wurden die in Kap. 2.7.2 beschriebenen Kriterien zugrunde gelegt.

Neben der modellabhängigen wurde auch eine modellunabhängige Auswertung durchgeführt. Da zur Beschreibung der Konzentrations-Zeit-Verläufe in den Erythrozyten kein geeignetes Modell zur Verfügung stand, wurde die AUC in dieser Matrix mittels Trapezregel berechnet (s. Kap. 2.7.1). Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Matrices zu gewährleisten, wurden auch für die anderen Matrices die Flächen unter der Konzentrations-Zeit-Kurve zusätzlich nach dieser Methode bestimmt.

In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von *Platin* und nicht die von *Oxaliplatin* quantifiziert. Die im Folgenden beschriebenen pharmakokinetischen Parameter für die verschiedenen Matrices beziehen sich daher ebenfalls auf *Platin*.

### 3.3.1 Wöchentliche Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

Im Zeitraum von August 1998 bis November 2000 wurden acht Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, deren Charakteristika in Tab. 2.6 (s. Kap. 2.4.1) dargestellt sind. Die Patienten (1 Frau und 7 Männer) litten an verschiedenen Tumorentitäten und wurden mit unterschiedlichen oxaliplatinhaltigen Kombinationstherapien, bei denen Oxaliplatin mit 60 mg/m<sup>2</sup> dosiert wurde, behandelt. Die Patienten waren z.T. mit anderen Chemotherapieprotokollen vorbehandelt; eine Vorbehandlung mit Oxaliplatin hatte jedoch in keinem Fall stattgefunden. Das mediane Alter der Patienten betrug 47 Jahre (30 - 63 Jahre). Alle Patienten wurden jeweils in einem ihrer ersten drei Behandlungszyklen untersucht.

#### Konzentrations-Zeit-Profile

In Abb. 3.15 sind die Konzentrations-Zeit-Profile für die untersuchten Matrices dargestellt. In die Mittelwertskurven gingen die Werte von allen 8 Patienten ein; eine Ausnahme bildeten die Matrices Vollblut und Erythrozyten. Dort konnten nur sechs Patienten untersucht werden, da bei den Patienten 1 und 2 in der Klinik kein Vollblut aliquotiert wurde.

Durch die halblogarithmische Darstellungsweise wird der mehrphasige Verlauf der Konzentrations-Zeit-Profile in Ultrafiltrat und Plasma deutlich, der für Ultrafiltrat am stärksten ausgeprägt war. In Vollblut und Erythrozyten fielen die Konzentrationsänderungen über die Zeit deutlich geringer aus.

Die maximalen Konzentrationen  $C_{\max}$  wurden in den Matrices Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut jeweils am Ende der zweistündigen Infusion erreicht und lagen bei  $1,330 \pm 0,254$ ,  $0,362 \pm 0,147$  und  $1,179 \pm 0,300$  µg/mL. In den Erythrozyten wurden die  $C_{\max}$ -Werte erst zu einem späteren Zeitpunkt errechnet; im Mittel lagen sie bei  $1,209 \pm 1,046$  µg/mL und wurden 3 h nach Infusionsbeginn erreicht. Die relative Standardabweichung der  $C_{\max}$ -Werte, die für Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut unter 40 % lag, war für die Erythrozytenkonzentrationen mit 87 % auffallend hoch. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Untersuchung nicht bei allen Patienten am selben Behand-

lungstag innerhalb desselben Zyklus stattfand. Es wurden sowohl unterschiedliche Behandlungstage als auch verschiedene Zyklen miteinbezogen. Oxaliplatin wird in hohem Maße in die Erythrozyten aufgenommen und kumuliert dort, so dass die Konzentrationen dort während der ersten Behandlungszyklen kontinuierlich ansteigen. Daher waren die Unterschiede innerhalb der gemessenen Vollblut- und v.a. Erythrozytenkonzentrationen, die auch den übrigen Beobachtungszeitraum und nicht nur die  $C_{\max}$ -Werte betrafen, nicht nur auf interindividuelle Unterschiede zwischen den Patienten hinsichtlich der Platinaufnahme in Erythrozyten, sondern auch auf die unterschiedlichen Behandlungstage zurückzuführen.

Die Streuungen der Konzentrationen in den Matrices Plasma und Ultrafiltrat waren mit relativen Standardabweichungen zwischen 20 und 36 % am geringsten ausgeprägt. Auffällig war lediglich eine hohe Standardabweichung für die Konzentration, die 24 h nach Infusionsbeginn im Ultrafiltrat gemessen wurde. Auch diese starke Streuung war vermutlich nicht in erster Linie auf Unterschiede zwischen den Patienten zurückzuführen, sondern auf einen uneinheitlichen Zeitpunkt der Probengewinnung (24 - 28 h nach Infusionsbeginn). Für die Mittelwertskurve wurde jedoch der theoretische Wert "24 h" eingesetzt. Da die Konzentrationsveränderung über die Zeit im Ultrafiltrat vergleichsweise stark ausgeprägt war, resultierte aus dieser Vorgehensweise vermutlich eine starke Streuung der Werte.

Die mittleren Konzentrationen vor Beginn der Oxaliplatininfusion lagen im Ultrafiltrat in der Regel unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,005  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; nur bei drei Patienten wurden mit 0,006 - 0,009  $\mu\text{g}/\text{mL}$  höhere Werte ermittelt. In Plasma, Vollblut und Erythrozyten dagegen waren bei allen Patienten messbare Platinkonzentrationen vorhanden. Der Grund dafür lag darin, dass die Patienten nicht am ersten Tag des ersten Zyklus, sondern an späteren Behandlungstagen im ersten Zyklus oder in späteren Zyklen untersucht wurden und somit noch Platin der vorausgegangenen Infusion(en) quantifiziert wurde.

Die Abnahme der Platinkonzentrationen nach dem  $C_{\max}$  erfolgte im Ultrafiltrat am schnellsten; zwei Stunden nach Infusionsende wurden noch 34 % der  $C_{\max}$  gemessen. Im gleichen Zeitraum fielen die Konzentrationen im Plasma auf 73 % und im Vollblut auf 86 % der  $C_{\max}$  ab. In den Erythrozyten waren 4 h nach Infusionsende 97 % der  $C_{\max}$  vorhanden, die ja auch erst eine Stunde zuvor erreicht worden war.



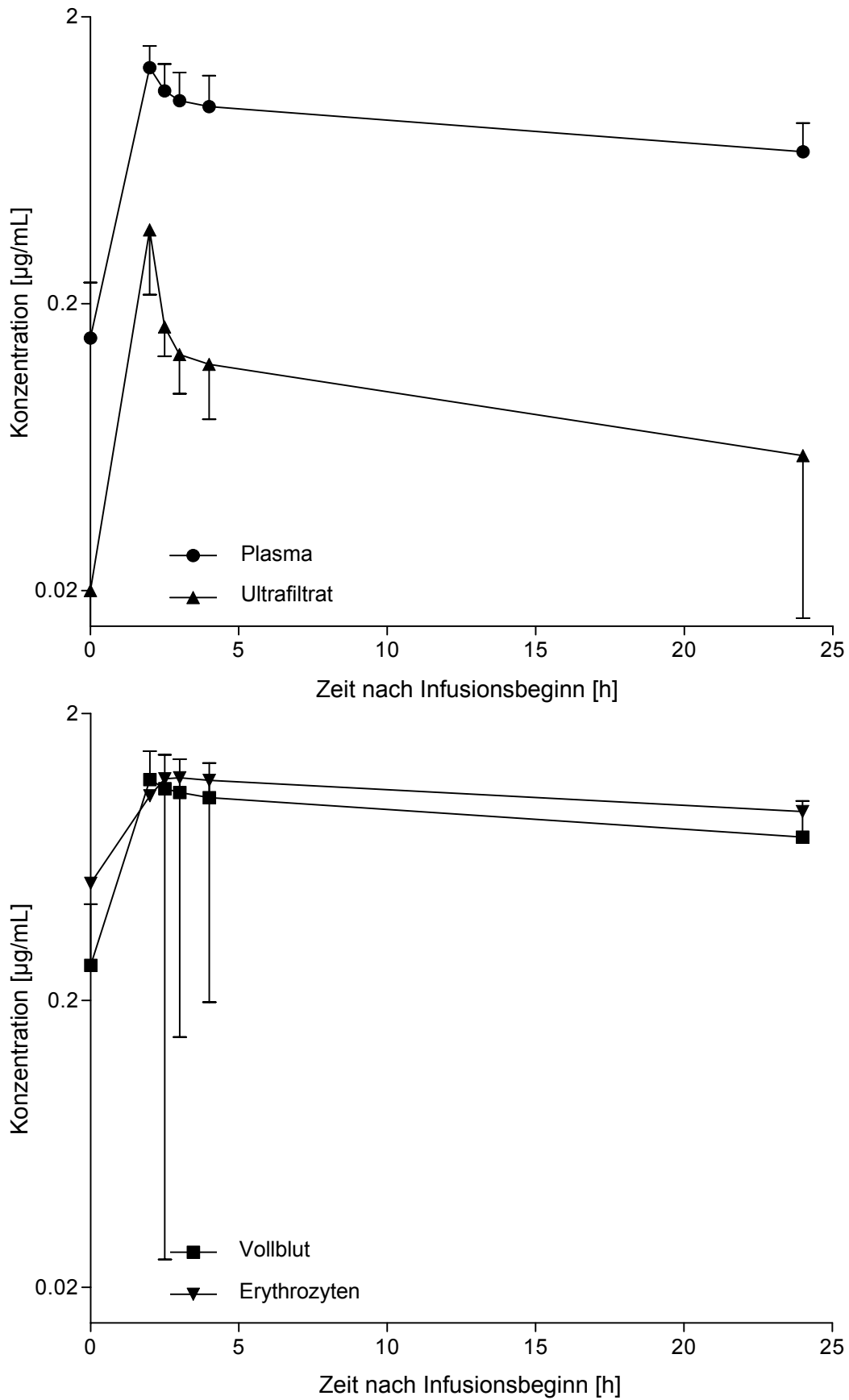


Abb. 3.15 Mittlerer Platinkonzentrations-Zeit-Verlauf in den Matrices Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten nach Applikation von  $60 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin ( $MW \pm SD$ ,  $n = 5 - 7$ )

### Bindung an Makromoleküle

Das Ausmaß der Bindung von Platin an Makromoleküle, wie z.B. Proteine, wurde durch die ultrafiltrierbare Fraktion ( $f_{UF}$ ) charakterisiert. Die ultrafiltrierbare Fraktion ist das Verhältnis der Konzentrationen von ultrafiltrierbarem Platin ( $C_{UF}$ ) und Gesamt-Platin im Plasma ( $C_{PL}$ ) und wurde für jeden Abnahmezeitpunkt nach folgender Gleichung berechnet.

$$f_{UF}[\%] = \frac{C_{UF}}{C_{PL}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.3}$$

Die mittleren Werte für  $f_{UF}$ , die von allen Patienten berechnet wurden, sind in Abb. 3.16 dargestellt.

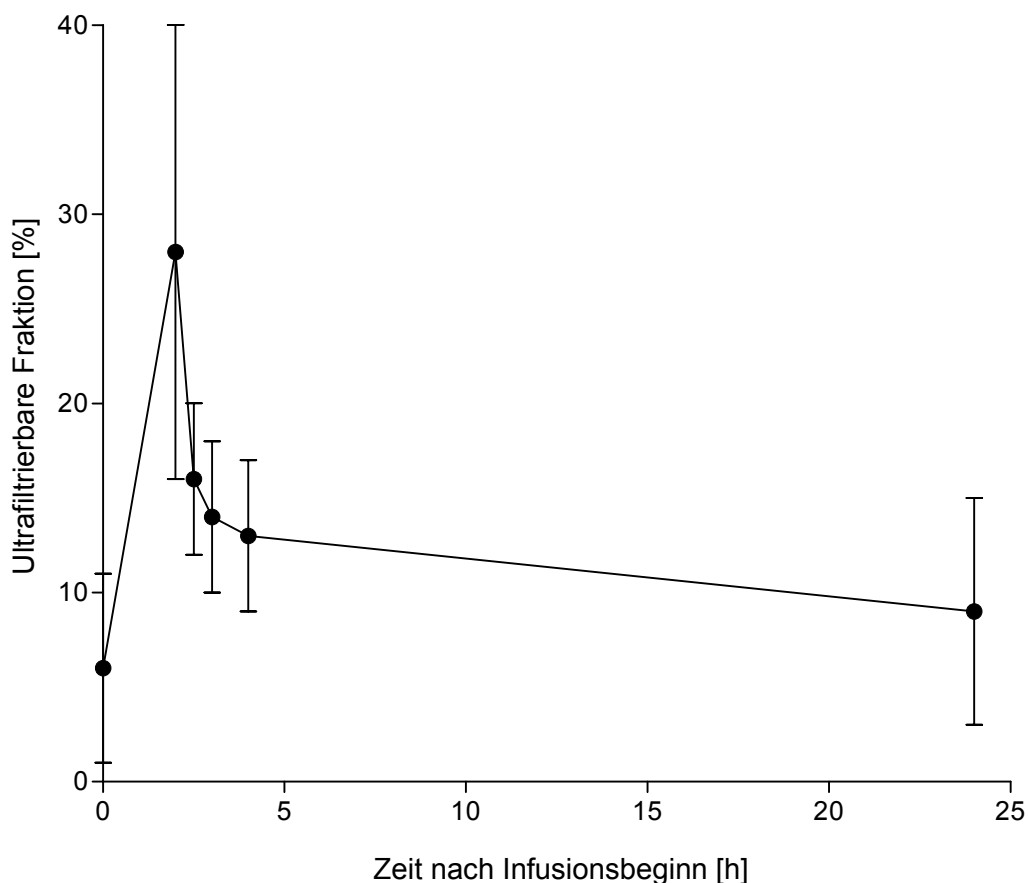


Abb. 3.16 Mittlere ultrafiltrierbare Fraktion  $f_{UF}$  nach Applikation von  $60 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin ( $MW \pm SD, n = 8$ )

Es zeigte sich eine äußerst schnelle Bindung von Platin an Makromoleküle; bereits am Ende der zweistündigen Infusion betrug die ultrafiltrierbare Fraktion nur noch  $28 \pm 12 \%$

der im Plasma messbaren gesamten Platinmenge. Der ultrafiltrierbare Anteil fiel innerhalb der nächsten 2 h auf  $13 \pm 4 \%$  ab; 24 h nach Infusionsbeginn waren nur noch  $9 \pm 6 \%$  des im Plasma messbaren Platins ultrafiltrierbar. Die vergleichsweise hohe Streuung für die 24 h-Werte war auf die hohe Standardabweichung der Ultrafiltrat-Konzentrationen zurückzuführen, die u.a. maßgeblich durch die ungleichen Abnahmezeitpunkte verursacht wurde.

### Individuelle pharmakokinetische Parameter

Die individuellen pharmakokinetischen Parameter von Platin in Ultrafiltrat, Plasma, Vollblut und Erythrozyten sind als Mittelwerte für alle Patienten in Tab. 3.25 zusammengefasst. Die Einzelergebnisse finden sich in Anhang B.

Für Plasma und Ultrafiltrat konnten 7 Patienten ausgewertet werden; bei Pat. 7 war eine pharmakokinetische Analyse aufgrund unvollständiger Probensammlung nicht möglich. Für Vollblut und Erythrozyten konnten 5 Patienten, bei denen Proben dieser Matrix vorlagen, ausgewertet werden.

Tab. 3.25 Pharmakokinetische Parameter von Platin nach Applikation von  $60 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin (MW  $\pm$  SD,  $n = 7$ , für Erythrozyten  $n = 5$ )

	Plasma	Ultrafiltrat	Vollblut	Erythrozyten
$AUC_{\infty}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ]	$79,3 \pm 41,6$	$4,02 \pm 1,59$	$78,2 \pm 35,2$	n.b.
$AUC_{0-24 \text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ]	$22,2 \pm 6,0$	$2,58 \pm 0,61$	$24,2 \pm 8,5$	$29,5 \pm 28,7$
$t_{1/2\lambda_1}$ [h]	$0,33 \pm 0,20$	$0,22 \pm 0,09$	n.b.	n.b.
$t_{1/2z}$ [h]	$60,3 \pm 50,6$	$17,5 \pm 4,8$	$46,7 \pm 10,5$	n.b.
CL [L/h]	$0,84 \pm 0,43$	$14,7 \pm 5,3$	$0,81 \pm 0,47$	n.b.
$V_{ss}$ [L]	$54,4 \pm 18,5$	$285 \pm 108$	$50,5 \pm 21,0$	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Die Fläche unter der Kurve wurde auf zwei Arten berechnet. Für die Matrizes Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut wurde sie zunächst mit Hilfe von Kompartiment-Modellen abgeschätzt ( $AUC_{\infty}$ ). Für die Erythrozyten waren diese Modelle für die Abschätzung der Sekundärparameter jedoch wenig geeignet, da durch den sehr geringen Konzentrationsabfall im terminalen Teil der Kurve eine unzuverlässige Extrapolation nach Unendlich resultierte. Daher wurde für diese Matrix die AUC kompartimentunabhängig mit Hilfe der Trapezregel ( $AUC_{0-24 \text{ h}}$ ) berechnet. Um die Platinexposition in den Erythrozyten

besser mit der in den anderen Matrices vergleichen zu können, wurde auch für Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut die  $AUC_{0-24\text{ h}}$  bestimmt.

Beim Vergleich der erhaltenen Sekundärparameter zeigten sich für das ultrafiltrierbare Platin mit 4,0 bzw. 2,6  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  die geringsten AUC-Werte. Die  $AUC_{\infty}$  betrug nur etwa 5 % und die  $AUC_{0-24\text{ h}}$  11 % der entsprechenden Werte in Plasma und Vollblut. Die Platinexposition in diesen beiden Matrices war sehr ähnlich. Auch die Clearances unterschieden sich kaum, während im Ultrafiltrat mit ca. 15 L/h eine 18-fach höhere Clearance erhalten wurde.

Die Variabilität der pharmakokinetischen Parameter war für Ultrafiltrat am geringsten ausgeprägt. Während dort für alle Größen relative Standardabweichungen zwischen 23 und 42 % erhalten wurden, zeigten sich für Plasma und Vollblut deutlich höhere Standardabweichungen.

Besonders hoch fiel die Streuung für die  $AUC_{0-24\text{ h}}$  in den Erythrozyten aus; diese betrug 97,3 %. Neben Unterschieden in Ausmaß und Geschwindigkeit der Bindung von Platin an Makromoleküle oder der Aufnahme in Erythrozyten kam auch hier wieder zum Tragen, dass der Untersuchungszeitpunkt innerhalb der Oxaliplatinbehandlung bei den Patienten nicht einheitlich war. Wie bereits mehrfach beschrieben, kommt es zur Kumulation von Platin in den Erythrozyten und somit mit steigender Anzahl der Zyklen auch zu ansteigenden Konzentrationen in Vollblut bzw. Erythrozyten.

Auch für Plasma war die Variabilität der pharmakokinetischen Parameter vergleichsweise hoch. Eine signifikante Kumulation in dieser Matrix wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Jedoch wurde bei allen untersuchten Patienten im Plasma noch Platin des vorangegangenen Zyklus detektiert. Dies deutete darauf hin, dass auch im Plasma Unterschiede hinsichtlich der Platinkonzentrationen zwischen den einzelnen Zyklen existierten und diese zur Variabilität der hier berechneten pharmakokinetischen Parameter beitrugen.

Da die 8 Patienten zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten während ihrer Behandlung untersucht wurden und zudem mit verschiedenen Chemotherapieprotokollen behandelt worden waren, konnte eine getrennte Betrachtung nach Untersuchungszeitpunkt, die den Einfluss des Parameters "Zyklus" bzw. "Behandlungstag im Zyklus" charakterisiert hätte, nicht durchgeführt werden.

Für einen statistischen Vergleich der Parameter in den verschiedenen Matrices wurden diese zunächst mit Hilfe des *Shapiro-Wilk*-Tests auf Normalverteilung geprüft. Alle

Parameter bis auf die terminale Halbwertszeit im Plasma und die AUC in den Erythrozyten wiesen eine Normalverteilung auf.

Mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Stichproben wurden die normalverteilten Parameter der verschiedenen Matrices miteinander verglichen; für die beiden Parameter, die signifikant von der Gauss'schen Verteilung abwichen, wurde der Wilcoxon-Test herangezogen.

Mit Ausnahme der initialen Halbwertszeit waren alle pharmakokinetischen Parameter für Ultrafiltrat hoch bzw. höchst signifikant von denen der anderen Matrices verschieden. Keine Unterschiede zeigten sich hingegen zwischen den Parametern für Plasma und Vollblut. Auch die AUC in den Erythrozyten ( $AUC_{ERY,0-24\text{ h}}$ ) wich nicht signifikant von der  $AUC_{0-24\text{ h}}$  in Plasma oder Vollblut ab.

### 3.3.2 Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen

Von November 2002 bis Juni 2003 wurden 24 Patienten nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin für die Untersuchung der Platin-Pharmakokinetik rekrutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 14 dieser Patienten in die pharmakokinetische Auswertung einbezogen; dies waren die Pat. 2, 6 - 12, 14, und 17 - 21, deren Charakteristika Tab. 2.10 (s. Kap. 2.4.3) entnommen werden können\*. Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen der Daten dieser Patienten sind in Tab. 3.26 dargestellt.

Tab. 3.26 Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane für die Charakteristika der Patienten der pharmakokinetischen Analyse

	Alter [Jahre]	Körpergröße [cm]	Körpergewicht [kg]	KOF [m <sup>2</sup> ]	Anzahl vorheriger Chemotherapien
<b>MW</b>	54,9	175	78	1,9	2
<b>SD</b>	13,9	8	11	0,2	2
<b>Median</b>	58,5	176	78	2,0	2

Damit unterschied sich diese Auswahl von 11 männlichen und 3 weiblichen Patienten, die alle an nicht-gastrointestinalen Tumoren litten, nur unwesentlich hinsichtlich der o.g. Daten von den 24 Patienten, die in die pharmakodynamische Analyse (Kap. 3.4.2)

\* Die Kinetik der übrigen Patienten wird im Rahmen der Dissertation von A. Junker beschrieben<sup>194</sup>.

eingingen. Sechs Patienten erhielten im Vorfeld eine platinhaltige Chemotherapie; ein Patient war mit Oxaliplatin vorbehandelt. Bis auf die Patienten 2, 19 und 21 wurden einheitlich die ersten beiden Behandlungszyklen hinsichtlich Pharmakokinetik, Toxizität und Ansprechen untersucht. Bei den drei genannten Patienten wurde aus medizinischen Gründen nur ein Zyklus appliziert und ausgewertet.

Bei allen Patienten wurden innerhalb der ersten 48 h nach Infusionsbeginn 13 Blutproben entnommen und für die Platin-Analyse in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut vorbereitet. Bei 5 Patienten im ersten und 6 Patienten im zweiten Zyklus wurden darüber hinaus noch weitere Blutproben bis ein, zwei und/oder drei Wochen nach Infusionsbeginn gesammelt und untersucht.

### **Konzentrations-Zeit-Profile**

In den Abbildungen 3.17 und 3.18 sind die Konzentrations-Zeit-Verläufe in den Matrices Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten dargestellt. Für jede Matrix und jeden Zyklus wurde eine Mittelwertskurve erstellt, in die die mittleren Konzentrationen und Standardabweichungen zum jeweils theoretischen Abnahmezeitpunkt eingingen. Neben den für fast alle Patienten vorhandenen Werten innerhalb der ersten 48 h nach Infusionsbeginn wurden auch Konzentrationen zu späteren Zeitpunkten miteinbezogen. Dies gilt v.a. für Plasma und Vollblut; im Ultrafiltrat waren zu diesen Zeitpunkten in den meisten Fällen die Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für drei der untersuchten Patienten (Pat. 9, 10 und 11) wurden im ersten Zyklus ausgesprochen hohe Konzentrationen eine bzw. zwei Stunden nach Infusionsbeginn erhalten. Diese Werte, die vermutlich auf eine Kontamination der Proben durch die einlaufende Oxaliplatinlösung zurückgeführt werden können, wurden bei den vorliegenden Mittelwerten nicht berücksichtigt.

In den Matrices Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut zeigte sich deutlich der mehrphasige Verlauf der Platinkonzentrationen. Besonders deutlich war dieser im Ultrafiltrat zu erkennen, während die Konzentrationsveränderungen über die Zeit für Plasma und v.a. für Vollblut weniger stark ausgeprägt waren. Innerhalb der ersten 48 h konnte eine kurze Verteilungs- von einer je nach Matrix unterschiedlich langen Eliminationsphase unterschieden werden. Zog man auch die Werte in Betracht, die über 48 h hinausgingen, so konnte ein triphasischer Konzentrations-Zeit-Verlauf beobachtet werden.

In den Erythrozyten dagegen zeigte sich nach Erreichen des Maximalwerts nur ein sehr geringer Abfall der Konzentrations-Zeit-Kurve, der auch unter Berücksichtigung aller Werte nicht in verschiedene Phasen unterteilt werden konnte.

Die maximalen Konzentrationen wurden in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut 1,0 - 2,5 h nach Infusionsbeginn erreicht. Bei den meisten Patienten war die Konzentration, die direkt nach Ende der zweistündigen Infusion gemessen wurde zugleich der höchste Wert. Im ersten Zyklus lagen die mittleren  $C_{max}$ -Werte für Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut bei  $3,93 \pm 1,90$ ,  $1,99 \pm 1,06$  bzw.  $2,92 \pm 0,84$   $\mu\text{g/mL}$ . In den Erythrozyten wurde die Maximalkonzentration, die im Mittel  $1,85 \pm 0,59$   $\mu\text{g/mL}$  betrug, erst 2 - 6 h nach Infusionsbeginn erreicht.

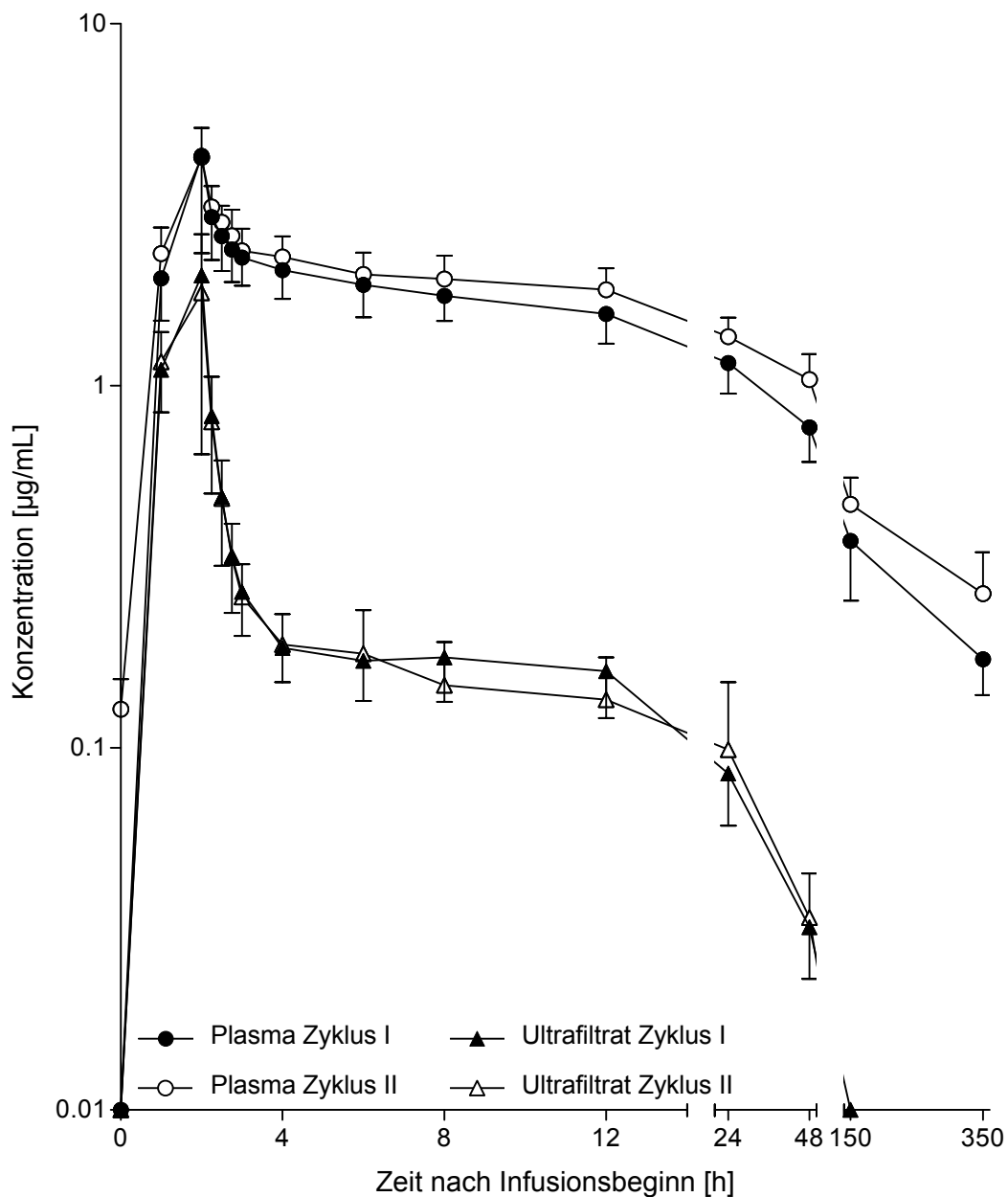


Abb. 3.17 Mittlere Platinkonzentrations-Zeitverläufe in Plasma und Ultrafiltrat in den Zyklen I und II nach Applikation von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin ( $MW \pm SD$ ,  $n = 11 - 14$ )

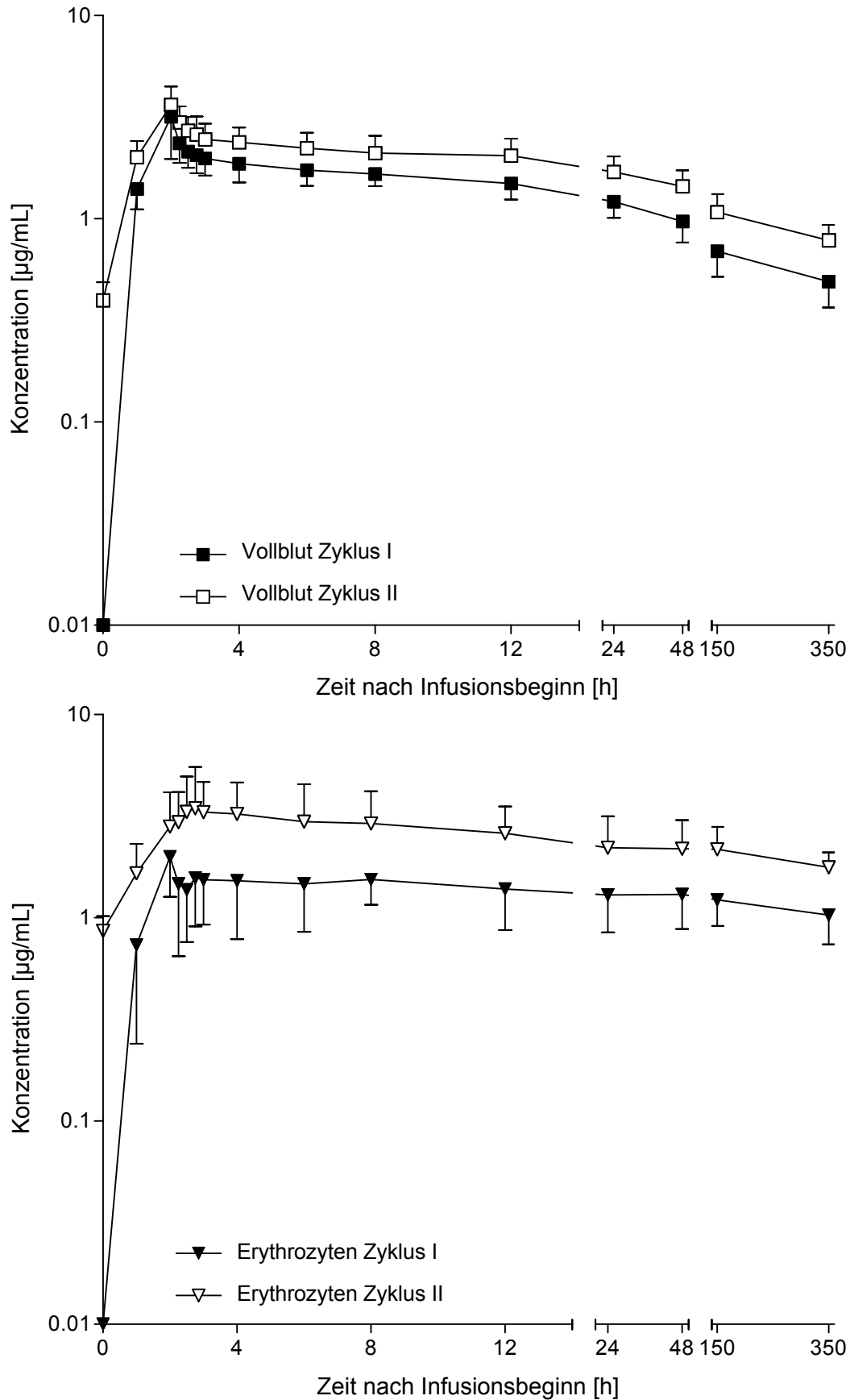


Abb. 3.18 Mittlere Platinkonzentrations-Zeit-Verläufe in Vollblut und Erythrozyten in den Zyklen I und II nach Applikation von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin ( $MW \pm SD$ ,  $n = 11 - 14$ )



Im zweiten Zyklus wurden mit  $4,34 \pm 0,94$  und  $2,10 \pm 0,89$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Plasma und Ultrafiltrat dem ersten Zyklus vergleichbare  $C_{\text{max}}$ -Werte erhalten. Für Vollblut und Erythrozyten waren die Maximalkonzentrationen mit  $3,64 \pm 0,83$  und  $3,34 \pm 0,82$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  höher als im ersten Zyklus; besonders für die Erythrozyten war der Unterschied mit einer Erhöhung um den Faktor 1,8 besonders deutlich ausgeprägt.

Dieser Unterschied erstreckte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum: für Vollblut und Erythrozyten lagen die Kurven des zweiten Zyklus auf einem deutlich höheren Niveau als die des ersten. Hinsichtlich der  $t_{\text{max}}$ -Werte gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Zyklen.

Die Konzentrationen vor Beginn der Oxaliplatininfusion lagen im Ultrafiltrat für alle Patienten in beiden Zyklen unterhalb der Bestimmungsgrenze von  $0,005$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Im Plasma wurde bei einem Patienten (Pat. 14) schon vor Beginn der Platininfusion des ersten Zyklus Platin quantifiziert ( $0,011$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass dieser Patient im Vorfeld bereits eine platinhaltige (aber nicht oxaliplatinhaltige) Chemotherapie erhalten hatte. Im zweiten Zyklus konnte bei allen Patienten Platin im Plasma quantifiziert werden; die mittlere Konzentration lag bei  $0,13 \pm 0,03$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Im Vollblut war Platin ebenfalls vor Beginn der Infusion des zweiten Zyklus mit einer mittleren Konzentration von  $0,40 \pm 0,09$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  quantifizierbar.

Die Abnahme der Konzentrationen nach der  $C_{\text{max}}$  in den folgenden Stunden und Tagen erfolgte im Ultrafiltrat am schnellsten. Schon 2 h nach Infusionsende waren in beiden Zyklen nur noch ca. 10 % der Maximalkonzentration vorhanden. Im selben Zeitraum sank die Konzentration in Plasma und Vollblut auf ca. 50 - 60 % und in den Erythrozyten auf ca. 75 (Zyklus I) bzw. auf lediglich 90 % (Zyklus II).

### **Bindung an Makromoleküle**

Für die Charakterisierung der Bindung von Platin an Makromoleküle wurde für alle Patienten in beiden Zyklen die ultrafiltrierbare Fraktion  $f_{\text{UF}}$  nach Gl. 3.3 berechnet. Die erhaltenen Mittelwerte der  $f_{\text{UF}}$  mit ihren zugehörigen Standardabweichungen sind in Abb. 3.19 dargestellt. In die Mittelwertskurve des zweiten Zyklus gingen die Werte von 11 Patienten ein, die einen zweiten Zyklus appliziert bekamen. Bei Zyklus I wurden die 1- und 2-h-Werte der Patienten 9, 10 und 11 außer Acht gelassen.

Es zeigte sich, ähnlich wie nach Applikation von  $60$   $\text{mg}/\text{m}^2$  Oxaliplatin, eine äußerst schnelle Bindung von Platin an Makromoleküle. Während eine Stunde nach Infusions-

beginn, also während der Infusion, die ultrafiltrierbare Fraktion noch etwa 50 - 65 % betrug, war sie bereits 2 h nach Infusionsbeginn (d.h. am Infusionsende) schon auf Werte zwischen 40 und 46 % abgesunken. Nach weiteren 2 h waren nur noch 8,5 % des Gesamtplatins, repräsentiert durch die Konzentration im Plasma, ultrafiltrierbar. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Abnahme langsamer und erreichte 48 h nach Infusionsbeginn ca. 4 %. Die Variabilität, charakterisiert durch die relative Standardabweichung, war mit Werten zwischen 17 und 28 % gering.

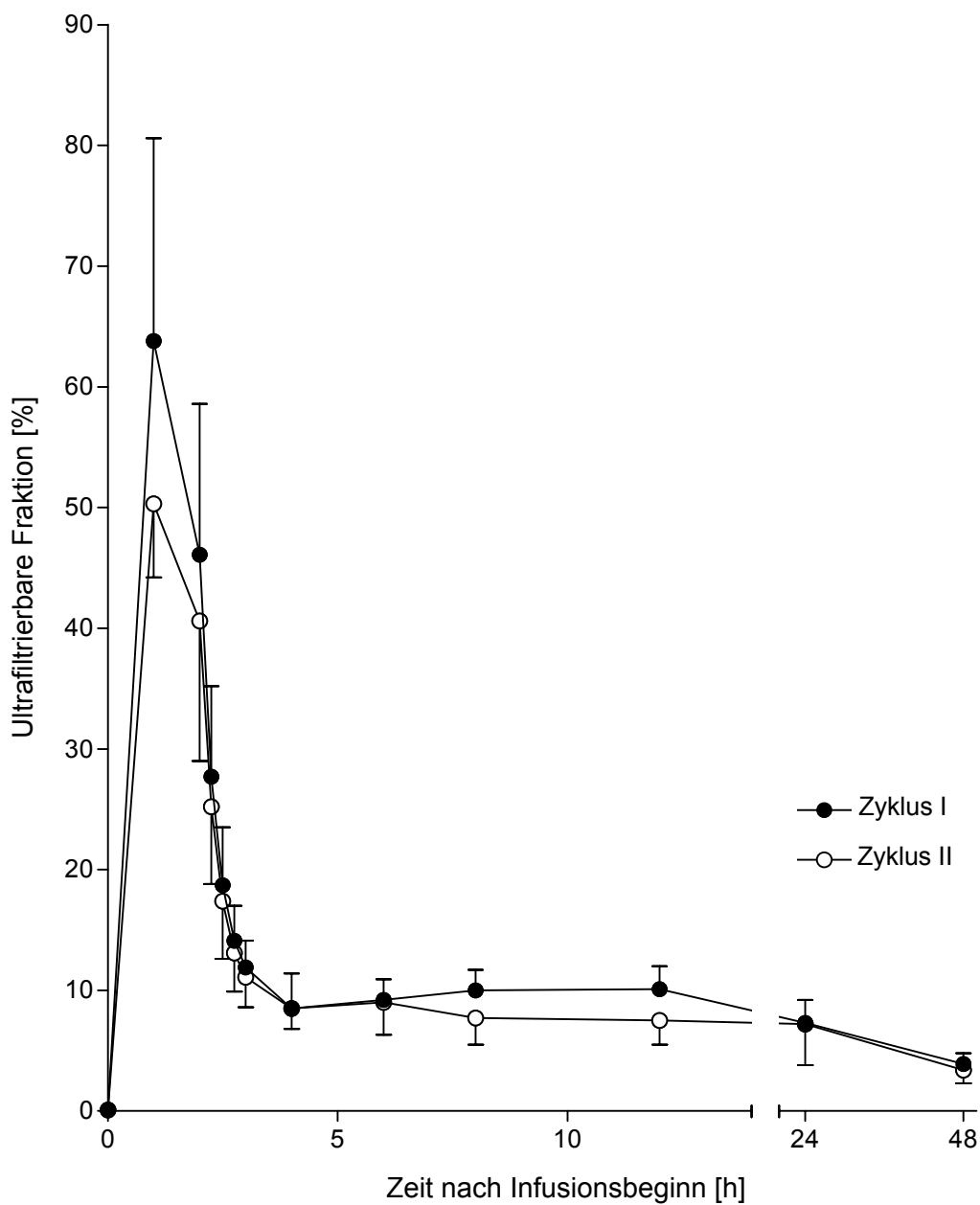


Abb. 3.19 Mittlere ultrafiltrierbare Fraktion  $f_{UF}$  nach Applikation von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin ( $MW \pm SD$ ,  $n = 11 - 14$ )

### Individuelle pharmakokinetische Parameter

In Tab. 3.27 sind die pharmakokinetischen Parameter für die Matrices Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten für beide Zyklen zusammengefasst; die Einzelergebnisse finden sich in Anhang B. Bei der Auswertung wurde ein Zeitraum von 48 h nach Infusionsbeginn berücksichtigt. Die Konzentrationen in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut konnten einheitlich mit einem Zwei-Kompartiment-Modell ausgewertet werden. Für die Charakterisierung der Platinexposition in den Erythrozyten wurde, wie bereits beschrieben, die AUC innerhalb der ersten 24 bzw. 48 h nach Infusionsbeginn mittels Trapezregel berechnet. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten wurden daher in allen anderen Matrices ebenfalls die  $AUC_{0-24\text{ h}}$  und die  $AUC_{0-48\text{ h}}$  bestimmt.

Tab. 3.27 *Pharmakokinetische Parameter nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen für Zyklus I und II (MW ± SD; n = 11 - 14\*)*

	Plasma	Ultrafiltrat	Vollblut	Erythrozyten
<b>Zyklus I</b>				
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	101 ± 14	8,21 ± 2,66	147 ± 52	n.b.
AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/mL]	39,3 ± 6,4	5,56 ± 1,28	36,3 ± 5,7	32,3 ± 10,6
AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/mL]	60,6 ± 8,1	6,88 ± 2,02	62,0 ± 10,5	67,7 ± 18,1
t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	0,60 ± 0,47	0,27 ± 0,07	1,38 ± 1,94	n.b.
t <sub>1/2z</sub> [h]	34,2 ± 5,1	20,0 ± 5,38	63,5 ± 30,0	n.b.
CL [L/h]	1,22 ± 0,21	15,7 ± 3,82	0,90 ± 0,26	n.b.
V <sub>ss</sub> [L]	57,9 ± 13,0	305 ± 45	73,1 ± 15,6	n.b.
<b>Zyklus II</b>				
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	122 ± 19	8,27 ± 3,50	204 ± 62	n.b.
AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/mL]	45,0 ± 5,7	5,70 ± 1,36	48,6 ± 9,2	57,5 ± 21,7
AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/mL]	73,6 ± 9,2	7,13 ± 1,76	87,5 ± 16,8	120 ± 36
t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	0,45 ± 0,30	0,27 ± 0,06	0,55 ± 0,19	n.b.
t <sub>1/2z</sub> [h]	36,8 ± 6,3	20,4 ± 7,0	61,7 ± 15,2	n.b.
CL [L/h]	1,00 ± 0,11	16,1 ± 4,3	0,63 ± 0,17	n.b.
V <sub>ss</sub> [L]	51,0 ± 8,5	306 ± 55	52,9 ± 9,1	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

\* In *Zyklus I* wurden die Patienten 9,10 und 11 wegen hoher Konzentrationen ein und zwei Stunden nach Infusionsbeginn nicht in die kompartimentabhängige Auswertung miteinbezogen. *Zyklus II* wurde an die Patienten 2, 19 und 21 nicht verabreicht.

In jedem Zyklus konnten jeweils 11 Patienten kompartimentabhängig ausgewertet werden. In Zyklus I wurden die Patienten 9, 10 und 11 aufgrund der Konzentrationen während bzw. kurz nach der Infusion, die mehr als zehnmals so hoch waren, wie die mittleren Konzentrationen aller anderen Patienten, außer Acht gelassen. Bei der Berechnung der  $AUC_{0-24\text{ h}/0-48\text{ h}}$  konnten diese jedoch mit ausgewertet werden. In diesen Fällen wurde das erste Trapez in beiden Zyklen erst mit dem ersten Wert, der im Vergleich zu den anderen Werten nicht auffällig hoch war (dem 2 h-Wert bei Pat. 11 bzw. dem 2,25 h-Wert bei Pat. 9 und 10) gebildet, was nur einen sehr geringen Fehler zur Folge haben dürfte, da durch die rasch aufeinander folgenden Abnahmen in diesem Zeitraum die ermittelten Trapeze nur wenig zur „Gesamt“- $AUC_{0-24\text{ h}/0-48\text{ h}}$  beitrugen.

Die pharmakokinetischen Parameter für das ultrafiltrierbare Platin hoben sich deutlich von denen der anderen Matrices ab. Im Ultrafiltrat wurden die geringste AUC (unabhängig von der Bestimmungsmethode), die höchste Clearance und das höchste Verteilungsvolumen bei den kürzesten Halbwertszeiten erreicht. Mit ca.  $8,2\text{ }\mu\text{g/mL}$  für  $AUC_{\infty}$  betrug die Platinexposition des Ultrafiltrats nur 7 - 8 % des Plasmas und lediglich 4 - 5 % des Vollbluts. Die AUC-Werte für die Erythrozyten lagen im ersten Zyklus noch im Bereich der  $AUC_{0-24\text{ h}/0-48\text{ h}}$  von Plasma und Vollblut, im zweiten Zyklus hoben sie sich aber deutlicher von den beiden anderen Matrices ab und erreichten Werte, die etwa 1,8-fach höher waren. Hinsichtlich der Clearance war diese aus dem Vollblut mit Werten zwischen 0,6 und 0,9 L/h am geringsten ausgeprägt. Während die Clearance aus Plasma in einem vergleichbaren Bereich lag (1,0 - 1,2 L/h), wurden im Ultrafiltrat Werte erhalten, die mehr als zehnmals so hoch waren. Die Unterschiede für die Halbwertszeiten waren nicht so deutlich ausgeprägt.

Die Variabilität der pharmakokinetischen Parameter war in den einzelnen Matrices vergleichbar; die relativen Standardabweichungen lagen bis auf wenige Ausnahmen für alle Parameter unter 30 %.

Eine Ausnahme bildete die initiale Halbwertszeit, bei der für alle Matrices vergleichsweise hohe relative Standardabweichungen (30 - 140 %) erhalten wurden. Ansonsten lagen nur die Variationskoeffizienten für die terminale Halbwertszeit im Vollblut (Zyklus I) und die  $AUC_{\infty}$ -Werte für Ultrafiltrat und Vollblut sowie die AUC in den Erythrozyten etwas höher als 30 % (32 - 42 %).

Um statistisch gesicherte Aussagen über Unterschiede der pharmakokinetischen Parameter in den verschiedenen Matrices zu treffen, wurden zunächst alle Werte mittels

*Shapiro-Wilk*-Test auf Normalverteilung geprüft. Die  $AUC_{UF,0-48\text{ h}}$  (Zyklus I), die  $AUC_{UF,\infty}$  (Zyklus I und II), die initiale Halbwertszeit im Vollblut (Zyklus I) und die terminale Halbwertszeiten im Ultrafiltrat (Zyklus I und II) und Vollblut (Zyklus I) wichen signifikant von einer Normalverteilung ab. Daher wurden für die Vergleiche der Parameter sowohl parametrische (t-Test für gepaarte Stichproben) als auch nicht-parametrische (*Wilcoxon-Test* für gepaarte Stichproben) Tests eingesetzt.

Bei den AUC-Werten zeigten sich unabhängig von der Bestimmungsmethode (kompartimentabhängige oder -unabhängige Auswertung) jeweils hoch bis höchst signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,01$  bzw.  $p \leq 0,001$ ) zwischen den Werten für Ultrafiltrat und für die anderen Matrices. Bis auf die  $AUC_{0-48\text{ h}}$  im zweiten Zyklus für Plasma und Erythrozyten, die sich signifikant unterschieden, gab es für die mit der Trapezregel bestimmten AUC-Werte der Matrices Plasma, Vollblut und Erythrozyten keine Unterschiede. Die  $AUC_{\infty}$ -Werte waren für alle Matrices mindestens signifikant unterschiedlich. Bis auf drei Ausnahmen (initiale Halbwertszeit und das Verteilungsvolumen von Plasma und Vollblut in Zyklus II) wurden für alle anderen Parameter und Matrices mindestens signifikante Unterschiede gefunden.

### **Vergleich der pharmakokinetischen Parameter in Zyklus I und II**

Für den Vergleich der pharmakokinetischen Parameter des ersten und zweiten Behandlungszyklus in den untersuchten Matrices wurden nur die Patienten herangezogen, bei denen zwei Zyklen appliziert worden waren. Damit ergab sich eine Fallzahl von insgesamt 8 Patienten: Pat. 6 - 8, 12, 14, 17, 18 und 20. Die restlichen Patienten konnten in diese Auswertung nicht aufgenommen werden, da ihnen entweder nur ein Zyklus appliziert wurde (Pat. 2, 19, 21), oder der erste Zyklus aufgrund besonders hoher Werte während und kurz nach der Infusion kompartimentabhängig nicht auswertbar war (Pat. 9, 10, 11). Für die kompartimentunabhängig bestimmten Parameter ( $AUC_{0-24\text{ h}}$ ,  $AUC_{0-48\text{ h}}$ ) standen die Daten von 11 Patienten zur Verfügung, da die Fläche unter der Kurve mittels Trapezregel auch für die Patienten 9, 10 und 11 berechnet wurde.

Vor der vergleichenden Analyse der Parameter in den beiden Zyklen wurden diese auf Normalverteilung geprüft. Da nicht alle Parameter einer *Gauss*'schen Normalverteilung folgten, kamen sowohl parametrische als auch nicht-parametrische Testverfahren zum Einsatz.

Es zeigte sich, dass sich die pharmakokinetischen Parameter des ersten und zweiten Zyklus für Ultrafiltrat nicht unterschieden, während für die anderen Matrices Plasma, Vollblut und Erythrozyten signifikante Unterschiede (s. Tab. 3.28) existierten.

Tab. 3.28 Vergleich der pharmakokinetischen Parameter in Zyklus I und Zyklus II nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (MW ± SD, n = 8; für AUC<sub>0-24 h/0-48 h</sub>: n = 11)

	Zyklus I	Zyklus II	p-Wert
<b>Plasma</b>			
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	104 ± 12	121 ± 17	0,024*
AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/mL]	39,4 ± 4,8	45,0 ± 5,7	< 0,001*
AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/mL]	62,5 ± 7,2	71,5 ± 7,0	< 0,001*
CL [L/h]	1,16 ± 0,14	0,99 ± 0,09	0,024*
V <sub>ss</sub> [L]	56,6 ± 8,6	51,5 ± 9,0	0,045*
<b>Ultrafiltrat</b>			
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	8,45 ± 3,01	8,48 ± 3,97	0,929
AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/mL]	5,59 ± 1,29	5,70 ± 1,36	0,615
AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/mL]	7,16 ± 2,14	6,91 ± 1,75	0,878
CL [L/h]	15,3 ± 3,8	15,9 ± 4,7	0,529
V <sub>ss</sub> [L]	310 ± 38	299 ± 55	0,674
<b>Vollblut</b>			
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	157 ± 58	188 ± 56,8	0,002*
AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/mL]	37,5 ± 4,8	48,6 ± 9,2	< 0,001*
AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/mL]	64,6 ± 9,1	86,4 ± 17,5	0,018*
CL [L/h]	0,84 ± 0,29	0,68 ± 0,17	0,006*
V <sub>ss</sub> [L]	69,8 ± 10,1	55,6 ± 9,3	0,011*
<b>Erythrozyten</b>			
AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/mL]	35,7 ± 9,6	57,7 ± 21,7	0,008*
AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/mL]	72,7 ± 15,5	121 ± 38	0,003*

\* kennzeichnet ein signifikantes Ergebnis.

Diese Unterschiede waren vermutlich auf Kumulation des Platins in Plasma und Erythrozyten zurückzuführen und spiegeln sich besonders in den AUC-Werten wider. Während im Ultrafiltrat die Werte für AUC<sub>0-48 h</sub> gleich blieben, erfolgte in allen anderen Matrices eine Zunahme, die bei den Erythrozyten am stärksten ausgeprägt war (Zunahme um den Faktor 1,62 - 1,66).

Zur Veranschaulichung sind die  $AUC_{0-48\text{ h}}$ -Werte für die verschiedenen Matrices und Zyklen in Abb. 3.20 dargestellt.

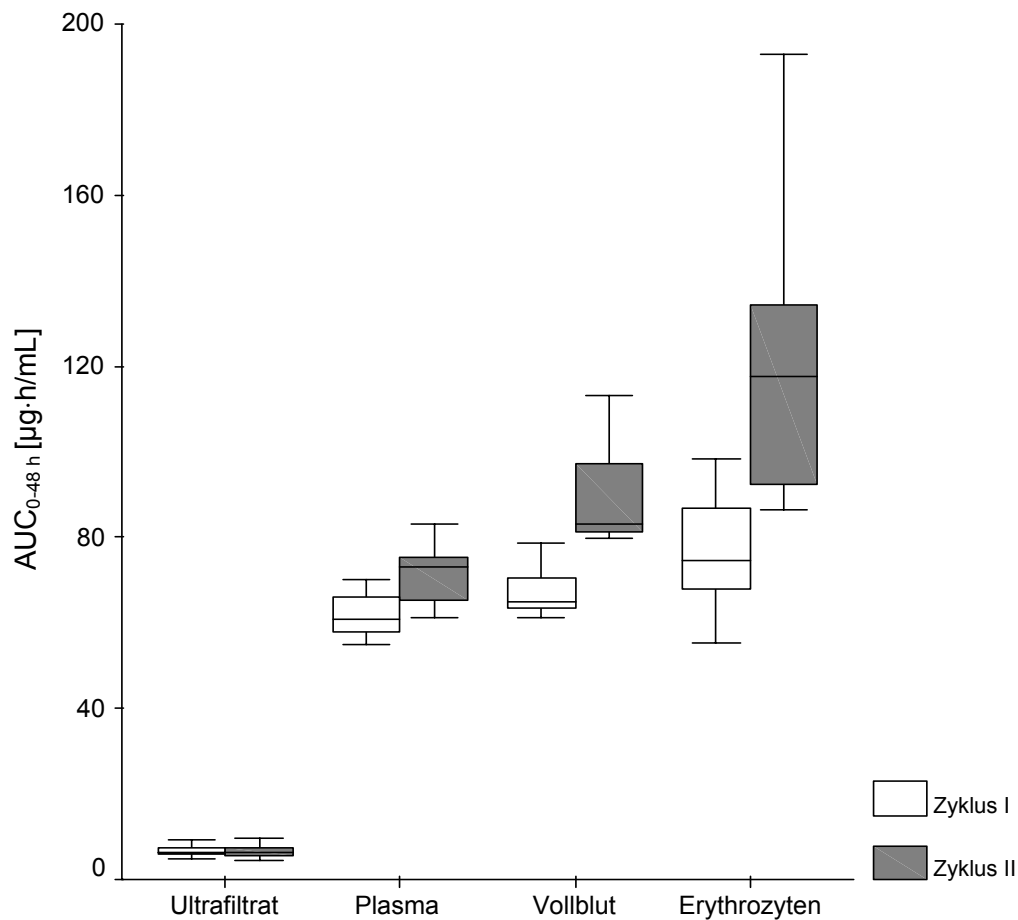


Abb. 3.20 Vergleich der  $AUC_{0-48\text{ h}}$  in verschiedenen Matrices nach Applikation von  $130\text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für Zyklus I und II

### Individuelle pharmakokinetische Parameter für einen Beobachtungszeitraum von bis zu 400 h nach Infusionsbeginn

Bei einzelnen Patienten und Zyklen wurden auch über die ersten 48 h nach Infusionsbeginn hinaus Blutproben gesammelt. Die Werte, die z.T. schon in die Abbildungen der Konzentrations-Zeit-Profile eingegangen sind, wurden pharmakokinetisch ausgewertet. Da nicht von allen Proben Ultrafiltrat gewonnen wurde, bzw. die Platinkonzentrationen für sehr späte Zeitpunkte unterhalb der Bestimmungsgrenze von  $0,005\text{ }\mu\text{g/mL}$  lagen, konnten für diese Matrix nur Proben innerhalb der ersten 300 h (ca. 12 Tage) nach Infusionsbeginn untersucht werden. Diese Werte, die für 4 (Zyklus I) bzw. 5 (Zyklus II) Patienten zur Verfügung standen, wurden mit Hilfe eines Zwei-Kompartiment-Modells ausgewertet. Die Anwendung eines Drei-Kompartiment-Modells ergab keine bessere

Anpassung (Auswahl des Modells s. Kap. 2.7.2). Für Plasma- und Vollblutkonzentrationen, die von 7 bzw. 8 Patienten ermittelt worden waren, wurde mit einem Drei-Kompartiment-Modell eine wesentlich bessere Kurvenanpassung erreicht. Da für eine kompartmentunabhängige Berechnung der AUC eine möglichst einheitliche Beobachtungsdauer nach der Infusion gegeben sein sollte, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Patienten zu gewährleisten, konnte diese Berechnung für die verschiedenen Matrizes nicht durchgeführt werden.

Die erhaltenen pharmakokinetischen Parameter sind in Tab. 3.29 zusammengefasst.

*Tab. 3.29 Pharmakokinetische Parameter nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen für Zyklus I und II über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 400 h nach Infusionsbeginn (MW ± SD; n = 4 - 8)*

	Plasma	Ultrafiltrat	Vollblut
<b>Zyklus I</b>	n = 7	n = 4	n = 8
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	209 ± 39	12,9 ± 5,4	472 ± 100
t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	0,38 ± 0,52	0,32 ± 0,07	0,23 ± 0,23
t <sub>1/2λ<sub>2</sub></sub> [h]	11,2 ± 4,0	n.b.	10,0 ± 4,0
t <sub>1/2z</sub> [h]	142 ± 39	55,6 ± 55,3	326 ± 66
CL [L/h]	0,59 ± 0,14	10,7 ± 4,4	0,27 ± 0,07
V <sub>ss</sub> [L]	104 ± 14	554 ± 393	119 ± 23
<b>Zyklus II</b>	n = 8	n = 5	n = 8
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	313 ± 86	11,2 ± 4,21	862 ± 418
t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	0,24 ± 0,21	0,33 ± 0,08	0,20 ± 0,18
t <sub>1/2λ<sub>2</sub></sub> [h]	13,6 ± 7,8	n.b.	10,4 ± 7,1
t <sub>1/2z</sub> [h]	214 ± 111	35,8 ± 6,5	426 ± 241
CL [L/h]	0,41 ± 0,12	12,0 ± 4,3	0,16 ± 0,06
V <sub>ss</sub> [L]	101 ± 23	490 ± 240	81,9 ± 17,2

n.b. = nicht bestimmt

Ähnlich wie nach Auswertung des Beobachtungszeitraums von 0 - 48 h nach Infusionsbeginn zeigten sich auch hier die geringste Platinexposition und die höchste Clearance im Ultrafiltrat. Die AUC<sub>∞</sub>-Werte für Plasma waren mit ca. 210 µg·h/mL etwa 16-fach höher, während die Vollblut-AUC mit 472 µg·h/mL die Plasma-AUC im ersten Zyklus um mehr als das Doppelte überstieg. Im zweiten Zyklus war diese Tendenz noch stärker ausgeprägt: die Vollblut-AUC war hier 80-fach höher als im Ultrafiltrat und 3-fach höher



als im Plasma. Die Clearance war in dieser Matrix mit nur 0,16 L/h am geringsten. Für Plasma und Vollblut konnten mit Hilfe des Drei-Kompartiment-Modells drei Halbwertszeiten bestimmt werden, von denen die ersten beiden für diese Matrizes in einer vergleichbaren Größenordnung lagen. Auf eine kurze Verteilungsphase von etwa 15 min folgte eine zweite Verteilungsphase, die eine Halbwertszeit von ca. 10 - 13 h aufwies. Die terminale Eliminationshalbwertszeit differierte zwischen den beiden Zyklen und auch zwischen den beiden Matrizes und lag für Plasma bei 140 - 210 h und für Vollblut bei 320 - 420 h.

Bis auf die Halbwertszeiten ( $t_{1/2\lambda_2}$  von Vollblut und Plasma in Zyklus I,  $t_{1/2\lambda_1}$ ,  $t_{1/2\lambda_2}$  von Vollblut und Plasma in Zyklus II) und das Verteilungsvolumen (Plasma und Vollblut Zyklus II) unterschieden sich die Parameter der untersuchten Matrizes signifikant.

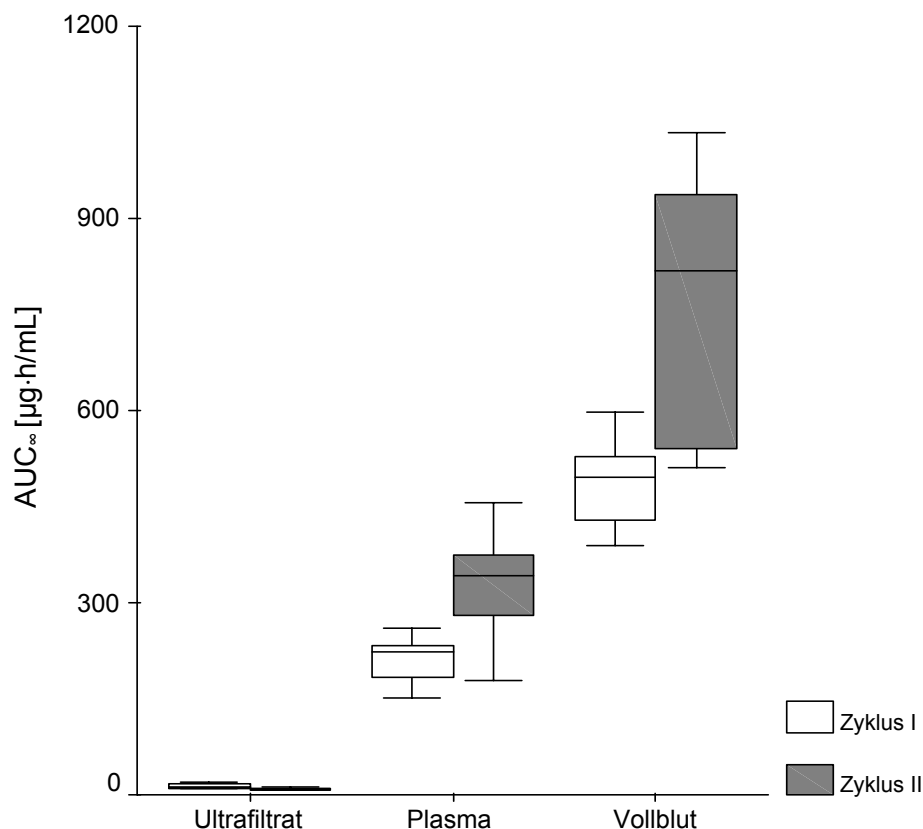


Abb. 3.21 Vergleich der  $AUC_{\infty}$  in verschiedenen Matrizes nach Applikation von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für Zyklus I und II

Bei einem Vergleich der Parameter der beiden Behandlungszyklen ergaben sich, ähnlich wie bei Betrachtung der ersten 48 h nach Infusionsbeginn, auch hier für die Parameter im Ultrafiltrat keine Unterschiede. Hingegen unterschieden sich die Parameter

AUC und Clearance für Plasma sowie AUC, Clearance und Verteilungsvolumen für Vollblut in Zyklus I und II jeweils signifikant. Dies war auf die hier noch stärker zum Ausdruck kommende Kumulation von Platin in Plasma und Vollblut zurückzuführen. Die AUC<sub>∞</sub>-Werte in beiden Zyklen für die verschiedenen Matrices sind in Abb. 3.21 dargestellt.

### 3.3.3 Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle zwei Wochen

Im Rahmen einer Studie zur Effektivität und Verträglichkeit von Oxaliplatin in Kombination mit Ganzkörperhyperthermie wurde bei 4 Patienten die Pharmakokinetik in Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin untersucht. Dabei wurden zwei aufeinander folgende Behandlungstage innerhalb eines Zyklus gewählt, wobei eine Gabe *mit* Hyperthermie und eine *ohne* Hyperthermie erfolgte. Alle Patienten bis auf einen hatten bereits mehrere Oxaliplatingaben erhalten. Die Charakteristika der Patienten können Tab. 2.11 (s. Kap. 2.4.4) entnommen werden. Die Behandlung und Blutabnahmen von jeweils 6 Proben erfolgten in zwei verschiedenen Kliniken: in einer waren nur Blutabnahmen bis zu 24 h nach Infusionsbeginn möglich; in der anderen wurde stattdessen nicht 24 h, sondern 48 h nach Infusionsbeginn die letzte Blutabnahme durchgeführt. Die Abnahmezeitpunkte der übrigen 5 Proben waren in beiden Häusern gleich.

#### Konzentrations-Zeit-Profile

Die folgenden Abbildungen 3.22 - 3.25 zeigen die Platinkonzentrations-Zeit-Profile in den Matrices Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten. Dabei wurde der jeweilige Behandlungszeitpunkt (Gabe I oder II symbolisiert durch geschlossene bzw. offene Symbole) und die Kombination mit Ganzkörperhyperthermie ("mit" oder "ohne Hyp." symbolisiert durch rote oder blaue Kurven) gekennzeichnet.

Gezeigt werden in den Abbildungen die Platin-Konzentrations-Zeit-Verläufe der einzelnen Patienten.

Bei einem Patienten war bei der zweiten, mit Hyperthermie kombinierten Gabe leider eine Abnahme 24 h nach Infusionsbeginn nicht möglich, so dass hier kein Messwert zur Verfügung stand.

Betrachtet man die Kurven unabhängig vom Zeitpunkt der Gabe oder der Hyperthermiekombination, zeigte sich auch bei diesen Profilen wieder sehr deutlich der biphasische Verlauf in Plasma und Ultrafiltrat; im Vollblut war er nur sehr schwach und in den Erythrozyten gar nicht zu erkennen.

Die maximalen Konzentrationen wurden in Ultrafiltrat, Plasma und Vollblut immer am Ende der zweistündigen Oxaliplatininfusion gemessen, während in den Erythrozyten das Maximum erst später und nach den einzelnen Gaben zu unterschiedlichen Zeitpunkten (dreimal 3 h, einmal 2 bzw. 2,5 h, zweimal 4 und einmal 48 h nach Infusionsbeginn) beobachtet wurde. Die  $C_{max}$ -Werte lagen bei 0,5 - 0,9  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  für Ultrafiltrat und waren mit 1,7 - 2,2  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  in den drei anderen Matrices etwa zwei- bis viermal so hoch.

Innerhalb der nächsten 24 bzw. 48 h nach Erreichen der Maximalkonzentration nahmen die Konzentrationen in den verschiedenen Matrices mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab. 4 h nach Infusionsbeginn, einem Zeitpunkt wo für alle Patienten Messwerte vorlagen, waren im Ultrafiltrat nur noch 21 % der  $C_{max}$ , im Plasma 62 - 65 % und im Vollblut 75 - 86 % der Maximalkonzentration vorhanden. In den Erythrozyten wurde die Maximalkonzentration, wie bereits beschrieben, zu unterschiedlichen Zeiten im Intervall von 3 - 48 h nach Infusionsbeginn erreicht, so dass in den ersten 2 h nach Infusionsende noch keine Abnahme der Platinkonzentration beschrieben werden konnte.

Die Konzentrationen vor Beginn der Oxaliplatininfusionen lagen bei beiden Gaben im Ultrafiltrat unter der Bestimmungsgrenze von 0,005  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Im Plasma und Vollblut wurden bis auf einen Patienten messbare Konzentrationen sowohl bei der ersten als auch der zweiten untersuchten Gabe erhalten. Dies war darauf zurückzuführen, dass diese drei Patienten bereits mehrere Gaben Oxaliplatin bekommen hatten.

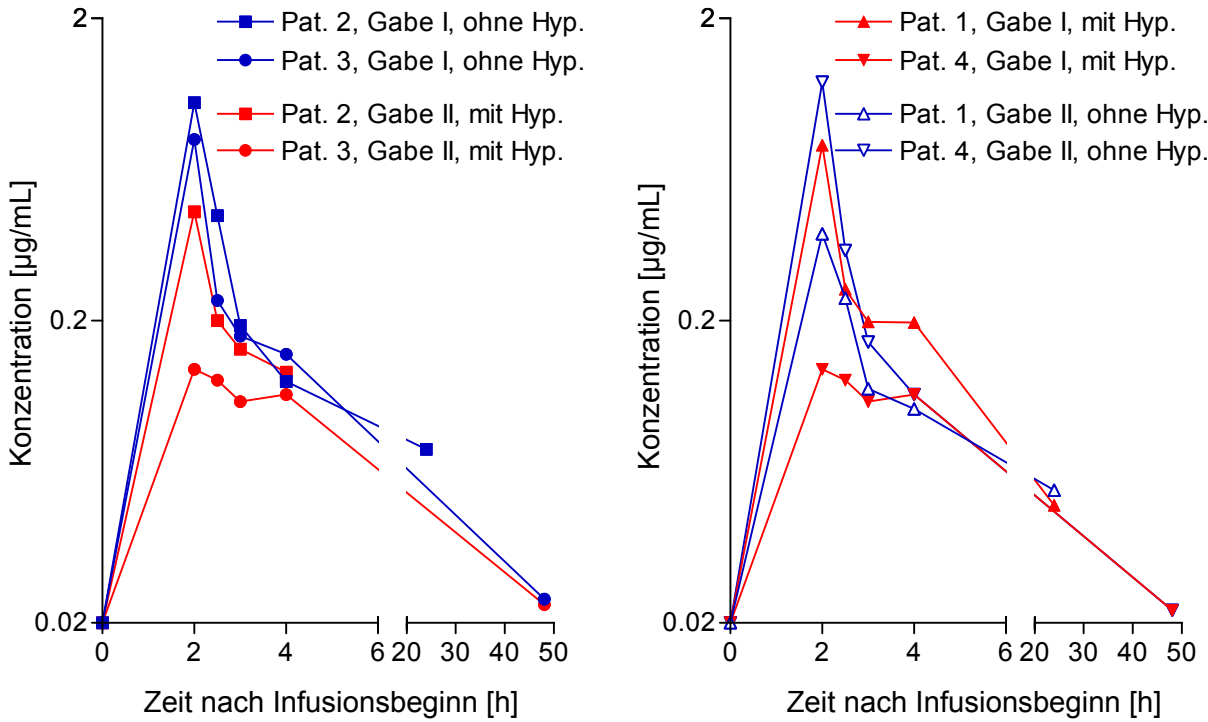


Abb. 3.22 Platinkonzentrations-Zeit-Profile im Ultrafiltrat nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

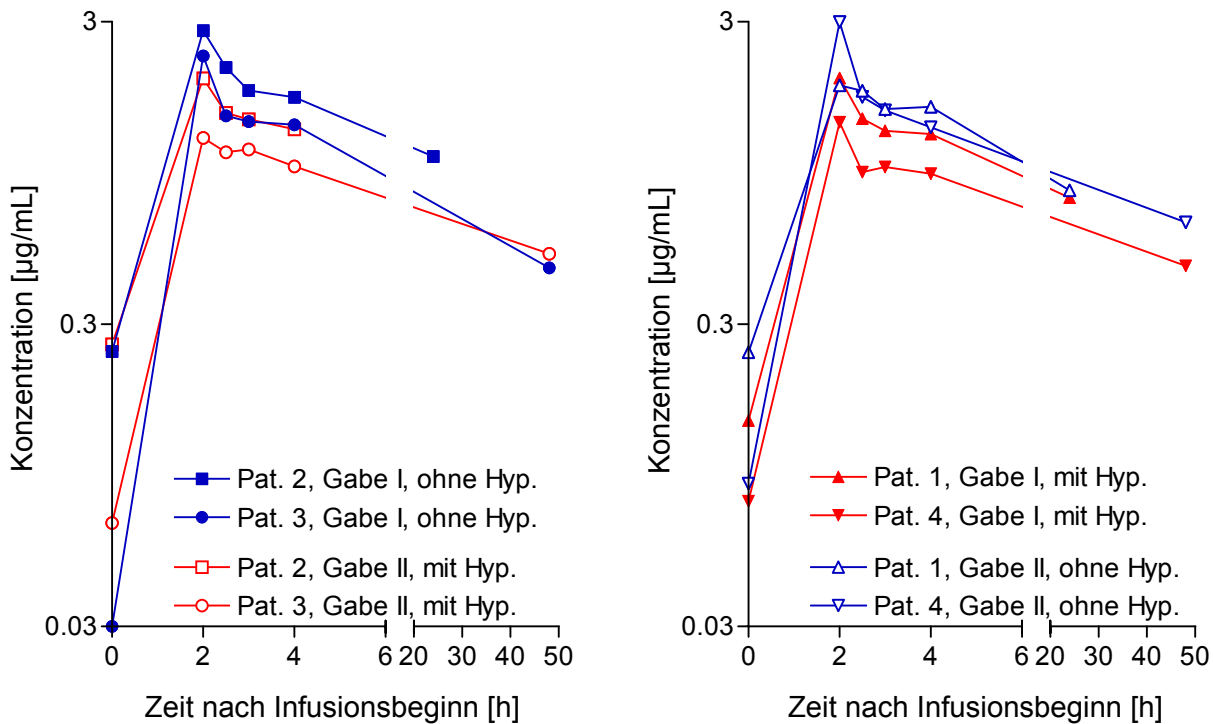


Abb. 3.23 Platinkonzentrations-Zeit-Profile im Plasma nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

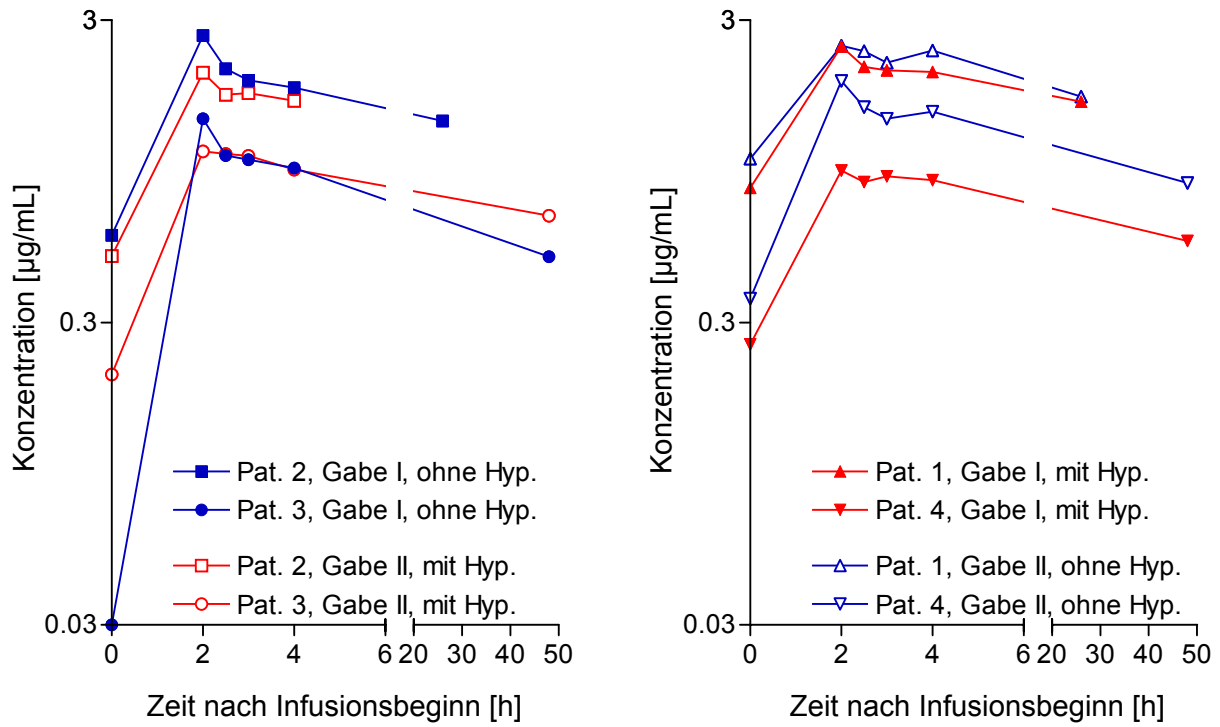


Abb. 3.24 Platinkonzentrations-Zeit-Profile im Vollblut nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

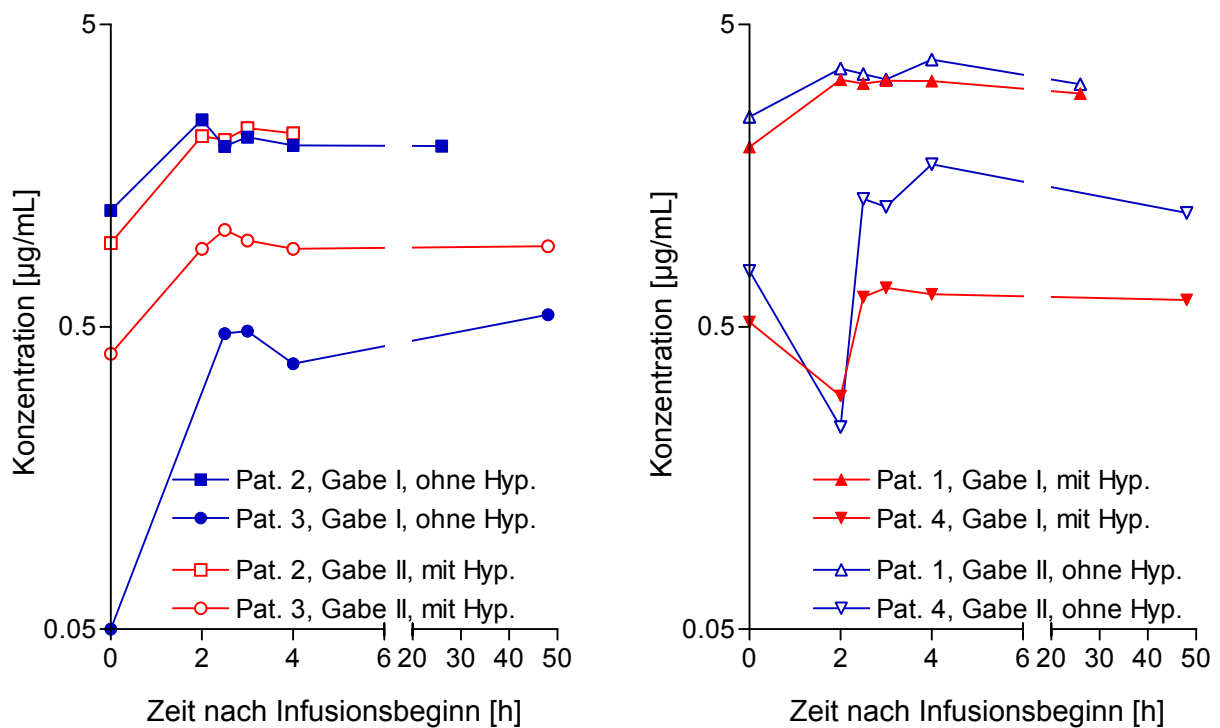


Abb. 3.25 Platinkonzentrations-Zeit-Profile in den Erythrozyten nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

Beim Vergleich der einzelnen Kurven für die jeweiligen Matrices muss unbedingt beachtet werden, dass eventuell beobachtete Unterschiede zwischen den Verläufen allenfalls Tendenzen darstellen, da nach Untersuchung von nur 4 Patienten keine verlässlichen Aussagen über die Effekte der Hyperthermie auf die Konzentrations-Zeit-Verläufe möglich sind.

Bei Betrachtung der Kurvenverläufe im Ultrafiltrat fiel auf, dass ohne Hyperthermie bei allen Patienten außer Pat. 1 höhere Konzentrationen erhalten wurden als bei Kombination mit Ganzkörperhyperthermie. Dieses Phänomen war unabhängig davon, ob die erste oder die zweite Gabe mit Hyperthermie, die während der Oxaliplatininfusion angewandt wurde, kombiniert wurde. Die Differenz zwischen den Konzentrationen war v.a. im Bereich der ersten drei Stunden nach Infusionsbeginn, also bis zu einer Stunde nach Infusions- und Hyperthermie-Ende, deutlich ausgeprägt, während zu späteren Zeitpunkten keine Unterschiede festgestellt werden konnten.

Im Plasma zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier waren die Konzentrationen in Kombination mit Hyperthermie jeweils geringer, unabhängig davon, welche Oxaliplatinapplikation mit Hyperthermie kombiniert wurde. Die Unterschiede waren hier bis zu 2 Stunden nach Infusionsende auch bei Pat. 1 zu beobachten.

Im Vollblut wurde in der Studie, in der  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin ohne Hyperthermie verabreicht wurden (s. Kap. 3.3.2), eine deutliche Konzentrationssteigerung nach der zweiten im Vergleich zur ersten Gabe beobachtet, die auf eine Kumulation von Platin in dieser Matrix zurückzuführen war. Hier jedoch wurde bei den Patienten, bei denen die zweite Gabe mit Hyperthermie kombiniert wurde, keine Kumulation beobachtet; die Konzentrationen lagen im selben Bereich mit einer Tendenz zu etwas niedrigeren Werten. Wurde die zweite Gabe ohne Hyperthermie verabreicht, so war nur bei Pat. 4 eine deutliche Konzentrationssteigerung festzustellen.

Bei Beurteilung der Konzentrationen in den Erythrozyten, bei denen sich eine Platin-Kumulation besonders stark äußern würde, muss beachtet werden, dass die Werte der Gabe I ohne Hyperthermie von zwei sehr unterschiedlichen Patienten stammen. Einer der Patienten bekam hier zum ersten Mal Oxaliplatin, während der andere schon mehrere Gaben erhalten hatte. Durch die unterschiedliche Vorbehandlung erklärte sich die große Differenz zwischen den Kurven der beiden Patienten. Die Konzentrationen der ersten Gabe bei Pat. 3 waren geringer als die nach der zweiten mit Hyperthermie kombinierten Gabe. Auch bei Pat. 4 zeigten sich bei der zweiten Gabe (ohne Hyperthermie) höhere Werte. So schien bei diesen beiden Patienten eine Kumulation im zweiten

Zyklus vorzuliegen. Bei Pat. 1 waren ähnlich wie bei Pat. 2 keine Unterschiede zwischen den Konzentrationen beider Gabe erkennbar.

Abschließend kann man sagen, dass in Ultrafiltrat und Plasma bis auf eine Ausnahme (Pat. 1, Ultrafiltrat) unter Hyperthermiebedingungen niedrigere Konzentrationen gemessen wurden. Eine Konzentrationszunahme in Vollblut und Erythrozyten nach der zweiten Gabe fand nur einem bzw. zwei Patienten statt; die Beurteilung dieses Phänomens war aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von Oxaliplatingaben, die die beteiligten Patienten erhalten hatten, nur schwer möglich.

### Bindung an Makromoleküle

Die Bindung an Makromoleküle wurde für alle Patienten durch Berechnung des ultrafiltrierbaren Anteils als Verhältnis der Ultrafiltratkonzentration zur Konzentration im Plasma (s. Gl. 3.3) charakterisiert. Die individuellen Verläufe der  $f_{UF}$  über die Zeit sind in Abb. 3.26 dargestellt.

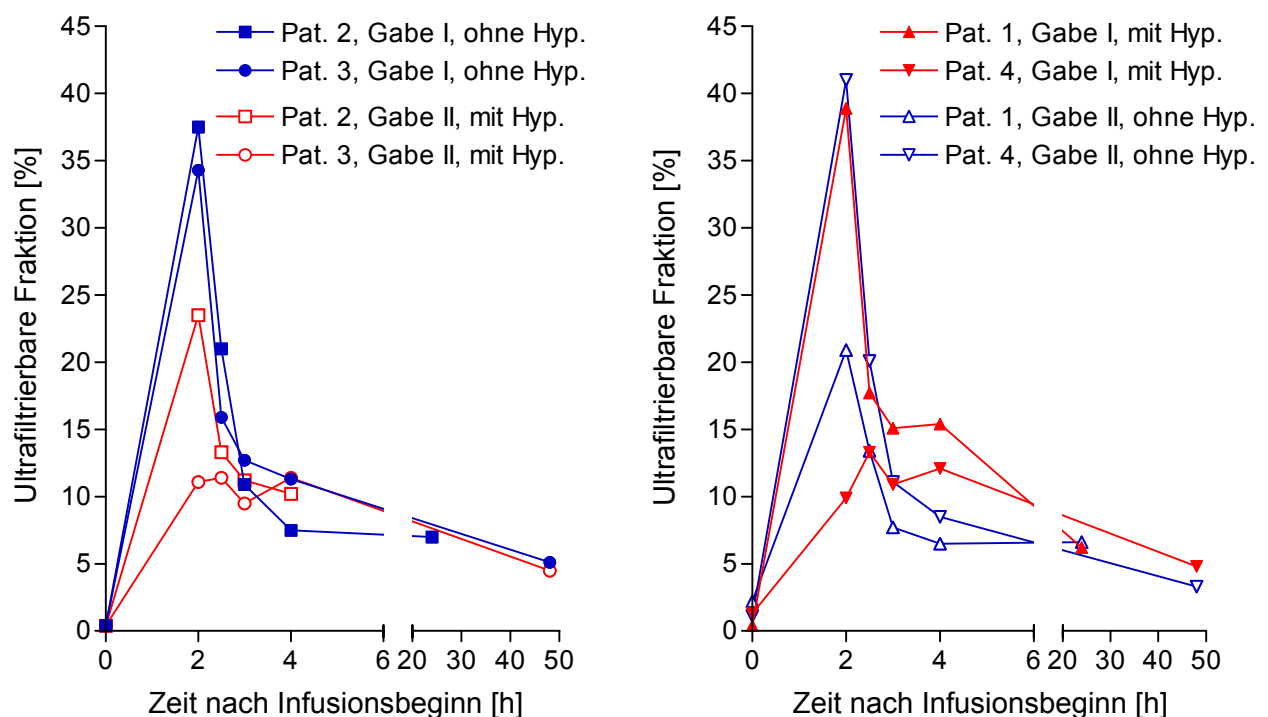


Abb. 3.26 Ultrafiltrierbare Fraktion  $f_{UF}$  nach Applikation von  $85 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin

Nach Gabe I ohne Hyperthermie zeigte sich eine schnelle Bindung von Platin an Makromoleküle; bereits am Infusionsende waren nur noch ca. 35 % des im Plasma messbaren Platins ultrafiltrierbar. Dieser Anteil verringerte sich in den nächsten zwei Stunden auf 10 %. Ähnliche Verhältnisse wurden nach Gabe II ohne Hyperthermie bei Pat. 4

beobachtet; hier lag die maximale ultrafiltrierbare Fraktion bei 41 % und nahm dann etwa auf 8,5 % ab. Bei Kombination mit Hyperthermie zeigte sich für die Patienten 2, 3 und 4 ein wesentlich geringerer ultrafiltrierbarer Anteil am Infusionsende. Er lag nach Gabe I mit Hyperthermie bei 13 % und nach Gabe II mit Hyperthermie bei zwischen 10 und 25 %. Bei Pat. 1 war die umgekehrte Tendenz zu erkennen: die ultrafiltrierbare Fraktion war unter Hyperthermiebedingungen fast doppelt so hoch wie ohne Hyperthermie. Die Bindung an Makromoleküle schien mit Ausnahme von Pat. 1 bei Kombination mit Hyperthermie in größerem Ausmaß zu erfolgen. Diese Differenz war v.a. 2 - 3 h nach Infusionsbeginn, also noch 1 Stunde nach Beendigung der Hyperthermie, zu beobachten.

Neben den Quotienten zwischen Ultrafiltrat- und Plasmakonzentration wurden auch die Quotienten zwischen Ultrafiltratkonzentrationen und Vollblut- bzw. Erythrozytenkonzentrationen berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (s. Abb. 3.27 und 3.28).

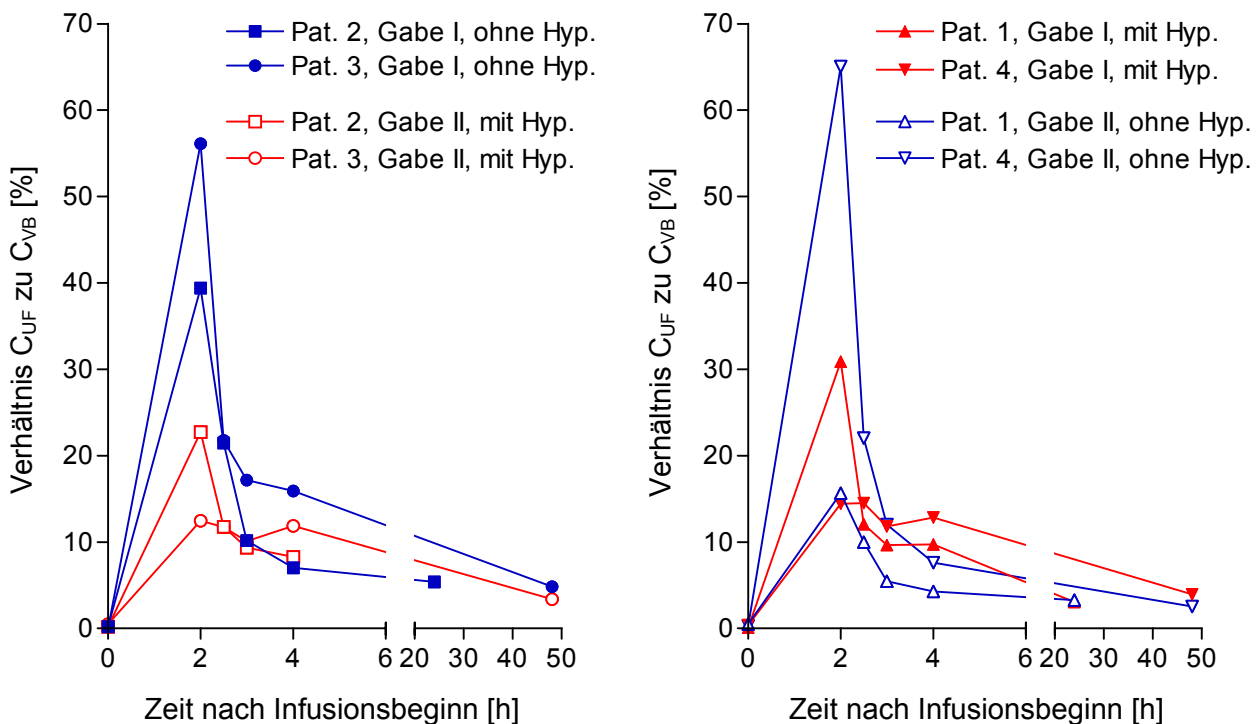


Abb. 3.27 Verhältnisse der Ultrafiltrat- zu Vollblutkonzentrationen nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin



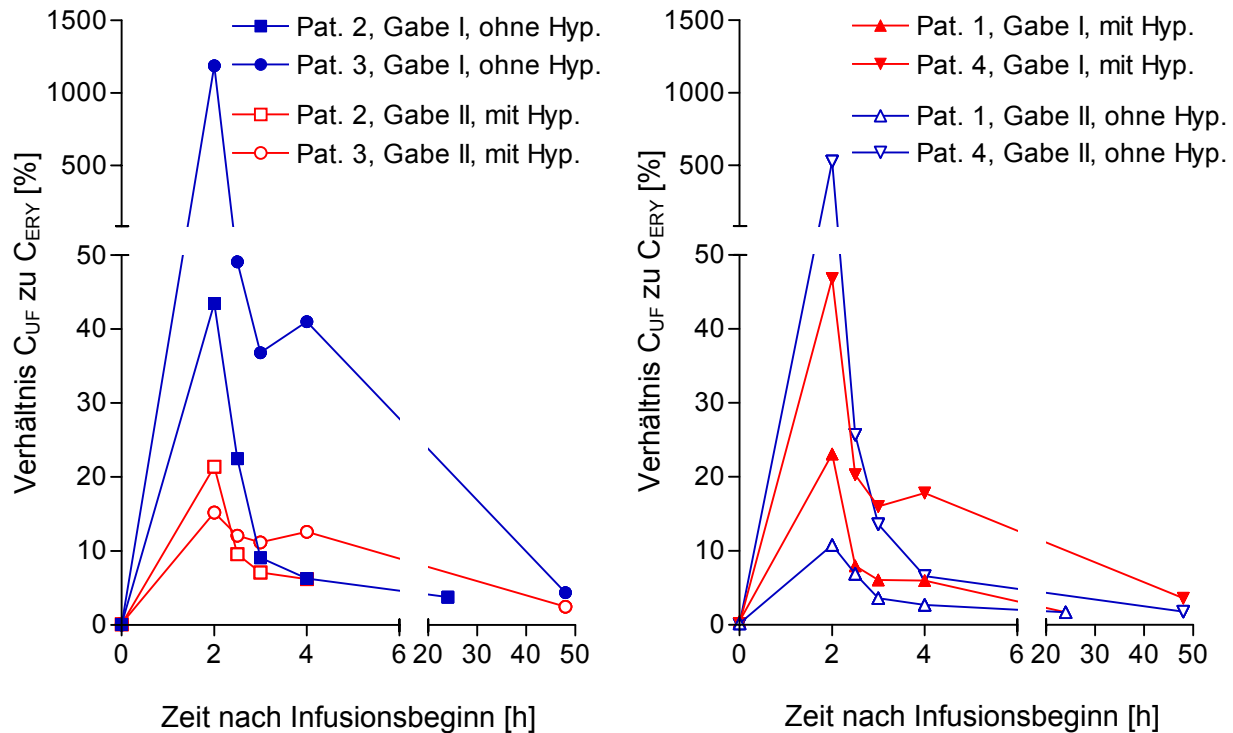


Abb. 3.28 Verhältnisse der Ultrafiltrat- zu Erythrozytenkonzentrationen nach Applikation von  $85 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin

Beim Vergleich der Konzentrationsverhältnisse zwischen Ultrafiltrat und Vollblut sowie Ultrafiltrat und Erythrozyten zeigte sich ähnlich wie bei der ultrafiltrierbaren Fraktion für die Patienten 2, 3 und 4 wesentlich geringere Quotienten unter Hyperthermie als unter normothermen Bedingungen. Dies deutete auf eine schnellere Bindung des Platins an Makromoleküle (Plasma- bzw. Erythrozytenproteine) hin.

Besonders auffällig waren die Verhältnisse von Ultrafiltrat- zu Erythrozytenkonzentrationen am Infusionsende; dort wurden ohne Anwendung von Hyperthermie zunächst höhere Konzentrationen im Ultrafiltrat als in den Erythrozyten gemessen und daher für Pat. 3 und 4 Werte von über 1000 % bzw. 500 % erhalten. Weiterhin muss bei der Beurteilung der Kurven mit und ohne Hyperthermie der unterschiedliche Grad der Vorbehandlung der untersuchten Patienten beachtet werden.

Ähnlich wie bei der ultrafiltrierbaren Fraktion zeigte sich auch für diese beiden Matrizes bei Pat. 1 die gegenläufige Tendenz; bei ihm waren die Konzentrationsverhältnisse mit Hyperthermie deutlich über denen ohne Anwendung von Hyperthermie.

Die hier beschriebenen Unterschiede hinsichtlich der Bindung an Makromoleküle unter "Normal"- bzw. Hyperthermiebedingungen können aufgrund der geringen Fallzahl von nur 4 Patienten nicht statistisch untersucht werden.

### Individuelle pharmakokinetische Parameter

Für jede der vier möglichen Kombinationen der beiden Oxaliplatingaben mit und ohne Hyperthermie (s. Tab. 3.30) existierten nur die Werte von jeweils zwei Patienten. Diese wurden bei der kompartmentabhängigen pharmakokinetischen Auswertung unterschiedlich gut abgeschätzt, da bei dem einen Patienten jeder Gruppe bis 24 h, bei dem anderen bis 48 h nach Infusionsbeginn Proben gesammelt wurden und somit unterschiedlich gute Kurvenanpassungen im terminalen Abschnitt resultieren. Daher waren die Differenzen zwischen den beiden angegebenen Werten z.T. sehr groß und nicht unbedingt nur auf interindividuelle Unterschiede zurückzuführen.

Bei Gabe II mit Hyperthermie wurde sogar nur ein Wert erhalten, da bei dem zweiten Patienten die letzte Probenentnahme aus medizinischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte, und somit nur Werte bis 4 h nach Infusionsbeginn zur Verfügung standen. Daher wurde bei allen Patienten die AUC, sofern sie kompartmentunabhängig bestimmt wurde, nur in den ersten 4 h nach Infusionsbeginn berechnet. In der folgenden Tab. 3.30 sind die Einzelwerte der pharmakokinetischen Parameter für die Patienten jeder Gruppe angegeben.

Um die AUC-Werte im Folgenden mit denen nach Applikation von 60 bzw. 130 mg/m<sup>2</sup> vergleichen zu können (s. Kap. 3.3.4), wurde bei den Patienten, bei denen als letzter Messwert der 48 h-Wert, aber nicht der 24 h-Wert, zur Verfügung stand, trotzdem versucht, eine AUC<sub>0-24 h</sub> zu berechnen. Dazu wurden die nach der kompartmentabhängigen Analyse der Konzentrations-Zeit-Verläufe abgeschätzten 24 h-Werte herangezogen. Bis zu diesem Punkt wurde dann mit Hilfe der Trapezregel die AUC<sub>0-24 h</sub> errechnet. Die Ergebnisse für diesen Parameter sind in Tab. 3.31 dargestellt.

Beim Vergleich der AUC<sub>0-4 h</sub> bzw. der AUC<sub>0-24 h</sub> für das ultrafiltrierbare Platin zeigte sich, dass diese Parameter bis auf eine Ausnahme (Pat. 1) in den Zyklen, in denen die Oxaliplatingabe mit Hyperthermie kombiniert wurde, geringer waren als in den Zyklen ohne Hyperthermie. Diese Tendenz war unabhängig davon, ob die erste oder die zweite Gabe mit Hyperthermie kombiniert wurde.

Tab. 3.30 *Pharmakokinetische Parameter nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle zwei Wochen (Einzelwerte)*

	Plasma		Ultrafiltrat		Vollblut		Erythrozyten	
<b>Gabe I ohne Hyperthermie</b>	<b>Pat. 2</b>	<b>Pat. 3</b>	<b>Pat. 2</b>	<b>Pat. 3</b>	<b>Pat 2</b>	<b>Pat 3</b>	<b>Pat 2</b>	<b>Pat 3</b>
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	92,4	61,4	8,70	5,44	118	63,1	n.b.	n.b.
AUC <sub>0-4 h</sub> [µg·h/mL]	6,99	5,38	1,75	1,32	7,28	3,57	7,82	0,87
t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	0,34	0,12	0,31	0,15	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
t <sub>1/2z</sub> [h]	35,7	28,0	41,0	16,1	38,1	38,3	n.b.	n.b.
CL [L/h]	0,72	1,09	7,90	15,3	0,58	1,32	n.b.	n.b.
V <sub>ss</sub> [L]	36,4	42,8	365	276	32,0	73,0	n.b.	n.b.
<b>Gabe II mit Hyperthermie</b>	<b>Pat. 2</b>	<b>Pat. 3</b>	<b>Pat. 2</b>	<b>Pat. 3</b>	<b>Pat 2</b>	<b>Pat 3</b>	<b>Pat 2</b>	<b>Pat 3</b>
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	22,9	89,9	1,92	3,48	22,9	108	n.b.	n.b.
AUC <sub>0-4 h</sub> [µg·h/mL]	5,18	3,52	0,86	0,37	5,97	3,41	7,45	3,24
t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	0,10	2,30	0,16	0,30	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
t <sub>1/2z</sub> [h]	9,22	78,5	4,42	19,6	7,62	70,1	n.b.	n.b.
CL [L/h]	2,92	0,74	35,8	24,0	3,00	0,77	n.b.	n.b.
V <sub>ss</sub> [L]	37,5	82,3	166	669	33,0	77,8	n.b.	n.b.
<b>Gabe I mit Hyperthermie</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	68,7	63,3	5,09	3,40	186	85,7	n.b.	n.b.
AUC <sub>0-4 h</sub> [µg·h/mL]	4,92	3,52	1,32	0,37	7,51	3,02	11,7	2,03
t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	0,21	0,07	0,14	0,29	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
t <sub>1/2z</sub> [h]	34,7	42,0	12,3	19,0	58,5	64,1	n.b.	n.b.
CL [L/h]	0,97	1,05	13,5	24,6	0,37	0,98	n.b.	n.b.
V <sub>ss</sub> [L]	47,8	63,1	189	667	31,2	90,1	n.b.	n.b.
<b>Gabe II ohne Hyperthermie</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	60,7	88,1	5,10	5,63	165	121	n.b.	n.b.
AUC <sub>0-4 h</sub> [µg·h/mL]	5,38	6,50	0,75	1,89	8,14	5,31	13,0	3,52
t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	0,45	0,21	0,38	0,22	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
t <sub>1/2z</sub> [h]	25,2	40,5	33,5	18,5	47,6	51,9	n.b.	n.b.
CL [L/h]	1,10	0,76	13,1	14,8	0,40	0,69	n.b.	n.b.
V <sub>ss</sub> [L]	39,6	42,8	557	241	27,7	51,8	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Tab. 3.31  $AUC_{0-24\text{ h}}$  nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle zwei Wochen (Einzelwerte)

	Plasma		Ultrafiltrat		Vollblut		Erythrozyten	
<b>Gabe I ohne Hyperthermie</b>	<b>Pat. 2</b>	<b>Pat. 3</b>	<b>Pat. 2</b>	<b>Pat. 3</b>	<b>Pat 2</b>	<b>Pat 3</b>	<b>Pat 2</b>	<b>Pat 3</b>
$AUC_{0-24\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	37,4	29,6	3,96	3,76	42,4	22,6	51,6	12,0
<b>Gabe II mit Hyperthermie</b>	<b>Pat. 2</b>	<b>Pat. 3</b>	<b>Pat. 2</b>	<b>Pat. 3</b>	<b>Pat 2</b>	<b>Pat 3</b>	<b>Pat 2</b>	<b>Pat 3</b>
$AUC_{0-24\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	n.b.	21,5	n.b.	2,23	n.b.	23,4	n.b.	26,2
<b>Gabe I mit Hyperthermie</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>
$AUC_{0-24\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	29,7	21,7	4,27	2,21	51,2	20,7	86,3	17,3
<b>Gabe II ohne Hyperthermie</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>	<b>Pat. 1</b>	<b>Pat. 4</b>
$AUC_{0-24\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	31,8	32,1	2,48	3,75	52,8	34,8	90,1	39,0

n.b. = nicht bestimmt

Für die  $AUC_{\infty}$  wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten. Pat. 1 zeigte hier keine gegenläufige Tendenz, sondern die kompartimentabhängig bestimmte AUC war in beiden Zyklen etwa gleich. Die Clearance unter Hyperthermiebedingungen war in der Regel deutlich höher als ohne Hyperthermie.

Ein Vergleich der Parameter für die anderen Matrices wurde zusätzlich dadurch erschwert, dass nicht alle Patienten zum gleichen Behandlungszeitpunkt in die Untersuchung aufgenommen wurden. Pat. 3 bekam zum ersten Mal Oxaliplatin, während die anderen Patienten schon mehrere Gaben erhalten hatten. Daher waren die AUC-Werte in den Erythrozyten nach der ersten Gabe, die bei diesem Patienten ohne Hyperthermie erfolgte, geringer als die für Gabe II. Ansonsten wurden für die  $AUC_{0-4\text{ h}}$  in Plasma und Vollblut die gleichen Tendenzen erhalten wie für die  $AUC_{0-4\text{ h}}$  im Ultrafiltrat. Die  $AUC_{\infty}$  und dementsprechend auch die Clearance zeigte kein einheitliches Bild: bei zwei Patienten war die  $AUC_{\infty}$  mit Hyperthermie höher als ohne; bei den beiden anderen war es genau umgekehrt.

Der Einfluss der Hyperthermie auf die Pharmakokinetik von Platin konnte anhand der geringen Fallzahl nicht eindeutig geklärt werden. Diese kam v.a. dadurch zustande, dass die Studie nicht bis zur geplanten Fallzahl von 105 Patienten durchgeführt, sondern bereits nach Behandlung von 44 Patienten beendet wurde<sup>185,195</sup>.

### 3.3.4 Vergleich der pharmakokinetischen Parameter für die verschiedenen Applikationsschemata

Nach Anwendung von drei unterschiedlichen Applikationsschemata, die neben drei unterschiedlichen Dosierungen von Oxaliplatin auch unterschiedliche Begleitmedikationen aufwiesen, wurde wie in den drei vorangegangenen Kapiteln dargestellt, die Platin-Pharmakokinetik untersucht.

Um die Parameter, die nach pharmakokinetischer Analyse der Kurvenverläufe erhalten wurde, miteinander zu vergleichen, wurden diese zunächst mit Hilfe des *Shapiro-Wilk*-Tests auf Normalverteilung geprüft und anschließend mittels t-Test bzw. U-Test nach *Mann und Whitney* miteinander verglichen.

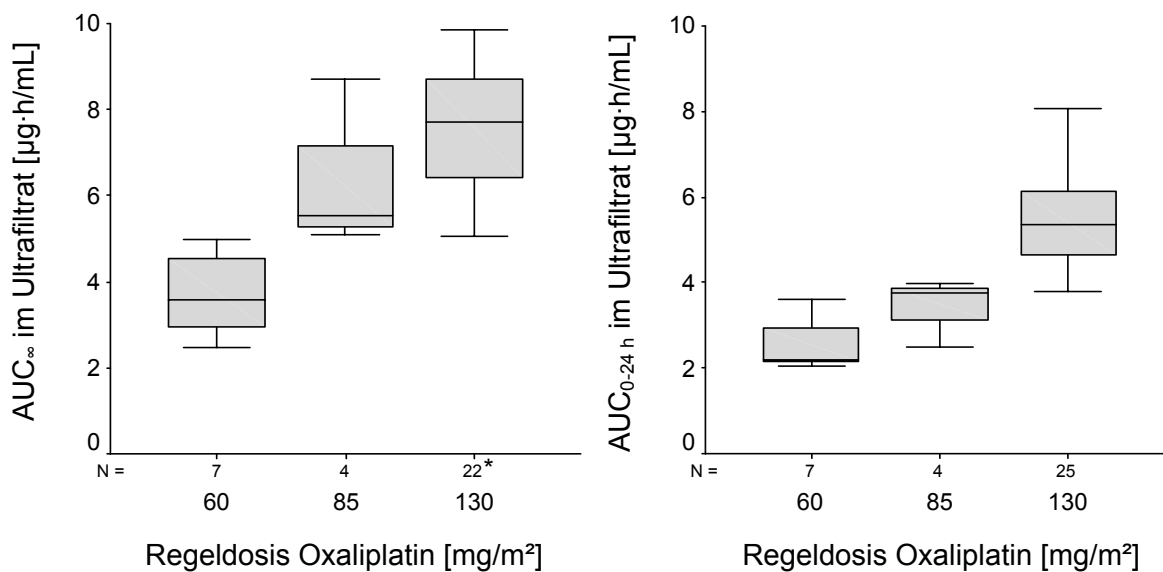
Der Schwerpunkt wurde auf die Parameter gelegt, die nach Analyse der Platinkonzentrations-Zeit-Verläufe im Ultrafiltrat erhalten wurden. Die Parameter des Ultrafiltrats, das primär die pharmakologisch aktiven Platinspezies enthält, sind im Gegensatz zu den anderen Matrices unabhängig von der Anzahl der im Vorfeld bereits erhalten Oxaliplatingaben. So konnten die Daten aller Patienten, auch bei uneinheitlichen Behandlungszeitpunkten innerhalb eines Zyklus oder bei unterschiedlichen Zyklen, in die Auswertung einbezogen werden. Aus der Hyperthermiestudie wurden nur die Zyklen herangezogen, bei denen keine Hyperthermie angewendet worden war, da die Effekte der Hyperthermiebedingungen auf die Platinkonzentrationen und die pharmakokinetischen Parameter nicht geklärt werden konnten.

Neben Maximalkonzentration, Clearance, Verteilungsvolumen und Halbwertszeit wurden die  $AUC_{\infty}$  sowie die  $AUC_{0-24\text{ h}}$ , die auch für die Patienten, die nach Applikation von  $130\text{ mg/m}^2$  extrem hohe Maximalkonzentrationen aufwiesen, bestimmt werden konnte, nach Applikation der drei Schemata miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass sich lediglich die AUC-Werte, die nach Applikation der drei Schemata erhalten wurden, unterschieden. Dabei waren die Unterschiede zwischen den  $AUC_{\infty}$  nach Applikation von  $60$  und  $130\text{ mg/m}^2$  ( $p < 0,001$ ) und  $60$  und  $85\text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin ( $p = 0,042$ ) signifikant, nicht aber zwischen  $85$  und  $130\text{ mg/m}^2$  ( $p = 0,112$ ). Die mittlere  $AUC_{0-24\text{ h}}$  nach Gabe von  $130\text{ mg/m}^2$  unterschied sich signifikant von den AUC-Werten der beiden anderen Patientengruppen ( $130$  vs.  $60\text{ mg/m}^2$ :  $p < 0,001$ ;  $130$  vs.  $85\text{ mg/m}^2$ :  $p = 0,002$ ). Zwischen den  $AUC_{0-24\text{ h}}$  nach Applikation von  $60$  und  $85\text{ mg/m}^2$  waren die Unterschiede nicht signifikant ( $p = 0,067$ ). Die AUC als dosisabhängiger

Parameter zeigte eine positive Korrelation mit der applizierten Regeldosis. Der Korrelationskoeffizient lag für die  $AUC_{\infty}$  bei  $r = 0,564$  ( $p < 0,001$ ) und für die  $AUC_{0-24\text{ h}}$  bei  $r = 0,765$  ( $p < 0,001$ ) und deutete somit auf einen mittelstarken Zusammenhang hin, der auch aus Abb. 3.29 ersichtlich wird. Die maximalen Konzentrationen, die für die drei Patientengruppen im Ultrafiltrat erhalten wurden, unterschieden sich ebenfalls signifikant und standen in Zusammenhang mit der applizierten Regeldosis ( $r = 0,690$ ;  $p < 0,001$ ).

Die Platin-Clearances als dosisunabhängige Parameter, die für die drei Patientengruppen erhalten wurden, unterschieden sich ebenso wenig voneinander wie alle anderen überprüften Parameter. Somit bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Pharmakokinetik im Ultrafiltrat zwischen den verschiedenen Therapie-schemata.



**Abb. 3.29**  $AUC_{\infty}$  und  $AUC_{0-24\text{ h}}$  im Ultrafiltrat in Abhängigkeit von der verabreichten Regeldosis ( $N =$  Anzahl der untersuchten Zyklen. \*Für die Pat. 9, 10 und 11 wurde wegen extrem hoher Konzentrationen am Infusionsende in Zyklus I keine  $AUC_{\infty}$  bestimmt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden zwei Extremwerte für  $AUC_{\infty}$  nach Gabe von  $130\text{ mg/m}^2$  nicht dargestellt: Pat. 20, Zyklus I:  $15,5$  und Zyklus II  $17,9\text{ µg·h/mL}$ .)

### 3.3.5 Individuelle Einflussfaktoren auf die Platin-Pharmakokinetik

Als mögliche Einflussfaktoren auf pharmakokinetische Parameter wurden verschiedene Patientencharakteristika, wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Körperoberfläche und Nierenfunktion, geprüft.

Da man davon ausgeht, dass der Platinanteil im Ultrafiltrat für die Wirkungen verantwortlich ist, bezogen sich die Untersuchungen in erster Linie auf die pharmakokinetischen Parameter des ultrafiltrierbaren Platins. Darüberhinaus wurden auch einige Parameter anderer Matrices mit einbezogen; dabei wurden einheitlich die Werte des ersten Behandlungszyklus genutzt. Für das Auffinden patientenindividueller Einflussfaktoren wurden zunächst die Daten der Patienten, die mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt worden waren, herangezogen, da diese Patientengruppe mit 14 Patienten die größte Fallzahl aufwies. Anhand der Daten aus der Studie, in der 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin appliziert wurden, wurden die gefundenen Korrelationen überprüft. Die Patienten der Hyperthermiestudie wurden wegen des unklaren Einflusses der Hyperthermie nicht mit einbezogen.

Als Maß für die Nierenfunktion wurde die Kreatininclearance (CL<sub>CR</sub>) herangezogen, die aus der Serumkreatininkonzentration mit Hilfe der Formel nach *Cockcroft und Gault* abgeschätzt wurde (s. Kapitel 2.6.3). Die Patienten, die mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt wurden, hatten eine mittlere Kreatininclearance von 101 ± 29 mL/min im ersten und 106 ± 29 mL/min im zweiten Zyklus. Die Werte für die Serumkreatininkonzentration (Zyklus I: 0,93 ± 0,23 mg/dL und Zyklus II: 0,84 ± 0,19 mg/dL) und die Kreatininclearance unterschieden sich in den beiden Zyklen nicht signifikant.

Die pharmakokinetischen Parameter wurden auf ihre Korrelation mit den Patientencharakteristika untersucht. Für alle normalverteilten Variablen wurde die Korrelationsanalyse nach *Pearson* angewandt, während für die nicht-normalverteilten Parameter die Rangkorrelationsanalyse nach *Kendall* durchgeführt wurde.

Es zeigten sich positive Korrelationen der Platin-Clearances aus Ultrafiltrat und Plasma mit dem *Körpergewicht* ( $r_{UF} = 0,704$ ;  $p_{UF} = 0,016$  und  $r_{PL} = 0,647$ ;  $p_{PL} = 0,031$ ). Dementsprechend war für die AUC<sub>∞</sub> im Ultrafiltrat ein umgekehrter Zusammenhang mit dem Gewicht, der mit  $r = -0,633$  ( $p = 0,037$ ) vergleichbar stark ausgeprägt war, vorhanden.

Für die *KOF*, nach der Oxaliplatin dosiert wird, existierte ebenfalls ein Zusammenhang mit der Clearance aus dem Ultrafiltrat; jedoch war dieser mit  $r = 0,544$  ( $p = 0,083$ ) nicht signifikant. Für die Clearance aus anderen Matrices war eine Korrelation mit der *KOF* nur schwach ausgeprägt. Für die  $AUC_{UF,\infty}$  war das Ergebnis ähnlich; die Korrelation war mit  $r = -0,522$  und einem  $p$ -Wert von  $p = 0,099$  nicht signifikant.

Das *Geschlecht* beeinflusste ebenfalls die Platinclearance bzw. die AUC in Ultrafiltrat und Plasma. Frauen wiesen demnach eine höhere  $AUC_{UF,\infty}$  ( $r = 0,572$ ;  $p = 0,034$ ) auf. Diese war mit  $12,5$  [ $9,50 - 15,5$ ]  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  signifikant höher als die der Männer, die im Median  $7,22$  [ $5,90 - 9,00$ ] betrug ( $p = 0,036$ ; U-Test). Die Clearance der Frauen aus dem Ultrafiltrat lag bei  $9,30$  [ $6,66 - 13,9$ ] L/h und unterschied sich signifikant ( $p = 0,036$ ) von der medianen Clearance der Männer ( $17,1$  [ $14,1 - 20,5$ ] L/h). Auch für die Platinclearance aus Plasma bestand mit  $p = 0,036$  ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $CL_{\text{Frauen}}$ :  $0,96$  [ $0,90 - 1,00$ ];  $CL_{\text{Männer}}$ :  $1,24$  [ $1,00 - 1,60$ ] L/h).

Um zu überprüfen, ob der Einfluss des Geschlechts auf die Platinclearance auf die geringere *KOF*, die geringere Körpergröße oder das geringere Körpergewicht der weiblichen Patienten zurückzuführen war, wurden die Plasma- und die Ultrafiltrat-Clearance auf jeweils einen der o.g. Parameter normiert. Die Korrelation blieb danach bestehen; auch die normierten AUC-Werte zeigten weiterhin einen Zusammenhang mit dem Geschlecht. Andere untersuchte Variablen, wie die Nierenfunktion, zeigten keine Abhängigkeit vom Geschlecht. Somit täuschte keine der untersuchten Variablen einen Zusammenhang zwischen Geschlecht und Pharmakokinetik vor, so dass offenbar noch andere geschlechtsspezifische Faktoren die Kinetik des ultrafiltrierbaren Platins beeinflussen.

Für Plasma war der oben beschriebene Zusammenhang nicht in demselben Ausmaß vorhanden. Die auf Gewicht, Größe oder *KOF* normierten Clearances korrelierten nur noch schwach mit dem Geschlecht; der stärkste Zusammenhang bestand für die auf die Größe normierte Clearance mit  $r = -0,509$ , der aber wie die beiden anderen keine Signifikanz mehr aufwies.

Für die Untersuchung des Einflusses der *Nierenfunktion* auf die Platinkinetik wurden zunächst die Platinclearances aus den Matrices Ultrafiltrat, Plasma und Vollblut auf eine Korrelation mit der Kreatininclearance geprüft. Die Zusammenhänge waren für Ultrafiltrat und Plasma mit Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,588$  ( $p = 0,057$ ) und  $r = 0,524$  ( $p = 0,098$ ) eher schwach ausgeprägt und nicht signifikant. Dagegen zeigte sich für die Clearance aus Vollblut ein wesentlich stärkerer Zusammenhang ( $r = 0,841$ ;  $p = 0,001$ ).



Nur für die Clearance aus Vollblut war eine negative Korrelation mit der Serumkreatininkonzentration gegeben ( $r = -0,832$ ;  $p = 0,001$ ); das Ausmaß des Zusammenhangs mit der Serumkreatininkonzentration war für die Clearances aus den anderen Matrices ebenfalls deutlich schwächer und ohne Signifikanz.

Neben der Prüfung der Kreatininclearance, die auf der Basis des *realen* Körpergewichts berechnet wurde, wurde auch die Kreatininclearance, bei der für Patienten mit mehr als 15 kg Übergewicht das *ideale* Körpergewicht eingesetzt wurde, untersucht. Dabei zeigte sich nur mit der Vollblut-Clearance eine signifikante Korrelation ( $r = 0,697$ ;  $p = 0,017$ ). Für alle anderen Matrices waren die Zusammenhänge nur schwach ausgeprägt ( $r < 0,5$ ).

Für die AUC in den drei Matrices wurden negative Korrelationen mit der Nierenfunktion gefunden. Dabei war der Zusammenhang für Vollblut mit  $r = -0,738$  ( $p = 0,01$ ) am größten. Bei allen anderen war die Korrelation schwächer und nicht signifikant [ $AUC_{ERY,0-48\text{ h}}$ :  $r = -0,605$  ( $p = 0,084$ ),  $AUC_{UF,\infty}$ :  $r = -0,559$  ( $p = 0,074$ ),  $AUC_{PL,\infty}$ :  $r = -0,455$  ( $p = 0,159$ )]. Die AUC im Vollblut ( $r = 0,730$ ;  $p = 0,011$ ) und in den Erythrozyten ( $r = 0,680$ ;  $p = 0,044$ ) zeigte ebenfalls einen Zusammenhang mit der Kreatininkonzentration; für die anderen Matrices lagen die nicht signifikanten Korrelationskoeffizienten bei 0,3 - 0,5.

Für die Patienten der Studie, in der 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin appliziert wurden, konnten lediglich die Daten für das ultrafiltrierbare Platin ausgewertet werden. Die Daten der anderen Matrices wurden durch den Behandlungszeitpunkt, der bei den Patienten nicht einheitlich war, maßgeblich beeinflusst, und daher nicht in die Analyse mit einbezogen. Der Zusammenhang zwischen Platinclearance bzw. AUC und Gewicht war für diese Patientengruppe nur sehr schwach ausgeprägt und allenfalls die gleiche Tendenz wie bei den zuvor untersuchten Patienten erkennbar. Der Einfluss des Geschlechts auf die Kinetik des ultrafiltrierbaren Platins konnte nicht untersucht werden, da unter den 8 Patienten lediglich eine weibliche Patientin war. Die Zusammenhänge mit der Nierenfunktion waren zwar erkennbar; allerdings waren die Korrelationen mit Koeffizienten zwischen 0,3 - 0,5 nur schwach ausgeprägt und nicht signifikant.

Für eine gemeinsame Auswertung beider Patientengruppen wurde nur die Platinclearance aus dem Ultrafiltrat herangezogen, da diese zyklus- und dosisunabhängig war. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Clearance und Serumkreatininkonzentration ( $r = -0,446$ ;  $p = 0,020$ ), aber kein Zusammenhang mit der Kreatininclearance.

### 3.4 Platin-DNA-Adduktbildung

Neben der Pharmakokinetik wurde im Rahmen dieser Arbeit die Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten nach Applikation von drei verschiedenen Oxaliplatin-Dosierungen untersucht.

Für die pharmakodynamische Auswertung standen Proben von 16 Patienten zur Verfügung, die im Sana Klinikum Remscheid mit 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin in wöchentlichen Abständen behandelt wurden. Neben den in der Hyperthermie-Studie untersuchten 4 Patienten wurde auch bei 24 Patienten, denen 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin verabreicht wurden, die Adduktbildung quantifiziert. Dabei wurden nicht nur die Patienten mit nicht-gastrointestinalen Tumoren (wie bei der pharmakokinetischen Untersuchung) eingeschlossen, sondern alle in Kap. 2.4.3 charakterisierten Patienten. Bei den Patienten, die mit 60 mg/m<sup>2</sup> behandelt worden waren, war die Adduktbestimmung leider nur in einem Fall möglich.

Für die Charakterisierung der Adduktbildung wurde das Platin-Nukleotid-Verhältnis in Leukozyten in drei bis vier Blutproben pro Patient und Zyklus nach der in Kap. 2.3 beschriebenen Methode bestimmt. Aufgrund der geringen DNA-Platinierung nach Oxaliplatingabe wurde für die Quantifizierung des Platingehalts in den Leukozytenproben einheitlich das Verfahren der adsorptiven Voltammetrie angewandt.

In den folgenden Kapiteln sind die zeitlichen Verläufe der Platin-Nukleotid-Verhältnisse dargestellt. Dabei wurden die einzelnen Werte jedes Patienten gegen die theoretischen Abnahmezeitpunkte aufgetragen; außerdem wurde der Median der Platin-Nukleotid-Verhältnisse für jeden Abnahmezeitpunkt bestimmt. Zur Charakterisierung der Gesamtexposition wurde die Fläche unter der Adduktkurve mittels Trapezregel berechnet.

#### 3.4.1 Wöchentliche Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

Von September 2001 bis September 2003 wurden für die Untersuchung der Pharmakokinetik und die Platin-DNA-Adduktbildung 16 Patienten in die Studie "Pharmakologische Untersuchung zu pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Unterschieden von Oxaliplatin in der First- und Second-Line-Therapie" aufgenommen. Die Patienten, die mit 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt und deren Charakteristika in Tab. 2.8 (s. Kap. 2.4.2) dargestellt wurden, waren durchschnittlich 64 Jahre alt (45 - 82 Jahre) und litten an

kolorektalen Karzinomen. Die Patienten waren zum großen Teil mit bis zu 4 verschiedenen Chemotherapieregimen vorbehandelt; eine platin- bzw. oxaliplatinhaltige Vorbehandlung hatten 2 Patienten erhalten.

Die Platin-Pharmakokinetik dieser Patienten wird im Rahmen der Dissertation von A. Junker<sup>194</sup> untersucht, während in der hier vorliegenden Arbeit die Platin-DNA-Adduktbildung charakterisiert wurde.

Dafür wurden den Patienten, die in ihrem ersten und zweiten Behandlungszyklus untersucht wurden, jeweils 3 Blutproben (0, 4 und 24 h nach Infusionsbeginn) entnommen und für die Messung der Platin-DNA-Addukte in Leukozyten aufgearbeitet. Ein Zyklus bestand aus insgesamt 4 Behandlungstagen in wöchentlichem Abstand; die Tage, an denen die Untersuchung durchgeführt wurde, waren bei den einzelnen Patienten nicht einheitlich. Hinsichtlich der Adduktbildung konnten in Zyklus I 16 Patienten untersucht und ausgewertet werden. Für den zweiten Zyklus stehen die Daten von 14 Patienten zur Verfügung, da bei zwei Patienten ein zweiter Zyklus aus medizinischen Gründen nicht appliziert wurde.

Tab. 3.32 sind die Mediane sowie Minimal- und Maximalwerte für die einzelnen Abnahmezeitpunkte und Zyklen zu entnehmen; die Einzelwerte werden in Anhang C angegeben. In Abb. 3.30 werden die Platin-Nukleotid-Verhältnisse in Pt-Atomen :  $10^6$  Nukleotiden dargestellt. Für jeden Abnahmezeitpunkt werden neben den einzelnen Werten der untersuchten Patienten die Median-Werte gezeigt.

Tab. 3.32 *Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Mediane mit Minimal- und Maximalwert; Zyklus I: n = 16, Zyklus II: n = 14)*

Zeit nach Infusionsbeginn [h]	Platin-Nukleotid-Verhältnisse [Pt-Atome : $10^6$ Nukleotide]	
	Zyklus I	Zyklus II
0	0,34 [< BG - 1,87]	0,42 [0,07 - 2,12]
4	1,51 [0,98 - 7,17]	1,23 [0,64 - 10,9]
24	0,79 [0,43 - 5,49]	1,19 [0,32 - 6,85]

< BG = Die Platinmenge in der DNA-Adduktprobe lag unter der Bestimmungsgrenze.

Zunächst war auffällig, dass zum Zeitpunkt "0 h nach Infusionsbeginn" bei der Mehrzahl der Patienten bereits schon Platin-DNA-Addukte quantifiziert werden konnten. Dies war darauf zurückzuführen, dass im ersten Zyklus nicht alle Patienten am ersten Behandlungstag untersucht wurden, sondern z.T. erst an Tag 8, 15 oder 22. Daher wurden bei

diesen Patienten Addukte gefunden, die von der vorangegangenen Behandlung noch vorhanden waren. Auch im zweiten Zyklus ist dies neben der Möglichkeit, dass Addukte des ersten Zyklus detektiert wurden, die Erklärung für Addukte vor Beginn der Infusion.

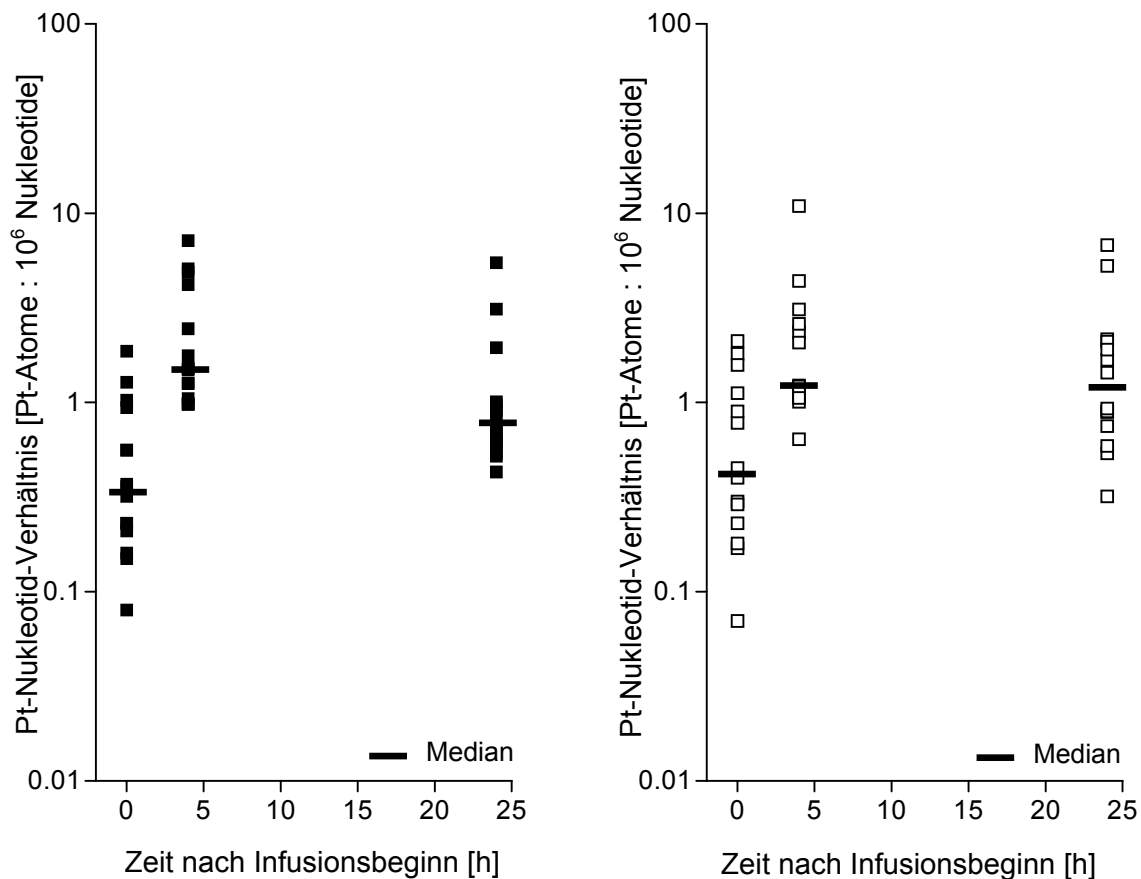


Abb. 3.30 Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Applikation von  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin (Einzelwerte und Mediane; Zyklus I: ■,  $n = 16$ , Zyklus II: □,  $n = 14$ )

Bei der Mehrzahl der Patienten (13 Patienten in Zyklus I und 11 Patienten in Zyklus II) wurde 4 h nach Infusionsbeginn das höchste Platin-Nukleotid-Verhältnis beobachtet. Die Mediane der 4 h-Werte lagen für beide Zyklen zwischen 1,2 und 1,5 Pt-Atomen :  $10^6$  Nukleotide und nahmen in den nächsten 20 h auf 0,8 - 1,2 Pt-Atome ab. Bei wenigen Patienten wurde der höchste Platinierungsgrad erst 24 h nach Infusionsbeginn gemessen. Dies zeigte sich u.a. bei Pat. 12 im zweiten Zyklus. Im ersten Zyklus wurden, wie z.B. auch bei dem repräsentativen Pat. 2, 4 h nach Infusionsbeginn die höchsten Platin-Nukleotid-Verhältnisse, deren Verläufe für beide Patienten in Abb. 3.31 dargestellt sind, beobachtet.

Der genaue Verlauf der Addukte über die Zeit konnte anhand der drei Messwerte natür-

lich nicht verfolgt werden, so dass die gemessene maximale Konzentration nicht zwangsläufig mit der tatsächlichen Maximalkonzentration übereinstimmen muss. Ein Maximum zwischen 4 und 24 h und eine Abnahme auf den bei 24 h gemessenen Wert ist ebenso wahrscheinlich.

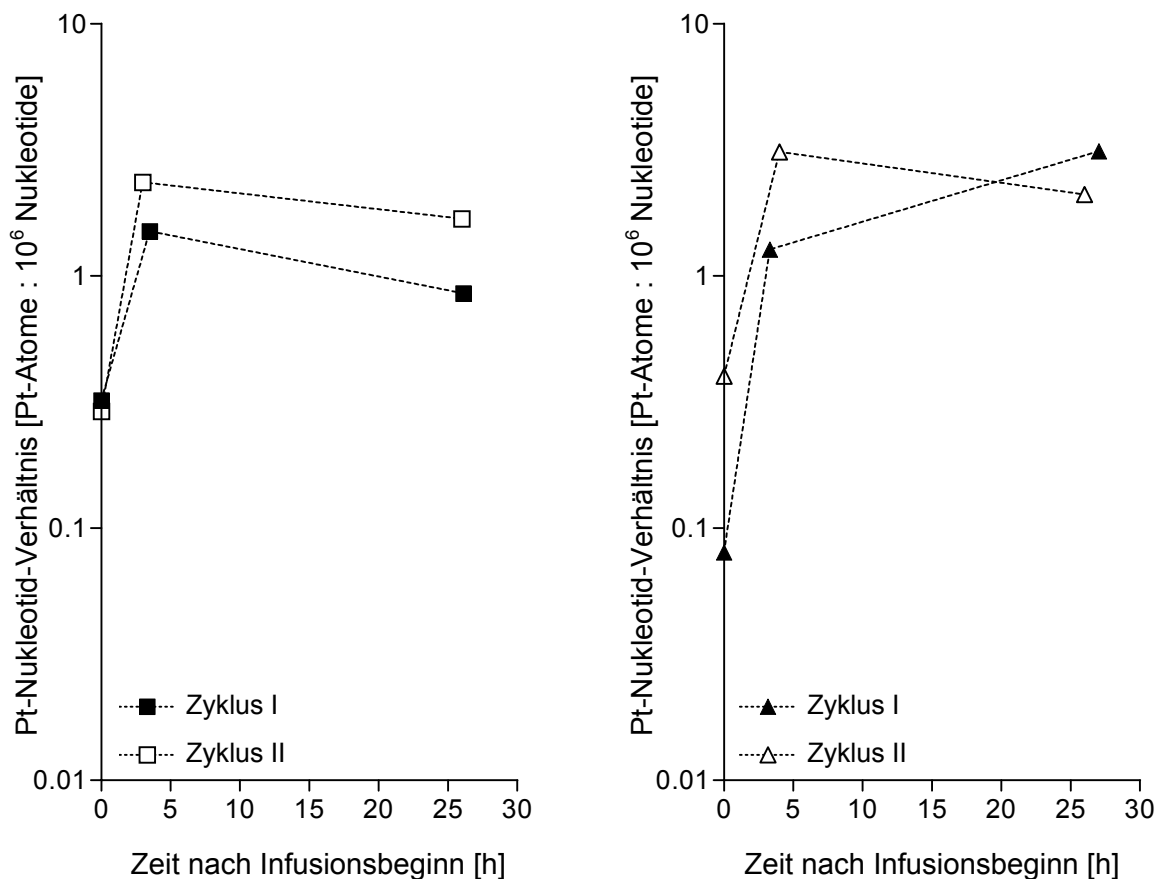


Abb. 3.31 Platin-Nukleotid-Verhältnisse von zwei repräsentativen Patienten nach Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Pat. 2: links, Pat. 12: rechts) in Zyklus I und II

Die Streuung der Werte war insgesamt sehr groß; sie umfasste für die einzelnen Abnahmezeitpunkte ca. Faktor 10. Um auszuschließen, dass die große Streuung der Werte auf die uneinheitlichen Behandlungstage innerhalb eines Zyklus zurückzuführen war, wurden die Addukte für jeden Zyklus getrennt nach Behandlungstagen ausgewertet. Dazu wurden die Werte für die theoretischen Abnahmezeitpunkte getrennt nach Behandlungstagen aufgetragen (s. Abb. 3.32). Es zeigte sich für jeden Abnahmezeitpunkt, dass die Werte, die an den Tagen 8, 15 und 22 gemessen wurden, nicht höher waren als die an Tag 1 und somit die unterschiedlichen Tage innerhalb eines Zyklus, an denen die Untersuchung stattfand, die Streuung nicht erkennbar vergrößerten.

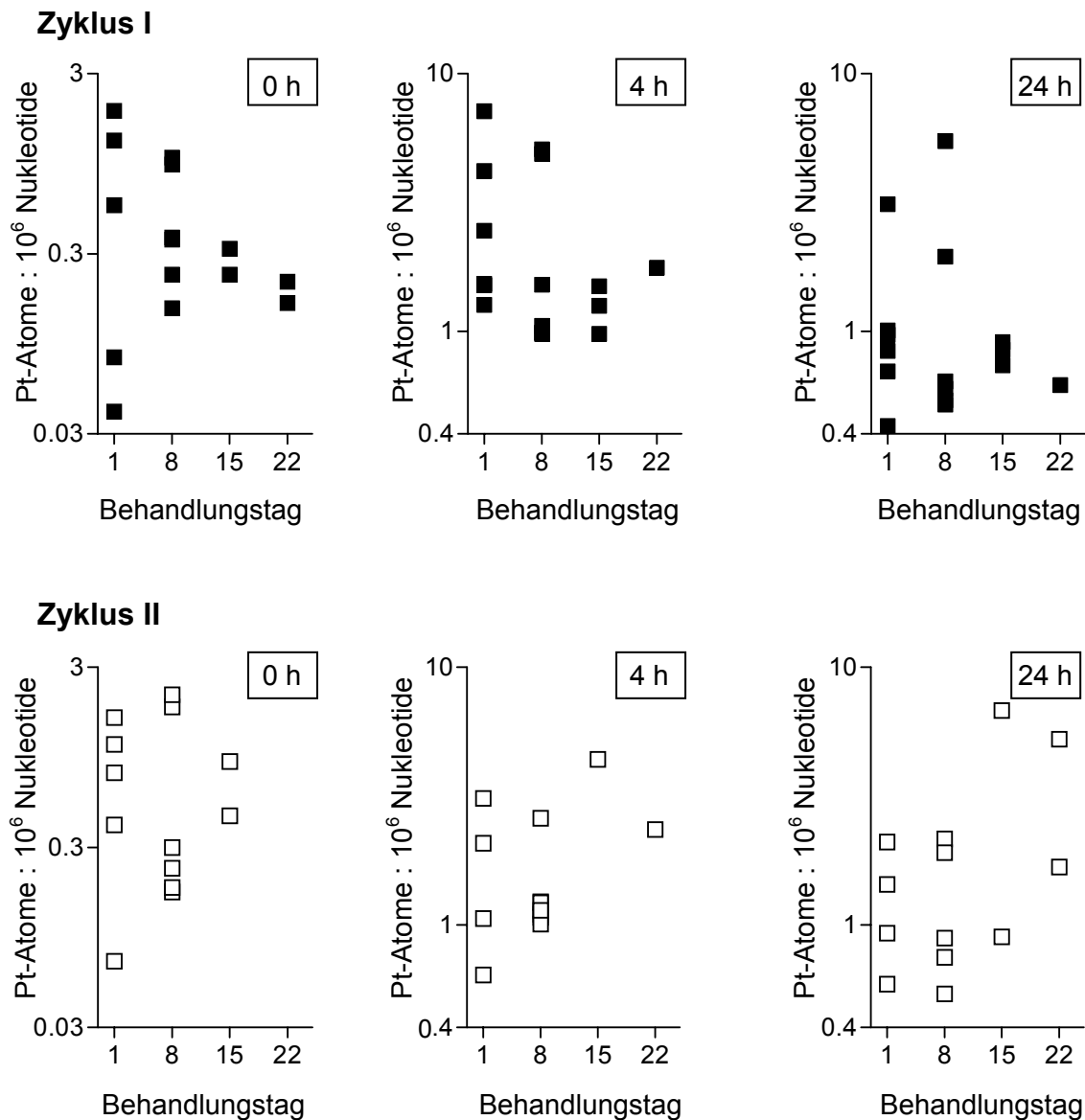


Abb. 3.32 Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin getrennt nach Zyklus (Zyklus I: ■, Zyklus II: □), Behandlungstag und Abnahmezeitpunkt

Um statistisch gesicherte Aussagen über Unterschiede zwischen den Werten einzelner Abnahmezeitpunkte oder auch zwischen entsprechenden Werten der beiden Zyklen treffen zu können, wurden die Platin-Nukleotid-Verhältnisse zunächst auf Normalverteilung geprüft. Mit Ausnahme der Nullwerte des zweiten Zyklus wichen alle Werte signifikant von einer Normalverteilung ab. Daher wurde nach Durchführung des *Friedman*-Tests, der signifikante Unterschiede der Adduktverhältnisse der einzelner Abnahmezeitpunkte  $A_{0h}$ ,  $A_{4h}$  und  $A_{24h}$  in jeweils beiden Zyklen gezeigt hatte (Zyklus I:  $p < 0,001$ ; Zyklus II:  $p = 0,004$ ) für vergleichende Prüfungen der *Wilcoxon*-Test für gepaarte Stichproben angewandt. Es zeigte sich, dass sowohl die Werte 4 h und 24 h nach Infusions-

beginn signifikant von den Nullwerten verschieden waren. Unterschiede zwischen 4 und 24 h-Werten bestanden nur in Zyklus I, jedoch nicht in Zyklus II.

Beim Vergleich der Werte beider Zyklen wurden keine Unterschiede festgestellt. Im Gegensatz zu den steigenden Platinkonzentrationen in den Erythrozyten stiegen die Platin-Nukleotid-Verhältnisse in den Leukozyten nicht signifikant an.

Zur weiteren Charakterisierung der Platinexposition wurde die Fläche unter der Addukt-kurve ( $AUA_{0-24\text{ h}}$ ) mit Hilfe der Trapezregel berechnet. Die medianen AUA-Werte sind mit den medianen maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnissen ( $A_{\max}$ ) in Tab. 3.33 dargestellt; die Einzelwerte werden in Anhang C angegeben.

*Tab. 3.33 Maximale Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{\max}$ ) und Flächen unter der Ad-dukktkurve ( $AUA_{0-24\text{ h}}$ ) nach Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Mediane mit Minimal- und Maximalwert; Zyklus I: n = 16, Zyklus II: n = 14)*

	$A_{\max}$ [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	$AUA_{0-24\text{ h}}$ [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]
<b>Zyklus I</b>	1,65 [0,98 - 7,17]	29,6 [18,5 - 127]
<b>Zyklus II</b>	1,65 [1,01 - 10,9]	35,1 [16,6 - 212]

Hinsichtlich der  $A_{\max}$  und der AUA zeigte sich wie schon bei Betrachtung der Einzelwerte eine große Streuung, die für beide Parameter zwischen Faktor 7 und 10 lag. Weder die  $A_{\max}$  noch die AUA beider Zyklen unterschieden sich signifikant voneinander.

### 3.4.2 Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen

Von November 2002 bis Juli 2003 wurden 24 Patienten nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin rekrutiert. Neben den Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik untersucht wurden (s. Kap. 3.3.2), wurden für die pharmakodynamische Auswertung auch die Daten weiterer 10 Patienten herangezogen. Die Patienten, deren Charakteristika Tab. 2.10 (s. Kap. 2.4.3) entnommen werden können, litten an unterschiedlichen Tumorentitäten: neben kolorektalen Karzinomen (5 Patienten), wurden 6 Patienten mit Aderhautmelanom, 3 mit Nierenkarzinom, 2 mit Kardiakarzinom, 3 mit Krebs unbekannter Herkunft und 5 mit weiteren unterschiedlichen Tumorarten in die Untersuchung eingeschlossen. Die Patienten, deren medianes Alter bei 61 Jahren lag, waren bis auf 2 Patienten z.T. stark vorbehandelt (1 - 5 Chemothera-

pieprotokolle). 15 Patienten erhielten im Vorfeld eine platinhaltige Chemotherapie; darunter waren 6 oxaliplatinhaltige Chemotherapieprotokolle.

Den Patienten wurden neben den Proben zur Untersuchung der Pharmakokinetik noch 4 weitere Blutproben für die Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte in Leukozyten entnommen (0, 4, 24 und 48 h nach Infusionsbeginn). Bei 3 Patienten lagen auch Proben in einem Zeitraum von bis zu 500 h nach Infusionsbeginn (ca. 3 Wochen) vor. Die Addukte wurden bei 19 Patienten in zwei Behandlungszyklen untersucht. Diese lagen in einem zeitlichen Abstand von 3 Wochen und wiesen hinsichtlich der Oxaliplatininfusion nur einen Behandlungstag auf. Bei 5 Patienten konnten nur die Werte des ersten Zyklus bestimmt werden, da ein zweiter Zyklus nicht appliziert wurde.

In Abb. 3.33 sind die Platin-Nukleotid-Verhältnisse als Platin-Atome pro  $10^6$  Nukleotide gegen die theoretischen Abnahmezeitpunkte für beide Zyklen dargestellt. Neben den Einzelwerten (s. auch Anhang C) sind auch die Medianwerte, deren Beträge Tab. 3.34 entnommen werden können, angegeben.

Es zeigte sich, ähnlich wie bei den Patienten, die mit  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin behandelt wurden, dass bereits vor Beginn der Infusion im ersten Zyklus Platin-DNA-Addukte quantifiziert werden konnten. Der Grund dafür lag darin, dass die Mehrzahl der Patienten mit Platin (meist Cisplatin) vorbehandelt worden waren. Im zweiten Zyklus lagen die 0 h-Werte in einem ähnlichen Bereich; diesmal war das Vorhandensein der Addukte vermutlich auf die Applikation des ersten Zyklus zurückzuführen. Wie die Kurven der drei Patienten zeigen, bei denen Addukte bis zu 3 Wochen nach Infusionsbeginn (= 1 Zykluslänge) untersucht wurden (s. Abb. 3.35), konnten die Addukte des vorangegangenen Zyklus sicher nachgewiesen und quantifiziert werden.

Tab. 3.34 *Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Applikation von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin (Mediane mit Minimal- und Maximalwert; Zyklus I:  $n = 24$ , Zyklus II:  $n = 19$ )*

Zeit nach Infusionsbeginn [h]	Platin-Nukleotid-Verhältnisse [Pt-Atome : $10^6$ Nukleotide]	
	Zyklus I	Zyklus II
0	0,44 [< BG - 7,31]	0,31 [0,06 - 3,86]
4	4,14 [1,02 - 165]	3,92 [1,45 - 115]
24	4,10 [0,10 - 69,4]	3,85 [1,02 - 23,9]
48	1,87 [0,70 - 7,64]	2,55 [0,81 - 12,7]

< BG = Die Platinkonzentration in der DNA-Adduktprobe lag unter der Bestimmungsgrenze.



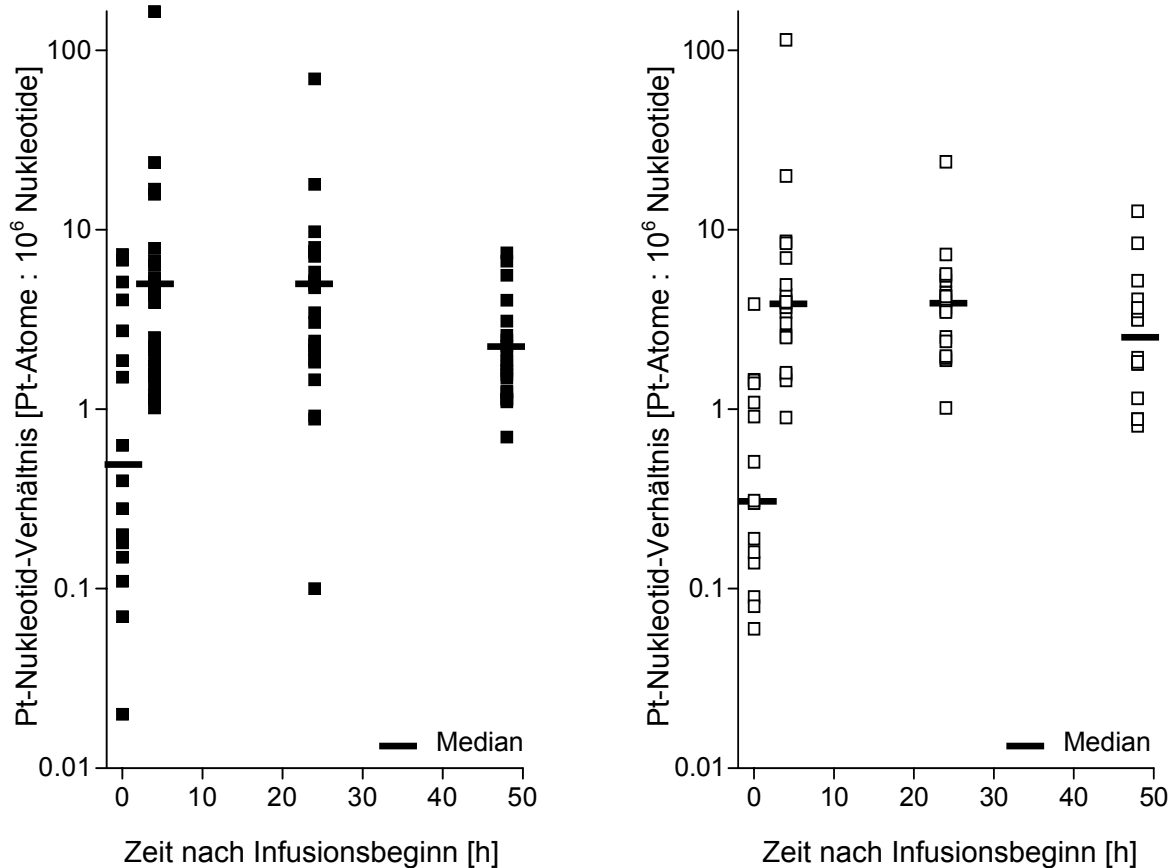


Abb. 3.33 Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Einzelwerte und Mediane; Zyklus I: ■, n = 24; Zyklus II: □, n = 19)

Wie auch den Verläufen der Platin-Nukleotid-Verhältnisse der beiden repräsentativen Patienten aus Abb. 3.34 entnommen werden kann, wurde in den meisten Fällen 4 h nach Infusionsbeginn das höchste Platin-Nukleotid-Verhältnis gemessen. Bei einigen Patienten (8 Patienten in Zyklus I, 2 Patienten in Zyklus II) wurde das Maximum erst nach 24 h beobachtet. Die Mediane der 48 h-Werte lagen mit 1,9 - 2,6 Pt-Atomen : 10<sup>6</sup> Nucleotide deutlich unter denen der 4 h- und 24 h-Werte (3,9 - 4,1 Pt-Atome : 10<sup>6</sup> Nucleotide), die in beiden Zyklen sehr ähnliche Medianwerte erreichten.

Die Variabilität der Platin-Nukleotid-Verhältnisse zu den vier Abnahmezeiten war auch bei dieser Untersuchung sehr hoch; minimaler und maximaler Wert differierten z.T. um den Faktor 100.

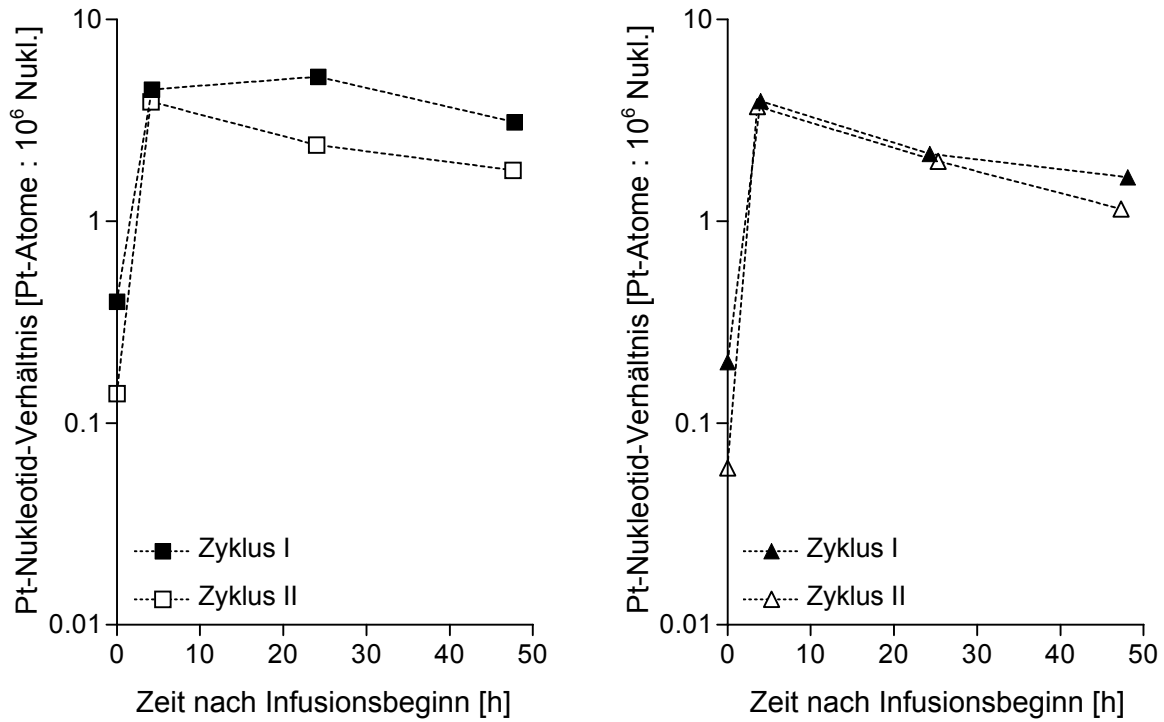


Abb. 3.34 Platin-Nukleotid-Verhältnisse von zwei repräsentativen Patienten nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Pat. 7: links; Pat. 8: rechts) in Zyklus I und II

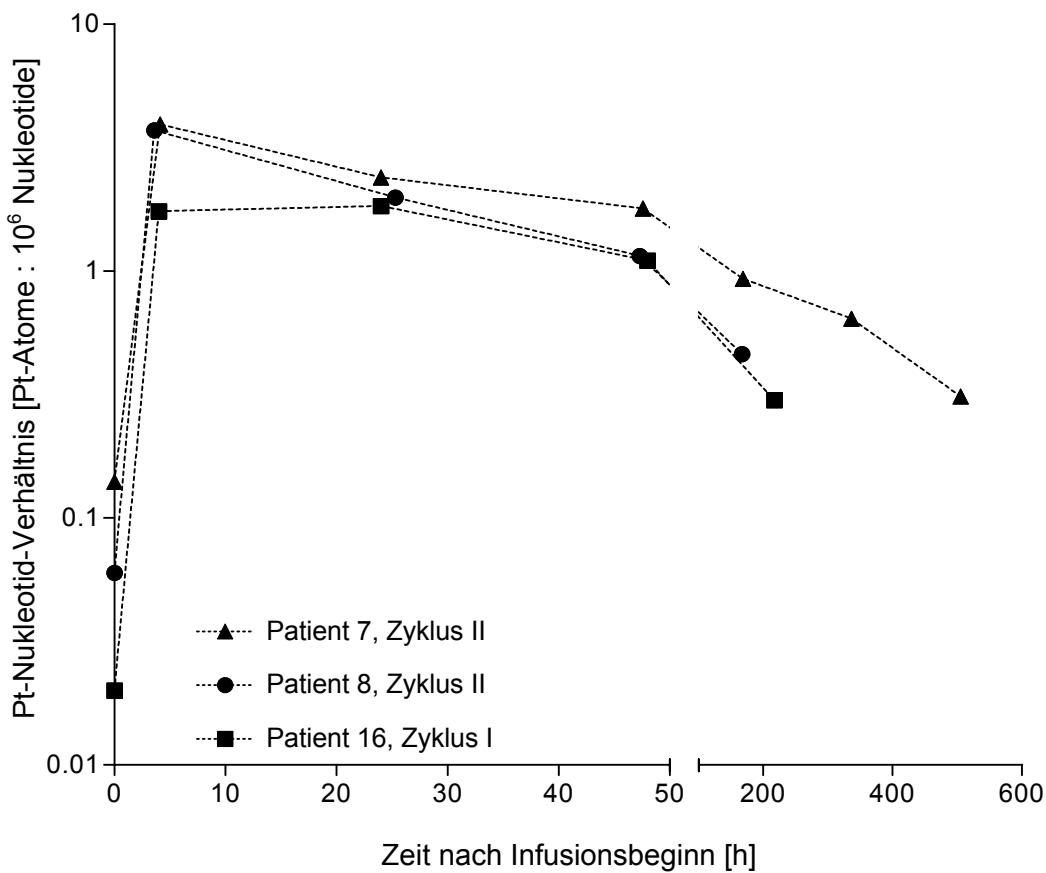


Abb. 3.35 Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> von drei Patienten (Nr. 7, 8, 16) bis zu 500 h nach Infusionsbeginn

Um die Platin-Nukleotid-Verhältnisse der Abnahmezeitpunkte und Zyklen miteinander zu vergleichen, wurden die Werte zunächst auf Normalverteilung geprüft. Bis auf die 0- und 24 h-Werte des zweiten Zyklus und die 48 h-Werte beider Zyklen wichen diese signifikant von der Normalverteilung ab. Daher wurden die Werte der einzelnen Abnahmezeitpunkte, die sich signifikant voneinander unterschieden [ $p = 0,009$  (Zyklus I),  $p < 0,001$  (Zyklus II); Friedman-Test] innerhalb eines Zyklus wie auch der verschiedenen Zyklen mittels *Wilcoxon*-Test für gepaarte, nicht-normalverteilte Stichproben und *t*-Test für normalverteilte gepaarte Stichproben miteinander verglichen<sup>196</sup>.

Es zeigte sich, dass im ersten Zyklus ein signifikanter Unterschied zwischen den 0 h- und 4 h- sowie den 24 h-Werten bestand. Außerdem unterschieden sich die 4 h-Werte signifikant von den 48 h-Werten und diese wiederum von den 24 h-Werten.

Im zweiten Zyklus zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Nullwerten und allen anderen Wertegruppen sowie zwischen den Werten 4 und 48 h nach Infusionsbeginn. Zwischen allen anderen Wertepaaren bestanden keine Unterschiede.

Für einen Vergleich der Werte beider Zyklen konnten nur die Daten von 19 Patienten herangezogen werden, da an 5 Patienten aus medizinischen Gründen kein zweiter Zyklus verabreicht wurde (Pat. 1, 2, 16, 19, 21). Beim Vergleich der Werte beider Zyklen wurden keine Unterschiede zwischen den Werten gleicher Abnahmezeitpunkte festgestellt. Ein Anstieg oder Abfall der Platin-Nukleotid-Verhältnisse von einem zum nächsten Zyklus war nicht erkennbar.

Für jeden Patienten wurde die Fläche unter der Adduktcurve ( $AUA_{0-24\text{ h}}$  und  $AUA_{0-48\text{ h}}$ ) berechnet. Die Ergebnisse für diese Parameter sind zusammen mit den maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnissen ( $A_{\max}$ ) in Tab. 3.35 dargestellt (Einzelwerte s. Anhang C).

Tab. 3.35 Maximale Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{\max}$ ) und Flächen unter der Adduktcurve ( $AUA_{0-24\text{ h}/0-48\text{ h}}$ ) nach Applikation von  $130\text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin (Mediane mit Minimal- und Maximalwert; Zyklus I:  $n = 21 - 24^a$ , Zyklus II:  $n = 15 - 18^{b,c}$ )

	$A_{\max}$ [Pt-Atome : $10^6$ Nukl.]	$AUA_{0-24\text{ h}}$ [Pt-Atome·h : $10^6$ Nukl.]	$AUA_{0-48\text{ h}}$ [Pt-Atome·h : $10^6$ Nukl.]
<b>Zyklus I</b>	6,09 [1,51 - 165]	102 [18,4 - 2696]	206 [50,7 - 3545]
<b>Zyklus II</b>	4,41 [2,54 - 115]	92,5 [40,2 - 1387]	185 [101 - 1501]

<sup>a,b</sup> Bei jeweils 3 Patienten in *Zyklus I (a)* und *Zyklus II (b)* konnte die  $AUA_{0-48\text{ h}}$  nicht bestimmt werden, da 48 h nach Infusionsbeginn keine Probenabnahme erfolgte.

<sup>c</sup> In Zyklus II konnten 18 von insgesamt 19 Patienten ausgewertet werden; bei Pat. 9 lag aufgrund eines Fehlers bei der Probenaufarbeitung der 24 h-Wert nicht vor.

Die medianen  $A_{\max}$ -Werte waren in beiden Zyklen vergleichbar; auch die  $AUA_{0-24\text{ h}}$  und die  $AUA_{0-48\text{ h}}$  zeigten ähnliche Mediane. Bei allen drei Parametern war zwar eine leichte Tendenz der Mediane zu niedrigeren Werten im zweiten Zyklus erkennbar; die statistische Überprüfung mit Hilfe des *Wilcoxon*-Tests auf Unterschiede der drei Parameter in den beiden Zyklen zeigte jedoch, dass sich die AUA wie auch die  $A_{\max}$  in Zyklus I nicht signifikant von den Werten des Zyklus II unterschieden.

### 3.4.3 Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle zwei Wochen

Im Rahmen der Hyperthermie-Studie wurde nicht nur die Platin-Pharmakokinetik, sondern auch die Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten bei 4 Patienten (Charakteristika s. Tab. 2.11 in Kap. 2.4.4) untersucht. Wie bereits in Kap. 3.3.3 ausführlich beschrieben, wurden die Patienten bei zwei aufeinander folgenden Applikationen von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin untersucht, wovon eine Gabe mit Hyperthermie kombiniert wurde. Für die Untersuchung der Adduktbildung wurden den Patienten jeweils 3 Blutproben abgenommen. Neben einer Probe vor Beginn der Oxaliplatininfusion und einer Probe 4 h nach Infusionsbeginn wurde bei 2 Patienten 24 h, bei den beiden anderen 48 h nach Infusionsbeginn eine dritte Probe entnommen. Für alle Patienten bis auf eine Ausnahme waren die zur Untersuchung herangezogenen Behandlungstage nicht die ersten, an denen Oxaliplatin verabreicht wurde.

So ist der Abb. 3.36, die die Platin-Nukleotid-Verhältnisse der einzelnen Patienten zeigt (Einzelergebnisse s. Anhang C), zu entnehmen, dass die Proben, die vor Beginn der Infusion entnommen wurden, bereits quantifizierbare Platin-DNA-Addukte enthielten. Dies war auf die früheren Gaben von Oxaliplatin zurückzuführen.

Bei Pat. 2 (Gabe I) und 4 (Gabe I und II) wurde der Maximalwert 4 h nach Infusionsbeginn beobachtet; bei den anderen beiden Patienten waren die Platin-Nukleotid-Verhältnisse 24 h nach Infusionsbeginn höher als der 4 h-Wert. Wo das Maximum tatsächlich lag, konnte anhand dieser drei Punkte, die den Verlauf der Platin-Nukleotidverhältnisse nur andeuten können, nicht festgestellt werden.

Der intraindividuelle Vergleich der Addukte nach den beiden Oxaliplatingaben für die Patienten 2 und 3 (oberer Teil der Abb. 3.36) zeigt, dass 2 h nach Infusionsende *mit* Hyperthermie niedrigere Werte erhalten wurden als *ohne* Anwendung von Hyperthermie. Bei Pat. 3 war nur der letzte Wert *mit* Hyperthermie höher als das entsprechende Platin-Nukleotid-Verhältnis *ohne* Hyperthermie. Pat. 2 konnte nicht beurteilt werden, da hier die Probenentnahme 24 h nach Infusionsbeginn nicht durchgeführt wurde.

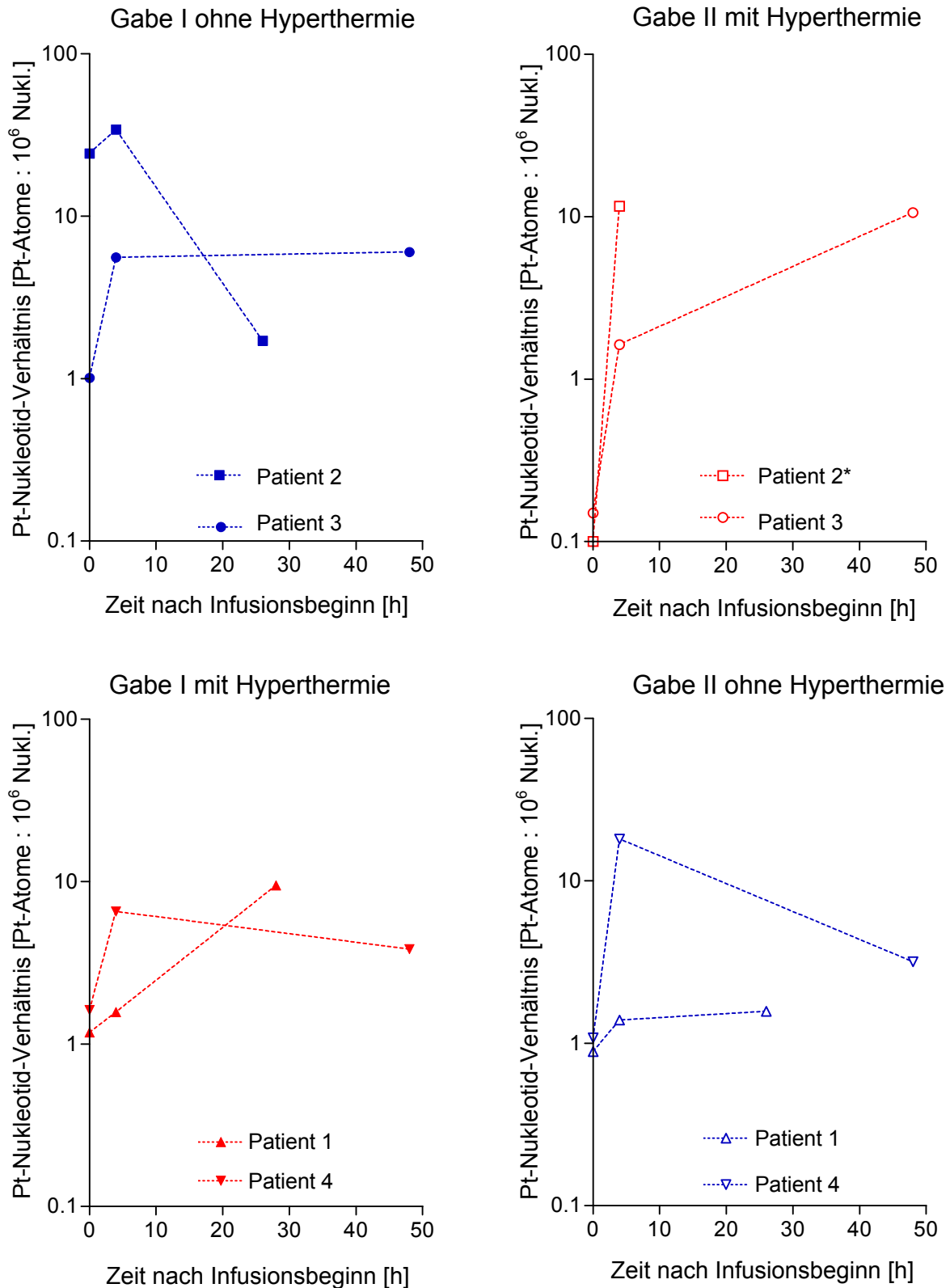


Abb. 3.36 *Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin mit und ohne Hyperthermie (\* 24 h nach Infusionsbeginn war die Probenentnahme nicht möglich)*

Bei Pat. 4 waren dieselben Tendenzen wie bei Pat. 3 festzustellen; 4 h nach Infusionsbeginn wurde ohne Hyperthermie ein deutlich höheres Platin-Nukleotid-Verhältnis beobachtet. 48 h nach Infusionsbeginn war dieses mit Hyperthermie etwas höher. Pat. 1 war der einzige, bei dem für alle Abnahmezeitpunkte mit Hyperthermie ein größeres Ausmaß der DNA-Platinierung festgestellt werden konnte.

Die Gesamtexposition wurde wie bei den zuvor beschriebenen Untersuchungen durch die AUA charakterisiert. Die individuellen AUA- und  $A_{\max}$ -Werte sind in Tab. 3.36 zusammengefasst.

*Tab. 3.36 Maximale Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{\max}$ ) und Flächen unter der Adduktkurve ( $AUA_{0-24\text{ h}/0-48\text{ h}}$ ) nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Einzelwerte)*

	$A_{\max}$ [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	$AUA_{0-24\text{ h} / 0-48\text{ h}}$ [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]
<b>Gabe I ohne Hyperthermie</b>		
Pat. 2	34,2	463 (0 - 24 h)
Pat. 3	6,01	268 (0 - 48 h)
<b>Gabe II mit Hyperthermie</b>		
Pat. 2	n.b.	n.b.
Pat. 3	10,6	272 (0 - 48 h)
<b>Gabe I mit Hyperthermie</b>		
Pat. 1	9,48	138 (0 - 24 h)
Pat. 4	6,54	245 (0 - 48 h)
<b>Gabe II ohne Hyperthermie</b>		
Pat. 1	1,57	37,1 (0 - 24 h)
Pat. 4	18,1	505 (0 - 48 h)

n.b. = nicht bestimmt wegen fehlender Probe bei 24 h nach Infusionsbeginn

Bei Pat. 3, der Gabe I ohne und Gabe II mit Hyperthermie erhielt, zeigte sich ein Anstieg des  $A_{\max}$ -Wertes aber keine Veränderung der AUA unter Hyperthermiebedingungen. Pat. 2 konnte aufgrund der fehlenden 24 h-Probe nicht beurteilt werden.

Für die Patienten 1 und 4, bei denen die erste Oxaliplatingabe mit Hyperthermie kombiniert wurde, zeigten sich unterschiedliche Tendenzen. Während bei Pat. 1 unter Hyper-

thermie höhere Maximal- und AUA-Werte gemessen wurden, war bei Pat. 4 eine Zunahme beider Parameter nach der 2. Gabe, die nicht mit Hyperthermie kombiniert wurde, gegenüber der ersten zu verzeichnen. Ob und welche Effekte die Hyperthermiebehandlung auf die Adduktbildung hat, lässt sich anhand dieser wenigen Werte nicht beurteilen.

#### 3.4.4 Vergleich der Platin-DNA-Adduktbildung für die verschiedenen Dosierungsschemata

Drei verschiedene Dosierungsschemata von Oxaliplatin (50, 85 und 130 mg/m<sup>2</sup>) wurden hinsichtlich der Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten charakterisiert. Neben den unterschiedlichen Dosierungen unterschieden sich diese auch in den zusätzlich applizierten Zytostatika. Für einen Vergleich der Adduktbildung nach Applikation der drei Schemata wurden die maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{\max}$ ) und die Flächen unter der Adduktcurve (AUA) zur Auswertung herangezogen.

Da in der Studie, in der 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin appliziert wurden, die letzte Blutabnahme 24 h nach Infusionsbeginn erfolgte, wurden die Schemata anhand der  $AUA_{0-24\text{ h}}$  verglichen. Die Daten aus der Hyperthermiestudie (85 mg/m<sup>2</sup>) wurden aufgrund der geringen Fallzahl, unterschiedlicher Probenentnahmezeiten und wegen des ungeklärten Einflusses der Hyperthermie nicht mit einbezogen.

Da durch den *Shapiro-Wilk*-Test eine signifikante Abweichung der  $AUA_{0-24\text{ h}}$  von der Normalverteilung nachgewiesen worden war, wurde für den Vergleich der Werte der U-Test nach *Mann und Whitney* herangezogen. Dabei zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied sowohl für die  $A_{\max}$ , als auch für die  $AUA_{0-24\text{ h}}$  zwischen den beiden Dosierungsschemata (50 mg/m<sup>2</sup> und 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin). Die Medianwerte (s. Tab. 3.33 und 3.35) der  $A_{\max}$  unterschieden sich in Zyklus I um den Faktor 3,7; in Zyklus II war die  $A_{\max}$  nach Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin 2,7mal so hoch. Für die AUA lagen die Unterschiede in derselben Größenordnung: für Zyklus I bei 3,5 und Zyklus II bei 2,6. Die verabreichten Regeldosen von 50 und 130 mg/m<sup>2</sup> unterschieden sich ebenfalls um Faktor 2,6.

Die  $A_{\max}$  und die  $AUA_{0-24\text{ h}}$  sind in Abb. 3.37 für die beiden Oxaliplatindosierungen getrennt nach Behandlungszyklus dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden für 130 mg/m<sup>2</sup> zwei Extremwerte für  $A_{\max}$  (Pat. 5, Zyklus I: 165 Pt-Atome : 10<sup>6</sup>Nukl.;

Pat. 18, Zyklus II: 115 Pt-Atome :  $10^6$  Nukl.) und  $AUA_{0-24\text{ h}}$  (Pat. 5, Zyklus I: 2696 Pt-Atome·h :  $10^6$  Nukl.; Pat. 18, Zyklus II: 1387 Pt-Atome h :  $10^6$  Nukl.) nicht angegeben.

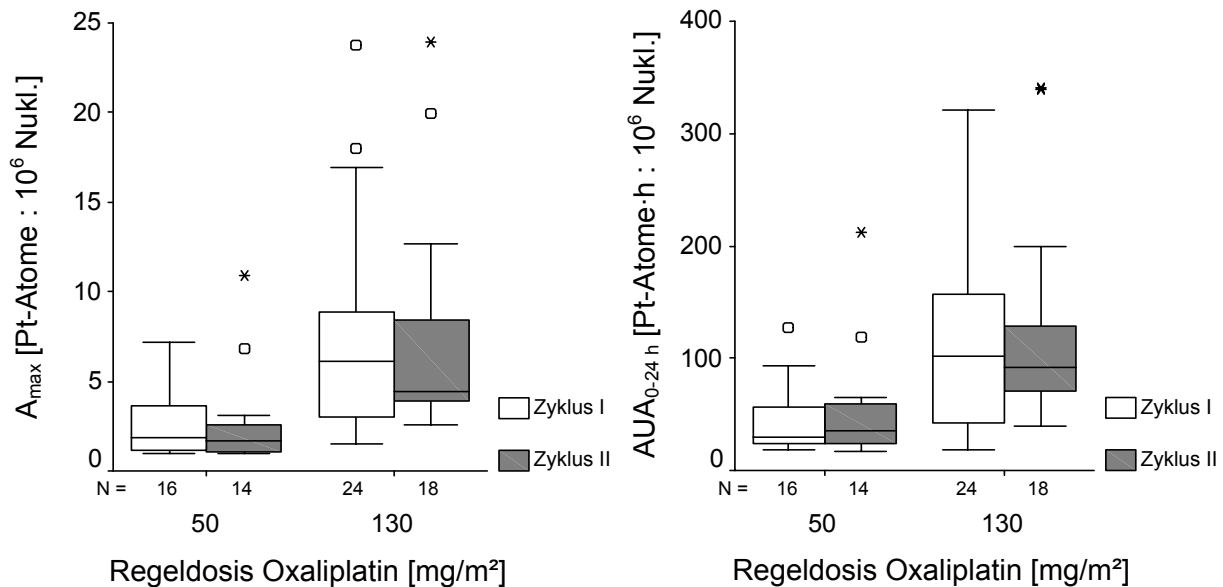


Abb. 3.37 Maximale Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{\max}$ ; links) und Flächen unter der Adduktcurve ( $AUA_{0-24\text{ h}}$ ; rechts) nach Applikation von 50 bzw. 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

### 3.4.5 Individuelle Einflussfaktoren auf die Platin-DNA-Adduktbildung

Ähnlich wie für die pharmakokinetischen Parameter wurden Alter, Geschlecht, Gewicht, Körperoberfläche und Nierenfunktion auf Zusammenhänge mit den Platin-Nukleotid-Verhältnissen 0, 4, 24 und z.T. 48 h nach Infusionsbeginn ( $A_{0\text{ h}/4\text{ h}/24\text{ h}/48\text{ h}}$  und den daraus berechneten pharmakodynamischen Parametern AUA und  $A_{\max}$  untersucht.

Die Auswertung wurde getrennt nach Applikationsschema (50 und 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin) und Behandlungszyklus vorgenommen.

Für die Patienten, die mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt worden waren, zeigte sich ein Zusammenhang der pharmakodynamischen Parameter mit dem Geschlecht.

Dieser war besonders im zweiten Zyklus stark ausgeprägt, in dem Männer signifikant höhere  $AUA_{0-24\text{ h}}$ ,  $AUA_{0-48\text{ h}}$ , und  $A_{\max}$  aufwiesen als Frauen. Im ersten Zyklus zeigte sich dieselbe Tendenz allerdings ohne Signifikanz. Auch für die Platin-Nukleotid-Verhältnisse, die 4 h nach Infusionsbeginn gemessen wurden ( $A_{4\text{ h}}$ ), wurde ein Unterschied hinsichtlich der DNA-Platinierung zwischen Männern und Frauen festgestellt.



Die unterschiedlichen  $AUA_{0-24\text{ h}}$ ,  $AUA_{0-48\text{ h}}$ ,  $A_{\text{max}}$  und  $A_{4\text{ h}}$  für Männer und Frauen sind in der folgenden Abb. 3.38 für beide Zyklen dargestellt. Die Patienten 5 (Zyklus I) und 18 (Zyklus II) hatten für alle Parameter sehr hohe Werte. Diese Extrema wurden in den Boxplots aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt ( $AUA_{0-24\text{ h}}$ : Pat. 5: 2696, Pat. 18: 1387 Pt-Atome·h :  $10^6$  Nukl.;  $AUA_{0-48\text{ h}}$ : Pat. 5: 3545, Pat. 18: 1501 Pt-Atome·h :  $10^6$  Nukl.;  $A_{\text{max}}$  und  $A_{4\text{ h}}$ : Pat. 5: 165, Pat. 18: 115 Pt-Atome :  $10^6$  Nukl.).

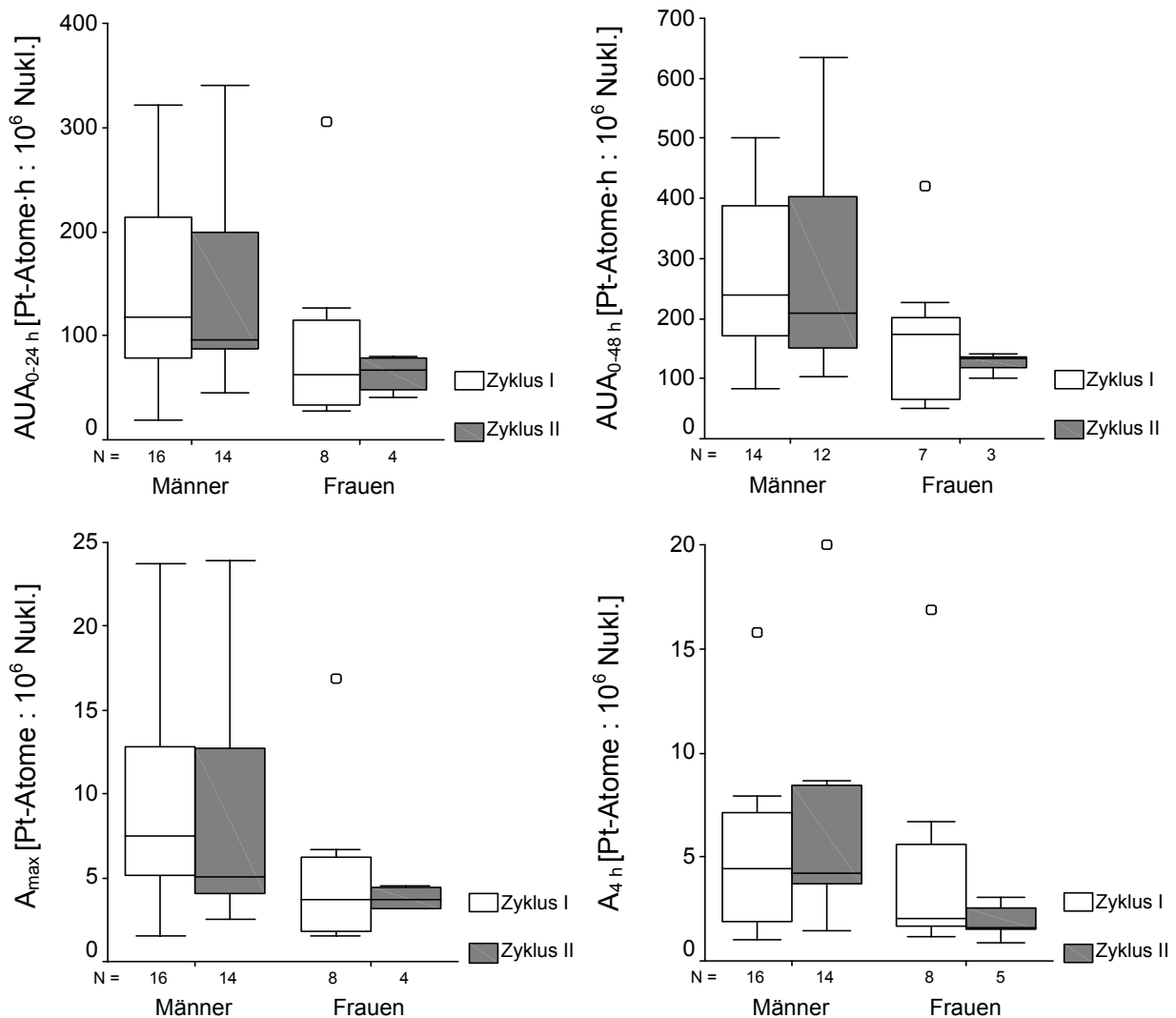


Abb. 3.38 Flächen unter der Addukturke (AUA<sub>0-24 h</sub> sowie AUA<sub>0-48 h</sub>) und Platin-Nukleotid-Verhältnisse (A<sub>max</sub> sowie A<sub>4 h</sub>) für Männer und Frauen nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

Die Mediane der Adduktparameter für Männer und Frauen und die zugehörigen p-Werte, die nach Durchführung des U-Tests nach *Mann und Whitney* für den Vergleich der Werte erhalten wurden, sind in Tab. 3.37 zusammengefasst.

Tab. 3.37 Vergleich der Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{max}$ ,  $A_{0h}$ ,  $A_{4h}$ ,  $A_{24h}$ ,  $A_{48h}$ ) und Flächen unter der Adduktcurve ( $AUA_{0-24h}$ ,  $AUA_{0-48h}$ ) zwischen Männern und Frauen nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Mediane mit Minimal- und Maximalwert sowie Signifikanzniveaus nach U-Test)

	Zyklus	Männer	Frauen	p-Wert
<b>A<sub>0h</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	0,96 [0,07 - 7,31]	0,20 [0,02 - 1,87]	0,234
	II	0,41 [0,06 - 3,86]	0,19 [0,08 - 1,46]	0,840
	I + II	0,46 [0,06 - 7,31]	0,20 [0,02 - 1,87]	0,254
<b>A<sub>4h</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	4,42 [1,02 - 165]	2,02 [1,14 - 16,9]	0,452
	II	4,22 [1,45 - 115]	1,60 [0,90 - 3,02]	0,005*
	I + II	4,35 [1,02 - 165]	1,88 [0,90 - 16,9]	0,022*
<b>A<sub>24h</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	4,99 [0,10 - 69,4]	2,44 [0,88 - 7,11]	0,206
	II	3,85 [1,02 - 23,9]	3,11 [1,88 - 4,48]	0,442
	I + II	4,14 [0,10 - 69,4]	2,49 [0,88 - 7,11]	0,064
<b>A<sub>48h</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	2,18 [0,70 - 7,46]	1,56 [1,10 - 5,59]	0,224
	II	2,68 [0,81 - 12,7]	2,55 [0,88 - 3,18]	0,599
	I + II	2,18 [0,70 - 12,7]	1,78 [0,88 - 5,59]	0,229
<b>A<sub>max</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	7,47 [1,51 - 165]	3,74 [1,54 - 16,9]	0,093
	II	5,06 [2,54 - 115]	3,74 [3,16 - 4,48]	0,127
	I + II	6,66 [1,51 - 165]	3,74 [1,54 - 16,9]	0,016*
<b>AUA<sub>0-24h</sub></b> [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	118 [18,4 - 2696]	62,5 [27,6 - 306]	0,120
	II	95,7 [44,9 - 1387]	66,8 [40,1 - 80,3]	0,025*
	I + II	103 [18,4 - 2696]	66,8 [27,6 - 306]	0,010*
<b>AUA<sub>0-48h</sub></b> [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	240 [81,9 - 3545]	173 [50,8 - 420]	0,128
	II	210 [103 - 1501]	134 [101 - 140]	0,048*
	I + II	229 [81,9 - 3545]	137 [50,8 - 420]	0,012*

\* kennzeichnet ein signifikantes Ergebnis

Um zu überprüfen, ob lediglich das größere Gewicht oder die Größe der männlichen Patienten die Menge der Addukte beeinflusste, wurden die  $AUA_{0-24h/0-48h}$ ,  $A_{max}$  und  $A_{4h}$  auf Gewicht oder Größe normiert und erneut miteinander verglichen. Es zeigten sich auch für die auf Gewicht oder Größe normierten Werte z.T. signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen, wie Tab. 3.38 entnommen werden kann.

Tab. 3.38 Vergleich von  $A_{max}$ , AUA und  $A_{4h}$  nach Normierung auf Gewicht oder Größe zwischen Männern und Frauen nach Applikation von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für beide Zyklen gemeinsam (Signifikanzniveaus nach U-Test)

	Normiert auf	p-Wert
$A_{4h}$	Größe [Pt-Atome : ( $10^6$ Nukl.·m)]	0,028*
	Gewicht [Pt-Atome : ( $10^6$ Nukl.·kg)]	0,066
$A_{max}$	Größe [Pt-Atome : ( $10^6$ Nukl.·m)]	0,025*
	Gewicht [Pt-Atome : ( $10^6$ Nukl.·kg)]	0,042*
$AUA_{0-24h}$	Größe [Pt-Atome·h : ( $10^6$ Nukl.·m)]	0,024*
	Gewicht [Pt-Atome·h : ( $10^6$ Nukl.·kg)]	0,077
$AUA_{0-48h}$	Größe [Pt-Atome·h : ( $10^6$ Nukl.·m)]	0,026*
	Gewicht [Pt-Atome·h : ( $10^6$ Nukl.·kg)]	0,045*

\* kennzeichnet ein signifikantes Ergebnis

Hinsichtlich der unterschiedlichen Adduktbildung bei Männern und Frauen zeigte sich für die mit  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin behandelten Patienten dieselbe Tendenz wie für die zuvor untersuchten Patienten. Die  $A_{4h}$ -Werte waren für Männer [1,53 (0,98 - 10,9) Pt-Atome :  $10^6$  Nukleotide] etwas höher als für Frauen [1,14 (0,64 - 4,20)]; allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant ( $p = 0,114$ ).

Für eine gemeinsame Bewertung wurden die Parameter zunächst dosisnormiert. Außerdem wurde überprüft, ob die patientenindividuellen Faktoren der beiden Gruppen unterschiedlich waren. Die beiden Patientengruppen unterschieden sich signifikant hinsichtlich des mittleren Alters ( $50 \text{ mg/m}^2$ : 65 Jahre;  $130 \text{ mg/m}^2$ : 56 Jahre) und der Nierenfunktion, die bei den älteren Patienten, die mit  $50 \text{ mg/m}^2$  behandelt worden waren, geringer war als bei den durchschnittlich jüngeren Patienten, die  $130 \text{ mg/m}^2$  erhielten. Der Unterschied hinsichtlich des Ausmaßes der Adduktbildung zwischen Männern und Frauen war für  $A_{max}$ ,  $AUA_{0-24h}$  und  $A_{4h}$  bei der gemeinsamen Auswertung der beiden Zyklen signifikant, wie Tab. 3.39 entnommen werden kann.

Tab. 3.39 Vergleich der dosisnormierten  $A_{4\text{ h}}$ ,  $A_{\text{max}}$  und  $AUA_{0-24\text{ h}}$  zwischen Männern und Frauen für beide Patientenkollektive nach Applikation von 50 bzw. 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Mediane mit Minimal- und Maximalwert sowie Signifikanzniveaus nach U-Test)

	Zyklus	Männer	Frauen	p-Wert
$A_{4\text{ h}}$ [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl./mg/m <sup>2</sup> ]	I + II	0,03 [0,01 - 1,27]	0,02 [0,01 - 0,13]	0,004*
$A_{\text{max}}$ [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl./mg/m <sup>2</sup> ]	I + II	0,04 [0,01 - 1,27]	0,02 [0,01 - 0,13]	0,011*
$AUA_{0-24\text{ h}}$ [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl./mg/m <sup>2</sup> ]	I + II	0,80 [0,14 - 20,7]	0,52 [0,21 - 2,35]	0,010*

\* kennzeichnet ein signifikantes Ergebnis

Auch nach Normierung dieser Werte auf Gewicht, Körpergröße oder KOF blieben die signifikanten Unterschiede bestehen ( $p = 0,005 - 0,037$ ). Eine Ausnahme bildete die auf die Dosis und auf das Körpergewicht normierte  $AUA_{0-24\text{ h}}$ ; bei dieser war der Unterschied zwischen den Geschlechtern mit  $p = 0,072$  nicht mehr signifikant.

Alle anderen untersuchten Parameter zeigten sowohl nach Applikation von 50 als auch 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin keine Zusammenhänge mit der Platin-DNA-Adduktbildung.

### 3.5 Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern

Nach Analyse der Konzentrations-Zeit-Verläufe und der Platin-DNA-Adduktbildung wurden die ermittelten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter auf Zusammenhänge geprüft. Dabei wurden hinsichtlich der Addukte die maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{\text{max}}$ ) und die Flächen unter der Adduktcurve (AUA) herangezogen. Bei den pharmakokinetischen Parametern wurden die maximale Konzentration im Ultrafiltrat sowie die AUC im Ultrafiltrat ausgewertet. Da die AUA mit Hilfe der Trapezregel bestimmt worden war, wurde für die Ultrafiltrat-AUC ebenfalls nur die kompartimentunabhängig bestimmte  $AUC_{0-24\text{ h}}$  bzw.  $AUC_{0-48\text{ h}}$  herangezogen.

Die Parameter wurden nach Prüfung auf Normalverteilung sowohl getrennt nach applizierter Regeldosis als auch zusammen auf Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern ( $C_{\text{max}}$  vs.  $A_{\text{max}}$  und AUC vs. AUA bzw.  $A_{\text{max}}$ ) durch

Korrelationsanalyse geprüft. Da die Parameter  $C_{\max}$  und AUC im Ultrafiltrat sowie  $A_{\max}$  und AUA zwischen den beiden Behandlungszyklen (50 und 130 mg/m<sup>2</sup>) keine signifikanten Unterschiede zeigten, wurden für eine Prüfung des Zusammenhangs zwischen den korrespondierenden Größen die Werte beider Zyklen benutzt.

Bei der separaten Auswertung der Daten getrennt nach Oxaliplatinosis wurden keine Zusammenhänge zwischen den vier ausgewählten Parametern gefunden.

Für beide Gruppen zusammen zeigten sich immerhin schwache Zusammenhänge, die alle signifikant waren; die erhaltenen Korrelationskoeffizienten mit den zugehörigen p-Werten sind in Tab. 3.40 zusammengefasst.

Tab. 3.40 Korrelationsausmaß und Signifikanzniveaus zwischen  $C_{\max,UF}$ ,  $AUC_{UF,0-24 h}$ ,  $A_{\max}$  und  $AUA_{0-24 h}$

	$A_{\max}$ [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	$AUA_{0-24 h}$ [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]
$C_{\max, UF}$ [µg/mL]	$r = 0,359$ ; $p < 0,001^*$	$r = 0,337$ ; $p < 0,001^*$
$AUC_{UF,0-24 h}$ [µg·h/mL]	$r = 0,383$ ; $p < 0,001^*$	$r = 0,388$ ; $p < 0,001^*$

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

Der stärkste Zusammenhang zeigte sich zwischen der AUC im Ultrafiltrat und der AUA; dieser wird durch Abb. 3.39 veranschaulicht.

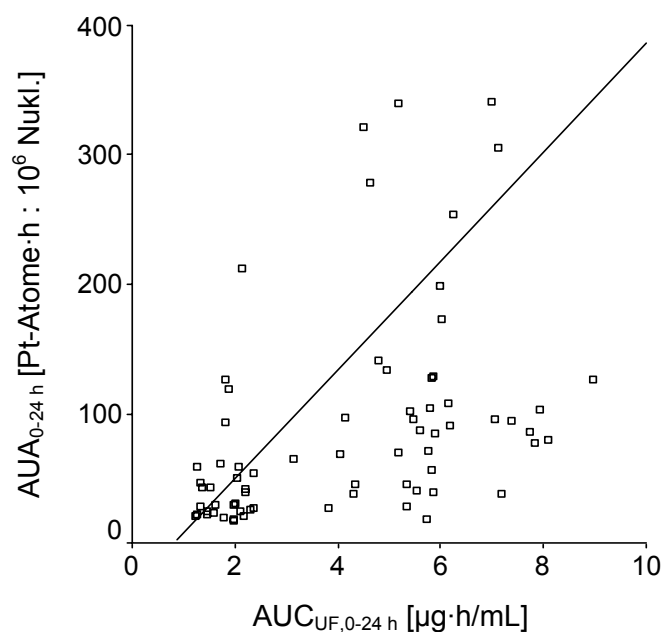


Abb. 3.39 Beziehung zwischen  $AUA_{0-24 h}$  und  $AUC_{UF,0-24 h}$

Die Wertepaare für zwei Patienten mit der Dosierung 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin wurden wegen extrem hoher AUA-Werte nicht dargestellt (Pat. 5: 2696 Pt-Atome·h : 10<sup>6</sup> Nukleotide / 7,47 µg·h/mL und Pat. 18: 1387 Pt-Atome·h : 10<sup>6</sup> Nukleotide / 5,25 µg·h/mL).

Bei der Untersuchung der möglichen Einflussfaktoren auf die Platinpharmakokinetik und die Platin-DNA-Adduktbildung zeigte sich, dass sich sowohl die pharmakokinetischen als auch die pharmakodynamischen Parameter zwischen Männern und Frauen unterschieden (s. Kap. 3.3.5 und 3.4.5).

Während die AUC im Ultrafiltrat bei den Frauen höher bzw. die Platin-clearance aus dieser Matrix geringer war als bei den Männern, erreichten die Männer höhere AUA-Werte als Frauen.

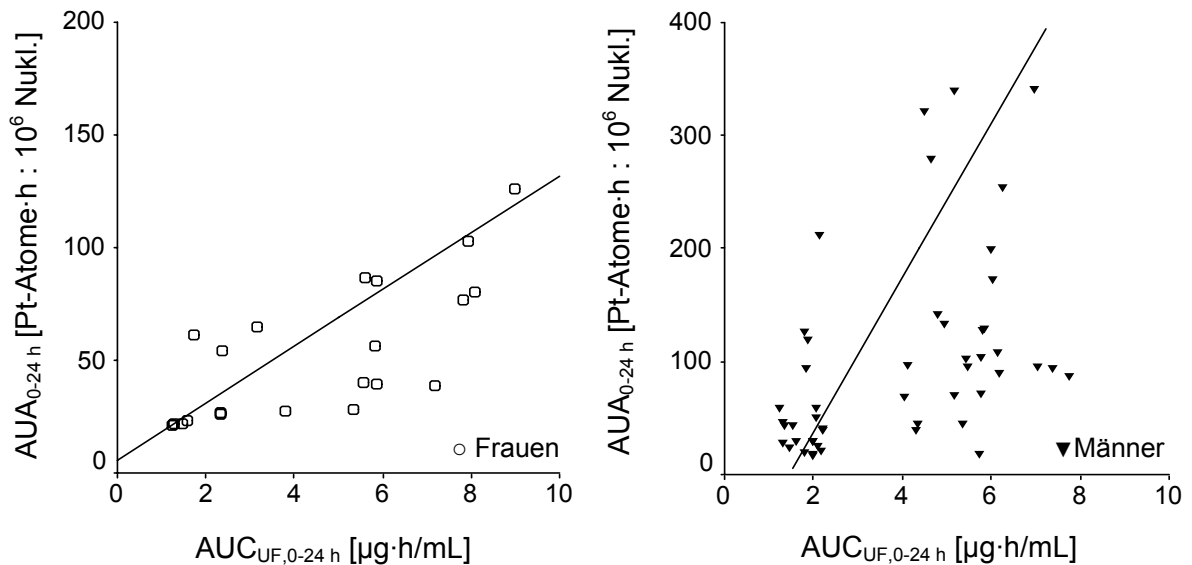
Daher wurde der Zusammenhang zwischen pharmakokinetischen Parametern im Ultrafiltrat ( $C_{\max,UF}$ ,  $AUC_{UF,0-24\ h}$ ) und der Platin-DNA-Adduktbildung ( $A_{\max}$ ,  $AUA_{0-24\ h}$ ) für die Patienten, die 50 oder 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin erhalten hatten, auch getrennt nach Geschlechtern untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zusammenhänge zwischen  $C_{\max,UF}$  und  $A_{\max}$  sowie  $AUC_{UF,0-24\ h}$  und  $AUA_{0-24\ h}$  bzw.  $A_{\max}$  bei Frauen wesentlich stärker ausgeprägt waren als bei Männern (s. Tab. 3.41).

Tab. 3.41 Korrelationsausmaß und Signifikanzniveaus zwischen  $C_{\max,UF}$ ,  $AUC_{UF,0-24\ h}$ ,  $A_{\max}$  und  $AUA_{0-24\ h}$  für Frauen und Männer

	$A_{\max}$ [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	$AUA_{0-24\ h}$ [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]
<b>Frauen</b>		
$C_{\max,UF}$ [µg/mL]	$r = 0,495$ ; $p = 0,002^*$	$r = 0,467$ ; $p = 0,003^*$
$AUC_{UF,0-24\ h}$ [µg·h/mL]	$r = 0,619$ ; $p < 0,001^*$	$r = 0,645$ ; $p < 0,001^*$
<b>Männer</b>		
$C_{\max,UF}$ [µg/mL]	$r = 0,385$ ; $p < 0,001^*$	$r = 0,322$ ; $p = 0,001^*$
$AUC_{UF,0-24\ h}$ [µg·h/mL]	$r = 0,378$ ; $p < 0,001^*$	$r = 0,394$ ; $p < 0,001^*$

Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

Der stärkste Zusammenhang wurde, wie auch schon bei der gemeinsamen Auswertung der beiden Gruppen, für Männer und Frauen zwischen der  $AUC_{UF,0-24\text{ h}}$  und der  $AUA_{0-24\text{ h}}$  beobachtet. Das unterschiedliche Ausmaß der Korrelation zwischen diesen beiden Parametern für Frauen ( $r = 0,645$ ;  $p < 0,001$ ) und Männer ( $r = 0,394$ ;  $p < 0,001$ ) wird in Abb. 3.40 veranschaulicht.



**Abb. 3.40** *Beziehung zwischen  $AUA_{0-24\text{ h}}$  und  $AUC_{UF,0-24\text{ h}}$  für Frauen (links) und Männer (rechts). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind 3 Extremwerte nicht dargestellt: Frauen: 306 Pt-Atome·h : 10<sup>6</sup> Nukleotide / 7,11 µg·h/mL; Männer: Pat. 5: 2696 Pt-Atome·h : 10<sup>6</sup> Nukleotide / 7,47 µg·h/mL und Pat. 18: 1387 Pt-Atome·h : 10<sup>6</sup> Nukleotide / 5,25 µg·h/mL*

### 3.6 Toxizität

Von allen untersuchten Patienten wurde die therapieassoziierte Toxizität gemäß der in Kap. 2.6.4 beschriebenen Kriterien dokumentiert. Dabei wurden der Schwerpunkt auf die Hämato-, Hepato-, Nephro- und Neurotoxizität gelegt.

Hämato-, nephro- und hepatotoxische Effekte wurden mit Hilfe der dokumentierten Laborparameter erfasst und anhand der Common-Toxicity-Criteria des National Cancer Institute evaluiert (s. Anhang A).

Zur Bewertung der oxaliplatin-spezifischen Neuropathie, die durch Befragung der Patienten und der behandelnden Onkologen erfasst wurde, wurde die von Lévi et al.<sup>187</sup> entwickelte Skala herangezogen.

Da der Einfluss der Hyperthermie auf die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Parameter aufgrund der geringen Patientenzahl nicht geklärt werden konnte, wurden die Daten dieser Patienten für die weiteren Auswertungen, bei denen Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern einerseits und klinischen Effekten andererseits untersucht werden sollten, nicht berücksichtigt. Insgesamt wurde die Kombination aus Chemotherapie und Hyperthermie gut vertragen. Bei allen 43 Patienten, die damit behandelt worden waren, wurde Toxizität des Schweregrads 4 gar nicht und des Schweregrads 3 nur selten beobachtet. Dabei traten die unerwünschten Wirkungen (Hämatotoxizität, gastrointestinale Beschwerden und Neurotoxizität) in Zyklen mit Hyperthermie genauso häufig auf wie unter normothermen Bedingungen<sup>195</sup>.

#### 3.6.1 Wöchentliche Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

Im Rahmen der Untersuchung, in der die Patienten mit 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt wurden, konnten 6 Patienten hinsichtlich der therapieassoziierten Toxizität ausgewertet werden.

Die Neurotoxizität wurde in der UNIVERSITÄTSKLINIK HALLE im Gegensatz zu den anderen an der Untersuchung beteiligten Kliniken nach der Skala der WHO evaluiert. Nach dieser werden Parästhesien und/oder verminderte Reflexe mit dem Toxizitätsgrad 1 bewertet; schweren Parästhesien wird der Grad 2 zugeordnet. Grad 3 entspricht intolerablen Par- und Dysästhesien und Grad 4 der Paralyse. In der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Skalierung, die in Kap. 2.6.4 beschrieben wurde, wurde der Grad 1 eben-



falls leichteren Parästhesien zugeordnet, die nur kurze Zeit andauerten. Schwere Parästhesien wurden allerdings mit Grad 3, und nicht wie nach der WHO-Skala mit Grad 2, bewertet. In der folgenden Tab. 3.42, in der die Häufigkeiten, mit der unerwünschte Wirkungen auftraten, zusammengefasst sind, wurde für die Neurotoxizität die WHO-Skala verwendet.

Tab. 3.42 Anzahl der Patienten mit unerwünschten Wirkungen nach Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (n = 6)

Schweregrad	0	1	2	3	4
<b>Hämatotoxizität</b>					
Hämoglobin	6	-	-	-	-
Leukozyten	6	-	-	-	-
Thrombozyten	6	-	-	-	-
<b>Nephrotoxizität</b>					
Serumkreatinin	5	1	-	-	-
<b>Hepatotoxizität</b>					
GOT	4	1	1	-	-
GPT	2	3	1	-	-
AP	3	2	1	-	-
Bilirubin ges.	1	-	5	-	-
<b>Neurotoxizität</b>					
	4	2	-	-	-

- = Toxizitätsgrad wurde nicht beobachtet

Die Patienten vertrugen die verabreichte Therapie sehr gut. Bei den 6 auswertbaren Patienten kam es nicht zu unerwünschten Wirkungen des Schweregrads 3 oder 4. Grad 2 als höchster beobachteter Toxizitätsgrad trat nur für die Hepatotoxizität auf. Neurotoxizität wurde lediglich in ihrer leichteren Form beobachtet, die mit WHO-Grad 1 bewertet wurde. Dieser Schweregrad war mit dem Grad 1 der im Rahmen der anderen Studien verwendeten Neurotoxizitätsskala nach *Lévi et al.* vergleichbar.

### 3.6.2 Wöchentliche Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

Im Rahmen der Studie "Pharmakologische Untersuchung zu pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Unterschieden von Oxaliplatin in der First- und Second-Line-Therapie" konnten 16 Patienten in Zyklus I und 13 in Zyklus II hinsichtlich der therapie-assoziierten Toxizität evaluiert werden.

Eine Übersicht über die innerhalb der ersten beiden Zyklen maximal beobachtete Toxizität gibt Tab. 3.43.

Tab. 3.43 Anzahl der Patienten mit unerwünschten Wirkungen nach Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin in Zyklus I (n = 16) und Zyklus II (n = 13)

Schweregrad	Zyklus I					Zyklus II				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<b>Hämatotoxizität</b>										
Hämoglobin	12	4	-	-	-	11	2	-	-	-
Leukozyten	14	2	-	-	-	9	3	1	-	-
Thrombozyten	15	1	-	-	-	11	2	-	-	-
<b>Nephrotoxizität</b>										
Serumkreatinin	9	7	-	-	-	8	5	-	-	-
<b>Hepatotoxizität</b>										
GOT	10	3	3	-	-	7	5	1	-	-
GPT	6	6	3	1	-	2	9	2	-	-
AP	7	5	3	1	-	8	2	3	-	-
Bilirubin ges.	9	7	-	-	-	10	3	-	-	-
<b>Neurotoxizität</b>	1	8	5	-	2	-	4	6	1	2

- = Toxizitätsgrad wurde nicht beobachtet

Insgesamt zeigte sich, dass die Therapie von den Patienten gut vertragen wurde. Unerwünschte Wirkungen der Schweregrade 3 und 4 wurden insgesamt nur viermal in Zyklus I und dreimal in Zyklus II beobachtet.

Hinsichtlich der *Hämatotoxizität* wurde im ersten Zyklus in der Mehrheit der Fälle keine Toxizität beobachtet; nur in 7 Fällen insgesamt kam es zu hämatotoxischen Effekten. Im

zweiten Zyklus war die Hämatotoxizität geringfügig höher, während die Ausprägung der *Nephrotoxizität* in beiden Zyklen in etwa gleich war. Es wurde jeweils bei der Hälfte der Patienten der Schweregrad 1 erreicht; alle anderen hatten keine unerwünschten Wirkungen bzgl. der Nierenfunktion. Etwas häufiger wurden höhere Schweregrade (1 und 2) bei der *Hepatotoxizität* erhalten.

Die vorherrschende Toxizität waren *neurotoxische* Wirkungen, die bis auf einen Patienten im ersten Zyklus bei allen Patienten auftrat. Bei den meisten Patienten wurden Parästhesien und Dysästhesien mit oder ohne Einwirkung von Kälte beobachtet, die mit den Schweregraden 1 und 2 bewertet wurden. Bei zwei Patienten in Zyklus I und drei Patienten in Zyklus II kam es zu schweren Parästhesien des Grads 3 bzw. zu neuropsensorischen Wirkungen mit Funktionseinschränkungen (Grad 4).

### **3.6.3 Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen**

Nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin wurden insgesamt 24 Patienten hinsichtlich der therapieassoziierten Toxizität evaluiert. Für Zyklus II war dies nur bei 19 Patienten möglich, da bei 5 Patienten aus medizinischen Gründen keine weitere Oxaliplatingabe erfolgte. Es wurde jeweils die maximal beobachtete Toxizität innerhalb des ersten bzw. der ersten beiden Zyklen registriert. Die Daten dieser Patienten, die in Tab. 3.44 dargestellt sind, wurden für die weitere Analyse der erhobenen pharmakodynamischen Ergebnisse herangezogen.

Eine Auswahl dieser Patienten, die alle nicht an einem Tumor des Gastrointestinaltrakts litten, wurde nur hinsichtlich der Pharmakokinetik bewertet. Die Daten für die Toxizität dieser Patienten sind in Tab. 3.45 zusammengestellt.

Betrachtet man alle 24 Patienten, so zeigte sich eine gute Verträglichkeit der Therapie hinsichtlich der untersuchten Hämato-, Hepato- und Nephrotoxizität. Insgesamt wurde nur in vier (Zyklus I) bzw. drei Fällen (Zyklus II) unerwünschte Wirkungen der Schweregrade 3 und 4 beobachtet.

Im ersten Zyklus waren hämatotoxische Effekte äußerst selten; im zweiten Zyklus wurden diese dagegen etwas häufiger beobachtet. Die Ausprägung der Toxizität war aber in der Mehrzahl der Fälle mit Grad 1 nur gering.

Hinsichtlich der *Nephrotoxizität* waren Häufigkeit und Schweregrad in beiden Zyklen vergleichbar; es wurde in beiden Zyklen zusammen nur einmal der Grad 2 als schwerste Nephrotoxizität erreicht; auch Grad 1 trat insgesamt nur in 5 Fällen auf.

*Hepatotoxische* Effekte traten im Vergleich zur Hämato- und Nephrotoxizität häufiger auf. Schweregrad und Häufigkeit waren in beiden Zyklen in etwa vergleichbar; Toxizität der Grade 3 und 4 traten in beiden Zyklen jeweils in zwei Fällen auf. Ansonsten waren die unerwünschten Effekte, die am häufigsten Grad 1 aufwiesen, eher moderat ausgeprägt.

Wie schon nach Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> trat die *Neurotoxizität* am häufigsten auf. Alle Patienten erfuhren neurosensorische Wirkungen, die bei der Mehrzahl der Patienten mit Grad 1 bewertet wurden. Bei einigen waren die unerwünschten Wirkungen schwerwiegender (längere Dauer und Intensität der Beschwerden) und erreichten bei einem Patienten in Zyklus II Grad 4.

Tab. 3.44 Anzahl der Patienten, die für die pharmakodynamische Analyse herangezogen wurden, mit unerwünschten Wirkungen nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin in Zyklus I (n = 24) und Zyklus II (n = 19)

Schweregrad	Zyklus I					Zyklus II				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<b>Hämatotoxizität</b>										
Hämoglobin	20	1	3	-	-	14	3	2	-	-
Leukozyten	21	2	-	1	-	12	7	-	-	-
Granulozyten	23	-	1	-	-	15	4	-	-	-
Thrombozyten	22	1	-	1	-	17	-	1	1	-
<b>Nephrotoxizität</b>										
Serumkreatinin	21	3	-	-	-	16	2	1	-	-
<b>Hepatotoxizität</b>										
GOT	10	12	2	-	-	8	9	2	-	-
GPT	14	8	2	-	-	12	5	2	-	-
AP	6	13	4	1	-	4	11	3	1	-
Bilirubin ges.	18	4	1	1	-	16	1	1	-	1
<b>Neurotoxizität*</b>										
	-	16	5	1	-	-	11	5	1	1

- = Toxizitätsgrad wurde nicht beobachtet

\* Bei zwei Patienten in Zyklus I und bei einem Patienten in Zyklus II nicht evaluiert

Vergleicht man die Auswahl von 14 Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit pharmakokinetisch ausgewertet wurden, hinsichtlich der Toxizität (s. Tab. 3.45), so zeigt sich,

dass diese in Schweregrad und Häufigkeit in etwa der Gesamtheit aller 24 Patienten entsprach.

Tab. 3.45 Anzahl der Patienten, die für die pharmakokinetische Analyse herangezogen wurden, mit unerwünschten Wirkungen nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin in Zyklus I (n = 14) und Zyklus II (n = 11)

Schweregrad	Zyklus I					Zyklus II				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<b>Hämatotoxizität</b>										
Hämoglobin	11	1	2	-	-	7	2	2	-	-
Leukozyten	12	2	-	-	-	7	4	-	-	-
Granulozyten	14	-	-	-	-	8	3	-	-	-
Thrombozyten	13	1	-	-	-	10	-	1	-	-
<b>Nephrotoxizität</b>										
Serumkreatinin	12	2	-	-	-	8	2	1	-	-
<b>Hepatotoxizität</b>										
GOT	7	6	1	-	-	4	5	2	-	-
GPT	8	4	2	-	-	7	3	1	-	-
AP	3	9	2	-	-	2	6	2	1	-
Bilirubin ges.	10	3	-	1	-	8	1	1	-	1
<b>Neurotoxizität*</b>										
	-	8	3	1	-	-	5	3	1	1

- = Toxizitätsgrad wurde nicht beobachtet

\* Bei 2 Patienten in Zyklus I und bei einem Patienten in Zyklus II nicht evaluiert

### 3.7 Tumoransprechen

Bei allen untersuchten Patienten wurde das Ansprechen des Tumors auf die verabreichte Therapie durch die behandelnden Onkologen gemäß den in Kap. 2.6.5 beschriebenen Kriterien bewertet.

Da der Einfluss der Hyperthermie auf die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Parameter aufgrund der geringen Patientenzahlen nicht geklärt werden konnte, wurden die Daten dieser Patienten für die weiteren Auswertungen hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern einerseits und klinischen

Effekten andererseits nicht berücksichtigt. Insgesamt betrug die Ansprechrate in dieser Studie, in der 44 Patienten mit der Kombination aus Chemotherapie und Hyperthermie behandelt worden waren, 20 % mit 2 kompletten (CR) und 6 partiellen Remissionen (PR). 56 % der Patienten erfuhren eine Stabilisierung (SD), während bei den übrigen 22 % die Erkrankung weiter fortschritt (PD)<sup>195</sup>.

### 3.7.1 Wöchentliche Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

Drei der mit 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelten Patienten konnten hinsichtlich des Tumoransprechens bewertet werden. Bei den anderen lagen die entsprechenden Daten nicht vor. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.46 zusammengefasst.

*Tab. 3.46 Tumoransprechen nach wöchentlicher Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (n = 3)*

<b>Ansprechen</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>
Komplette Remission (CR)	0
Partielle Remission (PR)	1
Stable Disease (SD)	1
Progressive Disease (PD)	1

### 3.7.2 Wöchentliche Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

Von 16 Patienten konnten 14 hinsichtlich des Tumoransprechens bewertet werden. Von den übrigen zwei Patienten lagen die Informationen zum Ansprechen nicht vor. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.47 dargestellt.

*Tab. 3.47 Tumoransprechen nach wöchentlicher Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (n = 14)*

<b>Ansprechen</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>
Komplette Remission (CR)	0
Partielle Remission (PR)	2
Stable Disease (SD)	7
Progressive Disease (PD)	5

### 3.7.3 Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen

Die Bewertung des Tumoransprechens erfolgte im Rahmen dieser Studie jeweils am Ende des zweiten Zyklus. Da bei 5 Patienten nur ein Zyklus appliziert wurde, konnte das Ansprechen durch die Onkologen nicht unter vergleichbaren Bedingungen evaluiert werden. Bei zwei weiteren Patienten war während der laufenden Untersuchung das Staging durch die Onkologen noch nicht erfolgt. Somit konnten Daten von insgesamt 17 Patienten (s Tab. 3.48) ausgewertet werden.

*Tab. 3.48 Tumoransprechen der Patienten, die für die pharmakodynamische Analyse herangezogen wurden, nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (n = 17)*

<b>Ansprechen</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>
Komplette Remission (CR)	0
Partielle Remission (PR)	1
No Change (NC)	
Minor Response (MR)	4
Stable Disease (SD)	4
Progressive Disease (PD)	8

Die Daten der Patienten hinsichtlich des Tumoransprechens, deren Pharmakokinetik im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet wurde, sind in Tab. 3.49 zusammengefasst. Es lagen nur Informationen von 9 der 14 Patienten vor, da bei 3 Patienten kein zweiter Zyklus appliziert wurde und bei 2 Patienten das Staging noch nicht erfolgt war.

*Tab. 3.49 Tumoransprechen der Patienten, die für die pharmakokinetische Analyse herangezogen wurden, nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (n = 9)*

<b>Ansprechen</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>
Komplette Remission (CR)	0
Partielle Remission (PR)	0
No Change (NC)	
Minor Response (MR)	2
Stable Disease (SD)	3
Progressive Disease (PD)	4

Bei Betrachtung der Daten aller drei Applikationsschemata zeigte sich, dass die Ansprechraten bei den untersuchten Patienten, die alle an einem relativ weit fortgeschrittenen Tumor litten, gering waren. Die meisten erfuhren ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung oder als minimalen Erfolg eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs. Eine partielle Remission fand lediglich in zwei Fällen statt.

### **3.8 Zusammenhänge von pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern mit klinischen Effekten**

Die erhaltenen pharmakokinetischen und -dynamischen Parameter wurden auf ihre Zusammenhänge mit klinischen Effekten hin untersucht. Bei den klinischen Effekten wurden Toxizität (Hämato-, Nephro-, Hepato- und Neurotoxizität) und Tumoransprechen untersucht. Für die pharmakokinetischen Parameter wurde der Schwerpunkt auf die AUC im Ultrafiltrat gelegt, die die systemische Exposition der Patienten mit pharmakodynamisch aktivem Platin charakterisierte. Da für toxische Effekte, v.a. für die Neurotoxizität, die Kumulation hydrophober Platinspezies in verschiedenen Geweben diskutiert wird, wurde neben der AUC des ultrafiltrierbaren Platins auch die des Vollbluts und der Erythrozyten auf ihren Zusammenhang zu unerwünschten Wirkungen geprüft. Da für die AUC in Vollblut und Erythrozyten der Zyklus einen großen Einfluss auf deren Höhe hat, wurde eine getrennte Auswertung der Zyklen vorgenommen.

Für die Evaluierung einer möglichen Beziehung zwischen dem Ausmaß der DNA-Platinierung und Toxizität bzw. Ansprechen wurden neben den Platin-Nukleotid-Verhältnissen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten auch deren Maximalwerte und die Flächen unter den Adduktcurve herangezogen.

Für die Evaluierung wurde versucht, die Patienten gemäß der unerwünschten Wirkungen in möglichst gleich starke Gruppen einzuteilen:

- Gruppe 1: Patienten mit keinen oder leichten unerwünschte Wirkungen (Toxizitätsgrade 0 bzw. 0 - 1)
- Gruppe 2: Patienten mit stärkeren unerwünschten Wirkungen (Toxizitätsgrade 1 - 4 bzw. 2 - 4).

Die Zusammenfassung der Toxizitätsgrade in Gruppen variierte je nach untersuchtem Parameter. Während bei der Hämato-, Nephro- und Hepatotoxizität Patienten ohne



Toxizität (Grad 0) von den Patienten mit Toxizität (Grad 1 - 4) unterschieden wurden, wurden für die Neurotoxizität die Grade 0 - 1 und 2 - 4 zusammengefasst. Aufgrund der geringen Rate an unerwünschten Wirkungen mit höheren Schweregraden waren gleiche Patientenzahlen nur annähernd zu erreichen.

Für die Evaluierung des Tumoransprechens wurde ebenfalls eine Einteilung in Gruppen vorgenommen:

- Gruppe 1: Patienten mit "progressive disease" und "stable disease" (= Non-Responder)
- Gruppe 2: Patienten mit "minor response" und partieller Remission (= Responder).

Anschließend wurden ein Vergleich der pharmakokinetischen und -dynamischen Parameter zwischen den Gruppen vorgenommen und mögliche Unterschiede mit Hilfe des U-Tests nach *Mann und Whitney* auf ihre statistische Signifikanz geprüft.

### 3.8.1 Unerwünschte Wirkungen

Hinsichtlich der Beziehung zwischen *pharmakokinetischen* Größen und Toxizität wurden zunächst die Daten der Patienten, die 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin erhalten hatten und für die im Rahmen dieser Arbeit die Pharmakokinetik analysiert worden war, untersucht.

Zwischen den Patienten der Gruppe 1 ohne und denen der Gruppe 2 mit Hepatotoxizität, die anhand der GOT-, GPT-, AP- und Bilirubinkonzentrationen bewertet wurde, unterschieden sich nicht in ihren medianen AUC-Werten.

Für die Hämatotoxizität hinsichtlich Hämoglobinkonzentration, Granulozyten- und Thrombozytenzahl wurde ebenfalls kein Zusammenhang mit den AUC-Werten des Ultrafiltrats, Vollbluts oder der Erythrozyten festgestellt.

Für Leukopenie, Nephrotoxizität, die anhand der Serumkreatininkonzentration evaluiert wurde, und Neurotoxizität werden die Ergebnisse im Folgenden dargestellt.

Für die Evaluierung eines möglichen Zusammenhangs von pharmakokinetischen Größen und Leukopenie konnten insgesamt 23 von 28 möglichen Zyklen ausgewertet werden. An drei Patienten wurde der zweite Zyklus nicht verabreicht; bei einem weite-

ren Patienten führte die Berechnung der Erythrozytenkonzentrationen nach Gl. 2.1 in beiden Zyklen z.T. zu negativen Ergebnissen (Erläuterungen: s. Kap. 4.1.1).

Eine leichte Verringerung der Leukozytenzahl (Toxizitätsgrad 1) wurde bei zwei Patienten im ersten und vier Patienten im zweiten Zyklus festgestellt. In diesen Zyklen wurde mit 54,6 [34,7 - 100,2]  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  eine deutlich höhere mediane AUC in den Erythrozyten ( $\text{AUC}_{\text{ERY}, 0-24 \text{ h}}$ ) gemessen als in den anderen Zyklen ohne Toxizität, in denen die mediane AUC 34,3 [16,4 - 63,8]  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  betrug.

Der Unterschied war für die  $\text{AUC}_{\text{ERY}, 0-24 \text{ h}}$  signifikant ( $p = 0,006$ ); auch für die  $\text{AUC}_{\text{ERY}, 0-48 \text{ h}}$  bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,037$ ). Exemplarisch wird die  $\text{AUC}_{\text{ERY}, 0-24 \text{ h}}$  für die Patientengruppen mit und ohne Leukopenie in Abb. 3.41 dargestellt.

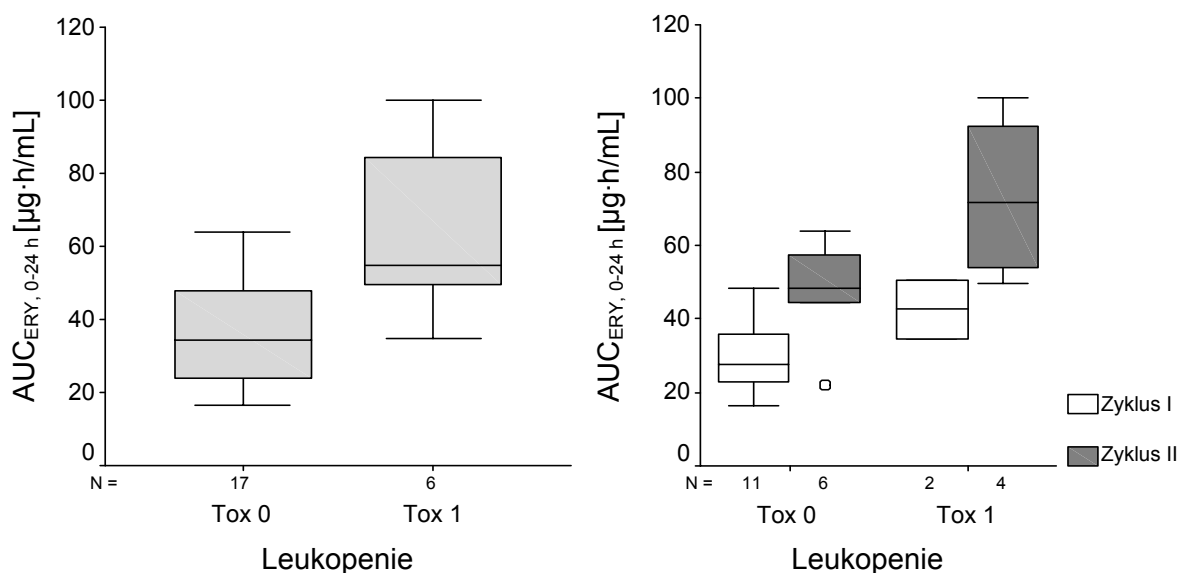


Abb. 3.41 Beziehung zwischen der AUC in Erythrozyten ( $\text{AUC}_{\text{ERY}, 0-24 \text{ h}}$ ) und Leukopenie für beide Zyklen gemeinsam (links) und getrennt nach Behandlungszyklen (rechts)

Neben der gemeinsamen Auswertung der Zyklen wurde dieser Befund auch getrennt nach Behandlungszyklen geprüft (s. rechter Teil der Abb. 3.41). Dabei zeigten sich dieselben Tendenzen, so dass der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei gemeinsamer Auswertung der Zyklen nicht nur darauf zurückgeführt werden konnte, dass die AUC bei den vier Patienten mit Leukopenie im zweiten Zyklus aufgrund der Kumulation von Platin in den Erythrozyten sowieso höher war. Auch bei Betrachtung der AUC im

Vollblut spiegelte sich dieser Trend wider; allerdings waren die Unterschiede für die AUC-Werte in dieser Matrix nicht signifikant.

In insgesamt 5 Zyklen (zweimal in Zyklus I und dreimal in Zyklus II) wurde Nephrotoxizität der Schweregrade 1 und 2 festgestellt. Aus denselben Gründen wie auch bei der Leukopenie konnten insgesamt 23 von 28 theoretisch möglichen Behandlungszyklen ausgewertet werden. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der AUC im Ultrafiltrat; ähnlich wie bei der Leukopenie waren aber Unterschiede bzgl. der AUC im Vollblut und in den Erythrozyten zu erkennen.

Diese Unterschiede waren für beide Matrizes, sowohl für  $AUC_{0-24\text{ h}}$  als auch für  $AUC_{0-48\text{ h}}$  signifikant. Exemplarisch wird die AUC in den Erythrozyten ( $AUC_{\text{ERY}, 0-24\text{ h}}$ ) in Abb. 3.42 dargestellt.

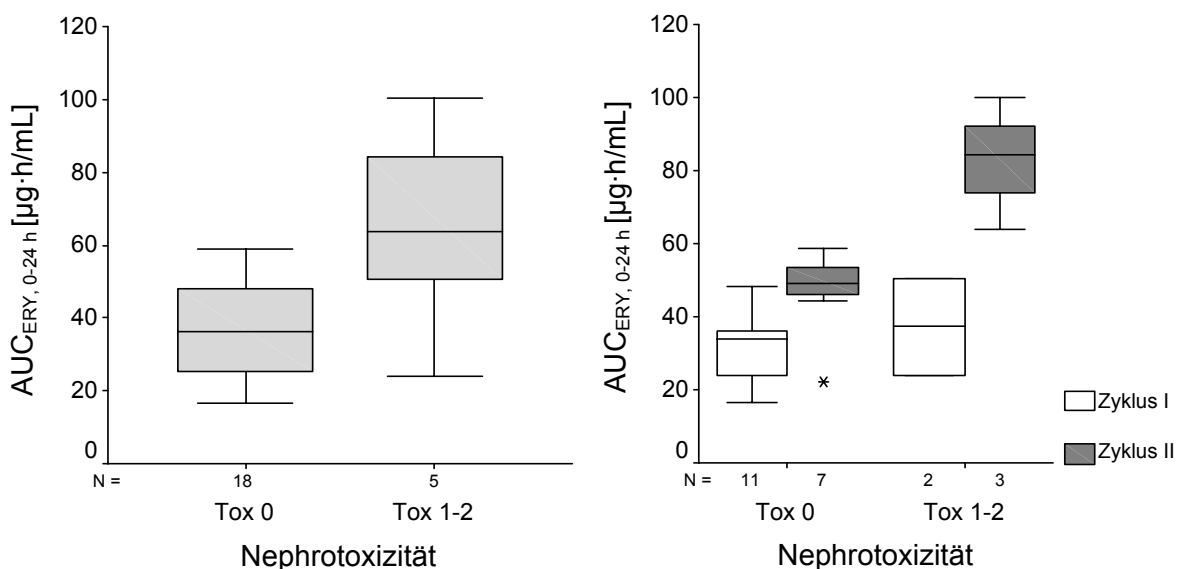


Abb. 3.42 Beziehung zwischen der AUC in Erythrozyten ( $AUC_{\text{ERY}, 0-24\text{ h}}$ ) und der Nephrotoxizität für beide Zyklen gemeinsam (links) und getrennt nach Behandlungszyklen (rechts)

Dieser Unterschied zeigte sich in beiden Zyklen. Im ersten Zyklus war er jedoch nicht deutlich erkennbar, da nur 2 Patienten an einer Nephrotoxizität litten. Im zweiten Zyklus war die Differenz zwischen den AUC-Werten der Patienten ohne und mit Toxizität jedoch offensichtlich.

Die Mediane mit minimalen und maximalen Werten für die beiden Patientengruppen mit den zugehörigen p-Werten (*Mann-Whitney-Test*; einseitiger Vergleich) sind für alle Matrizes und Beobachtungszeiträume in Tab. 3.50 zusammengefasst.

**Tab. 3.50** Vergleich der medianen AUC in Erythrozyten und Vollblut ( $AUC_{0-24\text{ h}}$  und  $AUC_{0-48\text{ h}}$ ) zwischen den Patienten ohne und mit Nephrotoxizität (Mediane mit Minimal- und Maximalwert sowie p-Werte nach U-Test)

	Nephrotoxizität		p-Wert
	Grad 0	Grad 1-2	
$AUC_{ERY, 0-24\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	36,2 [16,4 - 58,7]	63,8 [24,0 - 100]	0,030*
$AUC_{ERY, 0-48\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	80,6 [52,7 - 118]	134 [98,3 - 192]	0,003*
$AUC_{VB, \infty}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	144 [91,6 - 264]	254 [179 - 320]	0,014*
$AUC_{VB, 0-24\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	38,5 [24,3 - 56,4]	49,5 [41,6 - 63,7]	0,015*
$AUC_{VB, 0-48\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	64,6 [43,3 - 96,7]	84,8 [70,5 - 113]	0,025*

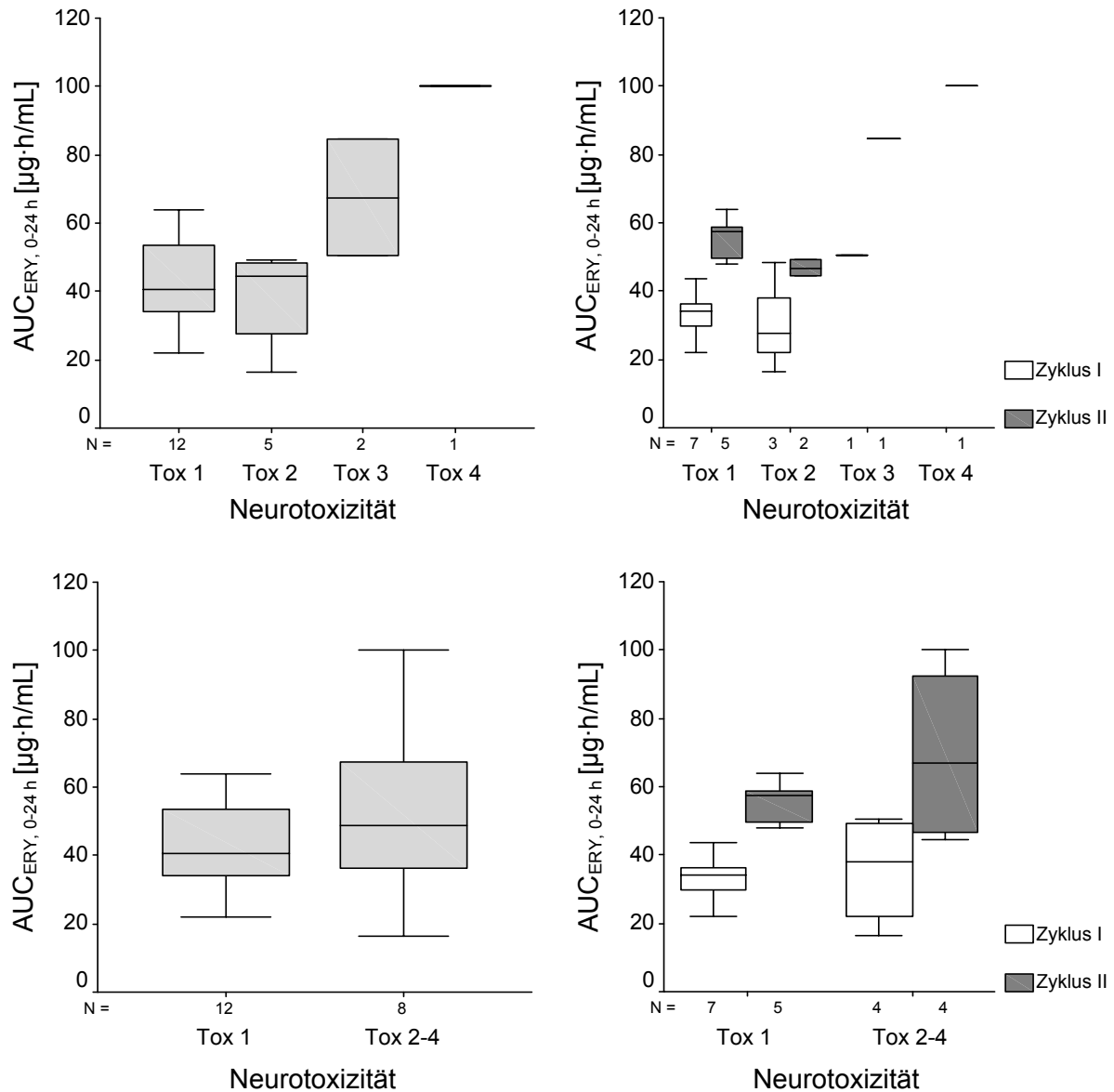
\* kennzeichnet ein signifikantes Ergebnis

Für die periphere sensorische Neuropathie, die therapielimitierende Toxizität für Oxaliplatin, wurden insgesamt 20 von 28 theoretisch möglichen Therapiezyklen ausgewertet. Aus denselben Gründen wie auch bei Leukopenie und Nephrotoxizität konnten 5 Zyklen nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Darüberhinaus lagen für 3 weitere Zyklen die Angaben zur Ausprägung der Neurotoxizität nicht vor.

Alle untersuchten Patienten erfuhren neuropathische Wirkungen; die des Schweregrads 1 waren am häufigsten. Nur in drei Behandlungszyklen traten neurotoxische Effekte des Grads 3 oder 4 auf, die mit einer hohen AUC in allen Matrizes verbunden waren. Beispielhaft zeigt dies Abb. 3.43 für die AUC in den Erythrozyten ( $AUC_{ERY, 0-24\text{ h}}$ ).

Wie auch für die AUC im Vollblut oder im Ultrafiltrat war in den Erythrozyten für steigende Toxizitätsgrade eine ansteigende Tendenz der Mediane für die AUC-Werte zu erkennen. Allerdings zeigten sich auch deutliche Überlappungsbereiche: einzelne Patienten mit gering ausgeprägter Neurotoxizität hatten ebenfalls eine hohe AUC in den Erythrozyten.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den medianen AUC-Werten von Patienten mit Toxizität der Grade 0 - 1 und der Grade 2 - 4 (s. unterer Teil der Abb. 3.43) bestand weder für Erythrozyten noch für eine andere der untersuchten Matrizes.



**Abb. 3.43** Zusammenhang zwischen  $AUC_{ERY, 0-24 h}$  und Neurotoxizität für beide Zyklen gemeinsam (links) und getrennt nach Behandlungszyklen (rechts). Im oberen Abbildungsteil wurden die Toxizitätsgrade jeweils einzeln aufgeführt, während in den beiden unteren Boxplots die Schweregrade in zwei Gruppen zusammengefasst wurden.

Die Auswertung der Daten nach Gabe von  $60 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin hinsichtlich möglicher Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen Parametern und unerwünschten Wirkungen war wegen der geringen Fallzahl und wegen der geringen Zahl an Patienten mit Toxizität nur eingeschränkt möglich. Bei keinem der untersuchten Patienten wurde Hämatoxizität beobachtet, so dass eine weitere Analyse nicht möglich war. Ein Patient litt unter einer leichten Nephrotoxizität; dieser Patient hatte aber keine besonders hohe, sondern allenfalls eine mittlere AUC in den untersuchten Matrices. Hinsicht-

lich der Hepatotoxizität und auch der Neurotoxizität zeigten sich keine auffälligen Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der Platinexposition und dem Schweregrad unerwünschter Wirkungen.

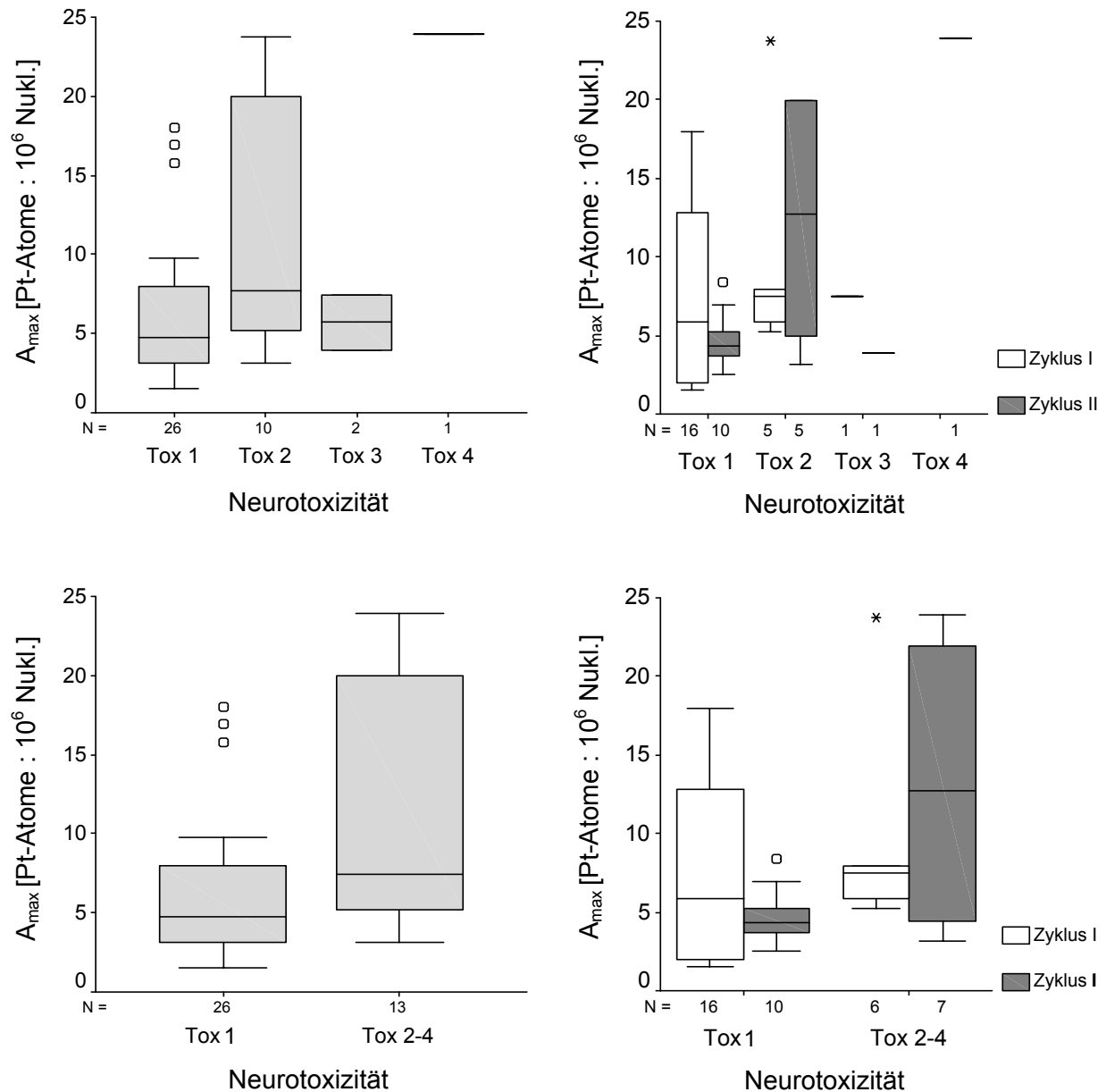
Die Zusammenhänge zwischen *pharmakodynamischen* Parametern und therapieassoziierter Toxizität wurden anhand der Daten von Patienten, die mit 130 und 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt worden waren, untersucht. Wie bei der Evaluierung der Beziehung zwischen Pharmakokinetik und Toxizität wurden die Patienten je nach Toxizitätsgrad in zwei Gruppen eingeteilt und das Ausmaß der Adduktbildung für die Gruppen miteinander verglichen. Neben den Flächen unter der Adduktcurve (AUA<sub>0-24 h</sub> und z.T. AUA<sub>0-48 h</sub>) wurden die Platin-Nukleotid-Verhältnisse der vier Abnahmezeitpunkte (A<sub>0 h</sub>, A<sub>4 h</sub>, A<sub>24 h</sub>, und A<sub>48 h</sub>) sowie die maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnisse (A<sub>max</sub>) für die Auswertung herangezogen.

Die Auswertung ergab für alle Patienten, sowohl nach Gabe von 50 als auch 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin, vergleichbare Ergebnisse. Für Hämato-, Nephro- und Hepatotoxizität wurden keine Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der Adduktbildung zwischen den jeweiligen Toxizitätsgraden gefunden. Die Patienten, die einen höheren Schweregrad dieser unerwünschten Wirkungen erfuhren, zeigten gleich hohe oder sogar niedrigere Platin-Nukleotid-Verhältnisse als Patienten ohne Toxizität.

Jedoch zeigten die Patienten, die mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt wurden und unter neurosensorischen Wirkungen der Schweregrade 2 - 4 litten, ein höheres maximales Platin-Nukleotid-Verhältnis A<sub>max</sub>.

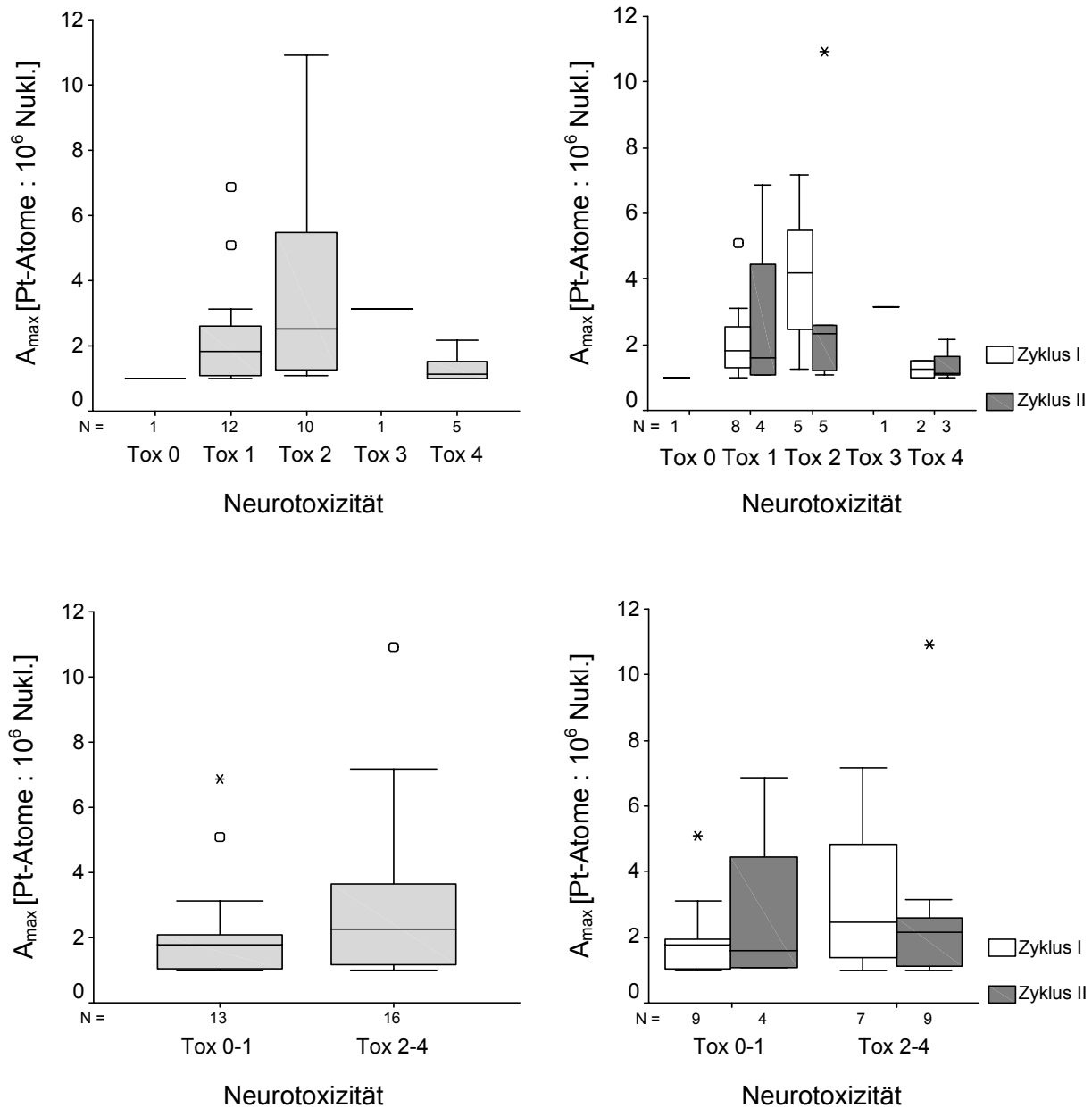
Diese Tendenz war in beiden Zyklen erkennbar, es bestand aber kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnisses zwischen den beiden Toxizitätsgruppen. Bei einer gemeinsamen Auswertung beider Zyklen war der Unterschied jedoch mit  $p = 0,043$  (U-Test nach *Mann und Whitney*) statistisch signifikant.

Der Zusammenhang zwischen A<sub>max</sub> und der Stärke der neurotoxischen Effekte ist in Abb. 3.44 dargestellt. In der Abbildung wurden zwei Extremwerte (Tox 1, Zyklus I: Pat. 5: 165 Pt-Atome : 10<sup>6</sup> Nukleotide und Tox 2, Zyklus II: Pat. 18: 115 Pt-Atome : 10<sup>6</sup> Nukleotide) nicht dargestellt.



**Abb. 3.44** Zusammenhang zwischen maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnissen ( $A_{max}$ ) und Neurotoxizität nach Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin für beide Zyklen gemeinsam (links) und getrennt nach Zyklus I und II (rechts). Im oberen Abbildungsteil wurden die Toxizitätsgrade jeweils einzeln aufgeführt, während in den beiden unteren Boxplots die Schweregrade in zwei Gruppen zusammengefasst wurden.

Bei den mit 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelten Patienten zeigten sich keine Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der Adduktbildung und der Stärke der aufgetretenen unerwünschten Wirkungen. Auch für die Neurotoxizität wurde keine Korrelation mit der  $A_{max}$  beobachtet, wie der Abb. 3.45 entnommen werden kann.



**Abb. 3.45** Zusammenhang zwischen den maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnissen ( $A_{max}$ ) und Neurotoxizität nach Gabe von  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für beide Zyklen gemeinsam (links) und getrennt nach Zyklus I und II (rechts). Im oberen Teil der Abbildung wurden die einzelnen Toxizitätsgrade aufgeführt; in den beiden unteren Boxplots wurden diese in zwei Gruppen zusammengefasst.

Die Skalierung für die Bewertung der Neurotoxizität dieser Studie unterschied sich von der zuvor beschriebenen Untersuchung (s. Kap. 2.6.4), da aufgrund der wöchentlichen Applikationen von Oxaliplatin das Bewertungsschema von Lévi *et al.*, das für Oxaliplatingaben im Abstand von je drei Wochen ausgelegt ist, leicht modifiziert werden musste. Daher wurden die Toxizitätsgruppen für die *gemeinsame* Auswertung der



Ergebnisse unterschiedlich eingeteilt. Für die Patienten, die  $130 \text{ mg/m}^2$  erhielten, wurden wie auch bei der getrennten Auswertung die Toxizitätsgrade 0 - 1 und 2 - 4 zusammengefasst. Bei den Patienten, denen  $50 \text{ mg/m}^2$  verabreicht wurde, wurde abweichend von der getrennten Auswertung die Gruppe der Patienten mit leichter Toxizität weiter gefasst und auch der Schweregrad 2 dieser Gruppe zugerechnet. Bei der gemeinsamen Auswertung der beiden Patientenkollektive wurde allenfalls eine Tendenz festgestellt, nach der die Patienten mit stärkerer Neurotoxizität eine höhere  $A_{\text{max}}$  aufwiesen. Ein deutlicher oder sogar statistisch signifikanter Unterschied bestand jedoch sowohl für diesen als auch für allen anderen untersuchten Parameter ( $A_{\text{UA}}$ ,  $A_{0 \text{ h}}$ ,  $A_{4 \text{ h}}$ ,  $A_{24 \text{ h}}$ ) nicht.

### 3.8.2 Tumoransprechen

Für die Untersuchung eines eventuell vorhandenen Zusammenhangs zwischen *pharmakokinetischen* Größen und Tumoransprechen wurden zunächst die Daten der Patienten, die  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin erhalten hatten und deren Pharmakokinetik im Rahmen dieser Arbeit analysiert worden war, untersucht.

Von den insgesamt 14 Patienten waren 9 Patienten nach zwei Behandlungszyklen in Bezug auf die Antitumoraktivität (s. Tab. 3.49) auswertbar. Drei der übrigen 5 Patienten erhielten keine zweite Oxaliplatingabe; bei zwei Teilnehmern der Studie war das Staging durch die Onkologen noch nicht erfolgt und sie wurden daher nicht in die Auswertung miteinbezogen. Bei lediglich zwei Patienten wurde eine "minor response" (MR) erreicht; alle anderen Patienten erfuhren eine Stabilisierung (SD) oder ein Fortschreiten (PD) des Krankheitsverlaufs.

Das Tumoransprechen zeigte keinen Zusammenhang mit der Platinexposition im Ultrafiltrat, die als entscheidender Parameter für die pharmakodynamische Wirkung angesehen wird. Für die Auswertung wurde  $AUC_{\text{UF}, 0-24 \text{ h}}$  gewählt, um auch die Patienten einschließen zu können, deren Daten nicht durch eine kompartmentabhängige Analyse ausgewertet werden konnten. Die Zusammenhänge zwischen der  $AUC_{\text{UF}, 0-24 \text{ h}}$  und dem Tumoransprechen, sind in Abb. 3.46 dargestellt.

Auch für die Beziehungen zwischen Tumoransprechen und der AUC in anderen Matrices bzw. über andere Beobachtungzeiträume ( $AUC_{\text{UF}, 0-48 \text{ h}}$ ,  $AUC_{\text{VB}, 0-24 \text{ h}/0-48 \text{ h}}$  und  $AUC_{\text{ERY}, 0-24 \text{ h}/0-48 \text{ h}}$ ) sowie für die Gesamt-AUC beider Zyklen zeigte sich ein ähnliches Bild.

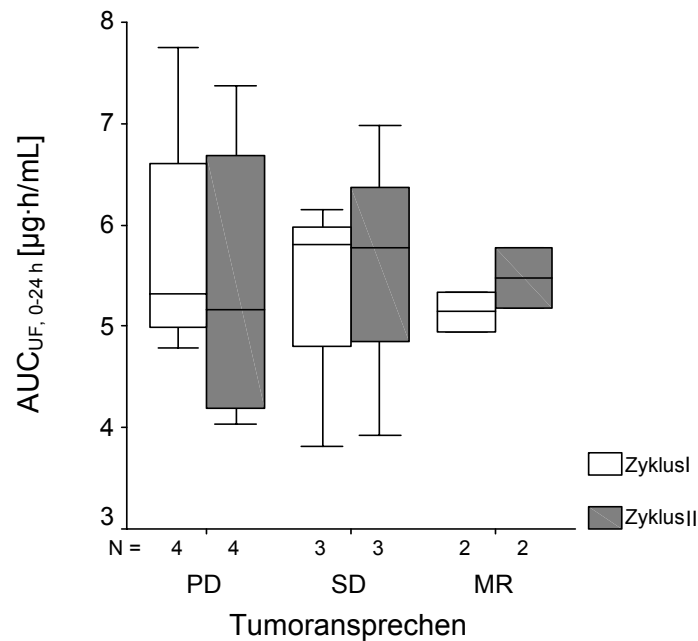


Abb. 3.46 Beziehungen zwischen der AUC im Ultrafiltrat ( $AUC_{UF, 0-24 h}$ ) und dem Tumoransprechen

Die Daten der Patienten, die mit  $60 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin behandelt worden waren, konnten nicht hinsichtlich möglicher Korrelationen zwischen Platinexposition und Ansprechen geprüft werden, da lediglich von drei Patienten Informationen zum Tumoransprechen vorlagen.

Für den Zusammenhang zwischen *pharmakodynamischen* Parametern und Tumoransprechen wurden zunächst die Daten der Patienten, die  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin erhalten hatten untersucht. Von 32 theoretisch möglichen konnten insgesamt die Daten aus 27 Behandlungszyklen in die Auswertung einbezogen werden. Für zwei Patienten (= 4 Zyklen) lagen die Informationen zum Tumoransprechen nicht vor; an einen weiteren Patienten wurde der zweite Zyklus aus medizinischen Gründen nicht verabreicht. Lediglich zwei Patienten wiesen eine partielle Remission auf (PR; Responder); alle anderen erfuhren eine Stabilisierung oder ein Fortschreiten der Erkrankung (SD, PD; Non-Responder) (s. Tab. 3.47).

Zunächst wurden die medianen maximalen Adduktverhältnisse ( $A_{\max}$ , s. Abb. 3.47) und die Flächen unter der Adduktcurve ( $AUA_{0-24 h}$ , s. Abb. 3.47) für Responder (PR) und Non-Responder (PD + SD) miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass das Ausmaß der Adduktbildung für die beiden Responder dem der Non-Responder entsprach.

Auch die medianen Adduktverhältnisse für die einzelnen Abnahmezeitpunkte 0, 4 und 24 h nach Infusionsbeginn [s. Abb. 3.48 ( $A_{0h}$ ,  $A_{4h}$ ) und Abb. 3.49 ( $A_{24h}$ )] waren für die beiden Patientengruppen nicht verschieden.

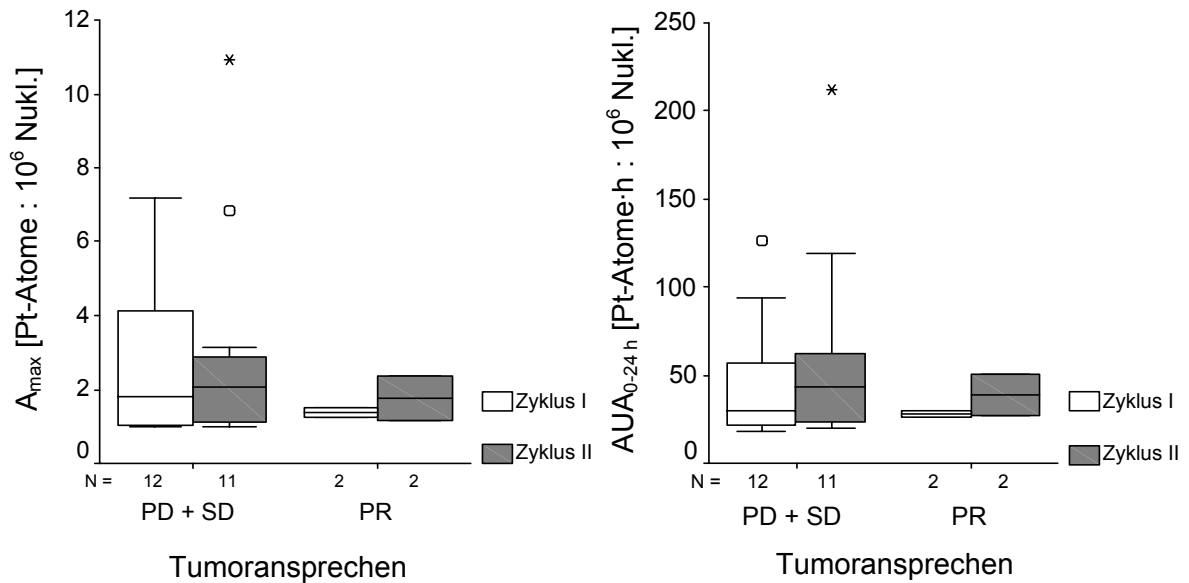


Abb. 3.47 Maximale Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{max}$ ; links) und Fläche unter der Adduktkurve ( $AUA_{0-24h}$ ; rechts) nach Gabe von  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für Non-Responder und Responder

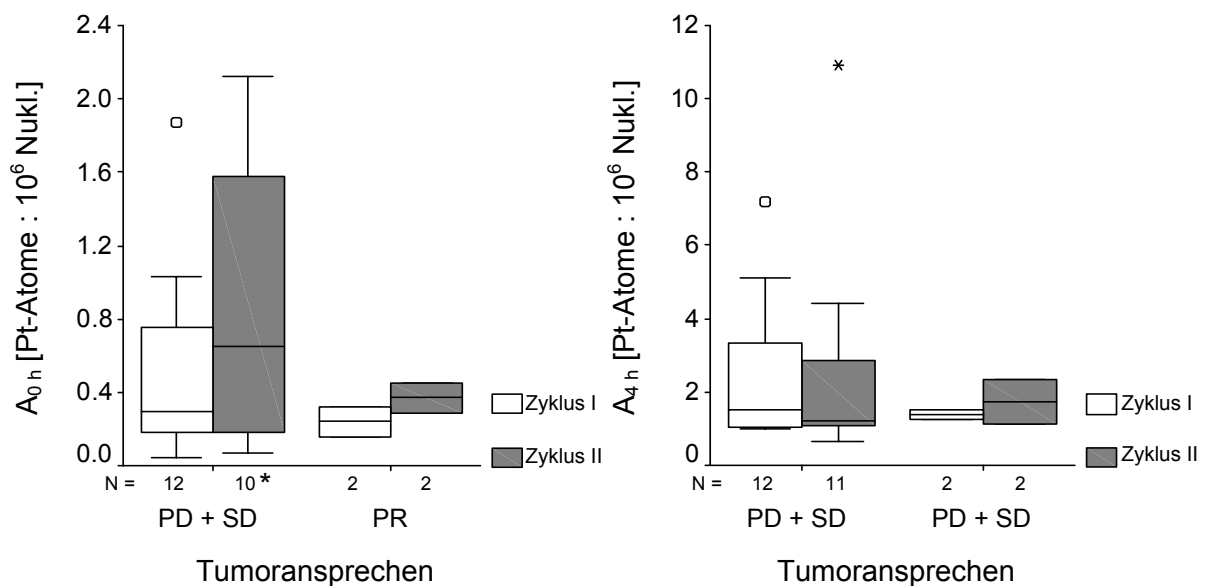


Abb. 3.48 Platin-Nukleotid-Verhältnisse 0 und 4 h ( $A_{0h}$ ,  $A_{4h}$ ) nach Infusionsbeginn nach Gabe von  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für Non-Responder und Responder [\* Ein Wert für  $A_{0h}$  war nicht plausibel, da  $A_{0h} > A_{4h}$ .]

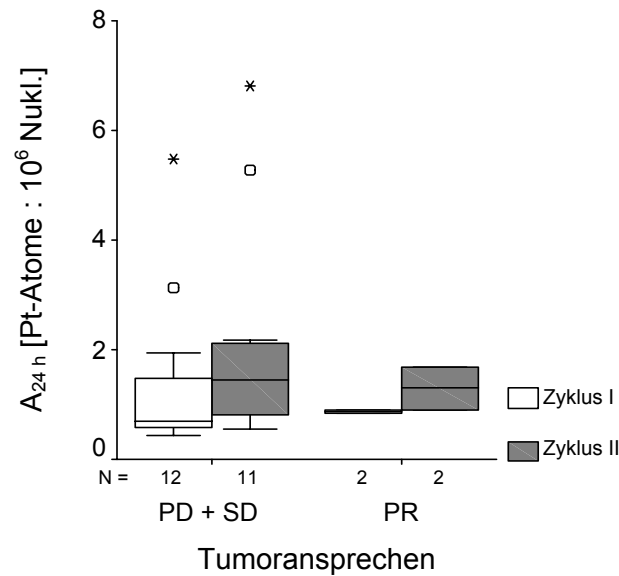


Abb. 3.49 Platin-Nukleotid-Verhältnisse 24 h nach Infusionsbeginn ( $A_{24h}$ ) nach Gabe von  $50 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für Non-Responder und Responder

Von den insgesamt 24 Patienten, die  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin erhalten hatten und die im Hinblick auf die Adduktbildung untersucht worden waren, waren 17 Patienten in Bezug auf die Antitumoraktivität auswertbar (s. Kap. 3.7.3, Tab. 3.48). Ein Patient hatte eine partielle Remission (PR), vier weitere zeigten eine "minor response" (MR). Alle anderen gehörten zur Gruppe der Non-Responder mit Stabilisierung (SD) oder Fortschreiten der Erkrankung (PD).

Wie schon bei den zuvor untersuchten Patienten wurden die medianen maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{\text{max}}$ , s. Abb. 3.50) und die Flächen unter der Addukt-kurve ( $AUA_{0-24h}$  s. Abb. 3.51 links und  $AUA_{0-48h}$  s. Abb. 3.51 rechts) für Non-Responder (PD + SD) und Responder (PR + MR) miteinander verglichen.

Für diese beiden pharmakodynamischen Parameter zeigten sich zwischen Non-Respondern und Respondern keine Unterschiede. Es waren allenfalls leichte Tendenzen dahingehend festzustellen, dass Patienten mit MR oder PR v.a. im zweiten Zyklus höhere Werte aufwiesen als die Non-Responder mit PD oder SD. Diese geringen Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (s. Tab. 3.51).

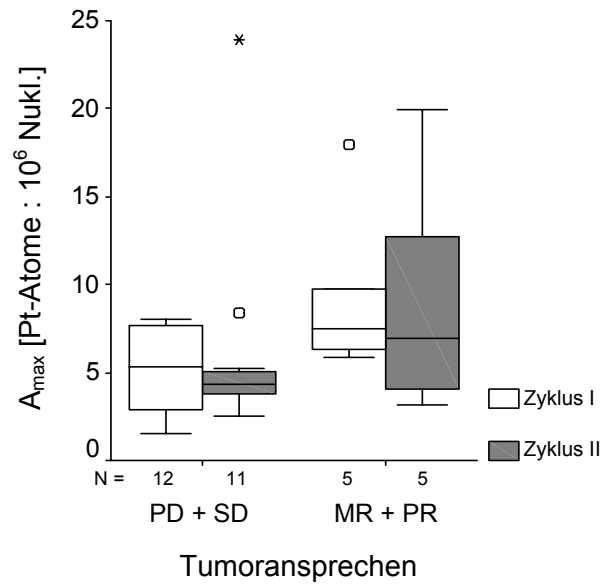


Abb. 3.50 Maximale Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{max}$ ) nach Gabe von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für Non-Responder und Responder (Ein Extremwert wurde nicht dargestellt: PD + SD, Zyklus I:  $165 \text{ Pt-Atome} : 10^6 \text{ Nukl.}$ )

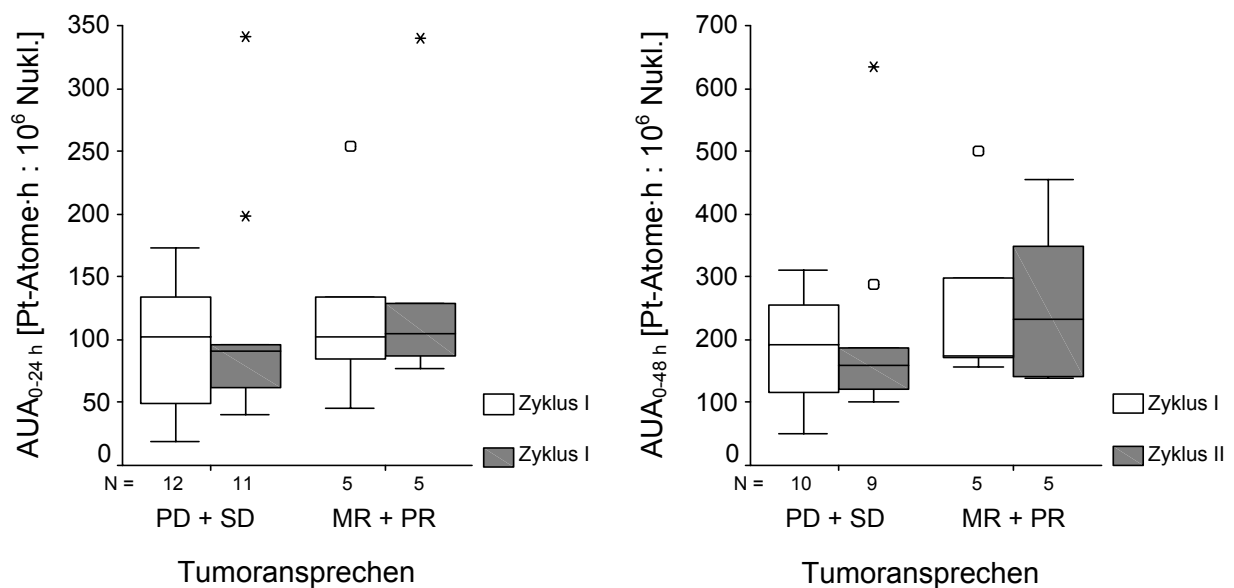


Abb. 3.51 Fläche unter der Adduktkurve ( $AUA_{0-24h}$ : links;  $AUA_{0-48h}$ : rechts) bei Non-Respondern und Respondern nach Gabe von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin. (Jeweils ein Extremwert wurde nicht dargestellt: PD + SD, Zyklus I:  $AUA_{0-24h} = 2695 \text{ Pt-Atome} \cdot \text{h} : 10^6 \text{ Nukl.}$  und  $AUA_{0-48h} = 3545 \text{ Pt-Atome} \cdot \text{h} : 10^6 \text{ Nukl.}$ )

Auch beim Vergleich der medianen Platin-Nukleotid-Verhältnisse 0, 4 und 24 h nach Infusionsbeginn ( $A_{0h}$ ,  $A_{4h}$ ,  $A_{24h}$ ) waren keine Unterschiede hinsichtlich der Höhe der Platin-Nukleotid-Verhältnisse zwischen der Gruppe der Responder und der Non-Responder zu erkennen (s. Abb. 3.52 und Tab. 3.51).

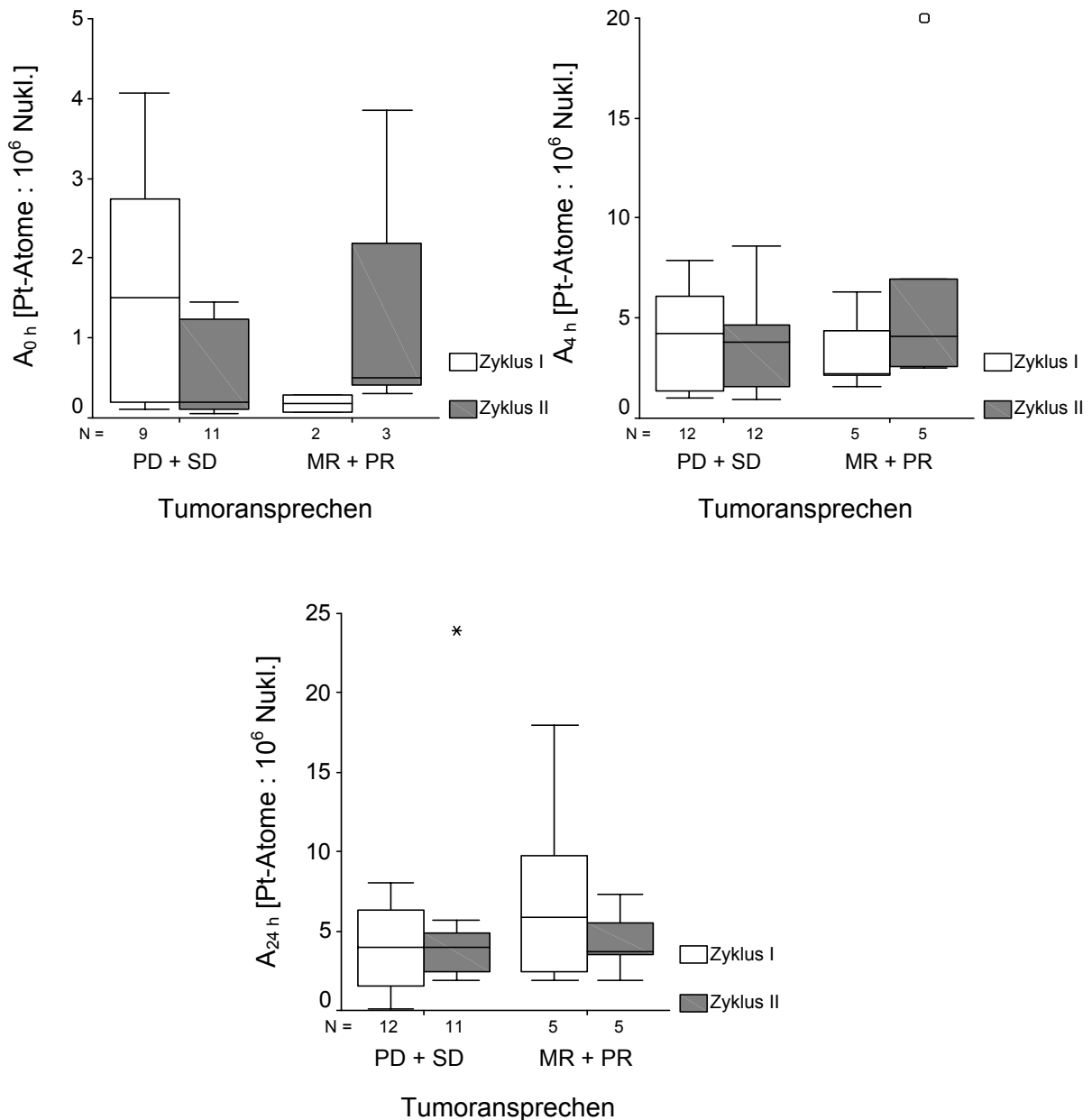


Abb. 3.52 Platin-Nukleotid-Verhältnisse 0, 4 und 24 nach Infusionsbeginn ( $A_{0h}$ ,  $A_{4h}$ ,  $A_{24h}$ ) nach Gabe von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für Non-Responder und Responder. (Für  $A_{4h}$  und  $A_{24h}$  wurde je ein Extremwert nicht dargestellt: PD + SD, Zyklus I:  $A_{4h} = 165 \text{ Pt-Atome} : 10^6 \text{ Nukl.}$  und  $A_{24h} = 69,4 \text{ Pt-Atome} : 10^6 \text{ Nukleotide}$ )

Für die Platin-Nukleotid-Verhältnisse, die 48 h nach Infusionsbeginn ( $A_{48h}$ ) auftraten, zeigten sich zwischen den beiden Patientengruppen deutliche Unterschiede.

Die medianen Platin-Nukleotid-Verhältnisse der Responder waren mit 3,5 und 4,1 Pt-Atomen :  $10^6$  Nukleotide in beiden Zyklen etwa doppelt so hoch wie die der Non-Responder (1,5 - 1,8 Pt-Atome :  $10^6$  Nukleotide); die Unterschiede wiesen mit  $p = 0,055$  bzw.  $p = 0,099$  jedoch keine Signifikanz auf.

Bei der gemeinsamen Auswertung der beiden Behandlungszyklen war der Unterschied zwischen den Patientengruppen (Responder: 3,8 Pt-Atome :  $10^6$  Nukleotide, Non-Responder: 1,8 Pt-Atome :  $10^6$  Nukleotide) mit  $p = 0,013$  statistisch signifikant (s. Abb. 3.53, Tab. 3.51).

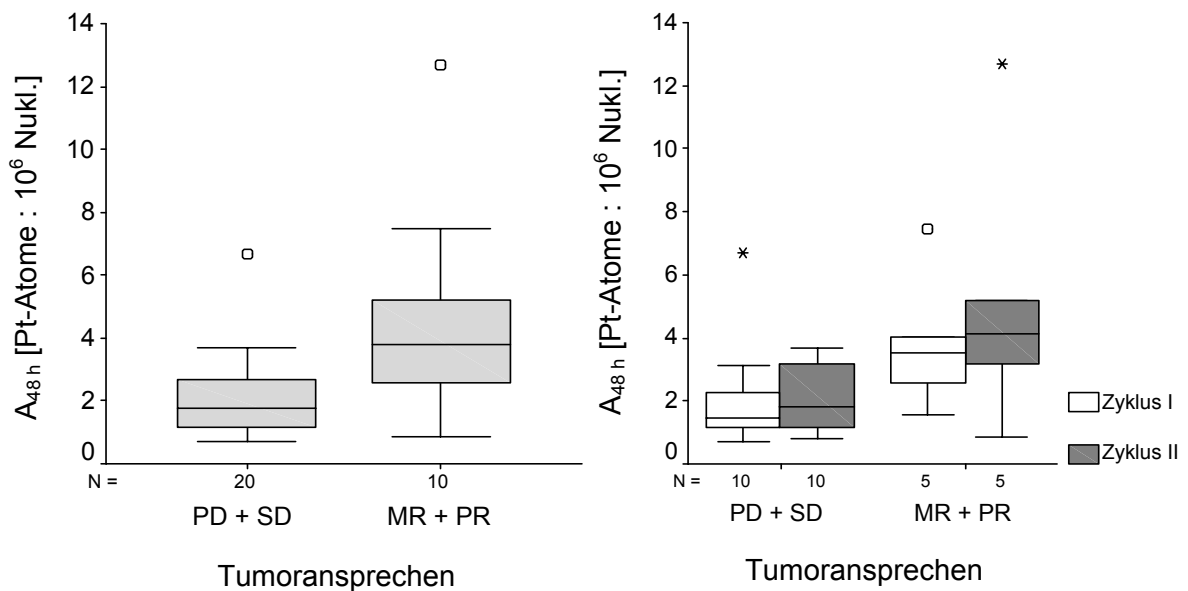


Abb. 3.53 Platin-Nukleotid-Verhältnisse 48 h nach Infusionsbeginn ( $A_{48h}$ ) nach Applikation von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin für Non-Responder und Responder für beide Zyklen gemeinsam (links) getrennt nach Zyklen (rechts)

Tab. 3.51 Vergleich der Adduktparameter von Non-Respondern und Respondern nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Mediane mit Minimal- und Maximalwert sowie p-Werte nach U-Test)

	Zyklus	Non-Responder	Responder	p-Wert
<b>A<sub>0 h</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	1,51 [0,11 - 7,31]	0,18 [0,07 - 0,28]	0,218
	II	0,19 [0,06 - 1,46]	0,51 [0,30 - 3,86]	0,291
	I + II	0,36 [0,06 - 7,31]	0,30 [0,07 - 3,86]	0,921
<b>A<sub>4 h</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	4,22 [1,02 - 165]	2,23 [1,57 - 6,34]	0,799
	II	3,82 [0,90 - 8,62]	4,08 [2,52 - 19,9]	0,442
	I + II	3,93 [0,90 - 165]	3,32 [1,57 - 19,9]	0,696
<b>A<sub>24 h</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	3,98 [0,10 - 69,4]	5,83 [1,88 - 18,0]	0,383
	II	4,01 [1,88 - 23,9]	3,69 [1,93 - 7,29]	0,913
	I + II	4,01 [0,10 - 69,4]	4,61 [1,88 - 18,0]	0,451
<b>A<sub>48 h</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	1,50 [0,70 - 6,70]	3,50 [1,60 - 7,50]	0,055
	II	1,83 [0,80 - 3,70]	4,11 [0,90 - 12,7]	0,099
	I + II	1,80 [0,70 - 6,70]	3,80 [0,90 - 12,7]	0,013*
<b>A<sub>max</sub></b> [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	5,30 [1,50 - 165]	7,50 [5,80 - 18,0]	0,160
	II	4,35 [2,50 - 23,9]	6,98 [3,20 - 20,0]	0,510
	I + II	4,93 [1,50 - 165]	7,24 [3,20 - 20,0]	0,068
<b>AUA<sub>0-24 h</sub></b> [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	102 [18,4 - 2695]	102 [45,5 - 254]	0,799
	II	90,5 [40,2 - 341]	105 [76,9 - 340]	0,267
	I + II	94,5 [18,4 - 2696]	103 [45,5 - 340]	0,324
<b>AUA<sub>0-48 h</sub></b> [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	I	191 [50,8 - 3545]	173 [156 - 501]	0,953
	II	160 [101 - 635]	233 [140 - 456]	0,298
	I + II	176 [50,8 - 3545]	203 [140 - 501]	0,308

\* kennzeichnet ein signifikantes Ergebnis

Um diesen Unterschied näher zu charakterisieren, wurden die Verläufe der Responder und Non-Responder getrennt voneinander betrachtet. Da sich die 24 h-Werte für die beiden Patientengruppen nicht signifikant voneinander unterschieden, wurde geprüft, inwieweit die Unterschiede der 48 h-Werte durch eine geringere Abnahme oder sogar durch eine Zunahme der Platin-Nukleotid-Verhältnisse bei den Respondern erklärt werden konnte.



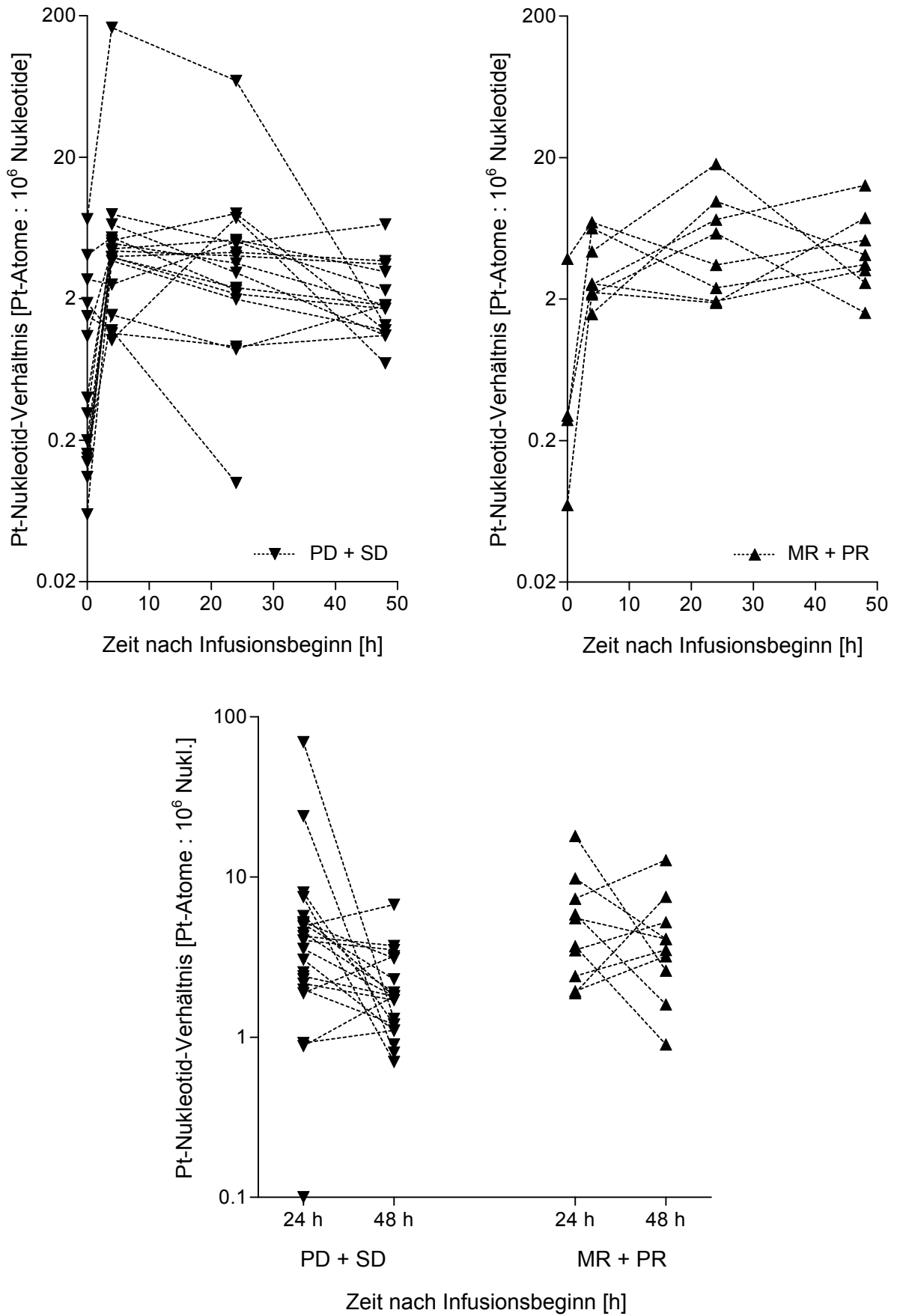


Abb. 3.54 Verläufe der Platin-Nucleotid-Verhältnisse nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin für Non-Responder (▼) und Responder (▲)

Zunächst wurden die Verläufe visuell beurteilt; in Abb. 3.54 sind neben den Werten aller vier Abnahmezeitpunkte für beide Behandlungszyklen (oberer Abbildungsteil) die 24 und 48 h-Werte für Responder und Non-Responder nochmals gesondert (unterer Teil der Abbildung) dargestellt.

In beiden Patientengruppen waren sowohl Abnahmen und Zunahmen der Platin-Nukleotid-Verhältnisse von 24 h auf 48 h nach Infusionsbeginn erkennbar. Auch gleich bleibende Platin-Nukleotid-Verhältnisse wurden beobachtet.

Um die Stärke der Veränderung vom 24 h-Wert auf den 48 h-Wert zu quantifizieren, wurde der Quotient der medianen Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{48\text{ h}}/A_{24\text{ h}}$ ) bestimmt. Dieser betrug für die Patienten ohne Response 0,45, während er bei den Patienten mit minor oder partieller response mit 0,82 wesentlich höher war.

Außerdem wurde die relative Veränderung der Platin-Nukleotid-Verhältnisse 48 h nach Infusionsbeginn bezogen auf den 24 h-Wert für jeden einzelnen Patienten berechnet. Dabei zeigte sich für Non-Responder eine mediane relative Differenz von -40,4 %. Bei den Respondern war mit einem Median von +10,0 % sogar eine Zunahme der Platin-Nukleotid-Verhältnisse zu verzeichnen. Der Unterschied zwischen diesen Werten war jedoch nicht statistisch signifikant.

Auch die Veränderung der Platin-Nukleotid-Verhältnisse vom 4 h-Wert oder dem  $A_{\text{max}}$ -Wert auf den 48 h-Wert wurden untersucht. Für die Abnahme der Platin-Nukleotid-Verhältnisse von 4 auf 48 h bestand eine ähnliche Tendenz wie für die Differenz zwischen  $A_{24\text{ h}}$  und  $A_{48\text{ h}}$ , jedoch war auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen zu verzeichnen. Das gleiche gilt auch für die Abnahme der DNA-Platinierung vom maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnis auf den 48 h-Wert.

Insgesamt deuten die berechneten Werte darauf hin, dass Responder eine geringere Abnahme der Platin-Nukleotid-Verhältnisse erfuhren als die Patienten ohne Ansprechen auf die Therapie. Dabei war von Bedeutung, dass die Adduktmenge 48 h nach Infusionsbeginn möglichst hoch war; das Ausmaß der Veränderung der Platin-Nukleotid-Verhältnisse über die Zeit war für die beiden Patientengruppen nur tendenziell verschieden.

## 4 Diskussion

Im Folgenden werden die in Kap. 3 beschriebenen Ergebnisse diskutiert für

- die bioanalytische Bestimmungsmethode zur Quantifizierung von Platin in verschiedenen Matrices sowie die Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte,
- die ermittelten pharmakokinetischen Parameter,
- die ermittelten Platin-Nukleotid-Verhältnisse,
- die Einflussfaktoren auf die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter,
- die Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern einerseits und
- den Zusammenhängen zwischen diesen Parametern und Toxizität bzw. Ansprechen andererseits.

### 4.1 Bioanalytische Quantifizierungsmethoden für Oxaliplatin

Für die Quantifizierung von Oxaliplatin bzw. Platin in biologischen Matrices wurden verschiedene Methoden publiziert, die bereits in den Kapiteln 1.5.1 und 1.5.2 dargestellt wurden. Neben z.T. sehr aufwändigen HPLC-Methoden, mit denen die Bestimmung der Ausgangssubstanz und einzelner Metaboliten möglich ist, werden für die Routineanalytik häufig Verfahren eingesetzt, mit denen alle Platinspezies erfasst werden.

Zu diesen zählt auch die in dieser Arbeit angewandte GF-AAS, die für die Quantifizierung von Platin in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut eingesetzt wurde. Im Vergleich mit anderen Analyseverfahren zeichnet sich die AAS-Technik durch eine einfache Probenaufarbeitung, kurze Analysenzeiten und ausreichend niedrige Bestimmungsgrenze aus. Neben der Quantifizierung von Platinkonzentrationen in verschiedenen Matrices wurde im Rahmen dieser Arbeit die Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten nach Gabe von Oxaliplatin untersucht. Für die Bestimmung von Platin-DNA-Addukten wurden in der Literatur bereits verschiedene Methoden, wie HPLC-, CE- oder Antikörper-basierte Verfahren (ELISA) beschrieben (s. Kap. 1.5.3). Auch für die Bestimmung der Gesamtplatinierung der DNA, die ein Ziel dieser Arbeit war, existierten bereits Methoden in der Literatur. Diese beruhen auf der Isolierung der DNA mittels unterschiedlicher Techniken und der nachfolgenden Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins meist mittels

AAS oder ICP-MS. Da die Platinierung der DNA nach Gabe von Oxaliplatin im Vergleich zu anderen Platinkomplexen eher gering ist, wurde für die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit eine Methode benötigt, die die Quantifizierung von besonders niedrigen Konzentrationen ermöglicht. Daher wurde für diese Fragestellung die adsorptive Voltammetrie eingesetzt, die sich durch eine vergleichsweise niedrige Bestimmungsgrenze auszeichnet.

#### 4.1.1 Quantifizierung von Platin in Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten mittels GF-AAS

In der Literatur finden sich zahlreiche AAS-Methoden zur Bestimmung von Platin in biologischen Matrices (Plasma, Ultrafiltrat, Gewebe)<sup>148</sup>; die neueren Verfahren wurden in ähnlicher Weise wie die in dieser Arbeit verwendete Methode gemäß den internationalen Anforderungen für Bioanalytik validiert<sup>149,150,156</sup>.

In den drei zitierten Veröffentlichungen wird u.a. die Analyse von Platin in Plasma und Ultrafiltrat, jedoch nicht in Vollblut beschrieben. Im Folgenden wird die Methode dieser Arbeit mit den drei Literaturmethoden verglichen hinsichtlich der verwendeten Temperaturprogramme für Plasma und Ultrafiltrat, der daraus resultierenden Analysendauer, der Probenaufarbeitung, der Bestimmungsgrenzen sowie Richtigkeit und Präzision.

Allen Temperaturprogrammen, sowohl denen der publizierten Methoden als auch der Methode dieser Arbeit (s. Tab. 2.1 und 2.2), ist eine im Vergleich zu den anderen Abschnitten lange Trocknungsphase gemeinsam, in der das Lösungsmittel verdampft wird. Diese Phase liegt für alle Methoden je nach Matrix zwischen 38 - 43 s (*Kloft et al.*<sup>149</sup>) und 110 - 270 s (*Vouillamoz-Lorenz et al.*<sup>156</sup>). Mit 75 s lag die Trocknungsdauer für diese Arbeit zwar höher als bei *Kloft et al.* aber deutlich unter der längsten Trocknungsphase von bis zu 270 s. Diese beträchtlichen Unterschiede der einzelnen Verfahren sind v.a. auf die Injektionsvolumina zurückzuführen, die bei *Kloft et al.* bei 15 - 20  $\mu\text{L}$ , in dieser Arbeit durchgängig bei 20  $\mu\text{L}$  und bei *Vouillamoz-Lorenz* bei 50  $\mu\text{L}$  lagen. Je höher dieses Volumen, desto längere Trocknungsphasen werden benötigt, da sonst die Gefahr besteht, dass durch Siedeverzüge Teile der Probe vor der eigentlichen Messphase verloren gehen und daraus hohe Impräzisionen resultieren.

Die Veraschungstemperatur der Methode dieser Arbeit betrug je nach Matrix 1300 - 1700 °C. Damit lag sie im Vergleich zu den anderen Verfahren in einem ähn-

lichen Bereich: während *van Warmerdam et al.*<sup>150</sup> für alle Matrizes die Veraschung bei 1400 °C durchführten, betragen die Temperaturen bei *Vouillamoz-Lorenz et al.* 1700 - 1750 °C und bei *Kloft et al.* 1900 - 2050 °C. Platin gehört zu den schwerflüchtigen Metallen, so dass ohne nennenswerte Platinverluste hohe Veraschungstemperaturen zur Abtrennung von Matrixbestandteilen vor der Atomisierungsphase eingesetzt werden können. Je höher der Anteil an diesen Begleitstoffen ist, desto höhere Temperaturen werden benötigt, um diese vor der eigentlichen Messphase abzutrennen. Dabei muss ein Kompromiss gefunden werden zwischen der möglichst vollständigen Abtrennung der Matrix und einem möglichen Platinverlust vor der Atomisierungsphase.

Wie bereits erwähnt wurde bei *Vouillamoz-Lorenz et al.* ein Injektionsvolumen von 50 µL gewählt; dieses wurde für Ultrafiltrat pro Messung sogar dreimal injiziert, so dass mit 50 - 150 µL Probe eine große Menge an Matrixbestandteilen verascht werden musste. Um eine möglichst vollständige Abtrennung der Matrix zu erreichen, wählten die Autoren daher mit 1700 °C eine eher hohe Temperatur, die in dieser Arbeit nur für die niedrigen Konzentrationsbereiche mit hohem Anteil an Matrix eingesetzt wurde. Bei den hohen Konzentrationsbereichen konnte auf die Anwendung von Temperaturen über 1300 bzw. 1500 °C verzichtet werden; dies wirkte sich auch positiv auf die Lebensdauer der Graphitrohrküvetten aus. Die außergewöhnlich hohen Veraschungstemperaturen von *Kloft et al.* wurden versuchsweise auch in dieser Arbeit angewandt (Ergebnisse nicht gezeigt); sie resultierten in deutlich niedrigeren Platinsignalen. Die Möglichkeit, bis zu 500 - 700 °C höhere Temperaturen anzuwenden, ist wahrscheinlich gerätebedingt. Gründe dafür können die Art der Temperaturkontrolle und eine herabgesetzte Leitfähigkeit zwischen Graphitrohr und Metallkontakten sein<sup>197</sup>.

Aufgrund dieser z.T. beträchtlichen Unterschiede ist es nur eingeschränkt möglich, Methoden von einem Gerät auf das andere zu übertragen; eine Optimierung der einzelnen Phasen der Temperaturprogramme ist daher notwendig.

Für die Atomisierungstemperaturen gilt dies gleichermaßen. In dieser Arbeit lag diese bei 2700 °C für alle Matrizes und Konzentrationsbereiche. In den drei Literaturmethoden variierten die Atomisierungstemperaturen zwischen 2300 und 2880 °C.

Aus den Dauern der einzelnen Abschnitte der Temperaturprogramme resultierten unterschiedliche Analysenzeiten. Kurze Analysenzeiten ermöglichen einen hohen Probenumsatz und eine längere Lebensdauer der Graphitrohre, da diese dann nicht lange hohen Temperaturen ausgesetzt sind. Pro Injektion betrug die gesamte Messzeit in dieser Arbeit je nach Probenmatrix und Konzentrationsbereich 120 - 134 s. Damit lag

sie höher als die Analysenzeit von *Kloft et al.* (65 - 75 s), aber immer noch deutlich unter den Zeiten anderer Autoren. Während *van Warmerdam et al.* 155 s pro Messung benötigten, war die Analysenzeit von *Vouillamoz-Lorenz et al.* mit 211 - 400 s deutlich länger. Dies war, wie bereits erwähnt, auf das hohe Injektionsvolumen und die Notwendigkeit einer langen Veraschungsphase zurückzuführen.

Ein anderer Grund für die unterschiedlichen Analysendauern war die jeweilige Methode der Probenaufarbeitung. Für Plasma und Ultrafiltratproben führte die Arbeitsgruppe von *Vouillamoz-Lorenz* keine Aufarbeitung durch. Auch Plasmaproben wurden unverdünnt in das Graphitrohr injiziert (35  $\mu\text{L}$ ), in das zuvor 15  $\mu\text{L}$  einer 5 %-igen Triton-X-Lösung als Trocknungshilfe eingebracht worden waren. Dadurch war im Gegensatz zu allen anderen Methoden, in denen die Probenvorbereitung aus einem oder mehreren Verdünnungsschritten bestand, durch die auch die Konzentration der Matrixbestandteile reduziert wurde, der Anteil an Begleitstoffen sehr hoch. Dies machte lange Trocknungs- und Veraschungsphasen notwendig.

*Kloft et al.* bereiteten die Proben durch Verdünnung im Verhältnis 1 : 2,5 bzw. 1 : 80 mit einer 0,2 %-igen Mischung aus Triton-X und Antifoam-B zur Messung vor. Während Triton-X als Tensid die Oberflächenspannung der z.T. hochviskosen Proben herabsetzte, sollte das Antifoam-B einer durch den Tensidzusatz bedingten Schaumbildung, die letztendlich zu einer geringen Injektionspräzision führen kann, entgegenwirken. In dieser Arbeit wurde auf den Zusatz von Antifoam-B verzichtet, da auch ohne diesen Entschäumer akzeptable Injektionspräzisionen erreicht wurden. Die relativen Standardabweichungen nach zehnmaliger Injektion einer tensidhaltigen Probelösung (s. Tab. 3.10; Plasma- oder Vollblutproben) lagen unter 5,5 %. Nur im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden Werte von ca. 10 % erhalten. Für Ultrafiltratproben war der Zusatz eines Tensids zur Herabsetzung der Oberflächenspannung und als Trocknungshilfe nicht notwendig. Eine Verdünnung mit 6,5 %-iger Salpetersäure, um Konzentrationen innerhalb des Kalibrierbereichs zu erhalten, oder die direkte Messung der unverdünnten Probe war ohne negative Auswirkungen auf die Injektionspräzision oder auf Richtigkeit und Präzision der Messung möglich.

Für die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode wurden Bestimmungsgrenzen ermittelt, die für Ultrafiltrat bei 5,0 und für Plasma bei 20,0 ng/mL Platin lagen. Unterschritten wird diese nur von *Vouillamoz-Lorenz et al.* mit einer Konzentration von 10 ng/mL Platin im Plasma. Die niedrigere Quantifizierungsgrenze für Plasma, die ge-

nauso wie in dieser Arbeit nach Analyse von Proben mit der vermuteten Grenzkonzentration und Bestimmung von Richtigkeit und Präzision festgelegt wurde, ist auf das höhere Injektionsvolumen und die andersartige Probenvorbereitung zurückzuführen. In dieser Arbeit wurde die zu messende Plasmaprobe mit einer Ausgangskonzentration von 20,0 ng/mL vor der Messung im Verhältnis 1 + 3 verdünnt (s. Tab. 2.3), so dass eine Endkonzentration von 5,0 ng/mL resultierte. Bei einem Injektionsvolumen von 20 µL stand somit eine Platinmenge von 100 pg zur Messung zur Verfügung. Nach *Vouillamoz-Lorenz et al.* wurden 35 µL der Probe unverdünnt zusammen mit 15 µL Triton-X-Lösung injiziert. Es resultierte daher eine absolute Platinmenge von 350 pg. Somit bedeutet die höhere Bestimmungsgrenze für Plasma in dieser Arbeit keine geringere Empfindlichkeit des Geräts. Nach Modifizierung der Probenaufarbeitung und des Temperaturprogramms wäre eine weitere Senkung der Quantifizierungsgrenze wahrscheinlich möglich gewesen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht, da alle zu vermessenden Plasmaproben bis zu 500 h nach Infusionsbeginn deutlich über der Konzentration von 20 ng/mL lagen und somit die Konzentrations-Zeit-Verläufe hinreichend genau charakterisiert werden konnten.

Die Bestimmungsgrenze im Ultrafiltrat betrug bei *Vouillamoz-Lorenz et al.* ebenfalls 5,0 ng/mL. Allerdings benötigten die Autoren die Dreifachinjektion von 50 µL Probelösung, so dass insgesamt 750 pg Platin zur Messung in das Graphitrohr eingebracht wurden. In dieser Arbeit war für die korrekte Bestimmung von 5 ng/mL Platin die Einfachinjektion von 20 µL (100 pg) ausreichend. Eine weitere Absenkung der Bestimmungsgrenze, die mit Dreifachinjektionstechnik zumindest für wässrige Proben bis auf eine Konzentration von 1 ng/mL möglich war, wurde für Ultrafiltratproben nicht vorgenommen.

Richtigkeit und Präzision der Methode wurden anhand der Interday-Richtigkeit und -Präzision für SQC-Proben, die über den gesamten Messzeitraum dieser Arbeit vermessen worden waren, im Vergleich mit den Literaturdaten beurteilt (s. Tab. 3.11, Kap. 3.1.4). Für die Bestimmung im Plasma wurden bei gemeinsamer Betrachtung der beiden Konzentrationsbereiche für den relativen Fehler Beträge zwischen 0,1 % und 13,2 % erhalten. Die relativen Fehler für die Messung im Ultrafiltrat lagen bei 0,02 - 7,5 %. Damit wurden die internationalen Anforderungen an bioanalytische Verfahren hinsichtlich der Richtigkeit voll erfüllt, zumal die beiden höchsten Abweichungen vom Sollwert jeweils im Bereich der Bestimmungsgrenze auftraten.

Mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren war die etablierte Methode im Hinblick auf die Richtigkeit der Ergebnisse durchaus vergleichbar. Von *Kloft et al.* wurden relative Fehler von 0,8 - 7,1 % für Plasma und 1,9 - 13 % für Ultrafiltrat erhalten. Die Methode von *van Warmerdam et al.* zeichnete sich dagegen durch geringere relative Fehler aus, die für Ultrafiltrat höchstens bei 6,1 und für Plasma bei 7,1 % lagen. Allerdings war der untersuchte Konzentrationsbereich mit einer Bestimmungsgrenze von 47 ng/mL im Ultrafiltrat und 163 ng/mL im Plasma auch wesentlich höher als in dieser Arbeit. Auch *Vouillamoz-Lorenz et al.* berichteten geringere relative Fehler, die für Plasma und Ultrafiltrat höchstens 3,9 bzw. 5,3 % betrug. Beim Vergleich dieser Werte muss jedoch beachtet werden, dass die Autoren einen wesentlich kleineren Konzentrationsbereich abdeckten. Dieser umfasste 5 - 150 ng/mL und sah keine Verdünnung der Proben in unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen vor. In dieser Arbeit wurde ein wesentlich größerer Bereich abgedeckt, der für Plasmaproben 20,0 - 2000,0 und für Ultrafiltrat 5,0 - 500,0 ng/mL umfasste. Dies konnte nur durch die Verdünnung in zwei unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen erreicht werden. Durch diese Aufarbeitung der Proben war das Risiko von Fehlern höher als bei einer direkten Messung der Patientenprobe. Dies zeigte sich auch bei der Betrachtung der Ergebnisse für Ultrafiltratproben im Konzentrationsbereich von 5,0 bis 50,0 ng/mL, die ähnlich wie bei *Vouillamoz-Lorenz et al.* ohne Vorbereitung gemessen wurden. Hier wurden mit 0,03 - 5,3 % die geringsten relativen Fehler erhalten.

Die Interday-Präzision in dieser Arbeit erfüllte ebenfalls die Anforderungen an bioanalytische Verfahren: für Plasma wurden für die relative Standardabweichung während der Messungen Werte zwischen 6,3 und 13,3 % und für Ultrafiltrat 6,7 - 12,8 % erhalten.

Auch diese Werte waren mit Literaturdaten vergleichbar. Nur bei *Vouillamoz-Lorenz et al.* lagen die Werte für beide Matrices knapp unter 10 %. Der Grund dafür ist ähnlich wie bei der Richtigkeit in der direkten, ohne weitere Vorbereitung durchgeführten Messung der Probe zu sehen, wodurch die Höhe der relativen Standardabweichung begrenzt wird.

Neben den AAS-Verfahren werden auch häufig ICP-MS-Methoden zur Platin-Quantifizierung in biologischen Matrices eingesetzt. Eine solche Methode wurde von *Morrison et al.* validiert und für die Platinbestimmung in Ultrafiltrat, Plasma und Vollblut nach Applikation von Oxaliplatin eingesetzt<sup>151</sup>.

Die Probenaufarbeitung bestand für Ultrafiltrat lediglich in einem Verdünnungsschritt; für Vollblut und auch für Plasma wurde ein einstündiger, saurer Aufschluss mit 65 %-iger



Salpetersäure bei 90 - 100 °C durchgeführt. Dies entsprach in etwa der Vorgehensweise in dieser Arbeit, bei der Vollblutproben ebenfalls mit konzentrierter Salpetersäure aufgeschlossen wurden. Die Zeiten und Temperaturen, die zum Erhalt einer klaren Probelösung notwendig waren, lagen aber nur bei 20 Minuten und 60 °C. Die Differenz kommt wahrscheinlich durch das eingesetzte Volumen der Vollblutprobe zustande, das in dieser Arbeit bei 25 µL, bei *Morrison et al.* jedoch bei 100 µL lag. Der saure Aufschluss mit 65 %-iger Salpetersäure in der Wärme ist ein gängiges Verfahren, das häufig für die Aufarbeitung von Vollblut- und Gewebeproben vor einer AAS-Messung angewandt wird<sup>148</sup>.

Ein Vorteil der ICP-MS-Technik, der in Publikationen von Methoden zur Platinbestimmung immer wieder hervorgehoben wird, ist die niedrigere Bestimmungsgrenze gegenüber den AAS-Verfahren. Beim Vergleich der Bestimmungsgrenzen der eigenen Methode mit der von *Morrison et al.* fällt jedoch auf, dass dies nur für Ultrafiltrat der Fall ist. Hier wurde eine Konzentration von 1 ng/mL als Bestimmungsgrenze erreicht. Damit scheint dieses Verfahren eine fünfmal niedrigere Bestimmungsgrenze zu ermöglichen als die in dieser Arbeit etablierte Methode. Allerdings sollte beachtet werden, dass für die ICP-MS-Methode 100 µL der Ultrafiltratprobe benötigt wurden, während für die höher konzentrierten Proben im Rahmen dieser Arbeit lediglich 25 µL Probe eingesetzt wurden. Im niedrigen Konzentrationsbereich, in dem die Proben unverdünnt gemessen wurden, wurde für eine zweimalige Injektion pro Probe ca. 80 µL Ultrafiltrat benötigt. Eine Bestimmungsgrenze von 1 ng/mL wurde in dieser Arbeit für wässrige Proben durch Anwendung der Dreifachinjektionstechnik erreicht. Dies wäre wahrscheinlich auch mit Ultrafiltratproben, die im Vergleich zu gleich konzentrierten wässrigen Proben Absorptionen mit vergleichbarer Höhe zeigten (s. Tab. 3.6, Kap. 3.1.3.4), möglich gewesen. In Plasma und Vollblut wurde mit der ICP-MS-Methode eine Bestimmungsgrenze von jeweils 100 ng/mL erreicht. Dies liegt deutlich über den in dieser Arbeit ermittelten Bestimmungsgrenzen.

Hinsichtlich Richtigkeit und Präzision waren keine Vorteile der ICP-MS-Methode erkennbar. Für die Interday-Richtigkeit ermittelten *Morrison et al.* für Ultrafiltrat, Plasma und Vollblut Werte im Bereich von 0,4 - 12 %, 4,1 - 12 % bzw. 0,08 - 7,4 %. Dies entsprach im Wesentlichen den eigenen Ergebnissen für die drei Matrices (s. Tab. 3.11, Kap. 3.1.4). Die Interday-Präzisionen des ICP-MS-Verfahrens waren mit 2,8 - 15 % für Ultrafiltrat, 3,0 - 14 % für Plasma und 2,5 - 9,2 % für Vollblut der Präzision der Methode dieser Arbeit vergleichbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für die drei untersuchten Matrices eine valide analytische Methode etabliert wurde. Der Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren (sowohl AAS als auch ICP-MS) zeigte, dass die Methode mit vergleichsweise kleinen Probenvolumina auskommt, eine einfache und schnelle Probenaufarbeitung und kurze Analysenzeiten gewährleistet. Auch konnte durch die Aufteilung in zwei Kalibrierbereiche ein breiter Konzentrationsbereich abgedeckt werden. Dies war, verbunden mit einer ausreichend niedrigen Bestimmungsgrenze, eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der Methode in klinischen Untersuchungen.

Zusätzlich zu den gängigen Validierungsrichtlinien wurde neben den SQC-Proben, die in derselben Weise wie die zu vermessenden Patientenproben vor der Messung aufgearbeitet wurden, eine weitere Art von QC-Proben eingeführt, die bereits direkt nach der Herstellung aufgearbeitet, aliquotiert und in diesem Zustand eingefroren wurden (PQC-Proben; s. Kap. 2.2.5). Die Signalhöhe dieser PQC-Proben war von der Aufarbeitung am jeweiligen Analysentag unabhängig und erlaubte somit eine Aussage über den Zustand des Graphitrohrs. Die Graphitrohre zeigten aufgrund der verglichen mit anderen Metallen hohen Veraschungs- und Atomisierungstemperaturen nach ca. 100 Messungen erste Alterungserscheinungen, die sich in einer Abnahme der Platinsignale äußerte. Diese Signalschwächung, die sowohl Kalibratoren, Proben und QC-Proben betraf, änderte zwar die absoluten Absorptionswerte, nicht aber die Relationen der Absorptionen zueinander. Sie konnte mit Hilfe der PQC-Proben kontrolliert und somit die Validität der Ergebnisse während der gesamten Lebensdauer eines Graphitrohrs gewährleistet werden.

Abweichend von anderen Autoren wurden die Platinkonzentrationen in den Erythrozyten nicht direkt in den roten Blutkörperchen, sondern indirekt im Vollblut gemessen und dann nach Gl. 2.1 (s. Kap. 2.2.3) berechnet. Voraussetzung für die Anwendung dieser Gleichung ist, dass sich die Konzentrationen im Plasma und den Erythrozyten im Gleichgewicht befinden. Dies ist aber besonders während und kurz nach der Oxaliplatininfusion nicht gegeben. Daher wurde bei einigen Proben eines Patienten im Plasma eine so hohe Konzentration gemessen, dass für die Erythrozytenkonzentration nach Anwendung von Gl. 1.2 negative Werte erhalten wurden. Außerdem zeigten sich im Verlauf der Erythrozytenkonzentrationen über die Zeit starke Schwankungen anstatt einer kontinuierlichen Zu- oder Abnahme der Konzentration. Dies war u.a. auch auf das fehlende Gleichgewicht zwischen den einzelnen "Blutkompartimenten" zurückzuführen.

Die erwähnten Schwankungen können auch durch eine uneinheitliche Probenaufarbeitung in der Klinik zurückzuführen sein. Ist die Zeit zwischen der Blutentnahme und dem Einfrieren der Vollblutprobe bei einer Probe länger als bei der anderen, so kann in dieser längeren Zeitspanne ungebundenes Platin in die Blutzellen aufgenommen werden. Dies führt dann zu einer vergleichsweise hohen Zellkonzentration in der betreffenden Probe. Auch fehlendes Durchmischen der Vollblutprobe vor dem Aliquotieren führt zu fehlerhaften Ergebnissen.

Eine andere Methode zur Bestimmung von Platin in Erythrozyten besteht in der Isolierung der roten Blutkörperchen und der direkten Messung nach entsprechender Aufarbeitung. Diese Methode, die von *Massari et al.* angewandt wurde<sup>86</sup>, wurde in zwei Zyklen von Patienten, die nicht Bestandteil der pharmakokinetischen Untersuchung dieser Arbeit waren, mit der Berechnungsmethode verglichen. Die Zellpellets wurden dabei ähnlich wie Vollblutproben mit konzentrierter Salpetersäure in der Wärme lysiert bis eine klare Lösung erhalten wurde und anschließend mit Triton-X-Lösung verdünnt. Die erhaltenen Verläufe für die berechneten und die direkt gemessenen Erythrozytenkonzentrationen sind in Abb. 4.1 dargestellt.

Es zeigte sich, dass die direkte Messung in Erythrozyten v.a. während und kurz nach der Infusion zu plausibler erscheinenden Werten führt als die Berechnung aus der Vollblutkonzentration. Zu späteren Zeitpunkten näherten sich die Konzentrationen der beiden Methoden aneinander an, wie besonders im links dargestellten Beispiel erkennbar ist. Dort lagen die Differenzen zwischen den Werten im Bereich der Streuung des Messverfahrens.

Jedoch ist auch das Verfahren der direkten Messung in Erythrozyten problematisch. Es besteht immer die Gefahr, dass bei der Aliquotierung einer Erythrozytenprobe Plasma mit entnommen wird. Dadurch würde die gemessene Konzentration wiederum verfälscht. Um dies zu vermeiden, müssten die Zellen nach ihrer Isolierung mit einer geeigneten isotonischen Lösung mehrmals gewaschen werden. Diese Methode, die allerdings den Aufwand bei der Probenaufarbeitung in der Klinik direkt nach der Blutentnahme stark erhöht und somit in der Praxis nur schwer umzusetzen ist, wurde von *Long et al.* für die Untersuchung von Erythrozytenkonzentrationen nach Gabe von Cisplatin angewandt<sup>198</sup>.

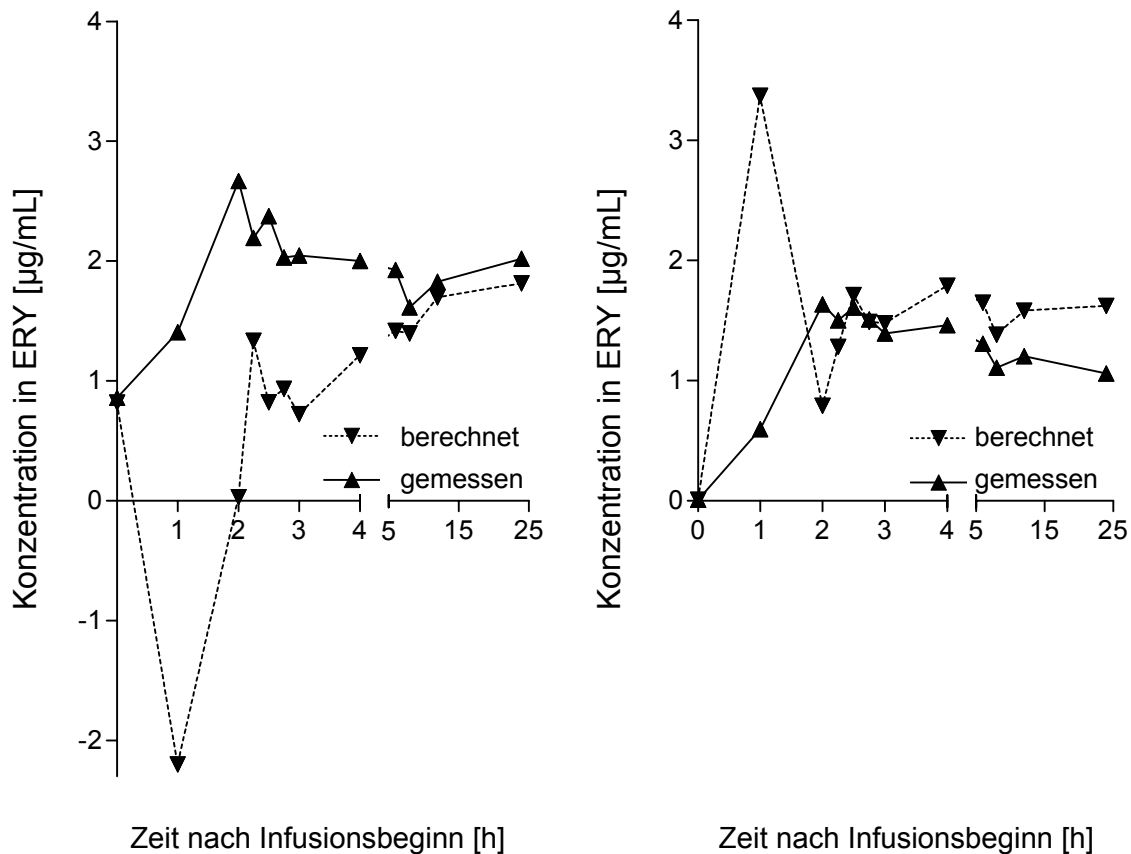


Abb. 4.1 Platinkonzentrationen in Erythrozyten bei 2 Patienten nach Berechnung der Konzentrationen mittels Gl. 1.2 (▼) und nach direkter Messung in isolierten Erythrozyten (▲)

#### 4.1.2 Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten in klinischen Proben nach Gabe von Oxaliplatin.

Im Gegensatz zu Cisplatin, für das zahlreiche Untersuchungen zur In-vivo-Adduktbildung publiziert wurden, existieren für Oxaliplatin bisher nur zwei Veröffentlichungen<sup>123,143</sup>, in denen Platin-Nukleotid-Verhältnisse während einer Oxaliplatin-Therapie beschrieben wurden. In beiden Untersuchungen wurde die ICP-MS-Technik zur Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins verwendet.

Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren basiert auf der Methode von Kloft *et al.*<sup>161</sup>. Es gliedert sich in die Abschnitte Leukozytenisolierung, Extraktion der DNA aus den

Leukozyten, DNA-Quantifizierung und Quantifizierung des an der DNA gebundenen Platins, die nach *Kloft et al.* mittels GF-AAS durchgeführt wurde.

Direkt nach der Blutabnahme wurde die Isolierung der Leukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation vorgenommen. Denkbar wäre auch die direkte Isolierung der DNA aus Vollblut, da ja von den Blutzellen nur die Leukozyten DNA enthalten. Bei dieser Vorgehensweise der DNA-Isolierung aus Vollblut kann es aber zu einer Ex-vivo-Bildung von Platin-DNA-Addukten und somit zu einer fehlerhaften Bestimmung der Platin-DNA-Adduktbildung kommen. Ungebundenes Platin kann bei dieser Methode während der Probenaufarbeitung in die Leukozyten diffundieren und dort nachträglich an die DNA binden. Wie *Ma et al.* feststellten, resultieren so wesentlich höhere Platin-Nukleotid-Verhältnisse als wenn die DNA aus isolierten Leukozyten extrahiert wird. Der Unterschied ist besonders dann von Bedeutung, wenn die Konzentrationen an freiem Platin noch sehr hoch sind. Dies ist für Oxaliplatin und auch Cisplatin nur kurz nach Infusionsende der Fall. Für Carboplatin, das nur langsam an Proteine bindet, ist auch lange nach Infusionsende der Gehalt an ungebundenem Platin noch sehr hoch, welches ex vivo an die DNA binden kann<sup>199</sup>.

An die DNA-Isolierung sind im Hinblick auf eine nachfolgende Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte diverse Anforderungen zu stellen. Neben einer hohen DNA-Ausbeute, von der die Quantifizierbarkeit des an die DNA gebundenen Platins abhängt, sollte die DNA in erforderlicher Reinheit isoliert werden können. Dies war mit allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolierungsmethoden (Phenolmethode, Festphasenextraktion mittels QIAamp<sup>®</sup> DNA-Blood-Kit und auf Ionenaustausch beruhende Extraktion mittels QIAGEN<sup>®</sup> Genomic-Tip-System) möglich. Die Reinheitskriterien an die erhaltene DNA-Lösung, die in Kap. 2.3.4 dargestellt wurden, konnten für alle Proben erfüllt werden. Somit war gewährleistet, dass Platin-DNA- und nicht Platin-Protein-Addukte gemessen wurden. In einer Untersuchung von *Liu et al.* wurden die Reinheitskriterien hinsichtlich des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Purine der DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren der Proteine) mit Werten zwischen 0,77 und 1,45 nicht erfüllt. Offenbar konnten die Proteine nicht vollständig von der DNA abgetrennt werden. Die Autoren begründen dies mit der Anwesenheit von Addukten, in denen durch den Platinkomplex DNA und Proteine miteinander verknüpft werden<sup>123</sup>. Dies ist theoretisch möglich, steht aber im Widerspruch zu anderen Untersuchungen, in denen die Isolierung von DNA

hoher Reinheit gelang<sup>161</sup> und nicht durch Platin-Mischaddukte aus DNA und Proteinen, die durch Oxaliplatin im Vergleich zu Cisplatin in wesentlich geringerem Ausmaß gebildet werden<sup>200</sup>, beeinträchtigt wurde.

Eine wie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Überprüfung verschiedener DNA-Isolierungsverfahren hinsichtlich der DNA-Ausbeute und -Reinheit sowie der Platin-Nukleotid-Verhältnisse nach Analyse von In-vitro-Proben wurde bisher nicht veröffentlicht, so dass die erhaltenen Ergebnisse nicht mit denen anderer Autoren verglichen werden können. Die Vor- und Nachteile der drei Methoden wurden bereits im Ergebnisteil (s. Kap. 3.2.1) ausführlich erörtert. Der für alle weiteren Untersuchungen gewählte QIAamp<sup>®</sup> DNA-Blood-Kit erschien aufgrund eigener Ergebnisse des Vorversuchs und der Ergebnisse von *Kloft et al.*<sup>161</sup> für die DNA-Isolierung und die nachfolgende Bestimmung der Platin-DNA-Adduktbildung geeignet.

Neben einer bereits beschriebenen möglichen Verfälschung der Platin-DNA-Verhältnisse durch miterfasste Proteine ist eine Beeinflussung ihrer Menge auch durch vorhandene Platin-RNA-Addukte denkbar, da keine der untersuchten DNA-Isolierungsmethoden zwischen DNA und RNA differenzieren kann. Daher wurde in einer vergleichenden Untersuchung mit und ohne RNAase deren Einfluss auf die Höhe der Platin-Nukleotid-Verhältnisse charakterisiert. Es zeigte sich, dass eine Verfälschung durch RNA-Addukte, soweit dies nach diesem In-vitro-Versuch beurteilt werden kann, in Leukozyten nicht stattfindet. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von *Ma et al.*, die ebenfalls sowohl hinsichtlich der Nukleotidmenge als auch der Platin-Nukleotid-Verhältnisse keine signifikanten Unterschiede nach Aufarbeitung mit oder ohne RNAase feststellen konnten<sup>199</sup>.

Die UV-spektrometrische Quantifizierung der DNA ist ein etabliertes Verfahren<sup>179</sup>. Damit konnten die DNA-Konzentrationen richtig und präzise bestimmt werden. Der Vorteil der Methode von *Kloft et al.*<sup>161</sup>, bei der die UV-Bestimmung vor der Platinquantifizierung stattfindet, besteht darin, dass so die gesamte Probe zur Platinbestimmung zur Verfügung steht, da es sich bei der UV-Spektrometrie um ein nicht destruktives Verfahren handelt.

Nach der DNA-Isolierung und -Quantifizierung sollte eine Matrix erhalten werden, in der Platin ohne nennenswerte Interferenzen bestimmt werden kann. Lassen sich diese nicht vermeiden, so sollte die Bestimmung aber mit einer reproduzierbaren Wiederfindungs-

rate möglich sein. Mit der in dieser Arbeit angewandten Festphasenextraktion der DNA konnte mittels GF-AAS Platin in der erhaltenen Matrix nicht vollständig wiedergefunden werden. Ščančar *et al.* kamen bei der Platinbestimmung in DNA-haltigen Proben mittels AAS zu ähnlichen Ergebnissen. Sie führten die verringerte Wiederfindung auf die vergleichsweise hohe Viskosität von DNA-Lösungen, die in ihren Experimenten Konzentrationen von 300 - 400 µg/mL aufwiesen, zurück. Dies führte dazu, dass die Probelösung nicht korrekt in die Graphitrohrküvette injiziert werden konnte und z.T. aus der Öffnung des Graphitrohrs austrat. Die Autoren konnten das Problem durch Verdünnen der Proben mit 32 %-iger Salpetersäure lösen<sup>201</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine unvollständige Tropfenablage der DNA-haltigen Proben in die Graphitrohrküvette nicht beobachtet. Auch konnte die Beeinflussung der Wiederfindungsrate durch die DNA selbst durch einen Versuch, in dem DNA-Lösungen mit Platin gespikt und vermessen wurden, ausgeschlossen werden (s. Kap. 3.2.1). Auch müssten bei der Störung der AAS-Messung durch die DNA selbst die Wiederfindungsraten nach den beiden anderen Verfahren (Phenolmethode und Genomic-Tip-Kit) in einem ähnlichen Bereich liegen; dies war jedoch v.a. für die Phenolmethode nicht der Fall (s. Kap. 3.2.1). Weitere Versuche, bei denen die zur Festphasenextraktion verwendeten Säulen mit Wasser gewaschen und diese Flüssigkeiten mit Platin gespikt und vermessen wurden, deuten eher darauf hin, dass Bestandteile des Säulenmaterials die Wiederfindung negativ beeinflussen. Da die Wiederfindungsrate zwar weniger als 100 % betrug, jedoch über den Konzentrationsbereich von 5 - 50 ng/mL reproduziert werden konnte, wurden die erhaltenen Werte mit einem Korrekturfaktor multipliziert.

Die Abweichung der Absorptionen der Leukozytenproben von denen des reinen Wassers war im Gegensatz zu den anderen Matrices von besonderer Bedeutung, da hier nicht wie bei den anderen Messungen matrixadaptiert kalibriert werden konnte. Dafür wären sehr große Mengen Buffy Coat oder Vollblut benötigt worden, die für die Messungen nicht zur Verfügung standen. Ähnlich wie von Kloft *et al.*<sup>161</sup> wurde daher die Kalibrierung in wässriger Lösung vorgenommen und somit war eine Korrektur der Messwerte für den Erhalt eines "richtigen" Ergebnisses notwendig. Eine andere Möglichkeit zur Kompensation der durch Matrixeffekte verringerten Wiederfindung wäre die Anwendung des Standardadditionsverfahrens gewesen. Dieses Verfahren ermöglicht eine nahezu perfekte Matrixadaptierung auch bei wechselnder Zusammensetzung von Probe zu Probe. Problematisch ist allerdings, dass ein größeres Probenvolumen benötigt wird als bei einer "normalen" Messung, da außer der eigentlichen Messung der

Probe selbst mit der Probelösung eine Kalibrierreihe aufgenommen werden muss. Dazu wäre es notwendig gewesen, die Rückstände nach dem Trocknen der DNA-Eluate in der Speed-Vac<sup>®</sup> in einem größeren Volumen Wasser aufzunehmen. Die Vergrößerung des Probenvolumens wäre aber mit einer Verringerung der Platinkonzentration möglicherweise unter die Bestimmungsgrenze einhergegangen.

Neben der Wiederfindungsrate wurden für das AAS-Verfahren zur Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins auch die Selektivität, Bestimmungsgrenze und Richtigkeit sowie Präzision untersucht. Dabei wurden diese Untersuchungen nicht für die nach der DNA-Isolierung erhaltene Matrix, sondern für Wasser durchgeführt. Mit dem in dieser Arbeit etablierten Verfahren konnte nach Anwendung der Dreifachinjektionstechnik (3 x 20 µL) eine Bestimmungsgrenze von 1,0 ng/mL erreicht werden. Dies entspricht einer absoluten Platinmenge von 60 pg. Damit wird die Bestimmungsgrenze von *Kloft et al.* (600 pg)<sup>149</sup> und *Reed et al.*, die 1988 die erste AAS-Methode zur Bestimmung von Platin-DNA-Addukten beschrieben (100 pg),<sup>177</sup> deutlich unterschritten. Mit einer von *Reed et al.* angestrebten DNA-Menge von 70 µg pro Probe ergibt sich für diese Methode eine Bestimmungsgrenze von 2,4 Pt-Atomen : 10<sup>6</sup> Nukleotiden. Bei gleicher DNA-Menge können mit dem Verfahren dieser Arbeit 1,4 Pt-Atome : 10<sup>6</sup> Nukleotide bestimmt werden. In vielen Fällen war die isolierte DNA-Menge aus den Patientenproben jedoch geringer als die im Median isolierten 75 µg [1,7 - 662 µg]; auch waren insbesondere nach Gabe von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin niedrigere Platin-Nukleotid-Verhältnisse zu bestimmen, so dass in vielen Fällen trotz der vergleichsweise niedrigen Bestimmungsgrenze die Quantifizierung nicht mittels AAS möglich gewesen wäre.

In dieser Arbeit wurden den Patienten für die Bestimmung der Platin-DNA-Addukte 15 mL Vollblut entnommen. Dieses Volumen konnte aus medizinischer und ethischer Hinsicht nicht, wie häufig in der Literatur beschrieben, auf 20 - 50 mL gesteigert werden<sup>135,136,141</sup>, um so die DNA-Ausbeute zu erhöhen und eventuell eine Bestimmung mittels GF-AAS durchzuführen.

Daher wurde für die Bestimmung der Platin-DNA-Addukte in In-vivo-Proben das Verfahren der adsorptiven Voltammetrie angewandt. Diese Methode wurde für diverse biologische Matrices im INSTITUT FÜR SPEKTROCHEMIE UND ANGEWANDTE SPEKTROSKOPIE (Dortmund) etabliert und validiert; ihre Bestimmungsgrenze lag bei 3 pg Platin<sup>152</sup>, so dass bei einer DNA-Menge von 70 µg mit dieser Methode Platin-Nukleotid-Verhältnisse von 0,05 Pt-Atomen : 10<sup>6</sup> Nukleotide bestimmt werden konnten. Im Rahmen dieser Ar-



beit wurde die Platinbestimmung in der nach der DNA-Isolierung erhaltenen Matrix mittels adsorptiver Voltammetrie hinsichtlich Richtigkeit und Präzision überprüft (s. Kap. 3.2.3.2). Die Ergebnisse erfüllten voll die Anforderungen an bioanalytische Verfahren. Das bereits mehrfach angesprochene Problem der unvollständigen Platinwiederfindung bestand für diese Methode nicht. Die Wiederfindungsrate lag für alle untersuchten Konzentrationen nahe 100 %, so dass keine Korrektur der Werte vorgenommen wurde. Offenbar gelang durch die aufwändige Probenvorbereitung die Abtrennung von allen potenziell störenden Begleitstoffen in der Matrix. Ein weiterer Grund für die korrekten Ergebnisse in dieser speziellen Matrix war der Einsatz des Standardadditionsverfahrens und damit einer nahezu optimalen Matrixadaptierung. Dieses Verfahren war hier ohne Beeinträchtigung der Bestimmungsgrenze anwendbar, da aufgrund der nicht-destruktiven Natur dieser elektrochemischen Bestimmung sowohl die Messung der Probe als auch der Kalibrierpunkte in derselben Lösung stattfinden konnte.

Neben der Bestimmung von Richtigkeit, Präzision und Wiederfindung für die reine Platin-Bestimmung wurde das gesamte Verfahren der Adduktquantifizierung mit seinen diversen Aufarbeitungsschritten hinsichtlich Präzision überprüft. Diese war mit einer relativen Standardabweichung von 10,4 bzw. 7,2 % für die Intra- und Interday-Präzision nach Bestimmung mittels GF-AAS und mit einer Interday-Präzision von 11,8 % nach Anwendung der adsorptiven Voltammetrie, besonders im Hinblick auf die Komplexität des Verfahrens, akzeptabel. Die Werte lagen z.T. unter denen der Untersuchung von *Eickhoff*, die eine relative Standardabweichung von 15 % ermittelte<sup>202</sup>.

Für diese Untersuchung der "Gesamt"-Präzision des Verfahrens wurden dieselben Proben sowohl mit GF-AAS als auch adsorptiver Voltammetrie gemessen und so ein Vergleich der beiden Platinquantifizierungsmethoden ermöglicht.

Diese vergleichende Untersuchung zeigte, dass mit beiden Verfahren übereinstimmende Platin-Nukleotid-Verhältnisse quantifiziert werden. Dieses Ergebnis bestätigte auch noch mal die Vorgehensweise, nach der die Ergebnisse der GF-AAS-Messung mit einem Korrekturfaktor umgerechnet wurden.

Mit der hier vorgestellten Methode wurden die Voraussetzungen geschaffen, die Adduktbildung in Leukozyten auch bei geringem Ausmaß der DNA-Platinierung in klinischen Proben zu untersuchen und deren Variabilität zuverlässig zu charakterisieren. Somit wurden weiterführende Untersuchungen hinsichtlich Einflussfaktoren oder Korrelationen der Platin-DNA-Adduktbildung mit klinischen Effekten möglich.

## 4.2 Individuelle Pharmakokinetik nach Gabe von Oxaliplatin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pharmakokinetik von Platin nach Gabe von 3 unterschiedlichen oxaliplatinhaltigen Therapieschemata untersucht (60, 130 und 85 mg/m<sup>2</sup>). Die ermittelten pharmakokinetischen Parameter werden im Folgenden mit den in der Literatur veröffentlichten Werten für AUC, Clearance, Verteilungsvolumen und Halbwertszeit in den Matrices Ultrafiltrat, Plasma, Vollblut und Erythrozyten verglichen (s. Tab. 4.1 - Tab. 4.4). Von den Daten der mit 85 mg/m<sup>2</sup> behandelten Patienten wurden nur die Gaben herangezogen, die ohne Hyperthermie verabreicht worden waren.

Beim Vergleich der Ergebnisse muss beachtet werden, dass sich die Methodik der verschiedenen Studien stark auf die ermittelten pharmakokinetischen Parameter auswirkt. Neben der angewandten Bestimmungsmethode für Platin und ihrer Bestimmungsgrenze spielen auch die Anzahl und Abnahmezeitpunkte der ausgewerteten Proben, die Infusionsdauer, das zur Auswertung verwendete pharmakokinetische Modell und das untersuchte Patientenkollektiv hinsichtlich der Variabilität der Ergebnisse eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit, in der Oxaliplatin immer als zweistündige Infusion verabreicht wurde, konnten Proben bis zu 24 bzw. 48 h nach Infusionsbeginn in die Auswertung einbezogen werden. Diese Daten wurden in Übereinstimmung mit Literaturangaben mit Hilfe eines Zwei-Kompartiment-Modells für Plasma und Ultrafiltrat ausgewertet. Aus Vollblutdaten, die bisher nur in einer Studie beschrieben wurden (s. Tab. 4.3), wurden bei einem Sammlungszeitraum von 24 h die pharmakokinetischen Parameter mit Hilfe eines Ein-Kompartiment-Modells, ansonsten mit einem Zwei-Kompartiment-Modell abgeschätzt.

Von einigen Patienten lagen nach Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin auch Proben bis zu 400 h nach Infusionsbeginn vor. Für diese zeigte sich für Plasma und Vollblut eine bessere Anpassung an ein Drei-Kompartiment-Modell, während für die entsprechenden Ultrafiltratkonzentrationen, die größtenteils nur bis zu 300 h nach Infusionsbeginn vorlagen und messbar waren, das Zwei-Kompartiment-Modell angewandt wurde.

Die Bestimmungsgrenze der Platin-Bestimmungsmethode reichte für Plasma und Vollblut aus, auch zu späten Zeitpunkten Platin zuverlässig zu quantifizieren. Für Ultrafiltrat lagen entweder späte Proben (300 - 500 h nach Infusionsbeginn) nicht vor oder ihre Konzentrationen lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,005 µg/mL.

Tab. 4.1 Pharmakokinetische Parameter von Platin im Ultrafiltrat nach Gabe von Oxaliplatin (MW  $\pm$  SD)

Referenz	Dosis [mg/m <sup>2</sup> ]	t <sub>inf</sub> [h]	C <sub>max</sub> [ $\mu$ g/mL]	AUC <sub>∞</sub> [ $\mu$ g·h/mL]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]	t <sub>1/2<math>\lambda</math>1</sub> [h]	t <sub>1/2<math>\lambda</math>2</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	Bemerkungen
Diese Arbeit	130	2	1,99 $\pm$ 1,06	8,24 $\pm$ 3,04	15,9 $\pm$ 4,0	306 $\pm$ 49	0,27 $\pm$ 0,06	n.b.	20,2 $\pm$ 6,1	Z I + II; FAAS; 0 - 48 h <sup>a</sup>
	130	2	2,35 $\pm$ 1,19	11,9 $\pm$ 4,5	11,4 $\pm$ 4,1	518 $\pm$ 297	0,32 $\pm$ 0,07	n.b.	44,6 $\pm$ 35,8	Z I + II; FAAS; 0 - 300 h <sup>a</sup>
	85	2	0,87 $\pm$ 0,37	6,22 $\pm$ 1,67	12,8 $\pm$ 3,4	359 $\pm$ 141	0,27 $\pm$ 0,10	n.b.	27,3 $\pm$ 12,0	Z I + II ohne Hyperthermie; 0 - 24/48 h <sup>a</sup>
	60	2	0,36 $\pm$ 0,15	4,02 $\pm$ 1,59	14,7 $\pm$ 5,3	285 $\pm$ 108	0,22 $\pm$ 0,09	n.b.	17,5 $\pm$ 4,8	Z I - III; FAAS; 0 - 24 h <sup>a</sup>
Graham et al., 2000 <sup>38</sup>	85	2	0,68 $\pm$ 0,08	4,25 $\pm$ 1,18	18,5 $\pm$ 4,7	295 $\pm$ 142	k.A.	k.A.	k.A.	Z III; ICP-MS
Wasser- man et al., 1999 <sup>203</sup>	85	2	k.A.	7,9 $\pm$ 4,5	14,8 $\pm$ 11,1*	k.A.	k.A.	k.A.	23,2 $\pm$ 8,8	Z I - II; FAAS; 0 - 240 h <sup>a</sup>
Gross- Goupil et al., 2002 <sup>121</sup>	85	2	0,90 $\pm$ 0,28	7,8 $\pm$ 3,7	12,7 $\pm$ 4,8*	k.A.	k.A.	k.A.	23,0 $\pm$ 9,0	Z I; FAAS; 0 - 192 h <sup>a</sup>
	110	2	1,08 $\pm$ 0,68	8,1 $\pm$ 3,1	15,5 $\pm$ 6,0	k.A.	k.A.	k.A.	22,0 $\pm$ 10,0	Z I; FAAS; 0 - 192 h <sup>a</sup>
Massari et al., 1998 <sup>86</sup>	130	2	1,09 $\pm$ 0,37	5,21 $\pm$ 2,12	25,7 $\pm$ 8,5	338 $\pm$ 155	0,42 $\pm$ 0,23	n.b.	25,2 $\pm$ 26,5	Z I; NRF FAAS; 0 - 48 h <sup>a</sup>
			1,28 $\pm$ 0,55	9,16 $\pm$ 4,28	14,2 $\pm$ 6,0	279 $\pm$ 168	0,61 $\pm$ 0,78	n.b.	23,2 $\pm$ 13,8	Z I; IRF FAAS; 0 - 48 h <sup>a</sup>
Takimo- to et al., 2003 <sup>119</sup>	130	2	1,31 $\pm$ 0,19	16,5 $\pm$ 5,0	4,20 $\pm$ 1,25*	361 $\pm$ 184*	k.A.	k.A.	k.A.	Z I; ICP-MS; 0 - 500 h <sup>a</sup>
Kern et al., 1999 <sup>204</sup>	130	4	1,61 $\pm$ 0,55	20,2 $\pm$ 7,0	13,3 $\pm$ 3,9	349 $\pm$ 132	0,09 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,54	27,3 $\pm$ 10,6	Z I - II; FAAS; 0 - 24 h <sup>a</sup>
Gamelin et al., 1997 <sup>35</sup>	130	2	0,45 $\pm$ 0,08	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	163 $\pm$ 48	Z I; ICP-MS 0 - 500 h <sup>a</sup>
Extra et al., 1998 <sup>108</sup>	130	2	1,21 $\pm$ 0,10	11,9 $\pm$ 4,6	10,1 $\pm$ 3,1	582 $\pm$ 261	0,28 $\pm$ 0,06	16,3 $\pm$ 2,9	273 $\pm$ 19	Z V; ICP-MS 0 - 500 h <sup>a</sup>

\* auf KOF normierte Werte

t<sub>inf</sub> Infusionsdauer

n.b. nicht bestimmt

k.A. keine Angabe

Z untersuchter Zyklus

a Probensammlungszeitraum nach Infusionsbeginn

FAAS Flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie

ICP-MS Induktiv-gekoppelte-Plasma-Massenspektrometrie

NRF Pat. mit normaler Nierenfunktion (CL<sub>CR</sub> 63 - 136 mL/min)IRF Pat. mit verminderter Nierenfunktion (CL<sub>CR</sub> 27 - 57 mL/min)

Beim Vergleich der  $C_{\max}$ -Werte im Ultrafiltrat dieser Arbeit (s. Tab. 4.1) mit den Literaturdaten fällt auf, dass die Maximalkonzentrationen nach Gabe von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin deutlich höher als die Maximalwerte vergleichbarer Studien waren. Außerdem zeigte sich bei den Werten dieser Arbeit eine vergleichsweise hohe Standardabweichung. Ein Grund für diese hohen Konzentrationen und ihre starke Streuung könnte eine ungleichmäßige Infusionsgeschwindigkeit sein. Die Infusion wurde in der Regel nicht mit Hilfe eines Infusomaten verabreicht, so dass eine konstante Geschwindigkeit nicht gewährleistet war. Da sich außerdem bei einigen Patienten während der Infusion höhere Platinkonzentrationen zeigten als am Infusionsende, ist dies sehr wahrscheinlich. Nach Gabe von  $85 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin lagen die  $C_{\max}$ -Werte im Bereich der Literaturdaten. Für den Vergleich der Maximalwerte und auch anderer pharmakokinetischer Parameter nach Applikation von  $60 \text{ mg/m}^2$  lagen in der Literatur keine gleichartigen Studien vor; die Werte erscheinen aber vor dem Hintergrund der beiden anderen Schemata plausibel.

Die Bestimmung aller anderen Parameter wurde, wie bereits angedeutet, stark durch die Dauer der Beobachtungsphase nach Infusionsbeginn und dem zur Auswertung herangezogenen pharmakokinetischen Modell beeinflusst.

Nach Gabe von  $130 \text{ mg/m}^2$  und einer Beobachtung über 48 h waren die Bedingungen der Studie von *Massari et al.* am ehesten mit denen dieser Arbeit vergleichbar. Beide Untersuchungen ergaben ähnliche pharmakokinetische Parameter, wobei die Daten dieser Arbeit meist zwischen den Daten der von *Massari* untersuchten Patienten mit normaler und eingeschränkter Nierenfunktion, lagen<sup>86</sup>.

*Kern et al.* untersuchten lediglich einen Zeitraum von 24 h nach Beginn der Infusion, die sich über 4 h erstreckte. Bis auf die hohe  $AUC_{\infty}$  ( $20,2 \pm 7,0 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ) und die  $t_{1/2\lambda_1}$ , die mit 0,09 h sehr niedrig war, lagen auch die Werte dieser Untersuchung unter Berücksichtigung ihrer Standardabweichungen im Bereich der eigenen Daten. Die hohe  $AUC_{\infty}$  ist wahrscheinlich auf die Auswertung des Datensatzes mit einem Drei-Kompartiment-Modell zurückzuführen, obwohl lediglich Daten von 24 h zur Verfügung standen. Dadurch war die terminale Eliminationsphase eventuell nicht durch eine ausreichende Zahl von Messpunkten charakterisiert und die Extrapolation nach Unendlich bei der Abschätzung der  $AUC$  ungenau. Die sehr kurze  $t_{1/2\lambda_1}$  kommt wahrscheinlich auch durch die Auswertung mittels Drei-Kompartiment-Modell zustande. Die beiden anderen Halbwertszeiten liegen eher wieder im Bereich der Halbwertszeiten dieser Arbeit und anderer publizierter Studien<sup>204</sup>.

In der Untersuchung von *Gross-Goupil et al.* wurden im Rahmen einer Interaktionsstudie zwei Dosierungen von Oxaliplatin eingesetzt. Nach Gabe von  $110 \text{ mg/m}^2$ , d.h. 84 % von  $130 \text{ mg/m}^2$  über einen Beobachtungszeitraum von 200 h wurden pharmakokinetische Parameter bestimmt, die in derselben Größenordnung lagen wie in dieser Arbeit<sup>121</sup>.

Bei Betrachtung der Werte, die in einem Zeitraum von bis zu 300 h nach Infusionsbeginn erhalten wurden, zeigten sich Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der Studie von *Extra et al.* Bis auf die Halbwertszeit waren die Parameter fast identisch mit ähnlichen Standardabweichungen wie in dieser Arbeit. Durch die Anwendung des Zweikompartiment-Modells und aufgrund des etwas kürzeren Beobachtungszeitraums wurde für die terminale Halbwertszeit  $t_{1/2z}$  ein Wert erhalten, der etwas höher als die von *Extra et al.* ermittelte  $t_{1/2\lambda_2}$ , aber deutlich unter der terminalen Halbwertszeit von 273 h liegt<sup>108</sup>.

Die pharmakokinetischen Parameter dieser Arbeit, die nach Gabe von  $85 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin ermittelt wurden, stimmten mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien überein, obwohl lediglich die Daten von 4 Patienten zur Auswertung zur Verfügung standen. Die Parameter für die Patienten, die  $60 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin erhielten, konnten nicht direkt mit Literaturwerten verglichen werden, da solche bisher nicht publiziert wurden.

Ähnlich wie für Ultrafiltrat zeigten sich vermutlich wegen der nicht konstant gehaltenen Infusionsgeschwindigkeit bei den Maximalkonzentrationen dieser Arbeit im Plasma (s. Tab. 4.2) etwas höhere Werte als bei vergleichbaren publizierten Studien. Die Abweichungen waren relativ gering und lagen im Bereich der Standardabweichungen.

Wie bereits erwähnt, stimmten die Bedingungen dieser Arbeit nach Applikation von  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin und einer Probensammlung bis 48 h nach Infusionsbeginn mit der Untersuchung von *Massari et al.* überein<sup>86</sup>.

Ähnlich wie die pharmakokinetischen Parameter des Ultrafiltrats, die in beiden Studien in einer vergleichbaren Größenordnung lagen, waren auch für Plasma die Halbwertszeiten und die Verteilungsvolumina ähnlich. Für die  $AUC_{\infty}$  zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen der vorliegenden Arbeit und *Massari et al.* Da weitere Studien zum Vergleich der eigenen Werte für die  $AUC_{\infty}$  nicht zur Verfügung standen, wurde die mittels Trapezregel bestimmte  $AUC_{0-48 \text{ h}}$  herangezogen, die außer in der Studie von *Massari et al.* noch in zwei weiteren Studien bestimmt worden war. Für Zyklus I betrug die in dieser Arbeit ermittelte  $AUC_{0-48 \text{ h}}$   $60,6 \pm 8,1 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  (s. Tab. 3.27).

Damit stimmte sie gut mit in der Literatur berichteten Werten überein, die im ersten Behandlungszyklus bei  $59,1 \pm 11,4^{108}$ ,  $71,5 \pm 13,3^{33}$  und  $50,4 \pm 12,2 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}^{86}$  lagen.

Bei der Auswertung der Daten, die bis zu 400 h nach Infusionsbeginn erhoben wurden, zeigten sich wie für Ultrafiltrat Übereinstimmungen mit den Literaturwerten<sup>108</sup>. Aufgrund der längeren Probensammlung konnte der Abfall der Konzentrationen über die Zeit, der ja im Plasma langsamer verläuft als im Ultrafiltrat, wesentlich besser charakterisiert und die pharmakokinetischen Parameter mit größerer Sicherheit abgeschätzt werden.

Ein Vergleich der Daten nach Gabe von  $85 \text{ mg}/\text{m}^2$  Oxaliplatin gestaltet sich schwierig, da nur die beiden Werte der Gabe I ohne Hyperthermie herangezogen werden können. Diese liegen in etwa im Bereich der Literaturdaten.

Nach Applikation von  $60 \text{ mg}/\text{m}^2$  wird der Vergleich mit Literaturwerten dadurch erschwert, dass die in Tab. 4.2 angegebenen Mittelwerte nicht nur Daten aus verschiedenen Zyklen, sondern auch von unterschiedlichen Behandlungstagen innerhalb der jeweiligen Zyklen zusammenfassen. Eine getrennte Auswertung nach Zyklus bzw. Behandlungstag, die für die korrekte Charakterisierung der Variabilität notwendig gewesen wäre, war aufgrund der geringen Patientenzahl nicht möglich. Auch wird die Abschätzung der Parameter durch die geringe Sammeldauer erschwert. Im Vergleich zu den Werten für die anderen Applikationsschemata erscheinen die Ergebnisse dieser Untersuchung jedoch plausibel.

Tab. 4.2 Pharmakokinetische Parameter von Platin im Plasma nach Gabe von Oxaliplatin (MW  $\pm$  SD)

Referenz	Dosis [mg/m <sup>2</sup> ]	t <sub>inf</sub> [h]	C <sub>max</sub> [µg/mL]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]	t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	t <sub>1/2λ<sub>2</sub></sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	Bemerkungen
	130	2	3,93 ± 1,90	101 ± 14	1,22 ± 0,21	57,9 ± 13,0	0,60 ± 0,47	n.b.	34,2 ± 5,1	Z I; FAAS; 0 - 48 h <sup>a</sup>
Diese Arbeit	130	2	3,66 ± 1,94	209 ± 39	0,59 ± 0,14	104 ± 14	0,38 ± 0,52	11,2 ± 4,0	142 ± 39	Z I; FAAS; 0 - 400 h <sup>a</sup>
	85	2	2,32 2,81	61,4 92,4	0,72 1,09	36,4 42,8	0,12 0,34	n.b.	28,0 35,7	Z I ohne Hyperthermie; 0 - 24 h <sup>a</sup>
	60	2	1,33 ± 0,25	79,3 ± 41,6	0,84 ± 0,43	54,4 ± 18,5	0,33 ± 0,20	n.b.	60,3 ± 50,6	Z I - III; FAAS 0 - 24 h <sup>a</sup>
Graham et al., 2000 <sup>38</sup>	85	2	1,92 ± 0,34	118 ± 9	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Z III; ICP-MS k.A. <sup>a</sup>
Wasserman et al., 1999 <sup>203</sup>	85	2	k.A.	144 ± 37	0,65 ± 0,19*	k.A.	k.A.	k.A.	123 ± 38	Z I - II; FAAS; 0 - 240 h <sup>a</sup>
Gross-Goupil et al., 2002 <sup>121</sup>	85	2	2,23 ± 0,42	151 ± 48	0,61 ± 0,17	k.A.	k.A.	k.A.	104 ± 23	Z I; FAAS; 0 - 192 h <sup>a</sup>
	110	2	3,22 ± 0,36	206 ± 66	0,57 ± 0,13	k.A.	k.A.	k.A.	86 ± 23	Z I; FAAS; 0 - 192 h <sup>a</sup>
Massari et al., 1998 <sup>86</sup>	130	2	2,59 ± 0,37	49,0 ± 9,0	2,51 ± 0,54	69,7 ± 17,1	0,45 ± 0,34	n.b.	37,5 ± 8,2	Z I; NRF FAAS; 0 - 48 h <sup>a</sup>
			2,58 ± 0,32	64,4 ± 29,6	1,94 ± 0,66	60,1 ± 11,3	0,66 ± 0,88	n.b.	49,2 ± 18,6	Z I; IRF FAAS; 0 - 48 h <sup>a</sup>
Goetz et al., 2003 <sup>205</sup>	110	2	2,52 ± 0,36	200 ± 25	0,21 ± 0,03*	k.A.	k.A.	k.A.	157 ± 6	Z I; ICP-MS 0 - 500 h <sup>a</sup>
Gamelin et al., 1997 <sup>35</sup>	130	2	3,20 ± 0,61	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	202 ± 26,4	Z I; ICP-MS 0 - 500 h <sup>a</sup>
Extra et al., 1998 <sup>108</sup>	130	2	3,61 ± 0,43	207 ± 61	0,56 ± 0,10	93,4 ± 16,8	7,3 ± 4,9	n.b.	239 ± 55	Z V; ICP-MS 0 - 500 h <sup>a</sup>

\* auf KOF normierte Werte

t<sub>inf</sub> Infusionsdauer

n.b. nicht bestimmt

k.A. keine Angabe

Z untersuchter Zyklus

a Probensammlungszeitraum nach Infusionsbeginn

FAAS Flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie

ICP-MS Induktiv-gekoppelte-Plasma-Massenspektrometrie

NRF Pat. mit normaler Nierenfunktion (CL<sub>CR</sub> 63 - 136 mL/min)IRF Pat. mit verminderter Nierenfunktion (CL<sub>CR</sub> 27 - 57 mL/min)

Tab. 4.3 Pharmakokinetische Parameter von Platin im Vollblut nach Gabe von Oxaliplatin (MW  $\pm$  SD)

Referenz	Dosis [mg/m <sup>2</sup> ]	t <sub>inf</sub> [h]	C <sub>max</sub> [µg/mL]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]	t <sub>1/2λ<sub>1</sub></sub> [h]	t <sub>1/2λ<sub>2</sub></sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	Bemerkungen
	130	2	2,92 ± 0,84	147 ± 52	0,90 ± 0,26	73,1 ± 15,6	1,38 ± 1,94	n.b.	63,5 ± 30,0	Z I, FAAS; 0 - 48 h <sup>a</sup>
Diese Arbeit	130	2	2,45 ± 0,37	472 ± 100	0,27 ± 0,07	119 ± 23	0,23 ± 0,23	10,0 ± 4,0	326 ± 66	Z I; FAAS; 0 - 400 h <sup>a</sup>
	85	2	1,42 2,67	63,1 118	0,58 1,32	32,0 73,0	n.b.	n.b.	38,1 38,3	Z I ohne Hyperthermie; 0 - 24 h <sup>a</sup>
	60	2	1,18 ± 0,30	78,2 ± 35,2	0,81 ± 0,47	50,5 ± 21,0	n.b.	n.b.	46,7 ± 11	Z I - III; FAAS 0 - 24 h <sup>a</sup>
Delord et al., 2003 <sup>206</sup>	80/ 100/ 130	3	k.A.	k.A.	0,13 ± 0,06	k.A.	k.A.	k.A.	58,3 ± n.b.	Z I - III FAAS; 0 - 24 h <sup>a</sup>

\* auf KOF normierte Werte

t<sub>inf</sub> Infusionsdauer

n.b. nicht bestimmt

Z untersuchter Zyklus

a Probensammlungszeitraum nach Infusionsbeginn

FAAS Flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie

k.A. keine Angabe

Angaben zur Pharmakokinetik in Vollblut (s. Tab. 4.3) wurden bisher nur von *Delord et al.*<sup>206</sup> publiziert. Insgesamt werden nur wenige pharmakokinetische Parameter, die Mittelwerte nach Auswertung von drei Behandlungszyklen und verschiedenen Applikationsschemata darstellen, angegeben. Die Daten wurden, obwohl nur bis 24 h nach Infusionsbeginn Proben gesammelt wurden, mit Hilfe eines Drei-Kompartiment-Modells ausgewertet. Daher ist ein Vergleich mit den Daten dieser Arbeit kaum möglich. Auffällig ist die niedrigere Clearance bei einer vergleichbaren terminalen Halbwertszeit. Ein Grund für die auffallend niedrige Clearance liegt darin, dass in den angegebenen Mittelwert auch die Clearances für die Zyklen II und III eingegangen sind, die in der Regel immer deutlich unter der des ersten Zyklus liegen (s. "Vergleich der pharmakokinetischen Parameter in Zyklus I und II" in Kap. 3.3.2). Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit für Plasma und die Literaturdaten für Plasma und Erythrozyten sind die ermittelten Daten für Vollblut jedoch plausibel. Für die beiden anderen Dosierungsschemata (85 und 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin) liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor. Für 85 mg/m<sup>2</sup> wurden wie bei Plasma nur die Daten der Gabe I ohne Hyperthermie angegeben. Für die Patienten, die mit wöchentlichen Gaben von



60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt wurden, unterschieden sich nicht nur die Daten der einzelnen Zyklen, sondern auch die Daten der Behandlungstage innerhalb des jeweiligen Zyklus. Eine getrennte Auswertung nach Zyklus und Behandlungstag war aufgrund der geringen Patientenzahl nicht möglich.

Tab. 4.4 *Pharmakokinetische Parameter von Platin in Erythrozyten nach Gabe von Oxaliplatin (MW ± SD)*

Referenz	Dosis [mg/m <sup>2</sup> ]	t <sub>inf</sub> [h]	C <sub>max</sub> [µg/mL]			t <sub>max</sub> [h]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/mL]	t <sub>1/2z</sub> [h]			CL [L/h]
			ZI	ZII	ZIII		ZI	ZI	ZII	ZIII	
Diese Arbeit	130	2	1,85 ± 0,59	3,34 ± 0,82	n.b.	2 - 6	n.b.*	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Graham et al., 2000 <sup>38</sup>	85	2	2,67 ± 0,80	n.b.	n.b.	n.b.	252 ± 35	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Gamelin et al., 1997 <sup>35</sup>	130	2	2,92 ± 0,53	3,58 ± 0,61	4,60 ± 1,20	2 - 5	n.b.	1200 ± 240	1118 ± 264	1092 ± 336	n.b.
Extra et al., 1998 <sup>108</sup>	130	2	3,25 ± 0,49	n.b.	n.b.	n.b.	1326 ± 570	589 ± 90	n.b.	n.b.	0,09 ± 0,03
Massari et al., 1998 <sup>86</sup>	130	2	2,05 ± 0,66	n.b.	n.b.	2 - 7	n.b.	400 - 600	n.b.	n.b.	n.b.
			2,17 ± 0,60	n.b.	n.b.	2 - 7	n.b.				

\* In dieser Arbeit wurde die AUC<sub>0-24 h/0-48 h</sub> bestimmt, die mit der AUC<sub>∞</sub> obiger Arbeiten nicht vergleichbar ist.

t<sub>inf</sub> Infusionsdauer

n.b. nicht bestimmt oder nicht angegeben

Die Platinkonzentrationen in den Erythrozyten wurden im Rahmen dieser Arbeit kompartmentunabhängig hinsichtlich AUC<sub>0-24 h/0-48 h</sub>, C<sub>max</sub> und t<sub>max</sub> ausgewertet. Die ermittelten Maximalkonzentrationen in den beiden untersuchten Behandlungszyklen und die Zeiten, zu denen diese erreicht wurden, stimmen mit den Literaturdaten überein, wie Tab. 4.4 entnommen werden kann. In nur wenigen Studien wurden weitere Parameter wie AUC<sub>∞</sub>, CL oder t<sub>1/2</sub> ermittelt, die untereinander große Differenzen aufweisen.

Diese starken Abweichungen sind vermutlich auf die gleiche Problematik zurückzuführen, die auch in dieser Arbeit bestand: durch die niedrige Clearance ergibt sich ein sehr flacher terminaler Konzentrationsabfall. Wird dann eine AUC-Bestimmung mit Extrapolation nach Unendlich vorgenommen, übersteigt der extrapolierte Anteil die AUC bis

zum letzten realen Messwert um ein Vielfaches, was zu großen Fehlern führt. Ein weiteres Problem bei einer kompartmentabhängigen Auswertung der Erythrozytendaten dieser Arbeit bestand auch in der bereits in Kap. 4.1.1 angesprochenen Problematik bei der Quantifizierung der Platinkonzentrationen in dieser Matrix. Die starken Schwankungen innerhalb der Konzentrations-Zeit-Verläufe erschweren eine korrekte Abschätzung von pharmakokinetischen Parametern zusätzlich. Daher wurde in dieser Arbeit die AUC nur mit Hilfe der Trapezregel bestimmt. Von *Extra et al.* wurde diese ebenfalls zusätzlich zur  $AUC_{\infty}$  berechnet. Beim Vergleich der beiden Werte wird die Vermutung, dass die kompartmentabhängige Analyse mit ihrer Extrapolation nach Unendlich bei dem geringen Konzentrationsabfall über die Zeit in Erythrozyten fehlerhaft wird, bestätigt. Die von *Extra et al.* bestimmte  $AUC_{0-48\text{ h}}$  lag bei  $151 \pm 41 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  und war damit wesentlich geringer als die  $AUC_{\infty}$ <sup>108</sup>, lag aber deutlich über der in dieser Arbeit bestimmten  $AUC_{0-48\text{ h}}$  von  $72,3 \pm 16,0 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ . Ein möglicher Grund dafür könnte ein stärkeres Ausmaß der Vorbehandlung mit Platinkomplexen sein. Diese verursachen je nach Zeitpunkt der Vorbehandlung vergleichsweise höhere Konzentrationen und damit auch AUC-Werte<sup>207</sup>. Aus der Publikation von *Extra et al.* geht zudem nicht klar hervor, aus welchem Zyklus die Werte stammen, die in den angegebenen Mittelwert eingegangen sind. Falls auch Werte späterer Zyklen mit eingerechnet wurden, wäre der höhere Wert damit leicht erklärbar.

### Dosisabhängigkeit von $C_{\text{max}}$ und AUC

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Maximalkonzentration  $C_{\text{max}}$  und die  $AUC_{0-24\text{ h}}$  im Ultrafiltrat eine Abhängigkeit von der applizierten Regeldosis gefunden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Befunden anderer Autoren, die für dieselben Parameter im Plasma ebenfalls einen Zusammenhang mit der applizierten Dosis fanden. Die Regeldosis wurde im Rahmen einer Dosiseskaltungsstudie von 20 auf  $180 \text{ mg}/\text{m}^2$  gesteigert; dabei wurden 5 Dosierungen untersucht. Die Autoren fanden eine starke Korrelation zwischen den AUC-Mittelwerten der jeweiligen Dosisstufe und den Regeldosen<sup>38</sup>.

### Variabilität der pharmakokinetischen Parameter

Die interindividuelle Variabilität der pharmakokinetischen Parameter, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden, lag, wie aus den Tabellen Tab. 4.1 - Tab. 4.4 hervorgeht, in derselben Größenordnung wie in vergleichbaren Untersuchungen. Die Streuung der einzelnen Parameter nach Gabe von  $130 \text{ mg}/\text{m}^2$  Oxaliplatin war trotz des heterogenen Patientenkollektivs eher gering einzustufen. Auch in anderen Publikationen

wurde die ermittelte interindividuelle Variabilität als gering eingeschätzt<sup>38,206</sup>. Vergleicht man die Streuung beispielsweise mit den interindividuellen Unterschieden, die man nach Dosierung auf der Basis der KOF für die AUC von Carboplatin erhält, so werden dort aufgrund der starken Abhängigkeit der Platinclearance von der Nierenfunktion relative Standardabweichungen von bis zu 300 % erreicht<sup>208</sup>.

Nach Gabe von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin wurde eine geringe Variabilität beobachtet. Diese konnte nur für Ultrafiltrat beurteilt werden, da für die anderen Matrices lediglich die Werte von zwei Patienten nach Gabe I ohne Hyperthermie zur Verfügung standen. Die Daten nach Gabe II oder Kombination mit Hyperthermie wurden nicht herangezogen.

Die größte interindividuelle Variabilität wurde für die Patienten festgestellt, die mit 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt worden waren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nicht nur ein heterogenes Patientenkollektiv vorlag, sondern die Patienten auch mit unterschiedlichen oxaliplatinhaltigen Kombinationschemotherapien behandelt wurden.

### **Bindung an Makromoleküle und Kumulation von Platin**

Die langen Halbwertszeiten, die hohe AUC und die verglichen mit dem Ultrafiltrat niedrigen Clearances in Plasma und Vollblut deuten auf eine hohe Proteinbindung hin<sup>113</sup>. Auch das hohe Verteilungsvolumen im Ultrafiltrat indiziert eine schnelle zelluläre Aufnahme und die Bindung an Plasma- bzw. Zellproteine. Die schnelle Bindung an Makromoleküle, die vermutlich irreversibel ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch bei der Untersuchung des ultrafiltrierbaren Anteils nach Gabe der drei unterschiedlichen Oxaliplatinregeldosen deutlich. Den Abbildungen Abb. 3.16, Abb. 3.19 und Abb. 3.26 ist jeweils zu entnehmen, dass schon am Infusionsende nur noch 50 - 60 % des im Plasma messbaren Platins ultrafiltrierbar waren. Nach weiteren 4 h war dieser Anteil auf lediglich 10 % gesunken. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von *Graham et al.* überein, die nach Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> am Infusionsende 65,5 ± 4,9 % des Platins an Proteine gebunden vorfanden. 6 h nach Infusionsbeginn lagen 90,3 ± 1,8 % in gebundener Form vor<sup>38</sup>.

Nach Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin konnte die Pharmakokinetik in dieser Arbeit in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen untersucht werden. Die AUC-Werte und die Clearances im Plasma, Vollblut und den Erythrozyten der beiden Zyklen unterschieden sich signifikant, wie Kap. 3.3.2 (Tab. 3.28, Abb. 3.20) entnommen werden kann. In den genannten Matrices waren die AUC-Werte im zweiten Zyklus deutlich höher als im ersten.

Andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Die Unterschiede für die Plasma-AUC waren in der Regel nicht signifikant, jedoch war immer ein Trend zu höheren Werten zu verzeichnen. Am stärksten war die Kumulation in Erythrozyten in dieser Arbeit und auch in anderen vergleichbaren Studien ausgeprägt. Dies wird bei Betrachtung der Quotienten der AUC-Werte ( $AUC_{0-48\text{h}}$ ) von Ultrafiltrat, Plasma, Vollblut und Erythrozyten aus Zyklus II und I deutlich. Diese betragen für die vier Matrices 1,0, 1,1, 1,3 und 1,6. *Graham et al.* verglichen die  $AUC_{0-48\text{h}}$  des 5. Zyklus und des 1. Zyklus für Ultrafiltrat, Plasma und Erythrozyten und ermittelten Quotienten von 1,0, 1,3 und 2,0<sup>38</sup>.

Die lange Platinretention wird auch in den Residualkonzentrationen 22 Tage nach Infusionsbeginn deutlich. Im Mittel konnten  $0,13 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$  im Plasma und  $0,40 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$  im Vollblut quantifiziert werden. Auch *Gamelin et al.* fanden 22 Tage nach dem ersten und zweiten Zyklus noch Plasmakonzentrationen von  $0,16 \pm 0,05$  bzw.  $0,19 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$  vor<sup>35</sup>. Die von *Massari et al.* gemessenen Residualkonzentrationen im Plasma lagen ebenfalls in derselben Größenordnung<sup>86</sup>.

Die Pharmakokinetik von Platin im Plasma wird vermutlich durch den Abbau von Plasmaproteinen bestimmt, durch den niedermolekulare Platin-Aminosäure-Konjugate freigesetzt und anschließend renal eliminiert werden. Die Verweildauer in den Erythrozyten hängt vermutlich mit der Lebensdauer der roten Blutkörperchen zusammen. Demnach kann erst beim Abbau von Erythrozyten Platin freigesetzt und eliminiert werden. Da die Halbwertszeit von Erythrozyten im Blut ca. 60 Tage beträgt und die Oxaliplatininfusionen üblicherweise in kürzeren Abständen erfolgen, resultiert dies in steigenden Konzentrationen und AUC-Werten.

### **Einfluss der Hyperthermie auf die Platin-Pharmakokinetik**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pharmakokinetik von 4 Patienten untersucht, die zusätzlich zur Oxaliplatingabe auch bei jeweils einer der beiden Gaben eines Behandlungszyklusses eine Ganzkörperhyperthermie erhielten. Die Auswertung der Platinkonzentrations-Zeit-Verläufe ergab im Ultrafiltrat bis auf eine Ausnahme (Pat. 1) niedrigere Konzentrationen bei Kombination mit Hyperthermie, unabhängig davon, ob die erste oder die zweite Gabe unter hyperthermen Bedingungen erfolgte. Auch im Plasma war dieser Trend festzustellen, während im Vollblut und den Erythrozyten eine Beurteilung der Auswirkungen der Hyperthermie nur sehr schwer möglich war. Da in diesen Matrices mit fortschreitenden Applikationen immer steigende Konzentrationen zu ver-

zeichnen sind (s. "Vergleich der pharmakokinetischen Parameter in Zyklus I und II" in Kap. 3.3.2), würden durch Hyperthermie hervorgerufene niedrigere Konzentrationen möglicherweise überdeckt werden.

Neben der Verringerung von Ultrafiltrat- und Plasmakonzentrationen und den AUC-Werten dieser Matrices war die Bindung an Makromoleküle unter Hyperthermiebedingungen i.d.R. schneller und stärker ausgeprägt, wie Abb. 3.26 - Abb. 3.28 zu entnehmen ist.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse, die aufgrund der geringen Patientenzahl allenfalls Tendenzen darstellen können, mit Literaturdaten gestaltet sich schwierig. Für Oxaliplatin existieren keine pharmakokinetischen Untersuchungen, in denen gleichzeitig Hyperthermie angewandt wurde. Mit Cisplatin wurden bisher auch nur wenige Studien durchgeführt, da die Verstärkung der Nephrotoxizität durch gleichzeitige Anwendung von Ganzkörperhyperthermie eine solche Behandlung erschwert bzw. verbietet<sup>81,209</sup>. Lokale Anwendungen von Zytostatika und regionaler Hyperthermie, z.B. durch intra-peritoneale Chemoperfusion<sup>210,211</sup> oder die isolierte Perfusion einzelner Organe<sup>212</sup> wurden dagegen häufiger untersucht. Daher kann hier für eine Prüfung der Plausibilität der eigenen Ergebnisse nur auf In-vitro-Daten, die Ergebnisse von Tierversuchen und zwei Studien am Menschen zurückgegriffen werden.

Bei einer Untersuchung der Applikation von Cisplatin und Hyperthermie an Hunden waren die gemessenen Platinkonzentrationen in Vollblut, Plasma und Ultrafiltrat unter hyperthermen Bedingungen geringer als unter Normothermie<sup>213</sup>. Dies entspricht auch den eigenen Beobachtungen. In zwei klinischen Untersuchungen am Menschen, in denen neben gleichzeitiger Hyperthermie Cisplatin bzw. Carboplatin verabreicht wurde, wurden hingegen keine oder nur geringe Effekte auf die Pharmakokinetik beobachtet<sup>209,214</sup>. Die Unterschiede hinsichtlich der pharmakokinetischen Parameter nach Applikation von Carboplatin mit und ohne Hyperthermie waren zwar nicht signifikant, zeigten aber mit einer höheren Clearance und einem höheren Verteilungsvolumen unter Hyperthermiebedingungen dieselben Tendenzen, wie sie auch in dieser Arbeit beobachtet wurden<sup>214</sup>. In der o.g. Tier-Studie wurde eine stärkere Aufnahme in die Zellen unter Hyperthermiebedingungen für bestimmte Gewebearten (Lunge, Gastrointestinaltrakt) gezeigt. Ein In-vitro-Versuch von *Ohno et al.*, der die Aufnahme von Cisplatin in L1210-Zellen (Leukämie-Zelllinie) untersuchte, ergab einen ähnlichen Befund. Die Aufnahme von Cisplatin in die Zellen war in der Wärme gegenüber normothermen Bedingungen stark erhöht<sup>215</sup>.

Abschließend kann man sagen, dass die Effekte einer Ganzkörperhyperthermie auf die Pharmakokinetik von Platinkomplexen nicht abschließend geklärt sind. Die veröffentlichten Studien beinhalten in der Regel Aussagen zur Toxizität oder Effektivität einer solchen Behandlung und weniger zur Beeinflussung der pharmakokinetischen Parameter. Auch sind die Patientenzahlen in solchen Untersuchungen eher gering, so dass wie in dieser Arbeit keine statistisch abgesicherten Aussagen möglich sind.

### 4.3 Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene patientenindividuelle Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Körperoberfläche und Nierenfunktion als mögliche Einflussfaktoren auf die Platinpharmakokinetik geprüft. Die Nierenfunktion wurde als Kreatinin-clearance aus den Serumkreatininkonzentrationen mit Hilfe der *Cockcroft-Gault*-Formel (s. Gl. 2.7) abgeschätzt. Diese Formel diente auch in den vier bisher publizierten Untersuchungen zu Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik nach Gabe von Oxaliplatin zur Bestimmung der Kreatinin-clearance<sup>86,206,216</sup>. Im Gegensatz zu diesen Studien wiesen die Patienten, die mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt wurden, mit einer mittleren Kreatinin-clearance von ca. 100 mL/min und einer relativen Standardabweichung von 30 % eine gute Nierenfunktion auf, die nur eine geringe Streuung zeigte. Auch für die zugrunde liegenden Serumkreatininkonzentrationen zeigten sich mit relativen Standardabweichungen von ca. 25 % zwischen den Patienten nur geringe Unterschiede. In allen anderen Untersuchungen war die Heterogenität der Patienten hinsichtlich ihrer Nierenfunktion wesentlich größer: dort zeigte sich eine große Bandbreite der Serumkreatininkonzentrationen, die sich in Kreatinin-clearances zwischen 12 und 157 mL/min niederschlug. Auch alle anderen untersuchten Einflussfaktoren wiesen in diesen Studien eine vergleichsweise hohe Variabilität auf.

Die erste Untersuchung hinsichtlich Einflussfaktoren der Platinpharmakokinetik wurde von *Massari et al.* durchgeführt, in der Patienten mit unterschiedlicher Nierenfunktion mit Oxaliplatin behandelt und die Auswirkungen einer verringerten Kreatinin-clearance auf die pharmakokinetischen Parameter geprüft wurde. In dieser Studie wurde eine Korrelation zwischen der Kreatinin-clearance und der Platin-clearance aus dem Ultrafiltrat festgestellt. Außerdem zeigte sich ein umgekehrter Zusammenhang zwischen der AUC im Ultrafiltrat und der Nierenfunktion. Diese Zusammenhänge waren mit Korrelationskoeffizienten von  $r_{CL,UF} = 0,791$  ( $p = 0,008$ ) und  $r_{AUC,UF} = -0,466$  ( $p = 0,025$ ) für Patienten

mit normaler und eingeschränkter Nierenfunktion nach gemeinsamer aber auch nach einer getrennten Auswertung moderat bis stark ausgeprägt<sup>86</sup>. Dieses Ergebnis entspricht dem von *Junker et al.* nach vorläufiger Auswertung von 6 Patienten in jeweils 2 Zyklen, die mit 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt worden waren. Dabei ergab sich eine Korrelation zwischen Kreatinin- und Platinclearance, die mit  $r = 0,865$  ( $p < 0,001$ ) stark ausgeprägt war<sup>217</sup>.

Die beiden anderen Studien von *Delord et al.* und *Bastian et al.* identifizierten in populationspharmakokinetischen Untersuchungen fast identische Einflussfaktoren als Kovariaten der Platinclearance aus dem Ultrafiltrat. Nach *Delord et al.* war die  $CL_{Pt,UF}$  umso größer, je höher die KOF, je jünger die Patienten und je geringer die Serumkreatininkonzentration war. Außerdem zeigte sich ein Geschlechtsunterschied dahingehend, dass Frauen eine geringere Clearance aufwiesen als Männer. Somit wurden neben der KOF mit Geschlecht, Alter und Serumkreatininkonzentration diejenigen Faktoren als bestimmend für die Platinclearance ermittelt, die auch in die Formel zur Berechnung der Kreatininclearance nach *Cockcroft und Gault* eingehen (s. Gl. 2.7). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch *Bastian et al.*, die Körpergewicht, Serumkreatininkonzentration und Geschlecht als Kovariaten für die Platinclearance aus dem Ultrafiltrat ermittelten. Dabei stellten sie fest, dass mit Körpergewicht und Kreatininkonzentration die Variabilität der Platinclearance besser erklärt werden konnte als mit der Kreatininclearance und der KOF.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und der  $CL_{Pt,UF}$  der Patienten. Eine entsprechend umgekehrte Beziehung wurde zwischen der AUC im Ultrafiltrat und dem Körpergewicht festgestellt.

Neben schwachen Zusammenhängen mit der KOF zeigte sich auch ein Unterschied hinsichtlich der Platinclearance zwischen Männern und Frauen, der nach Normierung auf Körpergewicht, Körpergröße oder KOF bestehen blieb. Offenbar kommt dieser Unterschied nicht durch das niedrigere Körpergewicht sowie die kleinere Körpergröße und -oberfläche der Frauen zustande. Außerdem bestanden auch keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern für die Serumkreatininkonzentrationen und die daraus berechneten Clearances. Diese wiederum standen in Zusammenhang mit der Platinclearance, wobei für die Clearance aus Vollblut eine wesentlich stärkere Korrelation mit der Kreatininclearance festgestellt wurde als für die Clearance aus Ultrafiltrat.

Nach der gemeinsamen Auswertung der Patienten, die 130 und 60 mg/m<sup>2</sup> erhielten, ergab sich ein Zusammenhang zwischen Platinclearance und der Nierenfunktion, charakterisiert durch die Serumkreatininkonzentration.

Die Art der Einflussfaktoren, die in dieser Arbeit hinsichtlich der  $CL_{Pt,UF}$  ermittelt werden konnten, deckten sich im Wesentlichen mit den in der Literatur beschriebenen Kovariaten für diesen Parameter, der sich aufgrund der Dosis- und Zyklusunabhängigkeit für diese Untersuchung besonders eignet. Außerdem geht man davon aus, dass das Ultrafiltrat die pharmakologisch aktiven Platinspezies enthält. Daher ist die in dieser Arbeit gefundene Abhängigkeit der Clearance aus dem Vollblut von der Nierenfunktion von geringerer Bedeutung im Hinblick auf eine eventuelle Nutzung der gefundenen Einflussfaktoren für eine Individualisierung der Dosis.

Die Stärke der gefundenen Korrelationen war in der Regel schwächer ausgeprägt als in den drei beschriebenen Studien. Dies ist vermutlich auf die geringere Spannweite der untersuchten Parameter in diesem Patientenkollektiv zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, war die Heterogenität in den publizierten Studien nicht nur für die Nierenfunktion, sondern auch für Alter, Körpergewicht und KOF größer. Außerdem sollte beachtet werden, dass in dieser Arbeit nur eine vergleichsweise kleine Gruppe von Patienten untersucht wurde. Die Patientenzahlen in den zum Vergleich herangezogenen Studien waren wesentlich höher und ermöglichten so Aussagen, die als zuverlässiger und eher auf andere Patientengruppen übertragbar erscheinen.

#### **4.4 Platin-DNA-Addukte nach Gabe von Oxaliplatin**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Pharmakokinetik auch die Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten nach Gabe von drei unterschiedlichen Oxaliplatin dosierungen untersucht. Dabei konnten auch nach der vergleichsweise niedrigen Regeldosis von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin durch Anwendung der adsorptiven Voltammetrie die Platin-Nukleotid-Verhältnisse zuverlässig quantifiziert werden.

Ähnlich wie für Carboplatin existieren für Oxaliplatin nur wenige Publikationen, in denen die Adduktbildung in Leukozyten als pharmakodynamischer Parameter untersucht wurde. Ein Grund dafür ist vermutlich in der verglichen mit Cisplatin geringen DNA-Platinierung zu sehen, die für die Quantifizierung des an die DNA gebundenen Platins die Anwendung von Methoden mit besonders niedriger Bestimmungsgrenze erforderlich macht.



In den bisher vorliegenden Untersuchungen zur Adduktbildung während einer Oxaliplatin-Therapie wurde die Quantifizierung des an die DNA gebundenen Platins mittels ICP-MS durchgeführt<sup>143,123</sup>. Die von den Autoren erhaltenen Ergebnisse sind in den beiden folgenden Tabellen (Tab. 4.5 und 4.6) in der in dieser Arbeit durchgängig verwendeten Einheit "Pt-Atome : 10<sup>6</sup> Nukleotide" dargestellt.

Die Platin-Nukleotid-Verhältnisse von *Allain et al.* nach Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> waren etwas niedriger als die in dieser Arbeit ermittelten Daten, deren Medianwerte (s. Tab. 3.34) für die vier untersuchten Abnahmezeiten 0,31 - 4,10 Pt-Atome : 10<sup>6</sup> Nukleotide betragen. Die Spannweiten der Platin-Nukleotid-Verhältnisse waren jedoch in dieser Arbeit wesentlich größer als bei *Allain et al.* Dies ist vermutlich auf die mit 24 Patienten deutlich größere Fallzahl zurückzuführen. Der Verlauf der Adduktmenge über die Zeit war in der Untersuchung von *Allain et al.* dem in dieser Arbeit ebenfalls ähnlich. Die maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnisse wurden in der Regel wenige Stunden nach Infusionsbeginn beobachtet; danach nahmen die medianen Addukt-mengen bis 24 h nach Infusionsbeginn nur wenig ab, während dann 5 Tage nach der Infusion Werte gemessen wurden, die in einer Größenordnung der Nullwerte lagen. Ein Unterschied zwischen den beiden Zyklen hinsichtlich des Ausmaßes der DNA-Platinierung konnte, wie auch in der vorliegenden Arbeit, nicht festgestellt werden. Die Quantifizierbarkeit von Addukten vor Beginn der Oxaliplatingabe des zweiten Zyklus war bei *Allain et al.* wie auch in dieser Arbeit möglich.

Tab. 4.5 *Platin-Nukleotid-Verhältnisse in Leukozyten nach Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen (Allain et al.<sup>143</sup>)*

Zeit nach Infusionsbeginn [h]	Platin-Nukleotid-Verhältnisse [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukleotide]	
	Zyklus I [n = 6]	Zyklus II [n = 4]
0	n.b.	0,17 [0,17 - 1,01]
3	1,69 [1,18 - 3,04]*	1,69 [1,35 - 1,69]
24	0,68 - 1,69**	1,19 [0,84 - 1,69]
120	0,17**	0,34 - 0,51*

\* Es konnten nur 5 (Zyklus I, 3 h) bzw. 2 (Zyklus II, 120 h) Patienten untersucht werden.

\*\* Bei nur 2 oder 1 der 6 untersuchten Patienten waren Platin-Nukleotid-Verhältnisse quantifizierbar.

n.b. nicht bestimmbar

Tab. 4.6 Platin-Nukleotid-Verhältnisse in Leukozyten nach Gabe von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin (Liu et al.<sup>123</sup>)

Patient Nr.	Platin-Nukleotid-Verhältnisse [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukleotide]	
	2 h nach Infusionsbeginn	72 h nach Infusionsbeginn
1	5458	115
2	5226	232
3	5392	4173
4	11281	540
5	3054	1066
6	1928	3508

Die Studie von Liu et al. kommt jedoch zu gänzlich anderen Ergebnissen. Die Platin-Nukleotid-Verhältnisse, die von den Autoren ermittelt wurden, sind um mehr als den Faktor 1000 höher als die Daten von Allain et al. oder der vorliegenden Arbeit. Dieses ist sehr überraschend, da die applizierte Regeldosis hier mit 60 mg/m<sup>2</sup> um den Faktor 2,2 geringer war. Sogar in In-vitro-Untersuchungen zur Adduktbildung von Oxaliplatin wurden solche extrem hohen Platin-Nukleotid-Verhältnisse nicht gemessen. Nach Inkubation von A2780-Zellen (Ovarialkarzinomzellen) mit 60 µM Oxaliplatin (= 11,7 µg Pt/mL) über 2 h war das Ausmaß der Platinierung mit ca. 42 Pt-Atomen : 10<sup>6</sup> Nukleotide wesentlich geringer<sup>218</sup>. Nach Inkubation von humanen Leukozyten über eine Dauer von 24 h mit 100 µM Oxaliplatin (= 39,7 µg Pt/mL) wurde ein Platin-Nukleotid-Verhältnis von ca. 6000 Pt-Atomen : 10<sup>6</sup> Nukleotide erreicht<sup>219</sup>. Dies entspricht in etwa den von Liu et al. ermittelten Werten; dabei muss aber beachtet werden, dass die Platinkonzentration mit fast 40 µg/mL im Zellmedium die durchschnittlichen Konzentrationen während einer Oxaliplatintherapie bei weitem übersteigt (C<sub>max,UF</sub> = 0,362 ± 0,147 µg/mL nach Gabe von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin). Außerdem liegen in vitro quasi Steady-state-Bedingungen vor, während die Platinkonzentrationen in vivo mit fortschreitender Zeit abnehmen. Daher sind gerade für Oxaliplatin solch extrem hohe Platin-Nukleotid-Verhältnisse in Leukozyten von Patienten sehr ungewöhnlich. Die Autoren selbst räumen diesen Sachverhalt ein und verweisen darauf, dass ihre Addukte nicht nur DNA enthielten, sondern auch Proteine. Dies wurde, wie bereits in Kap. 4.1.2 dargelegt, in den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm, die als Reinheitskriterium der isolierten DNA gelten, deutlich. Diese betragen 2 bzw. 72 h nach Infusions-

beginn  $0,96 \pm 0,08$  und  $1,15 \pm 0,29$ ; für den Nachweis der vollständigen Abtrennung von Proteinen wird dagegen ein Verhältnis von 1,7 - 1,9 gefordert und in der vorliegenden Arbeit auch erreicht. Daher sind die Ergebnisse von *Liu et al.* mit denen anderer Untersuchungen nicht vergleichbar.

Selbst nach Gabe von Cisplatin, das im Vergleich zu Oxaliplatin eine stärkere Platin-DNA-Adduktbildung hervorruft, wurde eine solch stark ausgeprägte DNA-Platinierung nicht beobachtet. Die Adduktverhältnisse in publizierten Studien waren für Cisplatin mit Medianwerten zwischen 1 und 42 Pt-Atomen :  $10^6$  Nukleotiden etwas höher und für Carboplatin mit 0,2 - 0,4 Pt-Atomen :  $10^6$  Nukleotiden deutlich niedriger als die in dieser Arbeit berichteten Adduktverhältnisse<sup>141,202,220</sup>. Allerdings müssen bei einem solchen Vergleich die Dosierungs- und Applikationsschemata beachtet werden, die sich in der Regel deutlich voneinander unterscheiden. Auch die Abnahmezeitpunkte der Proben variieren sehr stark und erschweren einen Vergleich der In-vivo-DNA-Platinierung nach Gabe der drei Platinkomplexe. In Ansätzen zeigen sich aber die gleichen Tendenzen wie in In-vitro-Untersuchungen, nach denen Oxaliplatin hinsichtlich der Adduktbildung zwischen Cisplatin und Carboplatin liegt<sup>219</sup>.

Die Variabilität der in dieser Arbeit bestimmten Platin-Nukleotid-Verhältnisse ist v.a. im Vergleich zu der der pharmakokinetischen Parameter sehr hoch: für einzelne Abnahmezeitpunkte wurde eine Spannweite beobachtet, die den Faktor 100 umfasste. Diese starken interindividuellen Unterschiede hinsichtlich der Platin-DNA-Adduktbildung wurden auch nach Gabe von Cisplatin oder Carboplatin u.a. von *Reed et al.* beobachtet<sup>221</sup>. Die Einflussfaktoren auf die Platin-DNA-Adduktbildung, die diese stark ausgeprägte Variabilität mitverursachen, werden im folgenden Kapitel diskutiert.

Zur Charakterisierung der DNA-Platinierung über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde die Fläche unter der Adduktcurve (AUA) berechnet. Diese Größe wurde in publizierten Studien bisher nur von *Schellens et al.* und *Veal et al.* zur Beschreibung der Platin-DNA-Adduktbildung herangezogen<sup>137,222</sup>. Andere Autoren benutzten als Größe zur Beurteilung der Adduktbildung die Höhe der Platin-DNA-Verhältnisse zu einem bestimmten Zeitpunkt, den in mehreren Zyklen gemessenen Maximalwert oder die Tatsache, ob Addukte quantifizierbar waren oder nicht. Die berechnete AUA kann aufgrund der geringen Anzahl von Proben die Platinierung nicht korrekt widerspiegeln; ihre Berechnung bietet aber die Möglichkeit, die Exposition über die Zeit mit Zu- und Abnahmen näher zu charakterisieren als dies mit Einzelwerten möglich wäre. Ein Ver-

gleich der Werte dieser Arbeit mit denen von *Schellens et al.* ist ebenso wie der Vergleich der einzelnen Platin-DNA-Adduktverhältnisse schwierig, da sich die beiden Untersuchungen nicht nur hinsichtlich des Platinkomplexes und seiner Dosierung, sondern auch in den Abnahmezeiten der Adduktproben unterscheiden.

In dieser Arbeit wurden die medianen  $A_{\max}$ - und  $AUA_{0-24\text{ h}}$ -Werte nach Gabe von 50 und 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin miteinander verglichen. Wie die AUC im Ultrafiltrat zeigte auch die AUA eine Abhängigkeit von der verabreichten Regeldosis. Nach Gabe von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin war die DNA-Platinierung etwa dreimal so hoch wie nach Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup>. Dies entspricht in etwa dem Verhältnis der verabreichten Regeldosen.

In der Literatur wurden hinsichtlich der Dosisabhängigkeit unterschiedliche Ergebnisse gefunden. Während einige Autoren einen linearen Zusammenhang zwischen den Platin-Nukleotid-Verhältnissen und der applizierten Regeldosis feststellten, konnten andere eine solche Korrelation nicht bestätigen. *Reed et al.* verglichen die mittleren maximalen Platin-DNA-Verhältnisse nach Gabe von 20 und 40 mg/m<sup>2</sup> Cisplatin. Die Mediane unterschieden sich um Faktor 2 und spiegelten so das Verhältnis der Regeldosen wieder<sup>134</sup>. *Schellens et al.* untersuchten die  $A_{\max}$  und AUA nach Gaben von 70 und 80 mg/m<sup>2</sup> Cisplatin. Dabei verhielten sich die gemessenen  $A_{\max}$ - und AUA-Werte ähnlich wie auch die AUC-Werte im Ultrafiltrat proportional zur verabreichten Regeldosis<sup>137</sup>. In einer von *Gill et al.* durchgeführten Dosiseskaltungsstudie für die Kombination aus Carboplatin und Cisplatin wurden Platin-DNA-Addukte in Leukozyten und auch in Mundschleimhautzellen quantifiziert. Während die Addukte in den Mundschleimhautzellen analog zur Dosis anstiegen, waren die Addukte in Leukozyten für die verschiedenen Dosisstufen gleich und zeigten keinen dosisabhängigen Anstieg<sup>223</sup>. Auch in der Studie von *Peng et al.*, in der die Adduktbildung in Leukozyten nach Gabe von 80 - 120 mg/m<sup>2</sup> Cisplatin und 340 - 1000 mg/m<sup>2</sup> Carboplatin untersucht wurde, zeigte sich keine Abhängigkeit des Adduktverhältnisses von der Regeldosis<sup>224</sup>. Offenbar wird die beobachtete Platin-DNA-Adduktbildung nicht nur von der applizierten Dosis beeinflusst, sondern von weiteren patientenspezifischen Faktoren, die z.T. im folgenden Kapitel diskutiert werden. Diese können, falls sie sich von Patient zu Patient stark unterscheiden, die Korrelation zwischen Adduktmenge und Dosis, die unter In-vitro-Bedingungen in der Regel beobachtet wird<sup>219</sup>, beeinflussen.

### **Einfluss der Hyperthermie auf die Platin-DNA-Adduktbildung**

Die Beurteilung des Einflusses der Hyperthermie auf die Platin-DNA-Adduktbildung war im Rahmen dieser Arbeit nur eingeschränkt möglich. Die geringe Patientenzahl und die uneinheitlichen Tendenzen hinsichtlich der Veränderung der Platin-Nukleotid-Verhältnisse mit Hyperthermie gegenüber normothermen Bedingungen lassen keine verlässlichen Angaben über den Effekt der Temperaturerhöhung auf die Adduktbildung zu. Nur bei einem Patienten kam es unter Hyperthermie zu allen untersuchten Zeitpunkten zu höheren Platin-Nukleotid-Verhältnissen; bei zwei anderen war nur der letzte Wert höher. Ein weiteres Problem bei dieser Untersuchung waren die z.T. ungleichen Probenentnahmezeitpunkte. Für die Beurteilung der Reparatur von Addukten wäre es wichtig gewesen, von allen Patienten einen 48 h-Wert zu untersuchen. Auch die berechneten AUA-Werte waren wegen des ungleichen Beobachtungszeitraums nicht direkt miteinander vergleichbar.

In der Literatur werden verschiedene In-vitro-Untersuchungen beschrieben, in denen ein positiver Einfluss der Hyperthermie auf das Ausmaß der DNA-Platinierung beobachtet werden konnte. Bei der bereits erwähnten Untersuchung von *Ohno et al.* konnte neben einer erhöhten Aufnahme von Cisplatin in die Zellen auch eine höhere Platin-DNA-Adduktbildung bei gleichzeitiger Anwendung von Hyperthermie festgestellt werden<sup>215</sup>. Neben Adduktverhältnissen wurde auch die Reparatur der DNA-Schädigung untersucht; diese war unter Hyperthermiebedingungen verringert, so dass letztendlich die Zytotoxizität gesteigert werden konnte<sup>215</sup>.

Für Oxaliplatin existiert eine ähnliche Untersuchung. *Rietbroek et al.* zeigten, dass das Ausmaß der oxaliplatininduzierten DNA-Platinierung durch Hyperthermie erhöht ist<sup>81</sup>.

Entsprechende klinische Untersuchungen, in denen die Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten nach Gabe eines Platinkomplexes mit und ohne Ganzkörper-Hyperthermie verglichen wird, wurden bisher nicht publiziert. *Van de Vaart et al.* untersuchten bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom nach intraperitonealer Gabe von Cisplatin kombiniert mit *regionaler* Hyperthermie die Adduktbildung in Tumor- und Mundschleimhautzellen. Dabei stellten sie fest, dass die DNA-Platinierung in den Tumorzellen wesentlich stärker ausgeprägt war als in den Mundschleimhautzellen. Dies deutet darauf hin, dass bei dieser speziellen Form der lokalen Applikation von Cisplatin die Aufnahme des Arzneistoffs in die Tumorzellen in stärkerem Maße stattfand als die Aufnahme in andere Gewebe. Eine vergleichende Untersuchung ohne Anwendung von Hyperthermie wurde von dieser Arbeitsgruppe jedoch nicht durchgeführt<sup>225</sup>.

Häufiger werden in vivo die Effektivität und Verträglichkeit einer solchen Behandlungsmethode evaluiert, aber nicht die pharmakokinetischen Parameter oder etwa die Adduktbildung. Eine einfache Übertragung der In-vitro-Ergebnisse ist nicht möglich, wie bereits die Untersuchung von lediglich 4 Patienten mit unterschiedlichen Reaktionen auf die Hyperthermie zeigte. Neben der Temperaturerhöhung kommen in vivo noch weitere Faktoren in Betracht, die das Ausmaß der DNA-Platinierung möglicherweise beeinflussen, wie z.B. die Tumorart, dessen Resistenz, die verabreichte Komedikation, die Pharmakokinetik der applizierten Arzneistoffe, deren Aufnahme in die Zellen und den Zellkern und andere patientenindividuelle Faktoren. Somit ist die Anzahl der Variablen ungleich größer gegenüber gut definierten In-vitro-Bedingungen.

#### 4.5 Einflussfaktoren auf die Platin-DNA-Adduktbildung

Nur wenige Arbeitsgruppen haben bislang mögliche Einflussfaktoren auf die Platin-DNA-Adduktbildung untersucht. In einigen Studien wurden die gemessenen Adduktverhältnisse auf Zusammenhänge mit pharmakokinetischen Parametern geprüft, jedoch wurden weitere patientenspezifische Faktoren nur sehr selten untersucht. Alle diese Studien beziehen sich auf Cisplatin oder Carboplatin; für Oxaliplatin wurden vergleichbare Untersuchungen noch nicht durchgeführt und publiziert.

Ein möglicher Parameter, der das Ausmaß der Adduktbildung beeinflussen könnte, ist die Platinexposition im Ultrafiltrat, das im Gegensatz zu den anderen Matrices die Platinspezies enthält, die zu einem gewissen Teil ungebunden vorliegen und somit pharmakologische Aktivität besitzen. Daher wurde in einigen Studien neben der Adduktbildung auch die Pharmakokinetik im Ultrafiltrat untersucht und die pharmakokinetischen und -dynamischen Parameter auf eine mögliche Korrelation geprüft.

Die Ergebnisse dieser Studien sind nicht einheitlich; während die Gruppe um *Schellens* feststellte, dass die AUC im Ultrafiltrat in hohem Maße mit der AUA ( $r = 0,78$ ;  $p < 0,0001$ ) und der  $A_{\max}$  ( $r = 0,73$ ;  $p < 0,0001$ ) korrelierte<sup>137</sup>, kamen sowohl *Veal et al.* als auch *Peng et al.* zu z.T. gegensätzlichen Ergebnissen. Für die AUC im Ultrafiltrat nach Gabe von Cisplatin, die mit Hilfe der Trapezregel bis 6, 24 und 48 h nach Infusionsbeginn von *Peng et al.* berechnet wurde, konnten für die  $AUC_{0-6\text{ h}}$  und die  $AUC_{0-48\text{ h}}$  Korrelationen mit den Platin-DNA-Verhältnissen zu den jeweiligen Entnahmepunkten (6 und 48 h nach Infusionsbeginn) festgestellt werden. Diese waren zwar mit Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,57$  und  $r = 0,47$  relativ schwach ausgeprägt, aber

statistisch signifikant. Für Carboplatin wurde ein solcher Zusammenhang jedoch nicht gefunden<sup>224</sup>.

In der Untersuchung von *Veal et al.* war ein Zusammenhang zwischen der  $AUC_{0-48\text{ h}}$  und der  $AUA_{0-48\text{ h}}$  mit  $r = 0,14$  nicht gegeben<sup>222</sup>.

Die beiden letztgenannten Autoren kamen zu dem Schluss, dass neben der Pharmakokinetik im Ultrafiltrat weitere patientenindividuelle Faktoren eine Rolle spielen. Dazu gehören z.B. die Aufnahme der Platinkomplexe in die Zellen und deren Zellkerne, die mögliche Inaktivierung durch Reaktion mit Glutathion oder andere Inaktivierungsmechanismen sowie die DNA-Reparatur<sup>224,222</sup>.

In der vorliegenden Arbeit waren die Korrelationen zwischen der AUC im Ultrafiltrat und  $A_{\text{max}}$  bzw. AUA mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,383 und 0,388 auch eher schwach ausgeprägt (s. Kap. 3.5, Tab. 3.40).

Weiterhin wurde ähnlich wie für die pharmakokinetischen Parameter versucht, patientenspezifische Einflussfaktoren zu finden, indem Geschlecht, Alter, Nierenfunktion, Gewicht und Körperoberfläche auf Korrelationen mit den Platin-Nukleotid-Verhältnissen und der AUA überprüft wurden. Dabei wurde das Geschlecht für die Patientengruppe, die  $130\text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin erhalten hatte, als möglicher Einflussfaktor ermittelt. Der Unterschied hinsichtlich der Adduktbildung zwischen den Geschlechtern blieb auch nach Normierung auf Körpergewicht, Körpergröße oder KOF bestehen, so dass er vermutlich nicht auf die unterschiedlichen Körpermaße von Männern und Frauen zurückgeführt werden kann. Während für die Gruppe der mit  $50\text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin behandelten Patienten die Platin-Nukleotid-Verhältnisse für Männer und Frauen nicht signifikant verschieden waren, bestanden bei beiden Patientengruppen für die auf die Regeldosis normierten Werte von  $AUA_{0-24\text{ h}}$ ,  $A_{\text{max}}$  und  $A_{4\text{ h}}$  statistisch signifikante Unterschiede.

Somit zeigten sich in dieser Arbeit sowohl für die pharmakokinetischen als auch die pharmakodynamischen Parameter Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Während Frauen höhere AUC-Werte im Ultrafiltrat aufwiesen als Männer, war bei diesen die AUA deutlich größer als bei den Frauen. Aufgrund dieser gegenläufigen Tendenz wurde auch die Korrelation zwischen der AUC im Ultrafiltrat und  $A_{\text{max}}$  bzw. AUA nochmals getrennt nach Geschlechtern untersucht (s. Tab. 3.41). Dabei zeigte sich, dass das Ausmaß der DNA-Platinierung bei Frauen wesentlich stärker mit der Platinexposition im Ultrafiltrat zusammenhing ( $AUC_{\text{UF}, 0-24\text{ h}}$  vs.  $AUA_{0-24\text{ h}}$ :  $r = 0,645$ ;  $p < 0,001$ ) als bei den Männern ( $AUC_{\text{UF}, 0-24\text{ h}}$  vs.  $AUA_{0-24\text{ h}}$ :  $r = 0,394$ ;  $p < 0,00$ ). Offenbar wird nicht nur die

Höhe der jeweiligen Parameter durch das Geschlecht beeinflusst, sondern auch deren Zusammenhänge untereinander.

*Veal et al.* und *Fichtinger-Schepman et al.* untersuchten neben dem Alter ebenfalls das Geschlecht als potentiellen Einflussfaktor auf die Höhe der Platin-DNA-Verhältnisse nach Gabe von Cisplatin. Beide kamen jedoch zu dem Schluss, dass diese beiden Charakteristika das Ausmaß der DNA-Platinierung nicht beeinflussen<sup>226,222</sup>.

Die beiden Studien unterscheiden sich außer im applizierten Platinkomplex in weiteren Punkten von der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchung. In der Studie von *Veal et al.* wurden lediglich 10 Patienten untersucht, deren Alter zwischen 1,4 und 19 Jahren lag. Eventuell sind geschlechtsbedingte Unterschiede hinsichtlich der DNA-Platinierung bei Kindern noch nicht ausgeprägt. Zudem wurden die Patienten mit drei unterschiedlichen Cisplatin-Applikationsschemata behandelt, die sich hinsichtlich ihrer Zusatzmedikation deutlich voneinander unterschieden<sup>222</sup>. Auch bei der Untersuchung von *Fichtinger-Schepman et al.* wurden unterschiedliche cisplatinhaltige Zytostatikakombinationen eingesetzt, die sich in Zusatzmedikation und in den Cisplatin-Regeldosen unterschieden<sup>226</sup>. Ein Einfluss der Zusatzmedikation auf die DNA-Platinierung kann für keine der Untersuchungen ausgeschlossen werden. Beispielsweise wird das Ausmaß der durch Cisplatin induzierten Adduktbildung durch die zusätzliche Gabe von Paclitaxel und Docetaxel verringert, wie in einer In-vitro-Untersuchung nachgewiesen werden konnte<sup>227</sup>. Die in den beiden publizierten Studien neben Cisplatin verabreichten Zytostatika wurden bisher nicht auf ihren Einfluss auf die Adduktbildung von Platinkomplexen untersucht. Durch die Vielzahl an gemeinsam ausgewerteten Applikationsschemata könnten eventuell vorhandene Unterschiede zwischen Männern und Frauen hinsichtlich der Adduktbildung aufgrund einer Beeinflussung der DNA-Platinierung durch die Zusatzmedikation aufgehoben worden sein. Auch für die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Kombinationstherapieprotokolle kann ein Einfluss der neben Oxaliplatin verabreichten Arzneistoffe nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wurden hier nur Daten von Patienten ausgewertet, die mit zwei Schemata behandelt worden waren; der Anteil von Männern und Frauen war für beide Gruppen in etwa gleich (s. Kap. 2.4.2, Tab. 2.8 und Kap. 2.4.3, Tab. 2.10). Außerdem wurden die Patientengruppen auch getrennt ausgewertet, wobei die Unterschiede für beide Gruppen erkennbar waren, auch wenn nur für eine Gruppe ein signifikanter Unterschied ermittelt wurde.



## 4.6 Toxizität

In dieser Arbeit wurden die Hämato-, Hepato-, Nephro- und Neurotoxizität erfasst und anhand der in Kap. 2.6.4 beschriebenen Skalen beurteilt. Bei allen unerwünschten Wirkungen ist zu beachten, dass ihr Auftreten nicht immer kausal mit der Oxaliplatingabe verknüpft sein muss, sondern auch durch die Zusatzmedikation hervorgerufen worden sein kann. Genauso ist es möglich, dass die entsprechenden Symptome durch die Tumorerkrankung selbst, unabhängig von der Chemotherapie, verursacht wurden. Andere Erkrankungen der Patienten und die im Vorfeld verabreichten Chemotherapien könnten die Ausprägung der Toxizität ebenfalls beeinflusst haben.

### 4.6.1 Hämato-, Hepato- und Nephrotoxizität

Die Erfassung der Hämato-, Hepato- und Nephrotoxizität erfolgte anhand der routinemäßig bestimmten Laborparameter, die einheitlich für alle untersuchten Applikations-schemata mit Hilfe der NCI-CTC-Kriterien beurteilt wurden. Alle drei Arten der Toxizität traten im Rahmen dieser Arbeit nur selten und in niedrigen Schweregraden auf.

Die nach Gabe von 50 und 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin aufgetretene Hämatotoxizität in Form von leichter Leukopenie, Anämie oder schwerwiegender Thrombozytopenie wurde in der Literatur ebenfalls beschrieben<sup>82</sup>.

Auch eine leichte Hepatotoxizität, die sich als transienter, leichter bis moderater Anstieg der Leberenzymwerte äußerte, wurde in anderen Untersuchungen beobachtet; diese trat dort jedoch nur selten auf<sup>113</sup>. Die größere Häufigkeit der hepatotoxischen Symptome in dieser Arbeit muss nicht unbedingt auf die Chemotherapie zurückzuführen sein. Patienten, die an einem fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom leiden, weisen häufig Metastasen in der Leber auf, durch die auch Veränderungen der Leberwerte hervorgerufen werden können. Für die Patienten, die 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin erhielten, war außerdem von Bedeutung, dass die zusätzlich applizierte Prüfsubstanz, hepatotoxisches Potenzial aufweist und vermutlich auch zur Lebertoxizität beigetragen hat<sup>184</sup>.

Eine ausgeprägte Nephrotoxizität wurde nicht beobachtet; auch im zweiten Zyklus wurde keine Verstärkung nephrotoxischer Symptome festgestellt. Dies entspricht den Ergebnissen von *Takimoto et al.*, die an 37 Patienten über mehrere Behandlungszyklen

keinen Anstieg der mittleren Serumkreatininkonzentrationen durch kumulative Oxaliplatin-dosen registrierten<sup>119</sup>.

#### 4.6.2 Neurotoxizität

Die herausragende Toxizität während einer oxaliplatinhaltigen Therapie ist eine periphere sensorische Neuropathie. In dieser Arbeit gab es insgesamt nur 5 Patienten, die in einem Zyklus keine neurotoxischen Symptome aufwiesen. Bei allen anderen Patienten lag der Schweregrad mindestens bei Grad 1 oder in Einzelfällen sogar noch höher.

Im Vergleich zu den drei o.g. Arten der Toxizität ist sowohl die Erfassung als auch die Bewertung der Neurotoxizität sehr schwierig. Die Erfassung erfolgte durch direkte Befragung der Patienten oder aufgrund der Eintragungen in die Patientenakten über aufgetretene unerwünschte Wirkungen durch den behandelnden Onkologen. Somit sind diese Angaben sehr subjektiv, was sowohl die Äußerungen der Patienten zu ihren Symptomen als auch deren Beurteilung durch den Arzt betrifft. Außerdem ist kritisch anzumerken, dass die Befragung der Patienten in den beteiligten Kliniken nicht in standardisierter Form erfolgte, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ebenfalls mindert<sup>228</sup>. Wünschenswert wären objektive Kriterien, anhand der die Neurotoxizität erfasst und danach beurteilt werden kann, beispielsweise durch neurologische Untersuchungen. Diese werden in einigen Studien zwar durchgeführt, in der klinischen Routine sind sie aber aufgrund des z.T. erheblichen Aufwands oft nicht möglich. Da auch durch eine ausführliche Patientenbefragung die Neurotoxizität gut erfasst werden kann<sup>229</sup>, sollte dies in einer detaillierten Weise mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens erfolgen, so dass die Ergebnisse verschiedener Studien besser miteinander vergleichbar sind und nicht durch die Art der Befragung beeinflusst werden.

Neben der schwierigen Erfassung der Symptome ist auch die Bewertung anhand von Skalen nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch in den publizierten Studien zur Oxaliplatin-Therapie nicht einheitlich<sup>83</sup>.

In der Untersuchung, in der die Patienten 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin erhielten, wurde zur Evaluierung der Neurotoxizität durch die Ärzte die WHO-Skala eingesetzt. Diese und auch die NCI-CTC-Skala werden oft als wenig geeignet zur Bewertung der neurosensorischen Symptome angesehen, da sie zwar ihre Schwere erfassen aber nicht die Dauer. Andererseits gewährleistet ihre Anwendung eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse

mit anderen Untersuchungen, auch wenn ihre Skalierung nicht so fein und auf die typische oxaliplatininduzierte Symptomatik abgestimmt ist<sup>83</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit stellte die zusätzlich eingesetzte WHO-Skala kein Problem für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dar, da nur leichte neurotoxische Symptome auftraten, die mit dem Schweregrad 1 bewertet wurden. Der WHO-Grad 1 entspricht in etwa dem Grad 1 der anderen verwendeten Skalen.

Die Skala nach Lévi *et al.*<sup>187</sup> wurde für die Bewertung der Neurotoxizität der Patienten, die 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin erhielten, angewandt. Sie wurde für die Gabe von Oxaliplatin alle drei Wochen entwickelt und schien daher gut geeignet, die Dauer und die Schwere der neurotoxischen Symptome zu bewerten. Problematisch an dieser Skala ist, dass sie in den ersten drei Stufen mehr Gewicht auf die Dauer der Beschwerden und weniger auf die Schwere legt. Funktionseinbußen werden nach dieser Einteilung Grad 4 zugeordnet, allerdings kann es auch kurz nach der Infusion für kurze Zeit zu funktionellen Einschränkungen kommen. Diese kurzzeitigen Beschwerden wurden in dieser Arbeit nicht mit Grad 4 bewertet, da dies im Vergleich mit den Patienten, die länger andauernde Beschwerden hatten, nicht gerechtfertigt erschien. Häufig war es auch schwierig für die Patienten, die Dauer der Beschwerden genau anzugeben; dies erschwerte die korrekte Zuordnung zu den Schweregraden ebenfalls.

Für die Patienten, die 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin erhielten, war eine Bewertung nach der Lévi-Skala nicht möglich, da diese nicht auf wöchentliche Gaben von Oxaliplatin zugeschnitten ist. Daher wurde diese Skala nochmals leicht modifiziert, um auch die Beschwerden dieser Patienten zu beurteilen (s. Kap. 2.6.4).

Ähnlich wie auch bei anderen Arten von Toxizität können auch die neurotoxischen Symptome nicht immer auf die Oxaliplatingabe allein zurückgeführt werden. Einige Patienten, die mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt wurden, erhielten im Vorfeld neurotoxische Substanzen, wie z.B. Taxanderivate oder Cisplatin. Dadurch bestand beispielsweise bei Pat. 11, der deutlich stärker und länger von neurotoxischen Symptomen betroffen war, die letztendlich zum Therapieabbruch führten, bereits vor Beginn der Therapie mit Oxaliplatin eine Polyneuropathie Grad 1. Auch andere Patienten waren möglicherweise vor der Therapie schon durch die starke Vorbehandlung "vorgeschädigt". Ein weiterer Faktor, der die Ausprägung der Neurotoxizität beeinflussen kann, ist eine durch eine andere Erkrankung bedingte Nervenschädigung. So könnte bei Pat. 12 ebenfalls die Schwere der neurosensorischen Beschwerden dadurch verstärkt worden sein, dass er an Diabetes mellitus Typ 2 litt.

Bei zukünftigen Studien sollte daher vor Beginn der Therapie ein Basiswert bestimmt werden, anhand dessen die im Verlauf der Therapie erhobenen Daten besser beurteilt werden können.

Neben Vorbehandlung und Vorerkrankung können auch komedizierte Krebstherapeutika zu Symptomen führen, die vom Patienten ähnlich wie die Oxaliplatin-Neurotoxizität empfunden werden. Sowohl die komedizierte Prüfsubstanz als auch Fluorouracil bewirken ein Hand-Fuß-Syndrom, das sich u.a. in Taubheitsgefühlen, Par- und Dysästhesien äußern kann<sup>184,230</sup>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erfassung und Bewertung der oxaliplatin-induzierten Neurotoxizität viele Probleme aufwirft. Außerdem kann nicht immer exakt beurteilt werden, ob die Symptome wirklich durch Oxaliplatin hervorgerufen wurden.

## 4.7 Tumoransprechen

Ähnlich wie für die Toxizität kann auch bei der Bewertung des Ansprechens nicht festgestellt werden, ob eine Tumorremission auf Oxaliplatin, auf die Kombinationspartner oder die möglicherweise synergistisch wirkende Kombination von Arzneistoffen zurückzuführen ist. Dieses Problem besteht grundsätzlich für alle Kombinationstherapien.

Außerdem können weitere Faktoren, die zunächst von der verabreichten Chemotherapie unabhängig sind, die Wahrscheinlichkeit einer Remission mit beeinflussen. Dazu gehören neben dem Stadium der Erkrankung bestimmte Eigenschaften der Tumoren, anhand der die Prognose des Patienten vorhergesagt werden kann. Für kolorektale Karzinome sind dies beispielsweise der Verlust von bestimmten Chromosomen, eine Mikrosatelliteninstabilität oder die Konzentration von vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) im Plasma<sup>231,232,233</sup>.

In dieser Arbeit war das Tumoransprechen in allen Teilen der Untersuchung moderat ausgeprägt. Unter allen Patienten, die hinsichtlich der Response beurteilt werden konnten, waren 21,6 %, die eine partielle Remission oder einen "minor response" erreichten. Trends hinsichtlich der antitumoralen Wirksamkeit bei bestimmten Tumortypen waren in der Patientengruppe, die bzgl. ihrer Tumorentitäten sehr heterogen war, nicht erkennbar.

#### 4.8 Zusammenhänge von pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern mit klinischen Effekten

Für alle in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge von pharmakokinetischen oder pharmakodynamischen Parametern und klinischen Effekten ist, wie bereits dargelegt, zu beachten, dass weder Toxizität noch Ansprechen auf Oxaliplatin allein zurückgeführt werden können. Auch können sowohl die Pharmakokinetik wie auch das Ausmaß der Platin-DNA-Adduktbildung theoretisch durch andere Substanzen beeinflusst worden sein.

Pharmakokinetische Interaktionen zwischen Fluorouracil und Oxaliplatin mit einer Beeinflussung der Platinkinetik sind nach Datenlage in der Literatur eher unwahrscheinlich (s. Kap. 1.3.6); Einflüsse auf die Platin-DNA-Adduktbildung sind bisher nicht bekannt. Gemcitabin und Irinotecan, die zusammen mit 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin verabreicht wurden, zeigten ebenfalls keine pharmakokinetischen Interaktionen mit Oxaliplatin. Während auch für diese Substanzen der Einfluss auf die Adduktbildung bisher nicht untersucht wurde, stellten *Ma et al.* fest, dass Docetaxel, das einem Patienten zusammen mit 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin appliziert wurde, sowie Paclitaxel die zelluläre Aufnahme von Cisplatin und die Adduktbildung inhibieren können<sup>227</sup>.

Hinsichtlich einer Interaktion mit der komedizierten Prüfsubstanz konnte in dieser Arbeit keine Beeinflussung der Pharmakokinetik oder -dynamik festgestellt werden. Die Substanz wurde im ersten Zyklus erst vier Tage nach Applikation von Oxaliplatin erstmalig eingenommen, so dass die Werte des Zyklus I von diesem Arzneistoff unbeeinflusst sind. Diese unterschieden sich nicht signifikant von denen des Zyklus II (s. Kap. 3.4.2), so dass eine Interaktion eher unwahrscheinlich ist. Jedoch kann eine Wechselwirkung nicht gänzlich ausgeschlossen werden, zumal In-vitro-Daten für eine Beeinflussung der Adduktbildung sprechen<sup>234</sup>. In wie weit diese In-vitro-Befunde jedoch für die klinische Anwendung relevant sind, ist noch nicht geklärt.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Platinkinetik auf Zusammenhänge mit der Toxizität geprüft (s. Kap. 3.8.1), wobei der Schwerpunkt dabei auf den Patienten, die 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin erhalten hatten, lag. Diese wurden dazu gemäß des Schweregrads ihrer Symptome in Gruppen mit niedriger und hoher Toxizität eingeteilt und diese Gruppen im Hinblick auf die Platinexposition in Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten miteinander ver-

glichen. Idealerweise wären die Gruppen gleich groß gewesen, was aber durch die geringe Zahl der Patienten und v.a. die niedrigen Toxizitätsraten nur ansatzweise möglich war. Dieser Aspekt und die in Kap. 3.8 dargelegten Schwierigkeiten bei der Gruppeneinteilung sowie die in Kap. 4.6 beschriebenen Probleme bei Erfassung und Evaluierung der Toxizität erlauben nur eine tendenzielle Beurteilung der Ergebnisse.

Für die Hepatotoxizität zeigten sich für alle untersuchten Patienten (130 und 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin) keine Zusammenhänge mit den untersuchten pharmakokinetischen Parametern. Dies stimmt gut mit der Tatsache überein, dass hepatotoxische Effekte unter einer Oxaliplatintherapie nur in seltenen Fällen auftreten und wahrscheinlich eher auf die komedizierten Arzneimittel oder eine Lebermetastasierung im Zuge eines kolorektalen Karzinoms zurückzuführen sind.

Granulozytopenie und Thrombozytopenie zeigten ebenfalls keine Zusammenhänge mit der Platinpharmakokinetik; dagegen wiesen Patienten mit einer Leukopenie des Schweregrads 1 in den Erythrozyten eine signifikant höhere AUC auf als die Patienten mit normaler Leukozytenzahl. Dieser Trend war in beiden Behandlungszyklen festzustellen. Für verlässlichere Angaben sollten weitere Patienten untersucht werden, da die Zahl von insgesamt zwei Patienten in Zyklus I und 4 Patienten in Zyklus II mit Leukopenie für eine sichere Aussage viel zu gering ist. In der Literatur wurde ein solcher Zusammenhang bisher noch nicht beschrieben, da auch in der Regel die Platinspezies in Erythrozyten als pharmakologisch inaktiv angesehen werden und daher diese Matrix für solche Untersuchungen nicht herangezogen wird. Beschrieben wurde bisher eine Dosisabhängigkeit für die Thrombozytopenie<sup>108</sup>, aber eine direkte Beziehung zwischen pharmakokinetischen Parametern und Hämatotoxizität konnte nicht festgestellt werden<sup>206</sup>. Dies kann allerdings auch auf die zu geringen Toxizitätsraten im untersuchten Patientenkollektiv zurückgeführt werden<sup>206</sup>.

Ebenso wenig wurden in der Literatur bisher Zusammenhänge zwischen Nephrotoxizität und der AUC in Vollblut und Erythrozyten beschrieben. Diese Beziehung wurde in dieser Arbeit festgestellt, da bei zwei Patienten in Zyklus I und drei Patienten in Zyklus II die AUC in den genannten Matrices höher war als bei den übrigen Patienten. Dieser Zusammenhang, der aufgrund der geringen Patientenzahl an einem größeren Kollektiv untersucht und bestätigt werden muss, ist insofern nicht verwunderlich, da die Clearance aus dem Vollblut und die Serumkreatininkonzentration, anhand der die Nephrotoxizität bewertet wurde, einen starken inversen Zusammenhang zeigten (s. Kap. 3.3.5). Dieser

Zusammenhang bestand, wie bereits in Kap. 4.3 erläutert, in etwas schwächerem Maße auch für das Ultrafiltrat. In vergleichbaren Untersuchungen wurde ebenfalls eine Korrelation zwischen Platinexposition und Serumkreatininkonzentration oder Kreatininclearance festgestellt. Im Rahmen dieser Untersuchungen war jedoch die höhere Platin-AUC nicht verbunden mit einer Verstärkung von Toxizität und somit kein Grund für eine Anpassung der Dosis<sup>86,206,216</sup>.

Für Oxaliplatin besitzt die Neurotoxizität die größte klinische Relevanz und ist häufig dosis- oder therapielimitierend. Im Rahmen dieser Arbeit konnte lediglich die *akute* Form der Neuropathie untersucht werden, da innerhalb der untersuchten Zyklen eine Gesamtdosis von ca. 700 mg/m<sup>2</sup>, ab der eine kumulative Neurotoxizität auftritt, nicht erreicht wurde.

Signifikante Unterschiede für Patienten mit Neurotoxizität der Schweregrade 2 - 4 gegenüber Grad 1 hinsichtlich der AUC in Ultrafiltrat, Vollblut oder Erythrozyten bestanden nicht. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz dahingehend, dass die Platinexposition bei Patienten mit besonders stark ausgeprägter Toxizität (Grad 3 - 4) höher war. Diese Tendenz bestand für alle drei untersuchten Matrices, v.a. aber für Vollblut und Erythrozyten. In Kap. 1.3.5 wurden verschiedene Hypothesen zum Pathomechanismus der Neurotoxizität vorgestellt. Danach könnte die Verteilung und Kumulation von Platin in verschiedenen Nervengeweben und Schädigung sensorischer Spinalganglien eine Ursache für die neurotoxischen Symptome sein. Oxaliplatin weist eine ausgeprägte Proteinbindung und Gewebeverteilung auf, die im Gegensatz zu Carboplatin, für das nur in der Hochdosistherapie Neurotoxizität beschrieben ist, wesentlich höher ist. Daher könnte zwischen der Kumulation von Platin in Erythrozyten, die möglicherweise als Surrogatzellen für Nervengewebe dienen könnten, und der stärkeren Nervenschädigung ein Zusammenhang bestehen. Ähnliche Zusammenhänge wären eventuell auch für die anderen Arten der Toxizität, die mit einer erhöhten Konzentration in den Erythrozyten einhergingen, denkbar. Die Kumulation von Platin im Vollblut oder in Erythrozyten wurde in klinischen Studien im Bezug auf die therapieassoziierte Toxizität bisher nicht untersucht, so dass die Ergebnisse nicht mit Literaturdaten verglichen werden können.

Zusammenhänge zwischen der Pharmakokinetik im Ultrafiltrat und den untersuchten Arten der Toxizität waren dagegen nicht erkennbar. Dies ist einerseits überraschend, da das Ultrafiltrat im Gegensatz zu Vollblut oder Erythrozyten als die pharmakologisch aktive Fraktion betrachtet wird, die neben antitumoraler Wirksamkeit auch Toxizität hervor-

rufen kann. Andererseits muss beachtet werden, dass auch im Ultrafiltrat inaktive Spezies in Form von Aminosäurekonjugaten vorhanden sind<sup>119</sup>. Hinsichtlich der fehlenden pharmakologischen Aktivität von Platinspezies in Erythrozyten dürfen Hinweise aus der Literatur nicht außer Acht gelassen werden, nach denen aus Erythrozyten freigesetzte Platinspezies durchaus in der Lage waren, Toxizität hervorzurufen oder zu verstärken<sup>105</sup>.

Zwischen der AUC von Platin im Ultrafiltrat und dem Tumoransprechen konnten keine Zusammenhänge festgestellt werden. Auch für die Platinexposition in anderen Matrices war keine Beziehung zur antitumoralen Wirksamkeit zu erkennen. Die Ursache dafür könnte sein, dass das Ultrafiltrat wie bereits mehrfach erwähnt, nicht nur pharmakologisch aktive Spezies sondern auch inaktive Aminosäurekonjugate enthält. Weiterhin muss beachtet werden, dass das beobachtete Ansprechen nicht unmittelbar mit der Oxaliplatingabe im Zusammenhang stehen muss, sondern ursächlich vielleicht eher mit Kombinationspartnern oder einer eventuell vorhandenen synergistischen Wirkung der kombinierten Substanzen verknüpft ist.

In ähnlicher Weise wie die Platinpharmakokinetik wurde auch das Ausmaß der Adduktbildung in Form der Platin-Nukleotid-Verhältnisse und der AUA auf Zusammenhänge zunächst mit der therapieassoziierten Toxizität geprüft. Dabei wurde festgestellt, dass Patienten mit Hämato-, Nephro- und Hepatotoxizität Addukte in einer vergleichbaren Menge bildeten wie Patienten ohne diese unerwünschten Wirkungen.

Für die Neurotoxizität zeigte sich jedoch, dass die  $A_{\max}$  bei Patienten mit neuropathischen Symptomen der Schweregrade 2 - 4 signifikant höher waren als bei Patienten, die keine oder nur eine leichte Form der Neurotoxizität aufwiesen. Diese Tendenz war v.a. bei den Patienten, die mit 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin behandelt wurden, ausgeprägt, während für die Gruppe, die 50 mg/m<sup>2</sup> in wöchentlichen Abständen erhielt, kein Unterschied festzustellen war.

Dieses nicht einheitliche Ergebnis könnte zum einen auf die Problematik bei der Erfassung und Bewertung der Neurotoxizität zurückzuführen sein (s. Kap. 4.6.2).

Als eine weitere Ursache dafür, dass nach Gabe von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin keine Beziehung zwischen  $A_{\max}$  und den akuten neurotoxischen Symptomen erkennbar war, kommt die niedrigere Dosis in Frage. Dadurch kamen wesentlich niedrigere maximale Adduktverhältnisse zustande als nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup>. Stattdessen sind die Werte vermutlich durch die wöchentlichen Gaben gleichmäßig hoch, aber ohne ausgeprägte



Spitzenwerte. Sind aber hohe Maximalwerte mit einer stärkeren Neurotoxizität verbunden, müsste das Applikationsschema mit der wöchentlichen Gabe von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin weniger neurotoxisch sein als die Gabe einer höheren Regeldosis in größerem zeitlichem Abstand. Vergleicht man Schweregrade und Häufigkeiten, mit denen neuropatische Symptome auftraten, so ist auch hier die unterschiedliche Bewertungsskala zu beachten. Ähnlich wie bei der gemeinsamen Auswertung der Daten beider Patientengruppen hinsichtlich  $A_{\max}$  und Neurotoxizität (s. Kap. 3.8.1) erscheint es sinnvoll, die mit Grad 2 bewerteten Patienten, die 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin erhielten, der leichteren Toxizität zuzurechnen. Nach dieser Art der Bewertung traten ausgeprägte akute neurotoxische Symptome unter 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin tatsächlich häufiger auf. Ein weiteres Indiz dafür, dass hohe Spitzenkonzentrationen mit höherer Neurotoxizität verbunden sind, ist die Tatsache, dass durch eine Verlängerung der Infusionsdauer von zwei auf vier oder sechs Stunden pharyngo-laryngeale Missempfindungen vermieden werden können. Außerdem wurde bei einem Vergleich verschiedener Applikationsschema festgestellt, dass nach Gabe von 85 mg/m<sup>2</sup> alle zwei Wochen weniger Neurotoxizität auftrat als nach einer Oxaliplatingabe von 130 mg/m<sup>2</sup> alle drei Wochen<sup>82,108</sup>.

In der Literatur wurde in einzelnen Studien, die in Tab. 4.7 zusammengestellt sind, nach Gabe von Cisplatin oder Carboplatin das Ausmaß der Platin-DNA-Adduktbildung im Hinblick auf die Toxizität bewertet. Dabei waren die Ergebnisse wie in dieser Arbeit nicht einheitlich. Während in zwei Untersuchungen keine Zusammenhänge gefunden wurden, wurde in einer weiteren Studie festgestellt, dass die AUA mit dem Ausmaß der Thrombozytopenie korrelierte. Auch eine inverse Korrelation zwischen AUA und Leukopenie sowie zwischen der Abnahme der Adduktmenge und Leukopenie wurden beobachtet. Die Ergebnisse waren von den verwendeten Techniken zur Quantifizierung der Platin-Nukleotid-Verhältnisse und den untersuchten Tumorentitäten unabhängig. Die erfassten Adduktparameter waren in diesen Studien nicht gleich: es wurden AUA,  $A_{\max}$  oder auch die Abnahme von Addukten gemessen. Ebenso waren die Applikationsschemata unterschiedlich. Daher sind Verallgemeinerungen hinsichtlich möglicher Zusammenhänge von Addukten und Toxizität auf der Basis dieser Daten nicht möglich.

Tab. 4.7 Zusammenhang zwischen Ausmaß der DNA-Platinierung und therapie-assoziiertes Toxizität

Referenz	Platin-komplex	Bestimmungsmethode	Tumortyp	Zusammenhang Addukte/Toxizität
Parker et al., 1993 <sup>235</sup>	Cisplatin + Carboplatin	GF-AAS	Kopf- und Hals-Tumore	Inverser Zusammenhang zwischen Abnahme der Adduktmenge (von A <sub>24h</sub> in Zyklus I auf A <sub>0h</sub> in Zyklus II) und <i>Leukopenie</i>
Schellens et al., 1996 <sup>138</sup>	Cisplatin	GF-AAS	Kopf- und Hals-Tumore, NSCLC, Melanome u.a.	Zusammenhang zwischen AUA und <i>Thrombozytopenie</i> , aber nicht Nephrotoxizität, Leukopenie, Anämie oder Neurotoxizität
Veal et al., 2001 <sup>222</sup>	Cisplatin	ELISA	Neuroblastom, Hepatoblastom, u.a.	Korrelation zwischen der AUA und der Abnahme der Leukozyten
Bonnetti et al., 1996 <sup>141</sup>	Cisplatin + Carboplatin	ICP-MS	Kopf- & Hals-Tumore, Mamma-, Hoden-, Ovarial-CA, NSCLC u.a.	Kein Zusammenhang zwischen Adduktmenge und Serumkreatininkonzentration bzw. Hämoglobin-Abnahme
Ghazal-Aswad et al., 1999 <sup>236</sup>	Carboplatin	ELISA	Ovarial-CA	Kein Zusammenhang zwischen Adduktmenge und Thrombozytopenie

NSCLC Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom

CA Karzinom

ELISA Enzyme linked immunosorbent assay

ICP-MS Induktiv-gekoppelte-Plasma-Massenspektrometrie

In zahlreichen Studien wurden mögliche Zusammenhänge zwischen Tumorsprechen und Ausmaß der DNA-Platinierung durch Cisplatin und Carboplatin oder deren Kombination untersucht. Diese Studien sind in Tab. 4.8 mit den untersuchten Tumorentitäten, dem erfassten Adduktparameter, der angewandten Quantifizierungsmethode und dem Ergebnis hinsichtlich einer Korrelation mit dem Ansprechen dargestellt.

All diese Studien sind nur schwer miteinander vergleichbar. Neben unterschiedlichen Substanzen und Zusatzmedikationen wurden auch verschiedene Analysemethoden zur Bestimmung der Platin-DNA-Addukte eingesetzt. Während mit Verfahren wie

GF-AAS oder ICP-MS die Gesamtplatinierung gemessen wird, wird mittels ELISA nur ein Bruchteil der gebildeten DNA-Addukte erfasst. Dieser beträgt ca. 0,2 % der Gesamtplatinierung und besteht im Wesentlichen aus den Pt-GG-Addukten, gegen die die verwendeten Antikörper gerichtet sind<sup>237</sup>. Die Art, wie die Addukte bestimmt werden, beeinflusst offenbar die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich einer Korrelation mit dem Tumoransprechen entscheidend. In vergleichenden Untersuchungen von *Gupta-Burt et al.* und *Poirier et al.* wurde festgestellt, dass das mittels ELISA quantifizierte Ausmaß der DNA-Platinierung mit dem Ansprechen korreliert, nicht aber das Ausmaß der mit AAS bestimmten DNA-Platinierung<sup>242,243</sup>.

Auch lassen sich die erhaltenen Ergebnisse nicht von einer Tumorerkrankung auf die andere übertragen. Während beispielsweise für Patientinnen mit Ovarialkarzinom ein Zusammenhang zwischen Adduktmenge und Response beobachtet werden konnte, wurde in derselben Untersuchung festgestellt, dass dies für Patientinnen mit Mamma-karzinom nicht galt<sup>242</sup>.

Daher sind die Ergebnisse von Untersuchungen, in denen bis zu 24 verschiedene Tumorentitäten gemeinsam untersucht und ausgewertet wurden<sup>221</sup>, nur eingeschränkt mit den Ergebnissen anderer Studien zu vergleichen und nicht zu verallgemeinern.

In allen aufgeführten Untersuchungen (s. Tab. 4.8) war eine hohe Variabilität der gemessenen Adduktparameter zu verzeichnen, die dazu führte, dass sich die Bereiche der Adduktverhältnisse von Respondern und Non-Respondern stark überlappten. Trotzdem wurde in einigen Studien ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Ausmaßes der DNA-Platinierung zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Allerdings gab es auch Studien, in denen keine Zusammenhänge oder sogar inverse Korrelationen beobachtet wurden. Danach wären hohe Platin-Nukleotid-Verhältnisse verbunden mit fehlendem Tumoransprechen und schlechter Prognose.

Tab. 4.8 Zusammenhang zwischen Ausmaß der DNA-Platinierung und Tumoransprechen

Referenz	Platin-komplex	Tumor-typ	Bestimmte Parameter	Bestimmungsmethode	Zusammenhang Addukte/Response
Poirier et al., 1985 <sup>238</sup>	Cisplatin	Ovarial-, Hoden-CA	Quantifizierbarkeit der Platin-DNA-Addukte	ELISA	+
Reed et al., 1986 <sup>239</sup>	Cisplatin	Ovarial-, Hoden-CA	Quantifizierbarkeit der Platin-DNA-Addukte	ELISA	+
Porier et al., 1987 <sup>240</sup>	Cisplatin	Ovarial-, Hoden-, Lungen-CA	Quantifizierbarkeit der Platin-DNA-Addukte	ELISA	+
Reed et al., 1987 <sup>135</sup>	Cisplatin + Carboplatin	Ovarial-CA	Adduktmenge am 6. oder 4. Zyklustag	ELISA	+
Reed et al., 1988 <sup>134</sup>	Cisplatin	Hoden-CA	A <sub>max</sub> der in verschiedenen Zyklen gemessenen Werte	ELISA	+
Dabholkar et al., 1992 <sup>241</sup>	Cisplatin + Carboplatin	15 verschiedene Tumortypen	A <sub>24 h</sub> nach Carboplatin- und Cisplatin-gabe in 2 Zyklen	GF-AAS	+
Gupta-Burt et al., 1993 <sup>242</sup>	Cisplatin + Carboplatin	Ovarial-CA	A <sub>24 h</sub> nach der letzten Platininfusion des jeweiligen Behandlungszyklus	ELISA	+
		Mamma-CA	A <sub>24 h</sub> nach der letzten Platininfusion des jeweiligen Behandlungszyklus	ELISA und GF-AAS	0
Parker et al., 1993 <sup>235</sup>	Cisplatin + Carboplatin	Kopf-/Hals-Tumore	A <sub>24 h</sub> in Zyklus I und A <sub>0 h</sub> in Zyklus II; Bestimmung der Addukt-Abnahme	GF-AAS	+(n.s.)
Parker et al., 1991 <sup>136</sup>	Cisplatin + Carboplatin	15 verschiedene Tumortypen	A <sub>24 h</sub> nach der Carboplatin- und der Cisplatin-gabe in 2 Zyklen	GF-AAS	+

Tab. 4.8 Fortsetzung

Referenz	Platin-komplex	Tumor-typ	Bestimmte Parameter	Bestimmungsmethode	Zusammenhang Addukte/Response
Poirier et al., 1993 <sup>243</sup>	Cisplatin + Carboplatin	Ovarial-, Mamma-, Hoden-, Kolon-CA	Adduktmenge 1 Tag nach der Platingabe	ELISA	+
			Adduktmenge 1 Tag nach der Platingabe	GF-AAS	0
Reed et al., 1993 <sup>221</sup>	Cisplatin + Carboplatin	24 verschiedene Tumortypen	Adduktmenge 1 Tag nach der Platingabe in zwei Zyklen	GF-AAS	+
Schellens et al., 1996 <sup>137</sup>	Cisplatin	Kopf-/Hals-Tumore, NSCLC, Melanome u.a.	Bestimmung der AUA aus A <sub>0 h</sub> , A <sub>3 h</sub> , A <sub>18 h</sub>	GF-AAS	+
Bonnetti et al., 1996 <sup>141</sup>	Cisplatin + Carboplatin	Kopf-/Hals-Tumore, Mamma-, Hoden-, Ovarial-CA, NSCLC u.a.	A <sub>0 h</sub> , A <sub>1 h</sub> , A <sub>24 h</sub>	ICP-MS	+ (A <sub>24 h</sub> ; n.s.)
Boffetta et al., 1998 <sup>244</sup>	Cisplatin	Hoden-CA	A <sub>15 min</sub> nach Platingabe an Tag 1 und 5; sowie A <sub>24 h</sub> nach der letzten Platininfusion	ELISA	0
Motzer et al., 1994 <sup>142</sup>	Cisplatin + Carboplatin	Keimzell-tumore	A <sub>0 h</sub> (1.Gabe) und A <sub>24 h</sub> (letzte Gabe)	ELISA	+ (n.s.)
			A <sub>0 h</sub> (1.Gabe) und A <sub>24 h</sub> (letzte Gabe)	GF-AAS	-
Fisch et al., 1996 <sup>220</sup>	Cisplatin	Keimzell-tumore	A <sub>24 h</sub> nach der ersten und letzten Platingabe in Zyklus I	GF-AAS	-

+ Responder wiesen eine höhere DNA-Platinierung auf als Non-Responder.

- Non-Responder wiesen eine höhere DNA-Platinierung auf als Responder.

0 Zwischen Respondern und Non-Respondern existierte hinsichtlich der DNA-Platinierung kein Unterschied.

n.s. nicht signifikant

CA Karzinom

Keine oder inverse Korrelationen zwischen dem Ausmaß der Adduktbildung und dem Tumorsprechen wurden v.a. in neueren Untersuchungen beobachtet, die nur eine oder wenige Tumorentitäten untersuchten. Daher ist es möglich, dass bei diesen die DNA-Platinierung in den Leukozyten nicht der Menge der Addukte im Tumorgewebe entsprach. Die Fallzahlen in den Autopsiestudien, die eine ähnliche Zahl an Platin-DNA-Addukten in Tumorgewebe und Knochenmark beobachteten, waren so gering, dass man nicht davon ausgehen kann, dass dieser Zusammenhang grundsätzlich für alle Tumorarten gilt<sup>141,220</sup>.

Wie bereits erwähnt, spielt auch die Quantifizierungsmethode der Addukte eine große Rolle beim Auffinden möglicher Korrelationen. Um letztendlich zu klären, welche Adduktspezies in Zusammenhang mit der Wirksamkeit bei einer bestimmten Tumorentität stehen, müssten Techniken zur Addukttrennung entwickelt werden, die auch für die Bestimmung in klinischen Proben eine ausreichend niedrige Bestimmungsgrenze aufweisen<sup>142,220</sup>.

Auch die Therapieschemata und die zusammen mit den Platinkomplexen verabreichten Zytostatika können die Korrelation zwischen DNA-Platinierung und Ansprechen beeinflussen<sup>142</sup>.

Zudem scheint auch der Zeitpunkt der Probenentnahme von Bedeutung zu sein. Die bestimmten Adduktparameter in den vorgestellten Studien waren nicht einheitlich, so dass daraus kein Fazit hinsichtlich eines optimalen Zeitpunkts gezogen werden kann. Der Zeitpunkt der Adduktbestimmung ist wichtig, da nicht nur die absolute Zahl der Addukte, sondern auch deren Veränderungen über die Zeit, die eventuell Reparaturvorgänge in den Zellen widerspiegeln können, in Zusammenhang mit dem Tumorsprechen stehen könnten<sup>235,237</sup>.

Somit können viele Faktoren die ermittelten Platin-Nukleotid-Verhältnisse und deren Zusammenhänge mit dem Tumorsprechen beeinflussen.

Dies zeigte sich auch im Rahmen dieser Arbeit. Die Ergebnisse für die beiden untersuchten oxaliplatinhaltigen Applikationsschemata, die sich bezüglich der Oxaliplatin-Regeldosis, der komedizierten Krebstherapeutika und der untersuchten Zeitspanne nach Infusionsbeginn unterschieden, waren nicht gleich. Auch die verschiedenen zur Auswertung herangezogenen Adduktparameter, wie  $A_{\max}$ ,  $AUA_{0-24\text{ h}}$ ,  $AUA_{0-48\text{ h}}$  und  $A_{0\text{ h}}$ ,  $A_{4\text{ h}}$ ,  $A_{24\text{ h}}$  sowie  $A_{48\text{ h}}$  zeigten unterschiedliche Ergebnisse.

Nach Gabe von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin, die in wöchentlichen Abständen appliziert wurden, waren für alle untersuchten Parameter keine Unterschiede zwischen der Gruppe der Responder und der Non-Responder festzustellen.

Für die Patienten, die 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin alle drei Wochen erhalten hatten, zeigte sich dagegen für einen der bestimmten Parameter ein Zusammenhang mit dem Tumoransprechen. Responder wiesen 48 h nach Infusionsbeginn ein höheres Platin-Nukleotid-Verhältnis auf als Non-Responder. Die DNA-Platinierung, die zu früheren Zeitpunkten 0, 4 und 24 nach Infusionsbeginn gemessen oder durch die A<sub>max</sub> sowie die AUA<sub>0-24 h/0-48 h</sub> charakterisiert wurde, stand in keiner Beziehung zum Ansprechen auf die Therapie. Somit wird auch an dieser Stelle deutlich, dass der Zeitpunkt der Probenentnahme eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Ergebnis spielt. In der Studie, in der 50 mg/m<sup>2</sup> appliziert wurden, waren Abnahmen später als 24 h nach Infusionsbeginn nicht möglich. Es ist also denkbar, dass aus diesem Grund eine Korrelation zwischen Adduktbildung und Ansprechen nicht erkannt werden konnte.

Für Oxaliplatin zeigten In-vitro-Untersuchungen, dass es im Vergleich zu Cisplatin in äquimolarer und äquitoxischer Dosierung weniger Addukte bildet und für die Wirkung somit eher die Resistenzmechanismen der Zellen eine entscheidende Rolle spielen<sup>39</sup>. Daher ist das bloße Ausmaß der DNA-Platinierung kurze Zeit nach der Oxaliplatingabe im Hinblick auf das Tumoransprechen wahrscheinlich weniger von Bedeutung als der Verlauf der Platin-Nukleotid-Verhältnisse über die Zeit, der eventuell Reparaturvorgänge widerspiegelt. Die Unterschiede im 48 h-Wert zwischen Respondern und Non-Respondern deuten darauf hin, dass bei Respondern offenbar die Addukte längere Zeit bestehen bleiben und nicht so schnell auf niedrigere Werte durch Reparatur gesenkt werden.

Das Ausmaß der Reparatur wurde auch durch Berechnung der Differenzen zwischen dem 48 h-Wert und den Platin-Nukleotid-Verhältnissen früherer Abnahmezeitpunkte bestimmt. Allerdings waren für die Abnahme der Adduktverhältnisse keine Korrelationen mit dem Ansprechen festzustellen, sondern allenfalls die Tendenz, dass Responder weniger Addukte reparierten. Das bedeutet, dass es möglicherweise für die Unterscheidung von Respondern und Non-Respondern nicht darauf ankommt, wie viele Addukte kurz nach der Infusion gebildet und im weiteren Verlauf repariert werden, sondern darauf, dass die DNA-Platinierung möglichst über längere Zeit erhalten bleibt.

Zur genaueren Charakterisierung der Addukt-Zeit-Verläufe und der Reparaturvorgänge nach Gabe von Oxaliplatin wäre es wünschenswert, die Platin-DNA-Adduktbildung engmaschiger zu untersuchen. Leider ist es aber bei einem benötigten Blutvolumen von 15 mL nicht möglich, noch mehr Entnahmen durchzuführen.

Der Trend, dass sich Responder und Non-Responder hinsichtlich der anhaltenden Platinierung der DNA unterscheiden, konnte auch in der Studie von *Parker et al.* gezeigt werden<sup>235</sup>. Dort wurde die Abnahme der Platin-Nukleotid-Verhältnisse zwischen dem 24 h-Wert des Zyklus I und dem Nullwert in Zyklus II zur Auswertung herangezogen. Diese Methode der Auswertung war nach Gabe von Cisplatin aufgrund des höheren DNA-Platinierungsgrad möglich. Auch vor Beginn der Platininfusion des zweiten Zyklus waren dort im Gegensatz zu Oxaliplatin die Werte deutlich von Null verschieden und konnten somit zur Auswertung herangezogen werden. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass die Nullwerte des ersten und zweiten Zyklus gleich waren und sich außerdem auch nicht zwischen Respondern und Non-Respondern unterschieden. Der Zeitpunkt "0 h nach Infusionsbeginn" ist somit für eine Differenzierung hinsichtlich des Ansprechens auf eine Oxaliplatin-Therapie eher ungeeignet.

Auch nach *Reed*<sup>237</sup> ist nicht nur das Ausmaß der DNA-Schädigung von Bedeutung im Hinblick auf das Tumorsprechen, sondern auch die DNA-Reparatur. Diese unterschiedliche Ausprägung der DNA-Reparatur bei Respondern und Non-Respondern, die sich in der Untersuchung von *Parker et al.* abzeichnet, steht im Einklang mit einem unterschiedlichen Ausmaß der Expression von NER-Enzymen, wie z.B. ERCC1 und XPA. Auch für diese existieren Unterschiede hinsichtlich der Expression im Tumorgewebe und außerdem Zusammenhänge mit dem Ansprechen auf die Therapie, die sich in verschiedenen Studien auch für Oxaliplatin zeigten<sup>125,126,127</sup>.

Eine gemeinsame Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte und der Expression verschiedener NER-Enzyme im Rahmen einer klinischen Studie wurde jedoch bisher nicht durchgeführt.

#### **4.9 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass verschiedene Strategien zur Optimierung einer oxaliplatinhaltigen Chemotherapie möglich sind.

Neben einer Anpassung von Therapieregime und Dosis der verabreichten Zytostatika als Reaktion auf aufgetretene klinische Effekte, wäre es wünschenswert, die individuell



geeignete Chemotherapie für einen Patienten im Vorfeld auszuwählen und eine Dosis zu applizieren, die auf die Einflussfaktoren des jeweiligen Patienten abgestimmt ist.

Für Oxaliplatin wurden bisher parallele Untersuchungen der Pharmakokinetik und der Platin-DNA-Adduktbildung, der patientenindividuellen Einflussfaktoren und ihrer Zusammenhänge mit klinischen Effekten nicht durchgeführt.

Hinsichtlich der Platinpharmakokinetik wurden in dieser Arbeit vergleichsweise geringe Variabilitäten für die pharmakokinetischen Parameter des Ultrafiltrats und des Plasmas gefunden. Es zeigten sich keine Zusammenhänge dieser Werte mit klinischen Effekten. Ein Grund dafür liegt vermutlich in der Bestimmung von Gesamtplatin, das, wie bereits mehrfach erwähnt, zu einem großen Teil auch im Ultrafiltrat aus Platinspezies besteht, die keine pharmakologische Aktivität mehr aufweisen. Im Falle des Carboplatins ist die Bestimmung aller platinhaltiger Verbindungen kein Nachteil, da die Bindung an Makromoleküle und die Metabolisierung so langsam erfolgen, dass das Gesamtplatin fast nur Carboplatin enthält.

Daher erscheint es sinnvoll, Verfahren anzuwenden, mit denen die Muttersubstanz Oxaliplatin und deren aktive Metaboliten bestimmt werden können. Dies ist mit Methoden von *Shord et al.* oder *Ehrson et al.* möglich<sup>114,115</sup>. In einer klinischen Untersuchung stellten *Shord et al.* fest, dass die pharmakodynamische Aktivität hinsichtlich Toxizität und antitumoraler Wirksamkeit auf Oxaliplatin selbst und weniger auf Biotransformationsprodukte zurückzuführen ist. Die von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Patienten zeigten für die pharmakokinetischen Parameter des Oxaliplatins eine geringe Variabilität, so dass keine Korrelation mit der Neurotoxizität beobachtet werden konnte<sup>115</sup>.

Auch die für Platin gefundenen Einflussfaktoren, wie z.B. die Nierenfunktion, zeigten bisher keine klinische Relevanz hinsichtlich einer Verstärkung von Toxizität. Dies ist aber wahrscheinlich auch auf die Problematik zurückzuführen, dass mit den verwendeten Analyseverfahren Gesamtplatin bestimmt wurde. Durch die Bestimmung der Ausgangssubstanz kann vielleicht ein Parameter gefunden werden, der Zusammenhänge mit klinischen Effekten zeigt und anhand dessen eine individualisierte Dosierung möglich ist.

Neben der Untersuchung der Platinexposition im Ultrafiltrat wurde auch die AUC in den Erythrozyten auf ihre Bedeutung für die Toxizität geprüft. In einzelnen Fällen zeigten sich in dieser Arbeit Zusammenhänge dieses Parameters mit der Stärke der aufgetretenen unerwünschten Wirkungen. Die Ursachen für die Kumulation von Platin in den Ery-

throzyten sind noch nicht abschließend geklärt. Ein Erklärungsansatz ist die hohe Membranpermeabilität der hydrophoben und reaktiven DACH-Komplexe und die nachfolgende irreversible Bindung an zelluläre Bestandteile. Es erscheint möglich, dass die Toxizität mit der Verteilung in Gewebe und der Kumulation in Zellen zusammenhängt und dass die Erythrozyten als Surrogatzellen zur Quantifizierung dieser Anreicherung im Gewebe dienen könnten. Für verlässlichere Angaben sollte allerdings die Platinkonzentration in den Erythrozyten direkt gemessen oder das Vollblut für eine Evaluierung herangezogen werden. Auch erscheint es notwendig, die Toxizität, insbesondere die Neurotoxizität besser und einheitlicher zu erfassen und zu bewerten.

Für die Platin-DNA-Adduktbildung bestehen unter bestimmten Bedingungen Zusammenhänge mit der Toxizität und mit dem Tumoransprechen. Diese wurden in dieser Arbeit aber auch in anderen Untersuchungen für Cisplatin beobachtet.

Falls sich diese Korrelationen zwischen dem Ausmaß der DNA-Platinierung und den klinischen Effekten in weiteren Untersuchungen, in denen besonders auf die späten Abnahmezeitpunkte und einheitliche Applikationsschemata Wert gelegt werden sollte, bestätigen, könnte man mit diesem Wissen nach der ersten Gabe von Oxaliplatin an einen Patienten mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorhersagen, ob dieser Patient von der Gabe profitiert oder ob er zur Gruppe der Non-Responder gehört.

Noch vorteilhafter wäre es, diesen Parameter mit prädiktivem Wert für das Ansprechen auf eine Therapie schon vor ihrem Beginn zu kennen. Dazu ist es notwendig zu untersuchen, ob die DNA-Platinierung in Leukozyten *während* einer Therapie mit der Platin-DNA-Adduktbildung *vor* einer Therapie nach Inkubation von Leukozyten des Patienten mit Oxaliplatin korreliert. Für Cisplatin konnte eine solche In-vivo-Ex-vivo-Korrelation gezeigt werden<sup>202,222,245</sup>. Falls ein solcher Zusammenhang auch für Oxaliplatin besteht, wäre es möglich, die Platin-DNA-Adduktbildung bereits vor der ersten Platininfusion zu charakterisieren und ein mögliches Tumoransprechen vorherzusagen.

Weiterhin sollten für die Auswahl eines geeigneten Therapieschemas auch andere prädiktive Faktoren nicht außer Acht gelassen werden, mit denen das Tumoransprechen auf eine spezielle Therapie vorhergesagt werden kann. Dazu gehören, wie bereits erwähnt, Enzyme des NER-Komplexes für Oxaliplatin oder auch metabolisierende Enzyme für Fluorouracil, mit dem Oxaliplatin häufig kombiniert wird. Eventuell kann die Untersuchung einer Kombination solcher prädiktiver Faktoren im Vorfeld unnötige Therapieversuche mit starker Toxizität aber ohne Wirksamkeit vermeiden helfen.

---

Die Einführung gänzlich neuer Therapien mit hoher Selektivität und wenig Toxizität sind in absehbarer Zeit nicht zu erwarten. Daher sollte im Moment auch die Optimierung der bestehenden Möglichkeiten vorangetrieben und so die Effektivität und Sicherheit der Chemotherapie in der Onkologie verbessert werden.

## 5 Zusammenfassung

Oxaliplatin ist ein Platinkomplex der dritten Generation, der eine gute antitumorale Wirksamkeit bei Tumoren aufweist, bei denen es bisher wenige Alternativen zur Standardtherapie gab. Aufgrund der fehlenden Kreuzresistenz zu anderen länger in der Therapie etablierten Komplexen und einem günstigen Toxizitätsprofil wird die Substanz inzwischen außer bei kolorektalen Karzinomen innerhalb klinischer Studien auch bei anderen Tumorentitäten eingesetzt. Oxaliplatin ist gut verträglich; seine dosislimitierende Toxizität besteht in einer sensorischen peripheren Neuropathie.

In dieser Arbeit wurden die Platinpharmakokinetik und die Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten untersucht und die Variabilität der bestimmten Parameter charakterisiert. Weiterhin wurden patientenindividuelle Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf die Pharmakokinetik und -dynamik geprüft. Außerdem wurde untersucht, in wie weit die pharmakokinetischen Parameter sowie das Ausmaß der DNA-Platinierung in Zusammenhang stehen mit klinischen Effekten wie Tumorsprechen und therapieassoziiierter Toxizität. Auf der Basis solcher Zusammenhänge könnten Strategien entwickelt werden, mit denen zum einen beurteilt werden kann, ob eine oxaliplatinhaltige Therapie für einen einzelnen Patienten geeignet ist. Zum anderen könnte die Dosierung von Oxaliplatin individuell angepasst werden.

Eine Voraussetzung für die pharmakokinetischen und -dynamischen Untersuchungen war die Etablierung und Validierung einer Quantifizierungsmethode für Platin in verschiedenen biologischen Matrices. Die Untersuchung der Platin-Konzentrations-Zeit-Verläufe in Ultrafiltrat, Plasma, Vollblut und Erythrozyten erfolgte mittels einer GF-AAS-Methode, die gemäß internationalen Anforderungen an bioanalytische Verfahren validiert wurde. Für alle geprüften Parameter, wie z.B. Selektivität, Linearität, Richtigkeit und Präzision konnten diese Anforderungen erfüllt werden.

Für die Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte nach Gabe von Oxaliplatin wurde eine bestehende Methode von *Kloft et al.*<sup>161</sup> dahingehend modifiziert, dass statt GF-AAS die adsorptive Voltammetrie zur Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins eingesetzt wurde. Für diese Methode der Platinquantifizierung, die eine wesentlich geringere Bestimmungsgrenze aufwies, wurde eine Teilvalidierung hinsichtlich Richtigkeit, Präzision und Wiederfindung von Platin in der speziellen Probenmatrix der Adduktproben durchgeführt. Auch die Gesamtpräzision des Verfahrens bestehend aus DNA-

Isolierung, DNA-Quantifizierung und Platin-Quantifizierung wurde überprüft; alle untersuchten Parameter erfüllten die Anforderungen an bioanalytische Verfahren.

Im Rahmen von Kooperationen mit 6 Kliniken wurden insgesamt 52 Patienten untersucht, die mit vier unterschiedlichen oxaliplatinhaltigen Kombinationstherapien behandelt wurden. Während und nach der Oxaliplatininfusion wurden 6 - 15 Blutproben pro Patient und Zyklus entnommen. In den Matrices Ultrafiltrat, Plasma, Vollblut und Erythrozyten wurden die Platin-Konzentrations-Zeit-Verläufe untersucht und anschließend mit Hilfe von Kompartiment-Modellen pharmakokinetisch ausgewertet. Die ermittelten Parameter, deren Variabilität gering war, stimmten im Wesentlichen mit Literaturdaten überein. Als Einflussfaktoren auf die Platinpharmakokinetik konnten Gewicht, Geschlecht, KOF und die Nierenfunktion ermittelt werden. Diese Faktoren, die die Platin-clearance beeinflussen, konnten auch in anderen Studien als Kovariaten identifiziert werden. Ihre klinische Relevanz und ihr Stellenwert für eine Anpassung der Oxaliplatin-dosis ist noch offen.

Weiterhin konnten Zusammenhänge zwischen der Platinexposition in Erythrozyten und der Toxizität beobachtet werden. Korrelationen von pharmakokinetischen Parametern des Ultrafiltrats mit der Stärke von unerwünschten Wirkungen bestanden nicht, genauso wenig wie Zusammenhänge zwischen Platinpharmakokinetik und Tumoransprechen.

Neben der Pharmakokinetik wurde die Platin-DNA-Adduktbildung in Leukozyten untersucht. Verglichen mit den pharmakokinetischen Parametern war die Variabilität der Platin-Nukleotid-Verhältnisse und der daraus bestimmten Maximalwerte und Flächen unter der Adduktcurve sehr hoch. Als Einflussfaktor auf das Ausmaß der DNA-Platinierung konnte das Geschlecht identifiziert werden. Neben einem Zusammenhang der maximalen Platin-Nukleotid-Verhältnisse mit der Neurotoxizität wurde festgestellt, dass die DNA-Platinierung 48 h nach Infusionsbeginn für Patienten mit Response höher war als für Non-Responder. Falls sich dieser Sachverhalt an weiteren Patienten bestätigt, wäre es mit der Bestimmung dieses Parameters möglich, den Nutzen einer oxaliplatinhaltigen Therapie für einen individuellen Patienten abzuschätzen. Diese Strategie sollte dahingehend weiter entwickelt werden, dass die Adduktbildung in einer Ex-vivo-Untersuchung bereits vor Therapiebeginn charakterisiert werden kann. Dadurch könnte eventuell in Kombination mit weiteren prädiktiven Faktoren der Nutzen der Oxaliplatintherapie vor der ersten Applikation vorhergesagt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt, Wiesbaden: *Todesursachen in Deutschland* (www.destatis.de)
- [2] Fraumeni JJ, Hoover R, Devesa S, Kinlen L. *Epidemiology of Cancer*. In: De Vita VT, Hellmann S, Rosenberg S (Hrsg.): *Cancer: Principles and practice in oncology*. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1989; 150-181
- [3] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (Hrsg.): *Chemotherapie maligner Tumoren*. In: *Mutschler - Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2001; 873-908
- [4] Scheulen ME, Strumberg D, Barth J, Weißler M. *Antineoplastisch wirksame Substanzen*. In: Seeber S, Schütte J (Hrsg.): *Therapiekonzepte Onkologie*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 2003; 48-114
- [5] Krämer I. *Onkologische Pharmazie*. In: Jaehde U, Radziwill R, Mühlebach A, Schunack W (Hrsg.): *Lehrbuch der Klinischen Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2003; 307-336
- [6] Kloft C, Jaehde U. *Dosisindividualisierung*. In: Jaehde U, Radziwill R, Mühlebach A, Schunack W (Hrsg.): *Lehrbuch der Klinischen Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2003; 201-223
- [7] Rosenberg B. *Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on*. In: Lippert B (Hrsg.): *Cisplatin*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH, Zürich/Weinheim, 1999; 3-27
- [8] Peyrone M. *Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür*. Ann Chem Pharm 1844; 51: 1-29
- [9] Highley MS, Calvert AH. *Clinical experience with cisplatin and carboplatin*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 171-194
- [10] Hartmann J, Lipp H. *Toxicity of platinum compounds*. Expert Opin Pharmacother 2003; 4: 889-901
- [11] Mannic S, Gatti L, Carenini N, Fumagalli G, Zunino F, Perego P. *Mechanisms controlling sensitivity to platinum complexes: role of p53 and DNA mismatch repair*. Curr Cancer Drug Targets 2003; 3: 21-29
- [12] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. *Clinical status of cisplatin, carboplatin and other platinum-based antitumor drugs*. In: Lippert B (Hrsg.): *Cisplatin*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH, Zürich/Weinheim, 1999; 31-69
- [13] Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R. *Cellular and molecular aspects of drugs of the future: Oxaliplatin*. Cell Mol Life Sci 2002; 59: 1914-1927
- [14] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. *Clinical experience - DACH-based platinum drugs*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 231-249
- [15] Burchenal JH, Kalahar K, O'Toole T, Chisholm J. *Lack of cross-resistance between certain platinum coordination compounds in mouse leukemia*. Cancer Res 1977; 37: 3455-3457
- [16] Kidani Y, Okamoto K, Noji M, Tashiro T. *Antitumor activity of platinum(II) complexes of 1-amino-2-aminomethylcyclohexane isomers*. Gann 1978; 69: 863-864
- [17] Sanofi-Synthelabo GmbH. *Europäische Zulassung für Oxaliplatin*. Dtsch Apoth Ztg 1999; 139: 3116

- [18] Satraplatin Firmeninformation, GPC Biotech, 2003 (<http://www.gpc-biotech.com>)
- [19] Kelland LR. *New platinum drugs*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 299-319
- [20] Muro K, Ando N, Nishimaki T, Ohtsu A, Aogi K, Aoyama N, Nagai K, Kato H. *A phase II study of nedaplatin and 5-fluorouracil in metastatic squamous cell carcinoma of the esophagus: The Japan Clinical Oncology Group (JCOG) trial (JCOG 9905)*. Proc Am Soc Clin Oncol 2003; 22: 277 (Abstr. 1112)
- [21] Kurata T, Yamamoto N, Tamura K, Kaneda H, Nogami T, Uejima H, Nakagawa K, Fukuoka M. *Phase I study of nedaplatin (N) in combination with gemcitabine (G) in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Proc Am Soc Clin Oncol 2003; 22: 692 (Abstr. 2781)
- [22] Onishi Y, Nakamura T, Hatae M, Adachi S, Ogasawara T. *Phase I study of weekly nedaplatin and radiation therapy for advanced cervical cancer*. Proc Am Soc Clin Oncol 2002; 21: 177 b (Abstr. 2528)
- [23] Kidani Y, Noji M, Tashiro T. *Antitumor activity of platinum (II) complexes of 1,2-diaminocyclohexane isomers*. Gann 1980; 71: 637-643
- [24] Serradell MN, Castañer J, Castañer RM, Kidani Y. *Oxaliplatin*. Drugs Fut 1989; 14: 529-532
- [25] Liedtke G. *Oxaliplatin*. In: Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, HagerRom, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2003
- [26] Kidani Y, Inagaki K, Iigo M, Hoshi A, Kuretani K. *Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexane-platinum complexes against sarcoma-180 ascites form*. J Med Chem 1978; 21: 1315-1318
- [27] Bruck MA, Bau R, Noji M, Inagaki K, Kidani Y. *The crystal structures and absolute configurations of the anti-tumor complexes Pt(oxalato)(1R,2R-cyclohexandiamine) and Pt(malonato)(1R,2R-cyclohexandiamine)*. Inorg Chim Acta 1984; 92, 279-284
- [28] Mani S, Graham MA, Bregmann DB, Ivy P, Chaney SG. *Oxaliplatin: A review of evolving concepts*. Cancer Invest 2002; 20: 246-263
- [29] Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo R. *Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel*. Biochem Pharmacol 1996; 52: 1855-1865
- [30] Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. *Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies*. Ann Oncol 1998; 9: 1053-1071
- [31] Luo FR, Wyrick SD, Chaney SG. *Biotransformations of oxaliplatin in rat blood in vitro*. J Biochem Mol Toxicol 1999; 13: 159-163
- [32] Pendyala L, Creaven PJ. *In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin*. Cancer Res 1993; 53: 5970-5976
- [33] Allen JM, Graham MA, Firth JW, Woolfrey S, Greenslade D, Morrison JG, McDougall S, Ross P, Cunningham D. *Biotransformation and pharmacokinetic analysis of oxaliplatin in patients with advanced gastrointestinal cancer*. Proc Am Assoc Cancer Res 1998; 39: 159
- [34] Allain P, Heudi O, Cailleux A, Le Bouil A, Larra F, Boisdron-Celle M, Gamelin E. *Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients*. Drug Metab Dispos 2000; 28: 1379-1384
- [35] Gamelin E, Le Bouil A, Boisdron-Celle M, Turcant A, Delva R, Cailleux A, Krikorian A, Brienza S, Cvitkovic E, Robert J, Larra F, Allain P. *Cumulative pharmacokinetic study of*

- oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-Fluorouracil in colorectal cancer patients.* Clin Cancer Res 1997; 3: 891-899
- [36] Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB. *The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Pharmacol 2002; 62: 1154-1159
- [37] Chaney SG. *The chemistry and biology of platinum complexes with the 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand.* Int J Oncol 1995; 6: 1291-1305
- [38] Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. *Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review.* Clin Cancer Res 2000; 6: 1205-1218
- [39] Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. *Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin.* Mol Cancer Ther 2002; 1: 227-235
- [40] Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. *Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin.* Mol Pharmacol 1999; 56: 633-643
- [41] Saris CP, van de Vaart PJM, Rietbroek RC, Blommaert FA. *In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells.* Carcinogenesis 1996; 17: 2763-2769
- [42] Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM. *DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells.* Biochem Pharm 2003; 66: 225-237
- [43] Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. *Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM 216) platinum intrastrand DNA diadducts.* Cancer Res 1999; 59: 3968-3971
- [44] Chaney SG, Vaisman A. *Specificity of platinum-DNA adduct repair.* J Inorg Biochem 1999; 77: 71-81
- [45] Zdraveski Z, Mello J, Farinelli CK, Essigmann JM, Marinus MG. *MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA.* J Biol Chem 2002; 277: 1255-1260
- [46] Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, Galizia E, Antolini A, Loretelli C, Piga A, Bearzi I, Cellerino R, Porfiri E. *Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression.* J Clin Oncol 2002; 20: 1203-1208
- [47] Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, Nehme A, Christen RD, Haas M, MacLeod CL, Howell SB. *In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair.* Cancer Res 1997; 57: 1841-1845
- [48] Nehme A, Baskaran R, Nebel S, Fink D, Howell SB, Wang JY, Christ RD. *Induction of JNK and c-AB1 signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells.* Br J Cancer 1999; 79: 1104-1110
- [49] Graeven U, Schmiegel W. *Das Kolonkarzinom - Konsens der therapeutischen Strategien.* Internist 2000; 41: 876-885
- [50] Nolte W, Ramadori G. *Neuere Aspekte in der palliativen Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms.* Med Klin 2001; 96: 521-52
- [51] Schmoll HJ. *The role of oxaliplatin in the treatment of advanced metastatic colorectal cancer: prospects and future directions.* Semin Oncol 2002; 29 (Suppl. 15): 34-39
- [52] Köhne CH. *Chemotherapie des Kolonkarzinoms.* Arzneimitteltherapie 2001; 19: 51-63
- [53] Lipp HP. *Adjuvante und palliative Therapie des Kolonkarzinoms.* Krankenhauspharmazie 1999; 20: 414-434
- [54] Ardan B, Cua L, Tian E, Reddy R, Sridhar K, Benedetto P, Richman S, Legaspi A, Waldman S, Morrell L, Feun L, Savaraj N, Livingstone A. *A phase II study of weekly 24-*



- hour infusion with high-dose fluorouracil with leucovorin in colorectal carcinoma.* J Clin Oncol 1991; 9: 625-630
- [55] O'Connell M. *A phase III trial of 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer: A Mayo Clinic/North Central Cancer Treatment Group study.* Cancer 1989; 63 (Suppl. 6): 1026-1030
- [56] Köhne CH, Wils J, Lorenz M, Schoeffski P, Voigtmann R, Bokemeyer C, Lutz M, Kleeberg U, Ridwelski K, Souchon R, El-Serafi M, Weiss U, Burkhard O, Rückle H, Lichinitser M, Langenbuch T, Scheithauer W, Baron B, Couvreur ML, Schmoll HJ. *Randomized phase III study of high-dose fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion with or without leucovorin versus bolus fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer: European Organization of Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40952.* J Clin Oncol 2003; 20: 3721-3728
- [57] Diaz-Rubio E, Sastre J, Zaniboni A, Labianca R, Cortes-Funes H, de Braud F, Boni C, Benavides M, Dallavalle G, Homerin M. *Oxaliplatin as single agent in previously untreated colorectal carcinoma patients: a phase II multicentric study.* Ann Oncol 1998; 9: 105-108
- [58] Bécouarn Y, Ychou M, Ducreux M, Borel C, Bertheault-Cvitkovic F, Seitz JF, Nasca S, Nguyen TD, Paillot B, Raoul JL, Duffour J, Fandi A, Dupont-Andre G, Rougier P. *Phase II trial of oxaliplatin as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. Digestive group of french federation of cancer centers.* J Clin Oncol 1998; 16: 2739-2744
- [59] Machover D, Diaz Rubio E, De Gramont A, Schilf A, Gastiaburu JJ, Brienza S, Itzhaki M, Metzger G, N'Daw D, Vignoud J, Abad A, Francois E, Gamelin E, Marty M, Sastre J, Seitz JF, Ychou M. *Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines.* Ann Oncol 1996; 7: 95-98
- [60] De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. *Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.* J Clin Oncol 2000; 18: 2938-2947
- [61] Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, Chollet P, Llory JF, Letourneau Y, Coudert B, Bertheault-Cvitkovic F, Larregain-Fournier D, Le Rol A, Walter S, Adam R, Misset JL, Lévi F. *Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol 2000; 18: 136-147
- [62] Grothey A, Deschler B, Kroening H, Ridwelski K, Reichardt P, Kretzschmar A, Clemens M, Hirschmann W, Lorenz M, Asperger W, Buechele T, Schmoll HJ. *Phase III study of bolus 5-fluorouracil (5-FU) / folinic acid (FA) (Mayo) vs. weekly high-dose 24h 5-FU infusion / FA + oxaliplatin (OXA) (FUFOX) in advanced colorectal cancer (ACRC).* Proc Am Soc Clin Oncol 2002; 21: 129 a (Abstr. 512)
- [63] Maindrault-Goebel F, De Gramont A, Louvet C, Andre T, Carola E, Mabro M, Artru P, Gilles V, Lotz JP, Izrael V, Krulik M. *High-dose intensity oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX 7).* Eur J Cancer 2001; 37: 1000-1005
- [64] Maindrault-Goebel F, Louvet C, Andre T, Carola E, Lotz JP, Molitor JL, Garcia ML, Gilles-Amar V, Izrael V, Krulik M, De Gramont A. *Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX 6).* Eur J Cancer 1999; 35: 1338-1342
- [65] Giacchetti S, Itzhaki M, Grucia G, Adam R, Zidani R, Kunstlinger F, Brienza S, Alafaci E, Bertheault-Cvitkovic F, Jasmin C, Reynes M, Bismuth H, Misset JL, Lévi F. *Long-term*

- survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery.* Ann Oncol 1999; 10: 663-669
- [66] De Gramont A, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Davidson N, Mounedji-Boudiaf L, Andre T. *Oxaliplatin / 5-FU / LV in adjuvant colon cancer: Safety results of the international randomized MOSAIC trial.* Proc Am Soc Clin Oncol 2002; 21: 132 a (Abstr. 525)
- [67] De Gramont A, Banzi M, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Bridgewater J, Rivera F, Figer A, Fountzilas G, Andre T. *Oxaliplatin / 5-FU / LV in adjuvant colon cancer: Results of the international randomized mosaic trial.* Proc Am Soc Clin Oncol 2003; 22: 253 (Abstr. 1015)
- [68] Faivre S, Kalla S, Cvitkovic E, Bourdon O, Hauteville D, Dourte LM, Bensmaine MA, Itzhaki M, Marty M, Extra JM. *Oxaliplatin and paclitaxel combination in patients with platinum-pretreated ovarian carcinoma. An investigator-originated compassionate-use experience.* Ann Oncol 10: 1125-1128, 1999
- [69] Sanofi-Synthelabo GmbH. *First-Line Eloxatin®-Therapieschemata beim metastasierten kolorektalen Karzinom.* Berlin, 2002
- [70] Cvitkovic E, Brekkada M. *Oxaliplatin: A new therapeutic option in colorectal cancer.* Semin Oncol 1999; 26: 647-662
- [71] Monnet I, Brienza S, Hugret F, Voisin S, Gastiaburu J, Saltiel JC, Soulie P, Armand JP, Cvitkovic E, de Cremoux H. *Phase II study of oxaliplatin in poor-prognosis non-small cell lung cancer (NSCLC).* Eur J Cancer 1998; 34: 1124-1127
- [72] Garufi C, Nistico C, Brienza S, Vaccaro A, D'Ottavio A, Zappala AR, Aschelter AM, Terzoli E. *Single-agent oxaliplatin in pretreated advanced breast cancer patients: a phase II study.* Ann Oncol 2001; 12: 179-182
- [73] Germann N, Brienza S, Rotarski M, Emile JF, Di Palma M, Musset M, Reynes M, Soulie P, Cvitkovic E, Misset JL. *Preliminary results on the activity of oxaliplatin (L-OHP) in refractory/ recurrent non-Hodgkin's lymphoma patients.* Ann Oncol 1999; 10: 351-354
- [74] Bokemeyer C, Kollmannsberger C, Harstrick A, Beyer J, Gerl A, Casper J, Metzner B, Hartmann JT, Schmoll HJ, Kanz L. *Treatment of patients with cisplatin-refractory testicular germ-cell cancer. German Testicular Cancer Study Group (GTCSG).* Int J Cancer 1999; 83: 848-851
- [75] Bécouarn Y, Agostini C, Trufflandier N, Boulanger V. *Oxaliplatin: available data in non-colorectal gastrointestinal malignancies.* Crit Rev Oncol Hematol 2001; 40: 265-272
- [76] Wust P, Hegewisch-Becker S, Issels R. *Hyperthermie - aktueller Stand und therapeutische Ergebnisse.* Tumor Diagn Ther 2003; 24: 177-184
- [77] Waterman FM, Tupchong L, Nerlinger R, Matthews, J. *Blood flow in human tumors during local hyperthermia.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991; 20: 1255-1262.
- [78] Katschinski DM, Wiedemann GJ, Longo W, d'Oleire FR, Spriggs D, Robins HI. *Whole body hyperthermia cytokine induction: a review, and unifying hypothesis for myeloprotection in the setting of cytotoxic therapy.* Cytokine Growth Factor Rev 1999; 10: 93-97
- [79] Wiedemann GJ, Roszinski S, Biersack S, Weiss C, Wagner T. *Hyperthermia enhances cyclophosphamide, ifosfamide and cisdiaminodichloroplatinum (II) cytotoxicity on human derived breast carcinoma and sarcoma xenografts in nude mice.* J Cancer Res Clin Oncol 1992; 118: 129-135
- [80] Hettinga JVE, Lemstra W, Meijer C, Mulder NH, Konings AWT, de Vries EGE, Kampinga HH. *Hyperthermic potentiation of cisplatin toxicity in a small cell lung carcinoma cell line and a cisplatin-resistant subline.* Int J Hyperthermia 1994; 10: 795-806

- [81] Rietbroek RC, van de Vaart PJM, Havemann J, Blommaert FA, Geerdink A, Bakker PJM, Veenhof CHN. *Hyperthermia enhances the cytotoxicity of platinum-DNA adduct formation of lobaplatin and oxaliplatin in cultured SW 1573 cells*. J Cancer Res Clin Oncol 1997; 123: 6-12
- [82] Cassidy J, Misset JL. *Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management*. Semin Oncol 2002; 29 (Suppl. 15): 11-20
- [83] Grothey A. *Oxaliplatin-safety profile: Neurotoxicity*. Semin Oncol 2003; 30 (Suppl. 15): 5-13
- [84] Mathé G, Kidani Y, Triana K Brienza S, Ribaud P, Goldschmidt E, Ecstein E, Despax R, Musset M, Misset JL. *A phase I trial of trans-1-diaminocyclohexan oxalate-platinum (I OHP)*. Biomed Pharmacother 1986; 40: 372-376
- [85] Extra JM, Espie M, Calvo F, Ferme C, Mignot L, Marty M. *Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer*. Cancer Chemother Pharmacol 1990; 25: 199-303
- [86] Massari C, Brienza S, Rotarski M, Gastiaburu J, Misset JL, Cupissol D, Alafaci E, Dutertre-Catella H, Bastian G. *Pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with normal versus impaired renal function*. Cancer Chemother Pharmacol 2000; 45: 157-164
- [87] Degardin M, Nguyen KT, Carlier D, Moreau L, Jaworski M, Desaulty A, Cappelaere P, Brienza S. *Comparative study of the ototoxicity of cisplatin and oxaliplatin in patients with mature epidermoid carcinoma of the upper respiratory tract*. J Fr Otorhinolaryngol Audiophonol Chir Maxillofac 1997; 46: 292-296
- [88] Brandi G, Pantaleo MA, Galli C, Falcone A, Antonuzzo A, Mordenti P, Di Marco MC, Biasco G. *Hypersensitivity reactions related to oxaliplatin (OHP)*. Br J Cancer 2003; 89: 477-481
- [89] Lenz G, Hacker UT, Kern W, Schalhorn A, Hiddemann W. *Adverse reactions to oxaliplatin: a retrospective study of 25 patients treated in one institution*. Anticancer Drugs 2003; 14: 731-733
- [90] Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S. *Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures*. Semin Oncol 2002; 29 (Suppl. 15): 21-33
- [91] Quasthoff S, Hartung HP. *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. J Neurol 2002; 249: 9-17
- [92] Screnci D, McKeage M. *Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches*. J Inorg Biochem 1999; 77: 105-110
- [93] Cavaletti G, Bogliun G, Zincone A, Marzorati L, Melzi P, Frattola L, Marzola M, Bonazzi C, Cantu MG, Chiari S, Galli A, Bregni M, Gianni MA. *Neuro- and ototoxicity of high dose carboplatin treatment in poor prognosis ovarian cancer patients*. Anticancer Res 1998; 28: 3797-3802
- [94] André T, Bensmaine MA, Louvet C, Francois E, Lucas V, Desseigne F, Beerblock K, Bouche O, Carola E, Merrouche Y, Morvan F, Dupont-Andre G, De Gramont A. *Multi-center phase II study of bimonthly high-dose leucovorin, fluorouracil infusion, and oxaliplatin for metastatic colorectal cancer resistant to the same leucovorin and fluorouracil regimen*. J Clin Oncol 1999; 17: 3560-3568
- [95] Taieb S, Trillet-Lenoir V, Rambaud L, Descos L, Freyer G. *Lhermitte sign and urinary retention atypical presentation of oxaliplatin in four patients*. Cancer 2002; 94: 2434-2439
- [96] Adelsberger H, Quasthoff S, Grosskreutz J, Lepier A, Eckel F, Lersch C. *The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons*. Eur J Pharmacol 2000; 406: 25-32

- [97] Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapied B, Pelhate M, Gamelin E. *A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels*. J Neurophysiol 2001; 85: 2293-2297
- [98] Garufi C, Pietrangeli A, Brienza S, Aschelter AM, Pace R, Giannarelli D, D'Attino RM, Zappala A, Vaccaro A, D'Ottavio AM, Iandolo B, Nistico C, Terzoli E. *Electrophysiological evaluation of oxaliplatin neurotoxicity*. Proc Am Soc Clin Oncol 1999; 18: 244 a (Abstr. 938)
- [99] McKeage MJ, Hsu T, Screnci D, Haddad G, Baguley BC. *Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs*. Br J Cancer 2001; 85: 1219-1225
- [100] Cavaletti G, Petruccioli MG, Marmiroli P, Rigolio R, Galbiati S, Zoia C, Ferrarese C, Tagliabue E, Dolci C, Bayssas M, Griffon EG, Tredici G. *Circulating nerve growth factor level changes during oxaliplatin treatment-induced neurotoxicity in the rat*. Anticancer Res 2002; 22: 4199-204
- [101] Gregg RW, Molepo JM, Monpetit VJ, Mikael NZ, Redmond D, Gadia M, Stewart DJ. *Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity*. J Clin Oncol 1992; 10: 795-803
- [102] Screnci D, McKeage MJ. *Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches*. J Inorg Biochem 1999; 77: 105-110
- [103] Holmes J, Stanko J, Varchenko M, Ding H, Madden VJ, Bagnell CR, Wyrick SD, Chaney SG. *Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin and ormaplatin in a wistar rat model*. Toxicol Sci 1998; 46: 342-351
- [104] Screnci D, McKeage MJ, Galettis P, Hambley TW, Palmer BD, Baguley BC. *Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs*. Br J Cancer 2000; 82: 966-972
- [105] Gornet JM, Savier E, Lokiec F, Cvitkovic E, Misset JL, Goldwasser F. *Exacerbation of oxaliplatin neurosensory toxicity following surgery*. Ann Oncol 2001; 13: 1315-1318
- [106] Luo FR, Wyrick SD, Chaney SG. *Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, ormaplatin, and their biotransformation products utilizing a rat dorsal root ganglia in vitro explant culture model*. Cancer Chemother Pharmacol 1999; 44: 29-38
- [107] Fachinformation "Eloxatin<sup>®</sup>", Sanofi-Synthelabo GmbH, 2003
- [108] Extra JM, Marty M, Brienza S, Misset JL. *Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin*. Semin Oncol 1998; 25 (Suppl. 5): 13-22
- [109] Maindrault-Goebel F, Louvet C, Carola E, Gilles V, Lotz JP, Izrael V, Krulik M, De Gramont A. *Oxaliplatin reintroduction in patients pretreated with leucovorin (LV), 5-FU and oxaliplatin for metastatic colorectal cancer*. Proc Am Soc Clin Oncol 2000; 19: 255 a (Abstr. 990)
- [110] André T, Figer A, Cervantes A, Lledo G, Flesch M, Maindrault-Goebel F, Mineur L, Russ G, Buyse M, De Gramont A. *FOLFOX 7 compared to FOLFOX 4. Preliminary results of the randomized optimox study*. Proc Am Soc Clin Oncol 2003; 22: 253 (Abstr. 1016)
- [111] Lévi F, Zidani R, Vannetzel JM, Perpoint B, Focan C, Faggiuolo R, Chollet P, Garufi C, Itzhaki M, Dogliotti L, Iacobelli S, Adam R, Kunstlinger F, Gastiburu J, Bismuth H, Jamin C, Misset JL. *Chronomodulated versus fixed-infusion-rate delivery of ambulatory chemotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid (leucovorin) in patients with colorectal cancer metastases: a randomized multi-institutional trial*. J Natl Cancer Inst. 1994; 86: 1608-1617
- [112] Lévi F, Zidani R, Misset JL. *Randomized multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer*. International Organization for Cancer Chronotherapy. Lancet 1997; 350: 681-686

- [113] Lévi F, Metzger G, Massari C, Milano G. Oxaliplatin *Pharmacokinetics and chronopharmacological Aspects*. Clin Pharmacokinet 2000; 38: 1-21
- [114] Ehrsson H, Wallin I, Yachnin J. *Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans*. Med Oncol 2002; 19: 261-265
- [115] Shord SS, Bernard SA, Lindley C, Blodgett A, Mehta V, Churchel MA, Poole M, Pescatore SL, Luo FR, Chaney SG. *Oxaliplatin biotransformation and pharmacokinetics: a pilot study to determine the possible relationship to neurotoxicity*. Anticancer Res 2002; 22: 2301-2309
- [116] Pendyala L, Creaven PJ. *In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin*. Cancer Res 1993; 53: 5970-5976
- [117] Strickmann D, Küng A, Keppler BK. *Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the investigation of the binding behaviour of oxaliplatin to 5'-GMP in the presence of the sulphur-containing amino acid L-methionine*. Electrophoresis 23: 74-80, 2002
- [118] Wisemann LR, Adkins JC, Plosker GL, Goa KL. *Oxaliplatin a review of its use in the management of metastatic colorectal Cancer*. Drugs Aging 14: 459-475, 1999
- [119] Takimoto CH, Remick SC, Sharma S, Mani S, Ramanathan RK, Doroshow JH, Hamilton A, Mulkerin D, Graham M, Lockwood GF, Ivy P, Egorin M, Schuler B, Greenslade D, Goetz A, Knight R, Thomas R, Monahan BP, Dahut W, Grem JL. *Dose-escalating and pharmacological study of oxaliplatin in adult cancer patients with impaired renal function: a national cancer institute organ dysfunction working group study*. J Clin Oncol 2003; 21: 2664-2672
- [120] Doroshow JH, Synold TW, Gandara D, Mani S, Remick SC, Mulkerin D, Hamilton A, Sharma S, Ramanathan RK, Lenz HJ, Graham M, Longmate J, Takimoto CH, Ivy P. *Pharmacology of oxaliplatin in solid tumor patients with hepatic dysfunction: a preliminary report of the national cancer institute organ dysfunction working group study*. Semin Oncol 2003; 30 (Suppl. 15): 14-19
- [121] Gross-Goupil M, Lokiec F, Lopez G, Tigaud J, Hasbini A, Romain D, Misset J, Goldwasser F. *Topotecan preceded by oxaliplatin using a 3 week schedule. a phase I study in advanced cancer patients*. Eur J Cancer 2002; 38: 1888-1898
- [122] Mavroudis D, Pappas P, Kouroussis C, Kakolyis S, Angelaki S, Kalbakis K, Androulakis N, Souglakos J, Vardakis N, Nikolaidou M, Samonis G, Marselos M, Georgoulis V. *A dose-escalating and pharmacokinetic study of gemcitabine and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors*. Ann Oncol 2003; 14: 304-312
- [123] Liu J, Kraut E, Bender J, Brooks R, Balcerzak S, Grever M, Stanley H, D'Ambrosio S, Gibson-D'Ambrosio R, Chan KK. *Pharmacokinetics of oxaliplatin (NSC 266046) alone and in combination with paclitaxel in cancer patients*. Cancer Chemother Pharmacol 2002; 49: 367-374
- [124] Bensmaine MA, Marty M, De Gramont A, Brienza S, Lévi F, Ducreux M, Francois E, Gamelin E, Bleiber H, Cvitkovic E. *Factors predicting efficacy of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil (5-FU) ± folinic acid in a compassionate-use cohort of 481 5-FU-resistant advanced colorectal cancer patients*. Br J Cancer 2001; 85: 509-517
- [125] Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iqbal S, Groshen S, Tsao-Wei DD, Park DJ, Lenz HJ. *A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer*. Anticancer Res 2001; 21: 3075-3080
- [126] Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. *A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer*. Cancer Res 2001; 61: 8654-8658

- [127] Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, Groshen S, Tsao-Wei DD, Danenberg PV, Lenz HJ. *ERCC1 and thymidilate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy*. J Clin Oncol. 2001; 19: 4298-4304
- [128] Du Bois D, Du Bois E. *A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known*. Arch Intern Med 1916; 17: 863-871
- [129] Van den Bongard HJGD, Mathôt RAA, Beijnen JH, Schellens JHM. *Pharmacokinetically guided administration of chemotherapeutic agents*. Clin Pharmacokinet 2000; 39: 345-367
- [130] Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, O'Reilly S, Burnell M, Boxall Z, Siddik ZH, Judson IR, Gore ME, Wiltshaw E. *Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function*. J Clin Oncol 1989; 7: 1748-1756
- [131] Evans WE, Relling MV, Rodmann JH, Crom WR, Boyett JM, Pui CH. *Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia*. N Engl J Med 1998; 338: 499-505
- [132] Gamelin E, Danquechin-Dorval EM, Dumesnil YF, Maillart PJ, Goudier MJ, Burtin PC, Delva RG, Lortholary AH, Gesta PH, Larra FG. *Relationship between 5-fluorouracil (5-FU) dose intensity and therapeutic response in patients with advanced colorectal cancer receiving infusional therapy containing 5-FU*. Cancer 1996; 77: 331-451
- [133] Poirier MC, Reed E, Litterst CL, Katz D, Gupta-Burt S. *Persistence of platinum-amine-DNA adducts in gonads and kidneys of rats and multiple tissues from cancer patients*. Cancer Res 1992; 52: 149-153
- [134] Reed E, Ozols RF, Tarone R, Yuspa SH, Poirier MC. *The measurement of cisplatin-DNA adduct levels in testicular cancer patients*. Carcinogenesis 1988; 9: 1909-1911
- [135] Reed E, Ozols RF, Tarone R, Yuspa SH, Poirier MC. *Platinum-DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 5024-5028
- [136] Parker RJ, Gill I, Tarone R, Vionnet JA, Grunberg S, Muggia FM, Reed E. *Platinum-DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy, measured by atomic absorption spectrometry*. Carcinogenesis 1991; 12: 1253-1258
- [137] Schellens JHM, Ma J, Planting AST, van der Burg MEL, van Meerten E, de Boer-Dennert M, Schmitz PIM, Stoter G, Verweij J. *Relationship between the exposure to cisplatin, DNA-adduct formation in leucocytes and tumour response in patients with solid tumours*. Br J Cancer 1996; 73: 1569-1575
- [138] Schellens JHM, Planting AS, Ma J, Maliepaard M, de Vos A, de Boer DM, Verweij J. *Adaptive inpatient dose escalation of cisplatin in patients with advanced head and neck cancer*. Anticancer Drugs 2001; 12: 667-675
- [139] Reed E, Ostchega Y, Steinberg SM, Yuspa SH, Young RC, Ozols RF, Poirier MC. *Evaluation of platinum-DNA adduct levels relative to known prognostic variables in a cohort of ovarian cancer patients*. Cancer Res 1990; 50: 2256-2260
- [140] Perera FP, Motzer RJ, Tang D, Reed E, Parker R, Warburton D, O'Neill P, Albertini R, Bigbee WL, Jensen RH. *Multiple biological markers in germ cell tumor patients treated with platinum-based chemotherapy*. Cancer Res 1992; 52: 3558-3565
- [141] Bonetti A, Apostoli P, Zaninelli M, Pavanel F, Colombatti M, Cetto GL, Franceschi T, Sperotto L, Leone R. *Inductively coupled plasma mass spectroscopy quantitation of platinum-DNA adducts in peripheral blood leukocytes of patients receiving cisplatin*. Clin Cancer Res 1996; 2: 1829-1835
- [142] Motzer RJ, Reed E, Perera F, Tang D, Shamkhani H, Poirier MC, Tsai WY, Parker RJ, Bosl GJ. *Platinum-DNA adducts assayed in leukocytes of patients with germ cell tumors*

- measured by atomic absorbance spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay.* Cancer 1994; 73: 2843-2852
- [143] Allain P, Brienza S, Gamelin R, Taamma A, Krikorian A, Turcant C, Cvitkovic E, Misset JL. *Oxaliplatin induced platinum DNA adducts in white blood cells of cancer patients.* Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res 1996; 37: 404 (Abstr. 2760)
- [144] Kizu R, Higashi S, Kidani Y, Miyazaki M. *Pharmacokinetics of (1R,2R-diaminocyclohexane)oxalatoplatinum(II) in comparison with cisplatin following a single intravenous injection in rabbits* Cancer Chemother Pharmacol 1993; 31: 473-480
- [145] Mauldin SK, Richard FA, Plescia M, Wyrick SD, Sancar A, Chaney SG. *High-performance liquid chromatographic separation of platinum complexes containing the cis-1,2-diaminocyclohexane carrier ligand.* Anal Biochem 1986; 157: 129-143
- [146] Luo FR, Yen TY, Wyrick SD, Chaney SG. *High-performance liquid chromatographic separation of the biotransformation products of oxaliplatin.* J Chromatogr B 1999; 724: 345-356
- [147] Ehrsson H, Wallin I. *Liquid chromatographic determination of oxaliplatin in blood using post-column derivatization in a microwave field followed by photometric detection.* J Chromatogr B 2003; 795: 291-294
- [148] De Waal WAJ, Maessen FJMF, Kraak JC. *Analytical methodologies for the quantitation of platinum anti-cancer drugs and related compounds in biological media.* J Pharm Biomed Anal 1990; 8: 1-30
- [149] Kloft C, Appelius H, Siegert W, Schunack W, Jaehde U. *Determination of platinum complexes in clinical samples by a rapid flameless atomic absorption spectrometry assay.* Ther Drug Monit 1999; 21: 631-637
- [150] van Warmerdam LJL, van Tellingen O, Maes RAA, Beijnen JH. *Validated method for the determination of carboplatin in biological fluids by Zeeman atomic absorption spectrometry.* Fresenius J Anal Chem 1995; 351: 777-781
- [151] Morrison JG, White P, McDougall S, Firth JW, Woolfrey SG, Graham MA, Greenslade D. *Validation of a highly sensitive ICP-MS method for the determination of platinum in biofluids: application to clinical pharmacokinetic studies with oxaliplatin.* J Pharm Biomed Anal 2000; 24: 1-10
- [152] Gelevert T, Messerschmidt J, Meinardi MT, Alt F, Gietema JA, Franke JP, Sleijfer DT, Uges DR. *Adsorptive voltammetry to determine platinum levels in plasma from testicular cancer patients treated with cisplatin.* Ther Drug Monit 2001; 23: 169-173
- [153] Schmidt KH, Gebel A. <http://www.icp-ms.de>
- [154] Hodes TJ, Underberg WJ, Los G, Beijnen JH. *Platinum antitumour agents: a review of (bio)analysis.* Pharm Weekbl Sci 1992; 14: 61-77
- [155] Welz B, Sperling M. *Boris L'vov und die Graphitküvette.* In: Welz B, Sperling M. *Atomabsorptionsspektrometrie*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997; 29-38
- [156] Vouillamoz-Lorenz S, Bauer J, Lejeune F, Decosterd LA. *Validation of an AAS method for the determination of platinum in biological fluids from patients receiving the oral platinum derivative JM 216.* J Pharm Biomed Anal 2001; 25: 465-475
- [157] Willems GG. *Elektrochemische Analysenmethoden: Grundlagen der Voltammetrie.* In: Rucker G, Neugebauer M, Willems GG (Hrsg.): *Instrumentelle pharmazeutische Analytik.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1992; 356-382
- [158] Henze G. *Applikation 25: Bestimmung von Platin durch Adsorptions-Stripping-Voltammetrie.* In: Henze G. *Polarographie und Voltammetrie - Grundlagen und analytische Praxis.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2001; 191-193

- [159] Zhao Z, Freiser H. *Differential pulse polarographic determination of trace levels of platinum*. Anal Chem 1986; 58: 1498-1501
- [160] Messerschmidt J, Alt F, Tölg G, Angerer J, Schaller KH. *Adsorptive voltammetric procedure for the determination of platinum baseline levels in human body fluids*. Fresenius J Anal Chem 1992; 343: 391-394
- [161] Kloft C, Eickhoff C, Schulze-Forster K, Maurer HR, Schunack W, Jaehde U. *Development and application of a simple assay to quantify cellular adducts of platinum complexes with DNA*. Pharm Res 1999; 16: 470-473
- [162] Tilby MJ, Johnson C, Knox RJ, Cordell J, Roberts JJ, Dean CJ. *Sensitive detection of DNA modifications induced by cisplatin and carboplatin in vitro and in vivo using a monoclonal antibody*. Cancer Res 1991; 51: 123-129
- [163] Hirose J, Inoue K, Morimoto E, Iwamoto H, Yamaguti Y, Kitase M, Inagaki K, Hiromi K. *Characterization of monoclonal antibodies against (1R,2R)-cyclohexanediamine platinum(II)-DNA adduct*. Biol Pharm Bull 1996; 19: 1220-1222
- [164] Saris CP, van de Vaart PJ, Rietbroek RC, Blommaert FA. *In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells*. Carcinogenesis 1996; 17: 2763-2769
- [165] Welters MJ, Maliepaard M, Jacobs-Bergmans AJ, Baan RA, Schellens JHM, Ma J, van der Vijgh WJ, Braakhuis JM, Fichtinger-Schepman AM. *Improved <sup>32</sup>P-postlabelling assay for the quantification of the major platinum-DNA adducts*. Carcinogenesis 1997; 18: 1767-1774
- [166] Eastman A. *Analysis and quantitation of the DNA damage produced in cells by the cisplatin analog cis-[<sup>3</sup>H]dichloro(ethylenediamine)platinum(II)*. Anal Biochem 1991; 197: 311-315
- [167] Warnke U, Gysler J, Hofte B, Tjaden UR, Van der Greef J, Kloft C, Schunack W, Jaehde U. *Separation and identification of platinum adducts with DNA nucleotides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry*. Electrophoresis 2001; 22: 97-103
- [168] Winklmaier D. <http://www.winklmaier.de/aas-mnt.pdf>
- [169] Welz B, Sperling M. *Der Zeeman-Effekt*. In: Welz B, Sperling M. *Atomabsorptionsspektrometrie*. Wiley-VCH, Weinheim, 1997; 102-108
- [170] Lange M, Projahn HD. *Möglichkeiten der Optimierung einer Graphitrohr-Methode für eine komplexe Matrix am Beispiel der Bestimmung von Platin im Serum*. Vortrag im Rahmen des AAS-Grundkurses der Fa. Varian (Darmstadt), 1999
- [171] Hisayasu GH, Cohen JL, Nelson RW. *Determination of plasma and erythrocyte lithium concentrations by atomic absorption spectrophotometry*. Clin Chem 1977; 23: 41-45
- [172] U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CVM: *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, 2001
- [173] Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. *Bioanalytical method validation - a revisit with a decade progress*. Pharm Res 2000; 17: 1551-1557
- [174] Gastl G, Berdel W, Edler L, Jaehde U, Port R, Mross K, Scheulen M, Sindermann H, Dittrich C. *Standard Operating Procedures for Clinical Trials of the CESAR Central European Society for Anticancer Drug Research – EWIV: SOP 12: Validation of Bioanalytical Methods*. Onkologie 2003; 26 (Suppl. 6): 52-55
- [175] Kromidas S. *Handbuch Validierung in der Analytik*. VCH-Verlag, Weinheim 2000; 187-195



- [176] QIAamp® DNA-Mini-Kit and QIAamp® DNA-Blood-Mini-Kit Handbook, Qiagen GmbH, Hilden, 2003
- [177] Reed E, Sauerhoff S, Poirier MC. *Quantitation of platinum-DNA binding after therapeutic levels of drug exposure - a novel use of graphite furnace spectrometry*. *Atom Spec* 1988; 9: 93-95
- [178] Terheggen PMAB, Begg AC, Emond JY, Dubbelman R, Floot BGJ, den Engelse L. *Formation of interaction products of carboplatin with DNA in vitro and in cancer patients*. *Br J Cancer* 1991; 63: 195-200
- [179] Jurk M, Kreße GB. *Nucleinsäureanalytik - Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren*. In: Lottspeich F, Zorbas H. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 1998; 571-634
- [180] Gietema JA, Meinardi MT, Messerschmidt J, Gelevert T, Alt F, Uges DRA, Sleijfer DT. *Circulating plasma platinum more than 10 years after cisplatin treatment for testicular cancer*. *Lancet* 2000; 355: 1075-1086
- [181] Büchele T, Schöber C, Schmoll HJ. *Prüfplan der Studie: Wöchentliche 24-Stunden Dauerinfusion von hochdosiertem 5-Fluorouracil mit Folinsäure plus Oxaliplatin bei Patienten mit 5-FU/FA-refraktärem metastasiertem kolorektalen Karzinom*. Klinik für Innere Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1997
- [182] Junker A, Wehmeier A, Jaehde U. *Prüfplan der Studie: Pharmakologische Untersuchung zu pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Unterschieden von Oxaliplatin in der First- und Second-Line-Therapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom*, Sana Klinikum Remscheid, 2001
- [183] Schmoll HJ. *Kolorektales Karzinom*. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.): *Kompendium Internistische Onkologie*, Springer Verlag-Heidelberg, 1999; 941-1039
- [184] Voliotis D, Voigt BU, Kuhlmann J. *Prüfplan der Studie: Single-center, open-label, non-placebo-controlled, non-randomized, dose-escalating Phase I study to define the safety profile, pharmacokinetics, pharmacodynamics and tumour response profile of BAY 43-9006 in combination with oxaliplatin chemotherapy in patients with advanced, refractory solid tumours*. Bayer AG, Wuppertal, 2002
- [185] Hossfeld DK, Hegewisch-Becker S. *Prüfplan der Studie: Offene randomisierte, multi-zentrische, zweiarmlige Phase III-Studie zur Überprüfung des Effekts von Oxaliplatin und 5-Fluorouracil / Folinsäure (L-OHP, 5-FU, FA) in der Zweit- und Drittlinientherapie bei Patienten mit inoperablen (lokal fortgeschrittenen oder metastasierten) kolorektalen Karzinomen und dokumentierter Progression unter oder innerhalb von drei Monaten nach hochdosiertem 5-FU24h / FA (ARDALAN) oder einer Irinotecan-haltigen Therapie: Alleinige Chemotherapie versus Chemotherapie in Kombination mit Ganzkörper-Hyperthermie bei jeder zweiten Gabe (14-tägiges Intervall)*. Klinik für Innere Medizin (Abt. Onkologie-Hämatologie) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, 2000
- [186] Cockcroft DW, Gault MH. *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. *Nephron* 1976; 16: 31-41
- [187] Lévi F, Misset JL, Brienza S, Adam R, Metzger G, Itzakhi M, Caussanel JP, Kunstlinger F, Lecouturier S, Descorps-Declere A. *A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer*. *Cancer* 1992; 69: 893-900
- [188] Schütte J. *Allgemeine Definitionen*. In: Seeber S, Schütte J. (Hrsg.): *Therapiekonzepte Onkologie*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 2003; 3-47
- [189] Jaehde U. *Klinische Pharmakokinetik*. In: Jaehde U, Radziwill R, Mühlebach A, Schunack W (Hrsg.): *Lehrbuch der Klinischen Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2003; 67-86

- [190] Derendorf H, Garret ER. *Grundlagen der Pharmakokinetik*. In: Derendorf H, Garret ER. (Hrsg.): *Pharmakokinetik*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, 1987; 15-71
- [191] Akaike A. *Posterior probabilities for choosing a regression model*. Ann Inst Stat Math 1978; 30: A9-14
- [192] Schwarz G. *Estimating the dimension of a model*. Ann Statistics 1978; 6: 461-464
- [193] Bühl A, Zöfel P. *SPSS-Version 10 - Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows*. Addison Wesley Verlag, München, 2000
- [194] Junker A. *Dissertation*. Universität Bonn, in Vorbereitung
- [195] Hegewisch-Becker S, Gruber Y, Corovic A, Pichlmeier U, Atanackovic D, Nierhaus A, Hossfeld DK. *Whole-body hyperthermia (41.8 °C) combined with bimonthly oxaliplatin, high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer: a phase II study*. Ann Oncol 2002; 13: 1997-1204
- [196] Bühl A, Zöfel P. *Nichtparametrische Tests*. In: Bühl A, Zöfel P. *SPSS-Version 10 - Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows*. Addison Wesley Verlag, München, 2000; 291-317
- [197] Kloft C. *Klinisch-pharmakokinetische und pharmakodynamische Untersuchungen zur Dosisoptimierung von Platinkomplexen*. Freie Universität Berlin, Dissertation 1997; 139-144
- [198] Long DF, Patton TF, Repta AJ. *Platinum levels in human erythrocytes following intravenous administration of cisplatin: importance of erythrocytes as a distribution site for platinum species*. Biopharm Drug Dispos 1981; 2: 137-146
- [199] Ma J, Verweij J, Planting AST, de Boer-Dennert M, van Ingen HE, van der Burg MEL, Stoter G, Schellens JHM. *Current sample handling methods for measurement of platinum-DNA adducts in leucocytes in man lead to discrepant results in DNA adduct levels and DNA repair*. Br J Cancer 1995; 71: 512-517
- [200] Woynarowski JM, Faivre S, Herzig MCS, Arnett B, Chapman WG, Trevino AV, Raymond E, Chaney SG, Vaisman A, Varchenko M, Juniewicz PE. *Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA*. Mol Pharmacol 2000; 58: 920-927
- [201] Ščančar J, Milačič R, Falnoga I, Čemažar M, Bukovec P. *Use of nitric acid in sample pretreatment for determination of trace elements in various biological samples by ET-AAS*. J Pharm Biomed Anal 2000; 22: 993-1002
- [202] Eickhoff C. *Behandlung heterogener Patientenkollektive mit platinhaltiger Chemotherapie: Strategien zur Dosierungsoptimierung*. Freie Universität Berlin, Dissertation 1997; 144-153
- [203] Wasserman E, Cuvier C, Lokiec F, Goldwasser F, Kalla S, Méry-Mignard D, Ouldkaci M, Bensmaine A, Dupont-Andre G, Mahjoubi M, Marty M, Misset JL, Cvitkovic E. *Combination of oxaliplatin plus irinotecan in patients with gastrointestinal tumors: results of two independent phase I studies with pharmacokinetics*. J Clin Oncol 1999; 17: 1751-1759
- [204] Kern W, Braess J, Böttger B, Kaufmann CC, Hiddemann W, Schleyer E. *Oxaliplatin pharmacokinetics during a four-hour infusion*. Clin Cancer Res 1999; 5: 761-765
- [205] Goetz MP, Ehrlichman C, Windebank AJ, Reid JM, Sloan JA, Atherton P, Adjei AA, Rubin J, Pitot H, Galanis E, Ames MM, Goldberg RM. *Phase I and pharmacokinetic study of two different schedules of oxaliplatin, Irinotecan, fluorouracil and leucovorin in patients with solid tumors*. J Clin Oncol 2003; 21: 3761-3769
- [206] Delord JP, Umlil A, Guimbaud R, Grégoire N, Lafont T, Canal P, Bugat R, Chatelut E. *Population pharmacokinetics of oxaliplatin*. Cancer Chemother Pharmacol 2003; 51: 127-131

- [207] Wiesmann KG. *Pharmakokinetik und Neurotoxizität von Oxaliplatin*. Universität Bonn, Diplomarbeit 2003; 63-67
- [208] Lipp HP, Bokemeyer C. *Individuelle Carboplatinddosierung - Anpassung an die Nierenfunktion*. Arzneimitteltherapie 1997; 15: 42-48
- [209] Gerad H, Egorin MJ, Whitacre M, Van Echo DA, Aisner J. *Renal failure and platinum pharmacokinetics in three patients with cis-diamminedichloroplatinum(II) and whole-body hyperthermia*. Cancer Chemother Pharmacol. 1983; 11: 162-166
- [210] Elias D, Bonnay M, Puizillou JM, Antoun S, Demirdjian S, El OA, Pignon JP, Drouard-Troalen L, Ouellet JF, Ducreux M. *Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution*. Ann Oncol 2002; 13: 267-272
- [211] Elias DM, Ouellet JF. *Intraperitoneal chemohyperthermia: rationale, technique, indications, and results*. Surg Oncol Clin N Am 2001; 10: 915-933
- [212] Schröder C, Fisher S, Pieck AC, Müller A, Jaehde U, Kirchner H, Haverich A, Macchiarini P. *Technique and results of hyperthermic (41 degrees C) isolated lung perfusion with high-doses of cisplatin for the treatment of surgically relapsing or unresectable lung sarcoma metastasis*. Eur J Cardiothorac Surg 2002; 22: 41-46
- [213] Riviere JE, Page RA, Rogers RA, Chang SK, Dewhirst MW, Thrall DE. *Nonuniform alteration of cis-diamminedichloroplatinum(II) tissue distribution in dogs with whole hyperthermia*. Cancer Res 1990; 50: 2075-2080
- [214] Robins HI, Cohen JD, Schmitt CL, Tutsch KD, Feierabend C, Arzoomanian RZ, Alberti D, D'Oleire F, Longo W, Heiss C. *Phase I clinical trial of carboplatin and 41.8 °C whole-body hyperthermia in cancer patients*. J Clin Oncol 1993; 11: 1787-1794
- [215] Ohno S, Siddik ZH, Kido Y, Zwelling LA, Bull JM. *Thermal enhancement of drug uptake and DNA adducts as a possible mechanism for the effect of sequencing hyperthermia on cisplatin-induced cytotoxicity in L1210 cells*. Cancer Chemother Pharmacol 1994; 34: 302-306
- [216] Bastian G, Barrail A, Urien S. *Population pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with metastatic cancer*. Anticancer Drugs 2003; 14: 817-824
- [217] Junker AM, Pieck AC, Wehmeier A, Jaehde U. *Interindividual differences in oxaliplatin pharmacokinetics*. Int J Clin Pharmacol Ther 2002; 40: 569-570
- [218] Pendyala L, Kidani Y, Perez R, Wilkes J, Bernacki RJ, Creaven PJ. *Cytotoxicity, cellular accumulation and DNA binding of oxaliplatin isomers*. Cancer Lett 1995; 97: 177-184
- [219] Kloft C. *Klinisch-pharmakokinetische und pharmakodynamische Untersuchungen zur Dosisoptimierung von Platinkomplexen*. Freie Universität Berlin, Dissertation 1997; 100-104
- [220] Fisch MJ, Howard KL, Einhorn LH, Sledge GW. *Relationship between platinum-DNA adducts in leukocytes of patients with advanced germ cell cancer and survival*. Clin Cancer Res 1996; 2: 1063-1066
- [221] Reed E, Parker RJ, Gill I, Bicher A, Dabholkar M, Vionnet JA, Bostick-Bruton F, Tarone R, Muggia FM. *Platinum-DNA adduct in leukocyte DNA of a cohort of 49 patients with 24 different types of malignancies*. Cancer Res 1993; 53: 3694-3699
- [222] Veal GJ, Dias C, Price L, Parry A, Errington J, Hale J, Pearson AD, Boddy AV, Newell DR, Tilby MJ. *Influence of cellular factors and pharmacokinetics on the formation of platinum-DNA adducts in leukocytes of children receiving cisplatin therapy*. Clin Cancer Res 2001; 7: 2205-2212
- [223] Gill I, Muggia FM, Terheggen PM, Michael C, Parker RJ, Kortes V, Grunberg S, Christian MC, Reed E, den Engelse L. *Dose-escalation study of carboplatin (day 1) and*

- cisplatin (day 3): tolerance and relation to leukocyte and buccal cell platinum-DNA adducts.* Ann Oncol 1991; 2: 115-121
- [224] Peng B, Tilby MJ, English MW, Price L, Pearson AD, Boddy AV, Newell DR. *Platinum-DNA adduct formation in leucocytes of children in relation to pharmacokinetics after cisplatin and carboplatin therapy.* Br J Cancer 1997; 76: 1466-1473
- [225] Van de Vaart PJ, van der Vange N, Zoetmulder FA, van Goethem AR, van Tellingen O, ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH, Bartelink H, Begg AC. *Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines.* Eur J Cancer 1998; 34: 148-154
- [226] Fichtinger-Schepman AM, Velde-Visser SD, Dijk-Knijnenburg HC, van Oosterom AT, Baan RA, Berends F. *Kinetics of the formation and removal of cisplatin-DNA adducts in blood cells and tumor tissue of cancer patients receiving chemotherapy: comparison with in vitro adduct formation.* Cancer Res 1990; 50: 7887-7894
- [227] Ma J, Verweij J, Planting AST, Kolker HJ, Loos WJ, de Boer-Dennert M, van der Burg MEL, Stoter G, Schellens JHM. *Docetaxel and paclitaxel inhibit DNA-adduct formation and intracellular accumulation of cisplatin in human leukocytes.* Cancer Chemother Pharmacol 1996; 37: 382-384
- [228] Postma TJ, Heimans JJ, Muller MJ, Ossenkoppele GJ, Vermorken JB, Aaronson NK. *Pitfalls in grading severity of chemotherapy-induced peripheral neuropathy.* Ann Oncol 1998; 9: 739-744
- [229] Rambaud L, Freyer G, Taieb S, Guilloton L, Descos L, Gaget R, Trillet-Lenoir V. *Managing oxaliplatin neurosensory toxicity: the use of somesthetic evoked potentials (SEP) is no more discriminating than a rigorous clinical follow-up.* Proc Am Soc Clin Oncol 2001; 20: 28 (Abstr. 1627)
- [230] Fachinformation "5-Fluorouracil", Biosyn Arzneimittel GmbH, 1994
- [231] Adlard JW, Richman SD, Seymour MT, Qirke P. *Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy.* Lancet Oncol 2002; 3: 75-82
- [232] Choi SW, Lee KJ, Bae YA, Min KO, Kwon MS, Kim KM, Rhyu MG. *Genetic classification of colorectal cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability predicts survival.* Clin Cancer Res 2002; 8: 2311-2322
- [233] Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. *Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma.* Br J Cancer 2002; 86: 417-423
- [234] Heim M, Sharifi M, Hilger RA, Scheulen ME, Seeber S, Strumberg D. *Antitumor effect and interaction with cytotoxic drugs activity in human colon carcinoma cells by the Raf kinase inhibitor (RKI) BAY 43-9006.* Onkologie 2003; 26 (Suppl. 5): 46 (Abstr. V403)
- [235] Parker RJ, Dimery IW, Dabholkar M, Vionnet J, Reed E. *Platinum-DNA adduct in head and neck cancer patients receiving cisplatin and carboplatin chemotherapy.* Int J Oncol 1993; 3: 331-335
- [236] Ghazal-Aswad S, Tilby MJ, Lind M, Baily N, Sinha DP, Calvert AH, Newell DR. *Pharmacokinetically guided dose escalation of carboplatin in epithelial ovarian cancer: effect on drug-plasma AUC and peripheral blood drug-DNA adduct levels.* Ann Oncol 1999; 10: 329-334
- [237] Reed E. *Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy.* Cancer Treat Rev 1998; 24: 331-344
- [238] Poirier MC, Reed E, Zwelling LA, Ozols RF, Litterst CL, Yuspa SH. *Polyclonal antibodies to quantitate cis-diamminedichloroplatinum(II)-DNA adducts in cancer patients and animal models.* Environ Health Perspect 1985; 62: 89-94

- 
- [239] Reed E, Yuspa SH, Zwelling LA, Ozols RF, Poirier MC. *Quantitation of cis-diammine-dichloroplatinum(II) (cisplatin)-DNA- intrastrand adducts in testicular and ovarian cancer patients receiving cisplatin chemotherapy.* J Clin Invest 1986; 77: 545-550
- [240] Poirier MC, Reed E, Ozols RF, Fasy T, Yuspa SH. *DNA adducts of cisplatin in nucleated peripheral blood cells and tissues of cancer patients.* Prog Exp Tumor Res 1987; 31: 104-113
- [241] Dabholkar M, Bradshaw L, Parker RJ, Gill I, Bostick-Bruton F, Muggia FM, Reed E. *Cisplatin-DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro.* Environ Health Perspect 1992; 98: 53-59
- [242] Gupta-Burt S, Shamkhani H, Reed E, Tarone RE, Allegra CJ, Pai LH, Poirier MC. *Relationship between patient response in ovarian and breast cancer and platinum drug-DNA adduct formation.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1993; 2: 229-234
- [243] Poirier MC, Reed E, Shamkhani H, Tarone RE, Gupta-Burt S. *Platinum drug-DNA interactions in human tissues measured by cisplatin- DNA enzyme-linked immunosorbent assay and atomic absorbance spectroscopy.* Environ Health Perspect 1993; 99: 149-154
- [244] Boffetta P, Fichtinger-Schepman AM, Weiderpass E, Dijk-Knijnenburg HC, Stoter G, van Oosterom AT, Keizer HJ, Fossa SD, Kaldor J, Roy P. *Cisplatin-DNA adducts and proteinbound platinum in blood of testicular cancer patients.* Anticancer Drugs 1998; 9: 125-129
- [245] Fichtinger-Schepman AMJ, van Oosterom AT, Lohman PHM, Berends F. *Interindividual human variation in cisplatin sensitivity, predictable in an in vitro assay?* Mutat Res 1987; 190: 59-62

## Anhang A

### Beurteilung der Toxizität nach Klassifikation des National Cancer Institute (NCI), „Common Toxicity Criteria“ (CTC)

Toxizität	Geschlecht	Normbereich	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
<b>Hämatotoxizität</b>							
Hämoglobin [mg/dL]	M:	14,0 - 17,5	≥ 11,0	10,0 - 10,9	8,0 - 9,9	6,5 - 7,9	< 6,5
	F:	12,3 - 15,3					
Leukozyten [x10 <sup>9</sup> /L]		4,4 - 11,3	≥ 4,0	3,0 - 3,9	2,0 - 2,9	1,0 - 1,9	< 1,0
Granulozyten [x10 <sup>9</sup> /L]		2,4 - 6,5	≥ 2,0	1,5 - 1,9	1,0 - 1,4	0,5 - 0,9	< 0,5
Thrombozyten [x10 <sup>9</sup> /L]		136 - 409	≥ 100	75 - 100	50 - 74,9	25 - 49,9	< 25
<b>Nephrotoxizität</b>							
Kreatinin [mg/dL]	M:	0,5 - 1,1	Normwerte	< 1,65	1,65 - 3,3	3,3 - 6,6	> 6,6
	F:	0,5 - 0,9		< 1,35	1,35 - 2,7	2,7 - 5,4	> 5,4
<b>Hepatotoxizität</b>							
GOT [U/L]	M:	< 18	Normwerte	≤ 45	46 - 90	91 - 380	> 380
	F:	< 15		≤ 38	28 - 75	76 - 300	> 300
GPT [U/L]	M:	< 22	Normwerte	≤ 55	56 - 110	111 - 440	> 440
	F:	< 17		≤ 42	43 - 85	86 - 340	> 340
AP [U/L]	M:	< 180	Normwerte	≤ 450	451 - 900	901 - 3600	> 3600
	F:	< 160		≤ 400	401 - 800	801 - 3200	> 3200
Bilirubin ges. [mg/dL]		< 1,1	Normwerte	< 1,65	1,65 - 3,2	3,3 - 11,0	> 11,0

## Anhang B

### Einzelergebnisse der pharmakokinetischen Datenanalyse von Platin in Plasma, Ultrafiltrat, Vollblut und Erythrozyten nach Applikation von 60 und 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin\*

Die pharmakokinetische Auswertung der Platin-Konzentrations-Zeit-Verläufe in Plasma, Ultrafiltrat und Vollblut erfolgte abhängig von der Beobachtungsdauer nach Infusionsbeginn mit Hilfe unterschiedlicher Kompartiment-Modelle. Für die Erythrozyten wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) kompartimentunabhängig mit Hilfe der Trapezregel bestimmt. Die Berechnung der AUC nach der Trapezregel wurde zusätzlich auch für die anderen Matrices durchgeführt. Die verwendeten Modelle und Wichtungsfaktoren für die verschiedenen Matrices und unterschiedlichen Beobachtungsdauern nach Infusionsbeginn sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

	Beobachtungsdauer nach Infusionsbeginn [h]	Modell (Wichtungsfaktor)
<b>Plasma</b>	0 - 24 h	Zwei-Kompartiment-Modell ( $1/C_i$ )
	0 - 48 h	Zwei-Kompartiment-Modell ( $1/C_i$ )
	0 - 400 h	Drei-Kompartiment-Modell ( $1/C_i$ )
<b>Ultrafiltrat</b>	0 - 24 h	Zwei-Kompartiment-Modell ( $1/C_i^2$ )
	0 - 48 h	Zwei-Kompartiment-Modell ( $1/C_i^2$ )
	0 - 300 h	Zwei-Kompartiment-Modell ( $1/C_i^2$ )
<b>Vollblut</b>	0 - 24 h	Ein-Kompartiment-Modell ( $1/C_i$ )
	0 - 48 h	Zwei-Kompartiment-Modell ( $1/C_i$ )
	0 - 400 h	Zwei-Kompartiment-Modell ( $1/C_i$ )
<b>Erythrozyten</b>	0 - 24 h	Kompartimentunabhängige Auswertung
	0 - 48 h	
	0 - 400 h	

\* Die Einzelwerte der pharmakokinetischen Datenanalyse nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> wurden bereits in Kap. 3.3.3. (Tab. 3.30) dargestellt.

## Pharmakokinetische Parameter nach Applikation von 60 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin

### Plasma

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ1</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]
01	1,05	46,8	17,6	0,22	38,8	1,18	65,3
02	1,44	50,4	22,5	0,25	31,1	1,01	44,8
03	0,99	36,8	16,8	0,40	31,9	1,48	67,5
04	1,21	117	25,5	0,27	73,3	0,37	39,0
05	1,39	67,1	25,8	0,07	36,6	0,93	48,9
06	1,25	150	15,1	0,36	170	0,34	84,0
07	1,62	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
08	1,70	86,2	31,9	0,72	40,3	0,55	31,5

n.b. = nicht bestimmt wegen unvollständiger Probensammlung

### Ultrafiltrat

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ1</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]
01	0,41	2,49	2,05	0,21	11,4	22,3	266
02	0,50	3,58	2,65	0,24	14,7	14,3	240
03	0,26	2,96	2,14	0,28	16,7	18,4	397
04	0,18	7,10	3,59	0,10	18,5	6,15	78
05	0,31	4,98	3,26	0,19	19,4	12,6	324
06	0,64	2,97	2,19	0,16	15,0	17,4	309
07	0,30	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
08	0,31	4,09	2,21	0,36	26,6	11,5	383

n.b. = nicht bestimmt wegen unvollständiger Probensammlung



**Vollblut**

Patient	$C_{\max}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$AUC_{\infty}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ]	$AUC_{0-24\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ]	$t_{1/2\lambda,1}$ [h]	CL [L/h]	$V_{\text{SS}}$ [L]
01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
02	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
03	1,63	131	34,6	60,2	0,42	36,1
04	0,96	80,6	22,1	55,8	0,54	43,7
05	1,23	68,6	25,1	38,8	0,91	51,2
06	0,77	32,8	11,5	38,0	1,57	86,2
07	1,13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
08	1,35	78,0	27,8	40,6	0,60	35,4

n.b. = nicht bestimmt, da für Pat. 1 und 2 keine und für Pat. 7 nur drei Vollblutproben gesammelt wurden

**Erythrozyten**

Patient	$C_{\max}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$AUC_{0-24\text{ h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ]
01	n.b.	n.b.
02	n.b.	n.b.
03	3,29	79,6
04	0,95	16,7
05	1,07	24,3
06	0,37	6,97
07	0,74	n.b.
08	0,84	19,8

n.b. = nicht bestimmt, da für Pat. 1 und 2 keine und für Pat. 7 nur drei Vollblutproben gesammelt wurden

## Pharmakokinetische Parameter nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin nach Auswertung von Daten bis zu 48 h nach Infusionsbeginn

### Plasma Zyklus I

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ1</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]
02	3,21	79,8	35,9	55,9	0,18	26,7	1,60	58,6
06	8,28	96,6	37,7	59,8	0,67	37,6	1,32	68,4
07	4,15	125	43,3	70,2	0,98	40,4	1,03	57,9
08	3,01	91,9	34,3	55,1	0,87	35,4	1,23	60,8
09	n.b.	n.b.	36,0	59,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	n.b.	n.b.	44,1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
11	n.b.	n.b.	35,4	56,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
12	3,18	112	39,1	64,0	0,40	37,9	1,14	61,3
14	2,37	85,7	33,1	53,9	0,04	32,1	1,32	59,3
17	3,18	103	42,5	68,2	0,10	29,5	1,24	51,4
18	3,64	102	38,6	62,1	0,50	35,2	1,10	54,7
19	3,36	86,5	28,5	46,5	0,65	42,3	1,48	86,5
20	2,03	112	48,9	76,1	1,68	30,9	0,92	39,2
21	6,80	114	52,3	n.b.	0,50	28,1	1,00	39,2

### Plasma Zyklus II

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ1</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]
06	6,16	128	44,7	73,0	0,57	40,2	1,00	56,4
07	4,57	135	49,9	83,0	0,08	33,0	0,95	44,1
08	2,69	103	39,0	61,2	0,15	35,7	1,10	55,5
09	3,76	100	41,3	64,5	0,37	31,6	1,07	47,4
10	3,92	158	56,0	90,7	1,04	37,8	0,81	43,2
11	5,25	113	41,6	66,3	0,47	38,1	1,13	59,3
12	3,80	135	43,6	73,3	0,24	43,8	0,94	58,1
14	3,89	107	36,3	n.b.	0,51	41,4	1,05	61,0
17	3,93	137	45,2	74,6	0,47	41,8	0,93	54,9
18	4,66	130	46,6	75,8	0,86	39,9	0,87	48,6
20	5,08	93,0	51,1	n.b.	0,22	21,6	1,11	33,5

n.b. = nicht bestimmt wegen hoher Konzentrationen am Infusionsende (Zyklus I: Pat. 9, 10, 11) oder fehlender Proben 48 h nach Infusionsbeginn (Zyklus I Pat. 21, Zyklus II Pat. 14, Zyklus II Pat. 20)

**Ultrafiltrat Zyklus I**

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ1</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]
02	1,63	7,01	4,64	5,75	0,14	16,9	18,2	253
06	4,87	8,10	7,75	9,23	0,33	17,3	15,8	265
07	1,94	9,03	6,15	7,90	0,30	20,3	14,1	309
08	1,37	7,22	5,18	6,42	0,34	16,9	15,6	270
09	n.b.	n.b.	3,81	4,77	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	n.b.	n.b.	5,47	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
11	n.b.	n.b.	5,81	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
12	1,33	7,46	4,94	6,25	0,17	18,3	17,1	317
14	1,34	6,42	4,79	6,03	0,19	15,9	17,6	309
17	1,29	8,03	5,34	6,83	0,23	22,3	15,9	373
18	1,46	5,86	4,32	5,35	0,26	17,8	19,3	355
19	1,79	6,23	4,50	5,46	0,31	20,1	20,5	370
20	2,03	15,5	7,94	11,6	0,36	35,2	6,66	285
21	2,81	9,46	7,19	n.b.	0,29	19,5	11,9	253

**Ultrafiltrat Zyklus II**

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ1</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]
06	3,35	8,71	7,38	9,59	0,31	17,4	14,7	258
07	1,79	8,15	5,77	7,14	0,20	18,0	15,7	279
08	1,32	5,07	4,04	4,92	0,22	15,1	22,3	402
09	1,40	5,15	3,92	4,63	0,21	15,8	21,0	262
10	0,96	8,06	6,00	8,84	0,36	22,8	15,8	388
11	2,89	9,84	6,98	8,96	0,33	22,4	13,0	319
12	3,80	7,68	5,78	7,39	0,24	14,9	16,6	245
14	1,73	6,23	4,33	n.b.	0,24	20,4	18,1	351
17	1,72	7,78	5,18	6,39	0,33	22,3	16,4	324
18	1,83	6,46	5,25	6,28	0,29	15,4	17,5	264
20	2,29	17,9	8,08	n.b.	0,23	39,4	5,77	271

n.b. = nicht bestimmt wegen hoher Konzentrationen am Infusionsende (Zyklus I: Pat. 9, 10, 11) oder fehlender Proben 48 h nach Infusionsbeginn (Zyklus I Pat. 21, Zyklus II Pat. 14, Zyklus II Pat. 20)

**Vollblut Zyklus I**

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ,1</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>SS</sub> [L]
02	2,56	119	31,6	54,6	0,23	53,3	1,07	80,8
06	2,36	121	36,3	61,2	0,73	48,9	1,05	72,5
07	3,64	206	45,2	78,6	1,56	69,7	0,62	61,2
08	2,58	264	37,9	64,9	6,53	146	0,43	86,4
09	n.b.	n.b.	35,6	64,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10	n.b.	n.b.	38,6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
11	n.b.	n.b.	41,6	73,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
12	2,61	156	38,5	67,5	0,27	56,4	0,82	66,0
14	2,07	100	33,6	56,6	0,08	38,1	1,13	61,3
17	2,13	142	36,0	62,5	0,63	55,1	0,90	71,0
18	2,48	91,6	27,1	46,0	0,45	46,8	1,23	81,7
19	2,19	119	24,3	43,4	0,65	71,2	1,08	109
20	3,21	179	41,7	70,5	3,34	73,3	0,57	58,5
21	4,03	115	39,8	n.b.	0,69	39,2	1,00	55,6

**Vollblut Zyklus II**

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-24 h</sub> [µg·h/ml]	AUC <sub>0-48 h</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ,1</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>SS</sub> [L]
06	4,80	196	45,9	80,2	0,47	63,0	0,65	58,4
07	4,57	221	63,7	110	0,29	46,8	0,58	38,6
08	2,44	288	49,5	84,8	0,68	94,2	0,39	53,0
09	3,28	206	47,8	82,2	0,66	63,6	0,53	47,6
10	3,73	213	56,4	96,7	0,89	53,9	0,60	46,1
11	4,98	320	63,2	113	0,62	75,5	0,40	43,1
12	3,27	200	46,2	82,9	0,25	62,4	0,64	56,9
14	3,59	147	41,4	n.b.	0,71	56,5	0,77	61,2
17	2,78	213	44,7	79,6	0,48	71,1	0,60	61,1
18	2,95	128	33,8	58,4	0,61	54,7	0,88	68,6
20	3,57	115	42,0	n.b.	0,40	37,0	0,90	47,1

n.b. = nicht bestimmt wegen hoher Konzentrationen am Infusionsende (Zyklus I: Pat. 9, 10, 11) oder fehlender Proben 48 h nach Infusionsbeginn (Zyklus I Pat. 21, Zyklus II Pat. 14, Zyklus II Pat. 20)

**Erythrozyten Zyklus I**

Patient	$C_{\max}$ [µg/ml]	$AUC_{0-24\ h}$ [µg·h/ml]	$AUC_{0-48\ h}$ [µg·h/ml]
02	1,63	25,5	52,7
06	2,31	34,1	63,4
07	2,78	48,2	93,0
08	2,47	43,4	80,6
09	n.b.	34,7	74,5
10	n.b.	22,1	n.b.
11	n.b.	50,5	98,3
12	1,95	37,7	72,0
14	2,02	34,3	60,8
17	1,54	27,8	55,2
18	n.b.	n.b.	n.b.
19	0,94	16,4	37,7
20	1,81	24,0	56,7
21	1,02	21,3	n.b.

**Erythrozyten Zyklus II**

Patient	$C_{\max}$ [µg/ml]	$AUC_{0-24\ h}$ [µg·h/ml]	$AUC_{0-48\ h}$ [µg·h/ml]
06	3,53	47,7	90,8
07	4,70	84,4	149
08	2,72	63,8	119
09	3,30	58,7	118
10	3,45	57,3	110
11	4,79	100	193
12	2,66	49,2	94,2
14	3,11	49,5	n.b.
17	2,38	44,3	86,5
18	n.b.	n.b.	n.b.
20	2,76	22,2	n.b.

n.b. = nicht bestimmt wegen hoher Konzentrationen am Infusionsende (Zyklus I: Pat. 9, 10, 11), fehlender Proben 48 h nach Infusionsbeginn (Zyklus I Pat. 21, Zyklus II Pat. 14, Zyklus II Pat. 20) oder aufgrund fehlerhafter Berechnung der Platinkonzentrationen in den Erythrozyten (Pat. 18)

## Pharmakokinetische Parameter nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin nach Auswertung von Daten bis zu 400 h nach Infusionsbeginn

### Plasma Zyklus I

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ1</sub> [h]	t <sub>1/2λ2</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]
02	3,21	151	0,11	7,35	103	0,85	112
06	8,28	196	0,63	13,4	140	0,65	118
12	3,18	236	0,36	15,2	156	0,54	108
14	2,37	228	0,03	11,3	178	0,50	117
17	3,18	224	0,08	10,5	131	0,57	96,8
18	3,64	171	0,03	5,02	88,2	0,66	78,8
19	3,36	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
20	2,03	261	1,45	15,8	199	0,39	94,4

### Plasma Zyklus II

Patient	C <sub>max</sub> [µg/ml]	AUC <sub>∞</sub> [µg·h/ml]	t <sub>1/2λ1</sub> [h]	t <sub>1/2λ2</sub> [h]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL [L/h]	V <sub>ss</sub> [L]
06	6,16	344	0,53	19,3	255	0,37	121
07	4,57	375	0,06	8,58	182	0,34	84,3
08	2,69	178	0,01	7,73	93,6	0,64	79,9
12	3,80	288	0,23	26,4	238	0,44	124
14	3,89	341	0,50	19,7	262	0,33	115
17	3,93	281	0,34	9,21	140	0,46	85,8
18	4,66	237	0,04	3,33	106	0,48	69,3
20	5,08	457	0,21	14,7	437	0,23	127

**Ultrafiltrat Zyklus I (0 - 300 h nach Infusionsbeginn)**

<b>Patient</b>	<b>C<sub>max</sub> [µg/ml]</b>	<b>AUC<sub>∞</sub> [µg·h/ml]</b>	<b>t<sub>1/2λ,1</sub> [h]</b>	<b>t<sub>1/2z</sub> [h]</b>	<b>CL [L/h]</b>	<b>V<sub>ss</sub> [L]</b>
<b>06</b>	4,87	8,81	0,36	23,3	14,5	337
<b>12</b>	1,33	8,88	0,22	31,6	14,4	492
<b>17</b>	1,29	20,2	0,33	138	6,32	1126
<b>20</b>	2,03	13,7	0,39	29,1	7,54	261

**Ultrafiltrat Zyklus II (0 - 300 h nach Infusionsbeginn)**

<b>Patient</b>	<b>C<sub>max</sub> [µg/ml]</b>	<b>AUC<sub>∞</sub> [µg·h/ml]</b>	<b>t<sub>1/2λ,1</sub> [h]</b>	<b>t<sub>1/2z</sub> [h]</b>	<b>CL [L/h]</b>	<b>V<sub>ss</sub> [L]</b>
<b>06</b>	3,35	9,66	0,34	25,7	13,2	353
<b>07</b>	1,79	9,78	0,25	33,4	13,1	470
<b>08</b>	1,32	6,47	0,43	41,8	17,5	896
<b>11</b>	2,89	12,2	0,36	37,6	10,5	451
<b>20</b>	2,29	17,8	0,24	40,3	5,80	278

**Vollblut Zyklus I**

<b>Patient</b>	<b>C<sub>max</sub> [µg/ml]</b>	<b>AUC<sub>∞</sub> [µg·h/ml]</b>	<b>t<sub>1/2λ1</sub> [h]</b>	<b>t<sub>1/2λ2</sub> [h]</b>	<b>t<sub>1/2z</sub> [h]</b>	<b>CL [L/h]</b>	<b>V<sub>ss</sub> [L]</b>
02	2,56	389	0,21	15,9	307	0,33	138
06	2,36	467	0,62	13,5	336	0,27	127
12	2,61	538	0,21	12,2	307	0,24	102
14	2,07	516	0,03	10,5	392	0,22	120
17	2,13	485	0,04	9,64	295	0,26	109
18	2,48	272	0,07	5,16	213	0,41	124
19	2,19	506	0,54	9,16	433	0,25	155
20	3,21	599	0,14	4,09	327	0,17	79,9

**Vollblut Zyklus II**

<b>Patient</b>	<b>C<sub>max</sub> [µg/ml]</b>	<b>AUC<sub>∞</sub> [µg·h/ml]</b>	<b>t<sub>1/2λ1</sub> [h]</b>	<b>t<sub>1/2λ2</sub> [h]</b>	<b>t<sub>1/2z</sub> [h]</b>	<b>CL [L/h]</b>	<b>V<sub>ss</sub> [L]</b>
06	4,80	510	0,41	11,7	235	0,25	82,4
07	4,57	842	0,07	8,35	294	0,15	62,6
08	2,44	535	0,01	10,0	212	0,21	63,1
12	3,27	829	0,21	14,8	422	0,15	91,2
14	3,59	809	0,05	1,01	343	0,14	68,8
17	2,78	1033	0,45	24,5	615	0,12	106
18	2,95	545	0,08	5,71	353	0,21	104
20	3,57	1789	0,35	7,41	936	0,06	77,3



## Anhang C

### **Einzelergbnisse für Platin-Nukleotid-Verhältnisse und Flächen unter der Adduktcurve nach Applikation von 50, 130 und 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin**

Neben den Platin-Nukleotid-Verhältnissen ( $A_{0\text{ h}}$ ,  $A_{4\text{ h}}$ ,  $A_{24\text{ h}}$ , z.T.  $A_{48\text{ h}}$ ) und deren Maximalwerten ( $A_{\text{max}}$ ) werden in den folgenden Tabellen die Flächen unter der Adduktcurve ( $AUA_{0-24\text{ h}}$  und  $AUA_{0-48\text{ h}}$ ) angeben, die mit Hilfe der Trapezregel berechnet wurden.

**Platin-Nukleotidverhältnisse ( $A_{0\text{ h}}$ ,  $A_{4\text{ h}}$ ,  $A_{24\text{ h}}$  und  $A_{\text{max}}$ ) und Flächen unter der Adduktcurve ( $AUA_{0-24\text{ h}}$ ) nach Applikation von 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin**

**Zyklus I**

Patient	Pt-Nukleotidverhältnisse [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]				Fläche unter Adduktcurve [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]
	$A_{0\text{ h}}$	$A_{4\text{ h}}$	$A_{24\text{ h}}$	$A_{\text{max}}$	$AUA_{0-24\text{ h}}$
01	1,87	1,51	0,43	1,87	28,2
02	< BG	1,27	3,12	3,12	54,4
03	1,03	1,52	1,95	1,95	43,3
04	0,15	0,98	0,54	0,98	20,5
05	0,23	0,98	0,74	0,98	21,8
06	0,16	1,26	0,91	1,26	25,8
07	0,56	7,17	1,01	7,17	93,5
08	0,23	0,99	0,52	0,99	18,5
09	0,37	5,10	0,60	5,10	59,1
10	0,36	1,05	0,64	1,05	21,5
11	0,32	1,50	0,85	1,05	21,5
12	0,21	1,77	0,62	1,50	29,8
13	< BG	1,53	0,84	1,77	29,3
14	0,94	4,89	5,49	1,53	30,1
15	1,28	4,20	0,70	4,20	61,5
16	0,56	2,46	0,97	2,46	41,4

< BG = Die Platinmenge in der DNA-Adduktprobe lag unter der Bestimmungsgrenze.

**Zyklus II**

Patient	Pt-Nukleotidverhältnisse [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]				Fläche unter Adduktcurve [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]
	A <sub>0 h</sub>	A <sub>4 h</sub>	A <sub>24 h</sub>	A <sub>max</sub>	AUA <sub>0-24 h</sub>
<b>01</b>	2,12	2,60	1,91	2,60	59,1
<b>02</b>	0,40	3,14	2,11	3,14	64,7
<b>03</b>	1,58	2,08	1,44	2,08	46,1
<b>04</b>	0,07	1,06	0,93	1,06	25,0
<b>05</b>	1,12	0,64	0,59	1,12	21,1
<b>06</b>	0,45	1,14	0,90	1,14	27,0
<b>07</b>	k.A.	10,9	5,27	10,9	212
<b>08</b>	0,23	1,01	0,54	1,01	19,5
<b>09</b>	0,94	4,35	6,85	6,85	119
<b>10</b>	0,18	1,10	0,89	1,10	23,5
<b>11</b>	0,29	2,35	1,68	2,35	50,2
<b>12</b>	0,17	1,22	0,75	1,22	24,2
<b>13</b>	Der zweite Zyklus wurde aus medizinischen Gründen nicht appliziert.				
<b>14</b>	1,81	1,23	2,16	2,16	43,1
<b>15</b>	0,78	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
<b>16</b>	0,30	1,07	0,32	1,07	16,6

n.b. = nicht bestimmt

k.A. = wegen fehlerhafter Probenaufarbeitung bzw. zu geringer Menge der isolierten DNA

**Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{0\text{ h}}$ ,  $A_{4\text{ h}}$ ,  $A_{24\text{ h}}$ ,  $A_{48\text{ h}}$  und  $A_{\text{max}}$ ) und Flächen unter der Adduktkurve ( $AUA_{0-24\text{ h}}$  und  $AUA_{0-48\text{ h}}$ ) nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin**

**Zyklus I**

Patient	Pt-Nukleotidverhältnisse [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]					Fläche unter Adduktkurve [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	
	$A_{0\text{ h}}$	$A_{4\text{ h}}$	$A_{24\text{ h}}$	$A_{48\text{ h}}$	$A_{\text{max}}$	$AUA_{0-24\text{ h}}$	$AUA_{0-48\text{ h}}$
01	k.A.	16,9	7,11	2,43	16,9	306	420
02	6,77	15,9	7,59	1,87	15,8	279	393
03	k.A.	4,34	18,0	2,59	18,0	254	501
04	k.A.	7,90	4,91	6,69	7,90	173	312
05	7,31	165	69,4	1,26	165	2696	3545
06	2,74	2,52	5,06	2,25	5,06	86,4	174
07	0,44	4,52	5,24	3,05	5,20	108	206
08	0,20	3,94	2,16	1,65	3,94	70,0	115
09	0,15	1,54	0,88	1,78	1,54	27,6	60,0
10	4,07	5,41	2,30	n.b.	5,41	96,1	n.b.
11	k.A.	1,02	7,47	0,70	7,47	128	225
12	k.A.	1,57	9,79	4,05	9,79	134	297
13	k.A.	2,16	5,83	1,56	5,83	85,2	173
14	< BG	5,14	7,99	1,24	7,99	142	254
15	0,28	6,34	2,40	3,51	6,34	102	172
16	0,02	1,74	1,83	1,09	1,83	39,7	73,3
17	0,07	2,23	1,88	7,46	7,46	45,5	156
18	0,18	1,37	2,14	1,49	2,14	38,6	81,9
19	5,12	23,8	3,45	2,11	23,8	321	387
20	0,20	4,51	4,76	5,59	5,59	103	227
21	0,63	1,88	1,46	n.b.	1,88	38,4	n.b.
22	1,51	1,20	0,10	n.b.	1,51	18,4	n.b.
23	k.A.	6,71	3,05	1,14	6,71	126	177
24	1,87	1,14	0,92	1,14	1,87	28,1	50,8

n.b. = nicht bestimmt

k.A. = keine Angabe, da Werte nicht plausibel ( $A_{0\text{ h}} > A_{4\text{ h}}$ )

< BG = Die Platinmenge in der DNA-Adduktprobe lag unter der Bestimmungsgrenze.

## Zyklus II

Patient	Pt-Nukleotidverhältnisse [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]					Fläche unter Adduktcurve [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	
	A <sub>0 h</sub>	A <sub>4 h</sub>	A <sub>24 h</sub>	A <sub>48 h</sub>	A <sub>max</sub>	AUA <sub>0-24 h</sub>	AUA <sub>0-48 h</sub>
<b>01</b>	Der zweite Zyklus wurde aus medizinischen Gründen nicht appliziert.						
<b>02</b>	Der zweite Zyklus wurde aus medizinischen Gründen nicht appliziert.						
<b>03</b>	3,86	6,98	3,48	5,21	6,98	129	233
<b>04</b>	0,31	4,93	3,55	1,84	4,93	95,3	160
<b>05</b>	0,16	3,97	4,26	3,67	4,26	90,5	186
<b>06</b>	1,09	4,35	4,01	3,51	4,35	94,5	185
<b>07</b>	0,14	3,92	2,39	1,79	3,92	71,0	120
<b>08</b>	0,06	3,71	1,98	1,15	3,71	68,4	103
<b>09</b>	0,08	1,60	n.b.	0,88	n.b.	n.b.	n.b.
<b>10</b>	k.A.	8,43	5,69	1,81	8,43	199	287
<b>11</b>	0,09	8,62	23,9	0,81	23,9	341	635
<b>12</b>	0,30	2,52	7,29	12,7	12,7	105	349
<b>13</b>	k.A.	2,57	1,93	3,16	3,16	76,9	140
<b>14</b>	1,40	1,45	2,54	n.b.	2,54	44,9	n.b.
<b>15</b>	0,51	4,08	3,69	0,88	4,08	86,8	142
<b>16</b>	Der zweite Zyklus wurde aus medizinischen Gründen nicht appliziert.						
<b>17</b>	k.A.	20,0	5,53	4,11	20,0	340	456
<b>18</b>	0,91	115	1,02	8,42	115	1387	1501
<b>19</b>	Der zweite Zyklus wurde aus medizinischen Gründen nicht appliziert.						
<b>20</b>	k.A.	3,02	4,29	n.b.	4,29	80,3	n.b.
<b>21</b>	Der zweite Zyklus wurde aus medizinischen Gründen nicht appliziert.						
<b>22</b>	1,45	3,48	5,20	n.b.	5,20	96,4	n.b.
<b>23</b>	0,19	0,90	4,48	1,94	4,48	56,6	134
<b>24</b>	1,46	1,56	1,88	3,18	3,18	40,2	101

n.b. = nicht bestimmt

k.A. = keine Angabe, da Werte nicht plausibel ( $A_{0 h} > A_{4 h}$ )

**Platin-Nukleotid-Verhältnisse ( $A_{0\text{ h}}$ ,  $A_{4\text{ h}}$ ,  $A_{24\text{ h}}$ ,  $A_{48\text{ h}}$  und  $A_{\text{max}}$ ) und Flächen unter der Adduktkurve ( $AUA_{0-24\text{ h}}$  und  $AUA_{0-48\text{ h}}$ ) nach Applikation von 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin mit und ohne Hyperthermie**

	Pt-Nukleotidverhältnisse [Pt-Atome : 10 <sup>6</sup> Nukl.]				Fläche unter Adduktkurve [Pt-Atome·h : 10 <sup>6</sup> Nukl.]	
	$A_{0\text{ h}}$	$A_{4\text{ h}}$	$A_{24\text{ h}}$	$A_{\text{max}}$	$AUA_{0-24\text{ h}}$	$AUA_{0-48\text{ h}}$
<b>Gabe I ohne Hyperthermie</b>						
Pat. 2	k.A.	34,2	1,71	34,2	463	
Pat. 3	1,01	5,58	6,01	6,01		268
<b>Gabe II mit Hyperthermie</b>						
Pat. 2	0,10	11,6	n.b.	n.b.	n.b.	
Pat. 3	0,15	1,63	10,6	10,6		272
<b>Gabe I mit Hyperthermie</b>						
Pat. 1	1,18	1,57	9,48	9,48	138	
Pat. 4	1,62	6,54	3,84	6,54		245
<b>Gabe II ohne Hyperthermie</b>						
Pat. 1	0,89	1,39	1,57	1,57	37,1	
Pat. 4	1,08	18,1	3,17	18,1		505

n.b. = nicht bestimmt wegen fehlender Probe

k.A. = keine Angabe, da Wert nicht plausibel ( $A_{0\text{ h}} > A_{4\text{ h}}$ )