

Gevoeligheid en specificiteit van een orale uracilbelastingtest bij patiënten met normale DPD-activiteit en met DPD-deficiëntie

M.C. van Staveren ^{a*}, A.B.P. van Kuilenburg ^b, T. Visser ^c en J.G. Maring ^d

^a Ziekenhuisapotheker i.o., Martini Ziekenhuis, Groningen. Thans ziekenhuisapotheker, Leveste Scheper Ziekenhuis, Emmen.

^b Klinisch-biochemisch geneticus, Laboratorium Genetisch Metabole Ziekten, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam.

^c Ziekenhuisapotheker, Martini Ziekenhuis, Groningen.

^d Ziekenhuisapotheker, Ziekenhuisapothek Diaconessenhuis Meppel.

* Correspondentie: m.vanstaveren@sze.nl.

Kernpunten

- Deficiëntie van dihydropyrimidinedehydrogenase (DPD) kan leiden tot ernstige bijwerkingen bij gebruik van fluorouracil of capecitabine.
- De uracilspiegels na de orale uracilbelastingtest verschillen significant tussen patiënten met normale DPD-activiteit en DPD-deficiënte patiënten.
- Zowel voor de uracilconcentratie als voor de ratio uracil:dihydrouracil zijn verschillende afnametijden waarop de orale uracilbelastingtest een perfect scheidend vermogen heeft.
- Opsporen van DPD-deficiëntie lijkt mogelijk door afname van een of twee monsters na de orale uracilbelastingtest.

Fluorouracil is een oncolyticum dat onder andere wordt gebruikt bij de behandeling van mammacarcinoom, colorectaal carcinoom, maagcarcinoom en levercarcinoom, vaak in combinatie met andere oncolytica. De belangrijkste werking van fluorouracil kan worden toegeschreven aan de vorming van de metabooliet FdUMP, die een sterke remmer is van thymidylaatsynthase, een cruciaal enzym dat nodig is voor DNA-synthese. Fluorouracil en zijn metaboolieten worden ook voor een deel ingebouwd in het DNA en het RNA, wat leidt tot toxische effecten. Capecitabine is een prodrug die intracellulair wordt omgezet in fluorouracil. Ongeveer 80-90% van toegediend fluorouracil wordt direct afgebroken. Het eerste enzym in deze katabolismeketen is dihydropyrimidinedehydrogenase (DPD) (figuur 1). Patiënten met een partiële of volledige DPD-deficiëntie kunnen fluorouracil onvoldoende afbreken, waardoor er meer fluorouracil beschikbaar komt voor anabolisme en de vorming van toxische metaboolieten. De meest voorkomende toxische effecten zijn ernstige mucositis, diarree en neutropenie. Jaarlijks overlijdt in Nederland een aantal patiënten aan de gevolgen van DPD-deficiëntie [1]. De klaring van fluorouracil is bij mensen die een partiële deficiëntie hebben ongeveer een factor tweeënhalve lager dan (AUC is tweeënhalve keer zo groot als) bij patiënten met een normale DPD-activiteit [2]. Bij 39-61% van de patiënten bij wie ernstige toxische reacties optreden bij de behande-

Abstract

Sensitivity and specificity of an oral uracil loading test in patients with normal DPD activity and with DPD deficiency

Objective

To determine the optimal time points to sample patients after the administration of an oral uracil loading test.

Design

From November 2003 until September 2008 an oral uracil loading test was applied in 38 patients in different hospitals in the Netherlands. 30 patients had a normal DPD status and 8 patients were DPD-deficient.

Methods

Blood samples were taken just before and on $t = 0, 15, 30, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 220$ or 240 minutes. Uracil and dihydrouracil levels were analysed with high pressure liquid chromatography.

Results

The blood uracil concentrations were significantly different between the two groups. The uracil concentration and the uracil:dihydrouracil ratio showed perfect discrimination at several sample points.

Conclusion

Based on this study the amount of sample points after the uracil loading test can be reduced to one or two.

PW Wetenschappelijk Platform 2009;3(10):183-186

ling met fluorouracil, is dit te wijten aan DPD-deficiëntie [3]. Het gen dat voor DPD codeert ligt op chromosoom 1p21.3 en bestaat uit 23 exonen. Inmiddels zijn meer dan 43 mutaties gevonden in het gen dat voor DPD codeert. De mutatie die het meest voorkomt is IVS14+1G>A. Deze mutatie heeft een relatief hoge frequentie in de Nederlandse populatie: 1,8% van de Nederlanders is drager van deze mutatie [1]. Er zijn echter ook mutaties gevonden die geen effect hebben op de DPD-activiteit. Daarentegen zijn er ook mensen met een verlaagde DPD-activiteit bij wie geen mutaties gevonden werden. Mede hierdoor is genotypering niet 100% geschikt voor het voorspellen van DPD-activiteit. Theeuwes e.a. concludeerden eerder dat een orale belastingtest met uracil een geschikte methode zou kunnen zijn om DPD-deficiëntie op te sporen [4]. Uracil is een niet-toxische lichaamseigen stof die gemakkelijk in bloed aangetoond kan worden. Uracil wordt door DPD omgezet in dihydrouracil. Dihydrouracilspiegels kunnen worden gebruikt voor het uitrekenen van de ratio uracil:dihydrouracil, die de mate van omzetting van uracil weergeeft en dus een maat is voor de DPD-activiteit. Wij beschrijven in dit artikel de resultaten van een orale uraciltest

bevattende kuur. Een aantal patiënten is prospectief geïncludeerd voorafgaand aan de eerste behandeling met fluorouracil intraveneus (adjuvant/palliatief) volgens Mayo Clinics of oraal als capecitabine (palliatief). Patiënten met een DPD-activiteit boven 5 nmol/mg per uur zijn als DPD-normaal gedefinieerd, patiënten met een DPD-activiteit onder 5 nmol/mg per uur zijn als DPD-deficiënt bestempeld.

Van alle patiënten is bloed afgenomen voor de bepaling van de DPD-activiteit in mononucleaire bloedcellen volgens de methode van Van Kuilenburg e.a. [5]. De patiënten die retrospectief zijn getest, zijn geïncludeerd aan de hand van opgetreden ernstige toxiciteit (CTC-graad 3 of 4) bij een capecitabine- of fluorouracil-bevattende chemokuur. Tot de toxische effecten zijn gerekend: leukopenie ($<2,0 \times 10^9/l$ maar $\geq 1,0 \times 10^9/l$), febrile neutropenie gepaard gaande met leukopenie, koorts, infectie, diarree, dehydratie, *hand-foot*-syndroom en mucositis.

De belastingtest is in diverse algemene en academische ziekenhuizen in Nederland uitgevoerd. De patiënten kregen 500 mg/m² uracil toegediend in de vorm van een waterige oplossing. Alle patiënten moesten de uracil drank op een nuchtere maag innemen en mochten gedurende twee uur na inname niets eten. Bloedafnames voor de bepaling van uracil en de ratio uracil:dihydrouracil vonden plaats voor het innemen van de uracil drank ($t = 0$ min) en op $t = 15, 30, 45, 60, 80, 100, 120, 150, 180$ en 220 of 240 minuten. Plasmaspiegels van uracil en dihydrouracil zijn bepaald met HPLC volgens Maring e.a. [6].

De statistische analyse is uitgevoerd na verdeling van de patiëntgegevens over twee groepen, gebaseerd op aan- of afwezigheid van DPD-deficiëntie. De farmacokinetische, demografische en patiëntgegevens zijn tussen beide groepen vergeleken met een eenzijdige student-t-test. In geval van niet normaal verdeelde gegevens, onderzocht met de kolmogorov-smirnovtest, is getest met een niet-parametrische mann-whitney-U-test. Van de uracil- en dihydrouracilwaarden op $t = 60, 80, 100$ en 120 minuten is een *receiver operating characteristic-curve* (ROC-curve) opgesteld. Deze curve is een grafische weergave van de gevoeligheid uitgezet tegen $(1 - S)$, waarbij S de specificiteit is.

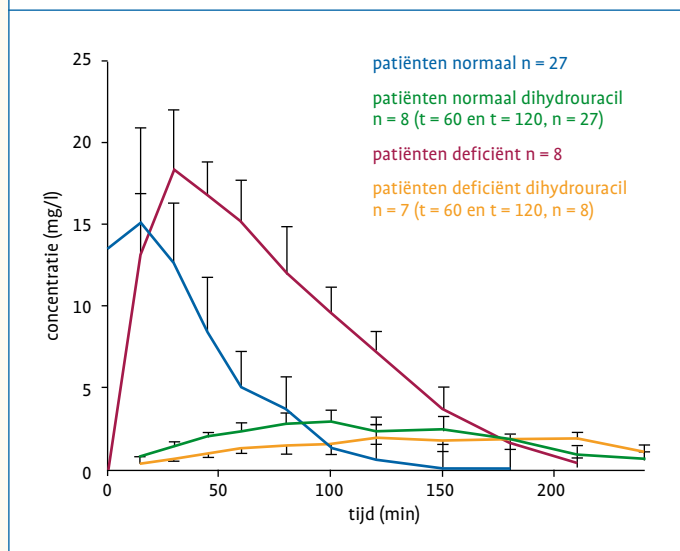
De studie is goedgekeurd door de medisch-ethische toetsingscommissie van het Martini Ziekenhuis.

Resultaten

De uracilbelastingtest is in totaal bij 38 patiënten uitgevoerd, van wie 29 vrouw en 9 man. Leeftijd, gewicht en lengte van de patiënten met een normale DPD-status waren 64 ± 9 jaar, 71 ± 12 kg en 170 ± 10 cm, versus 57 ± 14 jaar, 74 ± 14 kg en 170 ± 6 cm bij de DPD-deficiënte groep ($p = 0,173$ voor leeftijd, $p = 0,615$ voor gewicht en $p = 0,958$ voor de lengte). 30 patiënten hadden een normale DPD-status. Van deze 30 zijn 16 patiënten retrospectief getest naar aanleiding van opgetreden toxiciteit, de overige 14 zijn prospectief

Figuur 2

Gemiddelde waarden (\pm SD) van uracil en dihydrouracil van alle DPD-normale en DPD-deficiënte patiënten na toediening van uracil



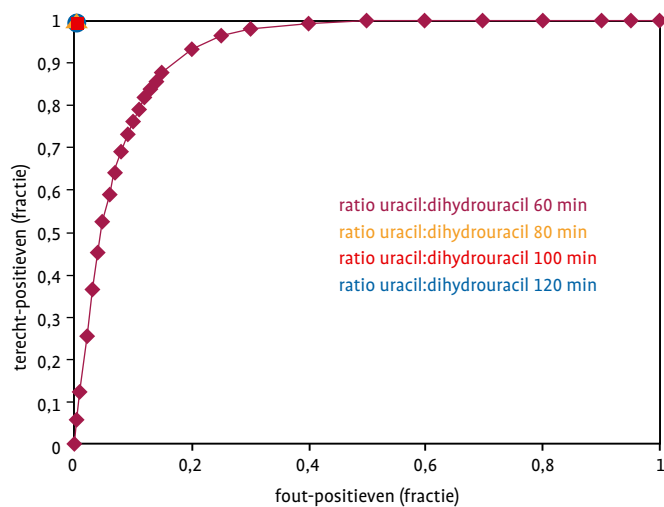
getest. Van de in totaal 8 deficiënte patiënten zijn 7 retrospectief getest naar aanleiding van opgetreden toxiciteit, de andere patiënt uit deze groep is als deficiënt getypeerd na vrijwillige blootstelling aan de uracilbelastingtest. Bij 16 van de 30 patiënten met een normale DPD-activiteit en bij 1 van de 8 patiënten met een verlaagde DPD-activiteit zijn twee bloedmonsters afgenomen op $t = 60$ en 120 minuten (tweepuntsbemonstering). Deze patiënten zijn afkomstig uit een onderzoek waar protocollair na het innemen van de uracilbelastingtestvloestof twee monsters zijn afgenomen in plaats van een volledige curve.

In figuur 2 zijn de curven van de gemeten uracil- en dihydrouracilwaarden bij de DPD-normalen en de DPD-deficiënten uitgezet tegen de tijd ($p \leq 0,0093$ tussen uracil- en dihydrouracilwaarden op de verschillen tijdstippen). Gezien het verloop van de curven is het grootste verschil tussen beide groepen te verwachten tussen $t = 60$ en $t = 120$. Van 4 patiënten met een normale DPD-activiteit is geen dihydrouracilwaarde gemeten en vervalt derhalve de berekening van de ratio. Tot deze 4 patiënten behoorden 3 met een volledige monsternamen en 1 met een tweepuntsbemonstering. Op de tijdstippen $t = 60$ en $t = 120$ is de statistische analyse twee keer uitgevoerd, een keer voor uitsluitend de patiënten die een volledige monsternamen ondergingen en een keer voor alle patiënten. De reden hiervan is de statistische power op deze punten te verhogen. Bij $t = 80$ kon bij een patiënt met normaal DPD geen waarde gemeten worden omdat de bepaling werd gestoord.

Bij de ROC-analyse wordt de gevoeligheid van een test uitgezet tegen $(1 - S)$. Een fractie terecht-positieven van 1 in combinatie met een fractie fout-positieven van 0 [punt (0,1) in de ROC-curve] duidt op een perfect scheidend vermogen van een test. De power van de test wordt 1 bij een perfect scheidend vermogen. Power is gelijk aan $(1 - \beta)$ ($1 -$ vals-negatieven). Als het aandeel terecht-positieven 1 is, is het aandeel vals-negatieven dus 0 en de power daarmee 1. Uit de

Figuur 3

Receiver operating characteristic-curve. De ratio's uracil: dihydrouracil vallen samen in het punt (0,1) voor de analyses op t = 80, 100 en 120 minuten



curven blijkt dat de voor de uracilconcentratie op t = 120 min er in de huidige steekproef een perfect scheidend vermogen is tussen patiënten met een normale DPD-activiteit en patiënten met een DPD-deficiëntie. Bij de uracil: dihydrouracilratio's blijkt dit het geval te zijn bij meting op t = 80, 100 en 120 minuten maar niet bij 60 minuten (figuur 3).

Beschouwing en conclusie

Wij onderzochten of er voor diagnostische doeleinden bruikbare verschillen zijn tussen de uracilspiegels en de uracil: dihydrouracilratio's van patiënten met een normale DPD-status en die met een DPD-deficiëntie. Gebleken is dat er in de tot dusver onderzochte populatie een duidelijk verschil bestaat in de uracilconcentraties en de uracil: dihydrouracilratio's tussen beide groepen na de blootstelling aan de uracilbelastingtest. Dit ondersteunt de conclusie van Theeuwes dat de onderzochte uracilbelastingtest geschikt kan zijn voor vroegtijdige opsporing van DPD-deficiëntie.

In dit onderzoek zijn patiënten meegenomen die zowel prospectief als retrospectief zijn geïncludeerd. De retrospectieve patiënten ondervonden allen toxiciteit naar aanleiding van de behandeling met fluorouracil of capecitabine. Van de prospectief geïncludeerde patiënten is niet bekend of ze na het krijgen van de eerste behandeling ook te maken hebben gekregen met toxische effecten. Beide groepen zijn dus niet volledig met elkaar vergelijkbaar omdat ze

verschillen in het wel of niet optreden van toxiciteit. Hoewel weinig verschil tussen prospectieve en retrospectieve patiënten valt te verwachten, verdient het de voorkeur alleen retrospectieve of prospectieve patiënten met elkaar te vergelijken om een eventuele bias van resultaten te voorkomen. De endogene uracil: dihydrouracilratio's zijn in dit onderzoek niet meegenomen.

In totaal zijn 35 patiënten geïncludeerd, van de deficiënte patiënten is bij 7 een volledige curve afgenomen, van de patiënten met een normale DPD-activiteit is dit bij 11 het geval. Bij de overige patiënten zijn monsters afgenomen na de uracilname op t = 60 en 120 minuten. De volledige curven leveren genoeg meetpunten (77 versus 121) op om de optimale afnametijden te bepalen voor de gelimiteerde tweepuntsafname. Patiënten retrospectief includeren is in de praktijk erg lastig gebleken. Op dit moment loopt in ruim dertig ziekenhuizen in Nederland de Eurabel 2 studie. In deze studie wordt bij vijftig patiënten met en vijftig patiënten zonder DPD-deficiëntie de belastingtest uitgevoerd naar aanleiding van opgetreden toxiciteit. Wij concluderen dat de uracilconcentraties en de uracil: dihydrouracilratio's significant van elkaar verschillen tussen patiënten met een normale DPD-status en patiënten met een DPD-deficiëntie.

Verder concluderen wij dat in de huidige steekproef op tijdstip t = 120 min de uracilbelastingtest een perfect scheidend vermogen heeft als de uracilconcentratie in plasma in ogenschouw genomen wordt. Wanneer wordt gekeken naar de uracil: dihydrouracilratio's in plasma, dan heeft de test een perfect scheidend vermogen bij t = 80, 100 en 120 minuten. De opsporing van DPD-deficiëntie zou op basis van dit onderzoek in het vervolg kunnen gebeuren door middel van het afnemen van een of twee monsters na inname van de uracil-drink.

Gebaseerd op de registratievoordracht van M.C. van Stavoren.

Deze studie werd mede mogelijk gemaakt door stichting PRISMA en een unrestricted grant van Roche Nederland.

LITERATUUR

- 1 van Kuilenburg ABP, Muller EW, Haasjes J, et al. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 2001;7(5):1149-53.
- 2 Maring JG, van Kuilenburg ABP, Haasjes J, et al. Reduced 5-FU clearance in a patient with low DPD activity due to heterozygosity for a mutant allele of the DPYD gene. *Br J Cancer* 2002;86:1028-33.
- 3 van Kuilenburg ABP. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2004;40:939-50.
- 4 Theeuwes-Oonk BN, Maring JG, van Kuilenburg ABP. Deficiëntie bijtijds opsporen. Bruikbaarheid van uracilbelastingtest voor fenotypering van dihydropyrimidinedehydrogenase. *Pharm Weekbl* 2005;140(3):100-3.
- 5 van Kuilenburg ABP, van Lenthe H, Tromp A, et al. Pitfalls in the diagnosis of patients with partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin Chem* 2000;46(1):9-17.
- 6 Maring JG, Schouten L, Greijdanus B, et al. A simple and sensitive fully validated HPLC-UV method for the determination of 5-fluorouracil and its metabolite 5,6-dihydrofluorouracil in plasma. *Ther Drug Monit* 2005;27(1):25-30.