

UNIWERSYTET MEDYCZNY im. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU

Joanna Sobiak

**FARMAKOKINETYKA WYSOKICH DAWEK ETOPOZYDU
I JEJ KLINICZNE ZNACZENIE W PRZYGOTOWANIU DO
ALLOGENICZNEJ TRANSPLANTACJI KOMÓREK
KRWIOTWÓRCZYCH U DZIECI CHORYCH NA OSTRĄ
BIAŁACZKĘ LIMFOBLASTYCZNĄ**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. Maria Chrzanowska

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej
i Farmakokinetiki
Kierownik Katedry i Zakładu:
Prof. dr hab. Franciszek K. Główka

Poznań 2012

Słowa kluczowe: etopozyd,
farmakokinetyka,
kondycjonowanie mieloablacyjne,
allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych,
pacjenci pediatryczni

Praca została wykonana we współpracy z:

- Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – Prof. dr hab. Jacek Wachowiak (Ordynator);
- Katedrą i Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy – Prof. dr hab. n. med. Mariusz Wysocki (Kierownik), Prof. dr hab. Jan Styczyński;
- Zakładem Immunologii Nowotworów Katedry Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – dr hab. Dariusz W. Kowalczyk, dr Urszula Kazmierczak.

Cześć pracy została opublikowana oraz przedstawiona na konferencjach naukowych.

Artykuły:

1. Chrzanowska M., Sobiak J., Grund G., Wachowiak J.: *Pharmacokinetics of high-dose etoposide administered in combination with fractionated total-body irradiation as conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia*, *Pediatr. Transplant.* 2011; 15: 96-102.
IF 1,475; KBN 27
2. Sobiak J.: *Przeszczepianie narządów i komórek krwiotwórczych - rys historyczny*, *Now. Lek.* 2011; 80: 157-161.
KBN 6
3. Chrzanowska M., Sobiak J., Wachowiak J.: *Etopozyd w onkologii dziecięcej*, *Probl. Ter. Monit.* 2008; 19: 217-229.
KBN 6

Komunikaty zjazdowe:

1. Sobiak J., Chrzanowska M, Szpecht D., Styczyński J., Wysocki M., Wachowiak J.: *Etoposide plasma concentration on day "0" and outcome of allogeneic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia*, 8th Meeting of the EBMT Paediatric Diseases WP 3rd Meeting of the EBMT Paediatric Nurses including Inborn errors WP educational day. Prague, Czech Republic, 7th-9th June 2012. *Pediatr. Praxi*, 2012 : R. 13 suppl. B, s. B28.
(wystąpienie ustne)
2. Sobiak J., Chrzanowska M., Wachowiak J., Szpecht D.: *Farmakokinetyka etopozydu u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną przygotowywanych do allogeneicznej transplantacji komórek krwiotwórczych*. V Zjazd Polskiego Towarzystwa Onkologii i Hematologii Dziecięcej. Międzyzdroje, 26-29 V 2010 r. *Onkol. Pol.* 2010, 13 (Supl. 2), 142.
(poster)
3. Sobiak J., Chrzanowska M., Wachowiak J.: *Etopozyd w onkologii dziecięcej*, Ogólnopolska Konferencja Naukowa - Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych. Poznań, 17-18 VI 2010 r. *Streszczenia*, P-59, s. 99.
(poster)

*Pani dr hab. Marii Chrzanowskiej
serdecznie dziękuję za naukową opiekę,
nieocenioną pomoc oraz życzliwość, wsparcie
i serdeczną atmosferę w trakcie realizacji pracy*

*Panu Profesorowi dr hab. Jackowi Wachowiakowi
serdecznie dziękuję za umożliwienie realizacji pracy
na podstawie materiału klinicznego,
za wszechstronną pomoc i okazaną życzliwość*

*Panu dr Dawidowi Szpechtowi
oraz
Pielęgniarkom Kliniki Onkologii, Hematologii
i Transplantologii Pediatrycznej UMiKM w Poznaniu
dziękuję za pomoc w zebraniu materiału klinicznego*

*Panu Profesorowi dr hab. Franciszkowi Głowce
serdecznie dziękuję
za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej
i zainteresowanie jej przebiegiem*

Składam serdeczne podziękowania

*Panu Profesorowi dr hab. Mariuszowi Wysockiemu
oraz Panu Profesorowi dr hab. Janowi Styczyńskiemu
za pomoc w zebraniu materiału klinicznego*

*Pani dr Urszuli Kazimierczak
i Panu Docentowi Dariuszowi Kowalczykowi
za pomoc w wykonaniu badań in vitro*

*Pracownikom Katedry i Zakładu
Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
za okazaną życzliwość i wszechstronną pomoc*

Pracę dedykuję

Kochanym Rodzicom i Kochanemu Mężowi

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	16
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	18
2.1. TRANSPLANTACJA KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH (HSCT).....	18
2.1.1. Rys historyczny	19
2.1.1.1. Historia HSCT na świecie.....	19
2.1.1.2. Przeszczepianie HSCT w Polsce.....	21
2.1.2. Allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych (allo-HSCT)	22
2.1.2.1. Wskazania do allo-HSCT u dzieci	23
2.1.2.1.1. Choroby rozrostowe.....	23
2.1.2.1.1.1. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	23
2.1.2.1.1.2. Ostra białaczka szpikowa (AML).....	25
2.1.2.1.1.3. Przewlekła białaczka szpikowa (CML).....	25
2.1.2.1.1.4. Chłoniak nieziarniczny (NHL)	25
2.1.2.1.1.5. Zespoły mielodysplastyczne (MDS) i młodzieńcza białaczka mielomonocytoza	26
2.1.2.1.1.6. Chłoniak Hodgkina (Hodgkin's lymphoma)	26
2.1.2.1.2. Choroby nierozrostowe układu krwiotwórczego	26
2.1.2.1.2.1. Nabyta ciężka niedokrwistość plastyczna, wrodzone niedokrwistości Fanconiego i hipoplastyczna Blackfana-Diamonda	26
2.1.2.1.2.2. Wrodzone niedobory odporności	27
2.1.2.1.2.3. Choroby metaboliczne.....	28
2.1.2.1.2.4. Hemoglobinopatie (talasemia).....	28
2.1.2.2. Kondycjonowanie przed HSCT u dzieci.....	28
2.1.2.2.1. Schematy kondycjonowania przed allo-HSCT u dzieci z ALL.....	30
2.1.2.2.2. Schematy kondycjonowania przed allo-HSCT u dzieci w innych chorobach niż ALL	33
2.1.2.2.3. Schematy kondycjonowania o zredukowanej intensywności (RIC).....	33
2.1.2.2.4. Aktualne tendencje w badaniach nad optymalizacją kondycjonowania....	34
2.2. ETOPOZYD (VP-16)	36
2.2.1. Postacie leku.....	36
2.2.2. Struktura i właściwości fizykochemiczne VP-16.....	36
2.2.3. Farmakokinetyka VP-16.....	37
2.2.3.1. Absorpcja i biodostępność	38
2.2.3.2. Dystrybucja i wiązanie z białkami	39
2.2.3.3. Metabolizm i wydalanie.....	40
2.2.4. Farmakodynamika i farmakoterapia VP-16	43
2.2.4.1. Mechanizm działania VP-16.....	43
2.2.4.2. Oporność na VP-16.....	44

SPIS TREŚCI

2.2.5. Zastosowanie VP-16 u dzieci w schematach terapeutycznych obowiązujących w Polsce.....	45
2.2.6. Dawkowanie.....	49
2.2.6.1. Dawkowanie w przypadkach upośledzonej funkcji wątroby i nerek.....	50
2.2.7. Działania niepożądane.....	51
2.2.7.1. Toksyczność hematologiczna.....	51
2.2.7.2. Kancerogenność VP-16.....	51
2.2.7.3. Mucositis.....	52
2.2.7.4. Zaburzenia żołądkowo-jelitowe.....	52
2.2.7.5. Zaburzenia sercowo-naczyniowe.....	52
2.2.7.6. Reakcje nadwrażliwości.....	52
2.2.7.7. Wpływ na układ nerwowy.....	53
2.2.8. Interakcje VP-16.....	54
2.2.9. Zmienność farmakokinetyki VP-16.....	55
2.2.10. Terapeutyczne monitorowanie VP-16.....	56
3. CEL PRACY.....	59
3.1. CELE SZCZEGÓŁOWE.....	59
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	60
4.1. METODYKA BADAŃ.....	60
4.1.1. Aparatura.....	60
4.1.2. Odczynniki.....	61
4.1.3. Metoda HPLC oznaczania VP-16.....	61
4.1.3.1. Warunki pracy chromatografu cieczowego.....	61
4.1.3.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych i krzywych wzorcowych.....	62
4.1.3.3. Walidacja metody.....	62
4.2. BADANIA KLINICZNE.....	65
4.2.1. Dane demograficzne dzieci przygotowywanych do allo-HSCT.....	65
4.2.2. Charakterystyka kondycjonowania przed allo-HSCT.....	66
4.2.3. Pobieranie i analiza próbek krwi.....	67
4.2.4. Leki podawane dzieciom równocześnie z VP-16.....	68
4.2.5. Parametry biochemiczne.....	69
4.3. OBLICZENIA I ANALIZA STATYSTYCZNA.....	71
4.3.1. Ocena stopnia nasilenia wczesnej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem.....	73
5. WYNIKI.....	74
5.1. STĘŻENIA VP-16.....	74
5.1.1. Stężenia VP-16 w dniu allo-HSCT.....	81
5.1.2. Stężenie i procent leku wolnego.....	85
5.2. PARAMETRY FARMAKOKINETYCZNE VP-16.....	86
5.2.1. Korelacje pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi VP-16.....	89

SPIS TREŚCI

5.2.2. Wpływ płci na parametry farmakokinetyczne VP-16	93
5.2.3. Porównanie wartości parametrów farmakokinetycznych w zależności od dawcy komórek krwiotwórczych.....	95
5.2.4. Porównanie wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 w zależności od podawania leków przeciwgrzybiczych.....	96
5.3. REKONSTYTUCJA KRWIOTWORZENIA ORAZ WYSTĘPOWANIE CHOROBY PRZESZCZEP PRZECIWKO GOSPODARZOWI (GvHD).....	98
5.3.1. Wpływ parametrów farmakokinetycznych VP-16 na rekonstytucję krwiotworzenia.....	105
5.4. WZNOWA ALL.....	106
5.4.1. Wartości parametrów farmakokinetycznych a wystąpienie wznowy ALL.....	108
5.4.2. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od wznowy ALL (pLFS).....	110
5.4.2.1. Porównanie pLFS dla dzieci będących w CR1, w zależności od obecności lub nieobecności VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT.....	110
5.4.2.2. Porównanie pLFS dla dzieci będących w CR2, u których stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT było oznaczalne lub nieoznaczalne.....	111
5.5. WCZESNA NIEHEMATOLOGICZNA TOKSYCZNOŚĆ NARZĄDOWA ZWIĄZANA Z KONDYCYJONOWANIEM	112
5.5.1. Wpływ parametrów farmakokinetycznych VP-16 na obserwowane działania niepożądane.....	114
5.5.1.1. Mucositis.....	114
5.5.1.2. Uszkodzenie nerek.....	116
5.5.1.3. Bez objawów wczesnej niehematologicznej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem	118
5.6. OCENA WPŁYWU VP-16 NA AKTYWNOŚĆ LIMFOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ (PBMCs) <i>IN VITRO</i>	119
5.6.1. Metodyka badań.....	119
5.6.1.1. Aparatura.....	119
5.6.1.2. Odczynniki.....	119
5.6.1.3. Izolacja PBMCs z krwi obwodowej.....	120
5.6.1.4. Ocena wpływu VP-16 na stopień proliferacji PBMCs.....	120
5.6.2. Wyniki.....	121
6. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW	123
6.1. Omówienie i dyskusja wyników uzyskanych u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c.	125
6.2. Omówienie i dyskusja wyników uzyskanych u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.	141
6.3. Podsumowanie.....	141
7. WNIOSKI.....	143
8. STRESZCZENIE.....	144
9. ABSTRACT.....	147
10. PIŚMIENNICTWO.....	149
11. ZAŁĄCZNIKI.....	167

SPIS TREŚCI

11.1. Zgody Komisji Bioetycznych przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy na prowadzenie badań.....	168
11.2. Informacja dla pacjenta i rodziców lub przedstawiciela ustawowego oraz Formularz świadomej zgody pacjenta i jego przedstawiciela ustawowego.	172
11.3. Charakterystyka dzieci przygotowywanych do allo-HSCT, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.	174
11.4. Parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w dniu podania VP-16 w dawkach 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c., w dniu allo-HSCT (dzień 0) oraz w trzeciej dobie po allo-HSCT (dzień +3).....	177
11.5. Stężenia VP-16 oznaczone do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.	184
11.6. Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.	187
11.7. Rekonstytucja granulopoezy i płytkotworzenia oraz działania niepożądane obserwowane u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.	190

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ALL – (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) ostra białaczka limfoblastyczna;
- allo-HSCT – (*Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*) allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych;
- AlAT – aminotransferaza alaninowa;
- AML – (*Acute Myeloid Leukemia*) ostra białaczka szpikowa;
- ANC – (*Absolute Neutrophil Count*) bezwzględna liczba granulocytów obojętnochłonnych;
- AspAT – aminotransferaza asparaginianowa;
- ATG – (*AntiThymocyte Globulin*) globulina antytymocytarna;
- AUC – (*Area Under the time–concentration Curve*) pole powierzchni pod krzywą stężenie–czas;
- auto-HSCT – (*Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation*) autologiczna transplantacja komórek krwiotwórczych;
- BM – (*Bone Marrow*) szpik kostny;
- BU – busulfan;
- CFU – (*Colony Forming Unit*) jednostka tworząca kolonię;
- CFU-GM – (*Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage*) komórki tworzące kolonię granulocytarno-makrofagalną;
- cGvHD – (*Chronic Graft-versus-Host Disease*) przewlekła choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi;
- CML – (*Chronic Myeloid Leukemia*) przewlekła białaczka szpikowa;
- C_{\max} – (*maximum Concentration*) stężenie maksymalne;
- Cl_{cr} – (*Creatinine Clearance*) klirens kreatyniny;
- Cl_s – (*Systemic Clearance*) klirens ogólnoustrojowy;
- CR1 – (*first Complete Remission*) pierwsza całkowita remisja;
- CR2 – (*second Complete Remission*) druga całkowita remisja;
- CR3 – (*third Complete Remission*) trzecia całkowita remisja;
- CsA – (*CycloSporine A*) cyklosporyna;
- C_{ss} – (*Steady State Concentration*) stężenie w stanie stacjonarnym;
- CV – (*Coefficient of Variation*) współczynnik zmienności;
- CY – cyklofosfamid;
- DMSO – dimetylosulfotlenek;
- EBMT – (*European Group for Blood and Marrow Transplantation*) Międzynarodowa organizacja skupiająca zespoły prowadzące procedury przeszczepowe;
- FBS – (*Fetal Bovine Serum*) bydlęca surowica płodowa;
- FTBI – (*Fractionated Total-Body Irradiation*) frakcjonowane napromienianie całego ciała;
- G-CSF – (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów;
- GvHD – (*Graft-versus-Host Disease*) choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi;
- GvL – (*Graft Versus Leukemia*) przeszczep przeciw białaczce;
- haplo-HSCT – (*Haploidentical HSCT*) allo-HSCT od dawcy haploidentycznego;
- HLA – (*Human Leukocyte Antygens*) ludzkie antygeny leukocytarne;
- HSCT – (*Haemopoietic Stem Cell Transplantation*) transplantacja komórek krwiotwórczych;
- IS – (*Internal Standard*) wzorzec wewnętrzny;

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- k_{12} – stała szybkości dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do kompartmentu drugiego;
- k_{21} – stała szybkości redystrybucji leku z kompartmentu drugiego do kompartmentu centralnego;
- k_{13} – stała szybkości dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do kompartmentu trzeciego;
- k_{31} – stała szybkości redystrybucji leku z kompartmentu trzeciego do kompartmentu centralnego;
- k_{10} – stała szybkości eliminacji leku z kompartmentu centralnego;
- LFS – (*Leukemia Free Survival*) przeżycie wolne od wznowy;
- LOD – (*Limit of Determination*) granica wykrywalności;
- LOQ – (*Limit of Quantification*) granica oznaczalności;
- MDR – (*MultiDrug Resistance*) oporność wielolekowa;
- MDS – (*MyeloDysplastic Syndromes*) zespoły mielodysplastyczne;
- MMD – (*MisMatched Donor*) częściowo niezgodny dawca;
- MRD – (*Minimal Residual Disease*) choroba resztkowa;
- MRT_{tot} – (*total Mean Residence Time*) średni czas przebywania leku w organizmie;
- MSD – (*Matched Sibling Donor*) rodzeństwo zgodne w HLA;
- MTX – (*Methotrexate*) metotreksat;
- MUD – (*Matched Unrelated Donor*) zgodny dawca niespokrewniony;
- NCI CTC - „Common Terminology Criteria” Adverse Events National Cancer Institute;
- NHL – (*Non-Hodgkin Lymphoma*) chłoniak nieziarniczny;
- PB – (*Peripheral Blood*) krew obwodowa;
- PBMCs – (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) limfocyty krwi obwodowej;
- PBS – (*Phosphate Buffered Saline*) sól fizjologiczna buforowana fosforanami;
- P-gp – glikoproteina P;
- pLFS – (*probability of Leukemia Free Survival*) prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od wznowy białaczki;
- RIC – (*Reduced Intensity Conditioning*) kondycjonowanie o zredukowanej intensywności;
- SD – (*Standard Deviation*) odchylenie standardowe;
- TBI – (*Total-Body Irradiation*) napromienianie całego ciała;
- TG – triglicerydy;
- $t_{0,5}$ α , β , γ – biologiczne okresy półtrwania faz α , β i γ ;
- TRM – (*Treatment Related Mortality*) śmiertelność związana z procedurą transplantacyjną;
- WBC – (*White Blood Cells*) liczba leukocytów;
- WHO – (*World Health Organization*) Światowa Organizacja Zdrowia;
- V_c – (*Volume of central compartment*) objętość kompartmentu centralnego;
- V_d – objętość dystrybucji;
- VP-16 – (*Etoposide*) etopozyd;
- V_{ss} – (*Volume of distribution at Steady State*) objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym.

1. WSTĘP

Transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych (HSCT) obejmuje aktualnie przeszczepianie allogenicznych (allo-HSCT) i autologicznych (auto-HSCT) komórek krwiotwórczych pochodzących ze szpiku kostnego (BM), krwi obwodowej (PB) lub krwi pępowinowej. Zarówno allo-HSCT jak i auto-HSCT z eksperymentalnych metod postępowania stały się w określonych chorobach rutynowymi procedurami terapeutycznymi [1, 2]. U dzieci i młodzieży allo-HSCT nie tylko odgrywa ważną rolę w leczeniu chorób nowotworowych, zwłaszcza ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) i nabytych niewydolnościach BM, lecz również stosowana jest jako skuteczna terapia w wielu zaburzeniach, takich jak wrodzone niedobory odporności, niektóre dziedziczne choroby metaboliczne, dziedziczna niewydolność BM i hemoglobinopatie [3]. Pomimo nadal aktualnego problemu, jakim jest wystąpienie poprzszczepowej wznowy ALL, zwłaszcza u pacjentów w grupie wysokiego ryzyka [4], pacjenci po HSCT żyją coraz dłużej i w związku z tym niezmiernie istotne stają się późne niepożądane następstwa związane z kondycjonowaniem przed allo-HSCT. Działania niepożądane mają szczególne znaczenie w wieku rozwojowym, ponieważ skutkują zahamowaniem wzrostu, bezpłodnością, zaburzeniami w rozwoju intelektualnym oraz wtórnymi nowotworami [1, 5].

U pacjentów z chorobą nowotworową, w tym u dzieci z ALL, kondycjonowanie przed allo-HSCT ma na celu przygotowanie biorcy do zabiegu poprzez wywołanie efektu mieloablacyjnego względem elementów prawidłowego krwiotworzenia, eliminację rezydualnych komórek białczkowych oraz zapobieżenie odrzuceniu przeszczepu w wyniku zastosowania odpowiedniej immunosupresji [6]. U dzieci z ALL przygotowywanych do allo-HSCT najczęściej stosowany schemat kondycjonowania, składający się z etopozydu (VP-16), podawanego w wysokich dawkach, w połączeniu z frakcjonowanym napromienianiem całego ciała (FTBI), charakteryzuje się pożądanym działaniem mieloablacyjnym [7]. Jednak stosowany w tym schemacie VP-16 wykazuje dużą zmienność osobniczą w farmakokinetyce konwencjonalnych dawek, która wpływa na jego toksyczność narządową i prawdopodobnie także na efekt terapeutyczny spostrzegany u poszczególnych pacjentów [8, 9]. Stężenie VP-16 obecne w osoczu w dniu allo-HSCT może mieć istotny wpływ na przyjęcie przeszczepu [10, 11]. Dlatego też wciąż aktualnym problemem jest ciągła optymalizacja efektu przeciwbiałczkowego kondy-

cjonowania poprzedzającego allo-HSCT u dzieci z ALL, z uwzględnieniem m.in. wyników badań farmakokinetycznych leków stosowanych w kondycjonowaniu [8, 12, 13].

2. CZEŚĆ TEORETYCZNA

2.1. TRANSPLANTACJA KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH (HSCT)

HSCT odnosi się do każdej procedury, w której komórki krwiotwórcze pochodzące od różnego typu dawców i z różnych źródeł podawane są biorcy w celu repopulacji i zastąpienia w całości lub częściowo układu krwiotwórczego. Przeszczepiane mogą być komórki krwiotwórcze pochodzące od dawcy odpowiednio dobranego w zakresie ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA): rodzeństwa (MSD), w tym komórki krwiotwórcze pochodzące od bliźniaka monozygotycznego (syngeniczna HSCT), oraz dawcy niespokrewnionego (MUD). Komórki krwiotwórcze mogą pochodzić z BM (60% allo-HSCT), PB (30% allo-HSCT) lub krwi pępowinowej (10% allo-HSCT). HSCT wykonuje się zarówno u dorosłych jak i u dzieci, jednak lepsze wyniki HSCT uzyskuje się u dzieci [1, 2, 6, 14].

BM i komórki progenitorowe z PB, mobilizowane przy użyciu czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF), stanowią podstawowe źródła komórek krwiotwórczych. Po allo-HSCT z zastosowaniem BM lub PB obserwuje się jednak różne działania niepożądane. Podanie komórek krwiotwórczych pochodzących z PB wiąże się z szybszym przyjęciem przeszczepu u biorców, jak również z częstszym występowaniem przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) w porównaniu z podaniem BM, co sprawia, że HSCT z użyciem PB jest mniej korzystnym postępowaniem u dzieci [1, 2, 15].

Komórki krwiotwórcze z krwi pępowinowej najczęściej podawane są gdy brak jest identycznego lub zgodnego pod względem HLA dawcy komórek krwiotwórczych z PB lub BM lub gdy stan pacjenta wymaga natychmiastowej transplantacji [1, 2]. W krwi pępowinowej znajduje się szczególnie dużo komórek krwiotwórczych, jednak przeciętna jednostka krwi pępowinowej dostarcza dawkę komórek krwiotwórczych wystarczającą dla biorcy o masie ciała do 30 kg [6].

W porównaniu do przeszczepu narządów litych, przeszczepienie szpiku jest pod względem technicznym zabiegiem relatywnie prostym, polegającym na przetoczeniu szpiku przez cewnik centralny. Jednak pod względem immunologicznym przeszczepienie komórek krwiotwórczych związane jest z obecnością ogromnej ilości komórek

układu immunologicznego i progenitorowych skierowanych przeciwko gospodarzowi i zdolnych do wywołania groźnej dla niego choroby GvHD, podczas gdy przeszczep narządu litego wiąże się z udziałem stosunkowo niewielkiej liczby komórek immunokompetentnych [16, 17].

2.1.1. Rys historyczny

2.1.1.1. Historia HSCT na świecie

Historycznie przyznaje się pierwszeństwo trojgu naukowcom Osgood, Riddle i Mathews, którzy w 1939 r. opisali pierwsze dożylne przetoczenie BM. Jednak pierwsze przeszczepienie BM wykonali Polacy: Jan Stefan Raszek i Franciszek Groer w 1938 r. na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie. Naukowcy wyszli z założenia, że skoro choroby krwi są w istocie chorobami BM, to powinny być wyleczone doszpikowym podaniem zdrowego BM. W tym celu pobierali BM od osób zdrowych i wstrzykiwali go osobom chorym. Jednak nie rozumieli oni wielu problemów i nie odnieśli sukcesu terapeutycznego, a w związku z II wojną światową swoje odkrycie opisali dopiero w 1948 r. [17, 18].

Po II wojnie światowej, wydarzenia w Hiroszynie i Nagasaki oraz dalszy rozwój technologii nuklearnej spowodowały rozwój badań nad możliwościami transplantologii BM. W 1947 r. Lorentz i Jacobson wykazali, że odbudowę układu odpornościowego i krwiotwórczego u zwierząt poddanych naświetleniu można uzyskać po podaniu BM zwierząt zdrowych. W ten sposób uratowali napromienione zwierzęta przeszczepieniem BM [17]. Obecnie napromienianie całego ciała (TBI) stanowi jeden z elementów kondycjonowania poprzedzającego allo-HSCT, które jako pierwsi zastosowali Barnes w 1956 r. i Thomas w 1962 r. w badaniach na zwierzętach [18, 19].

W latach 50. Geroges Mathe zaobserwował, że komórki macierzyste BM dawcy są obecne w organizmie biorcy. Na tej podstawie stwierdzono, że układ krwiotwórczy biorcy jest odtwarzany przez przeszczepione komórki macierzyste dawcy i tym samym biorca staje się chimera, czyli genetycznym mieszańcem pod względem komórek krwi [20].

U ludzi pierwsze próby przeszczepienia allogenicznego BM podejmowano w późnych latach 50. XX wieku. W początkowej fazie rozwoju transplantacji BM, gdy

wiedza na temat HLA i układu odpornościowego była niewielka [14], udawały się głównie przeszczepy BM syngeniczne, czyli od identycznego bliźniaka. Pierwsza udana transplantacja tego typu została przeprowadzona przez zespół E. Donnalla Thomasa w 1957 r. [18, 21]. Natomiast w 1959 r. Joseph J. McGovern wraz ze współpracownikami opisali wykonanie pierwszej autotransplantacji [18, 22].

Wyraźnym krokiem naprzód było odkrycie przez trójkę badawczy: Jean Dausset, George D. Snell i Baruj Benacerraf genów głównego układu zgodności tkankowej, biorących udział w rozróżnianiu systemu immunologicznego własnego ustroju od obcego i decydujących o utrzymaniu się lub odrzuceniu przeszczepu. Za to odkrycie w 1980 r. zostali uhonorowani Nagrodą Nobla [23, 24]. W momencie, kiedy zauważono, że dla powodzenia transplantacji niezbędne jest uprzednie zniszczenie układu odpornościowego biorcy, dostrzeżono najważniejsze zagrożenia związane z przeszczepieniem BM. Przełomowym momentem było odkrycie przez Barnesę i Loutitę w 1962 r. efektu "przeszczep przeciwko gospodarzowi", identyfikowanego dziś jako jednostka chorobowa (GvHD) [25].

W 1963 r. Mathe dokonał pierwszego doraźnego allo-przeszczepienia BM u człowieka, a w 1969 r. miała miejsce pierwsza udana próba allo-transplantacji od rodzeństwa. Do 1967 r. na świecie wykonano 417 przeszczepień u ludzi, z czego tylko 4 były udane [17].

Największy postęp w dziedzinie transplantologii szpiku kostnego dokonał się dzięki E. D. Thomasowi. W 1975 r. opublikował on w *The New England Journal of Medicine* przebieg transplantacji u 110 chorych [19]. W 1963 r. E. D. Thomas opisał metodę pobierania BM w celu pozyskania komórek krwiotwórczych [14], a ponadto wykonał pierwsze trwale udane transplantacje u pacjentów chorych na białaczkę oraz wprowadził metody napromieniania całego ciała (TBI). W 1990 r. otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny za badania nad transplantacją BM jako metodą leczenia białaczki [14, 17, 23].

W 1965 r. Santos i Owens zastosowali leki o działaniu cytostatycznym - busulfan (BU) i cyklofosfamid (CY) w kondycjonowaniu przed transplantacją [18], ponieważ wyłącznie TBI okazało się wystarczające do przyjęcia przeszczepu, lecz niewystarczające do uzyskania długotrwałej pełnej remisji białaczki. Udane transplantacje po dołączeniu CY do TBI w kondycjonowaniu obserwowano w późnych latach 70. W tych latach próbowano zastąpić TBI różnymi lekami m.in. CY, BU, VP-16, cytarabiną, karmustyną lub melfalanem. Połączenia CY z TBI, BU z CY lub karmustyna z cytarabiną,

VP-16 i 6-tioguaniną stanowiły główne schematy kondycjonowania w tamtym czasie [26].

Istotnym wydarzeniem było powstanie w 1974 r. organizacji European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) z siedzibą w Holandii, której zadaniem jest wymiana doświadczeń, promowanie badań i prac klinicznych oraz tworzenie baz danych dotyczących HSCT. Aktualnie do EBMT należy ponad 400 ośrodków europejskich i nieeuropejskich [27]. Wszystkie działające obecnie w Polsce ośrodki są zrzeszone w EBMT i posiadają jej akredytację [28].

Dla większości pacjentów transplantacji nie były możliwe do przeprowadzenia, ponieważ mniej niż 30% pacjentów posiada identyczne pod względem HLA rodzeństwo. Pierwszy przeszczep od dawcy niespokrewnionego, wykonany w 1979 r. u 10-letniej dziewczynki chorej na białaczkę, zapoczątkował tworzenie National Marrow Donor Program w Stanach Zjednoczonych. Rozwój założonej w 1986 r. organizacji odegrał olbrzymią rolę w wykazaniu, że BM od dawców niespokrewnionych może być z powodzeniem podawany biorcom pod warunkiem bliskiego dopasowania HLA [21, 24]. Dzisiaj, w bazie danych National Marrow Donor Program zarejestrowało się ponad 5 milionów ochotników, gotowych do oddania własnych komórek krwiotwórczych [24].

Pierwszą transplantację krwi pępowinowej przeprowadziła Eliane Gluckman w 1989 r. u chłopca z niedokrwistością Fanconiego od zgodnej w HLA siostry [29].

W latach 80. kładziono nacisk na intensyfikację dawki i poszukiwanie alternatyw do kondycjonowania CY i TBI. Nowe schematy kondycjonowania ustalano w celu zredukowania ryzyka wznowy choroby i odrzucenia przeszczepu [26].

2.1.1.2. Przeszczepianie HSCT w Polsce

Z powodu sytuacji finansowej, będącej wynikiem sytuacji politycznej, współczesna historia HSCT u dzieci we wschodnich krajach europejskich zaczęła się ponad 10 lat później w porównaniu do krajów zachodnich tzn. w połowie lat 80. XX w. Sytuacja zaczęła się zmieniać pod koniec lat 90. Nie bez znaczenia był również fakt wejścia niektórych krajów wschodnioeuropejskich do Unii Europejskiej w latach 2004 i 2007. Pierwsza allo-HSCT u dziecka chorego na ostrą białaczkę szpikową (AML) miała miejsce w 1985 r. Pierwszą auto-HSCT w kraju wschodnioeuropejskim przeprowadzono u dziecka z chłoniakiem nieziarniczym (NHL) w 1988 r. [3].

W Polsce pierwszy zabieg transplantacji BM syngenicznego u dziecka z anemią aplastyczną wykonała Profesor Urszula Radwańska wspólnie z dr med. Ryszardem Kafańskim w Klinice Pediatrii w Poznaniu w 1983 r. Sukces był jednak krótkotrwały, ponieważ po początkowym przyjęciu nastąpiło tzw. późne odrzucenie i w konsekwencji zgon [18].

Pierwsze udane przeszczepienia BM wykonał Profesor Wiesław Jędrzejczak w Warszawie: w 1984 r. allogeniczne u dziecka z zespołem Diamond-Blacfana [18], a w 1985 r. autologiczne [17]. Pierwsze przeszczepienie od dawcy niespokrewnionego (z zagranicy) wykonał Profesor Jerzy Hołowiecki w 1997 r. w Katowicach [18, 29]. Pierwsze jednoczesne przeszczepienie BM i krwi pępowinowej zawdzięczamy Profesorom Andrzejowi Lange (Wrocław) oraz Wiesławowi Jędrzejczakowi (Warszawa), którzy wykonali zabieg w 1996 r. [18]. W Poznaniu w 2000 r. Profesor Jacek Wachowiak wykonał pierwsze przeszczepienie oparte wyłącznie na krwi pępowinowej, pochodzącej od niespokrewnionego dawcy. Pierwsze jednoczesne przeszczepienie dwóch jednostek krwi pępowinowej, pochodzącej od dwóch różnych dawców wykonał Profesor Wiesław Jędrzejczak w 2003 r. w Warszawie [17].

2.1.2. Allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych (allo-HSCT)

Allo-HSCT stanowi aż 2/3 spośród wszystkich HSCT przeprowadzanych u dzieci do 18-tego roku życia. Rozwój rejestrów dawców komórek krwiotwórczych pozwala na znalezienie odpowiedniego dawcy niespokrewnionego dla 60-70% oczekujących na allo-HSCT, podczas gdy prawdopodobieństwo posiadania rodzeństwa o identycznym genotypie (MSD) wynosi ok. 25% [6, 29]. W przypadku allo-HSCT przyjęcie przeszczepu oceniane jest na podstawie wyników badania poprzyszczepowego chimeryzmu hematopoetycznego [1].

Allo-HSCT przeprowadza się od MSD, MUD lub częściowo niezgodnego dawcy niespokrewnionego lub rodzinnego (MMD). Wobec znacznej poprawy wyników HSCT przeprowadzanych od MUD u dzieci i młodzieży, coraz częściej ten rodzaj HSCT traktowany jest na równi z transplantacją od MSD [29].

U dzieci z chorobami rozrostowymi i nierozrostowymi w przypadku braku MSD oraz MUD lub dawcy rodzinnego można wykonać allo-HSCT od dawcy haploidentycznego, czyli od jednego z biologicznych rodziców, którzy są przynajmniej w jednym

haplotypie zgodni z dzieckiem (haplo-HSCT). Haplo-HSCT wykonuje się w przypadku braku dawcy, gdy wskazana jest jak najszybsza allo-HSCT oraz u dzieci po nieudanym przeszczepie krwi pępowinowej [29, 30].

2.1.2.1. Wskazania do allo-HSCT u dzieci

Głównymi wskazaniami do przeprowadzania allo-HSCT u dzieci w ramach procedur standardowych są zarówno choroby nowotworowe (ok. 80%), przede wszystkim choroby rozrostowe układu krwiotwórczego, jak i wrodzone nabyte choroby nierozrostowe (ok. 20%) [6].

2.1.2.1.1. Choroby rozrostowe

2.1.2.1.1.1. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)

ALL jest nie tylko najczęstszym nowotworem u dzieci, ale także najczęstszym (ok. 30%) wskazaniem do allo-HSCT [3, 31]. W ciągu ostatnich 25 lat rokowania dla dzieci chorych na ALL uległy znacznej poprawie. Co roku w Stanach Zjednoczonych diagnozowanych jest ponad 2500 nowych zachorowań na ALL u dzieci, z czego prawie 95% chorych osiąga remisję po chemioterapii indukcyjnej składającej się z 3 lub 4 leków. Konwencjonalna chemioterapia ALL pozwala na wyleczenie 70-85% dzieci, a wznowa choroby pojawia się u 20-30% pacjentów [32, 33].

Allo-HSCT wykonuje się tylko u tych dzieci, u których chemioterapia nadal zbyt często zawodzi. Są to dzieci, u których w chwili rozpoznania spostrzega się wykładniki złego rokowania tj. MLL-AF4 t(4; 11) (q21; q23) u niemowląt [33, 34] lub chromosom Philadelphia związany z genem fuzyjnym BCR-ABL (9; 22) (q34; q11) i/lub złą odpowiedź na wstępną kortykosteroidoterapię i/lub opóźnione wejście w pierwszą całkowitą remisję (CR1) [34, 35] lub wysoki poziom choroby resztkowej (MRD) [36]. Jednak allo-HSCT wykonuje się przede wszystkim u tych dzieci, u których wystąpiła wznowa ALL, zwłaszcza bardzo wczesna lub wczesna wznowa szpikowa lub szpikowo-narządowa, ponieważ prawdopodobieństwo uzyskania kolejnej trwałej

remisji u tych dzieci przy zastosowaniu wyłącznie konwencjonalnej chemioterapii jest niewielkie i wynosi poniżej 10% [1, 31, 32, 37].

Dla dzieci z ALL aktualne wskazania do allo-HSCT w CR1 dla grupy wysokiego ryzyka oraz w drugiej całkowitej remisji (CR2) lub w kolejnej remisji ustala program ALL-SCT BFM 2006 [38]. W zależności od spostrzeganych wykładników wysokiego ryzyka wznowy ALL, dla dzieci w CR1 przeszczepiane komórki krwiotwórcze mogą pochodzić od MSD jak również od dawcy rodzinnego lub MUD zgodnego w 10/10 lub 9/10 alleli w *loci* HLA A, B, Cw, DRB1 i DQB1 oraz MMD niezgodnego w więcej niż 9/10 alleli w 5 *loci* A, B, Cw, DRB1 i DQB1 [1, 6, 29]. MSD jest określany jako genotypowo lub fenotypowo identyczny [1, 29]. U dzieci w grupie wysokiego ryzyka w CR2, u których wystąpiła wznowa ALL, allo-HSCT wykonuje się od MSD, zgodnego dawcy rodzinnego lub MUD jak również od MMD, a u dzieci w grupie średniego ryzyka od MSD lub MUD, ale nie od MMD. Dzieci w trzeciej całkowitej remisji (CR3), obarczone są bardzo dużym ryzykiem kolejnej wznowy przy zastosowaniu wyłącznie chemioterapii. Z tego powodu mimo zwiększonego ryzyka wystąpienia śmiertelności związanej z procedurą transplantacyjną (TRM), czyli z zastosowanym leczeniem, zaleca się allo-HSCT od MSD, zgodnego dawcy rodzinnego lub MUD oraz według niektórych badaczy od MMD [1, 6, 39].

Zgodnie z programem INTERFANT-06, allo-HSCT w CR1 należy przeprowadzić wyłącznie u niemowląt poniżej 6 miesiąca życia, u których stwierdzono rearanżację MLL i/lub wstępną leukocytozę blastyczną i/lub niekorzystną odpowiedź na wstępną korytkosteroidoterapię oraz u pacjentów z grupy ryzyka pośredniego z wysokim poziomem choroby resztkowej. Dawcą komórek krwiotwórczych może być MSD, zgodny dawca rodzinny lub MUD [6, 40].

U dzieci z ALL w grupie bardzo wysokiego ryzyka i w CR2 oraz u młodych dorosłych wykazano przewagę HSCT od MSD nad chemioterapią [34, 36, 41], jednak u młodych dorosłych dane dotyczące allo-HSCT w CR1 są sprzeczne [36]. Nadal nie wszyscy autorzy są zgodni co do przewagi allo-HSCT nad auto-HSCT i chemioterapią u dzieci z ALL w CR1 w grupie bardzo wysokiego ryzyka [42].

U dzieci z grupy bardzo wysokiego ryzyka będących w CR1 oraz u dzieci z ALL w CR2, allo-HSCT znamienne poprawia wyniki konwencjonalnej chemioterapii dzięki przeciwbiałaczkowemu efektowi reakcji przeszczep przeciw białaczce (GvL), jednak nadal nie gwarantuje wyleczenia. TRM pozostaje poważnym ograniczeniem tej metody [39]. Niepowodzenie zabiegu może być spowodowane również toksycznymi,

infekcyjnymi lub immunologicznymi powikłaniami związanymi z procedurą transplantacyjną, ale przede wszystkim wystąpieniem poprzyszczepowej wznowy ALL [31, 36]. U dzieci w grupie bardzo wysokiego ryzyka gwałtownie maleje szansa na wyleczenie w przypadku wystąpienia wznowy po allo-HSCT [34, 37].

2.1.2.1.1.2. Ostra białaczka szpikowa (AML)

Dzieci chore na AML są leczone według programu AML-BFM 2004 INTERIM. Zgodnie z tym schematem u dzieci w grupie wysokiego ryzyka będących w CR1 dopuszczalna jest wyłącznie MSD-HSCT [43]. U dzieci z *de novo* AML oporną na leczenie i AML w CR2 lub kolejnej całkowitej remisji wskazania do allo-HSCT ustalane są według kryteriów programu Relapsed-AML BFM 2001/02 [44] oraz AML-SCT BFM-2005. U dzieci w CR2 i CR3 allo-HSCT przeprowadza się od MSD, zgodnego dawcy rodzinnego lub MUD. MMD-HSCT dopuszczalna jest u dzieci w CR2, jeśli czas trwania CR1 był krótszy niż 18 miesięcy oraz w CR3 [1, 2, 6]. Według niektórych autorów u dzieci z grupy bardzo wysokiego ryzyka w CR1 allo-HSCT można przeprowadzić nie tylko od MSD, lecz również od zgodnego dawcy rodzinnego lub MUD. Wyniki niektórych badań wskazują, że u dzieci z AML w grupie wysokiego ryzyka istotną rolę może pełnić haplo-HSCT [1, 2].

2.1.2.1.1.3. Przewlekła białaczka szpikowa (CML)

U dzieci chorych na CML allo-HSCT nadal pozostaje metodą leczenia z wyboru. Allo-HSCT od MSD, zgodnego dawcy rodzinnego lub MUD przeprowadza się po zastosowaniu imatinibu [1, 2, 6].

2.1.2.1.1.4. Chłoniak nieziarniczny (NHL)

U dzieci z NHL allo-HSCT od MSD, zgodnego dawcy rodzinnego lub MUD jest zalecana, jeśli w trakcie leczenia stwierdzono progresję NHL lub doszło do wznowy i uzyskano CR2 [1, 2, 6]. Szczegółowe wskazania do HSCT u dzieci z rozpoznaniem dojrzałego B-komórkowego NHL określają protokoły B-NHL BFM 04 oraz B-NHL

Rel/Ref-2003, natomiast u dzieci z nie-B-komórkowymi NHL protokoły NB-NHL-BFM 90 oraz EURO-LB-02 [6].

2.1.2.1.1.5. Zespoły mielodysplastyczne (MDS) i młodzieńcza białaczka mielomonocyto- towa

U dzieci z MDS, jak i u dzieci z młodzieńczą białaczką mielomonocytową allo-HSCT od MSD, zgodnego dawcy rodzinnego lub MUD jest metodą leczenia z wyboru, którą ze względu na agresywny przebieg MDS, tj. transformację w kierunku AML lub ALL w ciągu 1–2 lat, należy zastosować wkrótce po rozpoznaniu choroby i to bez uprzednich prób uzyskania remisji za pomocą konwencjonalnej chemioterapii [1, 2, 6].

2.1.2.1.1.6. Chłoniak Hodgkina (Hodgkin's lymphoma)

Rola allo-HSCT w leczeniu chłoniaka Hodgkina nie została ostatecznie ustalona i obecnie dopuszcza się ją tylko u pacjentów ze wznową, u których nie udało się pozyskać komórek do autoprzeszczepu oraz u chorych ze wznową po auto-HSCT [1, 2, 6, 45].

2.1.2.1.2. Choroby nierozrostowe układu krwiotwórczego

We wrodzonych i nabytych nierozrostowych chorobach układu krwiotwórczego wykonuje się wyłącznie allo-HSCT w celu odtworzenia układu krwiotwórczego u chorych z niewydolnością krwiotworzenia i/lub zastąpienia układu krwiotwórczego biorcy obciążonego defektem genetycznym [6].

2.1.2.1.2.1. Nabyta ciężka niedokrwistość plastyczna, wrodzone niedokrwistości Fanconiego i hipoplastyczna Blackfana-Diamonda

U dzieci z ciężką oraz bardzo ciężką nabytą niedokrwistością aplastyczną metodą leczenia z wyboru jest MSD-HSCT, którą należy przeprowadzić jak najszybciej po ustaleniu rozpoznania. U chorych nieposiadających MSD, w przypadku stwierdzenia

braku odpowiedzi na leczenie immunosupresyjne oraz przy wystąpieniu wznowy, wykonuje się HSCT od zgodnego dawcy rodzinnego lub MUD. Allo-HSCT wskazana jest również u dzieci z umiarkowanie ciężką postacią nabytej niedokrwistości aplastycznej, u których nie uzyskano odpowiedzi na zastosowane leczenie immunosupresyjne [1, 2, 6].

Allo-HSCT pozostaje nadal jedyną skuteczną metodą leczenia wrodzonej niedokrwistości aplastycznej typu Fanconiego, którą należy wykonać między 5 i 10 rokiem życia, najlepiej zanim pojawią się pierwsze hematologiczne wykładniki choroby. Allo-HSCT powinna zostać przeprowadzona, jeśli dziecko posiada MSD, a w przypadku jego braku komórki krwiotwórcze mogą pochodzić od MUD lub z krwi pępowinowej [1, 2, 6].

Wskazaniem do allo-HSCT od MSD u dzieci z wrodzoną niedokrwistością hipoplastyczną Blackfana-Diamonda jest oporność na kortykosteroidoterapię (ok. 40–50%), kortykosteroidozależność i nasilone objawy uboczne kortykosteroidoterapii [1, 2, 6].

2.1.2.1.2.2. Wrodzone niedobory odporności

Allo-HSCT od MSD, MUD lub MMD oraz w niektórych przypadkach od dawcy haploidentycznego jest metodą leczenia z wyboru we wrodzonych zespołach niedoborów odporności z wysokim ryzykiem infekcji zagrażających życiu, m.in.:

- w ciężkich złożonych niedoborach odporności;
- w zespole Wiskotta-Aldricha;
- ilościowych (ciężka wrodzona neutropenia, wrodzona dyskeratoza, zespół Shwachmana-Diamonda, dysgenезja siateczkowa) i czynnościowych (defekt aktywnej granuloocytów obojętnochłonnych, upośledzenie adhezji limfocytów, zespół Chediak-Higashi, przewlekła choroba ziarniniakowa, zespół Griscelliego) zaburzeniach granuloocytów;
- w zaburzeniach funkcji makrofagów (limfohistiocytoza hemofagocytarna) [1, 2, 6].

2.1.2.1.2.3. Choroby metaboliczne

U dzieci z niektórymi chorobami metabolicznymi, allo-HSCT umożliwia korektę defektu poprzez podanie komórek krwiotwórczych będących źródłem deficytowych enzymów. Niemożliwa jest natomiast regresja zmian narządowych, rozwiniętych przed allo-HSCT.

Allo-HSCT zalecana jest w:

- adrenoleukodystrofii sprzężonej z chromosomem X w fazie asymptotycznej;
- mukopolisacharydozie typu I (zespół Hurlera za wyjątkiem odmian Scheie i Hurler/Scheie);
- osteopetrozie (za wyjątkiem postaci neurodegeneracyjnej).

We wszystkich wrodzonych niewydolnościach układu krwiotwórczego, niedoborach odporności oraz chorobach metabolicznych będących wskazaniem do allo-HSCT najlepiej, jeśli dawcą komórek krwiotwórczych jest MSD, a w razie braku dawcy wśród rodzeństwa należy przeprowadzić HSCT od zgodnego dawcy rodzinnego, MUD lub MMD [1, 2, 6].

2.1.2.1.2.4. Hemoglobinopatie (talasemia)

Allo-HSCT od MSD lub MUD jest jak dotąd jedyną skuteczną metodą leczenia dzieci z talasemią- β i z niedokrwistością sierpowatą z grupy wysokiego ryzyka [1, 2, 6].

Wskazania do HSCT ulegają stałemu rozszerzaniu [14], jednak aktualnie allo-HSCT nie jest zalecana u dzieci z nowotworami litymi. Może być jednak przeprowadzana w ramach protokołów klinicznych (procedury będące opcją terapeutyczną lub na etapie rozwoju) w specjalistycznych ośrodkach ze względu na obserwowane korzystne wyniki [1, 2, 29].

2.1.2.2. Kondycjonowanie przed HSCT u dzieci

Kondycjonowanie tzn. przygotowanie pacjenta do transplantacji, odgrywa główną rolę w HSCT. Nadal aktualnym problemem jest ustalenie takiego schematu, który pozwalałby na całkowite usunięcie komórek nowotworowych oraz jednocześnie charak-

teryzowałyby się jak najmniejszą toksycznością. Kondycjonowanie z jednej strony jest główną przyczyną TRM, a z drugiej strony wpływa na długoterminowe kontrolowanie przebiegu choroby, a nawet na wyleczenie i uzyskanie trwałej remisji [4, 26, 36].

W kondycjonowaniu przed HSCT można wyróżnić dwa cele w zależności od choroby oraz źródła komórek krwiotwórczych. Większość allo-HSCT wykonywana jest u pacjentów z chorobami nowotworowymi, dlatego też podstawowym celem kondycjonowania jest efekt mieloablacyjny prowadzący do całkowitego zredukowania liczby komórek nowotworowych biorcy. Z drugiej strony schemat przygotowania powinien charakteryzować się odpowiednim efektem immunosupresyjnym, aby zapewnić przyjęcie przeszczepianych komórek i zapobiec odrzuceniu przeszczepu [6, 46]. Powinien on być szczególnie intensywny w przypadku transplantacji od tzw. dawców alternatywnych (MMD lub haploidentycznych). Niektórzy autorzy wyróżniają również trzeci cel kondycjonowania, którym jest stworzenie wolnej przestrzeni do zasiedlenia przez przeszczepiane allogeniczne macierzyste komórki krwiotwórcze [6, 26].

Wiele prac wykazało, że wybór kondycjonowania ma znaczący wpływ na przeżycie i częstość występowania wznów [39, 47]. Schematy o wysokiej intensywności zmniejszają częstość wznów, jednocześnie jednak zwiększają TRM z powodu wczesnej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem, uszkodzenia tkanek i zwiększonej częstości występowania i/lub poważności GvHD [4].

Istnieją dwie główne różnice pomiędzy pacjentami dorosłymi i pediatrycznymi w kontekście kondycjonowania. Dzieci zazwyczaj lepiej tolerują działania niepożądane niż starsi pacjenci, w związku z czym dzieciom można podawać większe dawki leków. W odróżnieniu od dorosłych, u dzieci kondycjonowanie wpływa na procesy wzrostowe i rozwój gruczołów wydzielania wewnętrznego. Opóźniony wzrost i zaburzenia okresu dojrzewania płciowego są głównymi późnymi następstwami HSCT u pacjentów pediatrycznych [26].

Większość stosowanych schematów przygotowawczych było pierwotnie zaprojektowanych dla dorosłych biorców z hematologicznymi chorobami nowotworowymi. Obecnie u pacjentów pediatrycznych stosowane są różne schematy mieloablacyjne poprzedzające allo-HSCT u dzieci [46]. Pomiędzy ośrodkami transplantacyjnymi brak jest jednak zgodnych ustaleń dotyczących najskuteczniejszego kondycjonowania, co odzwierciedla niepewność dotyczącą optymalnego schematu kondycjonowania [26, 47]. Schematy kondycjonowania są nadal modyfikowane na podstawie aktualnych danych

dotyczących m.in. MRD przed HSCT, zaawansowanych metod typowania HLA lub haplo-HSCT [46].

2.1.2.2.1. Schematy kondycjonowania przed allo-HSCT u dzieci z ALL

Większość stosowanych aktualnie schematów kondycjonowania przed allo-HSCT u dzieci powyżej 2 roku życia opiera się na FTBI w połączeniu z cytostatykami, najczęściej CY lub VP-16 [26, 34, 46]. Schematy kondycjonowania opierające się na FTBI charakteryzują się znacznym działaniem mieloablacyjnym, immunosupresyjnym, brakiem reakcji krzyżowej z innymi sposobami leczenia, jak również wykazują znaczny efekt przeciwbiałaczkowy, w tym, w odróżnieniu od kondycjonowania opartego wyłącznie na chemioterapii, pozwalają zniszczyć komórki białaczkowe, które naciekają tzw. sanktuaria (OUN, gonady), do których ze względu na istnienie bariery krew-tkanka cytostatyki docierają w stopniu niedostatecznym [46].

Dzieci przygotowywane do allo-HSCT zazwyczaj otrzymywały wcześniej wiele leków, które mogą mieć wpływ na ALL i z tego powodu uważa się, że zastosowanie FTBI wiąże się z dodatkowym działaniem przeciwbiałaczkowym [26]. FTBI stosowane jest w całkowitych dawkach do 10–14 Gy z redukcją dawki w płucach do 8–9 Gy i zazwyczaj podawane jest dwa razy dziennie w dniach –6, –5 i –4 w dawce 2 Gy [46]. W porównaniu z TBI, przeprowadzanej w jednej frakcji, FTBI redukuje częstość występowania i ciężkość przebiegu ostrych i późnych komplikacji ze strony zdrowych tkanek [26].

W kilku badaniach udowodniono podobne wyniki uzyskane przy stosowaniu kondycjonowania z zastosowaniem FTBI oraz w oparciu o chemioterapię [26, 46], a jednocześnie inne badania wskazują na istotność FTBI w kondycjonowaniu w celu kontrolowania przebiegu choroby [31]. Mechanizm zabijania przez FTBI komórek białaczkowych, jak również i zdrowych, jest nadal przedmiotem dyskusji. FTBI indukuje uszkodzenia DNA i błony komórkowej prowadząc do apoptozy [26]. Podawanie większych dawek FTBI może być korzystniejsze [31], jednak związane jest z późną toksycznością (m.in. zaburzenia wzrostu, zwiększone ryzyko wystąpienia wtórnych nowotworów) [5, 48]. Alternatywą do zwiększania dawek FTBI jest podanie VP-16 zamiast CY [31].

Kondycjonowanie z użyciem FTBI i CY, podawanym dożylnie w dawce 120 mg/kg m.c., uważane jest za standardowe, konwencjonalne postępowanie [26, 31, 46].

Kondycjonowanie opierające się na FTBI i VP-16 (podawanym dożylnie w dawce 60 mg/kg m.c. w dniu -3) opisali po raz pierwszy w 1987 r. badacze z City of Hope National Medical Center w Duarte. Jest ono bardzo skuteczne u pacjentów z ALL i z tego powodu aktualnie stanowi podstawę schematów kondycjonowania [6, 39, 46], będąc wcześniej uważane za postępowanie alternatywne [26, 36, 39].

W retrospektywnych badaniach wykazano przewagę kondycjonowania z użyciem FTBI i VP-16 nad innymi schematami u dzieci, jak również u dorosłych z ALL w CR2 po allo-HSCT od MSD [36, 39]. U pacjentów chorych na ALL z grupy wysokiego ryzyka będących w CR1, u których zastosowano różne kondycjonowanie przed allo-HSCT (CY i FTBI <13 Gy lub CY i FTBI \geq 13 Gy lub VP-16 i FTBI <13 Gy lub VP-16 i FTBI \geq 13 Gy) nie obserwowano istotnych różnic w TRM, odsetku wznów, przeżyciu wolnym od wznowy ALL (LFS) i całkowitym przeżyciu. Jednak u pacjentów będących w CR2, standardowe kondycjonowanie CY i FTBI i <13 Gy związane było z istotnie gorszymi wynikami (wznowy, całkowite przeżycie, śmiertelność i LFS) niż w kondycjonowaniu z VP-16 (niezależnie od dawki FTBI) oraz CY i FTBI \geq 13 Gy [36]. Długoterminowe przeżycie osiągnięto również po zastosowaniu kondycjonowania składającego się z cytarabiny, melfalanu i FTBI. Kondycjonowanie BU, CY i melfalanem charakteryzowało się wysokim odsetkiem TRM oraz dużym ryzykiem wznowy, co wskazuje, że w przypadku kondycjonowania bez FTBI nie osiąga się podobnie wysokiego odsetka remisji jak przy schemacie składającym się z VP-16 i FTBI [39].

U pacjentów poddanych allo-HSCT niepowodzenie zabiegu związane jest głównie z TRM, które występuje u 15-23% pacjentów po allo-HSCT od MSD bez względu na zastosowane kondycjonowanie. W jednym z badań TRM wystąpiło u 3% dzieci poddanych kondycjonowaniu CY z FTBI, co może być spowodowane mniej intensywną chemioterapią u dzieci w CR1 w porównaniu z dziećmi będącymi w CR2 i CR3 [32].

W przypadku allo-HSCT od MMD kondycjonowanie oprócz FTBI obejmuje podawanie BU, fludarabiny i CY w celu zapewnienia wysokiej limfotoksyczności [39].

Alternatywnym kondycjonowaniem do CY/FTBI u dzieci jest podawanie dożylnie CY z BU doustnie w różnych schematach i dawkach. W pierwszym schemacie BU podawany jest w dawce 16 mg/kg m.c. z CY w dawce 200 mg/kg m.c. przez cztery kolejne dni, w drugim schemacie BU podawany jest w dawce 16 mg/kg m.c. przez cztery

kolejne dni z CY w dawce 120 mg/kg m.c. przez dwa dni [48], a w trzecim schemacie BU podawany jest w dawce 1 mg/kg m.c. cztery razy dziennie od dnia -7 przez cztery kolejne dni z CY podawanym w dawce 60 mg/kg m.c. raz dziennie w dniach -3 i -2 [49]. Schematy te charakteryzują się zmniejszoną późną toksycznością objawiającą się opóźnieniem wzrostu, wystąpieniem zaćmy, zaburzeniami funkcji gruczołów płciowych lub tarczycy niż kondycjonowanie z użyciem FTBI [48]. Według niektórych autorów, BU może być stosowany jako alternatywa do FTBI, ponieważ charakteryzuje się małą późną toksycznością oraz może być podawany małym dzieciom bez potrzeby sedacji lub anestezji. Do schematu kondycjonowania z BU dołączany jest VP-16 w celu zwiększenia efektu przeciwbiałaczkowego i zapewnienia immunosupresji podobnej jak CY wymaganej do przyjęcia przeszczepu [5]. Wyniki porównujące kondycjonowanie BU/CY z kondycjonowaniem z FTBI są jednak sprzeczne. U dzieci chorych na ALL poddanych allo-HSCT od MSD wykazano dłuższe przeżycie oraz LFS po zastosowaniu kondycjonowania CY/FTBI niż BU/CY, natomiast u dzieci chorych na AML otrzymano podobne wyniki [48, 49].

Schematy składające się z FTBI są stosowane u pacjentów poniżej 18-tego miesiąca życia, szczególnie w przypadku MUD-HSCT. U pacjentów poniżej 2-3 roku życia, w celu uniknięcia długotrwałych efektów toksycznych FTBI, zaleca się kondycjonowanie opierające się wyłącznie na chemioterapii [26, 31, 33, 46], składającej się najczęściej z BU i CY w połączeniu z np. melfalanem, tiotepą, VP-16 lub alemtuzumabem [33, 34, 46]. BU podawany jest doustnie w dawce 5 mg/kg m.c. dziennie w dniach -8, -7, -6 i -5 w połączeniu z VP-16 podawanym dożylnie w dawce 40 mg/kg m.c. w dniu -4 i CY podawanym dożylnie w dawce 60 mg/kg m.c. dziennie w dniach -3 i -2 [6, 34].

U pacjentów w wieku powyżej 2-3 roku życia, którzy nie mogą zostać zakwalifikowani do FTBI (np. ze względu na wcześniejsze narażenie na wysokodawkowe napromieniowanie), kondycjonowanie opiera się również wyłącznie na chemioterapii, składającej się z BU, CY i melfalanu [46] lub wyłącznie BU [39].

Kondycjonowanie przed allo-HSCT obejmuje także profilaktykę GvHD. Profilaktyka ta składa się z cyklosporyny (CsA) (3 mg/kg m.c. dziennie) w przypadku MSD oraz CsA w połączeniu z metotreksatem (MTX) i globuliną antytymocytarną (ATG), podawaną dożylnie w celu deplekcji limfocytów T biorcy w przypadku HSCT od dawcy niespokrewnionego (MUD lub MMD) [6, 34, 39].

2.1.2.2.2. Schematy kondycjonowania przed allo-HSCT u dzieci w innych chorobach niż ALL

Najczęściej stosowane kondycjonowanie przed allo-HSCT u dzieci z innymi niż ALL chorobami rozrostowymi (AML, CML i MDS), jak i z chorobami genetycznie uwarunkowanymi obejmuje podawanie CY i BU (często w połączeniu z melfalanem lub VP-16 u dzieci z MDS) [6, 26, 50]. U dzieci z niedokrwistością Fanconiego, stosuje się kondycjonowanie bez napromieniania oparte na fludarabinie i ATG w połączeniu z niskimi dawkami BU i CY ze względu na ogromną wrażliwość wszystkich komórek na działanie leków alkilujących i na promieniowanie jonizujące. U dzieci z ciężką i bardzo ciężką nabytą niedokrwistością aplastyczną kondycjonowanie ma na celu wyłącznie immunosupresję i składa się z CY i ATG w przypadku MSD-HSCT oraz z fludarabiny, ATG i CY w dawce zredukowanej w przypadku HSCT od dawców alternatywnych [6]. U pacjentów powyżej 14 roku życia z ciężką nabytą niedokrwistością aplastyczną z powodzeniem zastosowano kondycjonowanie składające się z fludarabiny i CY przed allo-HSCT od MSD [51].

Ostatnio prowadzone są badania nad włączeniem treosulfanu w połączeniu z fludarabiną lub CY do protokołów kondycjonowania przed HSCT u dzieci. Treosulfan w porównaniu ze swoim analogiem (BU) charakteryzuje się wysoką cytotoksycznością w stosunku do różnych komórek nowotworowych, m.in. komórek białaczkowych, oraz podobnym działaniem mieloablacyjnym, immunosupresyjnym przy jednoczesnej mniejszej toksyczności niehematologicznej, porównywalnej ze schematami o zredukowanej intensywności (RIC) [52-55]. Wykazano skuteczność kondycjonowania treosulfanem w połączeniu z fludarabiną, CY, melfalanem lub VP-16 u dzieci z zaawansowanymi hematologicznymi chorobami nowotworowymi w grupie wysokiego ryzyka, jak również u dzieci z wysokim ryzykiem wystąpienia zagrażającej życiu wczesnej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem, zwłaszcza u dzieci ze szpikowymi chorobami rozrostowymi oraz u dzieci poddawanych drugiej HSCT [54, 52].

2.1.2.2.3. Schematy kondycjonowania o zredukowanej intensywności (RIC)

Od końca lat 90. u biorców demonstrujących przed HSCT wykładniki zwiększonego ryzyka powikłań związanych z wczesną toksycznością narządową kondycjonowa-

nia mieloablacyjnego coraz częściej stosuje się RIC, tj. kondycjonowanie niemieloablacyjne [6, 56]. Celem RIC-HSCT nie jest całkowite usunięcie komórek nowotworowych lub zniszczenie układu hematopoetycznego biorcy poprzez terapię cytotoksyczną, lecz immunosupresja, najczęściej z zastosowaniem CsA oraz mykofenolanu mofetylu [26, 57]. W pediatrii RIC-HSCT stosowane jest przede wszystkim u dzieci z chorobami nierozrostowymi [58]. U dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego zastosowanie RIC-HSCT dopuszcza się wyłącznie przy przeciwwskazaniach do kondycjonowania mieloablacyjnego oraz przed drugą allo-HSCT u dzieci, u których doszło do wznowy po pierwszej HSCT poprzedzonej kondycjonowaniem mieloablacyjnym [1, 6, 58].

Nadal nie ustalono jednoznacznie korzyści płynących z RIC-HSCT w długoterminowym przeżyciu w porównaniu ze standardowym kondycjonowaniem. Po RIC-HSCT obserwuje się zmniejszoną wczesną toksyczność narządową, jak również mniejszy wpływ na GvHD. RIC-HSCT związane jest jednak z większym ryzykiem wznowy [2, 26, 58], a w przypadku nieprzyjęcia przeszczepu pojawia się zazwyczaj długotrwała aplazja [58].

2.1.2.2.4. Aktualne tendencje w badaniach nad optymalizacją kondycjonowania

Do niedawna większość pacjentów otrzymywała ten sam schemat kondycjonowania. Aktualnie postuluje się, że pacjenci obarczeni wysokim ryzykiem TRM i niskim ryzykiem nawrotu choroby powinni otrzymywać inne kondycjonowanie niż pacjenci z niskim ryzykiem TRM, a wysokim ryzykiem nawrotu choroby. Optymalne przygotowanie do allo-HSCT powinno charakteryzować się dobrym efektem mieloablacyjnym, dobrym działaniem przeciwbiałaczkowym i jednocześnie niską toksycznością narządową [26].

Niektórzy badacze sugerują celowość monitorowania MRD po HSCT ze względu na obserwowane korelacje MRD z wystąpieniem wznowy. Monitorowanie MRD daje szansę szybkiej identyfikacji pacjentów obarczonych wysokim ryzykiem wznowy, co pozwoliłoby na rozpoczęcie immunoterapii na wczesnym etapie choroby, gdy liczba komórek nowotworowych jest jeszcze stosunkowo niewielka. We wcześniejszych badaniach wykazano częstsze występowanie wznowy ALL po HSCT u pacjentów z wykrywalną MRD przed HSCT [37, 59-61].

U pacjentów, u których wystąpiła wznowa po HSCT, szanse na wyleczenie są bardzo małe. Z tego powodu prowadzonych jest wiele badań, które mają na celu skuteczne zapobieganie, szybsze wykrywanie i leczenie nawracającej choroby. Możliwymi rozwiązaniami terapeutycznymi mogą być schematy nietoksycznej chemioterapii po HSCT opierające się na monoterapii, terapii komórkowe, jak i powtórna allo-HSCT po zastosowaniu RIC [56, 57, 61].

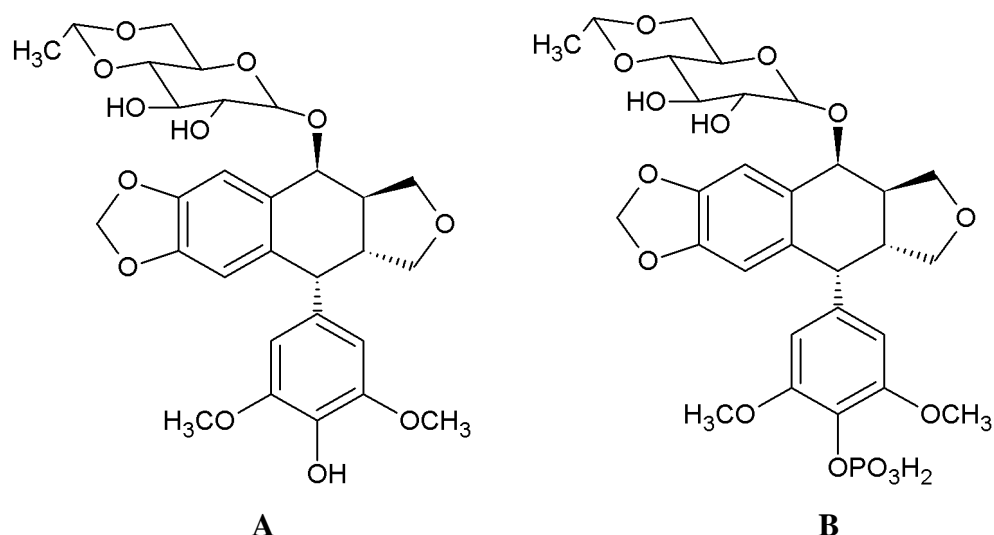
2.2. ETOPOZYD (VP-16)

2.2.1. Postacie leku

VP-16 jest dostępny w postaci kapsułek i koncentratu do sporządzania roztworów do infuzji pod nazwą handlową Vepesid® (Bristol Myers Squibb) oraz jako fosforan VP-16 w postaci proszku do sporządzania roztworów do infuzji o nazwie handlowej Etopophos® (Bristol Myers Squibb). Fosforan VP-16 podawany jest czasami doustnie, jednak nie jest w tej postaci zarejestrowany [62, 63].

2.2.2. Struktura i właściwości fizykochemiczne VP-16

VP-16 jest półsyntetyczną pochodną podofilotoksyny, którą wyodrębniono z korzeni indyjskich roślin z rodzaju Podophyllum [64]. VP-16 jest półsyntetycznym analogiem 4'-demetyloepipodofilinobenzylidenoglukozydu o większej przeciwnowotworowej aktywności oraz mniejszej toksyczności od pierwotnie wyodrębnionej podofilotoksyny [8, 65]. VP-16 otrzymano po usunięciu ze struktury podofilotoksyny grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia E i dołączenie 4,6-O-etylideno-β-glikopiranozydu w pozycji 1 pierścienia C [9]. VP-16 jest pod względem chemicznym 4'-demetyloepipodofilotoksyno-9-[4,6-O-etylideno-β-D-glikopiranozydem] o wzorze sumarycznym C₂₉H₃₂O₁₃ i masie molowej 588,58 g/mol [66]. VP-16 zidentyfikowano w 1966 r., a jego aktywność przeciwnowotworową wykazano w 1973 r. VP-16 został dopuszczony do obrotu przez amerykańską agencję FDA w 1983 r., a w 1996 r. wydano takie pozwolenie dla fosforanu VP-16 [65].



Ryc. 1. Wzory strukturalne VP-16 (A) i fosforanu VP-16 (B) [9, 63, 67].

VP-16 jest słabo rozpuszczalny w wodzie. W celu dożylnego podania VP-16 stosowane są solubilizatory, takie jak polisorbat 80, polietylenoglikol i alkohol benzylowy, a uzyskany roztwór jest rozcieńczany do stężenia poniżej 0,4 mg/ml w celu uniknięcia precypitacji [68]. Stosowanie VP-16 w takiej postaci wymaga podania dużej objętości płynów koniecznych do rozpuszczenia leku [65]. W celu uniknięcia problemów związanych ze słabą rozpuszczalnością VP-16, zsyntetyzowano prolek - fosforan VP-16 [69]. Po podaniu dożylnym fosforan VP-16 podlega szybkiej i całkowitej hydrolizie katalizowanej przez fosfatazy zasadowe. Konwersja ta jest niewysycalna nawet przy wysokich dawkach dożylnych (1200 mg/m² w 2-godzinym wlewie) [8]. Fosforan VP-16 mimo hydrofilowego charakteru jest wolno eliminowany przez nerki [69]. Najnowsze badania donoszą o nowej formulacji VP-16 (VP-16 rubusoside), charakteryzującej się dobrą rozpuszczalnością przy udowodnionej cytotoksyczności względem linii komórkowych raka jelita grubego, piersi i prostaty [70].

2.2.3. Farmakokinetyka VP-16

VP-16 wykazuje farmakokinetykę liniową po podaniu dożylnym. Po podaniu doustnym z powodu wysycalnej absorpcji farmakokinetyka VP-16 jest liniowa poniżej dawek 300 mg/m². VP-16 nie kumuluje się w organizmie po wielokrotnym podaniu dożylnym lub doustnym [9].

W badaniach klinicznych wykazano podobną aktywność farmakologiczną i toksyczność VP-16 i fosforanu VP-16 po podaniu dożylnym. Po doustnym i dożylnym podaniu fosforanu VP-16 w dawkach standardowych, jak i po dożylnym podaniu wysokich dawek obserwowano podobne stężenia w osoczu jak po podaniu VP-16 i nie obserwowano istotnych różnic w parametrach farmakokinetycznych [8, 62, 69, 71].

2.2.3.1. Absorpcja i biodostępność

Początkowe badania wykazały, że absorpcja VP-16 jest nieprzewidywalna i niecałkowita, co było spowodowane słabą rozpuszczalnością kapsułek liofilowych, które następnie zastąpiono roztworami VP-16 do podania doustnego [9].

Biodostępność doustnie podanego VP-16 wynosi od 40% do 90%, zmienia się wraz z dawką i charakteryzuje się znaczną zmiennością między- i wewnątrzsobniczą [8, 9, 68]. Nie obserwowano jednak różnic w absorpcji VP-16 pomiędzy dziećmi a dorosłymi [9]. Przy dawkach 50-100 mg i 400 mg średnie wartości biodostępności wynoszą odpowiednio około 75% i 50%. Absorpcja po podaniu doustnym jest liniowa do dawek 250 mg i zmniejsza się wraz z podawaniem dawek większych niż 300 mg [8, 9, 68].

Podjęmowano próby doustnego podawania fosforanu VP-16 w celu zwiększenia biodostępności i zmniejszenia międzysobniczej zmienności absorpcji leku, jednak nie udało się osiągnąć zadawalającej poprawy wymienionych parametrów [9].

Powody istnienia dużego zróżnicowania w absorpcji VP-16 nie są do końca znane, mogą natomiast wynikać z kilku oddziaływujących na siebie czynników. Słaba i zmienna biodostępność VP-16 może wynikać z małej trwałości VP-16 w płynach fizjologicznych. Innym powodem może być przenikanie leku przez błony śluzowe jelit, na co może mieć wpływ obecność w enterocytach białek wypierających, które mogą hamować absorpcję leku. W sekrecji jelitowej VP-16 może brać udział wiele białek transportowych, m.in. glikoproteina P (P-gp) oraz kanalikowy transporter anionów organicznych (cMOAT), których różna ekspresja w enterocytach może mieć duży wpływ na absorpcję i biodostępność VP-16 u pacjentów z chorobą nowotworową [9, 72]. Według innych autorów, zróżnicowanie biodostępności VP-16 po podaniu małych dawek może wynikać z dużej zmienności w metabolizmie leku pomiędzy pacjentami, wynikającej z aktywności izoformy CYP3A4 cytochromu P450, biorącej udział w metaboli-

zmie oksydacyjnym VP-16, nie tylko w wątrobie, ale również w błonie śluzowej jelit. Zróżnicowanie aktywności CYP3A4 obecnej w jelitach może bezpośrednio wpływać na biodostępność VP-16. Sugeruje się również, że na biodostępność VP-16 mogą wpływać różnice etniczne związane z farmakogenetyczną zmiennością aktywności enzymów cytochromu P450 [9].

Biodostępność VP-16 zmienia się, gdy lek podawany jest z pożywieniem lub na czczo. Sok grejpfrutowy, pomimo że jest inhibitorem CYP3A4, zmniejsza biodostępność VP-16 po podaniu doustnym [9, 73]. Fosforan VP-16 nie powinien być podawany doustnie łącznie z kwaśnymi napojami z powodu zależnej od pH aktywności zasadowej fosfatazy w jelitach biorącej udział w aktywacji proleku [8].

2.2.3.2. Dystrybucja i wiązanie z białkami

Objętość dystrybucji VP-16 w stanie stacjonarnym (V_{ss}) wynosi od 3 do 21 l/m² zarówno po podaniu dożylnym jak i doustnym, natomiast niższe wartości są osiągnięte u dzieci [9]. Średnie wartości i mediany V_{ss} VP-16 u dzieci mieszczą się w zakresie wartości od 4,8 l/m² do 7,2 l/m² [74]. Po podaniu większych dawek obserwowano 3-krotnie większą objętość dystrybucji (V_d) VP-16 niż po podaniu standardowych dawek [62]. Po podaniu dożylnym transport VP-16 do płynu mózgowo-rdzeniowego charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem i wynosi od stężeń nieoznaczalnych do 2,5 µmol/l po 1-4 godzinach od zakończenia wlewu leku podawanego w dawkach od 100 mg/m² do 800 mg/m². Po doustnym podaniu leku obserwowano podobne profile farmakokinetyczne, jak również stosunek stężeń VP-16 w płynie mózgowo-rdzeniowym do stężenia VP-16 w osoczu. Nie obserwowano natomiast kumulacji leku w płynie mózgowo-rdzeniowym po doustnym podawaniu VP-16 przez pięć kolejnych dni [9].

VP-16 w dużym stopniu wiąże się z białkami osocza, głównie z albuminami i w mniejszym stopniu z α_1 -kwaśną glikoproteiną [9]. Średnio od 93% do 98% dawki jest związane z białkami osocza, podczas gdy ułamek frakcji wolnej, aktywnej farmakologicznie wynosi średnio od 4% do 8% [8, 9, 68]. Stopień wiązania VP-16 z białkami charakteryzuje się 10-krotną zmiennością międzyosobniczą [75] i zależy od stężeń albumin i bilirubiny w osoczu [9]. Hiperbilirubinemia oraz hipoalbuminemia związane są z większym stężeniem leku wolnego, przez co mogą przyczynić się do nasilonego działania farmakologicznego, jak również toksycznego (np. mielotoksyczności) VP-16 [8,

68]. W badaniach *in vitro* wykazano, że przy stężeniu bilirubiny 15-30 mg/dl dochodzi do wypierania VP-16 z połączeń z albuminami, co sugeruje kompetycyjny mechanizm wiązania bilirubiny i VP-16 z albuminami [9].

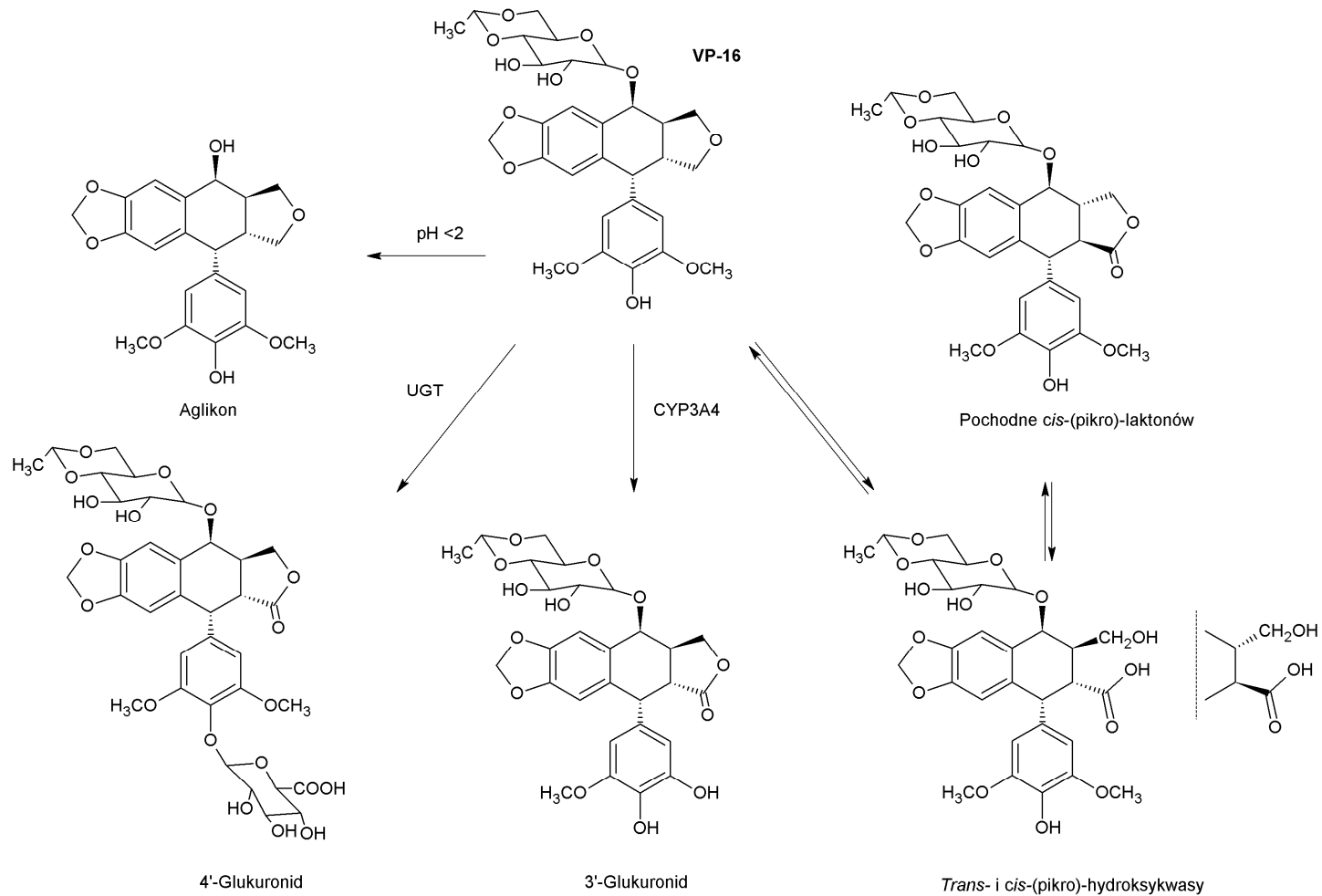
W kilku badaniach obserwowano duże międzyosobnicze zróżnicowanie [9, 13] oraz większe procentowe stężenie leku wolnego (13,9% [9], 3-20% [76]) u pacjentów leczonych VP-16 z powodu różnych nowotworów w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami (4,3%) [9, 76], jak również w porównaniu z pacjentami pediatrycznymi [13]. Według niektórych autorów, po podaniu wysokich dawek VP-16 wiązanie leku z albuminami może być wysycalne, prowadząc do większego procentowego stężenia leku wolnego [77]. Inni autorzy sugerują wpływ stężeń albumin i bilirubiny na większe stężenie wolnego VP-16, co potwierdza opracowane równanie, pozwalające oszacować stopień wiązania VP-16 z białkami:

$$\text{stężenie wolnego leku} = 0,014 \cdot \text{stężenie bilirubiny [mg/dl]} - 0,068 \cdot \text{stężenie albumin w osoczu [g/dl]} + 0,344$$

Udowodniono, że to równanie jest dokładne i precyzyjne w przewidywaniu stopnia wiązania VP-16 z białkami u chorych z nowotworami i współistniejącą hiperbilirubinemią (całkowita bilirubina >1,5 mg/dl) oraz hipoalbuminemią (albuminy w surowicy <3,3 g/dl) [9, 78]. Według innych autorów, czynnikami przewidującymi stężenie wolnego VP-16 mogą być stężenie albumin oraz w mniejszym stopniu wiek pacjentów [76].

2.2.3.3. Metabolizm i wydalanie

VP-16 podlega 3-*O*-demetylacji w wątrobie do metabolitu katecholowego (3-hydroksy-VP-16) lub glukuronidacji w obecności transferazy urydynodifosfoglukuronowej [8, 9, 68]. Hydroliza pierścienia laktonowego prowadzi do powstania *trans*- i *cis*-(pikro)-hydroksykwasów, będących w równowadze z *cis*-(pikro)-laktonem VP-16. W pH<2 grupa etylideno-β-glukopiranozydowa jest usuwana tworząc aglikon [9].



Ryc. 2. Metabolizm VP-16 [9].

Z powstałych metabolitów VP-16 jedynie katechol posiada udowodnioną aktywność cytotoksyczną wskutek zdolności do kowalentnego wiązania z DNA i białkami komórkowymi [79]. Pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (AUC) katecholu stanowi tylko 1-2% AUC VP-16 [68]. Metabolit ten powstaje w procesie 3-*O*-demetylacji VP-16 przy udziale enzymów cytochromu CYP 450, głównie CYP3A4 oraz w mniejszym stopniu CYP3A5 [79, 80]. W przekształceniu tym niewielką rolę odgrywają również CYP2E1 i CYP1A2 [79]. Metabolit katecholowy może podlegać kolejnym jednoelektronowym reakcjom utleniania, które prowadzą do powstania pochodnych semichinonowych i chinonowych. Wpływ powstałego katecholu na wystąpienie późnych działań niepożądanych VP-16, szczególnie jego działania leukemogenicznego, nadal podlega dyskusji [8, 68]. Wyższe AUC katecholu VP-16 w ostatnim dniu 5-dniowego cyklu leczenia VP-16 w porównaniu z AUC katecholu po terapii jednodniowej wskazuje, że codzienne podawanie VP-16 indukuje tworzenie metabolitu katecholowego [68].

Na podstawie udziału procentowego metabolitu katecholowego w metabolizmie VP-16 wykazano 40-krotne zróżnicowanie w stopniu *O*-demetylacji VP-16. Wykazano również, że u dzieci z ALL klirens ogólnoustrojowy (Cl_s) VP-16 jest związany z genotypem CYP3A5*3/*3 u rasy czarnej. Zależności takiej nie stwierdzono u rasy białej. Większe wartości Cl_s VP-16 obserwowano jednak u pacjentów niewykazujących ekspresji CYP3A5 w porównaniu z pacjentami wykazującymi ekspresję CYP3A5, co może być spowodowane zwiększoną indukcją CYP3A4 u pacjentów wykazujących ekspresję CYP3A5 związaną z wcześniejszą terapią prednizonem, który indukuje ekspresję CYP3A4 [79, 81].

Około 30-50% dożylnie podanej dawki VP-16 jest wydalane z moczem w postaci niezmienionej lub jako glukuronid [8, 9, 68, 74]. Głównym metabolitem VP-16 zarówno u dzieci, jak i u dorosłych jest glukuronid, wydalany drogą moczową oraz z żółcią [9]. Glukuronidacja w wątrobie stanowi około 25% eliminacji VP-16. Eliminacja VP-16 jest w niewielkim stopniu obniżona u pacjentów z zaburzeniami nerek oraz pozostaje bez zmian u pacjentów z zatorem wątrobowym [68].

Po podaniu dożylnym średnie wartości i mediany Cl_s VP-16 mieściły się w zakresie od 19,5 ml/min/m² do 25,9 ml/min/m² [74]. Zarówno po podaniu dożylnym, jak i doustnym dyspozycja VP-16 jest najczęściej opisywana jako dwufazowa, gdzie $t_{0,5}$ fazy dystrybucji wynosi średnio 1,5 godziny, a $t_{0,5}$ końcowej fazy eliminacji wynosi od 3 do 12 godzin [9].

2.2.4. Farmakodynamika i farmakoterapia VP-16

2.2.4.1. Mechanizm działania VP-16

VP-16 jest inhibitorem topoizomerazy, podobnie jak inna pochodna epipodofilotoksyny – tenipozyd. Do inhibitorów topoizomerazy zalicza się również kamptotecyny (topotekan i irinotekan) oraz antracykliny (daunorubicynę, doksorubicynę, idarubicynę, epirubicynę i mitoksantron). Pochodne kamptotecyny wywierają działanie przeciwnowotworowe poprzez hamowanie enzymu jądrowego – topoizomerazy I, zmniejszającego napięcie torsyjne dwuniciowego DNA podczas replikacji i transkrypcji. Antracykliny wbudowują się między łańcuchy DNA, powodując hamowanie jego syntezy, jak również, podobnie jak VP-16, hamują aktywność topoizomerazy II [65, 68, 82].

Topoizomerazy są enzymami jądrowymi, odpowiedzialnymi za modyfikację topologii DNA. Topoizomeraza I powoduje nacięcia w jednej helisie DNA, podczas gdy topoizomeraza II indukuje nacięcia w obu niciach [68]. Topoizomeraza II jest enzymem pozwalającym na rozwinięcie łańcucha DNA niezbędne do jego syntezy i naprawy [82]. Aktywność topoizomerazy I jest niezależna od cyklu komórkowego w odróżnieniu od topoizomerazy II, której aktywność wzrasta w zależności od fazy cyklu [8]. Topoizomeraza II występuje w dwóch wysoce homologicznych izoformach, α i β . Stężenie izoformy α , będącej celem działania VP-16, wzrasta 2-3-krotnie podczas fazy G_2M , jak również w szybko rosnących nowotworach. Ekspresja izoformy β nie zmienia się istotnie w ciągu cyklu komórkowego, a jej działanie jest celowane w wolno rosnące nowotwory [68].

W warunkach fizjologicznych enzymy topoizomerazy II, wykorzystując ATP, modułują topologią DNA poprzez rozdzielenie nici DNA. Umożliwiają one przeniesienie nienaruszonej helisy przez indukowane przejściowe nacięcia w obu niciach DNA, w trakcie czego powstaje kowalencyjne wiązanie między enzymem a DNA. W normalnych warunkach, po przejściu helisy nici DNA są ponownie łączone i przywracana jest struktura DNA.

VP-16 wiąże się z kompleksem rozszczepialnym DNA-topoizomeraza II, powodując jego stabilizację, przez co utrwała „przecięcia” łańcucha DNA i zapobiega przed ponowną ligacją DNA rozszczepionego przez topoizomerazę II. VP-16 przekształca

topoizomerazę II w „truciznę”, która wprowadza do genomu leczonych komórek liczne przejściowe przecięcia DNA [8, 68, 82].

Ścieżki sygnałowe prowadzące do apoptozy po indukowanych topoizomerazą uszkodzeniach DNA nie są całkowicie zrozumiałe [68]. Według jednych źródeł, powstałe dwuniciowe pęknięcia wymagają naprawy za pomocą p53. Cykl komórkowy zostaje zatrzymany w fazie G₂M, a następnie przy dużej ilości uszkodzeń przekazywany jest sygnał do apoptozy [68, 82, 83]. Według innych autorów, kaspaza 2, należąca do grupy proteaz cysteinowych, kontrolujących apoptozę, pośredniczy w uruchomieniu mitochondrialnej ścieżki apoptotycznej po indukowanym przez VP-16 uszkodzeniu DNA. Kaspaza 2 aktywuje kaspazę 8, co skutkuje uszkodzeniem mitochondrium i kolejnym kaskadowym aktywacją kaspaz 9 i 3. Wykazano, że komórki, którym brakuje kaspazy 3 są odporne na VP-16. Inne proteiny (np. c-Myc i BAFF) odpowiedzialne za kontrolę cyklu komórkowego, są również istotnymi mediatorami w apoptozie indukowanej VP-16 [68].

2.2.4.2. Oporność na VP-16

Zidentyfikowano różne mechanizmy oporności na VP-16. Najlepiej scharakteryzowanym mechanizmem oporności komórkowej na VP-16 jest pośredniczona przez P-gp oporność wielolekowa (MDR). P-gp jest produktem genu MDR1 [84]. Fizjologicznie P-gp usuwa ksenobiotyki oraz niektóre endogenne metabolity z wnętrza komórek [85]. Nadmierna ekspresja P-gp zwiększa wypływ leków z komórek, prowadząc do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia leku [9, 84, 85]. Zwiększona ekspresja P-gp powoduje powstanie oporności na lek, co w konsekwencji prowadzi najczęściej do oporności krzyżowej na inne leki [85]. MDR jest związane z szeroką krzyżową opornością na wiele cytotoksycznych czynników, m.in. antracyklin, alkaloidów barwinka, epipodofilotoksyn i taksonów [84, 86]. Wykazano, że leki takie jak werapamil i CsA mogą odwracać MDR *in vitro* i *in vivo* poprzez hamowanie transportu z udziałem P-gp [84]. P-gp jest obecna nie tylko w komórkach nowotworowych, ale również w zdrowych komórkach w nerkach, wątrobie, jelitach, mózgu jak również w macicy ciężarnych [87]. Oporność na VP-16 jest zauważana w komórkach, które posiadają fenotyp MDR [68, 87].

Oporność komórkowa na VP-16 może być również związana ze zmniejszoną aktywnością topoizomerazy II spowodowaną przez mutacje, szybką naprawą złamań w DNA indukowanych przez VP-16 oraz zmienioną apoptozą zależną od p53 [9, 68, 85].

2.2.5. Zastosowanie VP-16 u dzieci w schematach terapeutycznych obowiązujących w Polsce

Tabela 1. Zastosowanie VP-16 u dzieci w schematach terapeutycznych obowiązujących w Polsce

Jednostka chorobowa	Nazwa protokołu/programu	Etap schematu chemioterapii, w których podawany jest VP-16	Stosowane dawki VP-16
ALL	ALLIC-BFM-2002 [88]	Konsolidacja terapii ALL w grupie wysokiego ryzyka	100 mg/m ² w 1-godzinym wlewie dożylnym 5-krotnie co 12 godzin w dniach 3-5
	Interfant-99 [33]	Intensyfikacja terapii podtrzymującej w połączeniu z cytarabiną u dzieci <1 r. ż. w grupie wysokiego ryzyka	120 mg/m ² w 2-godzinym wlewie dożylnym w dniu 1 tygodni 8 i 9 (całość: 3 cykle 14-tygodniowe); Maksymalnie: 480–720 mg/m ²
AML	AML BFM Interim 2004 [43]	Leczenie indukcyjne (AIE): VP-16, cytarabina, idarubicyna	150 mg/m ² /dzień w 1-godzinym wlewie dożylnym w dniach 6, 7, 8
	AML BFM Interim 2004 (nieplanowana allo-HSCT) [43]	Leczenie intensyfikujące (HAE): VP-16, wysokie i standardowe dawki cytarabiny	125 mg/m ² /dzień w 30-minutowym wlewie dożylnym w dniach 2, 3, 4, 5
	Internationale Therapiestudie Relapsed AML 2001/01 [44]	Leczenie odpornej AML i wznowy AML: VP-16, cytarabina	100 mg/m ² w 1-godzinym wlewie dożylnym ośmiokrotnie co 12 godzin w dniach 1-5
Nerwiak zarodkowy	HR-NBL-1/SIOPEN [89]	10-tygodniowa chemioterapia indukcyjna (CO-JEC) składająca się z 3 cykli leczenia: A (karboplatyna, VP-16, winkrystyna), B (cisplatyna, winkrystyna) i C (VP-16, CY, winkrystyna)	Cykl A i C: 350 mg/m ² /cykl (2 x 175 mg/m ²) w 4-godzinym wlewie dożylnym
	HR-NBL-1/SIOPEN [89]	Megachemioterapia CEM przed auto-HSCT: karboplatyna, VP-16 i melfalan	Megachemioterapia CEM: dawka całkowita VP-16 1352 mg/m ² /cykl podawana w kolejnych 4 dniach w 24-godzinym wlewie dożylnym; Auto-HSCT następuje po upływie 72 godzin od podania ostatniej dawki VP-16
Mięsak poprzecznie prążkowany	CWS-2006 [90]	Schemat CEVAIE (9 cykli chemioterapii) u pacjentów z pierwotnymi przerzutowymi nowotworami tkanek miękkich: VP-16, ifosfamid, winkrystyna, aktynomycyna D, karboplatyna, epirubicyna	Dzień 1, 2 i 3 w trzecim, szóstym i dziewiątym cyklu w dawce 150 mg/m ² we wlewie dożylnym trwającym od 2 do 4 godzin łącznie z ifosfamidem i winkrystyną
	CWS-2006 [90]	Doustna terapia podtrzymująca (8 cykli): trofosfamid i idarubicyna naprzemiennie z trofosfamidem i VP-16	Doustnie 50 mg/m ² /dzień (2 x 25 mg/m ²) przez 10 dni

Cd. Tabela 1. Zastosowanie VP-16 u dzieci w schematach terapeutycznych obowiązujących w Polsce

Jednostka chorobowa	Nazwa protokołu/programu	Etap schematu chemioterapii, w których podawany jest VP-16	Stosowane dawki VP-16
	CWS-2006 [90]	Chemioterapia drugiego rzutu u pacjentów ze słabą odpowiedzią na chemioterapię	150 mg/m ² /dzień w dniach 1, 2, 3 i 4 w 1-godzinnym wlewie dożylnym; Cykl A (dwukrotnie): VP-16 łącznie z karboplatyną; Cykl B: VP-16 łącznie z ifosfamidem; Cykl A: VP-16 łącznie z karboplatyną; Cykl C (dwukrotnie): karboplatyna i ifosfamid
Mięsak Ewinga	EWING 2008 [91]	Chemioterapia indukcyjna VIDE (6 cykli): VP-16, winkrystyna, ifosfamid, dokсорubicyna	150 mg/m ² /dzień w 1-godzinnym wlewie dożylnym w dniach 1, 2 i 3 cyklu (450 mg/m ² /cykl)
Mięsak kościopochodny	Program EURAMOS-1; protokół MAPIE (OSSA-PL-2009) [92]	VP-16, MTX, cisplatyna, dokсорubicyna, ifosfamid	100 mg/m ² /dzień przez 5 dni w 1-godzinnym wlewie dożylnym łącznie z ifosfamidem (dokсорubicyna i cisplatyna w dniach 1 i 2)
Guzy OUN	Prokoół I – MB/PNET IP CZD (medulloblastoma u dzieci >3 r.ż.) [93]	Chemioterapia przed radioterapią w grupie standardowego ryzyka: VP-16, winkrystyna, karboplatyna, CY; Chemioterapia u dzieci z grupy wysokiego ryzyka - naprzemiennie dwie kombinacje leków z dwoma różnymi dawkami VP-16	100 mg/m ² /dzień w 1-godzinnym wlewie dożylnym przez 3 kolejne dni (dni 1, 2, 3; 21, 22,23; 42, 43, 44; 63, 64, 65) czterech cykli; Grupa wysokiego ryzyka: ▪ 100 mg/m ² /dobę w 1-godzinnym wlewie dożylnym z winkrystyną, karboplatyną przez 3 kolejne dni (dni 1, 2, 3; 42, 43, 44) dwóch cykli; ▪ 60 mg/m ² /dzień w 1-godzinnym wlewie dożylnym przez 5 kolejnych dni (dni 21, 22, 23, 24, 25; 63, 64, 65, 66, 67) dwóch cykli z ifosfamidem, cisplatyną
	Protokół II – HGG IP CZD (glejaki złośliwe u dzieci >3 r.ż.) [93]	Chemioterapia przed radioterapią: VP-16, ifosfamid, adriamycyna	150 mg/m ² /dzień w 1-godzinnym wlewie dożylnym przez 3 kolejne dni (dni 1, 2, 3; 42, 43, 44) dwóch cykli
	Protokół III (złośliwe guzy OUN u dzieci <3 r.ż.) [93]	VP-16, winkrystyna, cisplatyna, CY	100 mg/m ² /dzień w 1-godzinnym wlewie dożylnym przez 3 kolejne dni; u dzieci <10 kg w pierwszej kuracji 50% dawki, w razie dobrej tolerancji leczenia w drugiej kuracji 75% dawki, w następnej 100% dawek

Cd. Tabela 1. Zastosowanie VP-16 u dzieci w schematach terapeutycznych obowiązujących w Polsce

Jednostka chorobowa	Nazwa protokołu/programu	Etap schematu chemioterapii, w których podawany jest VP-16	Stosowane dawki VP-16
	Protokół V – GCT IP CZD(guzy nie wydzielające) [93]	VP-16, karboplatyna, cisplatyna, winblastyna, bleomycyna	100 mg/m ² w dniach 1, 2, 3
Złośliwe guzy zarodkowe o lokalizacji pozamózgowej	Program TGM 95 [94]	<p>Schemat VIP: ifosfamid, VP-16 i cisplatyna</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ chemioterapia uzupełniająca po zabiegu chirurgicznym: <ul style="list-style-type: none"> ▫ potworniaki niedojrzałe III stopnia nie wydzielające; ▫ złośliwe guzy zarodkowe nienasieniakowate wysokiego ryzyka zlokalizowane lub operowane na początku leczenia z pozostawieniem resztek lub z progresją z lub bez przerzutów; ▪ chemioterapia uzupełniająca – złośliwe guzy zarodkowe nienasieniakowate wysokiego ryzyka wstępnie nieoperacyjne z przerzutami lub bez przerzutów ▪ chemioterapia II rzutu – złośliwe guzy zarodkowe nienasieniakowate o ryzyku standardowym początkowo nieoperacyjne; ▪ wznowa – guz wydzielający 	75 mg/m ² /dzień przez 5 kolejnych dni (dni 1, 2, 3, 4, 5); chemioterapii typu VIP nie zaleca się u niemowląt od 3 do 6 miesiąca życia
Nerczak płodowy	Protokół SIOP [95]	Leczenie pooperacyjne guzów wysokiego ryzyka: VP-16, karboplatyna	150 mg/m ² /dzień w 1-godzinnym wlewie dożylnym przez 3 kolejne dni (łącznie 6 kuracji); u dzieci o masie ciała <12 kg, redukcja dawki do 100 mg/m ² /dzień
	Protokół SIOP [95]	Leczenie pooperacyjne u dzieci z guzami rozszianymi z obecnością przerzutów: VP-16, karboplatyna, CY, doksorubicyna	150 mg/m ² /dzień przez 3 kolejne dni w 1-godzinnym wlewie dożylnym w tygodniach 4, 10, 13, 16, 22, 25, 28, 34 (łącznie 24 dawki)

2.2.6. Dawkowanie

VP-16 jest podawany dożylnie lub doustnie oraz dożylnie jako fosforan VP-16 w różnych dawkach w zależności od choroby [63]. U dzieci z nawrotem ALL VP-16 może być podawany jednorazowo dożylnie lub kilkakrotnie dożylnie w kolejnych dniach, jak również doustnie raz dziennie lub dwa razy dziennie [96].

Brak jest ustalonego schematu dawkowania VP-16. Dożylnie VP-16 podaje się najczęściej bardzo rozcieńczony (0,5 mg/ml), co wydłuża czas podawania leku (5-10 godzin, przy stałej szybkości podawania 1 l/h) [75].

VP-16 podawany jest w konwencjonalnych dawkach (250-500 mg/m² przez 3-5 dni) w chemioterapii wielu nowotworów [77] oraz w wysokich dawkach (do 4,8 g/m² [69] lub >30 mg/kg [97]) najczęściej w kondycjonowaniu przed allo-HSCT [97]. Fosforan VP-16 podawany jest w niskich dawkach od 125 mg/m² do 250 mg/m² i wysokich od 250 mg/m² do 1200 mg/m² [69].

Aktywność przeciwnowotworowa VP-16 zależy od schematu podawania leku. W kilku pracach obserwowano lepszą odpowiedź kliniczną u pacjentów z chorobami nowotworowymi po podaniu mniejszych dawek VP-16 w ciągu kilku kolejnych dni niż po jednorazowym podaniu dużej dawki leku w ciągu jednego dnia, pomimo uzyskanych podobnych wartości AUC [8-10, 68, 96]. Udowodniono, że długo utrzymujące się niskie stężenia leku (>1 µg/ml) mogą działać przeciwnowotworowo w drobnokomórkowym raku płuc. Odpowiednie stężenia VP-16 wywołujące odpowiedź przeciwnowotworową mogą zależeć od czasu trwania ekspozycji na lek [9, 68]. W innym badaniu po podaniu VP-16 w 6- i 34-godzinny wlewie wykazano jednak brak jakichkolwiek różnic pomiędzy otrzymanymi parametrami farmakokinetycznymi, oprócz większego stężenia maksymalnego (C_{max}) po 6-godzinny wlewie oraz dłuższej eliminacji leku po podaniu 34-godzinny wlewu, co świadczy o farmakokinetycznej równoważności obu schematów dawkowania [75].

Docelowe stężenia VP-16 pozwalające na inhibicję topoizomerazy II różnią się w zależności od rodzaju nowotworu, w terapii którego jest podawany lek (np. w przypadku drobnokomórkowego raka płuc stężenia >1 µg/ml). Z drugiej strony duże stężenia leku (5-10 µg/ml) są najczęściej związane z ciężką mielosupresją [98].

U dzieci dawkowanie leków jest zazwyczaj dostosowywane do masy lub powierzchni ciała, przez co nie są brane pod uwagę fizjologiczne zmiany zachodzące pod-

czas dojrzewania. Kersting i wsp. [99] opracowali model farmakokinetyczno-fizjologiczny umożliwiający przewidywanie farmakokinetyki VP-16 u dzieci w różnym wieku na podstawie danych uzyskanych u dorosłych.

2.2.6.1. Dawkowanie w przypadkach upośledzonej funkcji wątroby i nerek

Łagodne oraz umiarkowane zaburzenia wątroby przy marskości nie wymagają redukcji dawki i nie powodują zwiększenia toksyczności VP-16, nawet przy hiperbilirubinemii [68]. Według innych autorów, u pacjentów z hiperbilirubinemią bilirubina obecna w osoczu wpływa istotnie na wiązanie leku z białkiem, prawdopodobnie poprzez wypieranie VP-16 z połączeń z białkami. W konsekwencji większe stężenie wolnego VP-16 występuje u pacjentów z podwyższonym stężeniem bilirubiny lub większą aktywnością enzymów wątrobowych z powodu zmniejszonej eliminacji wątrobowej oraz u pacjentów z hipoalbuminemią z powodu zmniejszonego wiązania VP-16 z białkami. U tych pacjentów wymagana jest redukcja dawki o przynajmniej 30% w celu uniknięcia toksyczności VP-16 [100]. Redukcja dawki VP-16 o 50% wskazana jest przy stężeniu bilirubiny 1,5-3,0 mg/dl lub przy aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) 60-180 U/l. Podawanie VP-16 powinno być zaprzestane przy stężeniu bilirubiny powyżej 3,0 mg/dl oraz aktywności AspAT powyżej 180 U/l [9].

U pacjentów pediatrycznych nie jest konieczne korygowanie dawek VP-16 w przypadku niedrożności dróg żółciowych [101].

U pacjentów z podwyższonym stężeniem kreatyniny obserwuje się 30-40% wzrost AUC VP-16, związany ze zmniejszoną eliminacją leku [9, 100]. Redukcje dawki VP-16 odpowiednio o 33% i 50% zalecane są u pacjentów z klirensiem kreatyniny (Cl_{cr}) 15-25 ml/min i <15 ml/min. U pacjentów z obniżoną szybkością przesączania kłębuszkowego może być wymagane 50% obniżenie dawki empirycznej [8]. Według innych autorów u dzieci chorych na nowotwory terminalna stała szybkości eliminacji VP-16 zmniejsza się istotnie przy uszkodzeniu nerek [74]. Niektóre protokoły lecznicze, obowiązujące u dzieci, zalecają redukcję dawki VP-16 przy obniżonym współczynniku przesączania kłębuszkowego [89, 91].

2.2.7. Działania niepożądane

Toksyczność VP-16 zależy prawdopodobnie od osiągniętych stężeń w osoczu [96]. Najczęściej występujące działania niepożądane po podaniu VP-16 to zahamowanie czynności szpiku kostnego (mielosupresja), mucositis, nudności, wymioty i utrata włosów. Hepatotoksyczność, gorączka i dreszcze mogą również pojawić się podczas terapii wysokimi dawkami VP-16 [65, 68, 102].

2.2.7.1. Toksyczność hematologiczna

Działaniem niepożądanym ograniczającym dawkę VP-16 jest mielosupresja [8, 65]. Leukopenia jest najpowszechniejszym działaniem niepożądanym po doustnym i dożylnym podaniu VP-16. Zwiększoną leukopenię obserwuje się przy jednoczesnym podawaniu CsA z VP-16 [84]. Trombocytopenia obserwowana jest u 23% pacjentów leczonych VP-16 [8].

2.2.7.2. Kancerogenność VP-16

Większość działań niepożądanych VP-16 pojawia się w czasie od 1 do 10 dni po podaniu leku, natomiast po roku do 5 lat (średnio od 2 do 3 lat) po stosowaniu VP-16, jak i innych inhibitorów topoizomerazy II, stwierdza się rozwój AML. Jest to najważniejsze działanie uboczne VP-16 i z tego względu Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) określiła lek karcynogenem dla ludzi. AML obserwuje się u około 5% (od 0,4% do 8,1%) pacjentów leczonych VP-16 z powodu guzów litych [8, 65, 68]. Ryzyko może być większe przy całkowitych dawkach VP-16 $>6 \text{ g/m}^2$. Ryzyko to było największe u pacjentów leczonych z powodu ziarnicy złośliwej lub mięsaka kościopochodnego oraz wysokie u pacjentów leczonych z powodu NHL i ALL. Powodem obserwowanych różnic mogą być zróżnicowane schematy leczenia i jednoczesne stosowanie kilku chemioterapeutyków [68].

Wykazano, że nie tylko VP-16, ale również jego metabolity (chinon i katechol VP-16) zwiększają występowanie kompleksów rozszczepialnych DNA-topoizomeraza II w pobliżu miejsc złamań translokacji MLL [68, 80, 103]. Miejsca złamań MLL mogą pojawiać się w komórkach macierzystych krwi pępowinowej, tłumacząc możliwy roz-

wój białaczki wieku niemowlęcego, mającej swój początek w narażeniu *in utero* na inhibitory topoizomerazy II [68, 103].

Dotychczas wykazano, że różne czynniki mogą predysponować do wystąpienia AML związanej z VP-16, m.in. dzięki genotyp CYP3A4 [8, 104], zwiększona tendencja do wariantów GSTM1 null i GSTT1 null oraz niższa aktywność metylotransferazy tiopurynowej. Przewlekła terapia lekami tiopurynowymi jest związana ze wzrostem ryzyka wystąpienia wtórnych nowotworów związanych z VP-16 [68, 105].

2.2.7.3. Mucositis

Toksycznością ograniczającą dawkę VP-16 jest zapalenie błony śluzowej jamy ustnej (mucositis, stomatitis), występujące po podaniu VP-16 w wysokich dawkach ($>1 \text{ g/m}^2$ lub 60 mg/kg m.c.). Często wystąpienie mucositis wymaga podania morfiny i żywienia dożylnego. Udowodniono, że mucositis koreluje z całkowitym AUC VP-16 [8, 68, 75].

2.2.7.4. Zaburzenia żołądkowo-jelitowe

Anoreksja, wymioty i biegunki występują zazwyczaj w łagodnej postaci po podaniu konwencjonalnych dawek VP-16 [8].

2.2.7.5. Zaburzenia sercowo-naczyniowe

Słaba rozpuszczalność VP-16 w wodzie wymaga podania dużej objętości płynów w celu rozpuszczenia wysokich dawek VP-16 i jednocześnie uniknięcia wytrącenia osadu, co może prowadzić do niewydolności serca u niektórych pacjentów [65, 106].

2.2.7.6. Reakcje nadwrażliwości

Reakcje nadwrażliwości na VP-16 są związane przede wszystkim ze środkami pomocniczymi (polisorbat 80, alkohol benzylowy i polyetylenoglikol), użytymi do przygotowania postaci parenteralnych, niż z samą substancją. Bardzo dobrze rozpusz-

czalny w roztworach wodnych fosforan VP-16 nie wymaga stosowania dodatkowych solubilizatorów. Reakcje nadwrażliwości rzadziej występują podczas podawania fosforanu VP-16 niż VP-16, co potwierdza wpływ środków pomocniczych na rozwój reakcji alergicznych [8, 68].

Do charakterystycznych objawów reakcji nadwrażliwości pojawiających się po dożylnym podaniu VP-16 należą skurcz oskrzeli, zaczerwienienie twarzy, wysypka, duszność, gorączka, dreszcze, tachykardia, ucisk w klatce piersiowej, sinica oraz zmiany w ciśnieniu krwi (niedociśnienie i nadciśnienie tętnicze). Jednak ciężkie postaci reakcji nadwrażliwości, takie jak zespół Stevensa-Johnsona, są niezwykle rzadkie. Po podaniu VP-16 reakcje typu anafilaktycznego pojawiają się u 0,7-2% pacjentów. Po przerwaniu wlewu leku objawy zazwyczaj szybko mijają. Reakcje nadwrażliwości na VP-16 są reakcjami typu I nadwrażliwości (pośredniczone przez IgE), a objawy pojawiają się zazwyczaj w ciągu kilku minut po rozpoczęciu dożylnego podawania leku. Premedykacja lekami antyhistaminowymi lub kortykosteroidami może zapobiec kolejnym reakcjom nadwrażliwości, nawet u tych pacjentów, u których podobne komplikacje wystąpiły już wcześniej. Jednak takie postępowanie nie powinno być uznawane za rutynową praktykę, jeśli u pacjenta obserwowano wcześniej poważną reakcję nadwrażliwości, taką jak długotrwałe utrzymujący się skurcz oskrzeli lub poważne niedociśnienie tętnicze. Po premedykacji lekami antyhistaminowymi lub kortykosteroidami, VP-16 w postaci wlewu o małej szybkości może być z powodzeniem włączony ponownie do terapii u ok. 80% pacjentów, u których wystąpiła wcześniej reakcja nadwrażliwości. U pacjentów, u których wystąpiły reakcje nadwrażliwości na VP-16, można bezpiecznie stosować fosforan VP-16 [8, 68].

Obserwowano jednak reakcje krzyżowe na VP-16 u pacjentów z reakcjami nadwrażliwości na tenipozyd, co sugeruje, że reakcje alergiczne nie są ograniczone wyłącznie do zastosowania rozpuszczalników. Dodatkowo, reakcje nadwrażliwości stwierdzono również po doustnym stosowaniu VP-16 [8].

2.2.7.7. Wpływ na układ nerwowy

Objawy neurotoksyczne występują rzadko, jednak obserwowane są częściej po leczeniu większymi dawkami VP-16. Działania niepożądane na układ nerwowy objawiające się bólami głowy, przejściowym splątaniem umysłowym i zawrotami głowy

mogą być związane z obecnością we krwi alkoholu benzylowego, stosowanego do przygotowania roztworów VP-16. Neuropatia obwodowa, głównie łagodna i sporadyczna, została opisana po zastosowaniu konwencjonalnych dawek VP-16. Poważna neuropatia obwodowa została stwierdzona podczas łącznego podawania VP-16 i alkaloidów vinca [8].

2.2.8. Interakcje VP-16

Doksorubicyna i ifosfamid nie zmieniają Cl_s VP-16 [68]. Czynniki alkilujące, takie jak BU i CY, podawane przed lub łącznie z VP-16 mogą wpływać na jego farmakokinetykę ze względu na zdolność reagowania z enzymami, DNA i białkami, m.in. z albuminami. Kinetyka wiązania VP-16 z białkiem może być zmieniona z powodu alkilacji albuminy. BU, będąc induktorem enzymatycznym, wpływa na eliminację podofilotoksyn [75]. Sprzeczne dane dotyczą interakcji z cisplatyną. Według niektórych autorów pomiędzy VP-16 z cisplatyną i karboplatyną nie występują żadne istotne interakcje [68]. Inni autorzy wykazali natomiast mniejszy Cl_s VP-16 przy jednoczesnym podawaniu z cisplatyną [9, 10] lub karboplatyną [99].

Wykazano synergistyczne działanie przy jednoczesnym podawaniu VP-16 i topotekanu, również będącego inhibitorem topoizomerazy. Synergia działania jest zwiększona przy mniejszym stosunku VP-16 do topotekanu, jak również gdy VP-16 podawany jest po topotekanie [85].

Łączne podawanie prednizonu z VP-16 indukuje Cl_s VP-16, prawdopodobnie poprzez indukowanie P-gp. Pacjenci otrzymujący glikokortykosteroidy mogą otrzymywać za małe dawki VP-16, ponieważ indukcja P-gp może zwiększać klirens nerkowy lub żółciowy leku [68]. Sugeruje się, że podawanie inhibitorów P-gp takich jak chinidyna lub hydroksyzyna może zwiększyć biodostępność VP-16 [9].

3-O-demetylacja VP-16 jest *in vitro* hamowana przez różne substraty dla CYP3A4, m.in. werapamil i CsA, które w badaniach stosowano w połączeniu z VP-16 jako modulatory MDR. W fazie farmakokinetycznej zachodzi wyłącznie interakcja z CsA, skutkująca wzrostem AUC VP-16 i obniżeniem Cl_s przy jednoczesnym dożylnym podawaniu VP-16 i CsA. Wzrost ten jest związany z hamowaniem P-gp, której ekspresja w warunkach fizjologicznych ma miejsce w przewodach żółciowych i kanałkach nerkowych [9, 107].

Leki będące inhibitorami CYP3A4 (m.in. ketokonazol, inhibitory proteazy, CsA, werapamil, winkrystyna) hamują metabolizm VP-16, co powoduje wzrost jego stężenia [9, 108, 109]. Udowodniono, że ketokonazol zwiększa absorpcję VP-16 i AUC VP-16 o 40% na skutek hamowania utleniania VP-16 w jelitach i w wątrobie [9]. Jednoczesne podawanie VP-16 i inhibitorów proteazy może prowadzić do zwiększonego ryzyka wystąpienia mielosupresji, jak również ciężkiej postaci mucositis oraz podwyższenia poziomu enzymów wątrobowych [109]. Na podstawie opisu przypadku stwierdzono, że możliwa jest również interakcja VP-16 z preparatami jeżówki ze względu na ich zdolność do inhibicji CYP3A4 [110].

Jednoczesne podawanie leków przeciwpadaczkowych (fenytoiny i fenobarbitalu) i VP-16 indukuje CYP3A4, co może prowadzić do wzrostu Cl_s VP-16 i związanej z tym mniejszej ekspozycji na lek. Nie obserwowano natomiast interakcji VP-16 z tamoksifenem, będącym substratem dla CYP3A4 [9].

2.2.9. Zmienność farmakokinetyki VP-16

Po doustnym jak i dożylnym podaniu VP-16 obserwuje się dużą międzypersoniczną zmienność w stężeniach VP-16 w osoczu, jak również parametrów farmakokinetycznych VP-16 [8, 9]. Większe zróżnicowanie w ekspozycji na lek obserwuje się po podaniu doustnym niż dożylnym [68], co może wynikać ze zróżnicowanej ekspresji i aktywności białek transportujących VP-16 [111]. Zróżnicowanie farmakokinetyki VP-16 widoczne jest zwłaszcza po podaniu większych dawek zarówno u dzieci jak i u dorosłych [8, 10, 75].

W przypadku konwencjonalnych dawek VP-16 nie obserwowano istotnych różnic w farmakokinetyce VP-16 pomiędzy dziećmi a dorosłymi, w szczególności w wartościach Cl_s [9], jak również między dziećmi a niemowlętami poniżej 1 roku życia [112]. Według niektórych autorów po podaniu wysokich dawek VP-16 wartości Cl_s leku u dzieci są niższe niż u dorosłych [9, 10].

Istotny wpływ na obserwowaną zmienność parametrów farmakokinetycznych VP-16 mogą mieć jednocześnie podawane leki, jak również uszkodzone funkcje narządów biorących udział w metabolizmie VP-16 (głównie nerek i wątroby) [10, 75]. Oprócz zmian w stopniu wiązania VP-16 z białkami, udowodniono, że osłabiona funk-

cja nerki powoduje wzrost ekspozycji na lek, dłuższy średni czas przebywania leku w organizmie (MRT_{tot}), mniejszą V_d oraz mniejszy Cl_s leku [75].

Badania nad farmakokinetyką kliniczną VP-16 wykazały znaczną międzyosobniczą zmienność w wartościach AUC i stężenia w stanie stacjonarnym (C_{ss}), nawet po podaniu tej samej dawki leku [8, 75]. Zmienność może być spowodowana przede wszystkim złożoną drogą metaboliczną, biorącą udział w eliminacji leku i powstaniem metabolitów, charakteryzujących się toksycznością o znaczeniu klinicznym. Metabolit katecholowy, pomimo małego udziału procentowego w metabolizmie VP-16, może być związany z większym ryzykiem pojawienia się wtórnych nowotworów [8].

Modyfikacja dawkowania VP-16 u pacjentów z obniżonym Cl_{cr} wpływa na zmienność ekspozycji na lek w niewielkim stopniu ($\pm 9\%$). U dzieci, zmienność międzyosobnicza AUC jest mniejsza, gdy dawki VP-16 są obliczone w oparciu o powierzchnię ciała niż masę ciała [68].

2.2.10. Terapeutyczne monitorowanie VP-16

Obserwowana znaczna międzyosobnicza zmienność po doustnym podaniu VP-16 (m.in. u dzieci ze wznową ALL) wskazuje na konieczność wprowadzenia terapeutycznego monitorowania leku w celu utrzymania efektywnego cytotoksycznego stężenia VP-16 w czasie oraz zredukowania ryzyka toksyczności ogólnoustrojowej. Wykorzystanie wyników badań naukowych w codziennej praktyce klinicznej nadal pozostaje jednak wielkim wyzwaniem [8, 113, 114].

Międzyosobnicza zmienność stężenia leku może mieć również znaczenie u pacjentów otrzymujących wysokie dawki VP-16 przed HSCT, ponieważ utrzymujące się przez dłuższy czas duże stężenie leku może mieć niekorzystny wpływ na przyjęcie przeszczepu. Monitorowanie stężenia VP-16 w osoczu pozwoliłoby na szybką identyfikację pacjentów z większym ryzykiem odrzucenia przeszczepu [8, 75].

Zróznicowanie między- i wewnątrzosobnicze ekspozycji organizmu na VP-16 jest prawie dwukrotnie mniejsze po dożylnym podaniu leku niż po podaniu doustnym [9, 115], co wskazuje, że dawkowanie leku w oparciu o populacyjne dane dotyczące biodostępności może być nieodpowiednie ze względu na prawdopodobieństwo wystąpienia stężeń subterapeutycznych lub toksycznych [9].

Ze względu na dużą zmienność między- i wewnątrzsobniczą w farmakokinetyce i farmakodynamice VP-16 najlepszą metodą indywidualizowania dawkowania VP-16 byłoby wyznaczanie parametrów farmakokinetycznych leku u każdego pacjenta. Ze względu na koszt badania, jak również jego uciążliwość dla pacjentów opracowano kilka strategii ograniczonej liczby próbek w przypadku wielokrotnego dożylnego i doustnego podawania VP-16 [9, 114, 116, 117]. Podejmowane były również próby terapeutycznego monitorowania leku w celu kontrolowania stężenia VP-16 podczas podawania leku w wielogodzinnym wlewie, jak również efektów farmakodynamicznych leku. Większość badań nie zakończyła się jednak sukcesem ze względu na nieprzewidywalną farmakodynamikę leku [9, 114]. Z drugiej strony, po doustnym podaniu VP-16 terapeutyczne monitorowanie VP-16 pozwala uwzględnić międzysobniczą zmienność farmakokinetyki VP-16 [114].

W próbach ustalenia czynników, które mogłyby pomóc przewidzieć narażenie na wystąpienie przewlekłej toksyczności związanej z podawaniem VP-16 brano pod uwagę parametry farmakokinetyczne VP-16 (C_{ss} , AUC, C_{max}), stężenie wolnego leku, czas ekspozycji organizmu na określone stężenie VP-16, jak również stężenie albumin w osoczu, stężenie bilirubiny przed rozpoczęciem leczenia, Cl_{cr} oraz wiek pacjentów [9, 114]. U dorosłych pacjentów leczonych z powodu nowotworów litych wykazano korelację C_{ss} i AUC VP-16 z odpowiedzią przeciwnowotworową na lek. Wykazano, że większe stężenia VP-16 mogą być związane z lepszym wynikiem terapii, ale równocześnie z większą toksycznością [96]. W kilku pracach wykazano korelację AUC VP-16 całkowitego i wolnego z neutropenią, będącą toksycznością ograniczającą dawkę VP-16 w monoterapii jak również w połączeniu z innymi lekami [100, 114]. Zauważono również zależności farmakokinetyczno-farmakodynamiczne u dzieci, dotyczące głównie powiązania farmakokinetyki z toksycznością. U dzieci z nerwiakiem płodowym AUC VP-16 korelowało dodatnio z obserwowaną toksycznością, a czas, w którym stężenie VP-16 utrzymywało się powyżej 1 $\mu\text{g/ml}$ pozwalał na przewidywanie indukowanej przez VP-16 neutropenii [74].

Zmiany w stopniu wiązania VP-16 z białkami mogą przyczynić się do dużego zróżnicowania ekspozycji organizmu na niezwiązany z białkami, aktywny lek, zwiększając w ten sposób efekt farmakologiczny standardowych dawek VP-16. Wykazano, że ekspozycja na wolny VP-16 lepiej koreluje z toksycznością hematologiczną, co wskazuje na lepszą wartość prognostyczną stężenia wolnego leku w optymalizacji dawkowania VP-16 niż stężenia leku całkowitego [9]. W pracy Perdaems i wsp. [118] zasugerowano

włączenie oznaczania stopnia wiązania VP-16 z białkami do terapeutycznego monitorowania leku. Ponadto, autorzy wykazali większe wartości C_{\max} wolnego VP-16, jak i jego AUC u pacjentów, u których wystąpiła neutropenia w stopniu III/IV, podczas gdy stężenie całkowite leku nie różniło się pomiędzy pacjentami.

Znajomość farmakokinetyki klinicznej VP-16 oraz możliwych interakcji jest niezbędna przy modyfikowaniu dawki oraz zapobieganiu istotnym działaniom niepożądanym leku [8, 9].

3. CEL PRACY

Celem pracy była analiza parametrów farmakokinetycznych VP-16 podawanego w wysokich dawkach w połączeniu z FTBI w kondycjonowaniu poprzedzającym allo-HSCT u dzieci chorych na ALL.

3.1. CELE SZCZEGÓŁOWE

1. Oznaczenie stężenia całkowitego i frakcji wolnej VP-16 stosowanego w kondycjonowaniu przed allo-HSCT u dzieci z ALL oraz obliczenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych VP-16;
2. Analiza korelacji parametrów farmakokinetycznych VP-16 z parametrami rekonstrukcji granulopoezy i płytkotworzenia;
3. Analiza korelacji parametrów farmakokinetycznych VP-16 z prawdopodobieństwem przeżycia wolnego od białaczki (pLFS) w grupie dzieci chorych na ALL po allo-HSCT;
4. Analiza wpływu parametrów farmakokinetycznych VP-16 na toksyczność narządową, związaną ze stosowanym kondycjonowaniem, obserwowaną do dnia +100 po allo-HSCT.
5. Analiza wpływu VP-16 w stężeniach obserwowanych w dniu allo-HSCT w warunkach *in vitro* na aktywność proliferacyjną limfocytów krwi obwodowej (PBMCs).

4. CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. METODYKA BADAŃ

4.1.1. Aparatura

W pracy korzystano z następującej aparatury:

- wysokosprawny chromatograf cieczowy HP 1100 z detektorem UV sterowany komputerem (Hewlett-Packard, Wiedeń, Austria);
- kolumna chromatograficzna Nucleosil 100 Phenyl 7u (250 × 4 mm);
- prekolumna (7,5 × 4,6 mm) Nucleosil Phenyl;
- zestaw do sączenia roztworów dla celów HPLC (Sartorius, Goettingen, Niemcy);
- filtry membranowe S&S Nylon, wielkość porów 0,45 μm (Sigma-Aldrich, USA);
- aparat do demineralizacji wody Simplicity® UV (Millipore, Francja);
- wirówka Centrifuge 5804 (Eppendorf, Niemcy);
- wirówka do ultrafiltracji EBA 12R (Hettich Zentrifugen, Germany);
- urządzenie do odgazowywania roztworów metodą ultradźwiękową UM-4 (Unitra, Polska);
- urządzenie do odparowywania próbek Techne Dri-Block DB 3 (Thermo-DUX, Wielka Brytania);
- wytrząsarka typ 358 S (Elpan, Polska);
- waga analityczna BP 110 S (Sartorius, Niemcy);
- probówki z heparyną o pojemności 5 ml (Sarstedt, Niemcy);
- pipety automatyczne 20 – 5000 μl (Eppendorf, Niemcy);
- fiolki szklane o pojemności 2 ml (Hewlett-Packard, Austria);
- sączi Milipore Ultra-0,5 mL (MWCO 10 000);
- zestaw szkła laboratoryjnego.

4.1.2. Odczynniki

W badaniach stosowano następujące odczynniki i materiały:

- etopozyd, substancja (Sigma-Aldrich, USA);
- tenipozyd (IS), substancja (Bristol-Myers Squibb, Warszawa);
- metanol do HPLC (J.T. Baker, Holandia);
- chloroform do HPLC (Acros Organics, New Jersey, USA);
- kwas octowy do HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holandia);
- osocze ludzkie (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu);
- woda demineralizowana.

4.1.3. Metoda HPLC oznaczania VP-16

W celu oznaczenia stężenia VP-16 w osoczu dzieci przygotowywanych do allo-HSCT zastosowano zmodyfikowaną metodę HPLC z detekcją UV [119, 120, 121], którą poddano walidacji. Jako wzorzec wewnętrzny (IS) wybrano tenipozyd. Analizę chromatograficzną poprzedzono ekstrakcją leku ciecz-ciecz z próbek biologicznych.

4.1.3.1. Warunki pracy chromatografu cieczowego

Chromatograf HP 1100 składał się z pompy, próżniowego układu odgazującego fazę ruchomą, układu automatycznie nasykającego badaną próbkę, detektora UV, układu termostatującego kolumnę, programu ChemStation do sterowania pracą chromatografu i komputerowej analizy danych. Rozdział prowadzono w odwróconym układzie faz.

Fazę ruchomą przygotowano przez zmieszanie metanolu, wody i kwasu octowego (55:44:1; v/v/v) i odgazowanie za pomocą ultradźwięków. Temperatura kolumny, objętość nasyżki i prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiły odpowiednio 25°C, 50 μ l i 1 ml/min, a detekcja następowała przy długości fali $\lambda = 240$ nm.

4.1.3.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych i krzywych wzorcowych

Ze względu na duże zróżnicowanie wartości stężeń VP-16 w osoczu dzieci (duże wartości od zakończenia wlewu do 8 godziny po jego zakończeniu i małe wartości w próbkach pobranych od 24-tej godziny po zakończeniu wlewu), przygotowano dwie krzywe wzorcowe: w zakresie stężeń VP-16 od 10 µg/ml do 200 µg/ml (krzywa I) oraz w zakresie stężeń VP-16 od 0,1 µg/ml do 10 µg/ml (krzywa II).

W celu wykonania oznaczeń przygotowano następujące roztwory:

- roztwory podstawowe VP-16 w metanolu o stężeniu 1000 µg/ml i 4000 µg/ml;
- roztwory podstawowe IS w metanolu o stężeniu 1000 µg/ml i 1250 µg/ml.

Korzystając z roztworów podstawowych VP-16 (4000 µg/ml) i IS (1250 µg/ml) przygotowano roztwory wzorcowe VP-16 w metanolu o stężeniu 100; 250; 500; 1000 i 2000 µg/ml zawierające IS o stężeniu 250 µg/ml (krzywa I). Roztwory o objętości 0,02 ml dodawano do 0,18 ml osocza zdrowych ochotników, uzyskując w ten sposób następujące stężenia VP-16 w osoczu: 10; 25; 50; 100 i 200 µg/ml oraz stałe stężenie IS 25 µg/ml. Próbkę ekstrahowano 2 ml chloroformu przez 30 min, a następnie po odwirowaniu (5 min, 250 g) fazę organiczną przenoszono do probówek szklanych i odparowywano do sucha pod azotem w temperaturze 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,1 ml fazy ruchomej, wirowano, przenoszono do fiolek szklanych i analizowano metodą HPLC.

Krzywą II przygotowano korzystając z roztworów podstawowych VP-16 i IS o stężeniu 1000 µg/ml. Z tych roztworów przygotowano roztwory wzorcowe VP-16 w metanolu o stężeniu 1; 2,5; 5; 10; 20; 50 i 100 µg/ml oraz stałym stężeniu IS 20 µg/ml. Następnie do probówek zawierających 0,5 ml osocza zdrowych ochotników dodawano 0,05 ml powyższych roztworów wzorcowych uzyskując w ten sposób następujące stężenia analitu w osoczu: 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 5 i 10 µg/ml oraz stałe stężenie IS równe 2 µg/ml. Dalszy tok postępowania był taki sam jak w przypadku krzywej I.

4.1.3.3. Walidacja metody

Krzywe wzorcowe I i II (n = 7) były liniowe w zakresie stężeń VP-16 od 10 µg/ml do 200 µg/ml i w zakresie stężeń VP-16 od 0,1 µg/ml do 10 µg/ml. Współczynniki korelacji obu krzywych wzorcowych mieściły się odpowiednio w zakresie od 0,9994 do

0,9999 i od 0,9971 do 0,9999. Uśrednione równanie regresji liniowej dla krzywej I miało postać: $y = 0,0319 \cdot x$, natomiast dla krzywej II: $y = 0,4359 \cdot x - 0,0041$, gdzie „y” oznacza stosunek powierzchni pików VP-16 do pików IS, natomiast „x” oznacza stężenie teoretyczne VP-16.

Wykrywalność (LOD) dla VP-16 przy stosunku sygnału do linii szumu 12:1 wynosiła 0,05 µg/ml, natomiast granica oznaczalności (LOQ) wynosiła 0,1 µg/ml (przy współczynniku zmienności [CV] = 7,52%) (Tab. 2).

Precyzja analizy VP-16 w ciągu dnia dla krzywej I wyrażona jako CV wynosiła 4,4% i 4,1% odpowiednio dla stężeń 25 µg/ml i 100 µg/ml. Precyzja analizy VP-16 w ciągu dnia dla krzywej II wynosiła 11,0% i 2,5% odpowiednio dla stężeń 0,5 µg/ml i 5,0 µg/ml. W analizie między dniami precyzja dla VP-16 w zakresie I i II krzywej wzorcowej wynosiła odpowiednio 3,56% i 6,07%. Średnia dokładność metody w analizie w ciągu dnia dla krzywej I wynosiła odpowiednio 102,1% i 99,2% dla stężeń 25 µg/ml i 100 µg/ml, a dla krzywej II odpowiednio 102,3% i 101,5% dla stężeń 0,5 µg/ml i 5 µg/ml. Średnia dokładność metody w analizie między dniami dla krzywej I wynosiła odpowiednio 97,2% i 99,7% dla stężeń 25 µg/ml i 100 µg/ml, a dla krzywej II odpowiednio 97,4% i 102,6% dla stężeń 0,5 µg/ml i 5 µg/ml (Tab. 2).

Odzysk VP-16 wynosił 87,3% i 89,1% odpowiednio dla stężeń 25 µg/ml i 100 µg/ml oraz 81,7% i 85,3% odpowiednio dla stężeń 0,5 µg/ml i 5,0 µg/ml (Tab. 2).

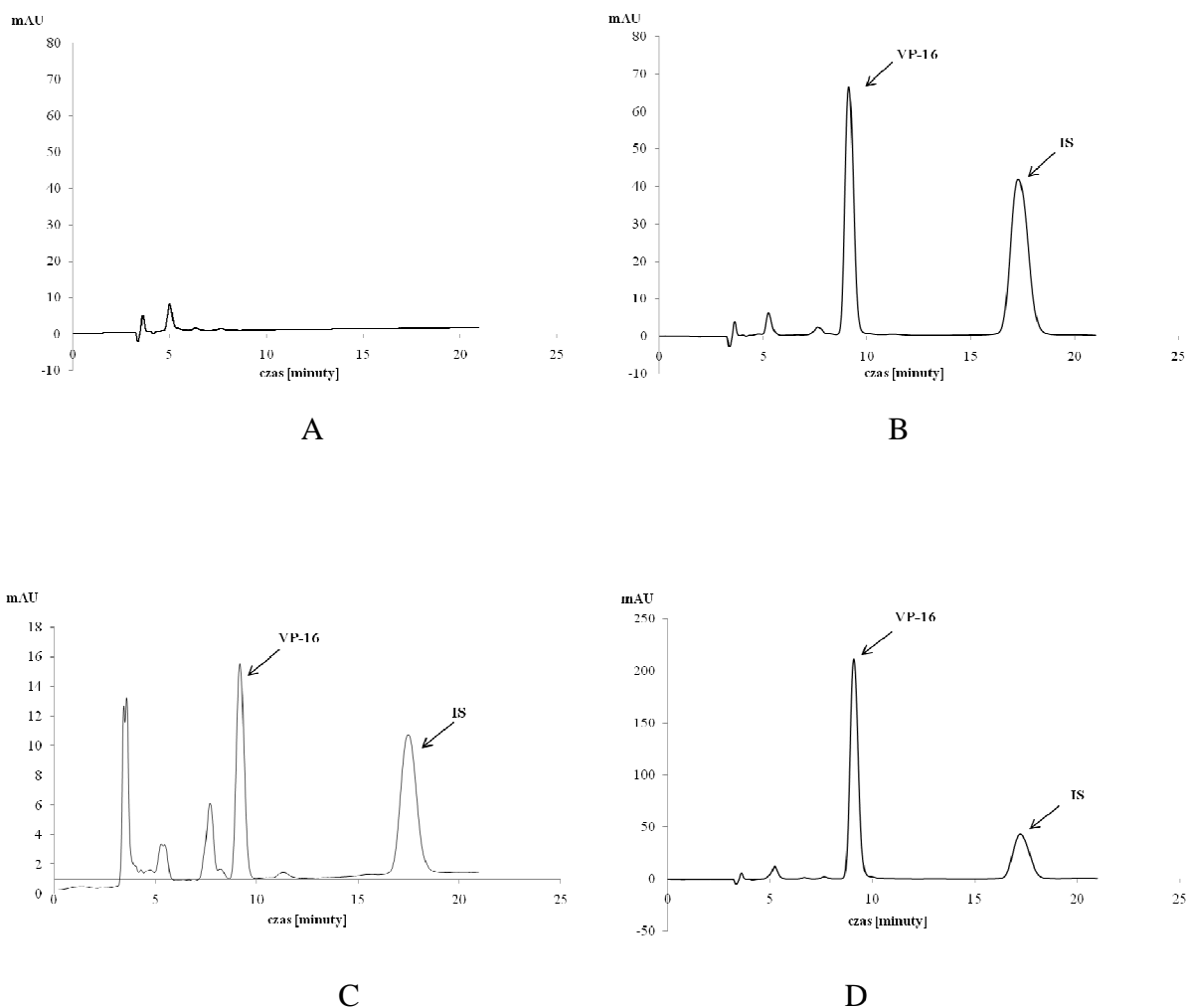
Tabela 2. Wyniki walidacji metody HPLC oznaczania VP-16

		Krzywa I	Krzywa II
Linijowość (µg/ml)		10 - 200	0,1 - 10
Równanie prostej		$y = 0,0319 \cdot x$	$y = 0,4359 \cdot x - 0,0041$
Współczynnik korelacji		0,9994 – 0,9999	0,9971 – 0,9999
LOD (µg/ml)		0,05	
LOQ (µg/ml)		0,1 (CV = 7,52%)	
Precyzja (CV, %)	w ciągu dnia	4,4 i 4,1 ^a	11,0 i 2,5 ^b
	między dniami	4,76 i 1,71 ^a	7,11 i 3,63 ^b
Dokładność (%)	w ciągu dnia	102,1 i 99,2 ^a	102,3 i 101,5 ^b
	między dniami	97,2 i 99,7 ^a	97,4 i 102,6 ^b
Odzysk (%)		87,3 i 89,1 ^a	81,7 i 85,3 ^b

^a Odpowiednio dla stężeń 25 i 100 µg/ml

^b Odpowiednio dla stężeń 0,5 i 5 µg/ml

Chromatogramy próbek osocza kontrolnego, osocza z VP-16 zawierającego IS oraz przykładowej próbki osocza dziecka, któremu podano VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. przedstawiono na Ryc. 3. Na chromatogramach nie obserwowano pików pochodzących od substancji endogennych lub innych leków stosowanych przez chorych w zakresie czasu retencji VP-16 i IS, który wynosił odpowiednio $9,33 \pm 0,17$ min i $18,00 \pm 0,52$ min.



Ryc. 3. Przykładowe chromatogramy HPLC:

A - osocze kontrolne;

B - osocze obciążone VP-16 o stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ oraz IS (krzywa I);

C - osocze obciążone VP-16 o stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$ oraz IS (krzywa II);

D - osocze dziecka, któremu podano VP-16 ($D = 60$ mg/kg m.c.), zawierające IS.

4.2. BADANIA KLINICZNE

Badania prowadzono we współpracy z Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz z Katedrą i Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum w Bydgoszczy. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 35/10) oraz zgodę Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (KB 358/2010).

4.2.1. Dane demograficzne dzieci przygotowywanych do allo-HSCT

W badaniu uczestniczyło 36 dzieci (35 dzieci w wieku od 2 do 18 lat i jeden młody dorosły w wieku 19 lat), które otrzymały VP-16 w kondycjonowaniu przed allo-HSCT. Trzydzieścioro jeden dzieci otrzymało VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. łącznie z FTBI. Maksymalna dopuszczalna całkowita dawka VP-16 wynosi 3600 mg i dlatego troje dzieci z masą ciała 80 kg, 77 kg i 75 kg otrzymało mniejsze dawki VP-16. Troje dzieci otrzymało VP-16 w dawce 40 mg/kg m.c., a dwoje w dawce 30 mg/kg m.c. Charakterystykę demograficzną dzieci przygotowywanych do allo-HSCT przedstawiono w Tabeli 3.

W grupie 36 dzieci uczestniczących w badaniach znajduje się ośmioro dzieci, u których stężenia VP-16 oznaczono w latach 1999-2001*.

* Badania zapoczątkowane przez Prof. dr hab. Łucję Skibińską

Tabela 3. Charakterystyka dzieci przygotowywanych do allo-HSCT

Parametr		Dawka VP-16 [mg/kg m.c.]		
		60	40	30
		n = 31	n = 3	n = 2
Płeć	Dziewczynki	n = 12 (39%)	n = 3 (100%)	n = 1 (50%)
	Chłopcy	n = 19 (61%)	n = 0 (0%)	n = 1 (50%)
Wiek (lata)	średnia ± SD	11 ± 4	8 ± 10	10 ± 8
	min	6	2	4
	max	18	19	15
Masa ciała (kg)	średnia ± SD	43 ± 18	22 ± 21	45 ± 44
	min	17	10	14
	max	80	47	77
Powierzchnia ciała (m ²)	średnia ± SD	1,28 ± 0,34	0,80 ± 0,55	1,28 ± 0,94
	min	0,70	0,47	0,61
	max	2,00	1,44	1,94

4.2.2. Charakterystyka kondycjonowania przed allo-HSCT

Dla dzieci, którym podano VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. schemat kondycjonowania obejmował również FTBI, które stosowano w 6 podzielonych dawkach przez 3 kolejne dni (2 dawki każdego dnia) w całkowitej dawce 12,0 Gy z redukcją do 9,4 Gy w płucach. VP-16 podawano w 4-godzinny wlewie dożylnym 72 godziny (dzień -3) lub 96 godzin (dzień -4) przed planowaną allo-HSCT. U dzieci, którym podano mniejsze dawki VP-16 (40 lub 30 mg/kg m.c.) kondycjonowanie obejmowało podawanie dodatkowych leków (VP-16 40 mg/kg m.c. łącznie z treosulfanem i CY u dwojga dzieci i BU oraz CY u jednego dziecka, a VP-16 30 mg/kg m.c łącznie z CY i FTBI u jednego dziecka oraz z BU i CY u jednego dziecka).

U większości dzieci wskazaniem do allo-HSCT była ALL (34 dzieci). U dwojga dzieci allo-HSCT przeprowadzono z powodu NHL w stopniu IV, tj. z zajęciem szpiku [122]. Większość dzieci była w CR1 lub CR2. Jedno dziecko było w CR3. Większości dzieciom (n = 22) przeszczepiono komórki krwiotwórcze pochodzące od MSD. Materiał przeszczepowy od MUD podano 14 dzieciom. Żadne dziecko nie otrzymało komórek krwiotwórczych pochodzących od MMD. Komórki krwiotwórcze pochodzące z BM przeszczepiono 19 dzieciom, a z PB 17 dzieciom. Dane dotyczące przygotowania dzieci do allo-HSCT przedstawiono w Tabeli 4.

Szczegółowe dane dotyczące charakterystyki dzieci oraz przygotowania do allo-HSCT zamieszczono w Załączniku 11.3 w Tabelach 1-3.

Tabela 4. Charakterystyka biorców, dawców i kondycjonowania przed allo-HSCT

Parametr		Dawka VP-16 [mg/kg m.c.]		
		60	40	30
		n = 31	n = 3	n = 2
Rozpoznanie	ALL	29 (94%)	3 (100%)	2 (100%)
	NHL	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)
CR	1	17 (55%)	3 (100%)	2 (100%)
	2	13 (42%)	0 (0%)	0 (0%)
	3	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)
Dawca	MSD	20 (65%)	0 (0%)	2 (100%)
	MUD	11 (35%)	3 (100%)	0 (0%)
Źródło komórek krwiotwórczych	BM	17 (55%)	0 (0%)	2 (100%)
	PB	14 (45%)	3 (100%)	0 (0%)
Kondycjonowanie	FTBI	31 (100%)	0 (0%)	1 (50%)
	CY	0 (0%)	3 (100%)	2 (100%)
	treosulfan	0 (0%)	2 (66%)	0 (0%)
	BU	0 (0%)	1 (33%)	1 (50%)
Dzień podania VP-16	-3	11 (35%)	0 (0%)	0 (0%)
	-4	20 (65%)	3 (100%)	2 (100%)

4.2.3. Pobieranie i analiza próbek krwi

Dzieciom pobierano próbki krwi do probówek z heparyną przed rozpoczęciem wlewu, przed jego zakończeniem, a następnie po 2, 4, 8, 24, 48, 60, 72, 96 i 120 godzinach po zakończeniu wlewu (łącznie pobierano około 30 ml krwi w ciągu 5 dni). Dzieciom, które poddane były allo-HSCT w latach 1999-2001 próbki krwi pobierano przed rozpoczęciem wlewu, przed jego zakończeniem, a następnie po 15, 30, 45 minutach, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 i 96 godzinach po zakończeniu wlewu. Do pobierania próbek krwi wykorzystano centralny cewnik żylny zainstalowany w związku z planowaną transplantacją, tzn. pobrania próbek krwi były całkowicie niebolesne dla dziecka. Po pobraniu krwi próbki wirowano 15 min przy 180 g, a zebrane osocze przechowywano w temp. -20°C do czasu analizy.

Dla spodziewanych dużych stężeń VP-16 w osoczu dziecka tzn. w momencie zakończenia wlewu i w czasie od 2 do 8 godzin po zakończeniu wlewu, do probówek pobierano 0,18 ml osocza i dodawano 0,02 ml IS o stężeniu 250 µg/ml. Dla oczekiwanych małych stężeń leku, w fazie eliminacji (od 24 do 120 godzin), do probówek pobierano 0,5 ml osocza dziecka i dodawano 0,05 ml roztworu IS o stężeniu 20 µg/ml. Dalszy tok postępowania był taki sam jak opisano w punkcie 4.1.3.2.

W próbkach krwi pobranych przed zakończeniem wlewu oznaczono stężenie wolnego VP-16. W celu oddzielenia leku wolnego od związanego z białkami osocza, 1 ml osocza chorych dzieci poddano ultrafiltracji przy użyciu sączków Millipore w temperaturze 37°C w czasie 30 min przy 10 000 g. Następnie do 0,5 ml ultrafiltratu dodano 0,05 ml roztworu IS o stężeniu 20 µg/ml. Dalszy tok postępowania był taki sam jak opisano w punkcie 4.1.3.2.

Stężenia całkowite VP-16 oraz stężenie leku wolnego w osoczu dzieci przygotowywanych do allo-HSCT oznaczano równoległe z roztworami wzorcowymi VP-16 walidowaną metodą HPLC.

4.2.4. Leki podawane dzieciom równocześnie z VP-16

Dzieciom, dla których dawcą komórek krwiotwórczych był MUD, podawano ATG w 4 dawkach między dniami -4 a -1 w celu deplecji limfocytów T biorcy. Jako premedykację podawano kortykosteroidy (deksametazon i/lub hydrokortyzon) przed każdą dawką ATG oraz w dawce jednorazowej przed wlewem VP-16.

Jako profilaktykę przeciwko wystąpieniu GvHD podawano odpowiednio CsA, gdy dawcą komórek krwiotwórczych był MSD lub CsA z MTX i folinianem wapnia, gdy dawcą komórek krwiotwórczych był MUD. Podawanie dożylnie CsA rozpoczynano 24 godziny przed allo-HSCT (dzień -1) i kontynuowano do momentu tolerowania przez dziecko postaci doustnej leku. Dawka CsA była dostosowywana do utrzymania stężenia CsA we krwi 100 ng/ml ± 10 ng/ml po MSD-HSCT oraz 150 ng/ml ± 10 ng/ml po MUD-HSCT. MTX podawano dożylnie w dawce 10 mg/m² w dniach +1, +3 i +6, a folinian wapnia podawano dożylnie w dawce 15 mg/m² 24 godziny po każdej dawce MTX.

Profilaktyka powikłań infekcyjnych obejmowała przebywanie dzieci w pomieszczeniach z laminarnym przepływem powietrza oczyszczanym przez filtry HEPA

oraz podawanie trimetoprimu i sulfametoksazolu w celu ochrony przed zakażeniem *Pneumocystis carinii*, leków przeciwgrzybiczych u części dzieci (amfoterycyna B, flukonazol, itraconazol, posakonazol, worykonazol) i immunoglobulin i.v. w celu utrzymania stężenia immunoglobulin G powyżej 5 g/l.

4.2.5. Parametry biochemiczne

Dzieciom przygotowywanym do allo-HSCT oznaczano podstawowe parametry biochemiczne w dniu podania VP-16 (przed rozpoczęciem wlewu), w dniu allo-HSCT (dzień 0) oraz w trzeciej dobie po allo-HSCT (dzień +3). W zależności od wieku dzieci, dla analizowanych parametrów biochemicznych przyjęto następujące normy, obowiązujące w centralnym laboratorium szpitalnym:

- liczba leukocytów (WBC):
 - 2 – 6 lat: $4,5 \cdot 10^9/l - 13,0 \cdot 10^9/l$;
 - 7 – 12 lat: $4,0 \cdot 10^9/l - 12,0 \cdot 10^9/l$;
 - >13 lat: $4,0 \cdot 10^9/l - 10,0 \cdot 10^9/l$;
- bezwzględna liczba granulocytów obojętnochłonnych (ANC):
 - 2 – 6 lat: $1,5 \cdot 10^9/l - 7,5 \cdot 10^9/l$;
 - 7 – 12 lat: $1,5 \cdot 10^9/l - 8,0 \cdot 10^9/l$;
 - >13 lat: $2,5 \cdot 10^9/l - 5,0 \cdot 10^9/l$;
- bilirubina: 0,3 – 1,2 mg/dl;
- aminotransferaza alaninowa (AlAT):
 - 1 – 3 lat: <39 U/l;
 - 4 – 6 lat: <29 U/l;
 - 7 – 12 lat: <39 U/l;
 - 13 – 17 lat: dziewczęta <23 U/l; chłopcy <26 U/l;
 - >18 lat: kobiety do 35 U/l; mężczyźni do 50 U/l;
- aminotransferaza asparaginianowa (AspAT):
 - 1 – 3 lat: <48 U/l;
 - 4 – 6 lat: <36 U/l;
 - 7 – 12 lat: <47 U/l;
 - 13 – 17 lat: dziewczęta <25 U/l; chłopcy <29 U/l;
 - >18 lat: kobiety do 35 U/l; mężczyźni do 50 U/l;

- triglicerydy (TG):
 - 0 – 3 lat: dziewczęta 31 – 105 mg/dl;
 chłopcy 31 – 96 mg/dl;
 - 4 – 9 lat: dziewczęta 35 – 109 mg/dl;
 chłopcy 31 – 105 mg/dl;
 - 10 – 12 lat: dziewczęta 35 – 136 mg/dl;
 chłopcy 31 – 131 mg/dl;
 - 13 – 19 lat: dziewczęta 39 – 127 mg/dl;
 chłopcy 35 – 157 mg/dl;
- białko całkowite: 5,7 – 8,0 g/dl;
- albuminy: 35 – 52 g/l;
- Cl_{cr} : > 100 ml/min.

Poszczególne parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w dniu podania VP-16 (w dawkach 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.), w dniu 0 i w dniu +3 przedstawiono w Załączniku 11.4. U większości dzieci wartości parametrów biochemicznych mieściły się w zakresie wartości referencyjnych, co było wymogiem do przeprowadzenia allo-HSCT. Niektóre dzieci, u których wartości parametrów biochemicznych wykroczały poza zakres referencyjny, zostały zakwalifikowane do allo-HSCT, ponieważ wartości analizowanych parametrów nie odbiegały istotnie od zakresów referencyjnych.

4.3. OBLICZENIA I ANALIZA STATYSTYCZNA

Parametry farmakokinetyczne VP-16 obliczono w oparciu o model trójkompartamentowy na podstawie programu komputerowego TopFit 2.0. Obliczono następujące parametry farmakokinetyczne: MRT_{tot} , objętość kompartmentu centralnego (V_c), AUC, C_{max} , Cl_s , biologiczne okresy półtrwania ($t_{0,5}$) faz α , β i γ , stałe szybkości: dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do kompartmentu drugiego (k_{12}), redystrybucji leku z kompartmentu drugiego do kompartmentu centralnego (k_{21}), dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do kompartmentu trzeciego (k_{13}), redystrybucji leku z kompartmentu trzeciego do kompartmentu centralnego (k_{31}), eliminacji leku z kompartmentu centralnego (k_{10}). Otrzymaną wartość Cl_s (ml/min) normalizowano do masy (ml/min/kg) oraz do powierzchni ciała (ml/min/m²) dzieci. Wartość V_c (l) normalizowano do masy ciała dzieci (l/kg). U trojga dzieci, którym podano mniejszą dawkę VP-16, ze względu na dopuszczalną maksymalną całkowitą dawkę VP-16 wynoszącą 3600 mg (1800 mg/m²), stężenia VP-16 normalizowano do dawki 60 mg/kg m.c. Zróżnicowanie międzyosobnicze parametrów farmakokinetycznych VP-16 wyrażono jako CV (%).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w oparciu o program komputerowy Statistica 10.0 firmy StatSoft. Szczegółowe dane dotyczące liczebności grup dzieci w analizach poszczególnych parametrów przedstawiono w Tabeli 5. Dla oceny normalności rozkładu badanych zmiennych zastosowano test Shapiro-Wilka. W celu zbadania różnic pomiędzy badanymi grupami zastosowano test Manna-Whitney'a, a w przypadku uzyskania normalności rozkładu zastosowano test t-Studenta lub test Cochran-Coxa w przypadku nierówności wariancji. Korelacje badano testem Spearmana, natomiast dla par zmiennych o rozkładzie normalnym obliczano współczynnik korelacji Pearsona. Aby sprawdzić dane pod względem jakościowym (różnice w liczebnościach grup) zastosowano test χ^2 Pearsona. pLFS obliczono dla 29 dzieci przy pomocy metody Kaplana-Meiera. Test log-rank zastosowano w celu porównania rozkładu pLFS w dwóch grupach (dzieci będących w CR1 lub CR2, dzieci z oznaczalnym lub nieoznaczalnym stężeniem VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT). Jako poziom istotności przyjęto wartość $p < 0,05$.

Tabela 5. Liczebności grup dzieci w zależności od analizowanego parametru (dawka VP-16: 60 mg/kg m.c.)

Parametr	Analizowano	Wyłączono	Uwagi dotyczące dzieci wyłączonych z analizy
parametry farmakokinetyczne VP-16	31 (100%)	0 (0%)	–
stężenie leku wolnego	29 (94%)	2 (6%)	za mała objętość osocza do oznaczenia stężenia leku wolnego
leki przeciwwgrzybicze	24 (77%)	7 (23%)	brak informacji dotyczących leków podawanych wspólnie z VP-16
przyjęcie przeszczepu	29 (94%)	2 (6%)	brak przyjęcia przeszczepu
rekonstytucja granulopoezy	29 (94%)	2 (6%)	brak przyjęcia przeszczepu
rekonstytucja płytkotworzenia	26 (84%)	5 (16%)	brak przyjęcia przeszczepu (n = 2); nie uzyskano danych (n = 3)
rekonstytucja granulopoezy w zależności od CR	28 (90%)	3 (10%)	CR3 (n = 1); brak przyjęcia przeszczepu (n = 2);
rekonstytucja płytkotworzenia w zależności od CR	25 (81%)	6 (19%)	CR3 (n = 1); brak przyjęcia przeszczepu (n = 2); nie uzyskano danych (n = 3)
rekonstytucja granulopoezy a stężenie leku wolnego	27 (87%)	4 (13%)	brak przyjęcia przeszczepu (n = 2); nie oznaczono stężenia leku wolnego (n = 2)
rekonstytucja płytkotworzenia a stężenie leku wolnego	24 (77%)	7 (23%)	brak przyjęcia przeszczepu (n = 2); nie oznaczono stężenia leku wolnego (n = 2); nie uzyskano danych (n = 3)
wznowa ALL	29 (94%)	2 (6%)	brak przyjęcia przeszczepu
pLFS	29 (94%)	2 (6%)	brak przyjęcia przeszczepu
pLFS w zależności od CR	28 (90%)	3 (10%)	CR3 (n = 1); brak przyjęcia przeszczepu (n = 2)
wczesna toksyczność narządowa związana z kondycjonowaniem	31 (100%)	0 (0%)	–

O przyjęciu przeszczepu allogenicznych komórek krwiotwórczych świadczy ANC równa lub większa 500 w 1 μl krwi ($0,5 \cdot 10^9/\text{l}$) przez 3 kolejne dni i/lub liczba krwinek płytkowych równa lub większa 20 000 w 1 μl krwi ($20 \cdot 10^9/\text{l}$) utrzymująca się przez co najmniej 3 kolejne dni bez przetoczeń koncentratu płytek krwi przez ostatnich 7 dni [6, 123].

4.3.1. Ocena stopnia nasilenia wczesnej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem

Do dnia +100 analizowano toksyczność narządową związaną ze stosowanym kondycjonowaniem przed allo-HSCT, spośród której najczęściej występującą jest mucositis [124].

Zgodnie z definicjami WHO oraz amerykańskimi kryteriami „Common Terminology Criteria” Adverse Events National Cancer Institute (NCI CTC) przyjęto następujące kryteria oceny stopnia nasilenia mucositis:

- stopień I mucositis definiowany jest jako pieczenie i rumień (definicja WHO) lub bezbolesne owrzodzenia, rumień lub umiarkowane pieczenie, bez owrzodzeń (definicja NCI CTC);
- przy stopniu II mucositis występuje rumień lub owrzodzenia, a chory może jeść stałe pokarmy (definicja WHO), mucositis w stopniu II towarzyszy ból (definicja NCI CTC);
- stopień III mucositis to owrzodzenia, a chory może pić (definicja WHO) lub rumień, obrzęk lub owrzodzenia, a chory wymaga nawodnienia dożylnego (definicja NCI CTC);
- stopień IV mucositis wymaga żywienia pozajelitowego [102].

Zgodnie z definicjami WHO oraz NCI CTC do analizy statystycznej przyjęto podział dzieci na dwie grupy: dzieci, u których nie wystąpiło mucositis lub wystąpiło mucositis w stopniu I lub I/II (dzieci bez mucositis; $n = 18$) oraz dzieci, u których mucositis wystąpiło w stopniu II lub III (dzieci z mucositis; $n = 13$) ze względu na konieczność stosowania analgetyków w tej grupie dzieci [102].

5. WYNIKI

5.1. STĘŻENIA VP-16

Stężenia VP-16 oznaczone u 31 dzieci, którym podano lek w 4-godzinnym wlewie dożylnym w dawce 60 mg/kg m.c., charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem międzyosobniczym. Stężenia VP-16 oznaczone przed końcem wlewu wynosiły od 131,6 µg/ml do 347,0 µg/ml (Tab. 6). Spośród 19 dzieci, którym pobrano próbkę krwi 120 godzin po zakończeniu wlewu, VP-16 był oznaczalny u 7 dzieci (37%), a stężenia zmieniały się od 0,1 µg/ml do 0,5 µg/ml (średnia ± SD: 0,3 µg/ml ± 0,1 µg/ml).

Tabela 6. Stężenia VP-16 do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci przygotowywanych do allo-HSCT (D = 60 mg/kg m.c., n = 31)

	koniec wlewu	0,25 h^a	0,5 h^a	0,75 h^a	1 h^a	2 h	4 h	8 h
średnia [µg/ml]	195,3	175,2	162,2	158,4	136,0	122,0	92,2	43,2
SD [µg/ml]	52,2	36,7	31,5	33,1	31,8	36,9	27,3	18,8
min [µg/ml]	131,6	131,3	126,3	107,9	93,6	62,8	49,6	12,7
max [µg/ml]	347,0	231,2	214,7	203,6	192,0	223,6	162,3	85,8
CV [%]	26,7	21,0	19,4	20,9	23,4	30,2	29,6	43,6
	24 h	48 h	60 h^b	72 h	96 h	120 h^b		
średnia [µg/ml]	5,0	0,8	0,6	0,4	0,1	0,1		
SD [µg/ml]	3,7	0,6	0,5	0,4	0,2	0,1		
min [µg/ml]	0,6	0,14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ		
max [µg/ml]	12,6	2,4	1,8	1,5	0,9	0,5		
CV [%]	73,7	71,0	82,6	101,4	160,85	150,4		

^a pobierano dzieciom (n = 7), u których allo-HSCT wykonano w latach 1999-2001

^b pobierano u większości dzieci (n = 19), u których allo-HSCT wykonano w latach 2008-2011

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Stężenia VP-16 oznaczone u trojga dzieci, którym podano lek w dawce 40 mg/kg m.c. oraz u dwojga dzieci, którym lek podano w dawce 30 mg/kg m.c. przedstawiono odpowiednio w Tabelach 7 i 8.

Tabela 7. Stężenia VP-16 do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci przygotowywanych do allo-HSCT (D = 40 mg/kg m.c., n = 3)

	koniec wlewu	2 h	4 h	8 h	24 h
średnia [µg/ml]	215,5	73,5	44,4	16,8	4,2
SD [µg/ml]	136,6	31,7	25,7	14,7	4,9
min [µg/ml]	88,0	41,9	25,1	5,1	1,3
max [µg/ml]	359,7	105,3	73,6	33,3	9,9
CV [%]	63,4	43,2	58,0	87,7	116,8
	48 h	60 h	72 h	96 h	120 h
średnia [µg/ml]	0,9	–	0,4	–	<LOQ
SD [µg/ml]	0,6	–	0,3	–	<LOQ
min [µg/ml]	0,4	<LOQ	0,2	<LOQ	<LOQ
max [µg/ml]	1,6	0,6	0,6	0,6	<LOQ
CV [%]	68,6	–	79,1	–	<LOQ

Wartości poszczególnych stężeń w czasie do 120 godzin po zakończeniu wlewu oznaczone u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c. przedstawiono w Załączniku 11.5 w Tabelach 1-3.

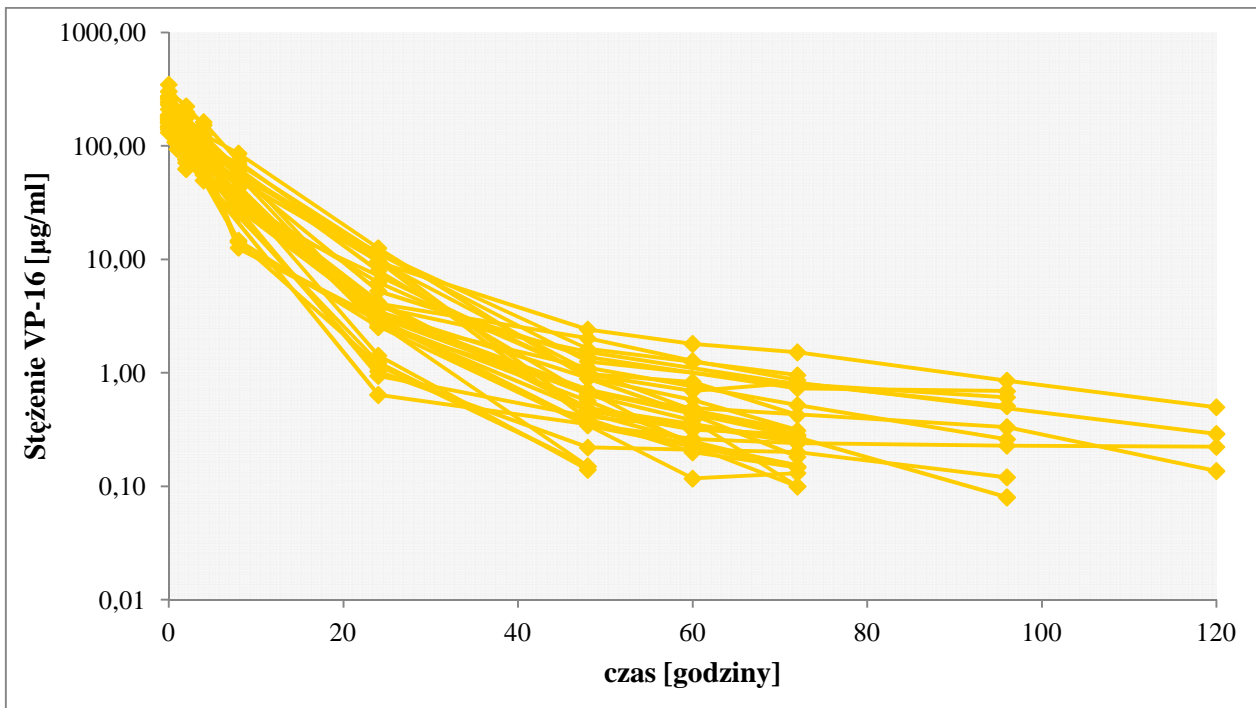
Tabela 8. Stężenia VP-16 do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci przygotowywanych do allo-HSCT (D = 30 mg/kg m.c., n = 2)

	koniec wlewu	0,25 h^a	0,5 h^a	0,75 h^a	1 h^a	2 h	4 h	8 h
średnia [µg/ml]	90,3	93,7	92,5	86,0	69,2	60,3	39,5	23,6
SD [µg/ml]	–	–	–	–	–	15,8	15,4	21,6
min [µg/ml]	–	–	–	–	–	49,2	28,6	8,3
max [µg/ml]	–	–	–	–	–	71,5	50,3	38,9
CV [%]	–	–	–	–	–	26,2	38,9	91,8
	24 h	48 h	60 h^b	72 h	96 h	120 h^b		
średnia [µg/ml]	2,4	–	–	–	<LOQ	<LOQ		
SD [µg/ml]	3,0	–	–	–	<LOQ	<LOQ		
min [µg/ml]	0,3	–	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ		
max [µg/ml]	4,5	0,1	0,2	0,1	<LOQ	<LOQ		
CV [%]	122,2	–	–	–	<LOQ	<LOQ		

^a pobierano u dziecka, u którego allo-HSCT wykonano w 2000 r.

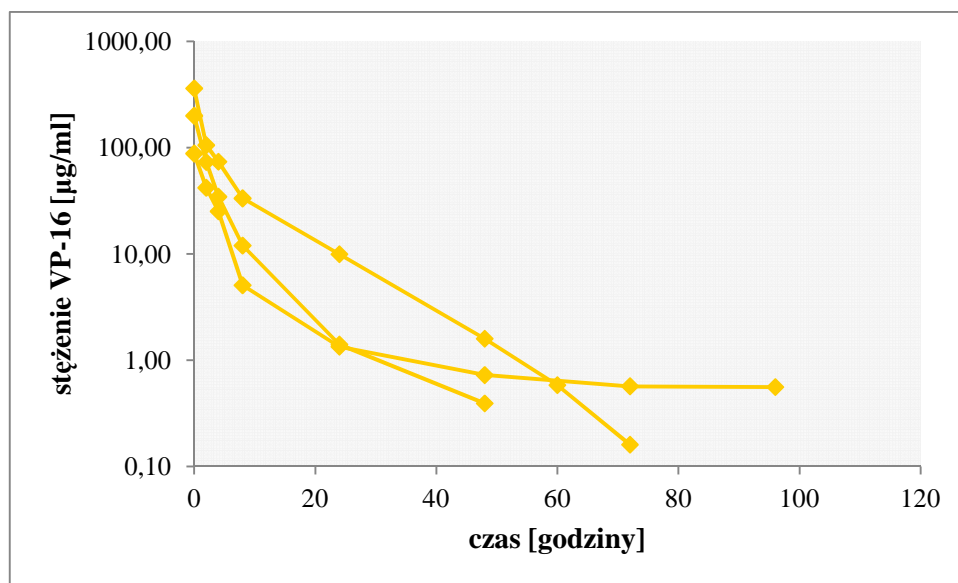
^b pobierano u dziecka, u którego allo-HSCT wykonano w 2009 r.

Stężenia VP-16 obrazujące eliminację leku do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci, którym podano VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. (n = 31) przedstawiono na Ryc. 4. Dla tych dzieci współczynniki α , β i γ , będące wartościami nachylenia poszczególnych krzywych obrazujących model trójkompartmentowy tj. dystrybucję leku do kompartmentu tkankowego (α), eliminację leku zachodzącą po ustaleniu się stanu stacjonarnego (β) oraz powolne uwalnianie leku z głębiej położonych tkanek (γ) wynosiły odpowiednio $5,85 \text{ 1/h} \pm 3,66 \text{ 1/h}$, $0,203 \text{ 1/h} \pm 0,074 \text{ 1/h}$ oraz $0,0386 \text{ 1/h} \pm 0,0242 \text{ 1/h}$.



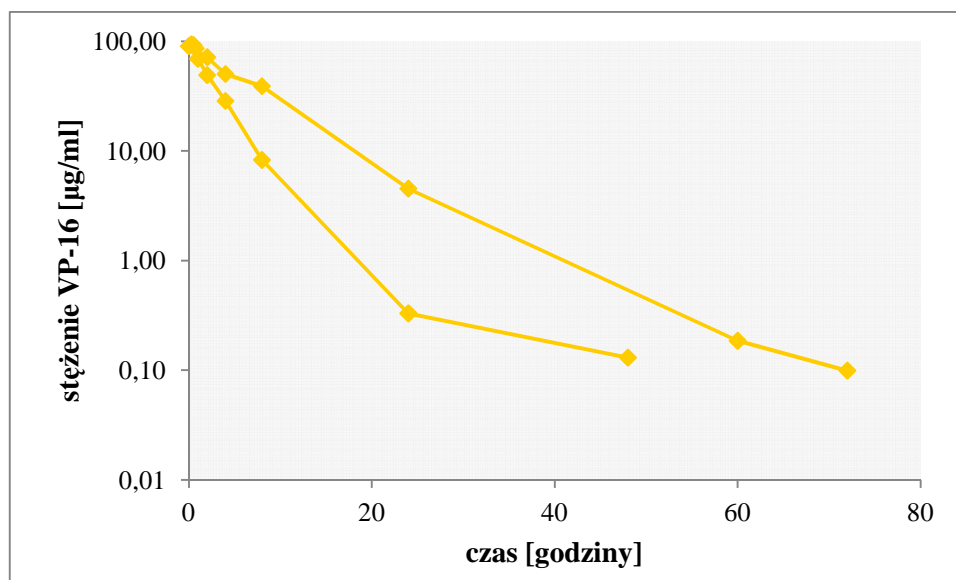
Ryc. 4. Stężenia VP-16 do 120 godzin po zakończeniu wlewu (D = 60 mg/kg m.c., n = 31).

U dzieci, którym podano VP-16 w dawce 40 mg/kg m.c. (n = 3) stężenia VP-16 obrazujące eliminację leku obserwowano do 96 godzin po zakończeniu wlewu (Ryc. 5), a wartości współczynników α , β i γ wynosiły odpowiednio $9,36 \text{ 1/h} \pm 6,14 \text{ 1/h}$, $0,427 \text{ 1/h} \pm 0,111 \text{ 1/h}$ oraz $0,0486 \text{ 1/h} \pm 0,0357 \text{ 1/h}$.



Ryc. 5. Stężenia VP-16 do 96 godzin po zakończeniu wlewu (D = 40 mg/kg m.c., n = 3).

U dzieci, którym podano VP-16 w dawce 30 mg/kg m.c. ($n = 2$) stężenia VP-16 obrazujące eliminację leku obserwowano do 72 godzin po zakończeniu wlewu (Ryc. 6), a wartości współczynników α , β i γ wynosiły odpowiednio $3,33 \text{ 1/h} \pm 2,86 \text{ 1/h}$, $0,222 \text{ 1/h} \pm 0,119 \text{ 1/h}$ oraz $0,0448 \text{ 1/h} \pm 0,0202 \text{ 1/h}$.



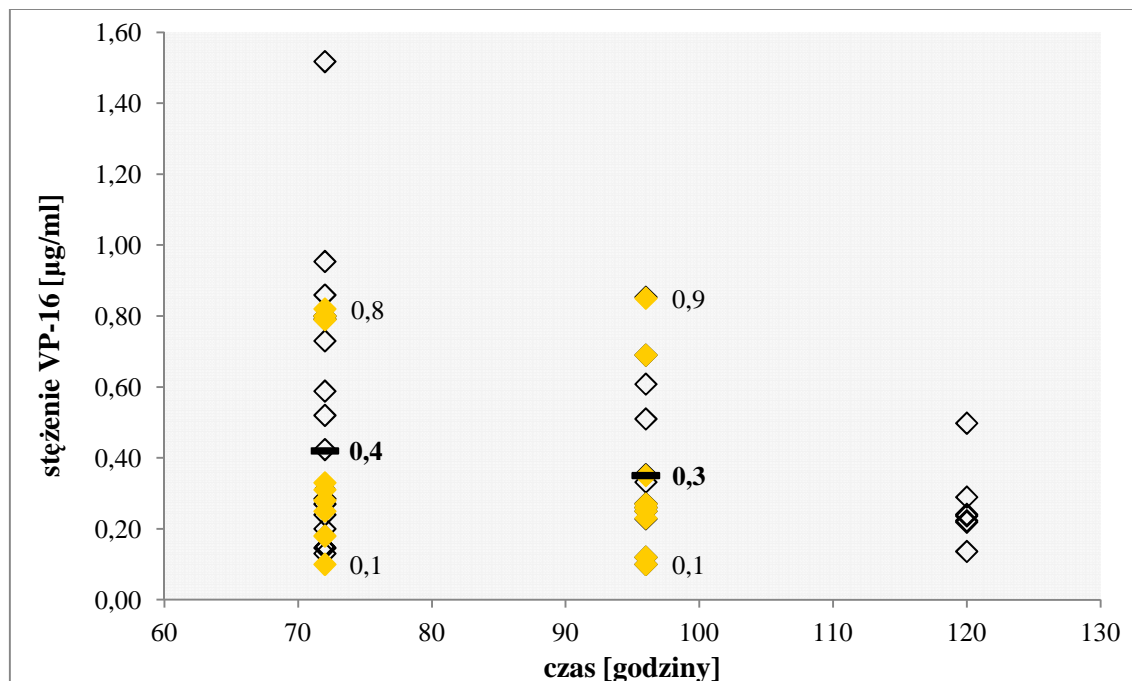
Ryc. 6. Stężenia VP-16 do 72 godzin po zakończeniu wlewu ($D = 30 \text{ mg/kg m.c.}$, $n = 2$).

5.1.1. Stężenia VP-16 w dniu allo-HSCT

W grupie dzieci, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c., u 26 dzieci (84%) VP-16 był obecny w osoczu w stężeniach od $0,1 \text{ µg/ml}$ do $1,5 \text{ µg/ml}$ (średnia \pm SD: $0,4 \text{ µg/ml} \pm 0,4 \text{ µg/ml}$) 72 godziny po zakończeniu wlewu, czyli w dniu, w którym kolejne wersje protokołu ALL-SCT BFM-I [38] zakładają przeprowadzenie allo-HSCT. U jednego dziecka nie udało się uzyskać próbki krwi 72 godziny po zakończeniu wlewu, jednak w próbce zebranej 96 godzin po zakończeniu wlewu stężenie VP-16 było oznaczalne. Z tego powodu do obliczeń przyjęto, że stężenie VP-16 72 godziny po zakończeniu wlewu nie może być niższe niż oznaczone 96 godzin po zakończeniu wlewu. W próbkach krwi pobranych 96 godzin po zakończeniu wlewu, VP-16 był obecny w osoczu 12 dzieci (39%) w stężeniach od $0,1 \text{ µg/ml}$ do $0,9 \text{ µg/ml}$ (średnia \pm SD: $0,4 \text{ µg/ml} \pm 0,2 \text{ µg/ml}$).

W dniu allo-HSCT VP-16 był obecny we krwi 19 dzieci (średnia \pm SD: $0,4 \text{ µg/ml} \pm 0,3 \text{ µg/ml}$). VP-16 w stężeniach od $0,1 \text{ µg/ml}$ do $0,8 \text{ µg/ml}$ (średnia \pm SD: $0,4 \text{ µg/ml} \pm 0,3 \text{ µg/ml}$) był obecny u 10 dzieci, u których allo-HSCT przeprowadzono

3 dni po podaniu VP-16 oraz w stężeniach od 0,1 µg/ml do 0,9 µg/ml (średnia ± SD: 0,3 µg/ml ± 0,3 µg/ml) u 9 dzieci, u których allo-HSCT przeprowadzono 4 dni po podaniu VP-16 (Ryc. 7).



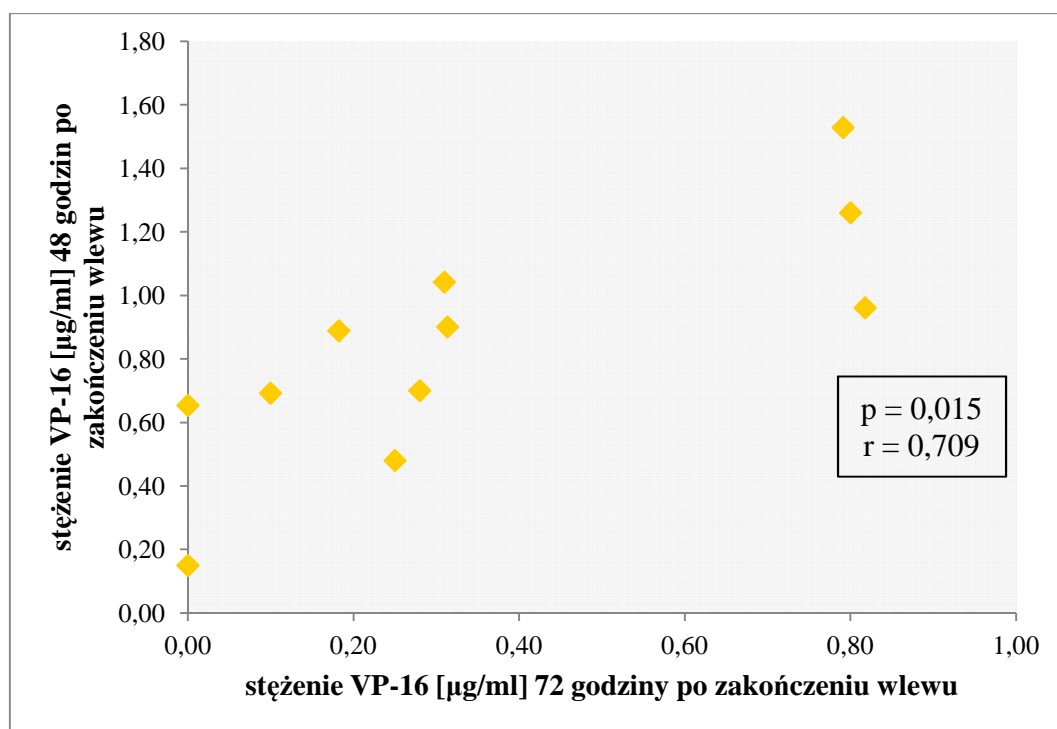
Ryc. 7. Stężenia VP-16 w czasie 72, 96 i 120 godzin po zakończeniu wlewu (◇) oraz w dniu allo-HSCT (◆) wraz ze średnim stężeniem, oznaczonym linią poziomą (—), w dniu allo-HSCT (D = 60 mg/kg m.c.).

Spośród trojga dzieci, którym podano VP-16 w dawce 40 mg/kg m.c., w próbkach pobranych 72 godziny po zakończeniu wlewu, VP-16 był obecny w osoczu dwojga dzieci w stężeniu 0,2 µg/ml i 0,6 µg/ml oraz u jednego dziecka w próbce pobranej 96 godzin po zakończeniu wlewu, czyli w dniu allo-HSCT w stężeniu 0,6 µg/ml.

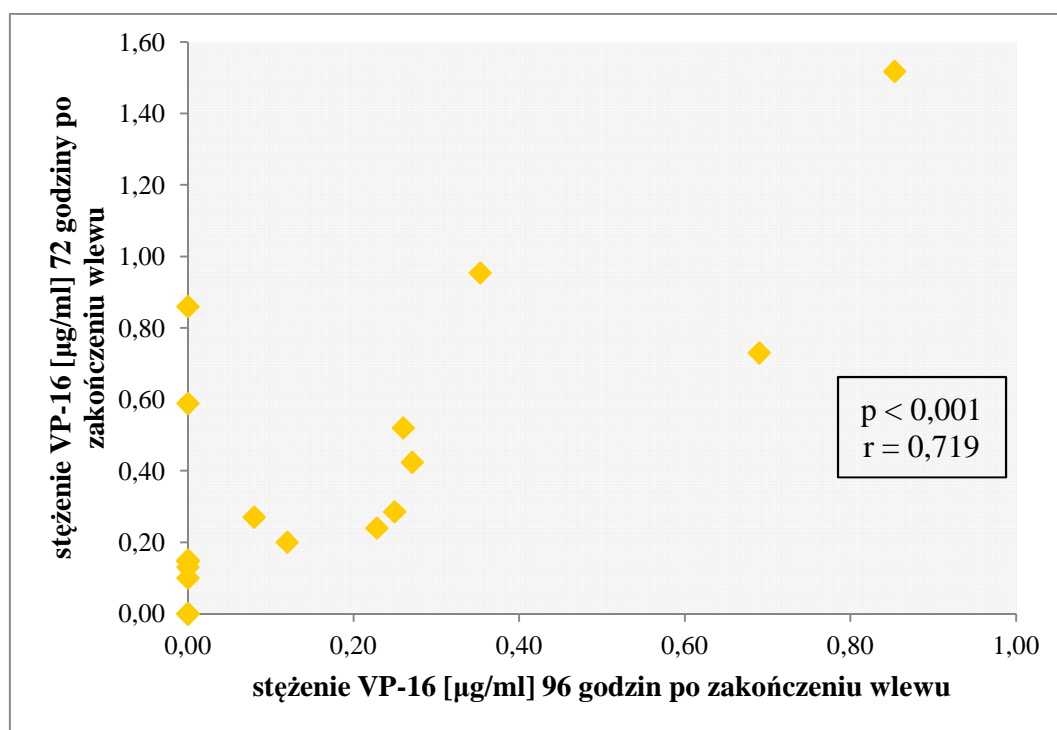
Spośród dwojga dzieci, którym VP-16 podano w dawce 30 mg/kg m.c., w próbkach pobranych 72 godziny po zakończeniu wlewu, VP-16 był obecny w osoczu jednego dziecka w stężeniu 0,1 µg/ml. U obojga dzieci allo-HSCT przeprowadzono w czwartym dniu po podaniu VP-16. U tych dzieci VP-16 był nieoznaczalny w dniu allo-HSCT.

Dla sprawdzenia, czy oznaczenie stężenia VP-16 24 godziny przed planowaną allo-HSCT pozwala prognozować stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT podjęto próbę korelacji stężeń oznaczonych 24 godziny przed planowaną allo-HSCT (stężenia oznaczone 48 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci, którym VP-16 podano w dobie -3 oraz stężenia oznaczone 72 godziny po zakończeniu wlewu u dzieci, którym VP-16 podano w dobie -4) ze stężeniami w dniu allo-HSCT w grupie dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c.

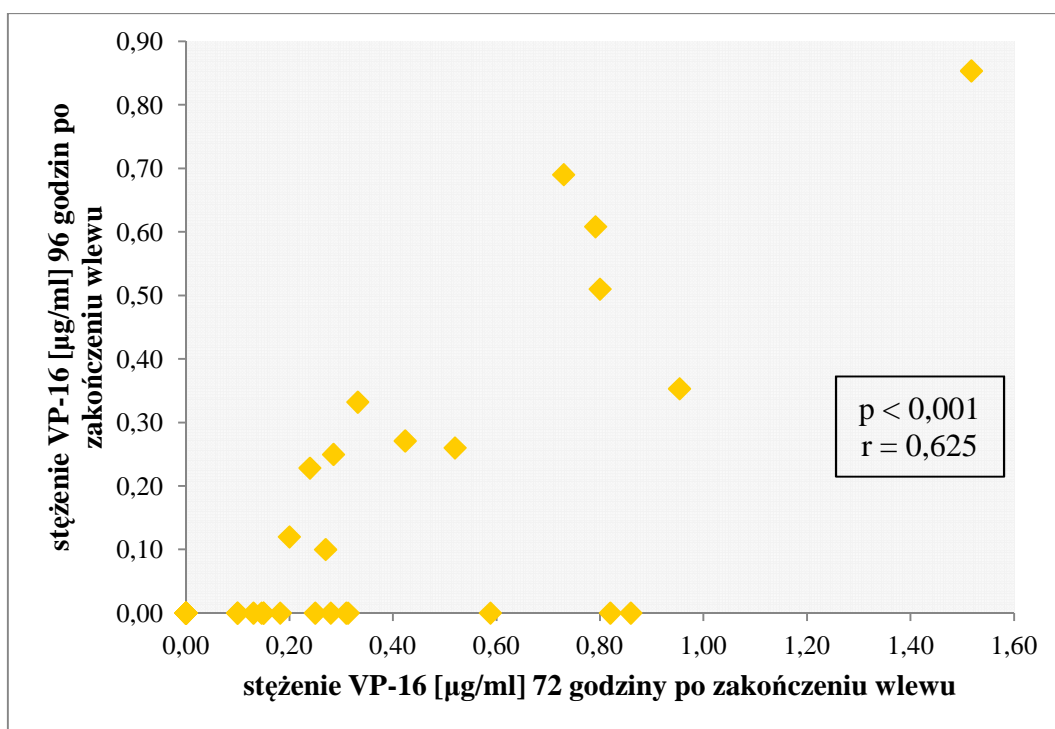
U dzieci, którym VP-16 podano w dniu -3 przed allo-HSCT, stężenia leku oznaczone 48 godzin po zakończeniu wlewu korelowały istotnie ze stężeniami w dniu allo-HSCT, czyli 72 godziny po zakończeniu wlewu ($p = 0,015$; Ryc. 8). W grupie dzieci, którym VP-16 podano w dniu -4 przed allo-HSCT, stężenia leku oznaczone 72 godziny po zakończeniu wlewu wykazywały istotną korelację ze stężeniem w dniu allo-HSCT, czyli 96 godzin po zakończeniu wlewu ($p < 0,001$; Ryc. 9). W całej badanej grupie dzieci stężenia VP-16 oznaczone 72 godziny po zakończeniu wlewu wykazywały istotną korelację ze stężeniami oznaczonymi 96 godzin po zakończeniu wlewu ($p < 0,001$; Ryc. 10).



Ryc. 8. Korelacja stężeń VP-16 oznaczonych 48 godzin po zakończeniu wlewu ze stężeniami VP-16 w dniu allo-HSCT (72 godziny po zakończeniu wlewu) dla dzieci, którym VP-16 podano w dniu -3 ($n = 11$).



Ryc. 9. Korelacja stężeń VP-16 oznaczonych 72 godziny po zakończeniu wlewu ze stężeniami VP-16 w dniu allo-HSCT (96 godziny po zakończeniu wlewu) dla dzieci, którym VP-16 podano w dniu -4 ($n = 20$).



Ryc. 10. Korelacja stężeń VP-16 oznaczonych 72 godziny po zakończeniu wlewu ze stężeniami VP-16 oznaczonymi 96 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci biorących udział w badaniu (n = 31).

5.1.2. Stężenie i procent leku wolnego

Lek wolny oznaczono u 29 dzieci wyłącznie w próbkach krwi pobranych przed zakończeniem wlewu. Stężenie leku wolnego w osoczu dzieci otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. charakteryzowało się dużym zróżnicowaniem i wynosiło od 2,8 µg/ml do 67,00 µg/ml, a procent leku wolnego zmieniał się od 1,6% do 39,9% (Tab. 9).

Tabela 9. Wyniki oznaczeń leku wolnego (dawka VP-16: 60 mg/kg m.c.) w próbkach pobranych przed zakończeniem wlewu (n = 29)

	Stężenie leku przed zakończeniem wlewu [µg/ml]		Lek wolny
	całkowitego	wolnego	%
średnia	186,7	20,5	10,8
SD	42,0	19,2	9,8
min	131,6	2,8	1,6
max	302,0	67,0	39,9
CV [%]	22,5	93,3	91,0

Wartości stężeń leku wolnego i procent leku wolnego oznaczony w próbce pobranej przy zakończeniu wlewu u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. przedstawiono w Załączniku 11.5 w Tabeli 1.

5.2. PARAMETRY FARMAKOKINETYCZNE VP-16

Wartości m.in. $t_{0,5 \alpha}$ i Cl_s normalizowanego do masy i powierzchni ciała, jak również AUC i C_{max} oraz stałych opisujących szybkość dystrybucji VP-16 pomiędzy kompartmentami wykazywały duże zróżnicowanie. Wartości $t_{0,5}$ fazy γ , opisującej eliminację leku z głębokiego, tkankowego kompartmentu, mieściły się w granicach od 7,2 godzin do 107,0 godzin (średnia 28,3 godzin). W Tabeli 10 przedstawiono parametry farmakokinetyczne VP-16 obliczone dla 31 dzieci otrzymujących lek w dawce 60 mg/kg m.c.

Tabela 10. Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci przygotowywanych do allo-HSCT (D = 60 mg/kg m.c., n = 31)

	MRT _{tot} [h]	V _c [l/kg]	Cl _s [ml/min/kg]	Cl _s [ml/min/m ²]	AUC [µg/ml·h]	C _{max} [µg/ml]	t _{0,5 α} [h]
średnia	9,3	0,31	1,07	33,8	1043,4	207,8	0,265
SD	3,3	0,07	0,38	10,2	345,1	61,8	0,417
min	4,5	0,15	0,53	16,9	538,0	138,0	0,046
max	16,4	0,43	1,86	61,7	1890,0	395,0	2,190
mediana	8,0	0,32	0,99	31,1	1010,0	188,0	0,136
CV [%]	35,4	23,0	35,1	30,3	33,1	29,7	157,1
	t _{0,5 β} [h]	t _{0,5 γ} [h]	k ₁₂ [1/h]	k ₂₁ [1/h]	k ₁₃ [1/h]	k ₃₁ [1/h]	k ₁₀ [1/h]
średnia	3,84	28,3	0,9022	4,912	0,0220	0,044	0,219
SD	1,29	21,7	1,7347	2,935	0,0205	0,029	0,108
min	1,83	7,2	0,0000	0,266	0,0032	0,007	0,116
max	6,07	107,0	8,3200	11,400	0,0880	0,107	0,699
mediana	3,49	26	0,0981	4,350	0,0160	0,030	0,189
CV [%]	33,5	76,6	192,3	59,8	93,1	65,2	49,1

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci, którym podano dawkę 40 mg/kg m.c. charakteryzowały się większym zróżnicowaniem międzyosobniczym niż u dzieci, którym podano dawkę 60 mg/kg m.c. (Tab. 11).

Tabela 11. Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci przygotowywanych do allo-HSCT (D = 40 mg/kg m.c., n = 3)

	MRT_{tot} [h]	V_c [l/kg]	Cl_s [ml/min/kg]	Cl_s [ml/min/m ²]	AUC [μ g/ml·h]	C_{max} [μ g/ml]	$t_{0,5 \alpha}$ [h]
średnia	16,1	0,25	1,29	29,8	649,0	226,2	0,129
SD	14,4	0,17	0,64	10,1	411,7	148,8	0,129
min	6,1	0,11	0,60	19,4	358,0	91,6	0,049
max	32,6	0,44	1,86	39,6	1120,0	386,0	0,278
mediana	9,6	0,20	1,42	30,4	469,0	201,0	0,0616
CV [%]	89,3	68,3	49,7	34,0	63,4	65,8	99,6
	$t_{0,5 \beta}$ [h]	$t_{0,5 \gamma}$ [h]	k_{12} [1/h]	k_{21} [1/h]	k_{13} [1/h]	k_{31} [1/h]	k_{10} [1/h]
średnia	1,69	27,6	2,9444	6,243	0,1814	0,103	0,338
SD	0,39	29,2	2,5547	3,524	0,1477	0,112	0,086
min	1,26	8,4	0,0031	2,490	0,0702	0,017	0,256
max	2,03	61,3	4,6100	9,480	0,3490	0,230	0,428
mediana	1,79	13,2	4,22	6,760	0,1250	0,063	0,329
CV [%]	23,3	105,8	86,8	56,4	81,4	108,5	25,6

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci, którym podano dawkę 30 mg/kg m.c. charakteryzowały się podobnym zróżnicowaniem międzyosobniczym jak u dzieci, którym podano dawkę 60 mg/kg m.c. (Tab. 12).

Tabela 12. Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci przygotowywanych do allo-HSCT (D = 30 mg/kg m.c., n = 2)

	MRT_{tot} [h]	V_c [l/kg]	Cl_s [ml/min/kg]	Cl_s [ml/min/m ²]	AUC [µg/ml·h]	C_{max} [µg/ml]	t_{0,5 α} [h]
średnia	6,9	0,31	1,15	32,0	519,5	96,7	0,329
SD	2,5	0,02	0,65	6,9	294,9	6,1	0,283
min	5,1	0,30	0,69	27,2	311,0	92,4	0,129
max	8,7	0,33	1,61	36,9	728,0	101,0	0,529
mediana	6,9	0,31	1,15	32,0	519,5	96,7	0,329
CV [%]	36,4	6,1	56,6	21,5	56,8	6,3	86,0
	t_{0,5 β} [h]	t_{0,5 γ} [h]	k₁₂ [1/h]	k₂₁ [1/h]	k₁₃ [1/h]	k₃₁ [1/h]	k₁₀ [1/h]
średnia	3,65	17,2	0,0521	3,260	0,0112	0,048	0,226
SD	1,94	7,8	0,0720	2,956	0,0073	0,023	0,139
min	2,27	11,7	0,0012	1,170	0,0060	0,032	0,127
max	5,02	22,7	0,1030	5,350	0,0163	0,064	0,324
mediana	3,65	17,2	0,05212	3,260	0,0112	0,048	0,226
CV [%]	53,3	45,2	138,1	90,7	65,0	47,1	61,8

Wartości poszczególnych parametrów farmakokinetycznych VP-16 wyznaczone dla dzieci, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c. zamieszczono w Załączniku 11.6 w Tabelach 1-3.

5.2.1. Korelacje pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi VP-16

Korelacje pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi VP-16 obrazującymi dystrybucję i ekspozycję organizmu na lek (AUC, C_{max} , V_c) a pozostałymi parametrami farmakokinetycznymi przedstawiono w Tabeli 13. Obserwowano dodatnie korelacje AUC VP-16 z MRT_{tot} , C_{max} oraz $t_{0,5\beta}$ oraz ujemne z Cl_s normalizowanym do masy jak i powierzchni ciała oraz ze stałymi k_{13} i k_{10} . Korelacja ze stałą k_{12} była na granicy istotności statystycznej ($p = 0,051$). C_{max} VP-16 korelowało ujemnie z Cl_s normalizowanym do masy ciała i z V_c , która korelowała dodatnio z Cl_s normalizowanym do masy ciała dzieci.

Tabela 13. Korelacje AUC, C_{max} i V_c VP-16 z pozostałymi parametrami farmakokinetycznymi leku

Parametr	AUC [$\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$]		C_{max} [$\mu\text{g/ml}$]		V_c [l/kg]	
	r	poziom p	r	poziom p	r	poziom p
MRT_{tot} [h]	0,410 ^a	0,022	-0,131	0,484	-0,008 ^a	0,966
C_{max} [$\mu\text{g/ml}$]	0,386	0,032	-	-	-0,992	0,000
V_c [l/kg]	-0,335 ^a	0,066	-0,993	0,000	-	-
Cl_s [ml/min/kg]	-0,998	0,000	-0,392	0,029	0,363	0,045
Cl_s [ml/min/m ²]	-0,846	0,000	-0,193	0,298	0,169	0,365
AUC [$\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$]	-	-	0,386	0,032	-0,335 ^a	0,066
$t_{0,5\alpha}$ [h]	0,146	0,434	-0,003	0,986	0,015	0,937
$t_{0,5\beta}$ [h]	0,629 ^a	0,000	-0,172	0,355	0,134 ^a	0,471
$t_{0,5\gamma}$ [h]	0,122	0,515	-0,042	0,822	0,010	0,958
k_{12} [1/h]	-0,354	0,051	-0,049	0,795	0,026	0,890
k_{21} [1/h]	-0,082 ^a	0,661	-0,076	0,683	0,051 ^a	0,784
k_{13} [1/h]	-0,515	0,003	0,118	0,527	-0,143	0,443
k_{31} [1/h]	-0,135	0,469	0,023	0,901	0,006	0,976
k_{10} [1/h]	-0,750	0,000	0,243	0,188	-0,277	0,131

^a test Pearsona

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Korelacje pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi VP-16 obrazującymi jego eliminację (MRT_{tot} , $t_{0,5 \beta}$, $t_{0,5 \gamma}$, Cl_s) a pozostałymi parametrami farmakokinetycznymi przedstawiono w Tabeli 14. Oprócz opisanych wyżej korelacji, MRT_{tot} VP-16 korelował dodatnio z $t_{0,5 \beta}$ i γ oraz ujemnie z Cl_s normalizowanym do masy, jak i powierzchni ciała i ze stałymi k_{31} i k_{10} . Obserwowano dodatnią korelację $t_{0,5 \beta}$ z MRT_{tot} oraz ujemną z Cl_s normalizowanym do masy, jak i powierzchni ciała oraz ze stałymi k_{13} i k_{10} . Dla $t_{0,5 \gamma}$ obserwowano dodatnią korelację z MRT_{tot} i ujemną ze stałą k_{31} . Wartości Cl_s normalizowane zarówno do masy, jak i powierzchni ciała korelowały dodatnio ze stałymi k_{13} i k_{10} oraz ujemnie z MRT_{tot} , AUC oraz $t_{0,5 \beta}$. Cl_s normalizowany do masy ciała korelował dodatnio z Cl_s normalizowanym do powierzchni ciała.

Tabela 14. Korelacje MRT , $t_{0,5 \beta}$, $t_{0,5 \gamma}$ oraz Cl_s VP-16 z pozostałymi parametrami farmakokinetycznymi leku

Parametr	MRT_{tot} [h]		$t_{0,5 \beta}$ [h]		$t_{0,5 \gamma}$ [h]		Cl_s [ml/min/kg]		Cl_s [ml/min/m ²]	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
MRT_{tot} [h]	-	-	0,537 ^a	0,002	0,753	0,000	-0,391	0,030	-0,473	0,007
C_{max} [µg/ml]	-0,131	0,484	-0,172	0,355	-0,042	0,822	-0,392	0,029	-0,193	0,298
V_c [l/kg]	-0,008 ^a	0,966	0,134 ^a	0,471	0,010	0,958	0,363	0,045	0,169	0,365
Cl_s [ml/min/kg]	-0,391	0,030	-0,631	0,000	-0,119	0,524	-	-	0,841	0,000
Cl_s [ml/min/m ²]	-0,473	0,007	-0,659	0,000	-0,164	0,379	0,841	0,000	-	-
AUC [µg/ml·h]	0,410 ^a	0,022	0,629 ^a	0,000	0,122	0,515	-0,998	0,000	-0,846	0,000
$t_{0,5 \alpha}$ [h]	0,096	0,606	0,076	0,684	0,232	0,209	-0,126	0,500	-0,086	0,646
$t_{0,5 \beta}$ [h]	0,537 ^a	0,002	-	-	0,304	0,096	-0,631	0,000	-0,659	0,000
$t_{0,5 \gamma}$ [h]	0,753	0,000	0,304	0,096	-	-	-0,119	0,524	-0,164	0,379
k_{12} [1/h]	0,103	0,580	0,084	0,652	0,196	0,290	0,346	0,057	0,238	0,197
k_{21} [1/h]	-0,209 ^a	0,259	-0,141 ^a	0,448	-0,309	0,091	0,026	0,890	-0,010	0,959
k_{13} [1/h]	0,042	0,822	-0,658	0,000	0,006	0,974	0,516	0,003	0,512	0,003
k_{31} [1/h]	-0,748	0,000	-0,331	0,069	-0,995	0,000	0,132	0,479	0,170	0,361
k_{10} [1/h]	-0,443	0,012	-0,790	0,000	-0,093	0,620	0,746	0,000	0,761	0,000

^a test Pearsona

Korelacje stężeń VP-16 oznaczonych 72 i 96 godzin po zakończeniu wlewu oraz w dniu allo-HSCT (72 godziny po zakończeniu wlewu dla 11 dzieci lub 96 godzin po zakończeniu wlewu dla 20 dzieci) z parametrami farmakokinetycznymi VP-16 przedstawiono w Tabeli 15. Stężenie VP-16 oznaczone 72 godziny po zakończeniu wlewu korelowało dodatnio z MRT_{tot} , AUC, $t_{0,5 \gamma}$ oraz ujemnie z Cl_s normalizowanym do masy ciała i ze stałą k_{31} . Korelacja z Cl_s normalizowanym do powierzchni ciała była bliska istotności statystycznej ($p = 0,055$). Stężenie VP-16 oznaczone 96 godzin po zakończeniu wlewu korelowało dodatnio z MRT_{tot} , $t_{0,5 \alpha}$ i γ oraz ujemnie ze stałymi k_{21} i k_{31} . Stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT korelowało dodatnio z MRT_{tot} , AUC i $t_{0,5 \gamma}$ oraz ujemnie z Cl_s normalizowanym do masy ciała ze stałą k_{31} .

Tabela 15. Korelacje parametrów farmakokinetycznych VP-16 ze stężeniami leku w 72, 96 godzinie po zakończeniu wlewu oraz w dniu allo-HSCT

Parametr	Stężenie VP-16 [$\mu\text{g/ml}$]					
	72 godzina		96 godzina		dzień allo-HSCT	
	r	poziom p	r	poziom p	r	poziom p
MRT_{tot} [h]	0,780	0,000	0,666	0,000	0,614	0,000
V_c [l/kg]	-0,136	0,466	-0,262	0,154	-0,209	0,259
Cl_s [ml/min/kg]	-0,414	0,021	-0,241	0,192	-0,365	0,043
Cl_s [ml/min/m ²]	-0,349	0,055	-0,278	0,129	-0,273	0,137
AUC [$\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$]	0,420	0,019	0,252	0,171	0,362	0,045
C_{max} [$\mu\text{g/ml}$]	0,120	0,519	0,234	0,205	0,182	0,328
$t_{0,5 \alpha}$ [h]	0,207	0,265	0,399	0,026	0,223	0,228
$t_{0,5 \beta}$ [h]	0,303	0,098	0,179	0,335	0,181	0,330
$t_{0,5 \gamma}$ [h]	0,628	0,000	0,720	0,000	0,597	0,000
k_{12} [1/h]	0,051	0,786	-0,170	0,362	-0,054	0,771
k_{21} [1/h]	-0,208	0,262	-0,439	0,014	-0,210	0,256
k_{13} [1/h]	0,263	0,153	0,174	0,348	0,216	0,243
k_{31} [1/h]	-0,614	0,000	-0,709	0,000	-0,583	0,001
k_{10} [1/h]	-0,283	0,123	-0,079	0,672	-0,175	0,345

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

W Tabeli 16 przedstawiono korelacje parametrów farmakokinetycznych VP-16 z całkowitą dawką leku oraz z danymi demograficznymi dzieci (wiek, powierzchnia i masa ciała). Obserwowano dodatnie korelacje AUC VP-16 z całkowitą dawką leku, wiekiem, powierzchnią i masą ciała dzieci. C_{max} VP-16 korelowało dodatkowo z całkowitą dawką leku, powierzchnią i masą ciała dzieci. V_c korelowało ujemnie z całkowitą dawką leku i masą ciała dzieci. Obserwowano dodatnią korelację $t_{0,5 \beta}$ z całkowitą dawką VP-16 oraz powierzchnią i masą ciała dzieci. Cl_s normalizowany do masy ciała korelował ujemnie z całkowitą dawką VP-16, wiekiem oraz powierzchnią i masą ciała dzieci. Stała k_{10} korelowała ujemnie z całkowitą dawką leku oraz powierzchnią i masą ciała dzieci. Nie obserwowano istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniami VP-16 72 i 96 godzin po zakończeniu wlewu oraz w dniu allo-HSCT a wiekiem, masą i powierzchnią ciała dzieci oraz całkowitą dawką VP-16.

Tabela 16. Korelacje dawki całkowitej VP-16 i danych demograficznych dzieci z parametrami farmakokinetycznymi VP-16

Parametr	dawka całkowita [mg]		wiek [lata]		powierzchnia ciała [m ²]		masa ciała [kg]	
	r	p	r	p	r	p	r	p
AUC [µg/ml·h]	0,645	0,000	0,382 ^a	0,034	0,572 ^a	0,001	0,641	0,000
C_{max} [µg/ml]	0,422	0,018	0,215	0,245	0,366	0,043	0,426	0,017
V_c [l/kg]	-0,398	0,027	-0,149 ^a	0,423	-0,254 ^a	0,168	-0,404	0,024
MRT _{tot} [h]	0,047	0,801	0,083 ^a	0,656	0,083 ^a	0,656	0,046	0,804
$t_{0,5 \beta}$ [h]	0,402	0,025	0,332 ^a	0,068	0,477 ^a	0,007	0,396	0,027
$t_{0,5 \gamma}$ [h]	-0,148	0,427	-0,089	0,636	-0,111	0,554	-0,144	0,440
Cl_s [ml/min/kg]	-0,652	0,000	-0,443	0,013	-0,642	0,000	-0,648	0,000
Cl_s [ml/min/m ²]	-0,226	0,221	-0,195	0,294	-0,299	0,103	-0,221	0,232
k_{10} [1/h]	-0,366	0,043	-0,276	0,133	-0,417	0,020	-0,358	0,048
Stężenie VP-16 [µg/ml]								
72 godzina	0,174	0,348	0,076	0,685	0,148	0,425	0,181	0,330
96 godzina	0,012	0,947	0,138	0,460	0,075	0,688	0,019	0,920
dzień allo-HSCT	0,161	0,387	0,116	0,534	0,179	0,337	0,167	0,371

^a test Pearsona

5.2.2. Wpływ płci na parametry farmakokinetyczne VP-16

Stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartościach parametrów farmakokinetycznych VP-16 takich jak MRT_{tot} , AUC oraz $t_{0,5\beta}$, jak również stężenia w dniu allo-HSCT w zależności od płci dzieci biorących udział w badaniu. Średnie wartości tych parametrów były większe u chłopców. Pozostałe wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 nie różniły się istotnie pomiędzy dziewczynkami a chłopcami (Tab. 17).

Tabela 17. Średnie wartości (\pm SD) parametrów farmakokinetycznych VP-16 w zależności od płci

Parametr	Dziewczynki (n = 12) Średnia \pm SD	Chłopcy (n = 19) Średnia \pm SD	P
MRT_{tot} [h]	7,8 \pm 2,5	10,2 \pm 3,4	0,044^a
V_c [l/kg]	0,31 \pm 0,07	0,31 \pm 0,07	0,899 ^a
C_{max} [μ g/ml]	209,3 \pm 66,4	206,9 \pm 60,5	0,584
Cl_s [ml/min/kg]	1,23 \pm 0,37	0,98 \pm 0,36	0,068
Cl_s [ml/min/m ²]	36,9 \pm 11,4	31,8 \pm 9,3	0,183
AUC [μ g/ml·h]	887,0 \pm 265,3	1142,1 \pm 359,1	0,043^a
$t_{0,5\alpha}$ [h]	0,197 \pm 0,223	0,309 \pm 0,504	0,330
$t_{0,5\beta}$ [h]	3,17 \pm 1,10	4,26 \pm 1,24	0,019^a
$t_{0,5\gamma}$ [h]	23,9 \pm 17,1	31,1 \pm 24,1	0,372
stężenie VP-16 [μg/ml]			
72 godzina	0,2 \pm 0,2	0,5 \pm 0,4	0,071
96 godzina	0,1 \pm 0,2	0,2 \pm 0,3	0,355
w dniu allo-HSCT	0,1 \pm 0,2	0,3 \pm 0,3	0,047

^a test t-Studenta

Całkowita dawka VP-16, wiek, masa ciała i powierzchnia ciała nie różniły się istotnie statystycznie w zależności od płci (Tab. 18).

Tabela 18. Całkowite dawki VP-16 i parametry demograficzne w zależności od płci

Parametr	Dziewczynki (n = 12) Średnia ± SD	Chłopcy (n = 19) Średnia ± SD	P
dawka całkowita [mg]	2234 ± 936	2823 ± 1106	0,137 ^a
wiek [lata]	11 ± 4	12 ± 4	0,577 ^a
powierzchnia ciała [m²]	1,18 ± 0,33	1,35 ± 0,33	0,162 ^a
masa ciała [kg]	37 ± 15	47 ± 19	0,133 ^a

^a test t-Studenta

5.2.3. Porównanie wartości parametrów farmakokinetycznych w zależności od dawcy komórek krwiotwórczych

Stała szybkości eliminacji k_{10} była istotnie większa u dzieci, dla których dawcą komórek krwiotwórczych był MSD (odpowiednio $0,248 \text{ 1/h} \pm 0,123 \text{ 1/h}$ i $0,168 \text{ 1/h} \pm 0,037 \text{ 1/h}$ dla MSD i MUD; $p = 0,008$). Pozostałe wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 nie zależały od dawcy komórek krwiotwórczych (Tab. 19).

Tabela 19. Średnie wartości (\pm SD) parametrów farmakokinetycznych VP-16 u dzieci w zależności od dawcy komórek krwiotwórczych

Parametr	MUD (n = 11) Średnia \pm SD	MSD (n = 20) Średnia \pm SD	p
MRT _{tot} [h]	9,2 \pm 2,9	9,3 \pm 3,6	0,934 ^a
V _c [l/kg]	0,33 \pm 0,06	0,30 \pm 0,08	0,188 ^a
C _{max} [μ g/ml]	187,1 \pm 38,0	219,2 \pm 69,9	0,193
Cl _s [ml/min/kg]	0,94 \pm 0,32	1,15 \pm 0,39	0,141 ^a
Cl _s [ml/min/m ²]	30,1 \pm 6,9	35,8 \pm 11,4	0,142 ^a
AUC [μ g/ml·h]	1165,5 \pm 354,3	976,2 \pm 329,6	0,147 ^a
t _{0,5 α} [h]	0,214 \pm 0,264	0,294 \pm 0,485	0,836
t _{0,5 β} [h]	4,30 \pm 1,29	3,59 \pm 1,24	0,140 ^a
t _{0,5 γ} [h]	19,3 \pm 9,2	33,2 \pm 25,0	0,201
k ₁₂ [1/h]	0,4065 \pm 0,7224	1,1749 \pm 2,0631	0,342
k ₂₁ [1/h]	5,191 \pm 2,693	4,759 \pm 3,117	0,702 ^a
k ₁₃ [1/h]	0,0199 \pm 0,0260	0,0232 \pm 0,0175	0,143
k ₃₁ [1/h]	0,052 \pm 0,029	0,0391 \pm 0,0277	0,148
k ₁₀ [1/h]	0,168 \pm 0,037	0,248 \pm 0,123	0,008
stężenie VP-16 [μg/ml]			
72 godzina	0,4 \pm 0,5	0,3 \pm 0,3	0,885
96 godzina	0,1 \pm 0,3	0,2 \pm 0,2	0,188
w dniu allo-HSCT	0,1 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,142

^a test t-Studenta

5.2.4. Porównanie wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 w zależności od podawania leków przeciwgrzybiczych

Dzieci, którym podawano leki przeciwgrzybicze z grupy triazoli (itakonazol, flukonazol, posakonazol, worykonazol), będące inhibitorami izoformy CYP3A4 cytochromu P450, wykazywały istotnie mniejsze wartości AUC ($925,1 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h} \pm 284,0 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) w porównaniu z dziećmi nie otrzymującymi tych leków ($1275,5 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h} \pm 296,1 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$; $p = 0,008$). W grupie dzieci otrzymujących leki przeciwgrzybicze obserwowano istotnie większe wartości Cl_s normalizowanego do masy (odpowiednio $1,18 \text{ ml/min/kg} \pm 0,37 \text{ ml/min/kg}$ i $0,83 \text{ ml/min/kg} \pm 0,19 \text{ ml/min/kg}$; $p = 0,011$), jak i powierzchni ciała (odpowiednio $37,5 \text{ ml/min/m}^2 \pm 9,0 \text{ ml/min/m}^2$ i $27,3 \text{ ml/min/m}^2 \pm 5,2 \text{ ml/min/m}^2$; $p = 0,002$) oraz stałych k_{13} (odpowiednio $0,0323 \text{ 1/h} \pm 0,0228 \text{ 1/h}$ i $0,0121 \text{ 1/h} \pm 0,0122 \text{ 1/h}$; $p = 0,003$ i k_{10} (odpowiednio $0,234 \text{ 1/h} \pm 0,054 \text{ 1/h}$ i $0,152 \text{ 1/h} \pm 0,024 \text{ 1/h}$; $p = 0,000$) w porównaniu z dziećmi nie otrzymującymi leków przeciwgrzybiczych (Tab. 20).

Tabela 20. Średnie wartości (\pm SD) parametrów farmakokinetycznych VP-16 u dzieci w zależności od podawania pochodnych triazolowych

Parametr	Tak (n = 11) Średnia \pm SD	Nie (n = 13) Średnia \pm SD	p
MRT _{tot} [h]	10,1 \pm 3,2	10,0 \pm 3,5	0,955 ^a
V _c [l/kg]	0,31 \pm 0,09	0,33 \pm 0,05	0,618 ^a
C _{max} [μ g/ml]	212,2 \pm 73,6	189,7 \pm 31,9	0,931
Cl _s [ml/min/kg]	1,18 \pm 0,37	0,83 \pm 0,19	0,011 ^b
Cl _s [ml/min/m ²]	37,5 \pm 9,0	27,3 \pm 5,2	0,002 ^a
AUC [μ g/ml·h]	925,1 \pm 284,0	1275,5 \pm 296,1	0,008 ^a
t _{0,5 α} [h]	0,385 \pm 0,655	0,142 \pm 0,060	0,750
t _{0,5 β} [h]	3,50 \pm 1,54	4,60 \pm 0,96	0,043 ^a
t _{0,5 γ} [h]	35,6 \pm 27,3	24,2 \pm 17,9	0,284
k ₁₂ [1/h]	0,8430 \pm 1,4090	0,4728 \pm 0,8012	0,099
k ₂₁ [1/h]	5,022 \pm 3,549	5,332 \pm 2,218	0,797 ^a
k ₁₃ [1/h]	0,0323 \pm 0,0228	0,0121 \pm 0,0122	0,003
k ₃₁ [1/h]	0,038 \pm 0,032	0,047 \pm 0,027	0,339
k ₁₀ [1/h]	0,234 \pm 0,054	0,152 \pm 0,024	0,000 ^b
stężenie VP-16 [μg/ml]			
72 godzina	0,4 \pm 0,3	0,4 \pm 0,4	0,417
96 godzina	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,3	0,334
w dniu allo-HSCT	0,3 \pm 0,2	0,2 \pm 0,3	0,115

^a test t-Studenta

^b test Cochran-Coxa

5.3. REKONSTYTUCJA KRWIOTWORZENIA ORAZ WYSTĘPOWANIE CHOROBY PRZESZCZEP PRZECIWKO GOSPODARZOWI (GvHD)

W Tabeli 21 przedstawiono parametry dotyczące rekonstytucji granulopoezy (n = 29) i płytkotworzenia (n = 26) dla grupy dzieci otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. W badanej grupie dzieci ANC osiągnęła wartość równą lub większą od 500 w 1 μ l między dniami +10 a +33 (mediana: dzień +15) po allo-HSCT. Liczba płytek osiągnęła wartość równą lub większą od 20 000 w 1 μ l między dniem +5 a +102 (mediana: dzień +18).

GvHD obserwowano u 18 dzieci (62%), z czego u jednego dziecka (3%) była to postać przewlekła (cGvHD). U 50% dzieci GvHD wystąpiła w stopniu II (Tab. 21).

Tabela 21. Rekonstytucja krwiotworzenia i występowanie GvHD u dzieci

		Liczba granulocytów ≥ 500/μl	Liczba płytek ≥ 20 000/μl
liczba dzieci		29	26
mediana		15	18
dzień	min	10	5
	max	33	102
	średnia	16	25
		GvHD	cGvHD
liczba dzieci	tak	18 (62%)	1 (3%)
	nie	11 (38%)	28 (97%)
		stopień GvHD	
liczba dzieci	I	1 (6%)	
	II	9 (50%)	
	III	7 (39%)	
	IV	1 (6%)	

W grupie dzieci, otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., u których obserwowano przyjęcie przeszczepu, porównano rekonstytucję granulopoezy i płytkotworzenia w zależności od dawcy i źródła komórek krwiotwórczych, płci, stężenia VP-16 w dniu allo-HSCT oraz CR, w której przeprowadzono allo-HSCT (Tab. 22). Rekonstytucja granulopoezy następowała istotnie później (p = 0,004) u dzieci, u których dawcą komórek krwiotwórczych była osoba niespokrewniona (MUD). Pozostałe czynniki nie wpływały istotnie na rekonstytucję granulopoezy. W przypadku płytkotworzenia nie obserwowano istotnych statystycznie różnic dla podanych wyżej czynników.

Rekonstytucję granulopoezy i płytkotworzenia porównano również w zależności od CR1 i CR2, biorąc pod uwagę wpływ czynników takich jak dawca i źródło komórek krwiotwórczych, płeć oraz stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT. Dla dzieci będących w CR1, wykazano statystycznie istotną różnicę w rekonstytucji granulopoezy w zależności od dawcy komórek krwiotwórczych (MSD lub MUD; $p = 0,025$). Pozostałe czynniki nie wpływały istotnie na rekonstytucję granulopoezy i płytkotworzenia zarówno wśród dzieci będących w CR1 jak i w CR2 (Tab. 23 i 24).

Szczegółowe dane dotyczące dnia rekonstytucji granulopoezy i płytkotworzenia oraz wystąpienia GvHD i cGVHD u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c. zamieszczono w Załączniku 11.7 w Tabelach 1-3.

Tabela 22. Rekonstytucja granulopoezy oraz płytkotworzenia u dzieci otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. w zależności od różnych czynników

		Liczba granulocytów $\geq 500/\mu\text{l}$			Liczba płytek $\geq 20\ 000/\mu\text{l}$		
		n	średnia \pm SD [dzień]	p	n	średnia \pm SD [dzień]	p
Dawca	MUD	9	20 \pm 5	0,004	9	28 \pm 30	0,957
	MSD	20	15 \pm 5		17	23 \pm 12	
Źródło komórek krwiotwórczych	BM	16	15 \pm 5	0,152	13	23 \pm 11	0,939
	PB	13	18 \pm 6		13	27 \pm 26	
Płeć	dziewczynki	12	16 \pm 5	0,947	11	20 \pm 13	0,185
	chłopcy	17	17 \pm 6		15	28 \pm 23	
Stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT	nieoznaczalne	11	17 \pm 7	0,484	10	25 \pm 28	0,526
	oznaczalne	18	16 \pm 5		16	24 \pm 14	
Całkowita remisja^a	1CR	17	17 \pm 7	0,396	15	25 \pm 24	0,470
	2CR	11	15 \pm 4		10	26 \pm 14	

^a test t-Studenta

Tabela 23. Rekonstytucja granulopoezy oraz płytkotworzenia u dzieci będących w CR1, otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. w zależności od różnych czynników

		Liczba granulocytów $\geq 500/\mu\text{l}$			Liczba płytek $\geq 20\ 000/\mu\text{l}$		
		n	średnia \pm SD [dzień]	p	n	średnia \pm SD [dzień]	p
Dawca	MUD	7	20 \pm 6	0,025	7	28 \pm 34	0,772
	MSD	10	15 \pm 6		8	22 \pm 11	
Źródło komórek krwiotwórczych	BM	8	16 \pm 6	0,268	6	24 \pm 12	0,516
	PB	9	19 \pm 7		9	26 \pm 30	
Płeć	dziewczynki	5	18 \pm 7	0,787 ^a	5	15 \pm 7	0,244
	chłopcy	12	17 \pm 7		10	30 \pm 28	
Stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT	nieoznaczalne	6	20 \pm 7	0,119	6	30 \pm 36	0,953
	oznaczalne	11	16 \pm 6		9	21 \pm 12	

^a test t-Studenta

Tabela 24. Rekonstytucja granulopoezy oraz płytkotworzenia u dzieci będących w CR2, otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. w zależności od różnych czynników

		Liczba granulocytów $\geq 500/\mu\text{l}$			Liczba płytek $\geq 20\ 000/\mu\text{l}$		
		n	średnia \pm SD [dzień]	p	n	średnia \pm SD [dzień]	p
Dawca	MUD	2	20 \pm 4	—	2	32 \pm 23	—
	MSD	9	14 \pm 4	—	8	25 \pm 13	—
Źródło komórek krwiotwórczych	BM	8	14 \pm 4	—	7	22 \pm 11	0,165 ^a
	PB	3	19 \pm 3	—	3	36 \pm 18	
Płeć	dziewczynki	7	15 \pm 4	0,420 ^a	6	24 \pm 15	0,286
	chłopcy	4	17 \pm 5		4	29 \pm 14	
Stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT	nieoznaczalne	5	14 \pm 4	0,334 ^a	4	19 \pm 8	0,201
	oznaczalne	6	17 \pm 4		6	31 \pm 16	

^a test t-Studenta

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

W grupie dzieci otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. parametry określające rekonstytucję krwiotworzenia porównano w zależności od obecności lub braku obecności VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT, jak również w zależności od źródła przeszczepianych komórek krwiotwórczych (BM lub PB) (Tab. 25).

Tabela 25. Charakterystyka rekonstytucji krwiotworzenia w zależności od obserwowanego stężenia VP-16 w dniu allo-HSCT oraz źródła komórek krwiotwórczych

Obecność VP-16 w dniu allo-HSCT					
		nie		tak	
liczba dzieci		11 (38%)		18 (62%)	
		BM	PB	BM	PB
liczba dzieci		5 (45%)	6 (55%)	11 (61%)	7 (39%)
Liczba granulocytów $\geq 500/\mu\text{l}$					
dzień		mediana	11	18	14
		min	11	11	10
		max	20	33	28
		średnia	15	20	15
		p	0,416		0,111
Liczba płytek $\geq 20\ 000/\mu\text{l}$					
dzień		mediana	17	16	20
		min	11	6	12
		max	30	102	44
		średnia	19	30	24
		p	0,784		0,948
GvHD					
liczba dzieci		tak	8 (73%)		10 (56%)
		nie	3 (27%)		8 (44%)
stopień GvHD					
liczba dzieci		I	0 (0%)		1 (10%)
		II	3 (37%)		6 (60%)
		III	4 (50%)		3 (30%)
		IV	1 (13%)		0 (0%)
cGvHD					
liczba dzieci		tak	1 (9%)		0 (0%)
		nie	10 (91%)		18 (100%)

Gdy źródłem komórek krwiotwórczych był BM lub PB, a ponadto w dniu allo-HSCT VP-16 był nieoznaczalny w osoczu, rekonstrukcja granulopoezy następowała odpowiednio w dniach od +11 do +20 (mediana dzień +11) lub w dniach od +11 do +33 (mediana dzień +18). Gdy źródłem komórek krwiotwórczych był BM lub PB, a ponadto w dniu allo-HSCT VP-16 był oznaczalny w osoczu, rekonstrukcja granulopoezy następowała odpowiednio w dniach +10 do +28 (mediana dzień +14) lub w dniach +10 do +26 (mediana dzień +17). Średni dzień, w którym obserwowano rekonstrukcję granulopoezy był taki sam u dzieci, u których źródłem przeszczepianych komórek krwiotwórczych był BM (dzień +15) niezależnie od obecności VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT. Rekonstrukcja granulopoezy następowała później u dzieci, którym podawano PB jako źródło komórek krwiotwórczych. Analiza statystyczna nie wykazała jednak istotnych różnic w rekonstrukcji granulopoezy u dzieci z oznaczalnym lub nieoznaczalnym VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT, jak również u dzieci, u których źródłem komórek krwiotwórczych był BM lub PB, zarówno w grupie z oznaczalnym, jak i nieoznaczalnym VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT (Tab. 25).

W grupie dzieci, dla których źródłem przeszczepianych komórek krwiotwórczych był BM lub PB, a VP-16 był nieoznaczalny w osoczu w dniu allo-HSCT, rekonstrukcja płytkotworzenia następowała odpowiednio w dniach od +11 do +30 (mediana dzień +17) lub w dniach od +6 do +102 (mediana dzień +16). Pomimo różnych wartości średnich dni rekonstrukcji płytkotworzenia (odpowiednio dzień +19 i +30 dla BM i PB), różnice te nie były istotne statystycznie. W grupie dzieci, dla których źródłem przeszczepianych komórek krwiotwórczych był BM lub PB, a VP-16 był oznaczalny w osoczu w dniu allo-HSCT, rekonstrukcja płytkotworzenia następowała odpowiednio w dniach od +12 do +44 (mediana dzień +20; średnia dzień +24) lub w dniach od +5 do +48 (mediana dzień +22; średnia dzień +24). Pomimo występujących różnic nie wykazano istotności statystycznej dla rekonstrukcji płytkotworzenia w opisanych grupach dzieci (Tab. 25).

5.3.1. Wpływ parametrów farmakokinetycznych VP-16 na rekonstytucję krwiotworzenia

W grupie dzieci uczestniczących w badaniach nie obserwowano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy dniem rekonstytucji granulopoezy i dniem rekonstytucji płytkotworzenia a wybranymi parametrami farmakokinetycznymi VP-16 (MRT_{tot} , V_c , Cl_s normalizowanym do masy i powierzchni ciała, AUC, C_{max} , $t_{0,5}$ faz α , β i γ , stężeniami VP-16 72, 96 godzin po zakończeniu wlewu i stężeniem w dniu allo-HSCT). Dzień rekonstytucji granulopoezy i dzień rekonstytucji płytkotworzenia nie korelował również z wiekiem dzieci biorących udział w badaniu (Tab. 26).

Tabela 26. Korelacje pomiędzy dniem rekonstytucji granulopoezy i płytkotworzenia a wybranymi parametrami farmakokinetycznymi VP-16 (n = 29) oraz wiekiem dzieci

Dzień rekonstytucji granulopoezy	r	p	Dzień rekonstytucji płytkotworzenia	r	p
	n = 29			n = 26	
MRT_{tot} [h]	0,038	0,845	MRT_{tot} [h]	0,139	0,499
V_c [l/kg]	0,232	0,226	V_c [l/kg]	0,178	0,385
Cl_s [ml/min/kg]	-0,136	0,483	Cl_s [ml/min/kg]	0,209	0,305
Cl_s [ml/min/m ²]	-0,147	0,448	Cl_s [ml/min/m ²]	0,138	0,501
AUC [μ g/ml·h]	0,148	0,444	AUC [μ g/ml·h]	-0,204	0,318
C_{max} [μ g/ml]	-0,241	0,207	C_{max} [μ g/ml]	-0,202	0,321
$t_{0,5 \alpha}$ [h]	-0,099	0,610	$t_{0,5 \alpha}$ [h]	0,025	0,904
$t_{0,5 \beta}$ [h]	0,032	0,870	$t_{0,5 \beta}$ [h]	-0,155	0,449
$t_{0,5 \gamma}$ [h]	-0,216	0,261	$t_{0,5 \gamma}$ [h]	0,065	0,751
wiek [lata]	0,202	0,294	wiek [lata]	-0,029	0,889
stężenie VP-16 [μg/ml]					
w 72 godzinie	0,137	0,479	w 72 godzinie	-0,114	0,579
w 96 godzinie	-0,194	0,313	w 96 godzinie	0,191	0,349
w dniu allo-HSCT	-0,049	0,801	w dniu allo-HSCT	0,065	0,753

Nie obserwowano wpływu stężenia i procentu leku wolnego na rekonstytucję granulopoezy i płytkotworzenia (Tab. 27).

Tabela 27. Korelacje pomiędzy dniem rekonstytucji granulopoezy i płytkotworzenia a stężeniem i procentem wolnego VP-16

Dzień rekonstytucji granulopoezy	r	P	Dzień rekonstytucji płytkotworzenia	r	P
	n = 27			n = 24	
stężenie leku wolnego [µg/ml]	0,275	0,166	stężenie leku wolnego [µg/ml]	-0,139	0,519
lek wolny [%]	0,367	0,060	lek wolny [%]	-0,091	0,672

5.4. WZNOWA ALL

W grupie 29 dzieci, którym podano VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. i u których obserwowano przyjęcie przeszczepu, wznowa ALL wystąpiła u czworga dzieci w czasie od 4 do 17 miesięcy po przeprowadzeniu allo-HSCT (mediana 10 miesięcy). Dwoje dzieci było w CR1 oraz dwoje w CR2 przed allo-HSCT. Wznowa ALL dotyczyła czworga spośród 19 dzieci, u których VP-16 był oznaczalny w osoczu w dniu allo-HSCT. Stężenia VP-16 u czworga dzieci ze wznową ALL wynosiły od 0,1 µg/ml do 0,8 µg/ml (średnie stężenie 0,3 µg/ml). Stężenia VP-16 24 godziny przed allo-HSCT wynosiły od 0,1 µg/ml do 1,5 µg/ml. (Tab. 28). U pozostałych dzieci stężenia VP-16 były oznaczalne w osoczu, ale nie stwierdzono wznowy ALL. U dzieci, u których VP-16 był nieoznaczalny w dniu allo-HSCT nie wystąpiła wznowa ALL.

Wznowa ALL wystąpiła również u dwojga dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce odpowiednio 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c. U tych dzieci VP-16 był nieobecny w osoczu w dniu allo-HSCT oraz w dniu poprzedzającym allo-HSCT (Tab. 28).

Tabela 28. Charakterystyka dzieci, u których wystąpiła wznowa ALL

Dawka VP-16 [mg/kg m.c.]	CR	Płeć	Podanie VP-16 [dzień]	Stężenie VP-16 [µg/ml]		Wznowa po allo- HSCT [miesiące]	Komórki krwio- twórcze	
				24 godziny przed allo- HSCT	w dniu allo- HSCT		dawca	źródło
60	1	k	-4	0,2	0,1	4	MSD	BM
60	1	m	-4	0,4	0,3	17	MSD	BM
60	2	m	-3	0,7	0,1	4	MUD	PB
60	2	k	-3	1,5	0,8	16	MSD	PB
40	1	k	-4	<LOQ	<LOQ	18	MUD	PB
30	1	k	-4	<LOQ	<LOQ	5	MSD	BM

5.4.1. Wartości parametrów farmakokinetycznych a wystąpienie wznowy ALL

W grupie dzieci, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c., parametry farmakokinetyczne VP-16 nie różniły się istotnie pomiędzy dziećmi, u których wystąpiła lub nie wystąpiła wznowa ALL. U dzieci, u których wystąpiła wznowa ALL, Cl_s normalizowany do powierzchni ciała był większy w porównaniu z grupą dzieci, u których nie wystąpiła wznowa ALL (Tab. 29), ale różnica nie była istotna statystycznie ($p = 0,077$).

Tabela 29. Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 w zależności od wystąpienia wznowy ALL

Parametr	Wznowa		p
	tak (n = 4) Średnia ± SD	nie (n = 25) Średnia ± SD	
MRT _{tot} [h]	10,2 ± 3,3	9,2 ± 3,4	0,611 ^a
C _{max} [µg/ml]	182,0 ± 28,0	214,2 ± 66,7	0,376
V _c [l/kg]	0,33 ± 0,05	0,30 ± 0,08	0,428 ^a
Cl _s [ml/min/kg]	1,30 ± 0,32	1,05 ± 0,39	0,155
Cl _s [ml/min/m ²]	38,8 ± 4,3	33,1 ± 11,1	0,077
AUC [µg/ml·h]	808,0 ± 201,5	1070,5 ± 361,1	0,172 ^a
t _{0,5 α} [h]	0,288 ± 0,357	0,270 ± 0,447	1,000
t _{0,5 β} [h]	3,46 ± 1,83	3,83 ± 1,20	0,593 ^a
t _{0,5 γ} [h]	34,4 ± 19,7	28,0 ± 22,7	0,411
k ₁₂ [1/h]	0,9887 ± 1,8880	0,9259 ± 1,8112	0,950
k ₂₁ [1/h]	4,518 ± 3,544	4,998 ± 2,988	0,773 ^a
k ₁₃ [1/h]	0,0386 ± 0,0350	0,0207 ± 0,0174	0,242
k ₃₁ [1/h]	0,042 ± 0,044	0,043 ± 0,025	0,487
k ₁₀ [1/h]	0,231 ± 0,030	0,222 ± 0,118	0,297
stężenie VP-16 [µg/ml]			
72 godzina	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,950
96 godzina	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,203
w dniu allo-HSCT	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,363

^a test t-Studenta

Średnie wartości stężenia leku wolnego oraz procent leku wolnego nie różniły się istotnie pomiędzy dziećmi, u których wystąpiła wznowa ALL oraz dziećmi, u których nie obserwowano wznowy ALL (Tab. 30).

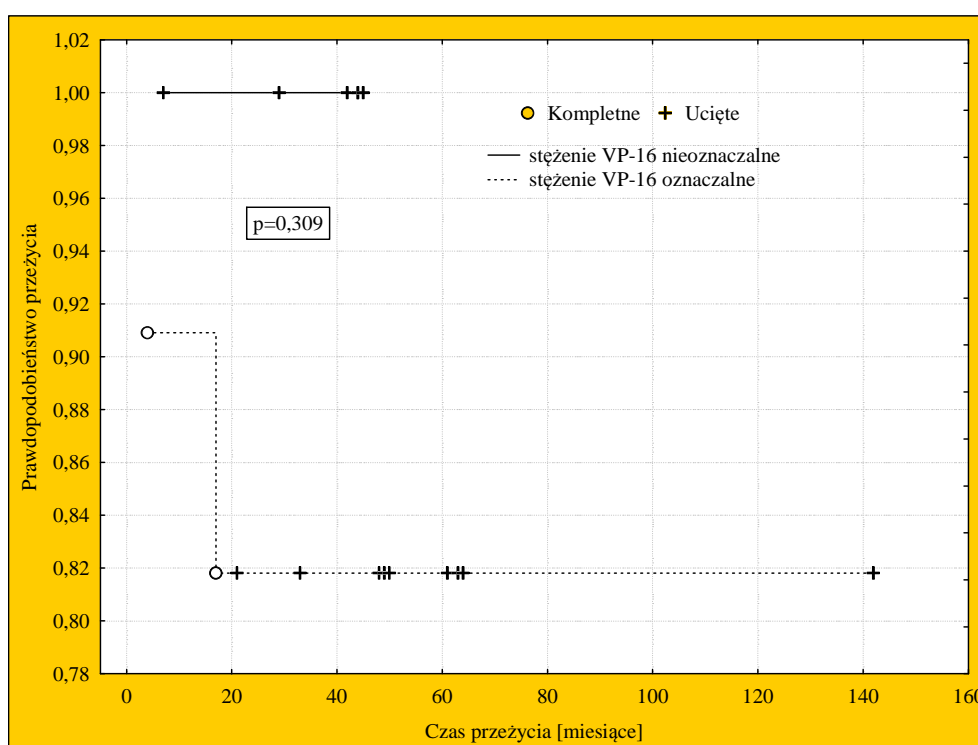
Tabela 30. Średnie wartości stężenia i procentu leku wolnego VP-16 w zależności od wystąpienia wznowy

Parametr	Wznowa		p
	tak (n = 4)	nie (n = 23)	
	Średnia ± SD	Średnia ± SD	
stężenie leku wolnego [µg/ml]	35,3 ± 36,0	18,3 ± 15,6	0,838
lek wolny [%]	19,24 ± 19,44	9,44 ± 7,47	0,838

5.4.2. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od wznowy ALL (pLFS)

5.4.2.1. Porównanie pLFS dla dzieci będących w CR1, w zależności od obecności lub nieobecności VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT

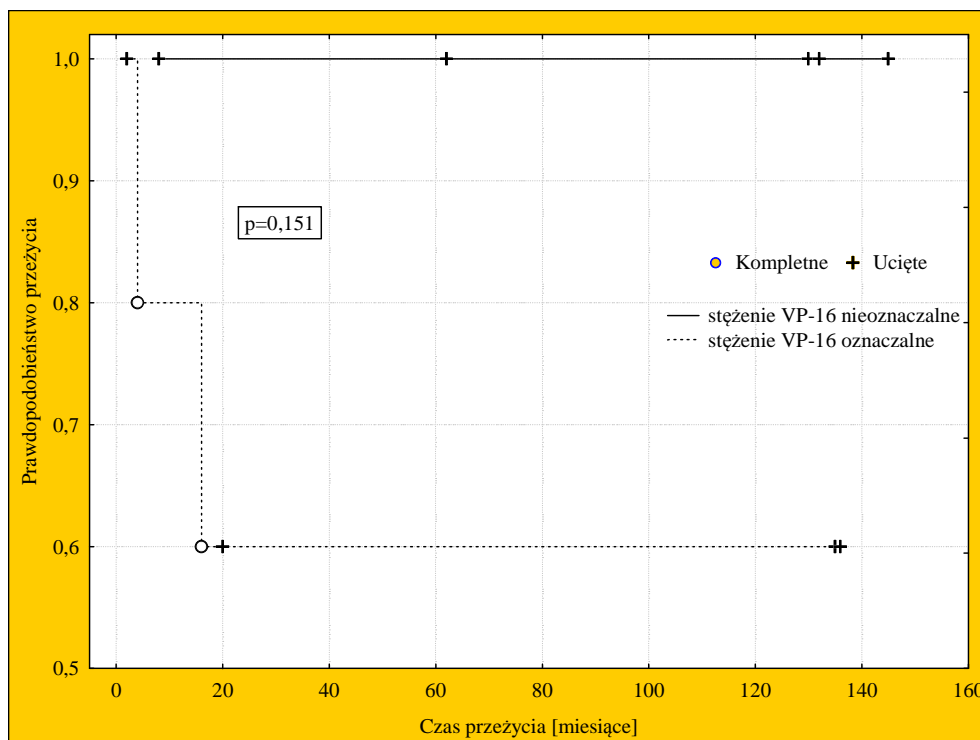
4-letnie pLFS dla dzieci, będących w CR1 wynosi odpowiednio 100% i 82% dla dzieci, u których stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT było nieoznaczalne ($n = 6$) lub oznaczalne ($n = 11$) (Ryc. 11), ale różnica nie była istotna statystycznie ($p = 0,309$).



Ryc. 11. Porównanie pLFS po allo-HSCT dla dzieci będących w CR1, u których stężenie VP-16 było oznaczalne ($n = 11$) lub nieoznaczalne ($n = 6$) w dniu allo-HSCT.

5.4.2.2. Porównanie pLFS dla dzieci będących w CR2, u których stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT było oznaczalne lub nieoznaczalne

11-letnie pLFS dla dzieci, będących w CR2 wynosi odpowiednio 100% i 60% dla dzieci, u których stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT było nieoznaczalne ($n = 5$) lub oznaczalne ($n = 6$) (Ryc. 12), ale różnica nie była istotna statystycznie ($p = 0,151$).



Ryc. 12. Porównanie pLFS po allo-HSCT dla dzieci będących w CR2, u których stężenie VP-16 było oznaczalne ($n = 6$) lub nieoznaczalne ($n = 5$) w dniu allo-HSCT.

5.5. WCZESNA NIEHEMATOLOGICZNA TOKSYCZNOŚĆ NARZĄDOWA ZWIĄZANA Z KONDYCJONOWANIEM

Toksyczność związaną z kondycjonowaniem analizowano do dnia +100 począwszy od dnia allo-HSCT dla dzieci, u których zastosowano kondycjonowanie składające się z VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. łącznie z FTBI (Tab. 31) oraz dla dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 30 mg/kg m.c. lub 40 mg/kg m.c. wraz z innymi lekami (BU, CY, treosulfan) (Tab. 32).

Najczęściej obserwowaną toksycznością u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. było zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego (mucositis) obserwowane u 24 dzieci (77%). Stopień I i I/II wystąpił łącznie u 11 dzieci (46%). U większości dzieci (50%) wystąpiło mucositis w stopniu II. Stopień III wystąpił u 1 dziecka (4%).

U dwojga dzieci (6%) obserwowano hepatotoksyczność w stopniu I lub II, a u pięciorga dzieci (16%) uszkodzenie nerek w stopniu I.

Pozostałe działania niepożądane obserwowano u pojedynczych dzieci (brak apetytu wymagający żywienia parenteralnego, krwawienie z dróg rodnych, zapalenie wyrostka robaczkowego, mikroangiopatia po CsA, obrzęk śródbronków po ATG).

U sześciorga dzieci (19%) nie obserwowano żadnych istotnych objawów wczesnej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem.

Żadne z dzieci nie zmarło z powodu wczesnej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem.

Tabela 31. Wczesna niehematologiczna toksyczność narządowa do dnia +100 związana z kondycjonowaniem z użyciem VP-16 (60 mg/kg mc.) i FTBI (n = 31).

Toksyczność	Liczba dzieci	Stopień	Liczba dzieci
mucositis	24 (77%)	I	3 (13%)
		I/II	8 (33%)
		II	12 (50%)
		III	1 (4%)
hepatotoksyczność	2 (6%)	I	1 (50%)
		II	1 (50%)
uszkodzenie nerek	5 (16%)	I	5 (100%)
Inne		Liczba dzieci	
brak apetytu, żywienie parenteralne		1 (3%)	
krwawienie z dróg rodnych		1 (3%)	
zapalenie wyrostka robaczkowego		1 (3%)	
mikroangiopatia po CsA		1 (3%)	
obrzęk śródbłonnków po ATG		1 (3%)	
bez istotnych objawów toksyczności		6 (19%)	

U dzieci, które otrzymały mniejsze dawki VP-16 nie obserwowano hepatotoksyczności (Tab. 32).

Tabela 32. Wczesna niehematologiczna toksyczność narządowa do dnia +100 związana z kondycjonowaniem z użyciem VP-16 (40 mg/kg mc. lub 30 mg/kg m.c.) w połączeniu z BU i CY

Toksyczność	Stopień	D = 40 mg/kg m.c.	D = 30 mg/kg m.c.
		Liczba dzieci	Liczba dzieci
mucositis	I	0 (0%)	0 (0%)
	I/II	1 (33%)	0 (0%)
	II	1 (33%)	0 (0%)
	III	0 (0%)	0 (0%)
uszkodzenie nerek	I	1 (33%)	0 (0%)
Inne		Liczba dzieci	
długotrwałe żywienie parenteralne		1 (33%)	0 (0%)
krwawienie z dróg rodnych		1 (33%)	0 (0%)
miokloniczne napady padaczkowe		0 (0%)	1 (50%)
mikroangiopatia po CsA i takrolimusie		0 (0%)	1 (50%)
zaburzenia widzenia po ATG (obrzęk śródbłonnków i nerwów wzrokowych)		1 (33%)	0 (0%)
brak danych		0 (0%)	1 (50%)

Szczegółowe dane dotyczące wczesnej niehematologicznej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem, obserwowanej do dnia +100 u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c. zamieszczono w Załączniku 11.7 w Tabelach 1-3.

5.5.1. Wpływ parametrów farmakokinetycznych VP-16 na obserwowane działania niepożądane

5.5.1.1. Mucositis

Parametry farmakokinetyczne VP-16 ($n = 31$) nie różniły się pomiędzy dziećmi, u których obserwowano mucositis ($n = 24$) w stopniu I, I/II, II lub III lub nie obserwowano mucositis ($n = 7$).

Wartości stałych k_{12} i k_{10} były istotnie większe u dzieci bez mucositis w porównaniu z dziećmi z mucositis w stopniu II lub III (dla k_{12} i k_{10} odpowiednio $p = 0,023$ i $p = 0,028$). U dzieci, u których wystąpiło mucositis w stopniu II lub III obserwowano istotnie mniejsze wartości Cl_s normalizowanego do masy ciała ($p = 0,050$), jak i powierzchni ciała ($p = 0,051$). W grupie dzieci z mucositis w stopniu II lub III obserwowano większe wartości AUC ($1177,1 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h} \pm 351,4 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) w porównaniu z grupą dzieci bez mucositis ($946,8 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h} \pm 315,4 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$), a różnica ta była bliska istotności statystycznej ($p=0,066$). Dla pozostałych parametrów farmakokinetycznych nie obserwowano różnic pomiędzy opisanymi grupami dzieci (Tab. 33).

Tabela 33. Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 w zależności od wystąpienia mucositis

Parametr	Mucositis II-III (n = 13) Średnia ± SD	Mucositis < I/II (n = 18) Średnia ± SD	p
MRT _{tot} [h]	10,0 ± 3,0	8,8 ± 3,5	0,295 ^a
C _{max} [µg/ml]	197,9 ± 46,9	214,9 ± 71,1	0,984
V _c [l/kg]	0,32 ± 0,06	0,30 ± 0,08	0,600 ^a
Cl _s [ml/min/kg]	0,93 ± 0,33	1,17 ± 0,38	0,050
Cl _s [ml/min/m ²]	29,6 ± 7,0	36,8 ± 11,3	0,051 ^a
AUC [µg/ml·h]	1177,1 ± 351,4	946,8 ± 315,4	0,066 ^a
t _{0,5 α} [h]	0,136 ± 0,055	0,359 ± 0,531	0,575
t _{0,5 β} [h]	4,07 ± 1,08	3,67 ± 1,42	0,298
t _{0,5 γ} [h]	31,9 ± 26,9	25,7 ± 17,3	0,522
k ₁₂ [1/h]	0,4585 ± 0,9592	1,2227 ± 2,0980	0,023
k ₂₁ [1/h]	5,522 ± 2,324	4,472 ± 3,302	0,334 ^a
k ₁₃ [1/h]	0,0165 ± 0,0138	0,0261 ± 0,0238	0,230
k ₃₁ [1/h]	0,040 ± 0,025	0,047 ± 0,031	0,496
k ₁₀ [1/h]	0,179 ± 0,056	0,249 ± 0,127	0,028
stężenie VP-16 [µg/ml]			
72 godzina	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,984
96 godzina	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,749
w dniu allo-HSCT	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,303

^a test t-Studenta

Nie obserwowano różnic w stężeniu i procencie leku wolnego pomiędzy dziećmi z mucositis w stopniu II lub III a dziećmi z mucositis w stopniu I lub I/II lub bez mucositis (Tab. 34).

Tabela 34. Średnie wartości stężenia i procentu leku wolnego VP-16 w zależności od wystąpienia mucositis

Parametr	Mucositis II-III (n = 13) Średnia ± SD	Mucositis < I/II (n = 16) Średnia ± SD	p
stężenie leku wolnego [µg/ml]	21,7 ± 19,0	19,7 ± 19,9	0,456
lek wolny [%]	11,63 ± 9,86	10,16 ± 10,11	0,511

5.5.1.2. Uszkodzenie nerek

Uszkodzenie nerek w stopniu I wystąpiło u jednego chłopca i czterech dziewczynek. Wartości C_{max} były większe u dzieci, u których wystąpiło uszkodzenie nerek w stopniu I ($247,4 \mu\text{g/ml} \pm 89,2 \mu\text{g/ml}$) w porównaniu z dziećmi, u których nie obserwowano uszkodzenia nerek ($200,2 \mu\text{g/ml} \pm 54,2 \mu\text{g/ml}$), różnica ta nie była jednak istotna statystycznie ($p = 0,068$). Wartości pozostałych parametrów farmakokinetycznych nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami dzieci (Tab. 35).

Tabela 35. Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 w zależności od wystąpienia uszkodzenia nerek

Parametr	Uszkodzenie nerek		p
	tak (n = 5) Średnia ± SD	nie (n = 26) Średnia ± SD	
MRT _{tot} [h]	7,8 ± 3,8	9,6 ± 3,2	0,288 ^a
C _{max} [μg/ml]	247,4 ± 89,2	200,2 ± 54,2	0,068
V _c [l/kg]	0,27 ± 0,08	0,32 ± 0,07	0,134 ^a
Cl _s [ml/min/kg]	1,13 ± 0,44	1,06 ± 0,37	0,788
Cl _s [ml/min/m ²]	34,8 ± 15,8	33,6 ± 9,3	0,822 ^a
AUC [μg/ml·h]	996,2 ± 360,9	1052,4 ± 348,7	0,745 ^a
t _{0,5 α} [h]	0,260 ± 0,321	0,267 ± 0,438	0,788
t _{0,5 β} [h]	3,40 ± 0,97	3,92 ± 1,34	0,413 ^a
t _{0,5 γ} [h]	27,0 ± 23,2	28,5 ± 21,8	0,629
k ₁₂ [1/h]	2,2116 ± 3,5967	0,6504 ± 1,0642	0,957
k ₂₁ [1/h]	4,819 ± 3,358	4,930 ± 2,921	0,940 ^a
k ₁₃ [1/h]	0,0231 ± 0,0289	0,0218 ± 0,0193	0,629
k ₃₁ [1/h]	0,052 ± 0,037	0,042 ± 0,027	0,747
k ₁₀ [1/h]	0,304 ± 0,230	0,203 ± 0,061	0,485
stężenie VP-16 [μg/ml]			
72 godzina	0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,119
96 godzina	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,951
w dniu allo-HSCT	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,333

^a test t-Studenta

Nie obserwowano różnic w stężeniu i procencie leku wolnego pomiędzy dziećmi, u których wystąpiło uszkodzenie nerek w stopniu I a dziećmi, u których nie obserwowano uszkodzenia nerek (Tab. 36).

Tabela 36. Średnie wartości stężenia i procentu leku wolnego VP-16 w zależności od wystąpienia uszkodzenia nerek

Parametr	Uszkodzenie nerek		p
	tak (n = 3) Średnia ± SD	nie (n = 26) Średnia ± SD	
stężenie leku wolnego [µg/ml]	7,7 ± 5,7	22,0 ± 19,6	0,133
lek wolny [%]	4,30 ± 3,18	11,57 ± 10,10	0,100

5.5.1.3. Bez objawów wczesnej niehematologicznej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem

W grupie dzieci, którym podano VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. (n = 31) nie obserwowano istotnych różnic w parametrach farmakokinetycznych VP-16 u dzieci wykazujących lub niewykazujących wczesnej toksyczności narządowej (Tab. 37).

Tabela 37. Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 w zależności od wystąpienia wczesnej toksyczności narządowej związanej z kondycjonowaniem

Parametr	Toksyczność narządowa (n = 25)	Brak toksyczności narządowej (n = 6)	p
	Średnia ± SD	Średnia ± SD	
MRT _{tot} [h]	9,2 ± 3,4	9,6 ± 2,8	0,781 ^a
C _{max} [µg/ml]	209,2 ± 58,5	201,8 ± 80,3	0,194
V _c [l/kg]	0,30 ± 0,07	0,33 ± 0,08	0,271
Cl _s [ml/min/kg]	1,06 ± 0,39	1,14 ± 0,33	0,330
Cl _s [ml/min/m ²]	33,2 ± 10,7	36,4 ± 8,4	0,271
AUC [µg/ml·h]	1069,0 ± 363,9	936,5 ± 248,8	0,408 ^a
t _{0,5 α} [h]	0,218 ± 0,235	0,463 ± 0,848	0,841
t _{0,5 β} [h]	3,82 ± 1,18	3,91 ± 1,79	0,891 ^a
t _{0,5 γ} [h]	28,9 ± 23,6	25,8 ± 11,7	0,783
k ₁₂ [1/h]	0,8332 ± 1,8000	1,1896 ± 1,5429	0,134
k ₂₁ [1/h]	4,977 ± 2,951	4,641 ± 3,128	0,806 ^a
k ₁₃ [1/h]	0,0198 ± 0,0181	0,0314 ± 0,0288	0,169
k ₃₁ [1/h]	0,044 ± 0,028	0,042 ± 0,033	0,920
k ₁₀ [1/h]	0,220 ± 0,118	0,217 ± 0,053	0,409
stężenie VP-16 [µg/ml]			
72 godzina	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,270
96 godzina	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,776
w dniu allo-HSCT	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,395

^a test t-Studenta

5.6. OCENA WPŁYWU VP-16 NA AKTYWNOŚĆ LIMFOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ (PBMCs) *IN VITRO*

W celu sprawdzenia, czy VP-16 w stężeniach obserwowanych w dniu allo-HSCT może mieć wpływ na aktywność proliferacyjną stymulowanych PBMCs, czyli komórek efektorowych reakcji GvL, wykonano dwa eksperymenty badawcze *in vitro*.

Badania dotyczące wpływu VP-16 na aktywność proliferacyjną PBMCs przeprowadzono w Zakładzie Immunologii Nowotworów, Katedry Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Na prowadzenie badań otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (Uchwała nr 736/11).

5.6.1. Metodyka badań

5.6.1.1. Aparatura

W pracy korzystano z następującej aparatury:

- inkubator CO₂;
- harvester (Perkin Elmer Cell Harvester);
- licznik scyntylicyjny (Wallac MicroBeta, Perkin Elmer).

5.6.1.2. Odczynniki

W badaniach stosowano następujące odczynniki:

- VP-16, substancja (Sigma-Aldrich, USA);
- pożywka do hodowli komórek RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA);
- 10% bydlęca surowica płodowa (FBS; Sigma-Aldrich, USA);
- błękit tryptanu (Sigma-Aldrich, USA);
- ficoll (LymphoSep, ICN Biomedicals, USA);
- tymidyna znakowana trytem (3H-thymidine; PerkinElmer Polska Sp. z o.o.);
- dimetylosulfotlenek (DMSO; Sigma-Aldrich, USA);
- sól fizjologiczna buforowana fosforanami (PBS) (Sigma-Aldrich, USA);

- rozpuszczalne przeciwciała anti-human CD3 i anti-human CD28 (BD Biosciences).

5.6.1.3. Izolacja PBMCs z krwi obwodowej

Do każdego eksperymentu wykorzystywano PBMCs izolowane z krwi zdrowych ochotników według niżej opisanego schematu.

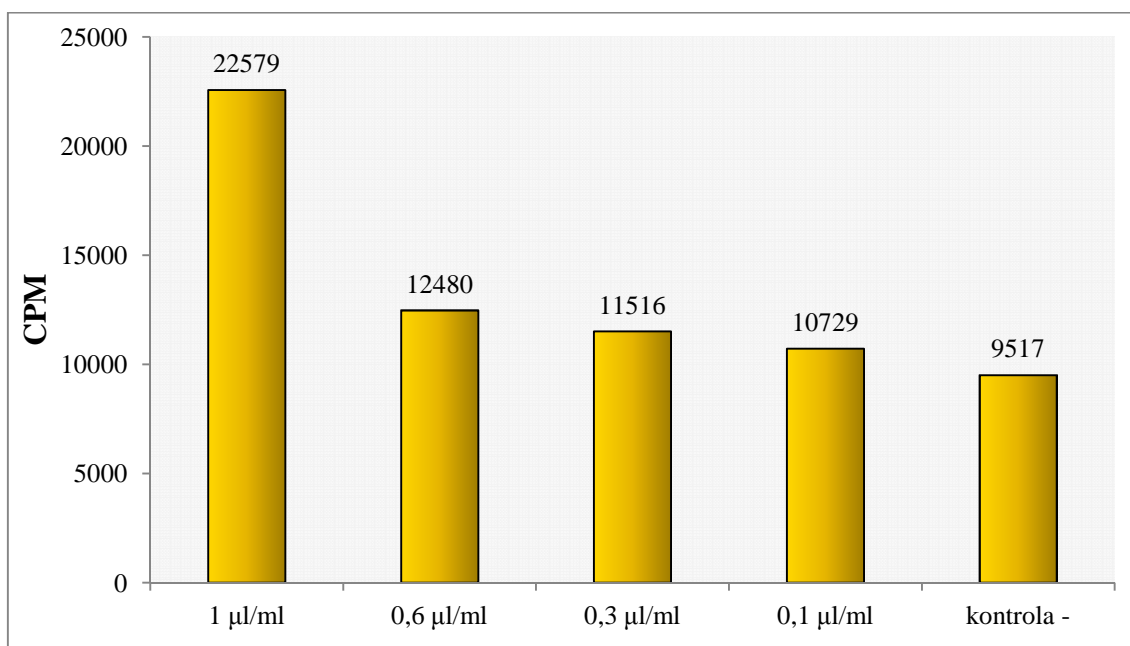
PBMCs izolowano w gradiencie gęstości z 10 ml krwi pobranej od zdrowych ochotników. Krew nawarstwiano na ficoll i wirowano 20 min przy prędkości 800 g w temperaturze 16°C. Komórki płukano dwukrotnie buforem PBS, zliczano ich liczbę w błękie tryptanu, a następnie zawieszano w pożywce RPMI zawierającej L-glutaminę, glukozę i węglan sodu oraz 10% FBS i 40 mg gentamycyny. Tak przygotowane PBMCs poddawano dalszym testom.

5.6.1.4. Ocena wpływu VP-16 na stopień proliferacji PBMCs

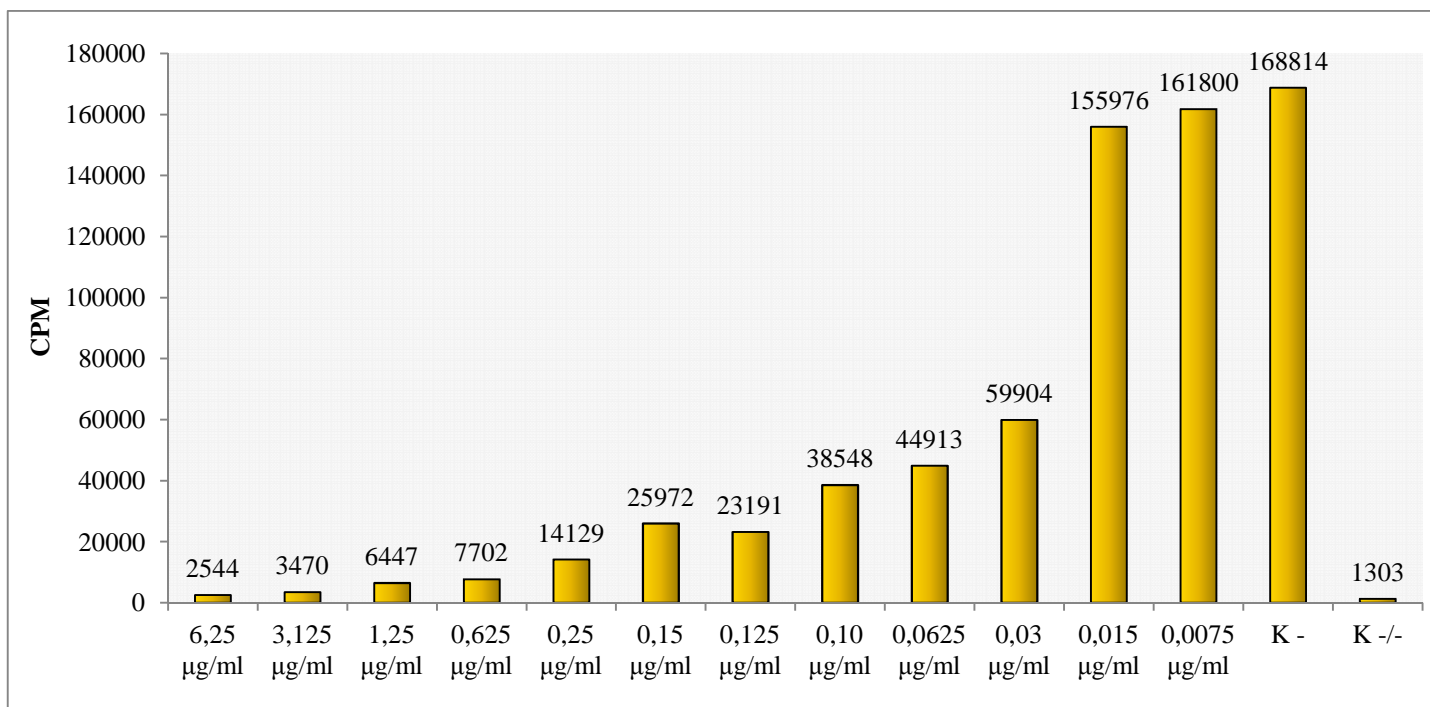
Wpływ VP-16 na proliferację PBMCs *in vitro* oceniano po stymulacji za pomocą rozpuszczalnych przeciwciał anti-CD3/CD28. W tym celu PBMCs wysiewano na 96-dołkową płytkę hodowlaną w liczbie 10^5 komórek na dołek, a następnie dodawano do nich rozpuszczalne przeciwciała anti-CD3 i anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) i inkubowano z różnymi stężeniami VP-16 w zakresie od 0,0075 $\mu\text{g/ml}$ do 6,25 $\mu\text{g/ml}$. Wykonano dwie serie kontrolne: bez VP-16 (kontrolna negatywna, K-) oraz bez VP-16 oraz przeciwciał (kontrolna podwójnie negatywna, K-/). Zastosowano dwa różne czasy ekspozycji na VP-16: 24 oraz 72 godziny. W pierwszym eksperymencie po 3 dniach inkubacji do hodowli dodawano tymidynę znakowaną trytem (1 $\mu\text{Ci/dołek}$), a następnie mierzono wielkość promieniowania β jako stopień proliferacji PBMCs, stosując licznik scyntylicyjny. W drugim eksperymencie zastosowano następujące stężenia VP-16: 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,3 $\mu\text{g/ml}$; 0,6 $\mu\text{g/ml}$ i 1,0 $\mu\text{g/ml}$. VP-16 usunięto po 24 godzinach, a następnie PBMCs stymulowano przeciwciałami przez 3 dni. Następnie dodawano tymidynę znakowaną trytem (1 $\mu\text{Ci/dołek}$). Odczyt prowadzono przy użyciu licznika scyntylicyjnego. Każdy z testów wykonano trzykrotnie.

5.6.2. Wyniki

W pierwszym eksperymencie sprawdzono, czy VP-16 wpływa na aktywność proliferacyjną zdrowych PBMCs. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno 24-godzinna jak i 72-godzinna inkubacja z VP-16 wpływa na aktywność proliferacyjną stymulowanych PBMCs w zależności od zastosowanej dawki VP-16 (Ryc. 13 i 14). W przypadku 72-godzinnej ekspozycji stopień proliferacji wzrastał przy stosowaniu mniejszych stężeń VP-16. W przypadku 24-godzinnej ekspozycji otrzymano wyniki charakteryzujące się odwrotną tendencją – w miarę wzrostu stężenia VP-16 stopień proliferacji PBMCs również wzrastał. Na podstawie wyników otrzymanych po 72-godzinnej ekspozycji stwierdzono, że minimalne stężenie VP-16 potrzebne do zatrzymania wzrostu PBMCs wynosi 0,03 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku mniejszych stężeń VP-16 (0,015 $\mu\text{g/ml}$ i 0,0075 $\mu\text{g/ml}$) stopień proliferacji PBMCs był porównywalny z kontrolą (Ryc. 14).



Ryc. 13. Wpływ różnych stężeń VP-16 na proliferację PBMCs po 24-godzinnej ekspozycji na VP-16.



Ryc. 14. Wpływ różnych stężeń VP-16 na proliferację PBMCs po 72-godzinnej ekspozycji na VP-16.

6. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

HSCT u dzieci i młodzieży znajduje zastosowanie zarówno w leczeniu chorób nowotworowych, w tym przede wszystkim chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, jak i w terapii wrodzonych i nabytych chorób nierozrostowych. Szczegółowe wskazania do HSCT ustalane są w zależności od wyników leczenia konwencjonalnego, a zabieg jest uzasadniony tylko wtedy, gdy znamienne zwiększa szanse chorego na wyleczenie [8, 18].

ALL jest najczęstszym nowotworem u dzieci oraz najczęstszym (ok. 30%) wskazaniem do allo-HSCT [3]. Wobec na ogół dobrych wyników leczenia ALL, wyniki allo-HSCT nadal nie są zadawalające. Allo-HSCT wykonuje się w celu zwiększenia szans na uzyskanie długotrwałej pełnej remisji ALL u dzieci w CR1, będących w grupie bardzo wysokiego ryzyka, u których chemioterapia nadal zbyt często zawodzi. Jednak przede wszystkim allo-HSCT wykonuje się u dzieci w CR2, u których wystąpiła wznowa ALL, zwłaszcza bardzo wczesna lub wczesna wznowa szpikowa lub szpikowo-narządowa. W przypadku tych ostatnich prawdopodobieństwo uzyskania kolejnej trwałej remisji przy zastosowaniu wyłącznie konwencjonalnej chemioterapii jest niewielkie i wynosi poniżej 10%. U dzieci z tych dwóch grup allo-HSCT znamienne poprawia wyniki konwencjonalnej chemioterapii, jednak nie gwarantuje wyleczenia. Allo-HSCT od dawcy spokrewnionego wiąże się z istotną terapeutyczną korzyścią dla pacjentów pediatrycznych. Pomimo, że rokowania dla pacjentów pediatrycznych są lepsze niż dla dorosłych, rokowania dla pacjentów ze wznową są nadal niekorzystne w obu przypadkach. Niepowodzenie zabiegu może być spowodowane toksycznymi, infekcyjnymi lub immunologicznymi powikłaniami związanymi z procedurą transplantacyjną, ale przede wszystkim wystąpieniem poprzeczypowej wznowy ALL [4, 29, 31, 125]. Stąd wciąż aktualnym problemem jest dalsza optymalizacja efektu przeciwbiałaczkowego kondycjonowania poprzedzającego allo-HSCT u dzieci z ALL z uwzględnieniem m.in. wyników badań farmakokinetycznych leków stosowanych w kondycjonowaniu [8, 12, 13, 97]. Dąży się do ustalenia takiego schematu terapii mieloablacyjnej, która charakteryzowałaby się największą ekspozycją organizmu na lek oraz minimalnym ryzykiem wystąpienia toksyczności narządowej zagrażającej życiu [97].

VP-16 jest często podawany dzieciom łącznie z BU i CY w różnych schematach kondycjonowania przed allo-HSCT [4, 12, 50, 126, 127]. Nadal niewiele jest prac opisujących farmakokinetykę VP-16 stosowanego w wysokich dawkach (60 mg/kg m.c.) w kondycjonowaniu przed allo-HSCT w połączeniu wyłącznie z FTBI [12, 128].

Celem pracy doktorskiej było obliczenie parametrów farmakokinetycznych VP-16 u dzieci chorych na ALL przygotowujących do allo-HSCT oraz analiza wpływu farmakokinetyki VP-16 na odległe wyniki allo-HSCT (pLFS) u tych dzieci. Podjęto również próbę oceny wpływu VP-16 na obserwowaną wczesną toksyczność narządową związaną z kondycjonowaniem oraz ustalenia zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami farmakokinetycznymi VP-16. Oczekuje się, że wyniki badań pomogą w dalszej optymalizacji kondycjonowania przed allo-HSCT z użyciem VP-16 u dzieci chorych na ALL i pozwolą na poprawę odległych wyników allo-HSCT.

Badaniem objęto 36 dzieci, w tym 31 dzieci otrzymujących VP-16 w wysokich dawkach (60 mg/kg m.c.) w połączeniu z FTBI w schemacie kondycjonowania przed allo-HSCT. Badania prowadzono we współpracy z Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz z Katedrą i Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Praca doktorska stanowi kontynuację badań farmakokinetyki VP-16, rozpoczętych przez Prof. dr hab. Łucję Skibińską w latach 1999-2001 we współpracy z Prof. dr hab. Jackiem Wachowiakiem z Kliniki Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W grupie 36 dzieci biorących udział w badaniach przedstawionych w pracy doktorskiej u ośmiorga dzieci stężenia VP-16 zostały oznaczone przez Prof. dr hab. Łucję Skibińską (siedmioro dzieci otrzymało VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. i jedno dziecko w dawce 30 mg/kg m.c.). Dla dzieci uczestniczących we wcześniejszych badaniach, a włączonych do niniejszej pracy, parametry farmakokinetyczne VP-16 obliczyłam w oparciu o model trójkompartmenny, zamiast stosowanego wcześniej modelu dwukompartmenny, samodzielnie zebrałam szczegółowe dane dotyczące charakterystyki przygotowania do allo-HSCT (źródło komórek krwiotwórczych, dawca itp.), jak również toksyczności obserwowanej do dnia +100 po allo-HSCT. Włączając ośmiorgo dzieci z wcześniejszych badań do tematyki badawczej pracy doktorskiej kierowałam się możliwością przeprowadzenia pełniejszej analizy statystycznej i dyskusji wyników.

Ze względu na duże zróżnicowanie stężeń VP-16 jego farmakokinetyka opisywana jest za pomocą modeli dwu- [77, 129] i trójkompartimentowych [75, 97], jak również w oparciu o farmakokinetykę bezmodelową [62, 69]. W przypadku pacjentów pediatrycznych stosowane są modele jedno- [129, 96], dwu- [10, 131, 132] lub trójkompartimentowe [12]. Zastosowanie modelu dwu- lub trójkompartimentowego zależy od czasu pobierania próbek krwi do badań, począwszy od zakończeniu wlewu VP-16. Zgodnie z Würthwein i wsp. [12], model trójkompartimentowy najlepiej opisuje farmakokinetykę VP-16, gdy próbki krwi do badań są zbierane powyżej 95 godzin po zakończeniu wlewu. Model dwukompartimentowy natomiast powinien być stosowany, gdy próbki krwi zbierane są do 60 godziny po zakończeniu wlewu. W badaniach własnych ze względu na długie pobieranie próbek (do 120 godziny po zakończeniu wlewu) wykazano, że uzyskane wyniki najlepiej opisuje model trójkompartimentowy, co jest zgodne z piśmiennictwem [12].

6.1. Omówienie i dyskusja wyników uzyskanych u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c.

Stężenia VP-16 oznaczone u 31 dzieci, którym podano VP-16 w 4-godzinny wlew dożylny charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem zgodnie z danymi z piśmiennictwa, dotyczącymi podania dożylnego i doustnego [9, 12]. Czas trwania wlewu był za krótki dla osiągnięcia stanu stacjonarnego, dlatego stężenie oznaczone przy zakończeniu wlewu przyjęto za C_{max} . Z danych z piśmiennictwa wynika, że w przypadku podania VP-16 dzieciom w 96-godzinny wlew dożylny stan stacjonarny zostaje osiągnięty przed upływem 48 godzin od rozpoczęcia wlewu [133].

W porównaniu z danymi z piśmiennictwa [9, 133], dotyczącymi konwencjonalnych dawek VP-16, otrzymane w badaniach własnych stężenia leku wolnego wskazują na mniejszy stopień wiązania VP-16 z białkami (procent leku wolnego przedstawiony w piśmiennictwie [9, 133] wynosi od 2% do 7%, a w badaniach własnych od 1,6% do 39,9%). Większe stężenie i procent leku wolnego w badaniach własnych może wynikać z zastosowania wysokich dawek VP-16, co może być związane z wysycalnym charakterem wiązania leku z białkami. Schwinghammer i wsp. [77] obserwowali większy procent leku wolnego (21%) po podaniu wysokich dawek VP-16 (50-60 mg/kg m.c.) dla stężeń obserwowanych przy zakończeniu wlewu w porównaniu z procentem

leku wolnego przy najniższych stężeniach VP-16 (13%). W badaniach własnych stężenie leku wolnego oznaczano wyłącznie w próbkach pobranych przy zakończeniu wlewu ze względu na ograniczoną objętość krwi pobieraną dzieciom i uzyskaną w związku z tym niewystarczającą objętość osocza.

Średnie wartości $t_{0,5}$ faz α i β w badaniach własnych były zbliżone do danych literaturowych obliczonych u dzieci i u dorosłych w oparciu o model trójkompartментowy [12, 75], lecz charakteryzowały się większym zróżnicowaniem. Istotnie większe wartości $t_{0,5}$ β obserwowano u chłopców oraz po podaniu większych całkowitych dawek VP-16. Zgodne z danymi z piśmiennictwa, wartości $t_{0,5}$ β u dzieci, świadczące o eliminacji leku z kompartmentu centralnego, wynoszą od 2 do 6 godzin [133]. Otrzymana w badaniach własnych mediana $t_{0,5}$ β (3,49 godziny) jest natomiast niższa w porównaniu z medianą $t_{0,5}$ β obliczoną w oparciu o model dwukompartментowy, przedstawiony w piśmiennictwie (5,9 godziny) [10]. W pracy Würthwein i wsp. [12], przy zastosowaniu modelu trójkompartментowego stwierdzono, że w fazie β eliminuje się 80% leku a faza ta jest porównywalna z końcową fazą β modelu dwukompartментowego, podczas gdy końcowa faza γ odnosi się zaledwie do 6% eliminacji. W badaniach własnych obserwowano ujemne korelacje $t_{0,5}$ β z Cl_s normalizowanym do powierzchni, jak i masy ciała ze stałymi k_{13} i k_{10} , podczas gdy $t_{0,5}$ γ nie korelował z Cl_s , zarówno normalizowanym do powierzchni, jak i masy ciała, jak również ze stałymi k_{13} i k_{10} , co może wskazywać na większe znaczenie analizy $t_{0,5}$ β niż $t_{0,5}$ γ w odniesieniu do eliminacji VP-16. Obserwowana istotna ujemna korelacja stałej k_{31} z $t_{0,5}$ γ , obrazująca powolne przechodzenie VP-16 z głębokiego trzeciego kompartmentu do kompartmentu centralnego, może natomiast być odpowiedzialna za długo utrzymujące się małe stężenia VP-16, obecne w osoczu dzieci w dniu allo-HSCT.

W porównaniu z pracą Würthwein i wsp. [12], średnia wartość $t_{0,5}$ γ w badaniach własnych była mniejsza i charakteryzowała się większym zróżnicowaniem międzyosobniczym (od 7,2 do 107,0 godzin), podobnie jak u dorosłych pacjentów w pracy Mross i wsp. (od 6,2 do 43,0 godzin) [97]. Model trójkompartментowy, który zastosowano do obliczeń farmakokinetycznych w badaniach własnych, zakłada istnienie głębokiego trzeciego kompartmentu [12], na który składają się słabo ukrwione tkanki. Otrzymana wartość $t_{0,5}$ γ obrazuje powolną fazę uwalniania VP-16 z obwodowego, głębokiego kompartmentu, czyli z prawie nieodwracalnego połączenia ze słabo ukrwionymi tkankami [75]. Zgodnie z oczekiwaniami, po zastosowaniu modelu trójkompartментowego otrzymane wartości biologicznych czasów półtrwania są dłuższe, jednak według

Mross i wsp. znaczenie kliniczne stosowania modeli wielokompartmentowych do obliczeń $t_{0,5}$ VP-16 nie zostało dotąd ustalone [75].

MRT w badaniach własnych był dłuższy (od 4,5 do 16,4 godzin; średnia 9,3 godzin) w porównaniu z dorosłymi pacjentami (od 3,8 do 8 godzin; średnia 5,5 godzin), którym podano VP-16 w 6-godzinnym wlewie [97]. Według niektórych autorów, w przypadku zastosowania farmakokinetyki bezmodelowej wartości MRT są dużo krótsze niż $t_{0,5}$ fazy eliminacji dla farmakokinetyki modelowej [75]. Jednak w pracy Kreis i wsp. [69], MRT VP-16 obliczony w oparciu o farmakokinetykę bezmodelową po podaniu fosforanu VP-16 wynosił od 3,07 do 10,04 godzin, a wartość średnia wynosząca 6,24 godzin była zbliżona do MRT obliczonego w oparciu o farmakokinetykę modelową u dorosłych [97]. W badaniach własnych obserwowano istotnie większe wartości MRT_{tot} u chłopców. Wartość MRT nie zależała od dawki, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa [69]. Dłuższe przebywanie leku w ustroju wiązało się z większą ekspozycją organizmu na lek, o czym świadczą dodatnie korelacje MRT_{tot} VP-16 z AUC, $t_{0,5}$ β i γ oraz ujemne korelacje MRT_{tot} VP-16 z Cl_s normalizowanym do masy, jak i powierzchni ciała oraz ze stałymi k_{31} i k_{10} .

Wartości stałych k_{12} , k_{21} , k_{13} i k_{10} , obrazujących dystrybucję VP-16 pomiędzy poszczególnymi kompartmentami, charakteryzowały się znacznie większym zróżnicowaniem w porównaniu z danymi z piśmiennictwa, oprócz stałej k_{31} [12]. W odróżnieniu od pracy Schwinghammer i wsp. [77], w badaniach własnych obserwowano ujemną korelację całkowitej dawki VP-16 ze stałą k_{10} . Stałe k_{12} i k_{13} korelowały ujemnie z AUC VP-16, co świadczy o wolniejszym przechodzeniu VP-16 z kompartmentu centralnego do kompartmentów drugiego i peryferyjnego.

W badaniach własnych, średnie wartości C_{max} były większe niż u dorosłych pacjentów, którym podano VP-16 w wysokich dawkach w 4- lub 6-godzinnym wlewie [77, 97]. Większe wartości C_{max} obserwowano u tych dzieci, które posiadały większą powierzchnię i masę ciała oraz po podaniu większych całkowitych dawek VP-16. Większe wartości C_{max} związane były z mniejszą V_c VP-16. Ponadto, w odróżnieniu od autorów Rodman i wsp. [10], większe wartości C_{max} VP-16 związane były z mniejszym Cl_s normalizowanym do masy ciała dzieci, co może być związane ze stężeniami obserwowanymi nawet 120 godzin po zakończeniu wlewu, a wynikającymi z długiej eliminacji VP-16. Uzyskane wyniki świadczą o zależności eliminacji VP-16 od osiągniętego C_{max} .

Wartości i zróżnicowanie AUC w badaniach własnych było zbliżone do danych z piśmiennictwa, dotyczących pacjentów pediatrycznych [12]. Średnie wartości AUC u dzieci w badaniach własnych były większe, w porównaniu z dorosłymi pacjentami, którym VP-16 podano w 6-godzinny wlew [97], a mniejsze, gdy VP-16 podano w 4-godzinny wlew przed auto-HSCT [77]. Większe wartości AUC były związane z wolniejszą eliminacją leku, o czym świadczą istotne ujemne korelacje AUC z Cl_s normalizowanym do masy, jak i powierzchni ciała oraz ze stałą k_{10} , jak również dodatnie korelacje AUC VP-16 z MRT_{tot} oraz $t_{0,5\beta}$. Wykazano większe wartości AUC VP-16 u dzieci starszych, jak również charakteryzujących się większą powierzchnią i masą ciała oraz u chłopców. W badaniach własnych AUC korelowało dodatnio z całkowitą dawką VP-16 (mg), podobnie jak w pracach Kato i wsp. [130] u pacjentów pediatrycznych oraz Kreis i wsp. [69] u dorosłych pacjentów, którym podawano fosforan VP-16. Dawki w wymienionych pracach podawano w mg/m^2 . Wyniki badań własnych wskazują na dużą ekspozycję VP-16 w organizmie dzieci, o czym świadczy dodatnia korelacja C_{max} VP-16 z AUC. Korelacja ta jest zgodna z danymi z piśmiennictwa i wskazuje, że pobranie próbki krwi pod koniec wlewu dobrze odzwierciedla całkowitą ekspozycję na VP-16 (wyrażoną wartością AUC) [130].

Nie obserwowano różnic w wartościach Cl_s normalizowanego do masy lub powierzchni ciała pomiędzy dziewczynkami i chłopcami uczestniczącymi w badaniach, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa [133]. W badaniach własnych obserwowano natomiast, podobnie jak Würthwein i wsp. [12], istotną korelację Cl_s normalizowanego do masy ciała z wiekiem oraz brak korelacji Cl_s normalizowanego do powierzchni ciała z wiekiem. W pracach Palle i wsp. [133] oraz Rodman i wsp. [10] nie wykazano również istotnej korelacji Cl_s normalizowanego do powierzchni ciała z wiekiem, stwierdzono natomiast największą wartość Cl_s ($ml/min/m^2$) u najmłodszego dziecka [10]. Wyniki innych autorów [134] wskazują na zależność Cl_s VP-16 od wieku. Według Würthwein i wsp. [12] oraz Baheti i wsp. [134] korelacja Cl_s normalizowanego do masy ciała z wiekiem powinna być dyskutowana ostrożnie, ponieważ w tej kwestii autorzy otrzymują odmienne wyniki.

Stwierdzono istotną statystycznie ujemną korelację Cl_s normalizowanego do masy ciała z całkowitą dawką VP-16 oraz brak korelacji Cl_s normalizowanego do powierzchni ciała z dawką, co sugeruje, że w przypadku wysokich dawek eliminacja VP-16 może zależeć od dawki. W piśmiennictwie dotyczącym badań u dzieci nie wykazano jednak zależności Cl_s normalizowanego do powierzchni ciała od dawki (mg/m^2) [10, 69,

133] ani od masy ciała [133], podobnie jak u dorosłych pacjentów [77], a brak zależności Cl_s VP-16 od dawki tłumaczono proporcjonalnym wzrostem AUC wraz z podaną dawką leku [134]. W badaniach własnych pomimo, że AUC korelowało dodatnio z dawką VP-16, Cl_s normalizowany do masy ciała korelował ujemnie z całkowitą dawką VP-16. W przypadku Cl_s normalizowanego do masy ciała dzieci i Cl_s normalizowanego do powierzchni ciała dzieci otrzymano podobne korelacje (poza brakiem korelacji C_{max} z Cl_s normalizowanym do powierzchni ciała). Ponadto Cl_s normalizowany do masy ciała korelował dodatnio z powierzchnią ciała oraz bardzo istotnie dodatnio z Cl_s normalizowanym do powierzchni ciała, co wskazuje na możliwość analizowania zamiennie Cl_s normalizowanego do powierzchni ciała lub masy ciała.

Średnie wartości Cl_s VP-16 normalizowanego do powierzchni ciała w badaniach własnych były większe niż u pacjentów pediatrycznych w pracach Rodman i wsp. [10], Würthwein i wsp. [12] oraz Palle i wsp. [133] i podobnie jak w pracy Rodman i wsp. [10] charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem. Wartości Cl_s VP-16 normalizowanego do masy ciała w badaniach własnych są również większe w porównaniu z piśmiennictwem [133]. W pracy Rodman i wsp. [10] niższe wartości Cl_s u dzieci tłumaczono osłabioną funkcją nerki i wątroby, co może wskazywać na brak wpływu funkcji nerki i wątroby na otrzymane wyniki w badaniach własnych. W grupie dzieci uczestniczących w badaniach Cl_{cr} i aktywności enzymów wątrobowych (AlAT, AspAT) oraz stężenie bilirubiny nie odbiegało od wartości referencyjnych.

Według niektórych autorów, wartości ogólnoustrojowego Cl_s leków są zazwyczaj większe u dzieci niż u dorosłych, jednak w przypadku wysokich dawek VP-16 autorzy Rodman i wsp. [10] oraz Würthwein i wsp. [12] stwierdzili odwrotną zależność. W porównaniu z dorosłymi pacjentami, wartości Cl_s VP-16 normalizowane do powierzchni ciała otrzymane w badaniach własnych były porównywalne z wartościami uzyskanymi po podaniu VP-16 w 4-godzinnym wlewie dożylnym w dawkach 35-60 mg/kg m.c. przed auto-HSCT łącznie z lekami przeciwpadaczkowymi [77], a większe po podaniu VP-16 w 6-godzinnym wlewie dożylnym w dawkach 30-45 mg/kg m.c. przed allo-HSCT w połączeniu z BU i CY [97]. Uzyskane wartości Cl_s VP-16 normalizowanego do powierzchni ciała u dzieci były jednocześnie mniejsze niż u pacjentów dorosłych, którym VP-16 podawano w 1-godzinnym wlewie dożylnym przez trzy kolejne dni.

Na eliminację VP-16 może wpływać podawanie innych leków [9, 10, 68]. Jednoczesne stosowanie CsA może zmniejszać eliminację VP-16 [12, 84, 87, 133]. W ba-

daniach własnych CsA podawano w profilaktyce przeciwko GvHD od 24 godziny przed allo-HSCT, czyli po 48 lub 72 godzinach od zakończenia wlewu. Wpływ CsA na farmakokinetykę VP-16 wydaje się być minimalny ze względu na obserwowane jednocześnie większe wartości Cl_s w porównaniu z piśmiennictwem. Mross i wsp. [75] również wykluczyli wpływ CsA na farmakokinetykę VP-16 ze względu na podanie CsA jeden dzień przed transplantacją.

Większe wartości Cl_s VP-16 mogą wynikać z równoczesnego podawania leków indukujących cytochrom P-450, którego izoformy CYP3A4 i CYP3A5 biorą udział w metabolizmie VP-16 [79, 135]. Zgodnie z pracą Rodman i wsp. [10], mediana Cl_s VP-16 u dzieci, otrzymujących leki przeciwpadaczkowe indukujące cytochrom P-450 (fenobarbital i/lub fenytoinę), była istotnie większa niż u dzieci, które nie otrzymywały tych leków. W badaniach własnych większości dzieciom podawano silne induktory CYP3A4 - kortykosteroidy (hydrokortyzon lub deksametazon) [81, 133]. Zgodnie z piśmiennictwem [97] większe wartości Cl_s VP-16 obserwowano u dorosłych pacjentów, którym podawano deksametazon jako premedykację przed wlewem VP-16, a prednizon, inny kortykosteroid, zwiększa Cl_s VP-16, prawdopodobnie ze względu na jego wpływ na metabolizm VP-16 przebiegający przy udziale CYP3A4 [81]. W badaniach własnych dzieciom, dla których dawcą komórek krwiotwórczych był MUD podawano kortykosteroidy jako premedykację przed każdą dawką ATG. Dzieciom, dla których dawcą komórek krwiotwórczych był MSD, kortykosteroidy podawano wyłącznie w pojedynczej dawce przed rozpoczęciem wlewu VP-16. Większe wartości Cl_s VP-16 w badaniach własnych nie mogą być jednak tłumaczone jednoczesnym podawaniem kortykosteroidów, ponieważ nie obserwowano istotnych różnic w wartościach Cl_s VP-16 oraz pozostałych parametrów farmakokinetycznych pomiędzy opisanymi grupami dzieci. Co więcej, większe wartości stałej k_{10} , obrazującej eliminację VP-16 z kompartmentu centralnego, obserwowano u dzieci, dla których dawcą komórek krwiotwórczych był MSD. Deksametazon nie miał wpływu na farmakokinetykę VP-16 u dzieci w pracy Urien i wsp. [132], jednak w pracy tej uzyskane wartości Cl_s VP-16 u dzieci były zbliżone do dorosłych. Sugeruje to istnienie innych czynników mających wpływ na szybszą, w porównaniu z danymi z piśmiennictwa [10, 12, 133], eliminację VP-16 w badanej grupie dzieci.

Jedną z teorii, która może wytłumaczyć obserwowane w pracy doktorskiej większe wartości Cl_s VP-16 są wyniki przedstawione w pracach Krogh-Madsen M. i wsp. [136] oraz Toffoli i wsp. [137]. Autorzy stwierdzili, że u dorosłych pacjentów z Cl_{cr}

większym od zakresu referencyjnego, dawka VP-16 powinna być zwiększona ze względu na duże wartości Cl_s leku, które mogą prowadzić do nieskutecznego leczenia. Badania przeprowadzono jednak w małych grupach pacjentów i z tego powodu dla potwierdzenia obserwacji wymagane są dalsze badania na liczniejszej grupie pacjentów [136, 137].

Część dzieci (11 z 24), biorących udział w badaniach własnych, otrzymywała leki przeciwgrzybicze (pochodne triazolowe), będące inhibitorami CYP3A4 [138, 139, 140]. Dla dzieci, u których allo-HSCT przeprowadzono w latach 1999-2001 nie udało się uzyskać informacji dotyczącej podawania leków przeciwgrzybiczych z powodu zniszczenia archiwum szpitala, w którym przechowywane były karty historii leczenia pacjentów. U dzieci otrzymujących leki przeciwgrzybicze obserwowano jednak istotnie niższe wartości AUC, świadczące o mniejszej ekspozycji na VP-16 oraz istotnie większe wartości Cl_s normalizowanego do masy, jak i powierzchni ciała, jak również większe wartości stałych k_{13} oraz k_{10} i mniejsze wartości $t_{0,5}$ fazy β . Uzyskane wyniki wskazują na szybszą eliminację ogólnoustrojową VP-16 oraz z kompartmentu centralnego u dzieci otrzymujących leki przeciwgrzybicze z grupy pochodnych triazolowych, co świadczy o braku wpływu tych leków na farmakokinetykę VP-16.

V_c VP-16 nie była związana z płcią, wiekiem dzieci i powierzchnią ciała dzieci, korelowała natomiast ujemnie z masą ciała i całkowitą dawką VP-16. W pracy [77] u dorosłych pacjentów porównywano wartości V_{ss} i wykazano, że nie korelują one z wiekiem, płcią i masą ciała pacjentów. Średnia wartość V_c w badaniach własnych była większa niż w pracy Würthwein i wsp. [12], w której VP-16 podawano w połączeniu z BU i CY. Obserwowano jednak podobne zróżnicowanie międzyosobnicze wartości V_c . W badaniach własnych obserwowano większe wartości V_c VP-16 u dzieci z większym Cl_s normalizowanym do masy ciała. Według Mross i wsp. [97] Cl_s i V_c są niezależnymi parametrami, na które mogą wpływać zmiany w wiązaniu leku z białkami osocza, ze względu na prawdopodobnie wysycalny charakter wiązania VP-16 z białkami przy stężeniach obserwowanych po podaniu wysokich dawek leku [77]. W przypadku modeli wielokompartментowych, $t_{0,5}$ nie jest niezależnym parametrem ($t_{0,5} = 0,693 \cdot V_d / Cl$). Równanie to wskazuje, że wzrost $t_{0,5}$ nie może być rozumiany jako zmniejszenie eliminacji leku, lecz jako odzwierciedlenie wzrostu V_c [97].

W badaniach własnych nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w całkowitej dawce VP-16 oraz w wieku, masie i powierzchni ciała, jak również w wartościach większości parametrów farmakokinetycznych VP-16 pomiędzy dziewczynkami

a chłopcami. W pracy Rodman i wsp. [10] nie obserwowano żadnej korelacji parametrów farmakokinetycznych VP-16, takich jak V_c , k_{10} , k_{12} , k_{21} i $t_{0,5\beta}$, obliczonych według modelu dwukompartamentowego, z wiekiem i płcią dzieci, jak również z parametrami biochemicznymi oznaczonymi u dzieci (stężenia albumin, bilirubiny i kreatyniny oraz aktywnością enzymów wątrobowych). Istotnie różne w badaniach własnych wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 pomiędzy dziewczynkami a chłopcami dotyczyły MRT_{tot} , AUC i $t_{0,5\beta}$, a wiek dzieci korelował dodatnio z AUC VP-16 i ujemnie z Cl_s normalizowanym do masy ciała.

Dokładnej ocenie poddano wyniki stężeń VP-16 w osoczu u dzieci, oznaczane 72 i 96 godzin po zakończeniu wlewu oraz w dniu allo-HSCT ze względu na nadal aktualny problem optymalizacji schematu kondycjonowania u dzieci poddawanych allo-HSCT oraz niejednoznaczny wpływ VP-16 obecnego w osoczu w dniu allo-HSCT na wyniki transplantacji. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa, utrzymujące się przez dłuższy czas duże stężenie leku może wpływać niekorzystnie na przyjęcie przeszczepu [8]. Według niektórych autorów HSCT powinna być przeprowadzona nawet po całkowitej eliminacji leków przeciwnowotworowych, stosowanych w kondycjonowaniu, tak aby na podawane macierzyste komórki krwiotwórcze nie oddziaływały czynniki toksyczne [75]. Stąd kwestią nadal podlegającą dyskusji jest ustalenie bezpiecznego stężenia VP-16, jakie może być obecne w osoczu w dniu allo-HSCT, a które pozwoliłoby uniknąć toksycznego uszkodzenia przeszczepianych allogenicznych komórek krwiotwórczych oraz komórek immunokompetentnych obecnych w materiale przeszczepowym, odpowiedzialnych za reakcję GvL [97].

Wyniki badań własnych wykazały obecność VP-16 w stężeniach od 0,1 $\mu\text{g/ml}$ do 1,5 $\mu\text{g/ml}$ w osoczu aż u 84% dzieci w czasie 72 godzin po zakończeniu wlewu, czyli w dniu, w którym zgodnie z obowiązującym protokołem powinna zostać przeprowadzona allo-HSCT. W dniu, w którym allo-HSCT wykonano u większości dzieci (65% dzieci; 4 dni po podaniu leku), VP-16 był obecny w osoczu 39% dzieci w stężeniach od 0,1 $\mu\text{g/ml}$ do 0,9 $\mu\text{g/ml}$. Stężenia VP-16 obserwowano również u 37% dzieci w próbkach pobranych 120 godzin po zakończeniu wlewu, czyli w pierwszym (dzień+1) lub drugim dniu (dzień +2) po allo-HSCT.

Otrzymane w badaniach własnych stężenia VP-16 u dzieci w dniu allo-HSCT były większe niż u dorosłych w pracy Schwinghammer i wsp. [77], gdzie przewidywane stężenia VP-16 w momencie auto-HSCT wynosiły od $<0,001$ $\mu\text{g/ml}$ do 0,294 $\mu\text{g/ml}$ (średnia 0,050 $\mu\text{g/ml} \pm 0,081$ $\mu\text{g/ml}$). U dorosłych w pracy Mross i wsp. [75] po dożył-

nym podaniu VP-16 w dawkach od 30 mg/kg m.c. do 45 mg/kg m.c., lek był wykrywalny u 50% pacjentów w dniu przeprowadzenia HSCT. Wartości stężenia VP-16 były bardzo zbliżone do otrzymanych w badaniach własnych i wynosiły od 0,08 µg/ml do 0,82 µg/ml, nie obserwowano jednak zwiększonej toksyczności w związku z wydłużoną eliminacją VP-16, a rekonstytucja granulopoezy następowała w tym samym czasie, niezależnie od długości wlewu VP-16. Rekonstytucję granulopoezy obserwowano średnio w 13 dniu (zakres 11-16 dzień) i 12 dniu (zakres 9-14 dni) odpowiednio po podaniu 6- i 34-godzinne go wlewu VP-16 [75].

Zgodnie z danymi z piśmiennictwa, podjęte wcześniej próby określenia stężenia VP-16, jakie może być obecne w osoczu w dniu allo-HSCT, jak i auto-HSCT, w celu zapewnienia przyjęcia przeszczepu, nie przyniosły jednoznacznych ustaleń. W badaniach *in vitro*, opisanych w pracy Krüger i wsp. [141] wykazano, że bezpieczne dla przeprowadzenia HSCT stężenie VP-16 powinno być niższe niż 0,40 µg/ml [10, 11]. W badaniach własnych u dzieci z oznaczalnym stężeniem VP-16 w dniu allo-HSCT, mediana stężenia VP-16 była niższa niż 0,4 µg/ml, jednak u niektórych dzieci obserwowane większe stężenia mogły wpłynąć niekorzystnie na przyjęcie przeszczepu. W badaniach własnych spośród 19 dzieci, u których VP-16 był oznaczalny w dniu allo-HSCT u 6 dzieci (32%) stężenie VP-16 było większe niż 0,4 µg/ml. W pracy Rodman i wsp. [10] stężenie VP-16 powyżej 0,40 µg/ml obserwowano u 31% dzieci. Wznowa ALL w badaniach własnych pojawiła się jednak również u dzieci, u których stężenie VP-16 było niższe od 0,4 µg/ml.

W badaniach u dzieci poddanych auto-HSCT, Rodman i wsp. [10] obserwowali opóźnione przyjęcie przeszczepu tylko u pacjentów, u których stężenie VP-16 było większe niż 5,00 µg/ml w momencie transplantacji, a wartość Cl_s była mniejsza niż 15 ml/min/m².

Według Schwinghammer i wsp. [77] auto-HSCT może być przeprowadzona, gdy stężenie VP-16 jest mniejsze niż 0,30 µg/ml. Wartość tę ustalono w oparciu o badania *in vitro*, jako stężenie powodujące minimalną inhibicję ($\leq 22\%$) wzrostu jednostek tworzących kolonię (CFU) i bezpieczne dla przeprowadzenia HSCT.

W badaniach *in vitro* wykazano, że stężenie VP-16 0,01 µg/ml powoduje inhibicję komórek progenitorowych tworzących kolonię granulocytarno-makrofagalną (CFU-GM) w 50% w medium pozbawionym białek. Ze względu na silne wiązanie VP-16 z białkami, w obecności albumin stężenie powodujące 50% inhibicję wzrasta do

0,38 µg/ml. Pomimo, że CFU-GM stanowią tylko część komórek układu krwiotwórczego, wykazano, że 50% inhibicja CFU-GM koreluje z dłuższą fazą aplazji szpiku [75].

Kwestią dotąd nie badaną jest wpływ stężeń VP-16 obecnych w osoczu w dniu allo-HSCT na przeszczepiane komórki krwiotwórcze oraz komórki efektorowe reakcji GvL. Z tego powodu podjęto próbę oceny w warunkach *in vitro*, czy VP-16 w stężeniach obserwowanych w dniu allo-HSCT w badaniach własnych może mieć wpływ na przyjęcie przeszczepu. Uzyskane wyniki wykazały, że VP-16 wpływa na aktywność proliferacyjną stymulowanych PBMCs w zależności od zastosowanego stężenia VP-16, oraz czasu inkubacji. W przypadku 72-godzinnej ekspozycji aktywność proliferacyjna była wyższa, jeśli stosowano mniejsze stężenia VP-16, jednak w przypadku 24-godzinnej ekspozycji w miarę wzrostu stężenia VP-16 stopień proliferacji PBMCs również wzrastał. Na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć hipotezę, zakładającą, że w przypadku 24-godzinnej ekspozycji w obecności czynnika uszkadzającego uruchomione zostają wewnątrzkomórkowe mechanizmy obronne, co skutkuje większą aktywnością proliferacyjną PBMCs przy stężeniu VP-16 1 µg/ml niż w próbie kontrolnej. Natomiast 72-godzinna ekspozycja jest prawdopodobnie na tyle długa, że potencjał mechanizmów obronnych zostaje wyczerpany i ujawnia się cytotoksyczny wpływ VP-16. W przypadku VP-16 udowodniono, że programy leczenia, w których czas podawania tego leku jest wydłużony charakteryzują się lepszą skutecznością z powodu utrzymujących się przez dłuższy czas złamań w DNA [65], co może tłumaczyć uzyskane w badaniach własnych wyniki. Ekspozycja na lek krótsza niż 24 godziny skutkuje obniżoną odpowiedzią na leczenie [65].

Na podstawie wyników otrzymanych po 72-godzinnej ekspozycji stwierdzono, że minimalne stężenie VP-16 potrzebne do zatrzymania wzrostu PBMCs stymulowanych przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 wynosi 0,03 µg/ml. Wyników badań *in vitro* nie można odnosić bezpośrednio do warunków *in vivo*, jednak uzyskane w badaniach własnych wyniki sugerują, że VP-16 obecny w osoczu dzieci w dniu allo-HSCT w stężeniach obserwowanych w badaniach własnych mógł wpływać w różnym stopniu na przeszczepiane macierzyste komórki krwiotwórcze, jak również na komórki efektorowe reakcji GvL. Wniosek ten potwierdzają wyniki badań klinicznych, w których wykazano, że stężenia 0,5-2,0 µg/ml uważa się za aktywne przeciwnowotworowo [65]. Z drugiej jednak strony, w badaniach *in vitro* Tazawa i wsp. [142] wykazali brak wpływu niskich stężeń VP-16 (0,5 µg/ml i 1 µg/ml) na zdolność komórek białaczkowych linii K-562 do życia.

W celu ustalenia czynników, które mogłyby wpływać na wyniki allo-HSCT, podjęto próbę korelacji stężeń obserwowanych 72 i 96 godzin po zakończeniu wlewu VP-16 oraz w dniu allo-HSCT z obliczonymi wartościami parametrów farmakokinetycznych VP-16 i danymi demograficznymi dzieci. Obserwowane wartości C_{max} VP-16 przy zakończeniu wlewu nie korelowały ze stężeniami 72 i 96 godzin po zakończeniu wlewu oraz w dniu allo-HSCT, przez co C_{max} nie jest użytecznym parametrem w prognozowaniu wydłużonej eliminacji VP-16, pomimo istotnej korelacji C_{max} z AUC. Dla stężenia oznaczonego 72 godziny po zakończeniu wlewu obserwowano natomiast dodatnią korelację z AUC oraz ujemną z Cl_s normalizowanym do masy i bliską istotności korelację z powierzchnią ciała dzieci ($p = 0,055$), co wskazuje, że stężenia VP-16 obserwowane w 72 godzinie po zakończeniu wlewu w grupie dzieci uczestniczących w badaniach mogą być na tyle istotne, że będą niekorzystnie wpływać na przyjęcie przeszczepu.

Stężenia VP-16 oznaczone 72 godziny, jak i 96 godzin po zakończeniu wlewu oraz w dniu allo-HSCT korelowały dodatnio z MRT_{tot} i $t_{0,5} \gamma$ oraz ujemnie ze stałą k_{31} , co tłumaczy długo utrzymujące się stężenia VP-16, mimo obserwowanych dużych wartości Cl_s VP-16 u dzieci, jak również potwierdza założenia modelu trójkompartментowego, mówiące o powolnej eliminacji leku z głębokiego, tkankowego kompartmentu.

Uzyskane istotne dodatnie korelacje stężeń VP-16 oznaczonych 24 godziny przed planowaną allo-HSCT (odpowiednio 48 godzin lub 72 godziny po zakończeniu wlewu dla dzieci, którym VP-16 podano w dobie -3 lub -4) ze stężeniami w dniu allo-HSCT (odpowiednio 72 godziny lub 96 godzin po zakończeniu wlewu dla dzieci, którym VP-16 podano w dobie -3 lub -4) mogą być pomocne w prognozowaniu stężenia VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT. W przypadku podania VP-16 w dniu -4 wartość oznaczonego stężenia leku w dniu poprzedzającym allo-HSCT (dzień -3) może wskazywać, że dniu allo-HSCT w osoczu będzie nadal oznaczalne stężenie VP-16 ze względu na długą eliminację VP-16. Problem ustalenia stężenia VP-16, które może być obecne w osoczu w dniu allo-HSCT nie uszkadzając przeszczepianych komórek krwiotwórczych i komórek efektorowych reakcji GvL jest nadal otwarty.

Nie obserwowano istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniami VP-16 72 i 96 godzin po zakończeniu wlewu oraz w dniu allo-HSCT a wiekiem, masą i powierzchnią ciała dzieci oraz całkowitą dawką VP-16. Wartości stężenia VP-16 w dniu allo-HSCT były natomiast istotnie wyższe u chłopców.

W badaniach własnych nie obserwowano wpływu żadnego z parametrów farmakokinetycznych VP-16 oraz stężenia i procentu leku wolnego przy końcu wlewu na rekonstytucję granulopoezy i płytkotworzenia. W pracy Palle i wsp. [133] u pacjentów pediatrycznych z AML, nie wykazano również korelacji pomiędzy farmakokinetyką VP-16 a odpowiedzią kliniczną, w tym przypadkiem uzyskaniem CR lub czasem jej trwania po zastosowaniu VP-16.

Rekonstytucja granulopoezy w badaniach własnych (mediana 15 dzień) nastąpiła szybciej niż w pracy Rodman i wsp. (mediana 33 dzień) [10], a później niż w pracy Stein i wsp. (mediana 11 dzień) [4]. Mediana dnia rekonstytucji granulopoezy była podobna dla dzieci w badaniach własnych, którym podano BM w porównaniu z pracą Stein i wsp. [4]. W pracy Rodman i wsp. [10] oprócz VP-16 podawano również karboplatinę w trzech dawkach, a w pracy Stein i wsp. [4] zastosowano intensywny schemat kondycjonowania, składający się z BU i VP-16, co może świadczyć o korzystnym wpływie BU na rekonstytucję granulopoezy.

Rekonstytucja płytkotworzenia dla całej grupy dzieci w badaniach własnych nastąpiła w tym samym czasie jak w pracy Stein i wsp. [4] (mediana 18 dzień) oraz szybciej (mediana 28 dni) niż w pracy Rodman i wsp. [10], w której przyjęto jednak bardziej restrykcyjne kryterium dla rekonstytucji płytkotworzenia (odpowiednio 50 000/1 μ l [10] i 20 000/1 μ l w badaniach własnych).

W badaniach własnych rekonstytucja granulopoezy następowała później u dzieci, dla których dawcą komórek krwiotwórczych był MUD. Różnica dotyczyła głównie dzieci, będących w CR1, co może mieć znaczenie kliniczne ze względu na istniejące odrębne wskazania do allo-HSCT, związane z różną klasyfikacją ALL u dzieci. Pozostałe czynniki (źródło komórek krwiotwórczych, płeć, stężenia VP-16 w dniu allo-HSCT, CR, w której przeprowadzono allo-HSCT) nie miały wpływu na rekonstytucję granulopoezy oraz płytkotworzenia lub liczba dzieci w poszczególnych podgrupach była za mała na przeprowadzenie analizy statystycznej.

Rekonstytucja granulopoezy następowała wcześniej u dzieci, dla których źródłem komórek krwiotwórczych był BM niż dla dzieci, którym podano PB, zarówno gdy VP-16 był oznaczalny, jak i nieoznaczalny w osoczu w dniu allo-HSCT, co stwierdzono porównując mediany, ale różnice nie były istotne statystycznie. Po porównaniu wartości średnich, dzień rekonstytucji granulopoezy u dzieci z oznaczalnym i nieoznaczalnym stężeniem VP-16 w dniu allo-HSCT następował szybciej u dzieci, dla których źródłem przeszczepianych komórek krwiotwórczych był BM oraz później u dzieci, którym po-

dawano PB. Zbliżoną tendencję obserwowano dla rekonstytucji płytkotworzenia, jednak w tym przypadku również nie obserwowano istotności statystycznej. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa [1], przyjęcie przeszczepu po allo-HSCT następuje szybciej po podaniu PB niż BM.

Rodman i wsp. [10] zauważyli, że u pacjentów pediatrycznych, którym podawano VP-16 w trzech dawkach według schematu przygotowującego do auto-HSCT, stężenia VP-16 powyżej 5,0 µg/ml oznaczone 24 godziny po zakończeniu ostatniego (trzeciego) wlewu były związane z istotnie dłuższym czasem potrzebnym do rekonstytucji granulopoezy w porównaniu z dziećmi, u których stężenie VP-16 było mniejsze niż 5,0 µg/ml (odpowiednio 46 i 29 dni dla stężenia >5 µg/ml i <5 µg/ml) i płytkotworzenia (odpowiednio 43 dni i 24 dni dla stężenia >5 µg/ml i <5 µg/ml).

W pracy Mross i wsp. [97] wykazano, że podanie VP-16 w kondycjonowaniu przed allo-HSCT w jednorazowym 6-godzinnym wlewie wiązało się z szybszą rekonstytucją granulopoezy (średnio dzień 8) oraz płytkotworzenia (średnio dzień 25) niż w przypadku podawania VP-16 w 1-godzinnym wlewie przez 3 kolejne dni. Autorzy stwierdzili, że VP-16 obecny w osoczu u pacjentów w dniu allo-HSCT nie mógł mieć wpływu na wydłużenie rekonstytucji granulopoezy i płytkotworzenia ze względu na obserwowany brak stężeń większych niż 0,4 µg/ml, które mogłyby powodować wydłużenie czasu aplazji [97], co udowodniono w badaniach *in vitro* [141]. Późniejsza rekonstytucja granulopoezy i płytkotworzenia u pacjentów, którym VP-16 podano w ciągu trzech kolejnych dni mogła być spowodowana długą ekspozycją organizmu na lek oraz wystąpieniem trzech C_{max} po trzech dawkach VP-16 [97].

W badaniach własnych częstość występowania GvHD w stopniach II i III wynosiła 55% (16 z 29 dzieci), natomiast w stopniach III i IV 28% (8 z 29 dzieci), co jest porównywalne z wynikami opisanymi w piśmiennictwie. W pracy Mross i wsp. [97] u 4 z 7 pacjentów (57%) obserwowano GvHD w stopniach II i III po podaniu VP-16 w 6-godzinnym wlewie w połączeniu z BU i CY w kondycjonowaniu przed allo-HSCT. W pracy Stein i wsp. [4], natomiast GvHD w stopniach II i III wystąpiła u 63% pacjentów, a w stopniach III i IV u 23% pacjentów. W tej pracy VP-16 podawano w dawce 30 mg/kg łącznie z BU, a jako profilaktykę GvHD stosowano CsA i mykofenolan mofetylu.

VP-16 obecny w osoczu dzieci w dniu allo-HSCT może mieć wpływ na odległe wyniki transplantacji, ponieważ wznowa ALL w badaniach własnych wystąpiła u dzieci, u których VP-16 był oznaczalny w osoczu w dniu allo-HSCT. Jednocześnie nie ob-

serwowano istotnych statystycznie różnic w wartościach parametrów farmakokinetycznych VP-16 oraz w stężeniu i procencie wolnego leku oznaczonego przy końcu wlewu pomiędzy grupami dzieci, u których wystąpiła lub nie wystąpiła wznowa ALL. Wykazano natomiast tendencję ($p = 0,088$) w kierunku większych wartości Cl_s normalizowanego do powierzchni ciała u dzieci, u których wystąpiła wznowa ALL, co wskazuje, że VP-16 nie może być za szybko eliminowany, ponieważ dłużej utrzymujące się mniejsze stężenia są odpowiedzialne za uzyskanie pożądanej odpowiedzi na leczenie [10].

W badaniach własnych spośród 29 dzieci otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. wznowa ALL wystąpiła u czworga dzieci (2 dziewczynki, 2 chłopców), spośród których dwoje dzieci było w CR1 oraz dwoje w CR2 przed allo-HSCT. Wznowy obserwowano częściej u dzieci, dla których dawcą komórek krwiotwórczych był MSD. Zarówno dla dzieci w CR1, jak i w CR2, u których VP-16 był nieoznaczalny w osoczu w dniu allo-HSCT, pLFS wynosiło 100% (4-letnie dla CR1 i 11-letnie dla CR2). Dla dzieci w CR1 i CR2, u których VP-16 był oznaczalny w osoczu w dniu allo-HSCT, pLFS wynosiło poniżej 100%. Różnice w czasie obserwacji są spowodowane późniejszym włączeniem do wskazań do allo-HSCT dzieci będących w CR1. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o uszkodzaniu przez VP-16 komórek efektorowych reakcji GvL obecnych w materiale przeszczepowym.

VP-16 może wpływać na obserwowaną wczesną toksyczność narządową związaną z kondycjonowaniem taką jak mucositis, uszkodzenie nerek i hepatotoksyczność [36, 74]. Pozostałe objawy wczesnej toksyczności narządowej związane z kondycjonowaniem w badaniach własnych wynikają prawdopodobnie ze stosowania innych leków (ATG, CsA) lub są efektem współdziałania wielu czynników. W dniu podania VP-16 (dzień -3 lub -4), w dniu allo-HSCT (dzień 0) oraz trzy dni po allo-HSCT (dzień +3) wartości parametrów biochemicznych u wszystkich dzieci biorących udział w badaniu nie odbiegały istotnie od zakresów referencyjnych, co wskazuje, że obserwowana toksyczność wynika z zastosowanego schematu kondycjonowania. Zgodnie z piśmiennictwem, stężenie albumin w osoczu, poziom bilirubiny przed rozpoczęciem leczenia, Cl_{cr} oraz wiek mogą być pomocne w przewidywaniu toksyczności hematologicznej [9]. Stężenia VP-16 (w osoczu, C_{ss} i C_{max}) oraz poszczególne parametry farmakokinetyczne (m.in. AUC), jak również czas utrzymywania się VP-16 w organizmie powyżej ustalonej wartości są uważane za parametry, które mogą służyć do przewidywania wystąpienia późnej toksyczności spowodowanej przez VP-16 [9].

Głównym działaniem niepożądanym obserwowanym po stosowaniu VP-16 jest zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego (mucositis) [102]. Schematy kondycjonowania składające się z chemioterapeutyku, w szczególności VP-16, i FTBI charakteryzują się częstszym występowaniem mucositis niż schematy opierające się wyłącznie na chemioterapii [124, 143]. Mechanizm powstawania mucositis opiera się na bezpośrednim działaniu uszkadzającym cytostatyków na DNA szybko dzielących się komórek nabłonka przewodu pokarmowego oraz generowaniu przez cytostatyki wolnych rodników [102]. Wpływ parametrów farmakokinetycznych VP-16 na występowanie mucositis porównano w dwóch grupach dzieci: u dzieci bez mucositis lub z mucositis w stopniach I lub I/II (dzieci bez mucositis) oraz u dzieci z mucositis w stopniu II lub III (dzieci z mucositis). W całej badanej grupie nie obserwowano mucositis w stopniu IV. Przyjęty podział na dwie grupy związany jest z koniecznością podawania silnych środków przeciwbólowych przy mucositis w stopniu II i III, podczas gdy mucositis w stopniu I przebiega bez odczuwanego bólu [62, 102], co potwierdza praca Mross i wsp. [97]. W tej pracy ciężka postać mucositis (stopień II) wystąpiła u wszystkich pacjentów otrzymujących VP-16 w kondycjonowaniu przed allo-HSCT. Podobnie w pracy Stein i wsp. [4] oraz w pracy Dorr i wsp. [62] u dorosłych pacjentów, analizowano wystąpienie mucositis w stopniu równym lub wyższym II z powodu konieczności podawania opioidów i żywienia parenteralnego u tych pacjentów.

W badaniach własnych u dzieci z mucositis w stopniach II i III obserwowano mniejsze wartości Cl_s normalizowanego do masy ciała, jak i powierzchni ciała oraz stałych k_{12} i k_{10} oraz tendencję w kierunku większych wartości AUC VP-16, co wskazuje na większą ekspozycję na VP-16 i związaną z nią wolniejszą eliminację leku u tych dzieci. Pozostałe parametry farmakokinetyczne VP-16 oraz stężenie i procent leku wolnego oznaczony przy zakończeniu wlewu nie różniły się pomiędzy dziećmi z i bez mucositis. Według Mross i wsp. [97], AUC nie jest jednak najważniejszym parametrem farmakokinetycznym, który korelowałby z obserwowaną toksycznością. Optymalizacja kondycjonowania z użyciem wysokich dawek VP-16 nie powinna opierać się wyłącznie na dawce leku jak i maksymalnej tolerowanej dawce, ponieważ w przypadku tenipozydu wykazano, że zredukowanie międzyosobniczej zmienności w wartościach AUC do 50% wiązało się z 500% zmiennością w podanych dawkach tenipozydu.

Wydalenie drogą nerkową stanowi ok. 45% całkowitej eliminacji VP-16 i z tego powodu istniejące uszkodzenie nerek w momencie rozpoczęcia terapii VP-16 może wpływać na farmakokinetykę leku [133, 134], m.in. na wydłużoną eliminację leku.

Wśród dzieci biorących udział w badaniu, otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., wartości Cl_{cr} mieściły się w granicach normy w każdym z trzech dni, w których wartości te mierzono (w dniu podania VP-16, czyli w dniu -3 lub -4, w dniu allo-HSCT, czyli w dniu 0 oraz trzy dni po allo-HSCT, czyli w dniu +3). Z tego względu wykluczono wpływ istniejącego zaburzenia funkcji nerki przed włączeniem VP-16 w badanej grupie dzieci na otrzymane parametry farmakokinetyczne leku, m.in. na większe wartości Cl_s .

Z drugiej strony, VP-16, będąc eliminowany drogą nerkową [9], może powodować neurotoksyczność, często obserwowaną po zakończeniu terapii VP-16. W badaniach własnych uszkodzenie nerek w stopniu I w następstwie podania VP-16 pojawiło się u pięciorga dzieci (u jednego chłopca i czterech dziewczynek). Pomimo małej grupy, wykazano, że u dzieci, u których wystąpiło uszkodzenie nerek obserwowano większe wartości C_{max} , ale różnica ta nie była istotna statystycznie ($p = 0,068$). Wartości pozostałych parametrów farmakokinetycznych VP-16, jak również stężenie i procent leku wolnego oznaczony przy końcu wlewu nie różniły się istotnie pomiędzy dziećmi, u których obserwowano uszkodzenie nerek a dziećmi, u których nie obserwowano uszkodzenia nerek. W pracy Mross i wsp. [97] u pacjentów, którym VP-16 podano w kondycjonowaniu przed allo-HSCT nie obserwowano uszkodzenia nerek.

Metabolizm wątrobowy również odgrywa dużą rolę w eliminacji VP-16 [133]. Pomimo, że VP-16, podobnie jak pozostałe inhibitory topoizomerazy II, może wywoływać ostre uszkodzenie wątroby, toksyczność ze strony wątroby obserwowano u 2 dzieci (odpowiednio w stopniu I i II). Ze względu na małą liczebność grupy dzieci, u których wystąpiła hepatotoksyczność, nie przeprowadzono analizy statystycznej. W badaniach własnych nie obserwowano toksyczności ze strony wątroby związanej ze wzrostem stężenia bilirubiny. W pracy Mross i wsp. [97] większe stężenia bilirubiny i większą toksyczność wątrobową obserwowano po podaniu VP-16 w 1-godzinny wlew przez trzy kolejne dni niż po podaniu jednorazowego 6-godzinnego wlewu VP-16. Wartości parametrów biochemicznych, opisujących funkcję zarówno nerek jak i wątroby (Cl_{cr} , AlAT, AspAT itp.) mieściły się w zakresie normy dla wszystkich dzieci w każdym z trzech dni, w którym mierzono te wartości (w dniu podania VP-16, w dniu allo-HSCT oraz trzy dni po allo-HSCT), co było wymogiem do zakwalifikowania dzieci do allo-HSCT. U niektórych dzieci wartości parametrów biochemicznych wykraczały poza zakres referencyjny, jednak nie były to istotne różnice. Z tego powodu obserwo-

wana toksyczność może wynikać wyłącznie z zastosowanego schematu kondycjonowania przed allo-HSCT.

6.2. Omówienie i dyskusja wyników uzyskanych u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.

Nie przeprowadzono analizy statystycznej u dzieci, którym VP-16 podano w mniejszych dawkach (40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.) ze względu na małą liczebność grup, jak również nie normalizowano u tych dzieci stężeń VP-16 do dawki 60 mg/kg m.c. ze względu na brak FTBI w schemacie kondycjonowania. Ponadto u tych dzieci wartości parametrów farmakokinetycznych VP-16 mogą zależeć od innych leków podawanych w celu mieloablacji w kondycjonowaniu przed allo-HSCT.

Wyniki uzyskane u dzieci otrzymujących VP-16 w dawce 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c. są odmienne od wyników otrzymanych u dzieci po podaniu VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. AUC VP-16 było największe u dziecka, u którego obserwowano niewydolność nerek w stopniu I oraz brak mucositis. Wznowa ALL wystąpiła u dzieci, u których VP-16 był nieoznaczalny w dniu allo-HSCT. U dziecka, u którego stężenie VP-16 w dniu allo-HSCT wynosiło 0,6 µg/ml nie obserwowano wznowy ALL. W porównaniu z dziećmi, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c., rekonstytucja granulopoezy następowała szybciej u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 40 mg/kg m.c., pomimo że dzieci te otrzymały komórki krwiotwórcze pochodzące od MUD.

6.3. Podsumowanie

Obliczenia farmakokinetyczne w oparciu o model trójkompartментowy, które wymagają dłuższego pobierania próbek krwi od dzieci, wydają się być korzystniejsze ze względu na obserwowane w badaniach własnych stężenia VP-16 w osoczu dzieci w dniu allo-HSCT. Pobieranie próbek krwi do badań aż do 120 godziny po zakończeniu wlewu oraz obliczenia w oparciu o model trójkompartментowy mogą tłumaczyć obserwowane długie $t_{0,5}$, a tym samym obecność leku w organizmie w dniu allo-HSCT.

Stąd kwestią nadal podlegającą dyskusji jest ustalenie bezpiecznego stężenia VP-16, jakie może być obecne w osoczu w dniu allo-HSCT. Otrzymane wyniki mogą wskazywać na konieczność wydłużenia odstępu pomiędzy podaniem VP-16 a dniem

przeprowadzenia allo-HSCT. Bezpieczny odstęp czasu musi zostać zachowany ze względu na prawdopodobny wpływ VP-16 na uszkodzenie komórek efektorowych reakcji GvL obecnych w materiale przeszczepowym, przez co VP-16 obecny w osoczu w dniu allo-HSCT może zwiększać ryzyko wznowy ALL po transplantacji.

Międzyosobnicza zmienność w stężeniach VP-16 może być istotna u pacjentów otrzymujących wysokie dawki VP-16 w postępowaniu przygotowującym do allo-HSCT. W konsekwencji, monitorowanie stężenia leku w osoczu może być przydatne do wyodrębnienia pacjentów o dużym ryzyku odrzucenia przeszczepu.

7. WNIOSKI

1. Istotna ujemna korelacja stałej k_{31} z $t_{0,5}$ fazy γ , obrazująca powolne przechodzenie VP-16 z głębokiego trzeciego kompartentu do kompartentu centralnego, może być odpowiedzialna za stężenia VP-16 obserwowane do 120 godzin po zakończeniu wlewu.
2. Długo utrzymujące się stężenia VP-16 w osoczu dzieci, mimo większych wartości Cl_s VP-16 w porównaniu z danymi z piśmiennictwa, mogą wskazywać na konieczność wydłużenia rekomendowanego odstępu czasowego pomiędzy dniem podania VP-16, który obecnie wynosi 72 godziny a dniem przeprowadzenia allo-HSCT.
3. Większe prawdopodobieństwo wystąpienia wznowy ALL dotyczy dzieci, u których stężenie VP-16 w osoczu w dniu allo-HSCT jest oznaczalne.
4. Stężenie VP-16 oznaczone 24 godziny przed planowaną allo-HSCT może być przydatne w przewidywaniu stężenia VP-16 w dniu allo-HSCT.
5. W badaniach *in vitro* VP-16 w stężeniu 0,03 $\mu\text{g/ml}$ hamuje proliferację PBMCs stymulowanych przeciwciałami anti-CD3/CD28 przy 72-godzinnej ekspozycji, co może wskazywać na wpływ VP-16 na komórki efektorowe reakcji GvL obecne w materiale przeszczepowym.

8. STRESZCZENIE

U dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL) allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych (allo-HSCT) znamienne poprawia wyniki konwencjonalnej chemioterapii, jednak nie gwarantuje wyleczenia. Niepowodzenie zabiegu może być spowodowane różnymi powikłaniami związanymi z procedurą transplantacyjną, ale przede wszystkim wystąpieniem poprzyszczepowej wznowy ALL. Stąd wciąż aktualnym problemem jest dalsza optymalizacja efektu przeciwbiałaczkowego kondycjonowania poprzedzającego allo-HSCT u dzieci z ALL z uwzględnieniem m.in. wyników badań farmakokinetycznych leków stosowanych w kondycjonowaniu. U dzieci chorych na ALL kondycjonowanie składa się najczęściej z etopozydu (VP-16) oraz frakcjonowanego napromieniania całego ciała (FTBI). Zgodnie z obowiązującym w pediatrycznych ośrodkach transplantacyjnych protokołem terapeutycznym, VP-16 podawany jest w wysokiej dawce (60 mg/kg m.c.) w 4-godzinnym wlewie dożylnym 72 godziny przed allo-HSCT.

Celem pracy doktorskiej było oznaczenie stężenia całkowitego i frakcji wolnej VP-16 podawanego w wysokich dawkach w połączeniu z FTBI w kondycjonowaniu poprzedzającym allo-HSCT u dzieci chorych na ALL, obliczenie parametrów farmakokinetycznych VP-16 oraz analiza korelacji otrzymanych parametrów farmakokinetycznych VP-16 z parametrami rekonstrukcji granulopoezy i płytkotworzenia oraz prawdopodobieństwem przeżycia wolnego od białaczki. Ponadto, podjęto próbę analizy wpływu parametrów farmakokinetycznych VP-16 na toksyczność narządową, związaną ze stosowanym kondycjonowaniem, obserwowaną do dnia +100 po allo-HSCT. Zbadano również w warunkach *in vitro* wpływ VP-16 w stężeniach obserwowanych w dniu allo-HSCT na aktywność proliferacyjną limfocytów krwi obwodowej (PBMCs).

W badaniu uczestniczyło 36 dzieci w wieku od 2 do 19 lat, które otrzymały VP-16 w kondycjonowaniu przed allo-HSCT w dawkach: 60 mg/kg m.c. (n=31), 40 mg/kg m.c. (n=3) lub 30 mg/kg m.c. (n=2). VP-16 podawano w 4-godzinnym wlewie dożylnym 72 godziny (dzień -3) lub 96 godzin (dzień -4) przed planowaną allo-HSCT. Większości dzieciom (n=22) przeszczepiono komórki krwiotwórcze pochodzące od zgodnego dawcy rodzinnego. Materiał przeszczepowy od zgodnego dawcy niespokrew-

nionego podano 14 dzieciom. Komórki krwiotwórcze pochodzące ze szpiku kostnego przeszczepiono 19 dzieciom, a z krwi obwodowej 17 dzieciom.

Badania wykazały duże zróżnicowanie wartości parametrów farmakokinetycznych wysokich dawek VP-16 takich jak stężenie maksymalne, klirens ogólnoustrojowy (Cl_s), pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (AUC), średni czas przebywania leku w ustroju (MRT_{tot}), objętość kompartmentu centralnego, biologiczne okresy półtrwania faz α , β i γ . Stężenie i procent leku wolnego w osoczu u dzieci otrzymujących VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c. charakteryzowało się również dużym zróżnicowaniem. Wykazano istotne dodatnie korelacje pomiędzy masą ciała dzieci a AUC oraz większe wartości AUC i MRT_{tot} u chłopców.

Otrzymane w badaniach własnych wyniki mogą wskazywać na konieczność wydłużenia odstępu czasowego pomiędzy dniem podania VP-16 a dniem przeprowadzenia allo-HSCT. Uzasadnieniem dla tego stwierdzenia była obecność VP-16 w osoczu 84% dzieci 72 godziny po zakończeniu wlewu, czyli w dniu, w którym protokół ALL-SCT BFM-I zakłada przeprowadzenie allo-HSCT, oraz 39% dzieci 96 godzin po zakończeniu wlewu. U 37% dzieci VP-16 był oznaczalny w osoczu również 120 godzin po zakończeniu wlewu. Wydłużenie odstępu między podaniem VP-16 a allo-HSCT jest istotne, ponieważ mimo długo utrzymujących się stężeń VP-16 w osoczu dzieci, wartości Cl_s VP-16 u dzieci były większe w porównaniu z danymi z piśmiennictwa.

W przewidywaniu stężenia VP-16 w dniu allo-HSCT można opierać się na oznaczeniu stężenia VP-16 24 godziny przed planowaną allo-HSCT, ponieważ te stężenia korelowały ze stężeniami VP-16 w dniu allo-HSCT, niezależnie od tego, czy allo-HSCT przeprowadzono 3 lub 4 dni po podaniu VP-16.

W grupie dzieci uczestniczących w badaniach nie obserwowano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy dniem rekonstytucji granulopoezy i dniem rekonstytucji płytkotworzenia a parametrami farmakokinetycznymi VP-16. Dzień rekonstytucji granulopoezy i dzień rekonstytucji płytkotworzenia nie korelował również z wiekiem dzieci biorących udział w badaniu.

Większe prawdopodobieństwo wystąpienia wznowy ALL dotyczyło dzieci, u których stężenie VP-16 w osoczu było oznaczalne w dniu allo-HSCT. Wznowy ALL nie obserwowano u dzieci, u których stężenie VP-16 było nieoznaczalne w dniu allo-HSCT.

W badaniach *in vitro* wykazano, że VP-16 w stężeniu 0,03 $\mu\text{g/ml}$ hamuje proliferację stymulowanych PBMCs przy 72-godzinnej ekspozycji, co może wskazywać na

STRESZCZENIE

wpływ VP-16 na komórki efektorowe reakcji przeszczep przeciw białaczce, obecne w materiale przeszczepowym. Z tego powodu VP-16 może zwiększać ryzyko wznowy ALL po transplantacji. W przypadku 24-godzinnej ekspozycji na VP-16 uruchomione zostają wewnątrzkomórkowe mechanizmy obronne, co skutkuje większą aktywnością proliferacji stymulowanych PBMCs przy wzroście stężenia VP-16 w porównaniu z wynikami otrzymanymi po 72-godzinnej ekspozycji.

9. ABSTRACT

Pharmacokinetics and clinical significance of etoposide high-doses in conditioning prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia

In children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) improves the outcomes of the conventional chemotherapy, however does not guarantee the sustained remission. The failure of the allo-HSCT may be caused not only due to various complications related to the transplant procedure but mainly due to the occurrence of ALL relapse. Therefore, in children with ALL further optimization of the conditioning regimen antileukemic effect is still required, e.g. including the results of pharmacokinetic studies of the drugs used in conditioning. In children with ALL the most frequently used conditioning consists of etoposide (VP-16) and fractionated total body irradiation (FTBI). According to the current protocol applied in pediatric transplantation centers, high dose of VP-16 (60 mg/kg) is administered in 4 h i.v. infusion 72 hours before allo-HSCT.

The aim of study was to determine the concentrations of total and free VP-16 administered at high dose in combination with FTBI in children with ALL conditioned to allo-HSCT. The study included VP-16 pharmacokinetic parameters calculations and the analysis of the parameters correlations with granulocytes and platelets recovery as well as with the probability of leukemia free survival. The influence of VP-16 pharmacokinetic parameters on the non-hematological regimen related toxicity, observed until day +100, was also assessed. The influence of *in vitro* VP-16 concentrations observed on allo-HSCT day on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was also checked.

The study included 36 children, aged 2 to 19 years, receiving VP-16 in conditioning prior to allo-HSCT at dose: 60 mg/kg (n=31), 40 mg/kg (n=3) or 30 mg/kg (n=2). VP-16 was administered in 4 h i.v. infusion 72 h (3 days) or 96 h (4 days) before allo-HSCT. Most children (n=22) received stem cells from matched sibling donor. Stem cells from matched unrelated donor were infused to 14 children. The sources of stem cells were bone marrow for 19 children and peripheral blood for 17 children.

The results showed high variability of VP-16 pharmacokinetic parameters such as maximum concentration, systemic clearance (Cl_s), the area under time-concentration curve (AUC), mean residence time (MRT_{tot}), the central compartment volume, biological half-lives of α , β and γ phases. Free VP-16 plasma concentration and the unbound fraction were also variable in children receiving the dose of 60 mg/kg. The body weight was correlated with AUC and higher AUC and MRT_{tot} values were found in boys.

The results may indicate the necessity of longer time interval between VP-16 administration day and allo-HSCT as the VP-16 was detectable in 84% of children plasma samples collected 72 h after the end of infusion, which should be the day of allo-HSCT according to ALL-SCT BFM-I protocol. The VP-16 was still present in 39% of children 96 h after the end of infusion as well as in 37% of children 120 h after the end of infusion. The time extension is even more important as the VP-16 Cl_s values were higher comparing to the literature data.

The VP-16 concentrations determined 24 h before the allo-HSCT correlated with the VP-16 concentrations on allo-HSCT day (3 or 4 days after VP-16 administration) therefore, they may be useful in predicting VP-16 concentration on allo-HSCT day.

There were no significant correlations between granulocytes or platelets recovery and VP-16 pharmacokinetic parameters. The day of granulocytes or platelets recovery did not correlate with children age.

The probability of ALL relapse was higher in children with VP-16 detectable in plasma samples collected on the day of allo-HSCT. ALL relapse was not observed in children with VP-16 not detectable on the allo-HSCT day.

In vitro studies showed that VP-16 concentration of 0.03 $\mu\text{g/ml}$ inhibited the proliferation activity of stimulated PBMCs after 72 h exposition. It may suggest that VP-16 influences graft versus leukemia effector cells present in transplated material and thus increase the probability of ALL relapse. After 24 h exposition on VP-16 the intracellular defensive mechanism were probably activized leading to higher proliferation activity of stimulated PBMCs concurrently with higher VP-16 concentrations in comparison to 72 h exposition.

10. PIŚMIENICTWO

1. Ljungman P., Urbano-Ispizua A., Cavazzana-Calvo M., i wsp. for the European Group for Blood and Marrow Transplantation: *Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe*, Bone Marrow Transplant. 2006; 37: 439–449.
2. Ljungman P., Bregni M., Brune M., Cornelissen J., de Witte T., Dini G., Einsele H., Gaspar H.B., Gratwohl A., Passweg J., Peters C., Rocha V., Saccardi R., Schouten H., Sureda A., Tichelli A., Velardi A., Niederwieser D; European Group for Blood and Marrow Transplantation: *Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009*, Bone Marrow Transplant. 2010; 45: 219-234.
3. Wachowiak J., Labopin M., Miano M., Chybicka A, Stary J, Sterba J, Masszi T, Labar B, Maschan A, Kowalczyk JR, Lange A, Holowiecki J, Kalman N, Afanassiev BV, Dini G; EBMT Paediatric Working Party: *Haematopoietic stem cell transplantation in children in eastern European countries 1985–2004: development, recent activity and role of the EBMT/ESH Outreach Programme*, Bone Marrow Transplant. 2008; 41: S112–S117.
4. Stein A.S., O'Donnell M.R., Synold T.W., Dagens A.C., Tsiurunyan A., Nademane A.P., Parker P.M., Pullarkat V.A., Snyder D.S., Spielberger R.T., Wong J.Y., Alvarnas J.C., Thomas S.H., Forman S.J.: *Phase-2 trial of an intensified conditioning regimen for allogeneic hematopoietic cell transplant for poor-risk leukemia*, Bone Marrow Transplant. 2011; 46: 1256–1262.
5. Bunin N., Aplenc R., Kamani N., Shaw K., Cnaan A, Simms S.: *Randomized trial of busulfan vs total body irradiation containing conditioning regimens for children with acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study*, Bone Marrow Transplant. 2003; 32: 543–548.

6. Wachowiak J. *Transplantacje komórek krwiotwórczych u dzieci*. Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej. Red. Kowalczyk J.R.
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 2011, 121-138.
7. Dopfer R., Henze G., Bender-Götze C., Ebell W., Ehninger G., Friedrich W., Gadner H., Klingebiel T., Peters C., Riehm H.: *Allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission after intensive primary and relapse therapy according to the BFM- and CoALL-protocols: results of the German Cooperative Study*,
Blood 1991; 78: 2780-2784.
8. Hartmann J.T., Lipp H.P.: *Camptothecin and Podophyllotoxin Derivatives Inhibitors of Topoisomerase I and II – Mechanisms of Action, Pharmacokinetics and Toxicity Profile*,
Drug Saf. 2006; 29: 209-230.
9. Toffoli G., Corona G., Basso B., Boiocchi M.: *Pharmacokinetic optimisation of treatment with oral etoposide*,
Clin. Pharmacokinet. 2004; 43: 441-466.
10. Rodman J.H., Murry D.J., Madden T., Santana V.M.: *Altered etoposide pharmacokinetics and time to engraftment in pediatric patients undergoing autologous bone marrow transplantation*,
J. Clin. Oncol. 1994; 12: 2390–2397.
11. Littlewood T.J., Spragg B.P., Bentley D.P.: *When is autologous bone marrow transplantation safe after high dose treatment with etoposide?*,
Clin. Lab. Haematol. 1985; 7: 213–218.
12. Würthwein G., Klingebiel T., Krümpelmann S., Metz M., Schwenker K., Kranz K., Lanvers C., Boos J.: *Population pharmacokinetics of high-dose etoposide in children receiving different conditioning regimens*,
Anticancer Drugs 2002; 13: 101–110.
13. Liliemark E., Söderhäll S., Sirzea F., Gruber A., Osby E., Björkholm M., Zhou R., Peterson C., Liliemark J.: *Higher in vivo protein binding of etoposide in children compared with adult cancer patients*,
Cancer Lett. 1996; 106: 97-100.

14. Czyż A., Kozłowska-Skrzypczak M., Komarnicki M.: *Przeszczepianie hematopoetycznych komórek macierzystych*. Transplantologia w zarysie. Red. Dyszkiewicz W., Jemielity M., Wiktorowicz K.
Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2009, 175-206.
15. Jacobsohn D.A.: *Acute graft-versus-host disease in children*,
Bone Marrow Transplant. 2008; 41: 215–221.
16. de la Morena M.T., Gatti R.A.: *A history of bone marrow transplantation*,
Immunol. Allergy Clin. North Am., 2010; 30: 1-15.
17. Styczyński J.: *Przeszczepianie komórek krwiotwórczych: wczoraj, dziś i jutro*,
Wiadomości Akademickie, 2004, 4, 13-15.
18. Hołowiecki J.: *Transplantacja szpiku i komórek krwiotwórczych*,
Współczesna Onkol. 2000; 4: 195–202.
19. Thomas E.D.: *Bone Marrow Transplantation from the Personal Viewpoint*,
Int. J. Hematol. 2005; 81: 89-93.
20. Jansen J.: *The first successful allogeneic bone-marrow transplant: Georges Mathé*,
Transfus. Med. Rev. 2005; 19: 246-248.
21. Devine H., DeMeyer E.: *Hematopoietic cell transplantation in the treatment of leukemia*,
Semin. Oncol. Nurs. 2003; 19: 118-132.
22. Thomas E.D.: *A history of haemopoietic cell transplantation*,
Br. J. Haematol. 1999; 105: 330–339.
23. Cosimi A.B.: *Nobel Prizes in Medicine in the Field of Transplantation*,
Transplantation 2006; 82: 1558–1562.
24. McCullough J., Perkins H.A., Hansen J.: *The National Marrow Donor Program with emphasis on the early years*,
Transfusion 2006; 46: 1248-1255.

25. English D., Klingemann H.G.: *The Foundations of Cellular Therapy: Barnes and Loutit, 1957*,
J. Hematother. Stem Cell Res. 2001; 10: 323-324.
26. Gratwohl A. *Principles of conditioning*. The EBMT-ESH Handbook Haematopoietic stem cell transplantation. Red. Apperley J., Carreras E., Gluckman E., Gratwohl A., Masszi T., Genewa 2008, 128-142,
wersja elektroniczna podręcznika dostępna na stronie internetowej www.ebmt.org,
zakładka: „Education”, data wejścia 23.07.2012 r.
27. Rosti G., Ferrante P., Ledermann J., Leyvraz S., Ladenstein R., Koscileniak E., Crown J., Dazzi C., Cariello A., Marangolo M.: *High-dose chemotherapy for solid tumors: results of the EBMT*,
Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2002; 41: 129-140.
28. The European Group for Blood and Marrow Transplantation – www.ebmt.org,
zakładka: Members & Sponsors,
data wejścia 26.11.2012 r.
29. Wachowiak J.: *Przeszczepianie komórek krwiotwórczych u dzieci*,
Acta Haematol. Pol. 2009; 40: 321-331.
30. Klingebiel T., Bader P.: *HSCT for acute lymphoblastic leukaemia in children*. The EBMT-ESH Handbook Haematopoietic stem cell transplantation. Red. Apperley J., Carreras E., Gluckman E., Gratwohl A., Masszi T., ESH & EBMT, Paris 2008, 506-512,
wersja elektroniczna podręcznika dostępna na stronie internetowej www.ebmt.org,
zakładka: „Education”, data wejścia 30.07.2012 r.
31. Mehta P.A., Davies S.M.: *Allogeneic transplantation for childhood ALL*,
Bone Marrow Transplant. 2008; 41: 133–139.
32. Satwani P., Sather H., Ozkaynak F., Heerema N.A., Schultz K.R., Sanders J., Kersey J., Davenport V., Trigg M., Cairo M.S.: *Allogeneic bone marrow transplantation in first remission for children with ultra-high-risk features of acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group Study Report*,
Biol. Blood Marrow Transplant. 2007; 13: 218-227.

33. Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P., Hann I., De Rossi G., Felice M., Hovi L., LeBlanc T., Szczepanski T., Ferster A., Janka G., Rubnitz J., Silverman L., Stary J., Campbell M., Li C.K., Mann G., Suppiah R., Biondi A., Vora A., Valsecchi M.G.: *A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial*, Lancet 2007; 370: 240–250.
34. Balduzzi A., Valsecchi M.G., Uderzo C., De Lorenzo P., Klingebiel T., Peters C., Stary J., Felice M.S., Magyarosy E., Conter V., Reiter A., Messina C., Gadner H., Schrappe M.: *Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomization in an international prospective study*, Lancet 2005; 366: 635–642.
35. Pui C.H., Robison L.L., Look A.T.: *Acute lymphoblastic leukaemia*, Lancet 2008; 371: 1030–1043.
36. Marks D.I., Forman S.J., Blume K.G., Pérez W.S., Weisdorf D.J., Keating A., Gale R.P., Cairo M.S., Copelan E.A., Horan J.T., Lazarus H.M., Litzow M.R., McCarthy P.L., Schultz K.R., Smith D.D., Trigg M.E., Zhang M.J., Horowitz M.M.: *A comparison of cyclophosphamide and total body irradiation with etoposide and total body irradiation as conditioning regimens for patients undergoing sibling allografting for acute lymphoblastic leukemia in first or second complete remission*, Biol. Blood Marrow Transplant. 2006; 12: 438-453.
37. Sramkova L., Muzikova K., Fronkova E., Krejci O., Sedlacek P., Formankova R., Mejstrikova E., Stary J., Trka J.: *Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia*, Pediatr. Blood Cancer 2007; 48: 93-100.
38. Peters C. Multicenter therapy study: *ALL SCT BFM international. Allogeneic stem cell transplantation in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. International Therapy Protocol*, March 2006.
39. Peters C, Schrauder A, Schrappe M, von Stackelberg A, Stary J, Yaniv I, Gadner H, Klingebiel T; BFM Study Group, the IBFM-Study Group and the Paediatric Disease Working Party of the EBMT: *Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukaemia: the BFM/IBFM/EBMT concepts*,

Bone Marrow Transplant. 2005; 35, S9–S11.

40. Sanders J.E., Im H.J., Hoffmeister P.A., Gooley T.A., Woolfrey A.E., Carpenter P.A., Andrews R.G., Bryant E.M., Appelbaum F.R.: *Allogeneic hematopoietic cell transplantation for infants with acute lymphoblastic leukemia*, Blood 2005; 105: 3749-3756.
41. Schrauder A., Reiter A., Gadner H., Niethammer D., Klingebiel T., Kremens B., Peters C., Ebell W., Zimmermann M., Niggli F., Ludwig W.D., Riehm H., Welte K., Schrappe M.: *Superiority of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results from ALL-BFM 90 and 95*, J. Clin. Oncol. 2006; 24: 5742-5749.
42. Ribera J.M., Ortega J.J., Oriol A., Bastida P., Calvo C., Pérez-Hurtado J.M., González-Valentín M.E., Martín-Reina V., Molinés A., Ortega-Rivas F., Moreno M.J., Rivas C., Egurbide I., Heras I., Poderós C., Martínez-Revuelta E., Guinea J.M., del Potro E., Deben G.: *Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic, or autologous stem-cell transplantation as postremission treatment for children with very high risk acute lymphoblastic leukemia: PETHEMA ALL-93 Trial*, J. Clin. Oncol. 2007; 25: 16-24.
43. *Protokół leczenia ostrej białaczki mieloblastycznej u dzieci i młodzieży. Opracowany na podstawie programu AML-BFM 2004 INTERIM Gesellschaft für Pädiatrisch Onkologie und Hämatologie (GPOH). Tłumaczenie wersji niemieckiej programu z uwzględnieniem uzupełnień Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków, Kraków 2005.*
44. Kaspers G., Creutzig U.: *Internationale Therapiestudie Relapsed AML 2001/01 bei refraktärer und rezidivierter acuter myeloischer Leukämie im Kindes- und Jugendalter für die AML-BFM-Studiengruppen.*
45. Sureda A., Canals C., Arranz R., Caballero D., Ribera J.M., Brune M., Passweg J., Martino R., Valcárcel D., Besalduch J., Duarte R., León A., Pascual M.J., García-Noblejas A., López Corral L., Xicoy B., Sierra J., Schmitz N.: *Allogeneic stem cell transplantation after reduced intensity conditioning in patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. Results of the HDR-ALLO study – a prospective clinical trial by the Grupo Español de Linfomas/ Trasplante de Médula Osea*

(GEL/TAMO) and the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation,

Haematologica 2012; 97: 310-317.

46. Vettenranta K.: *Current European practice in pediatric myeloablative conditioning,* Bone Marrow Transplant. 2008; 41: S14–S17.
47. Gupta T., Kannan S., Dantkale V., Laskar S.: *Cyclophosphamide plus total body irradiation compared with busulfan plus cyclophosphamide as a conditioning regimen prior to hematopoietic stem cell transplantation in patients with leukemia: a systematic review and meta-analysis,* Hematol. Oncol. Stem Cell Ther. 2011; 4: 17-29.
48. Davies S.M., Ramsay N.K., Klein J.P., Weisdorf D.J., Bolwell B., Cahn J.Y., Camitta B.M., Gale R.P., Giralt S., Heilmann C., Henslee-Downey P.J., Herzig R.H., Hutchinson R., Keating A., Lazarus H.M., Milone G.A., Neudorf S., Perez W.S., Powles R.L., Prentice H.G., Schiller G., Socié G., Vowels M., Wiley J., Yeager A., Horowitz M.M.: *Comparison of preparative regimens in transplants for children with acute lymphoblastic leukemia,* J. Clin. Oncol. 2000; 18: 340-347.
49. Hamidieh A., Kargar M., Jahani M., Alimoghaddam K., Bahar B., Mousavi S.A., Iravani M., Jalali A., Jalili M., Ghavamzadeh A.: *The outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplants without total body irradiation in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: single centre experience,* J. Pediatr. Hematol. Oncol. 2012; 34: 101-107.
50. Al-Seraihy A., Ayas M., Al-Nounou R., El-Solh H., Al-Ahmari A., Al-Jefri A., Belgaumi A.: *Outcome of allogeneic stem cell transplantation with a conditioning regimen of busulfan, cyclophosphamide and low-dose etoposide for children with myelodysplastic syndrome,* Hematol. Oncol. Stem Cell Ther. 2011; 4: 121-125.
51. Al-Zahrani H., Nassar A., Al-Mohareb F., Al-Sharif F., Mohamed S., Al-Anazi K., Patel M., Rasheed W., Saleh A.J., Bakr M., Ahmed S., Ibrahim K., Hussain F., Elkum N., Elhassan T., Nurgat Z., Chaudhri N., Aljurf M.: *Fludarabine-based conditioning chemotherapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acquired severe aplastic anemia,*

- Biol. Blood Marrow Transplant. 2011; 17: 717-722.
52. Główka F.K., Romański M., Wachowiak J.: *High-dose treosulfan in conditioning prior to hematopoietic stem cell transplantation*,
Expert Opin. Investig. Drugs 2010; 19: 1275-1295.
 53. Munkelt D., Koehl U., Kloess S., Zimmermann S.Y., Kalaäoui R.E., Wehner S., Schwabe D., Lehrnbecher T., Schubert R., Kreuter J., Klingebiel T., Esser R.: *Cytotoxic effects of treosulfan and busulfan against leukemic cells of pediatric patients*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 2008; 62: 821–830.
 54. Wachowiak J., Sykora K.W., Cornish J., Chybicka A., Kowalczyk J.R., Gorczyńska E., Choma M., Grund G., Peters C; EBMT Pediatric Diseases Working Party.: *Treosulfan-based preparative regimens for allo-HSCT in childhood hematological malignancies: a retrospective study on behalf of the EBMT pediatric diseases working party*,
Bone Marrow Transplant. 2011; 46: 1510–1518.
 55. Cutting R., Mirelman A., Vora A.: *Treosulphan as an alternative to busulphan for myeloablative conditioning in paediatric allogeneic transplantation*,
Br. J. Haematol. 2008; 143: 748-751.
 56. Servais S., Baron F., Beguin Y.: *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) after reduced intensity conditioning*,
Transfus. Apher. Sci. 2011; 44: 205-210.
 57. Maris M.B., Storb R.: *Allogeneic hematopoietic cell transplantation as consolidation immunotherapy of cancer after autologous transplantation*,
Acta Haematol. 2005; 114: 221–229.
 58. Satwani P., Cooper N., Rao K., Veys P., Amrolia P.: *Reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation in childhood malignant and nonmalignant diseases*,
Bone Marrow Transplant. 2008; 41: 173–182.
 59. Uzunel M., Jaksch M., Mattsson J., Ringdén O.: *Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukemia*,
Br. J. Haematol. 2003; 122: 788–794.

-
60. Schilham M.W., Balduzzi A., Bader P.; PD-WP of the EBMT: *Is there a role for minimal residual disease levels in the treatment of ALL patients who receive allogeneic stem cells?*,
Bone Marrow Transplant. 2005; 35: S49–S52.
61. Petrovic A., Hale G.: *Clinical options after failure of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematologic malignancies*,
Expert Rev. Clin. Immunol. 2011; 7: 515–525.
62. Dorr R.T, Briggs A., Kintzel P., Meyers R., Chow H.H. List A.: *Comparative pharmacokinetic study of high-dose etoposide and etoposide phosphate in patients with lymphoid malignancy receiving autologous stem cell transplantation*,
Bone Marrow Transplant. 2003; 31: 643–649.
63. Hande K.R.: *Etoposide: Four Decades of Development of a Topoisomerase II Inhibitor*,
Eur. J. Cancer, 1998; 34: 1514-1521.
64. Cragg G.M., Newman D.J.: *Plants as a source of anti-cancer agents*,
J. Ethnopharmacol. 2005; 100: 72–79.
65. Hande K.R.: *Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II*,
Biochim. Biophys. Acta 1998; 1400: 173-184.
66. Jasti B.R., Du J., Vasavada R.C.: *Characterization of thermal behavior of etoposide*,
Int. J. Pharm. 1995; 118: 161-167.
67. Canel C., Moraes R.M., Dayana F.E., Ferreira D.: *Podophyllotoxin*,
Phytochemistry 2000; 54: 115-120.
68. Hande K.R.: *Topoisomerase II inhibitors*,
Update Cancer Ther. 2006; 1: 3–15.
69. Kreis W., Budman D.R., Vinciguerra V., Hock K., Baer J., Ingram R., Schacter L.P., Fields S.Z.: *Pharmacokinetic evaluation of high-dose etoposide phosphate after a 2-hour infusion in patients with solid tumors*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 1996; 38: 378-384.

-
70. Zhang F., Koh G.Y., Hollingsworth J., Russo P.S., Stout R.W., Liu Z.: *Reformulation of etoposide with solubility-enhancing rubusoside*,
Int. J. Pharm. 2012; 434: 453-459.
71. Reif S., Kingreen D., Kloft C., Grimm J., Siegert W., Schunack W., Jaehde U.: *Bioequivalence investigation of high-dose etoposide and etoposide phosphate in lymphoma patients*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 2001; 48: 134-140.
72. Guo A., Marinaro W., Hu P., Sinko P.J.: *Delineating the contribution of secretory transporters in the efflux of etoposide using Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells overexpressing P-glycoprotein (Pgp), multidrug resistance-associated protein (MRP1), and canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT)*,
Drug Metab. Dispos. 2002; 30: 457-463.
73. Reif S., Nicolson M.C., Bisset D., Reid M., Kloft C., Jaehde U., McLeod H.L.: *Effect of grapefruit juice intake on etoposide bioavailability*,
Eur. J. Clin. Pharmacol. 2002; 58: 491-494.
74. Groninger E., Proost J.H., de Graafa S.S.: *Pharmacokinetic studies in children with cancer*,
Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2004; 52: 173-97.
75. Mross K., Bewermeier P., Reifke J., Krüger W., Stockschräder M., Zander A., Hossfeld D.K.: *Pharmacokinetics of high-dose VP-16: 6-hour infusion versus 34-hour infusion*,
Bone Marrow Transplant. 1994; 13: 423-430.
76. Liu B., Earl H.M., Poole C.J., Dunn J., Kerr D.J.: *Etoposide protein binding in cancer patients*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 1995; 36: 506-512.
77. Schwinghammer T.L., Fleming R.A., Rosenfeld C.S., Przepiorcka D., Shadduck R.K., Bloom E.J., Stewart C.F.: *Disposition of total and unbound etoposide following highdose therapy*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 1993; 32: 273-278.
78. Stewart C.F., Fleming R.A., Arbuck S.G., Evans W.E.: *Prospective evaluation of a model for predicting etoposide plasma protein binding in cancer patients*,

- Cancer Res. 1990; 50: 6854-6856.
79. van Schaik R.H.: *CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy*, Drug Resist. Updat. 2008; 11: 77-98.
 80. Zhuo X., Zheng N., Felix C.A., Blair I.A.: *Kinetics and regulation of cytochrome P450-mediated etoposide metabolism*, Drug Metab. Dispos. 2004; 32: 993-1000.
 81. Kishi S., Yang W., Boureau B., Morand S., Das S., Chen P., Cook E.H., Rosner G.L., Schuetz E., Pui C.H., Relling M.V.: *Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia*, Blood 2004; 103: 67-72.
 82. Perek D. *Podstawy chemioterapii. Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej.* Red. Kowalczyk J.R. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 2011, 87-98.
 83. Nam C., Yamauchi H., Nakayama H., Doi K.: *Etoposide induces apoptosis and cell cycle arrest of neuroepithelial cells in a p53-related manner*, Neurotoxicol. Teratol. 2006; 28: 664-672.
 84. Lum B., Kaubisch S., Fisher G., Brown B., Sikic B.: *Effect of high-dose cyclosporine on etoposide pharmacodynamics in a trial to reverse P-glycoprotein (MDR1 gene) mediated drug resistance*, Cancer Chemother. Pharmacol. 2000; 45: 305-311.
 85. Joel S.: *The clinical pharmacology of etoposide: an update*, Cancer Treat. Rev. 1996; 22: 179-221.
 86. Zaremba M.: *Lekooporność w nowotworach wieku dziecięcego. Część I – białka związane z lekoopornością*, Onkol. Pol. 2005; 8: 57-61.
 87. CárceI-Trullols J., Torres-Molina F., Araico A., Saadeddin A., Peris J.E.: *Effect of cyclosporine A on the tissue distribution and pharmacokinetics of etoposide*, Cancer Chemother. Pharmacol. 2004; 54: 153-160.

88. Starý Jan i wsp.: *ALLIC BFM 2002 A randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia*, May 2002.
89. *High risk neuroblastoma study 1 of SIOP – Europe (SIOPEN)*. International Society of Paediatric Oncology, 2007.
90. *CWS-2006 – A guidance for risk adapted treatment of soft tissue sarcoma in children, adolescent, and young adults. Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe CWS der GPOH in cooperation with the European paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group EpSSG, Version 1.3*, December 15, 2006.
91. Craft A. E., Jürgens H., Dirksen U.: *EWING 2008*. Version 1.5, April 20, 2009.
92. Woźniak W., Karwicki M., Rychłowska-Pruszyńska M., Ługowska I.: *Polska Pediatryczna Grupa Guzów Litych: Leczenie mięsaka kościopochodnego u dzieci i młodych dorosłych*. Instytut Matki i Dziecka, Warszawa 14 września 2009 r.
93. *Ujednolicony, zmodyfikowany program diagnostyki i kompleksowego leczenia nowotworów ośrodkowego układu nerwowego u dzieci, ze szczególnym uwzględnieniem chemioterapii*, Ośrodek koordynujący- Instytut „Pomnik- Centrum Zdrowia Dziecka”. Warszawa 2007.
94. *Strategia leczenia złośliwych guzów zarodkowych o lokalizacji pozamózgowej u dzieci – TGM 95*. Francuskie Stowarzyszenie Onkologii Pediatrycznej S.F.O.P., 1994.
95. *Nerczak płodowy. Zalecenia terapeutyczne*, Wg protokołu SIOP Nephroblastoma December 2001
96. Edick M.J., Gajjar A., Mahmoud H.H., van de Poll M.E., Harrison P.L., Panetta J.C., Rivera G.K., Ribeiro R.C., Sandlund J.T., Boyett J.M., Pui C.H., Relling M.V.: *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral etoposide in children with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia*, J. Clin. Oncol. 2003; 21: 1340-1346.
97. Mross K., Reifke J., Bewermeier P., Krüger W., Hossfeld D.K., Zander A.: *The pharmacokinetics and toxicity of two application schedules with high-dose VP-16 in patients receiving an allogeneic bone marrow transplantation*,

Ann. Oncol. 1996; 7: 83–88.

98. Würthwein G., Boos J.: *Low dose-high dose: what is the right dose? Pharmacokinetic modeling of etoposide*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 2002; 49: 303-308.
99. Kersting G., Willmann S., Würthwein G., Lippert J., Boos J., Hempel G.: *Physiologically based pharmacokinetic modeling of high- and low-dose etoposide: from adults to children*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 2012; 69: 397–405.
100. Canal P., Chatelut E., Guichard S.: *Practical treatment guide for dose individualisation in cancer chemotherapy*,
Drugs 1998; 56: 1019-1038.
101. Veal G.J., Errington J., Thomas H.D., Boddy A.V., Lowis S.: *Biliary excretion of etoposide in children with cancer*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 2006; 58: 415–417.
102. Dembowska-Bagińska B. *Działania niepożądane cytostatyków. Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej*. Red. Kowalczyk J.R.
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 2011, 139-150.
103. Pui C.H., Relling M.V.: *Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukaemia*,
Br. J. Haematol. 2000; 109: 13-23.
104. Bosch T.M., Meijerman I., Beijnen J.H., Schellens J.H.: *Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer*,
Clin. Pharmacokinet. 2006; 45: 253-285.
105. Woo M.H., Shuster J.J., Chen C., Bash R.O., Behm F.G., Camitta B., Felix C.A., Kamen B.A., Pui C.H., Raimondi S.C., Winick N.J., Amylon M.D., Relling M.V.: *Glutathione S-transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid malignancies*,
Leukemia 2000; 14: 232–237.

106. Simbre V.C., Duffy S.A., Dadlani G.H., Miller T.L., Lipshultz S.E.: *Cardiotoxicity of cancer chemotherapy: implications for children*, Paediatr. Drugs 2005; 7: 187-202.
107. Lacayo N.J., Lum B.L., Becton D.L., Weinstein H., Ravindranath Y., Chang M.N., Bomgaars L., Lauer S.J., Sikic B.I., Dahl G.V.: *Pharmacokinetic interactions of cyclosporine with etoposide and mitoxantrone in children with acute myeloid leukemia*, Leukemia 2002; 16: 920–927.
108. Kawashiro T., Yamashita K., Zhao X.J., Koyama E., Tani M., Chiba K., Ishizaki T.: *A study on the metabolism of etoposide and possible interaction with antitumor or supporting agents by human liver microsomes*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998; 286: 1294-1300.
109. Antoniou T., Tseng A.: *Interactions between antiretrovirals and antineoplastic drug therapy*, Clin. Pharmacokinet. 2005; 44: 111-145.
110. Bossaer J.B., Odle B.L.: *Probable etoposide interaction with Echinacea*, J. Diet. Suppl. 2012; 9: 90-95.
111. Lagas J.S., Fan L., Wagenaar E., Vlaming M.L., van Tellingen O., Beijnen J.H., Schinkel A.H.: *P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide*, Clin. Cancer Res. 2010; 16:130-140.
112. Veal G.J., Cole M., Errington J., Pearson A.D., Gerrard M., Whyman G., Ellershaw C., Boddy A.V.: *Pharmacokinetics of carboplatin and etoposide in infant neuroblastoma patients*, Cancer Chemother. Pharmacol. 2010; 65: 1057–1066.
113. de Jonge M.E., Huitema A.D., Schellens J.H., Rodenhuis S., Beijnen J.H.: *Individualised cancer chemotherapy: strategies and performance of prospective studies on therapeutic drug monitoring with dose adaptation*, Clin. Pharmacokinet. 2005; 44: 147-173.
114. Gerritsen-van Schieveen P., Royer B.; Therapeutic Drug Monitoring Group of the French Society of Pharmacology and Therapeutics: *Therapeutic Drug Monitoring*

Group of the French Society of Pharmacology and Therapeutics. Level of evidence for therapeutic drug monitoring for etoposide after oral administration,
Fundam. Clin. Pharmacol. 2011; 25: 277-282.

115. Würthwein G., Krümpelmann S., Tillmann B., Real E., Schulze-Westhoff P., Jürgens H., Boos J.: *Population pharmacokinetic approach to compare oral and i.v. administration of etoposide,*
Anticancer Drugs 1999; 10: 807-814.
116. van den Bongard H.J., Mathôt R.A., Beijnen J.H., Schellens J.H.: *Pharmacokinetically guided administration of chemotherapeutic agents,*
Clin. Pharmacokinet. 2000; 39: 345-367.
117. Panetta J.C., Wilkinson M., Pui C.H., Relling M.V.: *Limited and optimal sampling strategies for etoposide and etoposide catechol in children with leukemia,*
J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. 2002; 29: 171-188.
118. Perdaems N., Bachaud J.M., Rouzaud P., Murriss-Espin M., Hermant C., Mihura J., Lochon I., Houin G., Canal P., Chatelut E.: *Relation between unbound plasma concentrations and toxicity in a prolonged oral etoposide schedule,*
Eur. J. Clin. Pharmacol. 1998; 54: 677-683.
119. Skibińska Ł.: *High-performance liquid chromatography in monitoring of concentrations of total and free etoposide in plasma,*
Chem. Anal., 2001, 46, 849-855.
120. Chrzanowska M., Sobiak J., Grund G., Wachowiak J.: *Pharmacokinetics of high-dose etoposide administered in combination with fractionated total-body irradiation as conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia,*
Pediatr. Transplant. 2011; 15: 96-102.
121. Chrzanowska M., Figas J., Wachowiak N., Żytkiewicz C.: *Walidacja metody HPLC analizy ilościowej etopozylu z przeznaczeniem do terapeutycznego monitorowania u dzieci przed transplantacją szpiku kostnego,*
Apteka Eduk. 2006; 3 (supl): XIII-XIV.
122. Rzepecki P., Sarosiek T., Szczylik C.: *Zastosowanie ifosfamidu w leczeniu chłoniaków u dzieci.*

Współczesna Onkol. 2004; 8: 509–513.

123. Wachowiak J. *Przeszczepianie allogenicznych macierzystych komórek krwiotwórczych*. Hematologia molekularna patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze. Red. Witt M., Szczepański T., Dawidowska M. Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 2009, 139-162.
124. Stiff P.: *Mucositis associated with stem cell transplantation: current status and innovative approaches to management*, Bone Marrow Transplant. 2001; 27: S3–S11.
125. Brentjens R.J.: *Cellular therapies in acute lymphoblastic leukemia*, Curr. Opin. Mol. Ther. 2009; 11: 375-382.
126. Shigematsu A., Tanaka J., Suzuki R., Atsuta Y., Kawase T., Ito Y.M., Yamashita T., Fukuda T., Kumano K., Iwato K., Yoshida F., Kanamori H., Kobayashi N., Fukuhara T., Morishima Y., Imamura M.: *Outcome of medium-dose VP-16/CY/TBI superior to CY/TBI as a conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia*, Int. J. Hematol. 2011; 94: 463–471.
127. Shigematsu A., Kondo T., Yamamoto S., Sugita J., Onozawa M., Kahata K., Endo T., Shiratori S., Ota S., Obara M., Wakasa K., Takahata M., Takeda Y., Tanaka J., Hashino S., Nishio M., Koike T., Asaka M., Imamura M.: *Excellent outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a conditioning regimen with medium-dose VP-16, cyclophosphamide and total-body irradiation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia*, Biol. Blood Marrow Transplant. 2008; 14: 568-575.
128. Bruserud O., Reikvam H., Kittang A.O., Ahmed A.B., Tvedt T.H., Sjo M., Hatfield K.J.: *High-dose etoposide in allogeneic stem cell transplantation*, Cancer Chemother. Pharmacol. 2012; 70: 765-782.
129. You B., Tranchand B., Girard P., Falandry C., Ribba B., Chabaud S., Souquet P.J., Court-Fortune I., Trillet-Lenoir V., Fournel C., Tod M., Freyer G.: *Etoposide pharmacokinetics and survival in patients with small cell lung cancer: A multicentre study*, Lung Cancer 2008; 62: 261-272.

130. Kato Y., Nishimura S., Sakura N., Ueda K.: *Pharmacokinetics of etoposide with intravenous drug administration in children and adolescents*,
Pediatr. Int. 2003; 45: 74–79.
131. Lowis S.P., Pearson A.D.J., Newell D.R., Cole M.: *Etoposide pharmacokinetics in children: The development and prospective validation of a dosing equation*,
Cancer Res. 1993; 53: 4881–4889.
132. Urien S., Doz F., Giraud C., Rey E., Gentet J.C., Chastagner P., Vassal G., Corradini N., Auvrignon A., Leblond P., Rubie H., Treluyer J.M.: *Developmental pharmacokinetics of etoposide in 67 children: lack of dexamethasone effect*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 2011; 67: 597–603.
133. Palle J., Frost B.M., Gustafsson G., Hellebostad M., Kanerva J., Liliemark E., Schmiegelow K., Lönnerholm G.: *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology Etoposide pharmacokinetics in children treated for acute myeloid leukemia*,
Anticancer Drugs 2006; 17: 1087–1094.
134. Baheti G., McGuire T.R., Davda J.P., Manouilov K.K., Wall D., Gwilt P.R., Gordon B.B.: *Clinical pharmacology of etoposide in children undergoing autologous stem cell transplantation for various solid tumours*,
Xenobiotica 2012; DOI: 10.3109/00498254.2012.713530.
135. Gervasini G., Vagace J.M.: *Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia*,
Front. Genet. 2012; 3: 249, DOI: 10.3389/fgene.2012.00249.
136. Krogh-Madsen M., Bender B., Jensen M.K., Nielsen O.J., Friberg L.E., Honoré P.H.: *Population pharmacokinetics of cytarabine, etoposide, and daunorubicin in the treatment for acute myeloid leukemia*,
Cancer Chemother. Pharmacol. 2012; 69: 1155-1163.
137. Toffoli G., Corona G., Sorio R., Robieux I., Basso B., Colussi A.M., Boiocchi M.: *Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral etoposide*,
Br. J. Clin. Pharmacol. 2001; 52: 511-519.
138. 2.28. Dvorak Z.: *Drug–drug interactions by azole antifungals: Beyond a dogma of CYP3A4 enzyme activity inhibition*,

Toxicol. Lett. 2011; 202: 129–132.

139. Zhang S., Pillai V.C., Mada S.R., Strom S., Venkataramanan R.: *Effect of voriconazole and other azole antifungal agents on CYP3A activity and metabolism of tacrolimus in human liver microsomes*,
Xenobiotica 2012; 42: 409–416.
140. Li Y., Theuretzbacher U., Clancy C.J., Nguyen M.H., Derendorf H.: *Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of posaconazole*,
Clin. Pharmacokinet. 2010; 49: 379–396.
141. Krüger W.H., Berger C., Mross K.B., Bewermeier P., Pichlmeier U., Stockschräder M., Schleimer B., Zander A.R.: *Inhibition of CFU-C growth by VP-16 containing plasma samples obtained from patients after conditioning therapy for bone marrow transplantation*,
Bone Marrow Transplant. 1995; 15: 9–15.
142. Tazawa Y., Matsumura K., Takekuma Y., Sugawara M.: *Schedule-dependent cytotoxicity of etoposide (VP-16) and cyclophosphamide in leukemia cell line K-562*,
Biol. Pharm. Bull. 2012; 35: 1132–1136.
143. Hoyt R., Ritchie D.S., Wirth A., Szer J., Grigg A.P.: *Etoposide induces more severe mucositis than CY when added to TBI as conditioning in allograft recipients receiving CsA and MTX*,
Bone Marrow Transplant. 2010; 45: 1457–1462.

11. ZAŁĄCZNIKI

11.1. Zgody Komisji Bioetycznych przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy na prowadzenie badań.



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersytecie Medycznym
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 35/10

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przekładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 07 stycznia 2010 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

prof. UM dr hab. Maria Chrzanowska

w sprawie prowadzenia badań w

Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

UM w Poznaniu

Główny badacz: mgr Joanna Sobiak

Członkowie zespołu

badawczego: prof. dr hab. Jacek Wachowiak

Temat

badania: "Kliniczne znaczenie badań farmakokinetyki etopozydu u dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 358 /2010

Bydgoszcz, 18.06.2010r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy Collegium Medicum

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **18.06.2010r.** przeanalizowała wniosek który złożył kierownik badania:

prof. dr hab. Maria Chrzanowska
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

z zespołem w składzie:

- **prof. dr hab. n. med. M. Wysocki, dr hab. med. J. Styczyński, prof. UMK, prof. dr hab. med. J. Wachowiak, prof. dr hab. n. med. J. Kowalczyk, dr n. med. A. Kołtan, dr. n. med. S. Kołtan, mgr J. Sobiak,**

w sprawie badania: „Kliniczne znaczenie badań farmakokinetyki etopozydu u dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od ich rodziców/opiekunów prawnych osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- **UWAGA!** W przypadku małoletnich, którzy ukończyli 16 lat życia oraz młodszych małoletnich, którzy są w stanie z rozeznanem wypowiedzieć się co do swojego udziału w badaniu obowiązuje również konieczność uzyskania zgody od tych małoletnich;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;

- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby (rodziców/opiekunów prawnych), a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (18.06.2010 r.) do końca 2012 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymują:

prof. dr hab. Maria Chrzanowska
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

ZAŁĄCZNIKI



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 736/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentyisty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 08 września 2011 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

dr hab. Maria Chrzanowska

w sprawie prowadzenia badań w

**Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UM w
Poznaniu**

Główny badacz: mgr Joanna Sobiak

**Członkowie zespołu
badawczego:**

**prof. dr hab. Jacek Wachowiak
dr hab. Dariusz Kowalczyk
dr Urszula Kazimierczak- Majchrzak**

Temat

**badania: "Ocena wpływu etopozydu na aktywność limfocytów T w
badaniach in- vitro".**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

11.2. Informacja dla pacjenta i rodziców lub przedstawiciela ustawowego oraz Formularz świadomej zgody pacjenta i jego przedstawiciela ustawowego.

Informacja dla pacjenta i rodziców lub przedstawiciela ustawowego

Nazwa ośrodka naukowego:
/pieczęć/

Temat badania: **Kliniczne znaczenie badań farmakokinetyki etopozydu u dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną**

Imię i nazwisko kierownika badania: **prof. UM dr hab. farm. Maria Chrzanowska**
Telefon kontaktowy: 0-61 854 64 36

Imię i nazwisko osoby badanej:
Wiek:

Szanowni Państwo,

Etopozyd jest lekiem cytostatycznym podawanym w połączeniu z napromienianiem całego ciała dzieciom chorym na ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL) w postępowaniu poprzedzającym allogeniczną transplantację szpiku kostnego (allo-BMT) i jest to obecnie najbardziej zalecany sposób postępowania u ww. dzieci. Allo-BMT wykonuje się tylko u tych dzieci, u których chemioterapia nadal zbyt często zawodzi, tj. u dzieci, u których w chwili rozpoznania spostrzega się wykładniki złego rokowania, a przede wszystkim u tych dzieci, u których wystąpiła wznowa ALL. W przypadku wznowy ALL prawdopodobieństwo uzyskania kolejnej trwałej remisji przy zastosowaniu wyłącznie chemioterapii jest niewielkie i wynosi poniżej 10%, a po allo-BMT wzrasta do 50-60%.

Prowadzone badania zmierzają do optymalizacji postępowania przygotowawczego poprzedzającego allo-BMT, które powinno wykazywać maksimum działania przeciwbiałaczkowego przy minimum toksyczności.

Próbki krwi (łącznie około 30 ml) będą pobierane przed rozpoczęciem wlewu dożylnego, przed zakończeniem wlewu a następnie po 2, 4, 8, 24, 48, 60, 72, 96 i 120 h po zakończeniu wlewu. Do pobierania próbek krwi zostanie wykorzystany centralny cewnik żylny zainstalowany w związku z planowaną transplantacją tzn. pobrania próbek krwi będą całkowicie niebolesne dla dziecka.

Zbieranie danych dotyczących prowadzonych badań i ich analiza odbywać się będą w ściśle poufny sposób z uwzględnieniem wszystkich zasad i przepisów dotyczących ochrony danych osobowych pacjentów. Dzięki Państwa / Pani / Pana zgodzie będzie można przeprowadzić badania, które przyczynią się do dalszej poprawy wyników postępowania przygotowawczego poprzedzającego allogeniczną transplantację szpiku kostnego u dzieci.

Jeżeli Pani/ Pan oczekuje dodatkowych informacji dotyczących badania prosimy o kontakt z:

prof. UM dr hab. farm. Maria Chrzanowska
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UM
60-781 Poznań, ul. Świecickiego 6
Tel. 0-61 854 64 36; Fax 0-61 854 64 30

Potwierdzenie przekazania i otrzymania informacji

Informacji udzieliła:	Imię i nazwisko	Data:	Podpis lekarza:
Rodzice dziecka	Imię i nazwisko	Data:	Jeden egz. nin. Informacji oraz informację o warunkach ubezpieczenia otrzymałem/łam Podpis:

ZAŁĄCZNIKI

Formularz świadomej zgody pacjenta i jego przedstawiciela ustawowego

Nazwa ośrodka naukowego
/pieczęć/

Temat badania: **Kliniczne znaczenie badań farmakokinetyki etopozydu u dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną**

Imię i nazwisko kierownika badania: **prof. UM dr hab. farm. Maria Chrzanowska**
Telefon kontaktowy: 0-61 854 64 36

Imię i nazwisko osoby badanej:
wiek:

Niniejszym oświadczam, że

Zostałem poinformowany o celu zamierzonych badań i sposobie ich przeprowadzenia oraz, że miałam/tem możliwość zadawania pytań prowadzącemu badanie i otrzymałam/tem odpowiedzi na te pytania. Rozumiem, na czym badania te mają polegać i do czego potrzebna jest moja zgoda. Zapoznałem się z treścią „*Informacji dla Rodziców badanego*”, której jeden egzemplarz otrzymałem.

Wiem, że mogę odmówić zgody na udział w badaniach lub cofnąć ją w każdej chwili – także podczas ich wykonywania, co w żaden sposób nie wpłynie na dalsze leczenie mojego dziecka.

W związku z udostępnieniem moich danych osobowych, wyrażam zgodę na ich przechowywanie, przetwarzanie i ewentualne anonimowe wykorzystanie do celów badawczych z zachowaniem tajemnicy lekarskiej. Przyjmuję do wiadomości, że dane te nie będą wykorzystywane ani udostępniane do celów pozamedycznych. Zgodę tę wyraziłam/tem w obecności świadka.

Otrzymałam/tem jeden egzemplarz niniejszego dokumentu.

Kierownik badań:	Data:	Podpis:
Rodzice lub opiekun prawny dziecka: <i>(należy wpisać właściwe)</i>	Data:	Podpis:
Świadek:	Data:	Podpis:

Uwaga: Nieodłączną częścią niniejszego oświadczenia jest „Informacja dla pacjenta”.

11.3. Charakterystyka dzieci przygotowywanych do allo-HSCT, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.

b.d. – brak danych

b.p.p. – brak przyjęcia przeszczepu

Tabela 1. Charakterystyka dzieci przygotowywanych do allo-HSCT, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c.

Lp.	powierzchnia ciała [m ²]	masa ciała [kg]	pleć	wiek [lata]	dzień podania VP-16	rok urodzenia	data allo-HSCT	wskazanie do allo-HSCT	CR	dawca	źródło komórek krwiotwórczych	kondycjonowana nie (oprócz VP-16)	pochodne triazolowe	uwagi
1	1,18	37	k	10	-4	1998	25.06.2008	ALL	1	MUD	PB	FTBI	nie	-
2	1,06	33	m	7	-3	1999	11.12.2006	ALL	1	MSD	PB	FTBI	tak	-
3	1,78	66	m	15	-3	1992	01.11.2007	ALL	1	MSD	PB	FTBI	nie	-
4	1,68	64,5	k	16	-3	1991	24.04.2007	ALL	2	MSD	PB	FTBI	tak	-
5	0,99	26	m	9	-3	2002	29.09.2011	ALL	2	MUD	PB	FTBI	tak	-
6	1,1	34,8	m	7	-4	1999	09.10.2006	ALL	1	MSD	BM	FTBI	nie	-
7	1,25	40	k	12	-4	1999	11.05.2011	ALL	2	MUD	PB	FTBI	nie	-
8	1,4	44,6	m	14	-4	1995	08.04.2009	ALL	1	MUD	PB	FTBI	nie	-
9	2	80	m	17	-3	1994	12.09.2011	ALL	2	MUD	PB	FTBI	nie	b.p.p.
10	0,95	25	k	9	-3	1999	18.01.2008	ALL	1	MSD	BM	FTBI	tak	-
11	1,05	27	m	14	-3	1997	22.11.2011	ALL	2	MSD	BM	FTBI	tak	-
12	1,19	35	m	14	-4	1996	06.04.2010	ALL	1	MSD	BM	FTBI	tak	-
13	1,54	50	k	18	-4	1990	14.05.2008	ALL	1	MSD	PB	FTBI	nie	-
14	1,74	67	m	12	-4	1995	14.12.2007	ALL	1	MUD	PB	FTBI	tak	-
15	1,55	55	m	16	-3	1992	06.03.2008	ALL	2	MUD	BM	FTBI	nie	b.p.p.
16	1,9	75	m	14	-4	1997	23.05.2011	ALL	1	MUD	PB	FTBI	nie	-
17	1,63	53,5	m	18	-4	1989	04.07.2007	ALL	1	MSD	BM	FTBI	tak	-
18	0,7	17	k	6	-4	2004	12.05.2010	ALL	2	MSD	BM	FTBI	tak	-
19	1,74	62	k	18	-4	1988	13.11.2006	ALL	2	MSD	BM	FTBI	tak	-
20	0,89	24	m	6	-4	2002	25.04.2008	ALL	1	MUD	PB	FTBI	nie	-
21	1,24	39	k	10	-4	1999	28.07.2009	ALL	1	MUD	BM	FTBI	nie	-
22	1,08	33,5	m	10	-4	1998	21.03.2008	ALL	1	MUD	PB	FTBI	nie	-
23	1,4	48	m	11	-3	1995	13.09.2006	ALL	1	MSD	BM	FTBI	nie	-
24	0,9	25	k	7	-4	1994	10.12.1999	ALL	2	MSD	BM	FTBI	b.d.	-
25	1,12	39	k	8	-4	1993	19.01.2001	ALL	2	MSD	BM	FTBI	b.d.	-
26	1,05	31	m	9	-4	1992	23.02.2001	ALL	2	MSD	BM	FTBI	b.d.	-
27	1,38	51	m	12	-4	1989	10.03.2000	NHL	1	MSD	BM	FTBI	b.d.	-
28	1,18	32	m	8	-3	1993	02.09.2000	ALL	2	MSD	BM	FTBI	b.d.	-
29	0,9	23,5	k	8	-4	1993	16.06.2000	ALL	1	MSD	BM	FTBI	b.d.	-
30	0,92	23	k	10	-4	1990	06.10.2000	NHL	2	MSD	BM	FTBI	b.d.	-
31	1,32	77	m	11	-3	2000	17.09.2011	ALL	3	MSD	PB	FTBI	tak	-

Tabela 2. Charakterystyka dzieci przygotowywanych do allo-HSCT, które otrzymały VP-16 w dawce 40 mg/kg m.c.

Lp.	powierzchnia ciała [m ²]	masa ciała [kg]	płeć	wiek [lata]	dzień podania VP-16	rok urodzenia	data allo-HSCT	wskazanie do allo-HSCT	CR	dawca	źródło komórek krwiotwórczych	kondycjonowanie (oprócz VP-16)	po pochodne triazolowe	uwagi
32	1,44	46,8	k	19	-4	1989	04.06.2008	ALL	1	MUD	PB	Treosulfan, CY	tak	-
33	0,49	10,5	k	2	-4	2007	10.04.2009	ALL	1	MUD	PB	BU, CY, Tymoglobulina	nie	-
34	0,47	10	k	2	-4	2005	12.03.2007	ALL	1	MUD	PB	Treosulfan, CY	tak	-

Tabela 3. Charakterystyka dzieci przygotowywanych do allo-HSCT, które otrzymały VP-16 w dawce 30 mg/kg m.c.

Lp.	powierzchnia ciała [m ²]	masa ciała [kg]	płeć	wiek [lata]	dzień podania VP-16	rok urodzenia	data allo-HSCT	wskazanie do allo-HSCT	CR	dawca	źródło komórek krwiotwórczych	kondycjonowanie (oprócz VP-16)	po pochodne triazolowe	uwagi
35	1,94	76,5	m	15	-4	1994	28.01.2009	ALL	1	MSD	BM	FTBI / CY	tak	-
36	0,61	14	k	4	-4	1997	17.03.2000	ALL	1	MSD	BM	BU, CY	b.d.	-

11.4. Parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w dniu podania VP-16 w dawkach 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c., w dniu allo-HSCT (dzień 0) oraz w trzeciej dobie po allo-HSCT (dzień +3).

W tabelkach kolorami zaznaczono wartości poszczególnych parametrów biochemicznych w zależności od wartości referencyjnych:

	<normy
	norma
	>normy

Tabela 1. Parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w dniu podania VP-16

Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	pleć	wiek [lata]
60 mg/kg m.c.											
1	2,0	-	0,6	14	21	163	6,0	55	-	k	10
2	2,7	-	0,8	26	20	-	5,4	62	-	m	7
3	0,8	0,0	0,8	31	24	86	5,0	67	95	m	15
4	3,7	3,2	0,8	49	15	-	5,6	61	175	k	16
5	1,5	0,8	0,4	66	33	92	6,5	42	97	m	9
6	0,7	0,0	0,9	58	27	846	5,5	51	90	m	7
7	2,5	-	0,3	20	12	106	5,5	71	120	k	12
8	3,6	-	0,9	22	55	53	6,0	66	103	m	14
9	5,7	-	0,6	12	10	94	3,9	55	>100	m	17
10	2,4	2,2	0,6	29	9	121	6,0	78	115	k	9
11	2,7	2,6	0,8	13	15	97	6,4	37	94	m	14
12	2,7	-	1,1	20	13	-	-	-	-	m	14
13	2,0	-	1,2	6	16	132	5,8	62	109	k	18
14	4,7	-	0,6	47	24	105	6,8	55	119	m	12
15	2,9	-	0,6	28	15	145	5,7	62	142	m	16
16	0,6	0,0	1,0	9	9	173	5,6	74	90	m	14
17	7,2	7,0	0,7	28	26	203	6,1	65	95	m	18
18	2,2	-	0,3	10	19	189	4,9	58	130	k	6
19	2,9	2,8	0,6	31	17	-	-	-	-	k	18
20	1,9	-	1,0	15	15	163	6,4	57	-	m	6
21	3,9	-	0,5	39	26	275	6,2	52	153	k	10
22	2,9	-	0,8	23	16	69	5,9	76	125	m	10
23	2,0	1,9	1,1	27	20	97	4,8	60	190	m	11
24	2,2	2,2	0,4	25	22	77	7,5	39	98	k	7
25	0,4	0,0	0,5	48	23	58	6,3	34	128	k	8
26	0,3	0,0	0,6	20	14	-	-	-	117	m	9
27	2,0	-	0,4	17	18	-	6,3	38	192	m	12
28	1,3	1,3	0,2	33	33	204	5,4	28	105	m	8
29	2,1	1,9	0,3	14	17	-	5,8	38	-	k	8
30	4,2	4,1	0,5	15	15	-	6,3	34	-	k	10
31	3,5	1,3	0,4	28	31	196	5,8	37	136	m	11

ZALĄCZNIKI

C.d. Tabela 1. Parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w dniu podania VP-16

Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	płeć	wiek [lata]
40 mg/kg m.c.											
32	2,7	-	0,5	24	15	129	5,4	54	50	k	19
33	2,1	-	0,4	16	28	-	5,3	62	-	k	2
34	4,2	-	0,4	33	27	-	5,6	55	-	k	2
Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	płeć	wiek [lata]
30 mg/kg m.c.											
35	3,5	-	0,6	17	13	-	5,8	65	-	m	15
36	1,1	0,6	0,2	18	34	80	5,8	36	-	k	4

Tabela 2. Parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w dniu allo-HSCT (dzień 0)

Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	pleć	wiek [lata]
60 mg/kg m.c.											
1	0,0	0,0	0,3	9	10	-	-	-	-	k	10
2	0,6	0,0	0,7	16	19	-	5,8	67	101	m	7
3	0,2	0,0	0,7	90	98	-	-	-	-	m	15
4	0,8	0,0	0,5	17	33	58	-	-	-	k	16
5	0,0	0,0	0,4	14	12	87	6,2	41	110	m	9
6	0,3	0,0	0,8	17	14	-	5,9	56	-	m	7
7	0,0	0,0	0,4	19	10	167	4,4	69	120	k	12
8	0,0	0,0	0,8	54	17	65	5,2	60	-	m	14
9	0,1	0,0	0,4	15	8	100	-	-	>100	m	17
10	1,5	-	0,6	20	12	-	-	-	-	k	9
11	1,0	0,8	0,7	12	14	92	6,2	37	97	m	14
12	0,4	0,0	0,8	15	26	-	6,3	-	-	m	14
13	0,3	0,0	0,8	6	17	-	6,2	63	104	k	18
14	0,0	0,0	0,7	24	9	76	5,7	58	91	m	12
15	0,0	0,0	0,4	12	9	-	-	-	-	m	16
16	0,0	0,0	0,9	7	6	143	5,4	60	110	m	14
17	0,5	0,0	0,5	15	14	-	-	-	-	m	18
18	0,4	0,0	0,3	9	20	-	5,1	-	-	k	6
19	0,4	0,0	0,6	12	12	209	6,3	68	119	k	18
20	0,0	0,0	0,4	15	10	-	-	-	72	m	6
21	0,0	0,0	0,6	16	9	100	4,7	54	-	k	10
22	0,0	0,0	0,6	20	10	-	-	-	-	m	10
23	0,3	0,0	0,6	10	10	-	5,6	61	-	m	11
24	0,2	0,0	0,2	12	14	-	-	-	-	k	7
25	0,0	0,0	0,4	19	17	-	-	-	-	k	8
26	0,2	0,0	0,3	10	13	-	-	-	-	m	9
27	0,2	0,0	0,3	24	27	76	6,0	32	-	m	12
28	0,2	0,0	0,3	15	26	-	5,2	28	65	m	8
29	0,4	0,0	0,3	8	16	-	-	-	109	k	8
30	0,0	0,0	0,2	10	13	-	-	-	-	k	10
31	1,1	0,5	0,5	18	24	192	5,7	38	141	m	11

C.d. Tabela 2. Parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w dniu allo-HSCT (dzień 0)

Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	płeć	wiek [lata]
40 mg/kg m.c.											
32	0,0	0,0	0,6	23	19	-	-	-	-	k	19
33	0,2	0,0	0,4	34	36	-	-	-	-	k	2
34	0,9	0,0	0,3	22	20	-	4,7	59	-	k	2
Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	płeć	wiek [lata]
30 mg/kg m.c.											
35	0,2	0,0	0,9	17	19	118	-	-	-	m	15
36	0,4	0,0	0,4	69	50	-	6,4	40	104	k	4

Tabela 3. Parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w trzeciej dobie po allo-HSCT (dzień +3)

Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	płeć	wiek [lata]
60 mg/kg m.c.											
1	0,0	0,0	0,7	8	9	362	5,9	50	-	k	10
2	0,2	0,0	0,9	8	14	-	4,8	55	-	m	7
3	0,2	0,0	1,0	96	60	-	-	-	-	m	15
4	0,5	0,0	0,6	26	25	-	-	-	-	k	16
5	0,0	0,0	0,5	6	11	90	6,4	39	119	m	9
6	0,3	0,0	0,6	10	10	-	-	-	-	m	7
7	0,0	0,0	0,6	18	11	167	6,0	66	120	k	12
8	0,0	0,0	-	45	25	90	-	-	-	m	14
9	0,0	0,0	0,7	8	7	111	4,7	60	90	m	17
10	0,0	0,0	0,8	14	12	329	6,6	63	-	k	9
11	0,2	0,2	0,8	15	19	91	6,3	36	92	m	14
12	0,1	0,0	0,6	12	21	-	-	-	-	m	14
13	0,2	0,0	1,0	7	9	83	5,2	67	-	k	18
14	0,1	0,0	2,0	35	17	-	-	-	-	m	12
15	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	m	16
16	0,0	0,0	1,2	8	7	321	5,8	66	110	m	14
17	0,4	0,0	0,6	20	17	-	6,1	56	93	m	18
18	0,1	0,0	0,3	12	19	-	-	-	-	k	6
19	0,3	0,0	0,5	10	11	-	-	-	-	k	18
20	0,0	0,0	0,5	14	13	178	-	-	-	m	6
21	0,0	0,0	0,5	12	10	-	-	-	-	k	10
22	0,0	0,0	-	-	-	206	5,3	50	-	m	10
23	0,1	0,0	0,5	9	12	-	-	-	-	m	11
24	0,2	0,0	0,3	14	16	101	6,1	28	149	k	7
25	0,0	0,0	0,3	15	18	125	7,0	35	117	k	8
26	0,0	0,0	0,7	12	14	-	6,5	35	-	m	9
27	0,0	0,0	0,3	42	29	107	6,0	30	174	m	12
28	0,0	0,0	0,3	14	20	83	5,7	32	107	m	8
29	0,0	0,0	0,2	7	17	107	5,5	30	-	k	8
30	0,0	0,0	0,2	9	14	74	5,5	31	133	k	10
31	0,8	0,3	0,4	16	15	190	5,8	37	148	m	11

C.d. Tabela 3. Parametry biochemiczne oznaczone u dzieci w trzeciej dobie po allo-HSCT (dzień +3)

Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	pleć	wiek [lata]
40 mg/kg m.c.											
32	0,1	0,0	1,0	18	15	138	6,3	60	66	k	19
33	0,0	0,0	0,6	16	15	221	6,8	55	-	k	2
34	0,1	0,0	0,3	20	21	-	-	-	-	k	2
Lp.	WBC [$\cdot 10^9/l$]	ANC [$\cdot 10^9/l$]	Bilirubina [mg/dl]	AlAT [U/l]	AspAT [U/l]	TG [mg/dl]	Białko całkowite [g]	Albuminy [g/l]	Cl _{cr} [ml/min]	pleć	wiek [lata]
30 mg/kg m.c.											
35	0,1	0,0	0,7	17	16	-	6,4	54	110	m	15
36	0,0	0,0	0,3	34	35	98	6,1	37	104	k	4

11.5. Stężenia VP-16 oznaczone do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.

^a stężenia normalizowane do dawki 60 mg/kg m.c.

Tabela 1. Stężenia VP-16 [$\mu\text{g/ml}$] oznaczone do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c.

Lp.	koniec wlewu	0,25 h	0,5 h	0,75 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	60 h	72 h	96 h	120 h	stężenie leku wolnego	procent leku wolnego
1	168,9	-	-	-	-	94,0	95,9	51,1	9,2	1,5	0,9	0,6	<LOQ	<LOQ	24,9	14,8
2	149,8	-	-	-	-	88,1	77,0	37,1	4,2	0,5	-	0,3	<LOQ	-	6,6	4,4
3	161,0	-	-	-	-	132,7	125,4	85,8	12,6	0,9	0,4	0,2	<LOQ	<LOQ	52,1	32,3
4	210,7	-	-	-	-	151,2	84,3	31,3	3,8	1,5	-	0,8	0,6	-	67,0	31,8
5	145,1	-	-	-	-	76,1	55,7	14,6	2,5	0,7	0,2	0,1	<LOQ	<LOQ	5,1	3,5
6	187,2	-	-	-	-	132,4	108,0	53,7	5,3	1,4	-	0,7	0,7	-	6,0	3,2
7	161,2	-	-	-	-	123,4	86,0	-	2,6	0,3	0,1	0,1	<LOQ	<LOQ	15,1	9,3
8	230,6	-	-	-	-	198,3	162,3	73,0	9,4	2,4	1,8	1,5	0,9	0,5	12,5	5,4
9 ^a	171,5	-	-	-	-	127,7	90,0	-	9,6	1,0	0,5	0,3	<LOQ	<LOQ	22,8	13,3
10	169,3	-	-	-	-	117,1	84,3	32,5	3,5	0,9	0,6	0,3	<LOQ	<LOQ	8,9	5,2
11	159,9	-	-	-	-	112,4	73,2	33,5	3,1	0,7	0,5	-	0,3	0,1	11,4	7,1
12	274,6	-	-	-	-	125,2	69,3	54,0	2,7	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	32,0	11,7
13	181,9	-	-	-	-	147,6	111,7	62,9	7,9	0,6	0,4	0,1	<LOQ	<LOQ	14,1	7,9
14	257,5	-	-	-	-	138,2	103,7	54,2	11,4	1,6	1,2	1,0	0,4	0,2	65,2	25,3
15	181,6	-	-	-	-	121,7	93,6	44,4	2,8	0,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11,6	6,4
16 ^a	176,0	-	-	-	-	153,8	118,8	59,4	10,4	0,4	0,2	0,1	<LOQ	<LOQ	28,7	16,3
17	165,4	-	-	-	-	62,8	72,2	32,9	6,3	1,0	0,8	0,4	0,3	0,2	65,9	39,9
18	131,6	-	-	-	-	76,0	49,6	-	0,6	-	0,3	0,2	0,2	0,2	6,3	4,8
19	183,2	-	-	-	-	111,5	74,3	12,7	3,0	0,4	-	0,2	<LOQ	-	11,3	6,2
20	147,9	-	-	-	-	87,1	55,7	33,7	4,1	2,0	1,3	0,9	<LOQ	<LOQ	22,8	15,4
21	172,0	-	-	-	-	123,9	102,1	42,4	2,8	0,6	0,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	9,5	5,5
22	139,9	-	-	-	-	103,3	86,0	50,0	9,6	0,4	0,2	0,1	<LOQ	<LOQ	13,5	9,6
23	244,6	-	-	-	-	135,4	102,8	69,1	11,2	1,3	-	0,8	0,5	-	8,8	3,6
24	268,3	204,7	191,1	182,0	161,3	155,6	77,1	37,4	1,4	0,1	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-
25	347,0	131,3	126,3	164,3	126,3	91,7	-	14,3	1,2	0,2	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-
26	166,8	151,4	156,7	107,9	93,6	71,3	-	-	1,2	0,2	-	<LOQ	<LOQ	-	3,8	2,3
27	242,2	231,2	214,7	203,6	192,0	177,0	124,4	62,4	3,0	1,1	-	0,5	0,3	-	28,5	11,8
28	187,0	160,0	135,9	143,8	123,4	98,6	80,6	28,2	3,3	0,7	-	0,3	<LOQ	-	7,9	4,2
29	-	172,8	166,3	149,0	134,7	102,0	63,4	25,0	1,0	0,2	-	0,2	0,1	-	3,2	1,8
30	175,2	-	144,2	-	120,8	-	-	-	0,9	0,4	-	0,3	0,1	-	2,8	1,6
31 ^a	302,0	-	-	-	-	223,6	152,9	27,4	-	1,0	0,7	0,8	-	0,3	27,9	9,2

Tabela 2. Stężenia VP-16 oznaczone do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 40 mg/kg m.c.

Lp.	koniec wlewu	0,25 h	0,5 h	0,75 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	60 h	72 h	96 h	120 h
32	359,7	-	-	-	-	105,3	73,6	33,3	9,9	1,6	0,6	0,2	<LOQ	<LOQ
33	199,0	-	-	-	-	73,2	34,5	12,0	1,4	0,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
34	88,0	-	-	-	-	41,9	25,1	5,1	1,3	0,7	-	0,6	0,6	-

Tabela 3. Stężenia VP-16 oznaczone do 120 godzin po zakończeniu wlewu u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 30 mg/kg m.c.

Lp.	koniec wlewu	0,25 h	0,5 h	0,75 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	60 h	72 h	96 h	120 h
35	90,3	-	-	-	-	71,5	50,3	38,9	4,5	-	0,2	0,1	<LOQ	<LOQ
36	-	93,7	92,5	86,0	69,2	49,2	28,6	8,3	0,3	0,1	-	<LOQ	<LOQ	-

11.6. Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.

Tabela 1. Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 60 mg/kg m.c.

Lp.	MRT _{tot}	V _c	Cl _s	Cl _s	AUC	C _{max}	t _{0,5 α}	t _{0,5 β}	t _{0,5 γ}	k ₁₂	k ₂₁	k ₁₃	k ₃₁	k ₁₀	C _{VP-16 w dniu allo- HSCT}	α	β	γ
	[h]	[l/kg]	[ml/min/kg]	[ml/min/m ²]	[μg/ml·h]	[μg/ml]	[h]	[h]	[h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[μg/ml]	[1/h]	[1/h]	[1/h]
1	11,9	0,35	0,83	26,0	1200,0	172,0	0,076	5,86	26,3	#####	6,910	0,0109	0,029	0,143	<LOQ	9,16	0,118	0,0264
2	9,6	0,39	1,13	35,3	883,0	153,0	0,070	4,70	39,4	#####	8,040	0,0079	0,019	0,173	0,3	9,94	0,148	0,0176
3	9,1	0,33	0,64	23,6	1570,0	182,0	0,071	5,66	12,5	#####	9,750	0,0032	0,058	0,116	0,2	9,75	0,122	0,0554
4	11,7	0,28	0,94	36,0	1070,0	217,0	0,170	2,81	30,0	#####	4,070	0,0384	0,028	0,203	0,8	4,07	0,247	0,0231
5	7,2	0,40	1,70	44,6	589,0	151,0	0,074	1,83	9,6	#####	9,280	0,0880	0,107	0,257	0,1	9,32	0,378	0,0723
6	14,0	0,31	0,76	24,0	1320,0	191,0	0,154	4,24	48,3	#####	4,490	0,0168	0,016	0,145	0,7	4,49	0,164	0,0143
7	6,2	0,35	1,05	33,6	952,0	173,0	0,136	3,66	14,3	#####	5,100	0,0061	0,051	0,181	<LOQ	5,11	0,190	0,0484
8	12,9	0,23	0,53	16,9	1890,0	257,0	0,219	4,38	32,5	#####	3,160	0,0188	0,025	0,136	0,9	3,16	0,158	0,0213
9	10,2	0,35	0,75	30,1	1330,0	172,0	0,097	5,90	31,2	#####	6,300	0,0040	0,023	0,129	0,3	7,18	0,117	0,0222
10	7,9	0,32	1,10	29,1	906,0	187,0	0,094	2,59	11,7	#####	7,270	0,0473	0,078	0,206	0,3	7,40	0,268	0,0592
11	9,5	0,38	1,14	29,3	908,0	165,0	2,190	4,16	34,5	#####	0,266	0,0144	0,022	0,182	0,3	0,32	0,166	0,0200
12	16,3	0,19	0,97	28,5	1030,0	321,0	0,102	3,97	107,0	#####	3,550	0,0224	0,007	0,311	0,2	6,80	0,175	0,0065
13	7,9	0,32	0,74	24,0	1400,0	193,0	0,224	4,48	9,4	#####	3,090	0,0078	0,083	0,138	<LOQ	3,09	0,155	0,0739
14	11,5	0,23	0,66	25,5	1500,0	256,0	0,991	5,81	27,2	#####	0,440	0,0147	0,028	0,171	0,4	0,70	0,119	0,0255
15	5,8	0,32	0,98	34,8	1020,0	188,0	0,235	3,49	7,2	#####	2,950	0,0070	0,103	0,184	<LOQ	2,96	0,200	0,0977
16	7,6	0,31	0,71	28,1	1400,0	197,0	0,176	4,75	13,4	#####	3,940	0,0038	0,054	0,140	<LOQ	3,95	0,146	0,0517
17	14,1	0,35	1,20	39,4	833,0	171,0	0,087	6,07	42,0	#####	4,020	0,0172	0,018	0,206	0,3	7,95	0,114	0,0165
18	10,5	0,43	1,85	44,9	541,0	138,0	0,178	2,47	52,6	#####	3,890	0,0243	0,015	0,255	0,2	3,90	0,280	0,0132
19	5,4	0,29	1,50	53,5	666,0	211,0	0,061	1,85	12,1	#####	#####	0,0477	0,068	0,316	<LOQ	11,40	0,376	0,0579
20	13,8	0,40	1,20	32,4	839,0	152,0	0,095	3,43	24,8	#####	6,110	0,0489	0,037	0,181	<LOQ	7,29	0,202	0,0280
21	6,5	0,32	0,99	31,1	1010,0	192,0	0,076	3,34	12,8	#####	9,130	0,0131	0,060	0,189	<LOQ	9,13	0,208	0,0544
22	7,9	0,41	0,92	28,4	1090,0	148,0	0,183	4,89	13,0	#####	3,780	0,0040	0,056	0,135	<LOQ	3,79	0,142	0,0531
23	16,4	0,24	0,64	21,9	1560,0	249,0	0,106	5,70	69,1	#####	4,600	0,0129	0,011	0,159	0,8	6,37	0,122	0,0101
24	5,0	0,22	1,04	28,9	956,0	269,0	0,056	3,07	12,9	#####	9,640	0,0058	0,055	0,281	<LOQ	12,30	0,226	0,0538
25	4,5	0,15	1,77	61,7	565,0	395,0	0,046	2,09	8,4	#####	6,170	0,0743	0,095	0,699	<LOQ	14,90	0,331	0,0827
26	5,3	0,35	1,86	55,0	538,0	174,0	0,517	3,21	10,6	#####	0,835	0,0168	0,071	0,323	<LOQ	1,34	0,216	0,0656
27	8,0	0,24	0,77	28,3	1310,0	252,0	0,150	3,28	26,0	#####	4,630	0,0160	0,029	0,193	0,3	4,63	0,211	0,0267
28	7,8	0,32	1,19	32,4	839,0	188,0	0,130	3,31	16,4	#####	4,350	0,0252	0,049	0,224	0,3	5,32	0,210	0,0424
29	7,8	0,32	1,35	35,3	740,0	189,0	0,819	3,12	56,0	#####	0,703	0,0109	0,013	0,256	0,1	0,85	0,222	0,0124
30	8,4	0,34	1,57	39,1	639,0	175,0	0,427	2,71	40,0	#####	1,390	0,0219	0,019	0,274	0,1	1,62	0,255	0,0173
31	7,4	0,165	0,80	46,5	1250,0	364,0	0,220	2,21	26,0	#####	3,020	0,0328	0,030	0,290	0,8	3,15	0,313	0,0267

Tabela 2. Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 40 mg/kg m.c.

Lp.	MRT _{tot}	V _c	Cl _s	Cl _s	AUC	C _{max}	t _{0,5 α}	t _{0,5 β}	t _{0,5 γ}	k ₁₂	k ₂₁	k ₁₃	k ₃₁	k ₁₀	C _{VP-16 w dniu allo- HSCT}	α	β	γ
	[h]	[l/kg]	[ml/min/kg]	[ml/min/m ²]	[μg/ml·h]	[μg/ml]	[h]	[h]	[h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[μg/ml]	[1/h]	[1/h]	[1/h]
32	9,6	0,11	0,60	19,4	1120,0	386,0	0,062	1,26	8,4	4,2200	6,760	0,3490	0,230	0,329	<LOQ	11,30	0,552	0,0822
33	6,1	0,20	1,42	30,4	469,0	201,0	0,049	2,03	13,2	4,6100	9,480	0,0702	0,063	0,428	<LOQ	14,30	0,342	0,0525
34	32,6	0,44	1,86	39,6	358,0	91,6	0,278	1,79	61,3	0,0031	2,490	0,1250	0,017	0,256	0,6	2,49	0,386	0,0112

Tabela 3. Parametry farmakokinetyczne VP-16 u dzieci, które otrzymały VP-16 w dawce 30 mg/kg m.c.

Lp.	MRT _{tot}	V _c	Cl _s	Cl _s	AUC	C _{max}	t _{0,5 α}	t _{0,5 β}	t _{0,5 γ}	k ₁₂	k ₂₁	k ₁₃	k ₃₁	k ₁₀	C _{VP-16 w dniu allo- HSCT}	α	β	γ
	[h]	[l/kg]	[ml/min/kg]	[ml/min/m ²]	[μg/ml·h]	[μg/ml]	[h]	[h]	[h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[1/h]	[μg/ml]	[1/h]	[1/h]	[1/h]
35	8,7	0,33	0,69	27,2	728,0	92,4	0,129	5,02	11,7	0,0012	5,350	0,0060	0,064	0,127	<LOQ	5,35	0,138	0,0591
36	5,1	0,30	1,61	36,9	311,0	101,0	0,529	2,27	22,7	0,1030	1,170	0,0163	0,032	0,324	<LOQ	1,31	0,306	0,0305

11.7. Rekonstytucja granulopoezy i płytkotworzenia oraz działania niepożądane obserwowane u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c., 40 mg/kg m.c. lub 30 mg/kg m.c.

b.p.p. – brak przyjęcia przeszczepu;

b.d. – brak danych

Tabela 1. Rekonstytucja granulopoezy i płytkotworzenia oraz działania niepożądane obserwowane u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 60 mg/kg m.c.

Lp.	rekonstytucja granulopoezy	rekonstytucja płytkotworzenia	GvHD	cGvHD	mucositis	uszkodzenie nerek	istotne objawy toksyczności	inne działania niepożądane	wznowa	data wznowy
	[dzień]	[dzień]	[stopień]		[stopień]	[stopień]				
1	18	6	III	tak	-	-	nie	-	nie	-
2	10	13	II	nie	II	-	tak	-	nie	-
3	26	25	-	nie	III	-	tak	-	nie	-
4	17	44	III	nie	II	-	tak	-	tak	03.09.2008
5	22	48	-	nie	I/II	-	tak	-	tak	08.01.2012
6	12	44	III	nie	II	I	tak	-	nie	-
7	17	15	-	nie	II	-	tak	-	nie	-
8	16	22	III	nie	II	-	tak	-	nie	-
9	b.p.p.	b.p.p.	-	nie	II	-	tak	mikroangiopatia po CsA	nie	-
10	28	15	II	nie	II	-	tak	brak apetytu, żywienie parenteralne (30 dni)	nie	-
11	20	20	-	nie	I/II	-	tak	-	nie	-
12	15	30	II	nie	II	-	tak	-	nie	-
13	11	14	III	nie	II	I	tak	krwawienie z dróg rodnych	nie	-
14	17	5	-	nie	I	-	tak	-	nie	-
15	b.p.p.	b.p.p.	-	nie	-	-	tak	obrzęk śródbrłonek po ATG	tak	30.04.2008
16	22	102	III	nie	II	-	tak	hepatotoksyczność - II stopień	nie	-
17	12	b.d.	II	nie	-	-	nie	-	tak	04.12.2008
18	14	43	II	nie	II	-	tak	-	nie	-
19	20	b.d.	IV	nie	I/II	-	tak	-	nie	-
20	33	26	III	nie	I/II	-	tak	-	nie	-
21	20	15	-	nie	II	-	tak	-	nie	-
22	17	17	II	nie	-	-	tak	zapalenie wyrostka robaczkowego	nie	-
23	14	b.d.	-	nie	I/II	-	tak	-	nie	-
24	11	11	-	nie	I/II	I	tak	-	nie	-
25	11	18	II	nie	I	I	tak	-	nie	-
26	11	30	II	nie	I/II	-	tak	-	nie	-
27	10	12	I	nie	-	-	tak	hepatotoksyczność - I stopień	nie	-
28	14	17	II	nie	-	-	nie	-	nie	-
29	13	25	-	nie	I	I	tak	-	tak	25.10.2000
30	12	13	-	nie	-	-	tak	-	nie	-
31	15	10	-	nie	I/II	-	nie	-	nie	-

Tabela 2. Rekonstytucja granulopoezy i płytkotworzenia oraz działania niepożądane obserwowane u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 40 mg/kg m.c.

Lp.	rekonstytucja granulopoezy	rekonstytucja płytkotworzeni	GvHD	cGvHD	mucositis	uszkodzenie nerek	istotne objawy toksyczności	inne działania niepożądane	wznowa	data wznowy
	[dzień]	[dzień]	[stopień]		[stopień]	[stopień]				
32	19	19	I	nie	-	I	tak	krwawienie z dróg rodnych; zaburzenia widzenia (obrzęk śródbłonek i nerwu wzrokowego po podaniu ATG)	nie	-
33	12	12	-	nie	I/II	-	tak	-	tak	09.2010
34	13	13	III	nie	II	-	tak	długotrwałe żywienie parenteralne	nie	-

Tabela 3. Rekonstytucja granulopoezy i płytkotworzenia oraz działania niepożądane obserwowane u dzieci, którym VP-16 podano w dawce 30 mg/kg m.c.

Lp.	rekonstytucja granulopoezy	rekonstytucja płytkotworzeni	GvHD	cGvHD	mucositis	uszkodzenie nerek	istotne objawy toksyczności	inne działania niepożądane	wznowa	data wznowy
	[dzień]	[dzień]	[stopień]		[stopień]	[stopień]				
35	26	26	IV	tak	-	-	tak	mikroangiopatia po CsA i tacrolimusie; miokloniczne napady padaczkowe	nie	-
36	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	tak	15.08.2000

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy **doktorskiej** p.t.:

„Farmakokinetyka wysokich dawek etopozydu i jej kliniczne znaczenie w przygotowaniu do allogenicnej transplantacji komórek krwiotwórczych u dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną”.

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia **naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**, a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)