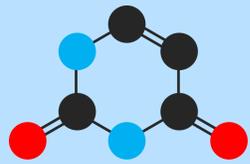


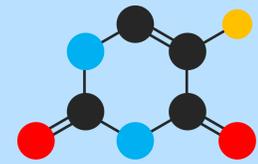
# 5-FU-Toxizität: DPD-Phänotypisierung und TDM als effiziente Alternative zur DPD-Genotypisierung

Eine LC-MS-basierte Routinemethode zur Begleitung der Therapie mit 5-FU-Präparaten



T. Böhle, G. Stamminger und D. Pohlers

Labor Chemnitz - Zentrum für Diagnostik GmbH am Klinikum Chemnitz  
Flemmingstr. 2, 09116, Chemnitz, Abteilung Biochemie/Proteinanalytik



## Einleitung

Seit ihrer Markteinführung 1962 sind 5-FU-Präparate Bestandteil der Standardtherapie vieler bösartiger Tumoren, z. B. Dickdarm-, Bauchspeicheldrüsen-, Magen-, Brust- sowie Kopf-Hals-Krebs. Der Abbau von 5-FU erfolgt normalerweise rasch ( $t_{1/2} = 12$  min) durch die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD). Bei einem Mangel oder verminderter DPD-Aktivität besteht jedoch das Risiko einer Akkumulation mit schwerwiegenden Nebenwirkungen, bis hin zum Tod. Bis zu 9% der europäischstämmigen Bevölkerung sind von einem partiellen DPD-Mangel betroffen, der eine TDM-basierte Steuerung der 5-FU-Therapie nötig macht. Bei bis zu 0,5% der Patienten besteht sogar ein vollständiger DPD-Mangel, der die Verabreichung von 5-FU-Präparaten kontraindiziert. Um die zuvor beobachtete Therapie assoziierte Letalität von 0,2 - 1,0% zu senken, haben EMA und DGHO eine DPD-Typisierung vor Therapiebeginn angeraten. Diese erfolgt bislang meist als Genotypisierung. Daneben konnte sich inzwischen die Phänotypisierung etablieren. ■

## Genotypisierung

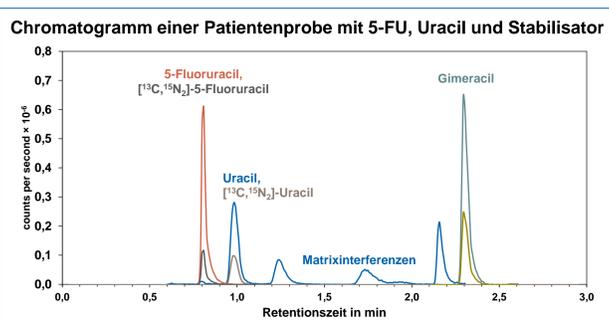
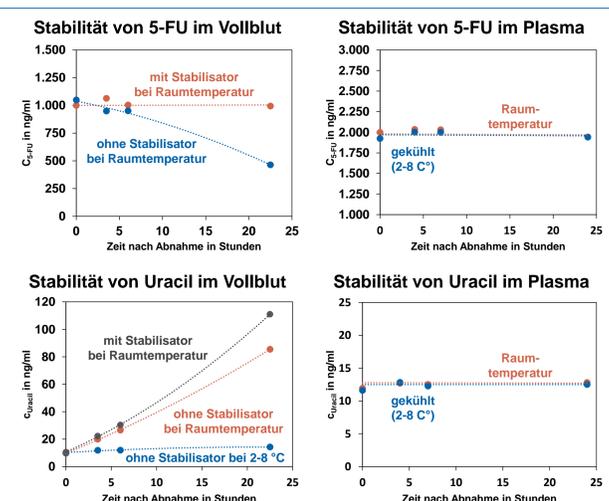
Im Rahmen der bislang etablierten Genotypisierung erfolgt eine Sequenzierung von vier Genbereichen (E11,13,14,22 von DPYD), die gemäß EMA / DGHO eine klinische Relevanz besitzen. Über ein Scoring erfolgt die Kategorisierung der enzymatischen Aktivität sowie Anpassung der Initialdosis zur 5-FU-Therapie. Weitere Mutationen, deren Einfluss auf die DPD-Aktivität diskutiert wird (ABCB1, MTHFR, TYMS, ...), werden nicht erfasst. Das TDM für 5-FU ist in jedem Fall indiziert. ■

## Phänotypisierung

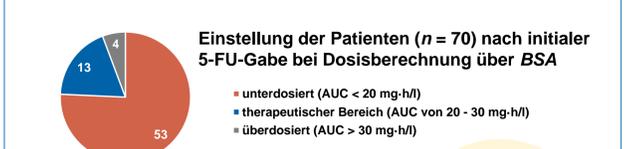
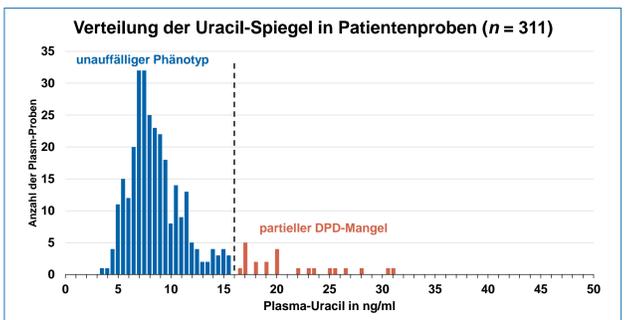
Sowohl 5-FU als auch das endogene Stoffwechselintermediat Uracil werden über DPD metabolisiert. Damit kann über den Uracil-Spiegel (Serum/Plasma) ein Rückschluss auf die DPD-Aktivität gezogen werden.

- $\leq 16 \mu\text{g/l}$ : unauffälliger Phänotyp
  - $> 16 \mu\text{g/l}$  bis  $< 150 \mu\text{g/l}$ : partieller Mangel
  - $> 150 \mu\text{g/l}$ : vollständiger Mangel
- Gegenüber der Genotypisierung können auch seltene/unbekannte genetische Ursachen oder erworbene Defekte erkannt werden. ■

Bezeichnung (Allelvariante)	rsID	Nukleotid-Sequenz/ Aminosäure-Sequenz	Enzymatische Aktivität	Träger mit $\geq 1$ Allelvariante
Wildtyp			1	
*2A	rs3918290	c.1905+1G>A Exon14 Skipping	0	0,9 - 1,5 %
*13	rs55886062	c.1679T>G I560S	0	0,1 - 0,2 %
Polymorphismus	rs67376798	c.2846A>T D949V	0,5	1,1 - 1,5 %
Haplotyp B3	rs75017182 rs56038477	c.1129-5923C>G c.1236G>A	0,5	4,3 - 4,7 %



Q1	Q3	Dwell (ms)	ID	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
129	59	50	5-FU	-40	-10	-34	-7
132	60	100	[ <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-5-FU	-45	-10	-40	-9
111	42	100	Uracil	-100	-10	-22	-19
114	44	100	[ <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Uracil	-100	-10	-22	-19
148	130	5	Gimeracil 1	86	10	29	12
148	75	5	Gimeracil 2	86	10	43	10



### 1 Präanalytik

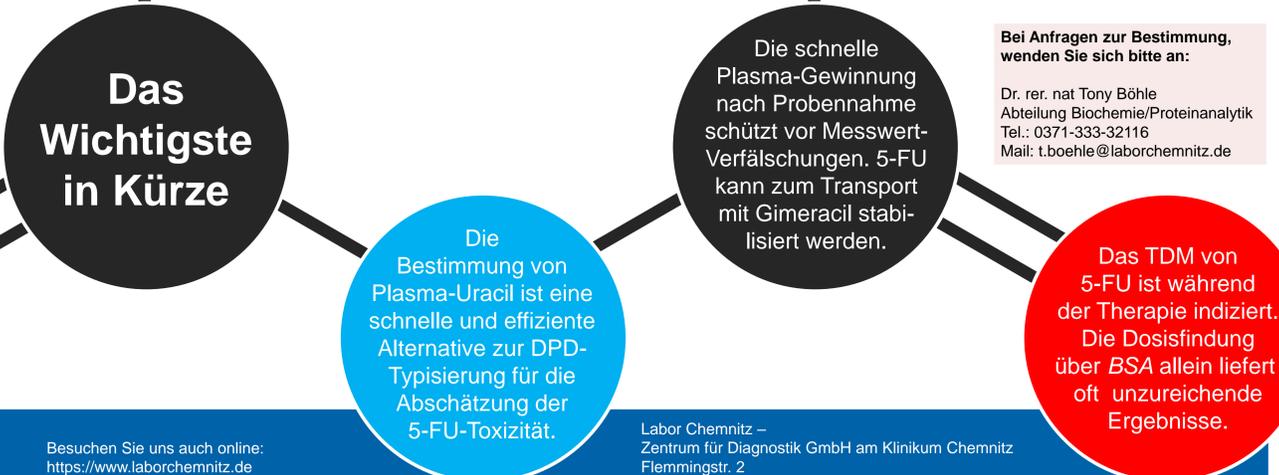
Nach der Blutentnahme sinkt der 5-FU-Spiegel rasch ab. Grund hierfür ist der Abbau von 5-FU durch DPD, das in den Leukozyten lokalisiert ist. Dieser Prozess kann durch die zeitnahe Gewinnung von Plasma (Abtrennung der zellulären Blutbestandteile) gestoppt werden. Alternativ ist auch eine Stabilisierung durch Zugabe von Gimeracil möglich. Dieses hemmt DPD kompetitiv, so dass Proben für den Transport bzw. Versand bei Raumtemperatur für wenigstens 24 Stunden stabil sind. Zwar findet analog auch ein Abbau von Uracil statt, dieses wird aber durch Stoffwechselprozesse auch ständig nachgebildet, so dass nach Blutentnahme insgesamt ein schneller Anstieg des Uracils in der Probe zu beobachten ist. Dieser Effekt wird durch Zugabe von Gimeracil verstärkt. Eine Kühlung der Probe kann den Anstieg verlangsamen, aber nicht unterbinden. So ist eine Plasma-Gewinnung innerhalb von 15 Minuten nach Abnahme unerlässlich, um richtige Analyseergebnisse zu erhalten. ■

### 2 Messung

Die Bestimmung von Uracil, 5-FU und Gimeracil (als Stabilisator) erfolgt nach einfacher Proteinfällung entsprechend den log P-Werten der Verbindungen im HILIC-Modus. Hierdurch wird auch eine verbesserte Sensitivität erreicht. Um die unterschiedlichen Konzentrationsbereiche von Uracil (2 - 200  $\mu\text{g/l}$ ) und 5-FU (50 - 2.500  $\mu\text{g/l}$ ) mit der selben Messmethode bestimmen zu können, wird der weniger sensitive Übergang 129  $\rightarrow$  59 für die Quantifizierung von 5-FU verwendet. ■

### 3 Ergebnisse

Die Auswertung zeigt bei 7,7% der Patienten (n=311) einen partiellen oder vollständigen DPD-Mangel. Ausgehend von einer angestrebten AUC von 20 - 30  $\text{mg} \times \text{h} \times \text{l}^{-1}$  bei der 5-FU-Dauerinfusionstherapie, zeigt sich nur bei einer Minderzahl von 18,6% der Patienten (n=70) eine optimale Dosierung, während 75,7% unterdosiert und 5,7% überdosiert sind. Die Ergebnisse belegen die Notwendigkeit des 5-FU-TDM, da eine reine Dosiskalkulation nach Körperoberfläche (BSA) unzureichend ist. ■



© Zentrum für Diagnostik GmbH am Klinikum Chemnitz | 24. und 25. Oktober 2022 | 20. Anwendertreffen der Sektion Klinische Massenspektrometrie in der Labormedizin