



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Quantifizierung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) bei  
der kombinierten Chemotherapie des fortgeschrittenen  
Pankreaskarzinoms“

Verfasserin

Ester Mirsajeva

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im April 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

a.o. Univ.-Prof. Dr. Martin Czejka



## **DANKSAGUNG**

Diese Diplomarbeit wurde am Department für klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien (Leitung: a.o. Univ.Prof. Mag. Dr. Walter Jäger) unter der Betreuung von a.o. Univ.Prof. Mag. Dr. Martin Czejka verfasst.

Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders bei a.o. Univ.-Prof. Dr. Martin Czejka, für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und für die hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Erarbeitung dieser Diplomarbeit bedanken.

Zudem möchte ich meiner Mutter, Eva Pawlica vom Herzen danken, die mir das Studieren ermöglichte und mich moralisch während der Studienzeit unterstützte.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner besten Freundin und Studienkollegin Antonia Grubescic. Gemeinsam haben wir die Höhen und Tiefen des Studiums durchlebt und uns gegenseitig ermutigt und vor allem motiviert weiter zu machen.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>1. EINLEILUNG.....</b>	<b>8</b>
<b>2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>9</b>
2.1    Reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale .....	9
2.2    Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) .....	10
2.3    Biologische Quellen für ROS.....	12
2.3.1    Endogene Quellen .....	12
2.3.2    Exogene Quellen .....	13
2.4    Oxidative Schädigung biologischer Moleküle .....	14
2.5    Antioxidative Kapazität .....	16
2.6    Antioxidative Schutzmechnismen gegen ROS .....	16
2.6.1    Enzymatische Schutzmechanismen.....	16
2.6.2    Nicht enzymatische Schutzmechanismen (Antioxidantien) .....	19
2.7    Freie Radikale und Kanzerogenese .....	22
2.8    Pankreaskarzinom.....	24
2.8.1    Chemotherapie .....	27
2.9    Erlotinib ( <i>Handelsname Tarceva®</i> ) .....	28
2.9.1    Beschreibung .....	28
2.9.2    Pharmakodynamik .....	29
2.9.3    Indikation und Dosierung .....	30
2.9.4    Pharmakokinetik .....	30
2.9.5    Nebenwirkungen und Interaktionen .....	31
<b>3. RATIONALE .....</b>	<b>33</b>
<b>4. EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>34</b>
4.1    Probenvorbereitung.....	34
4.2    Beschreibung des Testgeräts.....	34
4.3    Messung der freien Radikale: FORT (Free Oxygen Radicals Test) .....	35
4.3.1    Messprinzip.....	35
4.3.2    Praktische Durchführung.....	36

4.3.3	Ergebnisse .....	37
4.4	Messung der Antioxidativen Kapazität: FORD .....	38
4.4.1	Messprinzip.....	38
4.4.2	Praktische Durchführung.....	38
4.4.3	Ergebnisse .....	39
4.5	HPLC-Analyse.....	40
4.6	Biometrische Berechnungen .....	41
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>42</b>
5.1	FORT/FORD-Werte aller Patienten.....	43
5.2	FORT-Werte im Verlauf des 1. Tages .....	47
5.3	FORT/FORD-Werte im Verlauf von Tag 1 - Tag 8 .....	52
5.3.1	Patient 21 .....	54
5.3.2	Patient 20.....	54
5.3.3	Patient 19.....	54
5.3.4	Patient 18.....	56
5.3.5	Patient 17 .....	56
5.3.6	Patient 15.....	56
5.3.7	Patient 14.....	58
5.3.8	Patient 13.....	58
5.3.9	Patient 12.....	58
5.4	Antioxidative Kapazität aller Patienten im Vergleich .....	62
5.5	FORT-Werte aller Wochenpatienten .....	65
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>81</b>



# 1. Einleitung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden bei verschiedenen biochemischen Prozessen in unserem Körper gebildet. Sie entstehen im Rahmen von Stoffwechselfvorgängen der mitochondrialen Zellatmungskette und Cytochrom-P<sub>450</sub>-Oxidasen als Nebenprodukt. [2]

Aufgrund ihrer aggressiven Reaktivität besitzen sie nicht nur eine schädigende Wirkung, sondern auch eine wichtige physiologische Funktion als Abwehrmechanismus gegen eindringende Mikroorganismen, die in diesem Fall vom Immunsystem gebildet und freigesetzt werden.

Unter normalen physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien, sodass das antioxidative Verteidigungssystem des Körpers die Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) neutralisiert und unschädlich macht. Kommt es jedoch zu einer überdurchschnittlichen Produktion von Radikalen führt dies zum so genannten „oxidativen Stress“, das zur Schädigung der Zellmembran, Proteine oder DNA führen kann. Da oxidative Veränderungen eine große Rolle in der Pathogenese spielen, können sie die Entstehung bestimmter Krankheiten wie z.B. Krebs, Herz-Kreislauf- und neurodegenerativen Erkrankungen sowie Diabetes mellitus oder Katarakt begünstigen. [1]

Nicht nur die üblichen exogenen Einflüsse können als Auslöser zu oxidativem Stress führen, sondern speziell auch bestimmte Arzneistoffe und ihre Metabolite. [1]

Daher ist das Ziel dieser Diplomarbeit herauszufinden, ob die kombinierte Chemotherapie des Pankreaskarzinoms, besonders in Hinblick auf Erlotinib einen Effekt auf den oxidativen Stress der behandelten Patienten ausübt.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale

Reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale sind charakteristisch für ihre sehr hohe Reaktivität. Radikale können Atome oder Moleküle sein, die ein ungepaartes Elektronenpaar im äußeren Orbital besitzen und somit chemisch instabil sind. Aus diesem Grund sind sie paramagnetisch, d.h. sie richten sich im Magnetfeld aus. Freie Radikale entstehen durch Ab- oder Aufnahme von Elektronen bzw. durch Spaltung von kovalenten Bindungen. Auf diese Weise können sie die Elektronen anderer Moleküle entziehen, um in einen stabilen Zustand übergeführt zu werden, was zu veränderten Eigenschaften dieses Moleküls führen kann. Das wiederum kann für eine Funktionsstörung innerhalb der Zelle verantwortlich sein. [4]

Die Bezeichnung „Reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) ist ein Sammelbegriff sowohl für radikalische als auch für nicht radikalische Sauerstoffderivate.

Beispiele dafür sind:

#### Radikalische ROS:

- Superoxid-Anion-Radikal ( $O_2^{\circ-}$ )
- Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\circ}$ )
- Peroxyl-Radikal ( $ROO^{\circ}$ )
- Alkoxy-Radikal ( $RO^{\circ}$ )

#### Nicht-radikalische ROS:

- Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ )
- Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )
- Ozon ( $O_3$ )

## 2.2 Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

### Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$

Durch die Energieübertragung auf molekularem Triplett-Sauerstoff ( $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$ ) kommt es zu einer veränderten Anordnung der Elektronen in Spin. Nun besitzen die äußeren Elektronen des Singulett-Sauerstoffs ( $^1\text{O}_2$ ) nicht parallelen, sondern antiparallelen Spin und stellen daher einen elektronisch angeregten Zustand dar. Diese können während einer Prostaglandinbiosynthese oder auch bei der Phagozytose, also generell bei Entzündungsprozessen gebildet werden. Singulett-Sauerstoffe sind kurzlebig und gehen bevorzugt eine Reaktion mit organischen Molekülen ein. [4] [5]

### Superoxid-Anion-Radikal $\text{O}_2^{\circ-}$

Das Superoxid-Anion-Radikal entsteht durch Aufnahme eines Elektrons aus molekularem Sauerstoff. [3]



Dies kann auf dem physikalischen Weg erfolgen entweder durch UV-Licht, Röntgen- und Gammastrahlen oder aber auch durch Autooxidation. Signifikante Mengen an Superoxid-Anion-Radikale entstehen in Nebenreaktionen vieler unterschiedlicher enzymatischer Reaktionen. Bedeutend ist speziell die Metabolisierung durch Cytochrom  $\text{P}_{450}$ . [2]

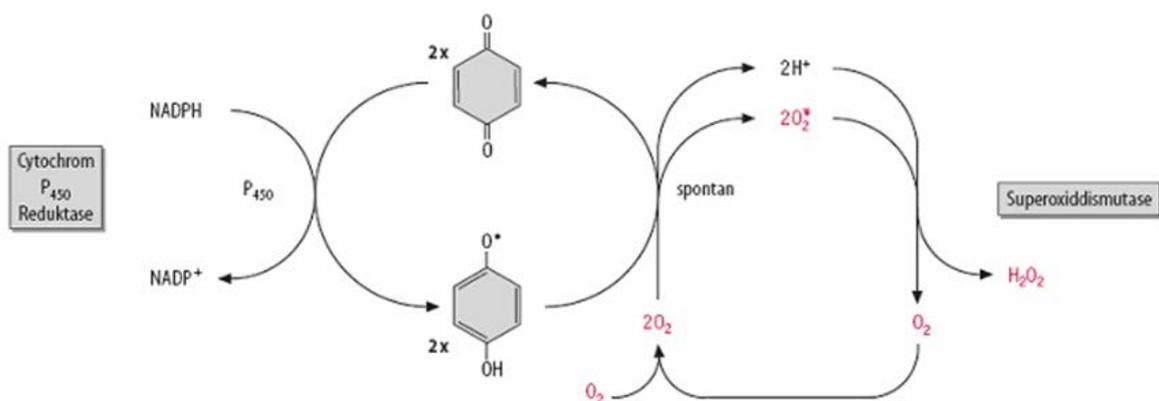


Abb. 1: Bildung von Superoxid-Radikalen durch Cytochrom  $\text{P}_{450}$  [2]

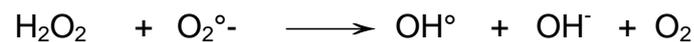
In diesen Nebenreaktionen der Monooxygenase werden aus Chinone Semichinon-Radikale gebildet, die unter Superoxidbildung spontan mit molekularem Sauerstoff reagieren. Mit Hilfe des Enzyms Superoxid-Dismutase werden aus zwei Superoxid-Radikale  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Sauerstoff gebildet. [2]



Superoxid-Radikale werden hauptsächlich von Phagozyten bei Entzündungsprozessen produziert. Diese können angeregt werden durch Bakterien, Komplementfaktor C5a, Leukotrien B4 und Tumorpromotoren. [4]

Durch die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wirkt es bakterizid.

Ausgehend vom Wasserstoffperoxid bilden sich spontan Hydroxyl-Radikale, die sehr aggressiv sind. [5]



Diese gebildeten ROS dienen nicht nur dem Schutzmechanismus vor Mikroorganismen, sondern können Wirtszellen in ihrer Umgebung angreifen und schädigen. [5]

Ein weiterer Bildungsort der Superoxide ist die mitochondriale Atmungskette, wo sie durch Oxidation von Ubisemichinone bzw. durch Reduktion von molekularem Sauerstoff entstehen. [2]

Superoxid-Anion-Radikale können generell auf viele unterschiedliche Weise Reaktionen eingehen. Als starke Base kann es Protonen abspalten, oder kann als Reduktionsmittel dienen und Chinone zu Semichinone reduzieren. Selbst als Nukleophil kann es mit elektrophilen Gruppen reagieren und sogar als schwaches Oxidationsmittel Moleküle wie Ascorbinsäure oder Adrenalin oxidieren. [5]

### **Wasserstoffperoxid $\text{H}_2\text{O}_2$**

Wasserstoffperoxid dient im Organismus als Reduktions- bzw. Oxidationsmittel und ist eine stabile Verbindung. Ebenfalls wird es als Nebenprodukt verschiedener enzymatischer Reaktionen wie z.B. bei der Oxidation von Aminosäuren (durch Monoaminoxidase) und Xanthinen gebildet. Wie bereits erwähnt spielt die

Fremdstoffmetabolisierung durch Cytochrom P<sub>450</sub> mit anschließender Einwirkung von Superoxid-Dismutase auch eine wesentliche Rolle für die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Wasserstoffperoxid selbst ist eher ein unreaktives Zwischenprodukt. Es ist jedoch das Ausgangsstoff für die Bildung von Hydroxyl-Radikale, welches aggressives Potential besitzt. Zusätzlich hat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Eigenschaft membrandurchlässig zu sein. [4] [5]

### **Hydroxyl-Radikale (OH°)**

Dieses Radial verhält sich äußerst aggressiv und zählt zu den reaktivsten Sauerstoffspezies. Im entzündeten Gewebe entstehen Hydroxyl-Radikale aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch eine Übergangsmetall-vermittelte Reaktion, wo z.B. Fe<sup>2+</sup> zu Fe<sup>3+</sup> aufoxidiert wird (Fenton-Reaktion). Diese Art von Elektronentransport auf das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann auch durch Cu<sup>2+</sup> oder Semichinone erfolgen. [3] [4] [5]

Fenton-Reaktion:



### **Alkyl- (RO°) und Peroxy-Radikale (ROO°)**

Diese entstehen während des Metabolismus verschiedener Fremdstoffe, so genannte Xenobiotika. [4]

## **2.3 Biologische Quellen für ROS**

### **2.3.1 Endogene Quellen**

1. Die Grundlage für alle Lebensvorgänge in höheren Organismen bildet die **Elektronentransportkette** in den Mitochondrien, wo molekularer Sauerstoff zu Wasser durch Elektronenübertragung, katalysiert durch Enzyme reduziert wird. Jedoch funktioniert sie nicht absolut präzise und dadurch entstehen undichte Stellen, sodass einzelne Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden und sich in ROS umwandeln. Schätzungsweise etwa 3% des täglich

konsumierten Sauerstoffs werden nicht direkt zu Wasser reduziert, sondern zu ROS umgewandelt. [5]

2. Während des **Purinstoffwechsels** oxidiert das Enzym **Xanthinoxidase** Arzneistoffe mit Xanthinstruktur. Dieses Enzym trägt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Superoxid-Radikal-Anionen während der Wiederdurchblutung nach Ischämien. [5]
3. Der **Katecholaminstoffwechsel** stellt eine weitere endogene Quelle dar. [3]
4. Auch **zelluläre Bestandteile** stellen Substanzen dar, die leicht **autooxidiert** werden und freie Radikale freisetzen können. Dazu zählen Hämoglobin, das zu Methämoglobin (=Methämoglobin) umgesetzt wird, sowie Thiole, die Disulfide bilden oder mehrfach ungesättigte Membranlipide, aus denen Lipidperoxide hervorgehen. [5]
5. Alle **entzündlichen Prozesse** führen zur vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Besonders Phagozyten fördern die Bildung von Sauerstoffradikalen während des Entzündungsprozesses, die antibakteriell wirksam sind um das Eindringen der Mikroorganismen zu verhindern. Ist jedoch der Ablauf der Entzündungsreaktion gestört, das bei chronischen Infektionen oder geschwächtem Immunsystem vorkommt, können diese überproduzierte reaktive Sauerstoffspezies Zellstrukturen schädigen. [5]
6. Über die Cyclooxygenase und der Lipoxygenase werden im Zuge der **Arachidonsäure-Metabolisierung** ebenfalls Peroxy-Verbindungen und Hydroxyl-Radikale gebildet. [3]

### 2.3.2 Exogene Quellen

1. Die Metabolisierung vieler Arzneistoffe ist mit ROS Bildung verbunden. Das **Cytochrom P<sub>450</sub>** ist die bedeutendste Quelle für die Bildung von Sauerstoffradikalen. Genau diese Eigenschaft wird medikamentös gezielt

genutzt, wie bei einigen Zytostatika zum Beispiel Bleomycin und Doxorubicin, bei der Bekämpfung von Tumorzellen. [3]

2. **Zigarettenrauch:** Im Rauch selbst kommen Radikale vor.
3. Die Einwirkung von ionisierender **Strahlung**, Röntgenstrahlung aber auch radioaktive und UV-Strahlung induzieren die Radikalbildung im biologischen Gewebe. [3] [5]
4. Der **Einfluss von Eisen** auf die Radikalbildung spielt eine große Rolle. Die meisten biologischen Fe-Komplexe, wie die Hämproteine Hämoglobin, Peroxidase, Myoglobin und Katalase, sowie Nicht-Hämproteine Transferin sind bedingt in der Lage die Fenton-Reaktion zu katalysieren. [3]

## 2.4 Oxidative Schädigung biologischer Moleküle

Bei einem Überschuss an produzierten reaktiven Sauerstoffverbindungen werden Biomoleküle in der Nähe ihres Entstehungsortes angegriffen, da es sich bekanntlich um instabile Verbindungen handelt, die aufgrund dessen eine kurze Lebensdauer haben. Ist der Entstehungsort beispielweise das Mitochondrium, so werden die mitochondriale Lipidmembranen und ihre Proteine angegriffen. [5]

### 2.4.1 Lipidschäden

Durch die reaktiven Sauerstoffspezies können Membranlipiden oxidiert werden, hier speziell die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, somit entstehen so genannten Lipidperoxide. Membranschäden wie unkontrollierter Ionenaustausch bis zum anschließenden Platzen der Membran sind Folgen der Lipidperoxidation.

Ausgangspunkt dafür ist zum Beispiel das Hydroxyl-Radikal, welches ein Wasserstoffatom von einer zwischen zwei Doppelbindungen  $-CH_2-$ Gruppe der mehrfach ungesättigten Fettsäure entziehen. Mit anschließender  $O_2$ -Anlagerung kommt es zur Bildung von Lipidperoxyl-Radikalen. Diese entziehen ebenfalls ein

Wasserstoffatom aus einer weiteren ungesättigten Fettsäure, sodass Lipidperoxide entstehen. Somit ist es ein zyklischer Prozess. [2]

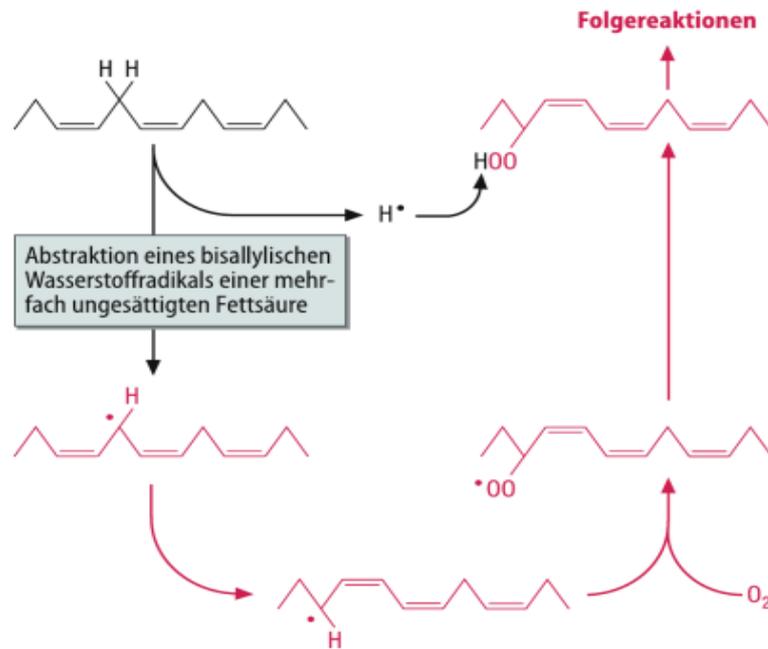


Abb. 2: Entstehung von Lipidperoxiden [2]

### 2.4.2 DNA-Schäden

Reaktive Sauerstoffspezies induzieren in der DNA Einzelstrangbrüche durch Modifikation der Zuckeranteile. Die Oxidation von Guanin führt zu 8-Hydroxyguanin, das nun die Möglichkeit hat sich mit Adenin zu paaren. Auf diese Weise kommt es zur Veränderung bzw. Zerstörung der Basen und dadurch zur Fehlpaarung und Mutation. ROS wirken somit als intrazelluläre Mutagene. [2] [5]

### 2.4.3 Proteinschäden

Besonders empfindlich sind Proteine mit Thiolgruppen wie L-Cystein, L-Methionin, L-Histidin, und aromatische Aminosäuren mit Tryptophanreste. Oxidativ angegriffene Proteine können eine veränderte räumliche Struktur aufweisen, zur Konformationsänderungen des Proteins beitragen und verantwortlich sein für den Funktionsverlust von Proteinen. [5]

## 2.5 Antioxidative Kapazität

Die Antioxidative Kapazität beschreibt die Schutzfunktion oxidative Vorgänge im Organismus zu verlangsamen oder diese gänzlich zu unterbrechen. Sowohl enzymatische also auch nicht-enzymatische Schutzmechanismen tragen dazu bei. Durch ihre unterschiedliche chemische Eigenschaft hemmen Antioxidantien unerwünschte Sauerstoffeinwirkung und verhindern so oxidativ schädigende Veränderungen im betroffenen Gewebe.

Das Abfangen freier Radikale, Entgiftung und Abbau reaktiver Sauerstoffspezies, Unterbrechung der bereits stattgefundenen Lipidperoxidationskette, lokale Reduzierung der Sauerstoffkonzentration sowie Chelat-Bildung pro-oxidativ wirkender Übergangsmetalle zählen zu den wichtigsten Schutzmechanismen der Antioxidantien. Es gibt Antioxidantien, die im Organismus selbst produziert werden und solche, die mit der Nahrung ausreichend zugeführt werden müssen. [7]

Die antioxidative Kapazität kann mit Hilfe verschiedener Testsysteme gemessen werden, die auf unterschiedliche Parameter basieren können, jedoch das Testprinzip bleibt bei allen Methoden gleich.

## 2.6 Antioxidative Schutzmechanismen gegen ROS

Alle aeroben Organismen verfügen über zahlreiche Mechanismen die schädigene Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies abzuschwächen oder zu verhindern. Dazu gehören enzymatische und nichtenzymatische Schutzmechanismen.

### 2.6.1 Enzymatische Schutzmechanismen

#### Superoxid-Dismutase (SOD)

In allen Eukaryotenzellen vorkommend katalysiert SOD die Umsetzung aus zwei Superoxid-Radikale-Anionen zu wenig aggressiveren Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. (Abb. 1)



Wasserstoffperoxid kann weiter über Katalasen disproportioniert werden. Es handelt sich um Metalloenzyme, die im katalytischen Zentrum je nach Spezies die Übergangsmetallionen Cu (Zn), Fe oder Mn haben. [4]

Zwei dieser Enzyme sind bekannt und zwar eine zytoplasmatische und eine mitochondriale SOD. [5]

### Katalase (CAT)

Wie SOD katalysieren sie eine Dismutation. Aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ .

Katalase ist ein Hämprotein, welches für die katalytische Spaltung verantwortlich ist und überall in Säugetiergewebe vorkommt. In Hepatozyten befinden sich Katalasen vorwiegend in den Peroxisomen und entgiftet freigewordenes Wasserstoffperoxid. [4]

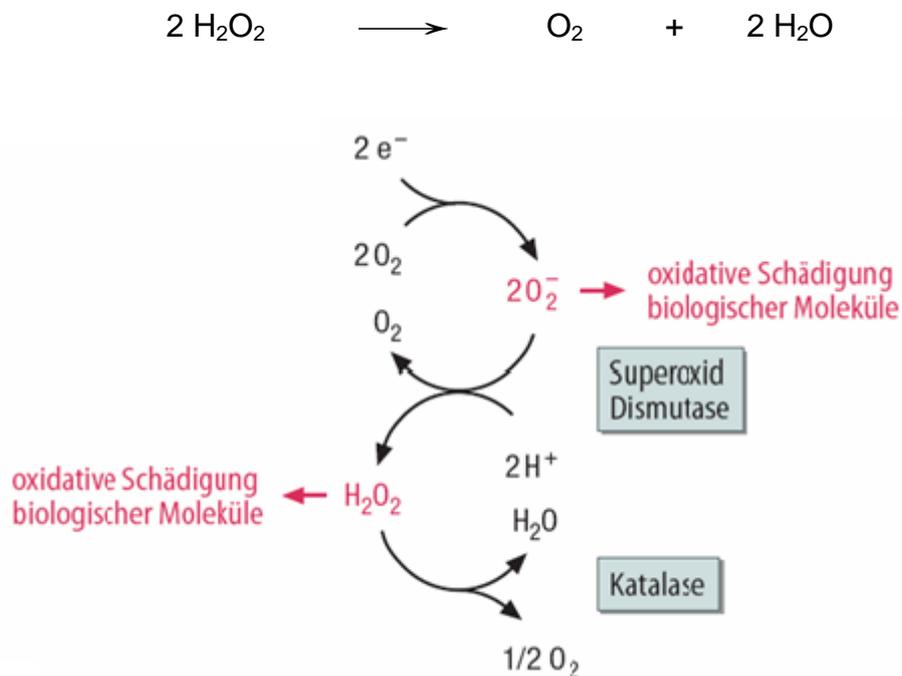


Abb. 3: Entstehung und Abbau reaktiver Sauerstoffspezies [2]

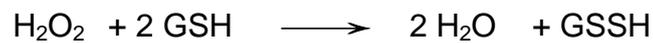
### Glutathion-Peroxidase (GPX)

Unter Verbrauch des Tripeptids Glutathion (GSH) reduzieren diese Glutathion-Peroxidasen  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Im Gegenzug wird Glutathion oxidiert zum GSSH und dadurch die Glutathion-Reduktase regeneriert.

Das essentielle Spurenelement Selen befindet sich im aktiven Zentrum des cytosolischen Enzyms. Unter Normalbedingungen kann durch die Einwirkung von Katalase und GPX die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration in der Zelle mehr oder weniger konstant

gehalten werden. Im Gegensatz zu Katalase ist GPX noch in der Lage mit Lipidhydroperoxiden von ungesättigten Fettsäuren, Steroide, Nukleotide u. a. zu reagieren. [4]

Über dieses Abfangsystem von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird somit die Bildung von Sekundärradikalen wie Hydroxy-Radikalen und Perhydroxyl-Radikalen aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  verhindert.



Das reduzierte Glutathion (GSH) ist wie bereits erwähnt ein Tripeptid, welches aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein besteht. Aufgrund der Thiol-Gruppe des Cysteinyrestes fungiert es als Elektronendonator und kann direkt unter Bildung der oxidierten Disulfidform mit Radikalen reagieren bzw. diese abfangen.

Glutathion selbst kommt in fast allen eukaryotischen Zellen in besonders hoher Konzentration vor und ist das wichtige Molekül im antioxidativen Stoffwechsel der Zelle. Besonders bei der Entgiftung von Arzneimittel und anderen Xenobiotika spielt Glutathion eine wichtige Rolle.

Während der Oxidation durch das Cytochrom  $\text{P}_{450}$  werden kleine Mengen von Radikalen gebildet, dessen schädigende Wirkung auf Zellproteine oder Membranen durch Konjugation mit Glutathion neutralisiert wird. Ist jedoch die Menge an Substanz, die entgiftet werden soll zu groß wird folglich die Glutathion-Konzentration in der Zelle verringert. Die antioxidative Abwehr ist erst dann nicht mehr gewährleistet, wenn die Konzentration auf 20-30% des Ausgangswertes absinkt. Daraus resultiert der Zelltod durch Aktivierung der Apoptose. [5]

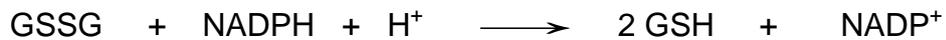
### **Glutathion-S-Transferasen**

Diese Schlüsselenzyme können reaktive Verbindung mit GSH neutralisieren indem sie Acetylcystein und Cysteiny-Leukotriene bilden.

Sie haben auch die Fähigkeit als selen-unabhängige Glutathion-Peroxidase (GPX) bereits gebildetes organisches Hydroperoxid ( $\text{ROOH}$ ), aber nicht  $\text{H}_2\text{O}_2$  umzusetzen.



Die **NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase** kann das oxidierte Glutathiondisulfid (GSSG) wieder zum GSH reduzieren.



Über die Glucose-6-Phosphat Reaktion wird wiederum NADPH nachgeliefert. [4]

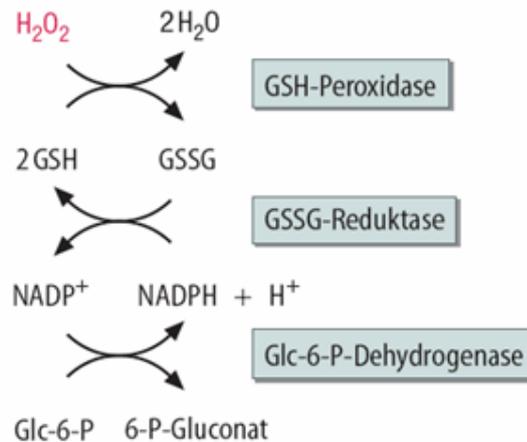


Abb. 4: Abbau reaktiver Sauerstoffspezies

## 2.6.2 Nicht enzymatische Schutzmechanismen (Antioxidantien)

Auch mit der Nahrung zugeführte Substanzen können antioxidativ wirken. Dazu gehören die Ascorbinsäure, Tocopherole, Ubichinon (Coenzym Q) und Pflanzeninhaltsstoffe wie zum Beispiel Carotinoide, Flavone, oligomere Procyanidine, Catechine, Terpene, Lignane und Steroide, die eine phenolische Gruppe in ihrer Struktur aufweisen. Daher ist eine ausreichende Zufuhr von Vitaminen, Spurenelementen und Mineralstoff sehr wichtig.

### Vitamin C (Ascorbinsäure)

Die wasserlösliche Ascorbinsäure ist ein starkes Reduktionsmittel, welches in der Lage ist  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  umzusetzen. In zweimalige 1-Elektronenübertragungsschritte wird Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure oxidiert. Dabei kann Ascorbat direkt mit reaktiven Sauerstoffverbindungen reagieren und diese abfangen.

Das Ascorbyl-Radikal entsteht als Zwischenprodukt, das von einer NADPH-abhängigen Reduktase zu Ascorbinsäure reduziert wird bzw. durch Reaktion

zweier Ascorbyl-Radikal Moleküle zu Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure. Diese Dehydroascorbinsäure wird weiter über eine GSH-abhängige DHA-Reduktase wieder zu Ascorbinsäure reduziert. [2]

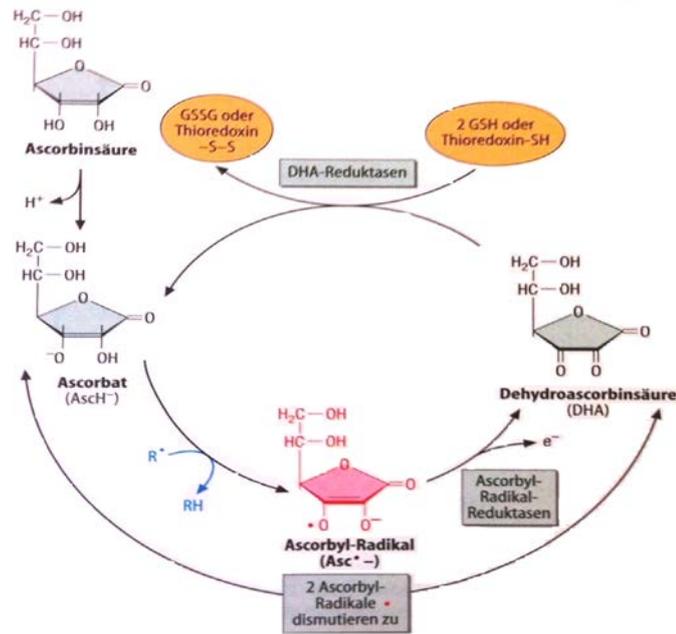


Abb. 5: Ascorbinsäure als reversibles Redox-System [2]

Aufgrund dieser Reaktionsfähigkeit gilt Ascorbinsäure als Radikalfänger bzw. Antioxidans. Von besonderer Bedeutung für die antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure ist die Eliminierung von Lipidperoxid-Radikalen, wo Tocopherole mit einbezogen werden. (siehe Abb. 6)

### Vitamin E (Tocopherole)

Das wichtigste lipidlösliche Antioxidans - hauptsächlich  $\alpha$ -Tocopherol - wird aufgrund ihrer lipophilen Struktur in Membranen eingebaut. Peroxid-Radikale von mehrfach ungesättigten Fettsäuren reagieren mit lipophilen Tocopherole. Dabei entstehen Tocopherol-Radikale, welche wiederum durch Umsetzung mit Ascorbat zu Tocopherole regeneriert bzw. reduziert werden. Die dabei entstandenen Ascorbat-Radikale, die nur schwach reaktiv sind, werden weiter zu Ascorbat und Dehydroascorbat umgesetzt. [2]

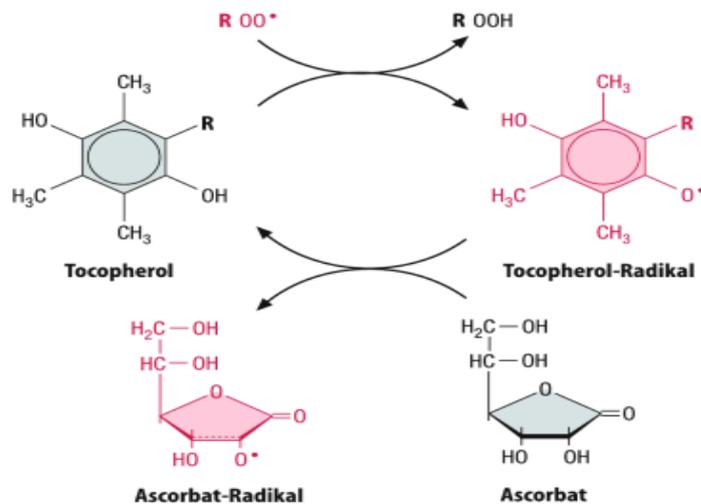


Abb. 6 Unterbrechung der Lipidperoxidationskette [2]

Somit besitzt Tocopherol die Fähigkeit entstandene Lipidperoxid-Radikale zu neutralisieren und auf diese Weise die Lipidperoxidationskette zu unterbrechen.

### Vitamin A

$\beta$ -Carotin ist die Vorstufe für die Bildung von Vitamin A und wird daher als Pro-Vitamin A bezeichnet. Es handelt sich um fettlösliche Pflanzenfarbstoffe, die aus 8 Isopreneinheiten mit einer Vielzahl von Methylgruppen bestehen. Sie befinden sich sowohl in der Retina als auch in der Haut und können Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$  unschädlich machen, die bei photooxidativen Prozessen entstehen.

Daher besitzt  $\beta$ -Carotin eine schützende Wirkung vor übermäßiger Sonneneinstrahlung, verhindert folglich die vorzeitige Hautalterung und senkt das Risiko an Hauttumoren zu erkranken. [1] [4]

### Selenreiche Pflanzenprodukte

Das lebenswichtige Spurenelement Selen ist selbst kein Antioxidans, wirkt jedoch als Cofaktor der Glutathionperoxidase und ist daher ein wichtiger Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems. [5]

### Phenolverbindungen

Den pflanzlichen Polyphenole wird eine antioxidative Wirkung zugeschrieben. Charakteristisch sind ihre Strukturelemente durch mindestens eine Hydroxylgruppe, welche an einem Benzolring gebunden sind. Solche Verbindungen

können in unterschiedlicher Variation in Pflanzen vorliegen wie beispielweise in Flavonoiden. Wegen ihres Grundgerüsts sind sie fähig reaktive Sauerstoffspezies abzufangen und Chelat-Komplexe zu bilden, welche prooxidative Übergangsmetalle stark einschränkt oxidativen Stress auszulösen. [3]

Polyphenole besitzen auch hemmende Effekte auf prooxidative Enzyme. Zu diesen Enzymen gehören Lipoxygenasen, Myeloperoxidase, NADPH-Oxidase sowie induzierbare NO-Synthase und Xanthinoxidasen.

Flavonoide sind vermehrt vorhanden in Rotwein, roten Traubensaft, Kakao, grünem und schwarzen Tee, sowie in diverse Obstarten und Fruchtsäfte. [1]

## 2.7 Freie Radikale und Kanzerogenese

Hochreaktive Sauerstoffspezies können wie bereits erwähnt entweder direkt oder indirekt mit der DNA interagieren. Durch Oxidation der Base Guanin kommt es zur Bildung von 8-Hydroxyguanin. Diese DNA-Veränderung führt zu einer fehlerhaften Basenpaarung mit Adenin und löst somit eine Mutation aus. 8-Hydroxyguanin gilt als Biomarker der Karzinogene. [5]

Die am häufigsten gefundenen Punktmutationen in oxidativ angegriffener DNA sind G:C – zu A:T- Transitionen und G:C – zu T:A- Transversionen. Translokationen können auch durch DNA-Strangbrüche verursacht werden. [8]

Tab. 1.: Oxidativer Stress induziert DNA-Schäden und Mutationen [8]

Agens		DNA-Schaden		Mutationen
*OH <sup>•</sup>	→	8 - OH - dG	→	G: C -> A: T-Transition G: C -> T: A-Transversion
		DNA-Strangbrüche	→	Gen-Translokationen
*NO	→	Deaminiert C, Methyl-C	→	G: C -> A: T-Transition G: C -> T: A-Transversion
*NO + *O <sub>2</sub> <sup>-</sup> → ONOO <sup>-</sup>	→	Deaminiert C, Methyl-C 8-O-dG 8-NO <sub>2</sub> -dG	→ →	G: C -> A: T-Transition G: C -> T: A-Transversion ?
Lipidperoxidation				
→ HNE und andere Aldehyde	→	Ethno - dG Ethno - dA	→	G: C -> T: A-Transversion

Auch chronisch entzündliche Vorgänge sind mit der Freisetzung von ROS und dessen Produkten der Lipidperoxidation verbunden, die eine Reihe von

Folgereaktionen auslösen, was zu Mutation und posttranslationale Modifikation an Proteinen führen kann. Weiters kann es zur Unterbrechung relevanter zellulärer Funktion kommen, sodass beispielsweise die DNA-Reperaturmechanismen in ihrer Funktion eingeschränkt werden oder gänzlich ausfallen können. Es kann auch zu Fehlfunktion von Wachstums- und Signalfaktoren führen, sowie Störung des Apoptosesignals. [5]

Nicht nur ROS werden bei entzündlichen Prozessen gebildet, sondern auch reaktive Stickstoffmonoxide, die aus NO-Synthese hervorgehend durch Zytokine induziert werden. Die Wirkungen der Stickstoffmonoxide sind ambivalent. Auf der einen Seite wirkt es entzündungshemmend und zytotoxisch gegen pathogene Mikroorganismen und auf der anderen Seite beeinflusst es das Protein p53. [5]

In Gegenwart von Sauerstoff kann Stickstoffmonoxid in  $N_2O_3$  umgesetzt werden, das ein starkes Nitrosierungsreagenz ist und fähig z.B. Guanin zu Xanthin, Adenin zu Hypoxanthin und Zytosin zu Uracil zu deaminieren. Genau diese deaminierten DNA-Basen, verursacht durch RNS, sind häufig verantwortlich für Mutationen in p53-Gen. [8]

Dieses 53-Dalton Protein ist verantwortlich für die Aktivierung der Apoptose. Es kann die Zellteilung, dessen DNA geschädigt ist, verhindern. Kommt es jedoch zu einer Veränderung des p53 kann dieses die geschädigte DNA nicht mehr binden, um den programmierten Zelltod auszulösen. Somit führt dies zu einer unkontrollierten Zellteilung. [5] [6]

Tab.2.: Chemische Veränderungen der DNA durch genotoxische Kanzerogene [8]

Kanzerogen	Veränderung
Aromatische Amine	C <sup>8</sup> - und N <sup>2</sup> -Guanin und N <sup>6</sup> -Adeninaddukte
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	N <sup>2</sup> -Guanin und -Adeninaddukte
Methylierende und ethylierende Substanzen	O <sup>6</sup> -Guaninaddukte, O <sup>2</sup> -, O <sup>4</sup> -Thyminaddukte, Depurinierung
Aflatoxin B <sub>1</sub>	N <sup>7</sup> -Guaninaddukte
Olefine (Ethen, Ethylenoxid, Vinylchlorid)	Ethenoaddukte an Adenin, Guanin und Zytosin
Interkalierende Agenzien (Daunorubicin, Doxorubicin, Mitoxantron, PhIP, PAK, 9-Aminoacridine)	Deletion bzw. Insertion von Basen während der Replikation
Bifunktionelle Agenzien, Mitomycin C	Strangvernetzung, Protein-DNA-Bindungen
UV-Strahlung	Pyrimidindimere, Protein-DNA-Bindungen
Ionisierende Strahlung Radikalbildner: Daunorubicin, Doxorubicin, Bleomycin, ROS	Doppel- und Einzelstrangbrüche, Clastogenese, Hydroxylierung von Thymin und Guanin, Depurinierung, Depyrimidinierung, Protein-DNA-Bindungen

Solche genotoxische Prozesse können durch Entzündungen zu Kanzerogenese beitragen. Demnach wird ROS eine große Bedeutung auch bei anderen Krebsursachen zugeschrieben. [8]

ROS kann auch einen gegenteiligen Effekt haben und zwar anti-kanzerogen wirken, indem sie in Krebszellen Apoptose oder Nekrose induzieren. [6] [14]

Die Wirkung von einigen Zytostatika beruht genau auf diese Eigenschaft ROS vermehrt zu bilden wie z.B. bei Anthracycline, Bleomycin und Cyclophosphamid.

Andererseits aber wie bereits beschrieben, können sie die Proliferation, Angiogenese und Hemmung der Apoptose begünstigen. Genau das gleiche kann man von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) behaupten, die die Cytochrom-Oxidase hemmen und die mitochondriale Atmungskette verlangsamen können, sodass es zu einem verringerten Tumorwachstum kommt. [6] [3] [14]

## **2.8 Pankreaskarzinom**

Bauchspeicheldrüsenkrebs ist wegen des raschen Wachstums eines der aggressivsten bösartigen Tumorformen. Eine frühzeitige Diagnose ist in diesem Fall kaum möglich, da es in frühen Krankheitsstadien kaum Beschwerden verursacht und somit lange Zeit unentdeckt bleibt. Symptome treten erst im fortgeschrittenen Stadium auf. Von allen Krebsarten haben Tumore der Pankreas die schlechtesten Heilungschancen. Pankreaskarzinom ist die vierte häufigste Todesursache bei Frauen und Männer und für 6% aller krebsbedingten Sterbefälle verantwortlich. Nur 24% beträgt die relative Lebenserwartung nach einem Jahr und 5% nach fünf Jahren. [9]

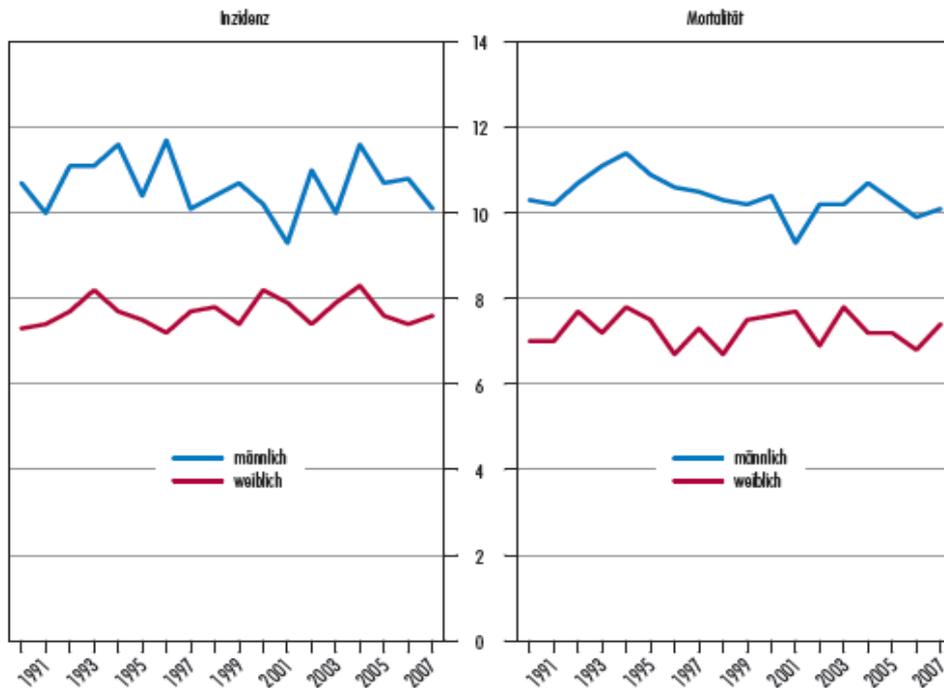


Abb.7: Bösartige Neubildungen der Bauchspeicheldrüse seit 1990 [10]  
altersstandardisierte Rate auf 100.000 Personen

Die alterstandardisierte Rate auf 100.000 Personen beträgt in Österreich sowohl für die Neuerkrankung als auch für die Mortalität pro Jahr rund 9 von 100.000 der Bevölkerung. Das Geschlechterverhältnis der betroffenen Patienten und ihre Todesfälle sind relativ ausgeglichen, wobei die Anzahl der Frauen leicht überwiegt. [10]

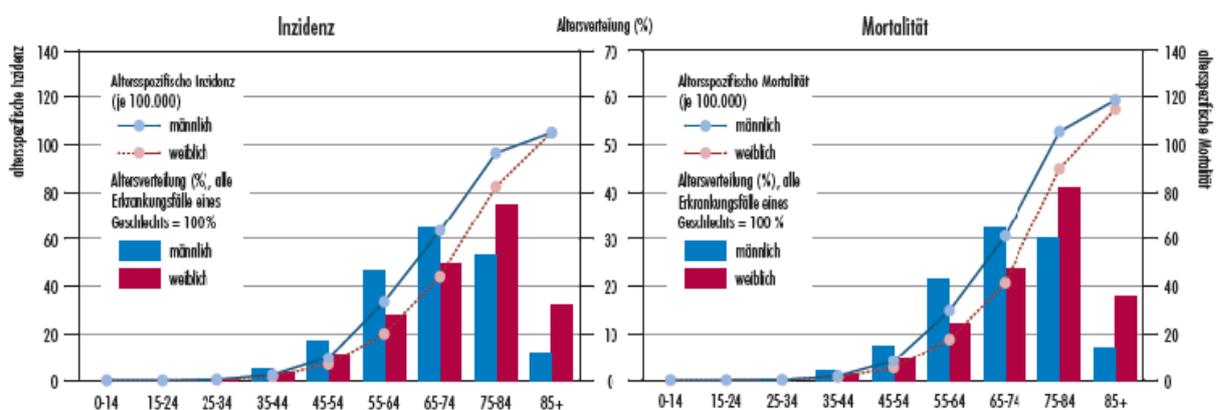


Abb. 8: Altersverteilung und alterspezifische Inzidenz bzw. Mortalität [10]

Betroffen von der Erkrankung sind meistens Personen ab dem 45. Lebensalter. Die Häufigkeit des Pankreaskarzinoms steigt mit dem Alter. Das Durchschnittsalter bei Diagnosen der Männer liegt etwa bei 69 Jahren, jenes der Frauen bei 75. [9] [10]

Das Rauchen zählt zu den wichtigsten Umweltfaktoren an Bauspeicheldrüsenkrebs zu erkranken. Auch Diabetes mellitus wird als Risikofaktor in Verbindung gebracht. Als hohes Erkrankungsrisiko gelten weiters die chronische Pankreatitis, welches meist durch langjährigen Alkoholkonsum verursacht wird und Adipositas, durch Ernährung mit hohem Fettanteil. Eine multizentrale Studie von mehr als 2000 Patienten mit chronischer Pankreatitis hat gezeigt, dass ein 26-mal erhöhtes Risiko besteht Pankreaskarzinom zu entwickeln. Genetische Faktoren spielen eine wesentliche Rolle aggressives Tumorwachstum auszulösen. Untersuchungen haben ergeben, dass Genmutationen des k-RAS, CDKN2, SMad4, p16 sowie p53 für die häufigsten Veränderungen der Fälle verantwortlich sind. [9]

Anatomisch gesehen ist die Bauchspeicheldrüse ein etwa 15-20 cm lang gestrecktes und 100g schweres Organ, welches im Oberbauch hinter dem Magen liegt. Unterschieden werden drei Abschnitte: [11]

- Pankreaskopf: liegt in der Biegung der Duodenalschleife
- Pankreaskörper: überquert in Höhe des ersten und zweiten Lendenwirbelkörper die Wirbelsäure und die Hauptschlagader
- Pankreasschwanz: erstreckt sich bis zur Milz

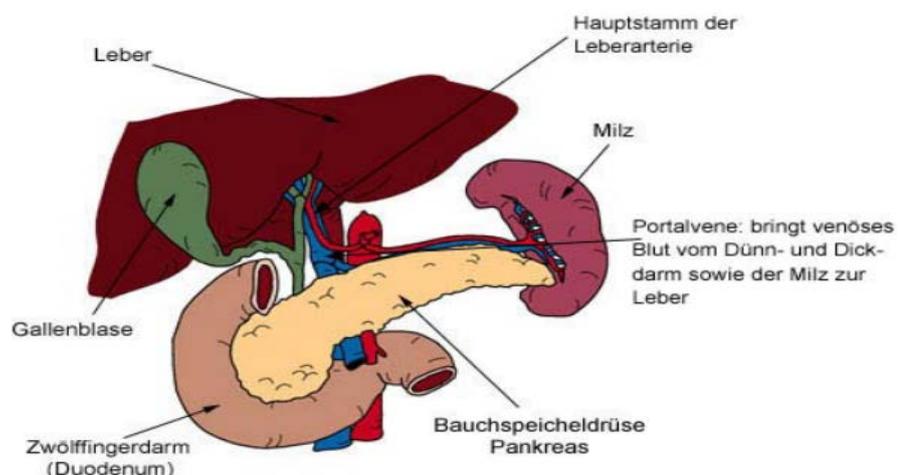


Abb. 9: Lage des Pankreas

Das Pankreas ist ein lebenswichtiges Organ, welches sowohl exokrine als auch endokrine Funktionen erfüllt. Als endokrin bezeichnet man die Produktion und Sekretion von Hormonen wie Insulin und Glukagon. Tritt hier eine Funktionsstörung auf, so führt dies zu Diabetes mellitus. Ist jedoch die exokrine Funktion beeinträchtigt, die zu 90% aus Verdauungsenzyme, hauptsächlich proteolytische Enzyme besteht, können aufgenommene Nährstoffe unverwertet ausgeschieden werden. Der Erkrankte verliert zunehmend an Gewicht, wird kraftlos und verhungert trotz ausreichender Nahrungsaufnahme. [11]

90% aller Adenokarzinome sind duktales bzw. epitheliales Ursprungs. Schätzungsweise 60-70% der Karzinome entstehen im ersten Drittel des Pankreas, dem Pankreaskopf. Etwa 10% werden im Pankreaskörper und 15% im Pankreasschwanz lokalisiert. [12]

Mehrere Studien haben gezeigt, dass in Pankreaskarzinomen eine Überexpression von verschiedenen Wachstumsfaktoren (EGF, EGF-R, TGF- $\alpha$  und VEGF) und dessen Rezeptoren stattfindet. Über Signaltransduktionskaskaden wird die vermehrte Zellproliferation induziert und Metastasierungsprozesse durch Angiogenese begünstigt. Die epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor(EGFR)-Familie spielt eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese von duktalem Pankreaskarzinom. [12] [13]

Bei lokal begrenztem Tumor, das bei 10-15% aller Patienten vorkommt, bietet die operative Therapie die bestmögliche potentielle Heilungschance. Dennoch überleben nur wenige Betroffene die ersten fünf Jahre. Mehr als 50% aller Patienten zeigen ein fortgeschrittenes Krebsstadium, das bereits Metastasen in Lymphknoten, der Leber oder Lunge zerstreut hat. Daher werden Chemotherapie und Strahlentherapie bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom palliativ und adjuvant eingesetzt. [12]

### **2.8.1 Chemotherapie**

Den Patienten werden antineoplastische Agenzien verabreicht, dessen Ziel es ist unkontrolliertes Zellwachstum zu verhindern.

Die palliative Chemotherapie sowohl beim lokal fortgeschrittenen als auch beim metastasierenden Pankreaskarzinom beinhaltet als *first-line-therapy* Gemcitabin. Für die Kombination von Gemcitabin und Erlotinib konnte ein signifikanter Überlebensvorteil gezeigt werden im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin. [12] [9]

Jedoch wurde für die Kombinationsbehandlung aus Gemcitabin und Capecitabin keine Verbesserung der klinischen Beschwerden bzw. der Lebensqualität nachgewiesen als vergleichsweise mit Gemcitabin alleine. [12] [9]

Bei Capecitabin (*Handelsname Xeloda<sup>®</sup>*) handelt es sich um ein Prodrug von 5-Fluoruracil, welches zum aktiven Antimetaboliten umgewandelt wird. Es inaktiviert die Thymidilat-Synthetase und hemmt folglich die DNA-Synthese. Als falscher Baustein wird 5-Fluoruracil auch in die RNA eingebaut. [15]

Das Zytostatikum Gemcitabin (*Handelsname Gemzar<sup>®</sup>*) ist ebenfalls ein Antimetabolit und stellt auch ein fluoriertes Pyrimidinanalogon (Difluor-Cytarabin) dar. Intrazellulär wird Gemcitabin in aktive Diphosphat- und Triphosphatnucleotide umgesetzt und hemmt somit die Bildung von Cytidindiphosphat in Desoxycytidindiphosphat. Das führt zum DNA Abbruch und anschließend zur Apoptose. Weiters hemmt es die RNA-Synthese durch Gemcitabintriphosphat. [15]

Erlotinib (*Handelsname Tarceva<sup>®</sup>*) hingegen wirkt als Tyrosinkinase-Hemmer des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR). [13]

## 2.9 Erlotinib (*Handelsname Tarceva<sup>®</sup>*)

### 2.9.1 Beschreibung

Erlotinib liegt als Hydrochloridsalz vor mit dem chemischen Namen N-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)-4-quinazolinamine, das folgende chemische Struktur besitzt: [16]

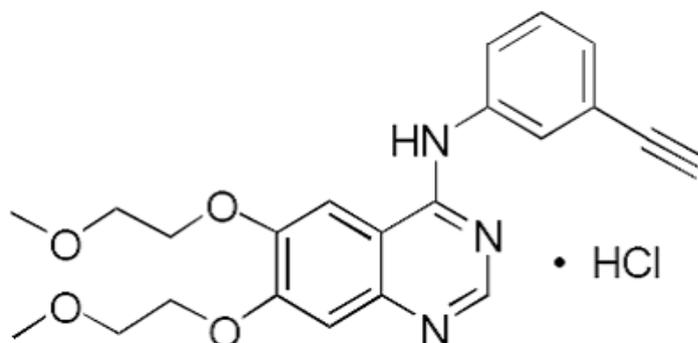


Abb. 10 : Strukturformel von Erlotinib [16]

Die maximale Löslichkeit des Erlotinib-Hydrochlorids beträgt bei 0,4 mg/ml bei einem pH-Wert von zwei. [16]

## 2.9.2 Pharmakodynamik

Pharmakologisch gesehen ist Erlotinib, das vor allem bei der Behandlung von Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom eingesetzt wird, ein oral wirksamer selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), die membranständig auf Tumorzellen überexprimiert vorliegen. Kommt es zur Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes, so führt dies zur Rezeptor-Dimerisierung, was wiederum zu einer ATP-abhängigen intrazellulären Autophosphorylierung von Tyrosin-OH-Gruppen der Rezeptoren führt. Diese Phosphorylierung verursacht eine komplexe Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade (RAS-RAF-MEK-MAPK), das vom Cytoplasma bis zum Zellkern übermittelt wird und die Gentranskription in ihrer Aktivität beeinflusst. Dieser Signaltransduktionsmechanismus ist daher an der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Tumor-induzierten Angiogenese sowie an der reduzierten Apoptose beteiligt. Erlotinib greift an der Tyrosinkinase-Domäne an, verhindert auf diese Weise die Phosphorylierung und unterdrückt somit die intrazelluläre signalvermittelte Tumorzellproliferation. Es bewirkt ein Wachstumsstillstand beziehungsweise die Apoptose. [13]

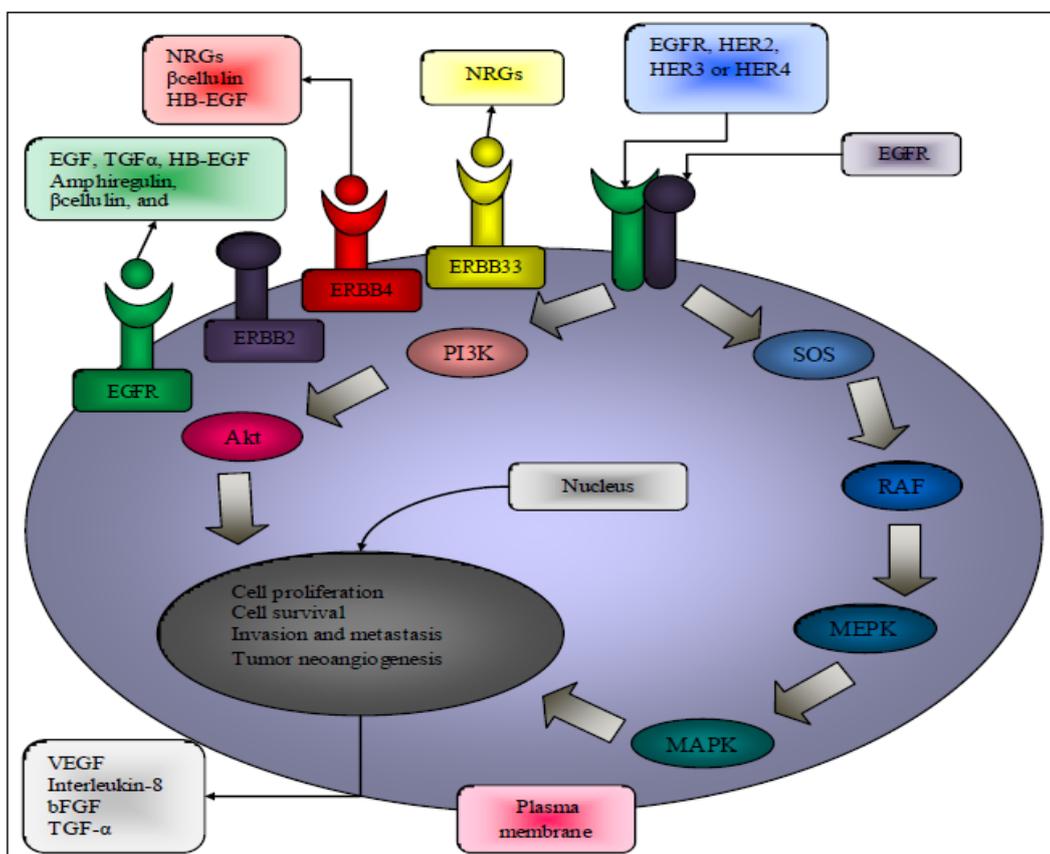


Abb. 11: Signaltransduktionsweg kontrolliert durch Aktivierung von EGFR [13]

### 2.9.3 Indikation und Dosierung

Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, bei denen eine Standardchemotherapie nach vier Zyklen versagt hat bzw. ihr Krankheitszustand unverändert blieb, wird Erlotinib als Monotherapie eingesetzt. Hier ist die empfohlene Dosierung bei 150mg einmal täglich, das am besten eine Stunde vor oder zwei Stunden nach der Mahlzeit eingenommen werden soll. Zur Behandlung von metastasiertem Pankreaskarzinom erhalten Patienten eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin als *first-line-Therapie* und Erlotinib. In diesem Fall liegt die empfohlene Dosis bei 100 mg, das ebenfalls einmal täglich mit den gleichen Mahlzeitintervallen in Kombination der Gemcitabin-Behandlung eingenommen werden soll. [17]

Tab. 3: Anwendungsgebiete und Dosierung von Erlotinib

<b>Indikation</b>	<b>Dosis</b>
Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	150mg 1 mal tägl
Pankreaskarzinom	100mg 1 mal tägl

### 2.9.4 Pharmakokinetik

Die maximale Plasmakonzentration von Erlotinib wird ungefähr 4 Stunden nach der oralen Gabe erreicht bei einer absoluten Bioverfügbarkeit von 59%. Im Rahmen einer Studie wurde die Metabolisierung und Ausscheidung von Erlotinib [18] untersucht, wobei sich herausstellte, dass Erlotinib hauptsächlich im Körper metabolisiert wird und nur 2% unverändert ausgeschieden werden. 83% werden in Form der Metabolite über den Stuhl ausgeschieden und 8% werden renal eliminiert. [18] [17]

Die durchschnittliche scheinbare Clearance nach Gabe von 100mg Erlotinib ergibt 4,47l/h bei einer Halbwertszeit von 36,2 Stunden. Daher muss mit etwa 7-8 Tagen gerechnet werden bis sich die Plasmakonzentration im Steady-State Bereich befindet. [17]

In der Leber erfolgt die Metabolisierung von Erlotinib durch das Cytochrom-P<sub>450</sub>-System. Es wird überwiegend durch CYP 3A4 und in geringerem Ausmaß auch durch CYP 1A2 und ihre extrahepatische Isoform CYP 1A1 verstoffwechselt. [18]  
Die Metabolisierung lässt sich in drei Hauptbiotransformationswege einteilen:

1. O-Demethylierung einer bzw. beider Seitenketten, mit nachträglicher Oxidation zur Carbonsäure (29,4%)
2. Oxidation des Acetylen-Anteils, mit anschließender Hydrolyse zu Aryl-Carbonsäure (21%)
3. Hydroxylierung des aromatischen Phenyl-Acetylen-Anteils (9,6%)

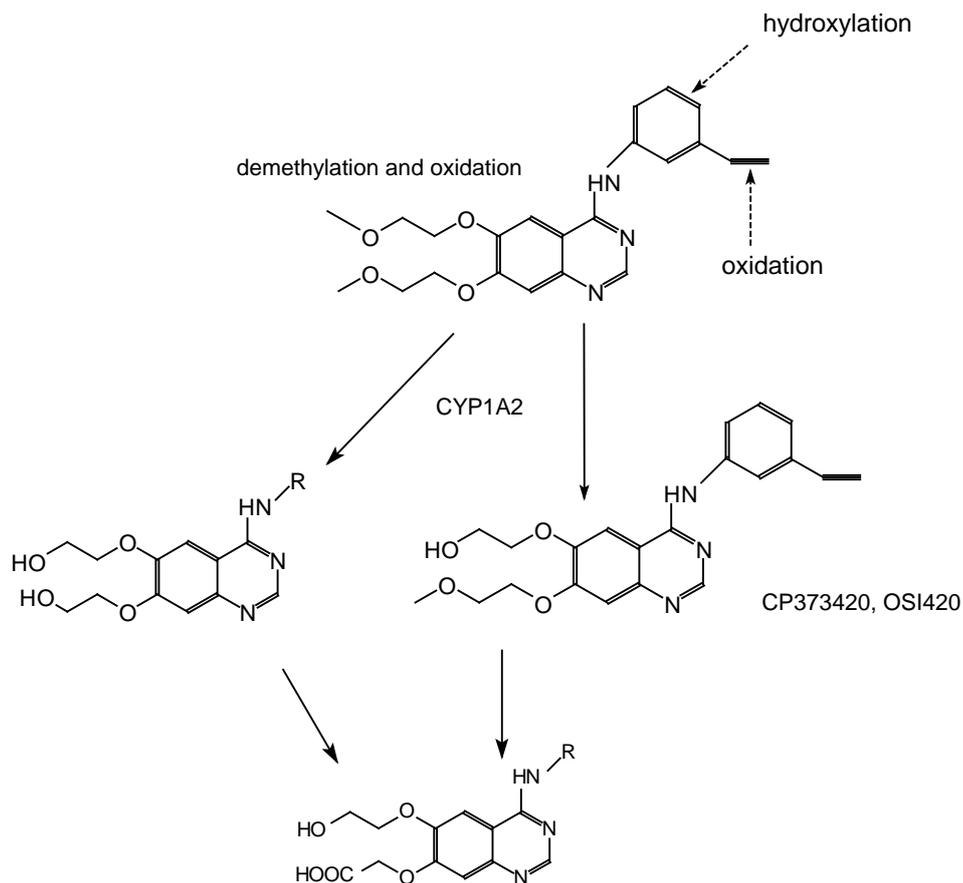


Abb. 12: Hauptbiotransformationswege von Erlotinib

Zwei aktive Hauptmetabolite von Erlotinib wurden identifiziert und zwar OSI-420 und OSI-413, die beide durch O-Demethylierung einer Seitenkette entstehen. Sie weisen ähnliche pharmakokinetische und somit auch pharmakologische Eigenschaften wie Erlotinib auf. [17]

### 2.9.5 Nebenwirkungen und Interaktionen

Akneartige Hautausschläge und Diarrhö wurden als die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen berichtet. Weiters können auch Beschwerden wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen auftreten. [17] [16]

Eine Arzneimittelinteraktion kann mit Protonenpumpenhemmer, Antazida und H<sub>2</sub>-Antagonisten eingegangen werden, weil dadurch der pH-Wert verändert wird, welcher sich auf die Löslichkeit des Erlotinib auswirkt. Somit kann dies zur Veränderung der Bioverfügbarkeit führen. Auch können CYP 3A4-Induktoren wie beispielsweise Antiepileptika oder Rifampicin die Wirksamkeit von Erlotinib herabsenken. Und umgekehrt kann ihre Toxizität erhöht werden durch CYP 3A4-Inhibitoren wie mit Antimykotika, Proteaseinhibitoren oder Erythromycin. Zusätzlich kann bei Rauchern eine gesteigerte Erlotinib-Clearance begünstigt werden, was eine reduzierte Plasmakonzentration zur Folge hat. [16] [17]

Im Rahmen einer Studie [19] wurde überprüft, ob Erlotinib eine potentielle anti-tumor Aktivität durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einer menschlichen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie entwickelt. Diese Untersuchungen haben ergeben, dass die Entwicklungsfähigkeit der Tumorzellen sich verringert, die Apoptose induziert wird, und dies gekoppelt ist mit einer raschen Akkumulation von ROS. Superoxid-Anionen werden gebildet. Zusätzlich beschleunigt Erlotinib die mitochondriale Atmungskette und erhöht bei dem Enzym NADPH-Oxidase die Expression einer bestimmten Untereinheit, die für ihre katalytische Aktivität verantwortlich ist. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von ROS von beiden Quellen ausgeht, sowohl über den mitochondrialen Weg als auch durch die NADPH-Oxidase. Weiters wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie und Western-Blot Analyse besagt, dass Erlotinib einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verursacht, sowie die Freisetzung von Cytochrom C und Apoptose-induziertem Faktor (AIF) beschleunigt. Somit weist Erlotinib eine weitere potentielle anti-tumor Aktivität auf, welches durch ROS-abhängige Apoptose hervorgerufen wird. [19]

### 3. Rationale

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollen reaktive Sauerstoffspezies während einer kombinierten Chemotherapiebehandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms quantifiziert werden. Anschließend soll herausgearbeitet werden, in wie fern die kombinierte Chemotherapie den oxidativen Stress sowie die antioxidative Kapazität der behandelten Patienten beeinflusst.

Hierzu wurden besonders die Erlotinib-Konzentrationen im Blutplasma, sowie der oxidative Stress und die antioxidative Kapazität der betroffenen Patienten in unterschiedlichen Phasen der Behandlung gemessen und miteinander in Korrelation gebracht.

Das Chemotherapieschema bestand aus:

1. Erlotinib: 100mg, 1 x tägl. bis auf weiteres
2. Capecitabin: 500mg/m<sup>2</sup>, 2 x tägl. über 2 Wochen  
[Wochenproben: Dose Level 3,  
d.h. diese Patienten erhielten 800mg/m<sup>2</sup>, 2 x tägl.]
3. Bevacizumab: 5mg/kg am Tag 1 jeder 2. Woche

Im Rahmen einer klinischen Phase I B Pharmakokinetik Untersuchung wurden die Genese von Sauerstoffspezies sowie die antioxidative Kapazität in Patienten gemessen. Die vorliegende Diplomarbeit ist ein Teil dieser klinischen Phase.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1 Probenvorbereitung

Im Zuge einer klinischen Studie wurden den Patienten, die an fortgeschrittenem Pankreaskarzinom erkrankt sind und eine kombinierte Dreifachchemotherapie aus Erlotinib, Capecitabin und Bevacizumab erhielten, in bestimmten Zeitabständen Blut abgenommen. Die Seren-Proben erhielten wir in tiefgefrorener Form, das auf Trockeneis transportiert wurde.

Zuerst wurden die tiefgefrorenen Seren etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit Hilfe eines Heizblocks vorsichtig auf 34°C aufgetaut. Dann erfolgte eine Zentrifugation der Proben.

### 4.2 Beschreibung des Testgeräts

Mit Hilfe des FORMplus Gerätes (Free Oxygen Radicals Monitor) kann durch eine sofort-diagnostische Methode die oxidative Belastung im Kapillarblut, sowohl die Radialbelastung (*Free Oxygen Radicals Test*) als auch die antioxidative Kapazität (*Free Oxygen Radicals Defence*) gemessen werden. Als ein Spektrophotometer funktionierend, welches auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei einer Wellenlänge von 505nm basiert, wird durch eine kinetischen Messung die Änderung der Extinktion gemessen.



Abb.13: FORMplus Gerät

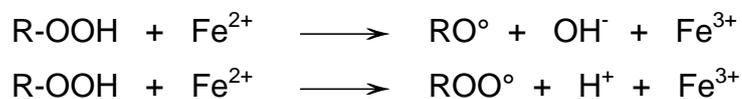
Tab. 4: Technische Daten FORMplus-Messgerät [20]

Messprinzip	Lambert-Beer-Gesetz
Temperatur Lesefach	37 ± 0,2°C
Lichtquelle	LED, Light Emitting Diode, 505nm
Optischer Weg	1cm
Display	Touch Screen, 128x128 Pixel
Testanzahl	5
PC-Software	Easy Store
Interface	USB
Drucker	Thermografisch
Gewicht	ca. 1,1kg
Masse	255 (b) x 273 (l) x 74 (h) mm
Strom	90 – 260V AC 50 – 60 Hz
Energieabsorption	maximal 45 Watt
Arbeitsbedingungen	15 – 34°C (max. Rh 90%)
Zertifizierung	CE-Kennzeichen

### 4.3 Messung der freien Radikale: FORT (Free Oxygen Radicals Test)

#### 4.3.1 Messprinzip

Das Messprinzip beruht auf eine kolometrische Reaktion. Dabei induziert ein Übergangsmetall wie beispielweise Eisen die Bildung von freien Radikalen aus Hydroperoxiden, die übrigens auch bei der Lipidperoxidation als Zwischenprodukt gebildet werden. Diese Testprinzipmethode liegt der *Fenton-Reaktion* zu Grunde:



Die dabei entstehenden Hydroxylradikale reagieren daraufhin mit einem Chromogen, dem Aminoderivat ( $\text{CrNH}_2$ ), wobei ein stabil gefärbtes Amin-Radikal gebildet wird, das bei der Wellenlänge von 505nm photometrisch ermittelt werden kann. Die Intensität der Farbe gemäß dem Lambert Beer'schen Gesetz verhält sich proportional zur Radikalmenge und folglich auch mit dem Oxidationszustand der untersuchten Probe. [20]



#### 4.3.2 Praktische Durchführung

20 µl der Probe wurden mit einer Kapillare entnommen und in die mit Reagenz gefüllten Mikrovette (FORT R2) gegeben, die eine Pufferlösung beinhaltet und anschließend verschlossen. Das Reagenzglas wurde solange mehrmals geschwenkt, bis sich das Kapillarröhrchen vollständig entleert hatte. Der gesamte Inhalt wurde ohne der Kapillare in die quadratische Küvette (FORT R1) gegossen, die ein Chromogenlyophilisat enthält und diese wieder vorsichtig gemischt, bis sich diese Lyophilisatschicht vollständig auflöste. Anschließend wurde die Küvette eine Minute lang bei mindestens 3500UpM in die Mini-Zentrifuge gegeben. Die Lösung in der Küvette sollte nach dem Zentrifugieren möglichst klar sein. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde die Küvette ohne zu schütteln in den Küvettenschaft des FORMplus Messgerätes eingesetzt um die Untersuchung zu starten zu können. Bei dem Einsetzen der Küvette in das Messgerät sollte darauf geachtet werden, dass das Barcode-Etikett nach vorne zeigt bzw. die geriffelten Seiten sich links oder rechts befinden. Das Resultat erhält man nach zwei Messungen, die jeweils drei Minuten dauern und am Display des Messgeräts in FORT-Einheit angezeigt werden. [20]

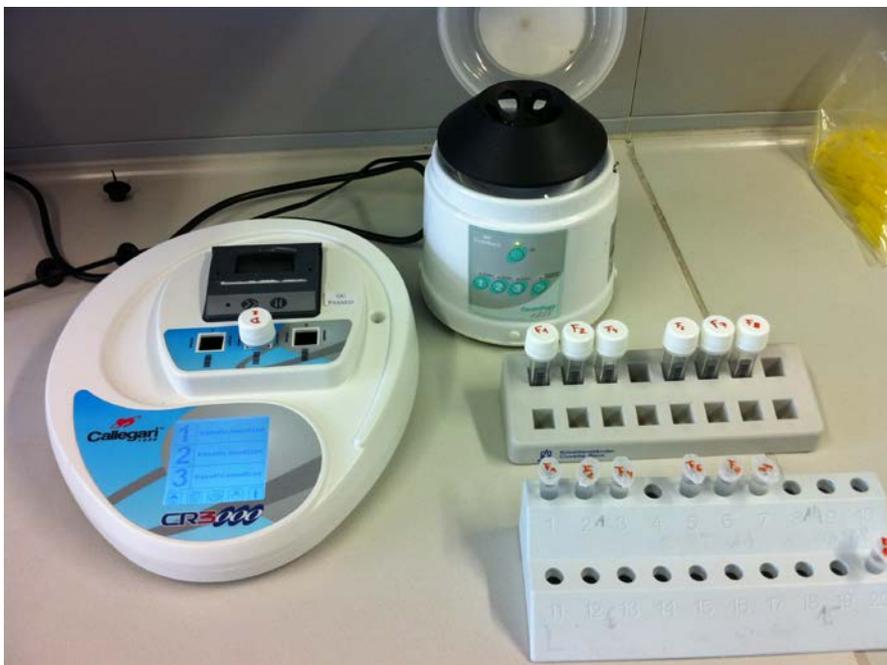


Abb. 14: Durchführung des FORT-Tests

Verwendet wurde die Mini-Zentrifuge vom Modell 6000, die eine kompakte Tischzentrifuge darstellt. Es ist ausgestattet mit einem festen Drehzahl-

Winkelmotor und einer elektromagnetischen Bremse. Zusätzlich verfügt es über ein Sicherheitssystem, welches beim nicht korrekt verschlossenen Deckel das Zentrifugieren verhindert oder den Vorgang automatisch stoppt. Das Modell 6000 enthält Einsätze für bis zu 3 x 2ml quadratische Küvetten oder auch für bis zu 6 x 1,5ml Mikroküvetten. Zu beachten ist, dass sich zwei gleiche gegenüberliegende Flüssigkeitsmengen in Mikroküvetten bzw. Küvetten befinden. Die Zentrifuge ermöglicht eine Einstellung auf entweder eine, zwei oder drei Minuten oder aber auch ein konstant fortlaufendes Zentrifugieren, das maximal 6000 Umdrehungen pro Minute durchläuft. [20]

Tab. 5: Technische Daten Mini-Zentrifuge Modell 6000 [20]

Durchmesser	16cm
Höhe	20cm
Gewicht	ca. 1700 Gramm
Rotor	68mm Ø
Strom	24 Vdc
Maximale Umdrehungen	6000 pro Minute
Laufzeiten	Voreinstellung von 1, 2, 3 Minuten oder ununterbrochenes Laufen
Arbeitsbedingung	14 – 34°C, (max. Rh 90%)
Zertifizierung	CE-Zeichen

#### 4.3.3 Ergebnisse

Die Messung des FORT-Tests basiert auf eine lineare kinetische Reaktion, wobei zwei dreiminütige Messungen hintereinander durchgeführt werden. Aus der Differenz der beiden Messungen kann der FORT-Wert automatisch berechnet werden. Diese FORT-Werte werden auch in äquivalente Konzentrationen von Wasserstoffperoxid angegeben. Dabei entspricht eine FORT-Einheit [1 FORT U] etwa 7,6 µmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,26mg/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Bis zu 310 FORT-Einheiten gelten Werte als normal, die ungefähr 2,3 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausmachen. [20]

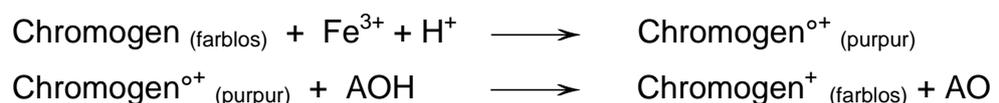
Tab. 6: Werte und ihre Beurteilung

<b>Beurteilung</b>	<b>FORT-Einheit</b>
Gut	bis 230
Grenzbereich	230-310
Oxidativer Stress	310-400
starker oxidativer Stress	über 400

#### 4.4 Messung der Antioxidativen Kapazität: FORD (Free Oxygen Radicals Defence)

##### 4.4.1 Messprinzip

Der FORD-Test beruht auf eine Reduktion der Farbintensität eines gefärbten Radikals, welches sich in Anwesenheit von Substanzen mit oxidationshemmender Wirkung verringert. Zunächst reagiert in saurer Umgebung (pH=5,2) ein geeignetes Oxidants (FeCl<sub>3</sub>) mit einem farblosen Aminoderivat (Chromogen), wobei ein stabil gefärbtes radikalische Chromogen-Kation gebildet wird. Nach etwa 3 - 4 Minuten wird die maximale Absorption bei 505nm erreicht und somit kann eine photometrische Bestimmung vorgenommen werden.



Daraufhin wird eine Probelösung mit oxidationshemmenden Substanzen (AOH) beigefügt, die eine Reduktion der Radikalmenge und dadurch eine Abnahme der Farbintensität erzielt. Ebenfalls wird diese Messung bei 505nm photometrisch erfasst. Das Entfärben der Lösung verhält sich direkt proportional zur Konzentration der antioxidativen Substanzen. [20]

##### 4.4.2 Praktische Durchführung

Die praktische Durchführung bestand aus zwei Messungen. Bei der Erstmessung wurde das stabil gefärbte Chromogen-Kation hergestellt und daraufhin bestimmt. Die vordosierte Pufferlösung mit einem pH-Wert von 5,2 (S2) wurde in die quadratische Messküvette (C1) gegeben, indem sich das feste Chromogen befindet und folglich gelöst. Zusätzlich zu dieser Lösung wurden 50µl des Reagenz

(S3), das ein Oxidans ist hinzugefügt und einige Sekunden geschwenkt. Danach wurde die Messküvette mit dem Barcode-Etikett nach vorne zeigend in den Küvettenschacht des FORMplus-Gerätes eingesetzt. Die erste Messung, die vier Minuten andauert, erfolgte automatisch. In der Zwischenzeit wurde aus der Probe 50µl mit Hilfe einer Kapillare entnommen und in die weiße Eppendorf-Mikrovette (S1), die mit einer Pufferlösung gefüllt ist, eingegeben, verschlossen und vorsichtig geschwenkt. Nun erfolgte eine einminütige Zentrifugation mit einem passenden Ausgleichsgefäß. Nach diesem Ablauf wurden 100µl dieses Überstandes mittels geeigneter Pipette in die gleiche Küvette hinzugefügt mit der die Erstmessung stattfand. Diese Küvette wurde mehrmals geschwenkt und wiederholt unverzüglich in den Küvettenschacht des Geräts eingesetzt. Nun fand die zweite Messung statt, die nach zwei Minuten das Resultat anzeigte. [20]

Nach dem Hinzufügen der Probe muss die Küvette unverzüglich in den Küvettenschacht eingebracht werden, denn die Reaktion zwischen dem Chromogen-Radikal und den Antioxidantien der Probe erfolgt sofort. [20]

#### 4.4.3 Ergebnisse

Aus der Differenz der beiden Messungen wird das Ergebnis der gemessenen kinetischen Reaktion in äquivalente Konzentration (mmol/l) von Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure) angegeben. Daher wird das hydrophile Vitamin E-Derivat Trolox bei dieser Messung als Referenz verwendet, weil es eine bedeutende antioxidative Eigenschaft besitzt. Somit entspricht der FORD-Wert der Fähigkeit Radikale zu reduzieren. Das Referenzintervall liegt zwischen 1.07-1.53 mmol/l Trolox. [20]

Tab. 7: FORT-Referenzwerte

<b>Beurteilung</b>	<b>FORD in mmol/l Trolox</b>
Erniedrigt	<0,9
Normal	0,9-1,4
Gut	>1,4

## 4.5 HPLC-Analyse

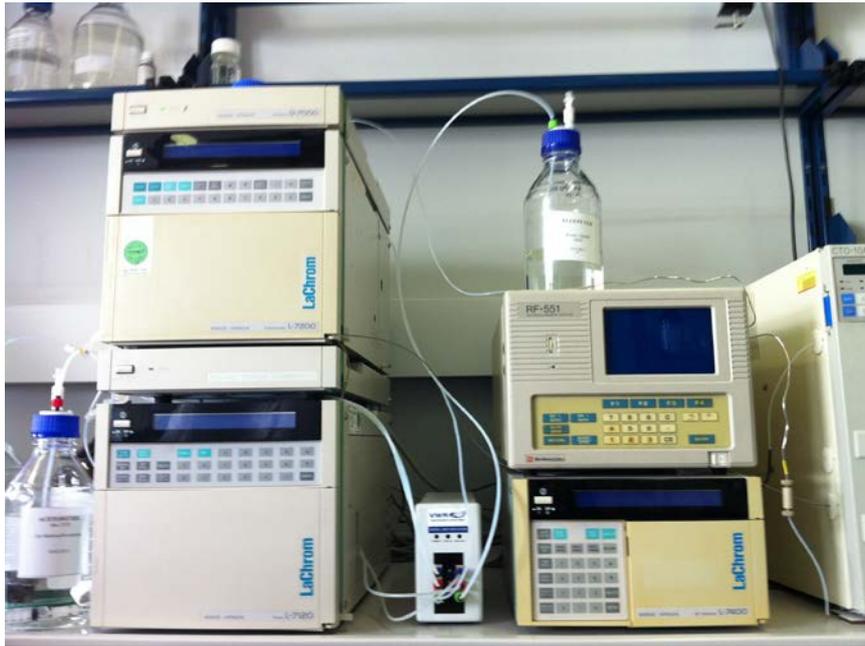
Die Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography) ist ein Verfahren, welches die Auftrennung von Substanzgemischen und dessen quantitative und qualitative Analysen ermöglicht. Das Trennungsprinzip besteht aus einer mobilen- und stationären Phase, wobei die mobile Phase das Substanzgemisch über eine stationäre Phase transportiert.

Im Chromatogramm werden Messwerte als Peaks dargestellt und ihre Retentionszeiten ermöglichen eine qualitative Aussage. Die Peakfläche verhält sich proportional zur Konzentration der ermittelten Substanz. Um eine Peakfläche berechnen zu können, muss eine Integration mittels einer Eichgerade vorgenommen werden. [21]

Tab. 8: Daten der HPLC-Anlage

<b><i>Merck-Hitachi D7000 high performance liquid chromatography system</i></b>	
<b>Vorsäule</b>	Symmetry C8 (Waters), 10 µm, 20 x 4.6 mm ID
<b>Trennsäule</b>	Symmetry C8 (Waters), 3.5 µm, 100 x 4.6 mm ID (11000 plates)
<b>Kartuschensystem</b>	Edelstahl- Kartuschensystem für Vor- und Trennsäule ohne Totvolumen
<b>Säulentemperatur</b>	36°C
<b>Eluent</b>	Methanol – Acetonitril - Wasser (16 + 40 + 44 %, v/v/v), vor der HPLC wird der Eluent 2 Stunden im Ultraschallbad entgast
<b>Flussrate</b>	0.8 ml / min
<b>Druck</b>	120 bar
<b>Injektionsvolumen</b>	30 µl
<b>Detektion</b>	229 nm
<b>Pumpe</b>	L-7100
<b>UV-Detektor</b>	L-7400
<b>Interface</b>	D-7000
<b>Autosampler</b>	L-7200
<b>Säulenofen</b>	Jetstream 2
<b>Hardware</b>	Compaq Deskpro XL 5100 (32 MB RAM, 2 GB Harddisk, Windows NT) Monitor 171FS Drucker: Hewlett Packard Deskjet 600
<b>Software</b>	Windows NT "HSM D-7000" Software zur Kontrolle und Integration

Abb. 15: Verwendete HPLC-Anlage



Die Erlotinib-Konzentrationen aller Patienten wurden von Kollegin Mag. Azra Sahmanovic bereitgestellt.

#### 4.6 Biometrische Berechnungen

Die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte mit folgenden Programmen:

- Microsoft Office Excel® 2003:  
hier wurden Tabellen erstellt, Berechnungen und Auswertungen durchgeführt
- GraphPad Prism®5:  
wurde für graphische Analysen und deren Darstellung der Werte verwendet, sowie für statistische Kalkulationen

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Sowohl die Ermittlung des FORT- als auch des FORD -Wertes erfolgte durch das bereits aufgetaute Blutplasma. Da das Messgerät eigentlich für Vollblut vorgesehen ist, wurden die Seren wie diese auch behandelt. Aber die meisten gemessenen Werte der Patienten überschreiten die Nachweisgrenze des Testgeräts, die bei 600 FORT-Einheiten liegt, daher wurde statt einer 20µl Kapillare wie vorgeschrieben, eine 10µl Kapillare verwendet und die erhaltenen FORT-Werte anschließend mit 2 multipliziert.

Zelluläre Bestandteile wie hauptsächlich Erythrozyten, die im Blutplasma nicht mehr vorliegen, verändern das Volumen im Vergleich zum Vollblut und folglich auch die Konzentration der Radikale. Deshalb erfolgte laut Literatur eine Division der erhaltenen Werte durch den Faktor 1,3. [22]

In dieser Diplomarbeit wurden aus einer über 2 Jahre laufenden klinischen Prüfung 9 Patienten von 27 für die ROS Untersuchung herangezogen.

Die Blutabnahme erfolgte jeweils vor der Chemotherapie (0h), 1 und 6 Stunden nach der Verabreichung. Weiters wurde an den acht darauf folgenden Tagen Blut abgenommen. Die antioxidative Kapazität wurde am ersten Tag vor (0h) und am achten Tag nach der Therapie gemessen. Darüber hinaus wurde an ausgewählten Patienten, die Erlotinib als Langzeit-Medikation erhielten, Blutproben über mehrere Wochen bzw. Monate untersucht.

## 5.1 FORT/FORD-Werte aller Patienten

Tab. 9: FORT/FORD Werte Patient 21

Patient 21	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	290	580	446	1,31
		1	1	269	538	414	
		2	2	228	456	351	
		3	3	268	536	412	
		4	4	224	448	345	
		5	5	256	512	394	
		6	6	321	642	494	
		8	8	228	456	351	
	Tag 2	0	24	188	376	289	
		4	28	211	422	325	
	Tag 3	0	48	308	616	474	
		4	52	259	518	398	
	Tag 4	0	72	286	572	440	
		4	76	269	538	414	
	Tag 5	0	96	202	404	311	
		4	100	241	482	371	
	Tag 6	0	120	308	616	474	
		4	124	197	394	303	
	Tag 7	0	144	247	494	380	
		4	148	241	482	371	
	Tag 8	0	168	352	704	542	
		4	172	310	620	477	1,19

Tab. 10: FORT/FORD Werte Patient 20

Patient 20	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	440	880	677	0,69
		1	1	346	692	532	
		6	6	352	704	542	1,19
	Tag 2	0	24	361	722	555	1,21
		4	28	418	836	643	1,00
	Tag 3	0	48	260	520	400	
		4	52	361	722	555	
	Tag 4	0	72	418	836	643	
		4	76	334	668	514	
	Tag 8	0	168	316	632	486	0,96

Tab. 11: FORT/FORD Werte Patient 19

Patient 19	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	400	800	615	1,89
		1	1	369	738	568	
		6	6	374	748	575	1,47
	Tag 2	0	24	391	782	602	1,77
		4	28	352	704	542	
	Tag 3	0	48	364	728	560	1,3
		4	52	347	694	534	
	Tag 4	0	72	373	746	574	
		4	76	352	704	542	
	Tag 8	0	168	414	828	637	0,95

Tab. 12: FORT/FORD Werte Patient 18

Patient 18	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	405	810	623	1,11
		1	1	458	916	705	
		6	6	418	836	643	
	Tag 2	0	24	383	766	589	
		4	28	365	730	562	
	Tag 3	0	48	409	818	629	
		4	52	387	774	595	
	Tag 4	0	72	499	998	768	
		4	76	458	916	705	
	Tag 8	0	168	480	960	738	0,79

Tab. 13: FORT/FORD Werte Patient 17

Patient 17	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	511	1022	786	<0,25
		1	1	467	934	718	
		6	6	467	934	718	
	Tag 2	0	24	454	908	698	
		4	28	506	1012	778	
	Tag 3	0	48	551	1102	848	
		4	52	502	1004	772	
	Tag 4	0	72	573	1146	882	
		4	76	577	1154	888	
	Tag 8	0	168	600	1200	923	<0,25

Tab. 14: FORT/FORD Werte Patient 15

Patient 15	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	290	580	446	0,65
		1	1	294	588	452	
		6	6	365	730	562	
	Tag 2	0	24	373	746	574	
		4	28	263	526	405	
	Tag 3	0	48	312	624	480	
		4	52	328	656	505	
	Tag 4	0	72	343	686	528	
		4	76	286	572	440	
	Tag 8	0	168	321	642	494	0,39

Tab. 15: FORT/FORD Werte Patient 14

Patient 14	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	303	606	466	0,53
		1	1	321	642	494	
		6	6	387	774	595	
	Tag 2	0	24	395	790	608	
		4	28	387	774	595	
	Tag 3	0	48	467	934	718	
		4	52	392	784	603	
	Tag 4	0	72	413	826	635	
		4	76	409	818	629	
	Tag 8	0	168	600	1200	923	0,84

Tab. 16: FORT/FORD Werte Patient 13

Patient 13	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	484	968	745	0,61
		1	1	568	1136	874	
		6	6	224	448	345	
	Tag 2	0	24	495	990	762	
		4	28	520	1040	800	
	Tag 3	0	48	409	818	629	
		4	52	436	872	671	
	Tag 4	0	72	445	890	685	
		4	76	400	800	615	
	Tag 8	0	168	400	800	615	<0.25

Tab. 17: FORT/FORD Werte Patient 12

Patient 12	Tag	Zeit [h]	Zeit [h]	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3	FORD
	Tag 1	0	0	299	598	460	1,24
		1	1	319	638	491	
		6	6	206	412	317	
	Tag 2	0	24	277	554	426	
		4	28	242	484	372	
	Tag 3	0	48	272	544	418	
		4	52	206	412	317	
	Tag 4	0	72	303	606	466	
		4	76	197	394	303	
	Tag 8	0	168	256	512	394	1,16

Tab. 18: Erlotinib-Konzentrationen in µg/ml

Erlotinib-Konzentration in µg/ml									
Zeit [h]	Pat21	Pat20	Pat19	Pat18	Pat17	Pat15	Pat14	Pat13	Pat12
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,81	0,39	0,48	0,67	0,05	0,04	0,69	0,78	0,03
2	0,68	0,40	0,91	0,68	0,30	0,10	1,58	0,87	0,14
3	0,49	0,21	0,85	0,47	0,47	0,39	1,44	0,57	0,28
4	0,38	0,25	0,97	0,52	0,56	0,43	1,13	0,58	0,29
5	0,34	0,25	0,90	0,47	0,97	0,46	1,23	0,57	0,33
6	0,32	0,29	0,92	0,46	1,04	0,52	1,26	0,69	0,35
8	0,22	0,28		0,47	0,74	0,46	0,93	0,51	0,26
24	0,07	0,12	0,26	0,28	0,04	0,31	0,50	0,24	0,10
28	1,04	0,46	0,93	0,66	0,52	1,11	1,16	0,87	0,44
48	0,37	0,35	0,45	0,55	0,02	0,53	0,54	0,45	0,11
52	0,98	0,69	1,52	0,95	0,85	1,34	1,23	0,52	0,54
72	0,54	0,38	0,73	0,59	0,05	0,67	0,62	0,69	0,14
76	0,73	0,77	1,48	1,34	0,73	1,46	1,23	1,63	0,59
96	0,45	0,62	1,15	0,66	0,13	0,64	0,66	0,70	0,13
100	1,67	1,04	1,97	1,38	3,70	1,23	0,94	1,24	0,53
120	0,65	0,69	0,96	0,53	0,56	0,68	0,87	0,64	0,13
124	1,59	1,08	1,88	1,33	2,43	1,31	1,77	0,96	0,50
144	0,87	0,81	0,99	0,58	0,70	0,85	1,07	0,63	0,23
148	1,54	1,27	1,33	1,21	0,90	1,99	1,97	1,09	1,09
168	0,51	0,98	0,84	1,36	0,69	0,86	1,23	0,62	0,12

Die angeführten Tabellen zeigen die Unterteilung der Patienten in einzelnen Tagen, wobei sie wiederum am Tag 1 in 0, 1 und 6 Stunden, und an den anderen Tagen in 0 und 4 Stunden unterteilt sind. Die darauf folgende Spalte stellt die durchlaufende Zeit von 0-168 Stunden dar. Die Berechnungen der einzelnen Messergebnisse der FORT-Werte für Patienten 21-12 sind nebenan angegeben. Für Patient 19 und 20 wurden 5 FORD-Werte ermittelt. Die restlichen Patienten sind mit 2 FORD-Ergebnisse angeführt und zwar am 1. Tag vor der Chemotherapie (0h) und am 8. Tag 4 Stunden nach der Gabe. Patient 16 kommt nicht vor, weil dieser falsch rekrutiert war.

Weiters sind in Tabelle 17 die einzelnen Erlotinib-Konzentrationen pro Patient in Spalten aufgelistet mit ihren dazugehörigen Zeitangaben.

## **5.2 FORT-Werte im Verlauf des 1. Tages**

Mit den nachstehenden Abbildungen 15-17 folgt nun ein graphischer Überblick der Therapie im Verlauf des 1. Tages. In den einzelnen Diagrammen sind für jeden Patienten die FORT-Werte gegen die Konzentration von Erlotinib in  $\mu\text{g/ml}$  aufgetragen. Im unteren Bereich der Diagramme befinden sich die Erlotinib-Konzentrationen. Die Skalierung auf der rechten Seite gibt die Konzentrationsmenge wieder, wobei die x-Achse die Zeit in Stunden darstellt. Im oberen Bereich der Abbildungen sind die gemessenen FORT-Werte aufzufinden, wobei sich die linke Skalierung auf die FORT-Werte in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Äquivalente bezieht.

Die punktierte Linie, die durch das Diagramm verläuft, ist der Bereich in dem der FORT-Wert in etwa bei Gesunden liegt und nicht überschritten werden sollte. Ab einem Graubereich von 350-400 FORT beginnt der oxidative Stress. Es werden drei Patienten auf einer Abbildung zusammengefasst für Tag 1.

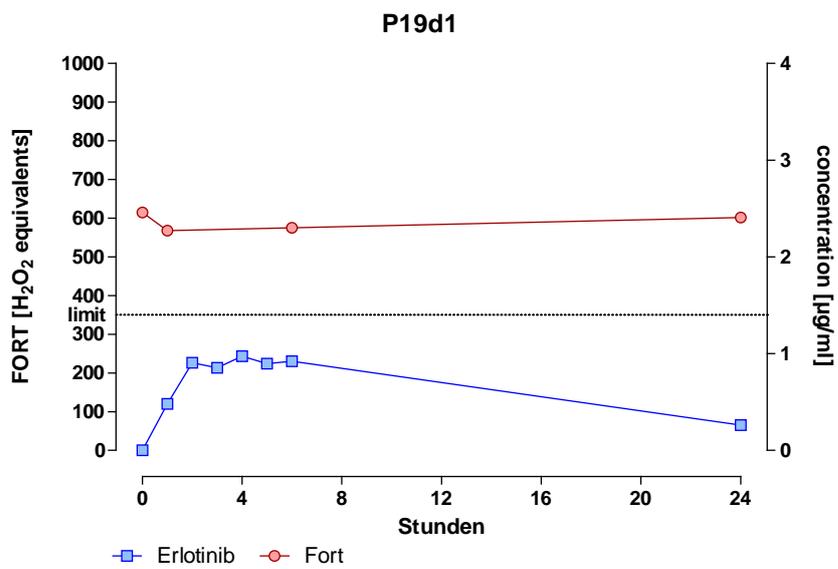
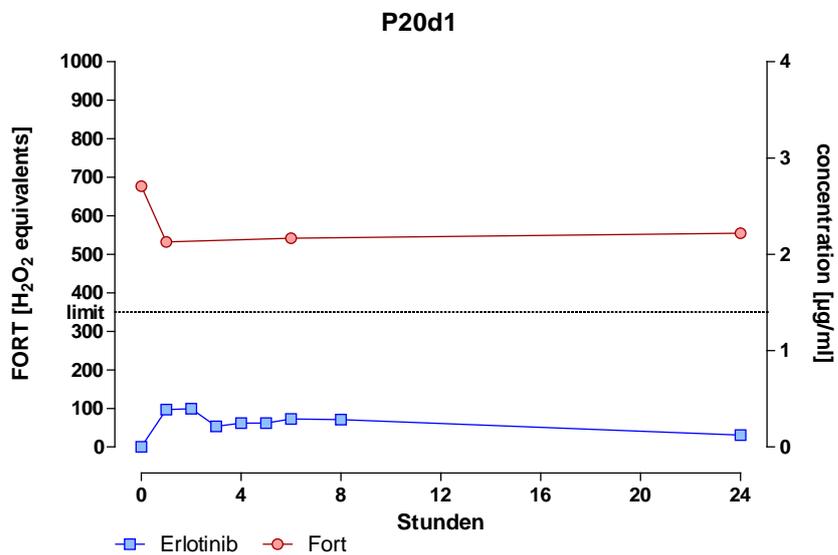
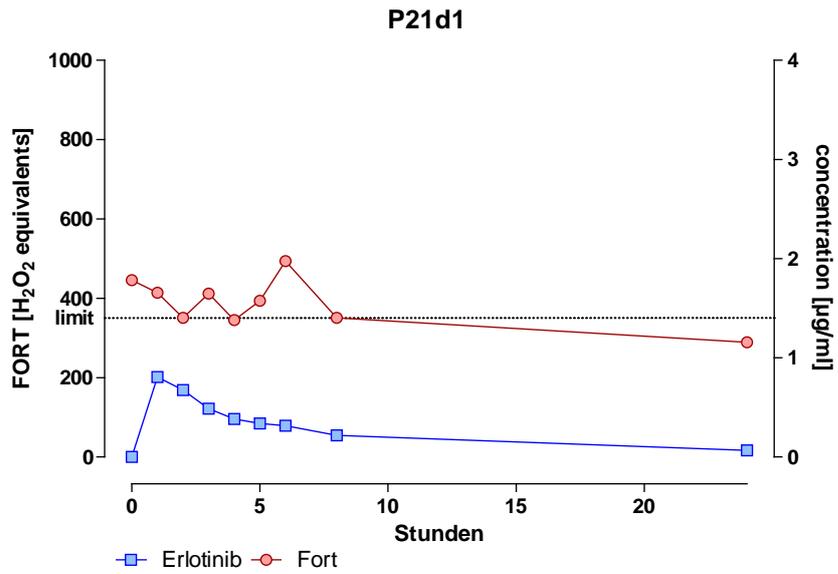


Abb. 16: Verlauf des 1. Tages von Patienten 21-19

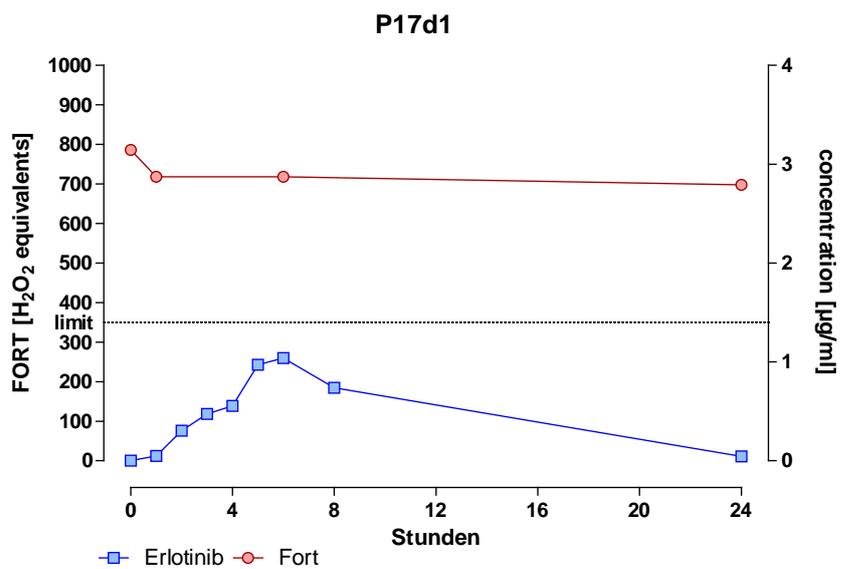
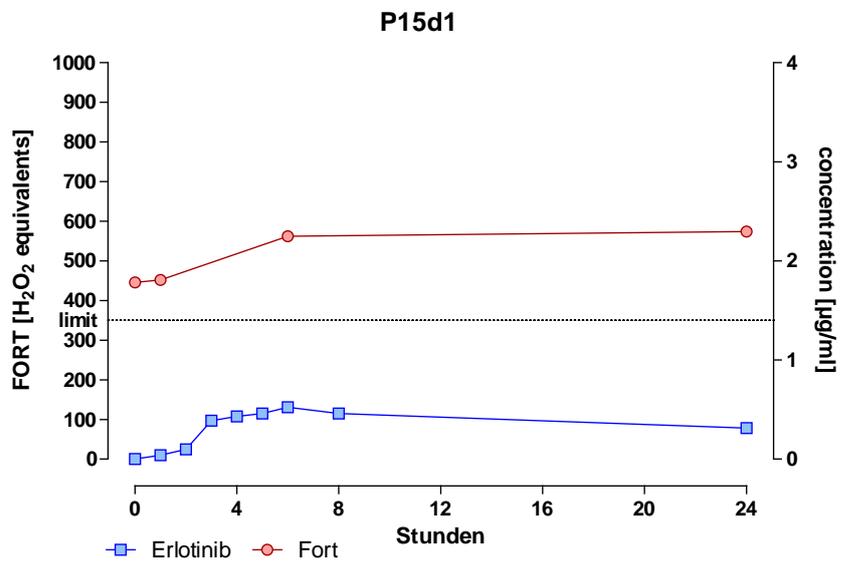
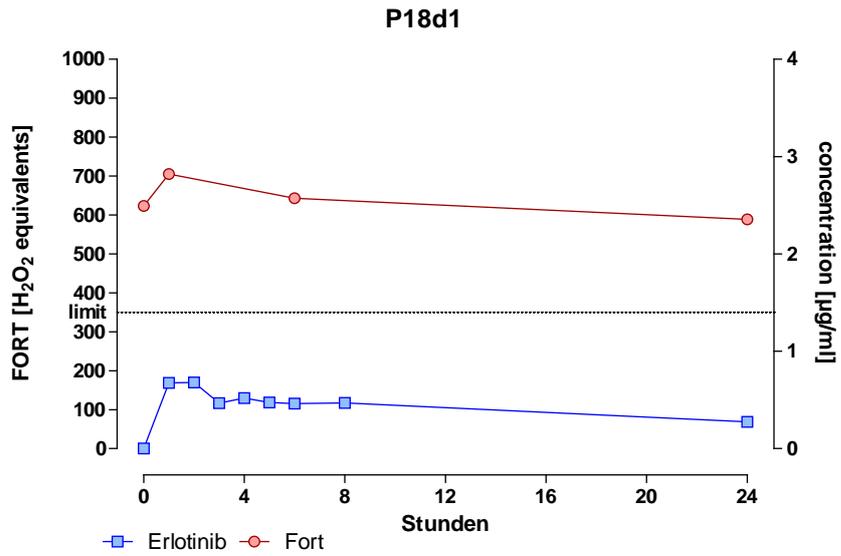


Abb. 17: Verlauf des 1. Tages von Patienten 18-15

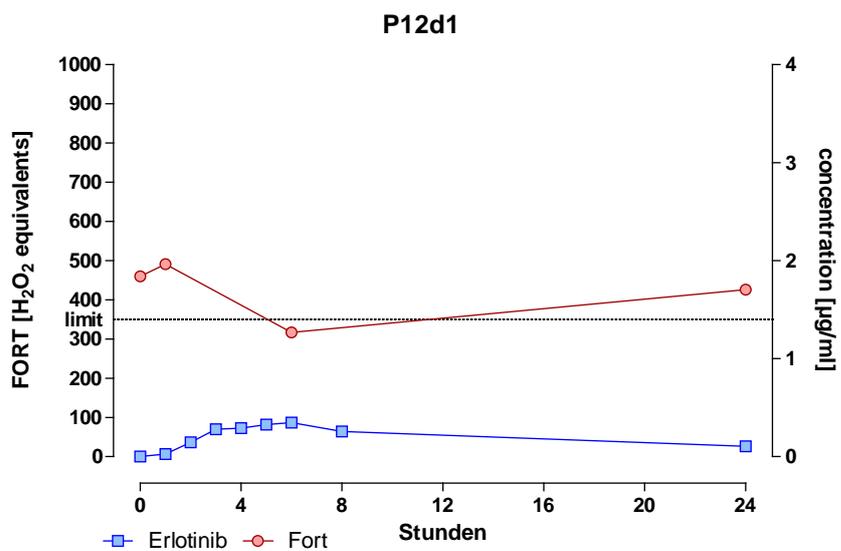
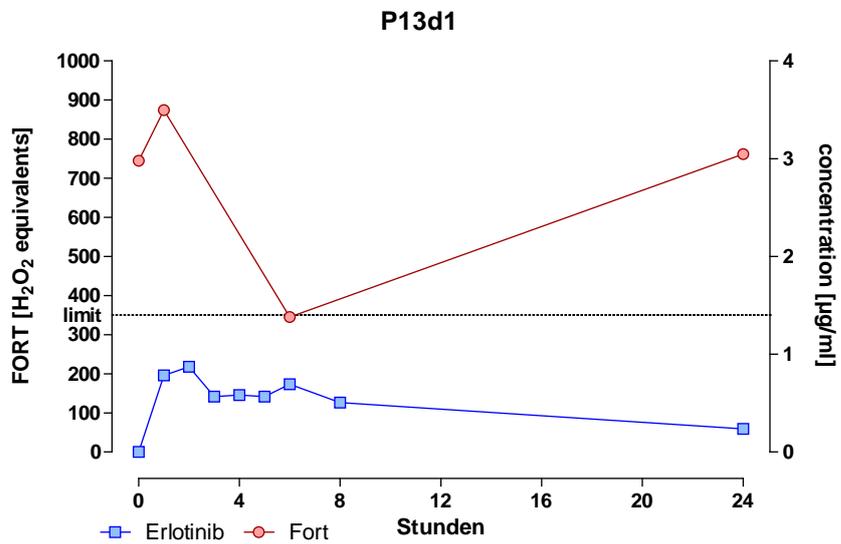
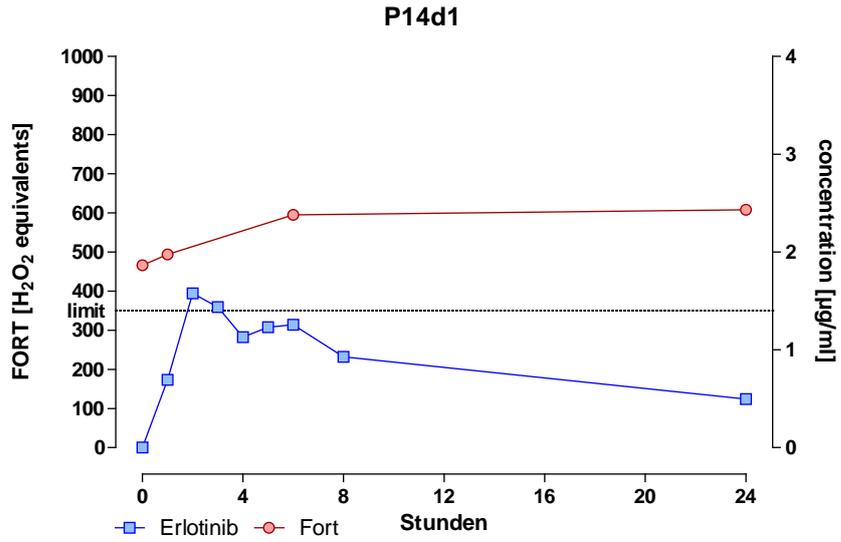


Abb. 18: Verlauf des 1. Tages von Patienten 14-12

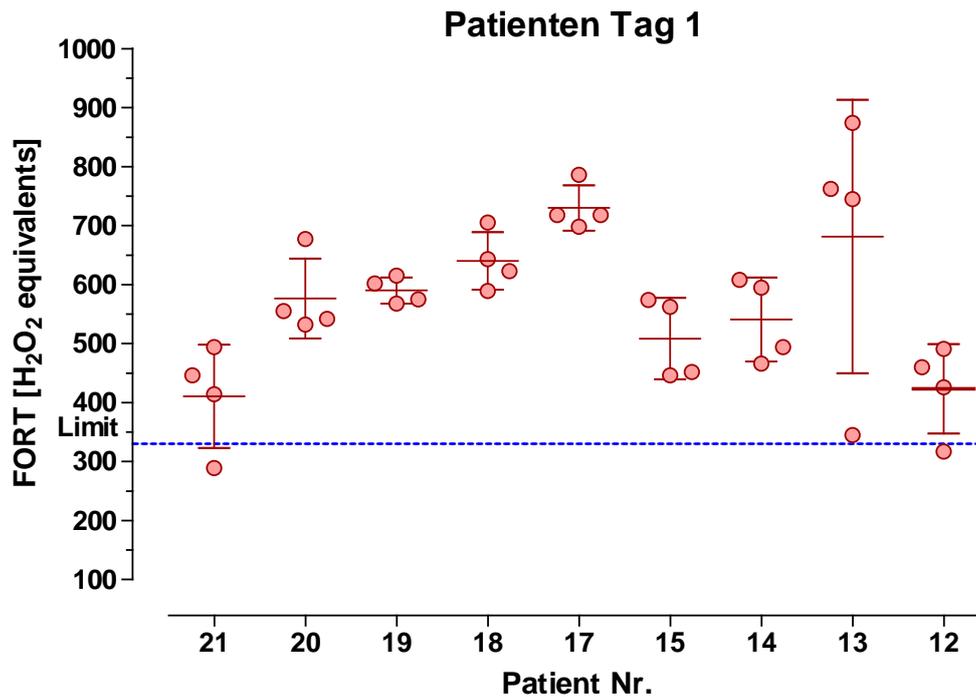


Abb. 19: Scattergramm FORT-Werte des 1. Tages

Tab. 19: Descriptive Statistik der FORT-Werte

Patient	21	20	19	18	17	15	14	13	12
Number of values	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Minimum	289,0	532,0	568,0	589,0	698,0	446,0	466,0	345,0	317,0
25% Percentile	320,3	534,5	569,8	597,5	703,0	447,5	473,0	445,0	344,3
Median	430,0	548,5	588,5	633,0	718,0	507,0	544,5	753,5	443,0
75% Percentile	482,0	646,5	611,8	689,5	769,0	571,0	604,8	846,0	483,3
Maximum	494,0	677,0	615,0	705,0	786,0	574,0	608,0	874,0	491,0
Mean	410,8	576,5	590,0	640,0	730,0	508,5	540,8	681,5	423,5
Std. Deviation	87,57	67,66	22,20	48,73	38,51	68,92	71,27	231,5	75,80
Std. Error	43,79	33,83	11,10	24,37	19,25	34,46	35,64	115,8	37,90
Lower 95% CI of mean	271,4	468,8	554,7	562,5	668,7	398,8	427,3	313,1	302,9
Upper 95% CI of mean	550,1	684,2	625,3	717,5	791,3	618,2	654,2	1050	544,1
Sum	1643	2306	2360	2560	2920	2034	2163	2726	1694

In diesem Scattergramm wurden für jeden einzelnen Patienten alle FORT-Werte des 1. Tages zusammengefasst, um zu vergleichen in wiefern sich die Patienten im Range von ihren FORT-Werten von einander unterscheiden. Es ist deutlich zu erkennen, dass zwei Patienten und zwar 21 und 12 vergleichsweise niedrige Werte aufweisen. Der Großteil der Patienten befindet sich jedoch in einem Bereich von 400 bis 800 FORT. Besonders signifikant ist hier Patient 13, dessen FORT-Werte sogar von 700 bis 930 FORT reichen. Man kann ebenfalls sehen, dass Patient 17 und 18 vergleichsweise hohe Stresswerte haben. Weiters unterscheiden sich die Mittelwerte der einzelnen Patienten sehr stark. Zu beachten ist auch, dass der oxidative Stress bereits vor Beginn der Therapie erhöht vorliegt.

### **5.3 FORT/FORD-Werte im Verlauf von Tag 1 - Tag 8**

In den folgenden Abbildungen 19-21 ist der komplette Untersuchungszeitraum von Tag 1 bis Tag 8 der einzelnen Patienten visualisiert. Hier wurden sowohl die FORT- als auch die FORD-Werte der Patienten gegen die Erlotinib-Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$  aufgetragen. Pro Abbildung werden drei Patienten in einzelne Diagramme dargestellt.

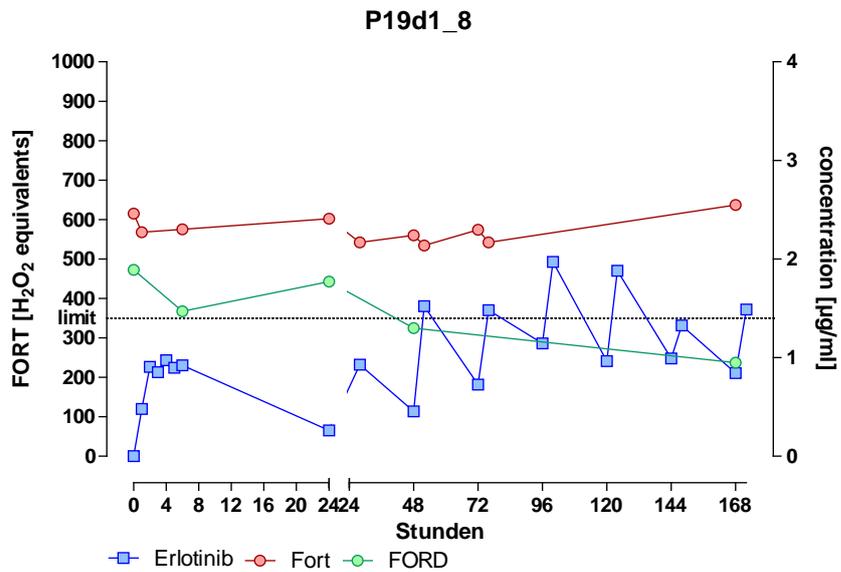
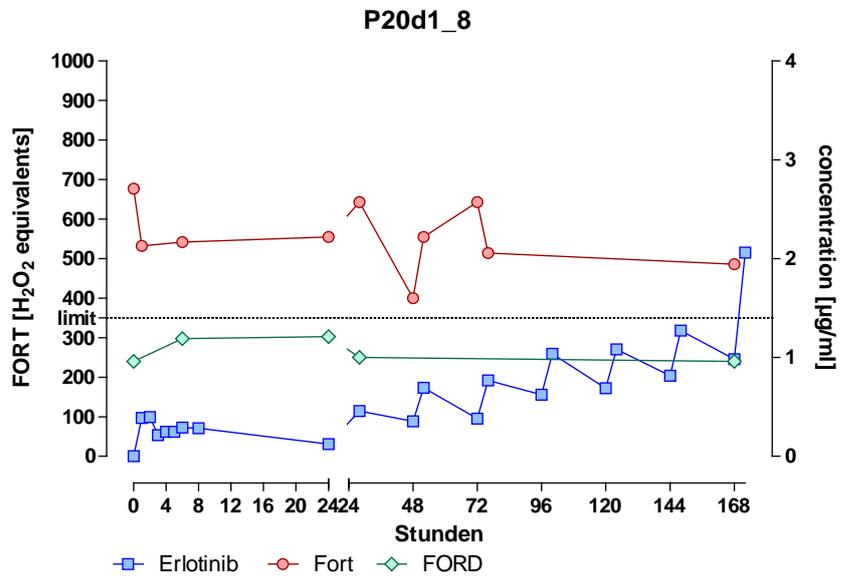
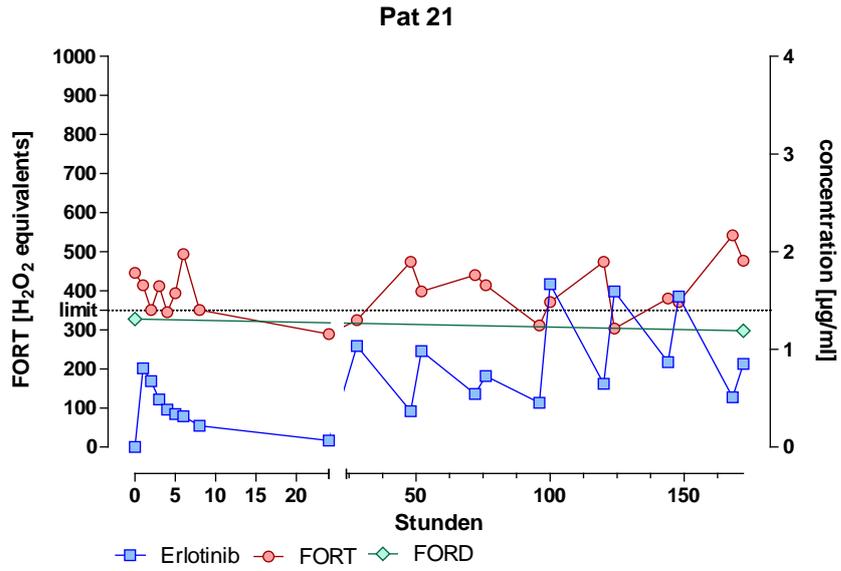


Abb. 20: Verlauf vom 1. bis 8. Tag von Patienten 21-19

### **5.3.1 Patient 21**

Die Antioxidative Kapazität des Patienten 21 beträgt 1,31 mmol/l Trolox und sinkt im Laufe der Therapie am 8. Tag auf 1,19 mmol/l. Vor Therapiebeginn liegt der Radikalwert des Patienten bei 446 FORT. Im weiteren Verlauf der Chemotherapie lässt sich zu der steigenden Erlotinib-Konzentration auch ein Anstieg der Radikalwerte verdeutlichen, der sein Maximum bei 542 FORT nach 168 Stunden erreicht.

### **5.3.2 Patient 20**

Mit einer Antioxidativen Kapazität von 0,69 mmol/l Trolox besitzt dieser Patient einen etwas niedrigeren Schutz gegen freie Radikale als im Vergleich zu Patient 21. Dementsprechend hoch ist auch der oxidative Stress vor Beginn der Therapie, der bei 677 FORT liegt. Die Kurve erreicht ein Minimum nach 48 Stunden, gefolgt von einem deutlichen Anstieg, der dann mit einer langsamen Abnahme der Radikalwerte einhergeht. Bei einem FORD-Wert von 0,96 mmol/l Trolox wird ein am 8. Tag ein Radikalwert von 486 FORT gemessen.

### **5.3.3 Patient 19**

Trotz eines FORD-Wertes von 1,89 mmol/l Trolox wurde eine erhöhte oxidative Belastung durch freie Radikale gefunden. Bereits vor der Verabreichung der kombinierten Therapie liegt der oxidative Stress bei 615 FORT. Im Verlauf des 1. Tages sinkt die Stresskurve sehr leicht ab, bis sie sich langsam wieder auf einen FORT-Wert von 602 anhebt. Sehr auffällig ist hier die Beziehung der Radikal-Kurve mit der Erlotinib-Plasmakonzentrations-Kurve, die sich direkt proportional zueinander zu verhalten scheinen. Im Zeitverlauf von 24h bis 76h lässt sich nämlich zur steigenden Erlotinib-Konzentration, die in Zick-Zack-Kurven verläuft, auch parallel ein Anstieg der Radikalwerte erkennen. Nach 168 Stunden wird ein Höchstwert von 638 FORT bei einer antioxidativen Kapazität von 0,95 mmol/l Trolox erreicht.

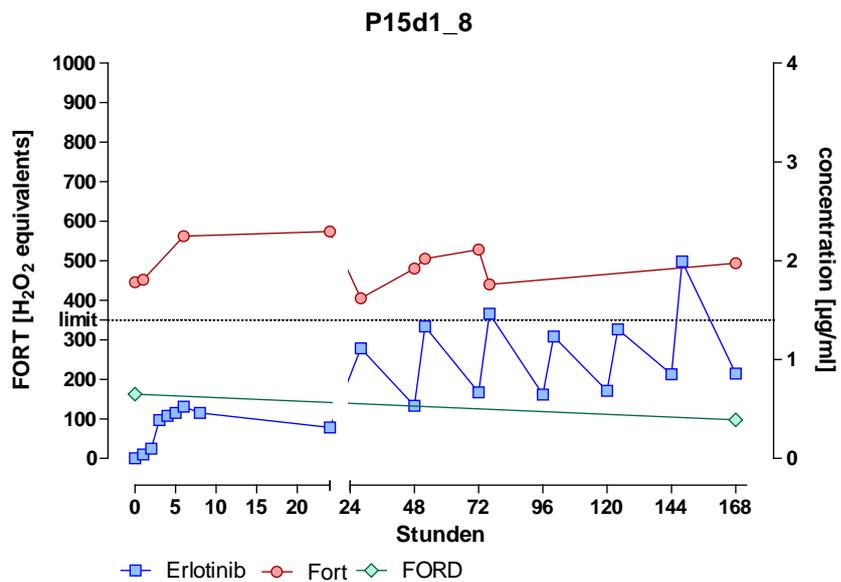
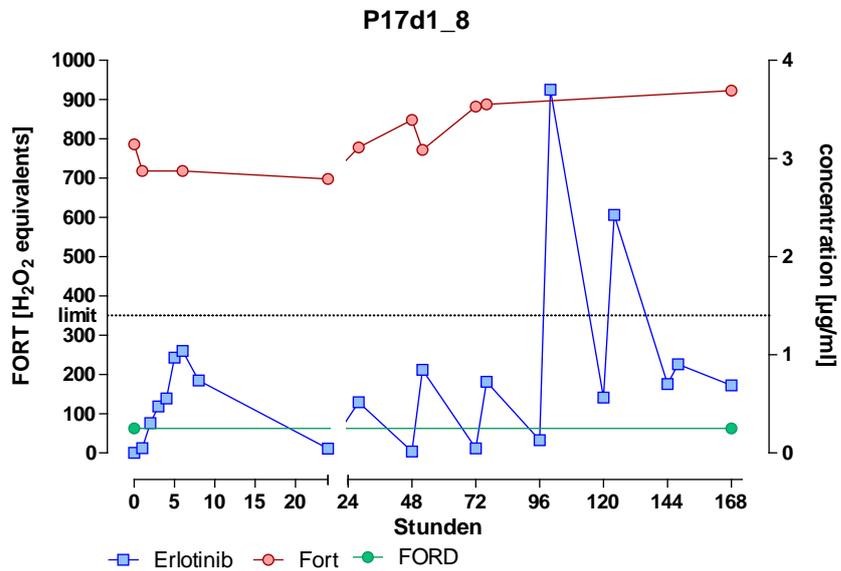
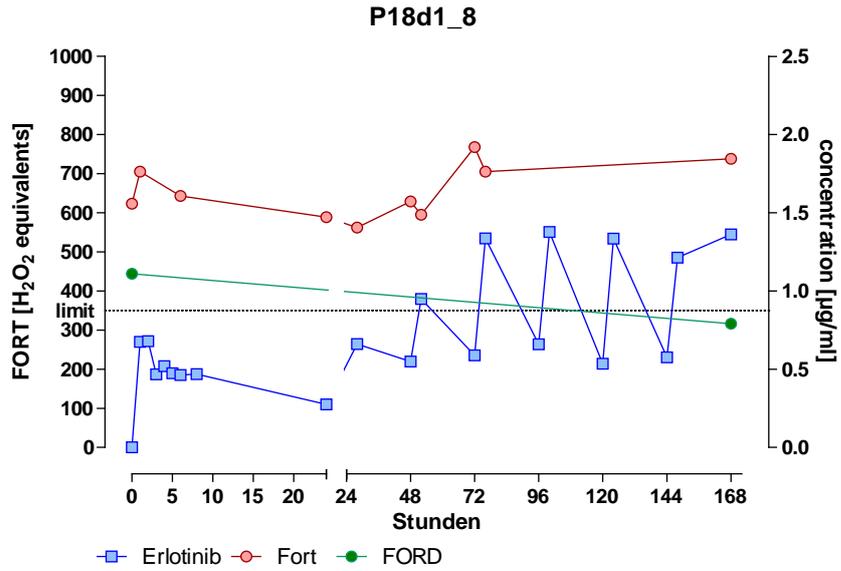


Abb. 21: Verlauf vom 1. bis 8. Tag von Patienten 18-15

#### **5.3.4 Patient 18**

Auch bei diesem Patient zeigen sich trotz eines höheren Schutzpotentials von 1,11 mmol/l Trolox sehr hohe FORT-Werte bereits vor der Therapie. Im Verlauf des 1. Tages ist gut ersichtlich, dass die Stress-Kurve und die Erlotinib-Konzentrations-Kurve gemeinsam einen gleichmäßigen Verlauf haben. Vergleicht man wieder den Verlauf der beiden Kurven zwischen dem Zeitraum 24h bis 76h, so fällt auf, dass sie direkt proportional zu einander in Beziehung stehen. Nach Erreichen des Minimums bei 562 FORT nach 28h folg ein rasches maximales Ansteigen bei einem Radikalwert von 768 FORT.

#### **5.3.5 Patient 17**

Dieser Patient weist eine äußerst geringe antioxidative Kapazität auf, sowohl vor als auch nach der Therapie am 8. Tag, die einen niedrigeren Wert als 0,25 mmol/l hat und somit unter der Nachweisgrenze des Messgeräts liegt. Folglich befinden sich alle Radikalwerte im Bereich von 700 bis 950 FORT-Einheiten. Die oxidative Belastung dieses Patienten ist extrem hoch. Wenn man weiters die Erlotinib-Konzentrationen betrachtet, so erkennt man im Allgemeinen etwas höhere Plasma-Konzentrationswerte im Vergleich zu den bereits besprochenen Patienten. Nach 6h wird eine Konzentration von 1,04 µg/ml analysiert, wobei nach 100h eine Erlotinib-Konzentration von 3,7 µg/ml besteht.

#### **5.3.6 Patient 15**

Mit einer anfänglichen antioxidativen Kapazität von 0,65 mmol/l Trolox sinkt im Laufe der Therapie dieser Wert auf 0,39 mmol/l. Beobachtet man den Verlauf des 1. Tages so kann man annehmen, dass die Stress-Kurve parallel zur Erlotinib-Konzentrations-Kurve verläuft. Jedoch kommt es nach 24h zu einem minimalen Radikalwert Anstieg von 562 auf 574 FORT-Einheiten, wo der oxidativer Stress sein Maximum erreicht. Der Verlauf der darauf folgenden Tage könnte ebenfalls auf ein direkt proportionales Verhalten der beiden vorhandenen Kurven deuten. Aber am 3. Tag 4 Stunden nach der Verabreichung, also nach insgesamt 52h steigt die FORT-Kurve weiter an, als erwartet.

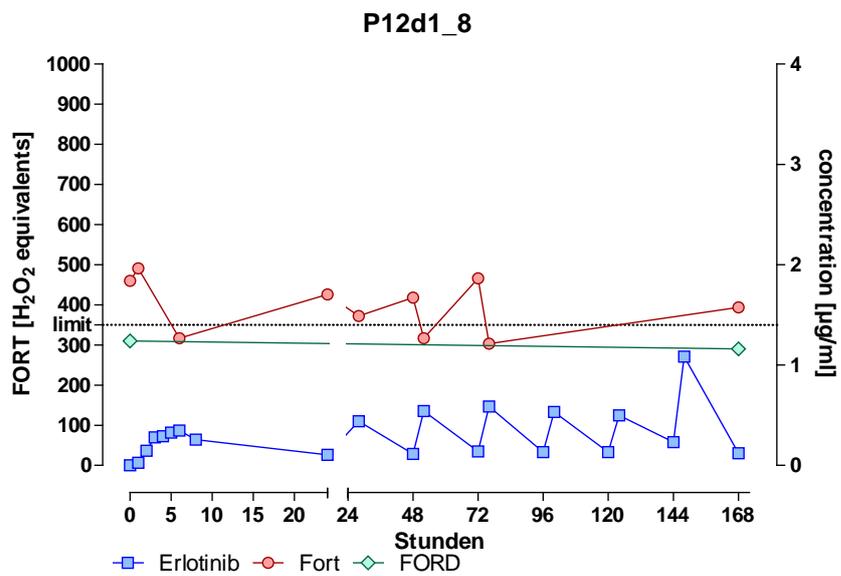
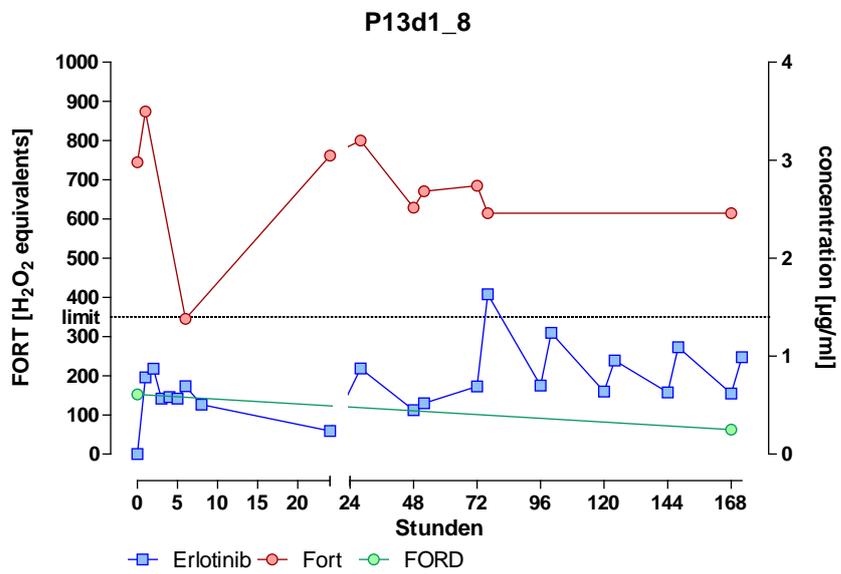
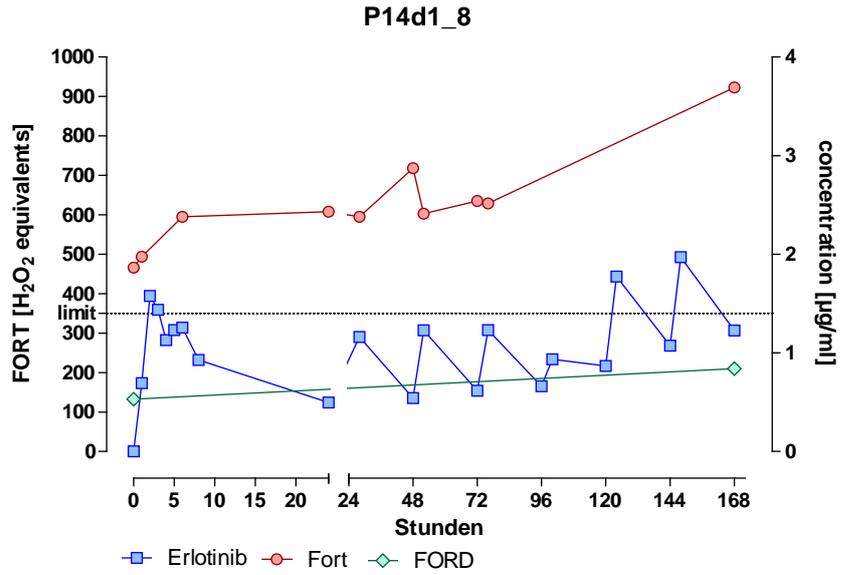


Abb. 22: Verlauf vom 1. bis 8. Tag von Patienten 14-12

### **5.3.7 Patient 14**

Betrachtet man die Stress-Kurve des Patienten 14, so ist kein direkter Zusammenhang mit der Plasmakonzentration von Erlotinib ersichtlich. Die Stress-Kurve verläuft zwar ebenfalls in Zick-Zack Form, aber nicht parallel zur Plasmakonzentration. Ab der 76h steigt der Radikalwert deutlich auf sein Maximum von 923 FORT an und liegt somit signifikant oberhalb des Ausgangswertes. Die antioxidative Kapazität steigt im Laufe der Therapie von 0,53 mmol/l Trolox auf 0,84 mmol/l an.

### **5.3.8 Patient 13**

Der gemessene FORD-Wert vor der Therapie liegt bei 0,61 mmol/l Trolox und weist ein äußerst geringes antioxidatives Potential im weiteren Verlauf auf, der weniger als 0,25 mmol/l beträgt. Auch hier sind sehr hohe Radikalwerte zu erkennen. Im Therapieverlauf des 1. Tages ist 1h nach Medikationsgabe ein Radikalanstieg von 745 auf 874 FORT ersichtlich, der den Höchstwert der Kurve darstellt. Anschließend erreicht die Kurve nach 6h ein deutliches Minimum mit 345 FORT. Im weiteren Verlauf der Chemotherapie ist ein paralleler Kurvenverlauf ersichtlich. Ab der 72h kann man jedoch eine leichte Abnahme der Radikalwerte erkennen, bei einer maximalen Plasmakonzentration von Erlotinib. In diesem Diagramm kann man einen leichten Abfall des oxidativen Stresses erkennen.

### **5.3.9 Patient 12**

Die antioxidative Kapazität beim Patient 12 ist vergleichsweise zu den anderen Patienten am stärksten ausgeprägt. Passend dazu sind relativ niedrige Radikalwerte zu finden. Auch hier sieht man einen deutlichen Abfall 6h nach der Behandlung mit einem FORT-Wert von 317. Ab der 24h ist ein Zusammenhang zwischen der Stress-Kurve und der Erlotinib-Plasmakonzentrationskurve zu erkennen, obwohl bei niedrigerer Erlotinib-Konzentration höhere Radikalwerte aufzufinden sind. Sowohl die Zunahme als auch die Abnahme der Stresswerte entsprechen dem Trend der Erlotinib-Plasmakonzentrations-Kurve. Auch in dieser Abbildung kann man eine mäßige Abnahme des oxidativen Stresses erkennen.

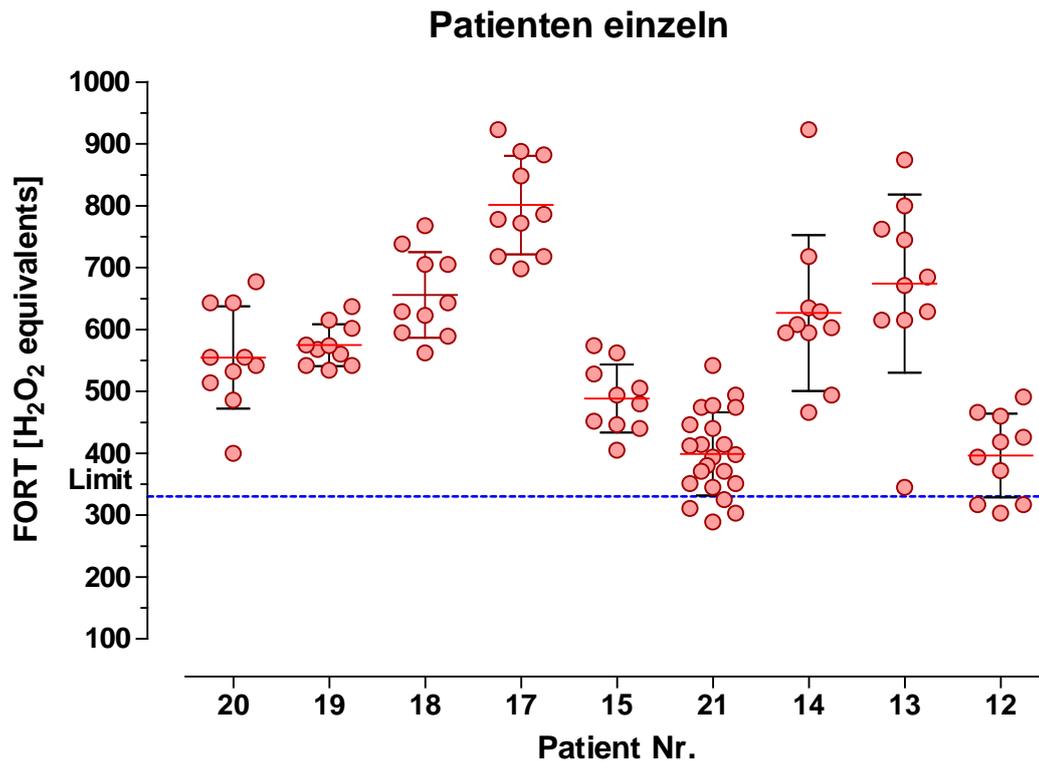


Abb. 23: Scattergramm aller FORT-Werte von Tag 1 bis 8

Tab. 20: Descriptive Statistik aller FORT-Werte

Patient	21	20	19	18	17	15	14	13	12
Number of values	22	10	10	10	10	10	10	10	10
Minimum	289,0	400,0	534,0	562,0	698,0	405,0	466,0	345,0	303,0
25% Percentile	349,5	507,0	542,0	593,5	718,0	444,5	569,8	615,0	317,0
Median	396,0	548,5	571,0	636,0	782,0	487,0	605,5	678,0	406,0
75% Percentile	453,0	643,0	605,3	713,3	883,5	536,5	655,8	771,5	461,5
Maximum	542,0	677,0	637,0	768,0	923,0	574,0	923,0	874,0	491,0
Mean	398,9	554,7	574,9	655,7	801,1	488,6	626,6	674,1	396,4
Std. Deviation	67,38	82,69	33,84	69,20	79,73	54,88	125,9	143,8	67,59
Std. Error	14,36	26,15	10,70	21,88	25,21	17,36	39,80	45,46	21,37
Lower 95% CI of mean	369,0	495,5	550,7	606,2	744,1	449,3	536,6	571,3	348,0
Upper 95% CI of mean	428,8	613,9	599,1	705,2	858,1	527,9	716,6	776,9	444,8
Geometric mean	393,5	548,9	574,0	652,5	797,6	485,8	616,3	657,0	391,1
Lower 95% CI of geo. mean	365,0	491,5	550,6	605,4	742,9	448,4	538,8	547,4	345,0
Upper 95% CI of geo. mean	424,2	613,1	598,4	703,2	856,2	526,4	705,0	788,5	443,3
Sum	8776	5547	5749	6557	8011	4886	6266	6741	3964

In dem nachstehenden Scattergramm, wo ebenfalls für jeden einzelnen Patienten alle FORT-Werte von Tag 1 bis Tag 8 zusammengefasst wurden, ist deutlich zu erkennen, dass der oxidativer Stress, bei allen Patienten bis auf Patient 21 und 12 sehr hoch ist. Denn die blaue Linie stellt auch in dieser Abbildung den Bereich der Radikalwerte bei gesunden Patienten dar, die nicht überschritten werden sollte. Ab einem Graubereich von 350 bis 400 FORT beginnt bereits der oxidativer Stress. Besonders auffällig sind hier die Höchstwerte von Patient 14 und 17, die beide bei 923 FORT-Einheiten liegen. Gefolgt von Patient 13 dessen Maximum ebenfalls im vergleichsweise ähnlichen Bereich liegt und zwar bei 874 FORT. Patient 18 weist auch hohe Stresswerte auf.

Vergleicht man nun die Scattergramme des 1. Tages mit dem Scattergramm, der die Radikalwerte von Tag 1 bis Tag 8 beinhaltet, so kann man feststellen, dass die Abbildung des 1. Tages ein Abbild von Tag 1 bis 8 ist. Sind beispielsweise die Stresswerte bei Patient 17 am Tag 1 hoch, dann bleiben sie annähernd in diesem Bereich auch noch nach 8 Tagen, wobei sich in diesem Fall im Laufe der Therapie am 8. Tag eine maximale Erhöhung der FORT-Werte finden lässt, dessen Stresswert sogar über 900 FORT erreicht wird.

Wenn man nun die Mittelwerte der beiden Scattergramme vor sich hat, so erkennt man bei Patient 12, 13, 15, 19, 20 und 21 verhältnismäßig niedrigere Stresswerte am Tag 8. Hingegen werden leicht erhöhte Radikalwerte bei Patient 14, 17 wie bereits besprochen und 18 nach dem 8. Tag beobachtet.

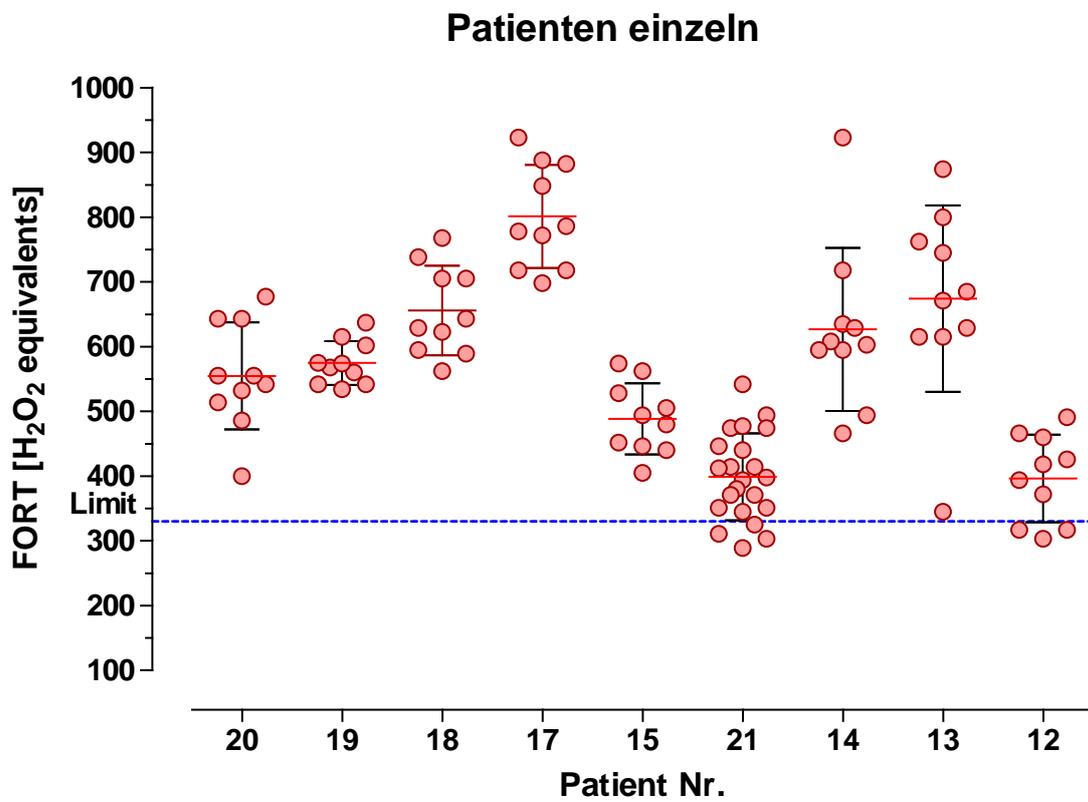
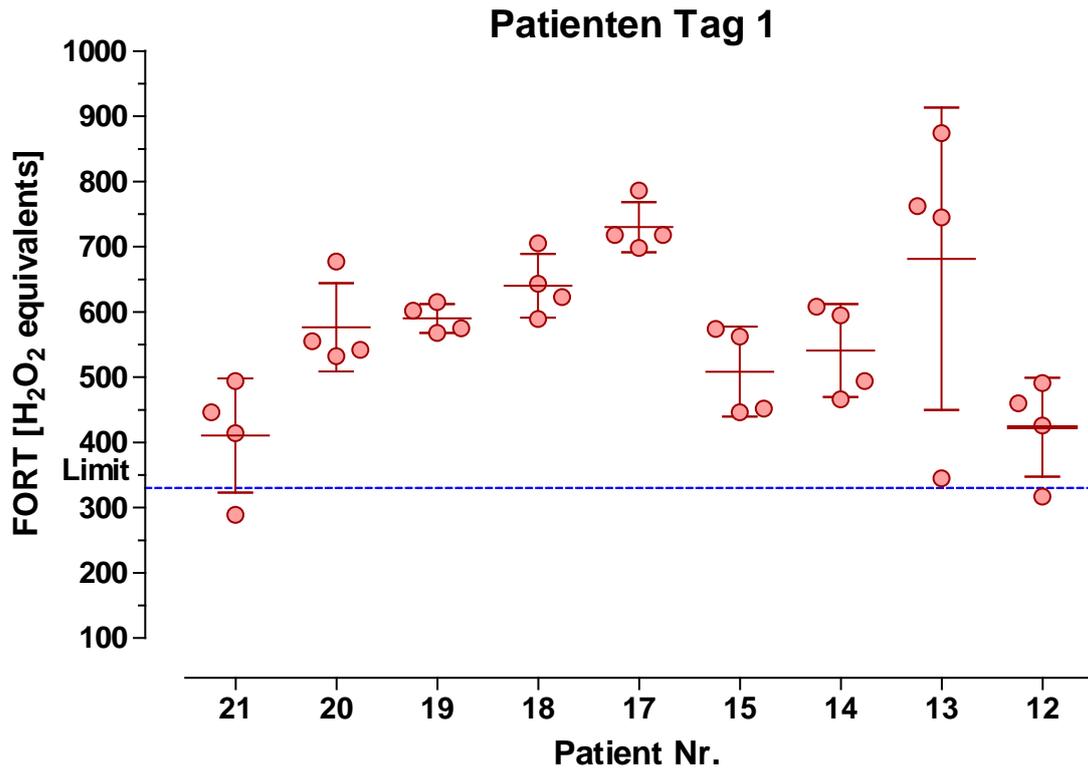


Abb. 24: Scattergramme im Vergleich

## 5.4 Antioxidative Kapazität aller Patienten im Vergleich

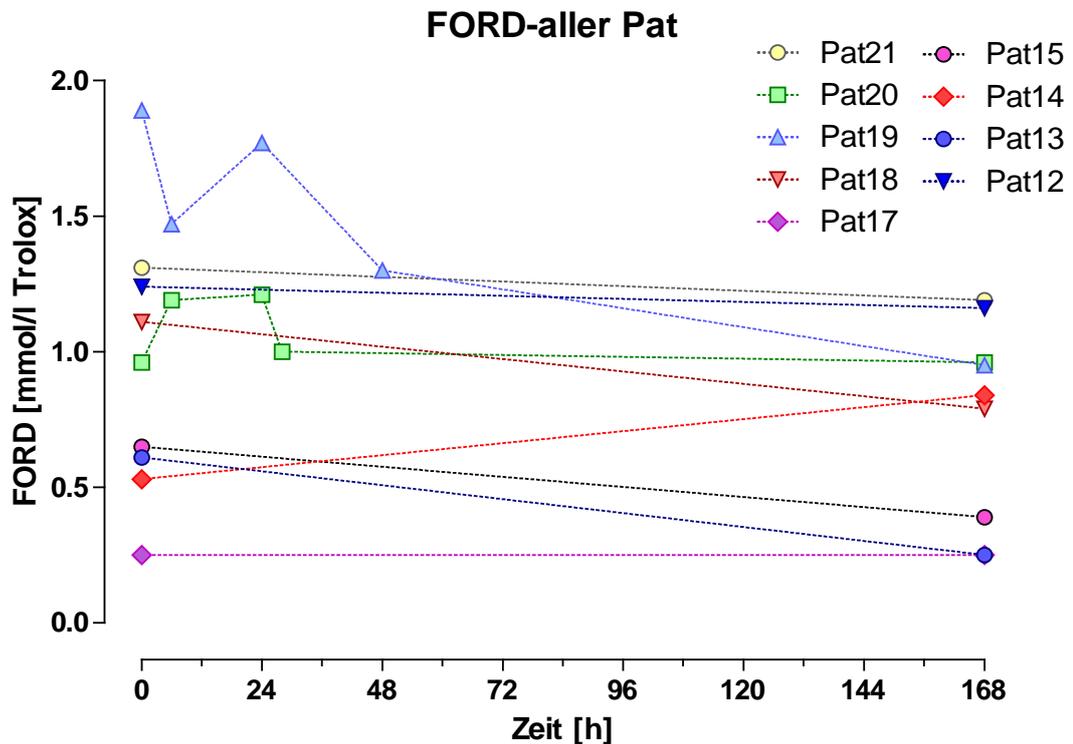


Abb. 25: FORD-Werte aller Patienten

Tab. 21: Messwerte der antioxidativen Kapazität

Patient	21	20	19	18	17	15	14	13	12
<b>0.Tag</b>	1,31	0,96	1,89	1,11	<0,25	0,65	0,53	0,61	1,24
<b>nach 6h</b>		1,19	1,47						
<b>nach 24h</b>		1,21	1,77						
<b>nach 28h</b>		1							
<b>nach 48h</b>			1,3						
<b>8.Tag</b>	1,19	0,96	0,95	0,79	<0,25	0,39	0,84	<0,25	1,16

Die Messung der antioxidativen Kapazität erfolgte bei 9 Patienten jeweils kurz vor Beginn der Therapie und anschließend nach dem 8. Tag. Zusätzlich wurden bei Patient 19 und 21 weitere auserwählte Messungen durchgeführt. Laut der angeführten Tabelle und ihrer graphischen Darstellung ist gut zu erkennen, dass sich das antioxidative Schutzpotential der Patienten im Laufe der Therapie im Allgemeinen stark abfällt. Dies kann mit der Instabilität der Antioxidantien im Plasma zusammenhängen, die vor allem durch eine ungeeignete Lagerung zu

einem Abbau der antioxidativen Bestandteile führen könnte. Hier stellt Patient 14 die einzige Ausnahme dar, dessen FORD-Wert mit einem leichten Anstieg von 0,53 mmol/l Trolox auf 0,84 mmol/l einhergeht. Betrachtet man die nachstehende Abbildung 24, so sieht man, dass Patient 21 einen leichten Rückgang des FORD-Werts erlebt, wobei beim Patient 20 der anfänglicher Wert bei 0,96 mmol/l Trolox liegt, nach insgesamt 24h sich aber auf 1,21 mmol/l erhöht und im weiterem Verlauf der Therapie auf seinen Ausgangswert wieder absinkt. Weiters zeigt sich beim Patient 19 eine äußerst stark ausgeprägte antioxidative Schutzfunktion, die bis zu den ersten 48h in einer Zick-Zack-Kurve verläuft und ab da bis zu 0,96 mmol/l Trolox stark abfällt. Ebenfalls kann man eine starke Reduzierung der FORD-Werte von Patient 18 beobachten. Das gleiche kann man auch von Patient 13 behaupten, wobei hier der Ausgangswert bei 0,61 mmol/l Trolox liegt und auf weniger als 0,25 mmol/l am herabsinkt. Patient 17 hingegen liegt sowohl vor Therapiebeginn als nach dem 8. Tag unter der Nachweisgrenze des Testgeräts und ist somit unerfassbar niedrig.

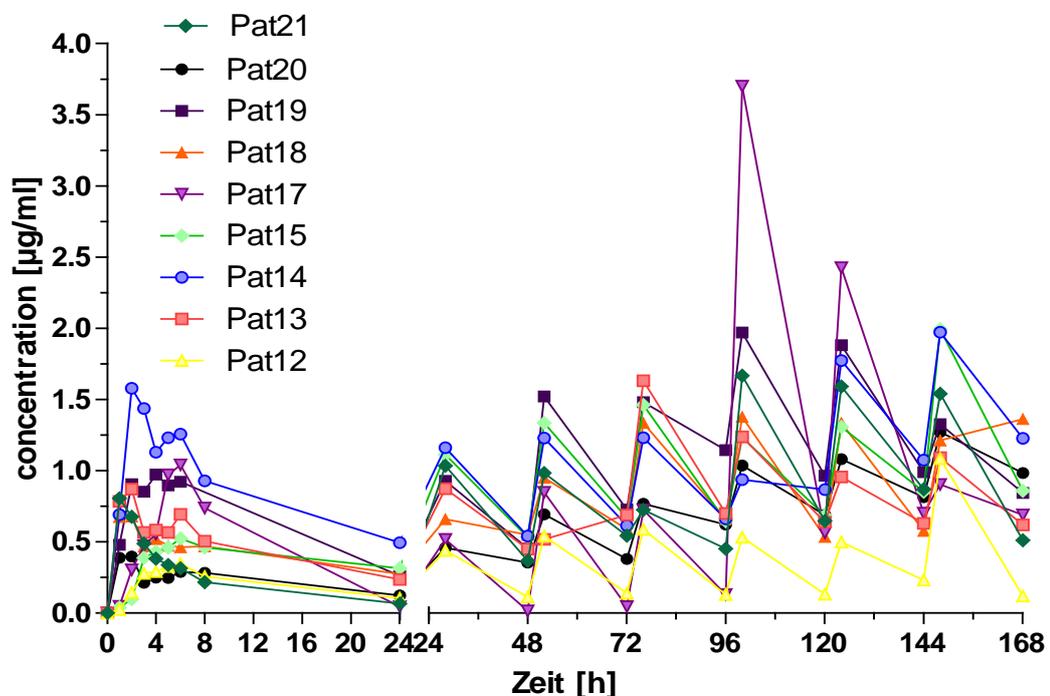


Abb. 26: Erlotinib-Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve im Patientenvergleich

Tab. 22: Descriptive Statistik aller Plasmakonzentrationen

	Pat20	Pat19	Pat18	Pat17	Pat 15	Pat 14	Pat 13	Pat12	Pat 21
<b>Number of values</b>	21	20	21	21	21	21	21	21	21
<b>Minimum</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>25% Percentile</b>	0,2655	0,7563	0,4710	0,0895	0,4090	0,6770	0,5425	0,1255	0,3525
<b>Median</b>	0,3960	0,9250	0,5890	0,5650	0,6440	1,129	0,6390	0,2580	0,5440
<b>75% Percentile</b>	0,7915	1,282	1,081	0,8755	1,174	1,244	0,8725	0,4690	0,9260
<b>Maximum</b>	1,271	1,970	1,377	3,700	1,993	1,972	1,632	1,085	1,668
<b>10% Percentile</b>	0,1418	0,2812	0,3126	0,0210	0,0510	0,5044	0,2786	0,0410	0,0964
<b>90% Percentile</b>	1,073	1,846	1,357	2,148	1,437	1,735	1,209	0,5780	1,582
<b>Mean</b>	0,5402	0,9764	0,7220	0,7353	0,7334	1,049	0,7067	0,3014	0,6773
<b>Std. Deviation</b>	0,3488	0,4923	0,3886	0,8674	0,5143	0,4578	0,3425	0,2508	0,4714
<b>Std. Error</b>	0,07611	0,1101	0,08480	0,1893	0,1122	0,09989	0,07474	0,05472	0,1029
<b>Lower 95% CI of mean</b>	0,3815	0,7459	0,5451	0,3405	0,4993	0,8411	0,5508	0,1872	0,4628
<b>Upper 95% CI of mean</b>	0,6990	1,207	0,8988	1,130	0,9676	1,258	0,8626	0,4155	0,8919
<b>Coefficient of variation</b>	64.56%	50.42%	53.82%	117.97%	70.13%	43.62%	48.46%	83.20%	69.60%
<b>Geometric mean</b>									
<b>Lower 95% CI of geo.m</b>									
<b>Upper 95% CI of geo.m</b>									
<b>Skewness</b>	0,5648	0,2358	0,5444	2,441	0,7272	-0,1423	0,7234	1,592	0,8756
<b>Kurtosis</b>	-0,6206	0,3042	-0,4604	6,849	0,2320	0,4232	2,121	3,542	0,1713
<b>Sum</b>	11,35	19,53	15,16	15,44	15,40	22,04	14,84	6,329	14,22

Die folgende graphische Darstellung zeigt die Erlotinib-Plasmakonzentrationen aller Patienten im Verlauf der Therapie von Tag 0 bis Tag 8. Der Konzentrationsanstieg von Erlotinib im Plasma ist in den ersten zwei bis vier Stunden deutlich zu erkennen, wobei Erlotinib nach seinen pharmakokinetischen Eigenschaften sein Maximum erst nach der vierten Stunde erreichen sollte. Achtet man nun zusätzlich auf die tabellarische Übersicht der Erlotinib-Konzentrationen der einzelnen Patienten, dann ist eindeutig festzustellen, dass jeder einzelne Patient sein Minimum 8 Stunde nach der Medikamentengabe erzielt.

Betrachtet man die weitere Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve ab der 24h so ist eine Gleichförmigkeit der Zu- und Abnahme in Zick-Zack-Form zu sehen. Vergleicht man nun mit Hilfe der descriptive Statistik die Mittelwerte der Plasma-Erlotinib-Konzentrationen jedes einzelnen Patienten, so zeigt dies eine verhältnismäßige Übereinstimmung von Patient 13, 15, 17, 18 und einigermaßen auch 21. Beide

Mittelwerte von Patient 14 und 19 befinden sich im oberen Bereich. Hier stellt Patient 14 die höchste durchschnittliche Erlotinib-Konzentration im Plasma dar, wobei die Erlotinib-Plasmakonzentration bei Patient 12 im Vergleich mit andern Konzentrationskurven am niedrigsten liegt.

## 5.5 FORT-Werte aller Wochenpatienten

Der zweite Teil der Diplomarbeit befasste sich mit einer Langzeit-Untersuchung der Patienten, die eine Chemotherapie mit Erlotinib erhielten. Abhängig vom gesundheitlichen Zustand der einzelnen Patienten wurden ihre ROS Werte über mehrere Wochen bzw. Monate ermittelt.

Tab. 23: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 21

Patient 21	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	321	642	494
	2.	259	518	398
	3.	281	562	432
	4.	175	350	269
	5.	250	500	385
	6.	229	458	352
	7.	184	368	283

Tab. 24: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 20

Patient 20	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	312	624	480
	2.	228	456	351
	3.	292	584	449
	4.	431	862	663
	5.	343	686	528
	6.	277	554	426

Tab. 25: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 19

Patient 19	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	373	746	574
	2.	405	810	623
	3.	431	862	663

	4.	431	862	663
	5.	373	746	574
	6.	347	694	534

Tab. 26: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 18

Patient 18	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	480	960	738
	2.	272	544	418
	3.	<160		
	4.	188	376	289
	5.	382	764	588

Tab. 27: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 14

Patient 14	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	321	642	494
	2.	339	678	522
	3.	368	736	566
	4.	352	704	542
	5.	400	800	615
	6.	356	712	548

Tab. 28: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 13

Patient 13	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	325	650	500
	2.	259	518	398
	3.	296	592	455
	4.	334	668	514

Tab. 29: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 12

Patient 12	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	<160		
	2.	352	704	542

Tab. 30: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 11

Patient 11	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	228	456	351
	2.	220	440	338
	3.	316	632	486
	4.	268	536	412
	5.	241	482	371
	6.	350	700	538
	7.	281	562	432
	8.	347	694	534
	9.	305	610	469
	10.	206	412	317
	11.	343	686	528
	12.	334	668	514
	13.	323	646	497
	14.	330	660	508
	15.	352	704	542
	16.	374	748	575
	17.	350	700	538
	18.	356	712	548
	19.	387	774	595
	20.	422	844	649
	21.	265	530	408
	22.	445	890	685
	23.	436	872	671
	24.	396	792	609

Tab. 31: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 10

Patient 10	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	228	456	351
	2.	323	646	497
	3.	303	606	466
	4.	255	510	392
	5.	299	598	460
	6.	274	548	422

	7.	418	836	643
	8.	272	544	418
	9.	<160		
	10.	166	332	255

Tab. 32: FORT-Werte der Wochenproben von Patient 9

Patient 9	Woche	FORT 1:1 verdünnt	FORT*2	(FORT*2)/1.3
	1.	294	588	452
	2.	308	616	474
	3.	206	412	317
	4.	287	574	442
	5.	286	572	440
	6.	294	588	452
	7.	<160		
	8.	<160		
	9.	219	438	337
	10.	<160		
	11.	<160		
	12.	<160		
	13.	215	430	331
	14.	308	616	474
	15.	294	588	452

Aus den tabellarischen FORT-Ergebnissen dieser Wochenproben wird nun wieder eine graphische Abbildung erstellt. Auf der X-Achse wird die Zeitangabe in Wochen angegeben. Die linke Skalierung im unteren Bereich bezieht sich auf die Erlotinib-Konzentration. Auf der gleichen Seite weiter oben ist die FORT-Skalierung darstellt. Für jeden Patienten werden die gemessenen FORT-Werte in einzelne Diagramme gegen ihre Erlotinib-Plasmakonzentration in µg/ml aufgetragen.

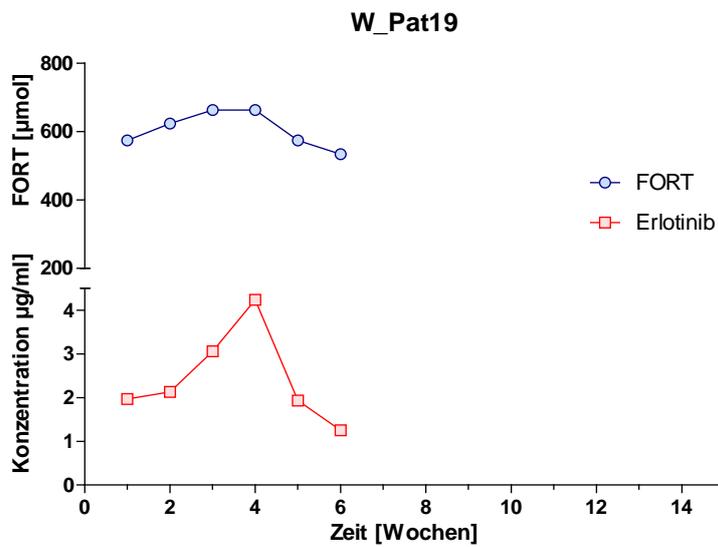
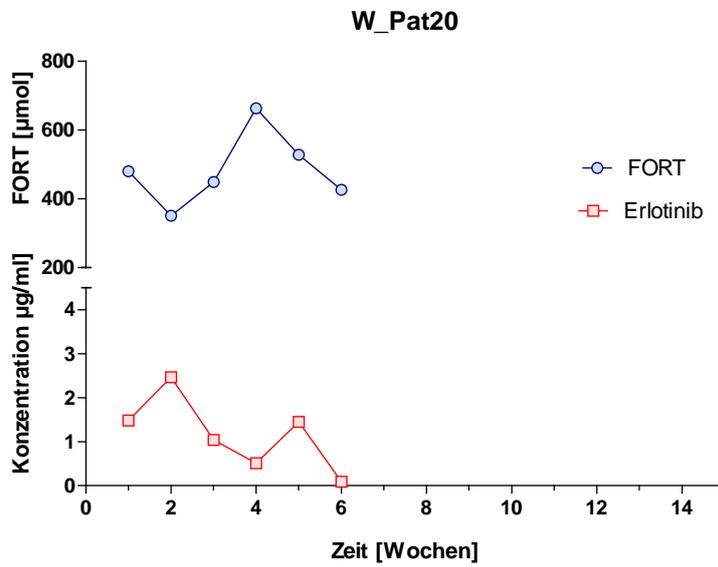
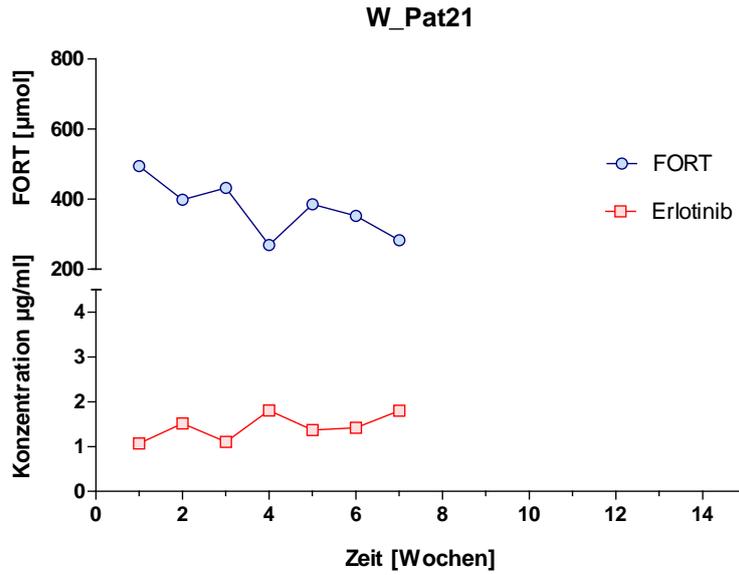


Abb. 27: FORT-Werte in Wochenabständen von Patient 21-19

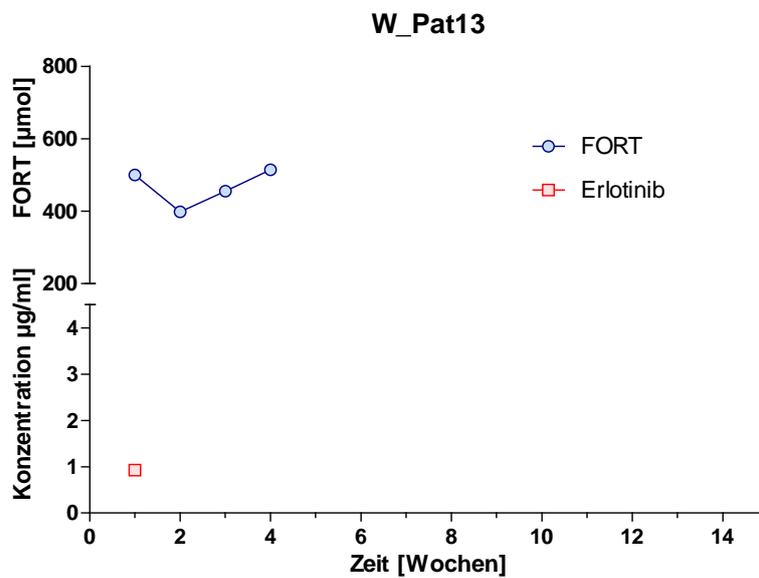
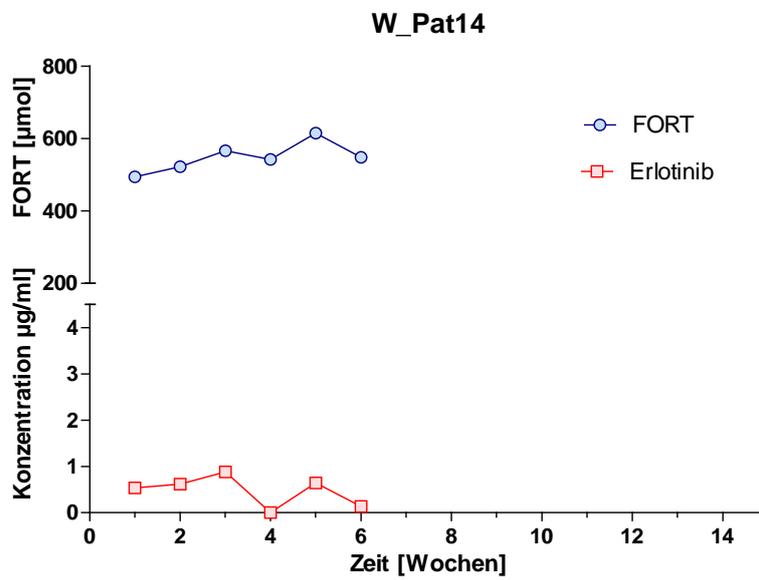
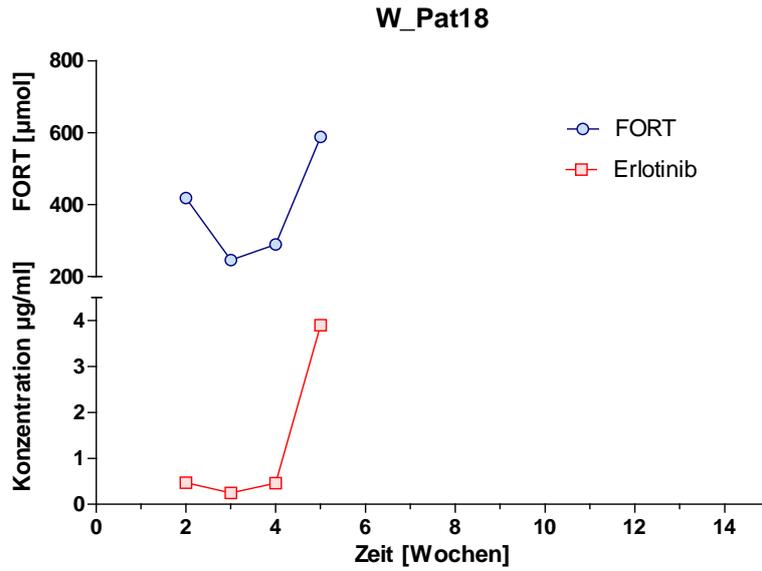


Abb. 28 :FORT-Werte in Wochenabständen von Patient 18-13

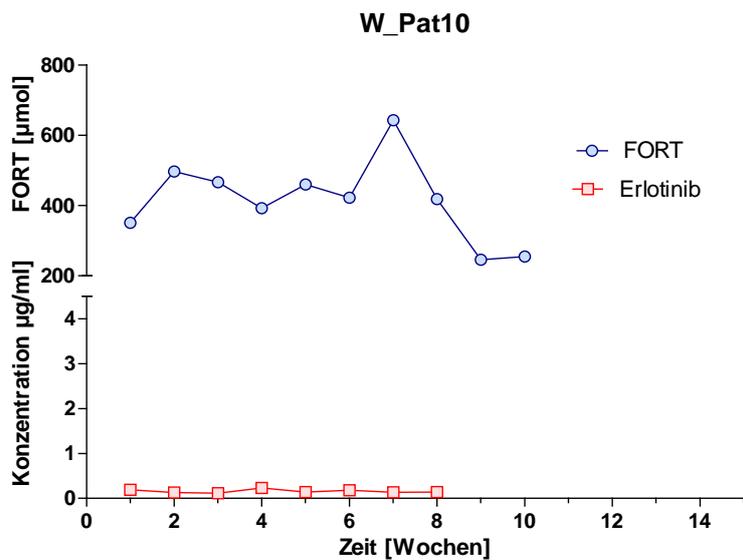
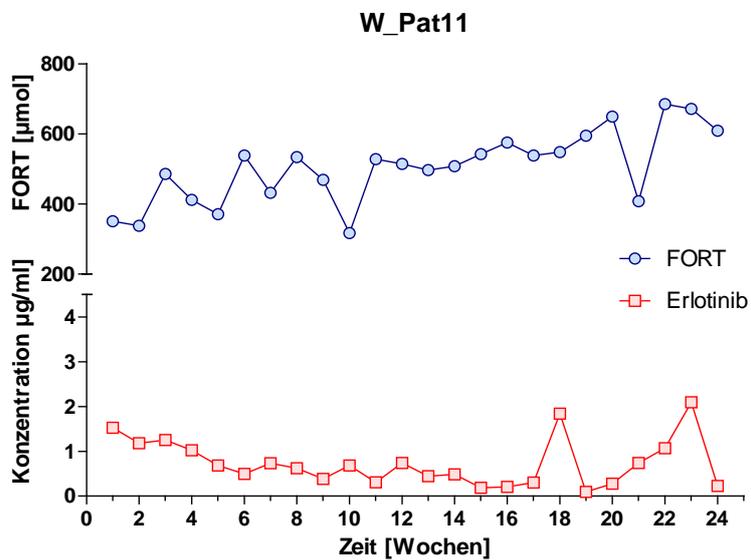
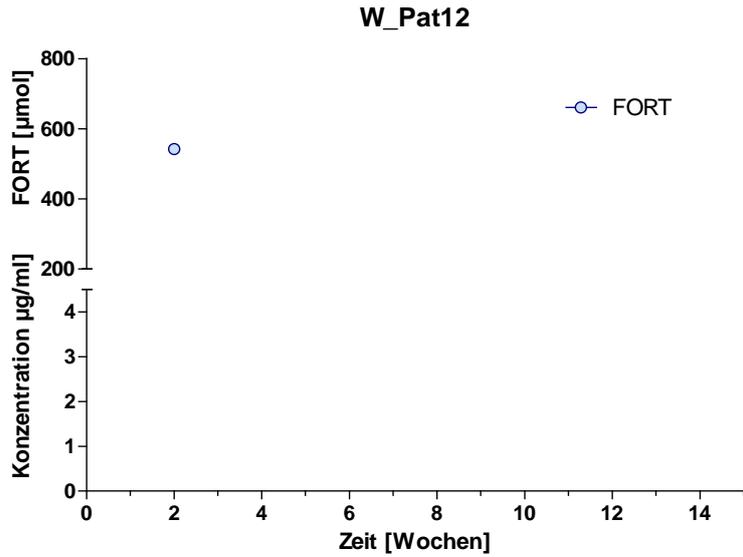


Abb. 29 :FORT-Werte in Wochenabständen von Patient 12-10

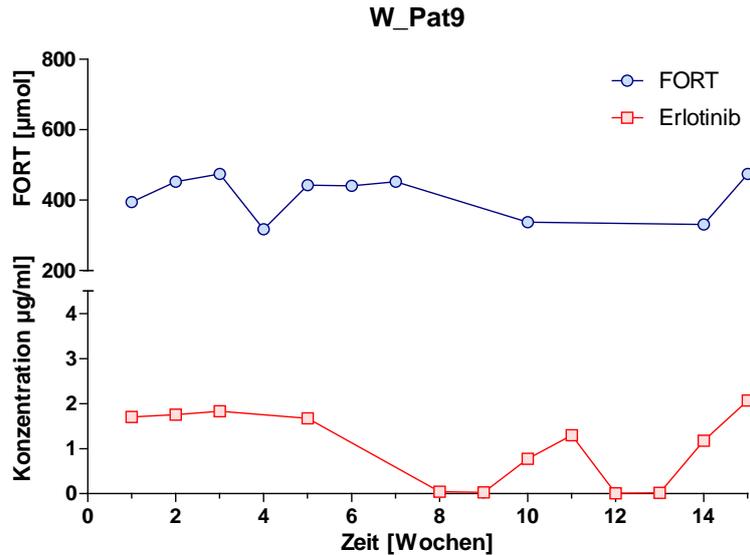


Abb. 30: FORT-Werte in Wochenabständen von Patient 9

Betrachtet man nun die einzelnen graphischen Darstellungen der Wochenpatienten, so kann man ungefähr feststellen, dass keine eindeutige Übereinstimmung der FORT-Kurve mit der Erlotinib-Konzentration besteht. Der Verlauf der Stress-Kurven von Wochenpatient 21 und 20, die in Abbildung 27 dargestellt sind, sehen wie Spiegelbilder zu ihrer Erlotinib-Konzentrations-Kurve aus. Genau das gleiche kann man vom Wochenpatient 20 behaupten. In diesem Fall bedeutet dies, dass bei höheren Erlotinib-Plasmakonzentrationen der FORT-Wert zu sinken beginnt. Diese Tatsache kann begründet werden mit unregelmäßigen Blutabnahmezeitpunkten. Laut der Diplomarbeit von Kollegin Nairi Baroian, die die Blutabnahmezeiten in Tabellen dokumentiert hat, ist eindeutig zu erkennen, dass diese nicht 4 Stunden standardisiert sind. Daher kann der Kurvenverlauf sehr stark schwanken.

Beim Wochenpatient 19 dagegen entspricht die Radikal-Kurve einigermaßen der Erlotinib-Konzentration. Nach der 4. Wochen erreicht die Konzentration sein Maximum und fällt in der 6. Woche stark ab. Die dazugehörigen FORT-Werte erreichen ab der 3. Woche 663, bleiben auch nach der darauf folgenden Woche konstant und sinken auch erst ab der 4. Woche nur sehr schwach ab. Dieser schwache Trend kann vorliegen weil Erlotinib bekanntlich in der Leber durch das Cytochrom-P-450-System durch 3 Hauptbiotransformationswege metabolisiert wird. So kann ihre Sauerstoffverarbeitung zu Bildung von ROS führen.

In der folgenden Abbildung 28 weisen die Stress-Werte von Wochenpatient 18 und 14 ein direkt proportionales Verhalten zur Erlotinib-Konzentrations-Werten auf.

Steigt die Konzentration auf ihr Maximum, so erhöht sich ebenfalls der oxidative Stress. Besonders aufschlussreich können die FORT-Werte von Wochenpatient 14 sein, die relativ hoch bleiben verhältnismäßig zur dazugehörigen äußerst geringen Plasmakonzentration. Dies kann mit einer Akkumulation von ROS zusammenhängen.

Die Daten von Wochenpatient 13 und 12 sind unvollständig, wobei bei Patient 12 nur eine Wochenprobe zur Verfügung stand. In der weiteren angeführten Abbildung 28 ist Wochenpatient 11 und 10 dargestellt. Eine starke Schwankung der Stress-Kurve besteht bei beiden Patienten im Vergleich zu ihrer Erlotinib-Konzentrations-Kurve. Hier liegt möglicherweise auch ein nicht standardisierter Abnahmezeitpunkt des Blutes zu Grunde. Auch bei Wochenpatient 19 kann man keine eindeutige Aussage machen.

Um den gesamten Verlauf der Radikalwerte in ihren Wochenabständen zu untersuchen, wurden Stresswerte jedes einzelnen Wochenpatienten in einem Scattergramm erneut graphisch übersichtlich gemacht. Die Zeitangabe in Wochen befindet sich auf der x-Achse, sowie die FORT-Skalierung auf der y-Achse. Wieder stellt die rote Linie, die bei 330 FORT entlang geht den Radikal-Grenzbereich dar.

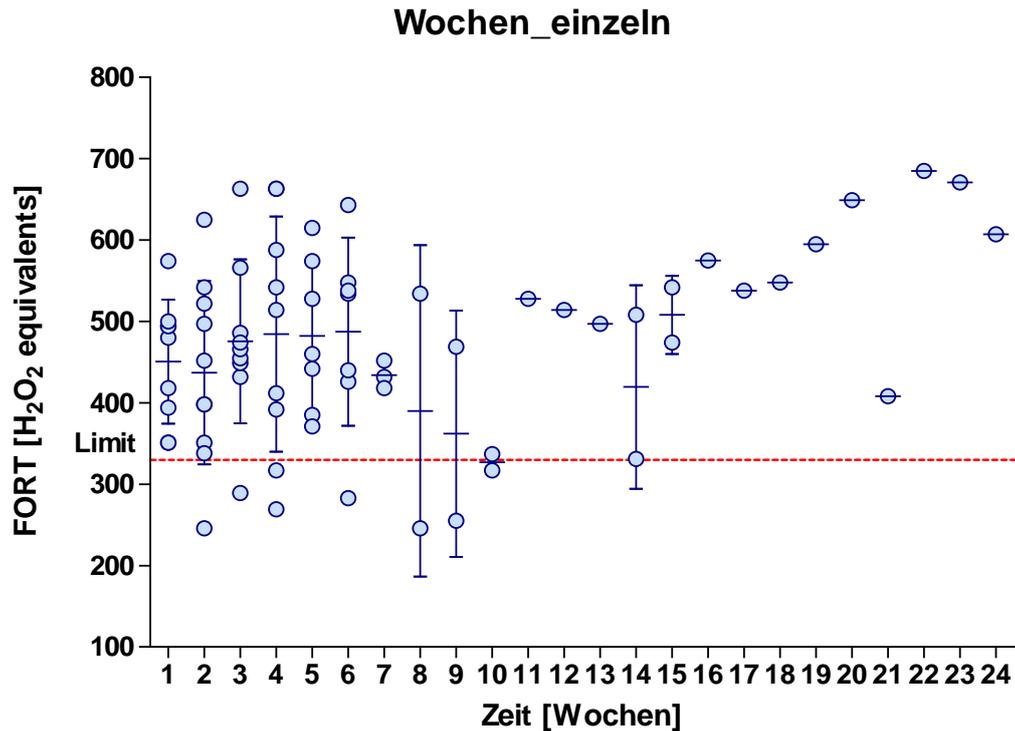


Abb. 32: Alle FORT-Werte in Wochenabständen

Tab. 33: Column-Statistik aller FORT-Werte in Wochenabständen

Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	18	19	20	21	22	23	24
No	9	10	9	9	7	7	3	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
Min	351,0	246,0	289,0	269,0	371,0	283,0	418,0	246,0	255,0	317,0	528,0	548,0	595,0	649,0	408,0	685,0	671,0	607,0
25% Perc	372,5	347,8	440,5	354,5	385,0	426,0	418,0	246,0	255,0	317,0	528,0	548,0	595,0	649,0	408,0	685,0	671,0	607,0
Median	480,0	425,0	466,0	514,0	460,0	534,0	432,0	390,0	362,0	327,0	528,0	548,0	595,0	649,0	408,0	685,0	671,0	607,0
75% Perc	497,0	527,0	526,0	625,5	574,0	548,0	452,0	534,0	469,0	337,0	528,0	548,0	595,0	649,0	408,0	685,0	671,0	607,0
Max	574,0	625,0	663,0	663,0	615,0	643,0	452,0	534,0	469,0	337,0	528,0	548,0	595,0	649,0	408,0	685,0	671,0	607,0
Mean	450,7	436,9	475,6	484,4	482,1	487,4	434,0	390,0	362,0	327,0	528,0	548,0	595,0	649,0	408,0	685,0	671,0	607,0
SD	76,16	112,6	100,8	144,4	93,17	115,8	17,09	203,6	151,3	14,14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SE	25,39	35,61	33,61	48,15	35,21	43,76	9,866	144,0	107,0	10,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lower 95% CI	392,1	356,3	398,0	373,4	396,0	380,4	391,6	-1440	-997,6	199,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Upper 95% CI	509,2	517,5	553,1	595,5	568,3	594,5	476,4	2220	1722	454,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Geometric mean	444,8	423,1	465,6	463,7	474,5	473,9	433,8	362,4	345,8	326,8	528,0	548,0	595,0	649,0	408,0	685,0	671,0	607,0
Lower 95% CI	389,7	347,8	392,0	362,0	396,6	370,3	393,5	2,635	7,205	221,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Upper 95% CI	507,8	514,6	552,9	594,0	567,6	606,6	478,2	49854	16598	482,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sum	4056	4369	4280	4360	3375	3412	1302	780,0	724,0	654,0	528,0	548,0	595,0	649,0	408,0	685,0	671,0	607,0

In dem nachstehenden Scattergramm ist eindeutig zu erkennen, dass die meisten FORT-Werte über dem Graubereich, nämlich über 400 FORT liegen. Im weiteren Verlauf der Wochen bleiben die Stresswerte im 400 bis 800 FORT-Bereich. Somit ist der Organismus dieser Patienten mit erhöhtem oxidativen Stress belastet.

## 6. Conclusion

Die vorliegende Diplomarbeit untersuchte an 9 Patienten den oxidativen Stress und ihre antioxidative Kapazität während der kombinierten Chemotherapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms. Dabei zeigte sich am Tag 1, dass bei allen Patienten die FORT-Werte durchwegs über der kritischen Grenze von 330 FORT lagen. Patient 17 wies die höchsten Werte mit 700 FORT auf und Patient 12 und 21 die niedrigsten mit 400 FORT. Werden die FORT-Werte über den gesamten Untersuchungszeitraum betrachtet, so bleibt die Verteilung der gemessenen Daten gleich.

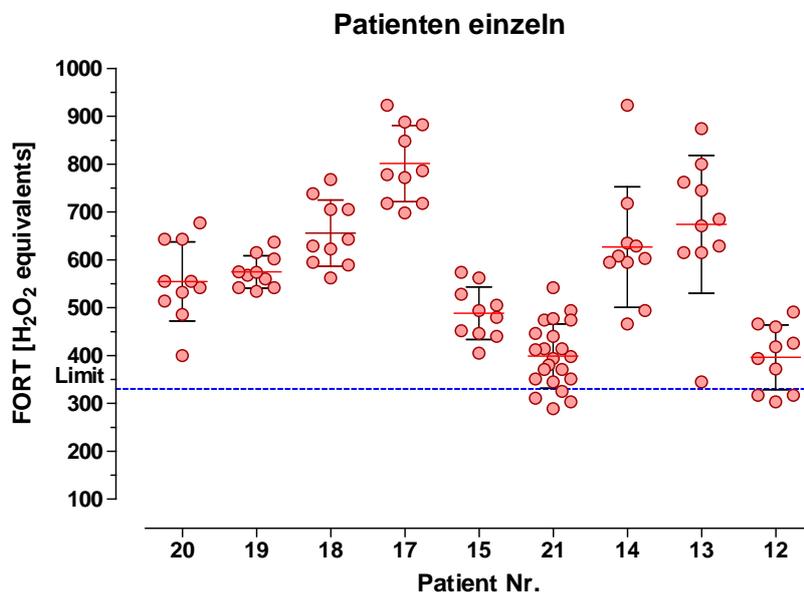


Abb. 22: Scattergramm aller FORT-Werte von Tag 1 bis 8

Die Mittelwerte der Patienten lagen zwischen 400 bis 800 FORT. Auch die antioxidative Kapazität zeigte eine breite Streuung, dessen Messwerte sich zwischen 0,2 bis 2,0 mmol/l Trolox befanden, wobei vier Patienten deutlich unter der Grenze lagen und nur ein Patient drüber. Die antioxidative Kapazität ändert sich nicht dramatisch außer bei Patient 19.

Die Langzeitbeobachtung der FORT-Werte zeigt folgendes Ergebnis wie bei Tag 1-Tag 8 Proben. Ihre Werte liegen zwischen 400 bis 800 FORT, wobei kein Trend für eine kontinuierliche Zu- oder Abnahme der FORT-Werte im Untersuchungszeitraum messbar war.

In manchen Patienten ist ein Zusammenhang zwischen Erlotinib-Konzentration und Radikalwerte erkennbar (Patient 14, 18, 19, 20 und teilweise auch Patient 9). Bei den anderen Patienten wurde jedoch kein Zusammenhang festgestellt.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass bei der Therapie mit Erlotinib hohe Radikalwerte im Blut der Patienten nachzuweisen sind, was zu einer zusätzlichen oxidativen Belastung der bereits ohnehin bei geschwächten Patienten mit Pankreaskarzinome vorliegt, führt.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass es wünschenswert wäre bei derartiger Chemotherapie die ROS-Werte zu senken, vor allem da die antioxidative Kapazität der Patienten teilweise sehr oder extrem niedrig ist. Dies könnte zum Beispiel durch eine Supplementierung mit Antioxidantien wie Polyphenole, Vitamine oder Bioflavonoide erfolgen.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Sies H, Stahl W, Klotz LO, Brenneisen P; Oxidativer Stress: vom molekularen Mechanismus zur Klinik - Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
[www.uni-duesseldorf.de/Jahrbuch/2003/PDF/Sies.pdf](http://www.uni-duesseldorf.de/Jahrbuch/2003/PDF/Sies.pdf)
- [2] Löffler G, Petrides P, (Hrsg.); Biochemie und Pathochemie, 8. Auflage, Springer Verlag, 2007
- [3] Siems W, Krämer K, Grune T; Oxidativer Stress und Pharmaka. Pharmazeutische Zeitung-Schriftenreihe, Band 15, 2005
- [4] Reichl Franz-Xaver, Benecke J; Taschenatlas der Toxikologie: Sustanzen, Wirkungen, Umwelt, 2. Auflage, Thieme-Verlag
- [5] Hänsel R, (Hrsg), Sticher O; Pharmakognosie-Phytopharmazie, 8. Ausgabe, Springer-Medizin-Verlag, 2007
- [6] Halliwell B; Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem. J. (2007) 401 (1–11)
- [7] Ohlenschläger G; Freie Radikale, oxidativer Stress und Antioxidantien: krankheitsverursachende, präventive und reparative Prinzipien in lebenden Systemen, 2. Ausgabe, 2000
- [8] Hiddemann W, Bartram CR; Die Onkologie, Teil 1, *Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie*. Springer-Verlag, 2009
- [9] Dragovich T, Erickson RA, eMedicine, Medscape; Pancreatic cancer
- [10] Homepage, STATISTIK Austria, Österreichisches Krebsregister; Bauchspeicheldrüse-Krebsinzidenz und Krebsmortalität

- [11] Mutschler E, Thews G, Vaupel P; Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflage, Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart, 1999
- [12] Stathis A, Moore MJ; Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges, *Nature Review, Clinical Oncology* 7. 163-172, 2010
- [13] Oliveira-Cunha M, Newman W.G., Siriwardena A.K.; Epidermal Growth Factor Receptor in Pancreatic Cancer, MDPI Online, Open Access Journal / Cancers - [www.mdpi.com/journal/cancers](http://www.mdpi.com/journal/cancers), 2011
- [14] Kenneth A. Conklin; Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness, Jonsson Comprehensive Cancer Center, David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, *Integrative Cancer Therapies* 3(4), 2004
- [15] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M; Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart, 2001
- [17] EMEA, Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) Tarceva, 2007
- [18] Jie Ling, Kim A. Johnson, Hhuang Miao, Ashok Rakhit, Michael P. Pantze, Marta Hamilton, Bert L. Lum, Chandra Prakash; Metabolism and Excretion of Erlotinib, A Small Molecule Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in healthy Male Volunteers, Department of Pharmacokinetic, Pharmacodynamic and Bioanalytical Sciences, Genentech Incorporated, South San Francisco, California, 2005
- [19] Xia Qian, Jing Li, Jianhua Ding, Zhiyuan Wang, Wenjing Zhang, Gang Hu; Erlotinib activates mitochondrial death pathways related to the production of reactive oxygen species in the human non-small cell lung cancer cell line A549, Department of Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2009

- [20] Firma Incomat Medizinische Geräte GmbH; FORMplus  
Bedienungshandbuch; Version 1.0; 2006
  
- [21] Brumnik Tamara, Messung des oxidativen Stresses und der antioxidativen  
Kapazität bei der Chemotherapie solider Tumore mit Docetaxel,  
Diplomarbeit, Universität Wien, 2009
  
- [22] Pehan Marina, Messung des oxidativen Stress bei der Chemotherapie des  
Pankreaskarzinoms, Diplomarbeit, Universität Wien, 2010

## **8. Abstract**

In der Diplomarbeit wurde untersucht, ob im Rahmen einer kombinierten Chemotherapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms vermehrt reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) im Blut der behandelten Patienten auftreten. Hierfür wurden sowohl die Konzentrationen von Erlotinib im Blutplasma, als auch der oxidative Stress und die antioxidative Kapazität dieser Patienten ermittelt und miteinander in Korrelation gebracht.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Ester Mirsajeva  
Geburtsdatum: 29. April 1986  
Geburtsort: Termes  
Staatsbürgerschaft: Österreich

### Ausbildung

---

Seit Oktober 2005 Studentin der Pharmazie an der Universität Wien  
2001-2005 Bundesoberstufenrealgymnasium in Wien 3., Landstraßer Hauptstraße 70; Abschluss mit Matura  
1997 – 2001 Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium in Wien 3., Hagenmüllergasse 30  
1993– 1997 Lauder Chabad Volksschule in Wien 2., Schwarzenstockallee 2

### Berufsbezogene Tätigkeiten

---

März 2010-März 2012 Tutoriumauftrag am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik für Module:

- Apotheken-Screening
- Oxidative Stress-Messung

Dez. 2007-Feb. 2009 St. Rochs-Apotheke  
Mag. Pharm. Dr. Walther Pahs  
Landstraßer Hauptstraße 50

