

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Magdalena Ćwiklińska

**CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA ELIMINACJĘ I TOLERANCJĘ
WYSOKICH DAWEK METOTREKSATU, STOSOWANYCH U DZIECI
W KONSOLIDACJI REMISJI
OSTREJ BIAŁACZKI LIMFOBLASTYCZNEJ**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Walentyna Balwierz

Pracę wykonano w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki: dr hab. med. Walentyna Balwierz

Kraków, 2009

Wyrażam głęboką wdzięczność:

moim Nauczycielom, a zwłaszcza Panu Profesorowi Jerzemu Armacie, dzięki któremu zostałam hematologiem,

Pani Docent Walentynie Balwierz, Promotor tej pracy – za inspirację, cenne uwagi i wszelką pomoc udzieloną w trakcie realizacji badań i pisanie pracy,

Panu Profesorowi Jackowi J. Pietrzykowi,

Panu Doktorowi Mirosławowi Bik-Multanowskiemu i innym Osobom z Zakładu Genetyki Klinicznej Katedry Pediatrii UJ – za umożliwienie badań polimorfizmu 677C>T genu MTHFR i miłą atmosferę współpracy,

Panu Doktorowi Jackowi Nowakowi, Kierownikowi Pracowni Monitorowania Leków Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie – za zainteresowanie tematem farmakokinetyki metotreksatu i owocną współpracę,

Pani Doktor Helenie Stanuch – za pomoc w opracowaniu statystycznym danych

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEKŚCIE	7
I. WSTĘP	9
II. CEL PRACY	13
III. MATERIAŁ I METODY BADAŃ	14
1. Pacjenci i metody leczenia ALL-SR w latach: 1993 - 2002 (grupa leczona dawką 3 g/m ² Mtx) i 2003 - 2007 (grupa leczona dawką 2 g/m ² leku)	14
1.1. Ogólna charakterystyka pacjentów	14
1.2. Porównanie cech dzieci leczonych dwoma różnymi dawkami Mtx	16
1.3. Terapia konsolidacyjna w dwu analizowanych okresach	18
2. Oznaczenia stężeń Mtx w surowicy metodą immunoenzymatyczną	19
2.1. Stały panel oznaczeń w 4 punktach czasowych eliminacji leku	19
2.2. Oznaczenia stężeń Mtx w surowicy w przypadku jego przedłużonej eliminacji	19
3. Obliczenia stałej eliminacji leku metodą Wagnera, w różnych okresach jego wydalania	19
4. Badania morfologii krwi przed i po zakończeniu cykli z HD-Mtx	20
5. Oznaczenia podstawowych parametrów biochemicznych funkcji wątroby i nerek przed i po cyklach z HD-Mtx	21
6. Monitorowanie funkcji nerek w trakcie cykli z Mtx	21
7. Ocena kliniczna leczonych pod kątem występowania ostrych neurotoksyczności terapii systemowej i dokanalowej z Mtx	21
8. Ocena kliniczna toksyczności skórno – śluzówkowych	22
9. Analiza zakażeń związanych z terapią HD-Mtx	22
10. Ocena opóźnień w chemioterapii, wywołanych nasilonymi ostrymi toksycznościami leczenia z zastosowaniem HD-Mtx	22
11. Rozszerzone kryteria stopni toksyczności wg NCI-CTC w modyfikacji GPOH, dla oceny powikłań narządowych i układowych po HD-Mtx	22
12. Analiza nosicielstwa polimorfizmu 677C>T reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej metodą PCR-RFLP w badanej populacji	23
13. Metody analizy statystycznej	24
IV. WYNIKI	26
1. Stężenia stacjonarne Mtx w surowicy po dobowych wlewach leku w dwu wysokich systemowych dawkach: 2 g/m ² i 3 g/m ²	26
1.1. Wysokość stężeń stacjonarnych Mtx w zależności od zastosowanej dawki	26

1.2. Zmienność wartości stężeń stacjonarnych Mtx w kolejnych cyklach.....	27
1.3. Wartości stężeń stacjonarnych w zależności od dawki Mtx a minimalne stężenie stacjonarne (16,0 $\mu\text{mol/l}$).....	29
1.4. Stężenia stacjonarne a wiek leczonych.....	31
1.5. Stężenia stacjonarne a stężenia w 48 godzinie od początku wlewu HD-Mtx.....	32
2. Ocena sprawności eliminacji Mtx, stosowanego w dwu różnych dawkach systemowych	34
2.1. Średnie wartości stężeń Mtx w surowicy a stężenia krytyczne w 4 punktach czasowych eliminacji leku.....	34
2.2. Częstość zaburzonej eliminacji leku w zależności od kolejności cyklu dla dwu różnych dawek Mtx	36
2.3. Częstość przedłużonej eliminacji dwu różnych dawek leku – analiza w odniesieniu do pacjentów.....	38
2.4. Płeć, wiek i BMI pacjentów a zaburzenie eliminacji dwóch wysokich dawek Mtx	39
2.5. Nosicielstwo polimorfizmu 677 C>T MTHFR a zaburzenie eliminacji Mtx.....	40
2.6. Częstość zaburzonej eliminacji Mtx w trzech punktach czasowych cyklu a wysokość dawki systemowej	40
2.7. Częstość zaburzenia eliminacji Mtx a czas trwania cyklu.....	42
3. Stała eliminacji w pierwszej, szybkiej fazie wydalania Mtx – jako wczesny marker prawidłowej lub zaburzonej eliminacji leku	42
3.1. Stała eliminacji Mtx zastosowanego w dawce 2 g/m ² w fazie szybkiego i wolnego wydalania leku	43
3.2. Stała eliminacji Mtx zastosowanego w dawce 3 g/m ² w fazie szybkiego i wolnego wydalania leku	44
3.3. Porównanie wartości stałych eliminacji Mtx w dwu fazach wydalania dwóch różnych dawek leku (2 g/m ² i 3 g/m ²).....	45
3.4. Analiza korelacji wartości stałej eliminacji Mtx w fazie szybkiego wydalania leku, podanego w dwóch różnych dawkach, z wiekiem, BMI i płcią	47
4. Czynniki istotnie wpływające na zaburzenie eliminacji obu wysokich dawek Mtx	50
5. Ocena bliskiej toksyczności dwu różnych wysokich dawek systemowych Mtx: 2 g/m² i 3 g/m², w odniesieniu do sprawności wydalania leku	54
5.1. Wpływ HD-Mtx na wartości parametrów biochemicznych oceniających funkcję wątroby, w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji leku	54
5.2. Wpływ terapii HD-Mtx na wartości parametrów biochemicznych oceniających funkcję nerek, w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji leku	59
5.3. Analiza zbiorcza istotności wpływu terapii HD-Mtx na wartości podstawowych parametrów biochemicznych funkcji wątroby i nerek - w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji leku.....	61
5.4. Zakażenia w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji Mtx	62
5.5. Toksyczności skórno – śluzówkowe w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji Mtx	63
5.6. Wczesne objawy neurotoksyczne w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji Mtx	64
5.7. Opóźnienia w planowym leczeniu konsolidacyjnym, spowodowane bliskimi toksycznościami terapii HD-Mtx, w przypadku prawidłowej i zaburzonej eliminacji leku	66
5.8. Analiza zbiorcza istotności wpływu wysokości dawki oraz zaburzonej eliminacji Mtx na częstość bliskich toksyczności terapii	66

6. Polimorfizm genowy 677C>T MTHFR a częstość i nasilenie bliskich toksyczności w przebiegu terapii HD-Mtx	70
6.1. Ocena porównawcza częstości ostrych toksyczności leczenia HD-Mtx, w zależności od polimorfizmu genowego 677C>T MTHFR pacjentów	70
6.2. Ocena porównawcza stopnia nasilenia bliskich toksyczności terapii HD-Mtx w zależności od polimorfizmu 677C>T genu MTHFR	72
7. Czynniki wpływające na bliskie toksyczności terapii HD-Mtx	74
7.1. Dawka Mtx a bliskie toksyczności – analiza w odniesieniu do leczonych	75
7.2. Kolejność cyklu a bliskie toksyczności terapii HD-Mtx	75
7.3. Analiza zbiorcza istotności czynników wpływających na wystąpienie co najmniej dwu bliskich toksyczności terapii HD-Mtx	77
V. OMÓWIENIE I Dyskusja	81
1. Znaczenie HD-Mtx w leczeniu białaczki	81
2. Metody oceny farmakokinetyki Mtx w terapii systemowej wysokimi dawkami leku....	84
3. Stężenia stacjonarne Mtx - problem zmienności farmakokinetyki HD-Mtx	88
4. Stężenia stacjonarne a krytyczna wartość minimalnego stężenia stacjonarnego	90
5. Stężenia stacjonarne, a sprawność eliminacji Mtx	92
6. Stała eliminacji we wstępnej fazie wydalania Mtx jako wczesny marker zaburzonego klirensu leku	93
7. Sprawność eliminacji Mtx i czynniki ryzyka zaburzonego klirensu leku.....	98
8. Bliskie toksyczności terapii HD-Mtx u dzieci	103
8.1. Objawy toksyczne ze strony wątroby	106
8.2. Nudności i wymioty.....	109
8.3. Powikłania infekcyjne	110
8.4. Zapalenie śluzówek przewodu pokarmowego i odczyn ze strony skóry.....	111
8.5. Ostre toksyczności ze strony ośrodkowego układu nerwowego.....	114
8.6. Ostra niewydolność nerek	116
9. Polimorfizm 677C>T MTHFR a eliminacja HD-Mtx oraz nasilenie bliskich toksyczności związanych z terapią konsolidacyjną ALL	119
9.1. Znaczenie aktywności MTHFR w leczeniu białaczki z zastosowaniem Mtx.....	119
9.2. Polimorfizm 677C>T MTHFR a sprawność eliminacji Mtx	121
9.3. Polimorfizm 677C>T MTHFR a bliskie toksyczności terapii HD-Mtx.....	122
10. Czynniki ryzyka wystąpienia nasilonych ostrych toksyczności terapii HD-Mtx.....	127
VI. WNIOSKI.....	131
VII. PIŚMIENNICTWO	133
VIII. STRESZCZENIE	148

IX. SUMMARY	154
X. ANEKS	160
1. Schemat leczenia dzieci standardowego ryzyka ALL w I okresie (1993-2003): indukcja i konsolidacja remisji.....	160
2. Schemat leczenia dzieci standardowego (SR) i pośredniego (IR) ryzyka ALL w II okresie (2003-2007) - indukcja i konsolidacja remisji.....	161
3. Schemat chemioterapii HD-Mtx.....	162
4. Diagram dawkowania Leukoworyny w przypadku przedłużonej eliminacji Mtx z organizmu, w oparciu o aktualne stężenia leku w surowicy	163
5. Tabela stopni toksyczności wywołanych chemioterapią HD-Mtx, wg rozszerzonych kryteriów National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) w modyfikacji German Society of Pediatric Oncology/Hematology (GPOH)	164
6. Tabela analizująca zmienność wartości stężeń stacjonarnych Mtx.....	165

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEKŚCIE

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna

ALL-IC – międzykontynentalny protokół leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci

ALL-SR – ostra białaczka limfoblastyczna standardowego ryzyka wznowy choroby

AUC – pole pod krzywą zmian stężeń leku w surowicy w czasie

BFM – niemiecka Pediatria Grupa Onkologiczna (Berlin-Frankfurt-Munster)

BMI – wskaźnik masy ciała

CCG – amerykańska Pediatria Grupa Onkologiczna

DAMPTA – kwas 4-amino-4-dezoksy-N10-metylopteroilowy

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

DFS – współczynnik przeżycia wolnego od choroby

EFS – współczynnik przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń

EORTC – Europejska Organizacja do Badania i Leczenia Nowotworów

genotyp CC – obecne 2 allele C (warian „dziki“ polimorfizmu 677 C>T MTHFR)

genotyp CT – obecny 1 allele C i 1 allele T

genotyp TT – obecne 2 allele T

FUO – gorączka niewiadomego pochodzenia

GFR – wartość filtracji kłębuszkowej

GOT – aminotransferaza asparaginianowa

GPOH – Niemieckie Stowarzyszenie Onkologii i Hematologii Dzieci

GPT – aminotransferaza alaninowa

HD-Mtx – wysokie systemowe dawki metotreksatu

IR – grupa pacjentów pośredniego ryzyka wznowy białaczki

i.th. – dokanałowe podanie leku

i.v. – dożylnie podanie leku

K_{el} – stała eliminacji leku

MODS – zespół dysfunkcji wielonarządowej

MRP – rodzina białek związanych z opornością wielolekową

MTHFR – reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa

Mtx – metotreksat

n – liczba dzieci lub cykli poddanych analizie

NCI-CTC – powszechne kryteria toksyczności wg amerykańskiego Narodowego Instytutu

Nowotworów

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

p – poziom istotności statystycznej

PL – nakłucie lędźwiowe

PCR-RFLP – analiza zmienności długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA
powielonego techniką łańcuchowej reakcji polimerazy

RFC1 – nośnik zredukowanych folianów

RT – radioterapia

SR – grupa pacjentów standardowego ryzyka wznowy białaczki

TS – syntaza tymidylowa

USD – Uniwersytecki Szpital Dziecięcy

I. WSTĘP

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), najczęstszy nowotwór wieku dziecięcego, stanowi około 30% wszystkich złośliwych chorób nowotworowych w tym okresie życia. Obecnie, dzięki zastosowaniu skojarzonego intensywnego leczenia oraz stale doskonalonym metodom terapii wspomagającej, możliwe jest wyleczenie około 80% ogółu dzieci, dotkniętych tą chorobą. Wypracowane w latach 70. i 80. dwudziestego wieku zasady terapii ALL, zakładające szybkie osiągnięcie remisji (etap indukcji), a następnie jej utrwalenie (etap konsolidacji i reindukcji) oraz odpowiednio długo prowadzone leczenie podtrzymujące, pozostają aktualne, ale są stale doskonalone (15, 69, 132, 190, 201, 204, 217). Obecna strategia leczenia ALL zmierza do zachowania równowagi między uzyskiwaniem maksymalnego odsetka wyleczeń, a ryzykiem występowania ciężkich wczesnych i późnych powikłań terapii.

Poza odpowiednio intensywną chemioterapią systemową, ważnym elementem leczenia jest zapobieganie wznowie choroby w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Fizjologiczna bariera „krew-mózg” powoduje, że większość cytostatyków stosowanych w standardowych dawkach dożylnie lub doustnie, nie uzyskuje w tkance mózgowej stężeń terapeutycznych (37, 69, 169, 235). Dlatego OUN może stanowić swoisty rezerwuar komórek nowotworowych, zagrażający wystąpieniem nawrotu choroby nie tylko w jego obrębie, ale także w szpiku, co zwykle jest trudne do opanowania. Do połowy lat 80. w zapobieganiu wznowie w OUN stosowano profilaktyczną radioterapię (RT) mózgowia i chemioterapię dokanałową.

Niezaprzeczalna skuteczność RT została zdyskredytowana przez obserwowane z biegiem lat ciężkie, a niekiedy zagrażające życiu odległe powikłania. Najpoważniejszymi skutkami ubocznymi tego postępowania są wtórne nowotwory mózgowia, ujawniające się często późno, nawet po wielu latach od zakończenia leczenia (27, 59, 86, 92, 118, 127, 145, 171, 247).

Z końcem lat 80. kilka wiodących ośrodków onkologii dziecięcej na świecie (m.in. w Europie - Grupa Berlin-Frankfurt-Munster /BFM/ i ośrodek skandynawski, a w USA - bostoński Dana Farber Institute), podjęło niezależne badania nad zastąpieniem RT w najlepiej rokującej grupie pacjentów (tzw. standardowego ryzyka /SR/), inną - równie skuteczną, a bezpieczniejszą metodą. Wykazano, że metotreksat (Mtx), zastosowany dożylnie w odpowiednio wysokiej dawce (HD), przenika do płynu mózgowo-rdzeniowego i w połączeniu z dokanałowym podaniem tego leku pozwala na osiągnięcie stężenia terapeutycznego, zabezpieczającego OUN przed nawrotem choroby (11, 15, 21, 25, 36, 37, 41, 66, 78, 84, 103, 143, 144, 202, 203, 204, 235). Ponadto HD-Mtx, podana w etapie konsolidacji remisji, zmniejsza ryzyko zarówno wznowy jądrowej jak i szpikowej, co zwiększa szanse na wyleczenie białaczki. Wysokość skutecznej dawki Mtx w leczeniu ALL nadal pozostaje przedmiotem kontrowersji (37, 55, 66, 151, 170, 190, 266).

Badania Poplacka, dotyczące eskalacji dawki systemowej Mtx do ponad 33 g/m², prowadzone we wczesnych latach 80., nie wykazały korzystnego wpływu tak wysokich dawek leku na zabezpieczenie OUN przed białaczką, a łączyły się ze znacznymi toksycznościami (25, 37, 149, 151). Okazało się natomiast, że dla profilaktyki OUN najważniejsze jest zapewnienie cytotoksycznego stężenia leku w płynie mózgowo-rdzeniowym, utrzymującego się przez odpowiedni czas, co można uzyskać stosując wielogodzinne wlewy Mtx w niższych, kilkugramowych dawkach (1, 21, 95, 98, 139, 231, 234, 245, 258).

Od kilku lat standardem postępowania zapobiegającego wznowie ALL w OUN u dzieci, zakwalifikowanych do grupy standardowego i pośredniego ryzyka, jest dożylne stosowanie HD-Mtx, połączone z wcześniej rozpoczętą i systematycznie kontynuowaną terapią dokanałową, polegającą na podaniu 1-3 leków do kanału kręgowego (136, 202, 235). Obecnie pediatryczne grupy onkologiczne w leczeniu konsolidacyjnym ALL stosują Mtx w różnie wysokich dawkach (1 – 8 g/m²) i uzyskują podobne wyniki. Tylko dzieci z grupy wysokiego ryzyka i z białaczką z prekursorów limfocytów T nadal wymagają profilaktycznej RT OUN (28, 67, 84, 143, 144, 145, 170, 190, 205, 221, 234).

Metotreksat jest klasycznym antymetabolitem, który na drodze bloku enzymatycznego prowadzi do drastycznego niedoboru aktywnej postaci folianów – tetrahydrofolianów. Skutkuje to wstrzymaniem zależnej od nich syntezy puryn i tymidyny, przemiany homocysteiny w metioninę, a także metabolizmu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w tkance mózgowia. Zahamowanie podziałów komórkowych, wynikające z zaburzenia syntezy i naprawy DNA, ma najpoważniejsze konsekwencje wobec szybko dzielących się tkanek, takich jak: nabłonki, śluzówki i szpik. Istotne jest, by Mtx podany był w dawce pozwalającej na osiągnięcie co najmniej minimalnej wartości stężenia stacjonarnego, co koreluje w badaniach klinicznych ze znacząco mniejszym ryzykiem nawrotu białaczki (1, 11, 21, 36, 65, 66, 67). Na tle większości cytostatyków, które cechuje bardzo niski indeks terapeutyczny, a dawkę maksymalną ściśle determinuje tolerancja skutków ubocznych, lek ten stanowi wyjątek. Leczenie HD-Mtx, stosowane poza ALL m.in. w nieziarniczych chłoniakach złośliwych i mięsaku kości, jest możliwe dzięki istnieniu swoistego dla Mtx antidotum, kwasu folinowego (leukoworyny). To antidotum, stosowane w zależności od wskazań w szerokim zakresie dawek, odwraca na poziomie komórkowym działanie Mtx, gdyż odtwarzając zasoby folianów zabezpiecza pacjenta przed wystąpieniem nasilonych ostrych toksyczności chemioterapii. Istotny jest nie tylko adekwatny dobór dawek leukoworyny, ale także odpowiedni moment rozpoczęcia podaży tego preparatu. Leukoworyna zastosowana zbyt wcześnie lub w nadmiarze niweczy przeciwnowotworowy efekt działania Mtx, a podana zbyt późno lub w zbyt niskiej dawce – nie

spełnia swej roli detoksykacyjnej (21, 24, 38, 57, 212, 223, 234, 245). Dlatego uznanym standardem leczenia HD-Mtx (począwszy od dawki 1 g/m²) jest terapia monitorowana, której istotą jest kontrola sprawności wydalania leku w określonym przedziale czasowym. Polega ona zwykle na pomiarach stężeń Mtx w surowicy, w okresie jego naturalnej eliminacji (2 - 3 doby) oraz podawaniu leukoworyny w adekwatnych dawkach (18, 21, 143, 196, 234).

Wydalanie Mtx jest wieloetapowe; większość leku (około 50-80%) jest eliminowana w postaci niezmienionej w ciągu pierwszych 12 godzin przez nerki. Dlatego prawidłowa funkcja nerek warunkuje bezpieczne przeprowadzenie terapii HD-Mtx. W badaniach farmakokinetycznych, po dobowych wlewach Mtx wyróżniono dwie fazy eliminacji; pierwszą tzw. szybką, związaną z oczyszczaniem krwi z leku oraz drugą, wolną – zależną od eliminacji tego leku z kompartmentu obwodowego (tkanek). Wykazano także istotne różnice w sprawności wydalania HD-Mtx, pomiędzy poszczególnymi pacjentami, a nawet w odniesieniu do tej samej osoby, w różnych cyklach (8, 54, 65, 67, 68, 148, 153, 167, 205, 262, 269). Do znanych czynników, wpływających na eliminację Mtx należy nie tylko prawidłowa funkcja nerek, lecz także: wiek, masa ciała, współistnienie przesieków do jam ciała, stopień nawodnienia, interakcje wielu leków, a nawet rasa. Jednakże po ich uwzględnieniu nie jest możliwa trafna ocena, czy w trakcie konkretnej chemioterapii wydalanie leku będzie sprawne. Przedłużona eliminacja HD-Mtx u dzieci występuje stosunkowo często i nieprzewidywalnie (67, 121, 205, 207, 262). Kliniczne następstwa tego faktu mogą być poważne, gdy dotyczą życiowo ważnych narządów i układów lub istotnie zaburzają planowy przebieg leczenia. Poza uszkodzeniem szpiku przedłużona ekspozycja na lek może wywołać: odczyny zapalne błon śluzowych przewodu pokarmowego, zmiany skórne, dysfunkcję wątroby i nerek, objawy wynikające z neurotoksyczności leku, a także – korelujące z immunosupresją – powikłania infekcyjne. Występowanie oraz nasilenie tych ostrych toksyczności zależy nie tylko od przekroczenia wartości stężeń krytycznych leku w surowicy, ale przede wszystkim od czasu przedłużonej ekspozycji na lek i indywidualnej wrażliwości pacjenta, zależnej od wielu zmiennych (8, 11, 18, 21, 45, 54, 65, 85, 93, 148, 175, 178, 183, 195, 234, 245, 258, 262). Ostatnio zwrócono uwagę na rolę czynników genetycznych, warunkujących osobniczo zmienną aktywność receptorów komórkowych leku oraz wielu enzymów, zaangażowanych w transport, metabolizm i mechanizm działania Mtx (14, 34, 44, 69, 90, 97, 101, 102, 105, 120, 125, 133, 135, 166, 169, 172, 177, 185, 189, 216, 217, 220, 229, 243, 270). Ważną rolę pełni wśród nich reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR), której działanie blokuje Mtx i jego metabolity, co przerywa szlak syntezy zredukowanych folianów, koniecznych w syntezie puryn, DNA i białek oraz w metylacji homocysteiny i metabolizmie neurotransmiterów mózgu. Powszechnie spotykane polimorfizmy genu MTHFR, zlokalizowanego na krótkim ramieniu 1 chromosomu, a zwłaszcza najczęstszy z nich

polimorfizm 677 C>T dotyczący jego 4 eksonu, wpływają na zmienną aktywność kodowanego enzymu. W przypadku heterozygotyczności CT, a zwłaszcza homozygotyczności TT produkowany jest termolabilny enzym o upośledzonej aktywności, co może wpływać na odmienną wrażliwość na Mtx. Dane z literatury dotyczące wpływu nosicielstwa tego polimorfizmu na tolerancję HD-Mtx nie są jednak jednoznaczne, choć większość autorów przedstawia dowody świadczące o większej wrażliwości na ten cytostatyk i o większym ryzyku nasilenia ostrych toksyczności u osób homo- i heterozygotycznych, w przypadku stosowania u nich HD-Mtx (33, 34, 44, 90, 117, 166, 169, 172, 192, 208, 209, 224, 236, 237, 238, 239, 241).

Problem istnienia genetycznie uwarunkowanych różnic w farmakokinetyce cytostatyków jest żywo dyskutowany, gdyż stanowi przesłankę do, realizowanej zresztą często empirycznie, indywidualizacji dawkowania leków (2, 14, 33, 44, 66, 97, 102, 122, 137, 166, 170, 190, 266). W Polsce, mimo iż prowadzone są takie badania, wciąż niewiele jest publikacji analizujących ten problem w odniesieniu do dzieci leczonych z powodu najczęstszego nowotworu, jakim jest białaczka. Do dziś otwarta pozostaje dyskusja na temat optymalnej wysokości dawki Mtx w leczeniu konsolidacyjnym dzieci z ALL. Nieliczne są także opracowania, poświęcone klinicznej tolerancji wysokich systemowych dawek leku, dotyczące dużych grup dzieci, jednolitych pod względem rozpoznania i metod leczenia (1, 9, 10, 54, 60, 65, 67, 83, 91, 98, 106, 126, 140, 162, 167, 183, 191, 194, 206, 213, 215, 245, 249, 262, 263, 268, 269). Niewiele analiz dotyczy też czynników wpływających na eliminację HD-Mtx i ryzyko wystąpienia nasilonych bliskich toksyczności tej terapii. Dlatego podjęto badania w tym temacie.

II. CEL PRACY

Celem pracy była analiza czynników wpływających na zaburzenie eliminacji i tolerancję dwóch różnie wysokich dawek metotreksatu, stosowanych u dzieci w leczeniu konsolidacyjnym ostrej białaczki limfoblastycznej i odpowiedź na następujące pytania:

1. Czy opóźniona eliminacja metotreksatu zależy od: wysokości dawki systemowej (2 g/m^2 i 3 g/m^2), kolejności cyklu, wysokości stężenia stacjonarnego leku oraz wieku, płci i BMI?
2. Czy stała eliminacji (K_{el}) Mtx, obliczona we wstępnej fazie szybkiego wydalania leku, może być przydatnym markerem wczesnej identyfikacji pacjentów z zaburzonym klirensiem leku?
3. Jaka jest kliniczna tolerancja terapii wysokimi dawkami Mtx w leczeniu konsolidacyjnym ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci i jaka jest przydatność wybranych parametrów biochemicznych funkcji wątroby i nerek w monitorowaniu bliskich toksyczności tego leczenia?
4. Czy przedłużona ekspozycja na cytotoksyczne stężenia Mtx, stosowanego w dwu różnie wysokich dawkach miała, pomimo adekwatnej terapii leukoworyną, istotny wpływ na występowanie i nasilenie bliskich toksyczności narządowych i układowych oraz planowy przebieg leczenia?
5. Czy nosicielstwo najczęstszego polimorfizmu genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) - 677C>T miało wpływ na sprawność eliminacji leku oraz na częstość i nasilenie bliskich toksyczności związanych z terapią HD-Mtx?
6. Jakie są najistotniejsze czynniki ryzyka wystąpienia nasilonych bliskich toksyczności leczenia Mtx zastosowanym w wysokich dawkach?

III. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

1. Pacjenci i metody leczenia ALL-SR w latach: 1993 - 2002 (grupa leczona dawką 3 g/m² Mtx) i 2003 - 2007 (grupa leczona dawką 2 g/m² leku)

1.1. Ogólna charakterystyka pacjentów

Badania przeprowadzono w dwóch okresach terapii, różniących się wysokością dawki systemowej Mtx, stosowanego w czasie leczenia konsolidującego remisję białaczki w grupie dzieci standardowego i pośredniego ryzyka.

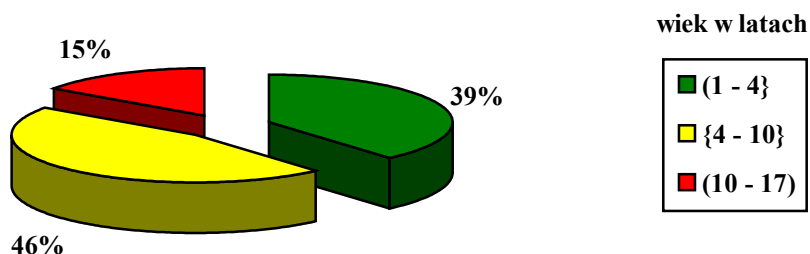
Okres leczenia: 1993 - 2002

Badaniem objęto 146 dzieci, leczonych w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego (USD) w Krakowie, u których w latach 1993 - 2002, w ramach leczenia konsolidującego ALL, zgodnie ze zmodyfikowanym Protokołem ALL-BFM-90 (aneks 1), przeprowadzono cykle chemioterapii z zastosowaniem Mtx w dawce 3 g/m².

Kwalifikacja dzieci do grupy standardowego ryzyka była oparta na wytycznych niemieckiej grupy onkologicznej BFM i uwzględniała takie czynniki jak: wiek, liczbę krwinek białych, czynniki cytogenetyczne i odpowiedź na wstępne leczenie.

W badanej grupie było 78 chłopców (53,4%) oraz 68 dziewcząt (46,6%). Wiek pacjentów w chwili rozpoczęcia leczenia konsolidującego wahał się od 1 roku i 3 miesięcy do 16 lat i 6 miesięcy; mediana wynosiła 4 lata i 10 miesięcy. W oparciu o dane z literatury, dotyczące wpływu wieku na farmakokinetykę HD-Mtx, wyróżniono (rysunek 1) trzy grupy wiekowe: od 1 roku do 4 lat, od ponad 4 do 10 lat i grupę dzieci w wieku ponad 10 lat (11, 21, 23, 54, 88, 107, 153, 234, 249).

Rysunek 1. Grupy wiekowe wśród 146 dzieci z ALL leczonych w latach 1993 - 2002 z zastosowaniem Mtx w dawce 3 g/m²



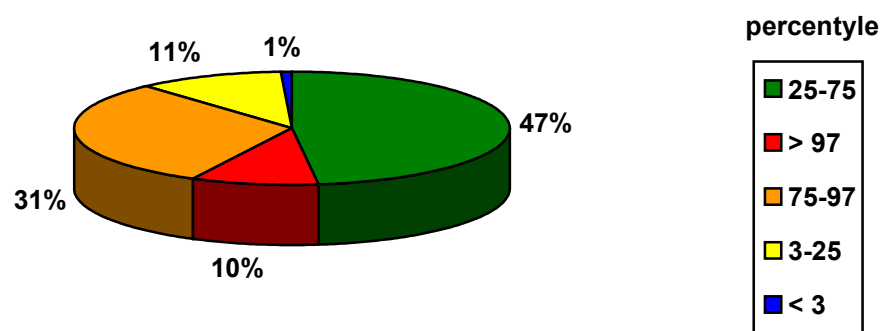
Średnia wieku chłopców (tabela 1) była niższa (5 lat i 6 mies.) niż dziewcząt (6 lat i 3 mies.). Różnice nie były istotne statystycznie (p=0,20).

Tabela 1. Wiek (w miesiącach) dzieci leczonych Mtx w dawce 3 g/m² w zależności od płci

Płeć	n	%	$\bar{x}$	s	Me	min-max	p
chłopcy	78	53,4	65,6	41,8	52,5	17 - 184	0,20
dziewczęta	68	46,6	75,0	45,6	61,0	15 - 198	

Masa ciała dzieci badanej grupy wahała się w zakresie 9,9 kg - 67,5 kg (mediana 20 kg).

W celu obiektywnej oceny stanu odżywienia dla każdego pacjenta obliczono wartość wskaźnika masy ciała (BMI), a uzyskane wyniki odniesiono do norm rozwoju fizycznego dzieci warszawskich (157). Na tej podstawie pacjentów zakwalifikowano, w oparciu o siatki centylowe do 4 grup. Za normę przyjęto wartości BMI w zakresie 75 - 25 percentyla (1 odchylenie standardowe), za nadwagę w stopniu umiarkowanym i znacznym, odpowiednio: 75 - 97 i ponad 97 percentyla. Natomiast za niedobór masy ciała miernego i znacznego stopnia uznano odpowiednio wartości w zakresie: 3 - 25 i poniżej 3 percentyla (rysunek 2).

Rysunek 2. Wartości BMI w grupie dzieci leczonych Mtx w dawce 3 g/m²

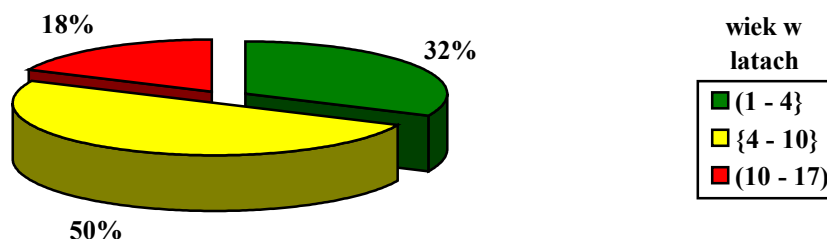
Okres leczenia: 2002 - 2007

Badanie dotyczyło grupy 72 dzieci leczonych w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej USD w Krakowie, u których w latach 2002-2007 w leczeniu konsolidującym remisję ALL, w ramach realizacji Protokołu ALL-IC-2002 zastosowano cykle z Mtx w dawce 2 g/m².

Kwalifikacja do grupy standardowego i pośredniego ryzyka, zgodnie z wymogami protokołu terapeutycznego, oparta była o: wiek, wstępną liczbę krwinek białych, odpowiedź na leczenie i badania cytogenetyczne. Protokół leczenia indukcyjnego, poprzedzającego terapię konsolidacyjną był prawie identyczny, jak w okresie wcześniejszym (aneks 2).

W badanej grupie było 37 chłopców (51,4%) i 35 dziewcząt (48,6%). Wiek pacjentów w chwili rozpoczęcia leczenia konsolidującego wahał się od 1 roku i 6 miesięcy do 16 lat i 4 miesięcy; mediana wynosiła 5 lat i 4 miesiące. Udział procentowy trzech grup wiekowych ilustruje rysunek 3.

Rysunek 3. Grupy wiekowe wśród 72 dzieci z ALL leczonych w latach 2002 - 2007 z zastosowaniem Mtx w dawce 2 g/m²



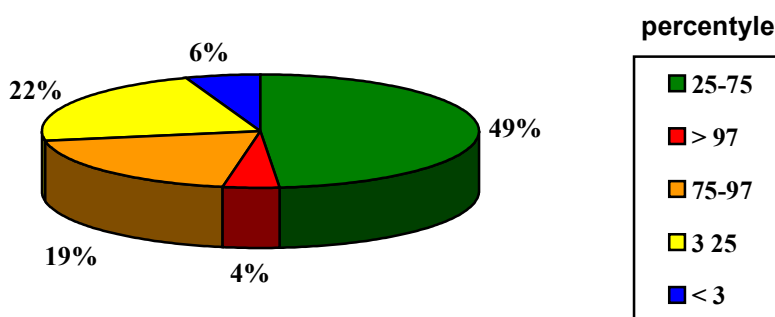
Średnia wieku chłopców (tabela 2) była w tej grupie pacjentów wyższa (7 lat) niż dziewcząt (6 lat i 2 mies.). Różnice nie były istotne statystycznie ($p=0,39$).

Tabela 2. Wiek (w miesiącach) dzieci leczonych dawką Mtx 2 g/m², w zależności od płci

Płeć	n	%	$\bar{x}$	s	Me	min-max	p
chłopcy	37	51,4	83,9	52,9	65,0	18 - 195	0,39
dziewczęta	35	48,6	73,9	46,4	64,0	20 - 196	

Masa ciała badanej grupy wahała się w zakresie 10,7 kg - 74,5 kg (mediana 19,6 kg). Rozkład wartości BMI dla obu płci, zanalizowany analogicznie jak w grupie dzieci leczonych Mtx w dawce 3 g/m², ilustruje rysunek 4.

Rysunek 4. Wartości BMI w grupie dzieci leczonych Mtx w dawce 2 g/m²



1.2. Porównanie cech dzieci leczonych dwoma różnymi dawkami Mtx

Porównano: wiek, płeć oraz podstawowe cechy antropometryczne dzieci z dwóch grup, leczonych Mtx w dwóch różnych dawkach dożylnych. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie: wieku ($p=0,627$), płci ($p=0,777$), masy ciała ($p=0,415$), wzrostu ($p=0,277$) i powierzchni ciała badanych ($p=0,538$) pomiędzy grupą leczoną dawką 2 g/m² i 3 g/m² Mtx. W obu okresach nieznacznie dominowali chłopcy, a średnie wartości: wieku, masy ciała, wzrostu i powierzchni ciała pacjentów były porównywalne.

Istotnie statystycznie różnice ($p=0,01$) dotyczyły BMI badanych. Blisko 50% dzieci w obu grupach miało BMI w granicach normy (75 - 25 percentyl). Jednak w grupie leczonej Mtx w dawce 2 g/m^2 dwukrotnie rzadziej obserwowano nadmiernie otyłe dzieci ($\text{BMI} > 97$ percentyl), a dwukrotnie częściej zbyt szczupłe (BMI : 25 - 3 percentyl) i ośmiokrotnie częściej hipotreptycznych pacjentów ($\text{BMI} < 3$ percentyla). W grupie leczonej Mtx w dawce 3 g/m^2 więcej było pacjentów (31% ogółu) z umiarkowaną nadwagą (BMI w zakresie 75 - 97 percentyl). Obserwowane różnice uznano za przypadkowe. Z uwagi na małą liczebność pacjentów z dwu ekstremalnych grup BMI niektóre analizy przeprowadzono w trzech grupach: dzieci nadmiernie otyłych ($\text{BMI} > 75$ percentyla), prawidłowo odżywionych (BMI w zakresie: 25-75 percentyla) i nadmiernie szczupłych ($\text{BMI} < 25$ percentyla). Szczegółowe dane ilustruje tabela 3.

Tabela 3. Charakterystyka porównawcza badanych grup: 146 i 72 dzieci leczonych Mtx w dawce odpowiednio: 3 g/m^2 i 2 g/m^2

Badany parametr		I okres: 1993 - 2002 dawka Mtx: 3 g/m^2	II okres: 2002 – 2007 dawka Mtx: 2 g/m^2	Wartość p
liczba i % pacjentów		146 (66,9%)	72 (33,1%)	
płeć	dziewczeta	68 (46,6%)	35 (48,6%)	0,777
	chłopcy	78 (53,4%)	37 (51,4%)	
wiek (lata)	min-max	1,3 – 16,5	1,5 – 16,3	0,627
	Me	4,8	5,3	
	$\bar{x}$	5,9	6,6	
masa ciała (kg)	min-max	9,9 – 67,5	10,7 – 74,5	0,415
	Me	20,0	19,6	
	$\bar{x}$	24,1	25,7	
wzrost (cm)	min-max	70 – 180	52 – 182	0,277
	Me	112	111	
	$\bar{x}$	125	117,9	
powierzchnia ciała (m^2)	min-max	0,4 – 1,8	0,5 – 1,95	0,538
	Me	0,8	0,76	
	$\bar{x}$	0,9	0,9	
BMI	> 97 percentyla	n = 14 (9,6%)	n = 3 (4,2%)	0,01
	97-75 percentyl	n = 45 (30,8%)	n = 14 (19,4%)	
	75-25 percentyl	n = 70 (47,9%)	n = 35 (48,6%)	
	25-3 percentyl	n = 16 (11,0%)	n = 16 (22,2%)	
	< 3 percentyla	n = 1 (0,7%)	n = 4 (5,6%)	

1.3. Terapia konsolidacyjna w dwu analizowanych okresach

Schemat leczenia HD-Mtx różnił się w obu analizowanych okresach jedynie wysokością podawanej systemowej dawki Mtx i rodzajem terapii dokanałowej (jeden lub trzy leki). Wszystkie warunki i sposób przeprowadzania chemioterapii pozostawały identyczne (aneks 3). W pierwszym okresie (1993-2002) dawka systemowa wynosiła 3 g/m^2 , w okresie drugim (2002-2007) – 2 g/m^2 . Podstawą wyliczenia należnej dawki leku w danym cyklu chemioterapii były aktualne pomiary antropometryczne dziecka. Dawki dostosowywano do realnych wartości powierzchni ciała pacjenta, obliczanych przed każdym z cykli. Chemioterapie HD-Mtx rozpoczynano po dwutygodniowej przerwie po zakończeniu pierwszego etapu leczenia, mającego na celu uzyskanie remisji choroby (Protokół I - aneks 1). Warunkiem przeprowadzenia każdego cyklu był dobry stan kliniczny pacjenta, brak cech zakażenia oraz zadowalające wyniki badań podstawowych. U każdego dziecka realizowano cztery chemioterapie HD-Mtx, planowo co dwa tygodnie. Lek stosowano po uprzednim nawodnieniu i alkalizacji, według identycznych zasad w obu okresach leczenia. Obliczona dawka leku podawana była dożylnie, do dużego naczynia (przez tzw. cewnik centralny), w ciągłym 24-godzinnym wlewie z zastosowaniem pompy infuzyjnej. W drugiej godzinie wlewu wykonywano nakłucie lędźwiowe, połączone z badaniem płynu mózgowo-rdzeniowego i dokanałowym podaniem trzech - w pierwszym okresie, lub jednego leku - w okresie drugim (aneks 3). Dzieci otrzymywały intensywne nawadnianie dożylne ($3 \text{ l/m}^2/\text{dobę}$), połączone z alkalizacją i ścisłym monitorowaniem dobowego bilansu płynów, wg identycznych zasad, aż do chwili satysfakcjonującej eliminacji Mtx (oczekiwanej planowo w 48. godzinie od rozpoczęcia wlewu Mtx). Celem odwrócenia toksyczności terapii HD-Mtx każdorazowo podawano co najmniej trzy dawki leukoworyny (dostosowane do aktualnej powierzchni ciała), w odstępach 6-godzinnych, począwszy od 42. godziny od rozpoczęcia wlewu Mtx. Wobec przedłużonej eliminacji Mtx, stosowano intensywniejsze nawadnianie dożylne i wyższe, adekwatne dawki antidotum (aneks 4), aż do uzyskania zadowalająco niskiego stężenia leku w surowicy, identycznego dla obu stosowanych dawek ($0,25 \text{ } \mu\text{mol/l}$). W trakcie całego leczenia konsolidującego pacjenci otrzymywali ponadto doustnie 6-merkaptopurynę w dawce 25 mg/m^2 . W celu zapobieżenia możliwym interakcjom lekowym, dwie doby przed podaniem Mtx i do czasu jego zadowalającej eliminacji, unikano jednoczesnego stosowania pewnych leków, a w szczególności biseptolu i aminoglikozydów. W przypadku wystąpienia wczesnych toksyczności terapii HD-Mtx wdrażano adekwatne postępowanie pielęgnacyjno-terapeutyczne, zgodnie z wypracowanymi standardami. Przedmiotem niniejszej analizy było 276 i 576 cykli z Mtx, odpowiednio w dawce: 2 g/m^2 i 3 g/m^2 . Łącznie oceniono 852 cykle z HD-Mtx, ale szczegółowe analizy dotyczyły w niektórych wypadkach mniejszej liczby chemioterapii.

2. Oznaczenia stężeń Mtx w surowicy metodą immunoenzymatyczną

2.1. Stały panel oznaczeń w 4 punktach czasowych eliminacji leku

Każdorazowo, niezależnie od wysokości dawki Mtx (2 g/m^2 lub 3 g/m^2), celem monitorowania sprawności jego eliminacji i adekwatnego dawkowania antidotum, oznaczano stężenia leku w surowicy, rutynowo czterokrotnie w: 24. 36. 42. i 48. godzinie od rozpoczęcia dobowego wlewu. Oznaczenia stężeń Mtx w surowicy wykonywano metodą immunoenzymatyczną (EMIT® - Syva) na analizatorze VIVA-Vitalab (DADE-BEHRING, USA) w Pracowni Monitorowania Leków Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Stężenie Mtx po zakończeniu dobowego wlewu dożylnego (w 24. godzinie cyklu) uznawano, zgodnie z zasadami farmakokinetiki HD-Mtx, za reprezentatywne dla stanu stacjonarnego.

2.2. Oznaczenia stężeń Mtx w surowicy w przypadku jego przedłużonej eliminacji

Stężenia leku, uzyskiwane w 4 stałych punktach czasowych jego eliminacji odnoszono do ustalonych, w wyniku badań nad farmakokinetyką HD-Mtx, identycznych dla obu dawek, progów tzw. stężeń krytycznych Mtx. Wartości stężeń krytycznych wynosiły w 24. 36. 42. i 48. godzinie od początku wlewu cytostatyku odpowiednio: $150 \mu\text{mol/l}$, $3 \mu\text{mol/l}$, $1 \mu\text{mol/l}$ oraz $0,4 \mu\text{mol/l}$. Wyższe stężenia wiązały się każdorazowo z: eskalacją dawek antidotum, intensywniejszym nawadnianiem pacjentów, dalszym ścisłym monitorowaniem eliminacji leku i obserwacją leczonych pod kątem ewentualnego wystąpienia wczesnych toksyczności terapii. Postępowanie to było kontynuowane do chwili uzyskania zadowalającej eliminacji Mtx, potwierdzonej stężeniem leku $\leq 0,4 \mu\text{mol/l}$ w 48. godzinie cyklu, lub $\leq 0,25 \mu\text{mol/l}$ - później. Częstość kolejnych oznaczeń stężenia Mtx w surowicy uzależniona była od uzyskiwanych wyników i stanu klinicznego pacjenta. W incydentalnych przypadkach znacznie zaburzonej eliminacji leku, monitorowanie stężeń Mtx, jak i całe postępowanie terapeutyczne, zapobiegające rozwojowi nasilonych toksyczności było indywidualizowane w szczególnie sposób, z uwzględnieniem metod nerkozastępczych w przypadku ostrej niewydolności nerek.

3. Obliczenia stałej eliminacji leku metodą Wagnera, w różnych okresach jego wydalania

Jak to potwierdziły badania nad farmakokinetyką Mtx, podawanego drogą dobowych wlewów dożylnych, po 4 – 5 okresach półtrwania leku, gdy szybkość podaży zrównuje się z szybkością jego wydalania, Mtx osiąga w surowicy tzw. stężenie stacjonarne (11, 18, 21, 36, 47, 57, 58, 82, 109). O jego wysokości świadczyły, w przedstawianym badaniu, stężenia uzyskane z próbek surowicy, pobieranej w 24. godzinie od początku dobowego wlewu HD-Mtx. Zgodnie z modelem dwukompartmencyjnym, opisującym farmakokinetykę dobowych wlewów Mtx,

wydalenie tak podanego leku jest dwuetapowe. W pierwszej fazie (której półokres trwania wynosi 2 – 4 i pół godziny) Mtx wydany jest szybko, nie podlegając procesom metabolicznym, głównie drogą nerek i etap ten związany jest z oczyszczaniem z leku krwi krążącej oraz dobrze ukrwionych tkanek. Druga, wolna faza wydalenia, wiąże się z uwalnianiem Mtx z połączeń z białkami oraz z tzw. kompartmentu głębokiego, tj. gorzej ukrwionych tkanek oraz narządów i trwa około 8 – 10 godzin.

Poza półokresem trwania i klirensiem leku, podstawowym parametrem opisującym farmakokinetykę Mtx w organizmie leczonych jest stała eliminacji (K_{el}), która odzwierciedla dynamikę spadku stężeń leku w surowicy w czasie, zależną od sprawności jego biotransformacji i wydalenia. Wartość stałej eliminacji zależy od wielu czynników, m.in. od właściwości osobniczych i rodzaju leczonej patologii oraz interakcji lekowych.

Posługując się wzorami Wagnera, obowiązującymi dla procesów kinetyki pierwszego rzędu (eliminacja jest proporcjonalna do stężenia leku) obliczono wartości stałych eliminacji Mtx dla obu faz jego wydalenia

$$K_{el} = \ln c_1 - \ln c_2 / t_2 - t_1$$

Następnie porównano wartości stałych eliminacji fazy szybkiej i wolnej wydalenia Mtx, w dwu grupach dzieci: z prawidłową i przedłużoną eliminacją leku, podanego w dwu różnych dawkach. Sprawdzono, czy istnieje korelacja wartości stałych eliminacji Mtx z wiekiem, płcią i BMI.

4. Badania morfologii krwi przed i po zakończeniu cykli z HD-Mtx

Każdorazowo, podstawą kwalifikacji do przeprowadzenia chemioterapii z zastosowaniem HD-Mtx, były zadowalające wartości morfologii krwi, oznaczanej w przeddzień cyklu. Koniecznym wymogiem (poza potwierdzoną remisją choroby) była prawidłowa odnowa hemopoetyczna (leukocyty $> 1\,500/\text{mm}^3$, granulocyty $> 500/\text{mm}^3$, płytki krwi $> 50\,000/\text{mm}^3$). Morfologię powtarzano w drugiej lub trzeciej dobie od rozpoczęcia cyklu oraz w około 1 i 2 tygodnie od jego zakończenia. W analizach uwzględniono odbiegające od normy wartości krwinek: białych, czerwonych i płytek w okresie dwu tygodni od zakończenia każdego cyklu. W razie znaczących odchyleń któregośkolwiek z parametrów morfologii wdrażano adekwatne postępowanie, a badania powtarzano, w odstępie i częstości zależnej od potrzeb. Oznaczenia wykonano w laboratorium hematologicznym przy Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej USD w Krakowie.

5. Oznaczenia podstawowych parametrów biochemicznych funkcji wątroby i nerek przed i po cyklach z HD-Mtx

Każdy z cykli, niezależnie od wysokości zastosowanej dawki HD-Mtx był przeprowadzany po weryfikacji dobę wcześniej dobrego stanu klinicznego pacjenta, w szczególności wykluczeniu ostrych zakażeń i potwierdzeniu prawidłowej funkcji nerek oraz wątroby. Panel badań obejmował oznaczenia stężeń: mocznika, kreatyniny, białka całkowitego, albumin, bilirubiny, aminotransferazy alaninowej (GPT) i asparaginianowej (GOT) oraz podstawowych jonów. Chemioterapię przeprowadzano, gdy wartości bilirubiny w surowicy nie przekraczały trzykrotnie progu uznanego za górną granicę normy wiekowej, a stężenia transaminaz – pięciokrotnie. Te same oznaczenia powtarzano w próbce krwi, pobranej około 48. godziny od rozpoczęcia dobowego wlewu Mtx. W razie znaczących odchyśleń od normy wartości oznaczeń uzyskanych po przeprowadzeniu kuracji HD-Mtx, wdrażano odpowiednie postępowanie terapeutyczne, zgodnie z ustalonymi standardami, a oznaczenia powtarzano.

Pełny panel badań biochemicznych w trakcie realizacji każdego z cykli nie został wykonany u wszystkich pacjentów. W analizach wpływu chemioterapii HD-Mtx na funkcję wątroby i nerek ocenie poddano tylko te cykle, w których odnośne badania były wykonane dwukrotnie (przed i po zakończeniu wlewu Mtx). Wszystkie oznaczenia wykonano w Pracowni Biochemii Zakładu Biochemii Klinicznej USD w Krakowie.

6. Monitorowanie funkcji nerek w trakcie cykli z Mtx

Co najmniej 4 godziny przed rozpoczęciem dobowego wlewu Mtx rozpoczynano nawadnianie dożylnie ($3 \text{ l/m}^2/\text{dobę}$), połączone z alkalizacją. Przez cały cykl ściśle kontrolowano dobowy bilans płynów; zwykle konieczne było forsowanie diurezy. Poza prawidłowymi wartościami parametrów biochemicznych, oceniających funkcję nerek przed rozpoczęciem chemioterapii (mocznik, kreatynina), diureza adekwatna do intensywnego nawadniania była klinicznym dowodem wydolności nerek, kluczowego narządu dla sprawnej eliminacji leku, koniecznej dla bezpiecznego leczenia.

7. Ocena kliniczna leczonych pod kątem występowania ostrych neurotoksyczności terapii systemowej i dokanałowej z Mtx

Obserwowane w trakcie leczenia HD-Mtx wczesne objawy toksyczności ze strony OUN, związane były zarówno z wysoką dawką systemową leku jak i równoczesną terapią dokanałową, z zastosowaniem jednego lub trzech leków (aneks 3). Dotyczyły najczęściej symptomów podrażnienia opony pajęczej, w postaci typowych objawów popunkcyjnych. W analizie objawów neurotoksycznych uwzględniono: bóle głowy i okolicy lędźwiowej, sztywność karku, jednorazowy skok temperatury $\geq 38,0^\circ \text{C}$, parestezje i drgawki. Natomiast występowanie

nudności i wymiotów, towarzyszących terapii HD-Mtx (jednej z najczęstszych bliskich toksyczności leczenia) oceniono odrębnie.

8. Ocena kliniczna toksyczności skórno – śluzówkowych

Metotreksat jako klasyczny antymetabolit, działający na komórki w fazie syntezy DNA przygotowującej do mitozy, wywiera najsilniejszy wpływ na szybko odnawiające się tkanki, takie jak: nabłonek przewodu pokarmowego i szpik. Typowe objawy stanu zapalnego śluzówki przewodu pokarmowego to jej zaczerwienienie, obrzmienie, aż po zmiany martwicze z bolesnymi nadżerkami. W jelitach, w przypadku owrzodzeń, taki stan może być powodem śluzowo-krwistych biegunk, podatnych na nadkażenie nawet fizjologiczną Gram ujemną florą bakteryjną.

Zmiany obserwowane w jamie ustnej oceniono zgodnie z rozszerzonymi kryteriami NCI-CTC. Pośrednio świadczyły o nasileniu procesu zapalnego śluzówek całego przewodu pokarmowego.

9. Analiza zakażeń związanych z terapią HD-Mtx

Ocenie poddano rodzaj, charakter oraz nasilenie zakażeń, jakie wystąpiły w okresie leczenia konsolidującego remisję, po każdym co dwutygodniowym cyklu z HD-Mtx. Analizowano wspólnie: zakażenia dróg oddechowych, FUO i posocznice, a osobno biegunki, które rozwijały się zazwyczaj w konsekwencji odczynów zapalnych śluzówek przewodu pokarmowego.

10. Ocena opóźnień w chemioterapii, wywołanych nasilonymi ostrymi toksycznościami leczenia z zastosowaniem HD-Mtx

Oceniono częstość nieplanowych przerw w kontynuacji chemioterapii konsolidacyjnej, w zależności od wysokości dawki HD-Mtx i sprawności wydalania leku w danym cyklu. Za znaczące przerwy uznano trwające ponad 7 dni; osobno oceniono opóźnienia przekraczające 14 dni.

11. Rozszerzone kryteria stopni toksyczności wg NCI-CTC w modyfikacji GPOH, dla oceny powikłań narządowych i układowych po HD-Mtx

W ocenie nasilenia bliskich toksyczności narządowych i układowych, stwierdzanych w przebiegu leczenia HD-Mtx posłużono się rozszerzoną skalą stopni toksyczności wg NCI-CTC (National Cancer Institute Common-Toxicity-Criteria), w modyfikacji GPOH (German Society of Pediatric Oncology/Hematology), zgodnie z założeniami protokołu terapeutycznego. Kryteria kwalifikacji do poszczególnych stopni toksyczności, przedstawiono w aneksie 5.

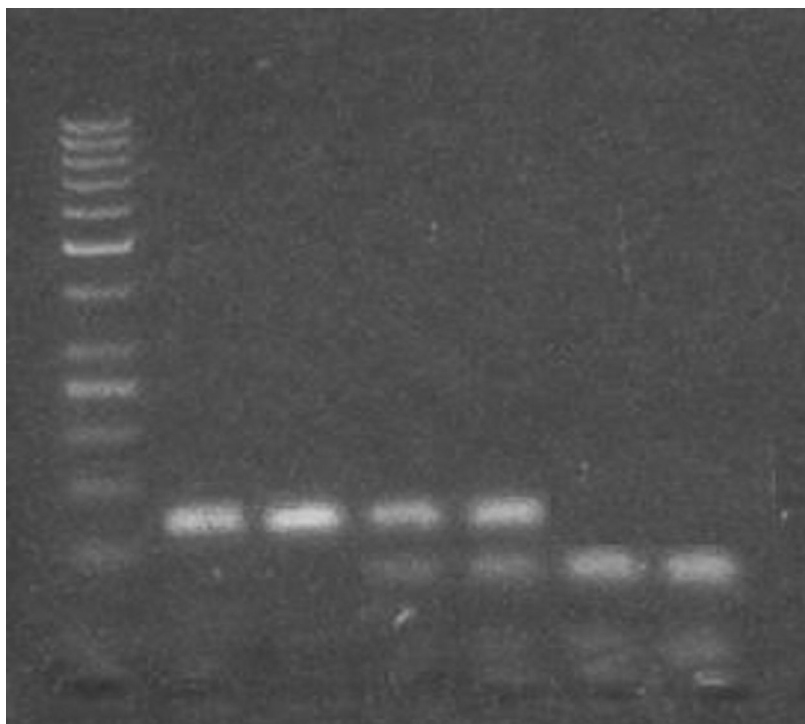
12. Analiza nosicielstwa polimorfizmu 677C>T reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej metodą PCR-RFLP w badanej populacji

Badania nosicielstwa najczęstszego polimorfizmu MTHFR, 677C>T wykonano techniką PCR-RFLP w Zakładzie Genetyki Medycznej Katedry Pediatrii UJ. Materiał do badań stanowiły zamrożone leukocyty uzyskane z próbek krwi (1ml na EDTA) pacjentów. Uzyskiwane wyniki przedstawia rysunek 5 (zdjęcie).

Rysunek 5. Polimorfizm 677C>T genu MTHFR – wynik elektroforezy w żelu agarozowym po trawieniu próbek DNA enzymem *Hinf I*

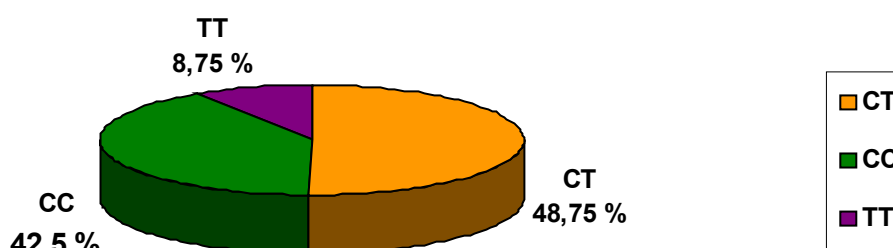
kierunek elektroforezy od góry w dół - widoczne od lewej:

- marker wielkości (fragmenty DNA o malejącej ilości par zasad),
- 2 próbki homozygot CC (fragmenty DNA o 122 parach zasad),
- 2 próbki heterozygot CT (dwa fragmenty DNA: o długości 122 par zasad, odpowiadające allelowi 677C i sekwencje o długości 82 par zasad, odpowiadające allelowi 677T),
- 2 próbki homozygot TT (fragmenty DNA o długości 82 par zasad, odpowiadające dwu allelom 677T, posiadającym miejsce cięcia dla enzymu restrykcyjnego *Hinf I*)



W przebadanej grupie 160 dzieci, leczonych w obu analizowanych okresach z zastosowaniem HD-Mtx, 78 pacjentów (48,75 %) było heterozygotami CT, 68 dzieci stanowili nosiciele „dzikiego” genotypu CC (42,5 %), a homozygotyczność TT stwierdzono w 14 przypadkach (8,75 %). Uzyskane wyniki ilustruje rysunek 6.

Rysunek 6. Rozkład procentowy genotypów 160 dzieci z ALL w zależności od nosicielstwa trzech polimorficznych wariantów 677C>T genu MTHFR



Na podstawie odnotowanej w badaniu częstości występowania genów C i T, posługując się zasadą Hardy-Weinberga wyliczono oczekiwaną częstość trzech genotypów.

Częstość allele T: $2 \times 14 + 78 = 106$

Częstość allele C: $78 + 2 \times 68 = 214$ (łącznie 320 alleli u 160 pacjentów)

$$(106/320 + 214/320)^2 = (106/320)^2 + 2 \times 106/320 \times 214/320 + (214/320)^2 = 0,11 + 0,443 + 0,447 = 1$$

oczekiwane częstości genotypu TT: 11,0% uzyskane: 8,75%

oczekiwane częstości genotypu CT: 44,3% uzyskane: 48,75%

oczekiwane częstości genotypu CC: 44,7% uzyskane: 42,5%

Zgodność odnotowanej w badaniu częstości trzech genotypów: „dzikiego” CC, wariantu CT i homozygotycznego TT w populacji 160 pacjentów z ALL z częstościami oczekiwanymi, na podstawie prawa Hardy-Weinberga, sprawdzono z użyciem testu chi-kwadrat. Wykazano, że rozkład polimorfizmów 677 C>T genu MTHFR w badanej grupie spełniał warunki określone równaniem Hardy-Weinberga ($\chi^2=0,323$; $p=0,57$).

13. Metody analizy statystycznej

Do opisu materiału badawczego wykorzystano statystykę opisową; dla cech ilościowych: średnią arytmetyczną ($\bar{x}$), odchylenie standardowe (s), medianę (Me), wartość najmniejszą (min) i wartość największą (max); dla cech jakościowych zastosowano liczbę przypadków (n) oraz ich odsetki (%). Wyniki przedstawiono w tabelach wielozmiennych.

Weryfikację różnic cech ilościowych między wybranymi grupami przeprowadzano w zależności od spełnienia założeń: testem T-Studenta, analizą wariancji, testem Manna-Whitney’a, Kruskala-Wallisa, lub testem znaków.

Weryfikację zależności między cechami jakościowymi przeprowadzano testem chi-kwadrat (χ^2), lub dokładnym testem Fishera.

Do oceny zgodności rozkładu alleli w grupie badanej z rozkładem oczekiwanym na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga, zastosowano test chi-kwadrat.

W analizie zmienności stężeń stacjonarnych Mtx w każdym z 4 przebytych cykli wykorzystano test mediany.

Dla porównania wartości K_{el} dwu faz eliminacji Mtx, podanego w określonej dawce, w obrębie cykli o prawidłowym lub zaburzonym wydalaniu leku, zastosowano test Wilcoxona dla par zależnych.

W ocenie wpływu nosicielstwa polimorfizmu genowego 677C>T MTHFR na nasilenie bliskich toksyczności terapii HD-Mtx posłużono się jednostronnym testem frakcji.

Do wyodrębnienia czynników istotnie wpływających na przedłużenie eliminacji Mtx oraz nasilenie bliskich toksyczności terapii HD-Mtx zastosowano wielowymiarową regresję logistyczną.

Jako poziom istotności przy testowaniu hipotez statystycznych przyjęto $\alpha = 0,05$.

Baza danych została założona w Excelu. Obliczenia przeprowadzono pakietem statystycznym STATISTICA.

IV. WYNIKI

1. Stężenia stacjonarne Mtx w surowicy po dobowych wlewach leku w dwu wysokich systemowych dawkach: 2 g/m² i 3 g/m²

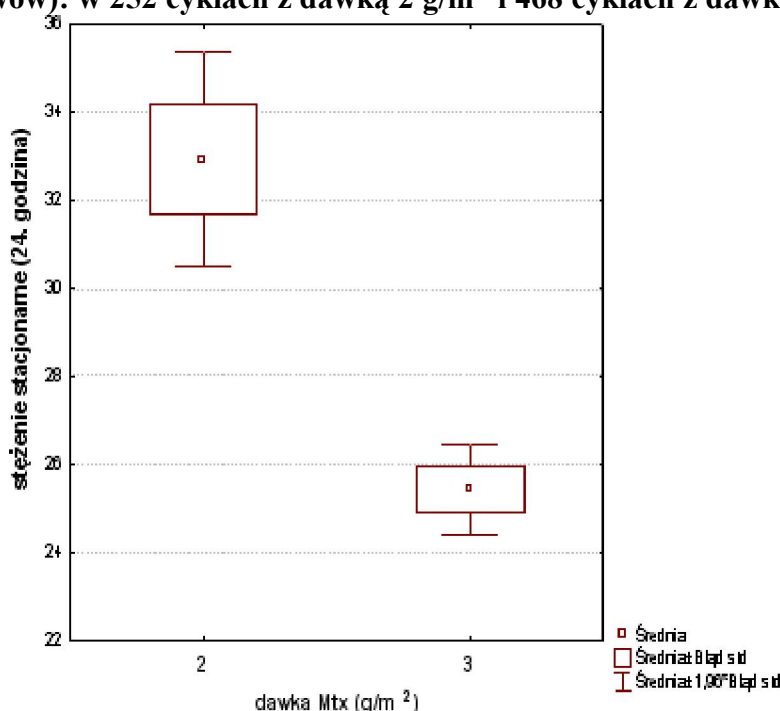
1.1. Wysokość stężeń stacjonarnych Mtx w zależności od zastosowanej dawki

Zgodnie z poznaną farmakokinetyką Mtx, stosowanego w dawkach 2 – 3 g/m² w 24-godzinnych wlewach, podlegającą z reguły zasadom kinetyki pierwszego rzędu, po 4 – 5 półokresach trwania ustala się tzw. stężenie stacjonarne, stabilne dzięki zrównoważeniu dynamiki procesów podaży i eliminacji leku. W praktyce klinicznej wysokość stężenia stacjonarnego odzwierciedla oznaczenie stężenia Mtx w próbce surowicy, pobranej w 24. godzinie od początku wlewu HD-Mtx. Celem porównania efektywności podaży dwu różnie wysokich dawek Mtx, oceniono wartości stężeń stacjonarnych w 252 cyklach z dawką 2 g/m² i 468 z dawką 3 g/m². Łączna ocena objęła 720 chemioterapii. Paradoksalnie, wyższe wartości stężeń: minimalnego, maksymalnego, mediany i średniej stwierdzono w przypadku cykli z niższą systemową dawką leku (2 g/m²). Różnice pomiędzy badanymi grupami były istotne statystycznie (p=0,001). Wyniki ilustruje tabela 4 i rysunek 7.

Tabela 4. Zależność wartości stężeń stacjonarnych Mtx w surowicy (μmol/l) od wysokości zastosowanej dawki leku w badanych cyklach

Dawka	Liczba cykli	$\bar{x}$	s	Me	min	max	Wartość p
2 g/m ²	252	32,9	19,6	29,1	1,7	95,7	0,001
3 g/m ²	468	25,4	11,5	23,4	1,0	89,2	

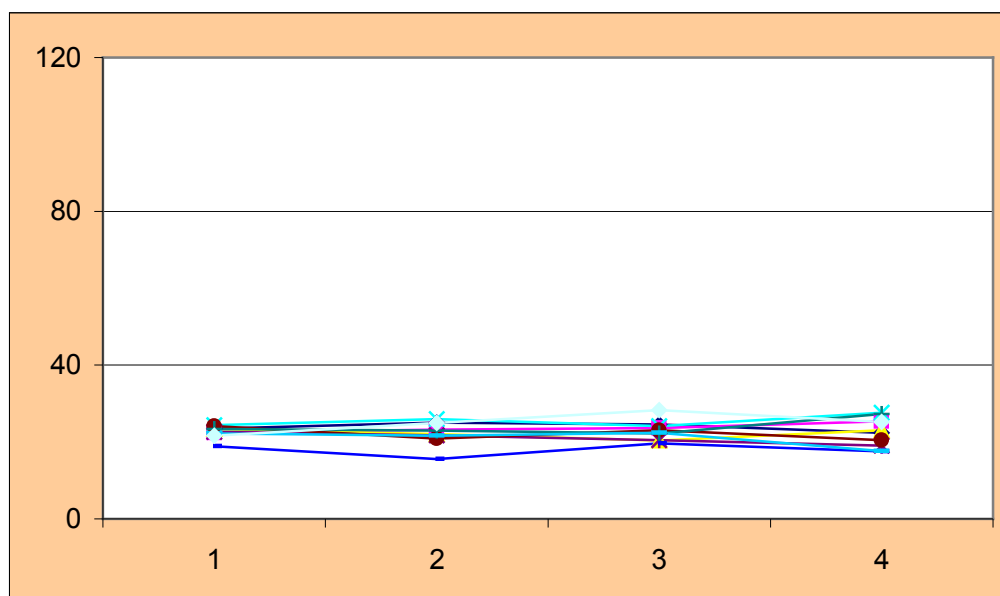
Rysunek 7. Wartości stężeń stacjonarnych Mtx w surowicy (po zakończeniu dobowych wlewów): w 252 cyklach z dawką 2 g/m² i 468 cyklach z dawką 3 g/m²



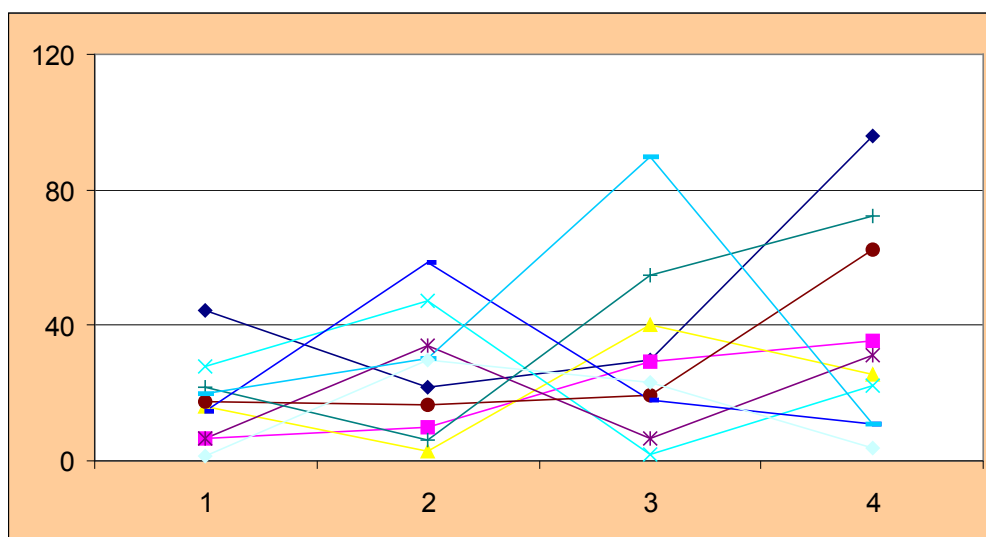
1.2. Zmienność wartości stężeń stacjonarnych Mtx w kolejnych cyklach

Celem analizy zmienności wysokości stężeń stacjonarnych Mtx u danego pacjenta, porównano wartości uzyskane w czterech kolejno zrealizowanych cyklach. Badaniem objęto wszystkie dzieci, u których parametr ten był oznaczony w każdym z czterech cykli, tj. 50 pacjentów leczonych dawką 2 g/m^2 Mtx oraz 87 dzieci, u których zastosowano lek w dawce 3 g/m^2 . Łącznie ocenie poddano 548 cykli z HD-Mtx. W celu obiektywnej oceny obserwowanych różnic, posłużono się współczynnikiem zmienności (V%) – procentowym wyrażeniem zmian wartości stężeń stacjonarnych leku w czterech cyklach u danego dziecka. W ocenionej grupie (łącznie 137 dzieci) wartości współczynnika zmienności mieściły się w zakresie od 5% do 97% u danego pacjenta. Szczegółowe wyniki przedstawiono w aneksie 6, w którym wszystkich pacjentów uszeregowano wg rosnącej wartości współczynnika zmienności. Dwa poniższe rysunki obrazują rozpiętość stężeń stacjonarnych w czterech cyklach, każdorazowo u 10 dzieci. Rysunek 8 ilustruje wyniki w grupie dzieci z najbardziej stabilnymi wartościami stężeń stacjonarnych Mtx (10 pierwszych pacjentów z aneksu 6). Rysunek 9 przedstawia wartości stężeń leku w 24. godzinie w grupie pacjentów, których charakteryzowała największa zmienność wartości stężeń stacjonarnych w kolejnych cyklach (10 ostatnich pacjentów z aneksu 6).

Rysunek 8. Zmienność wartości stężeń stacjonarnych Mtx ($\mu\text{mol/l}$) w 4 zrealizowanych cyklach HD-Mtx bez względu na dawkę leku, w grupie 10 dzieci o najbardziej stabilnych stężeniach ($V\% \leq 11\%$)



Rysunek 9. Zmienność wartości stężeń stacjonarnych Mtx ($\mu\text{mol/l}$) w 4 cyklach HD-Mtx, bez względu na dawkę leku, w grupie 10 dzieci z najbardziej zróżnicowanymi stężeniami ($V\% \geq 70\%$)



Celem oceny czy dawka, lub wiek miały wpływ na stabilność wartości stężeń stacjonarnych Mtx w kolejno realizowanych cyklach, zastosowano test mediany. Mediana dla współczynnika zmienności $V\%$ w całej badanej grupie wynosiła 30,4%.

Stwierdzono istotny wpływ wysokości dawki leku na stabilność stężeń stacjonarnych leku między cyklami (tabela 5). Dawka 3 g/m^2 zapewniała wyższą stabilność tych stężeń ($p=0,028$).

Tabela 5. Wpływ dawki HD-Mtx na stabilność stężeń stacjonarnych leku w 4 cyklach u danego pacjenta

Dawka Mtx (g/m ²)	Współczynnik zmienności				Razem	
	V% ≤ 30,4		V% > 30,4			
	n	%	n	%	n	%
2	19	38,0	31	62,0	50	100,0
3	50	57,5	37	42,5	87	100,0
χ ² =4,82; p=0,028						

Zaobserwowano także nieznaczny procentowy wzrost stabilności stężeń stacjonarnych Mtx między cyklami wraz z wyższym wiekiem leczonych (tabela 6), ale różnice nie były istotne statystycznie ($p=0,908$).

Tabela 6. Wpływ wieku leczonych dzieci na stabilność stężeń stacjonarnych Mtx w 4 cyklach /obie dawki łącznie/

Wiek (lata)	Współczynnik zmienności				Razem	
	V% ≤ 30,4		V% > 30,4			
	n	%	n	%	n	%
1 – 4	26	48,1	28	51,9	54	100,0
4 – 10	35	51,5	33	48,5	68	100,0
> 10	8	53,3	7	46,7	15	100,0
$\chi^2=0,192$; p=0,908						

1.3. Wartości stężeń stacjonarnych w zależności od dawki Mtx a minimalne stężenie stacjonarne (16,0 $\mu\text{mol/l}$)

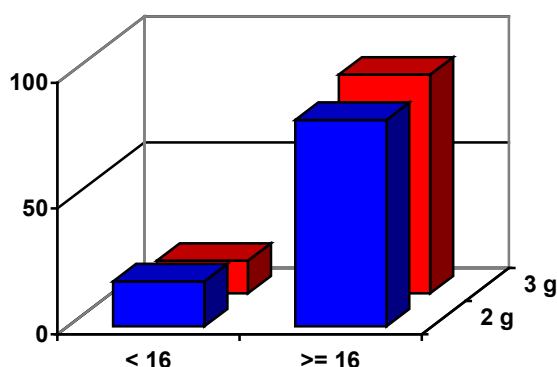
W dwu grupach leczonych różnymi dawkami Mtx porównano częstość uzyskiwania stężeń stacjonarnych wyższych lub niższych od, ustalonego na podstawie badań klinicznych, minimalnego stężenia stacjonarnego, które wynosi 16,0 $\mu\text{mol/l}$ (1, 66, 67). Ocenie poddano łącznie 720 chemioterapii z Mtx, w tym 252 cykle z dawką 2 g/m^2 i 468 cykli z dawką 3 g/m^2 . W przypadku wyższej dawki (3 g/m^2) stężenia stacjonarne Mtx powyżej 16,0 $\mu\text{mol/l}$ odnotowano w 87% cykli; a w przypadku dawki 2 g/m^2 w 82% chemioterapii.

Pomimo, że w grupie pacjentów, którzy otrzymywali Mtx w dawce 3 g/m^2 stwierdzono niższe średnie stężenia stacjonarne, to nieco częściej przekraczały one wartości minimalnego stężenia stacjonarnego, niż w grupie leczonej dawką 2 g/m^2 leku (tabela 7 i rysunek 10). Różnica między grupami nie była istotna statystycznie ($p=0,08$).

Tabela 7. Częstość uzyskiwania stężeń stacjonarnych powyżej wartości minimalnej (16,0 $\mu\text{mol/l}$) w zależności o dawki Mtx

Dawka Mtx (g/m^2)	Stężenia stacjonarne < 16,0 $\mu\text{mol/l}$		Stężenia stacjonarne ≥ 16,0 $\mu\text{mol/l}$		Razem	
	n	%	n	%		
2	45	17,9	207	82,1	252	100,0
3	61	13,0	407	87,0	468	100,0
$\chi^2= 3,03$; $p = 0,08$						

Rysunek 10. Diagram ilustrujący procentowy udział cykli, w których stężenia stacjonarne Mtx były niższe, lub wyższe od minimalnego stężenia (16,0 $\mu\text{mol/l}$) – w zależności od dawki leku



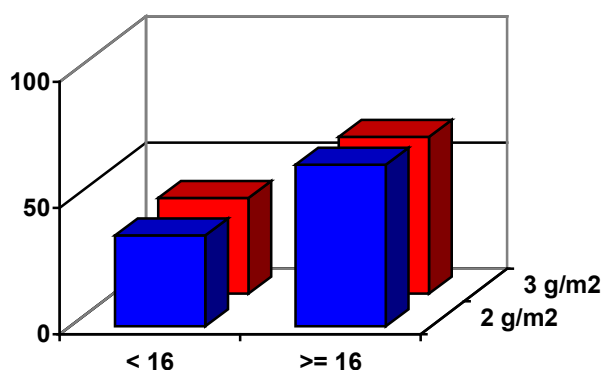
Wśród 87 dzieci z I okresu i 50 z II okresu, u których zrealizowano wszystkie cztery cykle z HD-Mtx i przeprowadzono pomiary stężeń stacjonarnych, podobny odsetek dzieci (odpowiednio 37,9% i 36,0%) nie osiągnął minimalnego stężenia stacjonarnego leku w co najmniej jednym cyklu (tabela 8 i rysunek 11).

Wyższa dawka Mtx (3 g/m^2) nie zmniejszyła ryzyka uzyskiwania stężeń stacjonarnych leku poniżej minimalnego poziomu.

Tabela 8. Porównanie częstości uzyskiwania stężenia stacjonarnego Mtx poniżej wartości minimalnej w co najmniej 1 cyklu i osiągnięcia co najmniej stężenia 16 $\mu\text{mol/l}$ we wszystkich 4 cyklach – w zależności od dawki leku

Dawka (g/m^2)	Stężenia stacjonarne < 16,0 $\mu\text{mol/l}$ w co najmniej 1 cyklu		Stężenia stacjonarne $\geq 16,0$ $\mu\text{mol/l}$ w każdym z 4 cykli		Razem	
	n	%	n	%	n	%
2	18	36,0	32	64,0	50	100,0
3	33	37,9	54	62,1	87	100,0
$\chi^2=0,05$; $p=0,822$						

Rysunek 11. Porównanie częstości nie uzyskania minimalnego stężenia stacjonarnego Mtx w co najmniej jednym z czterech cykli i osiągnięcia co najmniej stężenia 16 $\mu\text{mol/l}$ we wszystkich 4 cyklach – w zależności od dawki leku



1.4. Stężenia stacjonarne a wiek leczonych

Porównano z jaką częstością w co najmniej jednym z czterech przeprowadzonych cykli nie uzyskano minimalnego stężenia stacjonarnego w surowicy (16,0 $\mu\text{mol/l}$), a z jaką częstością było ono przekroczone we wszystkich czterech cyklach – w zależności od wieku pacjentów i dawki Mtx. Przeanalizowano 252 cykle z Mtx w dawce 2 g/m² i 468 cykli z dawką 3 g/m². Zarówno w grupie dzieci, które otrzymywały Mtx w dawce 2 g/m², jak i 3 g/m² stwierdzono istotne różnice (tabela 9) w częstości występowania stężenia stacjonarnego leku poniżej i powyżej wartości krytycznej 16,0 $\mu\text{mol/l}$ pomiędzy trzema analizowanymi grupami wiekowymi (p odpowiednio: 0,021 i 0,008). Odsetek dzieci, które nie uzyskały minimalnego stężenia stacjonarnego Mtx w co najmniej jednym z czterech cykli, zmniejszał się, niezależnie od zastosowanej dawki leku, wraz ze wzrostem wieku pacjentów.

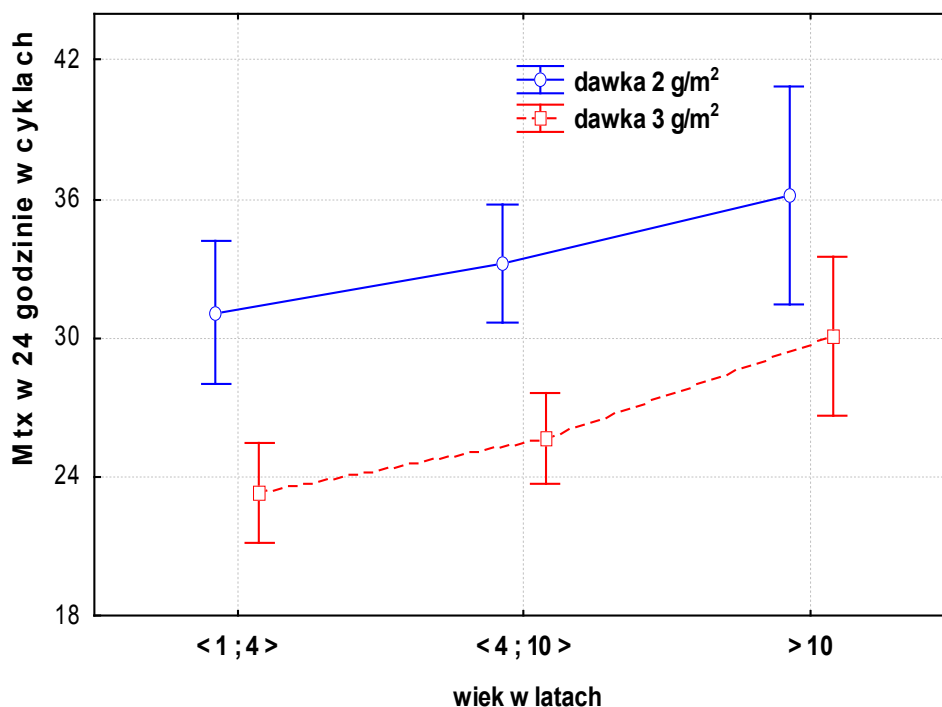
Tabela 9. Wysokości stężeń stacjonarnych Mtx poniżej i co najmniej 16 $\mu\text{mol/l}$ a wiek leczonych

Dawka Mtx (g/m ²)	Grupa wiekowa (lata)	Stężenie stacjonarne < 16,0 umol/l w co najmniej jednym na 4 cykle		Stężenie stacjonarne ≥ 16,0 umol/l w każdym z 4 cykli		Razem n	Wartość p
		n	%	n	%		
2	< 1 ; 4 ≥	20	23,5	65	76,5	85	0,021
	< 4 ; 10 ≥	24	18,5	106	81,5	130	
	> 10	1	2,7	36	97,3	37	
	razem	45	17,9	207	82,1	252	
3	< 1 ; 4 ≥	34	18,7	148	81,3	182	0,008
	< 4 ; 10 ≥	23	10,7	192	89,3	215	
	> 10	4	5,6	67	94,4	71	
	razem	61	13,0	407	87,0	468	

Porównano również średnie wartości stężeń stacjonarnych, uzyskane przez 72 i 146 pacjentów, leczonych Mtx w dawce odpowiednio: 2 g/m² i 3 g/m², w trzech grupach wiekowych.

Wykazano, że wraz z wyższym wiekiem dziecka, bez względu na dawkę leku, średnia wartość stężenia stacjonarnego Mtx rosła liniowo (rysunek 12).

Rysunek 12. Średnie stężenia stacjonarne Mtx w trzech grupach wiekowych dla obu dawek leku



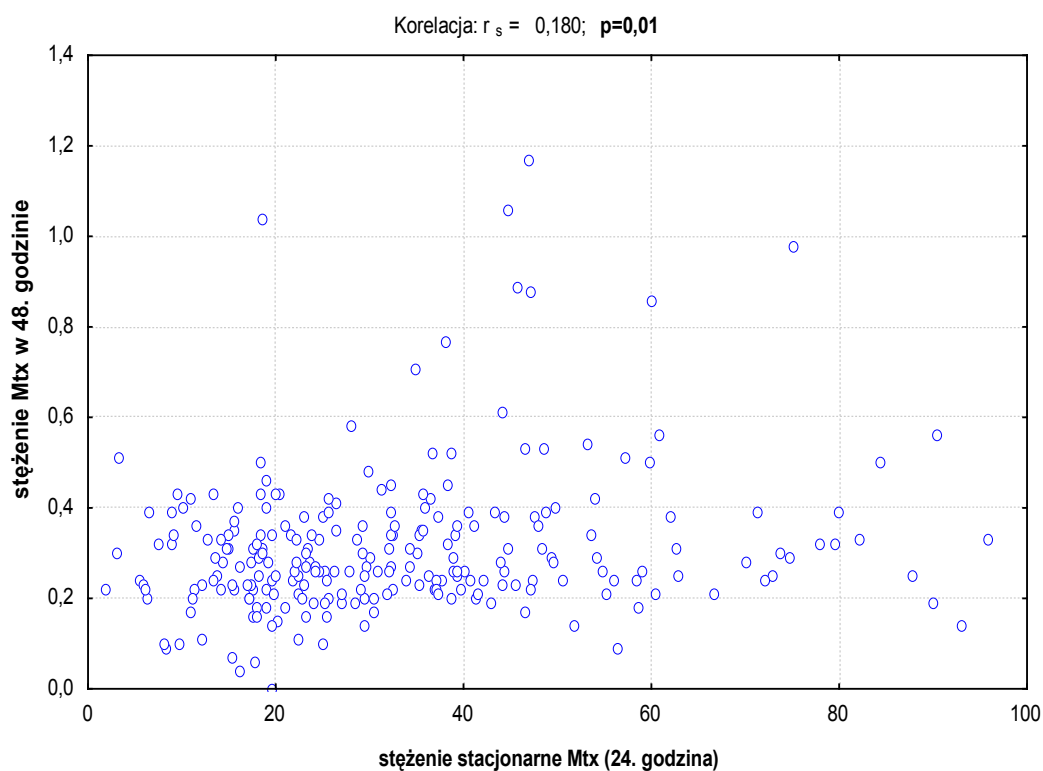
1.5. Stężenia stacjonarne a stężenia w 48 godzinie od początku wlewu HD-Mtx

Oceniono, czy i w jaki sposób wartości stężeń stacjonarnych Mtx wpływały na wartości stężeń leku w surowicy w 48. godzinie od początku cyklu, kiedy lek powinien już być wyeliminowany do bezpiecznych granic.

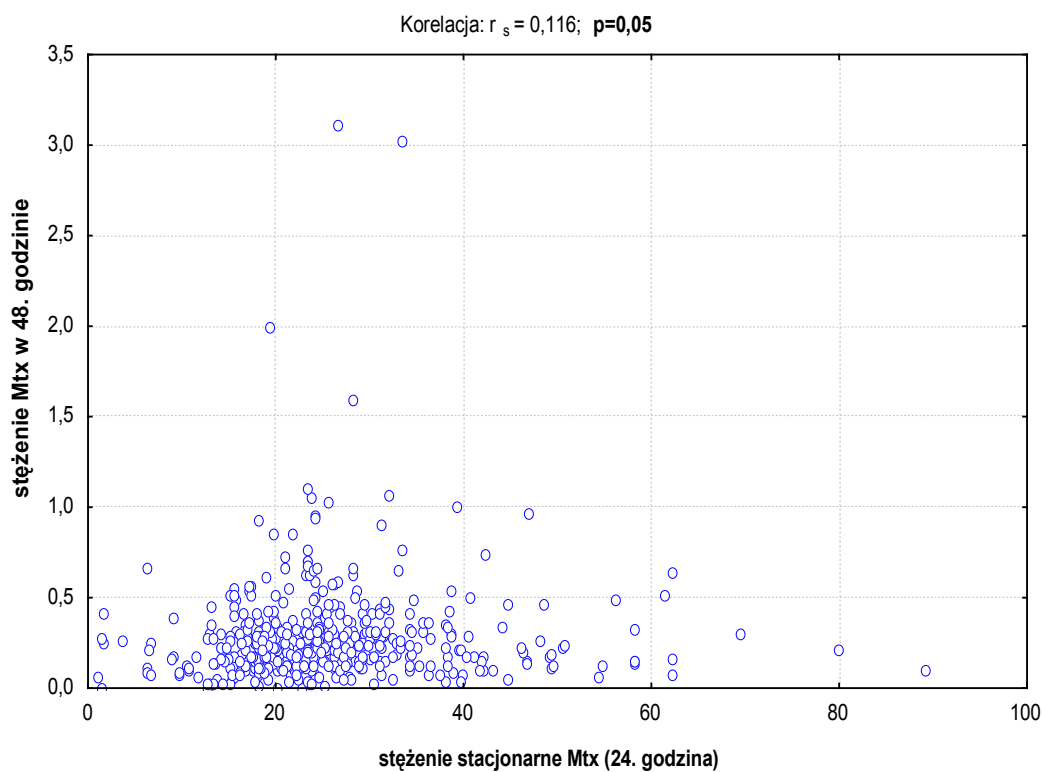
Analiza dotyczyła 246 i 455 cykli, w których lek podano w dawce odpowiednio: 2 g/m² i 3 g/m² oraz oznaczono stężenia zarówno w 24. jak i 48. godzinie od rozpoczęcia wlewu. Z oceny wyłączono dwa cykle (dawka Mtx 2 g/m²), w trakcie których doszło do ostrej niewydolności nerek. W przypadku dawki 2 g/m² uzyskano istotną zależność ($p=0,01$) wartości stężeń w 48. godzinie cyklu od wartości stężeń stacjonarnych leku (rysunek 13).

Natomiast w grupie dzieci leczonych Mtx w dawce 3 g/m² (rysunek 14) wykazano zależność na granicy istotności ($p=0,05$).

Rysunek 13. Zależność stężeń Mtx w surowicy w 48. godzinie eliminacji od wartości stężeń stacjonarnych dla cykli z dawką 2 g/m² (n=246)



Rysunek 14. Zależność wartości stężeń Mtx w surowicy w 48. godzinie eliminacji od wartości stężeń stacjonarnych dla cykli z dawką 3 g/m² (n=455)



2. Ocena sprawności eliminacji Mtx, stosowanego w dwu różnych dawkach systemowych

2.1. Średnie wartości stężeń Mtx w surowicy a stężenia krytyczne w 4 punktach czasowych eliminacji leku

Porównano średnie wartości stężeń leku w surowicy w każdym z czterech punktów czasowych jego eliminacji, pomiędzy cyklami z prawidłowym i przedłużonym w 48. godzinie wydalaniem Mtx. Ponieważ nie zawsze dokonywano czterech planowych oznaczeń stężeń leku w surowicy, szczegółowe analizy dotyczyły zmiennej liczby cykli. Oceniono procent cykli i dzieci, u których w: 36., 42. i 48. godzinie chemioterapii wydalanie leku było zaburzone.

Najistotniejsza ocena, odnosząca się do 48. godziny od rozpoczęcia chemioterapii, dotyczyła w przypadku cykli z Mtx stosowanym w dawce 2 g/m² i 3 g/m² odpowiednio: 276 cykli przeprowadzonych u 72 dzieci i 576 chemioterapii zrealizowanych u 146 dzieci.

Cykle z Mtx w dawce 2 g/m²

Średnie wartości stężeń Mtx w 24. godzinie od rozpoczęcia wlewu, oznaczone u 70 dzieci w 252 cyklach o prawidłowej i przedłużonej w 48. godzinie eliminacji leku, wynosiły odpowiednio: 31,7 µmol/l (zakres: 1,7 – 95,7 µmol/l; mediana: 27,0) i 40,2 µmol/l (zakres: 3,3 – 90,8 µmol/l; mediana: 38,2). W żadnym z cykli bezpośrednio po zakończeniu dobowego wlewu stężenie Mtx w surowicy nie przekroczyło wartości krytycznej (150,0 µmol/l).

Średnie wartości stężeń w 36. godzinie chemioterapii, oznaczone u 72 badanych w 256 cyklach, z prawidłową i przedłużoną eliminacją leku wyniosły odpowiednio: 0,88 µmol/l (zakres: 0,17 – 2,47 µmol/l; mediana: 0,83) i 3,45 µmol/l (zakres: 0,7 – 52,01 µmol/l; mediana: 1,63 µmol/l). Stężenie krytyczne (3 µmol/l) zostało przekroczone u 5 pacjentów (6,9 %) łącznie w 7 (2,7 %) cyklach. U trojga dzieci zaburzenie eliminacji Mtx w 36. godzinie stwierdzono w jednym cyklu, a u dwojga w dwu cyklach. Wartości stężeń średnich i minimalnych w 36. godzinie w tych 7 cyklach wynosiły odpowiednio: 12,87 µmol/l i 3,3 µmol/l.

Średnie wartości stężeń w 42. godzinie, zbadane u 72 pacjentów w 267 cyklach, z prawidłową i przedłużoną ponad 48. godzinę eliminacją Mtx, wynosiły odpowiednio: 0,42 µmol/l (zakres: 0,06 – 0,93 µmol/l; mediana: 0,40) i 1,58 µmol/l (zakres: 0,47 – 20,09 µmol/l; mediana: 0,83). Stężenie krytyczne leku w 42. godzinie od początku dobowego wlewu (1,0 µmol/l) było przekroczone u 11 (15,3 %) pacjentów, w 15 (5,6 %) cyklach chemioterapii. U 9 dzieci dotyczyło to tylko jednego cyklu HD-Mtx, a u dwojga aż trzech cykli. Wartości stężeń średnich i minimalnych w 42. godzinie chemioterapii w tych 15 cyklach wynosiły odpowiednio: 3,07 µmol/l i 1,06 µmol/l.

Średnie wartości stężeń Mtx w 48. godzinie cyklu, zbadane u 72 dzieci w 276 cyklach, z prawidłową i przedłużoną eliminacją leku wyniosły odpowiednio: 0,26 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 0 – 0,45 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 0,26 $\mu\text{mol/l}$) i 1,09 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 0,41 – 17,2 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 0,52 $\mu\text{mol/l}$). Stężenie krytyczne (0,4 $\mu\text{mol/l}$) było przekroczone u 32 dzieci (44,4 %) w 47 (17 %) cyklach. Dotyczyło to tylko jednego cyklu u 21 dzieci, dwu u 8 leczonych, trzech u 2 dzieci i wszystkich czterech cykli u 1 leczonego. Łączne wyniki odnoszące się do cykli z zaburzonym wydalaniem Mtx podanego w dawce 2g/m² przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Stężenia Mtx w surowicy ($\mu\text{mol/l}$) w cyklach z przedłużoną eliminacją leku, w trzech punktach czasowych jego wydalania – dla dawki 2 g/m²

Badany parametr	Czas w godzinach od rozpoczęcia cyklu (liczba ocenionych cykli)		
	36 (n=256)	42 (n=267)	48 (n=276)
wartość krytyczna	3,0	1,0	0,4
średnie stężenie Mtx	3,45 (12,87)	1,58 (3,07)	1,09
stężenie maksymalne	52,01	20,09	17,2
stężenie minimalne	0,7 (3,3)	0,47 (1,06)	0,41
liczba (odsetek) cykli z podwyższonym stężeniem Mtx	7 (2,7 %)	15 (5,6 %)	47 (17 %)
liczba (odsetek) pacjentów z podwyższonym stężeniem leku	5 (6,9 %)	11 (15,3 %)	32 (44,4 %)

Wartości: średnich i minimalnych stężeń podane w nawiasach odnoszą się do podgrupy pacjentów, wykazujących zaburzoną eliminację w danym punkcie czasowym pomiaru

Cykle z Mtx w dawce 3 g/m²

Średnie wartości stężeń Mtx w 24. godzinie od rozpoczęcia wlewu, oznaczone u 141 dzieci w 468 cyklach, z prawidłową i przedłużoną w 48. godzinie eliminacją leku, wyniosły odpowiednio: 24,98 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 1,04 – 89,16 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 23,00 $\mu\text{mol/l}$) i 27,40 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 1,68 – 87,82 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 24,95 $\mu\text{mol/l}$). W żadnym z cykli wartość stężenia leku w surowicy w 24. godzinie od rozpoczęcia chemioterapii nie osiągnęła wartości krytycznych.

Średnie wartości stężeń w 36. godzinie, oznaczone u 146 dzieci w 546 cyklach z prawidłową i przedłużoną w 48. godzinie eliminacją leku, wyniosły odpowiednio: 0,91 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 0,17 $\mu\text{mol/l}$ – 5,11 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 0,83 $\mu\text{mol/l}$) i 1,78 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 0,68 $\mu\text{mol/l}$ – 14,36 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 1,33 $\mu\text{mol/l}$). Stężenie krytyczne zostało przekroczone u 13 (8,9 %) dzieci łącznie w 14 (2,6 %) cyklach (w tym u jednego pacjenta w dwu cyklach). Spośród 14 cykli, w których zostało przekroczone stężenie krytyczne w 36. godzinie, w 6 nie doszło do przedłużenia eliminacji leku z surowicy w 48. godzinie chemioterapii. Wartości stężeń średnich i minimalnych w opisanych 14 cyklach wyniosły odpowiednio: 5,17 $\mu\text{mol/l}$ i 3,05 $\mu\text{mol/l}$.

Średnie wartości stężeń w 42. godzinie, oznaczone u 144 dzieci w 539 cyklach, z prawidłową i przedłużoną eliminacją wyniosły odpowiednio: 0,38 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 0,01 $\mu\text{mol/l}$ – 2,27 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 0,35 $\mu\text{mol/l}$) i 1,03 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 0,44 $\mu\text{mol/l}$ - 8,74 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 0,82 $\mu\text{mol/l}$). Stężenie krytyczne zostało przekroczone w 24 (4,5 %) cyklach u 22 (15,3 %) pacjentów (w tym u dwojga w 2 cyklach). W 4 cyklach o zaburzonej eliminacji leku na tym etapie, w 48. godzinie nie stwierdzono przedłużenia wydalania Mtx. Wartości stężeń średnich i minimalnych w opisanych 24 cyklach wyniosły odpowiednio: 2,02 $\mu\text{mol/l}$ i 1,01 $\mu\text{mol/l}$.

Średnie wartości stężeń w 48. godzinie, zbadane w grupie 146 dzieci, u których zrealizowano 576 cykli, z prawidłową i przedłużoną eliminacją wyniosły odpowiednio: 0,2 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 0 – 0,4 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 0,19 $\mu\text{mol/l}$) i 0,73 $\mu\text{mol/l}$ (zakres: 0,41 - 6,56 $\mu\text{mol/l}$; mediana: 0,54 $\mu\text{mol/l}$). Stężenie krytyczne było przekroczone u 70 (47,9 %) pacjentów w 101 (17,5 %) cyklach. Dotyczyło to tylko jednego cyklu u 46 dzieci, dwu u 18 leczonych, trzech u 5 dzieci i wszystkich czterech cykli u 1 leczonego. Łączne wyniki odnoszące się do cykli z przedłużonym wydalaniem Mtx zastosowanego w dawce 3 g/m^2 przedstawia tabela 11.

Tabela 11. Stężenia Mtx w surowicy ($\mu\text{mol/l}$) w cyklach z przedłużoną eliminacją leku, w trzech punktach czasowych jego wydalania – dla dawki 3 g/m^2

Badany parametr	Czas w godzinach od rozpoczęcia cyklu (liczba ocenionych cykli)		
	36 (n=546)	42 (n=539)	48 (n=576)
wartość krytyczna	3,0	1,0	0,4
średnie stężenie Mtx	1,78 (5,17)	1,03 (2,02)	0,73
stężenie maksymalne	14,36	8,74	6,56
stężenie minimalne	0,68 (3,05)	0,44 (1,01)	0,41
liczba (odsetek) cykli z podwyższonym stężeniem Mtx	14 (2,6 %)	24 (4,5 %)	101 (17,5 %)
liczba (odsetek) pacjentów z podwyższonym stężeniem leku	13 (8,9 %)	22 (15,3 %)	70 (47,9 %)

Wartości: średnich i minimalnych stężeń podane w nawiasach odnoszą się do podgrupy pacjentów, wykazujących zaburzoną eliminację w danym punkcie czasowym pomiaru

2.2. Częstość zaburzonej eliminacji leku w zależności od kolejności cyklu dla dwu różnych dawek Mtx

Oceniono 44 cykle z przedłużonym w 48. godzinie wydalaniem Mtx, podanego w dawce 2 g/m^2 i analogiczne 101 cykli, w których zastosowano dawkę 3 g/m^2 . Z niniejszej analizy wyłączono 3 cykle z Mtx w dawce 2 g/m^2 eliminowanym nieprawidłowo u dwojga dzieci - jedyne dwa zrealizowane u jednego i jedyny cykl podany u drugiego dziecka.

W grupie leczonej niższą dawką (2 g/m^2) Mtx 43,2 % cykli, w których wydalanie leku było przedłużone, dotyczyło pierwszego z czterech przeprowadzonych podań. Wśród 101 cykli z Mtx w dawce 3 g/m^2 to zaburzenie dotyczyło blisko 1/3 chemioterapii zrealizowanych jako pierwsze cykle, a w kolejnych trzech cyklach odsetek zaburzeń wydalania był podobny (tabela 12 i 13).

Tabela 12. Częstość przedłużonej eliminacji Mtx w 48. godzinie wydalania, w zależności od kolejności przeprowadzonego cyklu, dla dwu różnych dawek Mtx: 2 g/m^2 i 3 g/m^2

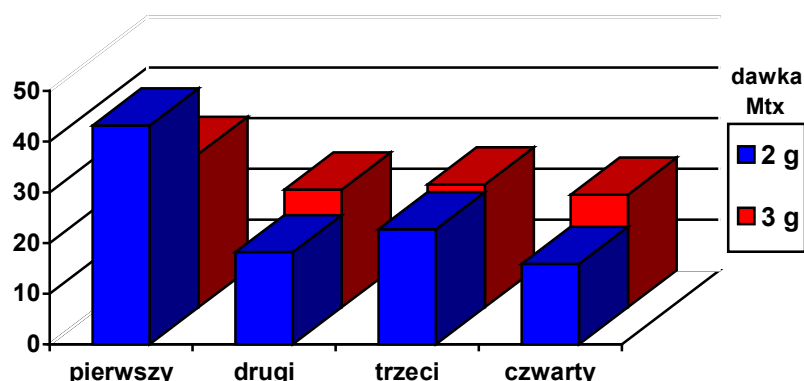
Dawka Mtx (g/m^2) i liczba	Odsetek (liczba) cykli z przedłużoną eliminacją Mtx			
	pierwszy cykl	drugi cykl	trzeci cykl	czwarty cykl
2 (n=44)	43,2 % (19)	18,2 % (8)	22,7 % (10)	15,9 % (7)
3 (n=101)	30,7 % (31)	23,8 % (24)	23,8 % (24)	21,7 % (22)

W przypadku Mtx stosowanego w dawce 2 g/m^2 przedłużona eliminacja leku istotnie częściej miała miejsce w pierwszym cyklu, w porównaniu z trzema kolejnymi (p odpowiednio: 0,007; 0,022; 0,003). Natomiast w przypadku zastosowania Mtx w dawce wyższej (3 g/m^2) zaburzona eliminacja leku także była stwierdzana najczęściej w pierwszych cyklach, ale różnice między kolejnymi cyklami nie były istotne (p odpowiednio: 0,136; 0,136; 0,068). Wyniki ilustruje tabela 13 i rysunek 15.

Tabela 13. Poziom istotności różnic (p) w częstości zaburzonej eliminacji Mtx w zależności od kolejności cyklu - dla dawki 2 g/m^2 i 3 g/m^2

Dawka Mtx (g/m^2)	Wartość p			
	Cykl	drugi	trzeci	czwarty
2	pierwszy	0,007	0,022	0,003
	drugi	-	0,293	0,388
	trzeci	-	-	0,201
3	pierwszy	0,136	0,136	0,068
	drugi	-	0,99	0,361
	trzeci	-	-	0,361

Rysunek 15. Odsetek cykli z nieprawidłowym wydalaniem Mtx w kolejnych 4 chemioterapiach, w zależności od zastosowanej dawki: 2 g/m² i 3 g/m²



2.3. Częstość przedłużonej eliminacji dwu różnych dawek leku – analiza w odniesieniu do pacjentów

Oceniono częstość zaburzonej eliminacji w jednym i więcej niż jednym cyklu, dwu ocenianych dawek leku, łącznie u 208 dzieci (69 i 139 pacjentów leczonych Mtx w dawce odpowiednio: 2 g/m² i 3 g/m²). Z oceny wyłączono dziesięcioro dzieci, u których zrealizowano mniej niż cztery cykle; troje leczonych dawką 2 g/m² Mtx i siedmioro leczonych dawką 3 g/m² leku.

Przedłużona eliminacja HD-Mtx, obserwowana tylko w jednym z czterech zrealizowanych cykli była częściej stwierdzana u pacjentów otrzymujących wyższą dawkę leku (31,6% dzieci), w porównaniu z grupą leczoną dawką 2 g/m² (24,6%). Zaburzenie klirensu Mtx, dotyczące więcej niż 1 cyklu występowało z porównywalną częstością w obu badanych grupach (16,0% vs 17,3%). W analizie statystycznej stwierdzono, że wysokość dawki Mtx: 2 g/m² lub 3 g/m² nie miała wpływu na częstość przedłużonej eliminacji leku ($p=0,492$), dotycząc odpowiednio: 59,4% i 51,1% pacjentów (tabela 14).

Tabela 14. Częstość przedłużonej eliminacji Mtx w zależności od wysokości zastosowanej dawki – analiza w odniesieniu do pacjentów

Dawka Mtx (g/m ²)	Prawidłowa eliminacja w każdym cyklu		Przedłużona eliminacja				Razem	
			w 1 cyklu		w więcej niż 1 cyklu			
	n	%	n	%	n	%	n	%
2	41	59,4	17	24,6	11	16,0	69	100,0
3	71	51,1	44	31,6	24	17,3	139	100,0
Razem	112	53,9	61	29,3	35	16,8	208	100,0
χ ² =1,42; p= 0,492								

2.4. Płeć, wiek i BMI pacjentów a zaburzenie eliminacji dwóch wysokich dawek Mtx

Analizie poddano łącznie 208 dzieci, u których przeprowadzono wszystkie 4 cykle z HD-Mtx w dawce 2 g/m² lub 3 g/m². Ponieważ wysokość systemowej dawki leku nie miała wpływu na częstość występowania zaburzonego wydalania, łącznej ocenie poddano wszystkie cykle, bez względu na dawkę Mtx. Porównano częstość występowania prawidłowej oraz zaburzonej eliminacji leku w jednym i więcej niż w jednym z czterech zrealizowanych cykli HD-Mtx, w zależności od płci, wieku i BMI pacjentów.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między chłopcami i dziewczętami pod względem częstości występowania przedłużonej eliminacji leku z surowicy ($p=0,275$).

Tabela 15. Częstość zaburzonej eliminacji HD-Mtx (2 g/m² i 3 g/m²) w zależności od płci

Płeć	Prawidłowa eliminacja w każdym cyklu		Przedłużona eliminacja				Razem	
			w 1 cyklu		w więcej niż 1 cyklu			
	n	%	n	%	n	%	n	%
chłopcy	63	57,3	27	24,5	20	18,2	110	100,0
dziewczęta	49	50,0	34	34,7	15	15,3	98	100,0
razem	112	53,9	61	29,3	35	16,8	208	100,0
$\chi^2=2,58$; p=0,275								

Porównano częstość przedłużonej eliminacji HD-Mtx także w zależności od przynależności dzieci do trzech wyłonionych grup wiekowych (niezależnie od płci, jako nieistotnej cechy).

W grupie najmłodszych dzieci (w wieku: 1 - 4 lata) 10,3% leczonych miało dwa, trzy lub cztery cykle z zaburzonym klirensiem Mtx, podczas gdy w grupie dzieci najstarszych (ponad 10-letnich) tak częste przedłużenie eliminacji dotyczyło 33,3%. Różnica, dotycząca częstości występowania przedłużonej eliminacji Mtx między grupą najmłodszych i najstarszych dzieci była na pograniczu istotności statystycznej ($p=0,08$).

Tabela 16. Częstość zaburzonej eliminacji HD-Mtx (2 g/m² i 3 g/m²) w zależności od wieku

Wiek (lata)	Prawidłowa eliminacja w każdym cyklu		Przedłużona eliminacja				Razem	
			w 1 cyklu		w więcej niż 1 cyklu			
	n	%	n	%	n	%	n	%
1 - 4	46	59,0	24	30,8	8	10,3	78	100,0
4 - 10	54	54,0	29	29,0	17	17,0	100	100,0
> 10	12	40,0	8	26,7	10	33,3	30	100,0
razem	112	53,9	61	29,3	35	16,8	208	100,0
χ ² =8,44; p=0,08								

Oceniono również częstość przedłużonej eliminacji leku w zależności od BMI leczonych, zgodnie z kwalifikacją dzieci do 5 grup, przedstawioną w charakterystyce badanej populacji. W analizie statystycznej nie stwierdzono istotnego wpływu stopnia odżywienia dzieci na częstość przedłużonej eliminacji Mtx ($p=0,661$). Zwraca jednak uwagę fakt, iż w grupie hipotreptycznych dzieci (wartość BMI < 3 percentyla) przedłużona eliminacja w ponad jednym cyklu dotyczyła aż 40% leczonych.

Tabela 17. Częstość zaburzonej eliminacji HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2) w zależności od BMI

BMI	Prawidłowa eliminacja w każdym cyklu		Przedłużona eliminacja				Razem	
			w 1 cyklu		w więcej niż 1 cyklu			
	n	%	n	%	n	%	n	%
25 – 75 percentyl	53	53,0	29	29,0	18	18,0	100	100,0
> 97 percentyl	11	68,8	3	18,7	2	12,5	16	100,0
75 – 97 percentyl	32	55,2	16	27,6	10	17,2	58	100,0
3 – 25 percentyl	14	48,3	12	41,4	3	10,3	29	100,0
< 3 percentyl	2	40,0	1	20,0	2	40,0	5	100,0
Razem	112	53,9	61	29,3	35	16,8	208	100,0
$\chi^2=5,88$; p=0,661								

2.5. Nosicielstwo polimorfizmu 677 C>T MTHFR a zaburzenie eliminacji Mtx

Celem odpowiedzi na pytanie czy częstość przedłużonej eliminacji Mtx, zastosowanego w dwu różnych dawkach, korelowała z nosicielstwem któregośkolwiek z trzech wariantów polimorfizmu 677 C>T genu MTHFR, przeanalizowano łącznie 617 cykli przeprowadzonych u 160 dzieci. Przedłużona eliminacja Mtx wystąpiła w: 15,8% cykli u nosicieli wariantu „dzikiego” genu MTHFR, 18,8% cykli u dzieci z genotypem heterozygotycznym CT oraz w 14,3% cykli u pacjentów z wariantem TT genu MTHFR. W analizie statystycznej (test chi-kwadrat NW) nie stwierdzono istotnych różnic w częstości zaburzenia eliminacji leku pomiędzy nosicielami trzech polimorficznych wariantów genu MTHFR ($p=0,543$).

2.6. Częstość zaburzonej eliminacji Mtx w trzech punktach czasowych cyklu a wysokość dawki systemowej

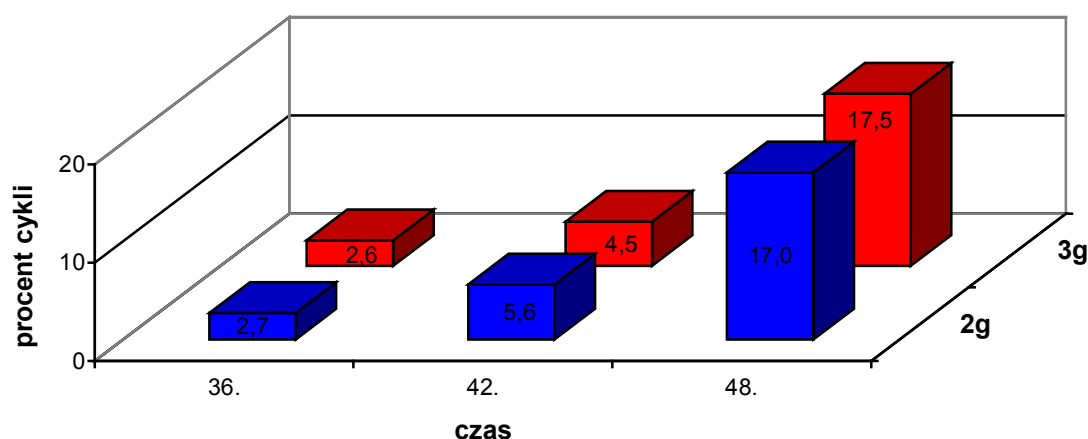
Porównano częstość z jaką dochodziło do przekraczania wartości krytycznych Mtx w surowicy w: 36., 42. i 48. godzinie jego eliminacji, w zrealizowanych: 276 cyklach w dawce 2 g/m^2 , podanych 72 dzieciom i 576 cyklach, w których lek w dawce 3 g/m^2 zastosowano u 146 pacjentów (tabela 18). Jak to wykazano wcześniej, porównywane grupy nie różniły się istotnie pod względem: płci, profilu wiekowego ani charakterystyki antropometrycznej (z wyjątkiem

BMI). Także polimorfizm 677 C>T genu MTHFR leczonych nie wpływał na zaburzenie klirensu leku. Oceniono czy wysokość dawki systemowej Mtx miała wpływ na częstość zaburzenia jego eliminacji w trzech punktach czasowych cykli, w których dokonywano pomiarów stężeń leku w surowicy. Nie stwierdzono istotnej różnicy między dwoma dawkami ($p=0,662$) w częstości występowania cykli z podwyższonym stężeniem Mtx w kolejnych pomiarach (tabela 18 i rysunek 16).

Tabela 18. Porównanie częstości zaburzonej eliminacji dwu różnych dawek Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2) w trzech punktach czasowych wydalania leku

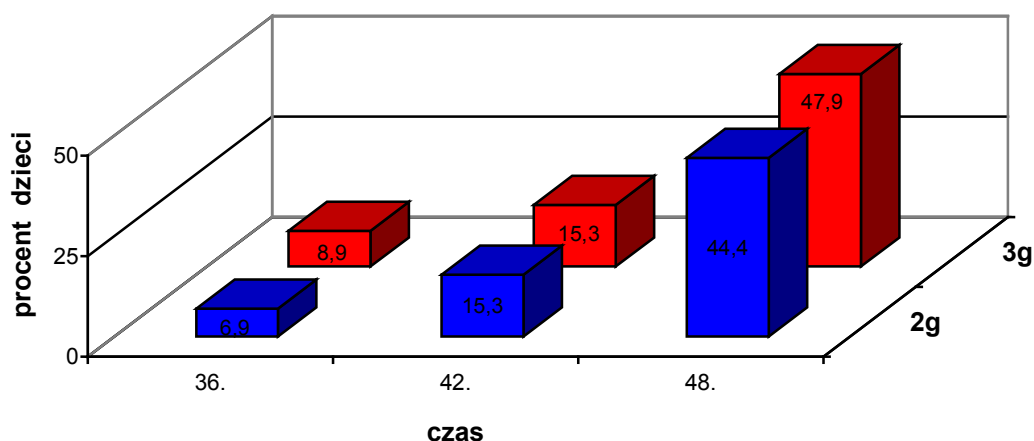
Dawka Mtx (g/m^2)		Odsetek (liczba) dzieci/cykli z przedłużoną eliminacją Mtx		
		36. godzina	42. godzina	48. godzina
2	dzieci (n=72)	6,9 % (5)	15,3 % (11)	44,4% (32)
	cykle (n=276)	2,7 % (7)	5,6 % (15)	17,0 % (47)
3	dzieci (n=146)	8,9 % (13)	15,3 % (22)	47,9 % (70)
	cykle (n=576)	2,6 % (14)	4,5 % (24)	17,5 % (101)

Rysunek 16. Odsetek cykli w których doszło do przekroczenia wartości krytycznych Mtx w trzech punktach czasowych wydalania (36., 42. i 48. godzina) dwu dawek



Nie stwierdzono także istotnej różnicy w częstości występowania dzieci z podwyższonym stężeniem leku w kolejnych pomiarach ($p=0,905$), w zależności od wysokości zastosowanej dawki leku (tabela 18 i rysunek 17).

Rysunek 17. Odsetek dzieci z zaburzoną eliminacją Mtx w trzech punktach czasowych wydalania (36., 42. i 48. godzina) dwu dawek leku



2.7. Częstość zaburzenia eliminacji Mtx a czas trwania cyklu

Wykazano, że zaburzenie eliminacji leku w 48. godzinie było istotnie statystycznie częstsze w porównaniu z występowaniem tej nieprawidłowości 6 godzin wcześniej (w 42. godzinie) – dla obu stosowanych dawek Mtx, w odniesieniu zarówno do cykli, jak i pacjentów (tabela 19).

Tabela 19. Ocena różnic częstości przedłużonej eliminacji dwu różnych dawek Mtx, między 36. a 42. godziną oraz 42. a 48. godziną, w odniesieniu do cykli i pacjentów

Badany parametr		Ocena istotności różnic w częstości przedłużonej eliminacji	
		między 36. a 42. godziną	między 42. a 48. godziną
cykle z podwyższonym stężeniem Mtx	dawka 2 g/m ²	p=0,04	p=0,0001
	dawka 3 g/m ²	p=0,04	p=0,0001
pacjenci z podwyższonym stężeniem leku	dawka 2 g/m ²	p=0,06	p=0,0003
	dawka 3 g/m ²	p=0,05	p=0,0001

Oznaczenia stężeń leku w surowicy w określonych punktach czasowych jego eliminacji nie były wystarczająco czułym sposobem wczesnej identyfikacji pacjentów z zaburzonym wydalaniem leku. W większości przypadków wskazywało na nie dopiero podwyższone stężenie leku oznaczone w 48. godzinie od rozpoczęcia chemioterapii.

Dlatego postanowiono ocenić, czy rolę wczesnego markera zaburzonego klirensu leku może spełniać stała eliminacji, wyliczona we wczesnej fazie wydalania Mtx.

3. Stała eliminacji w pierwszej, szybkiej fazie wydalania Mtx – jako wczesny marker prawidłowej lub zaburzonej eliminacji leku

Porównano, wyliczone metodą Wagnera, wartości stałych eliminacji dla fazy szybkiej i wolnej wydalania Mtx w dwu grupach dzieci: z prawidłową i przedłużoną eliminacją leku, podanego w dwu różnie wysokich systemowych dawkach: 2 g/m² i 3 g/m².

3.1. Stała eliminacji Mtx zastosowanego w dawce 2 g/m² w fazie szybkiego i wolnego wydalania leku

Zanalizowano łącznie 219 cykli, w których Mtx podano w dawce 2 g/m² i wykonano oznaczenia stężeń leku w surowicy w: 24., 36. i 48. godzinie. W 185 cyklach lek wydany był prawidłowo do 48. godziny od rozpoczęcia chemioterapii, a w 34 cyklach w sposób przedłużony.

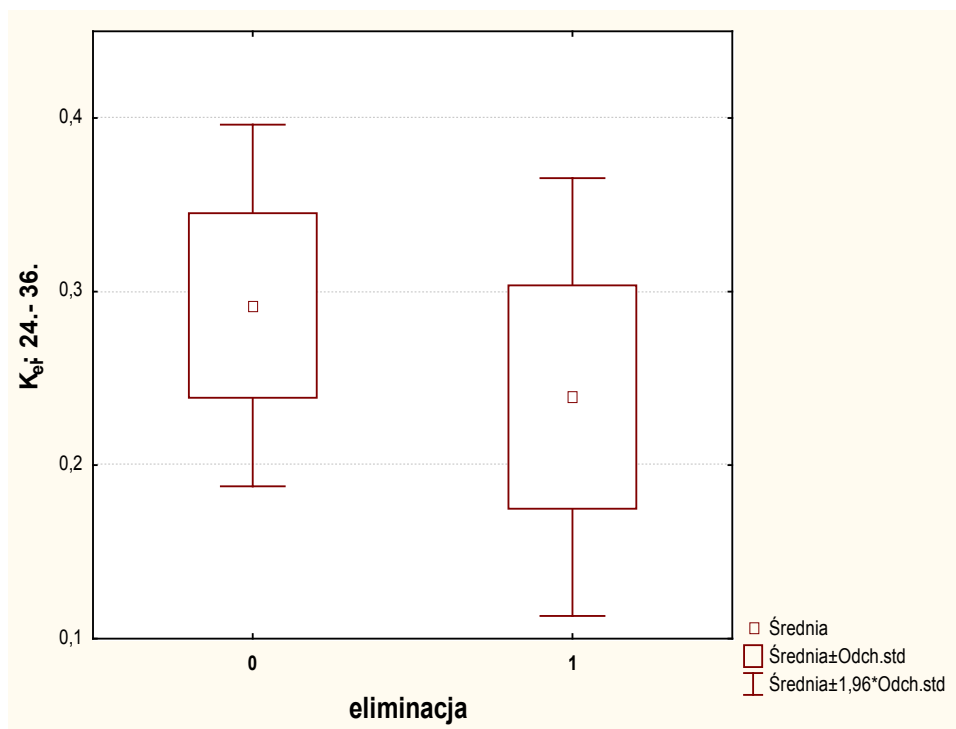
Porównano wartości stałych eliminacji (K_{el}) w cyklach o prawidłowym i zaburzonym wydalaniu leku. Analizy dotyczyły dwu faz eliminacji HD-Mtx: fazy szybkiej, pomiędzy 24. a 36. godziną cyklu oraz wolnej, pomiędzy 36. a 48. godziną. Stwierdzono istotne różnice w wartościach stałych eliminacji Mtx we wczesnej fazie szybkiego wydalania leku, pomiędzy cyklami o prawidłowej i zaburzonej eliminacji ($p=0,0001$). Wartości K_{el} w drugiej, wolnej fazie wydalania nie różniły się istotnie w zależności od klirensu leku ($p=0,434$).

Analiza wykazała też oczekiwaną, istotną różnicę w wartościach stałych eliminacji Mtx pomiędzy dwoma fazami jego wydalania, zarówno w cyklach o prawidłowej jak i przedłużonej eliminacji ($p=0,0001$). Wyniki przedstawia tabela 20 oraz rysunek 18.

Tabela 20. Wartości stałych eliminacji (h^{-1}) Mtx w dwu fazach wydalania leku, w cyklach z prawidłową i przedłużoną eliminacją Mtx – analiza 219 cykli z dawką 2 g/m²

Faza eliminacji	Stała eliminacji								Wartość p
	Cykle o prawidłowej eliminacji Mtx (n=185)				Cykle o przedłużonej eliminacji Mtx (n=34)				
	$\bar{x}$	Me	s	min-max	$\bar{x}$	Me	s	min-max	
Faza wczesna (24. – 36.)	0,292	0,298	0,053	0,061-0,450	0,239	0,253	0,064	0,046-0,324	0,0001
Faza późna (36. – 48.)	0,101	0,100	0,026	0,039-0,227	0,096	0,096	0,029	0,037-0,154	0,434
Wartość p	0,0001				0,0001				-

Rysunek 18. Wartości stałych eliminacji (h^{-1}) Mtx we wczesnej fazie wydalania leku (24.-36. godzina), w cyklach z prawidłową (kod: 0, n = 185) i przedłużoną (kod:1, n = 34) eliminacją leku – analiza cykli z dawką 2 g/m^2



3.2. Stała eliminacji Mtx zastosowanego w dawce 3 g/m^2 w fazie szybkiego i wolnego wydalania leku

Podobnej analizie jak w części 3.1, stosując identyczne kryteria doboru i oceny, poddano łącznie 423 cykle, zrealizowane z podaniem Mtx w dawce 3 g/m^2 . Prawidłowe wydalanie leku stwierdzono w 344, a zaburzone w 79 chemioterapiach.

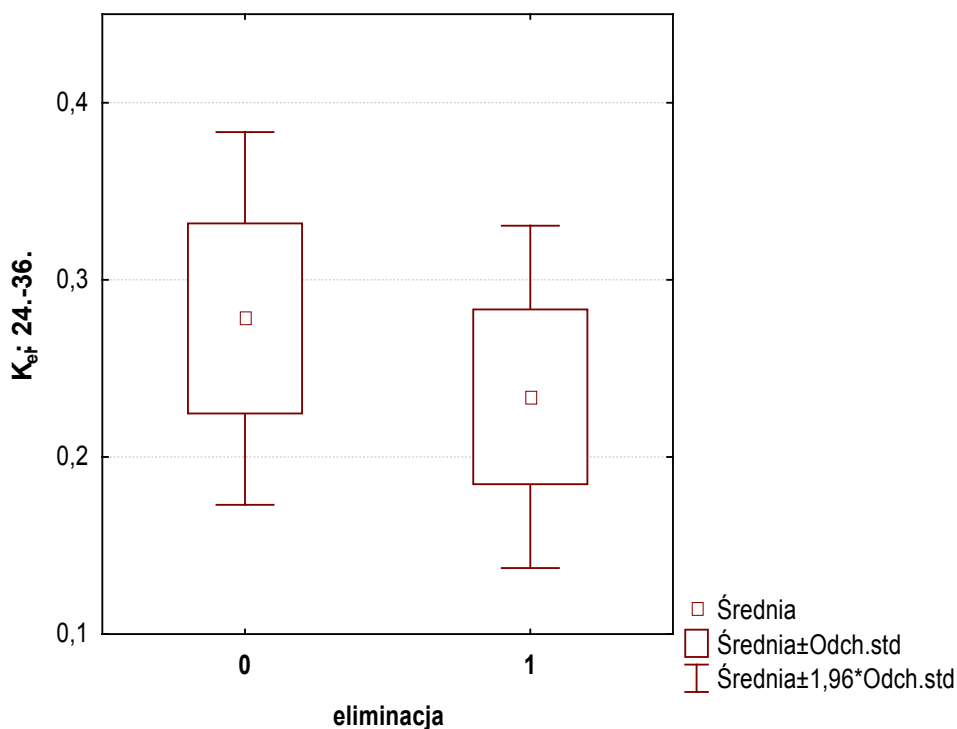
Wykazano istotne różnice w wartościach stałych eliminacji we wczesnej, szybkiej fazie wydalania leku, tj. między 24. a 36. godziną chemioterapii, pomiędzy cyklami z prawidłową i zaburzoną eliminacją Mtx ($p=0,0001$). Podobnie istotne różnice cechowały wartości K_{el} dla tych cykli w późnej fazie wydalania leku, tj. między 36. a 48. godziną jego eliminacji ($p=0,0001$).

Wykonana analiza potwierdziła także, iż wartości stałych eliminacji w dwu fazach wydalania leku, niezależnie od jego klirensu, różniły się istotnie ($p=0,0001$). Wyniki przedstawiono w tabeli 21 i na rysunku 19.

Tabela 21. Wartości stałych eliminacji (h^{-1}) Mtx w dwu fazach wydalania leku, w cyklach z prawidłową i przedłużoną eliminacją: analiza 423 cykli z dawką 3 g/m^2

Faza eliminacji	Stała eliminacji								Wartość p
	Cykle o prawidłowej eliminacji Mtx (n=344)				Cykle o przedłużonej eliminacji Mtx (n=79)				
	$\bar{x}$	Me	s	min-max	$\bar{x}$	Me	s	min-max	
Faza wczesna (24 -36)	0,278	0,279	0,054	0,006-0,474	0,234	0,232	0,049	0,054-0,308	0,0001
Faza późna (36 -48)	0,129	0,117	0,053	0,030-0,340	0,073	0,070	0,030	0,006-0,204	0,0001
Wartość p	0,0001				0,0001				-

Rysunek 19. Wartości stałych eliminacji (h^{-1}) Mtx we wczesnej fazie wydalania leku (24.-36. godzina), w cyklach z prawidłową (kod: 0, n = 344) i przedłużoną (kod:1, n = 79) eliminacją Mtx – analiza cykli z dawką 3 g/m^2



3.3. Porównanie wartości stałych eliminacji Mtx w dwu fazach wydalania dwóch różnych dawek leku (2 g/m^2 i 3 g/m^2)

Celem odpowiedzi na pytanie, czy farmakokinetyka Mtx podanego w dwóch różnych wysokich dawkach, oceniana na podstawie parametru jakim jest stała eliminacji, znacząco się różniła - porównano wartości tego parametru w dwu fazach wydalania leku, w cyklach z prawidłowym i zaburzonym klirensiem Mtx.

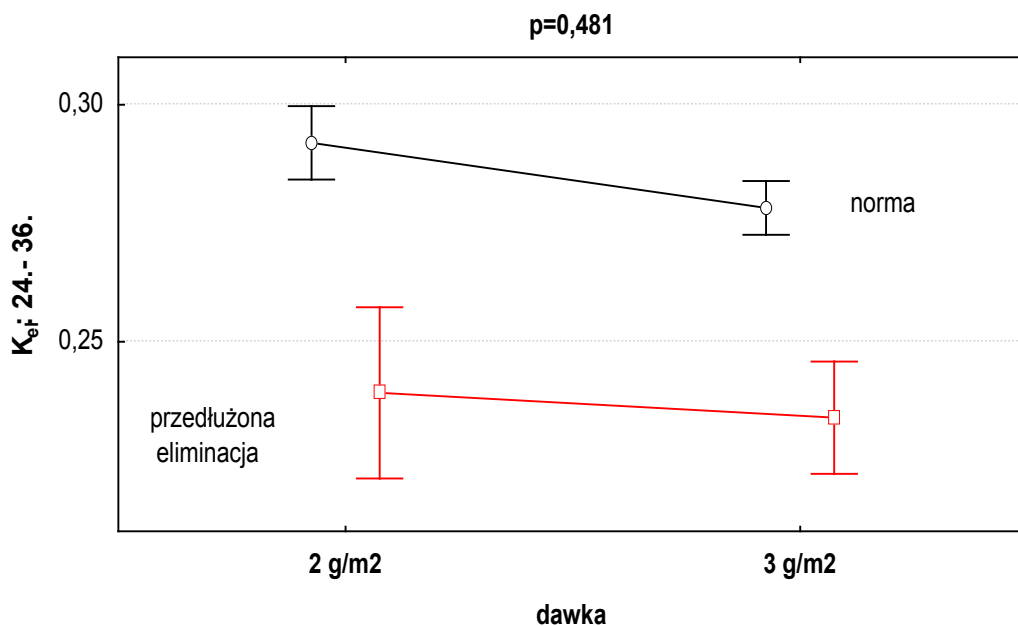
Stwierdzono, że średnia wartość stałej eliminacji leku we wczesnej fazie szybkiego wydalania dla cykli o prawidłowej eliminacji Mtx była istotnie wyższa ($p=0,0002$) dla niższej dawki leku (2 g/m^2). Natomiast w drugiej, wolnej fazie wydalania średnia wartość K_{el} była istotnie wyższa ($p=0,0001$) dla wyższej dawki (3 g/m^2) Mtx. W cyklach o zaburzonej eliminacji Mtx średnie wartości K_{el} były wyższe w obu fazach wydalania dla dawki niższej (2 g/m^2), ale istotną statystycznie różnicę stwierdzono tylko w fazie wolnej ($p=0,0001$). Wyniki przedstawiono w tabeli 22 i na rysunku 19.

Tabela 22. Porównanie średnich wartości stałych eliminacji (h^{-1}) dwu różnych dawek Mtx w obu fazach wydalania leku, w cyklach z prawidłową i przedłużoną eliminacją Mtx: analiza 219 cykli z dawką 2 g/m^2 i 423 cykli z dawką 3 g/m^2

Faza eliminacji Mtx	Dawka (g/m ²)	Stała eliminacji			Wartość p	Stała eliminacji			Wartość p
		Cykle o prawidłowej eliminacji Mtx				Cykle o zaburzonej eliminacji Mtx			
		$\bar{x}$	Me	s		$\bar{x}$	Me	s	
Faza wczesna (24-36 h)	2	0,292	0,298	0,053	0,0002	0,239	0,253	0,064	0,345
	3	0,278	0,279	0,054		0,234	0,232	0,049	
Faza późna (36-48 h)	2	0,101	0,100	0,026	0,0001	0,096	0,096	0,029	0,0001
	3	0,129	0,117	0,053		0,073	0,070	0,030	

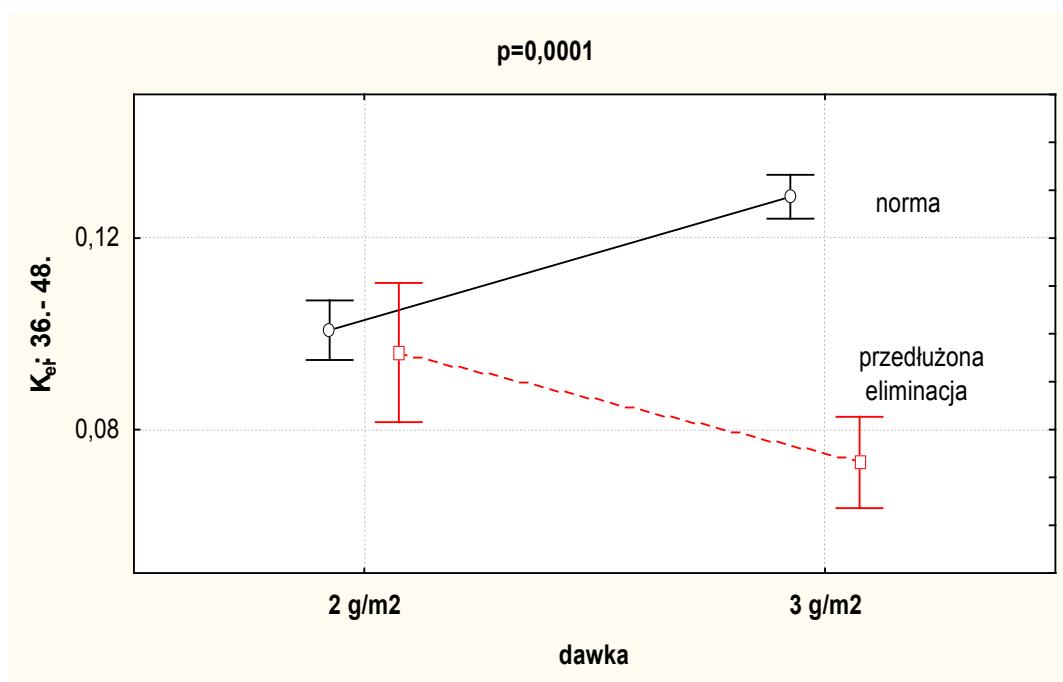
Stwierdzono (rysunek 20), że średnia wartość K_{el} w szybkiej fazie wydalania, zarówno w przypadku prawidłowej, jak i przedłużonej eliminacji Mtx, była niższa w badanej próbie, w cyklach z wyższą dawką leku - typ zmian K_{el} był podobny. Różnice zmian nie były jednak istotne statystycznie ($p=0,481$).

Rysunek 20. Zależność stałej eliminacji Mtx we wczesnej fazie wydalania (24.-36. godz) od dawki (2 g/m² i 3 g/m²) i sprawności wydalania leku



W późnej, wolnej fazie wydalania w cyklach o prawidłowej eliminacji wartość K_{el} była wyższa w cyklach z wyższą dawką leku, natomiast w przypadku przedłużonej eliminacji wartość K_{el} była niższa dla wyższej dawki leku (rysunek 21). Różnice zmian były istotne statystycznie ($p=0,0001$).

Rysunek 21. Zależność stałej eliminacji Mtx w późnej fazie wydalania (36.-48. godz) od dawki (2 g/m² i 3 g/m²) i sprawności wydalania leku



3.4. Analiza korelacji wartości stałej eliminacji Mtx w fazie szybkiego wydalania leku, podanego w dwóch różnych dawkach, z wiekiem, BMI i płcią

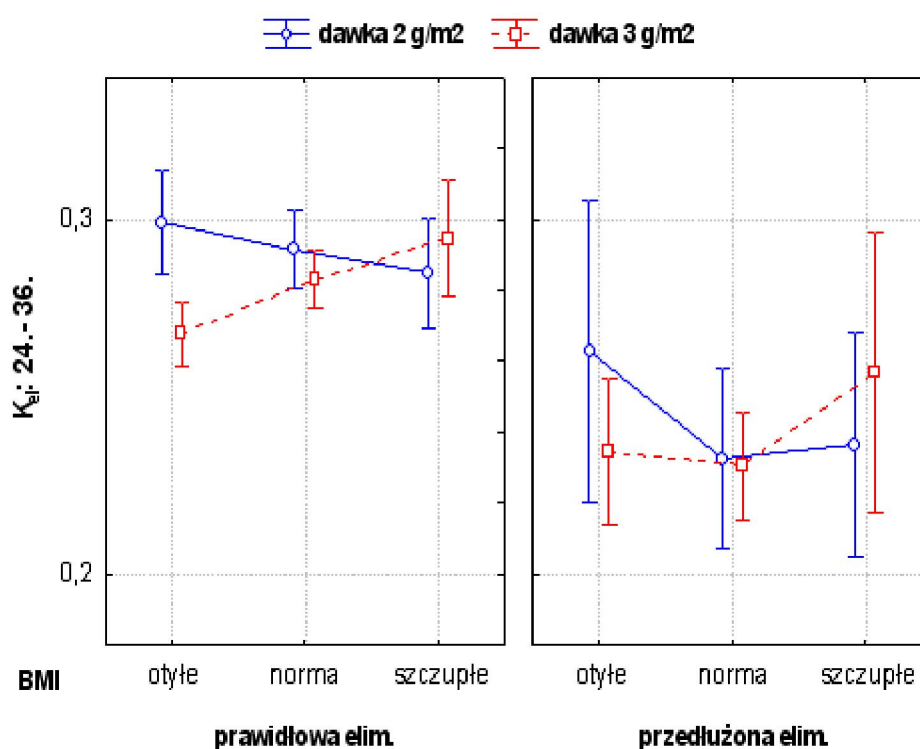
Sprawdzono, czy istniała korelacja wartości stałych eliminacji we wczesnej fazie wydalania Mtx (24.-36. godzina) z: wiekiem, płcią i BMI. Nie wykazano istotnych różnic w wartościach K_{el} wczesnej fazy wydalania Mtx w obrębie trzech grup wiekowych. Istotne statystycznie różnice w wartościach K_{el} stwierdzono w różnych grupach BMI dla dawki 3 g/m² oraz płci dla dawki 2 g/m², tylko w przypadku sprawnego wydalania leku. Zestawienie zbiorcze uzyskanych wyników przedstawia tabela 23. Z uwagi na małą liczebność pacjentów z ekstremalnych grup BMI, badanie przeprowadzono w trzech grupach: dzieci nadmiernie otyłych, prawidłowo odżywionych i nadmiernie szczupłych.

Tabela 23. Wartości stałej eliminacji ($\mu\text{mol/l}$) obu dawek Mtx we wczesnej fazie wydalania w zależności od: wieku, BMI i płci leczonych oraz sprawności eliminacji leku

Elimi- nacja	Parametry		Dawka 2 g/m ²				Dawka 3 g/m ²				Wartość p
			n	$\bar{x}$	s	Me	n	$\bar{x}$	s	Me	
Prawidłowa	wiek (lata)	< 1 ; 4 ≥	60	0,286	0,062	0,294	48	0,273	0,051	0,277	0,42
		< 4 ; 10 ≥	101	0,295	0,049	0,299	49	0,272	0,045	0,271	
		> 10	24	0,292	0,044	0,294	13	0,293	0,033	0,287	
		p	0,58				0,33				
	BMI	> 75 percentyla	50	0,299	0,054	0,301	138	0,267	0,055	0,272	0,01
		25 - 75 percentyl	90	0,291	0,054	0,300	166	0,283	0,049	0,280	
		< 25 percentyla	45	0,285	0,052	0,288	40	0,295	0,060	0,287	
		p	0,42				0,01				
	płeć	dziewczęta	97	0,304	0,045	0,305	179	0,276	0,060	0,276	0,002
		chłopcy	88	0,279	0,059	0,287	165	0,281	0,046	0,284	
		p	0,001				0,38				
Przedłużona	wiek (lata)	< 1 ; 4 ≥	13	0,252	0,052	0,274	5	0,258	0,029	0,249	0,89
		< 4 ; 10 ≥	14	0,229	0,083	0,253	13	0,230	0,035	0,217	
		> 10	7	0,237	0,042	0,242	9	0,225	0,056	0,247	
		p	0,66				0,36				
	BMI	> 75 percentyla	6	0,263	0,035	0,247	26	0,234	0,053	0,237	0,40
		25 - 75 percentyl	17	0,233	0,069	0,251	46	0,230	0,050	0,231	
		< 25 percentyla	11	0,236	0,071	0,272	7	0,257	0,030	0,272	
		p	0,62				0,43				
	płeć	dziewczęta	14	0,240	0,051	0,254	42	0,230	0,056	0,232	0,63
		chłopcy	20	0,238	0,073	0,253	37	0,239	0,041	0,239	
		p	0,94				0,41				

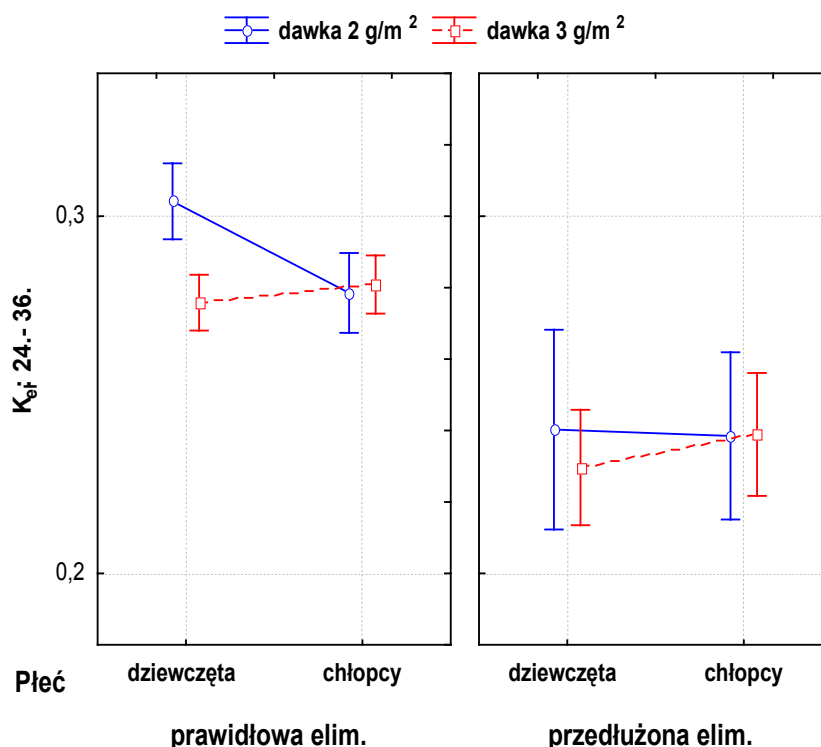
W analizie porównawczej wykazano, że zarówno w przypadku prawidłowego, jak i przedłużonego wydalania Mtx, najwyższe wartości stałej eliminacji we wczesnej fazie wydalania leku, w przypadku dawki 2 g/m² dotyczyły dzieci otyłych, a w przypadku dawki 3 g/m² – szczupłych. Ponadto stwierdzono, że w sytuacji prawidłowego klirensu leku średnie wartości K_{el} malały wraz z mniejszą masą tkanki tłuszczowej dzieci leczonych dawką 2 g/m², a rosły w przypadku zastosowania dawki 3 g/m² Mtx i że różnice te były istotne ($p=0,01$). Takich liniowych zależności wartości K_{el} od stopnia odżywienia pacjentów nie wykazano w sytuacji zaburzonego wydalania Mtx. Na rysunku 22 dzieci „otyle” oznaczają pacjentów o BMI ponad 75 percentyl, a „szczupłe” - dzieci o BMI poniżej 25 percentyla.

Rysunek 22. Zależność średnich wartości K_{el} ($\mu\text{mol/l}$) we wczesnej fazie wydalania leku (24.-36.godzina) od stopnia odżywienia dzieci dla dwu różnych HD-Mtx, w przypadku prawidłowego i zaburzonego klirensu leku



Istotne różnice średnich wartości K_{el} dotyczyły także płci ($p=0,002$), w przypadku prawidłowego wydalania Mtx. Wyższe wartości stałej eliminacji we wczesnej fazie wydalania leku, podanego w dawce 2 g/m² stwierdzono u dziewcząt, a w przypadku dawki 3 g/m² – u chłopców (rysunek 23).

Rys 23. Zależność średnich wartości K_{el} we wczesnej fazie wydalanania leku (24.-36. godzina) od płci, dla dwu różnych HD-Mtx, w przypadku prawidłowego i obniżonego klirensu leku



4. Czynniki istotnie wpływające na zaburzenie eliminacji obu wysokich dawek Mtx

W celu wyłonienia parametrów istotnie wpływających na przedłużenie wydalanania HD-Mtx, do modelu wieloczynnikowej regresji logistycznej, na podstawie danych literaturowych (5, 8, 9, 11, 21, 23, 54, 88, 90, 107, 153, 167, 183, 197, 213, 234, 236, 249, 257, 263, 269) i własnych badań, wybrano następujące zmienne: wysokość dawki leku, wiek, BMI i polimorfizm genowy 677C>T MTHFR leczonych oraz wysokość stężenia stacjonarnego leku i stałą eliminacji wczesnej fazy wydalanania Mtx.

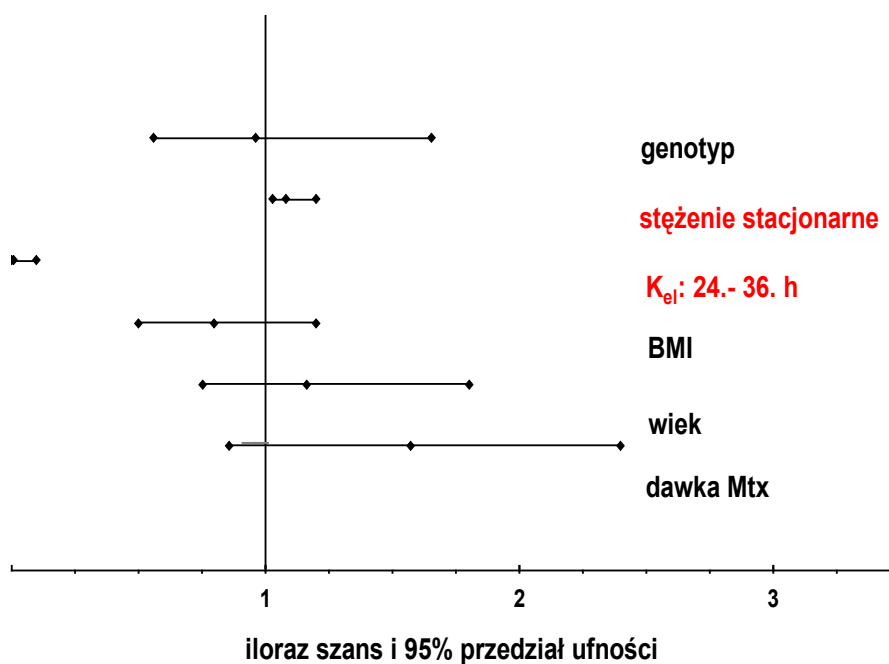
Analizą objęto łącznie 496 cykli (414 z prawidłowym i 82 z przedłużonym wydaleniem leku). Z uwagi na małe liczebności ekstremalnych grup BMI, podobnie jak wcześniej wyodrębniono trzy grupy dzieci: nadmiernie otyłych (BMI > 75 percentyla), prawidłowo odżywionych i nadmiernie szczupłych (BMI < 25 percentyla).

W analizie, z zastosowaniem modelu regresji logistycznej, czynnikami istotnie wpływającymi na zaburzenie klirensu Mtx okazały się: stała eliminacji we wczesnej fazie wydalanania leku oraz stężenie stacjonarne. Natomiast takie zmienne jak: wiek, BMI, polimorfizm genowy 677C>T MTHFR, wysokość dawki Mtx (2 g/m² lub 3 g/m²) nie wpływały istotnie na częstość przedłużonej eliminacji leku (tabela 24 i rysunek 24).

Tabela 24. Wyniki analizy regresji logistycznej do oceny zależności przedłużonej eliminacji HD-Mtx w cyklu, od badanych parametrów

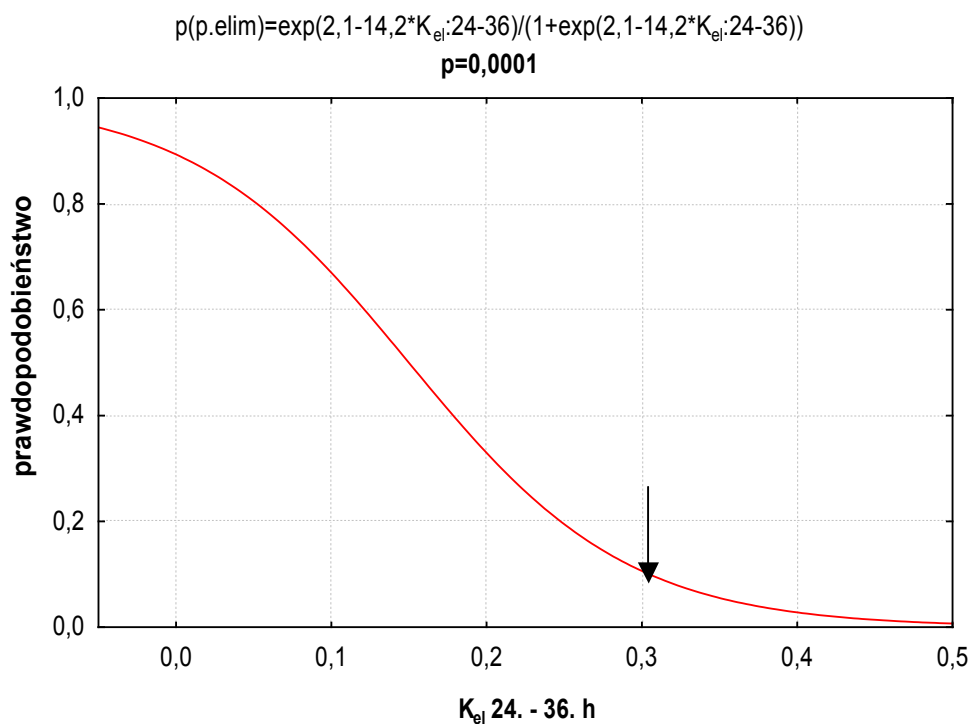
Oceniany parametr	Współczynnik regresji (beta)	Wartość p
dawka Mtx	0,453	0,139
wiek	0,146	0,509
BMI	-0,226	0,288
K_{el} : 24-36	-22,62	0,001
stężenie stacjonarne	0,053	0,001
genotyp (CC, inny)	-0,040	0,885
wartość stała dla modelu	2,690	0,001

Rysunek 24. Iloraz szans i przedział ufności dla poszczególnych parametrów, wpływających na wystąpienie przedłużonej eliminacji HD-Mtx



Przeprowadzona analiza wykazała, że wzrost wartości stężenia stacjonarnego oraz spadek wartości K_{el} wczesnej fazy wydalania Mtx istotnie zwiększały prawdopodobieństwo wystąpienia obniżonego klirensu leku, skutkującego jego przedłużoną eliminacją ponad 48. godzinę cyklu. Na rysunku 25 przedstawiono graficznie zależność prawdopodobieństwa wystąpienia przedłużonego wydalania HD-Mtx (dla obu dawek łącznie) od wartości stałej eliminacji leku we wczesnej fazie szybkiego wydalania, tj. między 24. a 36. godziną cyklu. Spadkowi wartości K_{el} wczesnej fazy wydalania Mtx towarzyszy wzrost prawdopodobieństwa zawyżonego stężenia leku w surowicy w 48. godzinie wydalania.

Rysunek 25. Krzywa logistyczna wystąpienia przedłużonej eliminacji HD-Mtx w cyklu, w zależności od wartości K_{el} 24. – 36.



Wartość progowa K_{el} wczesnej fazy wydalania leku, wyliczona dla modelu wynosi $0,3 \text{ h}^{-1}$ (tabela 25 i 26).

Tabela 25. Częstość zaburzonej eliminacji w zależności od wartości progowej K_{el} wczesnej fazy (24.-36. godzina) wydalania Mtx: analiza 676 cykli

K _{el} 24. – 36.	Prawidłowa eliminacja		Przedłużona eliminacja		Razem		Wartość p
	n	%	n	%	n	%	
< 0,3 h ⁻¹	357	77,6	103	22,4	460	100,0	0,0001
≥ 0,3 h ⁻¹	207	95,8	9	4,2	216	100,0	
χ ² = 35,32							

Tabela 26. Iloraz szans i przedział ufności dla wartości progowej K_{el} wczesnej fazy wydalania Mtx, wyższej lub równej $0,3 \text{ h}^{-1}$

Zmienna	Współczynnik beta	Iloraz szans	Przedział ufności dla ilorazu szans (0,95)	Wartość p
K_{el} 24. – 36. $\geq 0,3 \text{ h}^{-1}$ stała	-1,89	0,15	[0,08-0,31]	0,0001
	-1,24	0,29	[0,23-0,36]	0,0001

Wartości K_{el} fazy alfa niższe od $0,3 \text{ h}^{-1}$ wiązały się z gwałtownym wzrostem ryzyka zaburzonej eliminacji Mtx w danym cyklu (rysunek 25).

5. Ocena bliskiej toksyczności dwu różnych wysokich dawek systemowych Mtx: 2 g/m² i 3 g/m², w odniesieniu do sprawności wydalania leku

Analiza dotyczyła zarówno częstych jak i rzadkich bliskich objawów toksycznych, stwierdzanych w przebiegu chemioterapii z zastosowaniem HD-Mtx. Porównano częstość występowania i nasilenie obserwowanych niepożądanych bliskich skutków terapii, zgodnie z rozszerzoną skalą toksyczności wg National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) w modyfikacji German Society of Pediatric Oncology/Hematology (GPOH) (aneks 5), w zależności od zastosowanej dawki i sprawności wydalania Mtx.

W celu oceny wpływu terapii HD-Mtx na funkcję nerek i wątroby badaniu poddano tylko te cykle chemioterapii (różne liczebnie), w czasie których wykonano oznaczenia odpowiednich parametrów biochemicznych. Natomiast ocena wszystkich rodzajów ostrych toksyczności klinicznych, związanych z chemioterapią HD-Mtx dotyczyła łącznie 829 cykli, w tym 232 chemioterapii z prawidłową i 44 z zaburzoną eliminacją Mtx w dawce 2 g/m² oraz w przypadku dawki 3 g/m² odpowiednio: 456 i 97 cykli.

Uboczne objawy hematologiczne (związane nieodłącznie z każdym rodzajem chemioterapii) występowały z podobną częstością w przypadku obu dawek leku. Najczęściej stwierdzano niedokrwistość w stopniu 1. lub 2. wg NCI-CTC, co dotyczyło około 7% cykli z prawidłową i 20% z zaburzoną eliminacją obu dawek Mtx. Przejściową leukopenię i małopłytkowość odnotowywano jeszcze rzadziej. Z powodu toksyczności hematologicznych kolejne etapy planowego leczenia opóźniano wyjątkowo. Dlatego nie przeprowadzono szczegółowych analiz dotyczących tego rodzaju bliskiej toksyczności terapii HD-Mtx.

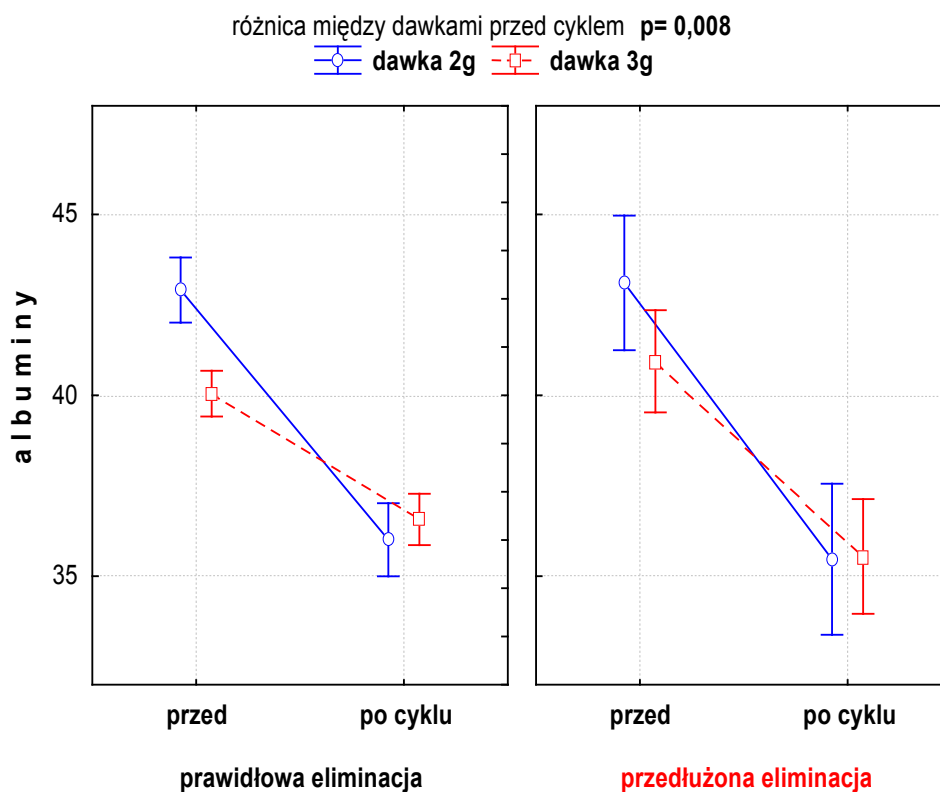
5.1. Wpływ HD-Mtx na wartości parametrów biochemicznych oceniających funkcję wątroby, w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji leku

W celu oceny wpływu chemioterapii HD-Mtx (dwu różnych dawek leku) na funkcję wątroby przeanalizowano zachowanie się takich biochemicznych parametrów jak: stężenia albumin i białka całkowitego oraz bilirubiny całkowitej, aminotransferazy asparaginianowej (GOT) i alaninowej (GPT) w surowicy.

W analizie zmian stężenia albumin w surowicy ocenie poddano ich wartości z 81 cykli z prawidłowym i 19 z zaburzonym wydalaniem Mtx zastosowanego w dawce 2 g/m² oraz odpowiednio z: 164 i 33 cykli, dotyczących dawki 3 g/m² leku. W przypadku obu dawek Mtx wartości tego parametru (podobnie jak stężenia białka całkowitego i bilirubiny w surowicy) oznaczane przed pierwszymi cyklami nie odbiegały od normy. Stężenia albumin w surowicy pacjentów, niezależnie od klirensu jak i wysokości zastosowanej dawki leku istotnie malały

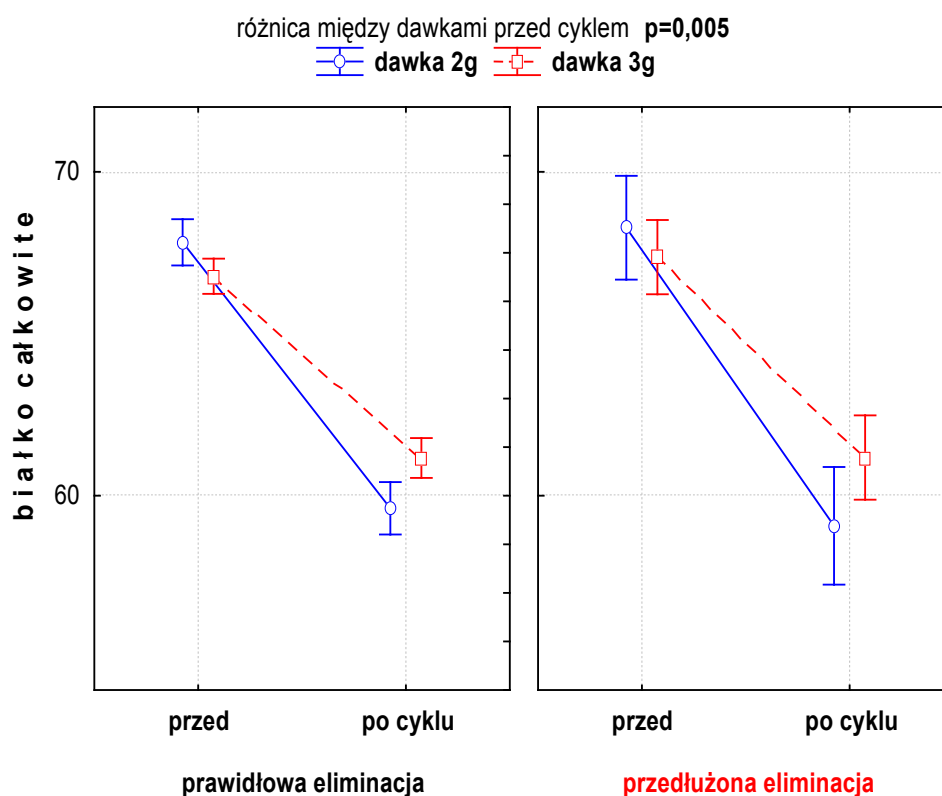
($p=0,0001$) po zakończeniu wlewu Mtx (tabela 27). Na wykresach zwraca uwagę fakt, że średnie stężenia albumin przed zastosowaniem Mtx w dawce 2 g/m^2 były istotnie wyższe ($p=0,008$) niż przed cyklami z podaniem tego leku w wyższej dawce. Obserwacja ta nasuwa przypuszczenie, że wyższa systemowa dawka (3 g/m^2) Mtx istotnie bardziej obniżała produkcję albumin w wątrobie, a zatem była obciążona większą bliską toksycznością w stosunku do tego narządu (rysunek 26).

Rysunek 26. Zmiany średnich stężeń albumin w surowicy w czasie chemioterapii z HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2), w zależności od klirensu leku



Wpływ chemioterapii HD-Mtx na stężenie białka całkowitego w surowicy, niezależnie od zastosowanej dawki i sprawności wydalania leku był podobny, jak w przypadku albumin. Stwierdzono istotny ($p=0,0001$) spadek wartości tego parametru po zakończeniu chemioterapii HD-Mtx (rysunek 27 i tabela 27). Większa dynamika zmian stężenia białka w surowicy, podobnie jak w przypadku albumin, dotyczyła cykli z niższą dawką (2 g/m^2) leku. Jednak średnie stężenia białka całkowitego przed cyklami z Mtx w dawce 2 g/m^2 , w łącznej analizie były istotnie wyższe ($p=0,005$) niż w przypadku wyższej dawki Mtx, co sugeruje większą toksyczność wlewów Mtx w dawce 3 g/m^2 . Ocenie poddano wartości z: 201 chemioterapii z prawidłowym i 40 z zaburzonym wydalaniem Mtx w dawce 2 g/m^2 oraz w przypadku dawki 3 g/m^2 odpowiednio z: 348 i 78 cykli.

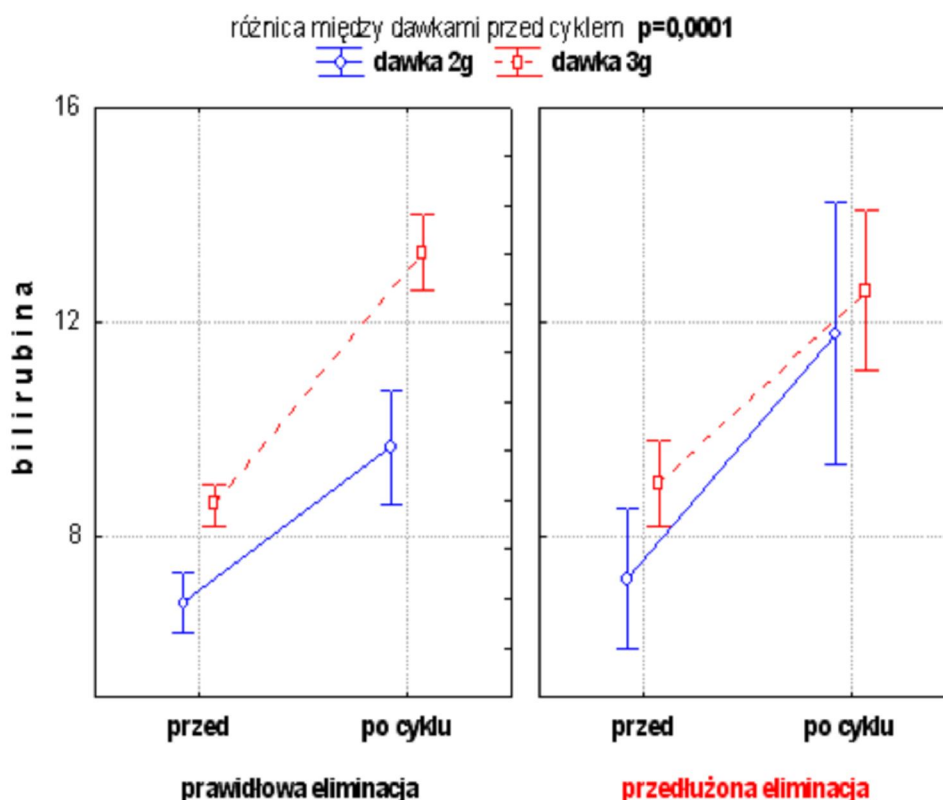
Rysunek 27. Zmiany średnich stężeń białka całkowitego w surowicy pod wpływem chemioterapii z HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2), w zależności od klirensu leku



Zmiany stężenia bilirubiny całkowitej oceniono w: 193 cyklach z prawidłową i 36 z zaburzoną eliminacją Mtx podanego w dawce 2 g/m^2 oraz odpowiednio w: 418 i 96 cyklach z Mtx zastosowanym w dawce 3 g/m^2 (rysunek 28).

Stężenie bilirubiny całkowitej w surowicy istotnie ($p=0,002$ i $p=0,0001$) wzrastało (tabela 27) w czasie chemioterapii z HD-Mtx, niezależnie od zastosowanej dawki i sprawności eliminacji leku. Zmiana ta była silniej wyrażona w przypadku wyższej dawki (3 g/m^2) Mtx, gdyż zarówno przed kolejnymi cyklami jak i po ich zakończeniu wartości bilirubiny były znacząco wyższe ($p=0,0001$), niż w przebiegu cykli z Mtx w dawce 2 g/m^2 (rysunek 28). Podobnie jak w odniesieniu do albumin, można więc wnioskować, że leczenie wyższą dawką systemową Mtx łączyło się z większym nasileniem bliskiej toksyczności ze strony wątroby, której wykładnikiem była hiperbilirubinemia.

Rysunek 28. Zmiany średnich stężeń bilirubiny całkowitej w surowicy pod wpływem chemioterapii z HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2), w zależności od klirensu leku

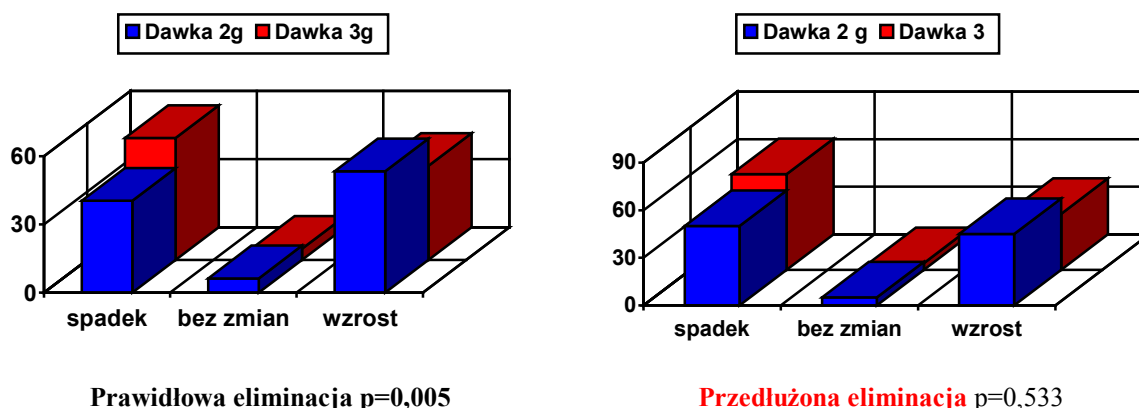


Aktywność podstawowych enzymów wątrobowych w surowicy zachowywała się, w przebiegu chemioterapii z HD-Mtx zmiennie; rosła lub malała. Zmiany aktywności GOT w surowicy pacjentów oceniono analizując ich wartości w: 263 cyklach Mtx w dawce 2 g/m^2 (w tym 40 cyklach z przedłużoną eliminacją leku) oraz 540 cyklach Mtx w dawce 3 g/m^2 (w tym 96 z zaburzonym wydalaniem leku).

W przypadku prawidłowej eliminacji leku, stężenie GOT w większości cykli (53,4%) z Mtx w dawce 2 g/m^2 pod wpływem chemioterapii wzrastało, a obniżało się w 40,4% cykli. Natomiast w większości chemioterapii (53,6%) z wyższą dawką leku (3 g/m^2) stężenie tej transaminazy zmniejszało się, a wzrastało w 41,4% chemioterapii. W obu przypadkach średnie wartości GOT zmieniały się istotnie statystycznie (tabela 27). Istotne różnice ($p=0,005$) dotyczyły także charakteru tych zmian w odniesieniu do obu zastosowanych dawek (rysunek 29).

W przypadku zaburzonej eliminacji Mtx zastosowanego w dawce 2 g/m^2 i 3 g/m^2 obserwowano podobną tendencję zmian aktywności GOT w surowicy. Wartości tej transaminazy w obu sytuacjach częściej obniżały się (odpowiednio: 50% i 60,4% cykli) niż wrosły (odpowiednio: 45% i 35,4% cykli). Podobny charakter zmian aktywności GOT, pod wpływem obu dawek cytostatyku sprawił, iż różnice zmian nie były istotne statystycznie ($p=0,5$).

Rysunek 29. Zmiany stężeń GOT w surowicy pod wpływem chemioterapii z HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2), w zależności od klirensu leku

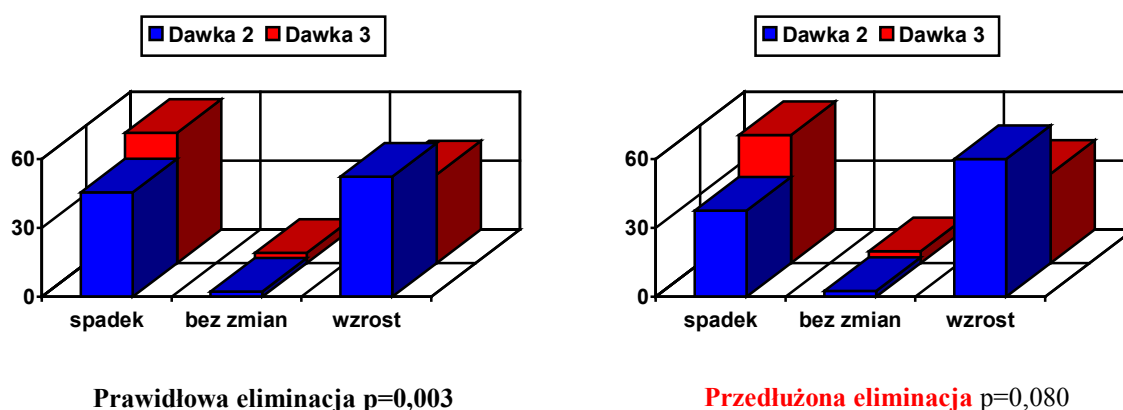


Stężenie GPT zachowywało się, w przebiegu chemioterapii z HD-Mtx podobnie jak GOT. Oceniono je w: 222 cyklach z prawidłową i w 40 z przedłużoną eliminacją Mtx podanego w dawce 2 g/m^2 oraz w przypadku dawki 3 g/m^2 leku odpowiednio w: 442 i 95 chemioterapiach (rysunek 30).

W przypadku prawidłowego wydalania dawki 2 g/m^2 stężenie tego enzymu wzrosło w 52,3% cykli, a obniżyło się w 45,5%. Natomiast w większości cykli (56,8%) z Mtx w dawce 3 g/m^2 stężenie tej transaminazy obniżało się, a wzrastało w przebiegu 38,7% chemioterapii. Stwierdzone różnice zmian aktywności GPT były istotne statystycznie ($p=0,003$), co przedstawiono na rysunku 30. Wykazano również istotne różnice ($p=0,018$) w średnich wartościach GPT pod wpływem chemioterapii Mtx w dawce 3 g/m^2 , w porównaniu z cyklami z dawką 2 g/m^2 leku (tabela 27).

W przypadku zaburzonej eliminacji Mtx, podanego w dawce 2 g/m^2 wartości stężeń GPT wzrastały w większości (60,0%) cykli, a obniżały się w około 1/3 chemioterapii (37,5%). Natomiast w przebiegu chemioterapii z opóźnionym wydalaniem Mtx, podanego w dawce 3 g/m^2 , stężenie GPT obniżało się w przebiegu większości cykli (55,8%), a wzrastało w około 1/3 cykli (39,0%), zachowując się podobnie, jak w cyklach z prawidłowym wydalaniem leku. Stwierdzone zmiany stężeń GPT w czasie chemioterapii nie były istotne statystycznie (tabela 27).

Rysunek 30. Zmiany stężeń GPT w surowicy pod wpływem terapii z HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2), w zależności od klirensu leku



5.2. Wpływ terapii HD-Mtx na wartości parametrów biochemicznych oceniających funkcję nerek, w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji leku

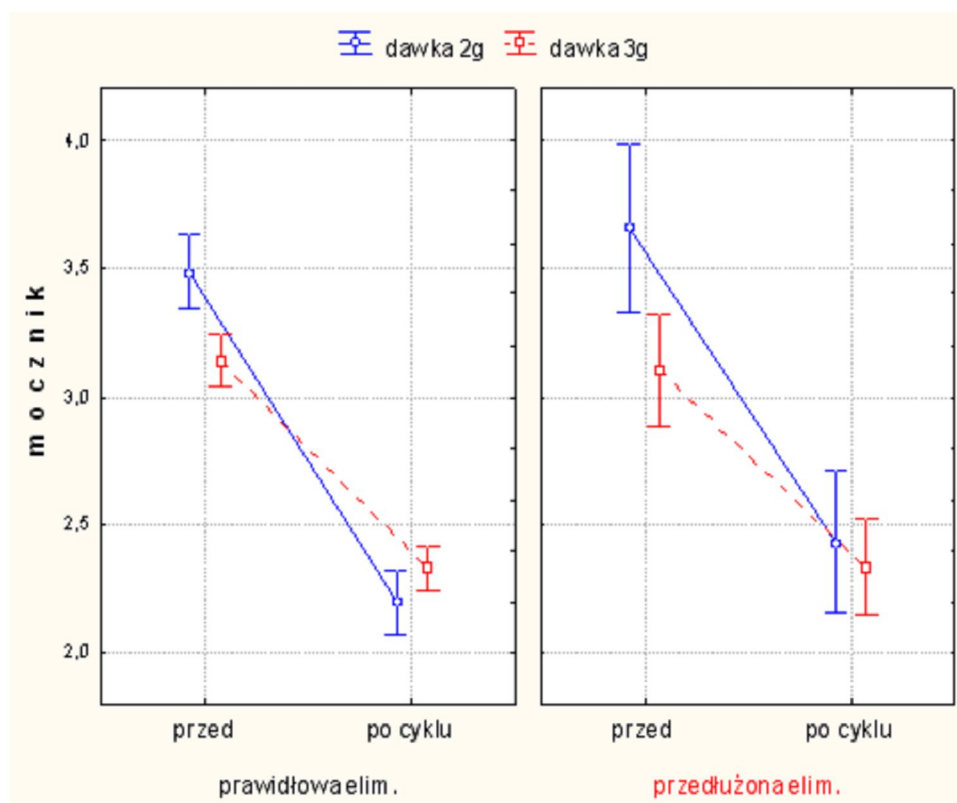
Porównano średnie wartości stężeń mocznika i kreatyniny w surowicy przed i po zakończeniu wlewu Mtx, zastosowanego w dwu różnych wysokich dawkach, w cyklach o prawidłowej i zaburzonej eliminacji leku.

W odniesieniu do mocznika, w przypadku dawki Mtx 2 g/m^2 , ocenie poddano wartości z 218 cykli o prawidłowej i z 41 cykli o zaburzonej eliminacji leku, a w przypadku dawki 3 g/m^2 odpowiednio: z 431 i 90 cykli.

Terapia HD-Mtx wiązała się, niezależnie od zastosowanej dawki i klirensu leku z istotnym spadkiem średnich wartości mocznika ($p=0,001$), co można wytłumaczyć intensywnym nawadnianiem dożylnym ($3 \text{ litry/m}^2/\text{dobę}$) pacjentów w trakcie chemioterapii (tabela 27).

Istotnie wyższe średnie stężenia mocznika, stwierdzone przed cyklami z Mtx w dawce 2 g/m^2 ($p<0,01$), niezależnie od tempa wydalania leku, wydają się być przypadkowe (rysunek 31).

Rysunek 31. Zmiany średnich stężeń mocznika w surowicy pod wpływem chemioterapii z HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2), w zależności od klirensu leku

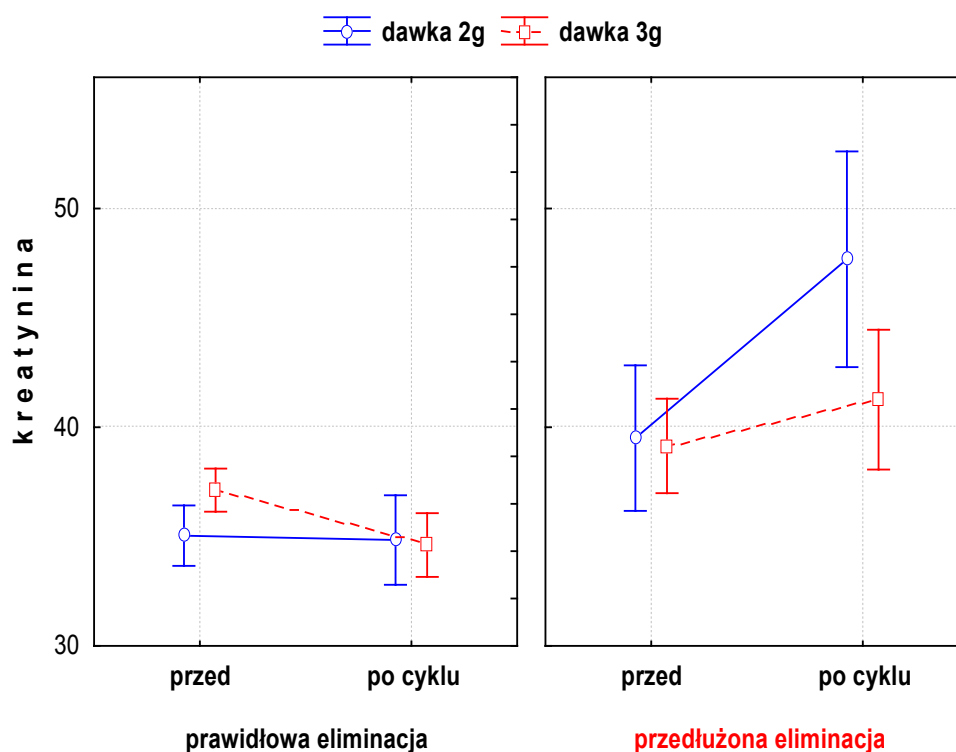


W odniesieniu do kreatyniny ocenie poddano wartości z 215 cykli z prawidłową i 37 z zaburzoną eliminacją Mtx, zastosowanego w dawce 2 g/m^2 oraz w przypadku dawki 3 g/m^2 odpowiednio z: 424 i 88 cykli.

W cyklach o prawidłowej eliminacji Mtx, podanego w dawce 2 g/m^2 nie stwierdzono istotnych zmian wartości stężeń kreatyniny w surowicy pod wpływem chemioterapii ($p=0,7$). Dla dawki 3 g/m^2 leku zaobserwowano istotny spadek średnich wartości stężeń tego parametru ($p=0,0001$) po zakończeniu wlewu Mtx, podobnie jak miało to miejsce w przypadku mocznika, co można tłumaczyć prawdopodobnym wpływem nawodnienia z forsowaniem diurezy (tabela 27).

W cyklach o zaburzonej eliminacji Mtx, dla obu dawek stwierdzono wzrost średnich wartości stężeń kreatyniny po zakończeniu chemioterapii (rysunek 32). Rozrzut wartości tego parametru był jednak w obu przypadkach duży, tak iż zmiany średnich stężeń kreatyniny nie były istotne statystycznie ($p=0,2$ i $p=0,4$ odpowiednio dla dawki Mtx 2 g/m^2 i 3 g/m^2). W 22 spośród 37 cykli (59,5%) Mtx w dawce 2 g/m^2 z przedłużonym wydalaniem leku, stężenia kreatyniny po zakończeniu wlewu Mtx były wyższe od wartości wyjściowych tego parametru, a w 15 cyklach (40,5%) niższe. W przypadku dawki 3 g/m^2 spośród 88 cykli z zaburzonym wydalaniem, stężenie kreatyniny po zakończeniu wlewu Mtx wzrosło w 39 (44,3%) cyklach, obniżyło się w 44 (50%) i nie uległo zmianie w 5 (5,7%) cyklach.

Rysunek 32. Zmiany średnich stężeń kreatyniny w surowicy pod wpływem chemioterapii z HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2), w zależności od klirensu leku



5.3. Analiza zbiorcza istotności wpływu terapii HD-Mtx na wartości podstawowych parametrów biochemicznych funkcji wątroby i nerek - w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji leku

W celu wyłonienia parametru, który najsilniej reagował na chemioterapię HD-Mtx porównano istotność statystyczną zmian wszystkich zbadanych parametrów funkcji wątroby i nerek, w odniesieniu zarówno do zastosowanej dawki, jak i tempa eliminacji Mtx (tabela 27).

Najczulszymi zmiennymi okazały się: stężenia białka całkowitego, albumin, bilirubiny i mocznika w surowicy. Wartości stężeń białka, albumin i mocznika istotnie zmniejszały się po zastosowaniu HD-Mtx, a bilirubiny całkowitej rosły. W przypadku każdego z tych parametrów zmiany były niezależne od podanej dawki i czasu ekspozycji na lek. Większa dynamika spadku wartości białka całkowitego i albumin w surowicy dotyczyła cykli z Mtx zastosowanym w niższej systemowej dawce (2 g/m^2). Natomiast wzrost stężeń bilirubiny całkowitej w surowicy pod wpływem chemioterapii HD-Mtx był bardziej nasilony w przypadku wyższej dawki leku.

Brak istotności statystycznej zmian stężenia kreatyniny w cyklach, w których stwierdzono opóźnione wydalenie Mtx wynika z faktu, iż w porównywalnej liczbie chemioterapii z zastosowaniem obu dawek leku występował tak spadek, jak i wzrost stężenia tego parametru.

Tylko w dwu odnotowanych przypadkach ostrej niewydolności nerek w trakcie terapii HD-Mtx, stężenie kreatyniny w surowicy bardzo wysoko wrosło.

Przedłużona ekspozycja na Mtx stosowany w dwóch różnie wysokich dawkach systemowych, nie spowodowała istotnego statystycznie wzrostu stężeń podstawowych enzymów wątrobowych, takich jak: GOT i GPT.

Tabela 27. Porównanie istotności statystycznej zmian średnich wartości parametrów biochemicznych funkcji nerek i wątroby, pod wpływem chemioterapii HD-Mtx (2 g/m² i 3 g/m²), w przypadku prawidłowej i zaburzonej eliminacji leku

Badany parametr	Eliminacja	Dawka 2 g/m ²		Dawka 3 g/m ²	
		Liczba oznaczeń	Istotność statystyczna zmian średnich stężeń pod wpływem HD-Mtx	Liczba oznaczeń	Istotność statystyczna zmian średnich stężeń pod wpływem HD-Mtx
mocznik	prawidłowa	218	0,0001	431	0,0001
	przedłużona	41	0,0001	90	0,0001
kreatynina	prawidłowa	215	0,711	424	0,0001
	przedłużona	37	0,163	88	0,395
albumina	prawidłowa	81	0,0001	164	0,0001
	przedłużona	19	0,0001	33	0,0001
białko	prawidłowa	201	0,0001	348	0,0001
	przedłużona	40	0,0001	78	0,0001
bilirubina	prawidłowa	193	0,0001	418	0,0001
	przedłużona	36	0,002	96	0,0001
GOT	prawidłowa	223	0,002	444	0,033
	przedłużona	40	0,138	96	0,155
GPT	prawidłowa	222	0,095	442	0,018
	przedłużona	40	0,063	95	0,104

5.4. Zakażenia w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji Mtx

Zakażenia oceniono w dwu grupach. Do pierwszej z nich zakwalifikowano: zakażenia dróg oddechowych, gorączki niewiadomego pochodzenia (FUO) i posocznice, a do drugiej biegunki, występujące najczęściej w przebiegu odczynów zapalnych śluzówek przewodu pokarmowego.

Zakażenia zakwalifikowane do pierwszej grupy wystąpiły po 10,8% cykli z Mtx w dawce 2 g/m² wydalanych prawidłowo i dwukrotnie częściej (20,5% cykli) w przypadku zaburzonego klirensu leku. W tej grupie zakażenia ocenione jako 2. stopień w skali NCI-CTC dotyczyły przede wszystkim zapaleń płuc i występowały znacząco częściej w przypadku zaburzonej eliminacji Mtx (6,8% cykli), w porównaniu z prawidłowym wydalaniem tego leku (1,3% cykli).

Udokumentowane posocznice ocenione w skali NCI-CTC jako 3. stopień toksyczności stanowiły najcięższe powikłania infekcyjne, obserwowane w badanej grupie. Te uogólnione zakażenia wystąpiły także częściej w przypadku przedłużonego wydalania leku (2,3% cykli), w porównaniu z cyklami o prawidłowej eliminacji Mtx (0,9% cykli).

Po chemioterapiach z Mtx w dawce 3g/m² zakażenia odnotowano istotnie częściej niż w przypadku zastosowania niższej dawki leku, gdyż dotyczyły one 17,5% cykli z prawidłowym wydalaniem oraz 29,9% z przedłużoną eliminacją Mtx. Zakażenia w 2. stopniu wg skali NCI-CTC wystąpiły z podobną częstością po cyklach z prawidłową (5,3% cykli) i z zaburzoną eliminacją leku (6,2%). Zakażenia w 3. stopniu wg NCI-CTC, podobnie jak po cyklach z Mtx w dawce 2 g/m² były rzadkie. Wystąpiły po 0,9% i 1,0% cykli, odpowiednio z prawidłowym i przedłużonym wydalaniem leku.

W wyniku przeprowadzonej analizy wykazano, że niezależnie od sprawności wydalania Mtx, zakażenia wystąpiły statystycznie istotnie częściej ($p=0,008$) po cyklach z wyższą dawką (3 g/m²) cytostatyku (tabela 28).

Biegunki, najczęściej spełniające kryterium 1. lub 2. stopnia wg NCI-CTC, w przypadku zastosowania Mtx w dawce 2 g/m² stwierdzono w przebiegu 5,2% i 13,6% cykli, odpowiednio z prawidłowym i zaburzonym klirensem leku. W odniesieniu do dawki Mtx 3 g/m² wystąpiły odpowiednio po: 4,6% i 2,1% cykli z prawidłowym i przedłużonym wydalaniem leku. Wysokość dawki Mtx nie miała wpływu na większą częstość ($p=0,1$), ani ciężkość przebiegu tego powikłania (tabela 27). Tylko w przypadku chemioterapii z Mtx w dawce 2 g/m² przedłużona ekspozycja na cytostatyk wiązała się z istotnym wzrostem częstości biegunek ($p=0,02$), w porównaniu z cyklami o prawidłowej eliminacji leku.

5.5. Toksyczności skórno – śluzówkowe w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji Mtx

Stan zapalny śluzówek po przeprowadzeniu chemioterapii z Mtx w dawce 2 g/m², w przypadku prawidłowej eliminacji tego leku wystąpił łącznie po 3,9% cykli; w 1., 2., 3. stopniu wg skali NCI-CTC odpowiednio po: 1,3%, 2,2% i 0,4% chemioterapii. W przypadku zaburzonego

wydalania leku bliskie toksyczności śluzówkowe były stwierdzane dwukrotnie częściej. Odnotowano je po 9,1% cykli, z identyczną częstością (4,6%) w stopniu 1. i 3.

Zastosowanie Mtx w dawce 3 g/m² Mtx wiązało się z częstszym wystąpieniem stanów zapalnych śluzówek, niż w przypadku dawki 2 g/m² leku (p= 0,0003), ale toksyczności nigdy nie przekroczyły 2. stopnia w skali NCI-CTC. W przypadku prawidłowej eliminacji leku stan zapalny śluzówek wystąpił łącznie po 12,3% cykli, w 1. i 2. stopniu odpowiednio po: 11,4% i 0,9% chemioterapii. W cyklach z zaburzonym klirensiem leku powikłanie to odnotowano łącznie po 14,4% chemioterapii; w stopniu 1. i 2. odpowiednio po: 10,3% i 4,1% cykli.

W odniesieniu do obu dawek Mtx, zaburzone wydalanie leku istotnie zwiększało (dla dawki 2 g/m² i 3 g/m² p odpowiednio: 0,03 i 0,05) częstość bliskich toksyczności ze strony błon śluzowych (tabela 28), ale 3. stopień ciężkości obserwowano tylko w przebiegu cykli z dawką 2 g/m² leku.

Toksyczności skórne, związane z terapią HD-Mtx były bardzo rzadkie, ich nasilenie oceniono maksymalnie jako 2. stopień w skali NCI-CTC. Nie odnotowano istotnie większej częstości tego powikłania po cyklach z wyższą dawką Mtx (p= 0,06)

Toksyczności skórne stwierdzono po 0,9% cykli z prawidłową i 4,5% chemioterapii z przedłużoną eliminacją Mtx, podanego w dawce 2 g/m². Przedłużona ekspozycja na cytotoksyczne stężenia cytostatyku istotnie zwiększała ryzyko wystąpienia zmian skórnych (p=0,05).

W przypadku dawki Mtx 3 g/m² powikłania skórne obserwowano po 3,3% cykli z prawidłowym oraz 6,2% cykli z zaburzonym wydalaniem Mtx. Przedłużona eliminacja cytostatyku zwiększała częstość tego powikłania, ale różnica nie była istotna (p=0,7) statystycznie (tabela 28).

5.6. Wczesne objawy neurotoksyczne w przypadku prawidłowej i przedłużonej eliminacji Mtx

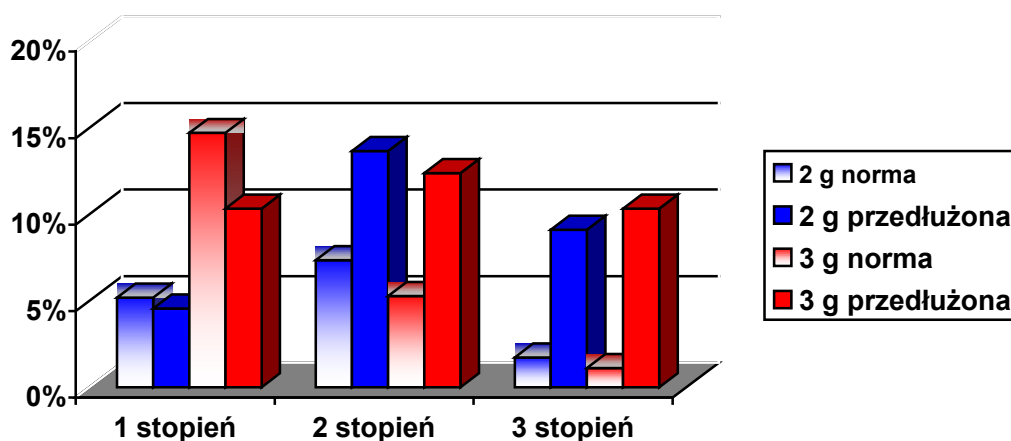
Najczęściej obserwowaną bliską kliniczną toksycznością ze strony układu nerwowego, w przebiegu terapii HD-Mtx były (pomimo postępowania profilaktycznego) nudności i wymioty, odnotowywane częściej w cyklach z wyższą dawką leku (p=0,02). Te powikłania najczęściej ocenione zostały jako 1. lub 2. stopień w skali NCI-CTC, niezależnie od sprawności eliminacji Mtx. Wymioty w 4. stopniu wystąpiły w przebiegu 1 cyklu (0,2%) z zaburzonym wydalaniem Mtx, zastosowanego w dawce 3 g/m².

W trakcie wlewów cytostatyku w dawce 2 g/m² nudności i wymioty były obecne w 14,2% i 27,3% chemioterapii odpowiednio z prawidłowym i przedłużonym wydalaniem leku. Różnica była istotna statystycznie (p=0,02).

W przypadku zastosowania Mtx w dawce 3 g/m^2 powyższe powikłanie także odnotowano istotnie częściej ($p=0,0001$) w przypadku zaburzonej eliminacji cytostatyku; dotyczyło 21,1% cykli z prawidłowym oraz 33,0% z przedłużonym wydalaniem leku.

Nudności i wymioty w stopniu 2., a zwłaszcza 3. w skali NCI-CTC odnotowano przede wszystkim w przebiegu cykli z zaburzonym wydalaniem, z podobną częstością bez względu na wysokość dawki Mtx. Zbiorcze wyniki tej analizy przedstawia rysunek 33. W przebiegu cykli z Mtx w dawce 3 g/m^2 podawano trzy leki dokanałowo, podczas gdy w trakcie chemioterapii z dawką 2 g/m^2 , dokanałowo podawany był tylko Mtx (aneks 1 i 2), co mogło mieć również wpływ na różne ryzyko wystąpienia nudności i wymiotów.

Rysunek 33. Nasilenie nudności w skali NCI-CTC w cyklach z Mtx w dawce 2 g/m^2 ($n=276$) i 3 g/m^2 Mtx ($n=553$), w zależności od sprawności wydalania leku



Rzadko stwierdzane inne powikłania neurotoksyczne dotyczyły najczęściej typowej symptomatologii zespołu popunkcyjnego lub rozdrażnienia (stopień 1. wg NCI-CTC). W przypadku chemioterapii z Mtx podawanym w dawce 2 g/m^2 stwierdzono je tylko w przebiegu cykli (2,2%) z prawidłowym wydalaniem leku. Natomiast w trakcie chemioterapii z Mtx w dawce 3 g/m^2 te powikłania obserwowano niezależnie od klirensu leku, ale częściej w cyklach z zaburzoną (2,1%) niż prawidłową eliminacją leku (0,9%).

Ponadto, w przebiegu chemioterapii z Mtx w dawce 3 g/m^2 incydentalnie wystąpiły poważniejsze objawy neurotoksyczne. W trakcie jednego cyklu z prawidłową eliminacją leku (0,2%) stwierdzono epizod uogólnionych drgawek kloniczno-tonicznych (3. stopień wg NCI-CTC). W przebiegu jednego cyklu z zaburzonym wydalaniem leku (1,0%) wystąpiły parestezje (2. stopień). W obu przypadkach obserwowane zaburzenia dotyczyły drugiego z czterech kolejno realizowanych cykli, miały charakter jednorazowy i krótkotrwały oraz nie spowodowały trwałego uszczerbku na zdrowiu pacjentów, ani opóźnień w kontynuowaniu planowego leczenia.

5.7. Opóźnienia w planowym leczeniu konsolidacyjnym, spowodowane bliskimi toksycznościami terapii HD-Mtx, w przypadku prawidłowej i zaburzonej eliminacji leku

Opóźnienia w planowej realizacji kolejnych etapów chemioterapii, spowodowane bliskimi toksycznościami terapii HD-Mtx były rzadkie i występowały z porównywalną częstością ($p=0,9$), w obu analizowanych grupach pacjentów leczonych różnymi dawkami cytostatyku. Najczęstszą przyczyną opóźnień były zakażenia i nasilone toksyczności wątrobowe, rzadziej mielosupresja.

W przypadku dawki leku 2 g/m^2 opóźnienie leczenia nigdy nie przekroczyło 14 dni i dotyczyło 3,4% cykli z prawidłową i 9,1% z przedłużoną eliminacją leku. Różnice nie były istotne statystycznie ($p=0,09$).

Zaburzone wydalenie Mtx, podanego w dawce 3 g/m^2 również nie zwiększyło istotnie ($p=0,3$) częstości opóźnień w planowej realizacji leczenia. Przerwa w terapii miała miejsce po 5,0% cykli, w których lek wydalaný był sprawnie i po 2,1% chemioterapii z zaburzoną eliminacją Mtx. Tylko po 2% cykli opóźnienie w leczeniu było dłuższe od 14 dni i dotyczyło to pacjentów z prawidłowym wydalaniem leku.

5.8. Analiza zbiorcza istotności wpływu wysokości dawki oraz zaburzonej eliminacji Mtx na częstość bliskich toksyczności terapii

Celem odpowiedzi na pytanie, czy dawka leku wpływała istotnie na częstość bliskich toksyczności narządowych i powikłań terapii HD-Mtx, porównano ich występowanie niezależnie od sprawności wydalania leku, poddając analizie 276 i 553 cykle z dawką odpowiednio: 2 g/m^2 i 3 g/m^2 . Łączna ocena objęła 829 cykli. Przeanalizowano także wpływ przedłużonej ekspozycji na cytotoksyczne stężenia Mtx na częstość występowania bliskich toksyczności leczenia dwoma dawkami cytostatyku.

Najczęściej obserwowaną ostrą toksycznością, związaną z terapią HD-Mtx było zaburzenie funkcji wątroby, definiowane jako: wzrost aktywności dwu enzymów wątrobowych – GOT i GPT, wzrost stężenia bilirubiny całkowitej, lub spadek stężenia białka całkowitego i albumin w surowicy leczonych. Zaburzenie funkcji wątroby występowało istotnie częściej ($p=0,02$) w cyklach z niższą dawką (2 g/m^2) leku, niezależnie od sprawności wydalania Mtx i dotyczyło ponad 30% cykli. Częstość tego powikłania nie zależała też od sprawności wydalania leku (wartości p dla dawki 2 g/m^2 i 3 g/m^2 odpowiednio: 0,1 i 0,3). Niezależnie od klirensu i zastosowanej dawki Mtx, po zakończeniu chemioterapii stwierdzano istotny spadek średnich stężeń białka całkowitego oraz albumin i wzrost stężeń bilirubiny w surowicy pacjentów. Natomiast trzy kolejne pod względem częstości występowania bliskie toksyczności: nudności i

wymioty, zakażenia oraz zapalenie śluzówek wystąpiły istotnie częściej w przebiegu cykli z wyższą (3 g/m^2) dawką leku (wartości p odpowiednio: 0,02; 0,008; 0,0003), niezależnie od sprawności eliminacji Mtx.

Najczęściej odnotowywane kliniczne toksyczności terapii HD-Mtx, pomimo stosowania standardowej profilaktyki, nudności i wymioty, obserwowane były istotnie częściej w cyklach z obniżonym klirensem leku (wartości p dla dawki 2 g/m^2 i 3 g/m^2 odpowiednio: 0,02 i 0,0001).

Stwierdzone zakażenia, związane z immunosupresją (niekiedy też leukopenią) dotyczyły najczęściej górnych dróg oddechowych i rzadko były powodem dłuższych (ponad 7 dni) opóźnień w planowym przebiegu leczenia. Podobnie jak w przypadku wymiotów, przedłużone wydalanie Mtx zwiększało częstość występowania tego powikłania, w tym w sposób istotny dla wyższej dawki leku ($p=0,026$). W przypadku zaburzonego wydalania Mtx, podanego w dawce 3 g/m^2 częstość zakażeń była większa (30% cykli), w porównaniu z ich występowaniem po chemioterapiach z niższą dawką leku (20,5% chemioterapii).

Zapalenie śluzówek jamy ustnej było stwierdzane stosunkowo rzadko, istotnie częściej w przebiegu chemioterapii z wyższą dawką (3 g/m^2) Mtx, niezależnie od klirensu leku ($p=0,0003$). Znacząco częściej odczyny zapalne błon śluzowych jamy ustnej występowały w przypadku zaburzonej eliminacji i były stwierdzane w 9,1% oraz 14,1% cykli z Mtx, podanym w dawce odpowiednio: 2 g/m^2 i 3 g/m^2 (wartości p odpowiednio: 0,03 i 0,05).

Biegunki nie należały do częstych powikłań leczenia HD-Mtx. Wyższa dawka Mtx (3 g/m^2) nie wiązała się z istotnym wzrostem częstości tego powikłania ($p=0,14$). W przypadku dawki 2 g/m^2 , w cyklach o przedłużonym wydalaniu leku częstość biegunek była istotnie wyższa ($p=0,02$) w porównaniu z cyklami, w których lek był eliminowany sprawnie.

Podobne zależności stwierdzono w odniesieniu do rzadkich bliskich toksyczności skórnych (tabela 28).

Potencjalnie najgroźniejsze kliniczne toksyczności terapii HD-Mtx, ostre powikłania nerkowe, w postaci ostrej niewydolności nerek wystąpiły u dwojga dzieci podczas pierwszego cyklu Mtx, zastosowanego w niższej dawce (2 g/m^2). W obu sytuacjach nie zidentyfikowano czynników, które mogłyby zwiększać ryzyko wystąpienia tego powikłania (jak np. podaż przeciwwskazanych leków, niezadowalający stan ogólny, niewystarczające nawodnienie, czy podwyższone biochemiczne markery funkcji nerek). W obu przypadkach w drugiej dobie chemioterapii obserwowano istotne zmniejszenie diurezy, a u jednego z dzieci całkowitą anurię, wymagającą wdrożenia procedury nerkozastępczej. Ostra niewydolność nerek w obu przypadkach wystąpiła w sposób niemożliwy do przewidzenia, ale też była całkowicie

odwracalna, tak iż możliwe było później kontynuowanie terapii HD-Mtx. Z uwagi na szczególną wagę tego powikłania poniżej przedstawiono jego krótką charakterystykę.

U ponad 16-letniej dziewczynki, bez żadnych znanych czynników obciążających, w trzeciej dobie od początku wlewu Mtx wystąpiły nasilone wymioty w stopniu 3. wg WHO i skąpa diureza. Poziom leku w 48. godzinie wynosił 6,0 $\mu\text{mol/l}$, a stężenie kreatyniny wzrosło 3-krotnie, w stosunku do wartości wyjściowych. W leczeniu zastosowano wszystkie znane środki terapeutyczne poza Carboxypeptydazą, w tym przez trzy doby - hemodializoterapię. Bezpieczne obniżenie stężenia Mtx poniżej 0,25 $\mu\text{mol/l}$ uzyskano dopiero w 9 dobie (216. godzina) od rozpoczęcia cyklu. W konsekwencji ekstremalnie zaburzonego klirensu leku wystąpiły nasilone toksyczności (stopień 3. wg NCI-CTC), w tym: wymioty, zapalenie śluzówek jamy ustnej, toksyczności wątrobowe oraz posocznica w przebiegu mielosupresji (stopień 2.). Powikłania te spowodowały opóźnienie dalszego leczenia o 14 dni. Pełna normalizacja biochemicznych wykładników funkcji nerek (kreatynina) oraz GFR nastąpiła w około dwa tygodnie od epizodu ostrej niewydolności, co pozwoliło na kontynuację leczenia HD-Mtx w dawkach należnych. W kolejnych trzech cyklach zastosowano preparat Mtx innego producenta i nie obserwowano zaburzenia wydalania leku. Osłonowo dodatkowo podawano cholestyraminę.

Drugi przypadek dotyczył prawie 3,5- letniej dziewczynki, u której w trakcie realizacji również pierwszego cyklu z HD-Mtx, także w dawce 2 g/m^2 , w drugiej dobie terapii przy stężeniu leku z 24. godziny: 90 $\mu\text{mol/l}$, wystąpiła: słaba diureza, nasilone wymioty i senność oraz 10-krotny wzrost wartości kreatyniny w surowicy. W 48. godzinie stężenie Mtx w surowicy wynosiło 17,2 $\mu\text{mol/l}$. W leczeniu, poza leukoworyną w odpowiednio wysokiej dawce, przeprowadzono jednorazowo już w drugiej dobie cyklu plazmaferezę, a następnie pięciokrotnie zabiegi dializoterapii, co doprowadziło do skutecznej eliminacji leku w 9 dobie (216. godzina) od początku chemioterapii. Pomimo znacznie dłuższej ekspozycji na lek, dzięki wcześnie wdrożonym technikom nerkozastępczym, toksyczności narządowe poza wątrobowymi (4. stopień wg. NCI-CTC) były mniej nasilone niż w pierwszym opisanym przypadku. Wymioty i mielosupresja spełniały kryteria 3. stopnia toksyczności. Zapalenie śluzówek jamy ustnej oceniono jako 1. stopień; nie doszło też do powikłań infekcyjnych, a przerwa w leczeniu ALL wyniosła 14 dni. W dalszej terapii, po normalizacji funkcji nerek, stwierdzonej w 15 dobie od zastosowania HD-Mtx kontynuowano bez powikłań leczenie tym cytostatykiem; dawkę leku zredukowano jednak w pozostałych cyklach do 1 g/m^2 i zastosowano preparat innej firmy.

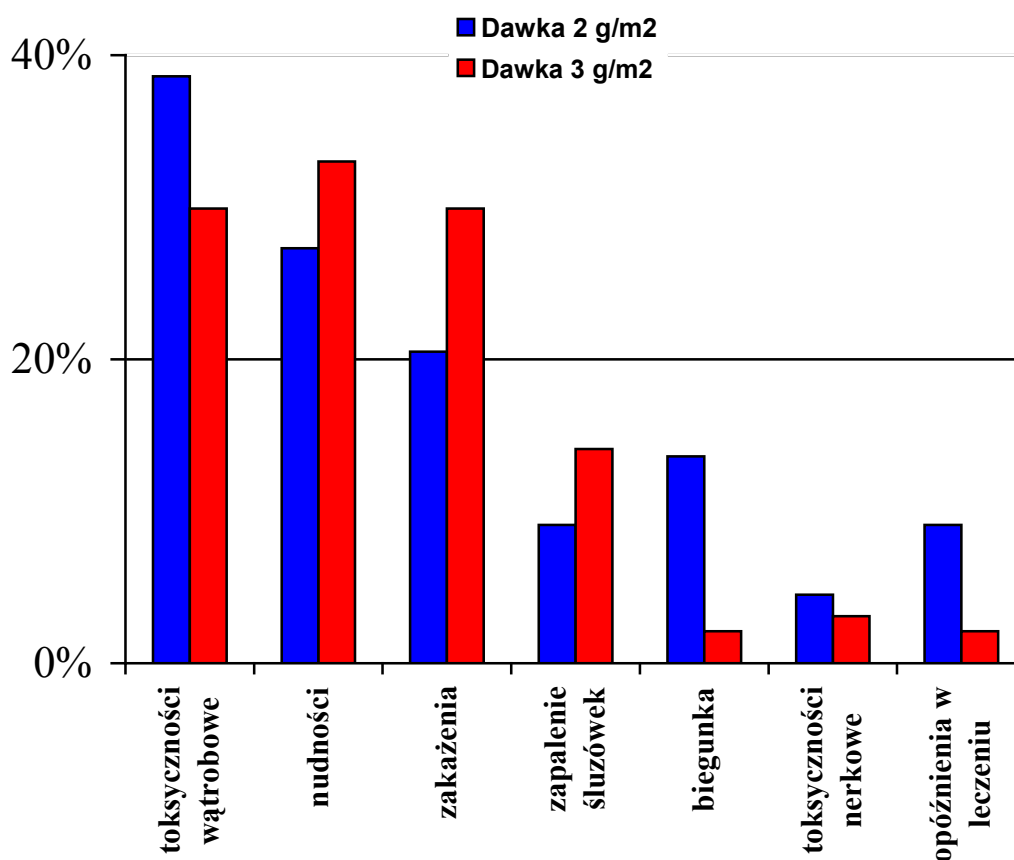
W odniesieniu do rzadkich powikłań neurotoksycznych oraz opóźnień w planowej kontynuacji leczenia, nie stwierdzono by wyższa dawka leku lub zaburzona eliminacja Mtx istotnie zwiększały częstość występowania tych powikłań (p odpowiednio: 0,7 i 0,9).

Zbiórce wyniki powyższej analizy przedstawiono w tabeli 28 i na rysunku 34.

Tabela 28. Częstość występowania bliskich toksyczności i powikłań terapii HD-Mtx w zależności od dawki (2 g/m² lub 3 g/m²) i sprawności eliminacji leku

Rodzaj bliskiej toksyczności	Eliminacja Mtx	Dawka Mtx 2 g/m ² (n= 276 cykli)		Dawka Mtx 3 g/m ² (n= 553 cykle)		Istotność statystyczna częstości toksyczności między dawkami (niezależnie od sprawności eliminacji)
		% cykli	Istotność statystyczna (p) częstości toksyczności pod wpływem zaburzenia eliminacji HD-Mtx	% cykli	Istotność statystyczna (p) częstości toksyczności pod wpływem zaburzenia eliminacji HD-Mtx	
toksyczności wątrobowe	prawidłowa	35,3	0,116	27,9	0,336	0,024
	przedłużona	38,6		29,9		
nudności/wymioty	prawidłowa	14,2	0,024	21,1	0,0001	0,019
	przedłużona	27,3		33,0		
zakażenia	prawidłowa	10,8	0,087	17,5	0,026	0,008
	przedłużona	20,5		29,9		
zapalenie śluzówek jamy ustnej	prawidłowa	3,9	0,030	12,3	0,050	0,0003
	przedłużona	9,1		14,1		
neurotoksyczności	prawidłowa	2,2	0,417	1,1	0,113	0,690
	przedłużona	0		3,1		
biegunka	prawidłowa	5,2	0,023	4,6	0,494	0,139
	przedłużona	13,6		2,1		
toksyczności skórne	prawidłowa	0,9	0,050	3,3	0,069	0,062
	przedłużona	4,5		6,2		
toksyczności nerkowe	prawidłowa	0	0,025	0	0,003	0,749
	przedłużona	4,5		3,1		
opóźnienie chemioterapii	prawidłowa	3,4	0,092	5,0	0,321	0,909
	przedłużona	9,1		2,1		

Rysunek 34. Najczęstsze bliskie toksyczności i powikłania terapii HD-Mtx z zaburzoną eliminacją leku: analiza 44 cykli z dawką 2g/m² i 97 cykli z dawką 3 g/m²



6. Polimorfizm genowy 677C>T MTHFR a częstość i nasilenie bliskich toksyczności w przebiegu terapii HD-Mtx

6.1. Ocena porównawcza częstości ostrych toksyczności leczenia HD-Mtx, w zależności od polimorfizmu genowego 677C>T MTHFR pacjentów

Celem odpowiedzi na pytanie, czy nosicielstwo któregoś z polimorficznych wariantów 677C>T genu MTHFR (a w szczególności allele T) korelowało z częstszym występowaniem ostrych toksyczności narządowych lub klinicznych w przebiegu leczenia HD-Mtx, przeanalizowano łącznie 617 cykli z oboma zastosowanymi dawkami.

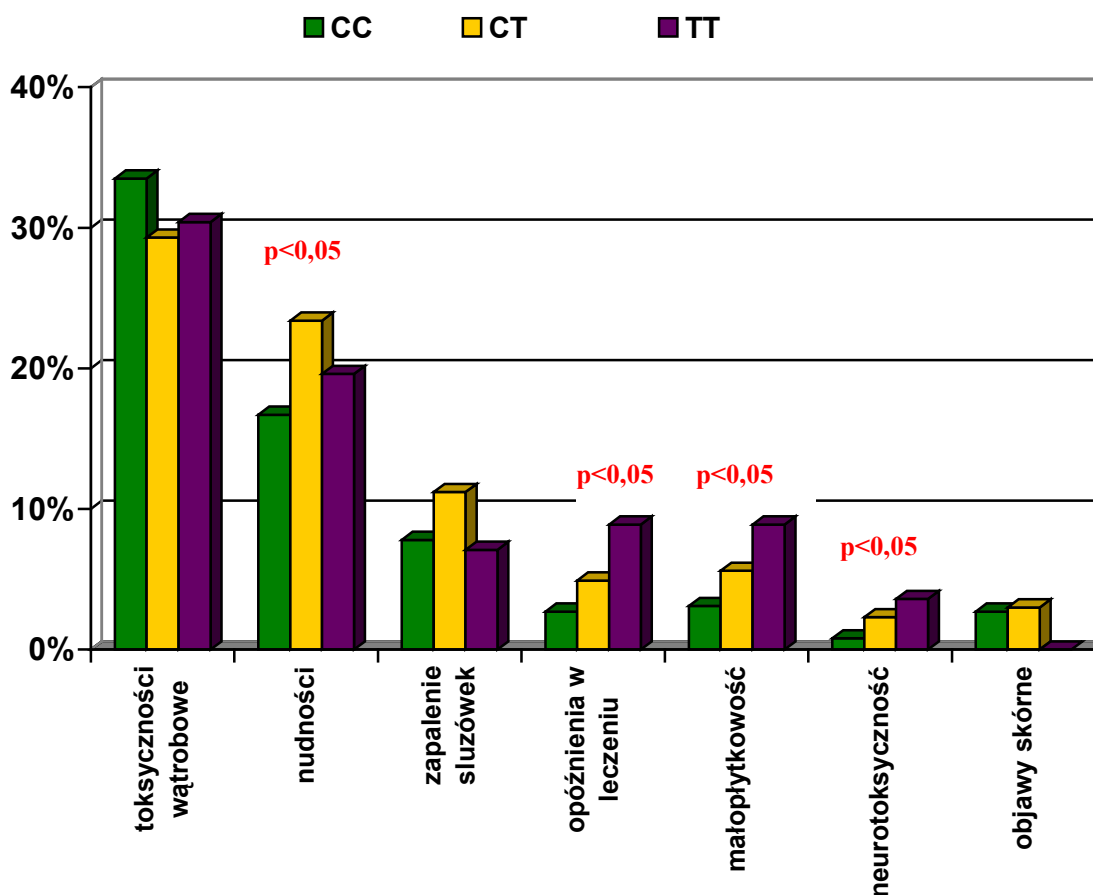
Nie stwierdzono istotnej korelacji najczęściej obserwowanych toksyczności, takich jak: nudności, laboratoryjnych cech dysfunkcji wątroby (podwyższone transaminazy, bilirubina, obniżone białko całkowite i albuminy) i zapaleń śluzówek jamy ustnej z którymkolwiek z genotypów, za wyjątkiem nudności - częstszych u heterozygot CT ($p=0,03$). W przypadku nosicieli dwu alleli T nie obserwowano jednak częstszego występowania nudności.

W odniesieniu do rzadziej stwierdzanych toksyczności, tylko ostre powikłania ze strony OUN, małopłytkowość i opóźnienia w planowym toku chemioterapii występowały statystycznie istotnie częściej u homozygot TT (wartość p odpowiednio: 0,05; 0,03 i 0,01), w porównaniu z nosicielami wariantu „dzikiego” CC. Zbiórce wyniki analizy, dotyczącej wpływu nosicielstwa jednego lub dwu alleli T polimorfizmu 677C>T genu MTHFR na częstość bliskich toksyczności i powikłań terapii HD-Mtx przedstawiono w tabeli 29 i na rysunku 35.

Tabela 29. Częstość bliskich toksyczności w przebiegu terapii HD-Mtx (2 g/m² i 3 g/m²) w zależności od nosicielstwa allele T polimorfizmu 677 C>T genu MTHFR: analiza 617 cykli

Rodzaj powikłania	% cykli powikłanych daną toksycznością u nosicieli trzech wariantów polimorfizmu 677 C>T genu MTHFR oraz różnicująca wartość p		
	CT (n=304 cykli)	CC (n=257cykli)	TT (n=56 cykli)
toksyczności wątrobowe	29,3%	33,5%	30,4%
	p = 0,143		p = 0,328
nudności	23,4%	16,7%	19,6%
	p = 0,025		p = 0,301
zakażenia	14,5%	18,3%	17,9%
	p = 0,112		p = 0,472
zapalenie śluzówek jamy ustnej	11,2%	7,8%	7,1%
	p = 0,087		p = 0,429
biegunka	5,6%	5,4%	1,8%
	p = 0,459		p = 0,126
objawy toksyczne ze strony OUN	2,3%	0,8%	3,6%
	p = 0,124		p = 0,05
objawy skórne	3,0%	2,7%	0,0%
	p = 0,416		p = 0,107
niedokrwistość (1. – 3. stopień)	3,9%	5,4%	7,1%
	p = 0,199		p = 0,306
leukopenia (1. – 4. stopień)	7,6%	6,2%	7,1%
	p = 0,258		p = 0,401
małopłytkowość (1. – 4. stopień)	5,6%	3,1%	8,9%
	p = 0,077		p = 0,025
toksyczności nerkowe	0,7%	0,4%	1,8%
	p = 0,343		p = 0,128
opóźnienie w leczeniu	4,9%	2,7%	8,9%
	p = 0,090		p = 0,014

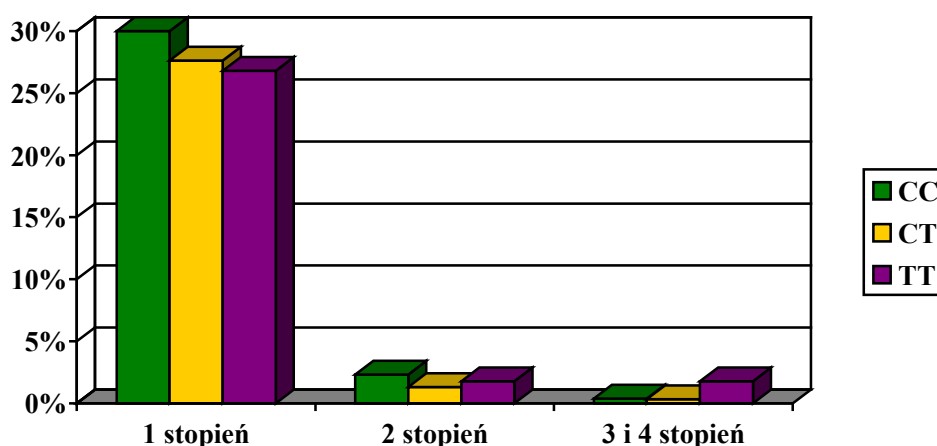
Rysunek 35. Częstość bliskich toksyczności w przebiegu terapii HD-Mtx (2 g/m^2 i 3 g/m^2) w zależności od polimorfizmu 677C>T MTHFR leczonych: analiza 617 cykli



6.2. Ocena porównawcza stopnia nasilenia bliskich toksyczności terapii HD-Mtx w zależności od polimorfizmu 677C>T genu MTHFR

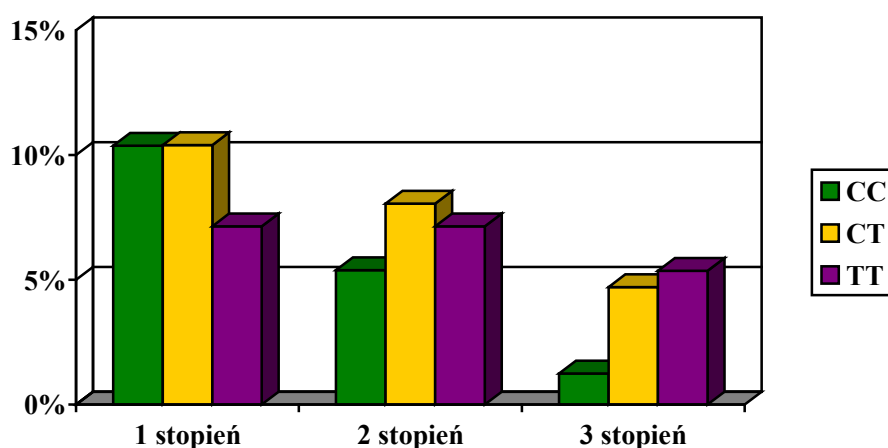
Częstość występowania najczęściej obserwowanej w przebiegu terapii HD-Mtx toksyczności, dysfunkcji wątroby, była porównywalna w odniesieniu do wszystkich trzech wariantów polimorfizmu 677C>T genu MTHFR (tabela 29). Najczęściej powikłania wątrobowe były oceniane jako 1. stopień toksyczności (rysunek 36) i były odwracalne. Toksyczności w 3. i 4. stopniu występowały bardzo rzadko, ale czterokrotnie częściej były odnotowane u nosicieli wariantu TT, w porównaniu z homozygotami CC. Różnice między porównywanymi grupami nie były jednak istotne statystycznie ($p=0,487$).

Rysunek 36. Stopień nasilenia bliskich toksyczności wątrobowych w skali NCI-CTC a polimorfizm 677C>T genu MTHFR: analiza 617 cykli



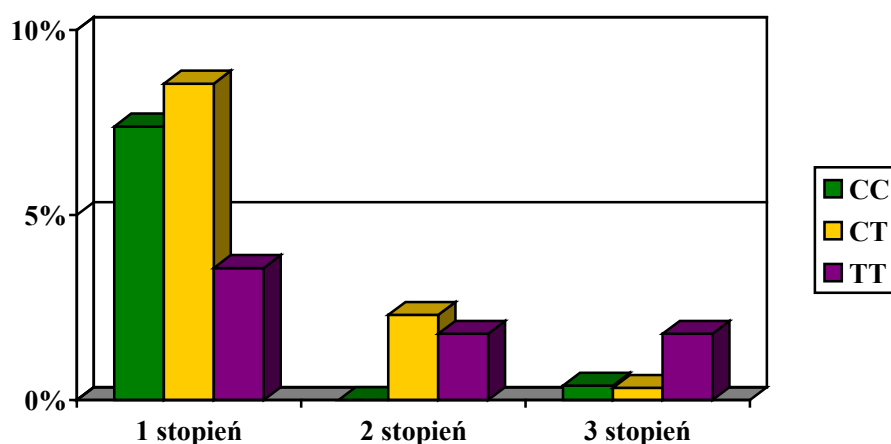
W przypadku nudności, najczęstszej z obserwowanych klinicznych bliskich toksyczności, częstsze występowanie tego powikłania w stopniu 2. i 3. w skali NCI-CTC stwierdzono również u dzieci będących nosicielami allelu T genu MTHFR (rysunek 37), ale różnice nie były istotne statystycznie ($p=0,196$).

Rysunek 37. Nasilenie nudności w skali NCI-CTC a polimorfizm 677 C>T genu MTHFR: analiza 617 cykli



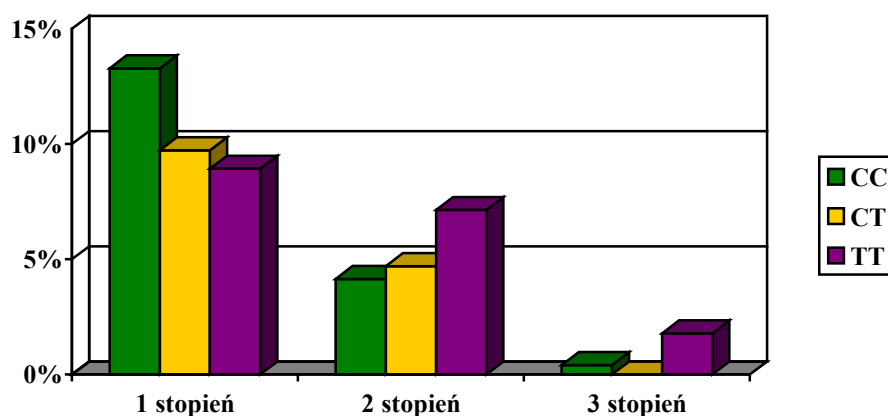
Zapalenie śluzówek jamy ustnej odnotowano z porównywalną częstością u nosicieli trzech polimorficznych wariantów genu MTHFR (rysunek 38), ale wyższe stopnie tej toksyczności, ocenione w skali NCI-CTC w 2. i 3. stopniu, obserwowano częściej u nosicieli allela T. Różnice pomiędzy grupami nie były jednak istotne ($p=0,136$).

Rysunek 38. Stopień nasilenia zapalenia śluzówek w skali NCI-CTC a polimorfizm 677 C>T genu MTHFR: analiza 617 cykli



Częstość występowania zakażeń była także podobna we wszystkich trzech wariantach polimorfizmu 677 C>T genu MTHFR leczonych dzieci (rysunek 39). Obecność allele C korelowała z wyższą częstością zakażeń górnych dróg oddechowych o lekkim przebiegu (1. stopień wg NCI-CTC), natomiast allele T z poważniejszymi powikłaniami, takimi jak zapalenie płuc (2. stopień) lub, rzadkie na tym etapie leczenia, uogólnione zakażenia (3. stopień). Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic między porównywanymi genotypami w ciężkości przebiegu zakażeń ($p=0,361$).

Rysunek 39. Stopień nasilenia zakażeń w skali NCI-CTC a polimorfizm 677C>T genu MTHFR: analiza 617 cykli



Uwagę zwraca także fakt, iż oba przypadki ostrej niewydolności nerek, obserwowanej od drugiej doby pierwszego cyklu, najcięższe odnotowane w materiale własnym powikłanie w przebiegu terapii HD-Mtx, wymagające m.in.dializoterapii, wystąpiły u nosicieli wariantu CT i TT polimorfizmu 677C>T MTHFR. W obu sytuacjach były to dziewczynki, a cykлом nie towarzyszyły żadne znane obciążające okoliczności, jak np. jednoczesne stosowanie leków zaburzających eliminację Mtx, obecność przebiegów do jam ciała, zakażenia itp.

7. Czynniki wpływające na bliskie toksyczności terapii HD-Mtx

7.1. Dawka Mtx a bliskie toksyczności – analiza w odniesieniu do leczonych

Porównano częstość obserwowanych bliskich toksyczności terapii HD-Mtx u 72 dzieci, leczonych dawką 2 g/m² leku i 146 pacjentów, u których zastosowano Mtx w dawce 3 g/m². Najczęstszą bliską toksycznością narządową było zaburzenie funkcji wątroby, które dotyczyło, niezależnie od zastosowanej dawki leku ponad 60% dzieci.

Nieco rzadsze, nudności i wymioty, stwierdzane u około 50% leczonych, także nie zależały od wysokości dawki Mtx.

Wyższa dawka leku (3 g/m²) była związana z istotnie częstszym występowaniem jedynie dwu rodzajów powikłań: zakażeń (55% dzieci, wobec 39% leczonych Mtx w dawce 2 g/m²) i odczynów zapalnych śluzówek jamy ustnej (32% wobec 15% pacjentów, otrzymujących niższą dawkę leku).

Częstość innych, rzadszych bliskich toksyczności terapii HD-Mtx, takich jak: niepożądanych objawów ze strony OUN, nerek, śluzówek przewodu pokarmowego, skóry oraz opóźnień w planowej terapii – była porównywalna i dotyczyła niewielkiego odsetka leczonych (tabela 30).

Tabela 30. Częstość występowania bliskich toksyczności terapii HD-Mtx, zależnie od dawki leku, a niezależnie od sprawności eliminacji: analiza w odniesieniu do 72 i 146 dzieci leczonych Mtx odpowiednio w dawce: 2 g/m² i 3 g/m²

Rodzaj toksyczności	Odsetek dzieci z obserwowanym powikłaniem, zależnie od dawki Mtx		Wartość p
	2 g/m ²	3 g/m ²	
toksyczności wątrobowe	63,9	61,0	0,675
nudności/wymioty	44,4	52,7	0,249
zakażenia	38,9	54,8	0,027
zapalenie śluzówek	15,3	32,2	0,008
biegunka	13,9	12,3	0,746
toksyczności skórne	5,6	9,6	0,309
neurotoksyczności	5,6	4,8	0,809
toksyczności nerkowe	2,8	2,1	0,737
opóźnienie chemioterapii	15,3	16,4	0,826

7.2. Kolejność cyklu a bliskie toksyczności terapii HD-Mtx

Celem odpowiedzi na pytanie, czy kolejność cyklu miała istotny wpływ na nasilenie bliskich toksyczności, występujących w przebiegu leczenia HD-Mtx, zanalizowano łącznie 760 cykli z Mtx (w tym 260 i 500 w dawce odpowiednio: 2 g/m^2 i 3 g/m^2), zrealizowanych u 190 dzieci.

Badaniem objęto jedynie tych pacjentów, u których przeprowadzono wszystkie cztery zaplanowane cykle. Oceniono częstość występowania danej toksyczności, każdorazowo w 190 chemioterapiach, przeprowadzanych jako pierwsze, drugie, trzecie, bądź czwarte z kolei cykle.

Istotne różnice stwierdzono w częstości występowania: zapaleń śluzówek, zakażeń i opóźnień w planowym leczeniu. Odczyny zapalne śluzówek przewodu pokarmowego wystąpiły istotnie częściej ($p=0,02$) w pierwszych z czterech zrealizowanych chemioterapiach. Natomiast po ostatnim cyklu istotnie rzadziej stwierdzano zakażenia ($p=0,001$) i opóźnienia w kontynuowaniu planowego leczenia ($p=0,003$). Częstość występowania wszystkich innych bliskich toksyczności chemioterapii HD-Mtx nie zależała od kolejności cyklu.

Na podstawie dokonanej analizy nie można jednoznacznie wskazać, który z kolejno przeprowadzanych cykli był obciążony największym ryzykiem wystąpienia bliskich niepożądanych skutków terapii HD-Mtx. Wydaje się jednak, że pierwsza z czterech realizowanych chemioterapii wiązała się z większym ryzykiem wystąpienia bliskich powikłań, a przede wszystkim zmian zapalnych ze strony śluzówki przewodu pokarmowego (tabela 31).

Tabela 31. Częstość występowania bliskich toksyczności a kolejność cyklu: łączna analiza 760 chemioterapii z Mtx w obu stosowanych dawkach (2 g/m² i 3 g/m²)

Rodzaj toksyczności	Liczba, % cykli bez (0) z (1) toksycznością		Kolejność cyklu				Razem	Wartość p
			1 (n=190)	2 (n=190)	3 (n=190)	4 (n=190)		
nudności/wymioty	0	n	145	162	149	147	603	0,128
		%	24,05	26,87	24,71	24,38	100%	
	1	n	45	28	41	43	157	
		%	28,66	17,83	26,11	27,39	100%	
zapalenie śluzówek	0	n	160	170	180	178	688	0,002
		%	23,26	24,71	26,16	25,87	100%	
	1	n	30	20	10	12	72	
		%	41,67	27,78	13,89	16,67	100%	
biegunka	0	n	178	180	179	184	721	0,523
		%	24,69	24,97	24,83	25,52	100%	
	1	n	12	10	11	6	39	
		%	30,77	25,64	28,21	15,38	100%	
toksyczności skórne	0	n	182	184	184	187	737	0,515
		%	24,69	24,97	24,97	25,37	100%	
	1	n	8	6	6	3	23	
		%	34,78	26,09	26,09	13,04	100%	
zakażenia	0	n	150	148	155	178	632	0,001
		%	23,73	23,42	24,53	28,32	100%	
	1	n	40	42	35	11	128	
		%	31,25	32,81	27,34	8,59	100%	
opóźnienie	0	n	182	179	176	190	727	0,003
		%	25,03	24,62	24,21	26,13	100%	
	1	n	8	11	14	0	33	
		%	24,24	33,33	42,42	0	100	
toksyczności wątrobowe	0	n	136	122	136	127	521	0,316
		%	26,10	23,42	26,10	24,38	100	
	1	n	54	68	54	63	239	
		%	22,59	28,45	22,59	26,36	100	
toksyczności nerkowe	0	n	189	190	189	190	758	0,571
		%	24,93	25,07	24,93	25,07	100	
	1	n	1	0	1	0	2	
		%	50	0	50	0	100	
neurotoksyczność	0	n	185	186	188	188	747	0,549
		%	24,77	24,9	25,17	25,17	100	
	1	n	5	4	2	2	13	
		%	38,46	30,77	15,38	15,38	100	

7.3. Analiza zbiorcza istotności czynników wpływających na wystąpienie co najmniej dwu bliskich toksyczności terapii HD-Mtx

W celu wyłonienia czynników, istotnie wpływających na nasilenie bliskich toksyczności terapii HD-Mtx do modelu wieloczynnikowej regresji logistycznej wybrano: wysokość dawki leku, wiek, BMI i polimorfizm genowy 677C>T MTHFR leczonych oraz stężenie Mtx w 48. godzinie od rozpoczęcia cyklu i stałą eliminacji późnej fazy (K_{el} 36.- 48.). Wszystkie z powyższych parametrów są wskazywane w wielu badaniach różnych autorów, jako związane z występowaniem, lub nasileniem wczesnych objawów toksycznych chemioterapii HD-Mtx (5, 9, 11, 17, 18, 21, 26, 31, 38, 39, 46, 54, 60, 71, 81, 87, 89, 93, 130, 153, 162, 168, 169, 172, 175, 178, 183, 214, 215, 222, 223, 234, 236, 245, 258, 261, 262, 263, 264, 269).

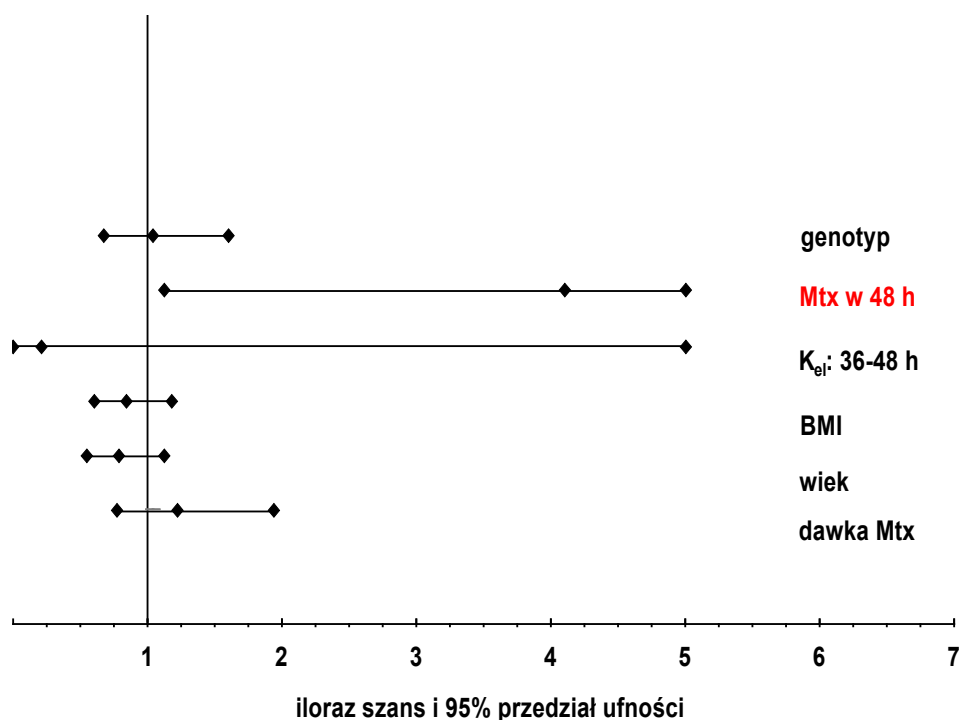
Dla większego zróżnicowania porównywanych grup, analizą objęto 205 chemioterapii, nie powikłanych żadnymi objawami bliskiej toksyczności leku oraz 161 cykli, po których obserwowano co najmniej dwa ich rodzaje. W badaniu pominięto cykle, po których obserwowano tylko jeden rodzaj powikłań. Z uwagi na małe liczebności ekstremalnych grup, podobnie jak wcześniej (rozdział 4) wyszczególniono trzy grupy dzieci: nadmiernie otyłych ($BMI > 75$ percentyla), prawidłowo odżywionych i nadmiernie szczupłych ($BMI < 25$ percentyla). Zbiorcze wyniki analizy przedstawiono w tabeli 32 i na rysunku 40.

Tabela 32. Wyniki analizy metodą regresji logistycznej, w celu oceny prawdopodobieństwa wystąpienia co najmniej dwu różnych toksyczności w cyklu ($\chi^2=14,9$; $p=0,021$)

Oceniane parametry	Współczynnik regresji (Beta)	Wartość p
dawka Mtx: 2 g/m² i 3 g/m²	0,204	0,381
wiek	-0,238	0,186
BMI	-0,164	0,330
K_{el} 36.- 48.	-1,586	0,551
stężenie Mtx w 48. h	1,413	0,033
genotyp (CC, inny)	0,038	0,864
stała	-0,283	0,547

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej wykazano, że jedynie stężenie Mtx w surowicy w 48. godzinie cyklu miała istotny statystycznie wpływ na wystąpienie co najmniej dwu bliskich powikłań po cyklu z HD-Mtx. Im wyższa była wartość stężenia cytostatyku w surowicy, tym ryzyko wystąpienia co najmniej dwu różnych toksyczności po cyklu było wyższe (rysunek 40).

Rysunek 40. Iloraz szans i przedział ufności dla poszczególnych parametrów, wpływających na wystąpienie co najmniej dwu różnych toksyczności w cyklu (2 g/m² i 3 g/m² łącznie)



Zależność prawdopodobieństwa wystąpienia co najmniej dwu ostrych toksyczności terapii HD-Mtx od wartości stężenia leku w 48. godzinie jego wydalania, przedstawia rysunek 41.

Wyliczona dla modelu regresji logistycznej wartość progowa stężenia Mtx w surowicy w 48. godzinie cyklu, powyżej której gwałtownie wzrasta ryzyko wystąpienia co najmniej dwu różnych bliskich toksyczności w cyklu, wynosi 0,3 µmol/l (tabela 33).

Przy stężeniu Mtx w surowicy w 48. godzinie cyklu około 4 µmol/l, prawdopodobieństwo wystąpienia co najmniej dwu różnych bliskich toksyczności po cyklu jest bliskie 1 (tj. 100%).

Rysunek 41. Krzywa logistyczna prawdopodobieństwa wystąpienia co najmniej dwu różnych bliskich toksyczności terapii HD-Mtx w zależności od stężenia leku w 48. godzinie

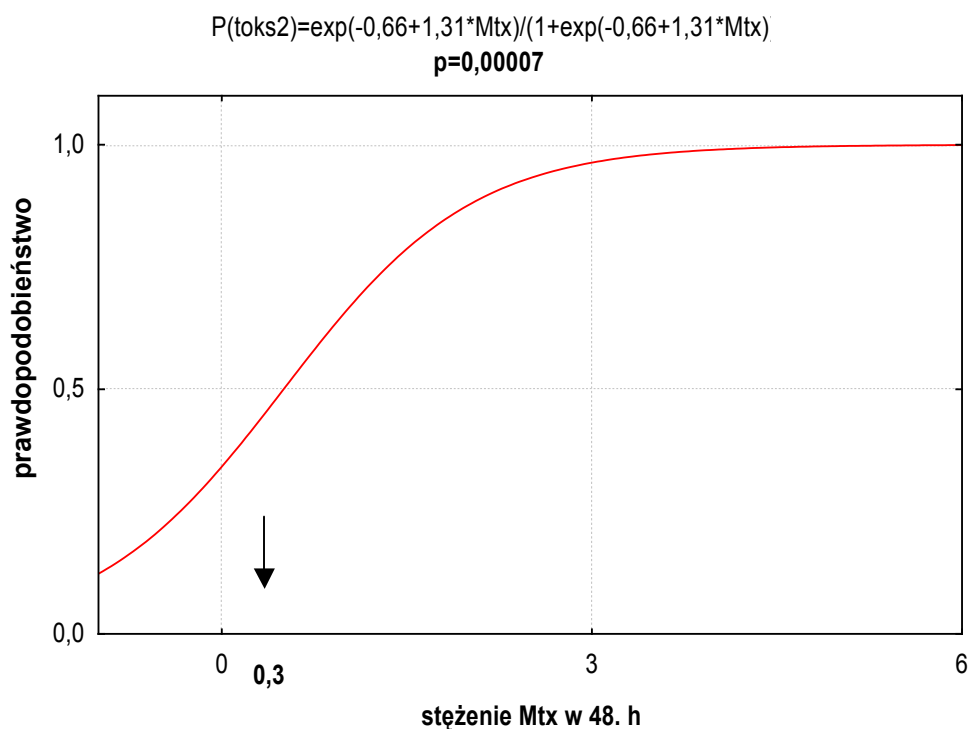


Tabela 33. Częstość występowania co najmniej dwóch różnych bliskich toksyczności po cyklu w zależności od wartości progowej stężenia Mtx w surowicy w 48. godzinie: analiza 525 cykli

Stężenie Mtx w 48.	Co najwyżej jeden rodzaj toksyczności		Co najmniej dwie różne toksyczności		Razem		Wartość p
	n	%	n	%	n	%	
< 0,3	202	63,7	115	36,3	317	100,0	0,0001
≥ 0,3	93	44,7	115	55,3	208	100,0	
χ² = 18,44							

Tabela 34. Iloraz szans i przedział ufności dla wartości progowej stężenia Mtx w surowicy w 48. godzinie cyklu powyżej lub równego 0,3 µmol/l

Zmienna	Współczynnik beta	Iloraz szans	Przedział ufności dla ilorazu szans (0,95)	Wartość p
Mtx w 48.h ≥ 0,3 µmol/l stała	0,78 -0,56	2,17 0,57	[1,52-3,11] [0,45-0,72]	0,0001 0,0001

V. OMÓWIENIE I DISKUSJA

1. Znaczenie HD-Mtx w leczeniu białaczki

Metotreksat, jeden z najczęściej stosowanych w onkologii antymetabolitów, jako jedyny dotąd znany cytostatyk, może być stosowany systemowo w szerokim zakresie dawek (od 10 mg/m² do 33,6 g/m²), dzięki istnieniu swoistego antidotum, leukoworyny (kwas folinowy) i monitorowaniu stężeń leku we krwi w trakcie jego eliminacji. Od wyników tych pomiarów oraz dynamiki ich zmian w określonych, na podstawie wcześniejszych badań, przedziałach czasowych, w jakich lek winien być wydalony do bezpiecznych granic, zależy dawkowanie leukoworyny. Sól wapniowa kwasu foliowego, metabolizowana do 5-metyl-tetrahydrofolianu, dostarcza grupy jednowęglowe do syntezy tymidyny (z pominięciem reduktazy kwasu 2-OH-foliowego), wznowia przerwana przez Mtx syntezę puryn i odwraca na poziomie komórkowym toksyczne działanie cytostatyku. Leukoworyna hamuje ponadto syntezę bardziej aktywnych niż sam lek poliglutaminianów Mtx, a także konkuruje z tym cytostatykiem w transporcie przez błony komórkowe oraz w powinowactwie do MTHFR i zwiększa wypływ Mtx z komórek. Badania eksperymentalne na zwierzętach, hodowlach ludzkich limfoblastów i komórkach szpiku, dotyczące pierwotnie aminopteryny, a później mniej od niej toksycznego metotreksatu, doprowadziły do wypracowania standardów dawkowania antidotum, zarówno w przypadku prawidłowej, jak i zaburzonej eliminacji Mtx. Po wielogodzinnych wlewach HD-Mtx stosowanie leukoworyny rozpoczyna się z reguły między 12. a 18. godziną od zakończenia podaży tego cytostatyku. W przypadku przedłużonego wydalania Mtx, w celu zneutralizowania jego toksyczności *rescue* podawane jest w wysokich dawkach, tak by uzyskać stężenia przekraczające nawet 10-krotnie stężenia cytostatyku (11, 21, 36, 57, 87, 129, 143, 196). Opinie na temat bezpieczeństwa takiej eskalacji folinianu wapnia nie są jednoznaczne. Niektórzy badacze uważają, że jego nadmierna podaż może osłabiać efekt antyleukemiczny Mtx, co stanowi ważny argument dla zwolenników indywidualizacji dawkowania obu leków i podkreśla znaczenie badań nad farmakokinetyką Mtx w każdym cyklu z udziałem tego cytostatyku (21, 51, 57, 65, 88, 129, 212, 223, 234, 245, 257). Wyniki wielu badań wskazują na to, że farmakokinetyka kwasu folinowego, podobnie jak Mtx, jest zmienna w różnych cyklach, nawet u tego samego pacjenta. Wagę tego problemu dobrze oddają wyniki analiz, przedstawionych w dwu poniższych doniesieniach.

Badania grupy szwedzkiej, którymi objęto 445 dzieci leczonych Mtx w dawkach 5 g/m² i 8 g/m² wykazały, że eskalowane dawki kwasu folinowego, jakie stosowano z powodu utrzymujących się wysokich stężeń i zaburzenia eliminacji Mtx, korelowały ze zwiększonym ryzykiem wznowy ALL (212). W innej pracy, dotyczącej 40 dorosłych, leczonych Mtx w dawkach 800 - 1350

mg/m², podawanym w 18-godzinny wlew, na podstawie stężeń leku oznaczonych w 18. i 24. godzinie cyklu wyliczano jego klirens, a dawki leukoworyny dostosowywano do przewidywanego stężenia Mtx w 36. godzinie jego wydalania. W ten sposób, wśród 118 zrealizowanych chemioterapii aż w 110 zmniejszono dawki antidotum, z powodu szybkiego klirensu leku (223). Osobny problem dotyczy kwestii optymalnej postaci leukoworyny: rutynowo stosowanej mieszaniny racemicznej dwu izomerów, czy jej aktywnego składnika, izomeru L (21, 24, 64, 77, 234)?

Wysokie dawki Mtx wprowadzono do leczenia ALL w celu zastąpienia profilaktycznego napromieniania mózgowia, gdyż wieloletnie obserwacje pacjentów dostarczyły alarmujące dowody na poważne późne następstwa radioterapii OUN, m.in: występowanie wtórnych nowotworów mózgowia, zaburzeń endokrynnych, niedoborów wzrostu, upośledzenia funkcji intelektualnych (16, 27, 59, 86, 92, 118, 127, 145, 171, 247). Od wielu lat prowadzone są badania nad skutecznością Mtx, stosowanego dożylnie w różnie wysokich dawkach (ponad 1000 mg/m²) w prewencji nawrotów białaczki w OUN (1, 6, 11, 15, 21, 28, 37, 41, 55, 67, 78, 84, 96, 103, 132, 133, 139, 143, 144, 145, 149, 151, 202, 204, 214, 234, 235, 245). W licznych pracach wykazano wyższą skuteczność tego cytostatyku stosowanego dożylnie w wysokich dawkach, niż częściej powtarzanych niskich (37, 55, 145, 151, 202, 204, 231). Mtx podany w dawce wyższej niż 1000 mg/m² może osiągać w płynie mózgowo-rdzeniowym i jądrach (tzw. sanktuariach choroby) odpowiednie stężenia cytotoksyczne, pozwalające na zniszczenie komórek białaczkowych. Lek ten, zastosowany w wysokiej dawce, po wysyceniu ATP-zależnego transportu przez błonowego, przenika do komórek drogą biernej dyfuzji, zależnej wyłącznie od wysokości stężenia Mtx we krwi. Ten mechanizm pełni kluczową rolę w przełamaniu oporności blastów białaczkowych, zależnej od aktywności rodziny białek MRP lub amplifikacji genu MTHFR, gdyż prowadzi do znacznie większego nagromadzenia poliglutaminianów Mtx w komórce, odpowiedzialnych w znacznej mierze za efekt antyleukemiczny (11, 18, 21, 36, 124, 133, 234, 245). Ponadto, cytostatyk podany w wysokiej dawce systemowej, w większym stopniu przełamuje barierę krew-mózg i krew-płyn mózgowo-rdzeniowy. Stężenia leku w płynie mózgowo-rdzeniowym, jak to wykazano w licznych badaniach, dobrze korelują z jego stężeniami w surowicy krwi (11, 18, 21, 36, 95, 98, 139, 205, 245, 258). W badaniu pochodzącym z ośrodka szwedzkiego, dotyczącym 353 dzieci z ALL, wykazano, że stężenia Mtx w płynie mózgowo-rdzeniowym są istotnie statystycznie zależne od stężenia stacjonarnego leku w surowicy i od AUC, a wysokie stężenia stacjonarne i stężenia leku w płynie powyżej 1 μmol/l korelują ze znamionym spadkiem (p=0,02) ryzyka wznowy oponowej (98). Grupa francuska opublikowała podobne wyniki badania randomizowanego, w którym wykazano, że Mtx podany w dawce 0,5 g/m², w przeciwieństwie do dawki 2,5 g/m² nie zapewnił

przekroczenia progu stężenia cytotoksycznego leku w płynie mózgowo-rdzeniowym w większości ocenionych cykli (231).

Natomiast badacze amerykańskiej grupy EORTC, analizując farmakokinetykę Mtx w 193 cyklach, nie zaobserwowali istotnego związku między wysokością stężenia leku we krwi, a jego stężeniem w płynie mózgowo-rdzeniowym. Jednocześnie uznali, że dawka 5 g/m² Mtx jest wystarczająca w prewencji wznów oponowych, ponieważ tylko 5% leczonych tak pacjentów nie uzyskało stężeń cytotoksycznych leku w płynie mózgowo-rdzeniowym w co najmniej jednym cyklu (139). Natomiast Borsi, uważany powszechnie za autorytet w dziedzinie terapii HD-Mtx, twierdzi, że krytyczny próg stężenia cytotoksycznego w płynie mózgowo-rdzeniowym nie jest osiągnięty w około 22% cykli z Mtx w dawce 1 g/m², a stosowana powszechnie dawka 5 g/m² także często nie zapewnia uzyskania odpowiedniego stężenia leku, bo aż w 19% chemioterapii (21).

Wieloletnie doświadczenia licznych grup badawczych ze stosowaniem Mtx w różnie wysokich dawkach, wciąż nie pozwalają na jednoznaczną odpowiedź na pytanie o bezpieczną i skuteczną, minimalną wysokość dawki tego cytostatyku w leczeniu systemowym ALL z prekursorów limfocytów B. Wykazano natomiast, że terapia HD-Mtx, prócz zabezpieczenia OUN, zmniejsza liczbę wznów szpikowych i jądrowych oraz przyczynia się do poprawy całkowitych wyników leczenia białaczki (37, 55, 66, 84, 144, 174, 204, 245).

Pomimo ponad 50-letnich doświadczeń z leczeniem wielu nowotworów Mtx, podawanym w szerokim zakresie dawek, wciąż powraca pytanie o optymalny sposób jego stosowania, zapewniający skuteczność u wszystkich leczonych nim pacjentów (10, 11, 65, 67, 88, 134, 139, 143, 149, 165, 167, 182, 214, 221, 234, 245). Badaczom do dziś nie udało się określić, jak wysoka dawka systemowa Mtx umożliwia optymalną ochronę mózgowia i zabezpiecza przed innymi nawrotami białaczki. Wydaje się, że jednoznaczna odpowiedź na to pytanie po prostu nie jest możliwa. Optymalna dawka różni się w zależności od typu ALL (białaczka z prekursorów limfocytów B, T, hiper- i hipodiploidia), polimorfizmu wielu genów zaangażowanych w metabolizm folianów, a nawet w kolejnych cyklach przeprowadzanych u tego samego pacjenta, z uwagi na bardzo zmienną farmakokinetykę leku (14, 66, 88, 169, 170, 186, 190, 201, 269).

W wyniku badań eksperymentalnych wiadomo, że około 1/30 leku obecnego we krwi przenika przez barierę mózgową, a krytyczne stężenie cytotoksyczne w płynie mózgowo-rdzeniowym wynosi 1 μmol/l (10⁻⁶M). Seria badań klinicznych, prowadzonych w St Jude Children's Hospital w Memphis dowiodła, że minimalne skuteczne stężenie Mtx we krwi winno wynosić co najmniej 16,0 μmol/l (1, 11, 21, 36, 65, 66, 67).

Wobec wielu wątpliwości, dotyczących optymalnej wysokości dawki Mtx, powstają następujące pytania: czy nie należałoby, monitorując wystandaryzowaną metodą stężenia stacjonarne leku, indywidualizować jego dawkę w każdym cyklu i czy dysponujemy jeszcze innymi metodami wglądu w farmakokinetkę leku?

W dalszej części pracy podjęto próbę odniesienia się do tych zagadnień.

2. Metody oceny farmakokinetyki Mtx w terapii systemowej wysokimi dawkami leku

W trakcie wielogodzinnych wlewów HD-Mtx stężenie cytostatyku we krwi stopniowo się zwiększa, aż do osiągnięcia stanu równowagi pomiędzy procesami podaży i równoczesnej eliminacji leku. Taki stan, nazywany stacjonarnym, jest osiągany po czasie odpowiadającym 4-5 okresom biologicznego półtrwania leku. Od tej pory stężenie cytostatyku we krwi pozostaje niezmienione, aż do końca jego wlewu (11, 18, 21, 36, 47, 57, 58, 82, 109). W przypadku 24-godzinnej podaży HD-Mtx, wysokość stężenia stacjonarnego w surowicy określa pomiar dokonywany w próbce krwi, pobranej zwyczajowo w chwili zakończenia dobowego wlewu.

Ponieważ od wysokości uzyskiwanych stężeń Mtx zależy dawkowanie leukoworyny, niezmiernie ważna jest wiarygodność dokonywanych oznaczeń. Najczęściej używane w praktyce klinicznej, z uwagi na ich czułość, dokładność i szybkość są metody immunochemiczne, w tym immunofluorescencyjna, lub immunoenzymatyczna (EMIT), która była zastosowana także w obecnie przedstawianym badaniu. Znacznie bardziej skomplikowane i wymagające większego nakładu czasu są metody chromatografii cieczowej i spektroskopii masowej, rezerwowane zwykle do badań naukowych (8, 31, 54, 64, 82, 178, 195, 205, 223).

Argumentów za niepodważalną przewagą metody chromatograficznej nad innymi sposobami oznaczeń stężeń Mtx dostarcza m.in. praca z renomowanego ośrodka szwedzkiego. Porównano wyniki oznaczeń stężeń leku w surowicy u 13 dzieci z ALL, leczonych dawkami 5 g/m^2 - 8 g/m^2 , dokonywane równocześnie pięcioma sposobami. Rezultaty, uzyskane czterema różnymi niechromatograficznymi metodami, tylko w 50% dobrze korelowały z oznaczeniami wykonanymi techniką chromatografii (63).

W innym badaniu wykazano, że metoda immunoenzymatyczna (EMIT) w porównaniu z chromatografią, daje zafałszowane wyniki stężeń Mtx, wynikające z obecności w surowicy metabolitu leku (7-OH-Mtx). Co więcej, fałszywie wysokie oznaczenia decydowały o podawaniu pacjentom nadmiernych dawek leukoworyny (72).

W związku z tym powstają pytania, czy oznaczenia stężeń metotreksatu, dokonywane rutynowo metodami niechromatograficznymi są wystarczająco czułym i swoistym narzędziem w

monitorowaniu terapii z zastosowaniem HD-Mtx i czy nie należałoby wesprzeć się innym instrumentem, w celu precyzyjniejszej oceny zmiennej w każdym cyklu farmakokinetyki leku?

Ponieważ farmakokinetykę leku, poza jego stężeniem w surowicy dobrze charakteryzującą: półokres trwania ($T_{1/2}$), pole pod krzywą zmian stężeń leku w surowicy w czasie (AUC) i klirens leku, w licznych badaniach klinicznych próbowano na nich opierać decyzje terapeutyczne, dotyczące ostatecznej dawki Mtx i leukoworyny.

W jednej z prac, dotyczącej realizacji 105 dobowych wlewów HD-Mtx u 24 dzieci z ALL, wyliczana na podstawie stężeń leku w 1. i 6. godzinie cyklu wartość stężenia stacjonarnego była podstawą modyfikacji podawanej dawki aż u 71% pacjentów. Autorzy odnotowali ponad 4-krotną zmienność klirensu leku pomiędzy poszczególnymi cyklami i blisko 3-krotną w poszczególnych cyklach u tego samego chorego (88).

W badaniach nad niskimi dawkami Mtx, stosowanymi w leczeniu łuszcycy u dorosłych, wykazano znaczący związek między osiąganymi stężeniami stacjonarnymi leku, a efektem terapeutycznym. Stwierdzono znaczne różnice w farmakokinetyce leku między poszczególnymi pacjentami, ale nie odnotowano istotnych wahań tych stężeń w kolejnych cyklach u tego samego chorego. Autorzy opracowania postulowali, bazując na tych obserwacjach, indywidualizację dawek Mtx, w oparciu o AUC oznaczane u danego pacjenta w pierwszym, testowym cyklu (33).

W jednym z opracowań, dotyczącym terapii HD-Mtx podano istotne wnioski z badania randomizowanego, w którym wzięło udział 71 dzieci ze złośliwym mięsakiem kostnym.

Pacjentom podawano lek w dawkach wyliczanych standardowo, w oparciu o aktualne pomiary antropometryczne, lub zależnie od jego farmakokinetyki w danym cyklu. Dawki indywidualizowane były nie tylko wyższe, ale pozwalały osiągać większe AUC. Co więcej, nie narażając chorego na nasilone bliskie toksyczności, zapewniały znacząco lepszą odpowiedź histologiczną oraz wyższe 5-letnie DFS (51).

Wiliam Evans, jeden z prekursorów idei indywidualizacji leczenia cytostatykami, po to aby dzieci o szybszym klirensie leku nie były narażone na niedostateczną systemową ekspozycję na cytostatyki, opublikował ważne wyniki badania randomizowanego, którym objęto 182 dzieci w okresie konsolidacji remisji ALL. Jedną grupę leczono standardowo wyliczanymi dawkami trzech cytostatyków, w tym Mtx w dawce $1,5 \text{ g/m}^2$, a w drugiej dawki dobierano indywidualnie, w zależności od aktualnego klirensu leku, tak by AUC odpowiadało 50 - 90% średnich stężeń, uzyskiwanych w pierwszej grupie leczonych. Klirens Mtx wyliczano, zgodnie z matematycznym algorytmem Bayesa w oparciu o stężenia leku w surowicy w 1. i 6. godzinie eliminacji. Dawkę Mtx eskalowano do prawie 2 g/m^2 , a różnice dawkowania były istotne statystycznie dla wszystkich trzech cytostatyków. Tylko w 7,6% cykli, w których dawkę dobierano

indywidualnie, uzyskano niższą niż zamierzano systemową ekspozycję na Mtx. Natomiast w grupie leczonej w sposób klasyczny, w 60% cykli obciążenie lekiem było niewystarczające. Bliskie toksyczności obu grup były porównywalne, a odległe wyniki (5-letni EFS) istotnie lepsze w grupie leczonej w sposób zindywidualizowany (67).

Nieco kontrowersyjna koncepcja szacowania przewidywanego stężenia leku w surowicy na podstawie dwu wcześniejszych pomiarów, oparta na metodzie Bayesa (matematyka żyjącego w XVI wieku), przedstawiana w wielu doniesieniach, pozwala nie tylko ograniczyć liczbę dokonywanych pomiarów stężeń Mtx w surowicy, ale i antycypować pewne decyzje terapeutyczne, w tym tak istotną jak dawkowanie leukoworyny (8, 10, 68, 153, 167, 223). W badaniu, w którym u 23 dzieci z ALL zrealizowano 80 cykli z Mtx w dawce 8 g/m^2 , na podstawie analizy parametrów farmakokinetycznych tego leku, określonych w 60 wstępnych i w 20 kolejnych cyklach, posługując się metodą Bayesa przewidywano czas konieczny do spadku stężeń leku poniżej $0,2 \mu\text{mol/l}$, na podstawie dwóch (24. i 48. godzina) lub tylko jednego (48. godzina) oznaczenia stężenia leku. Uzyskane wyniki, zdaniem autorów miały satysfakcjonującą precyzję, ale dokładna analiza wykazuje, że różnice między przewidywanym, a rzeczywistym czasem koniecznym do odpowiedniego obniżenia stężenia Mtx wynosiły nawet 10 godzin (153). Pomimo tego stwierdzono, że algorytm Bayesa, na podstawie indywidualnych parametrów farmakokinetyki HD-Mtx u danego pacjenta oraz danych populacyjnych umożliwia matematyczną estymację czasu, koniecznego dla wymaganej eliminacji leku u każdego pacjenta, na podstawie jednego oznaczenia - w 48. godzinie od rozpoczęcia dobowego wlewu leku. Powyższe postępowanie umożliwia redukcję liczby oznaczeń stężeń Mtx z kilku do tylko jednego. Ponadto, jak to stwierdzono w wielu analizach i co zaobserwowano także w obecnie przedstawianym badaniu, rutynowe pomiary w 24. godzinie cyklu są często obarczone błędem, wynikającym z domieszki w pobranej próbce krwi leku z końcowej fazy dobowego wlewu. Zgodnie z tą koncepcją, metoda Bayesa umożliwia redukcję oznaczeń stężeń leku i winna docelowo służyć indywidualizacji dawkowania HD-Mtx, tak by podana dawka zapewniała osiągnięcie pożądanego stężenia stacjonarnego, w kolejnym cyklu u danego chorego. W jednej z opublikowanych z końcem lat 70. prac, ten algorytm posłużył estymacji stężenia leku w przewidywanym czasie jego prawidłowej eliminacji i takiej podaży leukoworyny, by stężenia antidotum przekraczały 10-krotnie przypuszczalne stężenie cytostatyku. Autorzy wykazali, że powyższa metoda sprawdziła się w 115 na 118 cykli (223). Z kolei jedno z nowszych francuskich doniesień przedstawia dane z realizacji 231 cykli z Mtx w dawce 5 g/m^2 , podanym u 69 dzieci z ALL. Wyliczono, w modelu dwukompartментowym dane farmakokinetyczne: klirens całkowity leku, objętość dystrybucji i stałe eliminacji w 12. i 21. godzinie cyklu. Następnie, w oparciu o stężenia leku w 24. i 48. godzinie wydalania, precyzyjnie

i skutecznie wyliczano na podstawie zebranych danych i w oparciu o metodę Bayesa, czas konieczny dla uzyskania bezpiecznego stężenia leku w surowicy, pozwalającego na przerwanie podaży antidotum. Zmienność parametrów w poszczególnych cyklach u danego pacjenta nieznacznie przekraczała 13%. Satysfakcjonujące wyniki badania upoważniają, zdaniem autorów, do stosowania tej metody w przyszłości, celem optymalizacji leczenia dzieci (167). Z kolei polscy badacze, analizując farmakokinetykę 4-godzinnych wlewów różnie wysokich dawek Mtx, stosowanych w leczeniu dzieci z mięsakiem kości, stworzyli program komputerowej symulacji krzywej stężeń leku w czasie, w funkcji zastosowanej dawki, diurezy, sprawności funkcji nerek oraz wątroby pacjenta. Program miałby pozwolić na optymalizację dawkowania Mtx w kolejnych cyklach u danego leczonego (165).

Słabą stroną powyższej koncepcji jak i metody Bayesa ujawnia, jak się wydaje, empirycznie dowiedziona nieprzewidywalność farmakokinetyki HD-Mtx w kolejnym cyklu chemioterapii u danego chorego (14, 21, 51, 57, 65, 66, 88, 129, 169, 170, 186, 190, 201, 205, 212, 223, 234, 245, 257, 269), co potwierdziły także własne obserwacje. Sami autorzy cytowanego polskiego doniesienia (165) przyznają, że wykorzystanie symulacji komputerowych, opartych w części o dane populacyjne jest ryzykowne i ma w praktyce klinicznej leczenia HD-Mtx ograniczone i raczej tylko wspomagające znaczenie.

Poprzednio podejmowano także próby wglądu w indywidualną farmakokinetykę Mtx, w oparciu o testową podaż niskich dawek leku. Na podstawie obliczanego u danego pacjenta klirensu Mtx podanego w niskiej dawce, określano optymalną wartość wysokiej dawki leku. W jednym z opublikowanych badań, oszacowany po podaniu Mtx w dawce 10 mg/m^2 klirens leku, był podstawą do określenia stężenia stacjonarnego w 24. godzinie wlewu HD-Mtx. Autorzy opracowania konkludują, że ta metoda może być pomocna w modyfikacji wysokości dawki leku u niektórych pacjentów z wysokim ryzykiem wznowy choroby (107). Jednakże opinia ta budzi kontrowersje, z uwagi na zmienną i nieprzewidywalną w kolejnych cyklach u danego pacjenta farmakokinetykę HD-Mtx i zapewne dlatego przedstawiony sposób postępowania nie znalazł szerszego zastosowania.

W praktyce klinicznej, indywidualną dawkę całkowitą i godziną Mtx wylicza się ze znanych wzorów, w zależności od wysokości oczekiwanego stężenia stacjonarnego leku tylko wyjątkowo, zwykle w rzadkich przypadkach znacznego upośledzenia czynności nerek (11). Czy ten algorytm nie powinien jednak stanowić obowiązującej wytycznej, wpisanej w strategię terapii wysokimi systemowymi dawkami Mtx? W przypadku leczenia ALL postępowanie takie eliminowałoby ryzyko zbyt niskiej podaży kluczowego cytostatyku w terapii konsolidacyjnej i prewencji wznów oponowych.

3. Stężenia stacjonarne Mtx - problem zmienności farmakokinetyki HD-Mtx

W obecnie przedstawianym badaniu poddano analizie wartości stężeń stacjonarnych Mtx łącznie w 720 cyklach, zrealizowanych w jednorodnej grupie dzieci, leczonych z powodu ALL standardowego i pośredniego ryzyka.

Ocena dotyczyła 252 cykli z Mtx w dawce 2 g/m^2 i 468 cykli w dawce 3 g/m^2 . Nieoczekiwanie, znacząco wyższe ($p=0,001$) wartości stężeń stacjonarnych (średnich, wartości minimalnych i maksymalnych) uzyskano w grupie leczonej niższą dawką systemową Mtx. Trudno ten fakt wytłumaczyć, gdyż w obu grupach zarówno metodyka oznaczeń stężeń leku we krwi była taka sama, jak i przestrzegano tych samych warunków podaży HD-Mtx. Pacjenci nie różnili się istotnie pod względem wieku, ani płci. Natomiast w grupie chorych, leczonych Mtx w dawce 3 g/m^2 leku, było istotnie więcej dzieci nadmiernie otyłych. Ponieważ dawki leku były dobierane do rzeczywistej (wyższej z powodu nadwagi) powierzchni ciała, zatem dzieci te otrzymywały wyższe dawki Mtx, niż gdyby miały prawidłową masę ciała. Można przyjąć, że pacjenci nadmiernie otyli, charakteryzując się większą objętością dystrybucji oraz większym kompartmentem obwodowym (narządy i tkanki o słabym przepływie krwi), uzyskiwali niższe stężenia stacjonarne leku w kompartmentcie centralnym (krew oraz narządy dobrze ukrwione) i to wydaje się być jedynym logicznym wytłumaczeniem powyższej obserwacji. Zgodnie z poznanymi zasadami farmakokinetyki HD-Mtx, istnieje bowiem bezpośrednie przełożenie wysokości podanej dawki na uzyskiwane stężenia leku we krwi. Liniową korelację wysokości dawki Mtx z obserwowanym stężeniem leku potwierdzają wyniki licznych opublikowanych badań (25, 67, 87, 160, 168, 245).

W publikacjach, dotyczących farmakokinetyki HD-Mtx, sporadycznie znajduje się odniesienia do parametrów antropometrycznych leczonych. W jednej z prac przedstawiono ocenę 1236 oznaczeń stężeń Mtx, zastosowanego w dawce 3 g/m^2 u 37 dzieci z ALL. Z poddanych analizie domniemyanych czynników, jakie mogły mieć wpływ na zmienną farmakokinetykę Mtx: wieku, płci, masy ciała, wzrostu, powierzchni ciała, niższego pH moczu, stężeń kreatyniny, GOT, GPT, dawki leukoworyny i czasu stosowania *rescue* - jedynie wiek i masa ciała okazały się wpływać na klirens i objętość dystrybucji leku w kompartmentcie centralnym, co znajduje swoje uzasadnienie teoretyczne - klirens zależy od wieku, a masa ciała determinuje objętość dystrybucji (8). W innej pracy, poświęconej farmakokinetyce wlewów HD-Mtx w 105 cyklach u 24 dzieci, wykazano, iż wyższa masa ciała leczonych jest obok wyższego wieku jednym z czynników predysponujących do obniżonego klirensu leku (88).

Wyniki analizy obecnie przedstawianego materiału wykazały dużą osobniczą, jak również dotyczącą tego samego pacjenta w kolejnych cyklach, zmienność wartości stężeń stacjonarnych

Mtx (aneks 6). W badaniu własnym stwierdzono, że wiek leczonych nie miał istotnego wpływu na stabilność stężeń leku w kolejnych 4 cyklach u danego dziecka ($p=0,908$), chociaż u starszych pacjentów obserwowano nieco stabilniejsze stężenia stacjonarne.

Natomiast Seidel i wsp. analizując farmakokinetykę wlewów Mtx w dawkach 6 - 8 g/m² w grupie 42 dzieci z ALL, stwierdzili, że rozpiętość wysokości stężeń stacjonarnych leku była istotnie wyższa ($p=0,05$) u dzieci młodszych i to zarówno we krwi jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym. Ponadto zaobserwowali, że płeć, wzrost, masa ciała oraz BMI nie miały wpływu na zmienność wartości stężeń stacjonarnych Mtx. Dlatego wysnuli wniosek o nieprzewidywalnej farmakokinetyce leku w danym cyklu (205).

W innej pracy, w której u 52 pacjentów w 409 cyklach oceniano stężenia Mtx, zastosowanego w dawkach 1,5 – 7,5 g/m² podano, że niezależnie od dawki leku młodsze dzieci uzyskiwały niższe stężenia stacjonarne, niż starsi pacjenci (249).

Wyniki obecnie przedstawianej analizy wykazały również istotną korelację wartości stężeń stacjonarnych Mtx z wiekiem pacjentów. Zarówno w grupie dzieci leczonych Mtx w dawce 2 g/m², jak i 3 g/m² najniższe wartości stężeń stacjonarnych uzyskano u najmłodszych, a najwyższe u najstarszych dzieci. Różnice były istotne statystycznie ($p=0,02$ i $p=0,01$ odpowiednio dla niższej i wyższej dawki Mtx). Większość dostępnych publikacji potwierdza fakt zdecydowanie szybszego całkowitego klirensu leku u dzieci młodszych, co może stanowić wyjaśnienie dla uzyskanych wyników własnych badań (11, 88, 159, 207, 223, 230, 248).

Celem dokładniejszej oceny zmienności wartości stężeń stacjonarnych w poszczególnych cyklach, osobnej analizie w obecnie przedstawianym badaniu poddano wartości uzyskane we wszystkich 4 cyklach, zrealizowanych u danego pacjenta. Łącznie oceniono 548 cykli z Mtx, w tym 200 z dawką 2 g/m² (50 dzieci) i 348 cykli z dawką 3 g/m² leku (87 pacjentów).

Współczynnik zmienności, wyrażający procentowo wahania stężeń stacjonarnych leku pomiędzy czterema cyklami u danego dziecka, w ocenionej grupie liczącej łącznie 137 dzieci, wahał się od 5% aż do 97% (aneks 6). Istotnie bardziej stabilne ($p=0,028$) wartości stężeń stacjonarnych stwierdzono w cyklach z wyższą dawką leku.

Podobne spostrzeżenia, potwierdzające znaczną zmienność wysokości stężeń stacjonarnych w kolejnych cyklach u danego pacjenta, a także pomiędzy leczonymi, wspierają wyniki wielu innych opublikowanych badań (10, 23, 51, 54, 65, 67, 88, 153, 177, 178, 205, 223, 248).

Miedzy innymi analizowano farmakokinetykę Mtx w ponad 1000 cyklach u dzieci, po podaży leku w dawce 3 g/m². Współczynnik zmienności wysokości stężeń stacjonarnych u poszczególnych pacjentów był niższy od 30%; nie przeprowadzono jednak analizy różnic tych stężeń w kolejnych cyklach u danego dziecka (8), jak to wykonano w obecnym badaniu.

W innej pracy przedstawiono ocenę 266 cykli z Mtx, stosowanym w dawkach: $0,5 - 33,6 \text{ g/m}^2$, u 58 dzieci z ALL. Przedmiotem zainteresowania nie był sam lek, lecz jego metabolit, 7-OH-Mtx, którego stężenie w surowicy jest wprost zależne od zastosowanej dawki tego cytostatyku. Niezależnie od użytej dawki leku, stwierdzono znaczną zmienność stężeń badanego metabolitu. Ponadto wykazano, że w zakresie dawek: $0,5 - 8,0 \text{ g/m}^2$, znamienne wyższe stężenia metabolitu występowały u chłopców (47). To spostrzeżenie budzi wątpliwości, chyba że badanie dotyczyło w znacznej mierze nastolatków, gdyż wtedy wytłumaczeniem mogłaby być aktywność testosteronu, który może indukować metabolizm większości leków (47). W powyższym badaniu nie stwierdzono zmian w metabolizmie Mtx w kolejnych cyklach u danego pacjenta. Wykazano również, że pacjenci u których doszło do wznowy choroby mieli niższe stężenia 7-OH-Mtx i szybszy klirens cytostatyku (25). Spostrzeżenie to znajduje potwierdzenie w innych publikacjach, pokreślających niezależne złe prognostyczne znaczenie szybszego systemowego klirensu Mtx u dzieci z ALL (21, 23, 188).

Badania eksperymentalne wykazały, że, skutkiem powtarzania co 2 tygodnie terapii HD-Mtx, dochodzi do nabycia tolerancji wobec cytostatyku, co może w pewnym stopniu tłumaczyć zmienność parametrów farmakokinetycznych leku w kolejnych cyklach, zależną m.in. od osłabienia aktywnego transportu przez błonowy (18). Jednakże, jak to przedstawiono na rysunkach 7 i 8, w miarę realizacji kolejnych cykli z Mtx, w niniejszym badaniu nie stwierdzono regularnej tendencji zmian wartości stężeń stacjonarnych, zwłaszcza spadkowej. Takiej zależności nie obserwowano zresztą w żadnym z opublikowanych dotąd badań (5, 8, 23, 54, 65, 67, 68, 139, 153, 160, 195, 205, 207, 234, 245, 249, 262, 269).

Wyniki obecnie przedstawianego badania i doświadczenia innych autorów wskazują na to, że znaczna zmienność farmakokinetyki Mtx, podawanego w wysokich dawkach, mająca wyraz m.in. w dużej rozpiętości wartości stężeń stacjonarnych leku, jest jak dotąd trudna do wytłumaczenia, co zmusza do wnikliwej kontroli sprawności eliminacji leku i poszukiwania nowych, bardziej skutecznych metod doboru adekwatnej dawki i monitorowania terapii HD-Mtx.

4. Stężenia stacjonarne a krytyczna wartość minimalnego stężenia stacjonarnego

Istotne badania nad minimalną bezpieczną wysokością stężeń stacjonarnych Mtx, stosowanego w leczeniu dziecięcej ALL, podjął zespół Williama Evansa w St. Jude Children's Hospital w Memphis z końcem lat 80. W randomizowanym badaniu prospektywnym, którym objęto 108 dzieci standardowego ryzyka (ponad 1500 cykli z dawką 1 g/m^2), wykazano, że 59 pacjentów których stężenia stacjonarne były niższe niż $16 \mu\text{mol/l}$ miało 3-krotnie wyższe ryzyko

jakiegokolwiek wznowy ($p=0,01$) i 7-krotnie wyższe ryzyko wznowy szpikowej ($p=0,05$). W analizie wieloczynnikowej jednym z markerów progostycznych wznowy hematologicznej okazała się być wysokość stężenia stacjonarnego Mtx. Badania te stały się ważnym przyczynkiem do sformułowania tezy o konieczności adekwatniejszego doboru dawki Mtx, w zależności od indywidualnej farmakokinetyki leku oraz dowiodły, że dawka 1 g/m^2 nie jest wystarczająca dla dzieci z szybkim klirensiem leku (66).

W kolejnym badaniu klinicznym, w tym samym renomowanym ośrodku, dotyczącym skuteczności takiej samej dawki Mtx w leczeniu 154 dzieci z ALL stwierdzono, że stężenia stacjonarne poniżej $16,0 \text{ } \mu\text{mol/l}$ wiązały się z ponad dwukrotnym wzrostem występowania wszystkich rodzajów wznów, a prawie 4-krotnym nawrotów szpikowych, w porównaniu z pacjentami, u których osiągnęto wyższe niż progowe, stężenia leku (1). W następnym, randomizowanym badaniu (Study XII), którym objęto 188 dzieci z ALL, indywidualizacja dawek Mtx w oparciu o klirens leku, pozwoliła na osiągnięcie co najmniej minimalnego stężenia stacjonarnego w około 92% cykli, w porównaniu z 40% cykli, w których zachowano konwencjonalną dawkę $1,5 \text{ g/m}^2$. Prawdopodobieństwo uzyskania pięcioletniego EFS obu grup istotnie się różniło i wyniosło odpowiednio: 83% i 67%. Bardziej znamienne różnice obserwowano u pacjentów z białaczką wywodzącą się z prekursorów limfocytów B. Badanie dotyczyło celowości indywidualnego doboru dawek także innych cytostatyków (tenipozyd, cytarabina) i dowiodło, że tylko Mtx jest lekiem, którego dawkę należy adaptować do osobniczo zmiennego klirensu leku (67).

W obecnym badaniu, w ocenie jakiej poddano łącznie 720 cykli, w tym 252 z Mtx w dawce 2 g/m^2 i 468 w dawce wyższej (3 g/m^2), w ponad 80% wszystkich cykli stwierdzono przekroczenie progu $16,0 \text{ } \mu\text{mol/l}$. Dawka wyższa Mtx nie zapewniła istotnie lepszych pod tym względem wyników ($p=0,08$), gdyż tylko nieznacznie większy odsetek cykli, w porównaniu z chemioterapiami z dawką Mtx 2 g/m^2 , wiązał się z wyższymi niż $16,0 \text{ } \mu\text{mol/l}$ stężeniami stacjonarnymi (87% cykli wobec 82% dla dawki 2 g/m^2). Jednocześnie w analizie, dotyczącej łącznie 137 pacjentów, leczonych dawkami Mtx 3 g/m^2 i 2 g/m^2 , u porównywalnego odsetka dzieci (odpowiednio u 38% i 36%) nie odnotowano przekroczenia minimalnego stężenia stacjonarnego, w co najmniej jednym z czterech zrealizowanych cykli ($p=0,822$). Przedmiotem analizy nie była (jak w badaniach grupy Evansa) korelacja stężeń stacjonarnych Mtx przekraczających lub nie progową wartość $16,0 \text{ } \mu\text{mol/l}$ z uzyskanymi odległymi wynikami leczenia obu badanych grup, co jest osobnym, ważnym zagadnieniem. Warto w tym miejscu jednak zaznaczyć, że choć ocena wyników leczenia ALL u dzieci poddanych w okresie konsolidacji remisji terapii różnymi dawkami Mtx nie była celem niniejszej pracy, to 5-letnie EFS dla obu grup są porównywalne (dla dawki Mtx 2 g/m^2 i 3 g/m^2 odpowiednio: 84% i 87%).

W badaniu własnym wykazano, że dawki Mtx w zakresie: 2 - 3 g/m², w analizie dotyczącej 720 cykli i 137 leczonych, nie różniły się znamienne (p= 0,08) pod względem zapewnienia stężeń stacjonarnych, przekraczających minimalną wartość skuteczną, określoną w badaniach grupy z Memphis (1, 11, 21, 36, 65, 66, 67).

W ocenie dotyczącej wpływu wieku leczonych na wysokość stężeń stacjonarnych stwierdzono, że istotnie częściej nie osiągały one wartości minimalnych stężeń skutecznych w grupie najmłodszych dzieci (poniżej 4 lat). Aż w 23,5 % cykli z Mtx w dawce 2 g/m² co najmniej w jednej spośród czterech zrealizowanych chemioterapii stężenie leku w surowicy nie przekroczyło progu 16 µmol/l. Natomiast w grupie dzieci najstarszych (ponad 10-letnich) 3) dotyczyło to tylko 2,7% cykli. Różnice pomiędzy grupami wiekowymi były istotne statystycznie (p=0,021). W przypadku dawki Mtx 3 g/m² zaobserwowano identyczną tendencję (p=0,008). A zatem w odniesieniu do obu zastosowanych dawek systemowych HD-Mtx stwierdzono, że wraz ze wzrostem wieku leczonych dzieci, malało ryzyko uzyskiwania stężenia stacjonarnego niższego od 16,0 µmol/l.

Obserwacja ta jest zgodna ze znanym faktem szybszego klirensu leku w grupie młodszych dzieci. Można to tłumaczyć m.in. większą przepuszczalnością barier tkankowych i większym procentowym udziałem wody w organizmie małych dzieci, co sprzyja lepszej dystrybucji leku z krwi do kompartmentu tkankowego (8, 9, 11, 21, 47, 54, 107, 153, 234, 249).

Obecnie przedstawiane badanie, w którym oceniono łącznie 720 cykli z HD-Mtx wykazało również, udokumentowany w literaturze fakt ogromnej, nieprzewidywalnej zmienności wysokości stężeń Mtx pomiędzy pacjentami, a także u tego samego chorego w kolejnych cyklach chemioterapii. W badaniu nie wykazano istotnej przewagi wyższej dawki Mtx (3 g/m²), jeśli miernikiem jej skuteczności miałyby być gwarancja przekroczenia progu 16,0 µmol/l w surowicy w 24. godzinie chemioterapii.

5. Stężenia stacjonarne, a sprawność eliminacji Mtx

Stężenie stacjonarne Mtx, uzyskane drogą wielogodzinnego wlewu dożylnego leku, zależy od wysokości zastosowanej dawki i czasu jej podaży. Im wyższa jest dawka leku, tym uzyskuje się nieproporcjonalnie wyższe stężenie stacjonarne, które jest odwrotnie proporcjonalne do klirensu systemowego leku. Stan stacjonarny jest osiągany w wyniku zrównoważenia dynamiki procesów podaży i jednocześnie zachodzącej eliminacji leku (21, 32, 82, 87, 88).

Większość prac, poświęconych farmakokinetyce wielogodzinnych wlewów HD-Mtx opisuje wysokość stężeń stacjonarnych, zapewnianych przez różne dawki leku, a niekiedy odnosi je do charakterystyki badanej grupy, podkreślając najczęściej znaczenie wieku leczonych. Nieliczne

tylko doniesienia przedstawiają związek zaburzonej eliminacji Mtx z jego wyjściowo wysokimi stężeniami stacjonarnymi, skupiając się na kluczowej przyczynie, jaką jest obniżenie klirensu leku już po zakończeniu jego podaży. Jedna z publikacji, poświęconych temu zagadnieniu, opisuje wyniki badania dotyczącego dużej liczby analizowanych cykli - 4219, które przeprowadzono u 790 dzieci z mięśniakiem kostnym. Pacjentom podawano wlewy HD-Mtx w dawkach: 7,5 - 12 g/m². Analiza statystyczna wykazała znaczącą korelację ($p=0,0001$) wysokości stężeń stacjonarnych z przedłużoną eliminacją leku i zaburzeniem jego klirensu (9). Podobnie w badaniu, jakim objęto 227 cykli z Mtx w dawce 4,87 g/m², zrealizowanych u 37 dzieci, udowodniono związek wysokiego stężenia stacjonarnego z przedłużoną eliminacją leku (5). Z kolei w pracy, dotyczącej 1164 cykli Mtx w dawce 5 g/m² i 8 g/m², zastosowanych u 264 dzieci z ALL, wykazano związek wysokich stężeń stacjonarnych leku przekraczających 150 μmol/l (wartość krytyczna) z zaburzeniem wydalania Mtx (213).

W obecnym badaniu, w przypadku dawki 2 g/m² uzyskano istotną zależność ($p=0,01$) wartości stężeń leku w 48. godzinie od wysokości stężeń stacjonarnych; analiza dotyczyła 246 cykli. Podobna tendencja była zauważalna w odniesieniu do ocenionych 455 cykli Mtx w dawce 3 g/m² ($p=0,05$). Są to ważne spostrzeżenia, gdyż w literaturze, dotyczącej terapii HD-Mtx rzadko można znaleźć podobne obserwacje. Wyniki badań własnych oraz przedstawionych powyżej innych analiz, mogą wskazywać na wpływ wolniejszego klirensu leku już od rozpoczęcia cyklu na obserwowane w 48. godzinie zaburzenie wydalania Mtx. Dlatego przedmiotem oceny stała się w niniejszej pracy farmakokinetyka leku we wstępnej fazie jego szybkiej eliminacji.

6. Stała eliminacji we wstępnej fazie wydalania Mtx jako wczesny marker zaburzonego klirensu leku

Na farmakokinetykę leku składa się zespół procesów odpowiedzialnych za jego: wchłanianie, dystrybucję w organizmie, biotransformację i wydalanie. Zwyczajowo jej ocena opiera się na pomiarach stężeń leku w płynach ustrojowych, najczęściej krwi chorego. Farmakokinetykę leku można także ocenić, posługując się takimi pojęciami, jak: stężenie stacjonarne, półokres trwania ($T_{1/2}$), pole pod krzywą zmian stężeń leku w czasie (AUC), klirens leku (objętość osocza oczyszczona z leku w jednostce czasu). Innym, podstawowym parametrem, opisującym wydalanie leku, jest stała eliminacji (K_{el}), która określa w wymiarze liczbowym (godzina⁻¹) dynamikę spadku stężeń leku w surowicy, w danym przedziale czasowym. Wyższa wartość stałej eliminacji świadczy o szybszym klirensie leku. Zależy ona nie tylko od podanej dawki, interakcji lekowych, wydolności nerek, lecz także od właściwości osobniczych chorego, takich jak: genotyp, wiek, stan odżywienia, dieta i wiele innych czynników, co tłumaczy jej zmienność w kolejno przeprowadzanych u danego pacjenta cyklach (47, 58, 82).

Farmakokinetyka HD-Mtx, podobnie jak innych cytostatyków, rozważana jest zwykle w modelu dwukompartamentowym. Jak większość antymetabolitów podawanych w wysokich dawkach, po wysyceniu mechanizmów transportu, metabolizmu, czy wydalania nerkowego, podlega ona prawom kinetyki nieliniowej, w której biologiczny okres półtrwania Mtx wydłuża się, wraz z eskalacją zastosowanej dawki leku. Półlogarytmiczny wykres zmian stężeń leku w czasie ma kształt wielofazowy, a faza *plateau* odpowiada etapowi osiągnięcia stężenia stacjonarnego. Im wyższa dawka systemowa leku, tym nieproporcjonalnie wyższe stężenia stacjonarne, dłuższy $T_{1/2}$ i wolniejszy całkowity klirens leku. Jeśli jednak zastosowana wysoka dawka systemowa nie wyczerpie wydolności mechanizmów transportu, biotransformacji i wydalania leku, dynamika jego eliminacji, przebiegając zgodnie z zasadami kinetyki liniowej, zależy wprost proporcjonalnie od stężeń leku, a nie zastosowanej dawki (21, 58, 82). W jednej z polskich prac, poświęconych badaniom farmakokinetyki różnie wysokich dawek Mtx u dzieci, zaproponowano model zakładający współistnienie dwu dróg wydalania cytostatyku: eliminacji liniowej z kompartmentu centralnego oraz nieliniowej z obwodowego; praca wydaje się właściwie charakteryzować farmakokinetykę HD-Mtx (165).

Po dobowych wlewach HD-Mtx wyróżnia się dwie, różniące się dynamiką, fazy eliminacji i związane z nimi dwie stałe szybkości eliminacji: stałą fazy szybkiego wydalania (alfa) i fazy wolnej (beta). Faza szybka odpowiada eliminacji leku z kompartmentu centralnego (krew i dobrze ukrwione tkanki); wolna z głębokiego (gorzej ukrwione tkanki) oraz procesom: metabolizmu, krążenia jelitowo-wątrobowego oraz dysocjacji leku z połączeń z białkami. Po 24-godzinnym wlewie dożylnym HD-Mtx szybka faza wydalania ma półokres trwania wynoszący około 2 - 4 godziny, a druga, wolna - około 10 godzin (18, 21, 36, 82).

Powszechnie uważa się, że za zaburzenie eliminacji HD-Mtx odpowiada obniżenie klirensu leku w końcowej, wolnej fazie jego wydalania, co znajduje odzwierciedlenie w zawyżonych stężeniach leku w surowicy dopiero w 48. godzinie jego eliminacji.

Borsi, pisząc o konieczności znalezienia wcześniejszych, niż stężenie leku w surowicy w 48. godzinie cyklu, predyktorów zaburzonego wydalania HD-Mtx, podkreśla znaczenie wydłużenia $T_{1/2}$ ponad 3 i pół godziny w ciągu pierwszych 24 godzin cyklu i wolniejszego klirensu leku już pod koniec jego dobowego wlewu (21).

Podążając za tym tokiem rozważań, w obecnym badaniu wyliczono, a następnie poddano analizie wartości stałych eliminacji dwu faz wydalania Mtx i skupiono się zwłaszcza na ocenie wartości K_{el} wstępnej, szybkiej fazy alfa, w cyklach o różnej dynamice wydalania leku.

W większości przypadków pomiary stężeń leku w surowicy, dokonane przed 48. godziną cyklu nie zapowiadały wolniejszego klirensu leku i przedłużenia prawidłowego wydalania Mtx ponad

48. godzinę cyklu. Dlatego postanowiono sprawdzić, czy taką rolę może spełniać stała eliminacji K_{el} wczesnej fazy wydalania Mtx.

Przedmiotem obecnej analizy było: 219 cykli z Mtx w dawce 2 g/m^2 (w tym 34 cykle z przedłużoną eliminacją leku) i 423 w dawce 3 g/m^2 (w tym 79 cykli z zaburzonym wydalaniem). Łączną oceną objęto zatem 642 chemioterapie z HD-Mtx. Ponieważ badanie miało charakter retrospektywny, do wyliczeń stałej eliminacji fazy szybkiej można było wykorzystać stężenia leku w surowicy, oznaczone w 24. i 36. godzinie od rozpoczęcia wlewu Mtx. Interesujące byłoby badanie prospektywne, w którym K_{el} fazy alfa byłaby wyliczana na podstawie pomiarów z 24. i np. 30. godziny cyklu, adekwatnie do krótkiego $T_{1/2}$ fazy alfa.

Z podobnych względów, stałe eliminacji wolnej fazy wydalania leku, zostały obliczone na podstawie pomiarów stężeń leku w surowicy z 36. i 48. godziny.

Badanie własne wykazało istotne różnice ($p=0,0001$) w wartościach K_{el} we wczesnej fazie szybkiego wydalania Mtx stosowanego w dwóch różnych dawkach, pomiędzy cyklami o prawidłowej i zaburzonej eliminacji leku. Jest to ważna obserwacja, gdyż wskazuje na znaczenie wartości K_{el} fazy alfa, jako różnicującej sprawny i zbyt wolny klirens leku we wczesnej fazie cyklu. Na znaczenie zaburzenia wydalania HD-Mtx już we wczesnej fazie eliminacji leku zwracają uwagę także inni autorzy (21, 89, 178, 214, 223, 249).

Na uwagę zasługuje fakt, że w obecnie przedstawianej pracy wartości K_{el} drugiej, wolnej fazy wydalania Mtx (zwykle kojarzonej z zaburzeniem klirensu leku) różniły się istotnie, pomiędzy cyklami z prawidłowym i przedłużonym wydalaniem cytostatyku, jedynie w przypadku dawki 3 g/m^2 . Czyżby wyższa dawka Mtx wpływała na zaburzenie klirensu leku w wolnej fazie wydalania? A może decydujące znaczenie odegrała nadmierna otyłość (eskalująca kompartment obwodowy), którą stwierdzono istotnie częściej (tabela 3) u pacjentów leczonych Mtx w wyższej dawce?

Średnie wartości stałych eliminacji leku we wczesnej fazie wydalania Mtx różniły się istotnie, w porównaniu dotyczącym dwu dawek: 2 g/m^2 i 3 g/m^2 jedynie dla cykli o prawidłowej eliminacji Mtx ($p=0,0002$) i były wyższe dla niższej dawki leku. W cyklach o zaburzonym wydalaniu tego cytostatyku średnie wartości K_{el} były także wyższe dla dawki 2 g/m^2 w obu fazach eliminacji, ale w istotny sposób ($p=0,0001$) tylko w fazie beta. Obserwacja ta koresponduje ze stwierdzonymi w badaniu własnym istotnie wyższymi ($p=0,001$) wartościami średnich stężeń stacjonarnych Mtx w cyklach z dawką 2 g/m^2 . Jest to zgodne z zasadą kinetyki pierwszego rzędu, w której eliminacja leku jest proporcjonalna do jego stężenia, a nie podanej dawki (58, 82).

W obecnie przedstawianym badaniu stwierdzono także oczekiwane, istotne różnice ($p=0,0001$) między wartościami K_{el} dwóch faz wydalania Mtx, zarówno w cyklach o prawidłowej, jak i

zaburzonej eliminacji obu dawek leku. Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w średnich wartościach K_{el} wczesnej fazy eliminacji w obrębie trzech grup wiekowych, tak jak to odnotowano w przypadku stężeń stacjonarnych.

W materiale własnym uzyskano niespójne wyniki analizy wpływu stanu odżywienia leczonych, na średnie wartości stałych eliminacji wczesnej fazy wydalania Mtx. Najwyższe wartości K_{el} , przemawiające za najszybszym klirensiem Mtx w fazie szybkiej, w cyklach o sprawnym wydalaniu leku dotyczyły w przypadku dawki 2 g/m^2 – dzieci otyłych, a w przypadku dawki 3 g/m^2 – szczupłych.

W analizie dotyczącej wpływu płci na wartości stałych eliminacji wczesnej fazy wydalania Mtx, wyższe wartości K_{el} stwierdzono u dziewczynek leczonych Mtx w dawce 2 g/m^2 oraz u chłopców otrzymujących lek w dawce 3 g/m^2 . Wyjaśnieniem tej obserwacji może być, nieistotna co prawda statystycznie, przewaga młodszych dzieci (a zatem o szybszym klirensie leku) wśród chłopców w grupie leczonej Mtx w dawce 3 g/m^2 , oraz wśród dziewcząt leczonych dawką 2 g/m^2 (tabela 1 i 2).

W publikacjach, dotyczących wczesnej identyfikacji pacjentów z obniżonym klirensiem Mtx, stosowanego w wysokich systemowych dawkach, nieliczne tylko doniesienia odnoszą się do stałej eliminacji leku. Jest to spowodowane najprawdopodobniej tym, że dotychczas nie określono w badaniach eksperymentalnych zakresu norm tego parametru (jak dotyczy to np. półokresów trwania Mtx) i wartości krytycznych K_{el} fazy alfa (jak ma to miejsce w przypadku stężeń Mtx w surowicy).

W pracy, której celem była ocena indywidualnej farmakokinetyki 231 cykli z Mtx, podawanym w dawce 5 g/m^2 u 61 dzieci z ALL, poza całkowitym klirensiem leku i objętością jego dystrybucji, posłużono się dwoma stałymi eliminacji, wyliczanymi na podstawie stężeń leku z 24. i 48. godziny cyklu. Oznaczenia pozwoliły skutecznie przewidzieć moment wydalania leku do bezpiecznych granic, określonych protokołem terapeutycznym (167).

Podobnie polscy autorzy, w cytowanej już wcześniej pracy, poświęconej stworzeniu komputerowego programu symulacji optymalnego dawkowania HD-Mtx u dzieci, posługiwali się oprócz wysokości stężenia stacjonarnego, wyliczanymi wartościami: $T_{1/2}$, AUC oraz K_{el} wczesnej i późnej fazy eliminacji leku (165).

Najczęściej jednak stosowanym parametrem, w celu wczesnej identyfikacji pacjentów zagrożonych przedłużoną eliminacją Mtx, poza pomiarami stężeń leku w surowicy i wyliczanym klirensiem leku, jest $T_{1/2}$ dwu faz jego wydalania (23, 54, 65, 67, 89, 107, 148, 178, 182, 207, 214, 222, 223, 248, 249, 259, 269). Dla przykładu, w jednym z badań dotyczącym dorosłych, leczonych 6-godziennymi wlewami Mtx w dawkach $1,9 - 3,8 \text{ g/m}^2$, na podstawie dwu pomiarów

stężen leku w surowicy: bezpośrednio po zakończeniu wlewu i 6 godzin później, wcześniej identyfikowano pacjentów z zaburzonym klirensiem leku, na podstawie wyliczeń $T_{1/2}$ między 6., a 12. godziną cyklu. Autorzy zaobserwowali, że grupę z obniżonym klirensiem Mtx charakteryzowały znacząco wyższe stężenia leku w surowicy we wczesnej fazie jego wydalania (89). Warto wyróżnić jeszcze jedną z prac, w której posługiwano się półokresem trwania leku wczesnej i późnej fazy jego wydalania. Wśród 118 cykli Mtx w dawkach w zakresie: $0,8 - 1,35 \text{ g/m}^2$, w 8 doszło do przedłużonej eliminacji leku. Spośród tych 8 cykli, w 5 przypadkach wydłużony we wstępnej fazie wydalania $T_{1/2}$ informował o zaburzonym klirensie leku, a w 3 pozostałych – dopiero wydłużony $T_{1/2}$ wolnej fazy wydalania Mtx (223). W obu publikacjach podkreślono znaczenie obniżonego klirensu leku już we wczesnej fazie wydalania Mtx, co jest zgodne ze spostrzeżeniami wynikającymi z prezentowanego badania własnego i co powinno być wykorzystane dla poprawy monitorowania terapii HD-Mtx.

Natomiast opinie podkreślające znaczenie przekroczenia stężenia krytycznego Mtx w 24. godzinie cyklu, z równoczesnym wzrostem stężenia kreatyniny w surowicy o 50% wobec wartości wyjściowych, nie mogą być pomocne w większości sytuacji klinicznych, gdyż opisują rzadkie przypadki ekstremalnie zaburzonego klirensu Mtx, zwykle wiążące się z rozwijającą się niewydolnością nerek (89, 99, 213). W badaniu własnym, w obu odnotowanych przypadkach ostrej niewydolności nerek w przebiegu chemioterapii Mtx w dawce 2 g/m^2 , w 24. godzinie cyklu stężenia leku nie przekraczały wartości krytycznej.

Na podstawie dotąd przeprowadzonych i opisanych w niniejszej pracy wstępnych badań, wydaje się że stała eliminacji wczesnej fazy szybkiego wydalania Mtx może być, podobnie jak $T_{1/2}$, cennym parametrem w ocenie zmiennej farmakokinetiki HD-Mtx. W porównaniu z rutynowo dokonywanymi oznaczeniami stężeń leku w surowicy, z zastosowaniem metod niechromatograficznych, wartości K_{el} fazy alfa wcześniej (i być może precyzyjniej) informują o zaburzeniu klirensu Mtx już we wstępnej fazie jego wydalania, kiedy to jeszcze pomiary stężeń nie wskazują na zagrożenie przedłużoną eliminacją leku. Dla potwierdzenia tych spostrzeżeń konieczne byłoby przeprowadzenie badań prospektywnych, dotyczących większej liczby cykli, zrealizowanych w jednorodnej grupie pacjentów. Wyliczenia stałych eliminacji można by wtedy oprzeć na częściej, niż co 12 godzin dokonywanych pomiarach stężeń leku w surowicy we wstępnej fazie jego wydalania. Szczególna dbałość winna dotyczyć metodyki pobierania próbek krwi przy zakończeniu dobowego wlewu Mtx, tak by wyeliminować fałszywie zawyżone pomiary.

Wykorzystanie stałej eliminacji fazy alfa do przewidywania zaburzonego wydalania leku w praktyce klinicznej, wymagałoby określenia zakresu norm tego parametru, tak jak to dotyczy $T_{1/2}$ obu faz wydalania HD-Mtx, oraz wskazania jego wartości krytycznych.

7. Sprawność eliminacji Mtx i czynniki ryzyka zaburzonego klirensu leku

Badania eksperymentalne pozwoliły na ustalenie wartości krytycznych stężeń Mtx w określonych punktach czasowych jego wydalania. W zakresie dawek systemowych 1,5 – 4,5 g/m² są one identyczne i to na nich, zgodnie z wytycznymi protokołu terapeutycznego, oparto obecne badanie (21).

Farmakokinetyka HD-Mtx rozważana jest zawsze w modelu dwukompartamentowym, zakładającym współistnienie kompartmentu centralnego i obwodowego, w jakich lek jest rozprowadzany, metabolizowany i z których podlega eliminacji (8, 21, 36, 58, 68, 82, 93, 153, 167). Początkowo dynamika wydalania leku zależy wprost od jego stężenia we krwi, z czasem w coraz większym stopniu od jego uwalniania z tkanek. Znaczenie ma również stopień wiązania leku z białkami nośnikowymi, którymi w przypadku Mtx są albuminy (11, 18, 21, 36, 57, 129, 155, 160, 198). Udowodniono iż wiele leków, takich jak salicylany i suflonamidy, konkurując z Mtx, wypiera go z połączeń z albuminami, co zdaniem niektórych autorów może wpływać na zwiększenie wolnej frakcji leku we krwi i nasilać ostre toksyczności terapii (82, 234). Można też znaleźć opinie zgodnie z którymi lek związany z białkami nie przechodzi do tkanek, a zatem nie jest aktywny, nie ulega jednocześnie eliminacji, co może przedłużać w efekcie jego działanie. Badania, którymi objęto 58 cykli z HD-Mtx nie potwierdziły wpływu stężenia albumin na sprawność eliminacji Mtx (160). Również w obecnym badaniu, w analizie jednoczynnikowej, nie wykazano istotnego wpływu hipalbuminemii na nasilenie bliskiej toksyczności Mtx.

Metotreksat wydalaný jest z organizmu głównie z moczem, a w nieznacznym tylko stopniu (około 10% podanej dawki) drogą pasażu jelitowego. W ciągu pierwszych 6 - 12 godzin aż 70% leku jest eliminowane w postaci niezmodyfikowanej przez nerki i to one są kluczowym narządem, którego sprawne funkcjonowanie jest koniecznym warunkiem bezpiecznej podaży HD-Mtx. Znacznie mniejsza część leku jest metabolizowana w wątrobie. Największą aktywność cytotoksyczną, przewyższającą właściwości samego Mtx mają jego poliglutaminiany, powstające wewnątrzkomórkowo, w proporcji do zastosowanej dawki i czasu ekspozycji na cytostatyki. Wywołana przez nie supresja MTHFR, syntazy tymidylanowej i dwu enzymów zaangażowanych w syntezę puryn *de novo* jest - w przeciwieństwie do Mtx - słabo, lub wcale nie neutralizowana przez leukoworynę. W wątrobie, skutkiem mechanizmów oksydacyjnych powstaje 7-OH-Mtx, zachowujący około 1/100 aktywności cytostatyku wobec MTHFR i

kilkukrotnie gorzej od niego rozpuszczalny w środowisku wodnym. W trakcie krążenia jelitowo-wątrobowego leku, w wyniku aktywności flory jelitowej synetyzowany jest DAMPTA (kwas 4-amino-4-dezoksy-N10-metylopteroilowy), ostatni z trzech metabolitów Mtx, mający najsłabsze właściwości cytotoksyczne (11, 18, 21, 36, 57, 197, 225, 234, 245).

W trakcie wydalania Mtx i jego metabolitów przez nerki, zachodzą w nich trzy równoczesne procesy: przesączania kłębuszkowego, wydalania i reabsorpcji cewkowej. Sprawność tych procesów zależy zarówno od przepływu nerkowego (wydolności układu krążenia, hiperhydratacji), jak i od stanu filtracji kłębuszkowej i prawidłowej funkcji kanalików nerkowych. Wydalaniu leku i jego metabolitów sprzyja hiperhydratacja i alkalizacja moczu, gdyż w takim środowisku są one wielokrotnie łatwiej rozpuszczalne w cewkach nerkowych (11, 21, 36, 57, 76, 93, 96, 113, 129, 148, 153, 193, 197, 234).

Zasługującą na uwagę pracę, związaną z tym tematem, opublikowali badacze japońscy, którzy w randomizowanym badaniu z udziałem 30 dzieci z ALL wykazali, że wyższe stężenie sodu w kroplówkach nawadniających w trakcie terapii HD-Mtx, sprzyja szybszej eliminacji leku do 48. godziny cyklu, nie wpływając jednocześnie na wysokość stężeń stacjonarnych leku (109).

Wiadomo, że w przypadku zaburzonej funkcji nerek terapia HD-Mtx winna być zmodyfikowana, a dawka leku zredukowana. Jednak nawet pacjenci posiadający jedną nerkę mogą być bezpiecznie leczeni HD-Mtx. Wykładnikiem upośledzonej funkcji nerek jest zazwyczaj obniżony klirens kreatyniny. Jednakże, jak dowodzą liczne badania, klirens kreatyniny (niezależny od procesów cewkowych) nie koreluje ściśle z klirensiem nerkowym Mtx, który poza filtracją kłębuszkową jest też zarówno aktywnie resorbowany, jak i wydalany w cewkach nerkowych. Dlatego dawkowanie Mtx, podobnie jak i leukoworyny, trudno jednoznacznie opierać na wartości klirensu kreatyniny (8, 11, 21, 96, 107, 181, 234). Całkowity klirens Mtx, na jaki składa się klirens nerkowy i metabolizm leku (a zatem w jakimś stopniu funkcja wątroby) jest bardzo zmienny i waha się w granicach: 50–150 ml/min/m² (11, 18, 21, 57, 66, 88, 107, 109, 159, 207, 223, 230, 257, 259, 269).

Przedłużona eliminacja Mtx, podawanego dożylnie w wysokich dawkach, występuje często i jest przedmiotem licznych doniesień. Wywołać ją mogą m.in.: obecność tzw. „trzeciej przestrzeni” - eskalującej kompartment obwodowy, dysfunkcja nerek, interakcje wielu leków, nieprawidłowa dieta, a nawet występująca kilka dni wcześniej gorączka, lub dożylnie podany kontrast, stosowany w radiologii (5, 11, 18, 19, 21, 36, 45, 46, 57, 79, 100, 148, 155, 159, 193, 198, 210, 232, 234).

W obecnie przedstawianym materiale, zgodnie z zaleceniami protokołu terapeutycznego dotyczącymi warunków realizacji chemioterapii HD-Mtx, unikano w/w czynników ryzyka

zaburzonego wydalania leku. Jednak ściśle przestrzeganie protokołu terapeutycznego nie daje gwarancji zapewnienia prawidłowego klirensu leku, a tylko zmniejsza ryzyko jego zaburzeń. Nawet tak ekstremalne przypadki nefrotoksyczności Mtx, które prowadzą do ostrej niewydolności nerek, zdarzają się nieprzewidywalnie i wciąż publikowane są nowe doniesienia o ich występowaniu (17, 26, 50, 71, 80, 89, 94, 116, 121, 146, 164, 197, 216, 253, 254, 273).

W obecnym badaniu, którym objęto łącznie 852 cykle, w tym 276 z Mtx w dawce 2 g/m² (przeprowadzonych u 72 dzieci) i 576 cykli Mtx w dawce 3 g/m² (u 146 pacjentów z ALL), przedłużona eliminacja leku dotyczyła w różnym stopniu: 44,4% i 47,9% pacjentów, leczonych Mtx odpowiednio w niższej i wyższej dawce ($p=0,905$) oraz 17% i 17,5% chemioterapii ($p=0,662$). Wysokość dawki Mtx (2 i 3 g/m²) nie miała zatem wpływu na ryzyko występowania przedłużonego wydalania leku. Częstość zaburzonej eliminacji Mtx odnotowana w niniejszym badaniu jest podobna do przedstawianej w publikacjach innych autorów, dotyczących stosowania porównywalnych dawek systemowych tego cytostatyku u dzieci.

W badaniu, którym objęto 134 dzieci, leczone 481 cyklami z HD-Mtx w dawkach: 0,9 – 3,7 g/m², przedłużone wydalanie leku wystąpiło w 22% cykli i było związane z: wyższym AUC leczonych, niskim pH moczu, wymiotami, obniżonym klirensem leku i słabą diurezą (183). W polskiej publikacji, dotyczącej zastosowania u dzieci Mtx w dawce 1 g/m² i 5 g/m², dawka niższa wiązała się z zaburzeniem wydalania leku tylko w 2,6% cykli. W przypadku Mtx podanego w dawce 5 g/m² nieprawidłową eliminację leku stwierdzono jednak aż w 40% cykli (257). Inne opracowanie, dotycząc 497 cykli Mtx w dawce 3 g/m² i 5 g/m² wykazało, iż tylko 12,1% chemioterapii wiązało się z zaburzeniem klirensu Mtx (263). Zaskakująco niski odsetek około 3% cykli powikłanych zaburzeniem eliminacji HD-Mtx przedstawili, w jednej z prac badacze szweccy, w analizie dotyczącej aż 1164 cykli Mtx w dawce 5 lub 8 g/m², zrealizowanych u 264 dzieci z ALL (213).

Escalacja dawki Mtx, może wpływać na zmianę jego farmakokinetyki, prowadząc do wysycenia procesów metabolizmu cytostatyku, co w konsekwencji może zwolnić klirens systemowy leku i zaburzyć jego eliminację (153). Są jednak argumenty podważające tę tezę. Bardzo wysokie dawki Mtx (12 g/m²), typowe dla leczenia mięsaka kostnego, wiązały się z porównywalnym ryzykiem zaburzenia wydalania leku, jak dawki w zakresie 2 - 5 g/m² (49% cykli), co może przemawiać za brakiem wpływu wysokości dawki systemowej na częstość przedłużonej eliminacji Mtx (268). Inna z prac podkreśla znaczenie prawidłowej funkcji wątroby, odpowiadającej w niewielkim stopniu za systemowy klirens leku, dla sprawnej eliminacji Mtx (195). Na uwagę zasługuje publikacja przedstawiająca ocenę 497 cykli z Mtx, przeprowadzonych u 121 dzieci z ALL. Autorzy tej pracy uważają, że zaburzenie wydalania leku

podanego w dobowych wlewach w dawkach w zakresie: 3 - 5 g/m² nie zależy od wysokości dawki, ale od indywidualnych cech osób leczonych (262).

Kolejny ważny problem dotyczy kwestii ewentualnego wpływu powtarzanej ekspozycji na HD-Mtx na sprawność wydalania cytostatyku. W obecnym badaniu istotnie częściej przedłużona eliminacja miała miejsce w pierwszym z czterech realizowanych cykli z Mtx, podanym w niższej dawce (2 g/m²). Ponowna ekspozycja na terapię HD-Mtx nie wiązała się w tym przypadku z większym ryzykiem przedłużonej eliminacji tego leku. W odniesieniu do wyższej dawki (3 g/m²), zaburzenie klirensu Mtx obserwowano także najczęściej w pierwszych cyklach, ale nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (tabela 12 i 13).

Obserwacja ta zbiega się z wynikami badania, w którym oceniono aż 4219 chemioterapii Mtx w dawce: 7,5 – 12 g/m², zastosowanych w leczeniu mięsaka kości (9). Autorzy tego doniesienia podkreślają fakt, iż to pierwsze cykle, częściej niż kolejne wiązały się z przedłużonym wydalaniem Mtx. Brak wyższego ryzyka zaburzonej eliminacji leku, w przypadku ponownej ekspozycji na HD-Mtx podkreślają także inni autorzy (25). Inna z prac, poświęcona tej tematyce przedstawia, że to drugi w kolejności cykl (z trzech zrealizowanych) wiązał się z najwyższym odsetkiem (46%) zaburzeń eliminacji tego cytostatyku. Natomiast w przypadku pierwszych cykli, przedłużone wydalanie Mtx dotyczyło znacząco niższego (31%) odsetka chemioterapii (262).

Kwestia kluczowego znaczenia wieku pacjentów dla farmakokinetyki wlewów HD-Mtx i wolniejszego systemowego klirensu leku u dzieci starszych, cechujących się mniejszą objętością dystrybucji, jest dobrze zbadana i bywa przedmiotem wielu doniesień i opracowań dotyczących Mtx (11, 21, 88, 107, 159, 207, 223, 230, 234, 249).

Obserwacje, wynikające z obecnego badania, również przemawiają za wpływem wieku dzieci na farmakokinetykę Mtx. W analizie, dotyczącej 208 pacjentów leczonych Mtx w dwóch różnych dawkach, przedłużenie jego eliminacji w więcej niż 1 na 4 zrealizowane cykle, dotyczyło 3-krotnie częściej najstarszych (ponad 10-letnich) dzieci w porównaniu z najmłodszymi (1-4 lata). Narastające liniowo wraz z wyższym wiekiem leczonych ryzyko zaburzonego wydalania wysokich dawek leku było na pograniczu istotności statystycznej ($p=0,08$). Podobną tendencję opisują również autorzy omawianego wcześniej opracowania (9). W innym badaniu, którym objęto 122 dzieci z ALL, leczonych Mtx w dawce 5 g/m², klirens systemowy leku wykazał liniową zależność od wieku pacjentów i był wyraźnie wolniejszy w grupie dzieci ponad 10-letnich (54). Choć w obecnym badaniu nie wyliczano klirensu Mtx, to na podstawie analizy wysokości stężeń stacjonarnych i częstości zaburzonej eliminacji leku w trzech grupach wiekowych pacjentów (tabela 9 i 16), można pośrednio wysnuć podobne wnioski.

W jednym z badań, dotyczącym 23 dzieci z ALL, u których zrealizowano 80 cykli z Mtx, znacząco szybszy klirens leku charakteryzował dzieci poniżej 4 r.ż. (153). To spostrzeżenie potwierdza także Borsi, który uważa, iż to dzieci w wieku 1 - 4 lata mają najszybszy klirens Mtx (23). Inna z prac, poświęcona farmakokinetyce Mtx w dawce 4 g/m^2 , przedstawia szczegółową analizę zmian klirensu leku w okresie niemowlęctwa. Wykazano liniowy wzrost klirensu wraz z wyższym wiekiem niemowląt, łączącym się z postępującym dojrzewaniem funkcjonalnym nerek (230).

W obecnie przedstawianym badaniu nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu płci ($p=0,28$), ani BMI ($p=0,66$) na częstość występowania cykli z zaburzonym klirensiem Mtx (tabela 15 i 17). W nielicznych doniesieniach, odnoszących się do kwestii płci można znaleźć podobne opinie (153, 205). Z fizjologicznego punktu widzenia pokwitający chłopcy, skutkiem wpływu testosteronu, stymulującego procesy metaboliczne, mogą szybciej metabolizować Mtx, lecz ten mechanizm odgrywa tylko niewielką rolę w wydalaniu leku (11, 18, 21, 36, 155).

W publikacjach, poświęconych czynnikom wpływającym na farmakokinetykę HD-Mtx, opinie na temat roli stanu odżywienia pacjentów są podzielone. Podobnie jak w obecnym badaniu, w opracowaniu, którego przedmiotem analizy był wpływ BMI na farmakokinetykę Mtx, sprawność wydalania cytostatyku (a zatem systemowy klirens leku) nie miał związku z różnym stanem odżywienia 621 dzieci z ALL (83). Także w pracy, dotyczącej Mtx w dawce $6 - 8 \text{ g/m}^2$, stosowanego u 42 dzieci z ALL, BMI nie wpływał na farmakokinetykę tego leku (205). Przeciwną tezę formułują jednak badacze, relacjonujący przypadek ostrej niewydolności nerek w mechanizmie martwicy cewkowej, jaka wystąpiła po podaniu niskiej dawki Mtx - $0,25 \text{ g/m}^2$ u otyłego 16-latka z ALL. Jednym z wniosków jest postulowana redukcja wysokich dawek leku u pacjentów z nadwagą, do wartości odpowiadającej należnej masie ciała (197). W innym opracowaniu, którego celem było określenie czynników kształtujących klirens leku i objętość kompartmentu centralnego przedstawiono, na podstawie oceny 278 cykli Mtx w dawce 3 g/m^2 , podawanym dzieciom z ALL, że jedynie wiek i masa ciała wpływały na te parametry (8). Podobnie, w dwu innych pracach, dotyczących 24 i 329 dzieci z ALL wykazano, że masa ciała wpływa na całkowity klirens wysokich dawek Mtx (88, 269). Uzasadnieniem teoretycznym tych obserwacji jest fakt, iż otyłość zwiększa kompartment obwodowy pacjentów, od którego zależy w dużej mierze późniejsza faza eliminacji leku.

Ponadto, badania na własnym materiale wykazały, że żaden z wariantów polimorficznych $677\text{C}>\text{T}$ genu MTHFR nie wiązał się z ryzykiem zaburzonego klirensu Mtx ($p=0,54$).

Z teoretycznego punktu widzenia, jakakolwiek postać polimorfizmu genu MTHFR nie powinna mieć wpływu na sprawność wydalania Mtx. Jedynie geny kodujące transportery błonowe i

nośniki zredukowanych folianów RFC mogą być zaangażowane w ten proces. Liczne prace podkreślają wpływ polimorfizmów tych genów m.in. na uzyskiwane wyniki leczenia pacjentów, lub nawet stężenia stacjonarne Mtx (1, 4, 30, 44, 61, 75, 114, 120, 217, 220, 243). Tematem jednej z najnowszych prac jest np. wpływ polimorfizmu rodziny białek oporności wielolekowej ABC na transport przez błonowy i eliminację Mtx. Wykazano, że powszechne polimorficzne warianty genowe, determinujące aktywność białek ABC odgrywają rolę w zmiennej farmakokinetyce leku ich nosicieli (177).

Można jednak znaleźć nieliczne publikacje, w których autorzy próbują przekonać o związku polimorfizmu genowego MTHFR z wydalaniem Mtx. W pracy dotyczącej 29 dzieci z ALL, badano polimorfizmy kilku genów zaangażowanych w gospodarkę folianową, m.in. 677C>T MTHFR. Wykazano związek wariantu TT z wyższymi stężeniami leku w 48. godzinie eliminacji Mtx (90). Na uwagę zasługuje praca, przedstawiająca związek wystąpienia ostrej niewydolności nerek (a zatem skrajnego zaburzenia eliminacji leku) w przebiegu terapii HD-Mtx, z nosicielstwem wariantu TT polimorfizmu 677C>T MTHFR (236).

W podsumowaniu wyników badań własnych należy podkreślić, że w analizie wieloczynnikowej przy użyciu regresji logistycznej, uwzględniającej liczne wymieniane w literaturze zmienne, tylko stężenie stacjonarne leku i stała eliminacji Mtx we wczesnej fazie jego szybkiego wydalania, miały istotny statystycznie wpływ na zaburzenie wydalania HD-Mtx. Natomiast inne analizowane czynniki, takie jak: wysokość dawki systemowej Mtx (2 lub 3 g/m²), BMI, polimorfizm genowy 677CT MTHFR, a nawet wiek pacjentów, nie wykazały istotnego związku z przedłużoną eliminacją Mtx (tabela 24).

8. Bliskie toksyczności terapii HD-Mtx u dzieci

Metotreksat, jako typowy antymetabolit działa na fazę S cyklu komórkowego, zaburzając produkcję zasad purynowych, DNA i białek, a także metylację wielu aminokwasów i metabolizm długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (11, 18, 21, 36, 57, 87, 88, 133, 234, 245). Większa kinetyka podziałów komórek klonu nowotworowego i wynikające z tego około 5-krotnie wyższe zapotrzebowanie na foliany, w porównaniu z prawidłowymi komórkami sprawia, że komórki białaczkowe zostają uszkodzone w znacznie większym stopniu, skutkiem działania Mtx. Wśród prawidłowych tkanek najbardziej wrażliwe na jego wpływ są zbudowane z szybko dzielących się komórek: błona śluzowa przewodu pokarmowego, szpik kostny i gonady (18, 21, 47, 57, 234). Przedłużona ekspozycja na cytotoksyczne stężenia leku wywołuje nieco większe toksyczności śluzówkowe, w porównaniu z mielosupresją. Badania eksperymentalne, opisane przez Chabnera we wczesnych latach 70. wykazały, że progowe stężenia hamujące syntezę DNA

w szpiku są znacząco wyższe, niż stężenia odpowiedzialne za uszkodzenie błony śluzowej żołądka i jelit (30). Ten fakt łatwo wytłumaczyć, wynikającą z krążenia jelitowo-wątrobowego Mtx, wyższą akumulacją tego leku w śluzówce przewodu pokarmowego, niż w szpiku kostnym (30, 57, 234). Są jednak doniesienia przedstawiające wyniki badań, przemawiających za przenikaniem Mtx do krwiotwórczych komórek prekursorowych, stanowiących jeden ze swoistych elementów kompartmentu centralnego, a następnie uwalnianiem go z erytrocytów do krwi krążącej, co wydłuża działanie ogólnoustrojowe Mtx (93). Mielosupresja z odnową megaloblastyczną po dobowych wlewach kilkugramowych dawek leku nie stanowi jednak zwykle istotniejszego problemu. Zaplanowane w protokole terapeutycznym przerwy pomiędzy cyklami pozwalają w pełni na odnowę hematopoezy, tak iż wyjątkowo toksyczności szpikowe zaburzają planowy tok leczenia, lub zmuszają do redukcji dawek merkaptopuryny, podawanej również w leczeniu konsolidacyjnym ALL (111,152, 223, 234).

W obecnie przedstawianym badaniu także potwierdzono bezpieczeństwo stosowania Mtx w dawce 2 g/m² i 3 g/m², powtarzanego czterokrotnie co 2 tygodnie u dzieci w remisji ALL. Obserwowane toksyczności szpikowe nie były nasilone, występowały z porównywalną niską częstością po cyklach Mtx w obu dawkach, dlatego ten typ toksyczności pominięto w szczegółowych analizach.

Wieloletnie doświadczenia ze stosowaniem Mtx w różnie wysokich dawkach systemowych u dzieci dowiodły, że tolerancja przez nie kilkugramowych dawek leku jest dobra. Dotyczy to także terapii skojarzonej ze stosowaniem innych cytostatyków, jak ma to miejsce w chłoniakach lub białaczkach wysokiego ryzyka, a nawet tak ekstremalnych sytuacji, jak leczenie dzieci po przeszczepieniu wątroby lub usunięciu jednej nerki (1, 11, 12, 21, 118, 183, 184, 214, 215, 228, 234, 245). Bardzo wysokie dawki Mtx, takie jak 33,6 g/m², testowane przez amerykańską pediatryczną grupę CCG, wiązały się już ze znacznymi toksycznościami ze strony szpiku i wątroby oraz poważnymi zakażeniami, co zdecydowało o zaniechaniu ich stosowania (149). Zdarza się jednak, że w ekstremalnych sytuacjach, celem przełamania oporności, stosowane są jeszcze wyższe dawki Mtx. W jednej z prac dotyczącej dorosłych, opisano terapię z użyciem tego leku w dawce 50 g/m², podawanej w 6-godzinnych wlewach dożylnych w leczeniu zaawansowanych postaci różnych nowotworów. Nie opisano poważniejszych powikłań, a obserwowany u 81% leczonych wzrost stężenia transaminaz w surowicy miał charakter przejściowy (182).

Wczesne objawy toksyczne w przebiegu stosowania HD-Mtx, choć zwykle w pełni odwracalne, dotyczą znaczącego odsetka leczonych, pomimo wystandaryzowania monitorowania tej terapii i stosowania, gdy tylko jest to konieczne, wysokich dawek leukoworyny (9, 24, 38, 39, 71, 75,

206, 210, 223). W przypadku zaburzonej eliminacji Mtx ostre toksyczności leczenia są związane nie tylko z przedłużoną ekspozycją na lek. Wydaje się, że zarówno na ich występowanie, jak i nasilenie ma wpływ znacznie więcej czynników, w tym m.in. indywidualnie zmienna, uwarunkowana genetycznie wrażliwość osobnicza. Także immunofenotyp białaczki i indeks DNA mają tu kluczowe znaczenie. Wiele badań eksperymentalnych i klinicznych dowiodło, że blasty prekursorów limfocytów linii B akumulują znacząco więcej poliglutaminianów Mtx niż linii T lub mieloidalnej (11, 67, 69, 124, 158, 170, 190, 225, 270). Również hiperdiploidalne postacie ALL, związane zwykle z obecnością dodatkowego chromosomu 21 (kodującego główne białko nośnikowe Mtx – RFC) i chromosomu 9 (kodującego syntazę poliglutaminianów folianowych) są bardziej wrażliwe na działanie oraz toksyczności Mtx (11, 14, 67, 69, 74, 105, 125, 133, 135, 158, 170, 225, 252, 270). Z kolei we wznowie choroby obserwuje się zwykle oporność na wiele cytostatyków, w tym także Mtx podawany w wysokich dawkach. Wśród nabytych mechanizmów oporności na lek wymienia się: niższą akumulację leku w komórkach, związaną z mniejszą aktywnością RFC, amplifikację genu MTHFR i wyższą aktywność kodowanego przez niego enzymu, osłabioną syntezę lub przyspieszony rozpad poliglutaminianów. W obserwowanej oporności wielolekowej kluczową rolę przypisuje się natomiast aktywności rodziny białek MRP, warunkujących funkcję ATP-zależnej pompy intensywnie usuwającej cytostatyki z wnętrza komórek docelowych (11, 21, 69, 88, 105, 135, 177, 188, 219, 245, 250).

Wśród czynników odpowiedzialnych za ostre toksyczności terapii główne znaczenie przypisuje się wysokości dawki, a przede wszystkim czasowi ekspozycji na stężenie terapeutyczne Mtx (18, 46, 87, 168, 175, 215, 234, 245, 258). Zaburzenie drugiej, wolnej fazy eliminacji naraża pacjentów na przedłużoną ekspozycję na lek i ma być odpowiedzialne za większość bliskich toksyczności terapii. W wielu badaniach dowiedziono, że przedłużone (24-36 godzinne) wlewy Mtx w pośrednich dawkach ($0,5 - 1 \text{ g/m}^2$) są równie, lub nawet bardziej toksyczne, niż kilkugodzinna podaż wysokich (kilkugramowych) dawek (11, 18, 21, 36, 95, 234, 258, 263). Za ten efekt odpowiedzialna jest większa liczba zdrowych komórek objętych działaniem cytostatyku, po ich naturalnym wejściu w fazę S cyklu komórkowego (18, 36).

Zgony, wynikające z ostrej toksyczności leczenia HD-Mtx, opisywane są incydentalnie, zwłaszcza w pracach z końca lat 70., kiedy wypracowywano dopiero zasady bezpiecznej realizacji tej terapii. Dziś przeważa opinia, że w przeciwieństwie do innych cytostatyków, których toksyczność zależy wprost od dawki, Mtx może być stosowany w łączności z leukoworyną (a w ekstremalnych przypadkach z Carboxypeptydazą) w szerokim zakresie dawek, bez ryzyka wywoływania zagrażających życiu toksyczności (1, 9, 18, 36, 116, 168, 182, 206,

214, 234). W pracy z końca lat 70., dotyczącej zastosowania Mtx w dawce: 1,5–10 g/m² w leczeniu 43 dzieci z mięsakiem kościopochodnym, opisano zgony z toksyczności wśród 7% leczonych (162). W innej publikacji z podobnego okresu przedstawiono, że zakończone zgonem powikłania septyczne wystąpiły u 6% pacjentów leczonych HD-Mtx (246). Prace z lat późniejszych nie sygnalizują tego problemu.

W materiale własnym, dotyczącym 218 dzieci, u których zrealizowano łącznie 853 cykle, zagrażające życiu powikłania dotyczyły 2,3% leczonych i 0,6% chemioterapii (2 przypadki ostrej niewydolności nerek, 2 ciężkie zapalenia śródmiąższowe płuc, 1 ciężki przebieg posocznicy). U żadnego jednak dziecka nie doszło w przebiegu tych powikłań do zgonu.

8.1. Objawy toksyczne ze strony wątroby

Wysokie systemowe dawki Mtx, podobnie jak przewlekła terapia niskimi dawkami tego leku, powodują często przejściowe podwyższenie stężeń aminotransferaz, a rzadziej bilirubiny całkowitej w surowicy. Z reguły to powikłanie nie jest nasilone, a jego przejściowy charakter umożliwia planowy tok dalszego leczenia (11, 36, 99, 126, 129, 215, 234, 257, 260).

W literaturze opisywane są przypadki potwierdzonego histologicznie procesu włóknienia miąższu wątroby, dotyczy to jednak zwykle długotrwałego stosowania niskich dawek Mtx, u pacjentów z udokumentowanymi znacznymi toksycznościami (11, 260). W jednej z prac nie wykazano bezpośredniego wpływu wysokości dawki kumulacyjnej Mtx, podawanego przewlekłe w leczeniu łuszczycy u 63 pacjentów, na stopień toksyczności wątrobowych, polegających na wzroście stężenia transaminaz w surowicy, co dotyczyło 32% chorych (42). Z kolei w jednym z badań prospektywnych podniesiono rolę wcześniejszej dysfunkcji wątroby w podatności na hepatotoksyczność HD-Mtx. Autorzy, oceniając grupę 68 dzieci z ALL leczonych Mtx w dawce 5 g/m², obserwowali jedynie u 1,47% ostre objawy toksyczne ze strony wątroby (126). Jedna z cytowanych już wcześniej prac opisuje dobrą tolerancję cytostatyku, stosowanego w dawce 1,5–10 g/m², w leczeniu dzieci z mięsakiem kościopochodnym. Na 349 zrealizowanych chemioterapii, powikłania ze strony wątroby stwierdzono zaledwie po 8,6% cykli, jednak 3 spośród 43 pacjentów zmarło z powodu toksyczności (162). W innej pracy, oceniającej u dzieci bliską toksyczność 22 cykli Mtx w dawce 6-8 g/m², przemijający wzrost stężenia aminotransferaz stwierdzono w przebiegu 27% cykli (214). W krajowym doniesieniu, dotyczącym 161 chemioterapii Mtx w dawce 12 g/m², wykazano związek między toksycznościami wątrobowymi w stopniu 1.- 4., jako dominującym powikłaniem (po około 79% cykli), a zaburzeniem eliminacji leku (215). Podobnie jak w innej polskiej pracy, autorzy wyrażają obawę, że nawracające epizody toksycznego zapalenia hepatocytów mogą być związane z niepełną regeneracją miąższu wątroby, a nawet z jej włóknieniem (215, 260).

W interesującym opracowaniu z dwu krajowych ośrodków pediatrycznych, oceniającym tolerancję Mtx w dawce 1 g/m² (53 dzieci z ALL) oraz 5 g/m² (14 pacjentów z chłoniakami), opisano istotny ($p < 0,0007$) wzrost stężeń GOT oraz spadek stężeń białka całkowitego ($p < 0,0003$) po cyklach w porównaniu do ich wyjściowych wartości. Zaburzenie funkcji wątroby, podobnie jak w doniesieniach innych autorów było przejściowe (257).

Obserwowane w materiale własnym toksyczności ze strony wątroby należały do najczęstszych rejestrowanych bliskich powikłań chemioterapii HD-Mtx. Definiowane jako: wzrost aktywności dwu enzymów wątrobowych – GOT i GPT, wzrost stężenia bilirubiny całkowitej, lub spadek - zależnych od ich produkcji wątrobowej - stężeń białka całkowitego i albumin w surowicy leczonych, zostały ocenione łącznie w 829 cyklach z oboma dawkami leku. Tak rozumiane toksyczności wątrobowe zaznaczały się najwyraźniej w 3 - 7 dniu od rozpoczęcia wlewu HD-Mtx, były przejściowe i nie miały wpływu na ogólny stan kliniczny pacjentów. Wszystkie te laboratoryjne wykładniki dysfunkcji wątroby, analizowane łącznie, dotyczyły około 1/3 cykli oraz aż 60% leczonych oboma HD-Mtx. W odniesieniu do aktywności aminotransferaz i bilirubiny całkowitej, toksyczności wątrobowe spełniały najczęściej kryteria 1. i 2. stopnia toksyczności wg skali NCI-CTC, a tylko incydentalnie (3 % cykli), w przypadku niższej dawki leku – stopni 3. lub 4. Niespodziewanie, tak definiowane zaburzenie funkcji wątroby miało miejsce istotnie częściej ($p = 0,024$) w przebiegu cykli z niższą dawką (2 g/m²) leku, niezależnie od sprawności wydalania Mtx. Zaburzenie klirensu Mtx nie miało wpływu na istotny wzrost częstości występowania tego rodzaju toksyczności. Natomiast stwierdzono związek częstości występowania hepatotoksyczności ze stopniem odżywienia pacjentów. Znacząco częściej ($p = 0,02$) ten rodzaj powikłań dotyczył dzieci szczupłych (BMI < 25 percentyla), występując w tej grupie w przebiegu 40,7% realizowanych chemioterapii, w porównaniu z około 29% cykli u pacjentów normo- i hyperstenicznych (BMI > 75 percentyla). Nieliczne prace dotyczące tego aspektu bliskiej toksyczności Mtx (83, 85) nie potwierdzają jednak tego spostrzeżenia.

W analizie, mającej na celu wyłonienie parametrów biochemicznych określających czynność wątroby i najbardziej reagujących na terapię HD-Mtx, największe zmiany dotyczyły stężeń albumin i białka całkowitego w surowicy, które istotnie obniżały się ($p = 0,0001$), niezależnie od dawki i czasu ekspozycji na Mtx (tabela 27). Obserwację tę można wiązać z zaburzeniem produkcji wątrobowej albumin i innych białek syntetyzowanych w tym narządzie, przejściowo uszkodzonym skutkiem chemioterapii HD-Mtx. Większa dynamika zmian obu tych parametrów dotyczyła cykli z Mtx podanym w niższej dawce (rysunek 26 i 27). Być może było to spowodowane faktem, iż grupa leczona Mtx w dawce 2 g/m² istotnie różniła się pod względem BMI – znacząco częściej ($p = 0,01$) w porównaniu z leczonymi wyższą dawką Mtx były w niej

dzieci szczuplejsze (tabela 3). Średnie stężenia albumin, jak i białka całkowitego w surowicy przed cyklami z Mtx w dawce 2 g/m² były jednak istotnie wyższe, niż średnie ich wartości sprzed cykli z dawką 3 g/m² (p odpowiednio: 0,008 i 0,005), co może wskazywać na większy stopień uszkodzenia wątroby u leczonych wyższą systemową dawką leku. Podobne wnioski nasuwa analiza zmian średnich stężeń bilirubiny całkowitej, pod wpływem chemioterapii HD-Mtx. W badaniu stwierdzono istotny wzrost stężeń bilirubiny całkowitej w surowicy, niezależnie od stosowanej dawki leku i sprawności jego eliminacji. Różnica ta była istotnie bardziej nasiloną w przypadku wyższej dawki Mtx. Niezależnie od sprawności wydalania cytostatyku, średnie stężenia bilirubiny całkowitej przed, jak i po cyklach Mtx były wyższe (p=0,0001) w przypadku leczenia dawką 3 g/m², co przemawia, podobnie jak w przypadku albumin i białka, za większą toksycznością w stosunku do wątroby wyższej dawki cytostatyku (rysunek 28).

W opracowaniach, dotyczących mechanizmu działania oraz toksyczności Mtx, zaznacza się, że wysokie dawki cytostatyku zaburzą produkcję białek (18, 21, 57), co zaobserwowano również w badaniu własnym. Jednak większość prezentowanych w piśmiennictwie analiz skupia się nie tyle na zmianach stężeń albumin lub białka całkowitego w surowicy, co na czynnikach krzepnięcia syntetyzowanych w wątrobie. Obserwowane w przebiegu terapii HD-Mtx obniżenie stężeń: białka C i S, AT III oraz wydłużenie APTT, ulegało normalizacji około jednego tygodnia od zakończenia chemioterapii i nie miało konsekwencji klinicznych (70, 233).

Stężenia transaminaz: GOT i GPT zachowywały się w materiale własnym bardzo zmiennie; wzrastały lub obniżały się, niezależnie od dawki i sprawności wydalania leku. Istotny wzrost stężeń GOT (p=0,002) odnotowano jedynie w przypadku prawidłowej eliminacji Mtx podanego w dawce 2 g/m². Natomiast lek w dawce wyższej (3 g/m²) powodował w przebiegu większości cykli istotny statystycznie spadek stężeń tej aminotransferazy (p=0,033). Przedłużenie ekspozycji na Mtx, niezależnie od dawki leku wywołało - paradoksalnie - często obniżenie stężenia GOT w surowicy (rysunek 29). W przypadku GPT zaobserwowano jeszcze bardziej wyraźny brak wpływu dawki cytostatyku na wzrost stężeń tej aminotransferazy, gdyż w trakcie cykli Mtx w dawce 3 g/m² w większości przypadków stwierdzono, odwrotnie jak w przypadku dawki 2 g/m², spadki wartości tego enzymu. Identycznie zmieniała się aktywność GPT w surowicy, w przypadku zaburzonego wydalania leku.

Na podstawie analizy materiału własnego nie odnotowano zatem jednoznacznego wzrostu stężeń obu aminotransferaz w surowicy pacjentów, w trakcie leczenia HD-Mtx. Takie dane przedstawione są w większości publikacji poświęconych bliskim toksycznościom terapii zarówno niskimi, jak wysokimi dawkami Mtx, choć jednocześnie podkreślony jest zwykle

przemijający charakter wzrostu aktywności aminotransferaz w surowicy (12, 18, 21, 36, 85, 129, 155, 162, 175, 182, 184, 209, 214, 215, 234, 245).

Choć wyniki badań własnych nie wykazały jednoznacznie toksycznego wpływu terapii HD-Mtx w dawkach 2 – 3 g/m² na funkcję wątroby, w zakresie stężeń dwu podstawowych aminotransferaz, to monitorowanie jej funkcji w trakcie chemioterapii Mtx jest konieczne, zwłaszcza w przypadku przedłużonego działania cytostatyku. Dotyczy to, poza GOT i GPT również kontroli stężeń białka całkowitego, albumin oraz bilirubiny całkowitej w surowicy leczonych. Obserwacje własne i doniesienia z literatury podkreślają fakt szczególnego narażenia niektórych pacjentów na toksyczność ze strony wątroby oraz znaczenie powtarzającej się chemioterapii na obciążenie tego narządu. Niektórzy autorzy podkreślają, że terapia HD-Mtx może także wpływać na zaburzenie procesów oksydacyjnych w hepatocytach, nasilać toksyczność wielu leków metabolizowanych w wątrobie oraz powodować postępujący proces włóknienia tego narządu, co zdarza się jednak częściej w przypadku długiego stosowania niskich dawek tego cytostatyku (11, 18, 36, 215, 256, 260).

8.2. Nudności i wymioty

Jedną z częstszych bliskich toksyczności klinicznych, związanych z leczeniem HD-Mtx, są nudności i wymioty, których nasilenie nie zawsze koreluje z zaburzeniem eliminacji leku, a zależy w dużym stopniu od indywidualnej wrażliwości leczonych (11, 21, 36, 234). Jednak niewiele opracowań dotyczących bliskich powikłań terapii HD-Mtx wymienia wśród nich nudności i wymioty, a wśród wymienianych działań prewencyjnych, zabezpieczających przed ryzykiem ostrych toksyczności HD-Mtx, obok monitorowania funkcji nerek i eliminacji leku, nawodnienia z alkalizacją rzadko wymieniane jest postępowanie antiemetogenne (11, 18, 21, 36, 129, 155, 234). Najprawdopodobniej wysokość najczęściej stosowanych dawek systemowych leku nie odgrywa zasadniczej roli w nasileniu nudności i wymiotów. Wśród opisanych bliskich powikłań ekstremalnie wysokich dawek leku, takich jak 33,6 g/m², nie wymieniono tego rodzaju toksyczności (149). W pracy dotyczącej dorosłych, leczonych dawką 50 g/m² wymioty, choć nie nasilone, dotyczyły jednak 66% cykli (182). Jedno z doniesień, poświęconych 4-godzinnym wlewom Mtx w dawce 5 g/m², podkreśla wpływ wysokich stężeń tego leku w surowicy, uzyskiwanych po zakończeniu podaży cytostatyku, na większe ryzyko nasilonych nudności i wymiotów (5). W krajowym opracowaniu, dotyczącym tolerancji Mtx w dawce 12 g/m², stosowanego w leczeniu dzieci z mięsakiem kościopochodnym, na podstawie analizy 161 cykli przedstawiono, że ten rodzaj bliskiej toksyczności wystąpił w 3,1% chemioterapii (215).

W obecnym badaniu, którym objęto 276 cykli Mtx w dawce 2 g/m^2 i 553 cykle w dawce 3 g/m^2 , podobnie jak w innych pracach, najczęstszą kliniczną toksycznością były nudności i wymioty, obserwowane od 1 doby chemioterapii. Ich częstość zależała od zastosowanej dawki Mtx, która wiązała się także z jedno- lub trójkową terapią dokanałową (aneks 1). Trudno ocenić na ile nudności i wymioty były powikłaniem związanym z wysoką dawką systemową Mtx, a na ile z równoczesną terapią dokanałową, a także z techniką jej wykonania. W analizie, którą objęto 829 cykli z Mtx w dwóch dawkach (2 g/m^2 i 3 g/m^2), trójkowa terapia dokanałowa związana z wyższą systemową dawką leku łączyła się z istotnie częstszym ($p=0,019$) występowaniem wymiotów (tabela 28). Ogólnie nudności i wymioty, najczęściej w stopniu 1. i 2. w skali NCI-CTC, dotyczyły 53% dzieci leczonych Mtx w dawce 3 g/m^2 i 44% leczonych Mtx w dawce 2 g/m^2 oraz około 1/3 cykli z zaburzonym klirensu leku. Niewątpliwie czynnikiem, który istotnie zwiększał częstość występowania tego powikłania w trakcie realizacji chemioterapii, było zaburzenie klirensu Mtx. Różnica ta była wyraźniejsza w przypadku wyższej dawki leku ($p=0,0001$), ale i dla dawki 2 g/m^2 wykazano istotność statystyczną ($p=0,024$). Nasilenie nudności i wymiotów zależało również od czasu ekspozycji na Mtx, gdyż wyższe stopnie tych powikłań (stopień 2., a zwłaszcza 3. w skali NCI-CTC) były znacząco związane z zaburzonym wydalaniem leku (rysunek 33), co znalazło szczególny wyraz w dwóch przypadkach ostrej niewydolności nerek.

W analizie materiału własnego, obejmującej łącznie 829 cykli z obu dawkami Mtx, wykazano związek częstości występowania tego powikłania z wiekiem leczonych. Istotnie częściej nudności i/lub wymioty odnotowano u najstarszych dzieci (ponad 10-letnich), co dotyczyło około 1/3 zrealizowanych w tej grupie wiekowej chemioterapii. Wśród najmłodszych pacjentów (w wieku 1 - 4 lat) to powikłanie wystąpiło w trakcie 15% cykli. W analizie, z użyciem testu chi-kwadrat Pearsona, częstość nudności i wymiotów w trakcie chemioterapii HD-Mtx wzrastała liniowo wraz z wyższym wiekiem leczonych dzieci, a różnice między trzema grupami wiekowymi były istotne statystycznie ($p=0,001$).

8.3. Powikłania infekcyjne

Wśród bliskich toksyczności chemioterapii HD-Mtx zakażenia nie są wymieniane w literaturze jako typowe powikłania. Konsolidacja remisji ALL-SR u dzieci, której filarem jest Mtx stosowany w kilkugramowych dawkach w dobowych wlewach jako monoterapia (pomijając merkaptopurynę podawaną doustnie w niskich dawkach), stanowi po leczeniu indukcyjnym okres wyraźnie łagodniejszej chemioterapii. Mielosupresja, zwykle pod postacią leukopenii w tym okresie leczenia występuje bardzo rzadko, a jeśli się zdarza to trwa krótko i nie jest nasiloną

oraz wiąże się zwykle z przedłużoną ekspozycją na lek (11, 21, 31, 143, 152, 162, 175, 182, 215, 222, 223, 234, 262, 263). Miało to miejsce również w materiale, poddanym obecnej analizie.

Niewiele jest doniesień na temat znaczenia udokumentowanej immunosupresji na tym etapie leczenia. Aby w pełni ocenić wpływ terapii HD-Mtx na nasilenie powikłań infekcyjnych, należałoby zaplanować prospektywne badania oceniające status immunologiczny pacjentów i częstość oraz nasilenie zakażeń występujących na różnych etapach terapii ALL. Doniesienia z literatury o występujących w trakcie leczenia HD-Mtx powikłaniach infekcyjnych są bardzo skąpe. Opisane 4 przypadki ciężkiego przebiegu śródmiąższowego zapalenia płuc, w rozwoju którego obok udziału wirusów mogła mieć udział reakcja alergiczna na Mtx, dotyczyły stosowania niskich dawek leku u pacjentów w remisji ALL, prawdopodobnie w immunosupresji wywołanej długim wcześniejszym leczeniem (123). Nathan pisze o dużej liczbie powikłań septycznych po zastosowaniu Mtx w ekstremalnych dawkach $33,6 \text{ g/m}^2$ (55). Doświadczenie Balisa z tą samą dawką leku u 22 dzieci z ALL nie potwierdziło jednak tych spostrzeżeń (12). W innej publikacji, dotyczącej 21 cykli z Mtx w dawce 5 g/m^2 po 1 cyklu ze znacznie zaburzoną eliminacją leku doszło do posocznicy (259).

W badaniu własnym, obejmującym łącznie 829 chemioterapii, częstość zakażeń była istotnie większa w przypadku wyższej dawki leku ($p=0,008$) oraz wyraźnie rosła w sytuacji przedłużonej ekspozycji na lek. Dotyczyła wówczas aż $1/5$ chemioterapii Mtx w dawce 2 g/m^2 i $1/3$ cykli z dawką wyższą. W przypadku dawki 3 g/m^2 opóźniona eliminacja leku istotnie zwiększała ($p=0,026$) częstość tych powikłań (tabela 28). Poważniejsze zakażenia (w stopniu 2. i 3.) były bardzo rzadkie, występowały z podobną częstością w przypadku obu dawek i znamienne częściej w sytuacji zaburzonej eliminacji Mtx. Powikłanie to dotyczyło, niezależnie od klirensu leku istotnie częściej ($p=0,027$) dzieci leczonych wyższą dawką Mtx (tabela 30). Zagrożające życiu zakażenia wystąpiły u 1,38% leczonych, w przebiegu 0,36% cykli chemioterapii. U dwojga dzieci ciężkie zapalenie śródmiąższowe płuc wymagało leczenia w oddziałach intensywnej terapii i wspomagania oddechu, u innego pacjenta ciężki przebieg miała posocznica. Należy podkreślić, że w czasie terapii HD-Mtx zrealizowanej na etapie konsolidacji remisji u 218 dzieci z ALL-SR na przestrzeni 14 lat, nie zmarł żaden pacjent. Opisywane w literaturze, na tym etapie leczenia, zgony dzieci dotyczą pojedynczych przypadków ciężkiego przebiegu zakażeń, często mających związek ze znacznie przedłużonym wydalaniem Mtx (18, 162, 234, 246, 264).

8.4. Zapalenie śluzówek przewodu pokarmowego i odczyn ze strony skóry

Stan zapalny śluzówek, oceniany na podstawie ich wyglądu w jamie ustnej jest najczęstszą, obok nudności, kliniczną toksycznością, zależną w mniejszym stopniu od wysokości HD-Mtx, a

głównie od czasu ekspozycji na cytotoksyczne stężenia cytostatyku (5, 11, 18, 21, 31, 99, 130, 160, 178, 182, 183, 209, 234, 259, 262, 263). Zauważalna jest jednak także indywidualna predyspozycja do występowania tego powikłania jak i jego nasilenia, podobnie jak jest to obserwowane w przypadku wymiotów. Szczególnie wyrażone toksyczności śluzówkowe opisywane są po cyklach z ekstremalnie zaburzonym wydalaniem leku, w przypadkach ostrej niewydolności nerek w trakcie chemioterapii HD-Mtx (71, 80, 121, 164, 210).

Nowym, niezwykle skutecznym lekiem, w przypadkach nasilonych (stopień 3. i 4. wg NCI-CTC) toksyczności śluzówkowych jest palifermin, ograniczający stopień i czas trwania odczynów, jak i wikłających je zakażeń (199). Nie był on jednak dostępny w okresie realizacji chemioterapii HD-Mtx ocenianej w badaniu własnym.

W pracy analizującej bliskie toksyczności 349 cykli z Mtx w dawce: 1,5 - 10 g/m², zastosowanym u 43 dzieci z mięsakiem kościopochodnym, stan zapalny śluzówek dominował wśród obserwowanych toksyczności i dotyczył 8,6% cykli. Na jego nasilenie miała wpływ wyższa dawka kumulacyjna cytostatyku i wyższy (powyżej 15 r.ż.) wiek pacjentów (162). W innym doniesieniu podkreślono fakt, że zapalenie śluzówek występuje często również przy prawidłowej eliminacji Mtx stosowanego w dawce 5 - 8 g/m² (223). W innej pracy wykazano, że zapalenie śluzówek dotyczyło aż 39% cykli z prawidłowym wydalaniem leku i nie korelowało ze stężeniem leku w ślinie leczonych dzieci (176). Jest to zgodne także ze spostrzeżeniami z obecnie przedstawianego materiału, że istnieją pacjenci reagujący nasilonymi toksycznościami śluzówkowymi po każdym cyklu HD-Mtx, niezależnie od sprawności wydalania leku. Analiza obejmująca 481 chemioterapii z Mtx w dawce 0,9 - 3,7 g/m² u 134 dzieci z ALL wykazała (bez precyzowania związku ze sprawnością wydalania leku), że umiarkowane zapalenie śluzówek wystąpiło po 26% cykli (183). W innej pracy, dotyczącej dobowych wlewów Mtx w dawce 3 g/m² u 49 dzieci z ALL, podkreślono kluczowe znaczenie przedłużonej ekspozycji pacjentów na cytotoksyczne stężenia Mtx na rozwój tego powikłania. Autorzy odnotowali ten rodzaj toksyczności aż u 49% dzieci, a nasilenie stanu zapalnego śluzówek u 83% oceniono jako 1. lub 2. stopień (130). Inne opracowania podają mniejszą, kilku- lub kilkunastoprocentową częstość tego powikłania (214, 215).

Toksyczne odczyny skórne opisywane są w literaturze niezwykle rzadko. W dwu doniesieniach na ten temat przedstawiono opis trzech przypadków tzw. reakcji Burgdorfa, polegającej na zmianach rumieniowo-pęcherzowo-luszczących skóry dłoni i płaców, po przedłużonej eliminacji Mtx (251, 261). Inna kazuistyczna praca opisuje bolesne zmiany rumieniowe palców dłoni i stóp, z następowym łuszczeniem naskórka, jakie wystąpiły u 1,5% dzieci leczonych Mtx w dawce 3 - 8 g/m². Pacjenci prawidłowo eliminowali Mtx, zmiany ustępowały w ciągu tygodnia, a

kolejne cykle nie powodowały takich toksyczności (140). Opisano również dramatyczny przebieg toksycznego martwiczego odczynu skórno u 15-letniego chłopca, leczonego Mtx w dawce 5 g/m^2 (wydalany w sposób przedłużony), skojarzonym z równoczesną podażą biseptolu. Uogólnione pęcherzowo-wrzodziejące zmiany skórne, powikłane nadkażeniem, objęły 90% powierzchni ciała i doprowadziły do zgonu wśród objawów wstrząsu septycznego (264).

W literaturze znaleźć można także rzadkie opisy uogólnionych odczynów alergicznych na Mtx, mających postać rashes, obrzęków, niekiedy manifestacji płucnej z kaszlem i dusznością, wynikających ze zmian zapalnych drobnych naczyń krwionośnych i objawów przesiekania - leczonych skutecznie sterydami i lekami antyhistaminowymi obu generacji (49, 123, 265).

W materiale własnym, na podstawie oceny 829 cykli z HD-Mtx zrealizowanych u 218 dzieci, częstość zapalenia śluzówek jamy ustnej, pomimo wcześnie wdrażanego postępowania pielęgnacyjno-dietetycznego, dotyczyła znacząco częściej ($p=0,008$), niezależnie od sprawności wydalania leku, pacjentów otrzymujących wyższą dawkę systemową (tabela 30). Powikłanie to, w różnym nasileniu, obserwowano u 15,3% dzieci, leczonych dawką 2 g/m^2 , w porównaniu do 32,2% pacjentów, którzy otrzymywali Mtx w dawce 3 g/m^2 . Przedłużona eliminacja była czynnikiem istotnie zwiększającym zarówno częstość występowania, jak i stopień nasilenia zapalenia śluzówek (odpowiednio: $p=0,03$ i $0,05$), w przypadku obu stosowanych dawek. Maksymalne nasilenie zapalenia śluzówek nie przekroczyło 3. stopnia w skali NCI-CTC. W analizie z zastosowaniem testu chi-kwadrat Pearsona wykazano istotną zależność ($p=0,029$) częstości zapalenia śluzówek jamy ustnej od wieku leczonych. Blisko dwukrotnie częściej powikłanie to dotyczyło cykli (16,4 %) przeprowadzonych w grupie najstarszych dzieci (powyżej 10 r.ż.), w porównaniu do dwu grup młodszych pacjentów (9,5 % i 8,4 % cykli). Obserwacja ta koreluje ze spostrzeżeniami innych autorów oraz faktem większego narażenia starszych dzieci na przedłużone wydalanie leku (9, 54, 88, 107, 153, 162, 249).

Biegunki występowały rzadko i dotyczyły w odniesieniu do obu dawek Mtx 2 g/m^2 i 3 g/m^2 odpowiednio: 13,9 % i 12,3 % leczonych. Wyższa dawka cytostatyku nie zwiększała częstości ich występowania (tabela 30). Biegunki, obok toksycznego działania Mtx, w części były spowodowane zakażeniem. W przypadku Mtx w dawce 2 g/m^2 częstość ich występowania była istotnie wyższa ($p=0,023$) przy zaburzeniu eliminacji Mtx. Nasilenie tego powikłania oceniano zwykle jako 1. lub 2. stopień.

Toksyczności skórne w obecnie przedstawianym materiale, podobnie jak w literaturze były rzadkie i nie przekraczały 2. stopnia w skali WHO. Niezależnie od sprawności wydalania Mtx powikłanie to obserwowano u 5,6% leczonych dawką 2 g/m^2 oraz 9,6% dzieci leczonych dawką 3 g/m^2 . Różnice między grupami nie były istotne statystycznie ($p=0,309$). W przypadku

zaburzonej eliminacji Mtx częstość występowania toksyczności skórnych była wyższa, a istotne różnice dotyczyły tylko niższej dawki leku ($p=0,05$).

8.5. Ostre toksyczności ze strony ośrodkowego układu nerwowego

Eliminacja profilaktycznej RT mózgowia u większości dzieci z ALL znacząco ograniczyła częstość zarówno ostrych, jak i odległych powikłań ze strony układu nerwowego. Mtx podany w wysokich dawkach systemowych rzadko wywołuje ostre objawy toksyczne, odpowiadające 3. stopniowi w skali NCI-CTC, jednak opisy takich powikłań należą do liczniejszych w literaturze (36, 60, 92, 108, 115, 118, 138, 143). Na podstawie danych literaturowych, częstość ostrych toksyczności ze strony OUN oceniana jest w granicach 5 - 15% cykli z HD-Mtx (11, 36).

Symptomatologia ostrych, lub podostrych toksyczności ze strony układu nerwowego obejmuje objawy mielo- i encefalopatii (drgawki i niedowłady) lub nasilonego odczynu zapalnego ze strony pajęczynówki. Za ich powstanie obciąża się zaburzenie metabolizmu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i zależnej od nich syntezy neurotransmiterów mózgu, niedobór zredukowanych folianów, a zwłaszcza szkodliwy wpływ homocysteiny, której metylację i przemianę w metioninę blokuje Mtx (18, 21, 56, 111, 115, 141, 150, 164, 173, 242).

Homocysteina w wysokim stężeniu uszkadza endotelium naczyń mózgowia, co wywołuje powikłania niedokrwienne. Dodatkowo jej metabolity zaburzają syntezę dopaminy, serotoniny oraz metylację białek niezbędnych w procesie mielinizacji, a jako agoniści receptorów NMDA (N-metyl-D-aspartatu), mogą wywołać drgawki i martwicę neuronów mózgu (56, 104, 115, 141, 173). Opisane mechanizmy leżą u podłoża zmian o charakterze leukoencefalopatii polekowej. W dwu niezależnych badaniach, metodą chromatografii cieczowej potwierdzono wysokie stężenia homocysteiny i jej pochodnych w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z ostrymi objawami neurotoksycznymi po HD-Mtx (56, 173). Nie można także pominąć opinii dotyczących wpływu polimorfizmów wielu enzymów, zaangażowanych w produkcję i funkcjonowanie neurotransmiterów mózgu, na ryzyko takich powikłań (56, 115).

Według autorów jednej z prac, w postępowaniu terapeutycznym oraz profilaktyce ostrych neurotoksyczności HD-Mtx, poza działaniem objawowym, szczególna przydatność przypisywana jest dekstrometorfanowi (acodin), antagoniście receptorów NMDA (56). W innej publikacji rekomendowano łączne zastosowanie trimetyloglicyny (stosowanej w leczeniu homocystynurii) z kwasem foliowym i wysokimi dawkami witaminy B6 (173). Z kolei Cohen, na podstawie przeprowadzonej metaanalizy wyraża pogląd, iż adekwatne zastosowanie leukoworyny może skutecznie zapobiegać neurotoksyczności HD-Mtx, nie osłabiając cytotoksycznego działania leku wobec limfoblastów (38, 39).

W diagnostyce powikłań ze strony OUN szczególnie pomocne są metody obrazowania mózgowia, wśród których najczulszym jest badanie metodą MRI (62, 76, 128, 179, 194, 271). Pojedyncze prace donoszą o przydatności zwolnionego zapisu EEG lub badania PET z użyciem glukozy, której metabolizm w OUN jak i metabolizm mieliny, mają być w tych przypadkach obniżone (48, 112, 113, 211). Do klasycznych obrazów MRI, związanych z encefalopatią po HD-Mtx, wtórną wobec martwiczego zapalenia naczyń, zalicza się zmiany hyperdensyjne w istocie białej okołokomorowej w obrazach T2 zależnych, z typowymi dla leukoencefalopatii zwapnieniami (128, 271). Inne opisy dotyczą przemijającego obrzęku cytotoksycznego istoty białej lub ogniskowej demielinizacji (62, 111).

Ostre toksyczności ze strony OUN, pomimo groźnego nieraz obrazu klinicznego są z reguły przejściowe, co jest zgodne z obserwacjami własnymi. Ostre powikłania obejmują: ogniskowe drgawki, przemijające porażenie połowicze, splątanie, objawy opuszkowe, zaburzenia mowy i widzenia. Objawy pojawiają się do tygodnia od podania HD-Mtx, zwykle ustępują w ciągu kilku dni (rzadko tygodni), umożliwiając planową kontynuację leczenia konsolidacyjnego i nie pozostawiają trwałych objawów ubytkowych (12, 36, 56, 60, 62, 91, 142, 150, 173, 187, 191, 194, 271). Znane jest także zarówno lokalne, jak i systemowe działanie toksyczne Mtx, podanego dokanałowo; do incydentalnych zdarzeń należą nasilone toksyczności, o charakterze ostrej mielopatii (6, 13, 129, 187). Zwykle ostre objawy toksyczne ze strony OUN, związane z punkcją lędźwiową są łagodne i ograniczone do przejściowych nudności i wymiotów, bóli głowy i pleców, sztywności karku lub epizodu gorączki (18, 36, 129).

W jednej z amerykańskich prac z końca lat 80. przedstawiono porównanie skuteczności Mtx w dawce 1 g/m^2 z RT w dawce 18 Gy, połączoną z terapią dokanałową. W badaniu randomizowanym dotyczącym 309 dzieci z ALL drgawki wystąpiły u 1,9% leczonych HD-Mtx oraz u 9,6% pacjentów, u których po RT kontynuowano terapeutyczne nakłucia lędźwiowe (1). W innym badaniu przejściowa podostra encefalopatia, której objawy ujawniały się średnio po 6 dniach od podania HD-Mtx, miała miejsce u 4,8% dzieci z prawidłowym klirensiem tego leku (194). Wiele opracowań przedstawia, że znacznie przedłużona ekspozycja na stężenia cytotoksyczne Mtx w przypadkach ostrej niewydolności nerek w trakcie HD-Mtx, wiąże się z epizodami drgawek lub encefalopatii, podobnie jak z nasilonym zapaleniem śluzówek jamy ustnej (121, 210). Interesujące wnioski formułują autorzy pracy, dotyczącej 33 dzieci z ALL leczonych HD-Mtx. W badaniu prospektywnym zastosowano kilkukrotne obrazowanie mózgowia metodą MRI i testy neuropsychologiczne. Stwierdzono, że leukoencefalopatia nie zależy od wysokości zastosowanej dawki Mtx, lecz od wieku pacjenta i częstości cykli. Dzieci młodsze, których mielina ma mniejszą stabilność, są bardziej podatne na wtórne wobec niedotlenienia uszkodzenia oligodendrogleju. Najbardziej wrażliwa okolica to najpóźniej

mielinizowana wyściółka komórek bocznych okolic czołowo-skroniowych. Często powtarzane cykle z HD-Mtx nie pozwalają na regenerację istoty białej (156). Badacze z francuskiej grupy FRALLE, na podstawie analizy występowania ostrych objawów neurotoksycznych u 3,7 % pacjentów w grupie 1395 dzieci z ALL leczonych Mtx w dawce 1,5 g/m² i 8 g/m², odnotowali natomiast istotną korelację ($p=0,01$) neuropatii rdzeniowej i encefalopatii z wiekiem powyżej 10 r.ż. (60).

W obecnie analizowanym materiale, obejmującym 829 cykli HD-Mtx, nasilone objawy (2. i 3. stopień wg NCI-CTC) toksyczne ze strony OUN (za wyjątkiem nudności i wymiotów) wystąpiły jedynie w przebiegu dwu cykli (0,29%) u dwojga dzieci (0,92%), które otrzymały Mtx w dawce 3 g/m² i trzy leki dokanałowo. U jednego z tych dzieci, przy prawidłowej eliminacji leku doszło do jednorazowego epizodu drgawek kloniczno-tonicznych, które nie pozostawiły żadnych trwałych objawów ubytkowych. U drugiego pacjenta, z obniżonym klirensiem Mtx obserwowano przemijające zaburzenia o charakterze znacznego rozdrażnienia i niepokoju w drugiej dobie chemioterapii. W obu przypadkach obserwowane toksyczności miały charakter jednorazowy i krótkotrwały, nie spowodowały trwałego uszczerbku na zdrowiu leczonych i umożliwiły planową kontynuację leczenia. Typowe objawy podrażnienia opony pajęczkiej (stopień 1. wg NCI-CTC) były rzadkie. W przypadku Mtx w dawce 2 g/m² wystąpiły tylko w przebiegu cykli o prawidłowym wydalaniu leku i dotyczyły 2,2% chemioterapii u 5,6% leczonych. Przedłużona ekspozycja na Mtx, podany w dawce 3 g/m² nasilała częstość objawów podrażnienia opony pajęczkiej (3,1% cykli u 4,8% dzieci), ale różnice między grupami nie były istotne ($p=0,11$). Nudności i wymioty, towarzyszące terapii HD-Mtx omówiono wcześniej (rozdział 8.2).

8.6. Ostra niewydolność nerek

Ostra niewydolność nerek w przebiegu leczenia HD-Mtx występuje bardzo rzadko, ale jest najpoważniejszym ostrym powikłaniem tej terapii, stanowiącym potencjalne zagrożenie życia. Przestrzeganie wszystkich warunków bezpieczeństwa realizacji leczenia HD-Mtx, zgodnie ze znanymi standardami (m.in. prawidłowa funkcja nerek przed cyklem, brak „trzeciej przestrzeni” i interakcji lekowych, hiperhydratacja z forsowaniem diurezy i alkalizacją), nie eliminuje całkowicie ryzyka jej wystąpienia. Udowodniono, że klirens Mtx jest niezwykle osobniczo zmienny i nie zawsze koreluje z klirensiem kreatyniny (lub innymi markerami filtracji kłębuszkowej), którego prawidłowa wartość nie gwarantuje sprawnego wydalania Mtx u danego pacjenta (11, 21, 23, 96, 107, 129, 181, 182, 207, 234, 257). De Vita w renomowanym podręczniku onkologii podaje że, przy zachowaniu wszystkich znanych reguł bezpieczeństwa terapii, ostra niewydolność nerek towarzyszy mniej niż 1% cykli z HD-Mtx (36). Powikłanie to rozwija się w następstwie precypitacji Mtx lub jego metabolitów w moczu, reakcji alergicznej

odpowiedzialnej za śródmiąższowe zapalenie nerek, bądź skutkiem bezpośredniego działania toksycznego leku na cewki nerkowe (11, 36, 94, 129, 197, 234). Opisy tej ostrej toksyczności, dotyczące pojedynczych przypadków można wciąż znaleźć w bieżącej literaturze, ale doniesienia zazwyczaj nie identyfikują czynnika sprawczego tego zaburzenia (116, 121, 146, 216, 254). Przedstawiane są także rzadkie przypadki ostrej niewydolności nerek, występującej w trakcie leczenia Mtx w niskich (np. 225 mg/m²) dawkach (80). Wszystkie doniesienia dotyczące tej ostrej toksyczności narządowej w przebiegu leczenia Mtx podkreślają, iż jest ona całkowicie odwracalna, umożliwia dalszą terapię z zastosowaniem wysokich dawek tego leku oraz nie pozostawia trwałego upośledzenia funkcji nerek (17, 81, 94, 106, 206, 216, 254).

Złotym standardem postępowania w sytuacjach ekstremalnego zaburzenia wydalania Mtx, które pozwala w ciągu minut na bezpieczne obniżenie stężenia tego cytostatyku w surowicy jest zastosowanie Carboxypeptydazy, dobrze tolerowanego przez pacjentów enzymu, niezwykle skutecznie rozkładającego Mtx do DAMPA i kwasu glutaminowego (26, 116, 146, 165, 216, 234, 253, 254, 273). Niestety preparat ten do dziś nie jest dostępny w Polsce. Alternatywą postępowania pozostaje mniej efektywna hemodializa, lub hemoperfuzja, co naraża pacjentów na znacznie dłuższą ekspozycję na Mtx. Pomocne jest stosowanie cholestyraminy, która wiążąc kwasy żółciowe i lek w świetle jelit eliminuje jego krążenie jelitowo-wątrobowe i zwiększa, zwykle mało wydajne, wydalanie leku z żółcią. W zapobieganiu nasilonym toksycznościom skuteczne są wysokie dawki leukoworyny (odtwarzające zasoby folianów) oraz tymidyna (24, 71, 196, 198, 210, 223).

Wśród toksyczności, jakimi skutkuje ekstremalnie przedłużona ekspozycja na cytotoksyczne działanie Mtx, opisywane są: nasilone odczyny zapalne śluzówek, mielosupresja, powikłania septyczne, toksyczności wątrobowe, drgawki i inne objawy encefalopatii (11, 71, 80, 121). W jednej z prac opisano 13 przypadków ostrej niewydolności nerek, leczonej forsowaniem diurezy z alkalizacją i wysokimi dawkami leukoworyny. Nasilona neutropenia dotyczyła 62%, a małopłytkowość 41% pacjentów (71). W innej publikacji, przedstawiającej to powikłanie u 21 dzieci leczonych Mtx w dawce 5 g/m² i 12 g/m², zwrócono uwagę na brak możliwości identyfikacji czynnika wywołującego ostrą dysfunkcję nerek. Wśród nasilonych toksyczności, które dotyczyły łącznie 24% dzieci, u 9,5% stwierdzono ciężką lecz przemijającą encefalopatię (121). Interesujące opracowanie, poświęcone mechanizmowi nefrotoksyczności Mtx u dzieci, przedstawili autorzy prospektywnego badania, w którym oceniono 220 cykli z HD-Mtx w dawce: 1,5 g/m² i 12 g/m² wydalanych prawidłowo. Autorzy zaobserwowali przejściowe zaburzenie funkcji kłębuszków, wyrażające się proteinurią oraz spadkiem wartości GFR, zależne od wysokości dawki leku oraz brak bezpośredniego wpływu HD-Mtx na funkcję cewek

nerkowych (81). Taki efekt sugeruje praca opisująca przejściową poliurię u dwóch pacjentów w trakcie terapii Mtx, która ustąpiła po eliminacji leku z surowicy leczonych. Patomechanizm tego zaburzenia autorzy tłumaczą odwracalną utratą zdolności reabsorpcji płynów przez cewki nerwowe (119). W innej pracy, opisującej przypadek ostrej martwicy cewkowej u 16-letniego chłopca z ALL, podkreślono ewentualną rolę otyłości w etiopatogenezie tego zaburzenia i zaproponowano dostosowywanie wysokości HD-Mtx do korygowanej, a nie rzeczywistej powierzchni ciała leczonych (197).

W materiale własnym, zgodnie z danymi literaturowymi, wykazano rzadkie występowanie ostrej niewydolności nerek w przebiegu terapii HD-Mtx. Wśród 829 ocenionych cykli, to groźne powikłanie wystąpiło w przebiegu dwu chemioterapii (0,29%) z Mtx w dawce 2 g/m^2 u dwóch różnych pacjentów (0,9%). Podobnie jak w większości opisywanych w piśmiennictwie przypadków, powikłanie to było całkowicie nieprzewidywalne, ale też w pełni odwracalne. Stężenia Mtx w surowicy oznaczone w 24. godzinie cyklu, choć w obu przypadkach były wysokie, nie przekraczały wartości krytycznych. U obu pacjentów, z powodu braku dostępności Carboxypeptydazy, zastosowano hemodializę a zadowalającą eliminację cytostatyku osiągnięto dopiero w 9 dobie od początku cyklu. Wśród obserwowanych powikłań najbardziej nasilone były w obu przypadkach: wymioty (3. stopień), toksyczności wątrobowe (3. i 4. stopień), zapalenie śluzówek (1 i 3. stopień), mielosupresja (2. i 3. stopień) oraz u jednego dziecka - posocznica (3. stopień). U żadnego z dzieci nie obserwowano objawów encefalopatii. W obu przypadkach możliwe było dalsze leczenie HD-Mtx, ale w kolejnych cyklach zastosowano preparat innego producenta, a dawkę leku u jednego z dzieci w pozostałych 3 chemioterapiach zredukowano o połowę. Wydalanie cytostatyku w kolejnych cyklach u obojga pacjentów było sprawne, a późniejsze badania potwierdziły w pełni wydolną funkcję nerek.

Na podstawie opublikowanych danych i badań własnych, dwukrotny wzrost stężenia kreatyniny w surowicy krwi w stosunku do wartości wyjściowych należy uznać, obok: znacząco dodatniego bilansu płynowego, nasilonych nudności i wymiotów (3. stopień) oraz wysokiego stężenia leku w surowicy, za najczulszy sygnał ekstremalnie zaburzonej eliminacji Mtx w przebiegu ostrej niewydolności nerek, co może być już obserwowane w drugiej dobie chemioterapii z HD-Mtx (17, 18, 26, 89, 94, 99, 100, 121, 146, 183, 195, 213).

9. Polimorfizm 677C>T MTHFR a eliminacja HD-Mtx oraz nasilenie bliskich toksyczności związanych z terapią konsolidacyjną ALL

9.1. Znaczenie aktywności MTHFR w leczeniu białaczki z zastosowaniem Mtx

Mtx i jego aktywne metabolity zaburzają syntezę puryn i metylację DNA, hamując głównie działanie dwu enzymów: reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) oraz syntazy tymidylowej (TS). Innymi enzymami, zaangażowanymi w działanie Mtx, są m.in.: syntaza metioninowa, reduktaza syntazy metioninowej, transferaza glutationowa i transferaza serynowa. Poliglutaminiany Mtx, powstałe pod wpływem swoistej syntetazy, wykazują silniejsze działanie antymetaboliczne niż sam Mtx. Za rozkład tych związków odpowiada hydrolaza poliglutaminianów. Transport Mtx do komórek zależy od ekspresji nośnika zredukowanych folianów (RFC1), a jego wypływ z nich od aktywności białka oporności na raka piersi (BCRP) i białka oporności wielolekowej (MRP), które są w stanie usuwać z komórek wolny Mtx, lecz nie jego poliglutaminiany. Wgląd w genetycznie uwarunkowany status gospodarki folianowej i indywidualną wrażliwość na antymetabolit kwasu foliowego – Mtx – daje łączna analiza polimorfizmów genowych kilkudziesięciu enzymów i białek, zaangażowanych zarówno w metabolizm, jak i transport oraz działanie tego leku (2, 3, 4, 14, 32, 44, 61, 69, 75, 90, 97, 101, 102, 105, 120, 122, 125, 163, 169, 170, 172, 185, 186, 189, 190, 217, 220, 229, 240, 243, 266, 270). Ocena wpływu nosicielstwa polimorfizmu 677 C>T MTHFR na odmienną wrażliwość na leczenie Mtx i jego bliskie toksyczności, winna więc być połączona z kompleksową oceną wielu polimorfizmów genowych, zaangażowanych w szlak metabolizmu folianów. Badania z zastosowaniem techniki mikromacierzy, skupione na jednoczesnej ocenie genetycznych markerów zdolności akumulacji poliglutaminianów Mtx przez limfoblasty, aktywności MTHFR, TS, wielu innych enzymów szlaku metabolizmu folianów, funkcji białek nośnikowych i.t.p. powinny stać się w przyszłości wzorcowym modelem analiz, w których genetyka wspomagać będzie leczenie onkologiczne.

Jednym z celów niniejszej pracy była ocena wpływu jednego z dwu opisanych polimorfizmów genu MTHFR - 677C>T, warunkującego odmienną aktywność kodowanego enzymu, na tolerancję wysokich dawek Mtx przez dzieci leczone z powodu ALL. Reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa, choć jest tylko jednym z wielu enzymów zaangażowanych w gospodarkę folianową oraz działanie Mtx, odgrywa kluczową rolę, co uzasadnia jej wybór do analiz przeprowadzanych w obecnie przedstawianym badaniu. To jej działanie blokuje Mtx oraz aktywniejsze od niego poliglutaminiany, doprowadzając do niedoboru aktywnych postaci folianów, koniecznych w szlaku syntezy puryn, tymidyny, metylacji DNA i wielu białek (4, 11, 18, 21, 29, 32, 44, 61, 73, 88, 97, 117, 122, 172, 185, 190, 192, 200, 217, 239, 240).

W interesującej pracy z St. Jude Children's Hospital w Memphis przedstawiono wyniki pierwszego opublikowanego badania, którego celem była identyfikacja genów związanych z odpowiedzią *in vivo* na HD-Mtx (217). Lek zastosowano w dawce 1 g/m^2 we wstępnym leczeniu 161 dzieci z nowo zdiagnozowaną ALL. Oceniono ekspresję 50 genów u pacjentów ze złą, lub dobrą odpowiedzią na Mtx, której kryterium była redukcja blastozy obwodowej w trzecim dniu leczenia. Wykazano, że najistotniejszy wpływ na moc antymetabolicznego działania Mtx wywierają trzy geny odpowiedzialne za metabolizm nukleotydowy, replikację oraz naprawę DNA, proliferację i apoptozę komórkową. Spośród tych trzech genów, dwa kodowały aktywność MTHFR i TS - kluczowych enzymów, których funkcja jest blokowana przez Mtx i jego poliglutaminiany. Niska ekspresja obu tych enzymów istotnie korelowała ze złą odpowiedzią na HD-Mtx. Zdaniem autorów powyższej pracy, wyjaśnieniem tego spostrzeżenia może być (zależna wprost od ekspresji MTHFR i TS) obniżona liczba komórek białaczkowych w fazie S cyklu komórkowego, podatnych na wybiórcze działanie Mtx. Co więcej, w grupie pacjentów wysokiego ryzyka wykazano znaczący negatywny wpływ ($p = 0,014$) złej odpowiedzi na Mtx na 5-letni DFS leczonych (217). Niektóre z ostatnio opublikowanych prac przedstawiają istotne dane wskazujące wprost na związek aktywności MTHFR (zależnej od polimorfizmu $677C>T$) z wynikami leczenia ALL u dzieci (44, 114). Przykładowo, badania amerykańskiej grupy badawczej CCG, którymi objęto 40 dzieci z nowo rozpoznaną ALL, przemawiają za korelacją niskiej ekspresji RFC1 ($p < 0,03$) i MTHFR ($p < 0,01$) w komórkach blastycznych z gorszym EFS chorych na białaczkę dzieci (122). Jest to ważne doniesienie, gdyż poprzednie prace, z końca lat 90. wskazywały, iż to zwiększona, nie niższa aktywność MTHFR wiąże się z nabytą opornością na leczenie Mtx (135). Z kolei w pracy z 11 polskich ośrodków onkologii dziecięcej, w której przedstawiono wyniki badań nad 7 różnymi polimorfizmami genowymi, w tym $677C>T$ MTHFR, wykazano istotny związek ($p = 0,028$) homozygotyczności TT z ryzykiem zgonu z powikłań w trakcie leczenia ALL. W grupie 403 przebadanych dzieci najczęstszą przyczyną zgonów były posocznice, krwawienia do OUN i MODS. Hipotetyczną przyczyną większej częstości ww. powikłań chemioterapii u nosicieli alleli T, może być uszkodzenie endotelium (wtórne wobec hiperhomocystynemii), sprzyjające ciężkiemu przebiegowi zakażeń i uszkodzeniu wielonarządowemu, lub zaburzające homeostazę ustrojową upośledzenie metylacji DNA. Autorzy podkreślają równocześnie, podobnie jak badacze cytowanych wcześniej prac, wysoką częstość genotypu TT wśród pacjentów ze wznową choroby (166).

Wyniki licznych opublikowanych dotąd badań, dotyczących wpływu polimorfizmu $677C>T$ MTHFR na wrażliwość na Mtx, przedstawiają na ten temat rozbieżne dane. Niepodważalne pozostaje spostrzeżenie, iż wariant heterozygotyczny CT wiąże się z obniżoną do około 70% aktywnością MTHFR, a homozygoty TT cechuje jeszcze mniej aktywny, termolabilny enzym, o

około 30% efektywności enzymu nosicieli wariantu „dzikiego” CC. Proporcje trzech polimorficznych wariantów 677C>T genu MTHFR różnią się w danej populacji, w zależności od warunków geograficzno-etnicznych i związanej z nimi odmiennej diety różnie bogatej w foliany. Populację środkowoamerykańską, podobnie jak zamieszkującą rejon Morza Śródziemnego charakteryzuje większa częstość allele T, w porównaniu z innymi strefami geograficznymi (33, 44, 117, 180, 192, 208, 237, 238, 241). Są także dane przemawiające za wzrastającą częstością allele T, generalnie w populacji ostatnich dekad XX wieku, co można wiązać z powszechnym stosowaniem przez kobiety ciężarne diety bogatej w foliany.

Uzyskane w obecnie przedstawianej pracy, w wyniku zastosowania standardowej metodyki amplifikacji DNA metodą PCR i elektroforetycznego rozdziału w żelu fragmentów restrykcyjnych, wyniki genotypowania 160 dzieci z ALL spełniły warunki określone prawem Hardy-Weinberga i pozostają zbieżne z częstościami polimorfizmów 677C>T w populacji kaukaskiej (4, 44, 117, 200, 208).

9.2. Polimorfizm 677C>T MTHFR a sprawność eliminacji Mtx

W wielu badaniach wykazano, że hiperdiploidalne postaci ALL, które zwykle wiążą się z obecnością dodatkowej kopii chromosomu 21 (zawierającego gen kodujący RFC1), cechują istotnie wyższe stężenia stacjonarne Mtx w surowicy. Podobna zależność dotyczy nosicieli wariantu A80A genu RFC1 – nośnika zredukowanych folianów, głównego transportera cytostatyku do komórek w organizmie leczonych (75, 97, 120, 172, 229, 270). We wcześniejszej części pracy (rozdział 5) omówiono związek wysokości stężeń stacjonarnych Mtx w surowicy ze sprawnością wydalania tego leku. Natomiast, wynikająca z mutacji, nadekspresja białka oporności na raka piersi (BCRP) powoduje znaczne obniżenie kontrolowanej przez nią akumulacji Mtx i jego aktywnych form, poliglutaminianów, wewnątrz komórek, co wiąże się z opornością na leczenie tym antymetabolitem (101, 172, 243). Zarówno nadekspresja RFC1, jak BCRP, determinując różną ekspozycję leczonych na Mtx, mogą zatem wpływać na eliminację cytostatyku, jak i na uzyskiwane wyniki leczenia.

Uwarunkowana polimorfizmem genowym 677 C>T różna aktywność MTHFR nie powinna jednak, z teoretycznego punktu widzenia, wpływać na sprawność eliminacji Mtx, gdyż enzym ma kluczowe znaczenie w powstawaniu aktywnej postaci folianów, metylacji DNA i homocysteiny, syntezy puryn i tymidyny, ale nie ma żadnego związku z farmakokinetyką czy farmakodynamiką Mtx (4, 11, 18, 21, 32, 44, 97, 117, 122, 154, 163, 172, 217). W literaturze niewiele jest prac poświęconych tej tematyce. Opublikowane badania nad farmakokinetyką Mtx w dawce 3 g/m² w 43 cyklach u dzieci nie wykazały znamiennych różnic w stężeniach leku w

48. godzinie eliminacji u nosicieli polimorfizmów 677C>T MTHFR (209). Jednak można znaleźć badania, przedstawiające dowody na związek polimorfizmu 677C>T genu MTHFR z wydalaniem Mtx z organizmu leczonych. W pracy Imanishi i wsp. z 2007 r. przedstawiono wyniki, świadczące o korelacji genotypu TT ze znacząco wyższymi ($p=0,028$) poziomami Mtx w surowicy w 48. godzinie jego eliminacji (90).

W analizie obecnie prezentowanego materiału, którą objęto 160 dzieci nie stwierdzono wpływu żadnego z wariantów polimorficznych 677C>T genu MTHFR na zaburzenie wydalania HD-Mtx (tabela 24 i rysunek 24).

9.3. Polimorfizm 677C>T MTHFR a bliskie toksyczności terapii HD-Mtx

Związek allele T polimorfizmu 677C>T genu MTHFR ze zwiększonym ryzykiem wad cewy nerwowej i chorobą zakrzepową, wynikający z obniżonej aktywności MTHFR i nasilenia niedoboru zredukowanych folianów oraz zaburzenia metylacji homocysteiny, dowiedziono w wielu badaniach (29, 52, 73, 200, 227, 239, 240). Liczne są także doniesienia dotyczące wpływu genotypu TT na ryzyko zachorowania na ALL i inne nowotwory u dzieci. Przeważają dane, świadczące o protekcyjnym wpływie obecności allele T polimorfizmu 677C>T MTHFR. Zaburzenie metylacji DNA, związane z obecnością allele T ma zmniejszać ryzyko powstawania onkogennych mutacji (30, 32, 43, 61, 147, 154, 161, 163, 224, 267, 272). Można znaleźć jednak prace, których wyniki nie potwierdzają takiej zależności, a zwracają uwagę na rolę innych polimorfizmów genowych (a zwłaszcza ich asocjacji), które warunkują różną aktywność licznych enzymów i białek zaangażowanych m.in. w gospodarkę folianową, kluczową dla syntezy i naprawy DNA (20, 75, 101, 120, 163, 172, 180, 189, 200, 208, 220, 243).

Dotychczas publikowane dane przedstawiają również sprzeczne opinie na temat wpływu polimorfizmu 677C>T MTHFR na występowanie i nasilenie bliskich toksyczności terapii Mtx, niezależnie od wysokości stosowanej dawki leku, czy sytuacji klinicznej.

Z teoretycznego punktu widzenia, związana z obecnością allele T termolabilność MTHFR, wpływająca na istotnie zmniejszoną aktywność enzymu, powinna nasilać efekt stosowania Mtx, silnego supresora MTHFR. Niepokojące dane dostarczają badania, sygnalizujące korelację niższej ekspresji MTHFR z nasilonymi toksycznościami leczenia Mtx, przy równocześnie gorszej odpowiedzi na antyleukemiczne działanie cytostatyku (166, 217). Takie obserwacje są tłumaczone mniejszą pulą komórek białaczkowych w fazie S cyklu komórkowego, podatnych na działanie Mtx. Fakt, iż uzyskane dotąd wyniki wielu badań nie są jednoznaczne, a wręcz prowadzą do przeciwnych wniosków, uzasadnia celowość wykonywania kompleksowych badań molekularnych z zastosowaniem technik mikromacierzy, które stanowią przyszłość

farmakogenomiki. Badaniami winny być objęte (poza immunofenotypem ALL i indeksem DNA blastów) m.in. geny, których polimorfizm odpowiada za zmienną ekspresję białek nośnikowych Mtx, rodziny białek oporności wielolekowej i wielu innych enzymów zaangażowanych w szlak metabolizmu folianów (2, 3, 14, 20, 44, 61, 69, 90, 97, 101, 102, 117, 169, 172, 177, 185, 186, 217, 270).

Ostre objawy toksyczne ze strony: śluzówek, wątroby i szpiku

Zastanawia fakt, że większość prac, przedstawiających dowody na związek allele T polimorfizmu 677C>T MTHFR z nasileniem bliskich toksyczności terapii Mtx, dotyczy przewlekłego stosowania niskich dawek leku.

Badania holenderskie przeprowadzone u 236 pacjentów, leczonych z powodu reumatoidalnego zapalenia stawów niskimi dawkami tego antymetabolitu, wykazały jednoznacznie związek genotypów 677CT i TT z epizodami podwyższonych wartości GOT, co było powodem przerw w terapii. U chorych, którym suplementowano kwas foliowy lub podawano leukoworynę, ryzyko przerw w leczeniu było mniejsze (241). Także badania amerykańskie, dotyczące grupy 107 pacjentów, leczonych przewlekłe małymi dawkami Mtx z powodu zapalenia stawów, wykazały związek genotypu 677TT z częstszym występowaniem toksyczności śluzówkowych, dłuższymi przerwami w leczeniu i wolniejszą normalizacją liczby płytek krwi, w porównaniu z nosicielami pozostałych polimorfizmów genu MTHFR (117). Podobne wnioski, dotyczące 106 osób z zapaleniem stawów, zostały przedstawione przez badaczy japońskich (238). We włoskim retrospektywnym badaniu oceniono toksyczności niskich dawek cytostatyku, stosowanych w okresie podtrzymywania remisji ALL u 61 dzieci. Genotyp TT był znacząco związany z nasileniem toksyczności szpikowych i wątrobowych w przebiegu terapii Mtx. Autorzy postulowali nawet redukcję standardowych dawek leku u pacjentów z tym genotypem (33). W badaniu dotyczącym oceny tolerancji małych dawek leku w okresie podtrzymywania remisji u 82 osób dorosłych, także wykazano statystycznie istotną ($p=0,003$) korelację genotypu 677TT z nasilonymi toksycznościami wątrobowymi Mtx (34). Waga tego problemu wydaje się być szczególnie w populacji śródziemnomorskiej i środkowoamerykańskiej, gdzie częstość homozygot TT jest znacznie wyższa niż w populacji kaukaskiej (33, 117, 192, 227). Interesująca na tym tle jest analiza toksyczności w grupie 28 dorosłych pacjentów z ALL, z jednego z ośrodków w Meksyku, gdzie podobnie jak w krajach śródziemnomorskich częstość homozygot 677TT jest szczególnie wysoka. Autorzy nie odnotowali korelacji większej częstości zapaleń śluzówek przewodu pokarmowego z którymkolwiek z trzech genotypów i w związku z tym wyrazili opinię, że obciążający wpływ allele T jest neutralizowany przez typową w tym rejonie świata dietę bogatą w foliany (192). Ważne dane na temat większej toksyczności niskich dawek Mtx u nosicieli wariantu 677TT polimorfizmu MTHFR, dostarczyła także ocena 220 pacjentów,

u których lek zastosowano w prewencji aGvHD po przeszczepieniu szpiku, z powodu przewlekłej białaczki szpikowej. Nosiciele genotypu TT mieli o 36 - 20% wyższy wskaźnik toksyczności śluzówkowych i o 24% wolniejszą odnowę hematopoezy w zakresie liczby płytek krwi, w porównaniu z heterozygotami CT i homozygotami CC (237).

Wiodący onkolodzy, jak Pui wyrażają opinię, że nosicielstwo wariantu 677TT polimorfizmu genu MTHFR jest związane ze wzmożonym ryzykiem odczynów zapalnych śluzówek przewodu pokarmowego i toksyczności wątrobowych, w trakcie terapii zwłaszcza niskimi dawkami Mtx. Badania wrażliwości blastów nosicieli obu alleli T, prowadzone *in vitro* potwierdzają ich większą wrażliwość na ten cytostatyk (169, 172).

Równocześnie, wiele innych opracowań przedstawia przekonujące dowody na brak związku któregośkolwiek z trzech polimorficznych wariantów 677C>T genu MTHFR z częstością i nasileniem bliskich toksyczności leczenia Mtx. W badaniu grupy japońskiej dotyczącym 26 dzieci, leczonych z zastosowaniem HD-Mtx, nie wykazano korelacji nasilonych bliskich toksyczności wątrobowych lub szpikowych z odmiennym genotypem MTHFR (90). Także wielośrodkowe badanie, jakiemu poddano grupę 484 dzieci leczonych z zastosowaniem HD-Mtx z powodu chłoniaka złośliwego, nie wykazało wpływu polimorfizmu 677C>T MTHFR ani na rokowanie, ani na nasilenie bliskich toksyczności leczenia (208). W pracy oceniającej bliskie toksyczności Mtx w dawce 3 g/m², zastosowanego w 43 cyklach u dzieci, nie stwierdzono by ich częstość i stopień nasilenia różnicowały pacjentów o odmiennym genotypie MTHFR (209). Opublikowane cztery lata temu badania amerykańskiej grupy CCG stały się nawet podstawą do sformułowania kontrowersyjnej tezy, zgodnie z którą genotyp TT miałby wiązać się z ryzykiem wznowy ALL u dzieci. Badania dotyczyły dużej grupy 520 pacjentów pośredniego ryzyka ALL (o korzystnym rokowaniu) i wykazały istotny statystycznie związek ($p=0,036$), po wyeliminowaniu innych obciążających czynników, genotypu TT z ryzykiem niepowodzenia leczenia. Genotyp TT miałby być nawet bardziej predykcyjny niż zła odpowiedź na sterydy, oceniana w ósmym dniu indukcji! Hipotezą tłumaczącą to spostrzeżenie, miałyby być zwiększona pula 5,10-metylenotetrahydrofolianów, stanowiących dodatkowy substrat dla syntazy tymidylowej, co uruchamiałoby boczny tor produkcji DNA. W badaniu nie wykazano natomiast związku wariantu 677TT ze zwiększonym ryzykiem powikłań toksycznych w 3. i 4. stopniu wg NCI-CTC, ani zakażeń (4). Identyczną tezę sformułowała inna grupa badaczy, która analizując wpływ różnych polimorfizmów genowych na wyniki leczenia ALL, przedstawiła niższe EFS związane z wariantem TT polimorfizmu 677 MTHFR. Jednocześnie badanie to oceniło częstość i nasilenie toksyczności wątrobowych oraz hematologicznych towarzyszących terapii niskimi dawkami Mtx u 186 dzieci w remisji ALL. Wykazano duże różnice w nasileniu

powikłań toksycznych pomiędzy trzema grupami pacjentów. Nosiciele genotypu TT charakteryzowała znacząco niższa częstość nasilonych powikłań wątrobowych i hematologicznych, w 3. stopniu (44). Autorzy posuwają się nawet do sformułowania tezy o wskazaniach do eskalacji dawki Mtx u nosicieli allele T polimorfizmu 677C>T genu MTHFR. Według opinii autorów, mniejsza toksyczność terapii tym antymetabolitem idzie w parze z obniżoną skutecznością Mtx, tłumaczącą niższe EFS u nosicieli genotypu 677TT, co może wyjaśniać zwiększona pula substratów dla TS, niwecząca działanie cytostatyku. Taką opinię wspierają wyniki badań *ex vivo* z inkubacji limfoblastów (pochodzących od 157 dzieci z ALL) z Mtx w różnym stężeniu, koniecznym dla obniżenia o połowę aktywności TS. W eksperymencie nie wykazano związku polimorfizmu 677C>T MTHFR z różną wrażliwością na Mtx, lecz jej miernikiem była właśnie supresja TS (97). W badaniu z innego ośrodka, dotyczącym wyników leczenia 201 dzieci z ALL, także wykazano związek allele T z niższym EFS leczonych, choć autorzy tego doniesienia podkreślają znaczenie powiązań pomiędzy polimorfizmami różnych genów (114).

W obecnie prezentowanym badaniu, w analizie obejmującej 617 cykli z HD-Mtx u 160 dzieci z ALL, nie wykazano związku występowania najczęstszych ostrych objawów toksycznych - dysfunkcji wątroby, ani zapalenia śluzówek z żadnym wariantem polimorfizmu 677C>T genu MTHFR. Natomiast wyższe stopnie toksyczności wątrobowych (3. i 4. stopień), choć były rzadkie, występowały czterokrotnie częściej w przypadku genotypu TT, w porównaniu z homozygotami CC. Podobnie większe nasilenie zapalenia śluzówek jamy ustnej (2. i 3. stopień) było częstsze u nosicieli allele T. Jednak w wykonanych analizach nie stwierdzono istotnego wpływu obecności allele T na nasilenie obu tych toksyczności (p odpowiednio: 0,487 i 0,136). U homozygot TT, w porównaniu z nosicielami genotypu CC, istotnie częściej po zakończeniu cyklu występowały jednak: małopłytkowość (p=0,025), oraz opóźnienia w planowym toku chemioterapii (p=0,014) (tabela 29).

Zbiorcza analiza wpływu różnych czynników na nasilenie (wystąpienie co najmniej dwu) ostrych toksyczności w przebiegu chemioterapii HD-Mtx nie wykazała związku polimorfizmu 677C>T MTHFR z ich występowaniem (tabela 32 i rysunek 40).

Ostre objawy toksyczne ze strony OUN

Wiele prac potwierdza fakt, iż genotyp CT, a zwłaszcza TT, związany z mniejszą aktywnością MTHFR, wpływa na podwyższone stężenie homocysteiny w surowicy a także płynie mózgowo-rdzeniowym u nosicieli tych polimorfizmów, co zaburza strukturę endotelium i może generować

różne objawy toksyczne ze strony wielu narządów i układów, w tym OUN (2, 52, 73, 117, 166, 192, 227, 239, 240, 241).

Badania, jakimi objęto grupę 53 dzieci z ALL, leczonych z zastosowaniem HD-Mtx w okresie konsolidacji remisji, wykazały wpływ tej terapii na znaczący wzrost stężeń homocysteiny w surowicy w 23-44 godzinie chemioterapii, z następową normalizacją w 7 dniu od podania cytostatyku. Dzieci, u których doszło do nasilonych objawów toksycznych ze strony OUN w postaci drgawek, miały znacząco wyższe stężenia homocysteiny zarówno w surowicy jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym, niż pacjenci nie prezentujący takich powikłań. W badaniu nie wykazano jednak istotnej asocjacji jakiegokolwiek z wariantów polimorficznych genu MTHFR z występowaniem drgawek (110). Inny wniosek formułują badacze, przedstawiający przypadek 16-letniego chłopca, u którego w remisji białaczki w drugim miesiącu leczenia po kolejnej PL z podaniem Mtx, doszło do epizodu przejściowego porażenia połowiczego i dysartii. Obrazowanie mózgowia metodą MRI ujawniło obecność okołokomorowych zmian istoty białej, typowych dla encefalopatii związanej z Mtx. Chłopiec był heterozygotą 677CT, co stało się pretekstem do sformułowania hipotezy o sprawczym wpływie niedoboru folianów na zwiększoną wrażliwość OUN na Mtx (224). W innej pracy, przedstawiono przypadek 9-letniego chłopca z ALL o identycznym genotypie 677CT, u którego w 71. godzinie od zastosowania Mtx w dawce 5 g/m² doszło do epizodu śpiączki. U chłopca wykazano 10-krotnie niższe stężenie folianów i ponad 5-krotnie wyższe stężenie homocysteiny w surowicy, w porównaniu do ich stężeń w kolejnym cyklu, nie powikłanym taką toksycznością (239).

W materiale własnym (160 dzieci), zbadanym pod kątem polimorfizmu 677C>T MTHFR, objawy toksyczne w 2. i 3. stopniu wg NCI-CTC (drgawki i znaczne rozdrażnienie z przeczulicą) wystąpiły u dwojga dzieci, będących heterozygotami CT.

Mniej nasilone objawy ze strony OUN (w 1. stopniu) odpowiadały typowej symptomatologii podrażnienia pajęczynówki i sprowadzały się do: bóli głowy i okolicy łędźwiowej, sztywności karku, epizodów gorączki i pozostawały w bliskim związku czasowym z wykonanym PL, co uniemożliwia ich jednoznaczne powiązanie z równoczesną terapią HD-Mtx. Choć powyższe powikłania były rzadkie, wystąpiły istotnie częściej ($p=0,05$) u dzieci o genotypie 677TT w porównaniu z pacjentami 677CC. Podobnie nasilenie nudności i wymiotów odpowiadało wyższym stopniom toksyczności u dzieci, będących nosicielami allelu T i było istotnie częstsze ($p=0,025$) w przypadku genotypu CT, w odniesieniu do homozygot CC (tabela 29).

Ostra niewydolność nerek

Najpoważniejszą, bo stwarzającą potencjalne zagrożenie życia ostrą toksycznością terapii z zastosowaniem HD-Mtx jest, niezwykle rzadko występująca, ostra niewydolność nerek.

W kazuistycznej pracy opublikowanej niedawno, przedstawiono przypadek 11-letniej dziewczynki, u której drugi cykl z Mtx w dawce 5 g/m^2 doprowadził do tak dramatycznego powikłania. Zastosowanie Carboxypeptydazy doprowadziło do spektakularnie szybkiej normalizacji stężeń leku w surowicy. Jedynym wytłumaczeniem wystąpienia tej wyjątkowej toksyczności mógł być genotyp 677TT dziewczynki (236).

W obecnie przedstawianej pracy, obejmującej 617 cykli z HD-Mtx, toksyczności nerkowe były wyjątkowym zdarzeniem, co odpowiada danym z literatury. W analizie nie wykazano istotnego wpływu polimorfizmu 677C>T MTHFR na częstość ich występowania. Jednak nie można pominąć faktu, iż jedyne dwa przypadki ostrej niewydolności nerek wystąpiły u nosicieli wariantu CT i TT tegoż polimorfizmu, leczonych Mtx w niższej dawce (2 g/m^2) i że podobnie jak w przytoczonej powyżej pracy, nie znaleziono żadnego ze znanych czynników ryzyka rozwinięcia się ostrej niewydolności nerek w trakcie leczenia HD-Mtx.

10. Czynniki ryzyka wystąpienia nasilonych ostrych toksyczności terapii HD-Mtx

Wysoka wyleczalność ALL, która w krajach rozwiniętych dotyczy około 80% dzieci, sprawia, iż obecnie kluczowym sposobem optymalizacji terapii tego najczęstszego u dzieci nowotworu jest nie tylko dalsza poprawa wyników leczenia, lecz także minimalizacja zarówno bliskich, jak i odległych toksyczności skojarzonego leczenia.

Mtx podany w ekstremalnie wysokich dawkach, takich jak $33,6\text{ g/m}^2$, łączy się z wysokim ryzykiem wystąpienia poważnych bliskich toksyczności. Natomiast nie wykazano istotnych różnic w częstości bliskich powikłań zależnych od dawki w przebiegu cykli z Mtx, stosowanym w dawkach typowych dla terapii konsolidacyjnej ALL w zakresie: $2 - 5\text{ g/m}^2$ (99, 126, 143, 149, 151, 175, 176, 183, 214, 215, 234, 263). W pracy, przedstawiającej bliskie powikłania 922 cykli z Mtx stosowanym w dawkach: $0,5 - 33,6\text{ g/m}^2$ u 141 dzieci z ALL, jedynie krótsze wlewy cytostatyku, stosowanego w wyższej dawce, wiązały się ze znacznie większymi toksycznościami (206). Zdarzają się jednak odmienne opinie, stwierdzające że wysycenie szlaków metabolizmu Mtx stanowi przyczynę rosnącej toksyczności wyższych dawek tego cytostatyku (153, 168). Zgodnie z zasadami kinetyki nieliniowej tempo wydalania cytostatyku zależy wówczas od dawki, a nie stężenia leku w surowicy. W jednej z publikacji przedstawiono analizę przejściowej nefrotoksyczności (spadek GFR, proteinuria) terapii Mtx w dawce: $1 - 12\text{ g/m}^2$. Wysokość dawki systemowej determinowała wystąpienie tak zdefiniowanej toksyczności leku wobec nerek (81).

W badaniu własnym jedynie dwie z najczęstszych, poza dysfunkcją wątroby, toksyczności: zakażenia i zapalenie śluzówek wystąpiły istotnie częściej w przebiegu cykli z Mtx w wyższej dawce (p odpowiednio: 0,008 i 0,0003), niezależnie od sprawności eliminacji Mtx (tabela 28).

W odniesieniu do pacjentów, powikłania infekcyjne wystąpiły u 55% leczonych wyższą dawką systemową, w porównaniu z 39% otrzymujących dawkę 2 g/m². Zapalenie śluzówek jamy ustnej obserwowano odpowiednio u: 32% i 15% dzieci (tabela 30).

Najczęstsza bliska toksyczność narządowa, jaką było zaburzenie funkcji wątroby, dotyczyła niezależnie od zastosowanej dawki leku około 60% dzieci. Także wystąpienie, nieco tylko rzadszych, nudności i wymiotów (około 50% leczonych) nie zależało od dawki Mtx (tabela 30).

Wysokość dawki (2 g/m² lub 3 g/m²) nie miała wpływu ($p=0,492$), w odniesieniu do leczonych na częstość przedłużonej eliminacji leku (tabela 14), która ogólnie uważana jest za zasadniczy, choć nie jedyny czynnik sprawczy nasilonych wczesnych objawów toksycznych terapii HD-Mtx (5, 9, 11, 17, 18, 21, 26, 31, 38, 39, 46, 54, 71, 87, 89, 93, 130, 183, 209, 214, 215, 222, 223, 234, 245, 258, 261, 262, 263, 264). W obecnie przedstawianym badaniu przedłużona ekspozycja na cytotoksyczne stężenia Mtx, w odniesieniu do obu dawek, istotnie zwiększała częstość: nudności i wymiotów, odczynów zapalnych śluzówek przewodu pokarmowego oraz dysfunkcji nerek. Natomiast: zakażenia, biegunki i toksyczności skórne istotnie częściej występowały w przypadku przedłużonej eliminacji tylko jednej z ocenianych dawek Mtx (tabela 28).

W materiale własnym, w analizie z użyciem wieloczynnikowej regresji logistycznej, obejmującej 414 cykli z prawidłowym i 82 z przedłużonym wydalaniem leku, jedynymi czynnikami istotnie wpływającymi na zaburzenie klirensu Mtx była stała eliminacji we wczesnej fazie wydalania i stężenie stacjonarne leku. Natomiast takie parametry jak: wiek, BMI, polimorfizm genowy 677C>T MTHFR leczonych i wysokość dawki systemowej Mtx (2 g/m² lub 3 g/m²) nie wykazały takiego wpływu (tabela 24 i rysunek 24). Należy jednak podkreślić, że w grupie najstarszych dzieci wykazano ponad 3-krotnie większą częstość występowania przedłużonej eliminacji HD-Mtx w ponad jednym spośród czterech zrealizowanych cykli, w porównaniu z najmłodszymi pacjentami (tabela 16). Jednak w analizie statystycznej nie potwierdzono istotnego wpływu wieku leczonych na częstość występowania tego zaburzenia ($p=0,08$).

W jednej z prac, również z zastosowaniem metody regresji logistycznej, wykazano, że stężenie stacjonarne leku było jedynym czynnikiem predykcyjnym dla ostrej toksyczności, zwłaszcza w odniesieniu do: nudności, wymiotów, odczynów zapalnych błon śluzowych i opóźnienia eliminacji Mtx (5). W innym badaniu wyłoniono czas ekspozycji na wysokie stężenia leku w surowicy i wyższy wiek leczonych, jako czynniki odpowiedzialne za nasilenie bliskich toksyczności śluzówkowych i wątrobowych (175). W publikacji, poświęconej tolerancji Mtx w dawce 12 g/m², stosowanego w leczeniu mięsaka kości u dzieci, wysokie stężenie stacjonarne i zaburzona eliminacja Mtx zwiększały ryzyko wczesnych toksyczności terapii (178).

W niniejszej pracy, w celu wyodrębnienia czynników istotnie wpływających na nasilenie bliskich toksyczności terapii HD-Mtx, zastosowano metodę wieloczynnikowej regresji logistycznej. Analizą objęto łącznie 205 chemioterapii, które nie wiązały się z żadnymi powikłaniami oraz 161 cykli, po których obserwowano co najmniej dwa rodzaje bliskich objawów toksycznych. Spośród badanych sześciu zmiennych tylko wartość stężenia Mtx w surowicy w 48. godzinie cyklu miała istotny wpływ na wystąpienie zdefiniowanych powyżej toksyczności stosowania obu dawek Mtx. Ani wysokość dawki leku, ani wiek, BMI, czy polimorfizm genowy 677C>T MTHFR nie wykazały takiego związku.

W dostępnym piśmiennictwie przedstawiane są sprzeczne wyniki badań, dotyczących znaczenia wieku dzieci na częstość występowania bliskich powikłań w przebiegu terapii HD-Mtx. Niezależnie od zdeterminowanego wiekiem wolniejszego klirensu systemowego Mtx, niektórzy autorzy odnotowują większą częstość występowania toksyczności u starszych dzieci (60, 162, 175, 234). Natomiast w jednym z doniesień przedstawiono wyniki analizy z użyciem regresji logistycznej, wskazujące, że niższy wiek leczonych stanowił czynnik związany z większym ryzykiem biegunek (85). Istnieje uzasadnione przypuszczenie, że obserwowana zależność mogła wynikać z częstszych w tym okresie życia zakażeń i nie być zdeterminowana wyłącznie toksycznością Mtx.

W analizie materiału własnego nie stwierdzono istotnego wpływu ani stopnia odżywienia dzieci, ani płci zarówno na częstość występowania przedłużonej eliminacji HD-Mtx, jak i nasilenie wczesnych objawów toksycznych.

Podobne wnioski prezentują nieliczne prace poświęcone tej tematyce (205). Można jednak znaleźć przeciwne opinie, przekonujące, iż masa ciała determinuje klirens leku (88, 269).

W obecnie przedstawianym badaniu nie stwierdzono także istotnych różnic w częstości zaburzenia eliminacji leku pomiędzy nosicielami różnych polimorficznych wariantów 677C>T genu MTHFR ($p=0,54$). W odniesieniu do bliskich toksyczności, jedynie ostre powikłania ze strony układu nerwowego, małopłytkowość po zakończeniu cykli z Mtx i opóźnienia w planowym toku chemioterapii występowały istotnie częściej u homozygot TT (tabela 29).

Opisywana w literaturze (9, 18, 184, 262), kształtująca się z czasem, tolerancja wobec HD-Mtx może wyjaśniać fakt, że w materiale własnym w kolejno przeprowadzanych cyklach częstość toksyczności klinicznych nie narastała. To właśnie w przebiegu pierwszego cyklu występowało największe ryzyko wystąpienia przedłużonej eliminacji leku (tabela 13). W analizie dotyczącej łącznie 760 cykli Mtx (260 w dawce 2 g/m² oraz 500 w dawce 3 g/m²), jedynie odczyny zapalne śluzówek jamy ustnej wystąpiły istotnie częściej ($p=0,02$) w konsekwencji pierwszej z czterech zrealizowanych chemioterapii. Dwa przypadki najpoważniejszej bliskiej toksyczności terapii

HD-Mtx, jaką jest ostra niewydolność nerek miały miejsce także po pierwszym z czterech przeprowadzonych cykli. Z kolei zakażenia i opóźnienia w planowej kontynuacji leczenia dotyczyły istotnie rzadziej (p odpowiednio: 0,001 i 0,003) ostatniej, czwartej chemioterapii. Na podstawie przeprowadzonej analizy trudno jednoznacznie wskazać, który w kolejności cykl był obarczony największym ryzykiem bliskich niepożądanych skutków leczenia. Wydaje się jednak że dłuższej realizacji chemioterapii HD-Mtx towarzyszyło, w pewnym stopniu, zmniejszenie nasilenia obserwowanych bliskich toksyczności i powikłań terapii (tabela 31).

Reasumując, na podstawie przeprowadzonej analizy jaką objęto 720 cykli chemioterapii z HD-Mtx w dawce: 2 g/m^2 i 3 g/m^2 , zrealizowanych u 218 dzieci z ALL-SR, najistotniejszym czynnikiem ryzyka nasilonych bliskich powikłań terapii HD-Mtx była zaburzona eliminacja leku w 48. godzinie cyklu, której wczesnymi markerami były: wysokie stężenia stacjonarne i obniżona wartość stałej eliminacji Mtx we wczesnej fazie wydalania.

Dzieci starsze (powyżej 10 r.ż.) stanowiły grupę ryzyka wystąpienia wolniejszego klirensu Mtx, odpowiedzialnego za dłuższy czas ekspozycji na cytotoksyczne stężenia tego antymetabolitu.

Nasilenie objawów toksycznych, związanych ze stosowaniem Mtx, zależy w znacznej mierze od indywidualnych predyspozycji pacjentów. Kompleksowe badania nad polimorfizmem wielu genów, zaangażowanych w gospodarkę folianową mogą w przyszłości przyczynić się do wyjaśnienia złożonych mechanizmów związanych ze zmienną farmakokinetyką i wrażliwością na Mtx.

VI. WNIOSKI

1. Przedłużona eliminacja metotreksatu, zastosowanego w wysokich dawkach w 24-godzinnych wlewach dożylnych, występuje często; została stwierdzona u blisko połowy dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, leczonych tym lekiem w dawce 2 g/m^2 i 3 g/m^2 . Sprawność eliminacji metotreksatu nie zależała od wysokości dawki leku.
2. Zaburzone wydalenie metotreksatu nie zależało od takich czynników, jak: płeć, BMI i polimorfizm 677C>T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR). Przedłużona eliminacja leku najczęściej dotyczyła pierwszego z czterech realizowanych cykli. Wykazano istotną korelację wyższych stężeń stacjonarnych z zaburzoną eliminacją metotreksatu w 48. godzinie cyklu, co wskazuje na to, że wolniejszy klirens leku we wczesnej fazie cyklu znacząco wydłużał czas wydalania metotreksatu do bezpiecznych wartości stężeń. Dzieci starsze, powyżej 10 r.ż. osiągały istotnie wyższe stężenia stacjonarne i mogą stanowić grupę ryzyka zaburzonej eliminacji tego cytostatyku.
3. Farmakokinetyka metotreksatu, stosowanego w dawkach: 2 g/m^2 i 3 g/m^2 we wlewach dobowych była bardzo zmienna. Wyższa dawka cytostatyku wiązała się z uzyskaniem u danego pacjenta istotnie bardziej stabilnych wartości stężeń stacjonarnych metotreksatu w kolejnych czterech cyklach. W ponad 80% cykli z lekiem podanym w obu dawkach uzyskano stężenia stacjonarne powyżej wartości minimalnej ($16 \mu\text{mol/l}$).
4. Terapia monitorowana pomiarami stężeń Mtx w surowicy najczęściej dopiero w 48. godzinie cyklu wskazywała na zaburzenie jego wydalania. Stała eliminacji wczesnej, tzw. szybkiej fazy wydalania leku może być przydatnym markerem dla wcześniejszej identyfikacji pacjentów zagrożonych opóźnioną eliminacją metotreksatu. Praktyczne wykorzystanie tego parametru wymaga dalszych badań i określenia zakresu jego norm.
5. Tolerancja metotreksatu zastosowanego w dawce 2 g/m^2 i 3 g/m^2 w trakcie konsolidacji remisji u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną była dobra. Ciężkie powikłania w przebiegu tego leczenia występowały rzadko i nie były powodem zgonu żadnego pacjenta. Najczęstszą ostrą toksycznością było odwracalne zaburzenie funkcji wątroby, nudności i wymioty oraz odczyny zapalne śluzówek przewodu pokarmowego, obserwowane odpowiednio u: 60%, 50% oraz 30 - 45% pacjentów.
6. Ostra niewydolność nerek, dotyczyła mniej niż 1% dzieci i wystąpiła w przebiegu leczenia niższą dawką leku, co przemawia za koniecznością terapii monitorowanej także w leczeniu metotreksatem w dawce 2 g/m^2 . Zwiastunami tego najgroźniejszego bliskiego powikłania, poza wysokim stężeniem Mtx w surowicy już w 24. godzinie cyklu były: nasilone wymioty, obniżona diureza i co najmniej dwukrotny wzrost stężenia kreatyniny w surowicy w drugiej

dobie chemioterapii. Najskuteczniejszym lekiem w tej sytuacji klinicznej jest Carboxypeptydaza, która powinna być jak najszybciej dostępna w naszym Kraju.

7. Wyższa dawka systemowa leku (3 g/m^2) wiązała się z większą częstością nudności i wymiotów, zakażeń oraz odczynów zapalnych śluzówek przewodu pokarmowego. Najczulszym laboratoryjnym wykładnikiem bliskiej toksyczności leczenia z zastosowaniem metotreksatu w wysokich dawkach było obniżone stężenie albumin i białka całkowitego w surowicy. Albuminy, jako białka nośnikowe winny być suplementowane w celu zabezpieczenia prawidłowej farmakokinetyki leku.
8. Przedłużona ekspozycja na cytotoksyczne stężenie Mtx nie miała istotnego wpływu na nasilenie dysfunkcji wątroby, ani na zaburzenie planowego toku leczenia. Wiazała się natomiast z większą częstością nudności, wymiotów oraz zakażeń i większym nasileniem odczynów zapalnych śluzówek przewodu pokarmowego. Obserwowane toksyczności spełniały najczęściej kryteria 1. i 2. stopnia skali powikłań NCI-CTC. Adekwatna terapia leukoworyną nie eliminowała występowania tych toksyczności, choć niewątpliwie mogła ograniczać ich nasilenie.
9. Polimorfizm 677C>T genu MTHFR nie miał istotnego wpływu na sprawność eliminacji metotreksatu ani na częstość występowania najczęstszych bliskich toksyczności tej terapii. Jednak u homozygot TT nasilenie najczęściej obserwowanych klinicznych objawów toksycznych było większe, a ostra niewydolność nerek, która wystąpiła u dwojga dzieci, dotyczyła nosicieli wariantu CT i TT.
10. Do grupy ryzyka, zagrożonej nasilonymi bliskimi toksycznościami terapii wysokimi dawkami metotreksatu, należały: dzieci powyżej 10 r.ż., pacjenci uzyskujący wyższe stężenia stacjonarne, charakteryzujący się wolniejszym klirensiem leku już we wczesnej fazie wydalania (którego markerem może być niższa wartość stałej eliminacji tej fazy) oraz osiągający wysokie stężenia leku w 48. godzinie cyklu i poddani pierwszej chemioterapii. Wszystkie powyższe czynniki nie tłumaczą jednak w pełnym zakresie indywidualnie zmiennej wrażliwości na wystąpienie i nasilenie bliskich toksyczności w przebiegu leczenia tym cytostatykiem.
11. Terapia metotreksatem w wysokich dawkach powinna być zindywidualizowana i uwzględniać zarówno zmienną farmakokinetykę leku u danego pacjenta, jak i w przyszłości, wyniki badań genetycznych nad polimorfizmem wielu genów odpowiedzialnych za gospodarkę folianową oraz uwarunkowaną farmakokinetycznie i farmakodynamicznie odmienną wrażliwość pacjentów na ten cytostatyk, co pozwoli poprawić wyniki leczenia i ograniczyć toksyczności z nim związane.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Abromowitch M., Ochs J., Pui C.H. i in.: High-dose methotrexate improves clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia: St Jude Total Therapy Study X. *Med. Ped. Oncol.* 1988, 16, 297-303
2. Ansari M., St-Onge G., Krajcinovic M.: Pharmacogenomics of acute lymphoblastic leukemia. *Med.Sci.* 2007, 23(11), 961-7
3. Aplenc R., Lange B.: Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 2004, 125(4), 421-34
4. Aplenc R., Thompson J., Han P. i in.: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research* 2005, 65, 2482-7
5. Aquerreta I., Aldaz A., Giraldez J.i in: Pharmacodynamics of high-dose methotrexate in pediatric patients. *Annals of Pharmacotherapy* 2002, 36(9), 1344-50
6. Armata J.: Zapobieganie wznowom oponowym w ostrej białaczce limfoblastycznej. *Ped.Pol.* 1993, 11, 7-11
7. Armata J., Balwierz W.: Późne powikłania u pacjentów wyleczonych w dzieciństwie z nowotworów. *Przegl. Lek.* 1992, 49 (3), 69-72
8. Aumente D., Buelga D.S., Lukas J.C.i in.: Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Clin.Pharmacokinet.* 2006, 45(12), 1227-38
9. Bacci G., Ferrari S., Longhi i in.: Delayed methotrexate clearance in osteosarcoma patients treated with multiagent regimens of neoadjuvant chemotherapy. *Oncol.Rep.* 2003, 10(4), 851-7
10. Bagarry-Liegey D., Nicoara A., Duffaud F. i in.: Individual dose adjustment of high-dose methotrexate in clinical practice. *Rev.Med.Interne.* 1996, 17(8), 689-98
11. Balis F.M., Holcenberg J.S., Blaney S.M: Principles of multimodal therapy. w: Principles and practice of pediatric oncology. Pizzo P.A., Poplack D.G. (red), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2002, 262-4 i 282-6
12. Balis F.M., Savitch J.L., Bleyer W.A. i in.: Remission induction of meningeal leukemia with high-dose intravenous methotrexate. *J.Clin.Oncol.* 1985, 3(4), 485-9
13. Bay A., Oner A.F., Etlik O.i in.: Myelopathy due to intrathecal chemotherapy: report of six cases. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 2005, 27(5), 270-2
14. Belkov V.M., Krynetski E.Y., Schuetz J.D. i in.: Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood* 1999, 93(5), 1643-50
15. Billett A.L., Gelber R.D., Tarbell N.J.i in.: Results of Dana Farber Cancer Institute-Consortium Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Protocols. *I.J.Ped.Hematol. Oncol.* 1998, 5, 115-123
16. Birkebaek N.H., Fisker S., Clausen N. i in: Growth and endocrinological disorders up to 21 years after treatment for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Med.Ped.Oncol.* 1998, 30, 351-6
17. Blasco H., Silly S., Tournamille J.F. i in.: The need for a better definition of therapeutic indications of carboxypeptidase in delayed elimination of methotrexate. *Therapie* 2008, 63(1), 19-28
18. Bleyer W.A.: The clinical pharmacology of methotrexate. New application of an old drug. *Cancer* 1978, 41, 36-51
19. Boerlegui B., Aldaz A., Ortega A. i in.: Potential interaction between methotrexate and omeprazole. *Ann.Pharmacother.* 2000, 34(9), 1024-7
20. Bolufer P., Collado M., Barragan E. i in.: The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica* 2007, 92(3), 308-14

21. Borsi J.D.: Clinical pharmacology of anticancer drugs in children. Antimetabolites. w: Neoplastic diseases of childhood, Vol 1. Harwood Academic Publishers, Chur, 1994, 183-200
22. Borsi J.D., Moe P.J.: A comparative study on the pharmacokinetics of methotrexate in dose range of 0,5 g to 33,6 g/m² in children with acute lymphoblastic leukemia. Cancer 1987, 60, 5-13
23. Borsi J.D., Moe P.J. : Systemic clearance of methotrexate in the prognosis of acute lymphoblastic leukemia i children. Cancer, 1987, 60(12), 3020-4
24. Borsi J.D., Sagen E., Romslo I. i in.: Rescue after intermediate and high-dose methotrexate: background, rationale and current practice. Pediatr.Hematol.Oncol. 1990, 7(4), 347-63
25. Borsi J.D., Sagen E., Romslo I. i in.: Comparative study on the pharmacokinetics of 7-hydroxymethotrexate after administration of methotrexate in the dose range of 0,5-33,5 g/m² to children with acute lymphoblastic leukemia. Med.Pediatr.Oncol. 1990, 18(3), 217-24
26. Buchen S., Ngampolo D., Melton R.G.i in.: Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. Br.J.Cancer 2005, 14, 92(3), 480-7
27. Butler R.W., Hill J.M., Steinherz P.G. i in.: Neuropsychologic effects of cranial irradiation, intrathecal methotrexate, and systemic methotrexate in childhood cancer. J.Clin.Oncol. 1994, 12, 2621-9
28. Campbell M., Salgado C., Quintana J. i in.: Improved outcome for acute lymphoblastic leukemia in children of a developing country: results of the Chilean National Trial PINDA 87. Med.Pediatr.Oncol. 1999, 33(2), 88-94
29. Castro R., Rivera I., Ravasco P. i in.: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T and 1298A>C mutation are genetic determinants of elevated homocysteine. Q.J.M. 2003, 96(4), 297-303
30. Chatzidakis K., Goulas A., Athanassiadou-Piperopoulou F. i in.: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism: association with risk for childhood acute lymphoblastic leukemia and response during the initial phase of chemotherapy in greek patients. Pediatr.Blood Cancer, 2006, 47(2), 147-51
31. Cheng K.K.: Association of plasma methotrexate, neutropenia, hepatic dysfunction, nausea/vomiting and oral mucositis in children with cancer. Eur.J.Cancer Care 2008, 17(3), 306-11
32. Chiang E.P., Wang Y.C., Tang F.Y.: Folate restriction and methylenetetrahydrofolate reductase 677T polymorphism decreases adoMet synthesis via folate-dependent remethylation in human-transformed lymphoblasts. Leukemia 2007, 21(4), 651-8
33. Chiusolo P., Reddiconto G., Casorelli I. i in.: Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. Ann. Oncol. 2002, 13, 1915-18
34. Chiusolo P., Reddiconto G., Farina G. i in.: MTHFR polymorphisms' influence on outcome and toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients. Leuk.Res. 2007, 31(12), 1669-74
35. Chladek J., Grim J., Martinkova J. i in.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low-dose methotrexate in the treatment of psoriasis. Br.J.Clin.Pharmacol. 2002, 54(2),147-56
36. Chu E., Takimoto C.H.: Antimetabolites. w: Cancer. Principles and practice of oncology. De Vita V., Hellman S., Rosenberg S.A. (red.) J.B.Lippincott Company, Philadelphia, 1993, 358-62
37. Clarke M., Gaynon P., Hann I. i in.: CSN-directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Childhood ALL Collaborative Group overview of 43 randomised trials. J. Clin. Oncol. 2003, 21, 1798-1809
38. Cohen I.J.: Defining the appropriate dosage of folinic acid after high-dose methotrexate for childhood acute lymphatic leukemia that will prevent neurotoxicity without rescuing

- malignant cells in the central nervous system. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 2004, 26(3), 156-63
39. Cohen I.J.: Prevention of high-dose methotrexate neurotoxicity by adequate folinic acid rescue is possible even after central nervous system irradiation. *Med.Hypotheses* 2007, 68(5), 1147-53
 40. Cole P.D., Zebala J.A., Alcaraz M.J. i in.: Pharmacodynamic properties of methotrexate and Aminotrexate during weekly therapy. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2006, 57(6), 826-34
 41. Conter V., Arico M., Valsecchi M.G. i in.: Extended intrathecal methotrexate may replace cranial irradiation for prevention of CNS relapse in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia treated with Berlin-Frankfurt-Munster-based intensive chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 1995, 13(10), 2497-2502
 42. Correa G.H., Paredes S.N.: Serum liver tests in patients treated with methotrexate: a retrospective analysis. *Rev.Med.Chil.* 2007, 135(8), 1002-8
 43. Costa Ramos F.J., Cartaxo Muniz M.T., Silva V.C. i in.: Association between the MTHFR A1298C polymorphism and increased risk of acute myeloid leukemia in Brazilian children. *Leuk.Lymphoma* 2006, 47(10), 2070-5
 44. Costea I., Morghrabi A., Laverdiere C.i in.: Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006, 91, 1113-1116
 45. Crom W.R., Glynn-Barnhart A.M., Rodman J.H. i in.: Pharmacokinetics of anticancer drugs in children. *Clin.Pharmacokinet.* 1987, 12(3), 168-213
 46. Dalle J.H., Auvrignon A., Vassal G. i in: Interaction between methotrexate and ciprofloxacin. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 2002, 24(4), 321-2
 47. Danyasz A.: *Farmakologia ogólna. w: Kompendium farmakologii i farmakoterapii dla lekarzy, farmaceutów i studentów.* Wyd.Med.Urban i Partner, Wrocław, 2002, 18-31
 48. Davidson A., Payne G., Leach M.O. i in.: Proton magnetic resonance spectroscopy ((1)H-MRS) of the brain following high-dose methotrexate treatment for childhood cancer. *Med.Pediatr.Oncol.* 2000, 35(1), 28-34
 49. Davis K.A., Williams P., Walker J.C.: Successful desensitization to high-dose methotrexate after systemic anaphylaxis. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 2003, 90(1), 87-9
 50. De Angelis L.M., Tong W.P., Lin S.i in.: Carboxypeptidase G2 rescue after high-dose methotrexate. *J.Clin.Oncol.* 1996, 14(7), 2145-9
 51. Delepine N., Delepine G., Cornille H. i in.: Dose escalation with pharmacokinetics monitoring in methotrexate chemotherapy of osteosarcoma. *Anticancer Res.* 1995, 15(2), 489-94
 52. Domagała T.B., Adamek L., Nizankowska E. i in.: Mutations C677T and A1298C of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and fasting plasma homocysteine levels are not associated with the increased risk of venous thromboembolic disease. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2002, 13(5), 423-31
 53. Donadieu J., Auclerc M.F., Baruchel A. i in.: Critical study of prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia: differences in outcome are poorly explained by the most significant prognostic variables. Fralle group. French Acute Lymphoblastic Leukaemia study group. *Br.J.Haematol.* 1998, 102(3), 729-39
 54. Donelli M.G., Zucchetti M., Robatto A. i in.: Pharmacokinetics of HD-Mtx in infants, children and adolescents with non-B acute lymphoblastic leukemia. *Med.Pediatr.Oncol.* 1995, 24(3), 154-9
 55. Dördelmann M. , Reiter A., Zimmermann M. i in.: Intermediate dose methotrexate is as effective as high dose methotrexate in preventing isolated testicular relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J.Ped.Hematol.Oncol.* 1998, 20(5), 444-50
 56. Drachtman R.A., Cole P.D., Golden C.B. i in.: Dextrometorphan is effective in the treatment of subacute methotrexate neurotoxicity. *Ped.Hematol.Oncol.* 2002, 19, 319-27

57. Drzewoski J., Robak T.: Farmakologia kliniczna metotreksatu. w: Farmakologia kliniczna leków przeciwnowotworowych. Wyd. NAUKA, Warszawa 1991, 64-69
58. Drzewoski J., Robak T.: Podstawy farmakokinetyki leków przeciwnowotworowych. w: Farmakologia kliniczna leków przeciwnowotworowych. Wyd. NAUKA, Warszawa, 1991, 18-24
59. Dudzińska M., Sońta-Jakimczyk D., Izydorczyk B.: Ocena stanu neuropsychologicznego dzieci żyjących w remisji ostrej białaczki limfoblastycznej. *Ped.Pol.* 1994, 9, 753-8
60. Dufourg M.N., Landman-Parker J., Auclerc M.F. i in.: Age and high-dose methotrexate are associated to clinical acute encephalopathy in FRALE 93 trial for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia* 2007, 21(2), 238-47
61. Dulucq S., St-Onge G., Gagne V. i in.: DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 2008, 111(7), 3692-700
62. Eichler A.F., Batchelor T.T., Henson J.W.: Diffusion and perfusion imaging in subacute neurotoxicity following high-dose intravenous methotrexate. *Neuro.Oncol.* 2007, 9(3), 373-7
63. Eksborg S., Albertioni F., Rask C. i in.: Methotrexate plasma pharmacokinetics: importance of assay method. *Cancer Lett.* 1996, 29, 108(2), 163-9
64. Etienne M.C., Thyss A., Bertrand Y. i in.: L-folinic acid versus racemic folinic acid in the treatment of leukemia in children with high dose methotrexate. *Bull Cancer* 1993, 80(4), 357-63
65. Evans W.E.: Clinical pharmacodynamics of anticancer drugs: a basis for extending the concept of dose-intensity. *Blut* 1988, 56, 241-8
66. Evans W.E., Crom W.R., Abromowitch M. i in.: Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia. Identification of a relation between concentration and effect. *N. Engl. J. Med.*, 1986, 314(8), 471-477
67. Evans W.E., Relling M.V., Rodman J.H. i in.: Conventional compared with individualised chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 1998, 338(8), 499-505
68. Faltaos D.W., Hulot J.S., Urien S. i in.: Population pharmacokinetic study of methotrexate in patients with lymphoid malignancy. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2006, 58(5), 626-33
69. Felix C.A., Lange B.J., Chessells J.M.: Pediatric acute lymphoblastic leukemia: challenges and controversies in 2000. *Hematology* 2000, 285-302
70. Fisgin T., Yarali N., Kara A. i in.: Hemostatic side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 2004, 21(1), 77-83
71. Flombaum C.D., Meyers P.A.: High-dose leucovorin as sole therapy for methotrexate toxicity. *J.Clin.Oncol.* 1999, 17(5), 1589-94
72. Fotoohi K., Skärby T., Söderhäll S. i in.: Interference of 7-hydroxymethotrexate with the determination of methotrexate in plasma samples from children with acute lymphoblastic leukemia employing routine clinical assays. *J.Chromatogr.B.Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 2005, 817(2), 139-44
73. Frosst P., Blom H.J., Milos R. i in.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat.Genet.* 1995, 10(1), 111-3
74. Garré M.L., Relling M.V., Kalwinsky D. i in.: Pharmacokinetics and toxicity of methotrexate in children with Down syndrome and acute lymphocytic leukemia. *J.Pediatr.* 1987, 111(4), 606-12
75. Ge Y., Haska C.L., LaFiura K. i in.: Prognostic role of the reduced folate carrier, the major membrane transporter for methotrexate, in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Clin.Cancer.Res.* 2007, 13(2), 451-7
76. Glass J.O., Reddick W.E., Li C.S. i in.: Computer-aided detection of therapy-induced leukoencephalopathy in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients treated with intravenous high-dose methotrexate. *Magn.Reson.Imaging* 2006, 24(6), 785-91

77. Goorin A., Strother D., Poplack D. i in.: Safety and efficacy of l-leucovorin rescue following high-dose methotrexate for osteosarcoma. *Med.Pediatr.Oncol.* 1995, 24(6), 362-7
78. Gustafsson G., Schmiegelow K., Forestier E. i in.: Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high-dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation. *Nordic Society of Pediatric Haematology and Oncology (NOPHO). Leukemia* 2000, 14(12), 2267-75
79. Harned T.M., Mascarenhas L.: Severe methotrexate toxicity precipitated by intravenous radiographic contrast. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 2007, 29(7), 496-9
80. Hatae Y., Hatayama Y., Nishi M. i in.: Clinical evaluation of severe toxicity in two patients with acute lymphoblastic leukemia receiving outpatient methotrexate therapy. *Rinsho Ketsueki.* 1991, 32(11), 1503-8
81. Hempel L., Misselwitz J., Fleck C. i in.: Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-Mtx) on glomerular and tubular kidney function. *Med.Pediatr.Oncol.* 2003, 40(6), 348-54
82. Herman Z.S.: Podstawy farmakologii klinicznej. w: Farmakologia, podstawy farmakoterapii. Kostkowski W., Herman Z. (red.) PZWL, Warszawa, 2007, 467-77
83. Hijiya N., Panetta J.C., Zhou Y. i in.: Body mass index does not influence pharmacokinetics or outcome of treatment in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006, 108(13), 3997-4002
84. Hill F.G., Richards S., Gibson B. i in.: Successful treatment without cranial radiotherapy of children receiving intensified chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia: results of the risk-stratified randomized central nervous system treatment trial MRC UKALL XI (ISRC TN 16757172). *Br.J.Haematol.* 2004, 124(1), 33-46
85. Hoekstra M., van Ede A.E., Haagsma C.J. i in.: Factors associated with toxicity, final dose and efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2003, 62(5), 423-6
86. Howard S.C., Pui C.H.: Endocrine complications in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev.* 2002, 16(4), 225-43
87. Howell S.B., Chu B.B., Wung W.E. i in.: Long-duration intracavitary infusion of methotrexate with systemic leucovorin protection in patients with malignant effusions. *J.Clin.Invest.* 1981, 67, 1161-1170
88. Hua Y., Zhao W.H., Lu X.T. i in.: Investigation on individualized adjustment of target range of high-dose methotrexate. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2008, 46(3), 203-8
89. Ikeda H., Kihira K., Kuwata N. i in.: Early recognition of patients with decreased methotrexate clearance following high-dose methotrexate infusion therapy. *Hiroshima J.Med.Sci.* 1996, 45(2), 57-62
90. Imanishi H., Okamura N., Yagi M. i in.: Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J. Hum. Genet.* 2007, 52(2), 166-171
91. Inaba H., Khan R.B., Laningham F.H. i in.: Clinical and radiological characteristics of methotrexate-induced acute encephalopathy in pediatric patients with cancer. *Ann.Oncol.* 2008, 19(1), 178-84
92. Inati A., Sallan S.E., Cassady J.R. i in.: Efficacy and morbidity of central nervous system "prophylaxis" in childhood acute lymphoblastic leukemia: eighth years' experience with cranial irradiation and intrathecal methotrexate". *Blood* 1983, 61(2), 297-303
93. Iqbal M.P., Khursheed M., Mahboobali N.: Methotrexate clearance and clinical toxicity in osteosarcoma following high-dose methotrexate therapy. *J.Pak.Med.Assoc.* 1989, 39(2), 38-42
94. Isoda T., Ito S., Kajiwara M. i in.: Successful high-dose methotrexate chemotherapy in a patient with acute lymphocytic leukemia who developed acute renal failure during the initial treatment. *Pediatr.Int.* 2007, 49(6), 1018-9

95. Janka G.E., Mack R., Helmig M. i in.: Prolonged methotrexate infusions in children with acute leukemia in relapse and in remission and with medulloblastoma. Pharmacokinetics, toxicity and clinical results. *Oncology* 1984, 41(4), 225-32
96. Joannon P., Oviedo I., Campbell M. i in.: High-dose methotrexate therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of relation between serum methotrexate concentration and creatinine clearance. *Pediatr.Blood Cancer* 2004, 43(1), 17-22
97. Jonge R., Hooijberg J.H., van Zelst B.D. i in.: Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005, 106, 717-20
98. Jönsson P., Höglund P., Wiebe T. i in.: Methotrexate concentrations in cerebrospinal fluid and serum, and the risk of central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Anticancer Drugs* 2007, 18(8), 941-8
99. Jurgens H., Ebell W., Bachmann R. i in.: Essential laboratory determinations for monitoring high-dose methotrexate treatment with citrovorum factor rescue. *Pediatr.Pharmacol.* 1983, 3(3-4), 157-65
100. Kagawa Y., Mukohara R., Hori H. i in.: Fever as a factor causing delayed elimination of methotrexate in pediatric patients receiving high doses of cancer chemotherapy. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2004, 54(1), 34-8
101. Kager L., Cheok M., Yang W. i in.: Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J.Clin.Invest.* 2005, 115, 110-17
102. Kager L., Evans W.E.: Pharmacogenomics of acute lymphoblastic leukemia. *Curr.Opin. Hematol.* 2006, 13(4), 260-5
103. Kamps W.A., Böklerink J.P.M., Hähnen K. i in.: Intensive treatment of children with acute lymphoblastic leukemia according to ALL-BFM-86 without cranial radiotherapy: results of Dutch Childhood Leukemia Study Group Protocol ALL-7. *Blood* 1999, 94(4), 1226-36
104. Kashi T., Tanaka Y., Ueda K.: Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. *Cancer* 2000, 89(4), 925-31
105. Kaufman Y., Drori S., Cole P.D. i in.: Reduced folate carrier mutations are not the mechanism underlying methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2004, 100(4), 773-82
106. Kaya Z., Gursel T., Bakkaloglu S.A. i in.: Evaluation of renal function in Turkish children receiving BFM-95 therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 2007, 24(4), 257-67
107. Kerr I.G., Jolivet J., Collins J.M. i in.: Test dose for predicting high-dose methotrexate infusions. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1983, 33(1), 44-51
108. Kingma A., Van Dommelen R.I., Mooyaart E.L. i in.: No major cognitive impairment in young children with acute lymphoblastic leukemia using chemotherapy only: a prospective longitudinal study. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 2002, 24(2), 106-14
109. Kinoshita A., Kurosawa Y., Kondoh K. i in.: Effects of sodium in hydration solution on plasma methotrexate concentrations following high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2003, 51(3), 256-60
110. Kishi S., Griener J., Cheng C. i in.: Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *J.Clin.Oncol.* 2003, 21(16), 3084-91
111. Kishi T., Tanaka Y., Ueda K.: Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. *Cancer* 2000, 89(4), 925-31
112. Komatsu K., Takada G., Uemura K. i in.: Decrease in cerebral metabolic rate of glucose after high-dose methotrexate in childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatr.Neurol.* 1990, 6(5), 303-6

113. Korinthenberg R., Schneider A., Niemeyer C.: Central nervous system profilaxis with high-dose methotrexate does not give to significant electroencephalografic changes in children with acute lymphoblastic leukemia. *J.Child.Neurol.* 2002, 17(6), 409-12
114. Krajcinovic M., Lemieux-Blanchard E., Chiasson S. i in.: Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 2004, 4(1), 66-72
115. Krajcinovic M., Robaey P., Chiasson S. i in.: Polymorphisms of genes controlling homocysteine levels and IQ score following the treatment for childhood ALL. *Fut.Med.* 2005, 6(3), 293-302
116. Krause A.S., Weihrauch M.R., Bode U. i in.: Carboxypeptidase-G2-rescue in cancer patients with delayed methotrexate elimination after high-dose methotrexate therapy. *Leuk.Lymphoma* 2002, 43(11), 2139-43
117. Kremer J.M.: Methotrexate pharmacogenomics. *Ann.Rheum.Dis.* 2006, 65, 1121-3
118. Langer T., Martus P., Ottensmeier H. i in.: CNS late-effects after ALL therapy in childhood. Neuropsychological performance in long-term survivors of childhood ALL: impairments of concentration, attention, and memory. *Med.Pediatr.Oncol.* 2002, 38, 320-8
119. Lau K.K., Weiss A.R., Jones D.P.: Polyuria associated with high-dose methotrexate in two patients with acute lymphoblastic leukemia. *J.Oncol.Pharm.Pract.* 2005, 11(1), 31-3
120. Laverdière C., Chiasson S., Costea I. i in.: Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2002, 100, 3832-4
121. Lawrenz-Wolf B., Wolfrom C., Frickel C. i in.: Severe renal impairment of methotrexate elimination after high dose therapy. *Klin.Padiatr.* 1994, 206(4), 319-26
122. Levy A.S., Sather H.N., Steinherz P.G. i in.: Reduced folate carrier and dihydrofolate reductase expression in acute lymphocytic leukemia may predict outcome: a Children's Cancer Group Study. *J.Ped. Hematol.Oncol.* 2003, 25(9), 688-695
123. Lewis M.J., Cameron A.H., Shah K.J. i in.: Giant-cell pneumonia caused by measles and methotrexate in childhood leukaemia in remission. *Br.Med.J.* 1978, 1(6109), 330-1
124. Lin J.T., Tong W.P., Trippett T.M. i in.: Basis for natural resistance to methotrexate in human acute non-lymphocytic leukemia. *Leuk.Res.* 1991, 15(12), 1191-6
125. Liu M., Ge Y., Payton S.G. i in.: Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin.Cancer Res.* 2006, 12(2), 608-16
126. Locasciulli A., Mura R., Frascini D. i in.: High-dose methotrexate administration and liver damage in children treated for acute lymphoblastic leukemia. A prospective study. *Haematologica* 1992, 77(1), 49-53
127. Löning L., Zimmermann M., Reiter A. i in.: Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood* 2000, 95(9), 2770-5
128. Lovblad K., Kelkar P., Ozdoba C. i in.: Pure methotrexate encephalopathy presenting with seizures: CT and MRI features. *Pediatr.Radiol.* 1998, 28(2), 86-91
129. Madej G., Kuratowska Z.: Niekorzystny wpływ cytostatyków na prawidłowe tkanki. w: *Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci.* Madej G. (red), PZWL, Warszawa, 1994, 42-60
130. Maiguma T., Hayashi Y., Ueshima S. i in.: Relationship between oral mucositis and high-dose methotrexate therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* 2008, 46(11), 584-90
131. Margolin J.F., Steuber C.P., Poplack D.G.: Acute lymphoblastic leukemia. w: *Principles and practice of pediatric oncology.* Pizzo P.A., Poplack D.G. (red.), Lippincott Williams and Wilkins, 2002, 515-27

132. Masera G., Gardner H., Kamps W.A. i in.: The treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. The international BFM Study Group experience. *Inter.J.Ped.Hematol.Oncol.* 1998, 5(2-4), 141-4
133. Masson E., Relling M.V., Synold T.W. i in.: Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate. *J.Clin.Invest.* 1996, 97, 73-80
134. Matherly L.H., Taub J.W.: Molecular and cellular correlates of methotrexate response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk.Lymphoma* 1999, 35(1-2), 1-20
135. Matherly L.H., Taub J.W.: Methotrexate pharmacology and resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk.Lymphoma* 1996, 21(5-6), 359-68
136. Matioub Y., Lindemulder S., Gaynon P.S. i in.: Intrathecal triple therapy decreases central nervous system relapse but fails to improve event-free survival when compared with intrathecal methotrexate: results of the Children's Cancer Group (CCG) 1952 study for standard-risk acute lymphoblastic leukemia, reported by the Children's Oncology Group. *Blood* 2006, 108(4), 1165-73
137. McLeod H.L., Relling M.V., Liu Q. i in.: Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995, 85(7), 1897-902
138. Mennes M., Stiers P., Vandenbussche E. i in.: Attention and information procesing in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia treated with chemotherapy only. *Pediatr.Blood Cancer* 2005, 44(5), 478-86
139. Milano G., Thyss A., Serre Debeauvais F. i in.: CSF drug levels for children with acute lymphoblastic leukemia treated by 5 g/m² methotrexate. A study from the EORTC Children's Leukemia Cooperative Group. *Eur.J.Cancer* 1990, 26(4), 492-5
140. Millot F., Auriol F., Brecheteau P. i in.: Acral erythema in children receiving high-dose methotrexate. *Ped.Dermat.* 1999, 16(5), 398-400
141. Millot F., Dhondt J.L., Hayte J.M. i in.: Impairment of cerebral biogenic amine synthesis in a patient receving high-dose methotrexate. *Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 1992, 14(3), 276-8
142. Mittal R., Mottl H., Nemec J.: Acute transient cerebral toxicity associated with administration of high-dose methotrexate. *Med.Princ.Pract.* 2005, 14(3), 202-4
143. Moe P.J., Holen A.: High-dose methotrexate in childhood all. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 2000, 17(8), 615-22
144. Moe P.J., Holen A., Nygaard R. i in.: Methotrexate infusions as central nervous system profilaxis in children with acute lymphocytic leukemia: the Norvegian experience. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 2003, 20(3), 187-200
145. Moe P.J., Seidel H., Wesenberg F. i in.: High-dose methotrexate (4-8 g/m²/24hr) in childhood acute lymphocytic leukemia. *Inter.J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 1998, 5(2-4), 155-62
146. Mohty M., Peyriere H., Guinet C. i in.: Carboxypeptidase G2 rescue in delayed methotrexate elimination in renal failure. *Leuk.Lymphoma* 2000, 37(3-4), 441-3
147. Moon H.W., Kim T.Y., Oh B.R. i in.: MTHFR 677CC/1298CC genotypes are highly associated with chronic myelogenous leukemia: a case-control study in Korea. *Leuk.Res.* 2007, 31(9), 1213-7
148. Murry D.J., Synold T.W., Pui C.H. i in.: Renal function and methotrexate clearance in children with newly diagnosed leukemia. *Pharmacotherapy* 1995, 15(2), 144-9
149. Nathan P.C., Whitcomb T., Wolters P.L. i in.: Very high-dose methotrexate (33,6 g/m²) as central nervous preventive therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of National Cancer Institute/Children's Cancer Group trials CCG-191P, CCG-134P and CCG-144P. *Leuk.Lymphoma* 2006, 47(12), 2488-504
150. Netter J.C., Dhondt J.L., Rance F. i in.: Early neurotoxicity of high-dose methotrexate and tetrahydrobiopterin deficiency. *Arch.Fr.Pediatr.* 1991, 48(10), 719-22

151. Niemeyer C.M., Gelber R.D., Tarbell N.J. i in.: Low-dose versus high-dose methotrexate during remission induction in childhood lymphoblastic leukemia (Protocol 81-01 update). *Blood* 1991, 78(10), 2514-19
152. Nygaard U., Schmiegelow K.: Dose reduction of coadministered 6-mercaptopurine decreases myelotoxicity following high-dose methotrexate in childhood leukemia. *Leukemia* 2003, 17(7), 1344-8
153. Odoul F., Le Guellec C., Lamagnère J.P. i in.: Prediction of methotrexate elimination after high dose infusion in children with acute lymphoblastic leukaemia using a population pharmacokinetic approach. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 1999, 13, 595-604
154. Oliveira E., Alves S., Quental S. i in.: The MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in Portugal. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 2005, 27(8), 425-9
155. Orzechowska-Juzwenko K., Kotlarek-Haus S.: Niepożądane następstwa chemioterapii nowotworów - sposoby ich zwalczania i zapobiegania. w: *Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych*. Orzechowska-Juzwenko K. (red.), Volumes, Wrocław, 2000, 26-30
156. Pääkkö E., Harila-Saari A., Vanionpää L. i in.: White matter changes on MRI during treatment in children with acute lymphoblastic leukemia: correlation with neuropsychological findings. *Med.Ped.Oncol.* 2000, 35, 456-61
157. Palczewska I., Niedźwiecka Z.: Wskaźniki rozwoju somatycznego dzieci i młodzieży warszawskiej. *Med.Wieku Rozwoj.* 2001, 5(2 Suppl 1), 18-118
158. Panetta J.C., Yanishevski Y., Pui C.H. i in.: A mathematical model of in vivo methotrexate accumulation in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2002, 50 (5), 419-28
159. Pauley J.L., Panetta J.C., Schmidt J. i in.: Late-onset delayed excretion of methotrexate. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2004, 54(2), 146-52
160. Paxton J.W.: The protein binding and elimination of methotrexate after intravenous infusions in cancer patients. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 1982, 9(3), 225-34
161. Pereira T.V., Rudnicki M., Costa Pereira A. i in.: 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol.Biomarkers & Prev.* 2006, 15, 1956-63
162. Perez C., Sutow W.W., Wang Y.M. i in.: Evaluation of overall toxicity of high-dosage methotrexate regimens. *Med.Pediatr.Oncol.* 1979, 6(3), 219-28
163. Petra B.G., Janez J., Vita D.: Gene-gene interactions in folate metabolic pathway influence the risk for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leuk.Lymphoma* 2007, 48(4), 786-92
164. Peyriere H., Cociglio M., Margueritte G. i in.: Optimal management of methotrexate intoxication in a child with osteosarcoma. *Ann.Pharmacother.* 2004, 38(3), 422-7
165. Piekarczyk A., Zimak J., Taljański W.: Pharmacokinetics of methotrexate and therapeutic drug monitoring in children with osteosarcoma. Computer simulation using a pharmacokinetic model. *Med.Wieku Rozwoj.* 2000, 4(2), 27-33
166. Pietrzyk J.J., Bik-Multanowski M., Balwierz W. i in.: Additional genetic risk factor for death in children with acute lymphoblastic leukemia: a common polymorphism of the MTHFR gene. *Pediatr. Blood & Cancer* 2009, 52, 364-8
167. Plard C., Bressolle F., Fakhoury M. i in.: A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2007, 60(4), 609-20
168. Powis G.: Dose-dependent metabolism, therapeutic effect and toxicity of anticancer drugs in man. *Drug Metab.Rev.* 1983, 14(6), 1145-63
169. Pui C.H., Relling M.V., Evans W.E.: Role of pharmacogenetics and pharmacodynamics in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract.Res.Clin.Haematol.* 2002, 15(4), 741-56

170. Pui C.H.: Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr.Op.Oncol.* 2000, 12, 3-12
171. Pui C.H., Cheng C., Leung W. i in.: Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N.Eng. J. Med.* 2003, 349, 640-9
172. Pui C.H., Relling M.V., Downing J.R.: Acute lymphoblastic leukemia. *N.Eng.J.Med.* 2004, 350, 1535-48
173. Quinn C.T., Griener J.C., Bottiglieri T. i in.: Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment of cancer. *J.Clin.Oncol.* 1997, 15(8), 2800-6
174. Radwańska U., Michalewska D., Kołecki P. i in.: Wstępna analiza wyników leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej mniejszego ryzyka przy użyciu wysokich dawek metotreksatu z pominięciem napromieniania mózgowia. *Ped.Pol.* 1996, 6, 49-54
175. Rask C., Albertioni F., Bentzen S.M. i in.: Clinical and pharmacokinetic risk factors for high-dose methotrexate-induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia – a logistic regression analysis. *Acta Oncol.* 1998, 37(3), 277-84
176. Rask C., Albertioni F., Schroder H. i in.: Oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia after high-dose methotrexate treatment without delayed elimination of methotrexate: relation to pharmacokinetic parameters of methotrexate. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 1996, 13(4), 359-67
177. Rau T., Erney B., Göres R. i in.: High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2006, 80(5), 468-76
178. Raude E., Oellerich M., Weinl P. i in.: High-dose methotrexate: pharmacokinetics in children and young adults. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.Toxicol.* 1988, 26(7), 364-70
179. Reddick W.E., Glass J.O., Helton K.J. i in.: A quantitative MR imaging assessment of leukoencephalopathy in children treated for acute lymphoblastic leukemia without irradiation. *Am.J.Neuroradiol.* 2005, 26(9), 2371-7
180. Reddy H., Jamil K.: Polymorphisms in the MTHFR gene and their possible association with susceptibility to childhood acute lymphocytic leukemia in an Indian population. *Leuk.Lymphoma* 2006, 47(7), 1333-9
181. Rees H., Hann I.M., Chessells J.M. i in.: Are glomerular filtration rate estimations necessary before high dose methotrexate? *Arch.Dis.Child.* 1999, 81(4), 339-40
182. Reggev A., Djerassi I.: The safety of administration of massive doses of methotrexate (50 g) with equimolar citrovorum factor rescue in adult patients. *Cancer* 1988, 61(12), 2423-8
183. Relling M.V., Fairclough D., Ayers D. i in.: Patient characteristics associated with high-risk methotrexate concentrations and toxicity. *J.Clin.Oncol.* 1994, 12(8), 1667-72
184. Ridolfi L., Barisone E., Vivalda M. i in.: Toxicity of high dose methotrexate repeated infusions in children treated for acute lymphoblastic leukemia and osteosarcoma. *Minerva Pediatr.* 1996, 48(5), 193-200
185. Robien K., Boynton A., Ulrich C.M.: Pharmacogenetics of folate-related drug targets in cancer treatment. *Pharmacogenomics* 2005, 6(7), 673-89
186. Rocha J.C., Cheng C., Liu W. i in.: Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005, 105(12), 4752-8
187. Rolf N., Boehm H., Kaindl A.M. i in.: Acute ascending motoric paraplegia following intrathecal chemotherapy for treatment of acute lymphoblastic leukemia in children: case reports and review of the literature. *Klin.Padiatr.* 2006, 218(6), 350-4
188. Rots M.G., Pieters R., Peters G.J. i in.: Methotrexate resistance in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Brit.J.Hematol.* 2000, 109, 629-34
189. Rots M.G., Pieters R., Peters G.J. i in.: Role of folylpolyglutamate synthetase and folylpolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia. *Blood* 1999, 93(5), 1677-83
190. Rubnitz J.E., Pui C.H.: Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Treat.Rev.* 2003, 29, 31-44

191. Rubnitz J.E., Relling M.V., Harrison P.L. i in.: Transient encephalopathy following high-dose methotrexate treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998, 12(8), 1176-81
192. Ruiz-Argüelles G.J., Coconi-Linares L.N., Garcés-Eisele J. i in.: Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. *Hematology* 2007, 12(5), 387-91
193. Sand T.E., Jacobsen S.: Effect of urine pH and flow on renal clearance of methotrexate. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 1981, 19(6), 453-6
194. Sasazaki Y., Asami K., Utsumi J.: Transient subacute encephalopathy induced by high-dose methotrexate treatment in children with acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 1992, 19(11), 1851-7
195. Sato T., Nakanishi K., Takahashi M. i in.: The influence of liver and renal functions on the changes in serum methotrexate (Mtx) level in high-dose Mtx therapy. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1990, 17(12), 2375-9
196. Sauer H., Schalhorn A.: Rational basis and practice of the citrovorum factor (Leucovorin) protection after high-dose methotrexate therapy. High-dose methotrexate/leucovorin. *Onkologie* 1980, 3(2), 64-71
197. Sauer M., Rydholm N., Piatkowski J. i in.: Nephrotoxicity due to intermediate-dose methotrexate without rescue in an obese adolescent with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 2002, 19, 135-40
198. Schellens J.H., Beijnen J.H.: Management recommendations in patients with methotrexate intoxication. *Ned.Tijdschr.Geneeskd.* 2007, 151(6), 337-41
199. Schmidt E., Thoennissen N.H., Rudat A. i in.: Use of palifermin for the prevention of high-dose methotrexate-induced oral mucositis. *Ann.Oncol.* 2008, 19(9), 1644-9
200. Schnakenberg E., Mehles A., Cario G. i in.: Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *B.M.C.Med.Genet.* 2005, 6-23
201. Schrappe M.: Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann.Hematol.* 2004, 83, 121-3
202. Schrappe M., Reiter A., Henze G. i in.: Prevention of CNS recurrence in childhood ALL: results with reduced radiotherapy combined with CNS-directed chemotherapy in four consecutive ALL-BFM trials. *Klin. Padiatr.* 1998, 210, 192-9
203. Schrappe M., Reiter A., Rhiem H.: Prophylaxis and treatment of neoplastic meningeosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J.Neurooncol.* 1998, 38(2-3), 159-65
204. Schrappe M., Reiter A., Zimmermann M.: Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Leukemia* 2000, 14, 2205-22
205. Seidel H., Andersen A., Kvaloy J.T.. i in.: Variability in methotrexate serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics in children with acute lymphocytic leukemia: relation to assay methodology and physiological variables. *Leuk.Res.* 2000, 24(3), 193-9
206. Seidel H., Moe P.J., Nygaard R. i in.: Evaluation of serious adverse events in patients treated with protocols including methotrexate infusions. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 1994, 11(2), 165-72
207. Seidel H., Nygaard R., Moe P.J. i in.: On the prognostic value of systemic methotrexate clearance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Leuk.Res.* 1997, 21(5), 429-34
208. Seidemann K., Book M., Zimmermann M. i in.: MTHFR 677C>T polymorphism is not relevant for prognosis or therapy-associated toxicity in pediatric NHL: results from 484 patients of multicenter trial NHL-BFM 95. *Ann.Hematol.* 2006, 85(5), 291-300
209. Shimasaki N., Mori T., Samejima H. i in.: Effects of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J. Pediatr.Hematol.Oncol.* 2006, 28(2), 64-8

210. Shinozaki T., Watanabe H., Tomidokoro R. i in.: Successful rescue by oral cholestyramine of a patient with methotrexate nephrotoxicity: nonrenal excretion of serum methotrexate. *Med.Ped.Oncol.* 2000, 34, 226-8
211. Shishido F., Uemura K., Komatsu K. i in.: Cerebral glucose metabolic change after high-dose methotrexate treatment in patients with acute lymphocytic leukemia. *Acta Radiol.Suppl.* 1986, 369, 422-5
212. Skarby T.V., Anderson H., Heldrup J. i in.: High leucovorin doses during high-dose methotrexate treatment may reduce the cure rate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2006, 20(11), 1955-1962
213. Skärby T., Jönsson P., Hjorth L. i in.: High-dose methotrexate: on the relationship of methotrexate elimination time vs renal function and serum methotrexate levels in 1164 courses in 264 Swedish children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2003, 51(4), 311-20
214. Slordal L., Kolmannskog S., Moe P.J. i in.: High-dose methotrexate therapy (6-8 g/m²) in childhood malignancies: clinical tolerability and pharmacokinetics. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 1987, 4(1), 33-42
215. Słociak M., Wiela-Hojeńska A., Bogusławska-Jaworska J. i in.: Ocena toksyczności dużych dawek metotreksatu stosowanych u dzieci z mięsakiem kościopochodnym. *Supp. Ped. Pol.* 1997, 11, 295-300
216. Snyder R.L.: Resumption of high-dose methotrexate after methotrexate-induced nephrotoxicity and carboxypeptidase G2 use. *Am.J.Health Syst.Pharm.* 2007, 64(11), 1163-9
217. Sorich M.J., Pottier N., Pei D. i in.: In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile. *PLoS.Med.* 2008, 5(4), e83
218. Sosin M., Handa S.: Low dose methotrexate and bone marrow suppression. *Br.Med.J.* 2003, 326(7383), 266-7
219. Spencer H.T., Sorrentino B.P., Pui C.H. i in.: Mutations in the gene for human dihydrofolate reductase: an unlikely cause of clinical relapse in pediatric leukemia after therapy with methotrexate. *Leukemia* 1996, 10(3), 439-46
220. Steinbach D., Wittig S., Carrio G. i in.: The multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3) is associated with a poor outcome in childhood ALL and may account for the worse prognosis male patients and T-cell immunophenotype. *Blood* 2003, 102(13), 4493-8
221. Sterba J., Valik D., Bajciová V. i in.: High-dose methotrexate and/or leucovorin rescue for the treatment of children with lymphoblastic malignancies: do we really know why, when and how? *Neoplasma* 2005, 52(6), 456-63
222. Stoller R.G., Hande K.R., Jacobs S.A. i in.: Use of plasma pharmacokinetics to predict and prevent methotrexate toxicity. *N.Eng.J.Med.* 1997, 297(12), 630-4
223. Stoller R.G., Kaplan H.G., Cummings F.J. i in.: A clinical and pharmacological study of high-dose methotrexate with minimal leucovorin rescue. *Cancer Res.* 1979, 39, 906-12
224. Strunk T., Gottschalk S., Goepel W. i in.: Subacute leukoencephalopathy after low-dose intrathecal methotrexate in an adolescent heterozygous for the MTHFR C677T polymorphism. *Med.Pediatr.Oncol.* 2003, 40, 48-50
225. Synold T.W., Relling M.V., Boyett J.M. i in.: Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J.Clin.Invest.* 1994, 94(5), 1996-2001
226. Sztéfko K.: Badania laboratoryjne. Zakresy wartości referencyjnych. Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 1997 (publikacja wewnętrzna)
227. Szczeklik A., Sanak M., Jankowski M. i in.: Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: a risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia. *Am.J.Med.Genet.* 2001, 101(1), 36-9

228. Taj M.M., Messahel B., Mycroft J. i in.: Efficacy and tolerability of high-dose methotrexate in central nervous system positive or relapsed lymphoproliferative disease following liver transplant in children. *Br.J.Haematol.* 2008, 140(2), 191-6
229. Taub J.W., Ge Y.: Down syndrome, drug metabolism and chromosome 21. *Pediatr.Blood Cancer* 2005, 44(1), 33-9
230. Thompson P.A., Murry D.J., Rosner G.L. i in.: Methotrexate pharmacokinetics in infants with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2007, 59(6), 847-53
231. Thyss A., Milano G., Deville A. i in: Effect of dose and repeat intravenous 24 hr infusions of methotrexate on cerebrospinal fluid availability in children with hematological malignancies. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 1987, 23(6), 843-7
232. Titier K., Lagrange F., Pehourcq F. i in.: Pharmacokinetic interaction between high-dose methotrexate and oxacillin. *Ther.Drug Monit.* 2002, 24(4), 570-2
233. Totan M., Dagdemir A., Ak A.R. i in. Effects of high-dose methotrexate on the hemostatic system in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med.Pediatr.Oncol.* 2001, 36(4), 429-33
234. Treon S.P., Chabner B.A.: Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin.Chem.* 1996, 42:8(B), 1322-9
235. Tsurusawa M., Katano N., Yamamoto Y. i in.: Improvement in CSN protective treatment in non-high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: report from the Japanese Children's Cancer and Leukemia Study Group. *Med.Ped.Oncol.* 1999, 32, 259-66
236. Turello R., Rentsch K., Di Paolo E. i in.: Renal failure after high-dose methotrexate in a child homozygous for MTHFR C677T polymorphism. *Pediatr.Blood Cancer*, 2008, 50(1), 154-6
237. Ulrich C.M., Yasui Y. Storb R. i in.: Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001, 98(1), 231-4
238. Urano W., Taniguchi A. Yamanaka H. i in.: Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002, 12(3), 183-90
239. Valik D., Sterba J., Bajciová V. i in.: Severe encephalopathy induced by the first but not the second course of high-dose methotrexate mirrored by plasma homocysteine elevations and preceded by extreme differences in pretreatment plasma folate. *Oncol.* 2005, 69(3), 269-72
240. Van der Put N.M., Streegers-Theunissen R.P., Frosst P. i in.: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995, 346(8982), 1070-1
241. Van Ede A.E., Laan R.F., Bloom H.J. i in.: The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2001, 44(11), 2525-30
242. Vlachá V., Eliopoulou M., Haidas S. i in.: Correlation of cerebrospinal fluid beta-glucuronidase activity with plasma methotrexate concentrations in leukemic children receiving high-dose methotrexate. *Pediatr.Blood Cancer* 2004, 42(4), 350-6
243. Volk E.L., Schneider E.: Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res.* 2003, 63(17), 5538-43
244. Volm M., Sauerbrey A., Zintl F.: Dihydrofolate reductase and thymidylate-synthase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res.* 1994, 14(3B), 1377-81
245. Von Stackelberg A., Hartmann R., Bühner C. i in.: High-dose compared with intermediate-dose methotrexate in children with a first relapse of acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2008, 111(5), 2573-80

246. Von Hoff D.D., Penta J.S., Helman L.J. i in.: Incidence of drug-related deaths secondary to high-dose methotrexate and citrovorum factor administration. *Cancer Treat.Rep.* 1977, 61(4), 745-8
247. Waber D.P., Tarbell N.J., Fairclough D. i in.: Cognitive sequelae of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia: cranial radiation requires an accomplice. *J.Clin.Oncol.* 1995, 13(10), 2490-6
248. Wall A.M., Gajjar A., Link A. i in.: Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000, 14(2), 221-5
249. Wang Y.M., Sutow W.W., Romsdahl M.M. i in.: Age-related pharmacokinetics of high-dose methotrexate in patients with osteosarcoma. *Cancer Treat.Rep.* 1979, 63(3), 405-10
250. Weigand M., Frei E., Graf N. i in.: Mechanisms of resistance to methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia: circumvention of thymidylate synthase inhibition. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 1999, 125(8-9), 513-9
251. Werchaniak A.E., Chaffee S., Dinulos J.G.: Methotrexate-induced bullous acral erythema in a child. *J.Am.Acad.Dermatol.* 2005, 52(5), 93-5
252. Whitehead V.M., Vuchich M.J., Lauer S.J. i in.: Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (> 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1992, 80, 5, 1316-23
253. Widemann B.C., Adamson P.C.: Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncol.* 2006, 11(6), 694-703
254. Widemann B.C., Balis F.M., Murphy R.F. i in.: Carboxypeptidase-G2, thymidine, and leucovorin rescue in cancer patients with methotrexate-induced renal dysfunction. *J.Clin.Oncol.* 1997, 15 (5), 2125-34
255. Widemann B.C., Balis F.M., Shalabi A. i in.: Treatment of accidental intrathecal methotrexate overdose with intrathecal carboxypeptidase G2. *J.Natl.Cancer Inst.* 2004, 96(20), 1557-9
256. Wiela-Hojeńska A., Gorczyńska E., Orzechowska-Juzwenko K. i in.: Metabolic functions of the liver during chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* 2001, 39(6), 246-50
257. Wiela-Hojeńska A., Słociak M., Orzechowska-Juzwenko K. i in.: Leczenie średnio dużymi i dużymi dawkami metotreksatu u dzieci z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego. *Acta Haematol.Pol.* 1996, 27(3), 309-17
258. Wolfrom C., Hartmann R., Fengler R. i in.: Randomized comparison of 36-hour intermediate-dose versus 4-hour high-dose methotrexate infusions for remission induction in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *J.Clin.Oncol.* 1993, 11(5), 827-33
259. Wolfrom C., Hepp R., Hartmann R. i in.: Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 1990, 39(4), 377-83
260. Wysocki M., Balcar-Boroń A., Nowaczyk-Michalak A. i in.: Żółtaczka u dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki. *Wiad.Lek.* 1991, XLIV, 15-16
261. Wysocki M., Nowaczyk-Michalak A., Pilecki O. i in.: Reakcja Burgdorfa („painful acral erythema”) po leczeniu pośrednimi dawkami metotreksatu chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną. *Wiad.Lek.* 1992, XLV, 11-12
262. Xu W.Q., Tang Y.M., Fang C.Q. i in.: Study of elimination delay in high dose methotrexate therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2005, 26(1), 15-8
263. Xu W., Tang Y., Song H. i in.: Retrospective study on elimination delay in high-dose methotrexate therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia in China. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 2007, 29(10), 688-93

264. Yang C.H., Yang L.J., Jaing T.H. i in.: Toxic epidermal necrolysis following combination of methotrexate and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Int.J.Dermatol.* 2000, 39(8), 621-3
265. Yoruk A., Cizmecioglu F., Yukselgungor H. i in.: Methotrexate-induced systemic vasculitis. *Med.Pediatr.Oncol.* 2002, 38, 139-40
266. Yeoh E.J., Ross M.E., Shurtleff S.A. i in.: Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell.* 2002, 1(2), 133-43
267. Yuan J.M., Lu S.C., Van Den Berg D. i in.: Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes and risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007, 46(3), 749-58
268. Zelcer S., Kellick M., Wexler L.H. i in.: The Memorial Sloan Kettering Cancer Center experience with outpatient administration of high-dose methotrexate with leucovorin rescue. *Pediatr.Blood Cancer* 2008, 50(6), 1176-80
269. Zhang C.Y., Gu J., Li Y.Z. i in.: Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate administred in 329 children with acute lymphoblastic leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Za Zhi* 2008, 16(1), 106-10
270. Zhang L., Taub J.W., Williamson M. i in.: Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clin.Cancer Res.* 1998, 4, 2169-77
271. Ziereisen F., Dan B., Azzi N. i in.: Reversible acute methotrexate leukoencephalopathy: atypical brain MR imaging features. *Pediatr.Radiol.* 2006, 36(3), 205-12
272. Zintzaras E., Koufakis T., Ziakas P.D. i in.: A mata-analysis of genotypes and haplotypes of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in acute lymphoblastic leukemia. *Eur.J.Epidemiol.* 2006, 21(7), 501-10
273. Zoubek A., Zaunschirm H.A., Lion T. i in.: Successful carboxypeptidase G2 rescue in delayed methotrexate elimination due to renal failure. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 1995, 12(5), 471-7

VIII. STRESZCZENIE

Wprowadzenie

Metotreksat (Mtx) jest podstawowym cytostatykiem, stosowanym m.in. w prewencji wznów oponowych ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) u dzieci. Podawany w okresie konsolidacji remisji choroby, w różnie wysokich dawkach systemowych (HD), powinien być sprawnie eliminowany w określonym przedziale czasowym. Lek ten jest klasycznym antymetabolitem, blokuje działanie kluczowego dla gospodarki folianowej enzymu, reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR), której zmienna aktywność jest determinowana polimorfizmem genowym. Niedobór folianów prowadzi do przerywania szlaku syntezy białek i DNA, zaburzenia produkcji neurotransmiterów mózgu i odnowy najszybciej dzielących się tkanek. Istotne dla osiągnięcia zadowalających wyników leczenia białaczki jest uzyskanie co najmniej minimalnej wartości stężenia stacjonarnego Mtx ($16 \mu\text{mol/l}$) w każdym cyklu. Z kolei niezamierzona, przedłużona ekspozycja chorego na cytotoksyczne stężenia leku zagraża wystąpieniem nasilonych bliskich toksyczności, w tym odczynów zapalnych śluzówek przewodu pokarmowego, dysfunkcji wątroby i nerek, neurotoksyczności, powikłań infekcyjnych i supresji szpiku kostnego. Terapia monitorowana, oparta dotąd głównie na pomiarach stężeń Mtx w surowicy w określonych punktach czasowych cyklu, nie zapobiega występowaniu opóźnionej eliminacji leku i ostrych powikłań. Dlatego poszukuje się innych, bardziej skutecznych sposobów monitorowania przebiegu wydalania tego cytostatyku.

Celem pracy była ocena sprawności eliminacji i bliskich toksyczności dwóch wysokich dawek Mtx oraz próba wyłonienia czynników istotnie wpływających na zaburzenie wydalania i powikłania terapii tym cytostatykiem, stosowanym w dawkach: 2 g/m^2 i 3 g/m^2 w leczeniu dzieci z ALL. Poszukiwano także markerów dla wczesnej identyfikacji pacjentów zagrożonych przedłużonym wydalaniem leku.

Material i metody

Badaniem retrospektywnym objęto łącznie 218 pacjentów Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie w wieku 1 - 17 lat, w tym 146 leczonych Mtx w dawce 3 g/m^2 w latach: 1993-2002 oraz 72 leczonych w okresie: 2003-2007 z zastosowaniem dawki 2 g/m^2 . Cykle przeprowadzano czterokrotnie u każdego pacjenta w odstępie dwóch tygodni, wg tych samych zasad, zgodnie ze zmodyfikowanym Protokołem ALL-BFM-90 w pierwszym oraz ALL-IC-2002 w drugim okresie leczenia. W pracy oceniono łącznie 852 cykle z Mtx, podanym w dawce 2 g/m^2 i 3 g/m^2 , w odpowiednio: 276 i 576 chemioterapiach. Farmakokinetykę dwu różnych dawek Mtx oceniono na podstawie analizy: wartości stężeń stacjonarnych leku w surowicy, oznaczeń stężeń Mtx w 4 stałych punktach czasowych cykli oraz

obliczonych metodą Wagnera stałych eliminacji (K_{el}) leku w dwu fazach jego wydalania, dla cykli z prawidłowym i zaburzonym klirensiem leku. U 160 pacjentów oceniono wpływ polimorfizmu 677C>T MTHFR, zbadanego techniką PCR-RFLP, na eliminację cytostatyku oraz na częstość występowania i nasilenie bliskich toksyczności Mtx. Ocenę klinicznej tolerancji terapii HD-Mtx przeprowadzono porównując częstość występowania i nasilenie niepożądanych bliskich skutków terapii, zgodnie z rozszerzoną skalą toksyczności wg National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) w modyfikacji German Society of Pediatric Oncology/Hematology (GPOH), w zależności od zastosowanej dawki i sprawności wydalania Mtx. Wszystkie obliczenia przeprowadzono pakietem statystycznym STATISTICA. Celem wyłonienia czynników istotnie wpływających na przedłużenie eliminacji Mtx oraz nasilenie bliskich toksyczności terapii zastosowano wielowymiarową regresję logistyczną.

Wyniki

Podstawowymi czynnikami wpływającym na eliminację Mtx były: wysokość stężenia stacjonarnego i wiek pacjentów. Wartości stężeń stacjonarnych istotnie korelowały (dla dawki 2 g/m² i 3 g/m² Mtx p odpowiednio: 0,01 i 0,05) z przedłużeniem eliminacji leku ponad 48 godzinę chemioterapii. Istotnie wyższe ($p=0,001$) wartości stężeń stacjonarnych uzyskano w cyklach z niższą systemową dawką leku; obie grupy pacjentów różnił jedynie stan odżywienia (większy procentowy udział nadmiernie szczupłych w grupie leczonej dawką 2 g/m² leku). Wartości stężeń stacjonarnych, ocenione łącznie w 720 cyklach, wykazały istotną statystycznie, liniową zależność od wieku leczonych (dla dawki 2 g/m² i 3 g/m² p odpowiednio: 0,02 i 0,01). Najniższe średnie wartości stężeń stacjonarnych cechowały najmłodszych pacjentów (w wieku: 1 - 4 r.ż.), a najwyższe najstarszych (ponad 10-letnich). O niezwykle zmiennej farmakokinetyce Mtx, podanego w wysokich dawkach, świadczyły znaczne różnice w wartościach stężeń stacjonarnych leku, odnotowane u poszczególnych pacjentów, po podaży w identycznych warunkach tej samej dawki leku, w czterech kolejno realizowanych cyklach. Współczynnik zmienności wysokości tych stężeń, w analizie dotyczącej 548 chemioterapii, wahał się od 5 do 97%. Wyższa dawka Mtx determinowała uzyskiwanie istotnie bardziej stabilnych wartości stężeń stacjonarnych leku w kolejnych cyklach u danego pacjenta ($p=0,03$).

W ocenie skuteczności dwóch analizowanych dawek Mtx, pod względem zapewnienia minimalnego stężenia stacjonarnego w surowicy, nie wykazano przewagi żadnej z badanych dawek. W ponad 80% cykli, częściej ($p=0,08$) w przypadku zastosowania Mtx w dawce 3 g/m², uzyskane stężenie leku było wyższe od wartości minimalnego stężenia stacjonarnego. Jednocześnie prawie 40% dzieci, leczonych oboma dawkami, nie osiągnęło minimalnej wartości stężenia stacjonarnego w co najmniej jednym z czterech przeprowadzonych cykli.

W ocenie, dotyczącej łącznie 852 cykli z Mtx, podanym w dawce 2 g/m² i 3 g/m² (odpowiednio 72 i 146 dzieci oraz 276 i 576 chemioterapii), przedłużona eliminacja leku w 48. godzinie cyklu występowała z porównywalną częstością i dotyczyła odpowiednio: 17% cykli i 44,4% dzieci oraz 17,5% chemioterapii i 47,9% pacjentów. Przeprowadzona analiza wykazała brak wpływu: płci (p=0,28), BMI (p=0,66) oraz polimorfizmu 677C>T MTHFR (p=0,54) na sprawność wydalania leku. Zaobserwowana ponad 3-krotnie większa częstość przedłużonej eliminacji Mtx w ponad jednym cyklu w grupie pacjentów powyżej 10 r.ż., w porównaniu z najmłodszymi (1-4 r.ż.), była na pograniczu istotności statystycznej (p= 0,08). W grupie leczonej niższą dawką leku zaburzenie wydalania Mtx istotnie częściej (p=0,02), bo aż w 43,2 % chemioterapii, dotyczyło pierwszego z przeprowadzanych cykli. Przedłużona eliminacja leku w 48. godzinie była istotnie statystycznie częstsza (p=0,001) w porównaniu z występowaniem tej nieprawidłowości 6 godzin wcześniej (w 42. godzinie) – dla obu zastosowanych dawek Mtx, w odniesieniu zarówno do cykli, jak i do pacjentów.

W pracy wykazano, iż kolejnym czynnikiem istotnie wpływającym na zaburzenie wydalania Mtx było upośledzenie klirensu leku we wczesnej fazie jego szybkiego wydalania. W badaniu dotyczącym 642 chemioterapii z Mtx w dawce 2 g/m² i 3 g/m² (odpowiednio 219 i 423 cykle), dla obu dawek stwierdzono istotne różnice (p=0,0001) w wartościach K_{el} wczesnej fazy wydalania leku (24.-36. godzina), między cyklami z prawidłową i zaburzoną eliminacją. Wartości K_{el} w drugiej wolnej fazie wydalania nie różniły się natomiast istotnie (p=0,43), w zależności od klirensu leku. Dodatkowo wykazano, że w cyklach o zaburzonej eliminacji średnie wartości K_{el} były wyższe w obu fazach dla dawki 2 g/m², a w sposób istotny wyższe (p=0,0001) w fazie wolnej, co korelowało z obserwacją o istotnie wyższych wartościach stężeń stacjonarnych, uzyskanych w cyklach z Mtx w niższej dawce.

W analizie z zastosowaniem wieloczynnikowej regresji logistycznej jedynymi zmiennymi istotnie korelującymi (p= 0,001) z przedłużeniem wydalania Mtx w 48. godzinie cyklu okazały się: niskie wartości stałej eliminacji we wczesnej fazie wydalania oraz wysokie stężenia stacjonarne leku. Wartość progowa K_{el} wczesnej fazy wydalania Mtx, poniżej której gwałtownie rosło ryzyko przedłużonego wydalania leku, wynosiła dla badanej próby 0,3 h⁻¹.

Ocena wszystkich rodzajów ostrych toksyczności objęła 829 cykli, w tym 232 z prawidłową i 44 z zaburzoną eliminacją Mtx w dawce 2 g/m² oraz w przypadku dawki 3 g/m² odpowiednio: 456 i 97 cykli. Najczęstszymi bliskimi powikłaniami terapii HD-Mtx były: zaburzenie funkcji wątroby (dotyczące odpowiednio 64% i 61% pacjentów), nudności i wymioty (44% i 53%) oraz zapalenie śluzówek przewodu pokarmowego (29% i 45%). Nasilenie w/w toksyczności rzadko przekraczało 2. stopień. Ostra niewydolność nerek, najpoważniejsza z odnotowanych bliskich

toksyczności wystąpiła u 2 dzieci (0,9%) po zastosowaniu Mtx w niższej dawce. Nasilone wymioty, ograniczona diureza i dwukrotny wzrost wartości kreatyniny w 2 - 3 dobie chemioterapii były, poza wysokim stężeniem Mtx w surowicy, wczesnymi objawami tego powikłania.

Najczulszym parametrem biochemicznym, odzwierciedlającym bliską toksyczność wątrobową leczenia HD-Mtx, były stężenia albumin (oceniono 297 cykli) i białka całkowitego (667 cykli) w surowicy, które niezależnie od zastosowanej dawki leku i sprawności jego wydalania istotnie ($p=0,0001$) obniżały się po przeprowadzeniu chemioterapii. Średnie stężenia obu tych parametrów, kontrolowane około dwa tygodnie po podaniu Mtx, były istotnie wyższe w przypadku niższej dawki leku, co może przemawiać za wyższą toksycznością dawki 3 g/m^2 . Stężenie bilirubiny całkowitej (oceniono 743 cykle) w surowicy istotnie wzrastało ($p=0,0001$) w trakcie chemioterapii Mtx, także niezależnie od zastosowanej dawki i sprawności eliminacji leku. Podobnie jak w przypadku albumin i białka, tendencja ta była istotnie silniej wyrażona w cyklach z wyższą dawką cytostatyku. Stężenie w surowicy podstawowych enzymów wątrobowych, GOT (oceniono 803 cykle) i GTP (799 cykli) zachowywało się w przebiegu chemioterapii z HD-Mtx zmiennie - rosło lub obniżało się.

Wyższa dawka Mtx (związana z trójkową terapią dokanałową) wiązała się z większą częstością: nudności i wymiotów ($p=0,02$), zakażeń ($p=0,008$) oraz odczynów zapalnych śluzówek jamy ustnej ($p=0,0003$). Nudności i wymioty, najczęściej w stopniu 1. i 2., dotyczyły około 1/3 cykli z zaburzonym klirensiem leku.

Najistotniejszym czynnikiem wpływającym na nasilenie bliskich toksyczności terapii HD-Mtx była przedłużona ekspozycja na cytotoksyczne stężenia Mtx. W odniesieniu do cykli z Mtx w dawce 2 g/m^2 i 3 g/m^2 zaburzenie wydalania leku istotnie zwiększyło nasilenie i częstość występowania nudności i wymiotów (p odpowiednio: 0,024 i 0,0001), toksyczności ze strony błon śluzowych (p odpowiednio: 0,03 i 0,05), a także: zakażeń (p odpowiednio: 0,087 i 0,026), toksyczności skórnych (p odpowiednio: 0,05 i 0,069) i nerkowych (p odpowiednio: 0,025 i 0,003). Przedłużona eliminacja Mtx nie wpłynęła natomiast na nasilenie najczęstszej narządowej bliskiej toksyczności, jaką była dysfunkcja wątroby, a w szczególności na wzrost aktywności dwu podstawowych enzymów wątrobowych: GOT i GPT.

Polimorfizm 677C>T genu MTHFR nie miał wpływu na częstość występowania większości bliskich toksyczności terapii. Nasilenie najczęstszych powikłań: nudności i wymiotów, dysfunkcji wątroby oraz zapalenia śluzówek, a także kilku rzadszych objawów toksycznych, było wyższe u homozygot TT ale różnice nie były istotne statystycznie. Jedyne dwa przypadki

ostrej niewydolności nerek, w których genezie nie stwierdzono udziału żadnego ze znanych czynników ryzyka, wystąpiły u nosicieli wariantu CT i TT polimorfizmu 677C>T MTHFR.

Istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia najczęstszych toksyczności klinicznych: nudności, wymiotów i zapalenia śluzówek jamy ustnej był starszy wiek leczonych.

W ocenie jaką objęto łącznie 760 cykli zrealizowanych u 190 pacjentów jedno z częstszych powikłań klinicznych terapii HD-Mtx - odczyn zapalny śluzówek jamy ustnej - istotnie częściej ($p=0,002$) występował po pierwszej z czterech realizowanych kolejno chemioterapii. Natomiast zakażenia i opóźnienia w planowej kontynuacji leczenia istotnie rzadziej (p odpowiednio: 0,001 i 0,003) odnotowano po ostatnim, czwartym cyklu.

W analizie przy użyciu wieloczynnikowej regresji logistycznej wykazano, że tylko wysokie stężenia Mtx w surowicy w 48. godzinie cyklu, narażające pacjentów na przedłużoną ekspozycję na cytotoksyczne stężenia cytostatyku, istotnie ($p=0,03$) wpływały na wystąpienie co najmniej dwóch różnych bliskich powikłań terapii. Wartość progowa stężenia leku w 48. godzinie cyklu, dla tak zdefiniowanych nasilonych toksyczności terapii, wynosiła $0,3 \mu\text{mol/l}$.

Wnioski

Przedłużona eliminacja Mtx została stwierdzona u około połowy dzieci z ALL, leczonych dobowymi wlewami tego cytostatyku, w dawce 2 g/m^2 i 3 g/m^2 . Wykazana w pracy ogromna zmienność farmakokinetyki HD-Mtx jest argumentem przemawiającym za celowością adaptowania wysokości dawki Mtx do aktualnego, zmiennego kliresu leku u danego pacjenta. Terapia monitorowana pomiarami stężeń leku w surowicy zbyt późno, najczęściej dopiero w 48. godzinie cyklu, wskazywała na zaburzenie wydalania Mtx. Natomiast obniżona wartość K_{el} pierwszej, szybkiej fazy wydalania może być obiecującym markerem dla wczesnej identyfikacji pacjentów z zaburzonym kliresem leku. Praktyczne wykorzystanie tej obserwacji wymagałoby przeprowadzenia badań prospektywnych i ustalenia zakresu norm dla tego parametru.

Ogółem tolerancja Mtx podanego w dwu różnie wysokich dawkach - oceniona w 829 cyklach - była dobra, nie zagrażała nasilonymi (3. i 4. stopień) ani trwałymi toksycznościami, a powikłania występujące na tym etapie leczenia były krótkotrwałe i tylko wyjątkowo zaburzały planowy tok terapii. W obu przypadkach ostrej niewydolności nerek, najpoważniejszej bliskiej toksyczności, nie zidentyfikowano czynnika sprawczego tego powikłania - co jest argumentem za przydatnością monitorowania sprawności wydalania leku, stosowanego nawet w dawce 2 g/m^2 (czego nie wymagał protokół terapeutyczny). Ze względu na istotnie częstsze występowanie wymiotów u dzieci powyżej 10 r.ż., w tej grupie wiekowej należy rutynowo stosować leki z grupy antagonistów receptorów serotoninowych w trakcie terapii Mtx, już w dawce 2 g/m^2 .

Do grupy narażonej na nasilone bliskie powikłania i toksyczności leczenia Mtx w dawce 2 g/m^2 - 3 g/m^2 na podstawie przeprowadzonych badań można zaliczyć: pacjentów uzyskujących wyższe stężenia stacjonarne leku w surowicy, charakteryzujących się wolniejszym klirenssem Mtx i uzyskujących niższe wartości K_{el} we wczesnej fazie wydalania leku, dzieci powyżej 10 r.ż. oraz poddanych pierwszej chemioterapii HD-Mtx. Wydaje się, że poza wymienionymi czynnikami istotną rolę odgrywa uwarunkowana genetycznie i nie tłumaczona w pełni polimorfizmem 677 C>T MTHFR, indywidualna wrażliwość leczonych na ten cytostatyk. Tylko kompleksowe badania, w tym uwzględniające polimorfizmy genowe determinujące odmienną aktywność białek nośnikowych Mtx, enzymów odpowiedzialnych za metabolizm leku i zaangażowanych w szlak metabolizmu folianów, mogą dostarczyć dane tłumaczące osobniczo zmienną wrażliwość na Mtx.

IX. SUMMARY

Introduction

Methotrexate (Mtx) is one of principal chemotherapeutic agents employed in preventing meningeal relapses in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Administered as remission consolidation therapy in varied high systemic doses (HD), it should be effectively eliminated within a defined time frame. The drug is a classic antimetabolite; it inhibits the activity of the key enzyme involved in folate metabolism, i.e. 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), the variable activity of which is determined by gene polymorphism. Folate deficit leads to interruption of the protein and DNA synthesis path, disturbances in cerebral neurotransmitter production and regeneration of tissues containing the most rapidly dividing cells. Of significance in achieving satisfactory therapeutic results in leukemia patients is obtaining an at least minimum value of steady-state Mtx level ($16 \mu\text{mol/l}$) in each chemotherapy cycle. In turn, unintended, prolonged exposure of the patient to cytostatic concentrations of the drug is associated with a danger of intensified early toxicity, including inflammatory reactions involving oral and gastrointestinal mucosa, liver and kidney dysfunction, neurotoxicity, infectious complications and bone marrow suppression. Monitored therapy, generally based chiefly on determinations of serum Mtx levels at specified temporal points of the cycle, does not prevent delayed elimination of the drug and acute complications. This is why attempts are made at finding other, more effective methods of monitoring the course of elimination of the cytostatic drug.

The objective of the thesis was the assessment of the effectiveness of elimination and determination of early toxicity of two high Mtx doses, as well as an attempt at defining factors that considerably affect disturbances of elimination and complications triggered by Mtx therapy employing two doses - 2 g/m^2 and 3 g/m^2 - in children with ALL. The author also searched for markers of early identification of patients at risk of prolonged Mtx elimination.

Material and methods

A retrospective analysis was carried out in 218 patients aged 1-17 years managed at Department of Pediatric Oncology and Hematology, University Children's Hospital of Krakow, including 146 children treated with Mtx in the dose of 3 g/m^2 in the years 1993-2002, and 72 patients treated in the period 2003-2007, employing the dose of 2 g/m^2 . Each patient received four Mtx cycles, with the interval between chemotherapy cycles of two weeks; the same schedules of administration were applied, in keeping with the modified ALL-BFM-90 protocol in the initial and ALL-IC-2002 in the second period of treatment. The evaluation included 852 chemotherapy cycles with Mtx administered in the dose of 2 g/m^2 and 3 g/m^2 , in 276 and 576 chemotherapies,

respectively. The pharmacokinetics of two different Mtx doses was assessed based on the analysis of serum steady-state Mtx concentration values and determinations of Mtx concentration performed at four fixed time points of the cycles, as well as coefficient of elimination (K_{el}) calculated according to Wagner for two elimination phases for cycles with normal and delayed Mtx clearance. In 160 patients, the assessment included the effect of the 677C>T MTHFR polymorphism examined by PCR-RFLP on cytostatic drug elimination and on the frequency and intensity of early Mtx toxicity. The assessment of clinical tolerance of the HD-Mtx therapy was carried out comparing the frequency and intensity of adverse early effects of the therapy, in keeping with the extended toxicity scale according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC), as modified by the German Society of Pediatric Oncology/Hematology (GPOH), depending on the employed dose and effectiveness of Mtx elimination. All the calculations were performed using the STATISTICA software. In order to determine factors pronouncedly affecting prolonged elimination of Mtx and intensification of early toxicity of the therapy, the multiple logistic regression analysis was used.

Results

Major factors that affected drug elimination included the steady-state Mtx level and age of the patient. The values of steady-state Mtx concentrations were significantly correlated (for Mtx dose of 2 g/m² and 3 g/m², $p = 0.01$ and 0.05 , respectively) with prolonged drug elimination beyond the 48th hour of chemotherapy. Significantly higher ($p=0.001$) values of steady-state Mtx plasma concentrations were obtained in chemotherapy cycles with lower systemic Mtx doses; both groups of patients differed only in their nutritional status (a higher percentage of excessively thin patients in the group administered the dose of 2 g/m²). When evaluated globally in 720 cycles, the values of steady-state Mtx levels showed a statistically significant, linear correlation with the age of patients (for Mtx dose of 2 g/m² and 3 g/m², $p = 0.02$ and 0.01 , respectively). The lowest mean steady-state Mtx concentration values were characteristic for the youngest patients (aged 1- 4 years of life), and the highest were seen in the oldest children (above 10 years of age). The extremely variable pharmacokinetics of Mtx administered in high doses was demonstrated, by significant differences in steady-state serum concentration values observed in particular patients following the administration of the same dose under the same conditions, in four subsequent Mtx chemotherapy cycles. In the analysis of 548 chemotherapies, the variability coefficient of these concentration values ranged from 5 to 97%. A higher dose determined achieving significantly more stable steady-state Mtx concentration values in subsequent cycles in a given patient ($p=0.03$).

While assessing the effectiveness of the two analyzed Mtx doses with respect to providing the minimum steady-state serum concentration value, the author did not detect an advantageous

impact of any of the investigated doses. In more than 80% of the cycles, the achieved Mtx concentration level was more frequently ($p=0.08$) higher as compared to the minimum steady-state plasma level, when the medication was administered in the dose of 3 g/m^2 . At the same time, almost 40% of patients receiving either of the doses failed to achieve the minimum steady-state Mtx concentration value in at least one of four cycles.

While evaluating the total of 852 Mtx cycles with the drug administered in the dose of 2 g/m^2 and 3 g/m^2 (72 and 146 children, 276 and 576 chemotherapies, respectively), was observed that prolonged Mtx elimination in the 48th hour of the cycle occurred with a comparable frequency and was seen in 17% of chemotherapy cycles and 44.4% of children, as well as 17.5% of chemotherapies and 47.9% of patients, respectively. The analysis demonstrated no effect of gender ($p=0.28$), BMI ($p=0.66$) and the 677C>T MTHFR polymorphism ($p=0.54$) on the effectiveness of Mtx elimination. The observed almost three-fold higher frequency of prolonged Mtx elimination in more than one cycle in the group of patients above 10 years of life as compared to the youngest children (1-4 years of age), was at the threshold of statistical significance ($p=0.08$). In the group treated with the lower Mtx dose, disturbances in drug elimination were significantly more frequently ($p=0.02$) - in as many as 43.2 % chemotherapies - observed in the first of the four cycles. Delayed Mtx elimination in the 48th hour of the cycle was significantly more frequent ($p=0.001$) as compared to the occurrence of this abnormality 6 hours previously (in the 42nd hour of the cycle); this observation was true for both the employed Mtx doses and with respect to both the cycles and the patients.

In the study was demonstrated, that another factor that significantly delayed elimination of Mtx was the impairment of drug clearance in the early phase of rapid excretion of the medication. While analyzing 642 chemotherapies employing Mtx in the dose of 2 g/m^2 and 3 g/m^2 (219 and 423 cycles, respectively), both doses demonstrated significant differences ($p=0.0001$) in the K_{el} values of the early phase of drug elimination (24th-36th hour) between cycles with normal and disturbed excretion. On the other hand, the values of K_{el} in the second slow phase of elimination did not differ significantly ($p=0.43$) depending on Mtx clearance. In addition, in the study was demonstrated, that in cycles with delayed elimination, the mean K_{el} values were higher in both phases for the dose of 2 g/m^2 , and significantly higher ($p=0.0001$) in slow phase of elimination, what was correlated with the observation of significantly higher steady-state concentration values achieved in cycles with Mtx administered in the lower dose.

In the multiple logistic regression analysis, the only variables that were significantly correlated ($p = 0.001$) with delayed Mtx elimination in the 48th hour of the cycle were low values of coefficient of elimination in the early phase of excretion and high steady-state Mtx levels. For

the examined sample, the threshold value of K_{el} of early Mtx elimination phase, below which the risk of prolonged drug elimination rapidly increased, was 0.3 h^{-1} .

Evaluation of all types of acute toxicity was carried out in 829 chemotherapy cycles, including 232 cycles with normal and 44 cycles with disturbed elimination of Mtx administered in the dose of 2 g/m^2 ; in the case of the 3 g/m^2 dose, 456 and 97 cycles, respectively. The most common early complications of the HD-Mtx therapy were hepatic dysfunction (affecting 64% and 61% of patients, respectively), nausea and vomiting (44% and 53%) and oral mucositis (29% and 45%). The intensity of the above-mentioned toxicity rarely exceeded grade 2. Acute renal failure, the most severe of the detected early toxicity, was seen in two children (0.9%) following the administration of the lower dose of Mtx. Apart from high serum concentration values of Mtx also severe vomiting, decreased diuresis and a two-fold increase of creatinine level on day 2-3 of chemotherapy, were early signs of the complication.

The most sensitive biochemical parameter that reflected incipient hepatic toxicity in the course of the HD-Mtx therapy were serum concentration values of albumins (297 cycles were evaluated) and total protein (667 cycles), which, regardless of the administered Mtx dose and the effectiveness of its elimination, were significantly ($p = 0.0001$) decreased following chemotherapy. The mean concentration values of these two parameters, determined approximately two weeks following Mtx administration, were significantly higher in the case of the lower Mtx dose, what may support a higher toxicity of the 3 g/m^2 dose. Total serum bilirubin concentration (743 cycles were assessed) significantly increased ($p = 0.0001$) in the course of Mtx chemotherapy, again irrespectively of the employed dose and effectiveness of Mtx elimination. Similarly as in the case of albumins and protein, the tendency was significantly higher in cycles where the higher dose of the cytostatic drug was employed. Serum liver enzymes, AspAt (803 cycles were evaluated) and AlAt (799 cycles), showed variable levels in the course of the HD-Mtx chemotherapy, being either increased or decreased.

The higher dose of Mtx (in conjunction with triple intrathecal therapy) was associated with a higher frequency of nausea and vomiting ($p = 0.02$), infections ($p = 0.008$) and oral mucositis ($p = 0.0003$). Nausea and vomiting, most commonly of grade 1 and 2, were observed in approximately 1/3 of cycles with disturbed Mtx clearance.

The most significant factor affecting the intensity of early toxicity in patients on the HD-Mtx chemotherapy was prolonged exposure to cytotoxic concentrations of Mtx. In cycles with Mtx administered in the dose of 2 g/m^2 and 3 g/m^2 , disturbed Mtx elimination significantly increased the intensity and frequency of nausea and vomiting ($p = 0.024$ and 0.0001 , respectively), mucosal toxicity ($p = 0.03$ and 0.05 , respectively), as well as infections ($p = 0.087$ and 0.026),

skin ($p = 0.05$ and 0.069 , respectively) and renal toxicity ($p = 0.025$ and 0.003 , respectively). However, prolonged Mtx elimination did not affect the intensity of the most common early toxicity, i.e. liver dysfunction, and in particular, it did not affect an increased activity of the two basic liver enzymes, AspAt and AlAt.

The 677C>T polymorphism of the MTHFR gene showed no effect on the frequency of the majority of early toxicities. Intensification of the most common complications, i.e. nausea and vomiting, hepatic dysfunction and mucositis, as well as of a few less frequent toxic symptoms was higher in TT homozygotes, but the differences were not statistically significant. The only two cases of acute renal failure, in the pathogenesis of which no contribution of any known risk factor was detected, were observed in carriers of the CT and TT variants of the 677C> T MTHFR polymorphism.

A significant risk factor of developing the most common clinical toxicities, such as nausea, vomiting and oral mucositis was older age of patients.

In the analysis that included a total of 760 chemotherapy cycles implemented in 190 patients, one of the more common clinical complications of the HD-Mtx therapy, i.e. oral mucositis, was significantly more frequently ($p=0.002$) noted following the first of the four subsequent chemotherapies. On the other hand, infections and delays in the previously planned continued treatment were significantly less common ($p = 0.001$ and 0.003 , respectively) after the final, fourth chemotherapy cycle.

In the multiple logistic regression analysis, the author demonstrated that only high serum Mtx concentration values in the 48th hour of the cycle, which put the patients at risk of prolonged exposure to cytotoxic concentration levels of the drug, significantly ($p = 0.03$) affected the occurrence of at least two different early complications of therapy. For the thus defined intensified toxicities of the treatment, the threshold value of Mtx concentration in the 48th hour of the cycle, was $0.3 \mu\text{mol/l}$

Conclusions

Prolonged elimination of Mtx was observed in approximately one half of children with ALL treated with daily Mtx infusions in the dose of 2 g/m^2 and 3 g/m^2 . Considerable variability of HD-Mtx pharmacokinetics, demonstrated in the study, is an argument for adapting the dose of Mtx to a current, variable clearance of the drug in a given patient. Chemotherapy monitored by measurements of serum Mtx concentration levels was too late (most frequently only in the 48th hour of the cycle) in indicating disturbances of Mtx excretion. On the other hand, a decreased value of K_{el} of the first, rapid elimination phase may be a promising marker in early identification of patients with abnormal clearance of the drug. A practical application of this

observation would require performing prospective studies and determining the range of normal values for this parameter.

In general, tolerance of Mtx administered in two different doses and evaluated in 829 chemotherapy cycles was good, was not associated with intensified (grade 3 and 4) or prolonged toxicities. Complications occurring at this stage of treatment were transient and only exceptionally interfered with the planned course of therapy. In both cases of acute renal failure, the most severe early toxicity, no causative agent of this complication was identified, what provides an argument in favor of usability of monitoring Mtx elimination efficiency even when employing the medication in the dose of 2 g/m^2 (what was not required by the protocol). In view of vomiting occurring significantly more frequently in children above 10 years of life, this age group should be routinely administered serotonin receptor antagonists in the course of Mtx therapy, even with the dose of 2 g/m^2 .

Based on the present investigations, the high risk group for intensified early complications and toxicities of Mtx therapy administered in the dose of 2 g/m^2 - 3 g/m^2 , includes: patients with higher serum steady-state Mtx levels, characterized by slower drug clearance and lower K_{el} values in the early phase of elimination, children above 10 years of life and patients during the first HD-Mtx cycle. It seems that - apart from the above-mentioned factors - an important role is played by genetically determined and not fully explained by the 677 C>T MTHFR polymorphism individual sensitivity of the patient to the cytostatic drug. Only comprehensive studies, including investigations of gene polymorphisms that determine variable activity of Mtx carrier proteins, enzymes responsible for drug's metabolism and involved in folate metabolism pathway may provide data that would explain individual variations in sensitivity to Mtx.

X. ANEKS

1. Schemat leczenia dzieci standardowego ryzyka ALL w I okresie (1993-2003): indukcja i konsolidacja remisji

Indukcja remisji:

Protokół I – faza I:

Ecorton:	60 mg/m ² /doba	p.o.	dni: 1- 22
Winkrystyna:	1,5 mg/m ² /doba	i.v.	dni: 1, 8, 15, 22
Rubidomycyna:	30 mg/m ² /doba	i.v.	dni: 1, 8, 15, 22
L-asparaginaza:	10 000j/m ² /doba	i.v.	dni: 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33
Metotreksat, Arabinozyd cytozyny i SoluDacortin:	dawki zależne od wieku i.th. dni: 1, 15, 29		

Protokół I – faza II:

6-Merkaptopuryna:	60 mg/m ²	p.o.	dni: 36 – 64
Cyklofosfamid:	1000 mg/m ² /doba	i.v.	dni: 36, 64
Arabinozyd cytozyny:	75 mg/m ² /doba	p.o.	dni: 38-41, 45-48, 52-55, 59-62
Metotreksat, Arabinozyd cytozyny i SoluDacortin:	dawki zależne od wieku i.th. dni: 45, 59		

Przerwa w leczeniu 2 tygodnie

Konsolidacja remisji:

Protokół M:

6-Merkaptopuryna:	25 mg/m ² /doba	p.o.	dni: 1 – 57
Metotreksat:	3000 mg/m ² /doba	i.v.	dni: 8, 22, 36, 50
Metotreksat, Arabinozyd cytozyny i SoluDacortin:	dawki zależne od wieku i.th. dni: 9, 23, 37, 51		
Calcium leucovorin:	15 mg/m ² /doba	i.v.	godzina: 42, 48, 54 od rozpoczęcia wlewu Mtx

2. Schemat leczenia dzieci standardowego (SR) i pośredniego (IR) ryzyka ALL w II okresie (2003-2007) - indukcja i konsolidacja remisji

Indukcja remisji:

Protokół I – faza I:

Ecorton:	60 mg/m ² /doba	p.o.	dni: 1- 22
Winkrystyna:	1,5 mg/m ² /doba	i.v.	dni: 1, 8, 15, 22
Rubidomycyna:	30 mg/m ² /doba	i.v.	dni: 1, 8, 15, 22 – w grupie IR dni: 8, 15 – w grupie SR
L-asparaginaza:	5 000j/m ² /doba	i.v.	dni: 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33
Metotreksat		i.th.	dawki zależne od wieku dni: 1, 12, 33

Protokół I – faza II:

6-Merkaptopuryna:	60 mg/m ²	p.o.	dni: 36 – 64
Cyklofosfamid:	1000 mg/m ² /doba	i.v.	dni: 36, 64
Arabinozyd cytozyny:	75 mg/m ² /doba	p.o.	dni: 38-41, 45-48, 52-55, 59-62
Metotreksat		i.th.	dawki zależne od wieku. dni: 45, 59

Przerwa 2 tygodnie

Konsolidacja remisji:

Protokół M:

6-Merkaptopuryna:	25 mg/m ² /doba	p.o.	dni: 1 – 57
Metotreksat:	2000 mg/m ² /doba	i.v.	dni: 8, 22, 36, 50
Metotreksat:		i.th.	dawki zależne od wieku. dni: 9, 23, 37, 51
Calcium leucovorin:	15 mg/m ² /doba	i.v.	godzina: 42, 48, 54 od rozpoczęcia wlewu Mtx

3. Schemat chemioterapii HD-Mtx

Godzina – 4: jednogodzinny wlew dożylny o składzie: 8,4% NaHCO₃ 2 mmol/kg + Aqua destilata 2 ml/kg

Godzina – 3: Furosemid: 0,5 mg/kg i.v. (dawka maksymalna: 20 mg)
3-godzinny wlew dożylny: 375 ml/m² (tj 1/8 z 3000 ml/m²) o składzie:
0,9% NaCl + 5% glukoza 1:1 + 7,5 ml 15% KCl/ 500 ml płynu + 30 ml 8,4% NaHCO₃/ 500 ml

Godzina 0 – 24: wlew dożylny 24-godzinny 3000 ml/m² o składzie:
0,9% NaCl + 5% glukoza 1:1 + 45 ml/m² 15% KCl + 180 ml/m² 8,4% NaHCO₃
+ **Mtx: 3000 mg/m² lub 2000 mg/m²:**
1/10 dawki w ciągu pierwszych 30 minut
9/10 dawki w ciągu kolejnych 23 i pół godziny

Godzina 1 – 2: punkcja lędźwiowa z badaniem płynu mózgowo-rdzeniowego i podaniem dokanałowym:

Mtx (jeśli 2000 mg Mtx i.v.)

lub **Mtx + Arabinozyd cytozyny + Prednizon** (jeśli 3000 mg Mtx i.v.) – dawki

wg wieku:

Wiek (lata)	Lek dokanałowy (mg)		
	Metotreksat	Arabinozyd cytozyny	Prednizon
≥ 1 < 2	8 mg	20 mg	6
≥ 2 < 3	10 mg	26 mg	8
≥ 3	12 mg	30 mg	10

po punkcji leżenie w pozycji poziomej co najmniej przez 2 godziny

Godzina 24 – 72: wlew dożylny 24-godzinny 3000 ml/m² o składzie:
0,9% NaCl + 5% glukoza 1:1 + 45 ml/m² 15% KCl + 180 ml/m² 8,4% NaHCO₃

Godzina 42, 48 i 54: Calcium leucovorin: 15 mg/m² i.v.

Godzina 24, 36, 42 i 48: oznaczenia stężeń Mtx w surowicy

wymagane wartości stężeń Mtx w surowicy: godzina 24: ≤ 150.0 μmol/l
godzina 36: ≤ 3.0 μmol/l
godzina 42: ≤ 1.0 μmol/l
godzina 48: ≤ 0.4 μmol/l

Godzina 0 – 72:

- monitorowanie pH moczu z każdej oddanej porcji – jeśli pH < 7 podanie jednorazowo (bez przerywania wlewu dobowego Mtx): 2 ml/kg aqua destilata + 2 ml/kg 8,4% NaHCO₃ w ciągu 30 minut i.v.,
- monitorowanie bilansu płynów co 12 godzin - jeśli bilans dodatni na ponad 400ml/m²/12 godzin podanie Furosemidu w dawce 0,5 mg/kg (maksymalnie 20 mg) i.v.,
- monitorowanie stanu klinicznego, w szczególności kontrola: RR, masy ciała,
- kontrolne badania biochemiczne (pomiędzy 24 a 48 godziną cyklu)

w przypadku przedłużonego wydalania Mtx:

- wlew dożylny: 24-godzinny 4500 ml/m² o składzie:
0,9% NaCl + 5% glukoza 1:1 + 45 ml/m² 15% KCl + 180 ml/m² 8,4% NaHCO₃,
- jeśli stężenie Mtx w surowicy w 24 godzinie > 150.0 μmol/l - oznaczenie ponowne dokładnie w 36 godzinie i drożenie *rescue* natychmiast po uzyskaniu wyniku stężenia leku z 36 godziny,
- oznaczenia stężeń Mtx w surowicy co 6 godzin, aż do obniżenia do poziomu 0,25 μmol/l,
- eskalacja dawki Calcium leucovorin (Aneks 4),
- ściśle monitorowanie bilansu płynów co 6 lub 3 godziny, jeśli bilans dodatni na ponad 200 ml/m² w
ciągu 6 godzin - podanie Furosemidu w dawce 0,5 mg/kg i.v. (maksymalnie 30 mg),
- ścisła obserwacja kliniczna,
- kontrolne badania biochemiczne

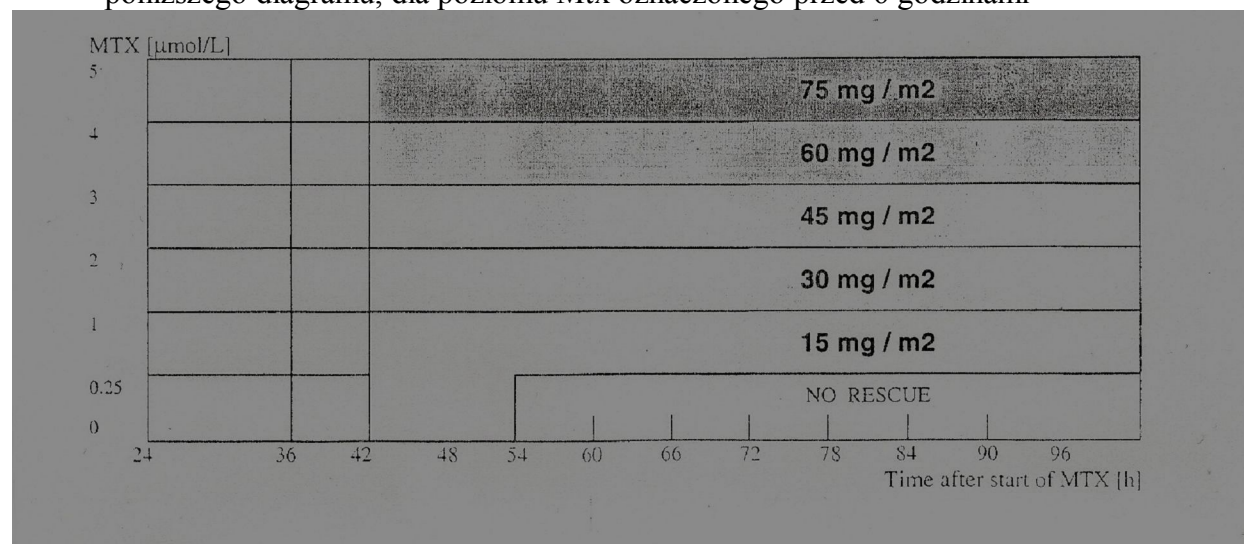
4. Diagram dawkowania Leukoworyny w przypadku przedłużonej eliminacji Mtx z organizmu, w oparciu o aktualne stężenia leku w surowicy

- **jeśli stężenie Mtx w 24 godzinie > 150 μmol/l (lub kliniczne objawy złej eliminacji leku):** ściśle oznaczenie stężenia w 36 godzinie i rozpoczęcie *rescue* Leucoworyną, gdy tylko potwierdzi się podwyższone stężenie leku w oznaczeniu z 36 godziny
- **jeśli stężenie Mtx w surowicy w 42 godzinie (lub później) > 5 μmol/l:** dawka Leucoworyny obliczana ze wzoru:

$$\text{Leucoworyna (mg)} = \text{stężenie Mtx w surowicy (}\mu\text{mol/l)} \times \text{masa ciała (kg)}$$

- do uzyskania spadku stężenia Mtx < 5 μmol/l, a następnie – jak poniżej
- jeśli pojedyncza dawka Leukoworyny jest większa niż 20 mg/kg – należy ją podać w jednogodzinny wlew dożylny, z uwagi na zagrożenie bradykarią spowodowaną dużą zawartością jonów wapnia

- **jeśli stężenie Mtx w surowicy w 42 godzinie: 1 – 5 μmol/l**
lub **stężenie Mtx w surowicy w 48 godzinie > 0,4 μmol/l:** Leucoworyna podawana jest co 6 godzin,
aż do uzyskania spadku stężenia Mtx w surowicy ≤ 0,25 μmol/l – w dawce odczytanej z poniższego diagramu, dla poziomu Mtx oznaczonego przed 6 godzinami



5. Tabela stopni toksyczności wywołanych chemioterapią HD-Mtx, wg rozszerzonych kryteriów National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) w modyfikacji German Society of Pediatric Oncology/Hematology (GPOH)

Rodzaj toksyczności	Stopień toksyczności			
	1	2	3	4
hematologiczne				
hemoglobina (g/l)	100 – N	80 – 100	65 – 79	< 65
WBC (x 10 ⁹ /l)	3.0 – 3.9	2.0 – 2.9	1.0 – 1.9	< 1.0
płytki (x 10 ⁹ /l)	75 – 100	50 – 74.9	10 – 49.9	< 10
wątrobowe				
GOT/GPT	≤ 2.5 x N	2.5 – 5.0 x N	5.0 – 20.0 x N	> 20 x N
bilirubina	≤ 1.5 x N	1.5 – 3.0	3.0 – 10.0 x N	> 10.0 x N
nerkowe				
kreatynina	≤ 1.5 x N	1.5 – 3.0	3.0 – 6.0	> 6.0 x N
żołądkowo-jelitowe i śluzówkowe				
nudności	prawidłowe łaknienie	obniżone łaknienie	prawie nie je	konieczne żywienie pozajelitowe
wymioty	1	2 - 5	6 - 10	> 10
zapalenie śluzówek jamy ustnej	rumień obrzmienie	pojedyncze nadżerki, może zjadać	bolesne, rozległe nadżerki, nie może zjadać	konieczne żywienie pozajelitowe
biegunka (ilość stolców/doba)	2 – 3 stolce	4 – 6 stolców niewielkie skurcze	7 – 9 stolców silne skurcze	> 10 stolców lub krwawienie
neurologiczne				
objawy toksyczne z centralnego układu nerwowego	umiarkowana senność lub pobudzenie, objawy popunkcyjne	senność < połowy dnia, mierna dezorientacja	senność > połowę dnia, nasilona dezorientacja, halucynacje	śpiączka drgawki
objawy toksyczne z obwodowego układu nerwowego	parestezje, obniżone odruchy ścięgniste	nasilone parestezje, obniżona siła mięśniowa	bardzo silne parestezje, deficyty ruchowe	niedowłady
skórne				
zmiany na skórze	rumień	suche łuszczenie, świąd	owrzodzenia	zapalenie eksfoliatywne, zmiany martwicze
zakażenia				
zakażenia	łagodne	mierne, patogen niezidentyfikowany, konieczne antybiotyki i.v.	ciężkie, patogen zidentyfikowany, konieczne antybiotyki i.v.	zagrożające życiu
gorączka (°C)	37.1 - 38	38.1 - 40	> 40 przez < 24 h	> 40 przez ≥ 24 h

N - norma

6. Tabela analizująca zmienność wartości stężeń stacjonarnych Mtx.

Oceniono łącznie 137 dzieci: 50 leczonych dawką 2 g/m² Mtx oraz 87 pacjentów leczonych dawką 3 g/m² leku.

U każdego pacjenta stężenia oceniono w 4 cyklach, dzieci uszeregowano wg rosnącej wartości współczynnika zmienności V% (procent odchylenia standardowego od średniej).

Pacjenci zaznaczeni kolorem są przedstawieni na rysunkach 7 i 8.

Nazwisko	dawka	kod wieku	średnia	s	min	max	V%
PE	2	3	23,89	1,20	22,4	25,09	5
SA	3	2	23,66	1,27	22,4	25,4	5
GK	3	2	22,24	1,35	20,41	23,4	6
OK	3	2	25,53	1,61	24,11	27,6	6
KM	3	1	20,97	1,55	19,08	22,63	7
GS	3	2	22,13	1,73	20,45	24,1	8
WW	3	1	23,97	2,28	22,18	27,3	10
TP	2	2	17,91	1,78	15,54	19,6	10
DA	2	2	20,96	2,24	17,63	22,35	11
ŁA	3	1	25,02	2,75	21,6	28,33	11
PM	3	1	19,96	2,35	18,15	23,4	12
KA	2	2	28,89	3,42	25,64	32,38	12
PJ	3	1	17,63	2,09	15,03	19,7	12
NK	3	2	22,64	2,76	18,86	25,1	12
SA	3	2	41,71	5,18	38,15	49,4	12
LW	2	2	47,28	6,08	41,1	55,1	13
PK	3	2	29,17	3,78	25,09	34,2	13
PK	3	2	23,85	3,11	19,68	26,8	13
WO	3	1	27,30	3,71	23,96	32,09	14
LM	2	1	19,31	2,81	17,1	23,17	15
KS	3	2	20,91	3,12	18,07	23,8	15
BM	3	2	19,61	2,98	15,52	22,6	15
KG	3	1	17,79	2,74	15,61	21,76	15
SA	3	2	26,14	4,22	20,15	29,6	16
KW	2	1	50,90	8,25	41,44	60,79	16
NJ	3	1	27,24	4,42	21,3	30,66	16
SP	2	2	14,28	2,38	12	17,6	17
CB	3	2	19,30	3,22	16,23	22,14	17
BM	3	1	21,49	3,61	16,49	24,36	17
DD	2	2	43,17	7,58	37,3	54,16	18
DP	3	2	20,43	3,59	16,36	23,6	18
MS	3	1	28,42	5,10	21,05	32,45	18
OG	3	2	20,69	3,74	18,12	26,14	18
WA	3	2	23,50	4,28	19,21	27,25	18
KR	3	1	16,82	3,07	14,15	20,61	18
SA	2	2	19,99	3,67	16,1	24,9	18
DI	2	3	59,67	11,06	49,67	75	19
SM	3	3	22,25	4,17	18,7	27,5	19
ZD	3	2	17,27	3,25	13,7	21,48	19
OW	3	3	21,34	4,03	16,77	26,6	19
CW	2	2	38,46	7,32	29,75	47,11	19
LK	3	1	24,74	4,84	19,82	29,4	20
DT	3	1	38,06	7,76	28,8	46,61	20
BT	3	2	25,47	5,38	20,16	32,97	21

WK	3	2	24,53	5,28	17,29	28,7	22
SA	3	2	20,55	4,45	15,04	25,06	22
BA	3	2	44,45	9,77	34,41	56,09	22
CK	3	1	25,63	5,73	17,66	30,42	22
GE	3	1	14,81	3,32	10,42	18,29	22
AM	3	3	26,13	5,88	17,43	30,17	22
KG	3	2	21,70	4,93	17,94	28,83	23
DA	3	1	19,82	4,59	14,07	23,9	23
MA	3	2	18,59	4,36	15,07	24,4	23
BK	2	1	33,89	7,97	25,51	44,11	24
SA	3	3	30,11	7,08	23,19	39,55	24
RZ	3	1	25,58	6,10	16,55	29,96	24
BK	3	3	30,54	7,95	25,62	42,35	26
SP	2	1	34,93	9,38	22,1	44,6	27
GK	3	2	29,03	7,87	20,14	38,71	27
ŁM	2	1	16,71	4,55	13,2	23,4	27
KK	2	1	17,20	4,82	10,13	21	28
PM	2	2	42,16	12,13	31,7	58,39	29
FB	3	2	29,41	8,54	19,98	40,65	29
CK	3	2	27,88	8,23	18	35,7	30
PP	3	1	29,96	8,90	22,6	42,16	30
KA	2	2	44,72	13,31	34,11	62,6	30
KD	3	1	26,00	7,87	15,5	34,2	30
KM	3	1	16,33	4,96	11,4	21	30
BM	2	3	45,15	13,73	29,4	62,82	30
KK	2	3	54,83	16,86	43,31	79,89	31
KK	3	2	24,04	7,39	17,2	33,19	31
LK	3	2	25,64	7,90	17,73	35	31
BM	3	2	56,01	17,27	38,9	79,9	31
BM	3	2	19,27	6,00	14,3	27,9	31
GM	2	2	35,11	10,95	24,5	49,36	31
ŁŁ	3	3	37,66	12,19	26,18	49,5	32
ŁP	3	1	23,10	7,49	14,7	31,5	32
OJ	3	2	24,44	7,99	15,4	34,6	33
KD	2	1	30,70	10,05	21	44,1	33
KK	3	3	34,63	11,41	21,16	46	33
ŚN	3	2	28,15	9,53	15,2	38,1	34
MP	3	3	26,94	9,15	15,1	36,41	34
MJ	3	1	21,00	7,15	13,4	30,3	34
KJ	2	2	45,35	15,46	24,05	57,13	34
MD	3	1	21,00	7,19	13,35	30,34	34
MB	3	2	23,83	8,22	15,4	31,52	34
MK	3	2	20,37	7,04	11,76	27,41	35
ŚE	2	1	10,80	3,74	7,36	15,97	35
ZG	3	2	27,49	9,53	13,23	33,12	35
HA	3	1	45,64	16,39	30,16	61,4	36
ŚJ	3	1	26,63	9,89	17,1	40,53	37
BD	2	2	12,92	4,82	6,18	17,51	37
SM	3	3	27,27	10,28	14,91	38,1	38
TA	3	1	17,99	6,83	10,67	27,18	38
SM	2	1	13,69	5,22	9,45	20,28	38
LZ	3	1	13,38	5,11	6,57	18,3	38
SD	2	1	41,80	15,99	27,73	59,02	38

KP	2	1	25,38	9,72	16,95	35,19	38
PS	3	2	28,05	11,04	18,19	40,35	39
PP	2	1	10,86	4,28	8,24	17,25	39
TP	2	1	28,14	11,96	12,01	38,7	43
RM	3	2	29,42	12,56	18,28	46,31	43
CS	2	2	44,53	19,26	29,6	72,8	43
PM	2	1	55,58	24,10	35,6	87,7	43
BS	3	1	17,82	7,82	6,32	23,4	44
KK	2	2	59,22	26,16	34,86	90,3	44
KP	3	1	25,01	11,13	13,24	39,7	45
SM	3	1	27,55	12,70	9,12	36,33	46
SE	3	2	42,18	19,66	18	58,2	47
QD	3	2	37,05	18,11	21,79	62,2	49
BE	3	2	55,92	27,46	23,2	89,16	49
OD	2	1	33,61	16,66	18,97	55,9	50
GK	3	2	35,22	17,67	16,7	58,2	50
GD	2	2	32,48	16,46	18	46,9	51
CJ	2	2	47,22	24,27	24,99	73,61	51
TT	3	3	27,32	14,30	15,78	48,13	52
WK	2	1	49,01	26,00	22,8	84,33	53
JA	2	2	20,23	10,90	5,92	32,24	54
SR	3	1	41,95	22,71	16,6	69,5	54
MK	2	2	51,37	28,03	31,99	93	55
NM	3	2	18,10	10,01	6,24	30	55
SP	2	2	38,88	21,62	24,2	70	56
BB	2	2	36,59	21,35	19,59	66,54	58
HJ	3	1	29,59	17,96	10,71	46,7	61
WN	2	2	9,97	6,51	3,3	15,6	65
CK	3	1	30,96	20,82	9,71	54,4	67
BD	2	2	41,82	28,80	14,18	79,43	69
MW	2	1	48,02	33,38	21,5	96	70
BA	2	2	20,25	14,31	6,46	35,4	71
CA	2	3	21,11	15,60	2,97	40	74
MZ	2	1	24,81	18,74	1,74	47,3	76
BA	3	1	19,61	15,07	6,51	34,23	77
CP	3	1	28,80	22,27	16,39	62,16	77
SJ	2	2	38,71	30,12	6,07	72,1	78
SK	2	2	25,59	22,23	10,92	58,65	87
LE	2	1	37,79	35,63	10,99	89,9	94
WP	3	2	14,62	14,15	1,5	29,9	97