



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

## Messung des oxidativen Stress bei der Chemotherapie des Pankreaskarzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades  
Magistra der Pharmazie (Mag<sup>a</sup> pharm.)  
an der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Universität Wien

Verfasserin / Verfasser:	Marina Peham
Matrikel-Nummer:	0303148
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Pharmazie (A449)
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Czejka

Wien, Dezember 2010



## Danksagung

Der praktische Teil der Diplomarbeit entstand am Department für klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien (Leitung: Ao. Univ.-Prof. Dr. Walter Jäger) unter der Anleitung von Ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Czejka.

Mein persönlicher Dank gilt besonders Ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Czejka für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hilfreiche und geduldige Unterstützung bei der Erstellung der Diplomarbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Mag. Azra Sahamanović für die Unterstützung und die Einführung in die Thematik.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, dass sie mir das Studium finanziert und ermöglicht haben und mich immer dabei unterstützten.

Meinen Geschwistern und Freunden danke ich, für die grenzenlose moralische Unterstützung in all den Höhen und Tiefen des Studiums.



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	3
2. Theoretische Grundlagen.....	4
2.1. Chemie von Radikalen .....	4
2.1.1. Molekularer Sauerstoff O <sub>2</sub> .....	4
2.1.2. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....	4
2.2. Radikalgenerierung .....	6
2.3. Quellen für Radikale .....	7
2.3.1. Endogene Quellen .....	7
2.3.2. Exogene Quellen - Umweltfaktoren .....	7
2.4. Biologische Wirkungen .....	8
2.4.1. Proteine .....	8
2.4.2. Lipide .....	8
2.4.3. DNA .....	9
2.5. Methoden zur Erfassung der freien Radikale im Körper.....	9
2.5.1. Direkte Messmethoden .....	10
2.5.2. Indirekte Messmethoden.....	11
2.6. Antioxidantien .....	11
2.6.1. Enzymatische Antioxidantien .....	11
2.6.2. Nicht enzymatische, endogene und exogene Antioxidantien .....	14
2.7. Antioxidative Kapazität .....	16
2.8. Freie Radikale und Tumorerkrankungen .....	16
2.8.1. Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich .....	17
2.9. Pankreaskarzinom.....	18
2.9.1. Chemotherapie .....	19
2.9.2. Erlotinib (Tarceva®) und seine Metabolisierung .....	20
3. Aufgabenstellung .....	23
4. Experimenteller Teil .....	24
4.1. Durchführung Stressmessung .....	24
4.2. FORT (Free Oxygen Radicals Test).....	25
4.2.1. Testprinzip .....	25
4.2.2. Durchführung .....	25
4.2.3. Ergebnisse und Interpretationen.....	26
4.3. FORD (Free Oxygen Radicals Defence).....	26
4.3.1. Testprinzip .....	26
4.3.2. Durchführung .....	27

4.3.3. Ergebnisse und Interpretationen.....	27
4.4. HPLC – Analyse der Metabolisierung von Erlotinib.....	28
5. Auswertung .....	29
5.1. Programme.....	29
5.1.1. GraphPad Prism 5.00 .....	29
5.1.2. Microsoft Excel.....	29
5.1.3. MDL ISIS Draw 2.5 .....	29
5.2. Statische Verfahren.....	29
5.2.1. Lagemaße.....	29
5.2.2. Streuungsmaße .....	29
5.2.3. Statistische Tests.....	30
6. Ergebnisse und Diskussion.....	31
6.1. Messwiederholungen.....	32
6.2. FORT-Werte aller Patienten .....	35
6.2.1. Patient 1 .....	48
6.2.2. Patient 2.....	50
6.2.3. Patient 3.....	52
6.2.4. Patient 4 .....	54
6.2.5. Patient 5.....	56
6.2.6. Patient 6.....	58
6.2.7. Patient 7.....	60
6.2.8. Patient 8.....	62
6.2.9. Patient 9.....	64
6.2.10. Korrelation aller Patienten.....	66
6.3. Die antioxidative Kapazität .....	72
6.4. Cortisol .....	77
6.4.1. Testprinzip und Durchführung.....	77
6.4.2. Ergebnisse.....	79
7. Conclusio .....	85
Anhang.....	87
Abkürzungsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	
Literaturverzeichnis	
Lebenslauf	
Abstract	

## 1. Einleitung

Zur Erhaltung der Struktur und der biologischen Aktivität müssen alle bekannten Lebensformen ständig Energie aus Nährstoffen gewinnen. Die Grundlage des Energiemetabolismus stellen Redox-Reaktionen dar. Die durch die Oxidation anorganischer und organischer Bestandteile produzierte Energie sind für den Antrieb und die Versorgung der Zellfunktion essentiell [2].

Die an die Reduktion von Sauerstoff gekoppelten Redox-Reaktionen in den Mitochondrien der höheren Lebewesen bilden eine besonders hohe Energieausbeute [1].

Allerdings wird in der Atmungskette nicht der gesamte konsumierte Sauerstoff direkt zu Wasser reduziert, ein Teil wird zu Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies umgewandelt, welche nahezu alle Biomoleküle angreifen und funktionell schwer schädigen können.

Sie haben aber nicht nur toxische Effekte, sondern spielen eine wichtige Rolle bei den Abwehrmechanismen des Körpers und bei der Zerstörung von Fremdstoffen.

Um der Gefährdung durch ROS entgegenzuwirken, verfügen alle aerob lebenden Zellen über ein vielfältiges Arsenal enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen, die in der Lage sind, Radikale zu neutralisieren und Oxidation zu vermeiden [1].

Ist nun die Balance zwischen der Produktion der reaktiven Sauerstoffmetabolite und dem antioxidativen System gestört, sei aus angeborenen oder erworbenen Gründen, resultiert so genannter „oxidativer Stress“. Dieses Verschieben des Gleichgewichts kann die Entstehung verschiedener Erkrankungen begünstigen und ist am Alterungsprozess beteiligt.

Tabelle 1: Erkrankungen, die mit Radikalen assoziiert werden

<b>Herz-Kreislauf-System</b>	Arteriosklerose, koronare Herzerkrankungen
<b>ZNS (neurodegenerativ)</b>	Parkinson, Alzheimer, Demenz, Multiple Sklerose
<b>Entzündungen</b>	Polyarthrit, Rheuma, Colitis, Pankreatitis
<b>Hauterkrankungen</b>	Neurodermitis
<b>Diabetes mellitus</b>	Vaskuläre Komplikationen
<b>Schädigung der Erbsubstanz</b>	mutagen, kanzerogen, Zellalterung
<b>Immunsystem</b>	Verminderte Effizienz

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Chemie von Radikalen

#### 2.1.1. Molekularer Sauerstoff O<sub>2</sub>

Die chemischen Eigenschaften des molekularen Sauerstoffs (O<sub>2</sub>) lassen sich gut mithilfe der Molekülorbital-Theorie zeigen.

Im Grundzustand, also im Zustand niedrigster Energie, liegt der Sauerstoff als Triplett vor, bei dem die Spins der Valenzelektronen parallel angeordnet sind. In diesem Zustand ist er paramagnetisch und kann nur durch Änderung des Spins mit diamagnetischen Molekülen reagieren [5]. Aufgrund seiner apolaren Natur ist Sauerstoff in organischen Lösungsmitteln besser löslich als in Wasser.

#### 2.1.2. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Sie können sowohl nicht-radikalischer als auch radikalischer Natur sein.

Nicht-radikalische ROS:

- Singulett-Sauerstoff
- Wasserstoffperoxid
- Ozon

Radikalische ROS:

- Superoxidanionradikal
- Hydroxyl-Radikal
- Perhydroxyl-Radikal
- Alkoxy-Radikal

##### 2.1.2.1. Singulett-Sauerstoff <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

Der Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) stellt den angeregten Zustand dar, der eine deutlich größere Energie als der Grundzustand besitzt. Die Spins der Valenzelektronen sind antiparallel angeordnet was den Singulett-Zustand sehr reaktiv macht.

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> diffundiert gut durch Membranen, ist sehr kurzlebig und reagiert bevorzugt mit organischen Molekülen.

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> wird unter anderem während der Prostaglandinsynthese und der Phagozytose gebildet. [10]

##### 2.1.2.2. Superoxid-Anion-Radikal O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

Das Superoxidanion-Radikal entsteht durch Transfer von einem Elektron aus molekularem Sauerstoff. Es wird unter anderem in Nebenreaktionen des Cytochrom P-450 gebildet. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ist sehr reaktiv, pH- und Lösungsmittel-abhängig [22]: es kann als

starke Base Protonen abspalten, als Reduktionsmittel kann es Chinone zu Semichinonen reduzieren, als Nucleophil kann es mit elektrophilen Gruppen reagieren und als schwaches Oxidationsmittel kann es Moleküle wie Ascorbinsäure oder Adrenalin oxidieren. [10]

### 2.1.2.3. Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Wasserstoffperoxid kann biologische Membranen ohne Probleme überwinden, ist daher von allen aktivierten Sauerstoffstufen intrazellulär am meisten vertreten, und dient als Ausgangsstoff für potente oxidative Spezies (reaktive Hydroxyl-Radikale, siehe Tabelle 2: aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildete reaktive Hydroxyl-Radikale [22]). Es entsteht im Zuge vieler enzymatischer Reaktionen, insbesondere aber während der Metabolisierung von Fremdstoffen, den so genannten Xenobiotica, durch Cytochrom P-450 durch die Superoxiddismutase.

<b>Haber-Weiß-Reaktion</b>	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}^{2\circ} \rightarrow \text{HO}^\circ + \text{HO}^- + \text{O}^2$
<b>Fenton-Reaktion</b>	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\circ + \text{OH}^-$
<b>Radiolyse des Wassers durch <math>\gamma</math>-Strahlen</b>	$\text{H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow \text{H}^\circ + \text{HO}^\circ + \text{e}^-$
<b>Reduktion durch Semichinone</b>	$\text{QH}^\circ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Q} + \text{OH}_2 + \text{HO}^\circ$

Tabelle 2: aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildete reaktive Hydroxyl-Radikale [22]

### 2.1.2.4. Hydroxyl-Radikal OH<sup>°</sup>

Das Hydroxyl-Radikal ist die aggressivste und reaktivste aktivierte Sauerstoffspezies und entsteht aus Wasserstoffperoxid bei Interaktionen mit Übergangselementen (meist Fe<sup>2+</sup>, siehe Fenton-Reaktion Tabelle 2) oder aber durch Reaktion mit anderen Verbindungen. Es kann allerdings nur direkt am Entstehungsort zerstörerisch wirken, da es nur kurz besteht ( $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und daher eine beschränkte Reichweite besitzt.

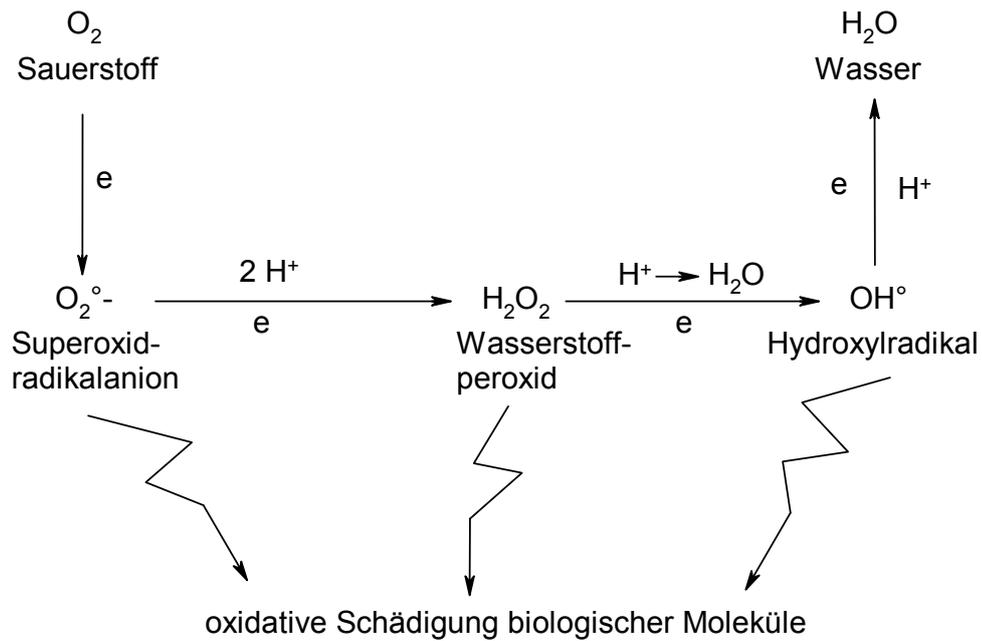


Abbildung 1: Oxidative Schädigung von Biomolekülen durch reaktive Sauerstoffspezies

## 2.2. Radikalgenerierung

Reaktionsfähige Radikale werden im Zuge des oxidativen Stoffwechsels generiert. Dieser setzt sich zusammen aus der Glykolyse, dem Citratcyclus, der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung von ADP zu ATP.

Die Glykolyse setzt Glucose in Pyruvat um, der Citratcyclus führt zur vollständigen Oxidation von Pyruvat über Acetyl-CoA zu  $CO_2$ , wobei die Elektronen schrittweise auf Coenzyme übertragen werden. Die Atmungskette reoxidiert die Coenzyme unter Verbrauch molekularen Sauerstoffs; die Energie der Coenzym-Oxidation dient zum Aufbau eines Protonen Gradienten über die Mitochondrien-Membran, der zur ATP-Bildung genutzt wird [6].

Die oxidative Phosphorylierung ist der Hauptlieferant für ATP in aeroben Organismen. Als Energiequelle dient die Oxidation von gebundenem Wasserstoff, der den Nährstoffen im katabolen Stoffwechsel entzogen und auf  $NAD^+$  oder FAD übertragen wurde. In Eukaryonten findet die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien statt [1].

Dieser Gradient wird durch die Atmungskettenkomplexe gebildet, welche die Elektronen von Reduktionsäquivalenten ( $NADH$  und  $FADH_2$ ) schrittweise auf den Sauerstoff übertragen. Voraussetzung für die effektive oxidative Phosphorylierung ist der spezielle Aufbau von Mitochondrien mit sehr dichten Membranen.

Während der Reaktion werden kleine aber signifikante Mengen an Intermediärprodukten, Superoxide und Peroxide, frei. Die Superoxid-Produktion kann

quantifiziert werden, da man die Cytochrom-Oxidase mit Cyaniden blockieren kann, und somit daher die Cyanid-unabhängige Atmung als Obergrenze für die Superoxid-Produktion annehmen kann.

### 2.3. Quellen für Radikale

Neben den endogenen im Zuge der mitochondrialen Atmung vom Körper selbst produzierten Radikalen können auch exogene Noxen zur Radikalbildung beitragen. Besonders wichtig sind die Bildung von Superoxiden, Peroxiden und Hydroxyl-Radikalen.

#### 2.3.1. Endogene Quellen

- Die **Elektronentransferkette** in den Mitochondrien hat undichte Stellen, an denen einzelne Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden und sich in ROS umwandeln. So werden schätzungsweise etwa 1-2% des täglich konsumierten Sauerstoffs nicht zu Wasser, sondern zu ROS umgesetzt [10]. Unter den Enzymen der Atmungskette wurden die Ubiquinon-Cytochrom-C-Reduktase und die NADH-Dehydrogenase als Lieferanten für Radikale identifiziert.
- **Entzündungen** führen zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Bei phagozytären Prozessen werden durch die NADPH-Oxidase der Leukozyten/Phagozyten gezielt große Mengen an Superoxidradikalanionen generiert, die wiederum durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxiden umgesetzt werden, welche bakterizid wirken. Daher spielen die im so genannten „respiratory burst“ hergestellten Superoxide eine wesentliche Rolle bei der Abwehr gegen Mikroorganismen. Bei gestörten Entzündungsreaktionen beispielsweise durch ein geschwächtes Immunsystem, können diese ROS auch Zellstrukturen schädigen.
- Die **Autooxidation** von Ascorbinsäure, Glutathion, Katecholaminen so wie Adrenalin und Pyrogallol können auch zur Bildung von Superoxiden führen.
- **Detoxifikationen** über das Cytochrom-P450-System

#### 2.3.2. Exogene Quellen - Umweltfaktoren

- **Medikamente:** Die Metabolisierung von Medikamenten führt zur Bildung von ROS. Hier sind vor allem Hormonpräparate wie beispielsweise Schilddrüsenpräparate und die Antibabypille zu nennen.
- **Rauchen:** Der Zigarettenrauch selbst enthält Radikale. Zusätzlich können Rauchbestandteile die Radikalbildung vorantreiben.

- **Umweltgifte:** Smog, Abgase
- **Ernährung:** die Ernährung spielt eine sehr wichtige Rolle, zumal die Zufuhr von genügend Antioxidantien gesichert werden muss.
- **Strahlung:** radioaktive- und UV-Strahlung können die Radikalbildung induzieren. Solarium und Ozon, Fernseher, Mobiltelefon, Flugreisen, Computer
- **Sport**

## 2.4. Biologische Wirkungen

Reaktive Sauerstoffspezies schädigen viele Biomoleküle.

### 2.4.1. Proteine

Besonders anfällig für oxidative Veränderungen sind die Aminosäuren L-Methionin, L-Histidin, L-Cystein und die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan. Diese Reaktionen können zu veränderter Raumstruktur zu Konformationsänderungen des Proteins und zum Verlust der Funktion von Proteinen führen.

### 2.4.2. Lipide

Reaktive Sauerstoffspezies können Lipide und Phospholipide, hier besonders die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) von Membranlipiden oxidieren. Dieser als Lipidperoxidation bezeichnete gut untersuchte Vorgang führt zu Membranschäden wodurch die Permeabilität der Membran verändert wird. Die Folgen reichen von unkontrolliertem Ionenaustausch bis zum Zerplatzen der Membran.

Die Kettenreaktion beginnt damit, dass reaktive Sauerstoffspezies ein Wasserstoffatom von einer mehrfach ungesättigten Doppelbindung entziehen. Addition von Sauerstoff an das gebildete Lipidradikal führt zur Bildung eines Lipidperoxyradikals. Dieses kann wiederum Wasserstoff von benachbarten Fettsäuren abstrahieren, sodass die entsprechenden Peroxide entstehen.

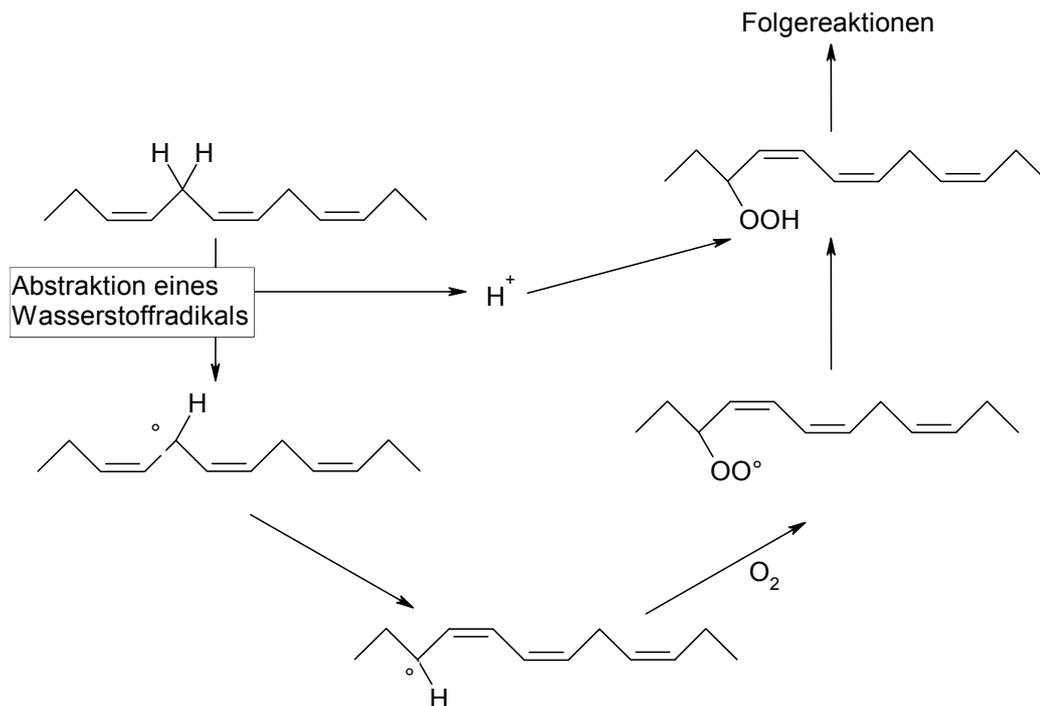


Abbildung 2: Lipidperoxidation

### 2.4.3. DNA

Oxidative Veränderungen der Nukleoside und Nukleotide sind besonders gravierend und spielen eine wesentliche Rolle bei der Mutagenese, Kanzerogenität, dem Altern und der Zell-Letalität [5], da biologische Informationen und genetische Grundregulationen und Reparationen beeinflusst werden.

Reaktive Sauerstoffspezies induzieren durch Modifikation des Zuckerteils (Desoxyribose) Strangbrüche.

Weiters können sie die Purinbasen (Adenin, Guanin) und die Pyrimidinbasen (Cytosin, Thymin) zerstören oder verändern wodurch es zu Fehlpaarungen und Mutationen kommen kann.

### 2.5. Methoden zur Erfassung der freien Radikale im Körper

Die Messung des oxidativen Stresses ist aufgrund seines Zusammenhanges mit einer zunehmenden Anzahl an Krankheiten sehr wichtig.

Allerdings ergeben sich analytische Probleme bei der Messung in Menschen.

Die größte Schwierigkeit stellt die kurze Halbwertszeit von freien Radikalen dar, die oft weniger als 10<sup>-4</sup>s beträgt. Außerdem verläuft die Radikal-Produktion nicht konstant und regelmäßig sondern stellt ein schnelles spontanes Phänomen dar. [5]

Abgesehen davon werden freie Radikale hauptsächlich in Geweben und weniger im Plasma produziert, was die Analyse in Blutproben von Patienten erschwert. Allerdings

werden die primären Radikale, die durch Aktivierung von Sauerstoff erzeugt wurden, durch Reaktion mit organischen Verbindungen in sekundäre, stabilere Radikale umgewandelt. Darum ist es auch möglich, den oxidativen Stress in Seren zu messen.

Generell gibt es so genannte direkte und indirekte Messmethoden.

Zur direkten werden physikalische Methoden, wie die Elektronenspin-Resonanz (ESR), die Chemolumineszenz und die angewandte FORM-Diagnostik verwendet.

Indirekt Methoden bedienen sich der Ermittlung des bereits zerstörten biologischen Materials.

### 2.5.1. Direkte Messmethoden

- **Colorimetrie und Fluorimetrie**
- **Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie:** Die ESR-Spektroskopie basiert auf der Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Substanzen (besitzen ungepaarte Elektronen), die sich in einem äußeren Magnetfeld befinden und über ihren quantenmechanischen Spin quantitativ nachgewiesen werden. Diese Methode wird sehr oft angewandt weil sie sowohl Auskunft über die chemische Natur des Radikals als auch über die Kinetik der Bildung und des Abbaus gibt. Um die kurzlebigen reaktiven Radikale messen zu können werden sie mithilfe der Spin-Trapping-Methode, bei der die Radikale an geeignete Moleküle addiert werden um stabile messbare Abfangprodukt zu generieren, modifiziert. Der Aufwand ist sehr groß.
- **Chemolumineszenz:** Bei dieser Methode werden fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt, die nachdem sie mit freien Radikalen reagiert haben, Strahlung emittieren. Diese Strahlung beruht auf der Rückkehr von Elektronen von einem angeregten Zustand in einen tiefer gelegenen Elektronenzustand bzw. in den Elektronengrundzustand. Die am meisten verwendete chemolumineszente Verbindung, die sehr spezifisch für das Superoxid-Anionen  $O_2^-$  ist, ist Lucigenin (10,10'-dimethyl-9,9'-biacridinium-dinitrat).
- **FORM-Test:** Die FORM-Diagnostik ermöglicht in biologischen Proben (z.B. Blut, Serum) die Konzentration an Hydroperoxiden festzustellen. Das Grundprinzip beruht darauf, dass Übergangsmetalle, wie zum Beispiel Eisen, die Bildung von freien Radikalen aus Hydroperoxiden katalysieren können. Das im Plasma an Proteine gebundenes Eisen wird freigesetzt und dient als Katalysator [19].

### 2.5.2. Indirekte Messmethoden

- **Lipid-Peroxidation:** Die Lipid-Peroxidation zählt aufgrund ihrer einfachen Durchführung zu den meist verwendeten diagnostischen Markern des oxidativen Stresses. Als Abbauprodukt entsteht Malondialdehyd (MDA), der sich gut bestimmen lässt.
- **Protein-Oxidation:** Radikale können Thiol-Gruppen oxidieren, Disulfidbrücken bilden, Tryptophan-Reste zerstören, die Empfindlichkeit gegenüber proteolytischen Enzymen verändern und Bi-Tyrosin-Brücken bilden [5].
- **DNA-Oxidation:** Die Basen der DNA sind besonders empfindlich gegenüber freien Radikalen und bilden viele messbare Derivate, wobei das gängigste 8-Hydroxydesoxy-Guanosin ist, das sowohl im Plasma als auch im Urin nachgewiesen werden kann.

### 2.6. Antioxidantien

Freie Radikale sind durch einen Elektronenmangel gekennzeichnet, den sie dahingegen auszugleichen versuchen, indem sie anderen Molekülen ein Elektron entreißen um selbst wieder stabil zu werden. Allerdings induziert dieses Entreißen die Radikalbildung beim nächsten Molekül – somit wird eine Kettenreaktion in Gang gesetzt.

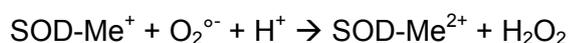
Antioxidantien besitzen ungepaarte Elektronen und haben die Eigenschaft freien Radikalen fehlende Elektronen abgeben zu können ohne selbst in aggressive und stark reaktionsfähige Moleküle umgewandelt zu werden. Somit haben sie die Fähigkeit, radikalische Bruchstücke abzufangen und zu binden.

#### 2.6.1. Enzymatische Antioxidantien

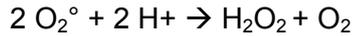
##### 2.6.1.1. Superoxid-Dismutase (SOD)

SODs katalysieren die Umwandlung von zelltoxischem metastabilem Superoxid zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid kann über Katalasen weiter disproportionieren.

Sie sind Metallproteine und ihre Reaktion erfolgt in zwei Schritten, in deren Verlauf ein enzymgebundenes redoxaktives Metallzentrum zunächst reduziert und dann wieder oxidiert wird.



Die Gesamtreaktion umfasst die Bindung des anionischen Substrats, die Übertragung von Elektronen und Protonen und die Freisetzung des Produkts.



Säugetiere besitzen drei verschiedene Isoformen, die im redoxaktivem Metallzentrum entweder Kupfer und Zink (Cu-Zn-SOD), Mangan (Mn-SOD) oder Eisen (Fe-SOD) enthalten, wobei sie sich in der Lokalisation im Körper und dem redoxaktivem Metallzentrum unterscheiden [24].

### 2.6.1.2. Katalasen (CAT)

Katalasen setzen Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff um. Für die katalytische Spaltung sind vier Porphyrin-Häm-Gruppen verantwortlich.



In tierischen Zellen wirken Katalasen, die in allen Körperteilen vorkommen aber in der Leber besonders konzentriert vorliegen, vor allem wie eine Peroxidase und entgiftet das in den Peroxisomen aus der Fettsäure-Oxidation freiwerdende Wasserstoffperoxid.

### 2.6.1.3. Glutathion-Peroxidasen (GPX)

Die Glutathion-Peroxidase katalysiert die Reduktion von Hydroperoxiden, zu denen Wasserstoffperoxid und organische Peroxide (R-OOH) zählen, zu unschädlichen Verbindungen (Wasser bzw. Alkohol).



Glutathion (GSH) wird im Gegenzug oxidiert zum GSSG, und durch die Glutathion-Reduktase wieder regeneriert.

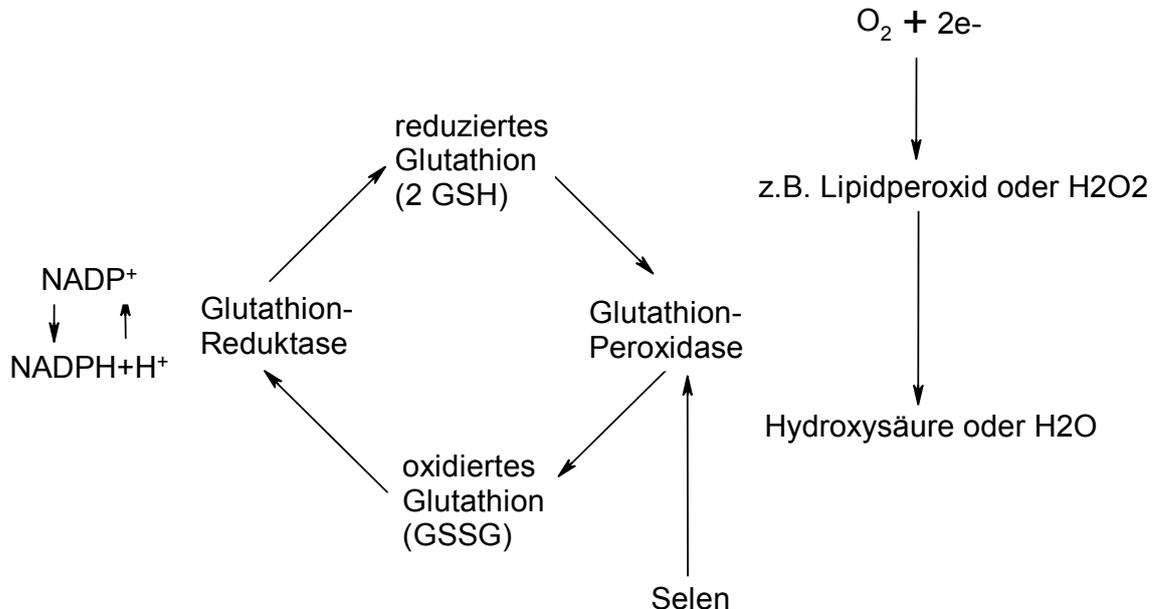
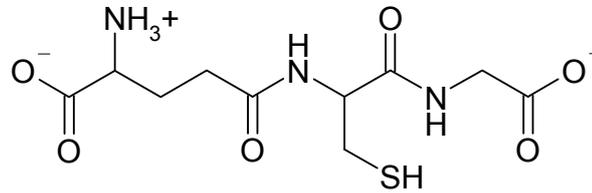


Abbildung 3: Funktion der Glutathion-Peroxidase bei der Entgiftung von Lipidperoxiden

Die Glutathion-Peroxidase ist Selen-abhängig, da sie im aktiven Zentrum die seltene Aminosäure Selenocystein enthält.

Glutathion ist ein Thiol-based (SH-)redoxfactor Tripeptid, das aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin besteht, das unerlässlich/grundlegend für die normale Zellfunktion ist.



Glutamyl-cystinyl-glycin

Abbildung 4: Glutathion

In Eukaryonten befinden sich 90% des intrazellulären GSH-Vorrats im Cytoplasma, der Rest befindet sich in Organellen wie den Mitochondrien, dem endoplasmatischem Retikulum und dem Nukleus, wobei die Biosynthese scheinbar nur im Cytosol abläuft [2].

GSH wird in Redoxprozessen durch Disulfidbrückenbildung zweier Moleküle GSH zum Glutathion-Disulfid oxidiert.

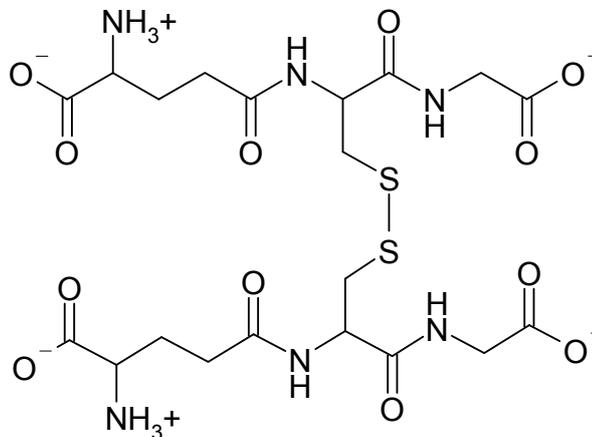


Abbildung 5: Glutathion-Disulfid

GSH ist in vielen biologischen Prozessen involviert, die wichtigste ist aber die Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Milieus und die Abwehr gegen reaktive Verbindungen und elektrophilen Substraten zu ermöglichen.

Da GSH Komplexe mit vielen Schwermetallen bilden kann, ist es bei der Speicherung und dem Transport von Metallen und als Cofaktor in Redoxreaktionen beteiligt.

## 2.6.2. Nicht enzymatische, endogene und exogene Antioxidantien

### 2.6.2.1. Ascorbinsäure (Vitamin C)

Vitamin C ist das effektivste wasserlösliche Antioxidant im menschlichen Plasma. Sie kann als Elektronendonator bzw. –akzeptor wirken und ist im Metabolismus von großer Bedeutung.

Die Ascorbinsäure ist ein Ein-Elektronen-Donator und steht mit der radikalischen L-Semidehydroascorbinsäure in einem Redox-Gleichgewicht. Zwei L-Semidehydroascorbatradikal-Teilchen disproportionieren unter Bildung von L-Dehydroascorbinsäure und Rückbildung von L-Ascorbinsäure.

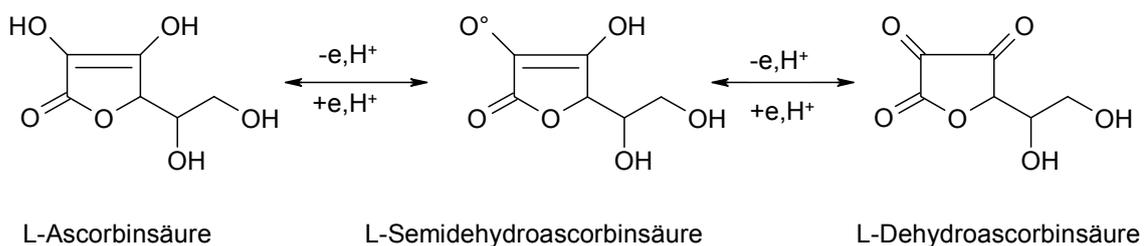


Abbildung 6: Ascorbinsäure

Ascorbinsäure als Radikalfänger/Schutz gegen ROS reagiert mit dem Hydroxyl-Radikal unter Bildung von L-Semidehydroascorbatradikal und Wasser, wobei das L-Semidehydroascorbatradikal wiederum disproportioniert zu Ascorbat und Dehydroascorbat [10].

Weiters kann Vitamin C das aus dem lipidlöslichen alpha-Tocopherol bei der Hemmung der Lipidperoxidation entstandene Tocopherylradikal entgiften.

Die L-Ascorbinsäure spielt als Redox-System in zahlreichen Biosynthesereaktionen eine wichtige Rolle: bei der Hydroxylierung von Steroiden, Dopamin (zu Noradrenalin), Tryptophan (zu 5-Hydroxytryptophan) und von Prolin und Lysin im Prokollagen bei der Kollagensynthese, beim enzymatischen Abbau von Fremd- und Arzneistoffen, bei der Reduktion von Folsäure zu Tetrahydrofolsäure und bei der Hemmung der Oxidation von Vitamin A und E [9: ].

### 2.6.2.2. $\alpha$ -Tocopherol

$\alpha$ -Tocopherol ist die biologisch aktivste Form der Vitamin E-Gruppe und stellt ein sehr potentes lipidlösliches Antioxidans dar. Es ist in der Lage mehrfach ungesättigte Fettsäuren der Membranlipide, Lipoproteine und des Depotfetts vor Lipidperoxidation durch freie Radikale zu schützen. Es bildet ein stabiles resonanzstabilisiertes

Tocopheryl-Radikal, das wiederum durch andere Antioxidantien (Ubichinon, Ascorbinsäure) zum regenerierten  $\alpha$ -Tocopherol reduziert werden kann.

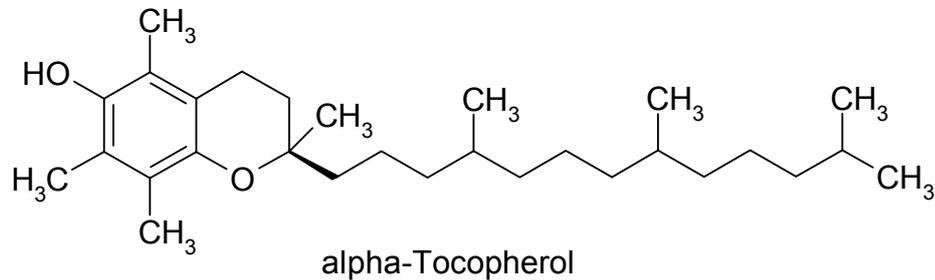


Abbildung 7:  $\alpha$ -Tocopherol

### 2.6.2.3. Carotinoide und Vitamin A

Diese fettlöslichen aus Isopreneinheiten bestehenden Pflanzenfarbstoffe können mit ihren konjugierten Doppelbindungen Radikale abfangen.

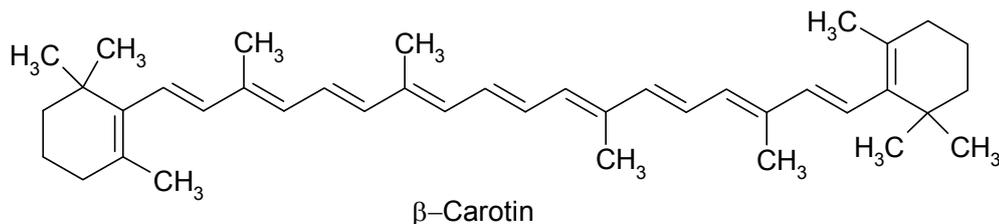


Abbildung 8:  $\beta$ -Carotin

### 2.6.2.4. Pflanzenphenole

Weiter wichtige Antioxidantien sind die in Pflanzen enthaltenen Phenole, die in vitro die Lipidperoxidation inhibieren können [24]. Hier sind vor allem Flavonoide, Anthocyanidine und Phenylpropan-Derivate von Bedeutung, deren Vorkommen sehr vielfältig ist.

### 2.6.2.5. Spurenelemente

Hier ist insbesondere Selen zu nennen, da es die Glutathion-Peroxidase aktiviert und somit die Elimination der reaktiven Sauerstoffradikale erhöht. Die Ergebnisse einer in den USA veröffentlichten „Nutritional Prevention of Cancer (NPC) Trial“ haben eine deutliche Reduktion von Prostatakarzinom-Häufigkeit durch Selensubstitution mit 0,2mg täglich gezeigt [7].

Zink und Mangan als weitere Bestandteile der GPO und der SOD haben auch einen großen Stellenwert.

Weiter wichtige körpereigene Antioxidantien sind  $\alpha$ -Ketosäuren, Sexualhormone, Melatonin, Liponsäure, Ubichinon (Vitamin Q) und die beiden Abbauprodukte des Stoffwechsels Harnsäure (Urat) und Bilirubin [24]

### **2.7. Antioxidative Kapazität**

Unter der antioxidativen Kapazität versteht man die Gesamtheit aller Gegenmechanismen zum oxidativen Stress. Diese antioxidative Kapazität wird durch enzymatische, nicht-enzymatische, endogene und exogene Antioxidantien gestellt. Daher nimmt das Blut eine wichtige Stellung zur Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts ein.

Die Antioxidantien-Konzentration im Plasma kann durch Interaktionen vieler chemischer Verbindungen und metabolischer Reaktionen ermittelt werden [19]. Die antioxidative Kapazität repräsentiert den körpereigenen oxidativen Status und lässt abschätzen, ob selbst bei hoher Radikalbelastung, genügend Gegenmechanismen vorhanden sind.

### **2.8. Freie Radikale und Tumorerkrankungen**

Jeder Tumor, ob maligner oder benignen Natur, zieht eine vermehrte Produktion von Radikalen mit sich. Tumortherapeutika können den oxidativen Stress noch zusätzlich erhöhen. Dieser führt wiederum zu reduzierten Zellproliferationsraten von normalen Zellen und Tumorzellen. Zytostatika wirken aber nur auf sich teilende Zellen, sodass ruhende G<sub>0</sub>-Phase-Zellen durch antineoplastische Agenzien nicht erreicht werden, die dann nach dem Ende der Chemotherapie wieder in die Zellteilung gehen und somit die Metastasierung initiieren. Die Folge kann die Ausbildung sekundärer Malignome, meist akuter Leukämien 4-5 Jahre nach der Therapie des Primärtumors bei 5-10% sein.

Weiters greifen freie Radikale zelluläres Material an und führen zu den Nebenwirkungen der Zytostatika [7].

Tabelle 3: Nebenwirkungen der Zytostatika

Gastrointestinale Toxizität, Mutagenese	
Kardiotoxizität	Doxorubicin, Epirubicin
Nephro- und Ototoxizität	Cisplatin, Ifosfamid, Methotrexat, Cyclophosphamid
Lungentoxizität und –fibrose	Bleomycin, Busulfan, Carmustin
Hepatotoxizität	Carmustin, Methotrexat

Der durch eine Krebserkrankung erzeugte Stress des Wirtsorganismus ist an einem schnellen Anstieg der Lipidperoxidation und einem niedrigen antioxidativen Status, der sich in einer reduzierten totalen Radikalfängerkapazität des Blutplasmas zeigt, abzulesen.

### 2.8.1. Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich

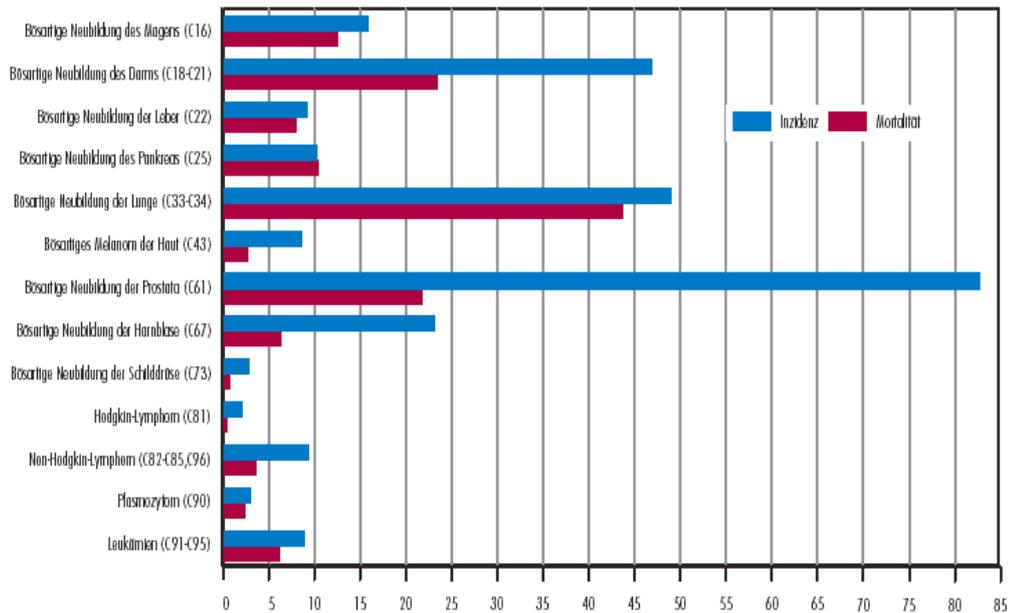


Abbildung 9: Krebslokalisationen Männer

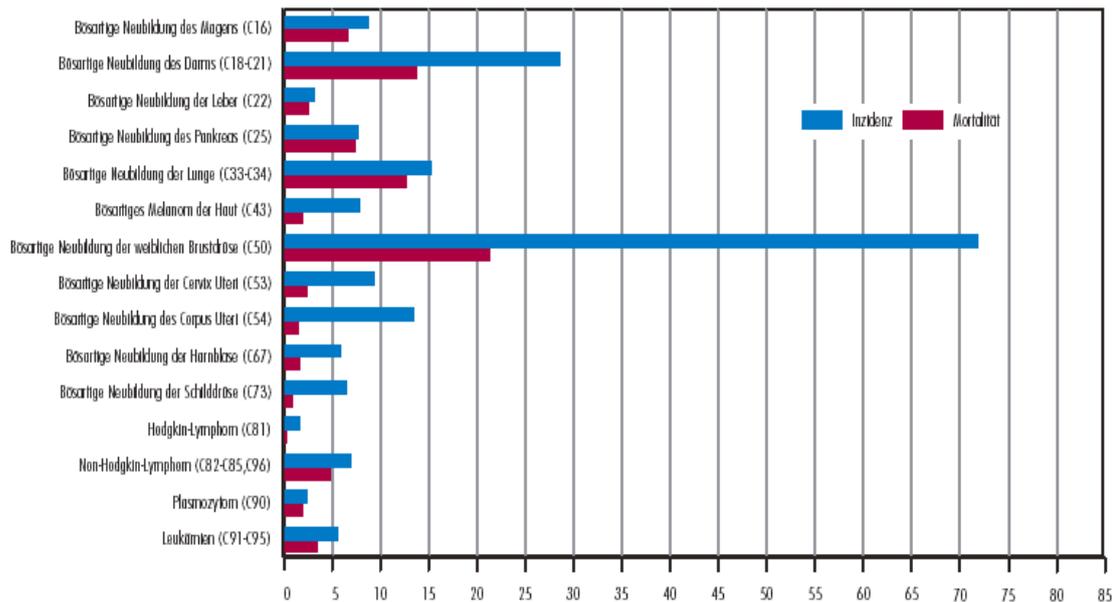


Abbildung 10: Krebslokalisationen Frauen

## 2.9. Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist einer der aggressivsten malignen Tumore überhaupt, wobei die Chancen auf Heilung sehr gering sind. Tumore der Pankreas sind für 6% aller krebisbedingten Todesfälle verantwortlich und stellen die viert-häufigste Todesursache bei Männern und Frauen dar [12].

Von 100.000 Menschen erkranken schätzungsweise 8-12 an Pankreaskarzinom, die Mortalität liegt nur wenig darunter.

Frühe Stadien sind sehr schwierig zu diagnostizieren, da die Krankheitssymptome oft erst spät und sehr uncharakteristisch auftreten. Die relative Lebenserwartung nach einem Jahr beträgt nur 24% und die nach 5 Jahren sogar weniger als 5%. Das Pankreaskarzinom kann sowohl von exokrinen als auch endokrinen Teilbereichen herrühren, wobei 95% dem exokrinen Teil entspringen.

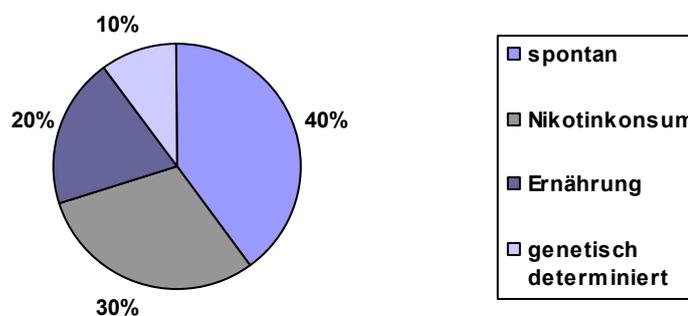


Abbildung 11: Ursachen für Pankreaskarzinom

Abbildung 11 zeigt die Ursachen des Pankreaskarzinoms, wobei für die überwiegende Mehrheit der Pankreaskarzinome keine Risikofaktoren genannt werden können.

Rauchen ist der wichtigste Umweltfaktor, der das Risiko an Pankreaskarzinom zu erkranken verdoppelt. Weiters wird Diabetes mellitus mit der Entstehung eines Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht. Falsche Ernährung, und hier vor allem Übergewicht, erhöht ebenfalls wesentlich die Inzidenz an Pankreaskarzinom zu erkranken. Patienten mit einer chronischen Pankreatitis erkranken 26-mal häufiger an Pankreaskarzinom als Angehörige der Kontrollgruppe. Weiters zeigt die genetische Analyse, dass diesem Tumor eine Vielzahl von Genmutationen in Suppressorgenen und Onkogenen zugrunde liegt, die eine Ursache für das aggressive Tumorwachstum darstellen (p53, p16, Smad4, K-ras) [11].

Pankreaskarzinome überexprimieren verschiedene Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren und regen dadurch selbst das Wachstum an (z.B. EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), TGF- $\alpha$  (transformierter Wachstumsfaktor-alpha)). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Tumoren, die diese Faktoren nicht überexprimiert haben, längere Überlebenszeiten haben [11].

Die einzige Möglichkeit mit Aussicht auf Heilung beziehungsweise auf ein längeres krankheitsfreies Intervall stellt die chirurgische Therapie dar, die ein hochanspruchsvoller Eingriff ist (z.B. Whipple-Operation). Außerdem kommen die Chemotherapie und/oder die Radiotherapie adjuvant oder bei inoperablen Karzinomen nicht adjuvant zum Einsatz. Da die Resektion nur bei 5-15% aller Patienten möglich ist, und da der Tumor bei 70% aller Patienten unmittelbar nach der Diagnosestellung über den ganzen Körper verteilt ist steht oftmals nur noch die zytostatische Therapie zur Verfügung [13].

### **2.9.1. Chemotherapie**

In der Chemotherapie des Pankreaskarzinoms werden antineoplastische Agenzien verwendet, die das Zellwachstum und die –proliferation hemmen. Die aktivsten Verbindungen sind Gemcitabin (Gemzar®) und 5-Fluorouracil, wobei Gemcitabin im Vergleich zu 5-FU eine kleine aber statistisch signifikante Überlebenszeitverlängerung mit sich bringt und sich zusätzlich durch einen so genannten ‚clinical benefit‘ auszeichnet. Das heißt es erfolgt unter der Therapie eine Symptomverbesserung bezüglich Gewichtsverlust und Schmerzen [13].

5-Fluorouracil (Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®) ist ein fluorierter Pyrimidin-Antimetabolit, der die Thymidylat-Synthase inhibiert und mit der RNA-Synthese und –funktion interferiert [12]. Die Ansprechrate liegt bei weniger als 20%. 5-Fluorouracil in Kombination mit Strahlung wurde als Standardtherapie durch Gemcitabin ersetzt.

Erlotinib (Tarceva®) stellt pharmakologisch einen Inhibitor der Tyrosinkinase des human epidermal growth factor receptor type 1/epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR) dar.

Carpecitabine (Xeloda®) ist ein Prodrug von Fluorouracil, das in der Leber und im Gewebe hydrolysiert und zum aktiven Metaboliten umgewandelt wird.

### 2.9.2. Erlotinib (Tarceva®) und seine Metabolisierung

Erlotinib (OSI-774), das bei metastasiertem Pankreaskarzinom in Kombination mit Gemcitabin eingesetzt wird, ist ein Hemmer des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors, der auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert werden. Durch diese Blockierung kann der Tumor die Signale nicht mehr empfangen, die für das Wachstum, das Fortschreiten und die Ausbreitung des Tumors (Metastasen) erforderlich sind, sodass Erlotinib das Wachstum und die Vermehrung der Krebszellen stoppen hilft [14].

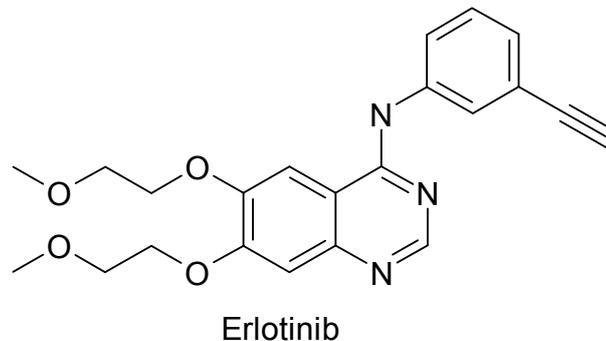


Abbildung 12: Strukturformel Erlotinib

Chemisch gesehen ist Erlotinib ein oral aktives Quinazolin-Derivat (4-Quinazolinamin), das selektiv und reversibel an die ATP-Bindungsstelle am Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR, epidermal growth factor receptor) bindet und so seine Autophosphorylierung verhindert. Dadurch wird die Signalübertragung über den für das Zellwachstum wichtigen Wachstumsfaktor EGF verhindert.

Der EGF-Rezeptor stellt eine Tyrosin-Kinase dar. Bindet ein Ligand an den Rezeptor kommt es zur Rezeptordimerisierung wodurch die Tyrosin-Kinase-Domäne aktiviert wird, die wiederum zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt. Dadurch werden eine Reihe von Adapterproteine rekrutiert und eine intrazelluläre Signalkaskade mit Einfluss auf die Gentranskription aktiviert, die zu Tumorzell-Proliferation, reduzierter Apoptose und stimulierter Tumor-induzierter Angiogenese führt.

Studien [15], [16] haben gezeigt, dass Erlotinib weitgehend im Körper metabolisiert wird und dass weniger als 2% unverändert im Harn (8%) oder Stuhl (83%) ausgeschieden werden bei einer Bioverfügbarkeit von ungefähr 60 %. Erlotinib wird

in der Leber durch das Cytochrom-P450-System, hauptsächlich durch CYP3A4 und CYP1A1 und zu geringen Anteilen auch CYP3A5, biotransformiert, siehe dazu Abbildung 13: Metabolisierung von Erlotinib.

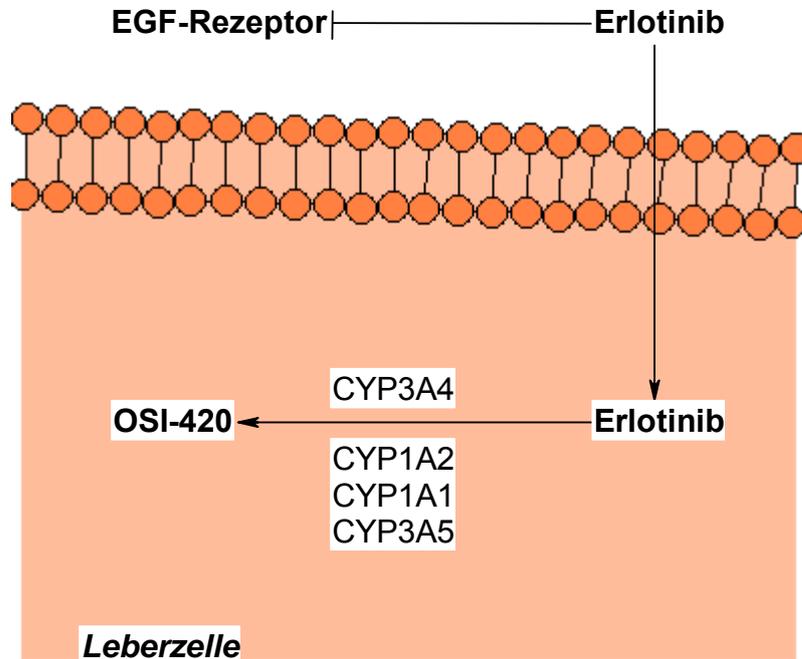


Abbildung 13: Metabolisierung von Erlotinib

Basierend auf der Struktur der Metabolite wurden drei Hauptbiotransformationswege identifiziert: die O-Demethylierung der Seitenketten, wobei eine Oxidation zur Carbonsäure folgt (29,4%), die Oxidation des Acetylen-Teils zur Carbonsäure (21%) und die Hydroxylierung des aromatischen Ringes (9,6%).

Erlotinib, das als Hydrochlorid angewandt wird (Tarceva®), wird nach oraler Gabe sehr schnell absorbiert. Den zirkulierenden Hauptbestandteil im Plasma stellt unverändertes Erlotinib dar. Der pharmakologisch aktive Metabolit M-14 (OSI-420), der durch O-Demethylierung hergestellt wird, macht hingegen nur 5% aus.

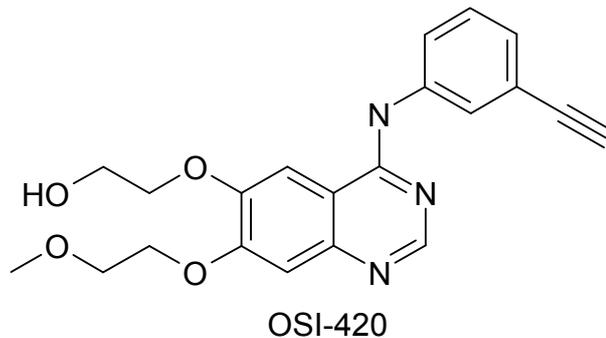


Abbildung 14: Hauptmetabolit OSI-420

Einige Phase-1-Metabolite werden als Glucuronide oder Sulfate ausgeschieden.

Untersuchungen [15] zeigten, dass weder Tarceva® noch irgendein Metabolit extrem beständig, oder labil sind. Durch die Analyse der Oberfläche konnte gezeigt werden, dass Erlotinib lipophile-Interaktionen eingeht und dadurch vermutlich elektrophil angegriffen werden kann. Außerdem besitzen alle Verbindungen Regionen mit einem Elektronendefizit, die einen nucleophilen Angriff durch beispielsweise Glutathion oder Nucleotidbasen der DNA erlauben. Der Abbau des Glutathions kann zu oxidativem Stress und folglich zu Zelltoxizität führen wohingegen die Oxidation der Nucleotidbasen DNA-Schäden induziert. Die Autoren schätzen die Rate dieser Nebenreaktionen aufgrund der geringen kinetischen Trägheit allerdings als gering ein.

### **3. Aufgabenstellung**

Die Metabolisierung von Arzneistoffen kann den Oxidativen Stress erhöhen. Nun soll im Zuge dieser Diplomarbeit herausgearbeitet werden in wie weit der mit dem FORM plus-Gerät gemessene oxidative Stress mit der Chemotherapie des Pankreaskarzinoms korreliert. Insbesondere wurde die Metabolisierung von antineoplastisch wirksamen Erlotinib beobachtet und als Bezugswert für den Vergleich mit dem oxidativen Stress und der antioxidativen Kapazität herangezogen.

Dazu wurden sowohl die Konzentrationen von Erlotinib und seines Metaboliten OSI-420 im Blutplasma, also auch der oxidative Stress und die antioxidative Kapazität der Patienten in unterschiedlichen Phasen der Therapie gemessen und miteinander in Zusammenhang gebracht.

Weiters bot sich aufgrund von Cortisol-Messungen im Rahmen des Praktikums „Praktikum für chemische Diagnostik und klinische Pharmazie“ die Möglichkeit, den Stress-Marker Cortisol direkt mit dem oxidativen Stress zu vergleichen.

## 4. Experimenteller Teil

Das Kollektiv bestand aus tiefgefrorenen und auf Trockeneis transportierten Seren von Pankreaskarzinom-Patienten, die im Zuge einer klinischen Studie mit der Trippeltherapie aus Erlotinib, Capecitabin und Bevacizumab behandelt wurden. Diese Studie wurde im Kaiser Franz-Josef Spital in der Abteilung „Zentrum für Onkologie“ durch Frau Dr. Margit Gneist durchgeführt.

### 4.1. Durchführung Stressmessung

Die Messung des oxidativen Stress und der antioxidativen Kapazität erfolgte mit dem FORM plus-Gerät, siehe Abbildung 15.



Abbildung 15: Das FORM plus-Testsystem

Dazu wurden die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Seren zunächst mit dem Heizblock vorsichtig auf  $36^{\circ}\text{C}$  aufgeheizt und aufgetaut.

Das Gerät führt nach dem Einschalten automatisch einen Eigentest durch, der Küvettenschacht wird auf konstante  $37^{\circ}\text{C}$  aufgeheizt.

Das FORM-Gerät entspricht einem Photometer, das basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei  $505\text{nm}$  die Änderung der Extinktion in einer kinetischen Messung misst.

## 4.2. FORT (Free Oxygen Radicals Test)

### 4.2.1. Testprinzip

Der FORT-Test gibt die antioxidative Kapazität an. Das Testprinzip beruht darauf, dass Übergangsmetalle (z.B. Eisen) die Fähigkeit besitzen, die Bildung von freien Radikalen aus Hydroperoxiden zu katalysieren (siehe Abbildung 16, Reaktionen 1 und 2), die wiederum mit einem Chromogen, einem Aminderivat ( $\text{CrNH}_2$ ), reagieren und ein stabiles farbiges Radikal-Kation bilden, dessen photometrisch messbare Intensität der Farbe basieren auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz direkt proportional zur Radikalmenge ist und korreliert folglich auch mit dem Oxidationszustand der untersuchten Probe. Das rot gefärbte farbiges Chromogen kann bei 505nm gemessen werden. [18]

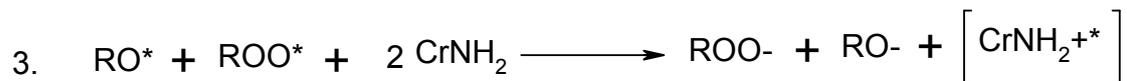


Abbildung 16: Nachweisreaktionen FORT

### 4.2.2. Durchführung

Die aufgetauten Seren wurden gleich behandelt wie Vollblut, für das das Gerät eigentlich vorgesehen ist.

Mithilfe einer Kapillare wurden 20  $\mu\text{l}$  Probe entnommen, die gefüllte Kapillare wurde in eine mit Pufferlösung (pH 5.0) gefüllten Mikrovette gegeben, verschlossen und gut geschüttelt, um das Serum aus der Kapillare in die Pufferlösung zu waschen.

Anschließend wurde die Mikrovette geöffnet und der gesamte Inhalt ohne der Kapillare in die quadratische Messküvette gegossen, in der sich das Chromogenlyophilisat befindet. Nach dem Verschließen der Küvette wurde durch vorsichtiges schwenken der Farbstoff aufgelöst. Das Reaktionsgefäß wurde dann mit einer der gerippten Seiten nach oben eine Minute in einer Mini-Zentrifuge zentrifugiert, wobei eine mitgelieferte Ausgleichküvette in der gegenüberliegenden Position eingesetzt wurde. Die zentrifugierte Küvette wurde vorsichtig ohne zu schütteln anschließend in den Küvettenschacht des FORM Messgerätes eingesetzt. Hier ist darauf zu achten, dass die Küvette mit dem Barcode-Etikett nach vorne und mit den geriffelten Seiten links

und rechts eingesetzt wurde. Während der gesamten Durchführung muss darauf geachtet werden, dass die Küvette an den nicht gerippten Seiten ganz sauber bleibt, da hier der Messstrahl die Probe durchquert/passiert. Nach dem Einsetzen der Küvette in die Messzelle beginnt der Test automatisch. Die Messung dauert zwei mal drei Minuten, nach deren Ablauf das Ergebnis angezeigt wurde.

Bei der Zentrifuge handelte es sich um eine Mini-Zentrifuge Modell 6000, einer kompakten Tischzentrifuge mit festem Drehzahl-Winkelrotor und einer elektromagnetischen Bremse.

#### 4.2.3. Ergebnisse und Interpretationen

Der Test basiert auf einer kinetischen Messung, wobei die Differenz aus zwei aufeinander folgenden dreiminütigen Lesungen als Ergebnis angegeben wird. Die gemessene kinetische Reaktion wird automatisch in FORT-Einheiten sowie in Wasserstoffperoxid-Äquivalenten angegeben, wobei eine FORT-Einheit (1 FORT U) ungefähr  $7,6 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$  ( $0,26 \text{ mg/l H}_2\text{O}_2$ ) entspricht.

Normalwerte: unter 230 bis 310 FORT U

Tabelle 4: Werte und ihre Interpretation

Werte	Interpretation
bis 230 FORT U	gut
230 bis 310 FORT U	Normalwerte/Grenzbereich
310 bis 400 FORT U	Oxidativer Stress
über 400 FORT U	Starker oxidativer Stress

#### 4.3. FORD (Free Oxygen Radicals Defence)

##### 4.3.1. Testprinzip

Mit dem FORD-Test kann die antioxidative Kapazität abgeschätzt werden. Er beruht darauf, dass sich ein farbiges Radikal in Gegenwart von oxidationshemmenden Substanzen proportional zu ihrer Menge entfärbt. Vorerst wird ein stabiles gefärbtes radikalische Chromogenkation gebildet, indem ein geeignetes Oxidans ( $\text{FeCl}_3$ ) in saurer Umgebung ( $\text{pH}=5,2$ ) mit einem farblosen Aminoderivat (Chromogen) reagiert. Dieses stabile Chromogen kann photometrisch bei  $505\text{nm}$  vermessen werden. Die in der Probe enthaltenen oxidationshemmenden Verbindungen (AOH) verringern das aminische Radikal-Kation und entfärben die Lösung proportional zur Menge an Antioxidantien.

1. Chromogen (farblos) +  $\text{Fe}^{2+}$  +  $\text{H}^+$   $\longrightarrow$  Chromogen<sup>•+</sup> (purpur)
2. Chromogen<sup>•+</sup> (purpur) + AOH  $\longrightarrow$  Chromogen+ (farblos) + AO

Abbildung 17: Nachweisreaktionen FORD

#### 4.3.2. Durchführung

Zuerst wurde eine Erstmessung durchgeführt in der das stabile gefärbte Chromogenkation hergestellt und vermessen wurde. Dazu wurde das vordosierte feste Chromogen, das sich in der Messküvette befindet, mit einem stabilisierten und vordosierten Puffer mit pH 5,2 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 50µl des Oxidans ( $\text{FeCl}_3$ ) hinzugefügt und geschwenkt. Die Messküvette wurde mit dem Barcodeetikett nach vorne in den Küvettenschacht des FORM plus Gerätes gesetzt, die Messung startet automatisch und dauert 4 Minuten. Während der Erstmessung wurden 50µl der Probe mit einer Kapillare aufgenommen, die dann in eine Eppendorfmikrovette die mit vordosiertem Puffer gefüllt war, gegeben wurde. Das Eppendorfgefäß wurde verschlossen, vorsichtig geschwenkt und anschließend in der Zentrifuge mit dem passendem Ausgleichgefäß eine Minute zentrifugiert. 100µl des Überstandes wurden zum zuvor hergestellten radikalischen Chromogenkation in der Messküvette hinzugefügt. Die Küvette wurde mehrfach geschwenkt und dann unverzüglich wieder in den Küvettenschacht gesetzt wobei diese zweite Messung zwei Minuten dauert. Es ist sehr wichtig, dass die Küvette sofort nach der Beifügung der Probe in den Küvettenschacht gegeben wird, da die Reaktion zwischen dem Farbstoffradikal, einem Aminradikal, und den Antioxidantien der Probe sofort erfolgen.

#### 4.3.3. Ergebnisse und Interpretationen

Das Ergebnis der gemessenen kinetischen Reaktion wird aus der Differenz zwischen den beiden Lesungen ermittelt und wird in Trolox-Äquivalenten (mmol/l) angegeben. Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure) (siehe Abbildung 18) ist ein zellendurchlässiges Derivat des Vitamin E mit sehr bedeutenden oxidationshemmenden Eigenschaften.

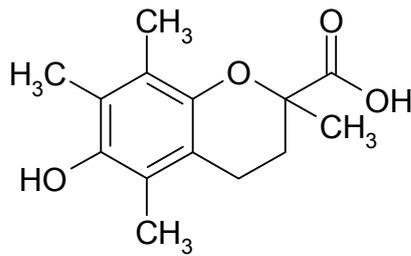


Abbildung 18: Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure)

Normwerte: 1.07 – 1.53 mmol/l Trolox

#### 4.4. HPLC – Analyse der Metabolisierung von Erlotinib

Um die Konzentration von Erlotinib und seines Metaboliten OSI-420 nachweisen zu können wurde zunächst eine Festphasenextraktion (engl. Solid Phase Extraction, SPE) durchgeführt. Die Trennung und die quantitative und qualitative Analyse erfolgte mit dem Hochleistungsflüssigchromatographie-Verfahren (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC).



Abbildung 19: HPLC-Gerät

## **5. Auswertung**

### **5.1. Programme**

#### **5.1.1. GraphPad Prism 5.00**

Graph PadPrism 5 der Firma GraphPad Software Inc. ist ein umfassendes statistisches Analysen- und Darstellungsprogramm zur Aufbereitung von wissenschaftlichen Daten. Es ermöglicht eine einfache Durchführung von statistischen Tests.

#### **5.1.2. Microsoft Excel**

Microsoft Excel der Firma Microsoft Corporation ist ein Tabellenkalkulationsprogramm, das umfangreiche Berechnungen mittels Formeln und Funktionen ermöglicht. Die Resultate können in Diagrammen graphisch dargestellt werden.

#### **5.1.3. MDL ISIS Draw 2.5**

MDL ISIS Draw 2.5 von MDL Information Systems Inc. ist ein frei zugängliches Formelzeichenprogramm.

### **5.2. Statistische Verfahren**

#### **5.2.1. Lagemaße**

Sie dienen der Beschreibung einer Position der beobachtenden Daten mittels eines aus den Daten berechneten Wertes und stellen das Maß der zentralen Tendenz dar.

Lageparameter kennzeichnen die Lage von Merkmalswerten, z.B. den kleinsten oder größten Wert oder die mittlere Lage.

Das arithmetisch Mittel oder der Mittelwert (engl.: mean) stellt den Durchschnitt durch alle Messwerte dar.

Der Median oder Zentralwert (engl.: median) gibt jenen Wert an, der genau zwischen der oberen und der unteren Hälfte der Verteilung liegt, wenn die Einzelwerte der Größe nach sortiert werden.

#### **5.2.2. Streuungsmaße**

Streuungsparameter (Dispersionsmaße) sind Kennzahlen für das Ausmaß der Streuung und geben die Intervallbreite von Merkmalswerten an.

Die Varianz stellt die mittlere quadratische Abweichung der einzelnen Beobachtungen vom arithmetischen Mittel dar.

die Standardabweichung (engl.: standard deviation) ist die Quadratwurzel aus der Varianz.

Ein aussagekräftiges Maß der Streuung ist der Quartilabstand. Quartile entstehen durch Viertelteilung des Datensatzes. Das 0. Quartil ist größer als 0% der Daten und entspricht dem Minimum, das 1. Quartil ist größer als 25% der Daten, das 2. Quartil ist größer gleich 50% der Daten und entspricht dem Median, das 3. Quartil ist größer als 75% der Daten und das 4. Quartil entspricht dem Maximum der erhobenen Messwerte. Die Differenz zwischen dem 3. und dem 1. Quartil wird Quartilabstand bezeichnet. er gibt die Streubreite der Mittleren 50% der Merkmalswerte an.

Der Standardfehler (engl.: standard error) oder auch Stichprobenfehler ist ein Maß für die durchschnittliche Größe des Stichprobenfehlers und liefert eine Aussage über die Güte des ermittelten Mittelwertes. der Standardfehler wird umso kleiner, je größer der Stichprobenumfang ist.

Das Konfidenzintervall (engl.: confidence interval, CI) oder Vertrauensbereich sagt etwas über die Präzision der Lageschätzung eines Parameters (z.B. eines Mittelwertes) aus. Er gibt an, in welchem Bereich (um den Mittelwert der Stichprobe) der wahre Mittelwert (der Grundgesamtheit) mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit liegt.

### **5.2.3. Statistische Tests**

Der t-Test bewertet ob die Mittelwerte zweier Gruppen statische Unterschiede zueinander aufweisen. Er erlaubt beispielsweise eine Aussage, ob verschiedene unabhängig voneinander durchgeführte Messungen konsistent sind. Sind die Stichprobengrößen gleich groß so spricht man von einen gepaartem t-Test, bei unterschiedlichen Stichprobengrößen wird jedoch ein ungepaarter Test durchgeführt.

## 6. Ergebnisse und Diskussion

Es wurde der oxidative Stress (FORT) und die antioxidative Kapazität (FORD) der Plasma-Proben von mit Erlotinib behandelten Pankreaskarzinom-Patienten/-innen gemessen.

Die Abnahme des Blutes und die Messungen erfolgten vor der Therapie (0h oder T0) und dann eine und 6 Stunden nach der Gabe und weiters zur selben Zeit an acht nachfolgenden Tagen. Das Kollektiv bestand aus 9 Patienten.

Außerdem wurde zur Zeit 0 am ersten Tag und am Tag 8 nach der Therapie die antioxidative Kapazität vermessen.

Alle Proben hatten einen FORT-Wert von über 600, also über der Nachweisgrenze des Testgerätes, daher wurden die Plasma-Proben 1:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und der erhaltene FORT-Wert mit zwei multipliziert. Laut Literatur stimmen diese errechneten Werte in groben Zügen mit den Ergebnissen der unverdünnten Proben überein [21].

Außerdem musste der erhöhte FORT-Wert von Plasma-Proben gegenüber Vollblutproben miteinbezogen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Plasma nicht durch zelluläre Bestandteile verdünnt wird.

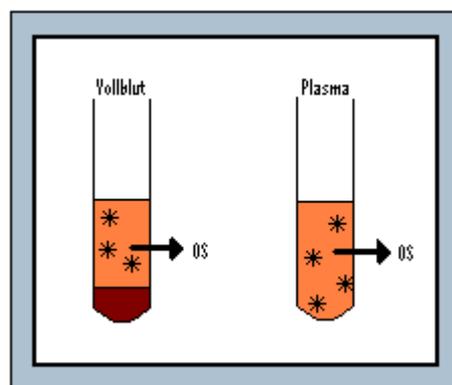


Abbildung 20: Vollblutproben gegen Plasma-Proben

Da im Plasma die zellulären Bestandteile, vor allem Erythrozyten, abzentrifugiert wurden ändert sich im Vergleich zum Vollblut, das zentrifugiert wurde, das Volumen und dadurch die Konzentration der Radikale. Die berechneten FORT-Werte wurden daher durch den Faktor 1,3 dividiert. [19]

### 6.1. Messwiederholungen

Um die Messgenauigkeit und die Arbeitspräzision abzuklären wurden Messwiederholungen durchgeführt. Ich hatte die Möglichkeit Daten dreier Patienten von der Diplomandin Feirer Cornelia zu übernehmen und diese als Vergleichsparameter zu nehmen. Die Datensätze wurden in den Kurvendiagrammen in Abbildung 21: Kurvendiagramme: Messwiederholungen mit FC für Feirer Cornelia, die eigenen Messwiederholungen mit MP für Marina Peham abgekürzt.

Messwiederholungen wurden bei den Patienten 1 bis 4 durchgeführt. Von den erhaltenen Werten wurden anschließend eine umfassende Statistik (Column-Statistic) und ein T-Test durchgeführt.

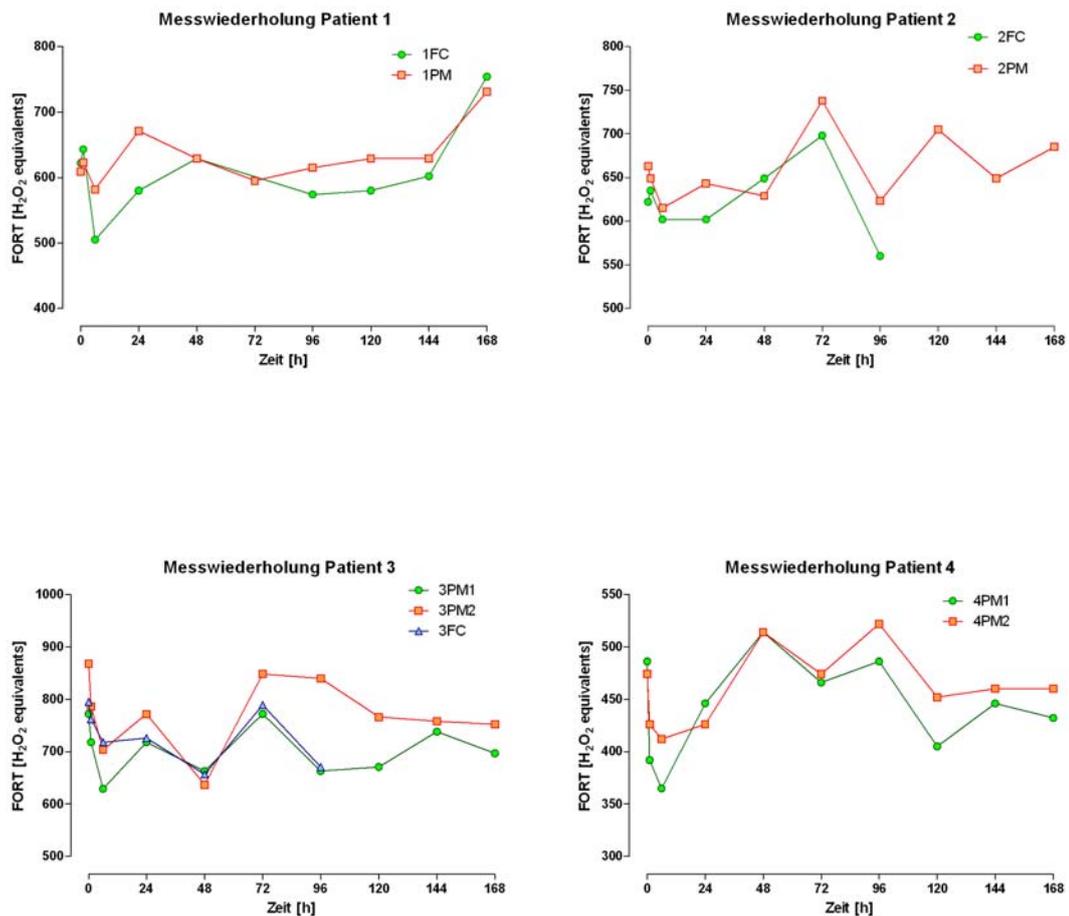


Abbildung 21: Kurvendiagramme: Messwiederholungen

Tabelle 5: t-Test Messwiederholungen

Table Analyzed	Pat 1	Pat 2	Pat 3	Pat 3	Pat 4
Column A	1FC	2FC	3PM1	3PM1	4PM1
vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column B	1PM	2PM	3PM2	3FC	4PM2
<b>Unpaired t test</b>					
P value	0,4139	0,0941	0,0190	0,2965	0,3422
P value summary	ns	ns	*	ns	ns
Are means signif. different?(P < 0.05)	No	No	Yes	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-t.	Two-t.	Two-t.	Two-t.	Two-t.
t, df	t=0.8375 df=17	t=1.787 df=15	t=2.577 df=18	t=1.082 df=15	t=0.9756 df=18

Es sind bei vier der fünf vergleichenden t-Tests keine signifikanten Unterschiede festzustellen, was darauf hinweist, dass die Gerätefunktion und die Arbeitsweise in Ordnung sind.

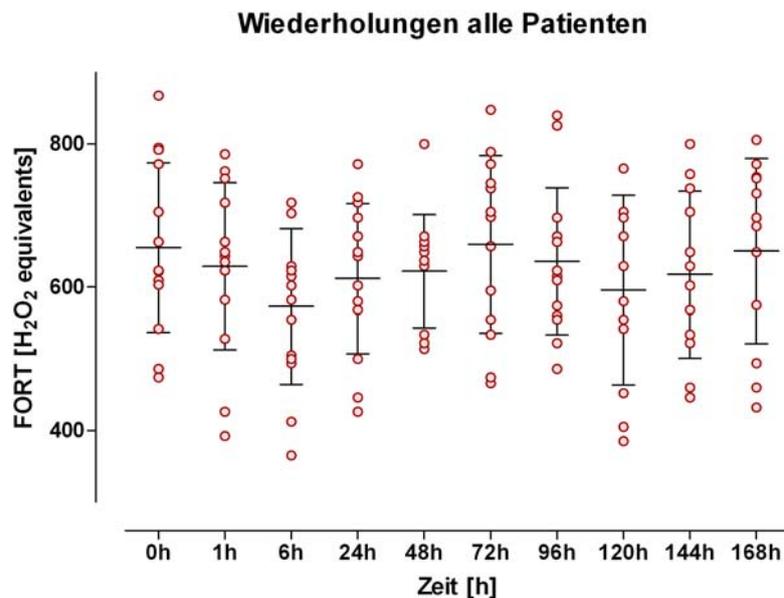


Abbildung 22: Scattergramm Messwiederholungen aller Patienten

Das Scattergramm zeigt sehr gut, dass die Stresswerte bei allen Patienten am Anfang abfallen und ihr Minimum 6 Stunden nach der Medikamentengabe erreicht haben, worauf sie dann wieder ansteigen mit einem Maximum bei 72 Stunden nach der Medikamentengabe. Es wurde eine deskriptive Statistik erstellt.

Tabelle 6: Column-Statistik aller Messwiederholungen

	0 h	1 h	6 h	24 h	48 h	72 h	96 h	12 h	14 h	16 h
<b>Number of values</b>	14	14	14	14	14	13	14	12	12	12
<b>Minimum</b>	474	392	365	426	514	466	486	385	446	432
<b>25% Percentile</b>	587,8	568,5	498,5	551	531	544,5	558,8	474,5	525	514,3
<b>Median</b>	622,5	646	592	622,5	633	698	619	604,5	615,5	691
<b>75% Percentile</b>	777,0	726,5	647,5	702,3	663,0	758,5	677,5	703,0	729,8	753,5
<b>Maximum</b>	868	786	718	772	800	848	840	766	800	806
<b>Mean</b>	655,4	629,1	572,9	611,9	622,2	659,7	636,0	596,1	617,6	650,6
<b>Std. Deviation</b>	118,4	116,8	108,5	104,7	78,86	124,1	102,7	132,5	116,5	129,3
<b>Std. Error</b>	31,63	31,22	28,99	27,99	21,08	34,41	27,45	38,26	33,64	37,34
<b>Lower 95% CI of mean</b>	587,1	561,7	510,3	551,4	576,7	584,7	576,7	511,9	543,6	568,4
<b>Upper 95% CI of mean</b>	723,8	696,6	635,6	672,3	667,7	734,7	695,3	680,3	691,6	732,8

## 6.2. FORT-Werte aller Patienten

Patient 1	Zeit [h]	FORT [H2O2 equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	396	792	609
	1	405	810	623
	6	378	756	582
	24	436	872	671
	48	409	818	629
	72	387	774	595
	96	400	800	615
	120	409	818	629
	144	409	818	629
	168	475	950	731

Patient 2	Zeit [h]	FORT [H2O2 equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	431	862	663
	1	422	844	649
	6	400	800	615
	24	418	836	643
	48	409	818	629
	72	480	960	738
	96	405	810	623
	120	458	916	705
	144	422	844	649
	168	445	890	685

Patient 3	Zeit [h]	FORT [H2O2 equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	502	1004	772
	1	467	934	718
	6	409	818	629
	24	467	934	718
	48	431	862	663
	72	502	1004	772
	96	431	862	663
	120	436	872	671
	144	480	960	738
	168	453	906	697

Patient 4	Zeit [h]	FORT [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	316	632	486
	1	255	510	392
	6	237	474	365
	24	290	580	446
	48	334	668	514
	72	303	606	466
	96	316	632	486
	120	263	526	405
	144	290	580	446
	168	281	562	432

Patient 5	Zeit [h]	FORT [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	458	916	705
	1	431	862	663
	6	405	810	623
	24	422	844	649
	48	431	862	663
	72	458	916	705
	96	431	862	663
	120	453	906	697
	144	458	916	705
	168	502	1004	772

Patient 6	Zeit [h]	FORT [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	405	810	623
	1	422	844	649
	6	361	722	555
	24	369	738	568
	48	436	872	671
	72	427	854	657
	96	453	906	697
	120	250	500	385
	144	347	694	534
	168	422	844	649

Patient 7	Zeit [h]	FORT [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	352	704	542
	1	343	686	528
	6	321	642	494
	24	369	738	568
	48	347	694	534
	72	361	722	555
	96	361	722	555
	120	361	722	555
	144	339	678	522
	168	321	642	494

Patient 8	Zeit [h]	FORT [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	392	784	603
	1	378	756	582
	6	325	650	500
	24	325	650	500
	48	339	678	522
	72	347	694	534
	96	396	792	609
	120	352	704	542
	144	369	738	568
	168	374	748	575

Patient 9	Zeit [h]	FORT [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equivalents] 1:1 verdünnt	berechnet	durch 1,3
	0	515	1030	792
	1	489	978	752
	6	467	934	718
	24	453	906	697
	48	520	1040	800
	72	484	968	745
	96	537	1074	826
	120	498	996	766
	144	520	1040	800
	168	524	1048	806

Tabelle 7: FORT-Werte aller Patienten

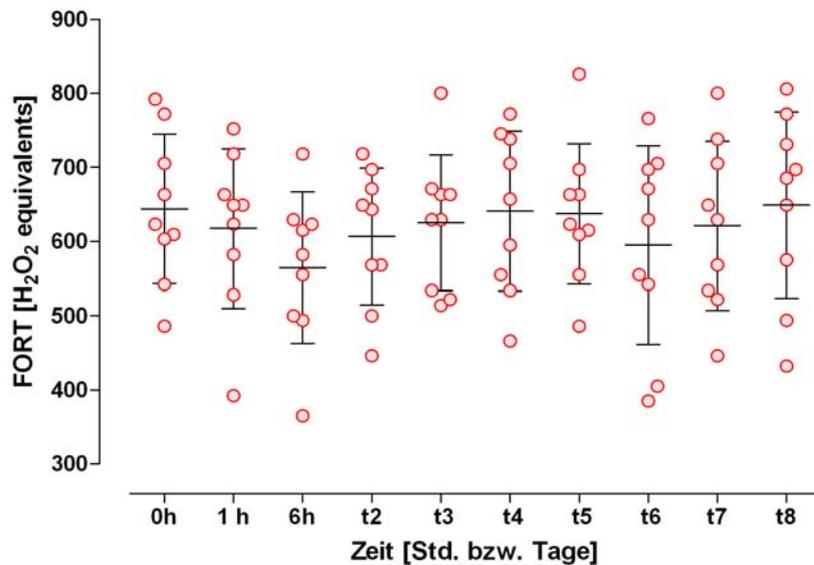


Abbildung 23: Streuungsdiagramm FORT-Werte

	0h	1 h	6h	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
<b>Number of values</b>	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
<b>Minimum</b>	486	392	365	446	514	466	486	385	446	432
<b>25% Percentile</b>	573	555	497	534	528	545	582	474	528	535
<b>Median</b>	623	649	582	643	629	657	623	629	629	685
<b>75% Percentile</b>	739	691	626	684	667	742	680	701	722	752
<b>Maximum</b>	792	752	718	718	800	772	826	766	800	806
<b>Mean</b>	644	617	565	607	625	641	637	595	621	649
<b>Std. Deviation</b>	101	107	102	92,2	91,4	108	94,6	134	114	126
<b>Std. Error</b>	33,6	35,8	34,0	30,7	30,5	36,0	31,5	44,6	38,1	41,9
<b>Lower 95% CI of mean</b>	567	535	486	536	555	558	565	492	533	552
<b>Upper 95% CI of mean</b>	721	700	643	678	695	724	710	698	709	746

Tabelle 8: Deskriptive Statistik aller FORT-Werte

Das Streuungsdiagramm aller FORT-Werte zeigt gut, dass die FORT-Werte aller Patienten unabhängig vom Geschlecht oder Krankheitszustand 6 Stunden nach der Medikamentengabe ihr Minimum haben (Mittelwert: 565 Wasserstoffperoxid-Äquivalente), dann wieder ansteigen und 6 Tage nach der Gabe wieder kurz abfallen.

Die Stresswerte sind dennoch bei allen Patienten sehr hoch, die FORT-Werte liegen schon vor der Therapie zwischen 792 FORT und 486 FORT, der Durchschnitt liegt bei 644 FORT. Die hohen Stresswerte sind bei Krebspatienten vorhersehbar.

Eine Stunde nach der Erlotinib-Gabe sinken die Werte auf einen durchschnittlichen Wert von 617 FORT bis zu einem Minimum von 565 FORT sechs Stunden nach der Erlotinib-Gabe. Der Mittelwert steigt bis zum Tag 4 wieder an (641 FORT) mit einem kurzen Abfall am Tag 6 (595 FORT). Am Tag 8 wird annähernd der Wert vor Therapiebeginn erreicht (649 FORT).

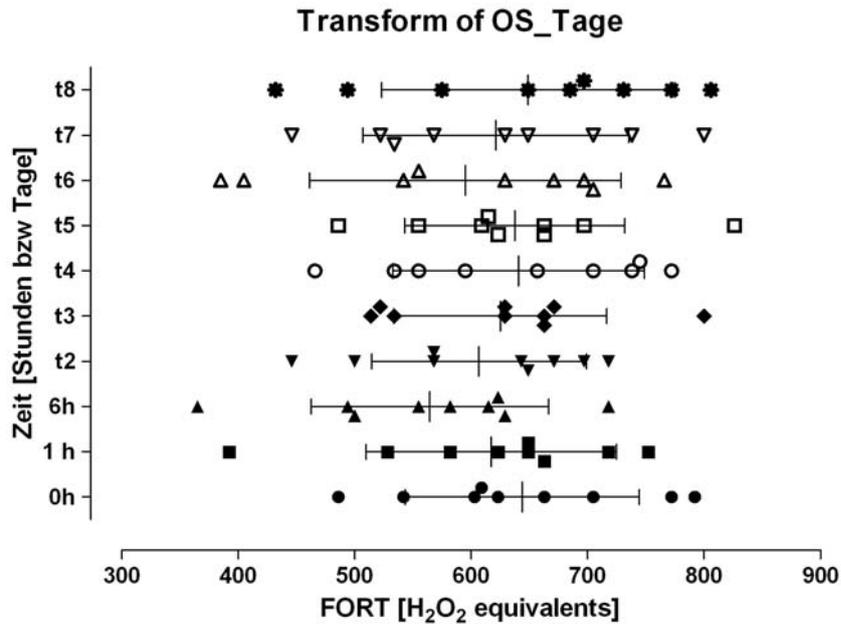


Abbildung 24: Transformation der FORT-Werte

In dem durch Transformation erhaltenen Streuungsdiagramm kann man gut erkennen, dass sich der Mittelwert um 600 FORT-Einheiten befindet.

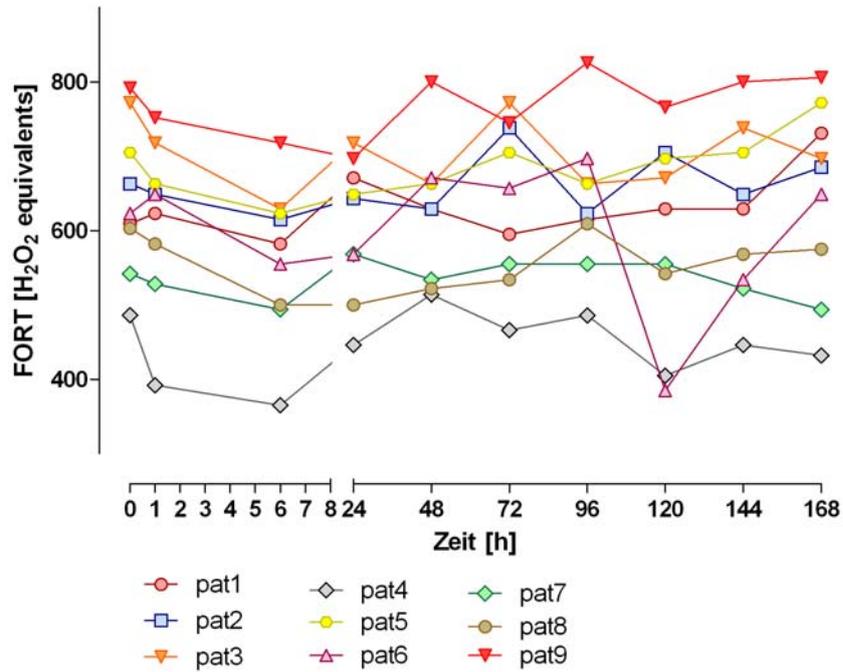


Abbildung 25: Kurvendiagramm der FORT-Werte

Das Diagramm zeigt die Kurven der FORT-Wert-Verläufe der einzelnen Patienten. Um den Abfall in den ersten Stunden besser darstellen zu können, wurde die Skalierung enger gewählt. Auffällig ist, dass Patient 4 vergleichsweise niedrige FORT-Werte hat, vor allem im Vergleich zu Patient 9.

Im Folgenden werden die ermittelten Erlotinib-Konzentrationen miteinbezogen.

Erlotinib in µg/ml									
time [h]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	Pat5	Pat6	Pat7	Pat8	Pat9
0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	1,73	3,28	2,94	0,03	1,99	0,00	0,31	0,05	0,56
2	0,87	4,76	2,93	0,96	1,32	0,00	0,32	0,28	2,10
3	0,86	3,21	2,29	1,28	1,32	0,20	0,33	0,44	1,28
4	0,63	2,87	1,90	1,09	1,36	0,23	0,22	0,51	1,05
5	0,59	2,47	1,48	0,91	1,14	0,24	0,25	0,61	1,24
6	0,49	2,60	2,11	0,80	1,03	0,22	0,28	0,62	1,03
8	0,40	2,85	1,57	0,65	1,28	0,28	0,27	0,82	1,09
24	0,10	0,63	1,46	0,18	0,73	0,18	0,50	0,49	0,75
28	0,97	2,48	2,68	1,11	1,38	0,36	1,58	0,49	2,09
48	0,21	0,35	1,36	0,31	0,58	0,35	0,96	0,26	1,44
52	1,26	0,93	2,78	1,29	0,77	0,55	1,71	0,73	3,45
72	0,18	0,38	2,19	0,34	0,46	0,42	1,10	0,55	2,17
76	1,47	1,78	2,47	1,50	1,28	0,97	1,60	1,08	3,89
96	0,36	0,71	1,44	0,29	0,68	0,75	1,15	0,69	2,60
100	1,25	3,12	2,59	0,86	1,54	1,32	1,67	1,19	4,09
120	0,41	1,24	1,84	0,25	0,74	1,17	1,17	0,67	2,54
124	1,89	2,80	2,48	1,19	1,88	1,22	1,58	1,31	3,75
144	0,75	2,35	2,04	0,34	1,00	1,12	1,32	0,73	2,50
148	2,59	6,00	2,87	1,38	1,82	1,23	2,54	1,11	4,08
168	1,43	4,97	2,34	0,33	0,88	0,81	1,46	1,09	2,53
172	3,60	5,35	2,75	0,76	2,08	1,06	2,63	0,94	4,32

Tabelle 9: Erlotinib-Konzentrationen in µg/ml

OSI in µg/ml									
time [h]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	Pat5	Pat6	Pat7	Pat8	Pat9
0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,11	0,11	0,17	0,00	0,09	0,00	0,01	0,00	0,02
2	0,09	0,23	0,23	0,05	0,08	0,00	0,01	0,00	0,08
3	0,05	0,15	0,19	0,06	0,09	0,00	0,01	0,01	0,06
4	0,03	0,15	0,18	0,06	0,10	0,01	0,01	0,01	0,05
5	0,03	0,12	0,15	0,05	0,09	0,01	0,01	0,01	0,06
6	0,03	0,12	0,24	0,04	0,09	0,01	0,01	0,01	0,05
8	0,02	0,14	0,18	0,03	0,11	0,02	0,01	0,02	0,06
24	0,00	0,02	0,23	0,00	0,09	0,01	0,02	0,02	0,04
28	0,04	0,09	0,37	0,07	0,14	0,02	0,10	0,02	0,11
48	0,01	0,01	0,21	0,01	0,08	0,03	0,05	0,02	0,09
52	0,07	0,03	0,38	0,07	0,09	0,03	0,07	0,02	0,17
72	0,01	0,01	0,37	0,01	0,07	0,03	0,06	0,02	0,16
76	0,09	0,07	0,35	0,11	0,11	0,06	0,09	0,04	0,24
96	0,01	0,03	0,22	0,01	0,13	0,05	0,06	0,03	0,22
100	0,07	0,13	0,35	0,05	0,19	0,10	0,10	0,05	0,27
120	0,02	0,05	0,29	0,01	0,15	0,09	0,06	0,03	0,22
124	0,11	0,10	0,30	0,07	0,27	0,10	0,08	0,04	0,27
144	0,05	0,09	0,29	0,01	0,22	0,10	0,07	0,03	0,24
148	0,16	0,25	0,35	0,07	0,27	0,10	0,17	0,04	0,38
168	0,08	0,22	0,33	0,02	0,20	0,06	0,09	0,05	0,25
172	0,21	0,22	0,37	0,03	0,27	0,08	0,19	0,04	0,36

Tabelle 10: OSI-Konzentrationen in µg/ml

Summe Erlotinib + OSI									
time [h]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	Pat5	Pat6	Pat7	Pat8	Pat9
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	1,85	3,39	3,11	0,03	2,08	0,00	0,32	0,05	0,58
2	0,96	4,99	3,16	1,02	1,40	0,00	0,33	0,28	2,19
3	0,91	3,37	2,48	1,34	1,41	0,20	0,34	0,44	1,35
4	0,67	3,02	2,08	1,16	1,46	0,24	0,22	0,52	1,10
5	0,62	2,59	1,63	0,96	1,23	0,25	0,26	0,62	1,30
6	0,52	2,72	2,35	0,84	1,12	0,24	0,28	0,63	1,07
8	0,42	2,99	1,75	0,68	1,39	0,30	0,28	0,84	1,14
24	0,10	0,66	1,69	0,18	0,82	0,20	0,52	0,51	0,79
28	1,02	2,58	3,04	1,17	1,52	0,39	1,67	0,51	2,20
48	0,22	0,36	1,57	0,32	0,66	0,38	1,00	0,27	1,52
52	1,33	0,96	3,15	1,37	0,86	0,58	1,77	0,75	3,62
72	0,19	0,40	2,55	0,35	0,53	0,45	1,16	0,57	2,32
76	1,56	1,85	2,82	1,60	1,38	1,03	1,68	1,12	4,13
96	0,38	0,74	1,65	0,30	0,81	0,80	1,21	0,73	2,82
100	1,33	3,25	2,93	0,91	1,73	1,42	1,77	1,25	4,36
120	0,42	1,30	2,13	0,27	0,89	1,26	1,23	0,70	2,75
124	2,01	2,90	2,78	1,26	2,15	1,31	1,66	1,35	4,02
144	0,79	2,44	2,33	0,35	1,22	1,22	1,38	0,76	2,74
148	2,76	6,25	3,22	1,45	2,09	1,33	2,72	1,15	4,46
168	1,51	5,19	2,67	0,35	1,08	0,87	1,55	1,14	2,77
172	3,81	5,57	3,12	0,80	2,35	1,14	2,82	0,98	4,67

Tabelle 11: Summe der Erlotinib und OSI-Konzentrationen in µg/ml

In den einzelnen Diagrammen der Patienten sind die FORT-Werte in Wasserstoffperoxid-Äquivalenten der Plasma-Proben gegen die entsprechenden Konzentrationen des Erlotinib in µg/ml und seines wichtigsten Metaboliten OSI in µg/ml aufgetragen. Auffällig ist, dass Erlotinib nach fünf Halbwertszeiten nicht den steady state erreicht.

In den Patientenproben variieren die Konzentrationen von Erlotinib sehr stark: nach der Infusion liegen sie zwischen 0 µg/ml und 3,28 µg/ml.

Eine allgemeine Aussage, ob nun die Erlotinib-Konzentration den Stresswert mit beeinflusst kann im Einzelnen nicht getroffen werden, deshalb wurde ein Diagramm mit den Mittelwerten erstellt, siehe Abbildung 29.

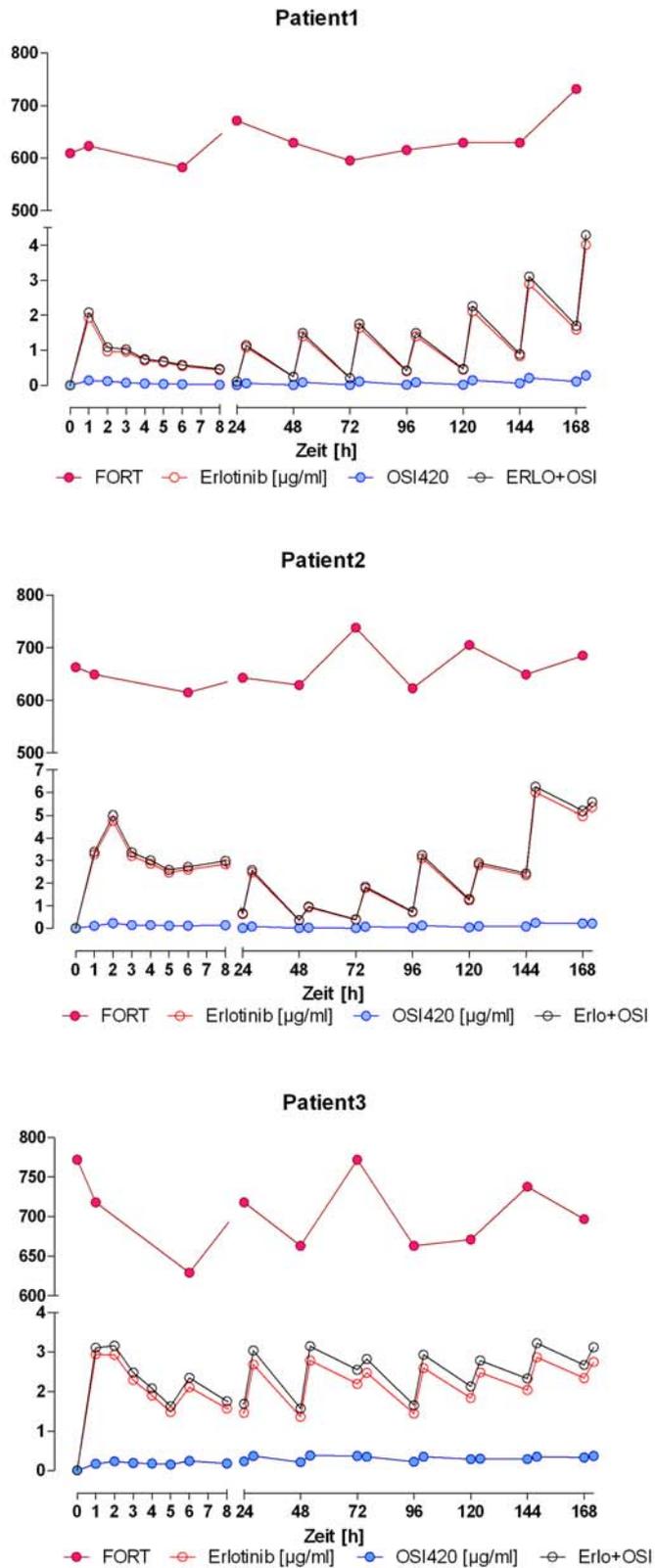


Abbildung 26: Diagramm der Patienten 1 bis 3

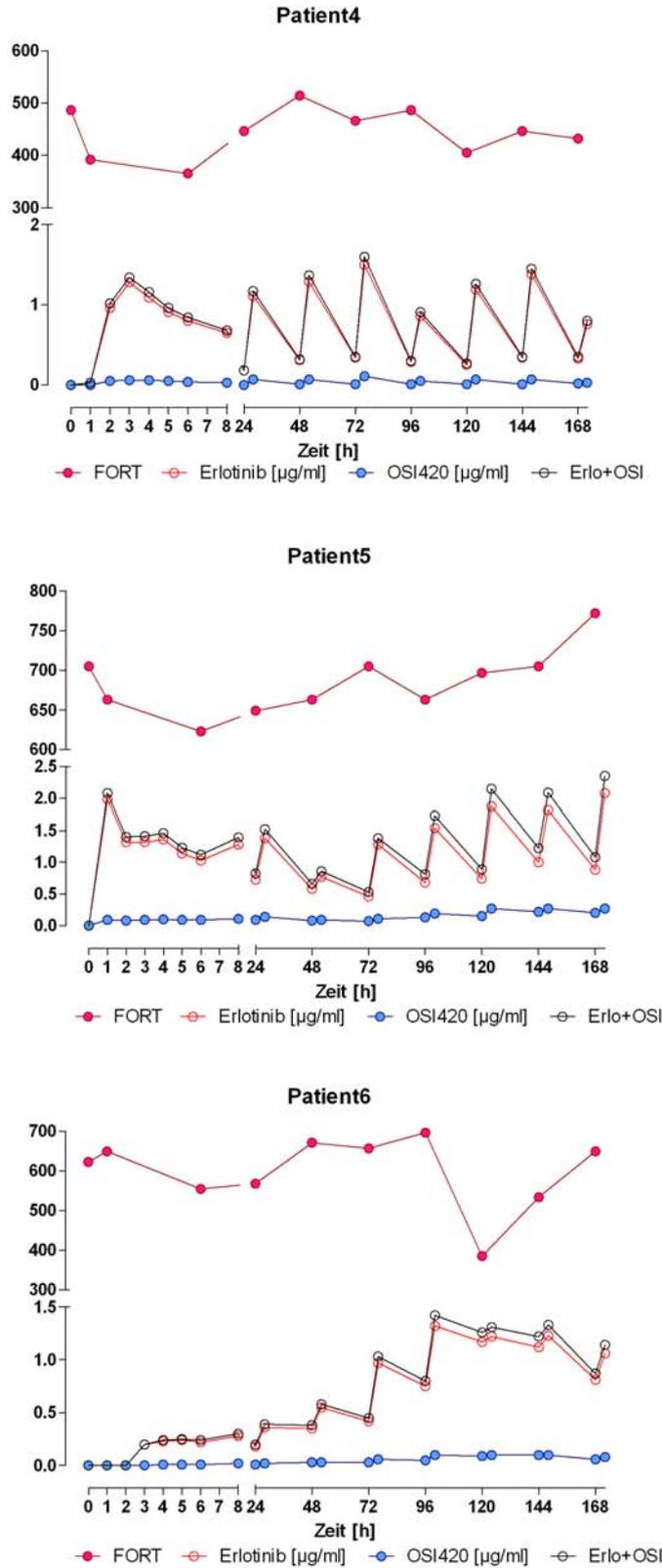


Abbildung 27: Diagramm der Patienten 4 bis 6

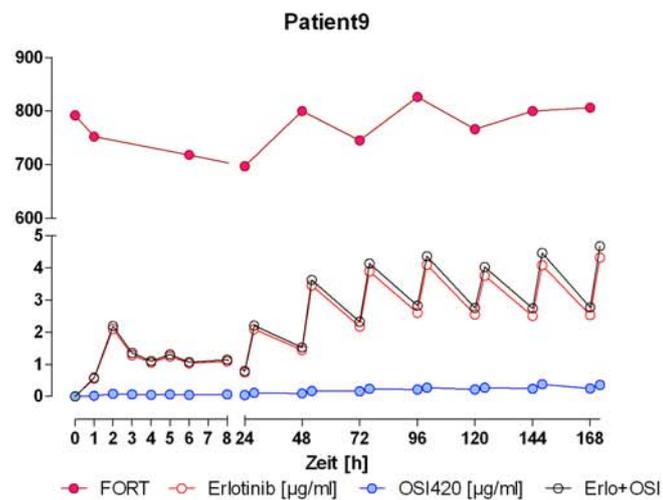
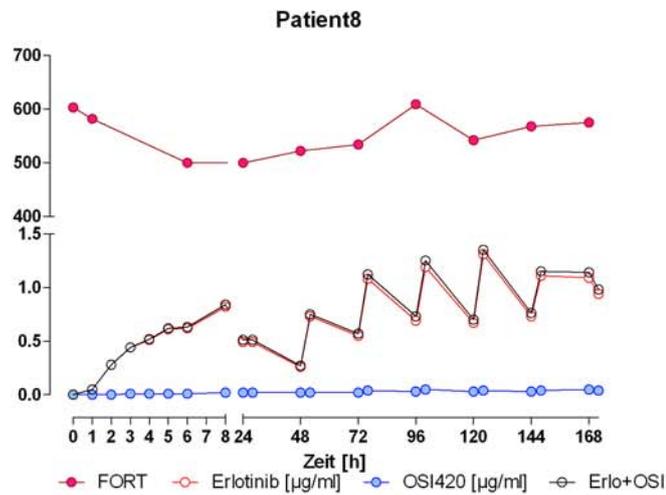
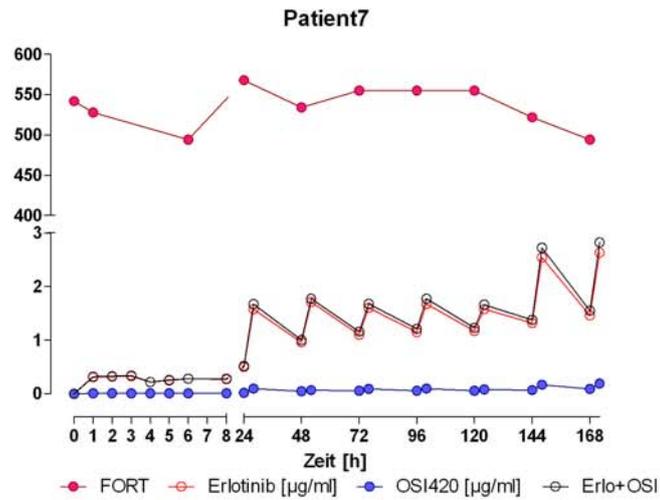


Abbildung 28: Diagramm der Patienten 7 bis 9

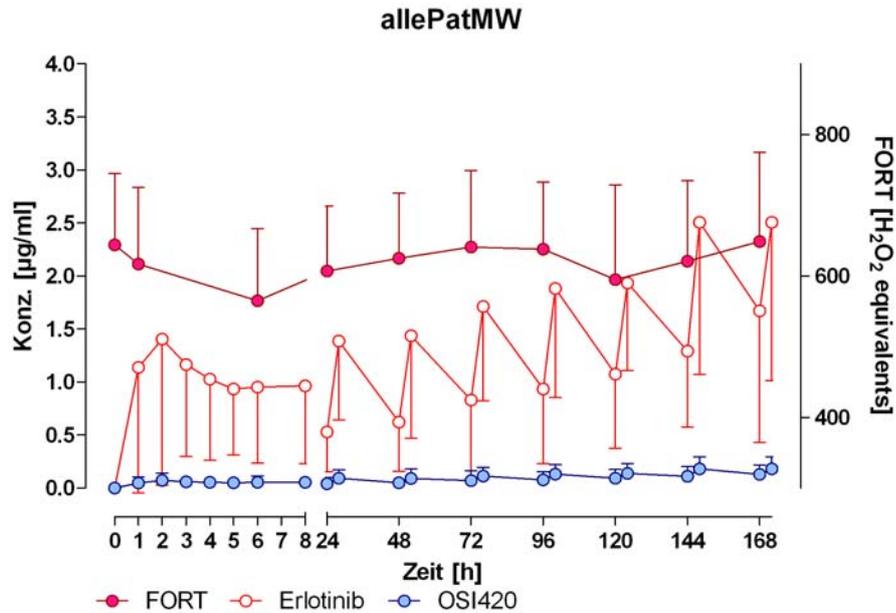


Abbildung 29: Mittelwerte aller Patienten der Konzentrationsverläufe von Erlotinib, OSI und FORT

In diesem Graphen ist der Konzentrationsanstieg von Erlotinib gut zu sehen, der zu Beginn stark ansteigt aber dann wie der FORT-Wert ungefähr 6 Stunden nach der Medikamentengabe wieder abfällt.

In den folgenden Diagrammen sind für jeden Patienten einzeln alle FORT-Werte gegen die zugehörigen Konzentrationen von Erlotinib und dem Metaboliten OSI aufgetragen. Anschließend wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die Korrelation zwischen den Werten von 0 bis 24 Stunden wurde separat von den Werten von 24 bis 168 Stunden analysiert.

6.2.1. Patient 1

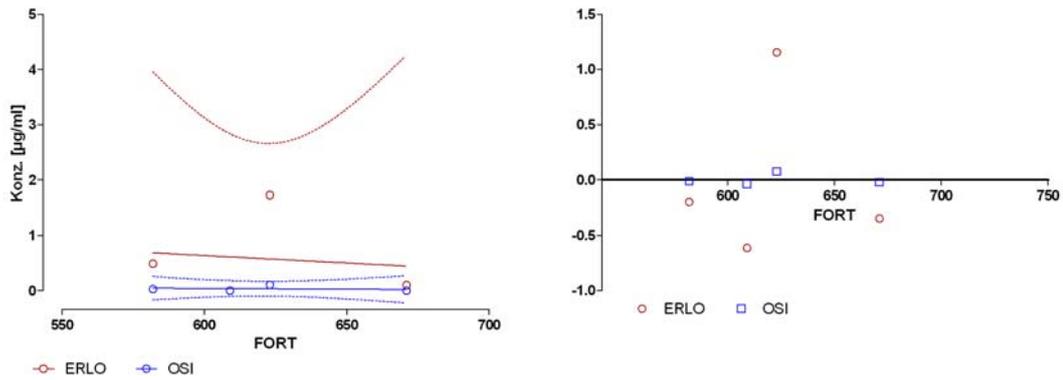


Abbildung 30: Regressionsanalyse Patient 1 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$-0.002694 \pm 0.01496$	$-0.0002363 \pm 0.0009714$
Y-intercept when X=0.0	$2.254 \pm 9.309$	$0.1818 \pm 0.6043$
X-intercept when Y=0.0	836,6	769,4
1/slope	-371,2	-4232
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.06709 to 0.06170	-0.004416 to 0.003944
Y-intercept when X=0.0	-37.80 to 42.31	-2.418 to 2.782
X-intercept when Y=0.0	-infinity to	-infinity to
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,01594	0,02873
Sy.x	0,9662	0,06272

Tabelle 12: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 1 0-24h

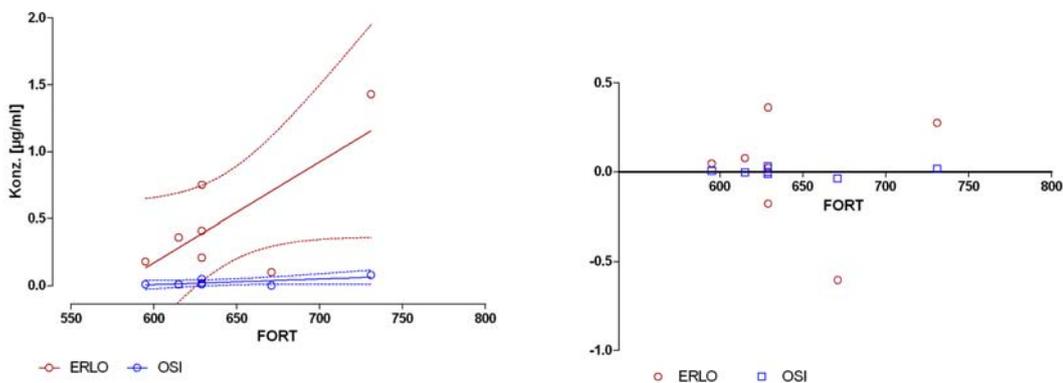


Abbildung 31: Regressionsanalyse Patient 1 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	0.007516 ± 0.003166	0.0004270 ± 0.0002121
Y-intercept when X=0.0	-4.339 ± 2.039	-0.2488 ± 0.1366
X-intercept when Y=0.0	577,3	582,5
1/slope	133,0	2342
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.0006241 to 0.01566	-0.0001184 to 0.0009725
Y-intercept when X=0.0	-9.582 to 0.9036	-0.6000 to 0.1025
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 626.0	-infinity to 636.4
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,5299	0,4477
Sy.x	0,3498	0,02343

Tabelle 13: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 1 24-168h

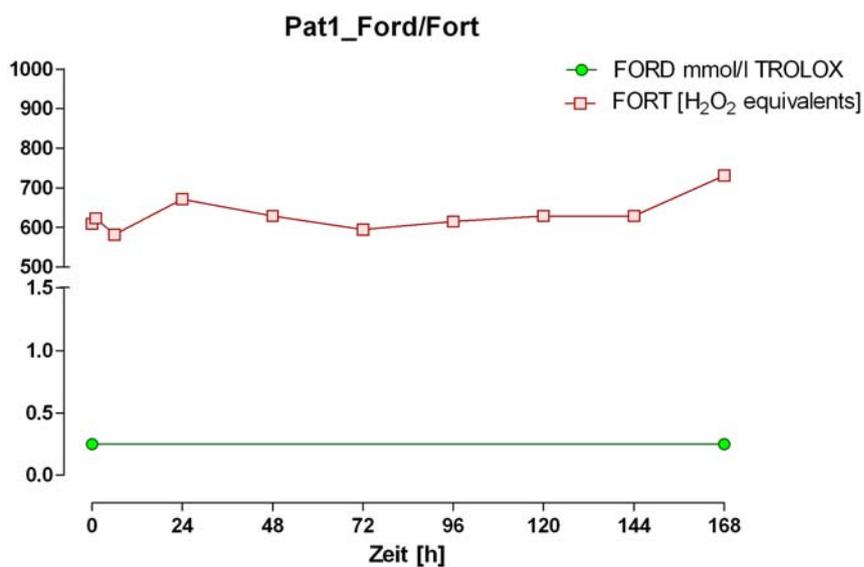


Abbildung 32: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 1

6.2.2. Patient 2

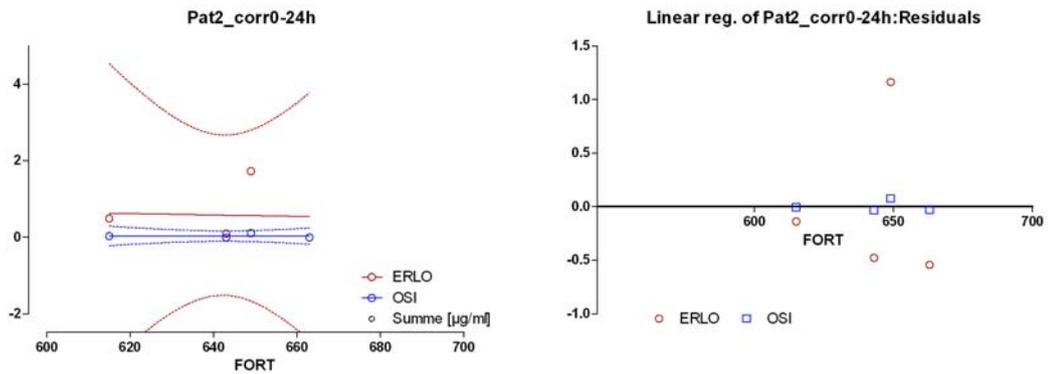


Abbildung 33: Regressionsanalyse Patient 2 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$-0.001788 \pm 0.02787$	$-0.00009024 \pm 0.001822$
Y-intercept when X=0.0	$1.729 \pm 17.91$	$0.09298 \pm 1.171$
X-intercept when Y=0.0	966,8	1030
1/slope	-559,2	-11080
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.1217 to 0.1181	-0.007929 to 0.007748
Y-intercept when X=0.0	-75.35 to 78.81	-4.945 to 5.131
X-intercept when Y=0.0	-infinity to	-infinity to
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,002055	0,001225
Sy.x	0,9730	0,06360

Tabelle 14: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 2 0-24h

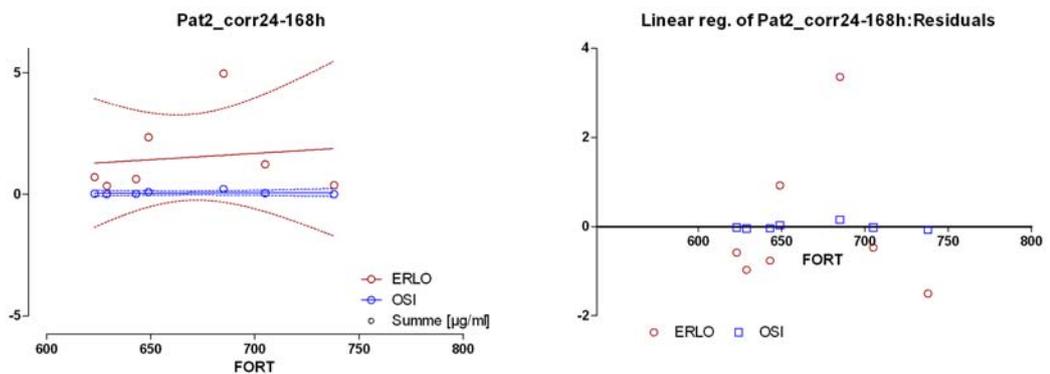


Abbildung 34: Regressionsanalyse Patient 2 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	0.005145 ± 0.01725	0.0002332 ± 0.0007771
Y-intercept when X=0.0	-1.915 ± 11.53	-0.09422 ± 0.5196
X-intercept when Y=0.0	372,3	404,0
1/slope	194,4	4288
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.03920 to 0.04949	-0.001765 to 0.002231
Y-intercept when X=0.0	-31.57 to 27.73	-1.430 to 1.242
X-intercept when Y=0.0	-infinity to	-infinity to
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,01748	0,01769
Sy.x	1,816	0,08183

Tabelle 15: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 2 24-168h

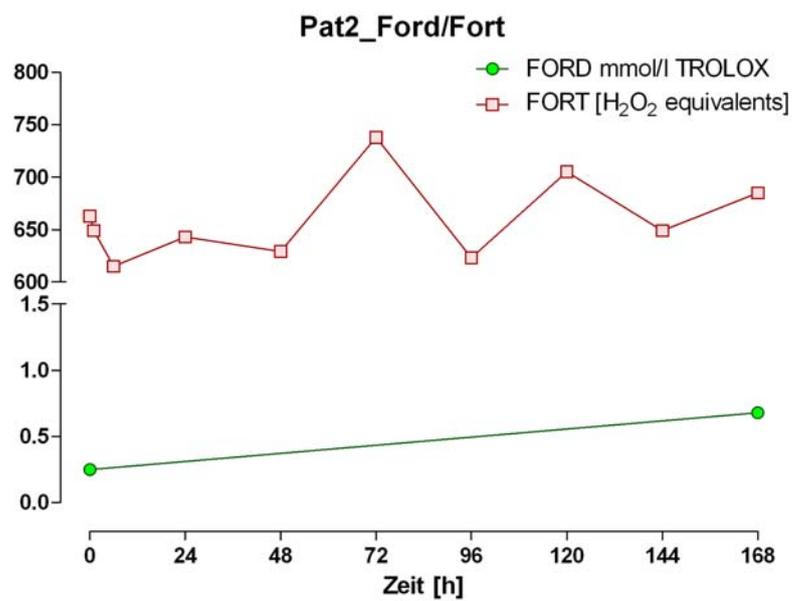


Abbildung 35: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 2

### 6.2.3. Patient 3

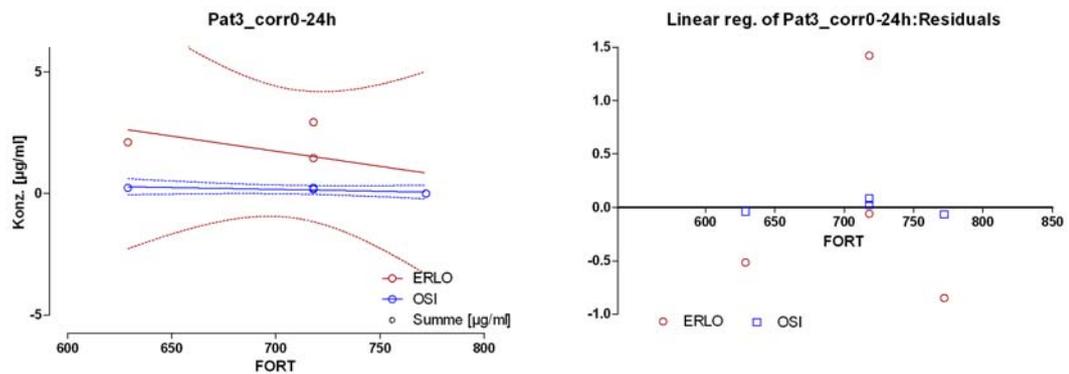


Abbildung 36: Regressionsanalyse Patient 3 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$-0.01242 \pm 0.01195$	$-0.001497 \pm 0.0007981$
Y-intercept when X=0.0	$10.44 \pm 8.497$	$1.221 \pm 0.5675$
X-intercept when Y=0.0	840,3	816,2
1/slope	-80,49	-668,2
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.06384 to 0.03899	-0.004931 to 0.001937
Y-intercept when X=0.0	-26.12 to 47.00	-1.221 to 3.663
X-intercept when Y=0.0	-infinity to	691.8 to +infinity
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,3509	0,6375
Sy.x	1,226	0,08190

Tabelle 16: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 3 0-24h

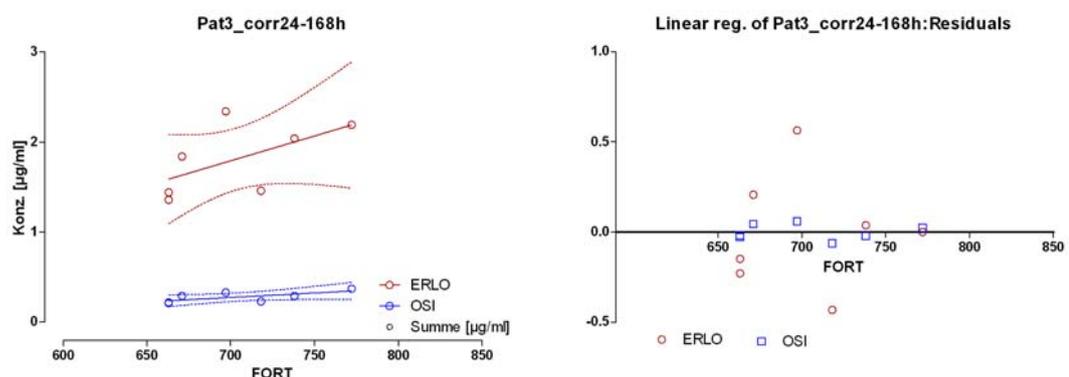


Abbildung 37: Regressionsanalyse Patient 3 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	0.005509 ± 0.003450	0.0009926 ± 0.0004672
Y-intercept when X=0.0	-2.063 ± 2.430	-0.4208 ± 0.3290
X-intercept when Y=0.0	374,6	423,9
1/slope	181,5	1008
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.003362 to 0.01438	-0.0002086 to 0.002194
Y-intercept when X=0.0	-8.310 to 4.184	-1.267 to 0.4251
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 581.0	-infinity to 580.1
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,3377	0,4744
Sy.x	0,3531	0,04781

Tabelle 17: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 3 24-168h

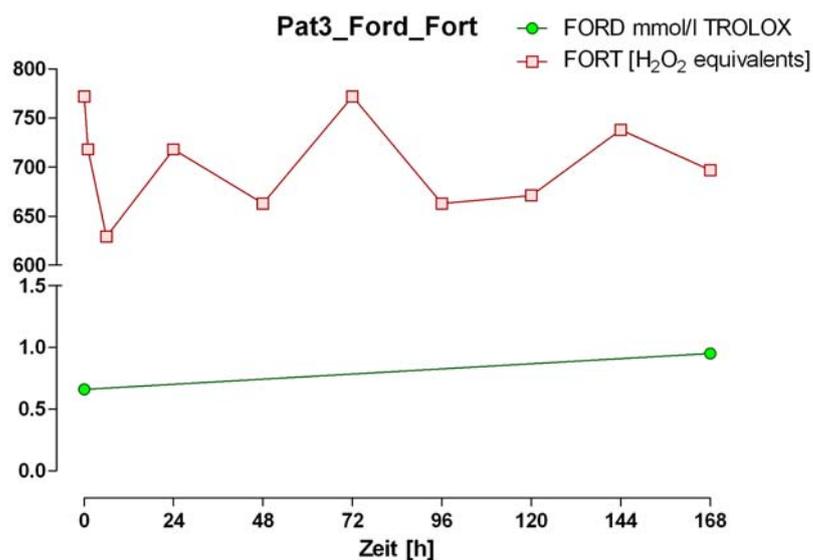


Abbildung 38: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 3

6.2.4. Patient 4

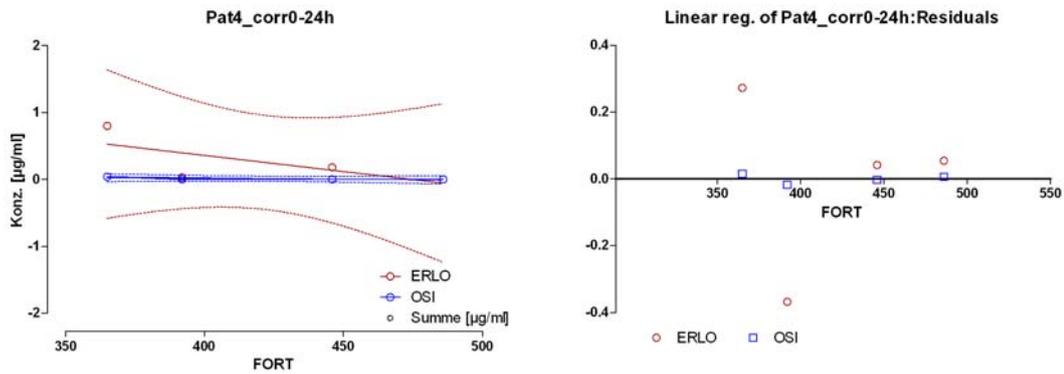


Abbildung 39: Regressionsanalyse Patient 4 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$-0.004811 \pm 0.003484$	$-0.0002596 \pm 0.0001853$
Y-intercept when X=0.0	$2.284 \pm 1.480$	$0.1196 \pm 0.07871$
X-intercept when Y=0.0	474,7	460,8
1/slope	-207,9	-3852
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.01980 to 0.01018	-0.001057 to 0.0005376
Y-intercept when X=0.0	-4.086 to 8.653	-0.2191 to 0.4583
X-intercept when Y=0.0	-infinity to	-infinity to
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,4880	0,4954
Sy.x	0,3272	0,01740

Tabelle 18: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 4 0-24h

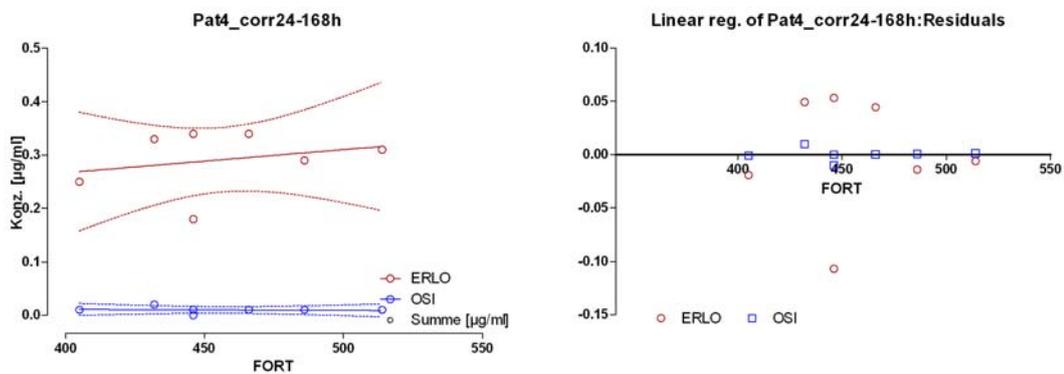


Abbildung 40: Regressionsanalyse Patient 4 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	0.0004310 ± 0.0007053	-0.00001809 ± 0.00007143
Y-intercept when X=0.0	0.09471 ± 0.3228	0.01826 ± 0.03269
X-intercept when Y=0.0	-219,8	1009
1/slope	2320	-55280
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.001382 to 0.002244	-0.0002017 to 0.0001656
Y-intercept when X=0.0	-0.7351 to 0.9245	-0.06579 to 0.1023
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 330.0	494.7 to +infinity
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,06950	0,01266
Sy.x	0,06205	0,006284

Tabelle 19: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 4 24-168h

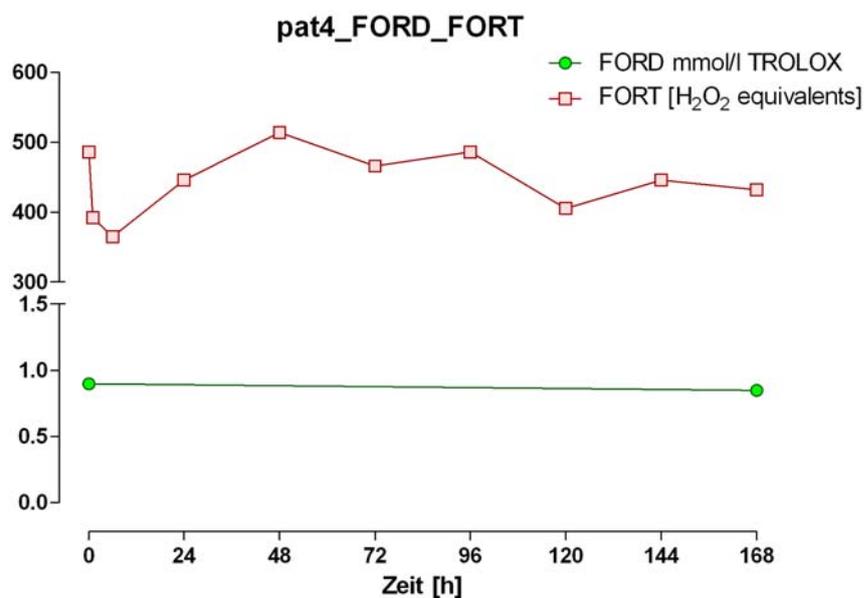


Abbildung 41: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 4

6.2.5. Patient 5

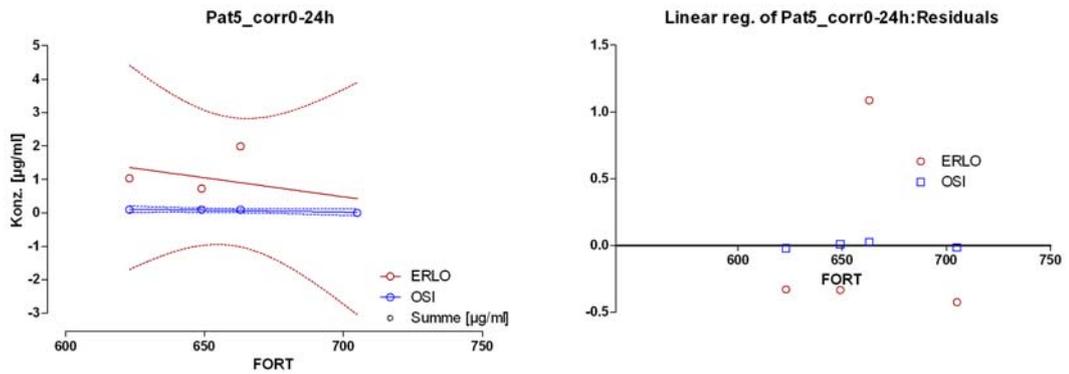


Abbildung 42: Regressionsanalyse Patient 5 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$-0.01140 \pm 0.01497$	$-0.001149 \pm 0.0004489$
Y-intercept when X=0.0	$8.461 \pm 9.893$	$0.8260 \pm 0.2966$
X-intercept when Y=0.0	742,2	718,7
1/slope	-87,73	-870,1
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.07583 to 0.05304	-0.003081 to 0.0007825
Y-intercept when X=0.0	-34.11 to 51.03	-0.4502 to 2.102
X-intercept when Y=0.0	-infinity to	667.3 to +infinity
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,2246	0,7662
Sy.x	0,8889	0,02665

Tabelle 20: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 5 0-24h

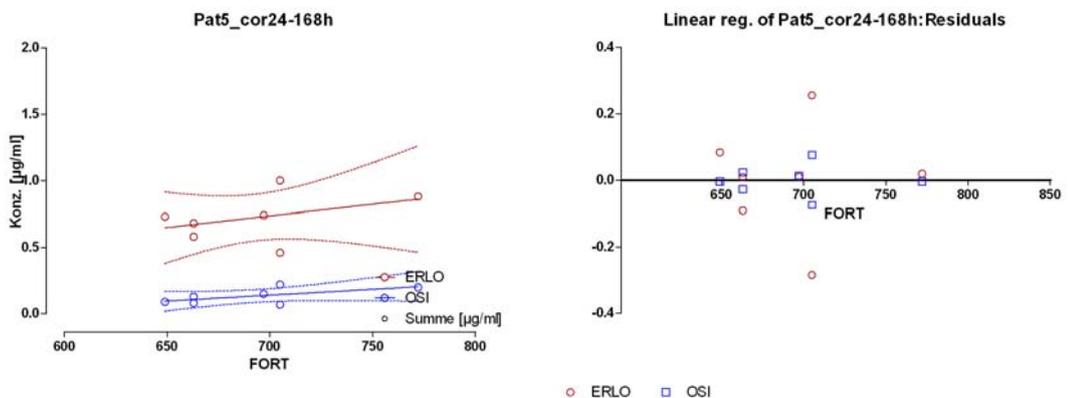


Abbildung 43: Regressionsanalyse Patient 5 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	0.001742 ± 0.001775	0.0008966 ± 0.0004972
Y-intercept when X=0.0	-0.4837 ± 1.233	-0.4875 ± 0.3453
X-intercept when Y=0.0	277,6	543,7
1/slope	574,1	1115
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.002822 to 0.006306	-0.0003817 to 0.002175
Y-intercept when X=0.0	-3.653 to 2.686	-1.375 to 0.4003
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 583.3	-infinity to 638.8
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,1615	0,3941
Sy.x	0,1800	0,05041

Tabelle 21: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 5 24-168h

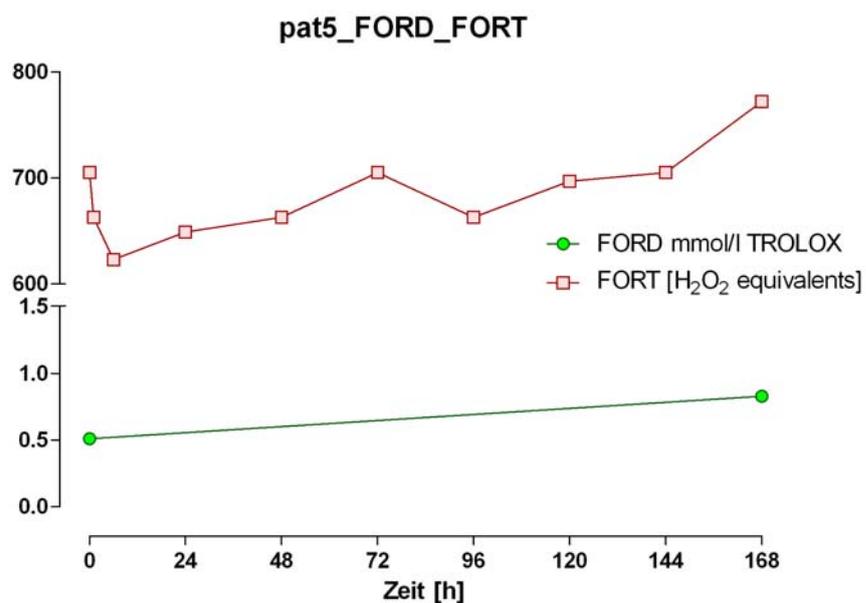


Abbildung 44: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 5

### 6.2.6. Patient 6

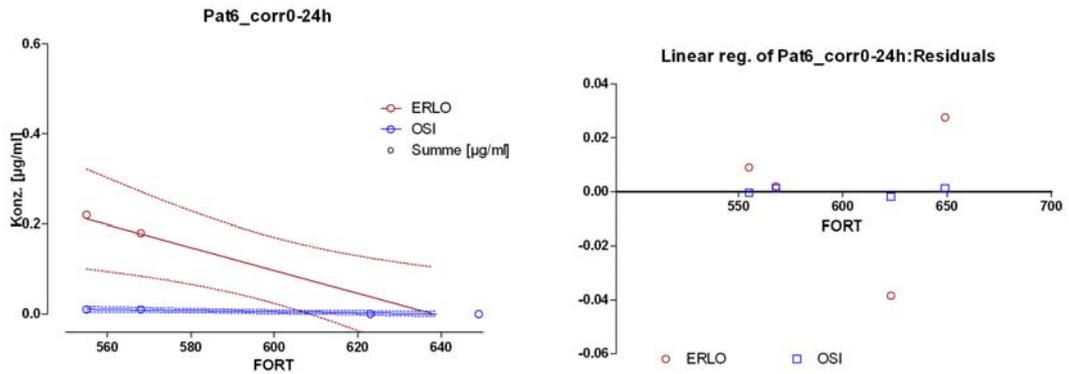


Abbildung 45: Regressionsanalyse Patient 6 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$-0.002538 \pm 0.0004408$	$-0.0001247 \pm 0.00002433$
Y-intercept when X=0.0	$1.620 \pm 0.2645$	$0.07968 \pm 0.01460$
X-intercept when Y=0.0	638,1	638,8
1/slope	-394,0	-8017
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.004435 to -0.0006415	-0.0002294 to -0.00002002
Y-intercept when X=0.0	0.4817 to 2.758	0.01686 to 0.1425
X-intercept when Y=0.0	608.4 to 767.6	605.9 to 863.2
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,9431	0,9293
Sy.x	0,03407	0,001881

Tabelle 22: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 6 0-24h

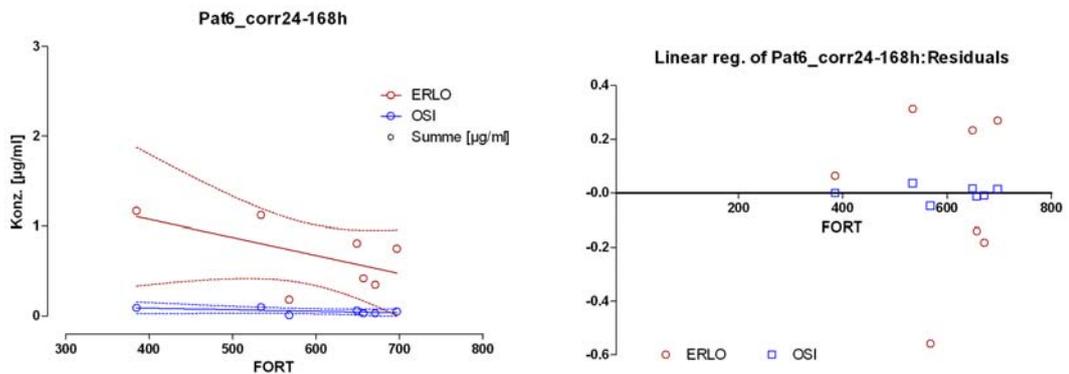


Abbildung 46: Regressionsanalyse Patient 6 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	-0.002004 ± 0.001290	-0.0001760 ± 0.0001101
Y-intercept when X=0.0	1.877 ± 0.7777	0.1574 ± 0.06636
X-intercept when Y=0.0	936,6	894,8
1/slope	-499,0	-5683
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.005320 to 0.001312	-0.0004589 to 0.0001070
Y-intercept when X=0.0	-0.1226 to 3.876	-0.01316 to 0.3281
X-intercept when Y=0.0	697.6 to +infinity	680.9 to +infinity
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,3256	0,3383
Sy.x	0,3449	0,02943

Tabelle 23: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 6 24-168h

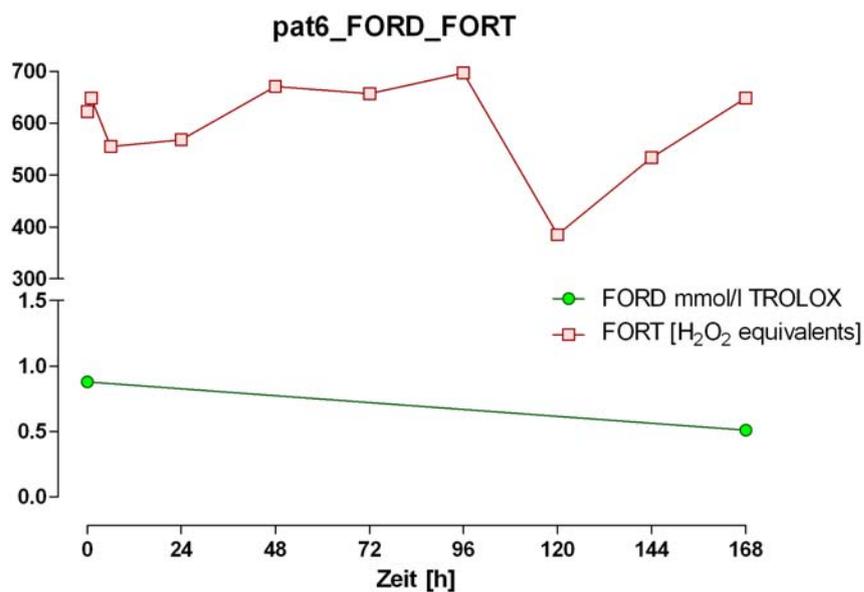


Abbildung 47: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 6

6.2.7. Patient 7

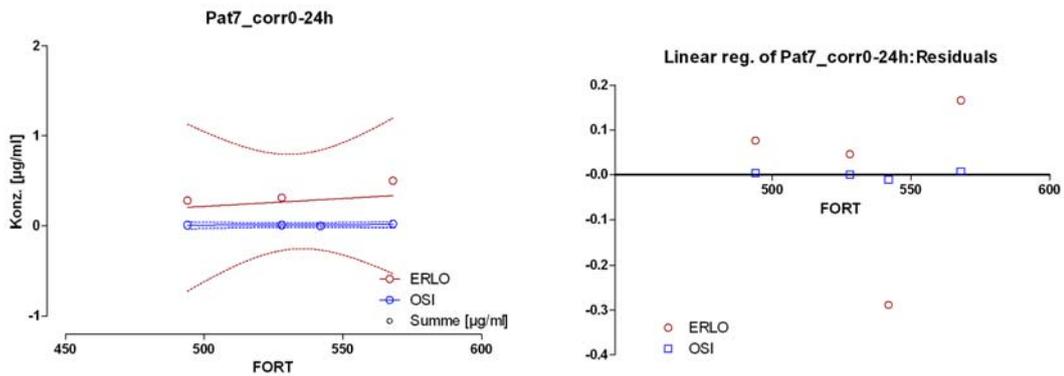


Abbildung 48: Regressionsanalyse Patient 7 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$0.001764 \pm 0.004560$	$0.00009116 \pm 0.0001758$
Y-intercept when X=0.0	$-0.6675 \pm 2.433$	$-0.03859 \pm 0.09382$
X-intercept when Y=0.0	378,5	423,3
1/slope	567,0	10970
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.01786 to 0.02139	-0.0006653 to 0.0008477
Y-intercept when X=0.0	-11.14 to 9.804	-0.4423 to 0.3651
X-intercept when Y=0.0	-infinity to	-infinity to
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,06959	0,1185
Sy.x	0,2435	0,009389

Tabelle 24f: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 7 0-24h

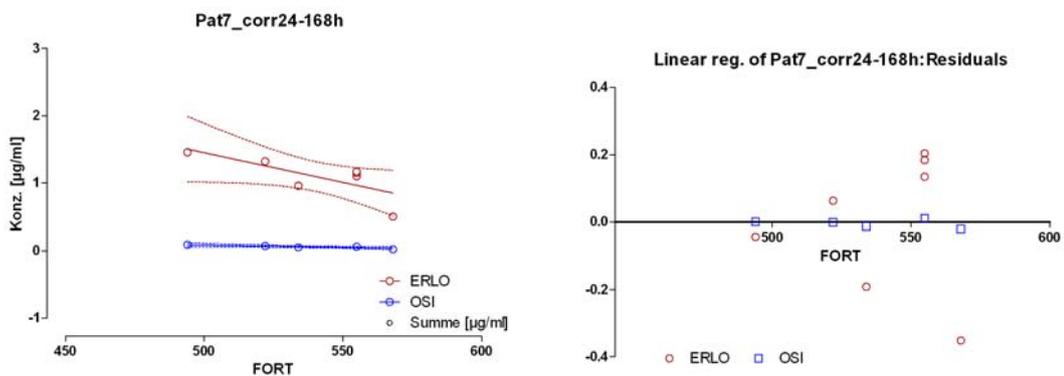


Abbildung 49: Regressionsanalyse Patient 7 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	-0.008812 ± 0.003631	-0.0006649 ± 0.0002194
Y-intercept when X=0.0	5.856 ± 1.964	0.4179 ± 0.1187
X-intercept when Y=0.0	664,6	628,5
1/slope	-113,5	-1504
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.01815 to 0.0005239	-0.001229 to -0.0001010
Y-intercept when X=0.0	0.8063 to 10.91	0.1129 to 0.7230
X-intercept when Y=0.0	598.3 to +infinity	585.4 to 1123
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,5408	0,6476
Sy.x	0,2277	0,01376

Tabelle 25: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 7 24-168h

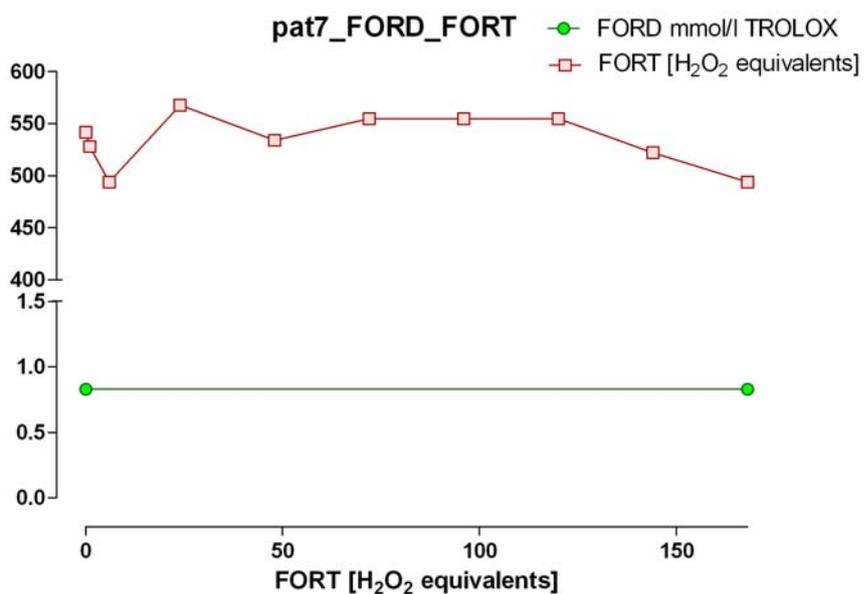


Abbildung 50: Kurvendiagramm FORD/FORT

6.2.8. Patient 8

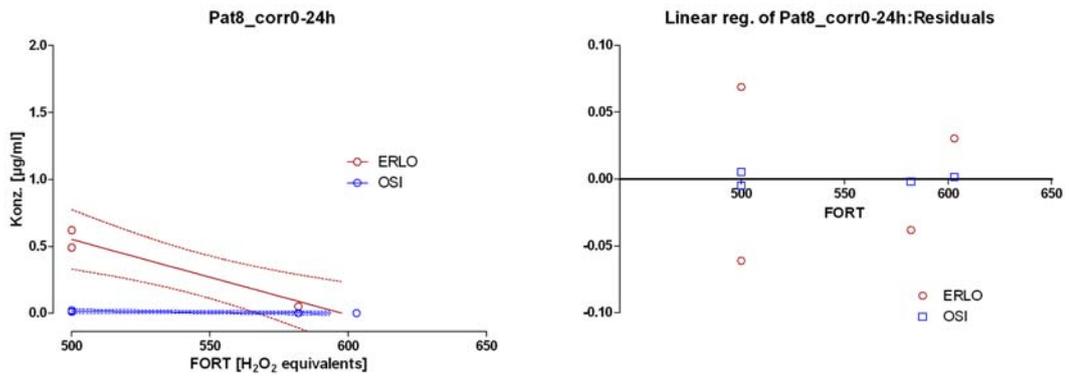


Abbildung 51: Regressionsanalyse Patient 8 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$-0.005646 \pm 0.0007866$	$-0.0001581 \pm 0.00005631$
Y-intercept when X=0.0	$3.374 \pm 0.4312$	$0.09386 \pm 0.03087$
X-intercept when Y=0.0	597,6	593,7
1/slope	-177,1	-6326
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.009030 to -0.002261	-0.0004004 to 0.00008420
Y-intercept when X=0.0	1.518 to 5.230	-0.03898 to 0.2267
X-intercept when Y=0.0	566.9 to 686.0	-infinity to
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,9626	0,7976
Sy.x	0,07369	0,005275

Tabelle 26: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 8 0-24h

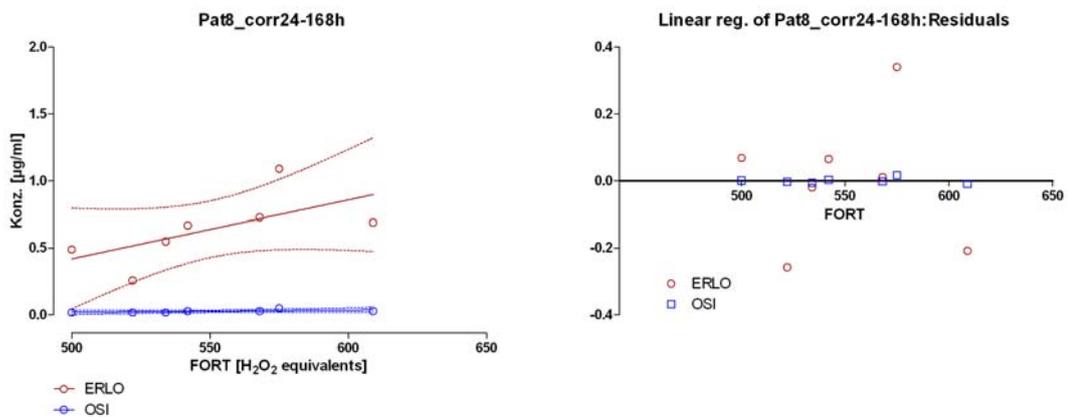


Abbildung 52: Regressionsanalyse Patient 8 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	0.004376 ± 0.002419	0.0001792 ± 0.0001032
Y-intercept when X=0.0	-1.767 ± 1.333	-0.07001 ± 0.05685
X-intercept when Y=0.0	403,8	390,6
1/slope	228,5	5579
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.001844 to 0.01060	-0.00008602 to 0.0004445
Y-intercept when X=0.0	-5.195 to 1.661	-0.2162 to 0.07616
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 495.3	-infinity to 491.1
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,3956	0,3764
Sy.x	0,2169	0,009248

Tabelle 27: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 8 24-168h

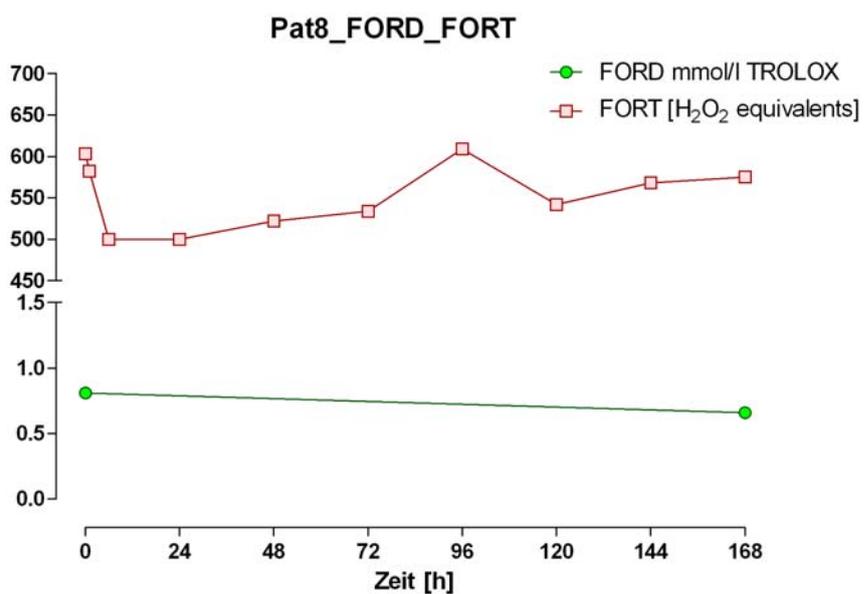


Abbildung 53: Kurvendiagramm FORT/FORD Patient 8

6.2.9. Patient 9

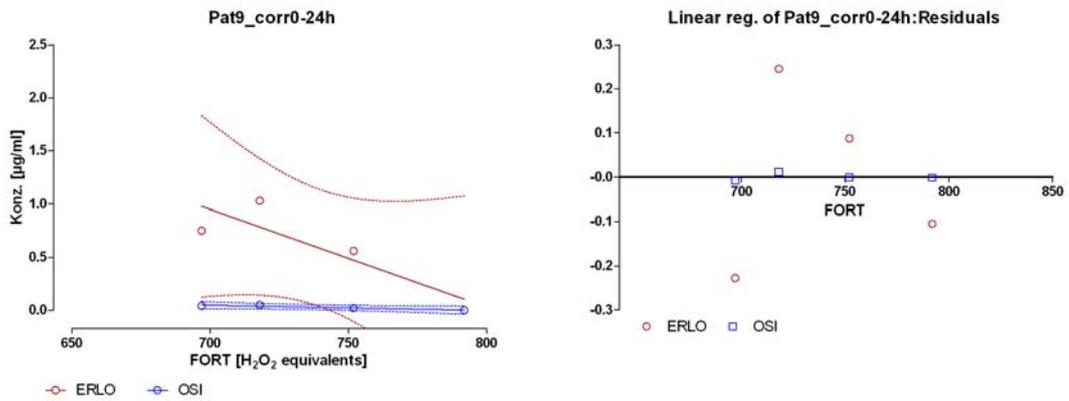


Abbildung 54: Regressionsanalyse Patient 9 0-24h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	$-0.009189 \pm 0.003551$	$-0.0004927 \pm 0.0001449$
Y-intercept when X=0.0	$7.382 \pm 2.630$	$0.3920 \pm 0.1073$
X-intercept when Y=0.0	803,4	795,6
1/slope	-108,8	-2030
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.02447 to 0.006092	-0.001116 to 0.0001306
Y-intercept when X=0.0	-3.935 to 18.70	-0.06967 to 0.8536
X-intercept when Y=0.0	743.3 to +infinity	748.7 to +infinity
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,7700	0,8526
Sy.x	0,2556	0,01043

Tabelle 28: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 9 0-24h

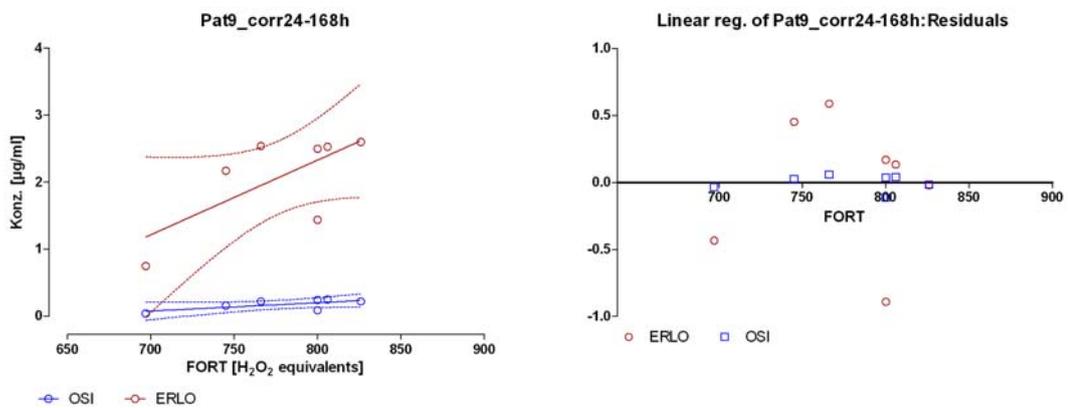


Abbildung 55: Regressionsanalyse Patient 9 24-168h

	ERLO	OSI
Best-fit values		
Slope	0.01114 ± 0.005162	0.001242 ± 0.0005999
Y-intercept when X=0.0	-6.581 ± 4.017	-0.7906 ± 0.4669
X-intercept when Y=0.0	590,8	636,8
1/slope	89,78	805,5
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.002132 to 0.02441	-0.0003008 to 0.002784
Y-intercept when X=0.0	-16.91 to 3.747	-1.991 to 0.4097
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 697.5	-infinity to 722.1
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,4822	0,4614
Sy.x	0,5618	0,06529

Tabelle 29: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 9 24-168h

In den einzelnen Korrelationsanalysen sind keine linearen Zusammenhänge zwischen dem oxidativen Stress und der Erlotinib-Konzentration ersichtlich. Das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) bei allen Patienten sehr gering und das Konfidenzintervall sehr breit.

Bezieht man nun auch noch die antioxidative Kapazität mit ein, die den Status des Patienten widerspiegelt (vergleiche Kapitel Freie Radikale und Tumorerkrankungen), so sieht man, dass sie bei einigen Patienten sogar ansteigt. Vermutlich ist aber die Instabilität der Antioxidantien in den Proben dafür verantwortlich.

### 6.2.10. Korrelation aller Patienten

Im Folgenden werden die FORT-Werte aller Patienten mit den jeweiligen Konzentrationen an Erlotinib in  $\mu\text{g/ml}$  verglichen. Um die Übersicht zu wahren wurde hier nur die Erlotinib-Konzentration betrachtet. Vorerst wurden die Werte von 0-24h und die von 24-168h wieder gesondert dargestellt und berechnet.

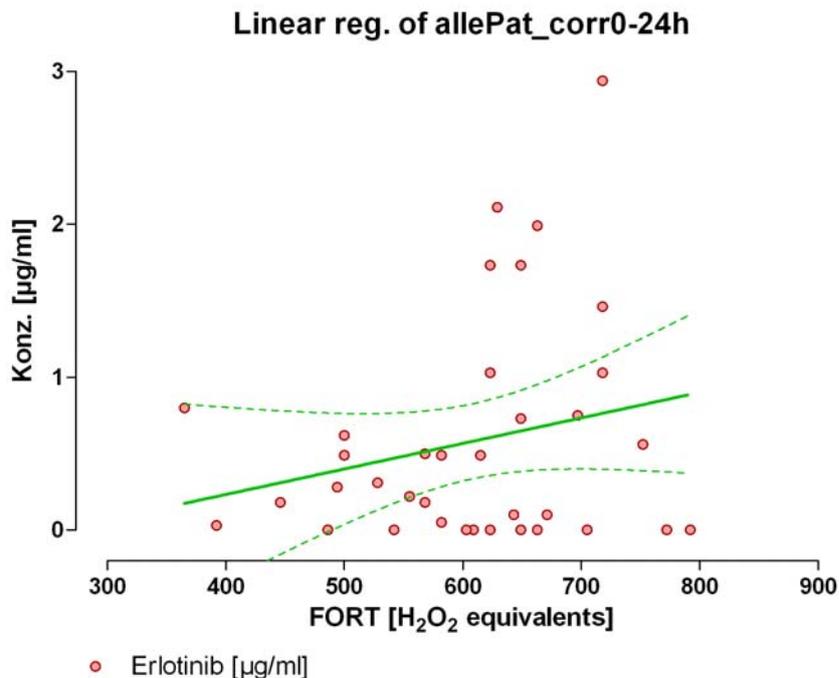


Abbildung 56: Regressionsanalyse aller Patienten 0-24h

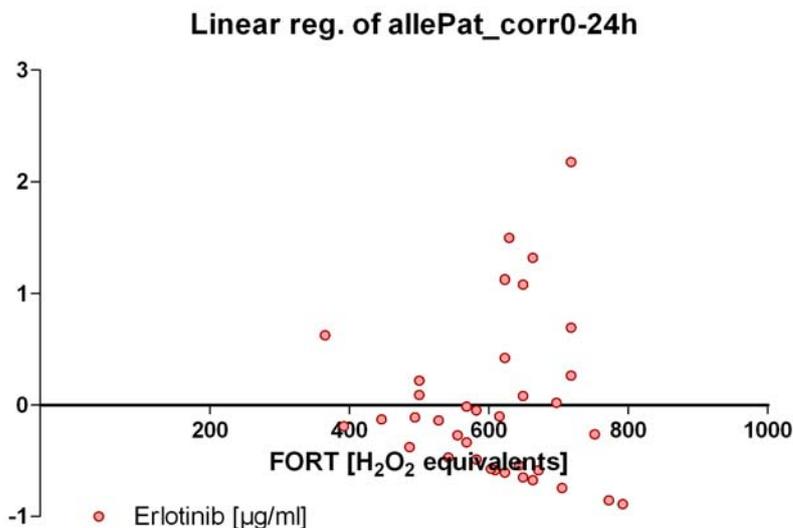


Abbildung 57: Lineare Regression aller Patienten 0-24h

	<b>ERLO</b>
Best-fit values	
Slope	0.001673 ± 0.001219
Y-intercept when X=0.0	-0.4369 ± 0.7512
X-intercept when Y=0.0	261,1
1/slope	597,7
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.0008063 to 0.004153
Y-intercept when X=0.0	-1.965 to 1.091
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 489.8
Goodness of Fit	
r <sup>2</sup>	0,05248
Sy.x	0,7253
Is slope significantly non-zero?	
F	1,883
DFn, DFd	1.000, 34.00
P value	0,1790
Deviation from zero?	Not Significant

Tabelle 30: Statistische Parameter der Regressionsanalyse aller Patienten 0-24h

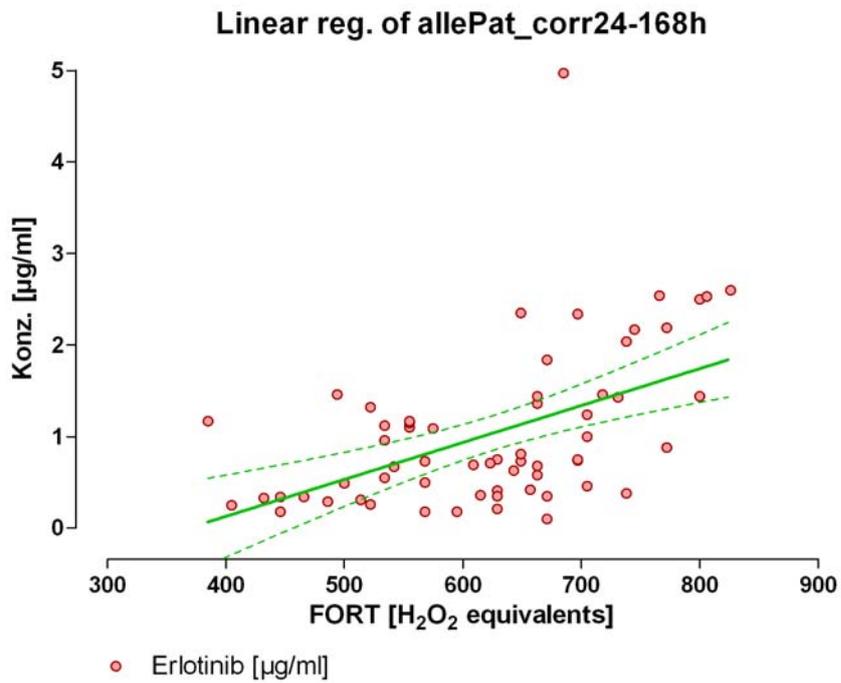


Abbildung 58: Regressionsanalyse aller Patienten 24-168h

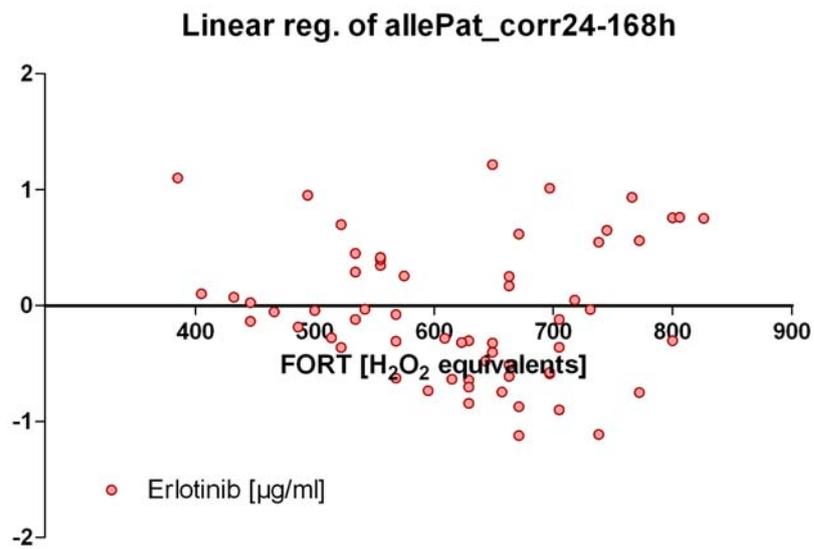


Abbildung 59: Lineare Regression aller Patienten 24-168h

	ERLO
Best-fit values	
Slope	0.004034 ± 0.0009069
Y-intercept when X=0.0	-1.485 ± 0.5748
X-intercept when Y=0.0	368,0
1/slope	247,9
95% Confidence Intervals	
Slope	0.002221 to 0.005848
Y-intercept when X=0.0	-2.634 to -0.3352
X-intercept when Y=0.0	148.8 to 457.0
Goodness of Fit	
r <sup>2</sup>	0,2449
Sy.x	0,7557
Is slope significantly non-zero?	
F	19,79
DFn, DFd	1.000, 61.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant

Tabelle 31: Statistische Parameter der Regressionsanalyse aller Patienten 24-168h

Führt man eine lineare Regressionsanalyse durch, so erkennt man, dass bei zunehmender Erlotinib-Konzentration im Plasma die FORT-Werte steigen. Um den Zusammenhang zu verdeutlichen wurden die Stresswerte und die Erlotinib-Konzentrationen aller Patienten von 0-168h miteinander korreliert. Betrachtet man alle Messwerte so beträgt der Korrelationskoeffizient 0.42, das Konfidenzintervall ist relativ schmal.

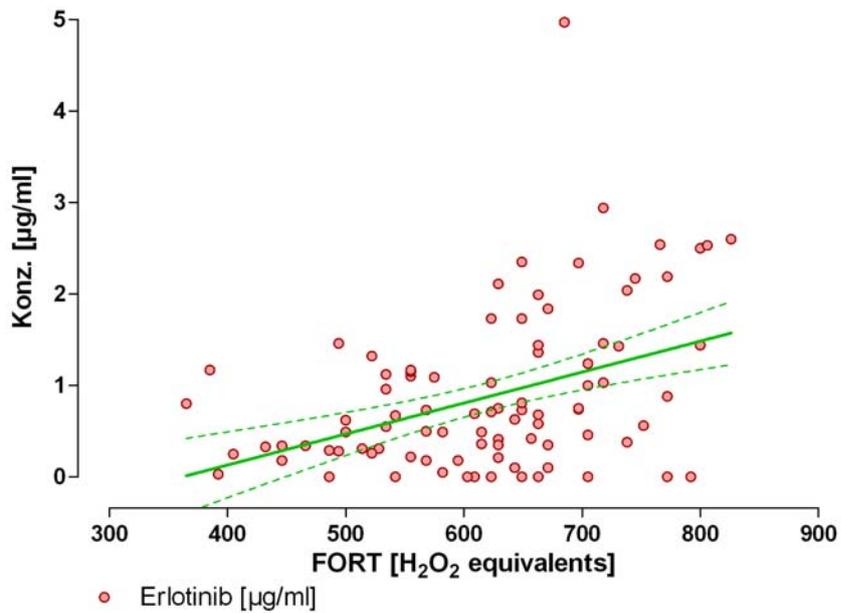


Abbildung 60: Regressionsanalyse aller Patienten 0-168h

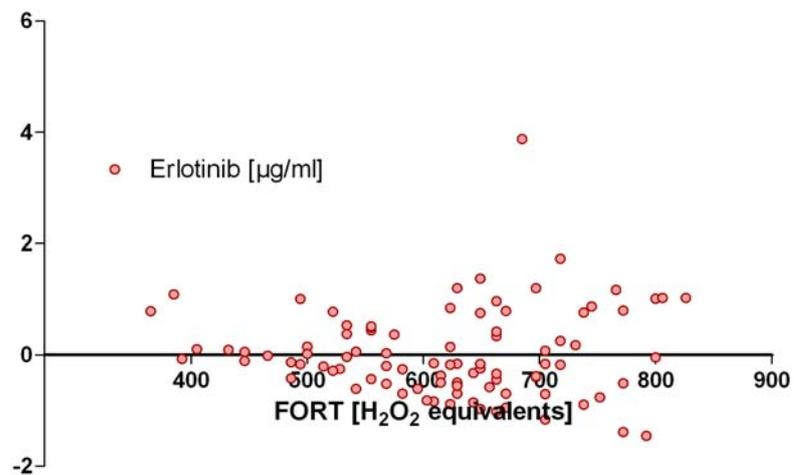


Abbildung 61: Lineare Regression aller Patienten 0-168h

	<b>ERLO</b>
Best-fit values	
Slope	0.003384 ± 0.0007510
Y-intercept when X=0.0	-1.224 ± 0.4712
X-intercept when Y=0.0	361,5
1/slope	295,5
95% Confidence Intervals	
Slope	0.001892 to 0.004877
Y-intercept when X=0.0	-2.160 to -0.2871
X-intercept when Y=0.0	149.7 to 449.2
Goodness of Fit	
r <sup>2</sup>	0,1731
Sy.x	0,7712
Is slope significantly non-zero?	
F	20,31
DFn, DFd	1.000, 97.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant

Tabelle 32: Statistische Parameter der Regressionsanalyse aller Patienten 0-168h

### 6.3. Die antioxidative Kapazität

Patient	FORD T1 0min [mmol/l Trolox]	FORD T8 0 min [mmol/l Trolox]
1	0,25	0,25
2	0,25	0,68
3	0,66	0,95
4	0,9	0,85
5	0,51	0,83
6	0,88	0,51
7	0,83	0,83
8	0,81	0,66

Tabelle 33: Messwerte der antioxidativen Kapazität (FORD)

Die antioxidative Kapazität wurde bei acht der neun Patienten kurz vor der Therapie und acht Tage nach der Therapie gemessen. Hier sind die Daten nicht ganz vollständig, die Messwerte vom Patienten 9 fehlen. Die antioxidativen Kapazität der einzelnen Patienten sind sehr gering. Das Minimum liegt sowohl an T1 also auch T8 bei 0,25 mmol/l Trolox, der unteren Testgrenze des Gerätes, und weit unter dem Referenzbereich (0.70-1.20 mmol/l Trolox). Das Maximum beträgt an T1 0,9 mmol/l Trolox und an T8 0,95 mmol/l Trolox, der Mittelwert beträgt 0,63 mmol/l Trolox (T1) und 0,69 mmol/l Trolox (T8). Die Werte für die antioxidative Kapazität liegen somit im unteren Bereich.

	FORD T1 0min [mmol/l Trolox]	FORD T8 0 min [mmol/l Trolox]
Number of values	8	8
Minimum	0,2500	0,2500
25% Percentile	0,3150	0,5475
Median	0,7350	0,7550
75% Percentile	0,8675	0,8450
Maximum	0,9000	0,9500
Mean	0,6363	0,6950
Std. Deviation	0,2703	0,2265
Std. Error	0,09558	0,08009
Lower 95% CI of mean	0,4102	0,5056
Upper 95% CI of mean	0,8623	0,8844
Sum	5,090	5,560

Tabelle 34: Deskriptive Statistik der FORD-Werte der Patienten vor der Therapie (T1) und acht Tage nach der Therapie (T8)

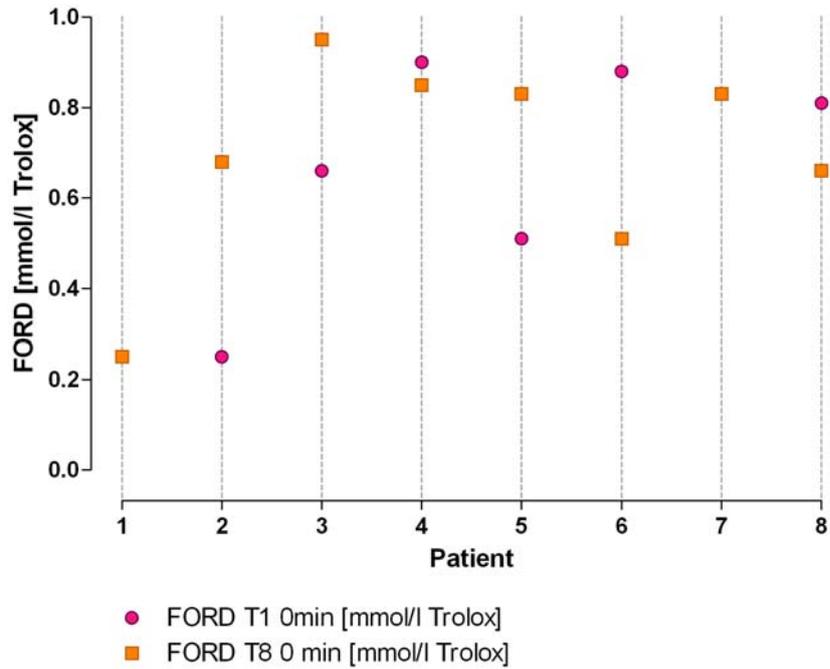


Abbildung 62: FORD-Werte der einzelnen Patienten

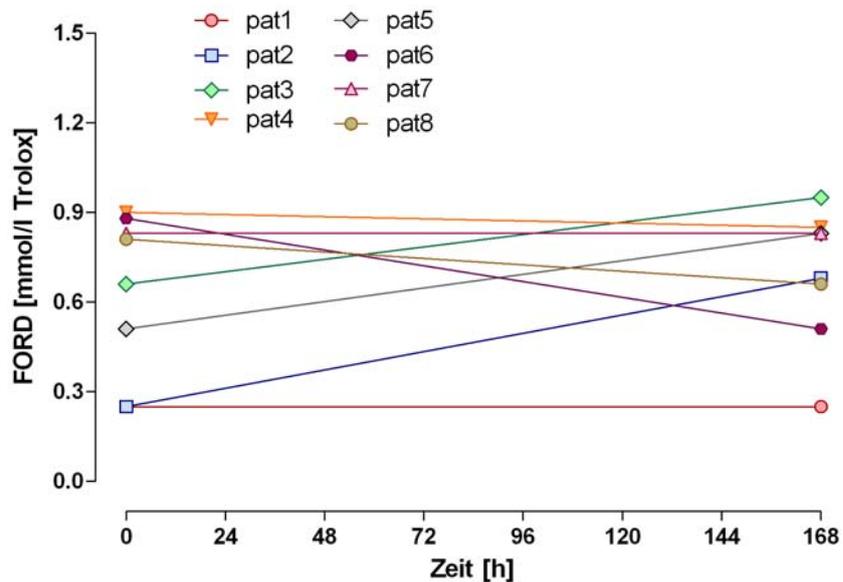


Abbildung 63: FORD [mmol/l Trolox] aller Patienten

In Abbildung 63: FORD [mmol/l Trolox] aller Patienten sind die Verläufe der antioxidativen Kapazität der einzelnen Patienten dargestellt. Um die Richtung der Entwicklung besser sehen zu können wurde ein Diagramm mit den Mittelwerten erstellt, siehe Abbildung 64. In diesem ist klar ersichtlich, dass der FORD-Mittelwert im

Verlauf der Therapie stark abfällt. Dieser Abfall kann mit Sicherheit mit der Instabilität der Antioxidantien im Blutplasma erklärt werden. Vor allem die lange Lagerung, die den FORT-Wert nicht beeinflusst, führt zum Abbau der antioxidativen Bestandteile im Plasma.

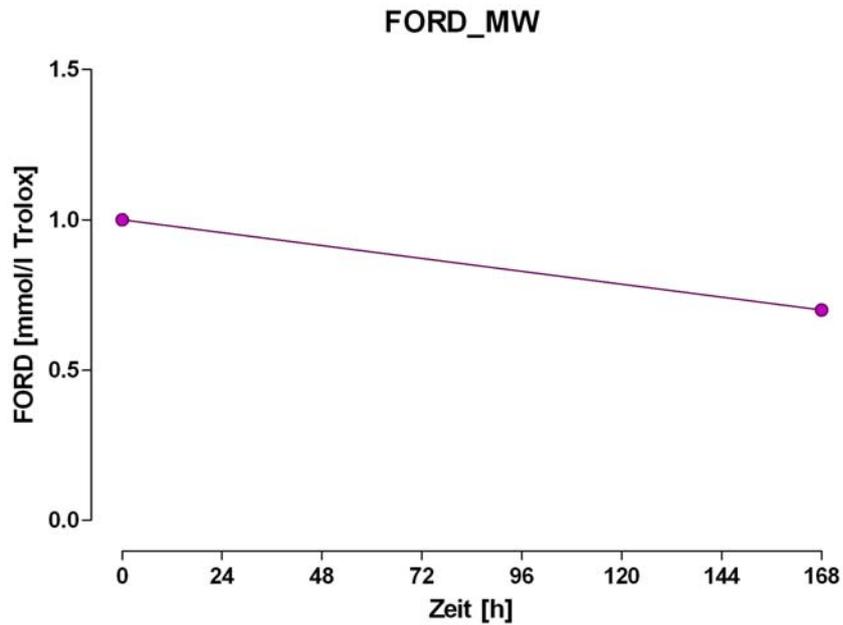


Abbildung 64: FORD-Mittelwert aller Patienten

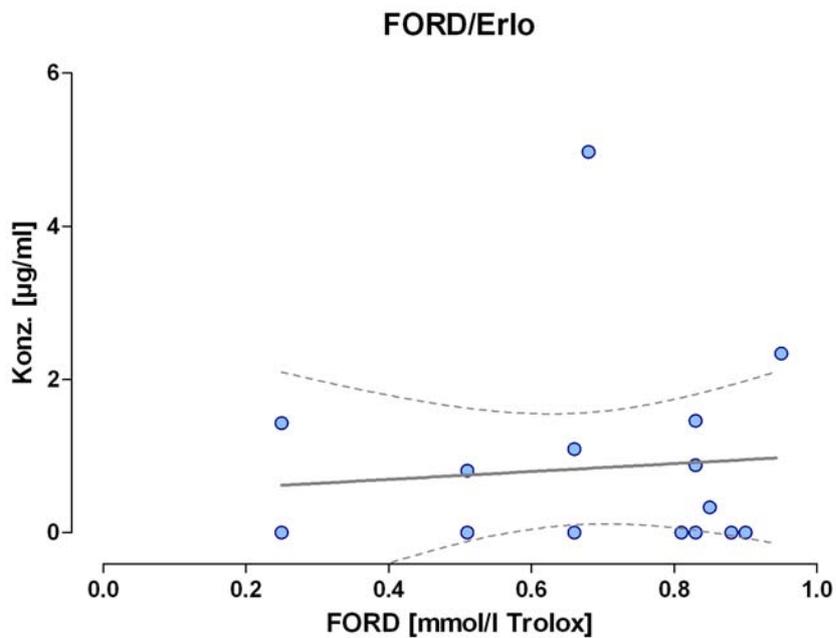


Abbildung 65: Lineare Regression der FORD-Werte mit der entsprechenden Erlotinib-Konzentration

Führt man anschließend eine lineare Regression durch, bei der jedem FORD-Wert die entsprechende Erlotinib-Konzentration zugeordnet wird, so ist ersichtlich, dass kaum ein Zusammenhang zwischen diesen Parametern besteht. Der Korrelationskoeffizient beträgt nur 0.10.

	<b>Erlotinib g/ml</b>
Best-fit values	
Slope	0.5153 ± 1.443
Y-intercept when X=0.0	0.4889 ± 1.018
X-intercept when Y=0.0	-0,9487
1/slope	1,941
95% Confidence Intervals	
Slope	-2.579 to 3.610
Y-intercept when X=0.0	-1.696 to 2.673
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 0.5717
Goodness of Fit	
r <sup>2</sup>	0,009031
Sy.x	1,357
Is slope significantly non-zero?	
F	0,1276
DFn, DFd	1.000, 14.00
P value	0,7263
Deviation from zero?	Not Significant

Tabelle 35: statistische Parameter der linearen Regressionsanalyse der FORD-Werte mit der Erlotinib-Konzentration

Nun werden die Werte der Stressmessung miteinander korreliert, also die antioxidative Kapazität mit dem oxidativen Stress. In dem Diagramm Abbildung 66: lineare Regression FORD-Werte gegen entsprechende FORT-Werte wurde der Stresswert (FORT) gegen die zugehörige antioxidative Kapazität (FORD) aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt.

Der Korrelationskoeffizient beträgt 0.35. Es lässt sich erkennen, dass bei erhöhtem oxidativem Stress die antioxidative Kapazität vermindert ist. Laut Literatur [21, 25] lässt sich dieser Zusammenhang dahingehend begründen, dass einerseits eine erhöhte Produktion an freien Radikalen die antioxidative Kapazität verbraucht aber dass andererseits ein vermindertes Antioxidative Gegensystem die gebildeten ROS nicht mehr entgiften kann.

Hier ist dieser Zusammenhang nicht so klar ersichtlich, was aber an der Instabilität der antioxidativen Kapazität in den Proben liegt.

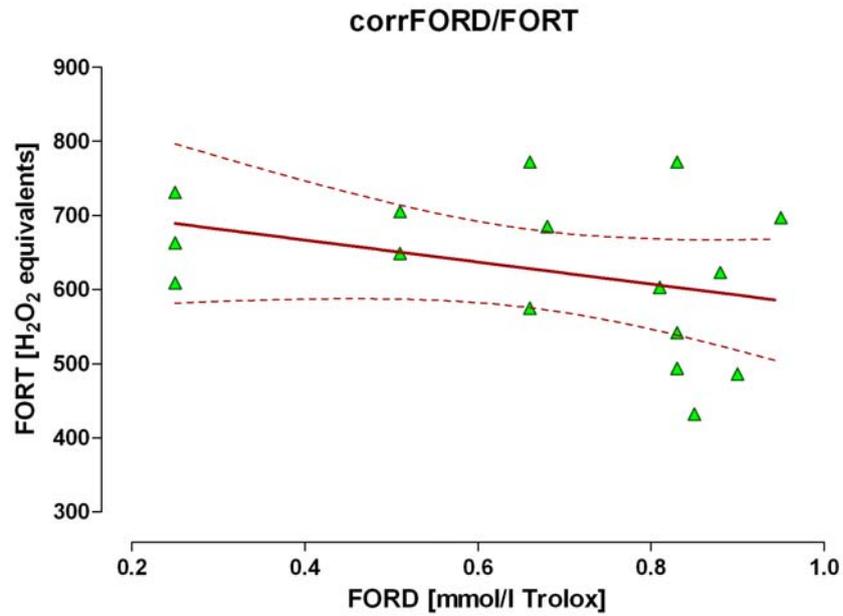


Abbildung 66: lineare Regression FORD-Werte gegen entsprechende FORT-Werte

Best-fit values	
Slope	$-148.5 \pm 104.8$
Y-intercept when X=0.0	$726.2 \pm 73.96$
X-intercept when Y=0.0	4,890
1/slope	-0,006733
95% Confidence Intervals	
Slope	-373.2 to 76.20
Y-intercept when X=0.0	567.6 to 884.9
X-intercept when Y=0.0	2.337 to +infinity
Goodness of Fit	
$r^2$	0,1255
Sy.x	98,53

Tabelle 36: statistische Parameter der Linearen Regression FORD/FORT

## **6.4. Cortisol**

Im nachstehenden, abschließenden Kapitel wurde untersucht, ob zwischen dem Hormon Cortisol und den FORT-Werten ein Zusammenhang besteht oder nicht.

Cortisol (Hydrocortison) ist das physiologisch wichtigste Glucocorticoid (95%) und stellt das so genannte Stresshormon dar. Es wird in der Nebennierenrinde gebildet, wobei die Sekretion und die Synthese durch das hypothalamisch-hypophysäre-System gesteuert werden und einem ausgeprägten zirkadianen Rhythmus unterliegen. Täglich werden unter dem Einfluss von Corticotropin etwa 15-60 mg Cortisol ausgeschüttet, bei Stress kann die Sekretion jedoch bis zu 240 mg betragen. [20] Das Blutspiegelminimum ist gegen Mitternacht, der maximale Glucocorticoid-Blutspiegel morgens zwischen 6 und 9 Uhr.

Cortisol kommt nicht nur im Blutplasma, sondern auch in andern Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Speichel, Urin, Tränen, Faeces, Samenflüssigkeit vor, deshalb können Cortisol-Proben aus dem Blutserum, dem 24-h-Sammelurin oder dem Speichel gewonnen werden. Da die tageszeitlichen und altersabhängigen Schwankungen aber sehr stark sind, ist die Untersuchung unter Beachtung genauer Vorschriften durchzuführen. Meist wird keine Einzelbestimmung durchgeführt sondern standardisierte dynamische Funktionstests mit Dexamethason.

Die Vorteile von Speichel als diagnostische Flüssigkeit sind, dass die Probengewinnung nicht invasiv ist, was unter anderem für Kinder und Behinderte von großem Nutzen ist und Mehrfachbestimmungen erleichtert und dass eine durch die Blutentnahme stressinduzierte Mehrsekretion von Cortisol vermieden wird.

Außerdem wird nur das freie Cortisol, also der biologisch aktive Cortisol-Anteil, bestimmt. Speichelproben sind bis zu 7 Tage stabil und haben geringe Konzentration an Antigenen (HIV, Hepatitis). Allerdings ist Speichel unsteril, die Sammlung ist schwierig zu standardisieren und die Ergebnisse sind abhängig von der Bestimmungsmethode sehr unterschiedlich.

### **6.4.1. Testprinzip und Durchführung**

Das Testprinzip beruht auf einem Enzymimmunoassay. Zum einen hat man auf einer Festphase einen Cortisol-spezifischen, monoklonalen anti-Cortisol-Antikörper (IgG).

Das Proben-Cortisol konkurriert mit einem mit Meerrettich-Peroxidase-(HRP) markiertem Cortisol als Tracer um die Bindungsstellen am festphasengebundenen

Antikörper. Nach einer einstündigen Inkubation bei Körpertemperatur werden die überschüssigen ungebundenen Proben- und Traceranteile durch Waschen entfernt und anschließend mit Tetramethylbenzidin (TMB) versetzt, das mit Wasserstoffperoxid ein blaues Chinon-Imin-Produkt bildet. Die Reaktion wird nach 15 Minuten durch Denaturierung des Enzyms mit 0,15 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, was zusätzlich zur Protonierung des Farbstoffes und zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führt. Die Farbintensität kann bei 450 nm vermessen werden, wobei die Intensität indirekt proportional zur Cortisol-Konzentration ist.

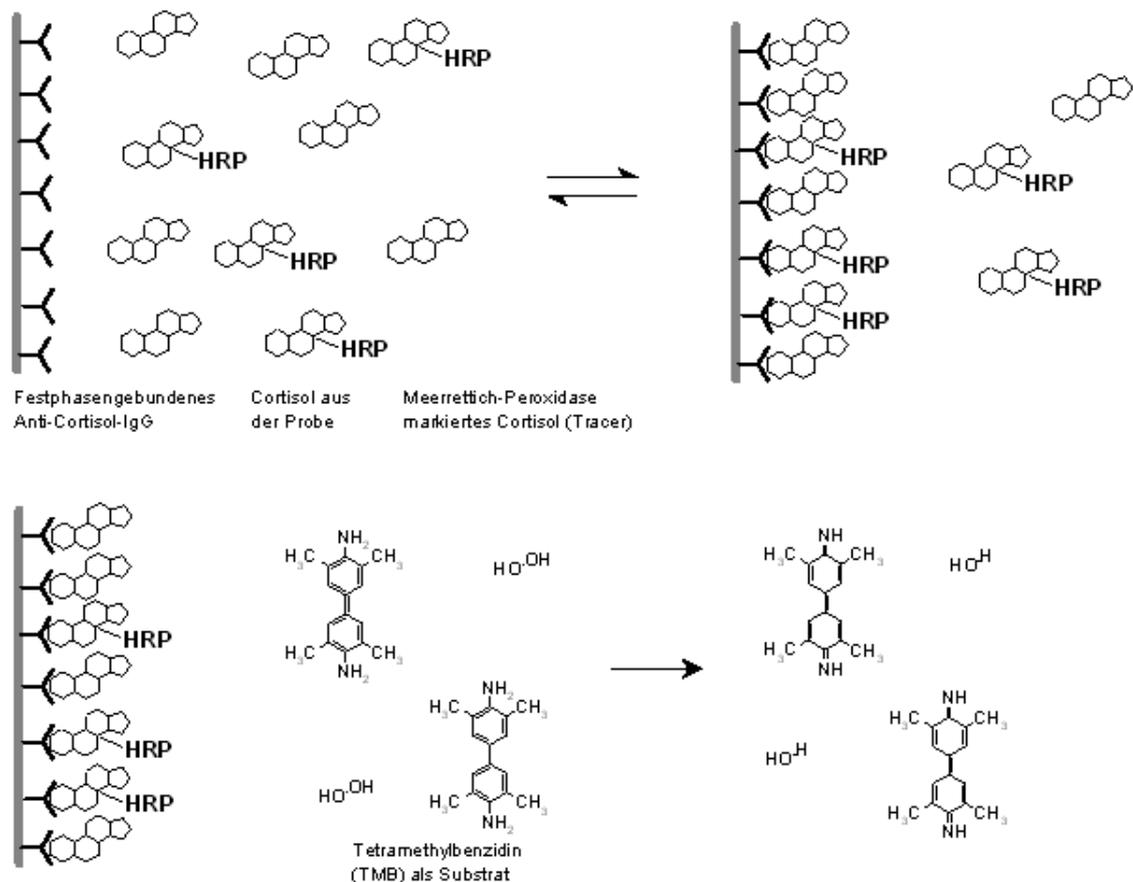


Abbildung 67: Cortisol-Immunoassay Testprinzip

Tabelle 37: Referenzwerte

REFERENZ-/NORMALWERTE	
Erwachsene (Blut), 8 Uhr	38-690 nmol/l
Erwachsene (Urin)	5-248 nmol/24 h
Erwachsene (Speichel), 8-10 Uhr	27 nmol/l
Erwachsene (Speichel), 14-15.30 Uhr	< 15 nmol/l
Erwachsene (Speichel), 0 Uhr	< 5,5 nmol/l

Da Cortisol einen Stressmarker darstellt war es sehr interessant den oxidativen Stress mit den Cortisol-Spiegeln zu vergleichen um eventuelle Korrelationen aufzuzeigen. Dies war im Rahmen des Praktikums für chemische Diagnostik und klinische Pharmazie möglich.

#### 6.4.2. Ergebnisse

Da die Messungen weder selben Tag noch zur gleichen Uhrzeit durchgeführt wurden dient diese Analyse lediglich einer Orientierung, ob ein genereller Zusammenhang zwischen den Parametern besteht.

Tabelle 38: Messwerte aus dem Praktikum für chemische Diagnostik und klinische Pharmazie

Cortisol nmol/L	FORT [H2O2 equivalents]	FORD [mmol/l Trolox]	Geschlecht
1,99	600	1,1	w
1,25	300	1,13	w
26,39	206	1,6	w
11,4	300	1,22	w
7,506	246	1,05	m
21,4	600	0,75	w
14,5	318	1,18	m
11	272	1,13	m
21,4	484	0,96	w
45,26	600	0,87	w
12,46	360	1,27	w
34,02	530	1,16	w
6,38	372	1,21	w
54,4	550	1,04	w
23,47	356	1,31	w
25,34	272	2,067	w
92,4	600	1,2	w
23,17	564	1,25	w
24	468	0,91	w
15,19	600	0,96	w
27,13	350	1,05	m
8,94	338	1,26	w
18,65	300	1,45	w
1,26	292	1,1	m
11,76	564	0,94	w
18,63	412	0,9	w
15,14	346	1,61	w
29,5	600	1,2	w
2,37	346	1,02	w
9,31	500	1,38	w
9,33	600	0,98	w
28,112	600	0,99	w
27,66	214	1,25	m
22,64	452	1,13	w
6,076	600	0,7	w
4,52	600	0,25	w
16,96	202	1,4	w
9,86	252	1,24	m
3,99	218	1,33	w
10,98	268	1,12	w
35,67	588	0,93	w
20,23	600	1,4	w
31,36	276	1,06	m
4,77	342	1,4	w
23,07	600	1,18	w
4,5	600	1,01	w
9,4	472	0,92	w
0,61	280	1,61	w
83,55	442	1,3	w
4,37	600	0,94	w
0,67	300	1,08	w
1,33	600	1,05	w
14,78	284	0,76	w
22,7	314	1,47	w
98,02	475	1,02	w
18,046	326	1,29	w
2,11	250	1,12	w
6,01	184	0,48	m
3,04	414	1	w
3,46	160>	1,88	w
2,04	464	1,1	w
7,3	396	1,59	w
5,2	533	2	w
6,24	418	0,81	w
35	560	1,05	w
40,93	480	1,34	w
5,15	400	1,02	w
4,05	400	1,14	w
6,09	302	1,17	w

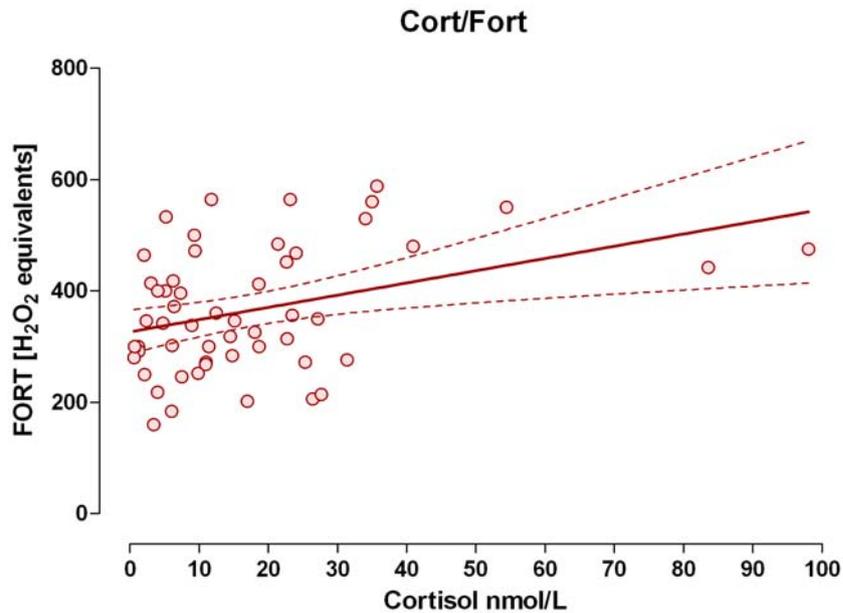


Abbildung 68: Lineare Regression der Cortisol-Werte mit den entsprechenden FORT-Werten

95% Confidence Intervals	
Slope	0.6478 to 3.746
Y-intercept when X=0.0	286.9 to 366.0
X-intercept when Y=0.0	-546.7 to -79.16
Goodness of Fit	
r <sup>2</sup>	0,1350
Sy.x	105,2
Is slope significantly non-zero?	
F	8,113
DFn, DFd	1.000, 52.00
P value	0,0063
Deviation from zero?	Significant

Tabelle 39: Lineare Regressionsanalyse Cortisol/FORT

Number of XY Pairs	
Number of XY Pairs	54
Pearson r	0,3674
95% confidence interval	0.1104 to 0.5783
P value (two-tailed)	0,0063
P value summary	**
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0,1350

Tabelle 40: Korrelationsanalyse Cortisol/FORT

Aus den Werten und der damit durchgeführten Regressionsanalyse ist ersichtlich, dass bei zunehmender Cortisol-Konzentration die FORT-Werte steigen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,36.

Nachfolgend sind die Cortisol-Konzentrationen gegen die entsprechenden FORD-Messwerte aufgetragen. Nach Durchführung einer linearen Regressionsanalyse ist aber erkennbar, dass zwischen diesen Parametern kein Zusammenhang herrscht. Der Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß sind sehr gering.

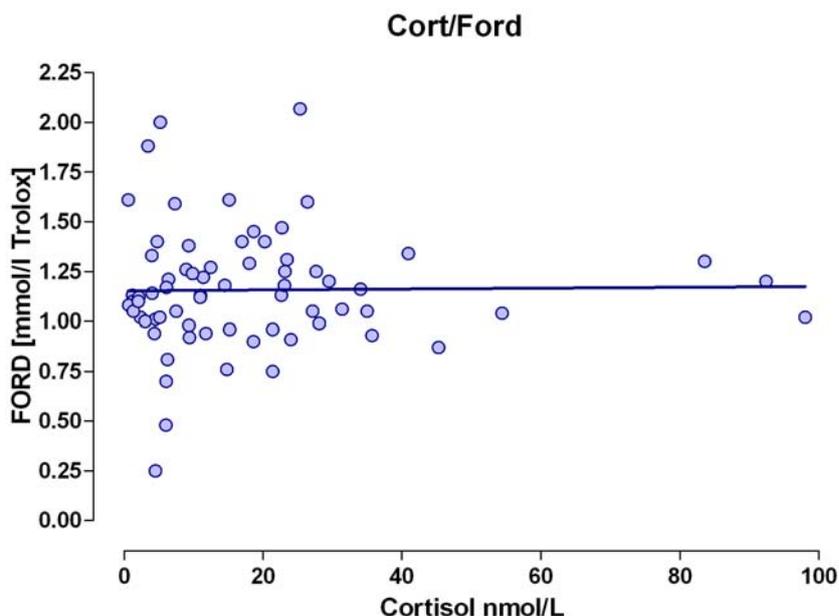


Abbildung 69: Korrelation zwischen Cortisol und FORD

95% Confidence Intervals	
Slope	-0.003496 to 0.003928
Y-intercept when X=0.0	1.053 to 1.252
X-intercept when Y=0.0	-infinity to -275.5
Goodness of Fit	
r <sup>2</sup>	0,0002024
Sy.x	0,3023
Is slope significantly non-zero?	
F	0,01356
DFn, DFd	1.000, 67.00
P value	0,9076
Deviation from zero?	Not Significant

Tabelle 41: Lineare Regressionsanalyse Cortisol/FORD

Number of XY Pairs	69
Pearson r	0,01423
95% confidence interval	-0.2233 to 0.2501
P value (two-tailed)	0,9076
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,0002024

Tabelle 42: Korrelationsanalyse Cortisol/Ford

Nun werden auch hier die Werte der Stressmessung miteinander korreliert, also die antioxidative Kapazität mit dem oxidativen Stress. In dem Diagramm Abbildung 70 ist der Stresswert (FORT) gegen die zugehörige antioxidative Kapazität (FORD) aufgetragen und eine lineare Regression wurde durchgeführt.

Auch hier lässt sich erkennen, dass bei erhöhtem oxidativem Stress die antioxidative Kapazität vermindert ist. Zwar beträgt der Korrelationskoeffizient nur 0.19, das Konfidenzintervall ist allerdings relativ schmal.

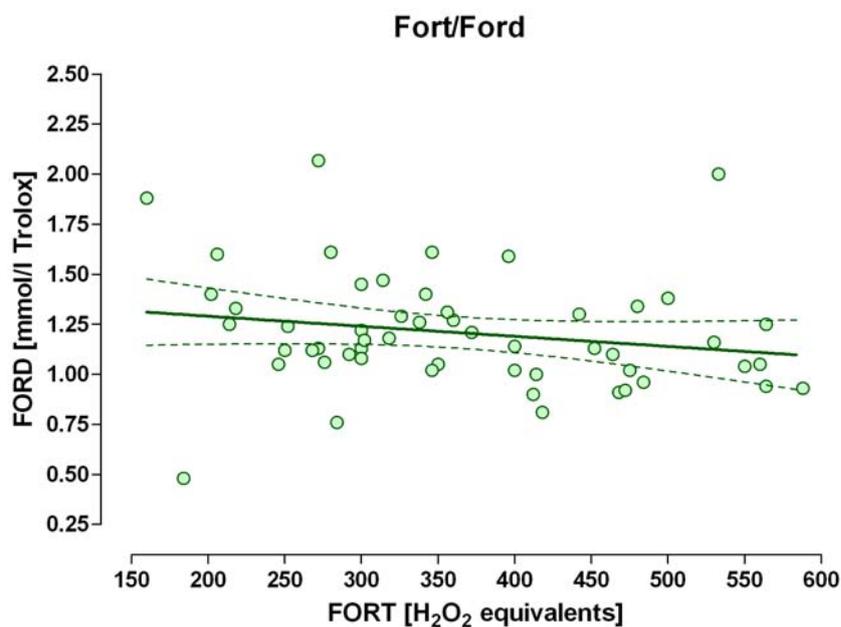


Abbildung 70: Korrelation zwischen FORT und FORD

<b>95% Confidence Intervals</b>	
Slope	-0.001211 to 0.0002047
Y-intercept when X=0.0	1.121 to 1.661
X-intercept when Y=0.0	1359 to +infinity
<b>Goodness of Fit</b>	
r <sup>2</sup>	0,03770
Sy.x	0,2874
Is slope significantly non-zero?	
F	2,037
DFn, DFd	1.000, 52.00
P value	0,1594
Deviation from zero?	Not Significant

Tabelle 43: Lineare Regressionsanalyse Fort/Ford

Number of XY Pairs	54
Pearson r	-0,1942
95% confidence interval	-0.4392 to 0.07769
P value (two-tailed)	0,1594
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0,03770

Tabelle 44: Korrelationsanalyse Fort/Ford

## 7. Conclusio

Der Oxidative Stress der einzelnen Patienten ist schon vor der Chemotherapie mit dem antineoplastisch wirkenden Medikament Erlotinib sehr hoch. Dies kann durch den Tumor selbst und der großteils sehr schlechten gesundheitlichen Verfassung der Patienten erklärt werden.

Die Betrachtung der Stresswerte der einzelnen Patienten im Therapieverlauf zeigt keinen vermuteten Anstieg der FORT-Werte durch die Gabe von Erlotinib, sondern sogar einen Abfall der Stresswerte 6 Stunden nach der Medikamentengabe.

Eine Korrelation aller Stresswerte mit der Erlotinib-Konzentration im Plasma zeigte jedoch, dass bei zunehmender Erlotinib-Konzentration im Plasma die FORT-Werte ansteigen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,42 und das Konfidenzintervall ist relativ schmal. (siehe Tabelle 32)

Die Messung der antioxidative Kapazität kurz vor und 8 Tage nach der Medikamentengabe wurde bei acht der neun Patienten durchgeführt. Die Messwerte sind alle sehr niedrig und befinden sich zwischen 0,25 und 0,95 mmol/l Trolox. Der FORD-Mittelwert fällt im Verlauf der Therapie ab, was aber unter anderem mit der Instabilität der Antioxidantien im Blutplasma erklärt werden kann.

Eine Korrelation der antioxidativen Kapazität mit der Erlotinib-Konzentration zeigt, dass kaum ein Zusammenhang zwischen diesen Parametern besteht, der Korrelationskoeffizient beträgt nur 0,10.

Durch eine Korrelation der Stresswerte mit den Werten der antioxidativen Kapazität ist ein indirekt proportionaler Zusammenhang ersichtlich, also bei steigendem oxidativen Stress nimmt die antioxidative Kapazität leicht ab.

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Cortisol-Konzentration und der Stresswerte lässt erkennen, dass bei zunehmender Cortisol-Konzentration die FORT-Werte ansteigen, die antioxidative Kapazität jedoch kaum beeinflusst wird.



## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

O <sub>2</sub>	Molekularer Sauerstoff
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>°</sup>	Superoxid-Anion-Radikal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
OH <sup>°</sup>	Hydroxyl-Radikal
PUFA	poly unsaturated fatty acids
SOD	Superoxid-Dismutase
CAT	Katalasen
GPX	Glutathion-Peroxidasen
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
ESR	Elektronenspin-Resonanz
FORM	Free Oxygen Radicals Monitor
MDA	Malondialdehyd
EGF	epidermal growth factor
TGF-α	transformierter Wachstumsfaktor-alpha
5-FU	5-Fluorouracil
HER1	human epidermal growth factor receptor type 1
AOK	Antioxidative Kapazität
FORD	Free Oxygen Radicals Defence
FORT	Free Oxygen Radicals Test
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
OS	Oxidativer Stress
ROS	reactive oxygen Species

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Oxidative Schädigung von Biomolekülen durch reaktive Sauerstoffspezies, Verfasser	6
Abbildung 2: Lipidperoxidation, Verfasser	9
Abbildung 3: Funktion der Glutathion-Peroxidase bei der Entgiftung von Lipidperoxiden, Verfasser	12
Abbildung 4: Glutathion, Verfasser	13
Abbildung 5: Glutathion-Disulfid, Verfasser	13
Abbildung 6: Ascorbinsäure, Verfasser	14
Abbildung 7: $\alpha$ -Tocopherol, Verfasser	15
Abbildung 8: $\beta$ -Carotin, Verfasser	15
Abbildung 9: Krebslokalisationen Männer	17
Abbildung 10: Krebslokalisationen Frauen	18
Abbildung 11: Ursachen für Pankreaskarzinom, Verfasser	18
Abbildung 12: Strukturformel Erlotinib, Verfasser	20
Abbildung 13: Metabolisierung von Erlotinib, Verfasser	21
Abbildung 14: Hauptmetabolit OSI-420, Verfasser	21
Abbildung 15: Das FORMplus-Testsystem, Verfasser	24
Abbildung 16: Nachweisreaktionen FORT, Verfasser	25
Abbildung 17: Nachweisreaktionen FORD, Verfasser	27
Abbildung 18: Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure), Verfasser	28
Abbildung 19: HPLC-Gerät, Verfasser	28
Abbildung 20: Vollblutproben gegen Plasmaproben, Verfasser	31
Abbildung 21: Kurvendiagramme: Messwiederholungen, Verfasser	32
Abbildung 22: Scattergramm Messwiederholungen aller Patienten, Verfasser	33
Abbildung 23: Streudiagramm FORT-Werte, Verfasser	38
Abbildung 24: Transformation der FORT-Werte, Verfasser	39
Abbildung 25: Kurvendiagramm der FORT-Werte, Verfasser	40
Abbildung 26: Diagramm der Patienten 1 bis 3, Verfasser	44
Abbildung 27: Diagramm der Patienten 4 bis 6, Verfasser	45
Abbildung 28: Diagramm der Patienten 7 bis 9, Verfasser	46
Abbildung 29: Mittelwerte aller Patienten der Konzentrationsverläufe von Erlotinib, OSI und FORT, Verfasser	47
Abbildung 30: Regressionsanalyse Patient 1 0-24h, Verfasser	48
Abbildung 31: Regressionsanalyse Patient 1 24-168h, Verfasser	48
Abbildung 32: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 1, Verfasser	49

Abbildung 33: Regressionsanalyse Patient 2 0-24h, Verfasser .....	50
Abbildung 34: Regressionsanalyse Patient 2 24-168h, Verfasser .....	50
Abbildung 35: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 2, Verfasser .....	51
Abbildung 36: Regressionsanalyse Patient 3 0-24h, Verfasser .....	52
Abbildung 37: Regressionsanalyse Patient 3 24-168h, Verfasser .....	52
Abbildung 38: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 3, Verfasser .....	53
Abbildung 39: Regressionsanalyse Patient 4 0-24h, Verfasser .....	54
Abbildung 40: Regressionsanalyse Patient 4 24-168h, Verfasser .....	54
Abbildung 41: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 4, Verfasser .....	55
Abbildung 42: Regressionsanalyse Patient 5 0-24h, Verfasser .....	56
Abbildung 43: Regressionsanalyse Patient 5 24-168h, Verfasser .....	56
Abbildung 44: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 5, Verfasser .....	57
Abbildung 45: Regressionsanalyse Patient 6 0-24h, Verfasser .....	58
Abbildung 46: Regressionsanalyse Patient 6 24-168h, Verfasser .....	58
Abbildung 47: Kurvendiagramm FORD/FORT Patient 6, Verfasser .....	59
Abbildung 48: Regressionsanalyse Patient 7 0-24h, Verfasser .....	60
Abbildung 49: Regressionsanalyse Patient 7 24-168h, Verfasser .....	60
Abbildung 50: Kurvendiagramm FORD/FORT, Verfasser .....	61
Abbildung 51: Regressionsanalyse Patient 8 0-24h, Verfasser .....	62
Abbildung 52: Regressionsanalyse Patient 8 24-168h, Verfasser .....	62
Abbildung 53: Kurvendiagramm FORT/FORD Patient 8, Verfasser .....	63
Abbildung 54: Regressionsanalyse Patient 9 0-24h, Verfasser .....	64
Abbildung 55: Regressionsanalyse Patient 9 24-168h, Verfasser .....	64
Abbildung 56: Regressionsanalyse aller Patienten 0-24h, Verfasser .....	66
Abbildung 57: Lineare Regression aller Patienten 0-24h, Verfasser .....	66
Abbildung 58: Regressionsanalyse aller Patienten 24-168h, Verfasser .....	68
Abbildung 59: Lineare Regression aller Patienten 24-168h, Verfasser .....	68
Abbildung 60: Regressionsanalyse aller Patienten 0-168h, Verfasser .....	70
Abbildung 61: Lineare Regression aller Patienten 0-168h, Verfasser .....	70
Abbildung 62: FORD-Werte der einzelnen Patienten, Verfasser .....	73
Abbildung 63: FORD [mmol/l Trolox] aller Patienten, Verfasser .....	73
Abbildung 64: FORD-Mittelwert aller Patienten, Verfasser .....	74
Abbildung 65: Lineare Regression der FORD-Werte mit der entsprechenden Erlotinibkonzentration, Verfasser .....	74
Abbildung 66: lineare Regression FORD-Werte gegen entsprechende FORT-Werte ...	76
Abbildung 67: Cortisol-Immunoassay Testprinzip, Mag. pharm. Dr.rer.nat. Martina Höferl .....	78

Abbildung 68: Lineare Regression der Cortisol-Werte mit den entsprechenden FORT-Werten, Verfasser .....	81
Abbildung 69: Korrelation zwischen Cortisol und FORD, Verfasser .....	82
Abbildung 70: Korrelation zwischen FORT und FORD, Verfasser.....	83

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erkrankungen, die mit Radikalen assoziiert werden .....	3
Tabelle 2: aus H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gebildete reaktive Hydroxyl-Radikale .....	5
Tabelle 3: Nebenwirkungen der Zytostatika .....	17
Tabelle 4: Werte und ihre Interpretation .....	26
Tabelle 5: t-Test Messwiederholungen .....	33
Tabelle 6: Column-Statistik aller Messwiederholungen .....	34
Tabelle 7: FORT-Werte aller Patienten .....	37
Tabelle 8: Deskriptive Statistik aller FORT-Werte .....	38
Tabelle 9: Erlotinib-Konzentrationen in µg/ml .....	41
Tabelle 10: OSI-Konzentrationen in µg/ml .....	42
Tabelle 11: Summe der Erlotinib und OSI-Konzentrationen in µg/ml .....	43
Tabelle 12: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 1 0-24h .....	48
Tabelle 13: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 1 24-168h .....	49
Tabelle 14: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 2 0-24h .....	50
Tabelle 15: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 2 24-168h .....	51
Tabelle 16: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 3 0-24h .....	52
Tabelle 17: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 3 24-168h .....	53
Tabelle 18: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 4 0-24h .....	54
Tabelle 19: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 4 24-168h .....	55
Tabelle 20: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 5 0-24h .....	56
Tabelle 21: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 5 24-168h .....	57
Tabelle 22: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 6 0-24h .....	58
Tabelle 23: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 6 24-168h .....	59

Tabelle 24: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 7 0-24h .....	60
Tabelle 25: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 7 24-168h .....	61
Tabelle 26: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 8 0-24h .....	62
Tabelle 27: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 8 24-168h .....	63
Tabelle 28: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 9 0-24h .....	64
Tabelle 29: Statistische Parameter der Regressionsanalyse von FORT mit den Konzentrationen an Erlotinib und OSI-420 Patient 9 24-168h .....	65
Tabelle 30: Statistische Parameter der Regressionsanalyse aller Patienten 0-24h .....	67
Tabelle 31: Statistische Parameter der Regressionsanalyse aller Patienten 24-168h .....	69
Tabelle 32: Statistische Parameter der Regressionsanalyse aller Patienten 0-168h .....	71
Tabelle 33: Messwerte der antioxidativen Kapazität (FORD) .....	72
Tabelle 34: Deskriptive Statistik der FORD-Werte der Patienten vor der Therapie (T1) und acht Tage nach der Therapie (T8) .....	72
Tabelle 35: statistische Parameter der linearen Regressionsanalyse der FORD-Werte mit der Erlotinib-Konzentration.....	75
Tabelle 36: statistische Parameter der Linearen Regression FORD/FORT .....	76
Tabelle 37: Referenzwerte .....	79
Tabelle 38: Messwerte aus dem Praktikum für chemische Diagnostik und klinische Pharmazie .....	80
Tabelle 39: Lineare Regressionsanalyse Cortisol/FORT .....	81
Tabelle 40: Korrelationsanalyse Cortisol/FORT .....	81
Tabelle 41: Lineare Regressionsanalyse Cortisol/FORD.....	82
Tabelle 42: Korrelationsanalyse Cortisol/Ford .....	83
Tabelle 43: Lineare Regressionsanalyse Fort/Ford .....	84
Tabelle 44: Korrelationsanalyse Fort/Ford .....	84

## Literaturverzeichnis

- 1: Biochemie und Pathobiochemie, G. Löffler, P. Petrides (Hrsg.), 7. Auflage, Springer Verlag
- 2: Redox-Biochemistry, Ruma Banerjee, Wiley Verlag, 2008
- 3: Welche Rolle spielt oxidativer Stress? Apotheker Jens Bielenberg, ÖAZ-aktuell 19/2004
- 4: Oxidative stress and antioxidant defense in Biology, Sami Ahamd, Verlag Chapman & Hall, 1995
- 5: Analysis of Free Radicals in Biological Systems, Favier et al., Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, 1995
- 6: Biochemie, Geoffrey L. Zubay, Brandt/Ulrich (Hrsg.), McGraw-Hill Internat., 2000
- 7: Onkologie integrative – konventionell und komplementäre Therapie, B. Pfeifer, J. Preiß, C. Unger, 2006
- 8: Biochemie: H. Robert Horton, Laurence A. Moran, K. Gray Scrimgeour, J. David Rawn, Marc D. Perry, 2008, Ausgabe 4
- 9: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, 10. überarbeitete Auflage, 2009
- 10: Pharmakognosie – Phytopharmazie, Rudolf Hänsel, Otto Sticher, Ausgabe 8, 2007
- 11: Gesundheit, Christian Herfarth 2006
- 12: eMedicine from WebMD, Pancreatic Cancer, Richard A. Erickson, 2009
- 13: Facharzt Hämatologie Onkologie, Dieter Engelhardt, 2007
- 14: EMEA, Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) Tarceva, 2007
- 15: Molecular modeling of the metabolism of Tarceva, Huq, Fazlul, Discipline of Biomedical Science, Faculty of Medicine, The University of Sydney, Australia. International Journal of Pure & Applied Chemistry (2007)
- 16: Metabolism and excretion of erlotinib, a small molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in healthy male volunteers, Jie Ling, Kim A. Johnson, Hhuang Miao, Ashok Rakhit, Michael P. Pantze, Marta Hamilton, Bert L. Lum, Chandra Prakash, Department of Pharmacokinetic, Pharmacodynamic and Bioanalytical Sciences, Genentech Incorporated, South San Francisco, California
- 17: Role of erlotinib in the management of pancreatic cancer. Starling, Naureen; Neoptolemos, John; Cunningham, David. Royal Marsden Hospital, Sutton, Surrey, UK. Therapeutics and Clinical Risk Management (2006),
- 18: Bedienungsanleitung FORMplus

- 19: Diplomarbeit Theorie und Praktische Anwendung der Oxidativen Stressmessung, Matzke Birgit 2006
- 20: Arzneimittelwirkungen, Lehrbuche der Pharmakologie und Toxikologie, Ernst Mutschler, 7.Auflage
- 21: Diplomarbeit: oxidative Stressmessung und antioxidative Kapazität: Untersuchungen an speziellen Kollektiven, Marion Eisl
- 22: Freie Radikale, Oxidativer Stress und Antioxidantien, Krankheitsverursachende, präventive und reparative Prinzipien in lebenden Systemen, Gerhard Ohlenschläger, 2. Auflage 2000
- 23: Wie entsteht Krebs? Programmänderungen der Zellteilungsmechanismen, Mutationen – Kanzerogenese – Onkogene, Gerhard Ohlenschläger, 1998
- 24: Free Radicals in Biology and Medicine, Barry Halliwell and John M.C. Gutteridge, 3. Auflage 1999
- 25: Diplomarbeit Messung des oxidativen Stresses und der antioxidativen Kapazität bei der Chemotherapie solider Tumore mit Docetaxel, Tamara Brumnik, 2009

## **Lebenslauf**

Name: Marina Peham  
Geburtsdatum: 11. Oktober 1984  
Geburtsort: Melk  
Staatsbürgerschaft: Österreich

## **Ausbildung**

---

seit Oktober 2003 Pharmaziestudium an der Universität Wien  
1995 - 2003 Bundesgymnasium / Bundesrealgymnasium Wieselburg  
1991 - 1995 Volksschule Persenbeug

## **Tätigkeiten**

---

seit März 2006 Alpha Apotheke, Wien Donaustadt  
Tutorium 2010 Übungen zur Chemischen Diagnostik,  
Universität Wien

## **Abstract**

Die Diplomarbeit befasst sich mit der Frage, ob eine antineoplastische Chemotherapie des Pankreaskarzinoms mit Erlotinib einen Einfluss auf den oxidativen Stress und die antioxidative Kapazität der behandelten Patienten besitzt.

Dazu wurden sowohl die Konzentration von Erlotinib im Blutplasma, als auch der oxidative Stress und die antioxidative Kapazität der Patienten gemessen und miteinander in Zusammenhang gebracht.

This thesis deals with the question whether Erlotinib, an antineoplastic chemotherapeutic agent, has influence over the oxidative stress and the antioxidant defence of patients with pancreatic cancer.

For this purpose the concentration of Erlotinib as well as the oxidative stress and the antioxidant defence have been quantified in blood plasma samples. The results were correlated with each other.