

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Tomasz Wróbel

**Farmakokinetyka treosulfanu u dzieci przechodzących leczenie
mieloablacyjne przed transplantacją komórek
hematopoetycznych**

Praca doktorska

Promotor pracy: prof. dr hab. Franciszek Główka

Poznań 2012

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i przedstawiona Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu celem uzyskania tytułu doktora nauk farmaceutycznych

Słowa kluczowe: treosulfan, kondycjonowanie, farmakokinetyka, HPLC, pacjenci
pediatryczni

Praca została wykonana we współpracy z:

- Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- Katedrą i Kliniką Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- Katedrą i Zakładem Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Panu prof. dr hab. Franciszkowi Głównce

serdecznie dziękuję

za umożliwienie wykonania pracy, wskazanie bardzo interesującego tematu, cenne wskazówki i uwagi podczas wykonywania pracy oraz za wyrozumiałość i zaufanie jakim mnie obdarzył

Składam serdecznie podziękowania

*Pracownikom Kliniki Onkologii, Hematologii i Transplantologii
Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Katedry i Kliniki
Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu za pomoc w klinicznej części badań*

*Pracownikom Katedry i Zakładu Farmakologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu za życzliwość i pomoc w przygotowaniu
materiału do badań*

*Pani dr hab. Marii Chrzanowskiej prof. nadzw. UM
za życzliwą pomoc w podjęciu aktywności naukowej oraz
wsparcie dydaktyczne*

*Pani dr n. farm. Marcie Karaźniewicz-Łada za nieocenioną
pomoc w realizacji pracy oraz miłą współpracę*

*Pracownikom Katedry Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu za wszechstronną pomoc i przyjemną atmosferę
podczas wykonywania pracy*

Część rozprawy doktorskiej została opublikowana:

- Głowska FK, Karaźniewicz-Łada M, Grund G, Wróbel T, Wachowiak J. *Pharmacokinetics of high-dose i.v. treosulfan in children undergoing treosulfan-based preparative regimen for allogeneic haematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplantation 2008; 42: S67-S70, IF=3.400
- Głowska FK, Romański M, Teżyk A, Żaba C, Wróbel T. *HPLC method for determination of biologically active epoxy-transformers of treosulfan in human plasma: pharmacokinetic application*. Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2012; 62: 105-113, IF=2.967

Komunikaty zjazdowe:

- Głowska FK, Karaźniewicz-Łada, Wróbel T, Grund G, Wachowiak J. *HPLC method for determination of treosulfan following intravenous infusion to children undergoing myeloablative treatment, pharmacokinetic studies*. PBA2008. 19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Gdańsk, Poland, 8th-12th June 2008; Abstract Book: s. 146
- Głowska FK, Wróbel T, Wachowiak J, Kałwak K, Karaźniewicz-Łada M. *Pharmacokinetic study of high-dose treosulfan i.v. in paediatric patients before haematopoietic stem cell transplantation*. 8th Meeting of the EBMT Paediatric Diseases WP 3rd Meeting of the EBMT Paediatric Nurses. Prague, Czech Republic, 7th-9th June 2012; *Pediatr. Praxi* 2012 (suppl.13): s. B27-B28

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów.....	11
1 WSTĘP.....	15
2 CEL PRACY	17
3 CZĘŚĆ TEORETYCZNA	18
3.1 Transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych (HSCT)	18
3.1.1 Definicja.....	18
3.1.2 Procedura transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych	19
3.1.3 Wskazania do HSCT u dzieci i młodzieży	19
3.1.3.1 Auto-HSCT	19
3.1.3.2 Allo-HSCT	19
3.1.4 Kondycjonowanie pacjentów przed transplantacją.....	20
3.1.5 Powikłania przeszczepienia	21
3.1.5.1 Powikłania wczesne.....	21
3.1.5.2 Powikłania późne.....	22
3.1.6 Kierunek rozwoju badań nad poprawą wyników HSCT u dzieci i młodzieży.....	23
3.2 Charakterystyka TREO.....	25
3.2.1 Budowa chemiczna i nazewnictwo TREO.....	25
3.2.2 Właściwości fizykochemiczne TREO	27
3.2.3 Postać farmaceutyczna	27
3.2.4 Właściwości farmakologiczne TREO	27
3.2.4.1 Mechanizm aktywacji TREO	27
3.2.4.2 Mechanizm działania TREO	29
3.2.4.3 Biologiczne efekty alkilacji DNA pod wpływem produktów aktywacji TREO.....	35
3.2.5 Aktywność farmakologiczna TREO.....	36
3.2.6 Zastosowanie TREO w leczeniu	38
3.2.7 Interakcje TREO	40

3.2.8	Działania niepożądane TREO.....	41
3.2.9	Farmakokinetyka TREO	43
3.2.9.1	Farmakokinetyka postaci dożylniej TREO u dorosłych	44
3.2.9.2	Farmakokinetyka postaci doustnej TREO u dorosłych	47
3.2.9.3	Farmakokinetyka TREO u dzieci	48
3.2.10	Metody analityczne oznaczania TREO	49
3.3	Parametry walidacyjne metod analitycznych.....	50
3.3.1	Selektywność metody	50
3.3.2	Liniowość.....	50
3.3.3	Oznaczalność i wykrywalność metody	50
3.3.4	Precyzja metody	51
3.3.5	Dokładność metody	52
3.3.6	Odzysk	53
3.3.7	Stabilność próbek biologicznych w czasie rozmrażania i zamrażania	53
3.3.8	Próby kontroli jakości.....	53
4	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	54
4.1	Aparatura i odczynniki chemiczne.....	54
4.1.1	Aparatura i sprzęt laboratoryjny	54
4.1.2	Odczynniki.....	54
4.2	Metoda HPLC do oznaczania TREO.....	55
4.2.1	Aparat do HPLC	55
4.2.2	Warunki analizy HPLC.....	55
4.2.3	Przygotowanie fazy ruchomej	55
4.3	Roztwory stosowane w metodzie HPLC	56
4.3.1	Roztwór kwasu cytrynowego	56
4.3.2	Roztwór wzorca wewnętrznego	56
4.3.3	Roztwór podstawowy TREO	56
4.3.4	Roztwory wzorcowe TREO	56
4.4	Analiza TREO w osoczu	57

4.4.1	Przygotowanie próbek osocza do krzywej wzorcowej.....	57
4.4.2	Harmonogram oraz sposób pobierania próbek krwi pacjenta.....	57
4.4.3	Przygotowanie próbek osocza pacjenta do analizy.....	58
4.5	Analiza TREO w moczu.....	58
4.5.1	Przygotowanie próbek moczu do krzywej wzorcowej.....	58
4.5.2	Harmonogram oraz sposób pobierania próbek moczu pacjenta.....	58
4.5.3	Przygotowanie próbek moczu pacjenta do analizy.....	59
4.6	Walidacja metody HPLC oznaczania TREO w osoczu i moczu.....	60
4.6.1	Liniowość.....	60
4.6.2	Precyzja i dokładność metody.....	60
4.6.3	Odzysk.....	60
4.6.4	Stabilność próbek biologicznych w czasie rozmrażania i zamrażania.....	61
4.6.4.1	Test stabilności próbek TREO w osoczu.....	61
4.6.4.2	Test stabilności próbek TREO w moczu.....	61
4.7	Opis badanej grupy.....	62
4.8	Parametry farmakokinetyczne.....	66
5	WYNIKI.....	68
5.1	Walidacja metody HPLC oznaczania TREO w osoczu.....	68
5.1.1	Selektywność metody.....	68
5.1.2	Liniowość.....	68
5.1.3	LOD i LOQ.....	71
5.1.4	Precyzja i dokładność metody.....	71
5.1.5	Odzysk.....	72
5.1.6	Stabilność próbek biologicznych w czasie rozmrażania i zamrażania.....	73
5.2	Walidacja metody HPLC oznaczania TREO w moczu.....	74
5.2.1	Specyficzność i selektywność metody.....	74
5.2.2	Liniowość.....	74
5.2.3	LOD i LOQ.....	77
5.2.4	Precyzja metody i dokładność metody.....	77

5.2.5	Stabilność próbek biologicznych w czasie rozmrażania i zamrażania	78
5.3	Wyniki badań klinicznych	79
5.3.1	Poziomy TREO w osoczu	79
5.3.1.1	Wlew 1 h.....	79
5.3.1.2	Wlew 2 h.....	83
5.3.2	Poziomy TREO w moczu.....	90
5.3.2.1	Wlew 1 h.....	90
5.3.2.2	Wlew 2 h.....	97
5.3.2.3	Zestawienie wyeliminowanego TREO z moczem pacjentów.....	103
5.3.3	Parametry farmakokinetyczne	105
5.3.3.1	Farmakokinetyka TREO u pacjentów.....	106
5.3.3.2	Zależności parametrów farmakokinetycznych.....	122
5.3.3.3	Zestawienie parametrów farmakokinetycznych badanej grupy pacjentów.....	131
6	OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników	133
7	WNIOSKI.....	142
8	STRESZCZENIE	143
9	ABSTRACT	145
10	PIŚMIENNICTWO	147
11	SPIS RYCIN I TABEL	165
12	WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW	172

Wykaz stosowanych skrótów

ACN	Acetonitryl
ALD	adrenoleukodystrophy – adrenoleukodystrofia
ALL	acute lymphoblastic leukemia – ostra białaczka limfoblastyczna
allo-HSCT	allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych
AML	acute myeloid leukemia – ostra białaczka szpikowa
AUC	area under the curve – pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia w czasie
AUC_{ozn}	area under the curve – pole powierzchni pod krzywą zmian oznaczonego stężenia w czasie
auto-HSCT	autologous hematopoietic stem cell transplantation - autologiczna transplantacja komórek krwiotwórczych
BAL	biphenotypic acute leukemia – ostra białaczka bifenotypowa
BD	1,3-butadien
BDA	Blackfan-Diamond anemia – niedokrwistość Blackfana-Diamonda
BM	bone marrow – szpik kostny
BSO	sulfoksoimina butioniny
BSA	Body Surface Area
BTM	beta-thalassemia major – niedokrwistość homozygotyczna
Bu	Busulfan
CB	cord blood – krew pępowinowa
CBSC	cord blood stem cells - komórki krwiotwórcze z krwi pępowinowej
CB SCT	cord blood stem cells transplantation - transplantacja z wykorzystaniem komórek krwiotwórczych z krwi pępowinowej
CGD	chronic granulomatous – przewlekła choroba ziarniakowa
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
CLL	chronic lymphocytic leukemia – przewlekła białaczka limfoblastyczna
Cl_{Ren}	klirens nerkowy
Cl_{tot}	całkowity klirens ogólnoustrojowy
C_{max}	stężenie maksymalne leku w osoczu
C_{max ozn}	stężenie maksymalne leku w osoczu obliczone z oznaczonych poziomów TREO
CML	chronic myelogenous leukaemia – przewlekła białaczka szpikowa
C_{ozn}	średnie stężenie oznaczone

C_{nom}	stężenie nominalne
CTC	common toxicity criteria; version 2.0 – klasyfikacja działań toksycznych wersja 2.
CVID	common variable immunodeficiency - pospolity zmienny niedobór odporności
Cy	cyklofosfamid
DBA	Diamond-Blackfan anemia – niedokrwistość Blackfana-Diamonda
DEB	Diepoksybutanu
DLT	dose-limiting toxicity – dawka ograniczająca toksyczność
DMA	N,N – dimetyloacetamid
DMSO	Dimetylosulfotlenek
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation - Europejskie Towarzystwo Przeszczepiania Szpiku i Komórek Krwiotwórczych
EMA	European Medical Agency – Europejska Agencja Medyczna
ES	Ewing's sarcoma – mięsak Ewinga
F	stopień dostępności biologicznej (biodostępność)
Fd	Fludarabina
FTBI	fractionated total body irradiation - frakcjonowane napromieniowanie całego ciała
GvHD	graft versus host disease – reakcja przeszczep przeciw gospodarzowi
GvL	graft versus leukemia – przeszczep przeciwko białaczce
HD	Hodgkin's disease – choroba Hodgkina
HLA	human leukocyte antigens – antygeny zgodności tkankowej
HLH	hematophagocytic lymphohistiocytosis
HMG	high mobility group - białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej
HPLC	high performance liquid chromatography – wysokosprawna chromatografia cieczowa
HS	Hurler's syndrome – zespół Hurlera
HSC	hematopoietic stem cells – macierzyste komórki krwiotwórcze
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation - transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych
ICE	interleukin-1-beta-converting enzyme
IS	internal standard – wzorzec wewnętrzny
k_{el}	stała szybkości eliminacji
k_{ner}	stała szybkości eliminacji nerkowej
LAD	leukocyte adhesion deficiency – zespół adhezji limfocytów

LCH	Langerhans cell histiocytosis – histiocytoza komórek Langerhansa
LOD	limit of detection – wykrywalność metody
LOQ	limit of quantification – oznaczalność metody
MDS	myelodysplastic syndrome – zespół mielodysplastyczny
Mel	melfalan
MM	multiple myeloma – szpiczak mnogi
MPS	Myeloproliferative syndrome
MPS1H	mucopolysaccharidosis type 1 Hurler syndrome
MRT	średni czas przebywania leku w organizmie
MSD-HSCT	matched sibling donor HSCT – transplantacja szpiku od zgodnego rodzeństwa
MTD	maximum tolerated dose – maksymalna tolerowana dawka
N	dowolny nukleotyd
N1A-N7G-BD	1-(aden-1-ylo)-4-(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu
N3A-N7G-BD	1-(aden-3-ylo)-4-(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu
N7A-N7G-BD	1-(aden-7-ylo)-4-(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu
N6A-N7G-BD	1-(aden-6-ylo)-4-(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu
NBL	neuroblastoma – nerwiak zarodkowy współczulny
NHL	non-Hodgkin lymphoma – chłoniak nieziarniczny
OP	Osteopetrosis
PB	peripheral blood - krew obwodowa
PBSC	peripheral blood stem cells - komórki krwiotwórcze z krwi obwodowej
PBSCT	peripheral blood stem cells transplantation – transplantacja z wykorzystaniem komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej
PFS	progression free survival - przeżycie wolne od progresji choroby
PNH	paroxysmal nocturnal – napadowa nocna hemoglobinuria
P_{TREO}	pole powierzchni piku TREO
P_{IS}	pole powierzchni piku IS
QS	quality sample - próby kontroli jakości
R	współczynnik korelacji
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography – wysoko-sprawną chromatografią cieczą w odwróconym układzie faz
RRT	regimen-related toxicity - toksyczność narządowa zastosowanego kondycjonowania
RSD	relative standard deviation - względne odchylenie standardowe

RTC	reduced toxicity conditioning – kondycjonowanie o zredukowanej toksyczności
SAA	severe aplastic anemia – ciężka nabyta niedokrwistość plastyczna
SCID	severe combined immunodeficiency – wrodzony złożony niedobór odporności
SCN	severe congenital neutropenia – choroba Kosmanna
SD	standard deviation – odchylenie standardowe
SDS	Schwachman-Diamond syndrome – zespół Schwachmana-Diamonda
S,S-DEB	(2S,3S)-1,2:3,4-diepoksubutan
S,S-N7-HEBG	monoaddukt S,S-N7-(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)guaninowy
S,S-bis-N7G-BD	diaddukt S,S-1,4-bis(guan-7-ylo)butano-2,3-diol
S,S-N7-THBG	monoaddukt S,S-N7-(2',3',4'-trihydroksybut-1'ylo)guaninowy
SM	sclerosis multiple - stwardnienie rozsiane
S_N2	substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa
S,S-EBDM	4-metanosulfonian (2S,3S)-1,2-epoksybutano3,4-diolu
t_{0,5}	biologiczny okres półtrwania
t_{max}	czas po którym uzyskano C _{max}
TREO	Treosulfan
V_d	pozorna objętość dystrybucji
VOD	veno-occlusive disease – choroba okluzyjna naczyń żylnych wątroby
VP-16	etopozyd
V_{ss}	objętość dystrybucji w stanie stacjonarym
WAS	Wiskott - Aldrich Syndrom – zespół Wiskotta – Aldricha
WS	Wolman syndrome – zespół Wolmana
Wz	coefficient of variation - współczynnik zmienności

1 WSTĘP

Odkrycie antygenów zgodności tkankowej (*human leukocyte antigens*, HLA), poznanie patomechanizmu odrzucania przeszczepu oraz reakcji przeszczep przeciw gospodarzowi (*graft versus host disease*, GvHD), pozyskiwanie komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej (*peripheral blood stem cells*, PBSC) i pępowinowej (*cord blood stem cells*, CBSC) oraz coraz powszechniejsze wykorzystanie dawców rodzinnych częściowo zgodnych i dawców niespokrewnionych znacznie zwiększyło możliwości i ilość transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT). Jednak ograniczeniem skutecznego zabiegu są powikłania toksyczne związane z postępowaniem konwencjonalnej procedury mieloablacyjno-immunosupresyjnej poprzedzającej transplantację.

Transplantacja komórek krwiotwórczych, która znajduje zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych i nienowotworowych u dzieci, poprzedzona jest kondycjonowaniem biorcy, tj. zastosowaniem frakcjonowanego napromieniowania całego ciała (*fractionated total body irradiation*, FTBI) i/lub cytostatyków w dawkach mieloablacyjnych. Pozwala to na nieodwracalne zniszczenie „chorego” szpiku i daje szansę usunięcia wszystkich rezydualnych komórek nowotworowych wrażliwych na leczenie. Najczęściej stosowanym lekiem mieloablacyjnym jest busulfan (Bu). Jednak zastosowanie Bu w konwencjonalnej mieloablacyjno-immunosupresyjnej terapii poprzedzającej HSCT lub FTBI może być przyczyną wielu niepowodzeń związanych z toksycznością i powikłaniami wczesnymi i/lub późnymi. Najwyższym ryzykiem powikłań obarczone są dzieci, u których razem z chorobą będącą wskazaniem do transplantacji, występują trwałe uszkodzenia narządów szczególnie narażonych na Bu i FTBI wywołane chorobą podstawową, chorobami współistniejącymi i/lub wcześniej stosowanym leczeniem (przeprowadzona HSCT i/lub chemioterapia, po której doszło do wznowy). Dlatego też nadal poszukuje się takiego kondycjonowania, które charakteryzowałoby się odpowiednim efektem mieloablacyjnym, immunosupresyjnym i przeciwnowotworowym przy jednocześnie niewielkiej toksyczności narządowej oraz przewidywalnym profilem farmakokinetycznym.

Wydaje się, że treosulfan (TREO) jest interesującym lekiem do włączenia w procedurę kondycjonowania, jako główna składowa mieloablacyjna. Pierwsze kliniczne badania pokazują, że TREO może spełniać powyższe właściwości, gdyż poza działaniem hematologicznym (zahamowanie czynności szpiku kostnego), brak jest wyraźnych niehematologicznych efektów ubocznych [1,2,3]. Jednak w odróżnieniu od wyników

uzyskanych od pacjentów dorosłych, ciągle brakuje wystarczającej liczby badań u dzieci, zwłaszcza wieloośrodkowych, na podstawie których można by należycie ocenić optymalne schematy dawkowania TREO. Dotychczasowe spostrzeżenia oceny farmakokinetyki TREO dotyczą głównie pacjentów dorosłych [3-9]. Stwierdzono, że parametry farmakokinetyczne, takie jak objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym (V_{ss}), biologiczny okres półtrwania ($t_{0,5}$) i eliminacja nerkowa leku są niezależne od dawki [6]. Tylko dwa opracowania odnoszą się do farmakokinetyki TREO u pacjentów pediatrycznych [10,11]. Jednak ze względu na małą liczebność oraz niejednorodność badanej grupy (różny wiek pacjentów, różne rozpoznania choroby podstawowej), „biologiczne różnice” pomiędzy białaczkami dziecięcymi a dorosłymi [12] (jako głównymi wskazaniami do leczenia mieloablacyjnego) oraz zastosowanie wyższych dawek leku, istnieje potrzeba określenia optymalnej dawki leku i dalszej oceny jego farmakokinetyki u dzieci. Stwierdzenie korelacji między zastosowaną dawką a parametrami farmakokinetycznymi, pozwoliłoby na zaproponowanie indywidualnego schematu dawkowania leku małym pacjentom z myślą o większym bezpieczeństwie terapii, skróceniu czasu hospitalizacji przy jednoczesnym zmniejszeniu kosztów terapii. Terapeutyczne monitorowanie stężenia TREO we krwi pozwoli nam odpowiedzieć na pytanie: jakie są zagrożenia objawami niepożądanymi zanim ujawnią się one klinicznie? Jest to szczególnie ważne u dzieci, gdzie na ostateczny wynik przeszczepienia największy wpływ ma zarówno prawdopodobieństwo wieloletniego przeżycia jak i jakość życia po transplantacji.

2 CEL PRACY

Celem pracy jest ocena farmakokinetyki TREO u dzieci w terapii mieloablacyjnej poprzedzającą transplantację komórek krwiotwórczych. Stężenia TREO w osoczu i moczu pacjentów będą oznaczane walidowaną metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*high performance liquid chromatography*, HPLC). Wyznaczona zostanie precyzja, dokładność, specyficzność, odzysk i stabilność TREO. Parametry farmakokinetyczne: $t_{0,5}$, stężenie maksymalne w osoczu (C_{max}), całkowity klirens ogólnoustrojowy (Cl_{tot}), V_{ss} , pole powierzchni pod krzywą $c = f(t)$ (AUC), średni czas przebywania leku w organizmie (MRT), stała szybkości eliminacji (k_{ner}) TREO, będą obliczane na podstawie zmiany stężenia leku w osoczu i ilości wyeliminowanego leku z moczem przy zastosowaniu programu WinNonlin 6.2. Wyniki badań zostaną podsumowane wnioskami zmierzającymi do optymalizacji dawkowania TREO u pacjentów pediatrycznych.

3 CZĘŚĆ TEORETYCZNA

3.1 Transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych (HSCT)

3.1.1 Definicja

Stosowanie transplantacji szpiku, a poprawniej transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych poprzedzone było długotrwałymi badaniami eksperymentalnymi zapoczątkowanymi ponad 80 lat temu i dopiero w ostatnich 30 latach stało się uznaną metodą pozwalającą na wyleczenie w dużym procencie nieuleczalnych wcześniej białaczek, złośliwych chłoniaków i innych chorób. O skuteczności świadczy szybki rozwój wyrażający się wykonywaniem na świecie około 50 tysięcy transplantacji rocznie [13].

Zgodnie z definicją Europejskiego Towarzystwa Przeszczepiania Szpiku i Komórek Krwiotwórczych (*European Group for Blood and Marrow Transplantation, EBMT*) HSCT oznacza taką procedurę, w której komórki krwiotwórcze, niezależnie od typu ich dawcy oraz ich źródła, zostają przetoczone biorcy po przeprowadzeniu terapii kondycjonującej w celu całkowitej lub częściowej wymiany lub odbudowy układu krwiotwórczego [14,15]. Jest to zatem zabieg polegający na wprowadzeniu zdrowego szpiku w miejsce zmienionego nowotworowo lub wadliwie funkcjonującego.

Do transplantacji mogą być użyte macierzyste komórki krwiotwórcze (*hematopoietic stem cells, HSC*) pochodzące od dawcy rodzinnego (dawca optymalny) lub niespokrewnionego dobraneo w zakresie HLA (*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT*), własne HSC biorcy (*autologous hematopoietic stem cell transplantation, auto-HSCT*), lub- bardzo rzadko – od bliźniaka monozygotycznego (*syngeneic HSCT*). Dawców niespokrewnionych (alternatywnych) do allo-HSCT szuka się za pomocą zintegrowanego systemu poszukiwania w światowych rejestrach dobrowolnych dawców. Prawdopodobieństwo zgodności z rodzeństwem wynosi tylko 25 %, stąd aż 75 % potrzebujących nie ma dawcy rodzinnego i wymaga znalezienia dawcy alternatywnego.

Źródłem przeszczepianych HSC może być:

- szpik kostny (*bone marrow, BM*),
- krew obwodowa (*peripheral blood, PB*) - transplantacja z wykorzystaniem komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej (*peripheral blood stem cells transplantation, PBSCT*),

- krew pępowinowa (*cord blood*, CB) - transplantacja z wykorzystaniem komórek krwiotwórczych z krwi pępowinowej (cord blood stem cells transplantation, CBSCT) [14,16].

3.1.2 Procedura transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych

Procedura transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych rozpoczyna się od ustalenia rzeczywistych wskazań. Następnie dokonuje się wyboru odpowiedniego dawcy i protokołu chemicznego lub chemiczno-radiologicznego uwarunkowania przeszczepu. Przeszczepienie rozpoczyna się megachemioterapią (kondycjonowaniem) biorcy. Po podaniu megachemioterapii pobiera się materiał przeszczepowy od dawcy i po ewentualnej preparatyce, zmieniającej jego skład jakościowy, przetacza się dożylnie biorcy. Biorca po transplantacji jeszcze przez określony czas poddawany jest immunosupresji w celu wywołania tolerancji immunologicznej. Bezpośredni okres okołoprzeszczepowy to czas największego zagrożenia wystąpieniem różnego rodzaju powikłań procedury przeszczepowej [17,18].

3.1.3 Wskazania do HSCT u dzieci i młodzieży

3.1.3.1 Auto-HSCT

Zastosowanie auto-HSCT ma miejsce niemalże wyłącznie w nowotworach hematologicznych lub w nowotworach litych zlokalizowanych pozaszpikowo. W ostatnich latach metodę auto-HSCT stosuje się w terapii niektórych chorób o mechanizmach autoimmunologicznych [18].

3.1.3.2 Allo-HSCT

Allo-HSCT u dzieci i młodzieży znajduje zastosowanie zarówno w leczeniu chorób nowotworowych, w tym przede wszystkim chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, a także w terapii wrodzonych i nabytych chorób nierozrostowych niewydolności układu krwiotwórczego oraz w niedoborach odporności, niektórych chorobach metabolicznych i hemoglobinopatiach [18].

3.1.4 Kondycjonowanie pacjentów przed transplantacją

Przeszczepianie komórek krwiotwórczych jest w większości przypadków poprzedzone zastosowaniem chemioterapii wysokodawkowej lub chemo+radioterapii wysokodawkowej, określanej jako kondycjonowanie. W zależności od rodzaju transplantacji i wskazań do zabiegu, kondycjonowanie biorcy do HSCT spełniać może różną rolę:

- auto-HSCT – charakter mieloablacyjny kondycjonowania zapewnia odtworzenie mielopoety po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. W przeszczepach autologicznych praktycznie nie istnieje problem bariery immunologicznej dla przeszczepianych komórek, które pochodzą od pacjenta poddanego procedurze transplantacji,
- allo-HSCT - kondycjonowanie powinno wykazywać efekt mieloablacyjny, wystarczający do całkowitego zniszczenia własnego, „chorego” szpiku biorcy i wytworzenia wolnej przestrzeni do zasiedlenia przez przeszczepiane komórki dawcy. Drugim istotnym mechanizmem kondycjonowania w allo-HSCT jest efekt immunosupresyjny. Przeszczepiane komórki, pochodzące od innej osoby, muszą pokonać barierę immunologiczną organizmu biorcy prowadząc do przewagi proliferacyjnej przeszczepionych komórek. Bez pokonania tej przeszkody może dojść do rekonstrukcji hematologicznej przeszczepionych komórek hematologicznych. Immunokompetentne komórki układu immunologicznego dawcy, przetoczone wraz z materiałem przeszczepowym, mogą eliminować komórki nowotworowe w mechanizmie immunologicznej eliminacji nowotworu poprzez oddziaływanie „przeszczep przeciwko białaczce” (*graft versus leukemia*, GvL) [17,19, 20^B,21].

Najczęściej kondycjonowanie składa się z różnych kombinacji cytostatyków w wysokich dawkach. Protokoły chemioterapii są zależne od rozpoznania i wieku pacjenta. Podstawowe znaczenie mają leki alkilujące: busulfan (Bu), melfalan (Mel), cyklofosfamid (Cy), tiotepa, pochodne nitrozomocznika, a także etopozyd (VP-16), karboplatyna i fludarabina (Fd). Chemioterapię niekiedy łączy się z radioterapią w formie FTBI (metoda obarczona wysokim ryzykiem późnych powikłań). Obecnie przed allo-HSCT u dzieci i młodzieży w konwencjonalnym mieloablacyjnym kondycjonowaniu stosuje się kombinacje FTBI i/lub megadawek wybranych cytostatyków: FTBI +VP-16, FTBI +Cy, Bu + Cy, Bu + VP-16 + Cy oraz Bu + Cy + Mel.

Transplantację allogeniczną, czyli dożylnie przetoczenie komórek krwiotwórczych, przeprowadza się zwykle dopiero 48 godzin po zakończeniu kondycjonowania.

Jest to czas konieczny do eliminacji cytostatyków zastosowanych w kondycjonowaniu i/lub ich aktywnych metabolitów z krwi biorcy. Zwykle dzień przed allo-HSCT wdrożona zostaje profilaktyka GvHD poprzez podawanie, w zależności od rodzaju dawcy: cyklosporyny A i niekiedy metotrexatu, w połączeniu z globuliną antytymocytarną lub alemtuzumabem [14].

3.1.5 Powikłania przeszczepienia

Mimo ciągłego doskonalenia procedury, skuteczność HSCT jest nadal ograniczona. Na ostateczny wynik składają się śmiertelność okołoprzeszczepowa (zgony z powikłań procedury) oraz ryzyko wznowy choroby podstawowej. W przypadku chorób nienowotworowych udane przeszczepienie oznacza ustąpienie objawów choroby. W przypadku chorób nowotworowych niepowikłany przebieg okresu poprzyszczepowego nie gwarantuje całkowitej eliminacji klonu (klonów) nowotworowego - nadal istnieje ryzyko wznowy białaczki. Wreszcie biorca jest narażony na późne powikłania procedury przeszczepowej, w tym rozwój wtórnych nowotworów.

W żadnym ze wskazań do allo-HSCT prawdopodobieństwo wieloletniego całkowitego przeżycia po transplantacji nie osiąga 100%. Wg raportu „Center for International Blood and Marrow Transplant Research” (CIBMTR; 2005) najczęstszą przyczyną niepowodzeń allo-HSCT jest wznowa choroby podstawowej a dalej powikłania procedury transplantacyjnej: toksyczność narządowa zastosowanego kondycjonowania (*regimen-related toxicity*, RRT), zakażenia oraz GvHD.

Należy pamiętać, że szpik jest tylko jednym z narządów uszkodzanych megachemioterapią. Inne tkanki i organy również ulegają uszkodzeniu. Uwzględniając czas wystąpienia powikłań, toksyczność kondycjonowania można podzielić na wczesną i późną.

3.1.5.1 Powikłania wczesne

Wczesne toksyczne powikłania kondycjonowania są w większości podobne do tych, które występują po intensywnej chemioterapii. Są to: nudności, hepatopatia, utrata owłosienia, krwotoczne zapalenie pęcherza, brak łaknienia, wymioty. Powszechnie występujące zapalenie błon śluzowych układu pokarmowego jest nie tylko przykre dla pacjenta (ból wymagający niekiedy dużych dawek morfiny, biegunka, konieczność stosowania żywienia pozajelitowego), ale ułatwia też wtargnięcie drobnoustrojom jelitowym [17,21]. Ponieważ pomiędzy zniszczeniem autologicznego szpiku kostnego

a przetoczeniem komórek krwiotwórczych i podjęciem przez nie w pełni adekwatnej mielopoety upływa zazwyczaj od 2 do 3 tygodni, istnieje duże ryzyko powikłań infekcyjnych w tym czasie. Agranulocytoza i towarzyszące uszkodzenie śluzówek prowadzi do wysokiego ryzyka endogennych infekcji bakteryjnych i grzybiczych. Infekcje w okresie okołoprzeszczepowym nie tylko bezpośrednio zagrażają życiu (posocznica), ale mogą także inicjować chorobę GvHD. Ze względu na zaburzenie odporności komórkowej biorcy przez cały czas istnieje zagrożenie infekcjami wirusowymi. W transplantologii głównym zagrożeniem jest wirus cytomegalii, który może doprowadzić do śródmiąższowego zapalenia płuc i zgonu [22].

Szczególnie niebezpieczne są jednak powikłania związane z uszkodzeniem śródbłonna naczyń krwionośnych prowadzące do aktywacji kaskady krzepnięcia. Zwiększona krzepliwość krwi jest przyczyną utrudnionego przepływu krwi przez naczynia krwionośne a w granicznym przypadku zamknięcia tych naczyń, prowadzącego do niewydolności narządów zaopatrywanych w krew przez dotknięte procesem naczynia. Klinicznymi przykładami wyżej opisanego procesu są: choroba okluzyjna naczyń żylnych wątroby (*veno-occlusive disease, VOD*), mikroangiopatia skojarzona z HSCT (*transplantation-associated microangiopathy*), zespół przeciekania drobnych naczyń, zespół wszczepiania (*engraftment syndrome*), rozsiane krwawienie do pęcherzyków płucnych (*diffuse alveolar haemorrhage*) oraz idiopatyczne zapalenie płuc (*idiopathic pneumonia syndrome*). Najczęściej występującym zespołem jest VOD. Występuje on u 10-50% biorców HSC, prowadząc do ostrej niewydolności wątroby [23,24].

Objawy wczesnej toksyczności ze strony płuc, przewodu pokarmowego i ośrodkowego układu nerwowego są charakterystyczne dla FTBI [25]. Wcześniej, bo już w trakcie podawania VP-16 mogą wystąpić przypadki nadciśnienia, niedociśnienia, tachykardii, skurczu oskrzeli, duszności, wysypka i łuszczyca skórna, podrażnienie skóry okolicy odbytu a nawet neuropatie obwodowe [26]. Cy razem ze swoimi metabolitami, w tym m.in. akroleiną jest odpowiedzialny za ciężkie uszkodzenie dróg moczowo-płciowych (obrzęk ściany pęcherza, zapalenie śródmiąższowe ze zwłóknieniem ściany pęcherza, nieodwracalne zaburzenia spermatogenezy) oraz wątroby (VOD) [27].

3.1.5.2 Powikłania późne

Do najczęstszych odległych następstw HSCT związanych z toksycznością kondycjonowania należy zaliczyć niedobór wzrostu, niedoczynność tarczycy, bezpłodność oraz wtórne nowotwory [28,29,30]. Po zastosowaniu FTBI zaobserwowano przypadki postępującego zwłóknienia płuc z następowym zmniejszeniem pojemności życiowej,

zaćmy, zwiększenie ryzyka rozwoju nowotworów tarczycy i osteochondromy [25,31,32]. Mel stosowany z innymi lekami alkilującymi zwiększa ryzyko rozwoju VOD, a w okresie późniejszym może powodować uszkodzenie mięśnia sercowego oraz śródmiąższowe zapalenie płuc, prowadzące do zwłóknienia tkanki płucnej [33-35].

3.1.6 Kierunek rozwoju badań nad poprawą wyników HSCT u dzieci i młodzieży

Na ostateczny rezultat przeszczepienia największy wpływ ma zarówno prawdopodobieństwo wieloletniego przeżycia wolnego od choroby jak i jakość życia po transplantacji. W celu dalszej poprawy tychże wyników u dzieci i młodzieży po allo-HSCT nadal poszukuje się takiego kondycjonowania, które zwłaszcza u biorców, wykazujących przed przeszczepieniem wykładniki zwiększonego ryzyka RRT, wykazywałoby niewielką toksyczność narządową, dobry efekt mieloablacyjny a w przypadku chorób rozrostowych także przeciwnowotworowy, przy jednocześnie przewidywalnym profilu farmakokinetycznym.

W konwencjonalnej terapii jednym z częściej stosowanych cytostatyków w leczeniu kondycjonującym jest należący do leków alkilujących Bu. Dawka mieloablacyjna Bu zarówno w postaci doustnej jak i dożylną wynosi 16 mg/kg. Bu posiada jednak wąskie „okno terapeutyczne”. Jego stosowaniu towarzyszą trudne do przewidzenia okresy mielosupresji (u < 10% pacjentów) [36]. Dodatkowo wykazano dużą zmienność osobniczą surowiczych stężeń Bu, zwłaszcza u dzieci, a także zmienność farmakokinetyki między dawkami przyjmowanymi przez jednego pacjenta [37-39]. Osiągnięcie zbyt wysokich stężeń może prowadzić do stosunkowo wczesnego powikłania Bu tj. choroby VOD. W konsekwencji może dojść do niewydolności wątroby i zgonu. W badaniach z zastosowaniem Bu, opisano zespół ostrej niewydolności oddechowej (prowadzącej do zgonu) w przebiegu śródmiąższowego zwłóknienia płuc. Podczas leczenia dużymi dawkami Bu opisywano występowanie drgawek [40]. Zbyt niskie stężenia Bu we krwi zwiększają odsetek odrzuceń przeszczepu i zwiększają ryzyko wznowy choroby. Ostatnio wprowadzone formy Bu (postać liposomalna i roztwory w DMSO lub DMA) umożliwiają dożylną podanie leku, ale zmienność farmakokinetyczna jest dalej znacząca, szczególnie u dzieci [41]. Według niektórych autorów postać dożylna wykazuje większą hepatotoksyczność niż doustna, tj. częstość występowania VOD wzrasta do 20-40%, a w kombinacji z Mel nawet do 87% [37-39].

Obecnie największe nadzieje wiąże się z zastosowaniem TREO jako czynnika mieloablacyjnego w reżimach kondycjonujących przed allo-HSCT. Cechuje go niska toksyczność narządowa, dobra rozpuszczalność w wodzie oraz wynikający ze wstępnych

badania przewidywalny profil farmakokinetyczny [1-9]. TREO stał się podstawą kondycjonowania o tzw. zredukowanej toksyczności (*reduced toxicity conditioning*, RTC). Do terapii TREO kwalifikowani są pacjenci, u których użycie innych cytostatyków w wysokich dawkach nie byłoby możliwe. Lek zapewnia prawidłowy przebieg przeszczepowy i uzyskanie odpowiedniego chimeryzmu dawcy w organizmie biorcy. Rekonstytucja hematologiczna oraz efekt kliniczny jest porównywalny do uzyskiwanych po standardowej chemioterapii mieloablacyjnej [42].

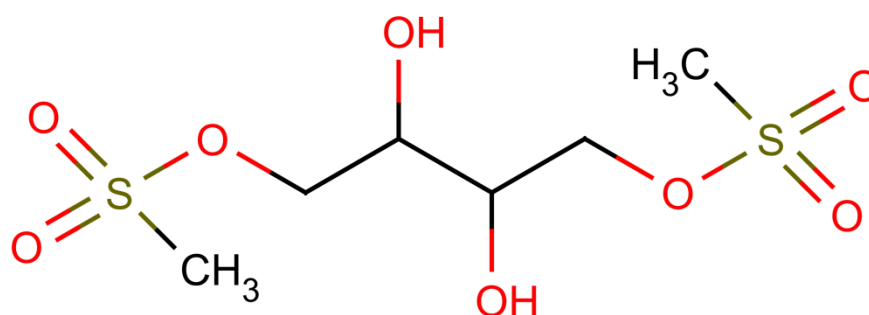
Pierwsze próby polskich pediatrycznych ośrodków transplantacyjnych (Poznań, Lublin, Wrocław) dotyczące zastosowania TREO w dawce całkowitej 30 g/m², jako głównej składowej kondycjonowania przed allo-HSCT u 8 dzieci z wysokim ryzykiem RRT zaprezentowano podczas 29th Annual Meeting of the EBMT w Istambule [43]. Wyniki tych badań (nieznaczna toksyczność narządowa, mieszany chimeryzm, częściowa wznowa białaczek) wydają się wskazywać na konieczność zwiększenia dawki całkowitej TREO oraz potrzebę optymalizacji dawki leku i dalszej oceny jego farmakokinetyki.

Warto dodać, iż pierwszą transplantację u dzieci, poprzedzoną kondycjonowaniem z udziałem TREO, przeprowadzono 14 lipca 2000 r. w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej UM w Poznaniu przez zespół prof. dr hab. Jacka Wachowiaka.

3.2 Charakterystyka TREO

TREO został zsyntetyzowany przez Petera Feita w 1961 roku [44,45]. Należy on do chemioterapeutyków cytostatycznych o działaniu nieswoistym dla fazy, tzn. niszczących komórki nowotworowe niezależnie od fazy cyklu komórkowego [46]. TREO podobnie jak Bu należy do najstarszych leków cytostatycznych z grupy środków alkilujących. Są to estry kwasu sulfonowego o charakterze dwufunkcyjnych związków alkilujących. Biorąc pod uwagę właściwości chemiczne, TREO i Bu są związkami organicznymi, obdarzonymi zdolnością do przenoszenia reszt alkilowych na ośrodki nukleofilowe o ładunku ujemnym, za pośrednictwem reakcji substytucji. Spośród wielu substratów komórkowych, kluczowe miejsce zajmuje łańcuch DNA, a miejscem o największej wrażliwości na alkilację jest atom N₇ guaniny. W dalszej kolejności alkilacji mogą ulegać atomy azotu N₁ guaniny, N₁ i N₃ adeniny i N₃ cytozyny. Poprzez alkilowanie zasad purynowych następuje rozluźnienie ich wiązania z resztą cukrową, wypadanie jednostek guaniny i adeniny (depurynacja) z cząsteczki DNA i rozpad łańcucha głównego. Skutkiem może być także połączenie kowalencyjne dwóch centrów nukleofilowych DNA (wiązanie krzyżowe), w wyniku którego, replikacja poprzecznie połączonych nici DNA jest niemożliwa z powodu zahamowania polimerazy DNA, zależnej od DNA [47,48].

3.2.1 Budowa chemiczna i nazewnictwo TREO



Treosulfan

M.mol. 278,298 g/mol

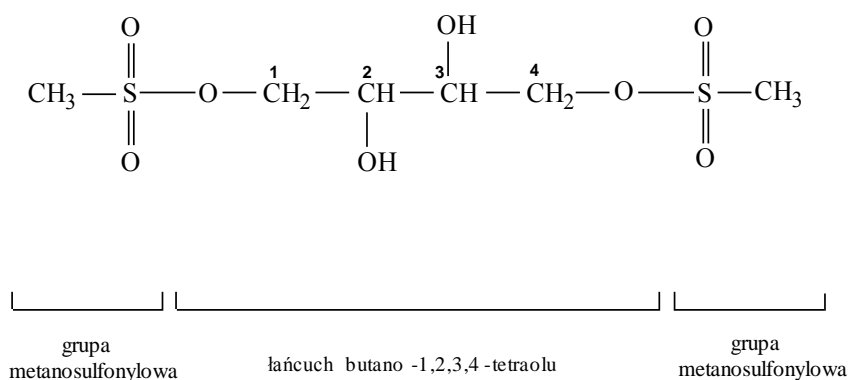
Wzór sumaryczny: C₆H₁₄O₈S₂

Nazwa chemiczna: 1,4-bismetanosulfonian butano-1,2,3,4-tetraolu

Nazwa systematyczna TREO wg nomenklatury IUPAC brzmi: metanosulfonian (2S,3S)-2,3-dihydroksy-4-metylosulfonyloksybutylu [49]

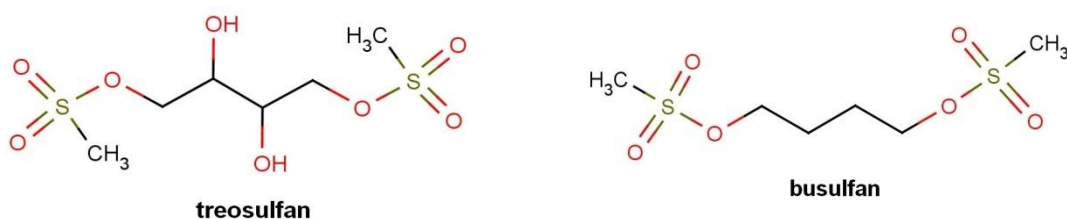
Synonimy: 1,4-bis-/metanosulfonian/L-treitolu; Dihydroksybusulfan; L-Threitol 1,4-dimethanesulfonate; (2S,3S)-Threitol 1,4-bismethanesulfonate; CB 2562; CB 40067; CCRIS 2781; DHB; Dihydroksymyleran; EINECS 206-081-0; HSDB 6963; L-Threitol, 1,4-bis(methanesulfonate); L-Threityl dimesylate; NSC 39069; NSC-39069; Threitol; 1,4-dimethanesulfonate, L-(+)-; Treosulfan; Treosulfano; Treosulfanum; Treosulphan; Tresulfan; l-Threitol-1,4-bis(methanesulfonate) [50,51].

Pod względem budowy chemicznej TREO jest 1,4-bismetanosulfonianem butano-1,2,3,4-tetraolu, czyli jest diestrem polialkoholu (butano-1,2,3,4-tetraolu) i kwasu sulfonowego (kwasu metanosulfonowego) (Ryc. 1) [52].



Ryc. 1. Wzór strukturalny 1,4-bismetanosulfonianu butano-1,2,3,4-tetraolu.

W ujęciu farmakologiczno-chemicznym TREO zaliczany jest do estrów metanosulfonowych alifatycznych dioli (jedna z grup leków przeciwnowotworowych) i może być traktowany, jako dihydroksypochozna Bu, pierwszego przedstawiciela tej grupy (Ryc. 2) [46].



Ryc. 2. Wzory strukturalne TREO i Bu.

3.2.2 Właściwości fizykochemiczne TREO

Postać i właściwości: TREO ma postać białego, pozbawionego zapachu, krystalicznego proszku [53]

Rozpuszczalność: substancja rozpuszcza się w wodzie: 1 : 14 [54], 100 mg/ml lub większa [51] oraz w etanolu: 1 : 20. Wodny 5% roztwór TREO jest czysty, wolny od zanieczyszczeń, pozbawiony koloru [54]

pH roztworu: pH roztworu TREO, otrzymanego przez rozpuszczenie 5% (m/V) w wodzie 4,8 – 7,0 [53]

Temperatura topnienia: 102,2 °C

3.2.3 Postać farmaceutyczna

W odróżnieniu od Bu, TREO łatwo rozpuszcza się w wodzie, stąd może być podawany dożylnie i doustnie. Postać do iniekcji dożylnych stanowi proszek do sporządzenia roztworu, znajdujący się w butelkach infuzyjnych w dawce 1000 mg lub 5000 mg leku. Postacią doustną są kapsułki żelatynowe twarde zawierające 250 mg leku. Aktualnie TREO jest zarejestrowany w kilku krajach europejskich (Wielka Brytania, kraje skandynawskie) do terapii II rzutu lub terapii paliatywnej zaawansowanego platynoopornego raka jajnika. Preparatem handlowym jest Ovastat®. Producentem leku jest firma Medac GmbH (Hamburg, Niemcy). W Polsce preparat nie jest jeszcze zarejestrowany i jest sprowadzany na tzw. import docelowy [53,55,56].

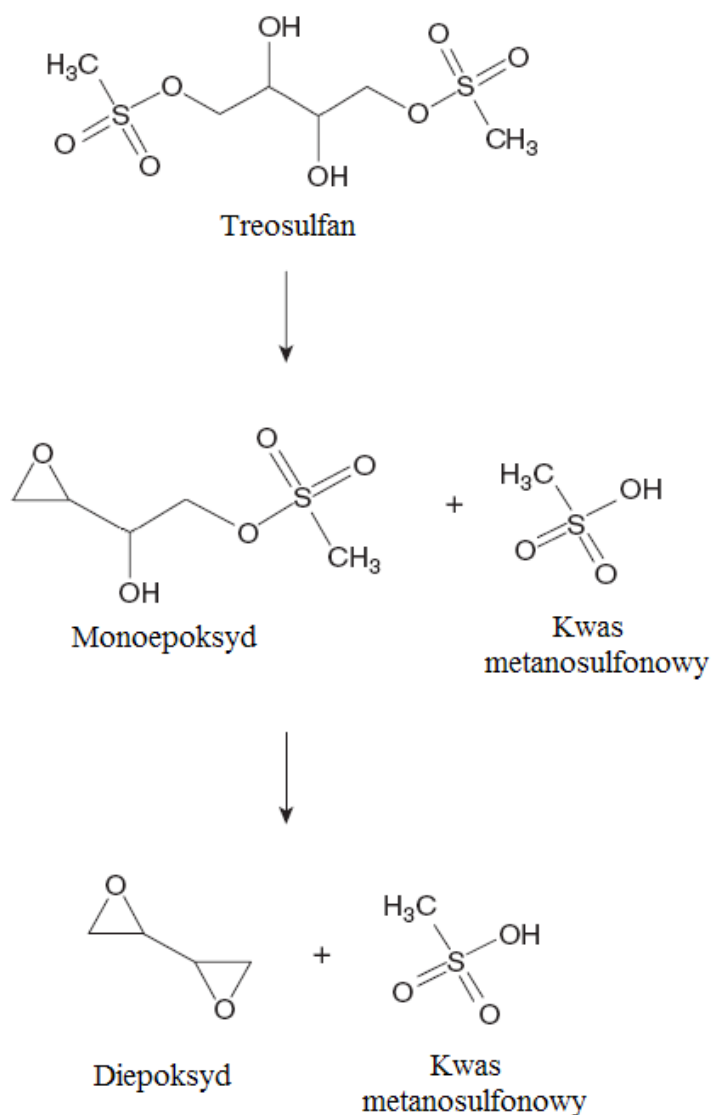
3.2.4 Właściwości farmakologiczne TREO

3.2.4.1 Mechanizm aktywacji TREO

Sam TREO jest farmakologicznie obojętny. Jego aktywnymi formami są pochodne epoksydowe: monoepoksydowy związek przejściowy - 4-metanosulfonian (2S,3S)-1,2-epoksybutano-3,4-diolu (S,S-EBDM) oraz diepoksydowy produkt aktywacji - (2S,3S)-1,2:3,4-diepoksubutan (L-diepoksybutan, S,S-DEB) [57,58]. Chociaż TREO jest strukturalnie podobny do Bu, mechanizm jego aktywacji jest całkowicie odmienny.

Podczas gdy metanosulfonowe grupy Bu alkilują nukleofilowe centra bezpośrednio, obecność dwóch grup hydroksylowych w pozycji 2' i 3' TREO prowadzi do aktywacji TREO inną drogą. Produkty transformacji powstają w reakcji wewnątrzcząsteczkowej syntezy Williamsona – otrzymywanie eterów cyklicznych z halogenohydryn w środowisku alkalicznym [59]. Dwie grupy metanosulfonianowe, które występują w cząsteczce TREO w układzie pierwszorzędowym, podobnie jak jony halogenkowe są doskonałymi grupami opuszczającymi. Znajdujące się grupy hydroksylowe w stosunku β do grup metanosulfonianowych w obecności jonów wodorotlenowych występują częściowo w postaci jonów alkoholowych. Na drodze reakcji S_N2 (substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa) następuje atak anionu hydroksylowego na węgiel α powodując podstawienie grupy metanosulfonianowej i utworzeniem monoepoksydu (I etap). Analogiczna reakcja wewnątrzcząsteczkowej syntezy Williamsona z udziałem grupy hydroksylowej i metanosulfonianowej monoepoksydu prowadzi do powstania diepoksydu (II etap). Ponieważ wewnątrzcząsteczkowa reakcja S_N2 jest dużo szybsza niż międzycząsteczkowa, konkurencyjne podstawienie grupy metanosulfonianowej przez anion wodorotlenowy środowiska reakcji nie powinno mieć znaczenia [60,61]. Reakcję aktywacji TREO do aktywnych metabolitów przedstawia Ryc. 3.

TREO jest więc pro-lekiem a reakcja transformacji TREO do epoksyzwiązków jest nieenzymatyczna i może przebiegać w środowisku wodnym, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Szybkość transformacji zależy tylko od pH i temperatury. W pH poniżej 6,0 transformacja TREO praktycznie nie zachodzi [57]. Wzrost wartości pH wywołuje zwiększenie szybkości reakcji transformacji, gdyż większa liczba grup hydroksylowych związku macierzystego występuje w postaci anionowej. Jednak zbyt duży wzrost pH inicjuje rozszczepienie pierścienia epoksydowego powstających transformerów i rozkłada je do odpowiednich glikoli [4,52]. Warto zauważyć, iż uwalniany podczas reakcji transformacji TREO mocny kwas metanosulfonowy ($pK_a = -1,9$) powoduje zakwaszenie środowiska reakcji a tym samym prowadzi do jej zatrzymania. Przeciwdziałać temu może czynnik korygujący pH np. fizjologiczny bufor krwi [62]. Badania kinetyki reakcji transformacji TREO do aktywnych metabolitów *in vitro* w warunkach stałego pH i temperatury (pH 8,5; temp. 25°C) prowadził Feit i wsp. [44,45,57]. Badacze ustalili, że konwersja TREO do monoepoksydu, jak i monoepoksydu do diepoksydu, są reakcjami pierwszego rzędu. Wykazali również, iż tworzenie monoepoksydu z TREO przebiega dwukrotnie szybciej niż tworzenie diepoksydu z monoepoksydu.



Ryc. 3. Transformacja TREO do aktywnych farmakologicznie związków epoksydowych.

3.2.4.2 Mechanizm działania TREO

Mechanizm działania TREO wynika z cytotoksycznych i promutagennych właściwości produktów aktywacji, głównie S,S-DEB, które alkilują centra nukleofilowe biocząsteczek [58,63,64]. Przenoszenie grupy aktywnej czynnika alkilującego na centra nukleofilowe odbywa się wg. mechanizmu S_N2 [63-65]. Pomimo, że TREO i Bu zaliczane są do reagentów reakcji przebiegającej wg powyższego mechanizmu [4], to jednak TREO został przyporządkowany do grupy o wyższej reaktywności chemicznej, razem z epoksydami i jonami etylenoimoniowymi (grupa A) [66]. Wyjątkową reaktywność chemiczną TREO tłumaczyć możemy naprężeniem pierścieni trójcłonowych epoksydowych produktów aktywacji [59]. Diepoksyd posiadający dwie aktywne grupy epoksydowe określany jest mianem bifunkcyjnego czynnika alkilującego, natomiast

monoepoksyd, którego cząsteczka zbudowana jest z jednej grupy epoksydowej, monofunkcyjnym czynnikiem alkilującym [64].

Głównym miejscem alkilacji S,S-DEB w łańcuchu DNA jest pozycja N₇ guaniny z preferencją na regiony o większej ilości nukleotydów guaninowych [58]. Wg Hartleya i wsp. takie zachowanie upodabnia S,S-DEB do wcześniej badanych i opisanych innych alkilujących czynników bifunkcyjnych – Bu [67] i pochodnych iperytu azotowego [68,69]. Pozycja N₇ guaniny ma charakter silnie nukleofilowy, a wpływ sąsiadujących zasad guaninowych zwiększa gęstość elektronową, co czyni to miejsce bardziej podatnym na atak silnie elektrofilowego czynnika alkilującego [68,70].

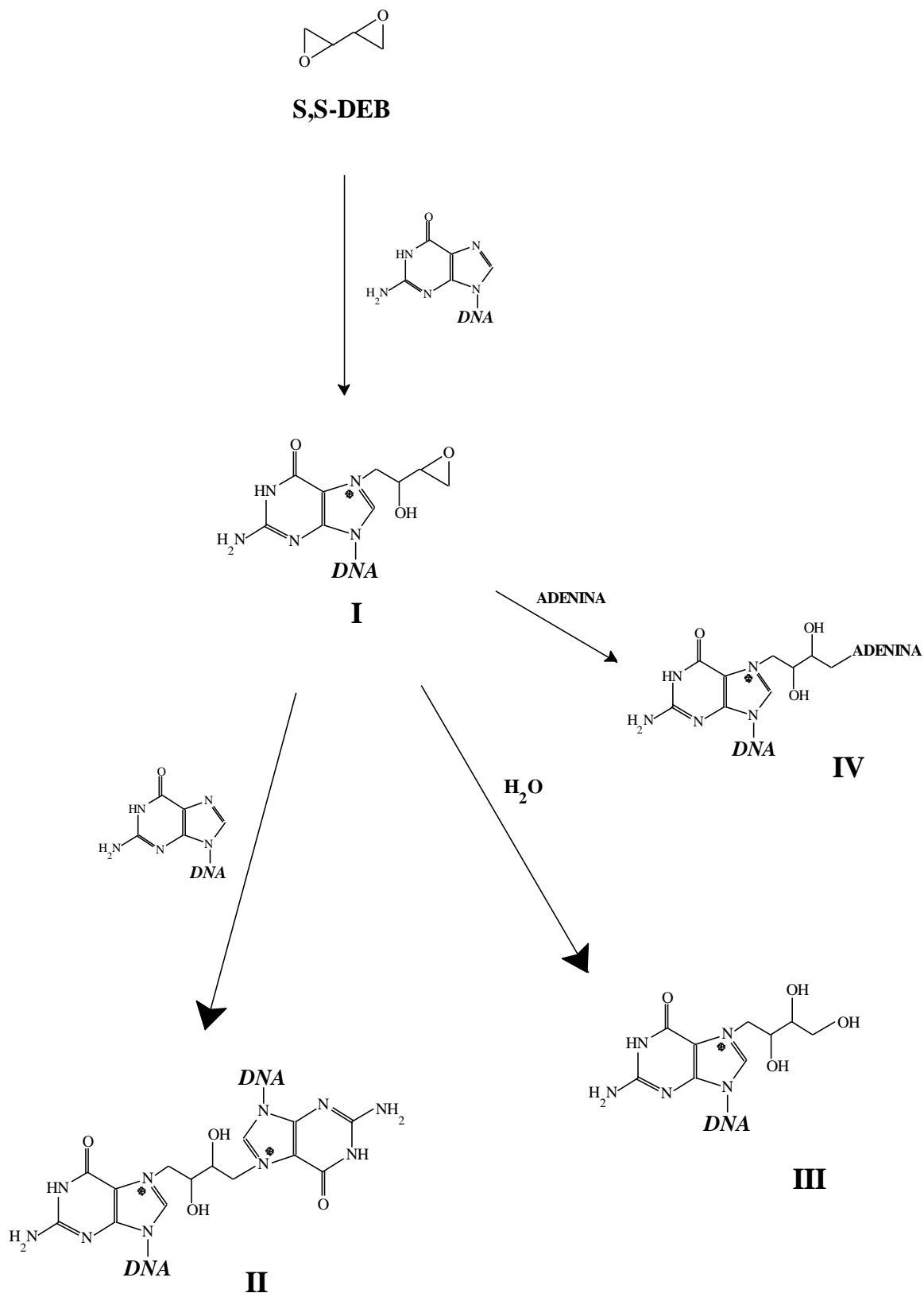
Produktem wstępnej alkilacji DNA przez S,S-DEB jest monoaddukt S,S-N7-(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)guaninowy (**S,S-N7-HEBG, I**). Pozostała wolna grupa epoksydowa utworzonego monoadduktu może następnie reagować dalej w trojaki sposób (Ryc. 4):

- alkilować inną cząsteczkę guaniny w pozycji N₇ w dużym rowku DNA prowadząc do powstania diadduktu N7-N7 S,S-1,4-bis(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu (**S,S-bis-N7G-BD, II**) i utworzyć wiązanie poprzeczne w obrębie helisy DNA,
- hydrolizować ugrupowanie epoksydowe i utworzyć monoaddukt S,S-N7-(2',3',4'-trihydroksybut-1'ylo)guaninowy (**S,S-N7-THBG, III**) [63,65],
- alkilować inną cząsteczkę adeniny w pozycji N₁, N₃, N₇ i N₆ tworząc odpowiedni diaddukt guanino-adeninowy (**IV**) [71-74].

W powstających adduktach konfiguracja absolutna na chiralnych atomach węgla pozostaje konfiguracją S. Przyczyną są zawady przestrzenne, które preferują uczestnictwo w mechanizmie S_N2 reakcji z DNA pierwszorzędowego atomu węgla pierścienia epoksydowego S,S-DEB [63].

Alkilacja DNA przez bifunkcyjny S,S-DEB wykazuje dużą specyficzność. Głównym miejscem alkilacji jest sekwencja 5'-GNC/3'CNG (gdzie: N-dowolny nukleotyd) dając prawie wyłącznie wiązanie „interstrand” 1,3-międzyzincowe bis-N7G-BD powstające głównie w wielkiej bruzdzie helisy DNA [65].

Dystans pomiędzy atomem N₇ guaniny w regionach o sekwencji 5'-GNC/3'CNG w cząsteczce DNA ludzkiego w konformacji B wynosi około 8,9 Å. Ponieważ 4-węglowy łańcuch alkilowy S,S-DEB jest za krótki (około 4-5 Å) aby połączyć sąsiadujące atomy azotu, konieczne jest lokalne, krótkotrwałe zniekształcenie helisy DNA. Prawdopodobnie jest ono indukowane powstawaniem kationowego monoadduktu N7-HEBG prowadząc do otwarcia drugiego pierścienia epoksydowego i wytworzenia wiązania „interstrand” 1,3-międzyzincowego DNA-DNA [64,65].



Ryc. 4. Drogi alkilacji DNA z wytworzeniem monoadduktu S,S-N7-THBG.

Wiązania poprzeczne diadduktu N7-N7 guanina tworzone przez S,S-DEB, zostało zauważone już blisko 40 lat temu przez Lawley'a i Brookes'a badających DNA w komórkach spermy łososia [75,76]. Literatura dość obszernie przedstawia tematykę tworzenia diadduktów N7-N7 guanina. Jednakże niektórzy autorzy w ostatnich latach, wskazują inne miejsca alkilacji przez S,S-DEB. Badając komórki grasicy cielęcej, Tretyakova i wsp. zwracają uwagę na możliwość zastąpienia jednego z atomów N₇ atomami N₁, N₃, N₇ i N₆ adeniny. Produktem są wówczas odpowiednie diaddukty:

- 1-(aden-1-ylo)-4-(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu (N1A-N7G-BD),
- 1-(aden-3-ylo)-4-(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu (N3A-N7G-BD),
- 1-(aden-7-ylo)-4-(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu (N7A-N7G-BD),
- 1-(aden-6-ylo)-4-(guan-7-ylo)butano-2,3-diolu (N6A-N7G-BD) [71-74].

Prawdopodobnie ilość tych asymetrycznych powiązań jest 10-krotnie mniejsza aniżeli odpowiednich wiązań bis-N7G [74].

Metabolity S,S-DEB w postaci monoadduktów występują częściej, jednak najważniejsze znaczenie w tworzeniu wiązań poprzecznych w obrębie helisy DNA, mają diaddukty [65,75,77]. Co ciekawe, badania prowadzone przez Park i wsp. dowiodły, że przy małych stężeniach (bardziej odpowiadających warunkom *in vivo*) S,S-DEB w warunkach *in vitro*, ilościowa proporcja monoadduktu (S,S-N7-THBG, III) i diadduktu (S,S-bis-N7G-BD, II) jest porównywalna. Z kolei proporcja ta, przy wyższych stężeniach, rośnie na korzyść monoadduktu. Prawdopodobnie przyczyną jest wysycenie ograniczonej liczby centrów nukleofilowych DNA zdolnych do utworzenia wiązania poprzecznego [63].

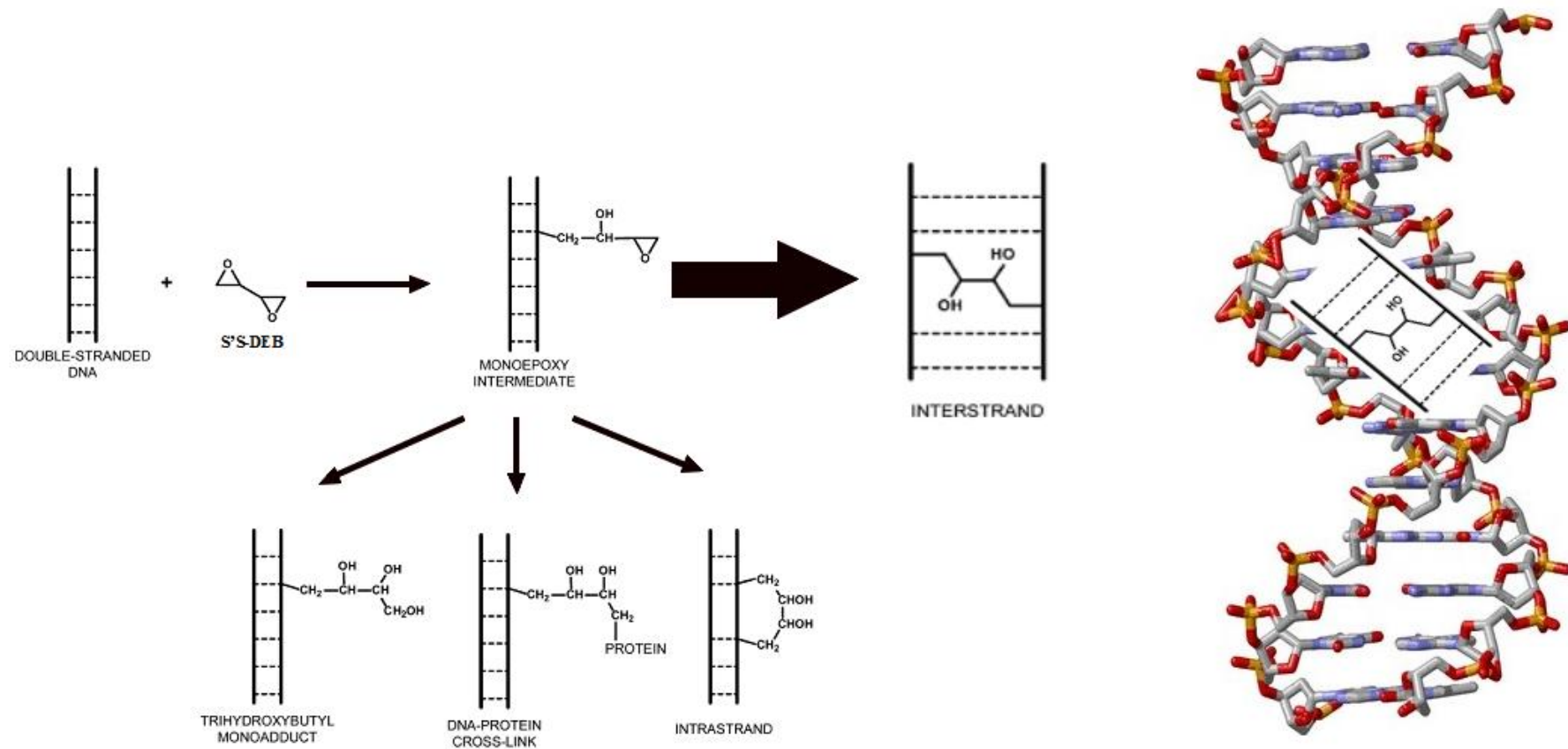
S,S-DEB jest jednym z trzech izomerów optycznych DEB. Pozostałe stereoizomery to: R,R-DEB i *meso*-DEB. Badania prowadzone przez Millard i wsp. oraz Sawyer i wsp. dowodzą, że racemat DEB preferencyjnie indukuje wiązania „interstrand” 1,3-międzyznicowe DNA-DNA (w obrębie grup guaniny na obu niciach helisy) w regionie o sekwencji nukleotydów 5'-GNC (N = G lub C) [64,78,79]. Niektórzy autorzy wspominają również o możliwości tworzenia wiązania „intrastrand” 1,2-wewnątrznicowe DNA-DNA (w obrębie dwóch grup guaniny jednej nici helisy) przez DEB, choć należy zaznaczyć, że literatura nie podaje żadnych przykładów tych wiązań [80]. Prawdopodobnie mogą one przedstawiać zarówno cytotoksyczne jak i promutagenne właściwości [77,80].

Badania prowadzone przez Parka i wsp. dowiodły również, że istnieją różnice w zdolności tworzenia adduktów DNA-DNA pomiędzy poszczególnymi izomerami DEB. Prawdopodobnie jest za to odpowiedzialna różna orientacja grup funkcyjnych pośredniego monoadduktu N7-THBG. W izomerze S,S-N7-HEBG zarówno grupa epoksydowa jak i grupa 2'-hydroksylowa mieści się po jednej stronie łańcucha alkilowego wpływając potencjalnie na miejsce drugiej alkilacji [65].

Wytworzone addukty „interstrand” międzyniciowe DNA-DNA są bardziej toksyczne, gdyż hamują one replikację i transkrypcję DNA, a ich enzymatyczne usunięcie przez polimerazę DNA jest bardzo problematyczne [77,81]. Wymagana jest bardziej kompleksowa naprawa, która może prowadzić do ponownego przegrupowania i/lub delecji nukleotydów [65,82]. Dlatego też, uważa się, że takie preferencyjne tworzenie wiązań „interstrand” międzyniciowe DNA-DNA uszkodzeń przez S,S-DEB jest w zgodzie z jego wysoką aktywnością cytotoksyczną i zdolnością do indukowania aberracji chromosomowych [58]. Powyższe rozważania przedstawia Ryc. 5.

Skutkiem reakcji alkilacji DNA epoksydowymi pochodnymi TREO jest naruszenie struktury i destabilizacja kwasu nukleinowego. Charakter kwasowy guaniny po alkilacji w pozycji N₇ ulega zwiększeniu na skutek wytworzenia czwartorzędowego jonu amoniowego. Powoduje to wywołanie reakcji wewnątrzcząsteczkowej guaniny i przesunięcie równowagi tautomerycznej w stronę jej formy enolowej co prowadzi do destabilizacji wiązania β-glikozydowego deoksyryboza – guanina [63]. Konsekwencją jest hydrolityczne odłączenie zasady purynowej (guaniny) od reszty nukleotydu (deoksyrybozy i reszty fosforanowej). Badania wykazały, że depurynacja adduktów N7A-N7G-BD (t_{0,5} = 31h) i N6A-N7G-BD (t_{0,5} = 17 h) zachodzi szybciej niż bis-N7G-BD (t_{0,5} = 81h) [74]. Bezpośrednim następstwem jest osłabienie wiązania deoksyryboza – fosforan, które może prowadzić do rozpadu nici DNA.

Addukty bis-N7G-BD, N7A-N7G-BD jak i N6A-N7G-BD S,S-DEB ulegające depurynacji w pozycji N₇ guaniny, mogą wiązać się z innymi wolnymi guaninami lub sąsiadującymi miejscami niezasadowymi np. białkami [74,83,84]. Prawdopodobnie te ostatnie odgrywają bardzo ważną rolę w cytotoksyczności TREO [85]. Powiązania DNA z białkami takimi jak: histony, białka HMG, czynniki transkrypcyjne, białka naprawcze DNA, tworzą tzw. „bulky adducts”, które są zdolne do blokowania replikacji i transkrypcji. Potwierdzają to badania prowadzone przez Carmical i wsp., które dowiodły, że zarówno wiązania monoalkilowe jak i „intrastrand” w pozycji N₂ guaniny kompletnie blokują polimerazę DNA u *Escherichia coli* [80,81]. Biorąc pod uwagę fakt, iż w komórkach nowotworowych liczba białek naprawczych DNA jest większa, Tretyakova i wsp. wysunęli hipotezę, iż addukty DNA-biako naprawcze DNA, przyczyniają się do mechanizmu, w którym to komórki nowotworowe są bardziej wrażliwe na działanie S,S-DEB [85].



Ryc. 5. Typy wiązań tworzonych przez S,S-DEB [74,77].

3.2.4.3 Biologiczne efekty alkilacji DNA pod wpływem produktów aktywacji TREO

Skutki działania TREO uzależnione są głównie od rodzaju tworzonych wiązań: „interstrand” międzyniciowe czy „intrastrand” wewnątrznicowe [74]. Za właściwości cytotoksyczne TREO odpowiedzialne są głównie „interstrand” międzyniciowe wiązania poprzeczne tworzone przez S,S-DEB. W zależności od ich struktury, mogą indukować albo śmierć komórki, albo przyczyniać się do wzrostu mutacji [85]. Prace wielu grup badaczy dowiodły, że wiązania „interstrand” odpowiedzialne są głównie za właściwości cytotoksyczne, ponieważ mają zdolność do blokowania replikacji i transkrypcji DNA [76,86-88]. Natomiast wiązania „intrastrand” wewnątrznicowe mogą mieć właściwości albo cytotoksyczne [87], albo mutagenne [89,90].

Badania prowadzone przez Parka i wsp. [65], dowodzą, iż izomer S,S-DEB wytwarza prawie wyłącznie wiązania „interstrand” 1,3-międzyniciowe bis-N7G-BD i potwierdzają silne właściwości cytotoksyczne TREO. Spośród trzech izomerów DEB to właśnie S,S-DEB przedstawia największą siłę genotoksyczną i cytotoksyczną [91,92].

Enzymatyczne usunięcie wiązania poprzecznego jest bardzo skomplikowane. Wymaga specyficznego procesu wycięcia obu nukleotydów połączonych wiązaniem krzyżowym, prowadząc do pęknięcia nici DNA i tzw. naprawy rekombinacyjnej. Brak lub błędnie przeprowadzony proces naprawy materiału genetycznego komórki może prowadzić do pęknięcia chromosomu [65].

Generowane przez S,S-DEB uszkodzenia prowadzą do zaburzenia wewnątrzkomórkowych układów, które są ze sobą ściśle powiązane, co sprawia, że uszkodzenie jednego z procesów wpływa na inne, powodując lawinowo szereg zaburzeń wtórnych [93]. Proces apoptozy może mieć różny przebieg, lecz zawsze rozpoczyna się aktywacją enzymów z rodziny ICE (*interleukin-1-beta-converting enzyme*) zwanych kaspazami. Odbywa się to pod wpływem białek z rodziny Bcl-2, które mogą mieć właściwości hamujące (np. Bag, Bcl-xL) lub aktywujące kaspazy (np. Bax, Bcl-xs), czyli promujące apoptozę. Uszkodzenie DNA prowadzi do produkcji białka p53, które m.in. stymuluje produkcję Bax. Następuje uwolnienie z mitochondrium do cytoplazmy cytochromu c, który z pro-kaspazą 9 i czynnikiem białkowym Apaf-1 tworzy kompleks zwany apoptosomem. Prowadzi to do uaktywnienia kaspazy indukującej (kaspaza 9), która uruchamia kaskadę kaspaz włącznie z najważniejszą kaspazą wykonawczą (kaspaza 3). Końcowym rezultatem apoptozy jest fragmentacja DNA prowadząca do degradacji białek (w tym szkieletu komórkowego), co prowadzi do rozpadu komórki na ciała apoptyczne. Dzięki temu, że błona otaczająca ciała ma zmienioną budowę, są one łatwo rozpoznawalne przez sąsiednie komórki, które ciała te wchłaniają

i rozkładają [20^A,93-95]. Należy nadmienić, iż literatura nie podaje dokładnego mechanizmu indukowania apoptozy przez TREO. Jednak większość badaczy zgodnie obserwuje zmiany w aktywności kaspazy 9, kaspazy 3 i białek z rodziny Bcl-2 [96-98].

Śmierć komórki pod wpływem produktów aktywacji TREO może zachodzić na drodze dwóch różnych procesów: apoptozy bądź nekrozy. Ścisłe powiązanie cytotoksyczności (nekrozy) i apoptozy prawdopodobnie wynika z faktu, iż uszkodzenia DNA przez TREO prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego. Zmiany molekularne w uszkodzonych komórkach zachodzą stosunkowo szybko, a morfologiczne ich przejawy występują z pewnym opóźnieniem. Stopień tych uszkodzeń oraz szybkość przejścia komórki od życia do śmierci, zależy od dawki i długości ekspozycji na lek [93,94]. Zasada przyjęta przez Brockmanna i wsp., mówiąca o tym, iż związki epoksydowe w tym DEB wywołują apoptozę przy niższych poziomach uszkodzeń (dawkach) a wyższe poziomy uszkodzeń (dawek) indukują zmiany nieodwracalne DNA i cytotoksyczność znajduje odzwierciedlenie w ostatnich pracach Wenera i wsp. oraz Munkelta i wsp. [94,96,99]. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* na różnych liniach komórkowych oraz *in vivo* na modelu mysim wskazują na zróżnicowanie działania w zależności od zastosowanej dawki TREO. Niskie stężenia TREO (0 do kilku $\mu\text{mol/l}$) wywołują uszkodzenia DNA, które są niewystarczające do wywołania mechanizmu apoptozy, ale wystarczające do zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2/M. Natomiast wyższe stężenia TREO (kilka oraz kilkadziesiąt $\mu\text{mol/l}$) hamują odpowiednio rozwój komórki dzięki apoptozie i nekrozie.

Wartym podkreślenia jest także fakt, iż DEB jest lotny i wykazuje lotną cytotoksyczność *in vitro*. Tetrahydrofuran i kwas metonosulfonowy jako produkty hydrolizy Bu nie wykazują cytotoksyczności lotnej [100]. Co więcej niektórzy autorzy twierdzą, że ten hydrolityczny rozkład Bu odpowiada za mniejszy efekt cytotoksyczny w porównaniu z TREO [101].

3.2.5 Aktywność farmakologiczna TREO

Aktywność przeciwnowotworowa

TREO wykazuje szeroki zakres działania przeciwnowotworowego. TREO w niskich dawkach, tj. 5-8 g/m^2 podawany co 3-4 tygodnie, stosowany jest od dawna przede wszystkim w chemioterapii raka jajnika [4,5,102-105]. Od 1980 roku prowadzono kliniczne badania nad dożylną postacią TREO podawanego w terapii raka jajnika w kombinacji z innymi lekami cytostatycznymi takimi jak: cisplatyna lub gemcytabina

[62,106-109]. Badania przedkliniczne *in vitro* na ludzkich i zwierzęcych liniach komórkowych wykazały szerokie spektrum aktywności TREO w stosunku do nowotworów litych i hematologicznych, takich jak: rak sutka, czerniak złośliwy oka, czerniak złośliwy skóry, glejak złośliwy, mięsak Ewinga (ES), rak płuc, rak nerki, AML, CML, ALL lub MM [6,99,110-121]. Przeciwbiałaczkowa skuteczność TREO u pacjentów z ALL była lepsza w porównaniu z podobnymi dawkami Cy czy Bu [122]. Ostatnie publikacje potwierdzają skuteczność TREO w takich jednostkach chorobowych jak: naczyniowe czerniaki czy glejaki złośliwe [123,124,125]. W 2004 roku Munkelt i wsp. wykazali wysoką aktywność TREO przeciwko komórkom zwojaka zarodkowego [99]. Werner i wsp. zaobserwowali wysoką skuteczność TREO w skojarzeniu z radioterapią w liniach komórkowych ES w warunkach *in vitro* i w modelu mysim [96]. Wstępne wyniki prac wykazują wrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego na TREO, co czyni go interesującym kandydatem na włączenie do protokołu leczenia raka prostaty [126]. Lanvers-Kaminsky i wsp. wykazali *in vitro* wyższą aktywność TREO od Bu w stosunku do linii komórkowych ES, zwojaka zarodkowego, mięsaka kostnego i dwóch linii komórek białaczkowych, przy czym najwyższą przeciw komórkom białaczkowym, a najniższą przeciw komórkom mięsaka kostnego [101].

Aktywność immunosupresyjna

Poza właściwościami cytotoksycznymi, TREO wykazuje również właściwości immunosupresyjne [99,127-129]. Za immunosupresyjny charakter TREO odpowiada jego zdolność do hamowania proliferacji komórek T, zmniejszenie regulacji cytokin prozapalnych (IL-12, IFN- γ), indukowanie apoptozy: monocytów, limfocytów T oraz komórek dendrytycznych [99,127,129]. Charakter immunosupresyjny TREO wyjaśniany był na komórkach szczura z eksperymentalnym, autoimmunologicznym zapaleniem mózgu i rdzenia oraz na modelu mysim. Badania wskazywały na większy potencjał immunosupresyjny TREO od Cy, uważanego dotychczas za jednego z najsilniejszych immunosupresantów [41,129]. Wstępne, pozytywne wyniki badań wskazują na możliwość zastosowania TREO w wybranych chorobach autoimmunologicznych OUN, jak np. stwardnienie rozsiane (*sclerosis multiple*, SM), gdzie oprócz bezpośredniego działania cytotoksycznego wykorzystuje się przede wszystkim działanie immunosupresyjne. Pierwsze próby przeprowadzone przez Wiendla i wsp. u pacjentów z aktywnie wtórnie postępującym SM, którzy otrzymywali infuzje dożylnie TREO w dawce 7 g/m² co 4 tygodnie (1-4 cykli) a później co 3 miesiące (5-7 cykli) wykazały, że leczenie TREO jest bezpieczne i dobrze tolerowane, a aktywność choroby jest istotnie zahamowana [128]. Pozytywne wyniki terapii TREO w SM tłumaczy się hamowaniem migracji prozapalnych,

immunokompetentnych komórek (komórki cytotoksyczne CD8+, komórki regulatorowe CD4+ jak również monocyty CD14+) przez barierę krew-mózg oraz w obrębie pozakomórkowej macierzy OUN. Proces ten zachodzi przy małych, jeszcze niedziałających cytotoksycznie stężeniach TREO [127,128].

Pomimo, że obserwowany efekt i zakres hamowania migracji przypomina inne leki immunosupresyjne stosowane w SM (mitoksantron, Cy), przypuszcza się, że dalsze ukierunkowane badania TREO mogą być ważnym krokiem w immunopatogenezie i leczeniu SM.

Aktywność mieloablacyjna

Badania przeprowadzone przez Westerhof i wsp., Pleomacher i wsp., Casper i wsp. wykazały wybiórczy i silny efekt cytotoksyczny TREO w stosunku do macierzystych i ukierunkowanych komórek krwiotwórczych przy jednocześnie niewielkiej toksyczności niehematologicznej [130-132]. Jednak uzyskanie działania mieloablacyjnego TREO wymaga zastosowania większej dawki niż uzyskanie efektu przeciwnowotworowego. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami, za właściwą uznaje się dawkę całkowitą 30-42 g/m² podawaną w sposób frakcjonowany, tj. podaną w trzech równych dawkach, przez trzy kolejne dni terapii we wlewie dożylnym [2,3,122,132]. Badania prowadzone na modelu mysim dowiodły, że właściwości mieloablacyjne TREO są takie same lub wyższe w porównaniu ze standardowymi czynnikami mieloablacyjnymi, takimi jak Bu czy FTBI [3].

3.2.6 Zastosowanie TREO w leczeniu

Efekt mieloablacyjny, immunosupresyjny i przeciwnowotworowy a jednocześnie niewielka toksyczność narządowa wczesna i późna oraz przychylny dotąd profil farmakokinetyczny uczyniły TREO interesującym lekiem włączonym w procedurę kondycjonowania pacjentów, poprzedzającą allo-HSCT. Od 1990 roku, wysokie dawki TREO zazwyczaj w połączeniu z innymi cytostatykami są wykorzystywane w kondycjonowaniu przed allo-HSCT u pacjentów z wysokim ryzykiem toksyczności konwencjonalnego kondycjonowania w szerokim spektrum chorób nowotworowych i nienowotworowych (Tab. 1).

Tab. 1. Zastosowanie TREO w chorobach nowotworowych i nienowotworowych u dzieci i dorosłych

Rodzaj transplantacji	Dzieci [133-143]		Dorośli [136,144-157]	
	Nowotwory	Choroby nienowotworowe	Nowotwory	Choroby nienowotworowe
Auto-PBSCT	ES	-	rak piersi chłoniaki rak jajnika	mielofibroza
Allo-HSCT	<u>ostre białaczki</u> ALL, BAL, AML <u>przewlekłe białaczki</u> CML <u>inne</u> LCH, MDS	ALD, BTM CGD, CVID DBA, HLH LAD, MPS1H OP, SCID WAS, SAA SDS, WS	<u>ostre białaczki</u> ALL, AML <u>przewlekłe białaczki</u> CLL, CML <u>inne</u> HD, HS, MDS, MPS, MM, NHL	mielofibroza PNH SAA

ALD (adrenoleukodystrophy) – adrenoleukodystrofia, **ALL** (acute lymphoblastic leukemia) – ostra białaczka limfoblastyczna, **AML** (acute myeloid leukemia) – ostra białaczka szpikowa, **BAL** (biphenotypic acute leukemia) – ostra białaczka bifenotypowa, **BTM** (beta-thalassemia major), **CGD** (chronic granulomatous) – przewlekła choroba ziarniakowa, **CLL** (chronic lymphocytic leukemia) – przewlekła białaczka limfatyczna, **CML** (chronic myelocytic leukemia) – przewlekła białaczka szpikowa, **CVID** (common variable immunodeficiency) - pospolity zmienny niedobór odporności, **DBA** (Diamond-Blackfan anemia) – niedokrwiłość Blackfana-Diamonda, **ES** (Ewing's sarcoma) – mięsak Ewinga, **HD** (Hodgkin's disease) – choroba Hodgkina, **HLH** (hematophagocytic lymphohistiocytosis), **HS** (Hurler's syndrome) – zespół Hurlera, **LAD** (leukocyte adhesion deficiency) – zespół adhezji limfocytów, **LCH** (Langerhans cell histiocytosis) – histiocytoza komórek Langerhansa, **MDS** (myelodysplastic sarcoma) – zespół mielodysplastyczny, **MM** (multiple myeloma) - szpiczak mnogi, **MPS** (myeloproliferative) **MPS1H** (mucopolysaccharidosis type 1 Hurler syndrome), **NHL** (non-Hodgkin's lymphoma) – chłoniak nieziarniczny, **OP** (osteopetrosis), **PNH** (paroxysmal nocturnal) – napadowa nocna hemoglobinuria, **SAA** (severe aplastic anemia) – ciężka nabyta niedokrwiłość plastyczna, **SCID** (severe combined immunodeficiency) – wrodzony złożony niedobór odporności, **SDS** (Schwachman-Diamond syndrome) – zespół Schwachmana-Diamonda, **WAS** (Wiskott-Aldrich Syndrom) – zespół Wiskotta-Aldricha, **WS** (Wolman syndrome)

W roku 2004 TREO uzyskał pozytywną opinię EMA (*European Medical Agency*), jednak do chwili obecnej nie został zarejestrowany do stosowania w chemioterapii kondycjonującej przed HSCT [42].

Zastosowanie TREO u pacjentów z wysokim ryzykiem powikłań konwencjonalnej procedury mieloablacyjnej przed HSCT zostało potwierdzone w pracach Beelena i wsp. [3]. Badania przeprowadzono z użyciem TREO ($3 \times 12 \text{ g/m}^2$ i $3 \times 14 \text{ g/m}^2$) i Cy u 18 pacjentów dorosłych z różnymi nowotworami układu krwiotwórczego (AML, ALL, CML, NHL, MDS). Dawka dobrana została na podstawie wcześniejszych badań i obserwacji toksyczności TREO u myszy [118,130,158]. Wybrano skojarzenie z Cy, gdyż pozwala ono na bezpośrednie porównanie skuteczności ze standardowym reżimem mieloablacyjnym takim jak FTBI i Cy czy Bu i Cy. Toksyczności niehematologiczne są mniejsze oraz przejściowe i wynikają z typowego osłabienia organów po HSCT. Należy je przypisać nie tylko kondycjonowaniu, ale także potransplantacyjnym efektom ubocznym działania leków immunosupresyjnych i/lub przeciwinfekcyjnych. Nie odnotowano wystąpienia drgawek i rozwinięcia choroby VOD [3,46,159].

Badania ze zmniejszoną skumulowaną dawką TREO prowadzone były przez Caspera i wsp. [2]. Skojarzone podanie TREO (30 g/m^2) i Fd (150 mg/m^2) przed HSCT grupie 30 pacjentów dorosłych z nowotworami układu krwiotwórczego (CML, MM, AML, CLL) wskazuje również na porównywalny efekt mieloablacyjny do Bu i Fd lub Mel i Fd przy mniejszych efektach toksycznych. Podczas gdy kombinacja Fd ze zredukowaną dawką Bu prowadzi do ciężkiego toksycznego uszkodzenia wątroby (II stopień w skali Bearmana [160]) i VOD, podanie jej razem z TREO powoduje tylko krótkotrwałe i odwracalne podwyższenie aminotransferaz wątrobowych (AspAT i ALAT). Toksyczność nie przekracza wówczas 3 stopnia skali toksyczności (*Common Toxicity Criteria, CTC*) [161]. Nie obserwowano przypadków choroby VOD.

3.2.7 Interakcje TREO

Opublikowane badania *in vitro*, badania kliniczne u pacjentów chorych na czerniaka złośliwego, raka jajnika a także u pacjentów przed allo-HSCT wskazują na synergizm działania podczas terapii skojarzonej TREO z lekami przeciwnowotworowymi takimi jak: antymetabolity pirymidynowe (cytarabina, gemcytabina) oraz purynowe (Fd), cisplatyna, paklitaksel [2,99,120,121,125,162-165]. Mechanizm synergii może być tłumaczony hamowaniem mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez TREO [166,167].

Autorzy zwracają szczególną uwagę na czas włączenia obu składników, od którego zależy siła synergistycznego działania. Największy synergizm jest wtedy, gdy oba leki podawane są jednocześnie lub gdy podawanie analogów cytozyny jest opóźnione w czasie o 24 godziny. Wcześniejsze podawanie analogów cytozyny lub opóźnione o 24 h podanie TREO zmniejsza efekt synergistycznego działania [125]. Badania prowadzone przez Schmittela i wsp. [162] dowodzą, że pacjenci leczeni TREO i gemcytabiną wykazują lepszy wskaźnik przeżycia wolnego od progresji choroby (*progression free survival*, PFS) i wyższy współczynnik stabilizacji w porównaniu z pacjentami leczonymi samym TREO. Literatura wskazuje na ciekawy efekt współdziałania TREO i Fd w warunkach *in vitro* na komórki ALL. Otóż w zależności od stężenia TREO, może mieć on działanie synergistyczne (powyżej 1 $\mu\text{mol/l}$) lub antagonistyczne (poniżej 1 $\mu\text{mol/l}$) [99]. TREO wykazuje także synergizm działania z lekami o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Przykładem może być sulfoksoimina butioniny (BSO) – inhibitor syntetazy glutationowej, który wzmacnia działanie cytotoksyczne TREO w terapii glejaka złośliwego [168]. Również w badaniach prowadzonych w AML z wykorzystaniem makrocyklicznego laktonu - briostatyna-1, będącego aktywatorem kinazy białkowej C, zauważono synergizm cytotoksyczny [98]. Ponadto stwierdzono, że TREO wzmacnia indukowane przez imatinib zahamowanie aktywności proliferacyjnej komórek białaczkowych pochodzących od chorych z CML [169].

Należy pamiętać o tym, że poza korzystnym wzmocnieniem działania przeciwnowotworowego, terapia skojarzona może zwiększać ryzyko działań niepożądanych cytostatyków w odniesieniu do zdrowych tkanek [54].

3.2.8 Działania niepożądane TREO

Głównym działaniem niepożądanym jest odwracalna mielosupresja z klinicznymi objawami anemii, leukopenii i trombocytopenii. Zazwyczaj stosowane dawki TREO (5-8 g/m^2 , i.v.) są dobrze tolerowane [6]. Eskalacja dawki TREO badana była u pacjentów z rozpoznaniem rakiem płuc. Wyznaczono maksymalnie tolerowaną dawkę (*maximum tolerated dose*, MTD) u pacjentów bez transplantacji z wykorzystaniem komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej (*peripheral blood stem cells transplantation*, PBSCT) po jednorazowym podaniu leku we wlewie dożylnym 10 g/m^2 w cyklu 4-tygodniowym. Objawem toksycznym ograniczającym zastosowanie wyższej dawki (*dose-limiting toxicity*, DLT) były toksyczności hematologiczne – trombocytopenia, obserwowana przy dawkach TREO 10-12,5 g/m^2 [1,116]. Natomiast odwracalne niehematologiczne toksyczności takie jak zaburzenia żołądkowo-jelitowe, nudności czy wysypki skórne, obserwowane były

sporadycznie [1]. Około 25% pacjentów leczonych TREO doświadcza nadmiernej pigmentacji skóry. Rzadko występują stany zapalne śluzówki jamy ustnej i gorączka neutropeniczna [54].

W I fazie badań klinicznych prowadzonych przez Scheulen'a i wsp. stwierdzono, że MTD TREO u pacjentów z PBSCT wynosi 47 g/m² w jednorazowym wlewie dożylnym [6]. Biorąc pod uwagę fakt, iż mielosupresja największe nasilenie osiąga po 10–14 dniach od podania leku [54], zastosowanie transplantacji komórek hematopoetycznych 2 dni po zastosowaniu TREO pozwoliło na zwiększenie dawki do 56 g/m² w 2 h wlewie dożylnym. DLT na tym poziomie objawiało się wysypką skórna, biegunkami, zapaleniem śluzówki jamy ustnej i/lub żołądka oraz kwasicą metaboliczną, co obrazuje Tab. 2.

Tab. 2. Wzrost toksyczności w zależności od dawki TREO [6]

Dawka [g/m ²]	Liczba pacjentów	Stopień CTC	Biegunka	Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej	Kwasica	Wykwity skórne	Wymioty	Ból	Gorączka
20,0	4	II III IV		1			1	1	
26,0	3	II III IV							
32,5	3	II III IV							1 1 1
39,0	3	II III IV							
47,0	3	II III IV	2			2		1	1
56,0	6	II III IV	1 2	1 1	2 1	3 1	2	3	2 1

Przy dawkach 47 g/m² wspomniane objawy uboczne były łagodniejsze a rumień, świąd, gorączka neutropeniczna, hiperpigmentacja skóry oraz bóle głowy były sporadyczne. Podczas stosowania wysokodawkowej terapii TREO z innymi lekami alkilującymi, takimi jak ifosfamid czy Cy, nie ma doniesień o działaniu toksycznym na nerki, pęcherz moczowy, serce oraz układ nerwowy [6].

Zauważono, że w odróżnieniu od Bu, TREO podawany w dawce 47 g/m² lub powyżej nie indukuje ciężkiej hepatotoksyczności i VOD [170,171]. Tłumaczy się to odmiennym sposobem alkilacji DNA, mimo, że miejsca alkilacji są identyczne [58]. Podczas podawania TREO w kombinacji z Fd lub Mel nie obserwowano zapalenia płuc [172,173] ani też ciężkiej niewydolności lewokomorowej serca [173,174].

Podczas podawania maksymalnych dawek TREO 56 g/m^2 w krótkim wlewie dożylnym zaobserwowano rozwijanie się kwasicy metabolicznej. Jest ona wynikiem odłączenia dwóch moli kwasu metanosulfonowego podczas nieenzymatycznej aktywacji jednego mola macierzystego TREO. Mimo to, alkalizacja np. wodorowęglanem sodowym nie jest wskazana, ponieważ może ona zwiększać pH-zależną aktywację TREO do związków epoksydowych w osoczu i moczu i tym samym wywoływać uszkodzenie pęcherza moczowego. Jednak przy wyższym stężeniu kwasu metanosulfonowego, który tworzy się podczas tej reakcji, proces ten ulega zahamowaniu [6].

TREO wykazuje także właściwości promutagenne, gdyż powstałe zmiany w DNA mogą przyczyniać się powstania mutacji [58,63,64]. Właściwości kancerogenne zostały ukazane w badaniach Pedersena-Bjergaarda i wsp. [175]. Zanotowano 8 przypadków wystąpienia AML jako działania niepożądanego w grupie 533 pacjentek leczonych TREO z powodu raka jajnika. Indukowane przez produkty aktywacji TREO zmiany w strukturze DNA, które nie zostały naprawione lub nie wywołały śmierci komórki, mogą przyczyniać się do zafałszowania informacji genetycznej. Badania przeprowadzone na zwierzęcych liniach komórkowych w warunkach *in vitro* potwierdzają, że aktywny metabolit TREO S,S-DEB jest silnym induktorem mutagenyzy. Jest on odpowiedzialny za powstawanie mutacji punktowych (gdzie dominują tranzycje G:C→A:T, transwersje G:C→C:G, A:T→T:A), delecji eksonów i/lub całych genów a także aberracji chromosomowych [63,72-74,80,176].

Dualistyczna aktywność TREO, zarówno przeciwnowotworowa jak i kancerogenna, może być częściowo tłumaczona faktem, iż aktywny epoksydowy metabolit TREO S,S-DEB jest izomerem optycznym DEB [65]. S,S-DEB razem z R,R-DEB i *meso*-DEB uznawane są za metabolity kancerogenego 1,3-butadienu (BD), składnika spalin samochodowych i dymu papierosowego ($20\text{-}75 \mu\text{g/papieros}$) [177,178].

Niemniej jednak, TREO charakteryzuje się niską toksycznością narządową i uznawany jest za lek bezpieczny, nawet u pacjentów wcześniej leczonych wysokimi dawkami innych leków, u których ryzyko wystąpienia skutków ubocznych jest duże [101].

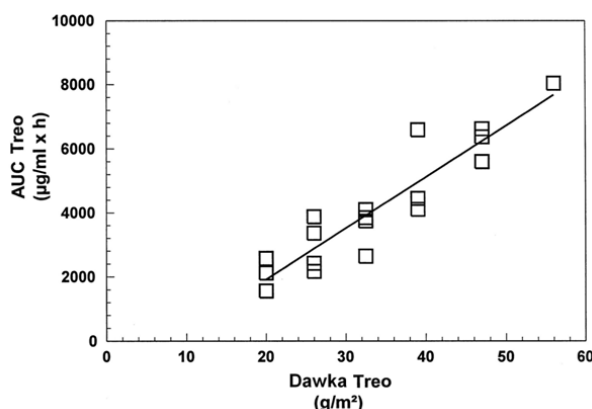
3.2.9 Farmakokinetyka TREO

Pomimo klinicznego użycia TREO od blisko 35 lat w postaci dożylniej i doustnej, opublikowane badania farmakokinetyki TREO są bardzo ograniczone. Dostępne w piśmiennictwie badania u ludzi dotyczą podania dożylnego leku w dawkach $8 - 56 \text{ g/m}^2$, podania drogą izolowanej brzusznej perfuzji w dawce $2,6 \text{ g/m}^2$ oraz podania doustnego w dawkach od 8 do 10 g/m^2 u osób dorosłych [3-9]. Zmiany stężeń TREO w osoczu

najlepiej opisuje model dwukompartментowy. Faza absorpcji (w przypadku postaci doustnej), dystrybucji i eliminacji przebiega zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu [4-6].

3.2.9.1 Farmakokinetyka postaci dożyłnej TREO u dorosłych

TREO po podaniu dożylnym wykazuje farmakokinetykę liniową w szerokim zakresie dawek, co zostało udowodnione podczas I fazy badań klinicznych prowadzonych przez Scheulena i wsp. [6]. Badania farmakokinetyki leku prowadzone w celu optymalizacji mieloablacyjnego efektu TREO wykazały liniową farmakokinetykę do dawki 47 g/m^2 z porównywalnie niską zmiennością wewnątrz i międzypersonalną. W tym celu eskalowano pacjentom pojedynczą dawkę leku w zakresie od 20 g/m^2 , poprzez 26 g/m^2 , $32,5 \text{ g/m}^2$, 39 g/m^2 , 47 g/m^2 aż do 56 g/m^2 w 2-godzinny wlew dożylny. Wykazano, że zależność C_{max} i AUC TREO od dawki leku jest liniowa. Jedynie przy najwyższej dawce zaobserwowano nieproporcjonalnie wyższy wzrost AUC, który może być tłumaczony zwiększonym uwalnianiem kwasu metanosulfonowego w osoczu powodującym zahamowanie pH-zależnej transformacji TREO (Ryc. 6).



Ryc. 6. Liniowa zależność $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ od dawki TREO [6].

Wykazano również, iż wydłużenie czasu infuzji z 2 do 24 h może pomóc w zmniejszeniu tworzenia się kwasu metanosulfonowego, a tym samym w zahamowaniu powstawania kwasicy metabolicznej [6]. Ponadto prace innych autorów wskazują na niezależność takich parametrów jak $t_{0,5}$, V_{ss} , Cl_{tot} od dawki leku, co potwierdza liniową farmakokinetykę TREO [3-7,9]. Badania przeprowadzone przez Hilgera i wsp. [4] wykazały, iż wydłużenie czasu trwania wlewu nie wywołuje zmiany $t_{0,5}$, V_{ss} , Cl_{tot} za wyjątkiem C_{max} i ilości wydalonego TREO. Porównanie parametrów farmakokinetycznych TREO po podaniu różnych dawek w jednorazowym wlewie dożylnym u pacjentów dorosłych zostały przedstawione poniżej w Tab. 3.

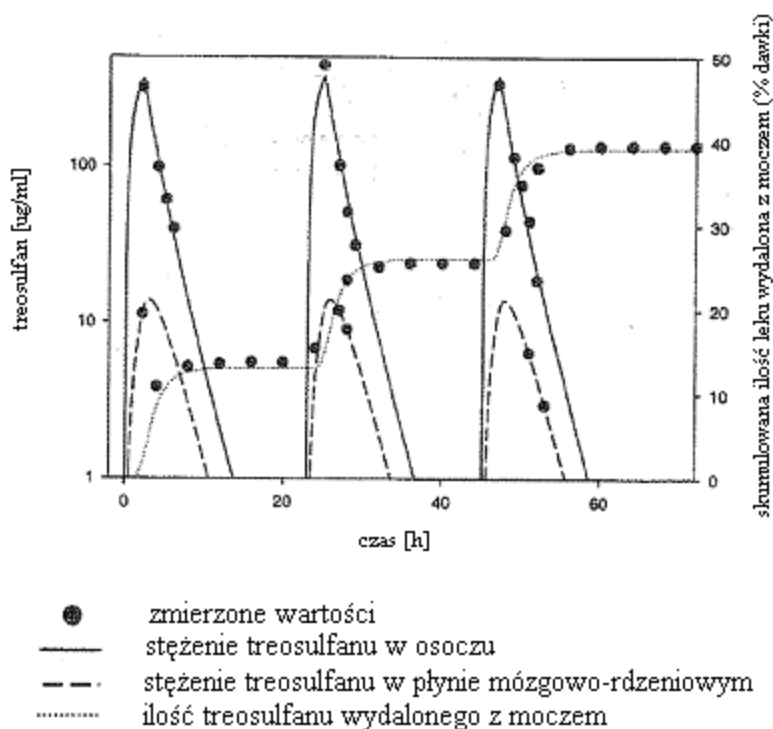
Tab. 3. Porównanie parametrów farmakokinetycznych TREO po podaniu różnych dawek w jednorazowym wlewie dożylnym u pacjentów dorosłych [3,4,6]

Parametry farmakokinetyczne	Dawka								
	8,0 g/m ² [4]	10,0 g/m ² [4]	8,0 g/m ² [4]	10,0 g/m ² [4]	12,0 g/m ² [3]	14,0 g/m ² [3]	20,0-26,0 g/m ² [6]	32,5-39,0 g/m ² [6]	47,0-56,0 g/m ² [6]
Czas wlewu [h]	0,5	0,5	2	2	2	2	2	2	2
t _{0,5} (h)	1,94 ± 0,99	1,87 ± 0,79	1,75 ± 0,06	1,99 ± 0,61	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,4	1,78 ± 0,30	2,38 ± 0,56
C _{max} [µg/ml]	465 ± 98	597 ± 94	181 ± 36	306 ± 94	260 ± 35	322 ± 47	796 ± 175	1283 ± 275	1352 ± 270
AUC _{0→∞} [µg/ml h]	708 ± 168	977 ± 182	541 ± 107	940 ± 293	898 ± 104	1104 ± 173	2741 ± 707	4105 ± 1405	6495 ± 1076
Cl _{tot} [ml/min]	199 ± 53	176 ± 34	255 ± 59	190 ± 63	225 ± 23	216 ± 32	151 ± 33	151 ± 35	127 ± 10
V _{ss} [l]	26 ± 17	22 ± 4	30 ± 8	26 ± 12	34 ± 5	31 ± 7	20 ± 4	18 ± 3	20 ± 3
Wyeliminowany % dawki	26 ± 12	24 ± 18	14 ± 5	17 ± 8	39 ± 5	39 ± 7	20 ± 7	33 ± 6	27 ± 7

Okolo 30% całkowitej dawki leku jest wyeliminowana z moczem w postaci niezmienionej w przeciągu 48 godzin od momentu podania leku, w tym okolo 90% w ciągu pierwszych 6 godzin. Indywidualne wartości ilości leku wyeliminowanego z moczem wykazują szeroki rozrzut (5% - 49%) i uzależnione są w sposób oczywisty od prawidłowej pracy i funkcji nerek [4,5,6]. Ponadto, indywidualne cechy pacjenta takie jak obecność wodobrzusza, wysięków opłucnych czy obrzęków, powodują zwiększenie V_{ss} i Cl_{tot} a co za tym idzie toksyczności TREO. Można to tłumaczyć dobrą rozpuszczalnością leku w wodzie i obecnością dodatkowego „trzeciego” kompartamentu [4,6]. Pomimo, że największa ilość niezmienionego TREO wydalana jest z moczem, obecność TREO potwierdzono także w żółci, ślinie i łzach [6,7,54].

Podczas pierwszej próby podawania TREO łącznie z Cy przed HSCT, Beelen i wsp. przeprowadzili analizę parametrów farmakokinetycznych TREO po podaniu wielokrotnych dawek dożylnych w trzech kolejnych dniach terapii [3,9]. Badacze potwierdzili, iż parametry takie jak AUC, C_{max} zwiększają się wraz z podaną dawką leku. Co więcej, wykazali oni, że parametry AUC, C_{max} , $t_{0,5}$, V_{ss} , Cl_{tot} i klirens nerkowy (Cl_{ren}) wykazują niską zmienność międzyosobniczą i międzydniową. Według autorów, wskazuje to na brak kumulacji i przyspieszonej eliminacji TREO pomimo wielokrotnego podania leku. Ciekawostką jest fakt, iż u jednego pacjenta zanotowano cytostatyczne stężenia TREO w płynie mózgowo-rdzeniowym i wyznaczono dla nich AUC, C_{max} , V_{ss} , które wynosiły odpowiednio 69,1 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$, 14 $\mu\text{g/ml}$, 30l. Wyniki tych interesujących badań zostały przedstawione, na Ryc. 7.

Badania farmakokinetyki TREO po podaniu dawki 2,6 g/m^2 drogą izolowanej brzusznej perfuzji prowadzili Müller H. i Hilger R. [8]. Zaobserwowano zbliżoną wartość AUC i dwukrotnie większą wartość C_{max} leku w krążeniu lokalnym oraz dwukrotnie niższą wartość C_{max} w krążeniu systemowym w porównaniu z podaniem blisko czterokrotnie większej dawki TREO (10 g/m^2) drogą tradycyjnego wlewu dożylnego. Takie podanie TREO, zapewnia obieg leku w ograniczonym obszarze jamy brzusznej i pozwala na zwiększenie efektywności terapii lokalnej przy równocześnie zmniejszonej toksyczności ogólnej.

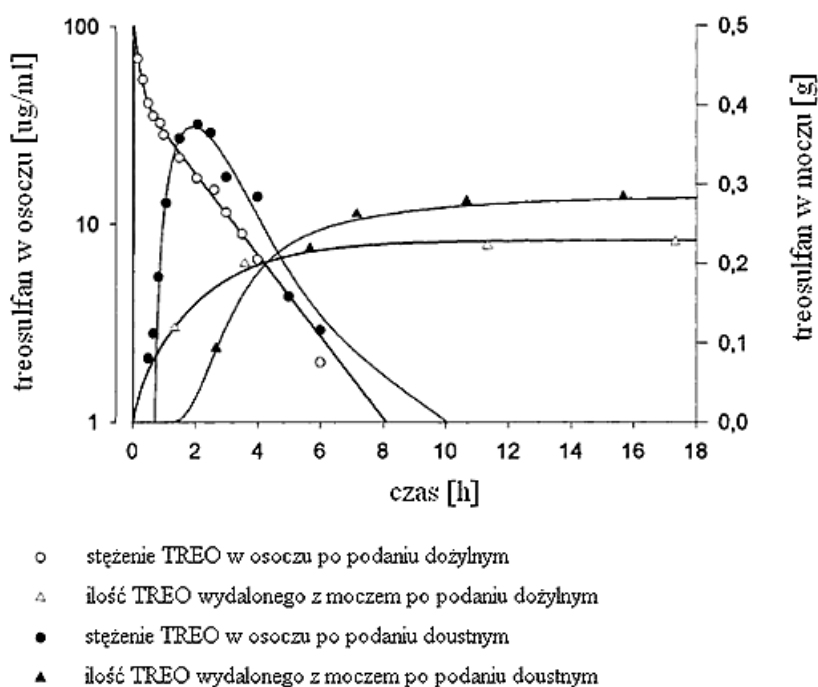


Ryc. 7. Przebieg zmiany stężeń TREO w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz ilości wydalonego leku z moczem jako funkcja czasu w modelu dwukompartamentowym u pojedynczego pacjenta, któremu podano TREO w dawce 14 g/m^2 przez trzy kolejne dni terapii w postaci wlewu dożylnego [9].

3.2.9.2 Farmakokinetyka postaci doustnej TREO u dorosłych

Badania porównawcze postaci doustnej i dożylnych prowadzone były przez Hilgera i wsp. oraz Welscha i wsp. [5,7]. Dostępność biologiczna (biodostępność, F) postaci doustnej TREO wynosi 97% i charakteryzuje się stosunkowo niską zmiennością międzypersonalną o czym świadczy współczynnik zmienności 18%. Wynik ten wskazuje, iż TREO (lek macierzysty) nie ulega efektowi pierwszego przejścia. Wartość C_{\max} po podaniu doustnym jest istotnie niższa niż po podaniu dożylnym (29 µg/ml vs 67 µg/ml) [5]. $T_{0,5}$ po podaniu doustnym i dożylnym wynosiła odpowiednio: 1,7 h (1,5 h - 1,9 h) vs 1,6 h (1,4 h - 1,8 h) [5,7,54]. Około 15% całkowitej dawki leku jest wydalana z moczem w postaci niezmienionej w ciągu 24 godzin od momentu podania leku, z tego 90% w ciągu pierwszych 6 godzin. Tak więc ilości leku wyeliminowanego drogą nerkową, jak i Cl_{tot} są porównywalne po podaniu drogą doustną jak i dożylną [5]. Zmiany stężeń TREO w osoczu oraz skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem

po podaniu doustnym i dożylnym w dawce $1,1 \text{ g/m}^2$ jako funkcja czasu u tego samego pacjenta przedstawia Ryc. 8.



Ryc. 8. Zmiany stężeń TREO w osoczu i skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem po podaniu doustnym i dożylnym w dawce $1,1 \text{ g/m}^2$ jako funkcja czasu u jednego pacjenta [5].

3.2.9.3 Farmakokinetyka TREO u dzieci

Pierwsze badania farmakokinetyki TREO u pacjentów pediatrycznych zostały przeprowadzone przez zespół prof. Głównki we współpracy z Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. TREO podawany był w pojedynczym 2 h wlewie dożylnym u dzieci poddanych leczeniu mieloablacyjnemu przed allo-HSCT. Badanie farmakokinetyki przeprowadzono u 5 pacjentów w wieku 2-15 lat, którym podawano TREO w dawkach: 10 g/m^2 i 12 g/m^2 . Otrzymane średnie wartości parametrów farmakokinetycznych wydają się wskazywać, że farmakokinetyka TREO po wlewie dożylnym u dzieci może być porównywalna z farmakokinetyką tego leku u dorosłych pacjentów [10].

Niezależne wyniki badań uzyskane przez Beier i wsp. zaprezentowano podczas 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation w 2012 r. [11]. Autorzy prowadzili porównanie farmakokinetyki TREO u 15 pacjentów

pediatrycznych podzielonych na dwie grupy w zależności od masy ciała: do 10 kg (średnia wieku - 10 miesięcy) i powyżej 10 kg (średnia wieku - 5 lat). Zaobserwowali oni wyższe wartości AUC (2203 mg/l*h do 1507 mg/l*h) i niższe wartości V_{ss} (9,4 l do 16,2 l) w grupie dzieci o masie ciała do 10 kg w porównaniu z grupą o większej masie. Pozostałe parametry takie jak $t_{0,5}$, ilość wyeliminowanego leku z moczem oraz MRT nie różniły się od siebie istotnie.

3.2.10 Metody analityczne oznaczania TREO

Do oznaczeń TREO stosuje się głównie metody chromatograficzne. TREO oznaczano metodą chromatografii gazowej po uprzedniej derywatacji *ex vivo* do L(+)-diepoksybutanu przez alkalizację próbki [4,7]. Do bezpośredniego oznaczenia TREO w płynach biologicznych zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (*reversed phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) z detektorem refraktometrycznym [4]. Rozdział TREO i związków endogennych uzyskano na kolumnie Nucleosil C18 (25 cm x 4,6 mm; wielkość cząstek 5 μ m), przez którą przepływała faza ruchoma z szybkością 1 ml/min, złożona z buforu fosforanowego o pH 5,0 (otrzymanego przez rozpuszczenie 1g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ i 0,1g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ w 1l H_2O i doprowadzonego do pH 5,0 przy użyciu 85% H_3PO_4). Metoda ta wykorzystana została we wszystkich badaniach farmakokinetyki TREO [3,5,6,8,9]. Jednakże należy zaznaczyć, iż literatura nie podaje parametrów walidacyjnych tej metody. Obserwowana niestabilność detektora refraktometrycznego podczas pierwszych prób oznaczania TREO u dzieci po allo-HSCT przez Główkę i wsp., była powodem modyfikacji metody przez zaproponowanie nowego składu fazy ruchomej. Przeprowadzono pełną walidację procedury analitycznej [10].

3.3 Parametry walidacyjne metod analitycznych

3.3.1 Selektowność metody

Selektowność jest to zdolność metody do oznaczania i odróżniania analizowanego analitu w obecności wzorca wewnętrznego (*internal standard*, IS) oraz innych związków w złożonej próbce rzeczywistej bez interferencji składników towarzyszących na sygnał analitu [179]. Selektowność metody ocenia się na podstawie analizy chromatogramów zarejestrowanych dla prób ślepych i prób obciążonych analizowanym analitem i IS.

3.3.2 Liniowość

Liniowość metody oznacza zakres stężeń analizowanego związku, w którym istnieje wprost proporcjonalna zależność pomiędzy stężeniem a stosunkiem powierzchni pików chromatograficznych analitu i IS. Przedział między najwyższym i najniższym stężeniem substancji badanej (zakres kalibracji) wyznaczany jest na podstawie oczekiwanych stężeń badanego związku w próbach. Miarą liniowości jest współczynnik korelacji (r) krzywej wzorcowej, który określa stopień zgodności punktów (x, y) z prostą regresji. Dodatkowo, liniowość krzywych wzorcowych potwierdza się używając testu Mandel'a (*Mandel's fitting test*) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$, który służy do weryfikacji poprawności liniowego lub kwadratowego modelu regresji. O liniowości świadczy wartość testowa $TV < F_{kryt}$ [180]. Krzywe wzorcowe wyznacza się, jako zależność stosunków pola powierzchni pików badanego związku i IS od stężenia badanego związku w płynie biologicznym.

3.3.3 Oznaczalność i wykrywalność metody

Oznaczalność metody (*Limit of quantification*, LOQ) jest to najniższe stężenie analitu, generującego sygnał, który może być statystycznie odróżniony od szumu linii podstawowej tj. oznaczone z odpowiednią precyzją ($Wz \leq 20\%$) i dokładnością (błąd oznaczeń $\leq 20\%$).

Wykrywalność metody (*Limit of detection*, LOD) jest to najmniejsze stężenie analizowanego związku rejestrowane przez detektor przy stosunku sygnału pomiarowego do poziomu zakłóceń linii podstawowej. Parametr ten można wyznaczyć wykorzystując

odchylenie standardowe (*standard deviation*, SD) i współczynnik kierunkowy prostej kalibracyjnej [179].

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot SD}{b} \quad (1)$$

gdzie:

SD – odchylenie standardowe

b – czułość metody, czyli nachylenie krzywej kalibracyjnej

3.3.4 Precyzja metody

Precyzja metody (*precision*) określa stopień zgodności między poszczególnymi wynikami analiz próbek o tym samym stężeniu, uzyskanymi tą samą metodą, przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczeń. Jest to rozrzut pojedynczych wyników (x_i), przy n powtórzeniach w stosunku do wartości średniej arytmetycznej pomiarów (\bar{x}). Do porównania precyzji oznaczeń wykorzystuje się wartość względnego odchylenia standardowego (*relative standard deviation*, RSD) zwanego także współczynnikiem zmienności (*coefficient of variation*, Wz), jeżeli wartość ta wyrażona zostanie w %:

$$Wz = \frac{SD}{C_{ozn}} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

SD – odchylenie standardowe

C_{ozn} – średnie oznaczone stężenie

Zgodnie z wytycznymi ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) precyzję można podzielić na:

- a) powtarzalność (*repeatability*) – jest to precyzja otrzymana w identycznych warunkach operacyjnych (w tym samym laboratorium, przez jednego analityka, przy użyciu tej samej aparatury, z jednakowymi odczytnikami) i w krótkim przedziale czasu, np. w ciągu tego samego dnia. Określa precyzję w ramach jednej sekwencji analitycznej (precyzja w ciągu dnia)

- b) precyzję pośrednią (*intermediate precision*) – wyraża ona zmienność wewnątrzlaboratoryjną (pomiar wykonany jest w różnych dniach i/lub przez różnych analityków i/lub przy użyciu różnej aparatury). Określa precyzję między seriami (precyzja między dniami) [179,181].

Wartość Wz nie powinna być większa niż 15% dla wszystkich oznaczeń stężeń z krzywej wzorcowej z wyjątkiem najmniejszego stężenia, dla którego $Wz \leq 20\%$.

3.3.5 Dokładność metody

Dokładność (*accuracy*) jest to stopień zgodności między wynikiem uzyskanym x_i lub średnią arytmetyczną \bar{x} z n oznaczeń a rzeczywistą zawartością analitu w badanej próbce. Dokładność metody określana jest na podstawie wartości średniej \bar{x} z n wyników uzyskanych tą samą metodą, w tej samej próbce, stanowiącej certyfikowany materiał odniesienia (*certified reference material*), w której rzeczywista zawartość analitu τ jest dokładnie znana.

Dokładność metody definiujemy następująco:

$$E_{\bar{x}} = \pm | \bar{x} - \tau | \quad (3)$$

gdzie: $\bar{x} - \tau$ błąd systematyczny [182].

Metoda dokładna umożliwia uzyskanie wyników analizy bliskich wartości nominalnej, które nie są obarczone błędem systematycznym.

Dokładność można wyrazić, jako procentowy błąd oznaczeń (%), który powinien mieścić się w zakresie $\pm 15\%$ nominalnej wartości, z wyjątkiem najmniejszego stężenia, dla którego błąd oznaczeń $\leq 20\%$. Oblicza się dokładność w ciągu dnia i między dniami, podobnie jak w przypadku precyzji [179].

$$\text{błąd oznaczeń [\%]} = \frac{(C_{ozn} - C_{nom})}{C_{nom}} \cdot 100\% \quad (4)$$

gdzie:

C_{ozn} – średnie oznaczone stężenie

C_{nom} – stężenie nominalne

3.3.6 Odzysk

Ocenia stopień utraty badanego związku w trakcie przygotowywania próbki do analizy. Odzysk liczy się z następującego wzoru:

$$\text{odzysk} = \frac{P_{\text{ekstr}} / P_{\text{IS}}}{P_{\text{nieekstr}} / P_{\text{IS}}} \cdot 100\% \quad (5)$$

P_{ekstr} – pole powierzchni badanego związku po ekstrakcji

P_{nieekstr} – pole powierzchni badanego związku przed ekstrakcją

P_{IS} – pole powierzchni IS

3.3.7 Stabilność próbek biologicznych w czasie rozmrażania i zamrażania

Stabilność badanych substancji w materiale biologicznym w danych warunkach i w określonym czasie oceniana jest na podstawie przygotowanych roztworów analitu w wolnym od zanieczyszczeń materiale badanym. Próby uznawane są za stabilne, jeżeli w porównaniu z odpowiednim roztworem odniesienia uzyskane wyniki charakteryzują się odpowiednią precyzją i dokładnością (Wz i błąd oznaczeń $\leq \pm 15\%$) [179]. Test zamrażania i rozmrażania (*freeze and thaw stability*) wyznacza stopień strat spowodowanych wielokrotnym procesem zamrażania i rozmrażania prób.

3.3.8 Próby kontroli jakości

Próby kontroli jakości (*quality sample*, QS) służą do monitorowania dokładności i precyzji w trakcie prowadzenia badania. Przygotowywane są na początku badania, w minimum trzech stężeniach z zakresu krzywej kalibracyjnej. Wyniki prób kontroli jakości są odczytywane z krzywej wzorcowej analizowanej w danym dniu. Rozmieszczenie prób QS w sekwencji analitycznej powinno być równomierne, a wyniki ich analizy stanowią podstawę do zatwierdzenia lub odrzucenia całej sekwencji analitycznej [179].

4 CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1 Aparatura i odczynniki chemiczne

4.1.1 Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- chromatograf HP 1100 (Hawlett-Packard, Waldbronn, Niemcy)
- kolumna HPLC Nucleosil 100 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, C18) z prekolumną Nucleosil C18 (Altech Associates Inc., Deerfield, USA)
- wstrząsarka laboratoryjna typu 380 S (Elpan, Polska)
- pH-metr automatyczny (CyberScan 500, Eutech Cybernetics, Singapur)
- urządzenie do odgazowywania próbek metodą ultradźwięków UM-4 (Unia, Olsztyn, Polska)
- waga analityczna SARTORIUS BP 100 S (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- probówki do ultrafiltracji Microcon Ultrafree-MC 30,000 NMWL (Millipore Corporation, Bedford, USA)
- wirówka Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- wirówka EBA 12 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Niemcy)
- komora laminarna „Biohazard” Cytostar (Telstar, Bristol, USA)
- zestaw do sączenia (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- filtry do sączenia z azotanu celulozy o wielkości porów 0,45 μ m (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- zestaw pipet automatycznych 10-5000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- zestaw szkła laboratoryjnego
- strzykawka chromatograficzna 100 μ l (Hamilton, Reno, Nevada USA)
- zestaw do otrzymywania wody dejonizowanej Simplicity UV (Millipore Corporation, Bedford, USA)

4.1.2 Odczynniki

- acetonitryl o czystości do HPLC (ACN) (J.T. Baker, Deventer, Holandia)
- kwas ortofosforowy 85%, czystość techniczna (Fluka, Buchs, Szwajcaria)
- kwas cytrynowy, czystość techniczna (P.O.Ch., Gliwice, Polska)

- metanol o czystości do HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holandia)
- monowodorooortofosforan (V) potasu trójwodny, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy)
- sól dipotasowa kwasu etylenotetraaminooctowego dwuwodna, $K_2EDTA \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy)
- treosulfan (TREO) (Ovostat® 5000) (Medac GmbH, Hamburg, Niemcy)
- weronal (IS) (Polfa Pabianice, Polska)
- do sporządzania roztworów oraz wykonania oznaczeń używano wody dejonizowanej uzyskanej z zastosowaniem aparatury Simplicity UV.

4.2 Metoda HPLC do oznaczania TREO

4.2.1 Aparat do HPLC

Chromatograf HP 1100 składał się z pompy czterotłokowej typ G1311A, próżniowego układu odgazowującego fazę ruchomą typ G1322A, systemu do manualnego nastrzyku próbki typ G1328A, detektora refraktometrycznego G1362A oraz programu HP ChemStation A.07.01 do sterowania pracą chromatografu i komputerowej analizy danych. Rozdział prowadzono na kolumnie Nucleosil wypełnionej krzemionką związaną chemicznie z fazą C18.

4.2.2 Warunki analizy HPLC

- faza ruchoma: acetonitryl – bufor fosforanowy (15:85, v/v), pH 5,0
- objętość nastrzyku: 100 μ l
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min
- temperatura pokojowa

4.2.3 Przygotowanie fazy ruchomej

Fazę ruchomą przygotowano poprzez zmieszanie 850 ml buforu fosforanowego (przygotowanego przez rozpuszczenie 1 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ oraz 0,1 g $K_2EDTA \cdot 2H_2O$ w 1000 ml wody dejonizowanej i doprowadzonego do pH 5,0 przy użyciu 85% kwasu

ortofosforowego) uprzednio przesączonego przez filtr z azotanu celulozy o średnicy porów 0,45 µm i 150 ml ACN. Następnie roztwór odgazowano za pomocą ultradźwięków przez 5 minut.

4.3 Roztwory stosowane w metodzie HPLC

4.3.1 Roztwór kwasu cytrynowego

Do kolby miarowej odważono 5,254 g kwasu cytrynowego, następnie rozpuszczono w wodzie dejonizowanej i uzupełniono wodą do 25 ml. W ten sposób otrzymano roztwór kwasu cytrynowego o stężeniu 1 mol/l.

4.3.2 Roztwór wzorca wewnętrznego

Do kolby miarowej odważono 250 mg IS, dodano 5 ml metanolu (w celu lepszej rozpuszczalności), rozpuszczono w wodzie dejonizowanej i uzupełniono wodą do 50 ml. W ten sposób otrzymano roztwór IS o stężeniu 5 mg/ml.

4.3.3 Roztwór podstawowy TREO

Do kolby miarowej odważono 1,0 g TREO, następnie rozpuszczono w wodzie dejonizowanej i uzupełniono wodą do 25 ml. W ten sposób otrzymano roztwór podstawowy TREO o stężeniu 40 mg/ml.

4.3.4 Roztwory wzorcowe TREO

Do kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzone kolejno 12,5; 25; 62,5; 125; 250; 625; 1250; 2500; 5000 µl roztworu podstawowego TREO o stężeniu 40 mg/ml i uzupełniono wodą. Tym sposobem otrzymano serię roztworów wzorcowych TREO o stężeniach wynoszących odpowiednio 50; 100; 250; 500; 1000; 2500; 5000; 10000; 20000 µg/ml.

Uwaga: Prace związane z roztworami TREO prowadzono pod wyciągiem z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności.

4.4 Analiza TREO w osoczu

4.4.1 Przygotowanie próbek osocza do krzywej wzorcowej

Do 250 μ l osocza zakwaszonego do pH 5,5 przy użyciu 1 mol/l kwasu cytrynowego dodawano: 25 μ l roztworu TREO o odpowiednim stężeniu i 50 μ l roztworu IS. W ten sposób otrzymano stężenia podane w Tab. 4.

Tab. 4. Stężenia roztworu wzorcowego TREO i IS w próbkach osocza

Stężenie roztworu wzorcowego TREO w wodzie [μ g/ml]	50	100	250	500	1000	2500	5000	10000	20000
Stężenie roztworu wzorcowego TREO w osoczu [μ g/ml]	5	10	25	50	100	250	500	1000	2000
Stężenie roztworu IS w osoczu [μ g/ml]					1000				

Po wymieszaniu próbki przenoszono ilościowo do probówek Millipore i sączono poprzez odwirowanie przez 50 min przy szybkości 16000 obr./min (29475 x g) i temp. 36°C. 100 μ l przesączu nastrzykiwano na kolumnę.

4.4.2 Harmonogram oraz sposób pobierania próbek krwi pacjenta

1. Pobranie próbek krwi – w danym dniu infuzji TREO: pierwsza próbka – czas „0” – bezpośrednio przed podaniem TREO, kolejne próbki – 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 oraz 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0 od rozpoczęcia wlewu leku; w niektórych przypadkach pobrano mniej próbek krwi kierując się wskazaniami lekarskimi;
2. Krew od pacjentów w objętości 3 ml pobierano z cewnika żyły podobojczykowej (typu Seldingera) i przenoszono do probówek wirówkowych zawierających 50 μ l roztworu 1 mol/l kwasu cytrynowego na 1 ml krwi – taka ilość kwasu cytrynowego gwarantuje trwałe utrzymanie pH 5,5 próbki; następnie krew wymieszano;
3. Krew wirowano w temp. 4° C z szybkością 10900 obr/min (22578 x g), w ciągu 10 min.; osocze przenoszono do nowej probówki i zamrażano w temperaturze -20°C.

4.4.3 Przygotowanie próbek osocza pacjenta do analizy

Do 250 µl zakwaszonego osocza pacjenta dodawano 25 µl wody dejonizowanej i 50 µl roztworu IS. Po wymieszaniu próbki przenoszono ilościowo do probówek Millipore i sączono poprzez odwirowanie przez 50 min przy 29475 x g i temp. 36°C. 100 µl przesączu nastrzykiwano na kolumnę.

4.5 Analiza TREO w moczu

4.5.1 Przygotowanie próbek moczu do krzywej wzorcowej

Mocz wirowano przy 22578 x g, w ciągu 15 min. Odwirowany mocz przelewano do nowej probówki. Do 100 µl moczu zakwaszonego do pH 5,5 przy użyciu 1mol/l kwasu cytrynowego dodawano 25 µl roztworu TREO o odpowiednim stężeniu i 50 µl roztworu IS. W ten sposób otrzymano stężenia, podane w Tab. 5.

Tab. 5. Stężenia roztworu wzorcowego TREO i IS w próbkach moczu

Stężenie roztworu wzorcowego TREO w wodzie [µg/ml]	50	100	250	500	1000	2500	5000	10000	20000	40000
Stężenie roztworu wzorcowego TREO w moczu [µg/ml]	12,5	25	62,5	125	250	625	1250	2500	5000	10000
Stężenie roztworu IS w osoczu [µg/ml]	2500									

Po wymieszaniu próbki rozcieńczono z użyciem 175 µl wody dejonizowanej. 100 µl próbki nastrzykiwano na kolumnę.

4.5.2 Harmonogram oraz sposób pobierania próbek moczu pacjenta

1. Pobranie próbek moczu – od momentu rozpoczęcia wlewu leku; liczba próbek była uzależniona od liczby mikcji;

2. Mocz od pacjentów pobierano do probówek z zaznaczeniem: daty i godziny pobrania oraz objętości całej wydalanej porcji moczu;
3. Próbkę moczu pobierano w objętości 4 ml i przenoszono do probówek wirówkowych zawierających 50 μ l roztworu 1 mol/l kwasu cytrynowego na 1 ml moczu – taka ilość kwasu cytrynowego gwarantuje trwałe utrzymanie pH 5,5 próbki;
4. Mocz wirowano w temp. 4°C przy 22578 x g w ciągu 15 min.; odwirowany mocz (bez osadu) przelewano do nowej probówki i zamrażano w temperaturze - 20°C;

4.5.3 Przygotowanie próbek moczu pacjenta do analizy

Do 100 μ l zakwaszonego moczu pacjenta dodawano 50 μ l roztworu IS. Po wymieszaniu próbki rozcieńczano z użyciem 200 μ l wody dejonizowanej. 100 μ l próbki nastrzykiwano na kolumnę.

4.6 Walidacja metody HPLC oznaczania TREO w osoczu i moczu

Walidację metody HPLC oznaczania TREO w osoczu i moczu przeprowadzono z użyciem wolnego od zanieczyszczeń materiału biologicznego, do którego dodano roztworów TREO i IS. Próbki osocza pochodziły z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu, próbki moczu uzyskano od zdrowych ochotników, którzy nie przyjmowali żadnych leków.

4.6.1 Liniowość

Krzywe wzorcowe przedstawiono, jako zależność stosunków pola powierzchni pików TREO (P_{TREO}) do pola powierzchni pików IS (P_{IS}) od stężenia TREO w osoczu i moczu. Krzywe wzorcowe analizowano w następujących zakresach stężeń: 5,0 – 2000,0 $\mu\text{g/ml}$ TREO dla osocza oraz 12,5 – 10000 $\mu\text{g/ml}$ TREO dla moczu. Metodą najmniejszych kwadratów obliczono równania krzywych wzorcowych, które posłużyły następnie do obliczenia poziomów TREO w osoczu i moczu. Wyznaczono współczynniki korelacji r . W celu potwierdzenia liniowości krzywych wzorcowych zastosowano test Mandela (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$), który służy do weryfikacji poprawności liniowego lub kwadratowego modelu regresji. O liniowości świadczy wartość testowa $TV < F_{\text{kryt}}$ [180]

4.6.2 Precyzja i dokładność metody

Precyzję metody HPLC w ciągu dnia obliczono dla następujących stężeń TREO: 50 i 1000 $\mu\text{g/ml}$ w osoczu oraz 250 i 5000 $\mu\text{g/ml}$ w moczu. Współczynnik zmienności określający precyzję obliczono ze wzoru (2). Precyzję między dniami wyznaczono dla wszystkich stężeń z krzywych wzorcowych TREO w osoczu i moczu.

Dokładność oznaczeń metody HPLC w ciągu dnia i między dniami określono dla tego samego zakresu stężeń analitu jak w przypadku precyzji korzystając ze wzoru (4).

4.6.3 Odzysk

Odzysk TREO wyznaczono dla próbek osocza. W tym celu przygotowano dwie serie próbek. Próbki pierwszej serii zawierały 250 μl osocza zakwaszone roztworem

1 mol/l kwasu cytrynowego, 25 μ l roztworu TREO o stężeniu 500 lub 10000 μ g/ml (co odpowiada stężeniom 50 oraz 1000 μ g/ml TREO w osoczu) oraz 50 μ l roztworu weronalu o stężeniu 5000 μ g/ml (1000 μ g/ml w osoczu). Próbki po wymieszaniu odwirowano i 100 μ l przesącza nastrzyknięto na kolumnę. Próbki drugiej serii przygotowano w podobny sposób, lecz 25 μ l roztworu TREO dodano do przesącza dopiero po odwirowaniu próbki. 100 μ l tak przygotowanego roztworu nastrzyknięto na kolumnę. Odzysk TREO obliczono z wzoru (5).

4.6.4 Stabilność próbek biologicznych w czasie rozmrażania i zamrażania

4.6.4.1 Test stabilności próbek TREO w osoczu

Do 2 ml osocza zakwaszonego 1 mol/l roztworem kwasu cytrynowego, dodano 200 μ l roztworu TREO o stęż. 500 μ g/ml i 10000 μ g/ml (50 i 1000 μ g/ml w osoczu). Po wymieszaniu pobrano 2 próbki o objętości 275 μ l każda, a resztę osocza zamrożono. Do próbki osocza o objętości 275 μ l dodano 50 μ l roztworu IS. Po wymieszaniu próbkę przenoszono ilościowo do probówek Millipore i sączono poprzez odwirowanie przez 50 min przy 29475 x g i temp. 36°C. 100 μ l przesącza nastrzykiwano na kolumnę. Zamrożoną próbkę osocza z TREO rozmrażano dwukrotnie: po 24 i 48 h, za każdym razem pobierając z niej po 2 próbki o objętości 275 μ l, które poddawano powyższej procedurze przed nastrzyknięciem na kolumnę.

4.6.4.2 Test stabilności próbek TREO w moczu

Do 1 ml odwirowanego moczu przy 22578 x g w ciągu 15 min i zakwaszonego 1 mol/l roztworem kwasu cytrynowego, dodano 250 μ l roztworu TREO o stęż. 500 μ g/ml i 10000 μ g/ml (125 i 2500 μ g/ml w moczu). Po wymieszaniu pobrano 2 próbki o objętości 125 μ l każda, a resztę moczu zamrożono. Do próbki moczu o objętości 125 μ l dodano 50 μ l roztworu IS, a następnie 175 μ l wody dejonizowanej. Po wymieszaniu 100 μ l próbki nastrzyknięto na kolumnę. Zamrożoną próbkę moczu z TREO rozmrażano dwukrotnie: po 24 i 48 h, za każdym razem pobierając z niej po 2 próbki o objętości 125 μ l, które poddawano powyższej procedurze przed nastrzyknięciem na kolumnę.

4.7 Opis badanej grupy

W badaniach farmakokinetyki TREO u dzieci w terapii mieloablacyjnej poprzedzającej HSCT uczestniczyło 16 dzieci w wieku do 18 lat (średnia 7,5 lat), obojga płci (4 dziewczynki, 12 chłopców) z chorobami rozrostowymi i nierozrostowymi leczonych w Klinice Onkologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (n = 9) oraz Katedrze i Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (n = 7), u których ze względu na wysokie ryzyko zagrażających życiu toksycznych powikłań przeciwwskazane jest zastosowanie konwencjonalnej procedury mieloablacyjnej zawierającej Bu lub FTBI. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Załącznik I). Rodzice i opiekunowie ustawowi badanych dzieci zostali poinformowani przez lekarza o wszystkich istotnych aspektach dotyczących badania, ich celowości i metodyce a następnie wyrazili pisemnie zgodę na udział w badaniu (Załącznik nr II i III).

TREO podany był we wlewie 1 lub 2 h w trzech kolejnych dniach poprzedzających przeszczep. Przed allo-HSCT wszyscy pacjenci otrzymali przez 3 dni TREO w łącznej dawce 30 g/m² (n = 1), 36 g/m² (n = 8) lub 42 g/m² (n = 7) i.v. oraz – w zależności od rozpoznania i/lub spostrzeganych czynników ryzyka – Cy, Fd, VP-16 i/lub Mel. W zależności od wskazań lekarskich i stanu zdrowia chorego zbiórka krwi oraz moczu prowadzona była w jednym, dwóch lub trzech kolejnych dniach podawania TREO. Charakterystykę wszystkich osób uczestniczących w badaniu oraz schemat dawkowania TREO u pacjentów przedstawiono w Tab. 6 i 7.

Tab. 6. Schemat przygotowania pacjenta do HSCT

	Dzień przygotowania pacjenta do HSCT									
	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	
Pacjent 1		■								Przeszczep
Pacjent 2		■								
Pacjent 3		■								
Pacjent 4	■									
Pacjent 5				■						
Pacjent 6		■								
Pacjent 7			■							
Pacjent 8		■								
Pacjent 9		■								
Pacjent 10		■								
Pacjent 11		■								
Pacjent 12		■								
Pacjent 13		■								
Pacjent 14		■								
Pacjent 15	■									
Pacjent 16					■					

gdzie:

Całkowita dawka TREO 30 g/m ²	■
Całkowita dawka TREO 36 g/m ²	■
Całkowita dawka TREO 42 g/m ²	■

Tab. 7. Charakterystyka pacjentów

Nr pacjenta	Płeć	Wiek [lata]	Waga [kg]	Deklarowana dawka TREO podana w 3 dni [g/m ²]	Dawka TREO [g/dzień]	Dawka TREO [g/m ² /dzień]	Dzień podania TREO	Czas wlewu [h]	Cl _{kreat} [ml/min]	Choroba podstawowa	Czynniki ryzyka powikłań toksycznych spostrzegane przed HSCT; Powód zastosowania TREO
1 M.CH.	M	5	16	36	7,5 8 10	10,5 11,3 14	(-7) (-6) (-5)	1 2 2	b.d.	NBL IV	II przeszczep po uprzednim PBSCT z Bu
2 J.K.	M	0,4	7,7	36	3 3	12 12	(-7) (-6)	2 2	94	SCN	zalecenia EBMT IE WP (Inborn Errors WP)
3 J.L.	M	6	21,4	42	12 12	14,3 14,3	(-7) (-5)	2 2	93	X-ALD	neurotoksyczność Bu w chorobie metabolicznej, padaczka
4 M.M.	K	3	14,4	30	7	11,1	(-6)	1	b.d.	NBL	II przeszczep po uprzednim PBSCT z Bu
5 P.P.	M	13	43	36	17 17 16	12,4 12,4 11,6	(-5) (-4) (-3)	1 1 1	b.d.	ES	zalecenia grupy ds. leczenia guzów łitych w ES
6 M.P.	M	9	33,8	36	14 14 13	12,4 12,4 11,5	(-7) (-6) (-5)	1 1 1	b.d.	ALL	II przeszczep po uprzednim PBSCT z Bu
7 D.G.	M	1,9	7,3	36	3 3 3	12 12 12	(-6) (-5) (-4)	1 1 1	b.d.	BDA	wiek < 2 lat
8 J.W.	M	9	32	36	13	11,8	(-7)	2	167	ALD	choroba podstawowa nierozrostowa; uszkodzenie OUN i układu dokrewnego

Tab. 7. Charakterystyka pacjentów c.d.

Nr pacjenta	Płeć	Wiek [lata]	Waga [kg]	Deklarowana dawka TREO podana w 3 dni [g/m ²]	Dawka TREO [g/dzień]	Dawka TREO [g/m ² /dzień]	Dzień podania TREO	Czas wlewu [h]	Cl _{kreat} [ml/min]	Choroba podstawowa	Czynniki ryzyka powikłań toksycznych spostrzegane przed HSCT; Powód zastosowania TREO;
9 Z.K.	K	2	9	36	6	12,8	(-7)	2	b.d.	ALL	wiek < 2 lat; brak współpracy z pacjentem
10 M.K.	M	2	12	42	7	14	(-7)	2	71	WAS	choroba podstawowa nierozrostowa; liczne wcześniejsze przetoczenia preparatów krwiopochodnych; nadwrażliwość na inne leki alkilujące;
11 A.B.	M	10	31,2	36	13	11,8	(-5)	2	71	CML	II HSCT
12 I.G.	K	18	46,5	42	20	14	(-7)	2	90	ALL	liczne wcześniejsze narządowe powikłania toksyczne po zastosowanej chemioterapii; posocznica grzybicza w wywiadzie; stan po licznych przetoczeniach
13 G.G.	M	6	29	42	14	14	(-7)	2	239	ALL	III remisja, druga HSCT, intensywna chemioterapia przed drugą allo-HSCT (DaunoFlag)
14 H.S.	M	14	50	42	21	14	(-7)	2	111	ALL	toksyczne uszkodzenie wątroby po chemioterapii konwencjonalnej
15 I.K.	K	15	45	42	20	13,7	(-8)	2	110	AML	druga HSCT, stan po intensywnej chemioterapii konwencjonalnej
16 R.K.	M	14	52	42	20	12,3	(-4)	2	110	ES	liczne cykle chemioterapii konwencjonalnej ze względu na chorobę podstawową i wznowę, stan po 8 torakotomiach

4.8 Parametry farmakokinetyczne

Na podstawie zmiany stężenia TREO w osoczu obliczono u każdego pacjenta następujące parametry farmakokinetyczne: $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, C_{max} , $t_{0,5}$, Cl_{tot} , V_{ss} , MRT a na podstawie stężenia TREO w moczu wyznaczono: k_{ner} , $t_{0,5}$, całkowitą ilość leku wyeliminowanego z moczem oraz % podanej dawki. Obliczenia wykonano korzystając z programu komputerowego WinNonlin 6.2 przyjmując, że zmiany stężeń TREO we krwi pacjentów przebiegają zgodnie z otwartym modelem 2-kompartmentowym.

- C_{max} – maksymalne stężenie uzyskane w czasie t_{max}
- t_{max} – czas, po którym uzyskano C_{max}
- AUC obliczono korzystając ze wzoru:

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_{0 \rightarrow t} + AUC_{t \rightarrow \infty} \quad (6)$$

gdzie:

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ - całkowite pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku jako funkcji czasu

$AUC_{0 \rightarrow t}$ - pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku w czasie $0 \rightarrow t$, obliczone metodą trapezów

$AUC_{t \rightarrow \infty}$ - resztkowe pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku w czasie $t \rightarrow \infty$

$$AUC_{t \rightarrow \infty} = \frac{C_n}{k_{el}} \quad (7)$$

C_n – ostatni pomiar stężenia leku w czasie t

k_{el} – stała szybkości eliminacji leku z krwi, obliczona metodą najmniejszych kwadratów dla terminalnego, prostoliniowego odcinka fazy eliminacji leku

- $t_{0,5}$ - biologiczny okres półtrwania leku obliczono ze wzoru:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{el}} \quad (8)$$

- Cl_{tot} – klirens, czyli szybkość, z jaką osocze jest oczyszczane w jednostce czasu, obliczone ze wzoru, przy założeniu, że dostępność biologiczna TREO wynosi 100% ($F=1$).

$$Cl_{tot} = \frac{F \cdot D}{AUC} \quad (9)$$

gdzie:

F – dostępność biologiczna

D - dawka leku

- V_{ss} – objętość dystrybucji obliczona z wzoru:

$$V_{ss} = \frac{F \cdot D}{AUC \cdot k_{el}} \quad (10)$$

- MRT – średni czas przebywania leku w ustroju (statystyczny odpowiednik przebywania leku w ustroju) obliczamy z wzoru:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \quad (11)$$

gdzie:

AUMC - pole powierzchni pod pierwszym momentem krzywej stężenie – czas (pole pod krzywą $C \cdot t = f(t)$)

5 WYNIKI

5.1 Walidacja metody HPLC oznaczania TREO w osoczu

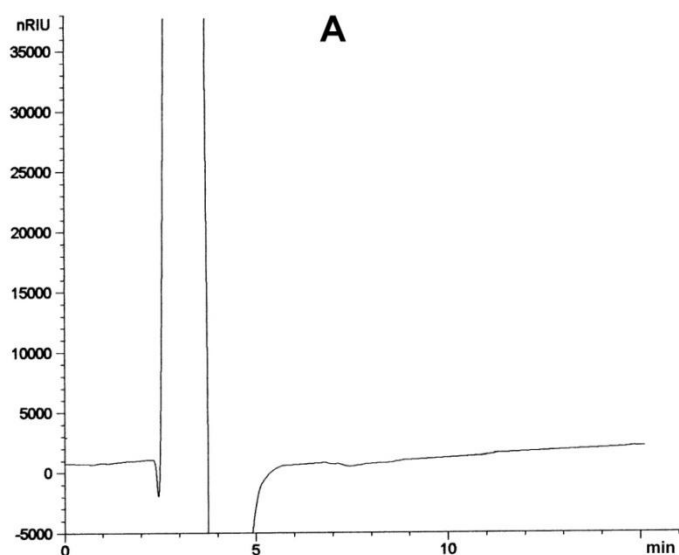
W celu zwalidowania stosowanej metody analitycznej oznaczania TREO w osoczu wyznaczono następujące właściwości metody: selektywność, liniowość, LOD, LOQ, precyzja, dokładność, odzysk oraz stabilność w czasie rozmrażania i zamrażania próbek.

5.1.1 Selektywność metody

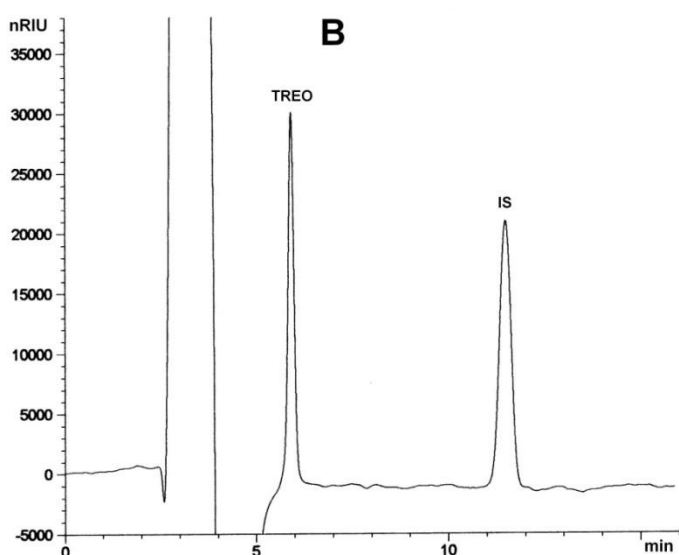
O selektywności metody świadczy całkowity rozdział od siebie pików TREO (czas retencji 5,9 min) oraz IS (czas retencji 11,4 min) oraz pików pochodzącego od endogennych związków osocza (czas retencji ok. 3 min). Ponadto nie zaobserwowano interferencji oznaczanych związków z innymi podanymi lekami takimi jak: FD, Cy, VP-16, Mel, Zofran, Clemastin i/lub Allopurinol (Ryc. 9).

5.1.2 Liniowość

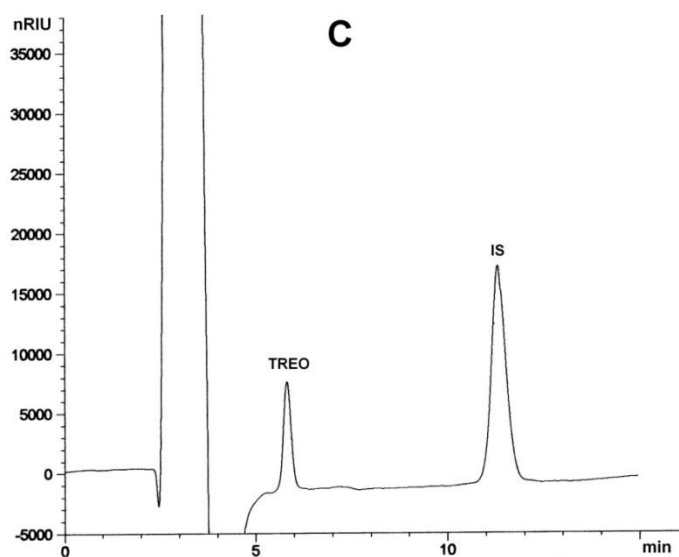
Liniowość krzywych wzorcowych TREO w osoczu została wyznaczona dla stężeń w zakresie 10 - 2000 µg/ml. Równanie średniej krzywej wzorcowej uzyskano na podstawie uśrednionych wartości stosunków P_{TREO} i P_{IS} z siedmiu wykonanych krzywych wzorcowych (Tab. 8).



A – chromatogram
uzyskany po mikrofiltracji
próbki osocza ochotnika
nieobciążonej TREO i IS



B – chromatogram
uzyskany po mikrofiltracji
próbki kontrolnej
zawierającej 250 μ l
osocza z 25 μ l TREO
o stężeniu 10 mg/ml
(stężenie TREO
w osoczu 1 mg/ml)



C – chromatogram
uzyskany po mikrofiltracji
próbki osocza pacjenta
10 otrzymanej 3 h od
rozpoczęcia wlewu
(oznaczone stężenie
TREO – 312,43 μ g/ml)

Ryc. 9. Chromatogramy otrzymane po mikrofiltracji osocza ludzkiego.

Tab. 8. Stosunki P_{Treo} i P_{IS} odpowiadające stężeniom TREO na podstawie siedmiu krzywych wzorcowych w osoczu

Stężenie TREO w osoczu [$\mu\text{g/ml}$]	P_{Treo} / P_{IS}							Średnia \pm SD
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2000	1,577	1,558	1,618	1,622	1,613	1,582	1,612	1,597 \pm 0,024
1000	0,785	0,797	0,805	0,807	0,816	0,789	0,782	0,797 \pm 0,012
500	0,402	0,375	0,411	0,412	0,399	0,379	0,364	0,392 \pm 0,018
250	0,204	0,211	0,210	0,213	0,222	0,201	0,209	0,210 \pm 0,006
100	0,089	0,082	0,082	0,083	0,072	0,066	0,077	0,079 \pm 0,007
50	0,035	0,034	0,040	0,036	0,038	0,033	0,034	0,035 \pm 0,002
25	0,022	0,020	0,020	0,021	0,021	0,017	0,019	0,020 \pm 0,001
10	0,007	0,009	0,008	0,008	0,009	0,009	0,006	0,008 \pm 0,001

Równanie krzywej wzorcowej wyznaczono przy pomocy programu MSExcel (Tab. 9). Istotność współczynnika regresji b została przeanalizowana przy pomocy testu t-Studenta ($\alpha = 0,05$). Wartość współczynnika b nie różniła się istotnie od zera dlatego przyjęto równanie krzywej wzorcowej $y = ax$ przechodzące przez początek układu współrzędnych. O liniowości przyjętego modelu świadczyła wartość testowa $TV < F_{kryt}$ ($0,36 < 21,19$). Obliczono także współczynnik korelacji r , który wynosił 0,9999. Wyznaczone równanie krzywej wzorcowej wykorzystano następnie do obliczenia poziomów TREO w próbkach osocza pacjentów przed allo-HSCT.

Tab. 9. Równanie krzywej wzorcowej TREO w osoczu

Zakres krzywej wzorcowej [$\mu\text{g/ml}$]	Równanie krzywej wzorcowej	Współczynnik korelacji r
10 - 2000	$P_{Treo}/P_{IS} = 0,0007985 \cdot C_{Treo}$	0,9999

5.1.3 LOD i LOQ

W opracowanej metodzie LOD oznaczanego TREO, wyznaczone przy stosunku sygnału do poziomu szumu linii podstawowej S/N = 3:1 wynosiło 5 µg/ml. LOD obliczone ze wzoru (1) było porównywalne i wyniosło 6,68 µg/ml.

LOQ jako najniższe stężenie TREO z krzywej wzorcowej wynosiło 10 µg/ml i oznaczone było z odpowiednio wysoką precyzją, Wz 13,6 % i dokładnością 93,71 %.

5.1.4 Precyzja i dokładność metody

Precyzja metody wyrażona jako Wz wynosiła 1,56 – 13,06 %. Dokładność wyrażono przez błąd oznaczeń i obejmował zakres 0,04 – 10,05 %. Szczegółowe dane dotyczące oznaczeń w osoczu przedstawiono w Tab. 10 i 11.

Tab. 10. Precyzja i dokładność oznaczeń TREO w osoczu wykonywanych w ciągu 1 dnia

Stężenie nominalne TREO [µg/ml]	Stężenie oznaczone TREO [µg/ml]	Średnia ± SD	Wz [%]	Błąd oznaczeń [%]
1000	1007,94	1007,10 ± 6,15	0,61	0,71
	996,86			
	1009,17			
	1013,49			
	1008,06			
50	43,04	46,04 ± 2,40	5,22	7,91
	44,72			
	47,54			
	49,21			
	45,70			

Tab. 11. Precyzja i dokładność oznaczeń TREO w osoczu między dniami (n=7)

Stężenie nominalne TREO [µg/ml]	Stężenie oznaczone TREO [µg/ml]								SD	Wz [%]	Błąd oznaczeń [%]
	dzień I	dzień II	dzień III	dzień IV	dzień V	dzień VI	dzień VII	Średnia			
2000	1974,9	1951,3	2026,2	2031,9	2021,0	1981,2	2019,1	2000,8	31,24	1,56	0,04
1000	984,1	999,0	1009,2	1011,3	1022,2	989,0	979,8	999,2	15,71	1,57	0,07
500	503,82	470,29	515,88	516,46	500,58	475,65	456,37	491,29	23,76	4,84	1,74
250	255,70	265,39	263,67	267,01	279,14	252,30	262,27	263,64	8,64	3,28	5,46
100	111,97	103,50	103,22	105,04	91,21	83,73	97,47	99,45	9,46	9,52	0,55
50	43,80	42,59	50,04	45,29	48,01	41,83	43,25	44,97	3,03	6,73	10,06
25	28,61	25,75	25,88	26,76	26,76	21,65	24,26	25,67	2,21	8,59	2,67
10	9,43	11,51	10,10	11,13	11,89	12,01	8,33	10,63	1,39	13,06	6,29

5.1.5 Odzysk

Odzysk TREO był stosunkowo wysoki i mieścił się w zakresie 75 – 76 % przy Wz poniżej 5,93 % (Tab. 12). Szczegółowe dane zamieszczono w Załączniku V.

Tab. 12. Odzysk TREO z osocza

Stężenie TREO w osoczu [µg/ml]	Odzysk ± SD	Wz [%]
1000	75,32 ± 1,75	2,32
50	76,34 ± 4,53	5,93

5.1.6 Stabilność próbek biologicznych w czasie rozmrażania i zamrażania

TREO w próbkach osocza był trwały podczas trzykrotnego procesu zamrażania i rozmrażania o czym świadczą niskie wartości Wz i błędu oznaczeń, odpowiednio 3,46 % i 2,21 % (Tab. 13).

Tab. 13. Test stabilności próbek biologicznych z TREO w osoczu podczas procesu zamrażania i rozmrażania

Stężenie nominalne TREO [$\mu\text{g/ml}$]	Stężenie TREO oznaczone w osoczu [$\mu\text{g/ml}$]				SD	Wz [%]	Błąd oznaczeń [%]
	0 h	24 h	48 h	Średnia			
1000	994,74	994,37	1003,61	997,43	5,41	0,54	0,25
	990,30	1003,82	997,75				
50	44,19	47,83	44,75	45,13	1,56	3,46	2,21
	44,13	46,14	43,75				

5.2 Walidacja metody HPLC oznaczania TREO w moczu

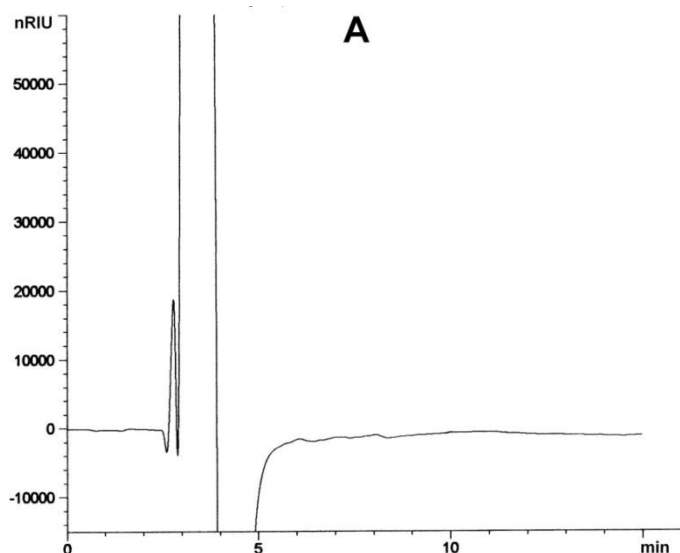
W celu zwalidowania stosowanej metody analitycznej oznaczania TREO w osoczu wyznaczono następujące właściwości metody: selektywność, liniowość, LOD, LOQ, precyzja, dokładność oraz stabilność w czasie rozmrażania i zamrażania próbek.

5.2.1 Specyficzność i selektywność metody

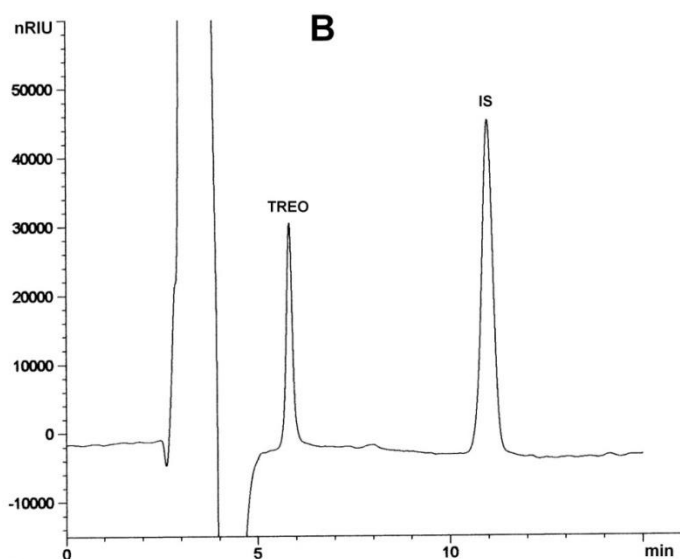
O selektywności metody świadczy całkowity rozdział od siebie pików TREO (czas retencji 5,9 min) oraz IS (czas retencji 11,4 min) oraz pików pochodzących od endogennych związków moczu (czas retencji ok. 3 min). Ponadto nie zaobserwowano interferencji oznaczanych związków z innymi podanymi lekami takimi jak: Fd, Cy, VP-16, Mel, Zofran, Clemastin i/lub Allopurinol (Ryc. 10).

5.2.2 Liniowość

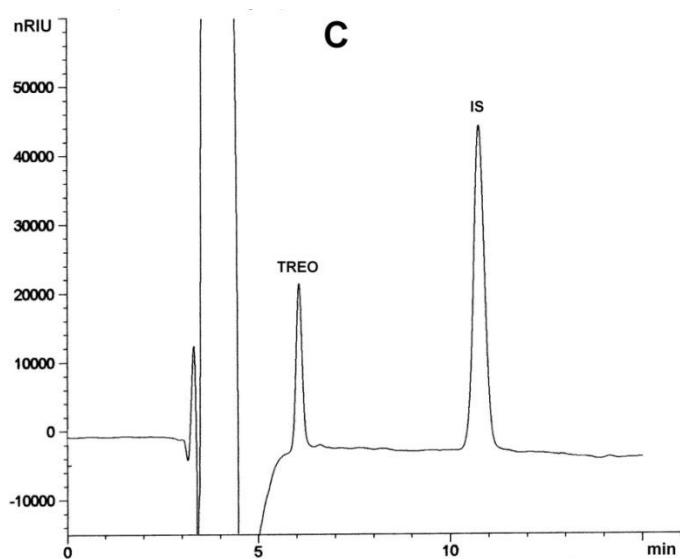
Liniowość krzywych wzorcowych TREO w moczu została wyznaczona dla stężeń w zakresie 62,5 - 10000 µg/ml. Równanie średniej krzywej wzorcowej uzyskano na podstawie uśrednionych wartości stosunków P_{TREO} i P_{IS} z siedmiu wykonanych krzywych wzorcowych (Tab. 14).



A – chromatogram
moczu ochotnika
nieobciążonego TREO
i IS



B – chromatogram próbki
moczu kontrolnego
zawierającego 100 μ l
moczu z 25 μ l TREO
o stężeniu 10 mg/ml
(stężenie TREO
w moczu - 2,5 mg/ml)



C – chromatogram próbki
moczu pacjenta 5
otrzymanej 7 h od
rozpoczęcia wlewu
w 3 dni przed
przeszczepem
(oznaczone stężenie
TREO – 1,95 mg/ml)

Ryc. 10. Chromatogramy uzyskane po analizie próbek moczu.

Tab. 14. Stosunki P_{TREO} i P_{IS} odpowiadające stężeniom TREO na podstawie krzywych wzorcowych w moczu

Stężenie TREO w mocz [$\mu\text{g/ml}$]	P_{TREO} / P_{IS}							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	Średnia \pm SD
10000	2,777	2,786	2,831	2,764	2,753	2,786	2,711	2,772 \pm 0,036
5000	1,393	1,401	1,422	1,391	1,383	1,399	1,411	1,400 \pm 0,013
2500	0,680	0,678	0,682	0,661	0,667	0,677	0,652	0,671 \pm 0,011
1250	0,320	0,324	0,326	0,319	0,307	0,327	0,296	0,317 \pm 0,011
625	0,163	0,160	0,152	0,150	0,159	0,162	0,126	0,153 \pm 0,013
250	0,067	0,066	0,059	0,058	0,066	0,061	0,058	0,062 \pm 0,003
125	0,031	0,038	0,033	0,033	0,028	0,035	0,026	0,032 \pm 0,004
62,5	0,014	0,017	0,015	0,015	0,014	0,014	0,012	0,014 \pm 0,001

Równanie krzywej wzorcowej wyznaczono przy pomocy programu MSEXcel (Tab. 15). Istotność współczynnika regresji b została przeanalizowana przy pomocy testu t-Studenta ($\alpha = 0,05$). Wartość współczynnika b nie różniła się istotnie od zera dlatego przyjęto równanie krzywej wzorcowej $y = ax$ przechodzące przez początek układu współrzędnych. O liniowości przyjętego modelu świadczyła wartość testowa $TV < F_{kryt}$ ($2,14 < 21,19$). Obliczono także współczynnik korelacji r , który wynosił 0,9997. Wyznaczone równanie krzywej wzorcowej wykorzystano następnie do obliczenia poziomów TREO w próbkach moczu pacjentów przed allo-HSCT.

Tab. 15. Równanie krzywej wzorcowej TREO w moczu

Zakres krzywej wzorcowej [$\mu\text{g/ml}$]	Równanie krzywej wzorcowej	Współczynnik korelacji r
62,5 - 10000	$P_{TREO}/P_{IS} = 0,000277 \cdot C_{TREO}$	0,9997

5.2.3 LOD i LOQ

W opracowanej metodzie LOD oznaczanego TREO, wyznaczone przy stosunku sygnału do poziomu szumu linii podstawowej $S/N = 2:1$ wynosiło 12,5 $\mu\text{g/ml}$. LOD obliczone ze wzoru (1) wyniosło 25,66 $\mu\text{g/ml}$.

LOQ jako najniższe stężenie TREO z krzywej wzorcowej wynosiło 62,5 $\mu\text{g/ml}$ i oznaczone było z odpowiednią wysoką precyzją, Wz 11,04 % i dokładnością 86,03 %.

5.2.4 Precyzja metody i dokładność metody

Precyzja metody wyrażona jako Wz wynosiła 0,93 – 12,60 %. Dokładność wyrażono przez błąd oznaczeń i obejmował zakres 0,10 – 13,97 %. Szczegółowe dane dotyczące oznaczeń w moczu przedstawiono w Tab. 16 i 17.

Tab. 16. Precyzja i dokładność oznaczeń TREO w moczu wykonywanych w ciągu 1 dnia

Stężenie nominalne TREO [$\mu\text{g/ml}$]	Stężenie oznaczone TREO [$\mu\text{g/ml}$]	Średnia \pm SD	Wz [%]	Błąd oznaczeń [%]
5000	5103,28	5098,09 \pm 59,56	1,16	1,96
	5191,85			
	5035,33			
	5099,72			
	5060,27			
250	217,43	234,93 \pm 9,96	4,24	6,02
	239,14			
	239,51			
	241,99			
	236,58			

Tab. 17. Precyzja i dokładność oznaczeń TREO w moczu między dniami (n=7)

Stężenie nominalne TREO [µg/ml]	Stężenie oznaczone TREO [µg/ml]							SD	Wz [%]	Błąd oznaczeń [%]	
	dzień I	dzień II	dzień III	dzień IV	dzień V	dzień VI	dzień VII				Średnia
10000	10025,3	10060,0	10221,0	9979,7	9939,3	10057,9	9788,7	10010,3	131,93	1,32	0,10
5000	5030,3	5058,6	5135,3	5022,1	4994,7	5053,4	5094,1	5055,5	47,11	0,93	1,11
2500	2455,41	2448,37	2462,30	2387,68	2409,87	2444,80	2356,66	2423,58	39,86	1,64	3,06
1250	1157,52	1173,09	1178,06	1154,58	1108,47	1183,31	1071,50	1146,65	41,46	3,62	8,27
625	591,31	579,28	549,48	542,22	577,11	586,34	456,67	554,63	46,98	8,47	11,26
250	242,47	240,74	214,69	211,86	238,18	222,22	211,31	225,92	14,11	6,25	9,63
125	112,70	138,96	120,30	113,00	101,25	128,09	97,27	115,94	14,61	12,60	7,25
62,5	53,82	64,07	54,91	54,56	52,08	53,15	43,77	53,77	5,93	11,04	13,97

5.2.5 Stabilność próbek biologicznych w czasie rozmrażania i zamrażania

TREO w próbkach moczu był trwały podczas trzykrotnego procesu zamrażania i rozmrażania o czym świadczą niskie wartości Wz i błędu oznaczeń, odpowiednio 3,07 % i 0,42 % (Tab. 18).

Tab. 18. Test stabilności próbek biologicznych z TREO w moczu podczas procesu zamrażania i rozmrażania

Stężenie nominalne TREO [µg/m]	Stężenie TREO oznaczone w moczu [µg/ml]				SD	Wz [%]	Błąd oznaczeń [%]
	0 h	24 h	48 h	Średnia			
5000	5030,17	4968,14	4944,10	4992,75	91,00	1,82	0,14
	5073,67	4848,83	5091,60				
250	241,46	229,19	225,80	232,59	7,14	3,07	0,42
	235,74	239,01	224,35				

5.3 Wyniki badań klinicznych

5.3.1 Poziomy TREO w osoczu

5.3.1.1 Wlew 1 h

Wartości oznaczonych poziomów TREO w osoczu pacjenta dla rzeczywistej dawki 11,1 g/m² przedstawiono w Tab. 19. Oznaczone stężenie TREO poddano normalizacji do deklarowanej dawki 10 g/m² (Tab. 20). Graficzną ilustracją zmian stężenia TREO po normalizacji jest Ryc. 11. Natomiast wartości oznaczonych poziomów TREO w osoczu pacjenta dla rzeczywistych dawek 10,5 - 12,4 g/m² przedstawiono w Tab. 21. Oznaczone stężenia TREO poddano normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m² (Tab. 22). Graficzną ilustracją zmian stężeń TREO po normalizacji jest Ryc. 12. Szczegółowe dane niezbędne do wykonania obliczeń zebrano w Załączniku IV.

Dawka deklarowana 10 g/m²

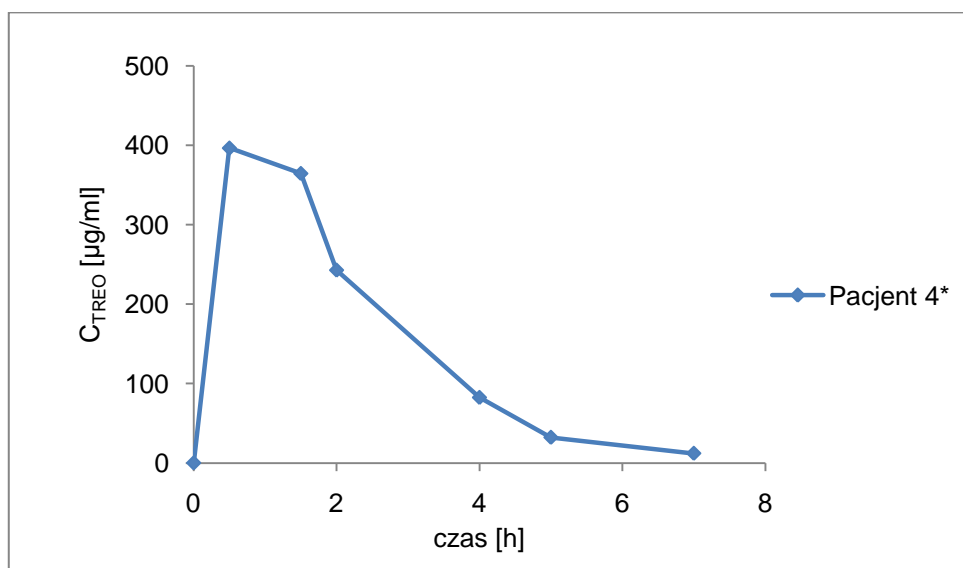
Tab. 19. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjenta po podaniu rzeczywistej dawki 11,1 g/m² w postaci 1 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent 4
	Stężenie TREO [µg/ml]
0,5	440,16
1,5	404,62
2	269,49
4	91,49
5	35,73
7	13,39

Tab. 20. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjenta po uwzględnieniu normalizacji do deklarowanej dawki 10 g/m²

Czas [h]	Pacjent 4*
	Stężenie TREO [µg/ml]
0,5	396,54
1,5	364,52
2	242,78
4	82,42
5	32,19
7	12,06

*dawka znormalizowana do deklarowanej



* pacjent po normalizacji dawki

Ryc. 11. Wykres zależności zmiany stężenia TREO w osoczu pacjenta jako funkcja czasu po podaniu deklarowanej dawki 10 g/m² TREO w postaci 1 h wlewu dożylnego.

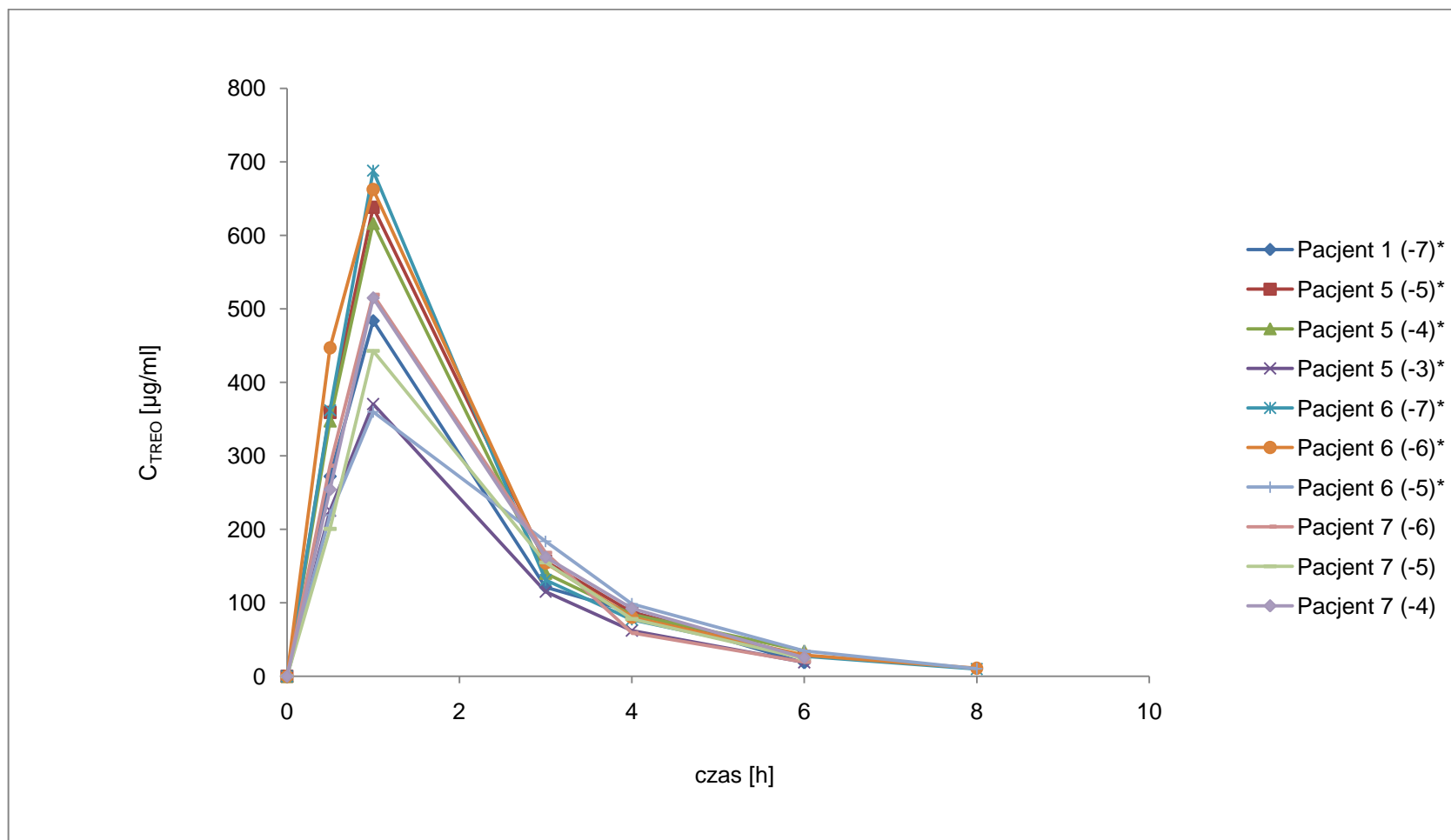
Dawka deklarowana 12 g/m²Tab. 21. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 10,5 - 12,4 g/m² w postaci 1 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent										Średnia	SD
	1 (-7)	5 (-5)	5 (-4)	5 (-3)	6 (-7)	6 (-6)	6 (-5)	7 (-6)	7 (-5)	7 (-4)		
	Stężenie TREO [µg/ml]											
0,5	238,05	371,1	359,13	217,89	373,98	461,72	210,21	286,51	200,59	254,17	297,34	88,77
1	423,29	659,38	637	358,02	710,87	684,42	344,85	519,09	442,63	514,71	529,43	136,62
3	106,04	161,57	144,97	111,34	135,34	159,32	175,88	168,19	154,89	161,95	147,95	23,60
4	76,48	90,05	86,97	60,01	79,65	82,99	94,31	58,91	78,05	92,42	79,98	12,37
6	16,03	27,58	35,68	18,29	28,32	29,76	33,03	19,28	24,18	25,53	25,77	6,43
8	-	-	-	-	10,16	11,28	10,01	-	-	-	10,48	0,69

Tab. 22. Oznaczone stężenia TREO w osoczu po uwzględnieniu normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m²

Czas [h]	Pacjent										Średnia	SD
	1 (-7)*	5 (-5)*	5 (-4)*	5 (-3)*	6 (-7)*	6 (-6)*	6 (-5)*	7 (-6)	7 (-5)	7 (-4)		
	Stężenie TREO [µg/ml]											
0,5	272,06	359,13	347,54	225,4	361,92	446,82	219,35	286,51	200,59	254,17	297,35	78,95
1	483,76	638,11	616,45	370,36	687,94	662,34	359,84	519,09	442,63	514,71	529,52	118,41
3	121,19	156,36	140,29	115,18	130,97	154,18	183,53	168,19	154,89	161,95	148,67	21,50
4	87,41	87,14	84,16	62,08	77,08	80,31	98,41	58,91	78,05	92,42	80,60	12,43
6	18,32	26,69	34,53	18,91	27,41	28,8	34,47	19,28	24,18	25,53	25,81	5,89
8	-	-	-	-	9,83	10,92	10,41	-	-	-	10,39	0,55

*dawka znormalizowana do deklarowanej



* pacjent po normalizacji dawki

Ryc. 12. Wykres zależności zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m^2 w postaci 1 h wlewu dożylnego.

5.3.1.2 Wlew 2 h

Wartości oznaczonych poziomów TREO w osoczu pacjentów dla rzeczywistych dawek 10,5 - 12,8 g/m² przedstawiono w Tab. 23. Oznaczone stężenia TREO poddano normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m² (Tab. 24). Graficzną ilustracją zmian stężeń TREO po normalizacji jest Ryc. 13. Natomiast wartości oznaczonych poziomów TREO w osoczu pacjentów dla rzeczywistych dawek 13,7 - 14,3 g/m² przedstawiono w Tab. 25. Oznaczone stężenia TREO poddano normalizacji do deklarowanej dawki 14 g/m² (Tab. 26). Graficzną ilustracją zmian stężeń TREO po normalizacji jest Ryc. 14. Szczegółowe dane niezbędne do wykonania obliczeń zebrano w Załączniku IV.

Dawka deklarowana 12 g/m²

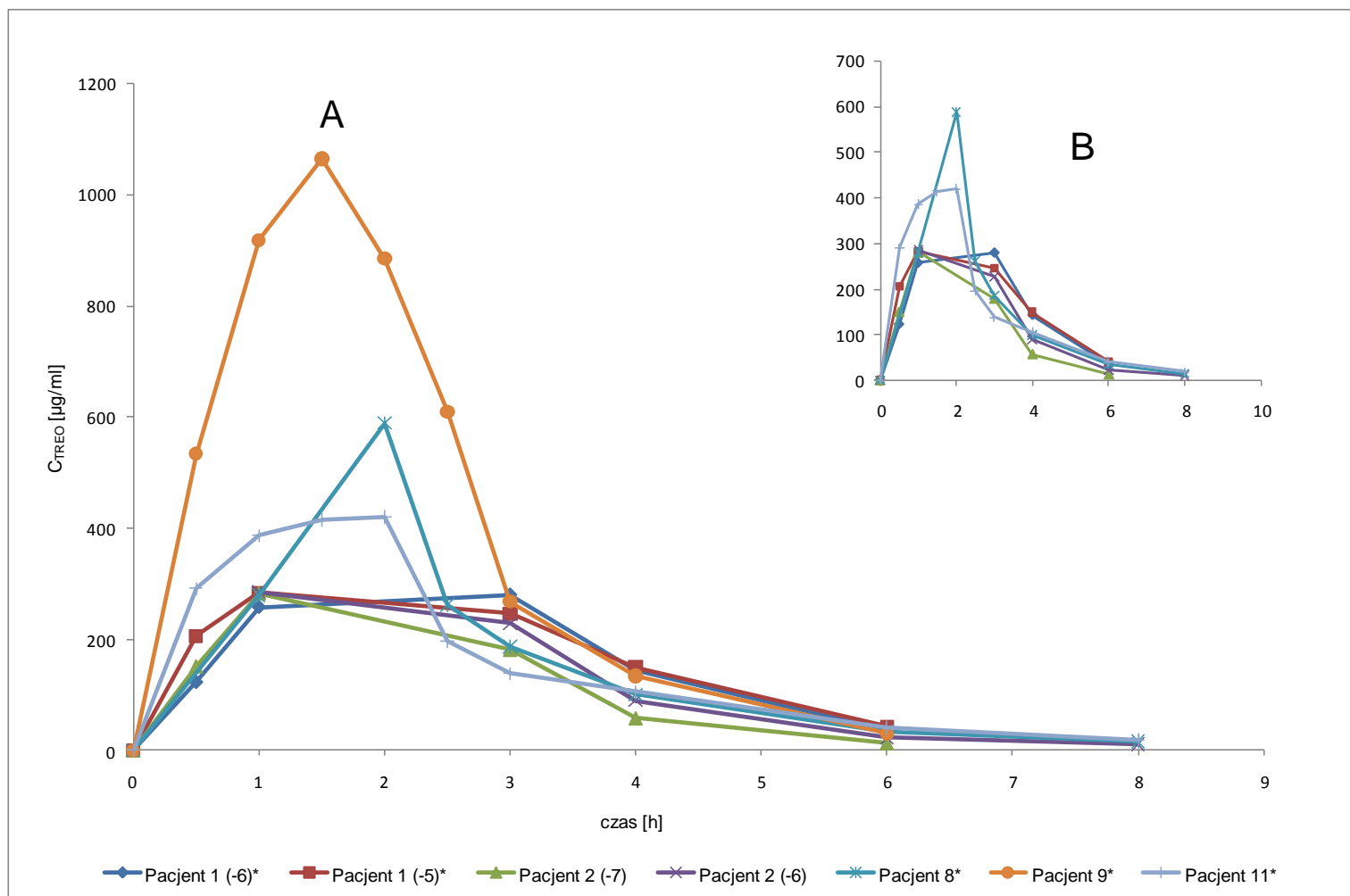
Tab. 23. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 10,5-12,8 g/m² w postaci 2 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent							Średnia	SD
	1 (-6)	1 (-5)	2 (-7)	2 (-6)	8	9	11		
	Stężenie TREO [µg/ml]								
0,5	115,25	239,74	150,5	-	-	568,75	285,7	271,99	179,32
1	242,25	330,12	281,55	285,05	274,77	979,94	379,39	396,15	261,20
1,5	-	-	-	-	-	1135,69	407,48	771,59	514,92
2	-	-	-	-	578,97	943,71	412,48	645,05	271,71
2,5	-	-	-	-	257,16	650,07	192,48	366,57	247,64
3	263,01	286,53	179,98	228,13	183,11	285,33	135,64	223,10	58,63
4	134,39	174,57	57,29	88,93	98,53	142,27	102,9	114,13	38,92
6	33,43	48,97	12,5	22,35	33,25	32,08	40,11	31,81	11,77
8	-	-	-	10,65	15,16	-	18,63	14,81	4,00

Tab. 24. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po uwzględnieniu normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m²

Czas [h]	Pacjent							Średnia	SD
	1 (-6)*	1 (-5)*	2 (-7)	2 (-6)	8*	9*	11*		
Stężenie TREO [µg/ml]									
0,5	122,39	205,49	150,5	-	-	533,2	290,54	260,42	165,43
1	257,25	282,96	281,55	285,05	279,42	918,69	385,82	384,39	239,23
1,5	-	-	-	-	-	1064,71	414,38	739,55	459,85
2	-	-	-	-	588,78	884,73	419,47	630,99	235,49
2,5	-	-	-	-	261,52	609,44	195,74	355,57	222,31
3	279,3	245,6	179,98	228,13	186,21	267,5	137,94	217,81	51,54
4	142,71	149,63	57,29	88,93	100,2	133,38	104,64	110,97	32,98
6	35,5	41,97	12,5	22,35	33,81	30,08	40,79	31,00	10,51
8	-	-	-	10,65	15,42	-	18,95	15,01	4,17

*dawka znormalizowana do deklarowanej



* pacjent po normalizacji dawki

Ryc. 13. Wykres zależności zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m² w postaci 2 h wlewu dożylnego (A – wszyscy pacjenci, B – z wyłączeniem pacjenta 9).

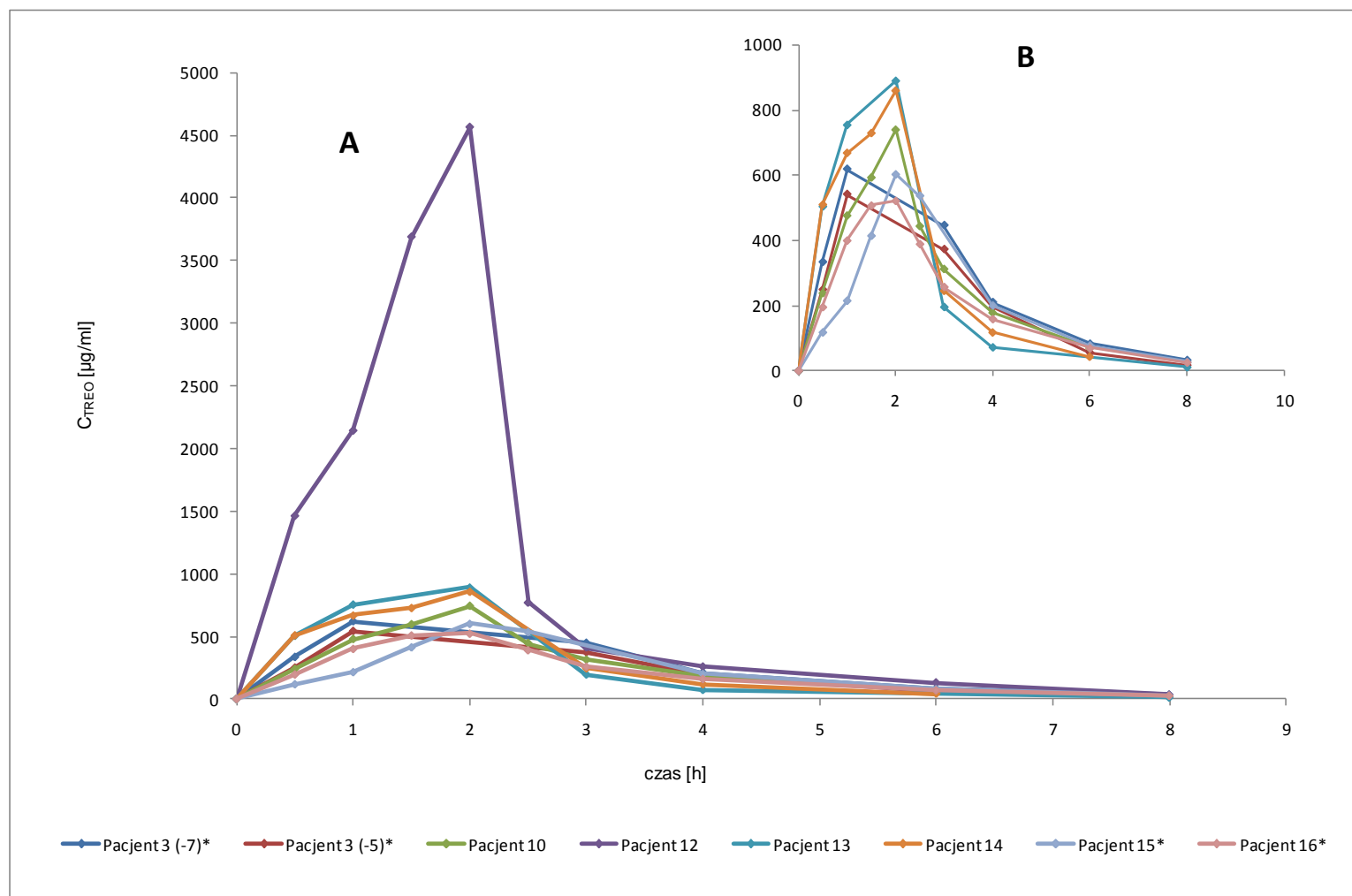
Dawka deklarowana 14 g/m²Tab. 25. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 13,7 - 14,3 g/m² w postaci 2 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent								Średnia	SD
	3 (-7)	3 (-5)	10	12	13	14	15	16		
	Stężenie TREO [µg/ml]									
0,5	340,53	254,02	238,24	1459,9	505,31	509,73	114,95	172,01	449,34	432,81
1	631,06	552,03	476,36	2139,88	755,93	668,22	209,8	352,04	723,17	598,94
1,5	-	-	593,18	3684,77	-	729,07	404,46	446,8	1171,66	1410,70
2	-	-	739,81	4559,92	891,6	859,15	588,4	459,52	1349,73	1581,14
2,5	-	-	444,02	767,64	-	-	524,48	342,69	519,71	181,25
3	455,41	380,02	312,43	410,82	196	245,19	-	226,56	318,06	99,93
4	214,7	199,13	178,18	257,77	72,09	117,52	195,32	139,67	171,80	59,15
6	84,53	56,69	69,62	131,04	-	43	75,66	60,93	74,50	28,33
8	33,38	17,56	-	33,7	10,68	-	26,19	22,18	23,95	9,05

Tab. 26. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po uwzględnieniu normalizacji do deklarowanej dawki 14 g/m²

Czas [h]	Pacjent								Średnia	SD
	3 (-7)*	3 (-5)*	10	12	13	14	15*	16*		
	Stężenie [µg/ml]									
0,5	333,39	248,69	238,24	1459,9	505,31	509,73	117,47	195,78	451,06	431,06
1	617,82	540,45	476,36	2139,88	755,93	668,22	214,39	400,7	726,72	595,14
1,5	-	-	593,18	3684,77	-	729,07	413,31	508,55	1185,78	1401,79
2	-	-	739,81	4559,92	891,6	859,15	601,28	523,03	1362,47	1572,93
2,5	-	-	444,02	767,64	-	-	535,96	390,05	534,42	166,74
3	445,86	372,05	312,43	410,82	196	245,19	-	257,87	320,03	92,82
4	210,2	194,95	178,18	257,77	72,09	117,52	199,6	158,97	173,66	57,62
6	82,76	55,2	69,62	131,04	-	43	77,32	69,35	75,47	27,93
8	32,68	17,19	-	33,7	10,68	-	26,76	25,25	24,38	8,96

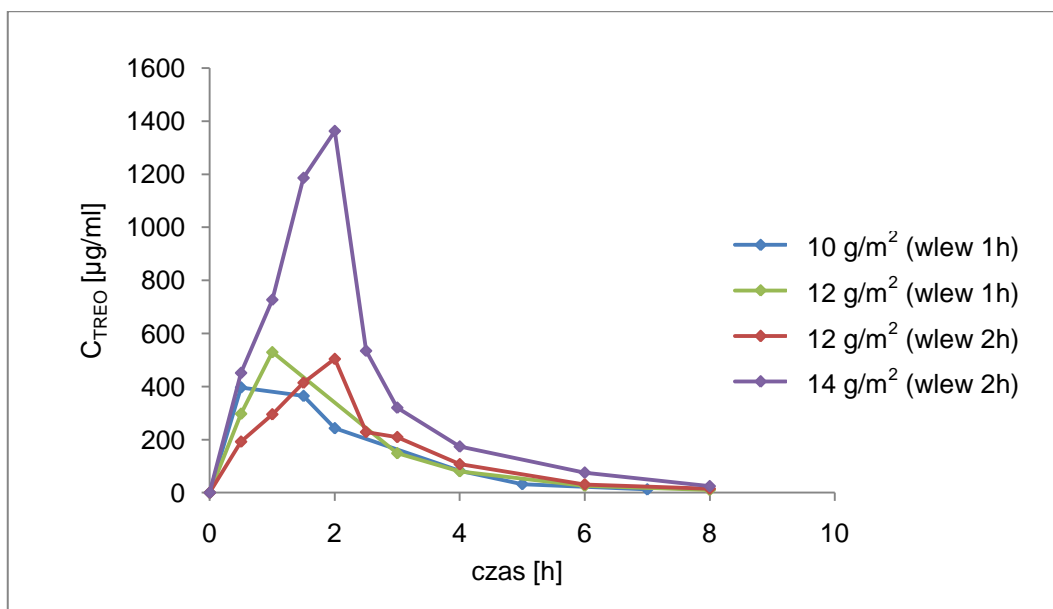
*dawka znormalizowana do deklarowanej



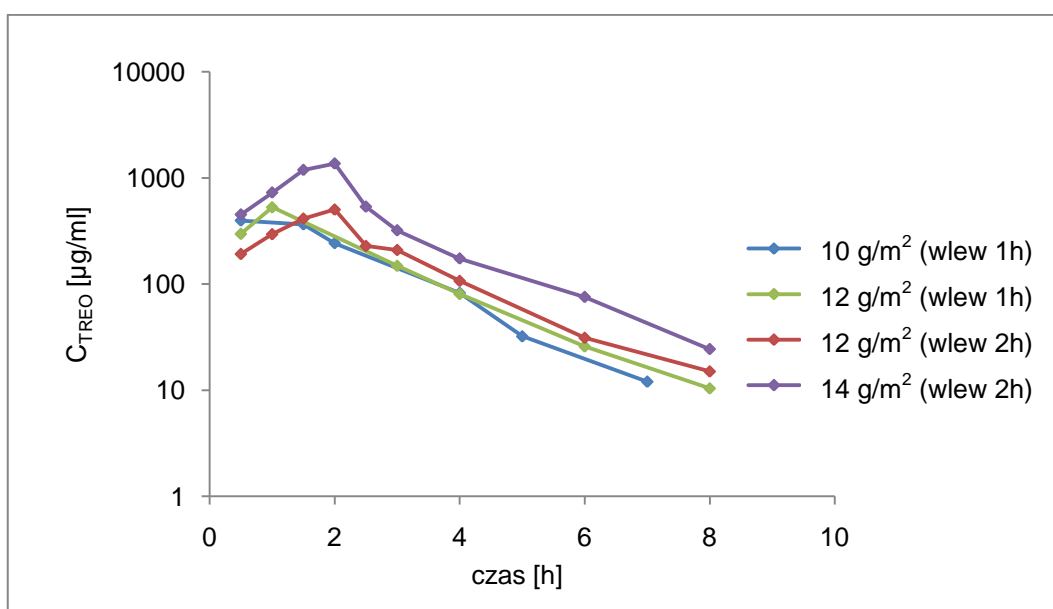
* pacjent po normalizacji dawki

Ryc. 14. Wykres zależności zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu deklarowanej dawki 14 g/m² w postaci 2 h wlewu dożylnego (A – wszyscy pacjenci, B – z wyłączeniem pacjenta 12).

Zależność średnich stężeń TREO w osoczu, jako funkcja czasu po podaniu znormalizowanych dawek 10 g/m^2 , 12 g/m^2 i 14 g/m^2 leku w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego przedstawiono na Ryc. 15 i 16. W zależnościach tych nie uwzględniono pacjenta 9 i 12.



Ryc. 15. Zależność średnich zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu 10 g/m^2 , 12 g/m^2 i 14 g/m^2 leku w postaci 1 lub 2 h wlewu dożylnego.



Ryc. 16. Półlogarytmiczna zależność średnich zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu 10 g/m^2 , 12 g/m^2 i 14 g/m^2 leku w postaci 1 lub 2 h wlewu dożylnego.

5.3.2 Poziomy TREO w moczu

5.3.2.1 Wlew 1 h

Na podstawie oznaczonych stężeń TREO i zmierzonych objętości próbek wydalonego moczu pacjentów zebranych w określonych przedziałach czasowych, obliczono całkowitą ilość wyeliminowanego leku. Szczegółowe dane niezbędne do wykonania obliczeń zebrano w Załączniku IV. Oznaczone ilości TREO w wydalonym moczu pacjentów poddano normalizacji do deklarowanej dawki.

Dawka deklarowana 10 g/m²

Oznaczone w moczu poziomy TREO w poszczególnych przedziałach czasowych oraz ich wartości po normalizacji do dawki 10 g/m² przedstawiono w Tab. 27 i 28. Skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem po podaniu deklarowanej dawki 10 g/m² przedstawiono w Tab. 29. Powyższe zmiany ilości wyeliminowanego TREO w czasie przedstawiono na Ryc. 17.

Tab. 27. Ilość TREO wyeliminowana z moczem pacjenta po podaniu rzeczywistej dawki 11,1 g/m² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent 4
	Ilość TREO [mg]
0,5	66,57
1	-
1,5	340,43
2	319,93
3	-
4	356,25
5	101,86
6	-
7	27,89
8	-
9	14,65
Całkowita ilość leku [g]	1,23
Wyeliminowany % dawki	17,57

Tab. 28. Ilość TREO wyeliminowana z moczem pacjenta po normalizacji do deklarowanej dawki 10 g/m²

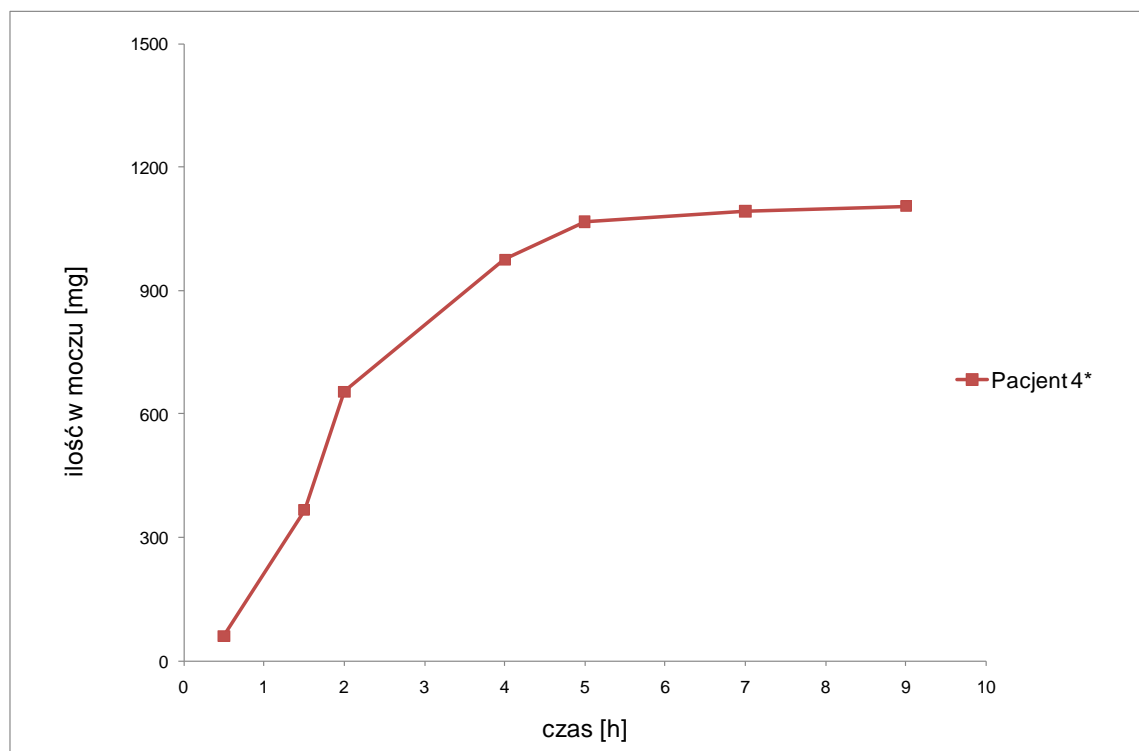
Czas [h]	Pacjent 4*
	Ilość TREO [mg]
0,5	59,97
1	-
1,5	306,69
2	288,22
3	-
4	320,95
5	91,77
6	-
7	25,13
8	-
9	13,20

*dawka znormalizowana do deklarowanej

Tab. 29. Skumulowana ilość TREO wyeliminowana z moczem pacjenta po podaniu deklarowanej dawki 10 g/m² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent 4*
	Ilość TREO [mg]
0,5	59,97
1	-
1,5	366,67
2	654,90
3	-
4	975,84
5	1067,61
6	-
7	1092,74
8	-
9	1105,93

*dawka znormalizowana do deklarowanej



* pacjent po normalizacji dawki

Ryc. 17. Wykres zależności skumulowanej ilości TREO wyeliminowanej z moczem pacjenta od czasu, po podaniu deklarowanej dawki 10 g/m^2 leku w postaci wlewu 1 h.

Dawka deklarowana 12 g/m^2

Oznaczone w moczu poziomy TREO w poszczególnych przedziałach czasowych oraz ich wartości po normalizacji do dawki 12 g/m^2 przedstawiono w Tab. 30 i 31. Skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m^2 przedstawiono w Tab. 32. Powyższe zmiany ilości wyeliminowanego TREO w czasie przedstawiono na Ryc. 18.

Tab. 30. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 11,5 - 12,4 g/m² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent					
	5 (-5)	5 (-4)	5 (-3)	6 (-7)	6 (-6)	6 (-5)
	Ilość TREO [mg]					
0,5	-	-	-	146,25	637,54	258,85
1	-	2818,18	-	634,60	318,31	291,15
1,5	2650,86	-	-	-	-	-
2	-	-	806,90	-	-	-
3	3201,00	2870,70	2891,75	-	600,08	111,04
4	-	1359,78	944,23	749,90	239,96	123,62
5	1590,77	-	-	-	-	-
6	-	957,51	-	201,43	-	226,83
7	532,22	-	391,98	-	-	-
8	173,20	416,78	-	-	-	98,46
9	-	-	341,24	-	-	-
Całkowita ilość leku [g]	8,15	8,42	5,37	1,73	1,79	1,11
% podanej dawki	47,94	49,55	33,56	12,35	12,78	8,53

Tab. 31. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m²

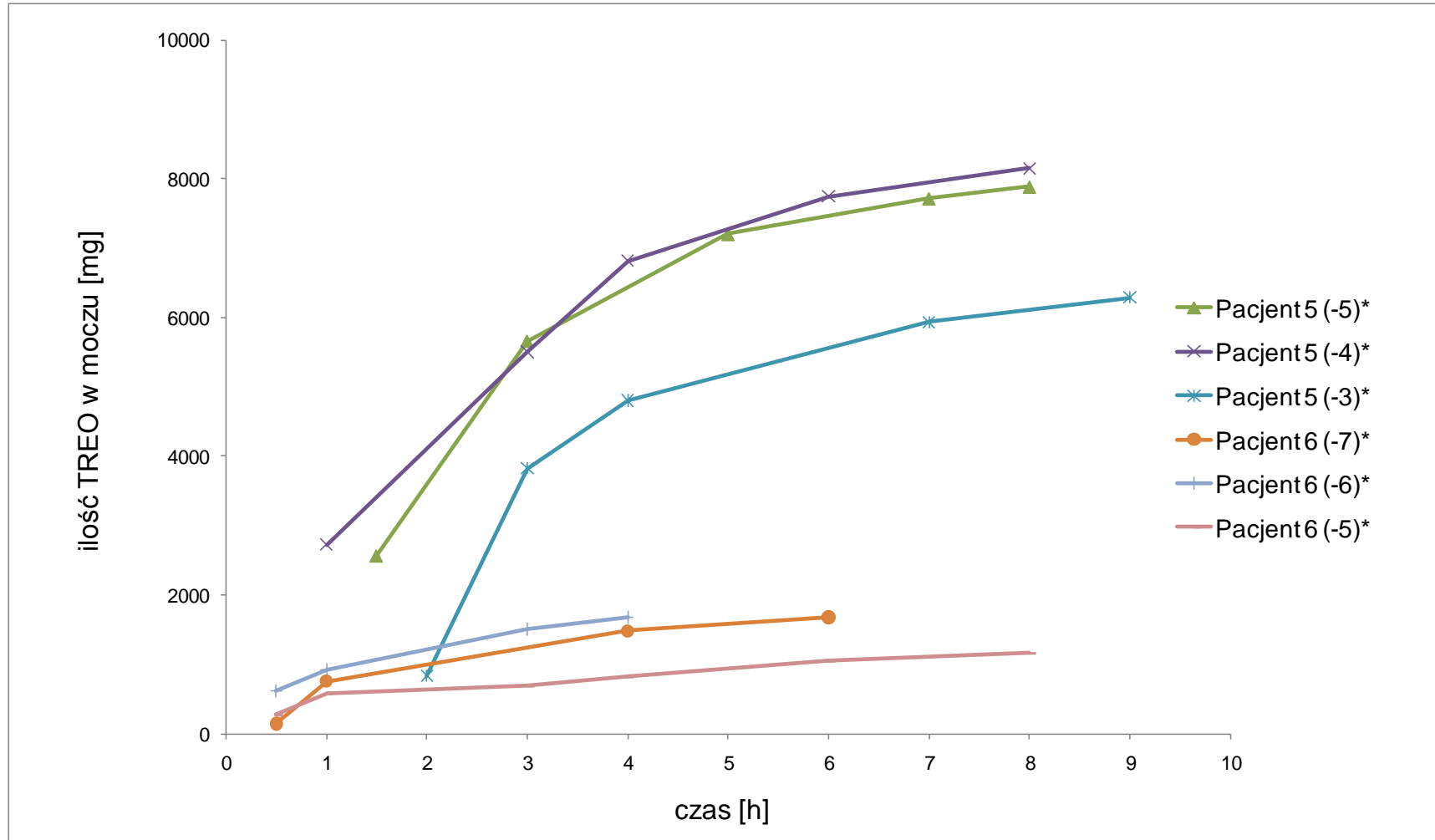
Czas [h]	Pacjent					
	5 (-5)*	5 (-4)*	5 (-3)*	6 (-7)*	6 (-6)*	6 (-5)*
	Ilość TREO [mg]					
0,5	-	-	-	141,53	616,97	270,10
1	-	2727,85	-	614,13	308,04	303,81
1,5	2565,34	-	-	-	-	-
2	-	-	834,72	-	-	-
3	3097,74	2778,09	2991,46	-	580,72	115,87
4	-	1315,91	976,79	725,71	232,22	128,99
5	1539,45	-	-	-	-	-
6	-	926,62	-	194,93	-	236,69
7	515,05	-	1135,38	-	-	-
8	167,61	403,33	-	-	-	102,74
9	-	-	353,01	-	-	-

*dawka znormalizowana do deklarowanej

Tab. 32. Skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent					
	5 (-5)*	5 (-4)*	5 (-3)*	6 (-7)*	6 (-6)*	6 (-5)*
Ilość TREO [mg]						
0,5	-	-	-	141,53	616,97	270,11
1	-	2727,27	-	755,66	925,01	573,91
1,5	2565,35	-	-	-	-	-
2	-	-	834,72	-	-	-
3	5663,08	5505,35	3826,18	-	1505,75	689,77
4	-	6821,27	4802,96	1481,37	1679,90	818,77
5	7202,53	-	-	-	-	-
6	-	7747,89	-	1676,30	-	1055,46
7	7717,58	-	5938,34	-	-	-
8	7885,19	8151,23	-	-	-	1158,20
9	-	-	6291,35	-	-	-

*dawka znormalizowana do deklarowanej



* pacjent po normalizacji dawki

Ryc. 18. Wykres zależności skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem pacjentów od czasu, po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m^2 leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.

5.3.2.2 Wlew 2 h

Na podstawie oznaczonych stężeń TREO i zmierzonych objętości próbek wydalonego moczu pacjentów zebranych w określonych przedziałach czasowych, obliczono całkowitą ilość wyeliminowanego leku. Szczegółowe dane niezbędne do wykonania obliczeń zebrano w Załączniku IV. Oznaczone ilości TREO w wydalonym moczu pacjentów poddano normalizacji do deklarowanej dawki.

Dawka deklarowana 12 g/m²

Oznaczone w moczu pacjentów poziomy TREO w poszczególnych przedziałach czasowych oraz ich wartości po normalizacji do dawki 12 g/m² przedstawiono w Tab. 33 i 34. Skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m² przedstawiono w Tab. 35. Powyższe zmiany ilości wyeliminowanego TREO w czasie przedstawiono na Ryc. 19.

Tab. 33. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu rzeczywistej dawki 11,8 g/m² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent	
	8	11
Ilość TREO [mg]		
0,5	337,91	-
1	479,12	-
2	1413,33	-
2,5	-	1239,86
3	1381,58	383,92
3,25	576,60	-
5,5	-	363,94
6	190,91	108,66
6,5	-	35,44
8,5	-	76,81
12	34,75	-
Całkowita ilość leku [g]	4,41	2,20
% podanej dawki	33,92	16,92

Tab. 34. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m²

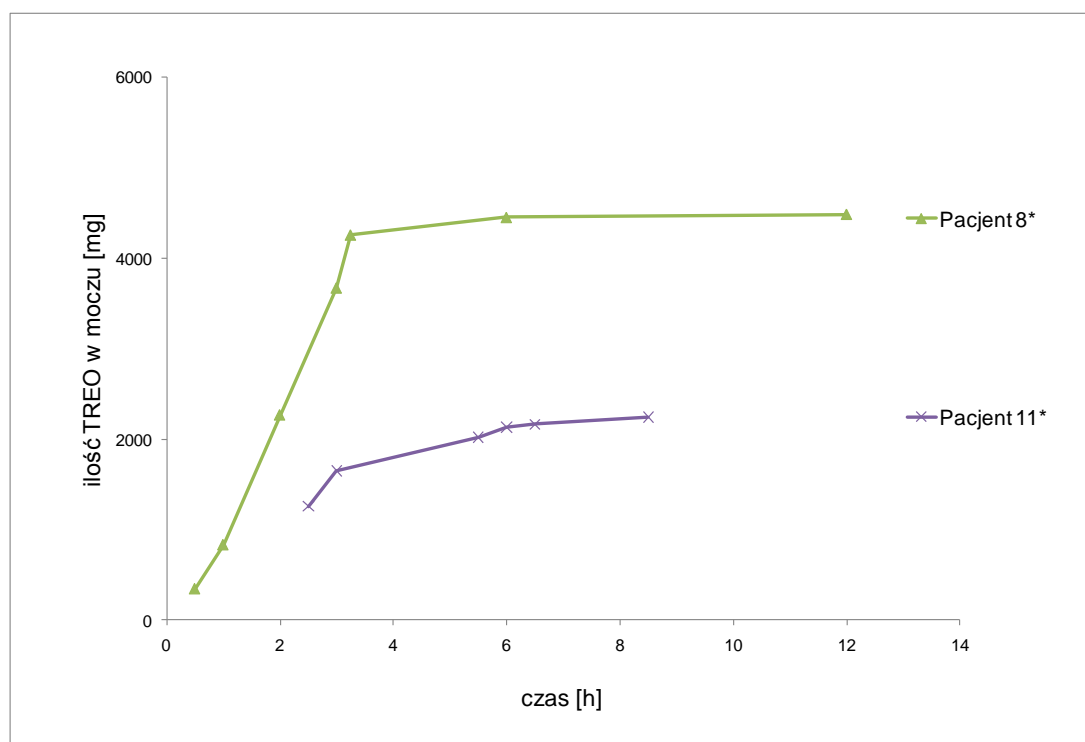
Czas [h]	Pacjent	
	8*	11*
Ilość TREO [mg]		
0,5	346,63	-
1	487,24	-
2	1437,27	-
2,5	-	1260,86
3	1404,98	390,42
3,25	586,37	-
5,5	-	370,11
6	194,14	110,50
6,5	-	36,04
8,5	-	78,11
12	35,34	-

*dawka znormalizowana do deklarowanej

Tab. 35. Skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent	
	8*	11*
Ilość TREO [mg]		
0,5	343,64	-
1	830,87	-
2	2268,14	-
2,5	-	1260,87
3	3673,13	1651,29
3,25	4259,50	-
5,5	-	2021,39
6	4453,64	2131,90
6,5	-	2167,93
8,5	-	2246,04
12	4488,98	-

*dawka znormalizowana do deklarowanej



* pacjent po normalizacji dawki

Ryc. 19. Wykres zależności skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem pacjentów od czasu, po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m^2 leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Dawka deklarowana 14 g/m^2

Oznaczone w moczu pacjentów poziomy TREO w poszczególnych przedziałach czasowych oraz ich wartości po normalizacji do dawki 14 g/m^2 przedstawiono w Tab. 36 i 37. Skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem po podaniu deklarowanej dawki 14 g/m^2 przedstawiono w Tab. 38. Powyższe zmiany ilości wyeliminowanego TREO w czasie przedstawiono na Ryc. 20.

Tab. 36. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 12,3 - 14,3 g/m² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent							
	3 (-7)	3 (-5)	10	12	13	14	15	16
Ilość TREO [mg]								
0,5	-	-	58,20	-	-	-	-	-
1	118,81	108,24	264,24	-	-	635,21	-	687,74
1,25	-	-	-	-	-	1143,66	-	-
1,5	-	-	421,72	-	-	-	920,31	477,89
1,58	-	-	-	-	907,88	-	-	-
2	812,47	-	-	1545,17	-	1798,89	-	775,14
2,5	-	-	304,92	-	-	-	2475,64	-
2,83	-	-	-	-	-	-	-	2517,38
2,92	-	-	-	-	704,00	-	-	-
3	-	1582,39	-	-	-	1590,65	-	-
3,35	-	-	-	-	-	1429,92	-	-
3,83	-	-	-	-	-	-	-	1200,45
4	1938,63	1076,39	-	4733,48	-	-	1943,64	-
4,5	-	-	-	793,23	-	-	-	-
4,75	-	-	-	-	-	-	-	862,14
5	-	-	-	364,75	-	-	-	-
5,25	-	-	-	-	325,57	-	-	-
5,5	-	-	-	-	-	-	-	609,80
5,75	-	-	-	-	-	2207,23	-	-
6	919,23	1257,92	74,51	473,01	-	-	1040,28	-
7	-	-	-	-	-	158,81	-	535,97
7,25	-	-	-	-	-	-	380,67	-
7,5	-	-	-	-	-	-	-	145,83
8	406,07	631,84	12,41	-	-	96,13	-	-
8,5	-	-	-	-	-	-	230,39	181,07
11	-	-	-	308,96	-	-	-	-
Całkowita ilość leku [g]	4,19	4,65	1,13	8,21	1,93	9,06	6,99	7,99
Wyeliminowany % dawki	34,91	38,75	16,14	41,05	13,78	43,14	34,95	39,95

Tab. 37. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po normalizacji do deklarowanej dawki 14 g/m²

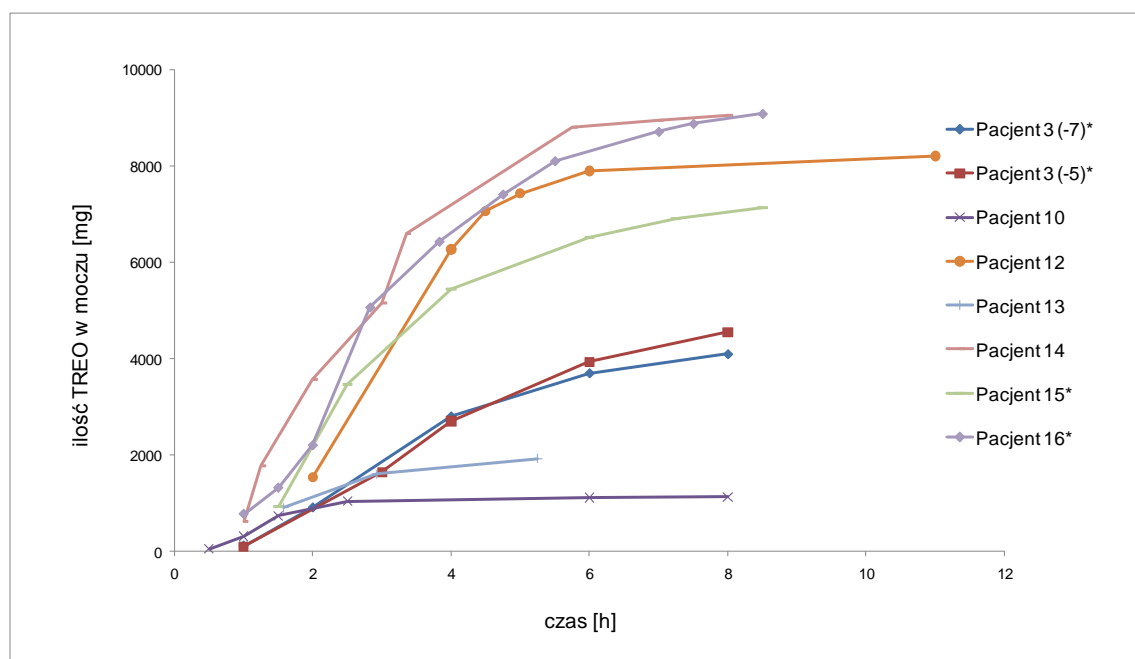
Czas [h]	Pacjent							
	3 (-7)*	3 (-5)*	10	12	13	14	15*	16*
Ilość TREO [mg]								
0,5	-	-	58,20	-	-	-	-	-
1	116,32	105,97	264,24	-	-	635,21	-	782,78
1,25	-	-	-	-	-	1143,66	-	-
1,5	-	-	421,72	-	-	-	940,46	543,94
1,58	-	-	-	-	907,88	-	-	-
2	795,42	-	-	1545,17	-	1798,89	-	882,27
2,5	-	-	304,92	-	-	-	2529,83	-
2,83	-	-	-	-	-	-	-	2865,31
2,92	-	-	-	-	704,00	-	-	-
3	-	1549,19	-	-	-	1590,65	-	-
3,35	-	-	-	-	-	1429,92	-	-
3,83	-	-	-	-	-	-	-	1366,37
4	1897,96	1053,81	-	4733,48	-	-	1986,19	-
4,5	-	-	-	793,23	-	-	-	-
4,75	-	-	-	-	-	-	-	981,30
5	-	-	-	364,75	-	-	-	-
5,25	-	-	-	-	325,57	-	-	-
5,5	-	-	-	-	-	-	-	694,08
5,75	-	-	-	-	-	2207,23	-	-
6	899,94	1231,53	74,51	473,01	-	-	1063,05	-
7	-	-	-	-	-	158,81	-	610,05
7,25	-	-	-	-	-	-	389,00	-
7,5	-	-	-	-	-	-	-	169,99
8	397,55	618,58	12,41	-	-	96,13	-	-
8,5	-	-	-	-	-	-	235,43	206,10
11	-	-	-	308,96	-	-	-	-

*dawka znormalizowana do deklarowanej

Tab. 38. Skumulowane ilości leku wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu deklarowanej dawki 14 g/m² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego

Czas [h]	Pacjent							
	3 (-7)*	3 (-5)*	10	12	13	14	15*	16*
	Ilość TREO [mg]							
0,5	-	-	58,20	-	-	-	-	-
1	116,31	105,97	322,44	-	-	635,21	-	782,79
1,25	-	-	-	-	-	1778,87	-	-
1,5	-	-	744,16	-	-	-	940,46	1326,73
1,58	-	-	-	-	907,88	-	-	-
2	911,74	-	-	1545,17	-	3577,76	-	2209,01
2,5	-	-	1049,08	-	-	-	3470,29	-
2,83	-	-	-	-	-	-	-	5074,32
2,92	-	-	-	-	1611,88	-	-	-
3	-	1655,16	-	-	-	5168,41	-	-
3,35	-	-	-	-	-	6598,33	-	-
3,83	-	-	-	-	-	-	-	6440,69
4	2809,70	2708,97	-	6278,65	-	-	5456,48	-
4,5	-	-	-	7071,89	-	-	-	-
4,75	-	-	-	-	-	-	-	7421,98
5	-	-	-	7436,63	-	-	-	-
5,25	-	-	-	-	1937,45	-	-	-
5,5	-	-	-	-	-	-	-	8116,06
5,75	-	-	-	-	-	8805,56	-	-
6	3709,64	3940,50	1123,59	7909,64	-	-	6519,53	-
7	-	-	-	-	-	8964,37	-	8726,11
7,25	-	-	-	-	-	-	6908,53	-
7,5	-	-	-	-	-	-	-	8892,11
8	4107,19	4559,08	1136,00	-	-	9060,50	-	-
8,5	-	-	-	-	-	-	7143,96	9098,16
11	-	-	-	8218,60	-	-	-	-

*dawka znormalizowana do deklarowanej

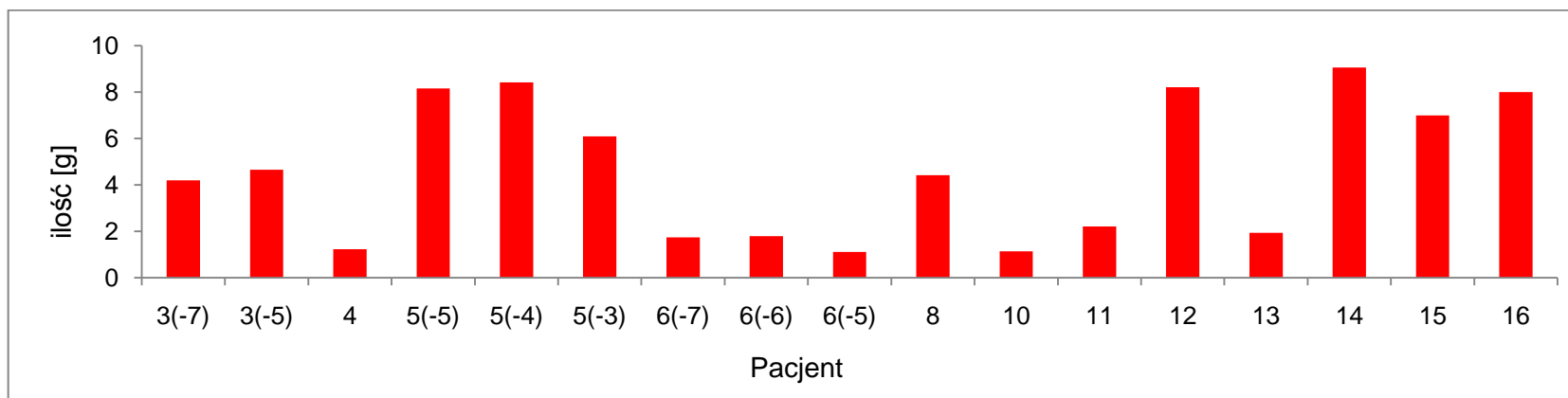


* pacjent po normalizacji dawki

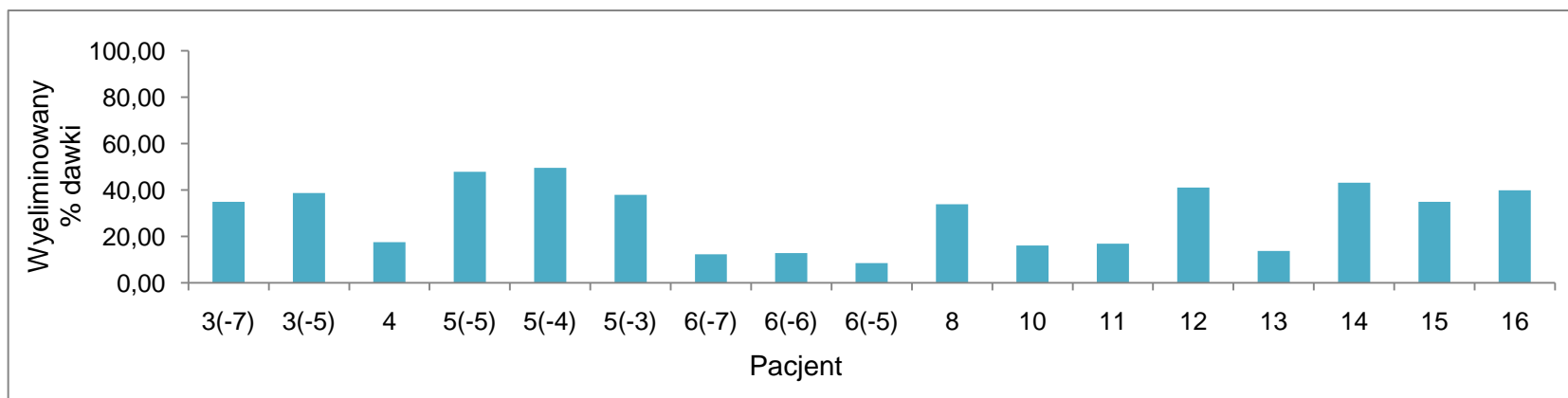
Ryc. 20. Wykres zależności skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem pacjentów od czasu, po podaniu deklarowanej dawki 14 g/m^2 leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

5.3.2.3 Zestawienie wyeliminowanego TREO z moczem pacjentów

Całkowitą ilość TREO wyeliminowaną z moczem pacjentów po podaniu leku w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego przedstawiono na Ryc. 21, natomiast ilość TREO wyeliminowana z moczem pacjentów, wyrażona jako % podanej dawki przedstawiono na Ryc. 22.



Ryc. 21. Całkowita ilość TReO wyeliminowana z moczem u 12 pacjentów.



Ryc. 22. Ilość TReO wyeliminowana z moczem wyrażona jako % podanej dawki u 12 pacjentów.

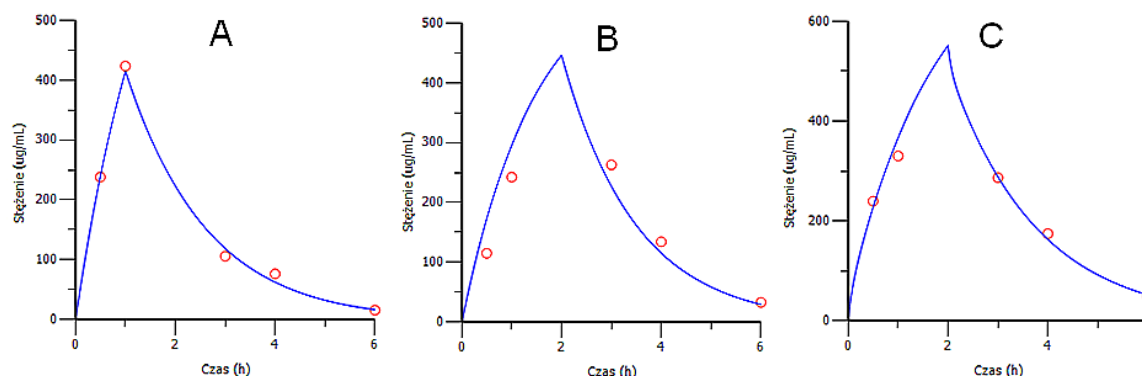
5.3.3 Parametry farmakokinetyczne

Parametry farmakokinetyczne TREO obliczono na podstawie zmian stężeń leku w osoczu oraz ilości wyeliminowanego leku z moczem pacjentów, którzy poddani zostali terapii mieloablacyjnej poprzedzającej HSCT. Przy użyciu programu WinNonlin 6.2 zostały wyznaczone następujące parametry farmakokinetyczne:

- osocze - $t_{0,5}$, C_{max} , Cl_{tot} , V_{ss} , AUC, MRT,
- mocz – k_{ner} , $t_{0,5}$ oraz wyeliminowany % dawki leku.

5.3.3.1 Farmakokinetyka TREO u pacjentów

Pacjent 1

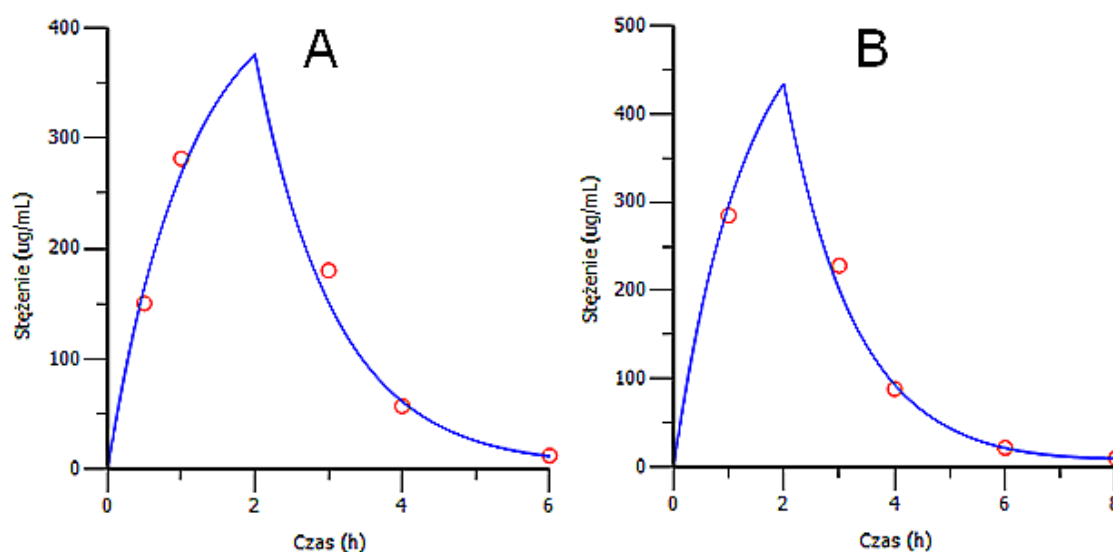


Ryc. 23. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 1 po podaniu 7,5 g (dzień -7; A), 8 g (dzień -6; B) i 10 g (dzień -5; C) leku w postaci 1 h (A) oraz 2 h (B, C) wlewu dożylnego.

Tab. 39. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 1

Charakterystyka pacjenta			
Wiek [lata]	5		
Płeć	M		
Waga [kg]	16		
Dawka TREO [g/m ²]	10,5	11,3	14
Dawka TREO norm. [g/m ²]	12	12	12
Całkowita dawka [g/dzień]	7,5	8	10
Dzień podania TREO	-7	-6	-5
Czas wlewu [h]	1	2	2
Parametry farmakokinetyczne			
Osocze			
C _{max} ozn [µg/ml]	414	445	550
C _{max} [µg/ml]	473	472	471
t _{0,5} [h]	0,96	1,02	1,21
V _{ss} [ml]	13229	9844	10540
AUC _{ozn} [h*µg/ml]	887	1202	1581
AUC [h*µg/ml]	1013	1276	1355
Cl _{tot} [ml/h]	8450	6646	6323
MRT [h]	1,56	1,48	1,66
Mocz			
k _{ner} [1/h]	-	-	-
t _{0,5} [h]	-	-	-
Ilość wydalonego leku [g]	-	-	-
Wyeliminowany % dawki	-	-	-

Pacjent 2

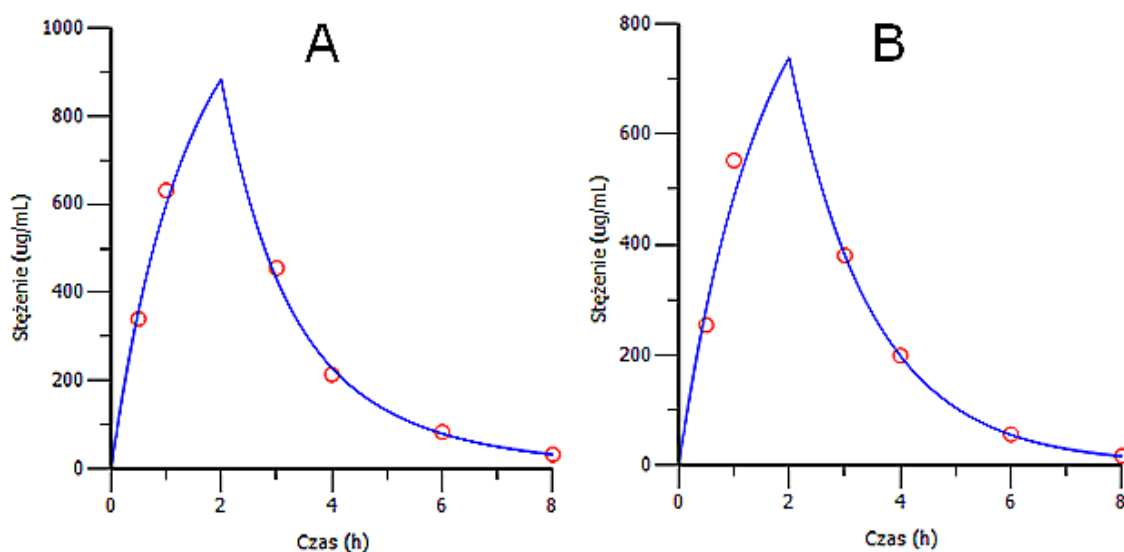


Ryc. 24. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 2 (A = dzień -7, B = dzień -6) po podaniu w kolejnych dniach 3 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 40. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 2

Charakterystyka pacjenta		
Wiek [lata]	0,4	
Płeć	M	
Waga [kg]	7,7	
Dawka TREO [g/m ²]	12	12
Całkowita dawka [g/dzień]	3	3
Dzień podania TREO	-7	-6
Czas wlewu [h]	2	2
Parametry farmakokinetyczne		
Osocze		
C _{max} [μg/ml]	375	433
t _{0,5} [h]	1,82	1,46
V _{ss} [ml]	3741	3536
AUC [h*μg/ml]	889	1103
Cl _{tot} [ml/h]	3371	2719
MRT [h]	1,10	1,30
Mocz		
k _{ner} [1/h]	-	-
t _{0,5} [h]	-	-
Ilość wydalonego leku [g]	-	-
Wylimowany % dawki	-	-

Pacjent 3

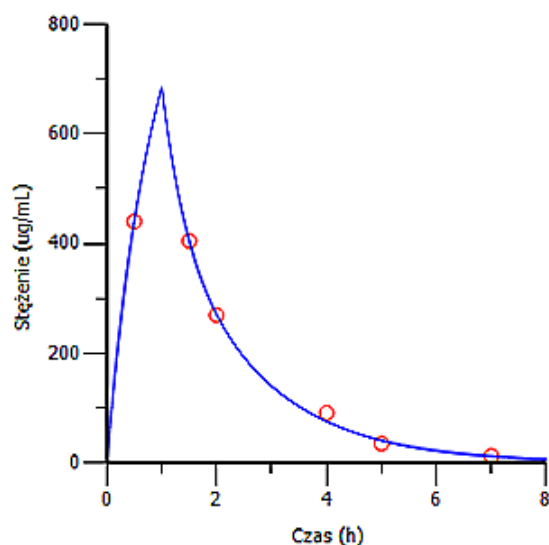


Ryc. 25. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 3 (A = dzień -7, B = dzień -5) po podaniu w kolejnych dniach 12 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 41. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 3

Charakterystyka pacjenta		
Wiek [lata]	6	
Płeć	M	
Waga [kg]	21,4	
Dawka TREO [g/m ²]	14,3	14,3
Dawka TREO norm. [g/m ²]	14	14
Całkowita dawka [g/dzień]	12	12
Dzień podania TREO	-7	-5
Czas wlewu [h]	2	2
Parametry farmakokinetyczne		
Osocze		
C _{max} ozn [μg/ml]	882	737
C _{max} [μg/ml]	863	721
t _{0,5} [h]	1,78	1,99
V _{ss} [ml]	8502	9327
AUC _{ozn} [h*μg/ml]	2110	2037
AUC [h*μg/ml]	2065	1994
Cl _{tot} [ml/h]	4780	5889
MRT [h]	1,77	1,58
Mocz		
k _{ner} [1/h]	0,39	0,34
t _{0,5} [h]	1,73	1,99
Ilość wydalonego leku [g]	4,19	4,65
Wyeliminowany % dawki	34,91	38,75

Pacjent 4

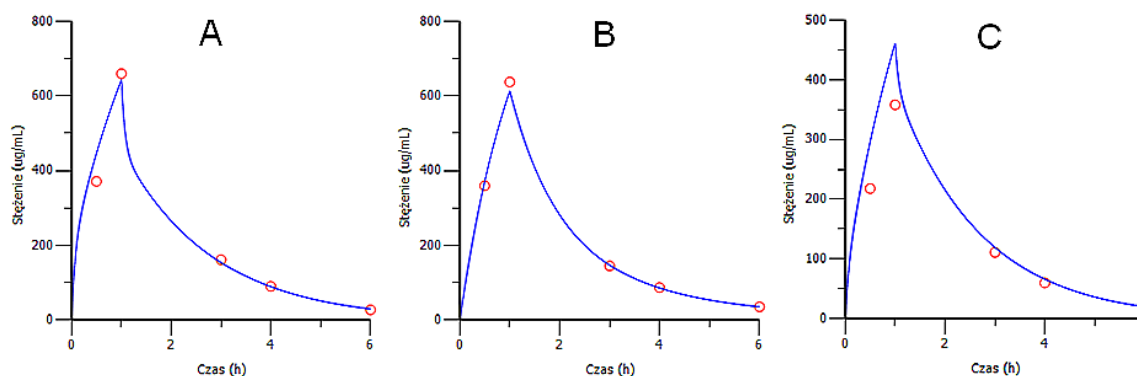


Ryc. 26. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 4 po podaniu 7 g leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.

Tab. 42. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 4

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	3
Płeć	K
Waga [kg]	14,4
Dawka TREO [g/m ²]	11,1
Dawka TREO norm. [g/m ²]	10
Całkowita dawka [g/dzień]	7
Dzień podania TREO	-6
Czas wlewu [h]	1
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max} ozn [µg/ml]	685
C _{max} [µg/ml]	617
t _{0,5} [h]	1,15
V _{ss} [ml]	7854
AUC _{ozn} [h*µg/ml]	1265
AUC [h*µg/ml]	1139
Cl _{tot} [ml/h]	5533
MRT [h]	1,41
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,36
t _{0,5} [h]	1,92
Ilość wydalonego leku [g]	1,23
Wyeliminowany % dawki	17,57

Pacjent 5

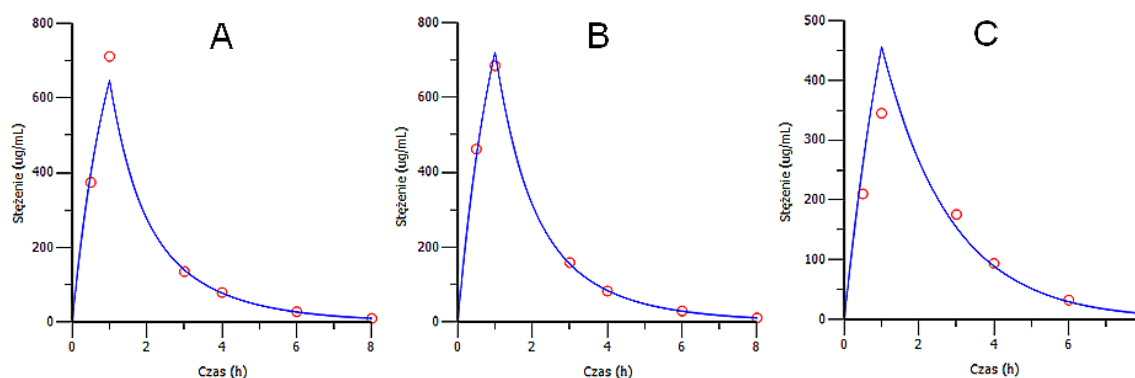


Ryc. 27. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 5 (A = dzień -5, B = dzień -4, C = dzień -3) po podaniu 17 g (A, B) i 16 g (C) leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.

Tab. 43. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 5

Charakterystyka pacjenta			
Wiek [lata]	13		
Płeć	M		
Waga [kg]	43		
Dawka TREO [g/m ²]	12,4	12,4	11,6
Dawka TREO norm [g/m ²]	12	12	12
Całkowita dawka [g/dzień]	17	17	16
Dzień podania TREO	-5	-4	-3
Czas wlewu [h]	1	1	1
Parametry farmakokinetyczne			
Osocze			
C _{max} ozn [µg/ml]	643	613	461
C _{max} [µg/ml]	622	593	476
t _{0,5} [h]	1,27	1,90	1,17
V _{ss} [ml]	21045	24765	26584
AUC _{ozn} [h*µg/ml]	1275	1296	944
AUC [h*µg/ml]	1233	1254	976
Cl _{tot} [ml/h]	13325	13114	16931
MRT [h]	1,57	1,88	1,57
Mocz			
k _{ner} [1/h]	0,37	0,42	0,34
t _{0,5} [h]	1,87	1,62	2,02
Ilość wydalonego leku [g]	8,15	8,42	6,08
Wyeliminowany % dawki	47,94	49,55	38

Pacjent 6

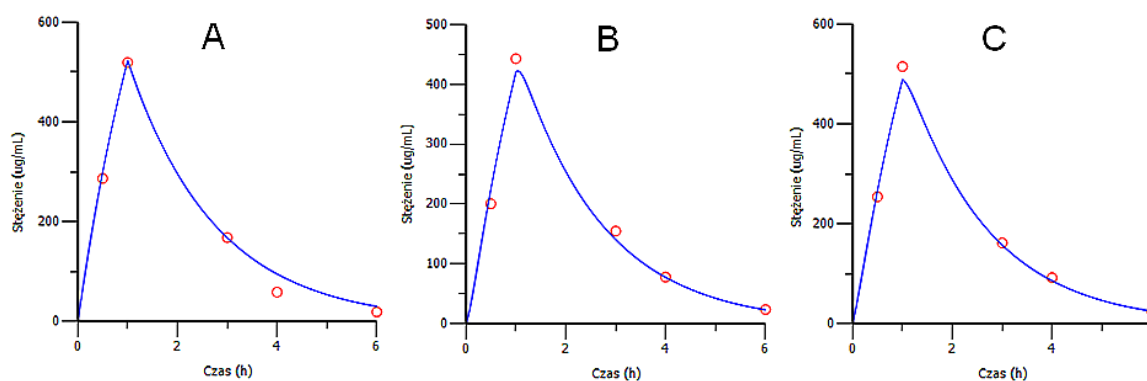


Ryc. 28. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 6 (A = dzień -7, B = dzień -6, C = dzień -5) po podaniu 14 g (A, B) i 13 g (C) leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.

Tab. 44. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 6

Charakterystyka pacjenta			
Wiek [lata]	9		
Płeć	M		
Waga [kg]	33,8		
Dawka TREO [g/m ²]	12,4	12,4	11,5
Dawka TREO norm. [g/m ²]	12	12	12
Całkowita dawka [g/dzień]	14	14	13
Dzień podania TREO	-7	-6	-5
Czas wlewu [h]	1	1	1
Parametry farmakokinetyczne			
Osocze			
C _{max} ozn [µg/ml]	646	720	456
C _{max} [µg/ml]	625	696	475
t _{0,5} [h]	1,40	1,47	1,27
V _{ss} [ml]	16324	15708	22000
AUC _{ozn} [h*µg/ml]	1258	1400	1090
AUC [h*µg/ml]	1217	1354	1137
Cl _{tot} [ml/h]	10331	9993	11924
MRT [h]	1,58	1,57	1,85
Mocz			
k _{ner} [1/h]	0,38	0,39	0,30
t _{0,5} [h]	1,77	1,74	2,30
Ilość wydalonego leku [g]	1,73	1,79	1,11
Wyeliminowany % dawki	12,35	12,78	8,53

Pacjent 7

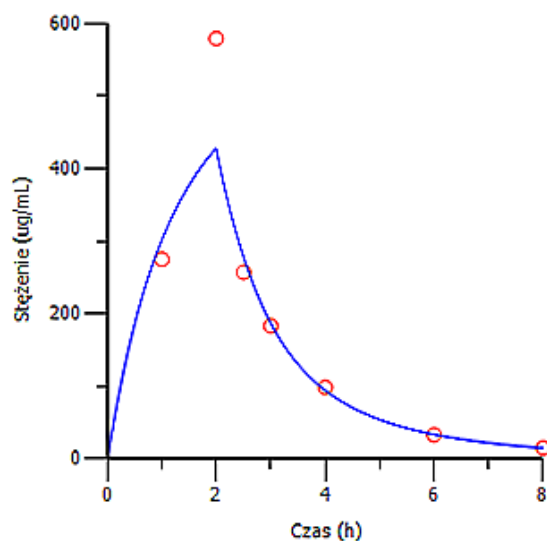


Ryc. 29. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 7 (A = dzień -6, B = dzień -5, C = dzień -4) po podaniu w kolejnych dniach 3 g leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.

Tab. 45. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 7

Charakterystyka pacjenta			
Wiek [lata]	1,9		
Płeć	M		
Waga [kg]	7,3		
Dawka TREO [g/m ²]	12	12	12
Całkowita dawka [g/dzień]	3	3	3
Dzień podania TREO	-6	-5	-4
Czas wlewu [h]	1	1	1
Parametry farmakokinetyczne			
Osocze			
C _{max} [µg/ml]	522	420	478
t _{0,5} [h]	1,23	1,16	1,14
V _{ss} [ml]	4379	5311	4552
AUC [h*µg/ml]	1207	999	1125
Cl _{tot} [ml/h]	2485	3031	2665
MRT [h]	1,76	1,75	1,70
Mocz			
k _{ner} [1/h]	-	-	-
t _{0,5} [h]	-	-	-
Ilość wydalonego leku [g]	-	-	-
Wyeliminowany % dawki	-	-	-

Pacjent 8

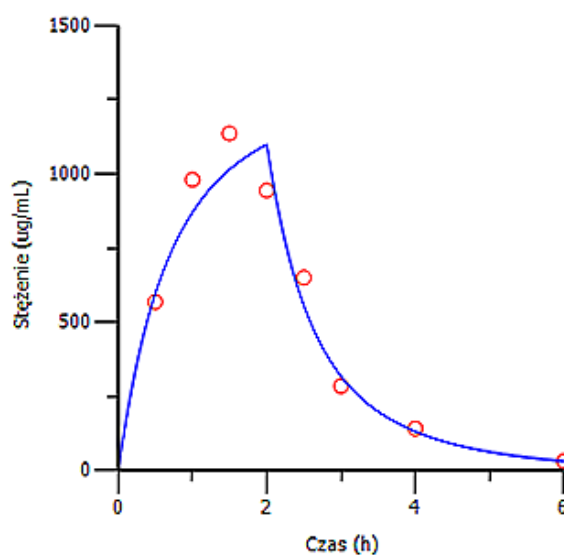


Ryc. 30. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 8 po podaniu 13 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 46. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 8

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	9
Płeć	M
Waga [kg]	32
Dawka TREO [g/m ²]	11,8
Dawka TREO norm. [g/m ²]	12
Całkowita dawka [g/dzień]	13
Dzień podania TREO	-7
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max ozn} [μg/ml]	427
C _{max} [μg/ml]	434
t _{0,5} [h]	1,86
V _{ss} [ml]	18730
AUC _{ozn} [h*μg/ml]	1169
AUC [h*μg/ml]	1188
Cl _{tot} [ml/h]	11111
MRT [h]	1,68
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,56
t _{0,5} [h]	1,21
Ilość wydalonego leku [g]	4,41
Wyeliminowany % dawki	33,92

Pacjent 9

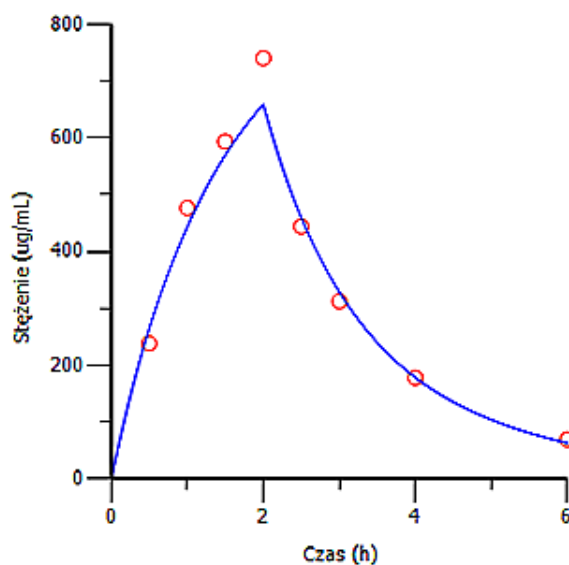


Ryc. 31. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 9 po podaniu 6 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 47. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 9

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	2
Płeć	K
Waga [kg]	9
Dawka TREO [g/m ²]	12,8
Dawka TREO norm. [g/m ²]	12
Całkowita dawka [g/dzień]	6
Dzień podania TREO	-7
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max ozn} [µg/ml]	1098
C _{max} [µg/ml]	1029
t _{0,5} [h]	1,04
V _{ss} [ml]	2319
AUC _{ozn} [h*µg/ml]	2550
AUC [h*µg/ml]	2390
Cl _{tot} [ml/h]	2352
MRT [h]	0,98
Mocz	
k _{ner} [1/h]	-
t _{0,5} [h]	-
Ilość wydalonego leku [g]	-
Wyeliminowany % dawki	-

Pacjent 10

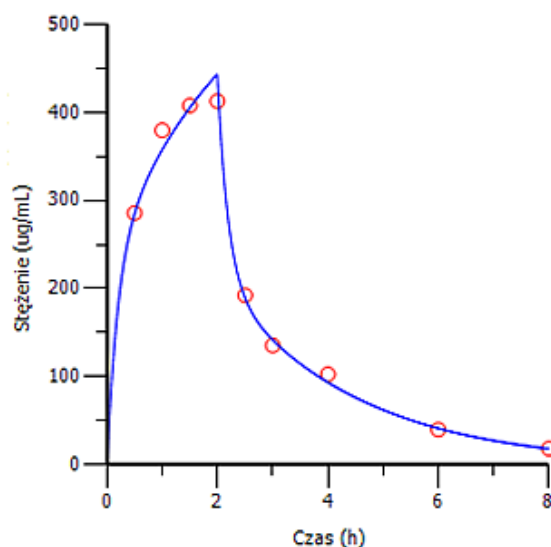


Ryc. 32. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 10 po podaniu 7 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 48. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 10

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	2
Płeć	M
Waga [kg]	12
Dawka TREO [g/m ²]	14
Całkowita dawka [g/dzień]	7
Dzień podania TREO	-7
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max} [µg/ml]	658
t _{0,5} [h]	1,66
V _{ss} [ml]	6624
AUC [h*µg/ml]	1891
Cl _{tot} [ml/h]	3700
MRT [h]	1,79
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,45
t _{0,5} [h]	1,52
Ilość wydalonego leku [g]	1,13
Wyselminowany % dawki	16,14

Pacjent 11

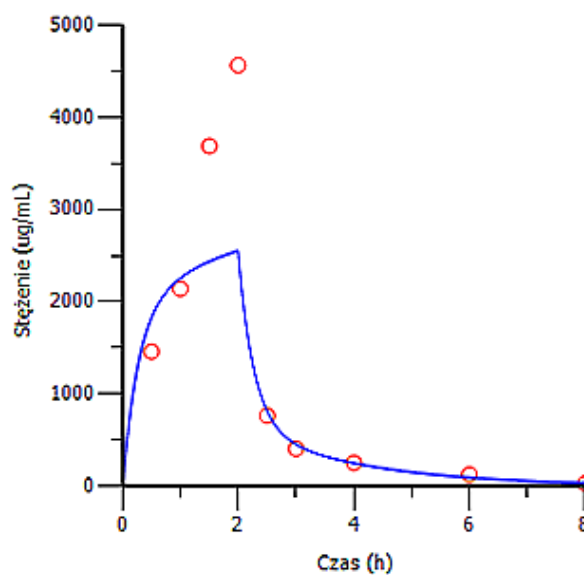


Ryc. 33. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 11 po podaniu 13 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 49. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 11

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	10
Płeć	M
Waga [kg]	31,2
Dawka TREO [g/m ²]	11,8
Dawka TREO norm. [g/m ²]	12
Całkowita dawka [g/dzień]	13
Dzień podania TREO	-5
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max ozn} [µg/ml]	443
C _{max} [µg/ml]	450
t _{0,5} [h]	1,70
V _{ss} [ml]	17027
AUC _{ozn} [h*µg/ml]	1223
AUC [h*µg/ml]	1243
Cl _{tot} [ml/h]	10625
MRT [h]	1,60
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,30
t _{0,5} [h]	2,27
Ilość wydalonego leku [g]	2,20
Wyeliminowany % dawki	16,92

Pacjent 12

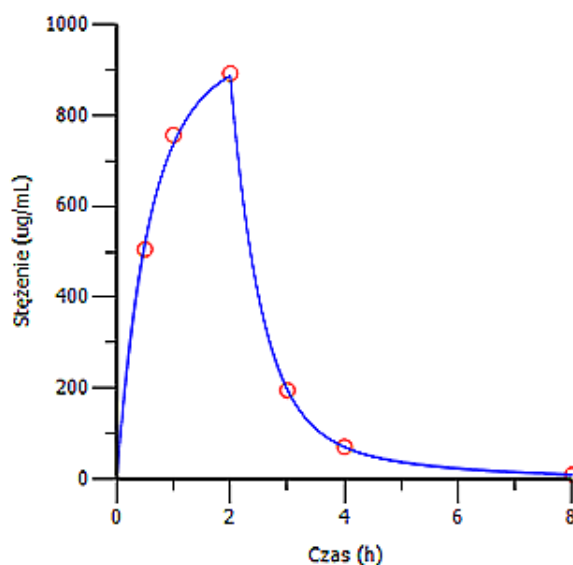


Ryc. 34. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 12 po podaniu 20 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 50. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 12

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	18
Płeć	K
Waga [kg]	46,5
Dawka TREO [g/m ²]	14
Całkowita dawka [g/dzień]	20
Dzień podania TREO	-7
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max} [µg/ml]	2552
t _{0,5} [h]	1,44
V _{ss} [ml]	3123
AUC [h*µg/ml]	5929
Cl _{tot} [ml/h]	3372
MRT [h]	0,92
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,67
t _{0,5} [h]	1,03
Ilość wydalonego leku [g]	8,21
Wyeliminowany % dawki	41,05

Pacjent 13

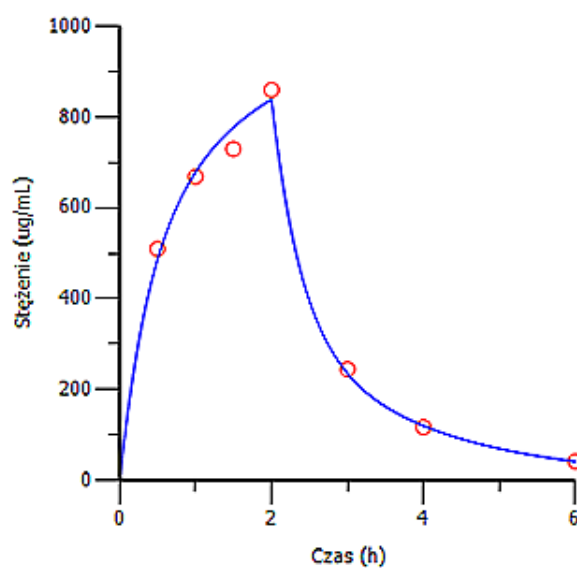


Ryc. 35. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 13 po podaniu 14 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 51. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 13

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	6
Płeć	M
Waga [kg]	29
Dawka TREO [g/m ²]	14
Całkowita dawka [g/dzień]	14
Dzień podania TREO	-7
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max} [µg/ml]	886
t _{0,5} [h]	1,70
V _{ss} [ml]	6665
AUC [h*µg/ml]	2004
Cl _{tot} [ml/h]	6985
MRT [h]	0,95
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,65
t _{0,5} [h]	1,06
Ilość wydalonego leku [g]	1,93
Wyliminowany % dawki	13,78

Pacjent 14

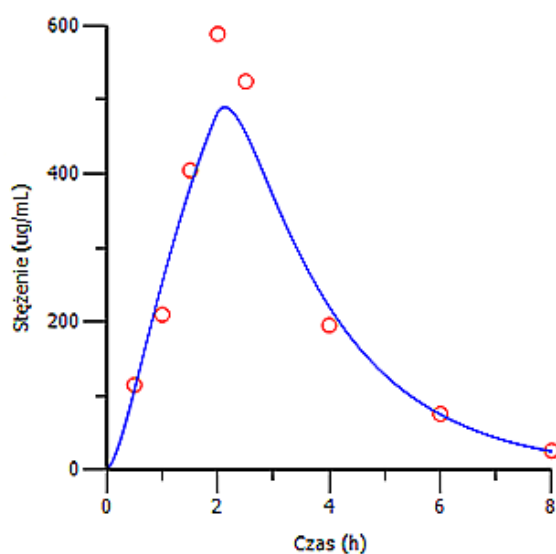


Ryc. 36. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 14 po podaniu 21 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 52. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 14

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	14
Płeć	M
Waga [kg]	50
Dawka TREO [g/m ²]	14
Całkowita dawka [g/dzień]	21
Dzień podania TREO	-7
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max} [µg/ml]	837
t _{0,5} [h]	1,36
V _{ss} [ml]	12057
AUC [h*µg/ml]	2051
Cl _{tot} [ml/h]	10237
MRT [h]	1,17
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,39
t _{0,5} [h]	1,78
Ilość wydalonego leku [g]	9,06
Wyeliminowany % dawki	43,14

Pacjent 15

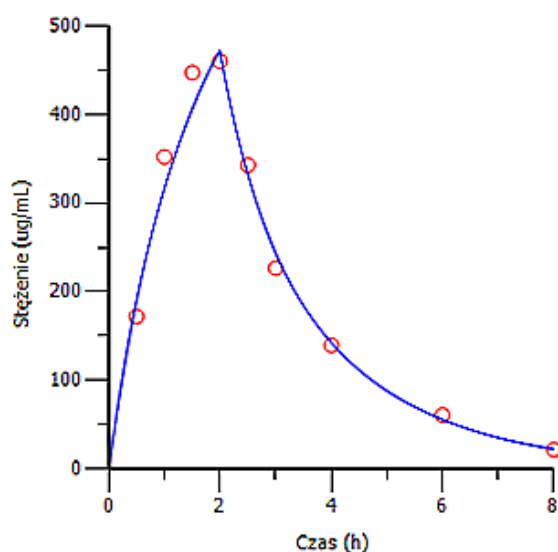


Ryc. 37. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 15 po podaniu 20 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 53. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 15

Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	15
Płeć	K
Waga [kg]	45
Dawka TREO [g/m ²]	13,7
Dawka TREO norm. [g/m ²]	14
Całkowita dawka [g/dzień]	20
Dzień podania TREO	-8
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max ozn} [µg/ml]	483
C _{max} [µg/ml]	493
t _{0,5} [h]	1,28
V _{ss} [ml]	26405
AUC _{ozn} [h*µg/ml]	1634
AUC [h*µg/ml]	1669
Cl _{tot} [ml/h]	12235
MRT [h]	2,15
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,39
t _{0,5} [h]	1,77
Ilość wydalonego leku [g]	6,99
Wyeliminowany % dawki	34,95

Pacjent 16



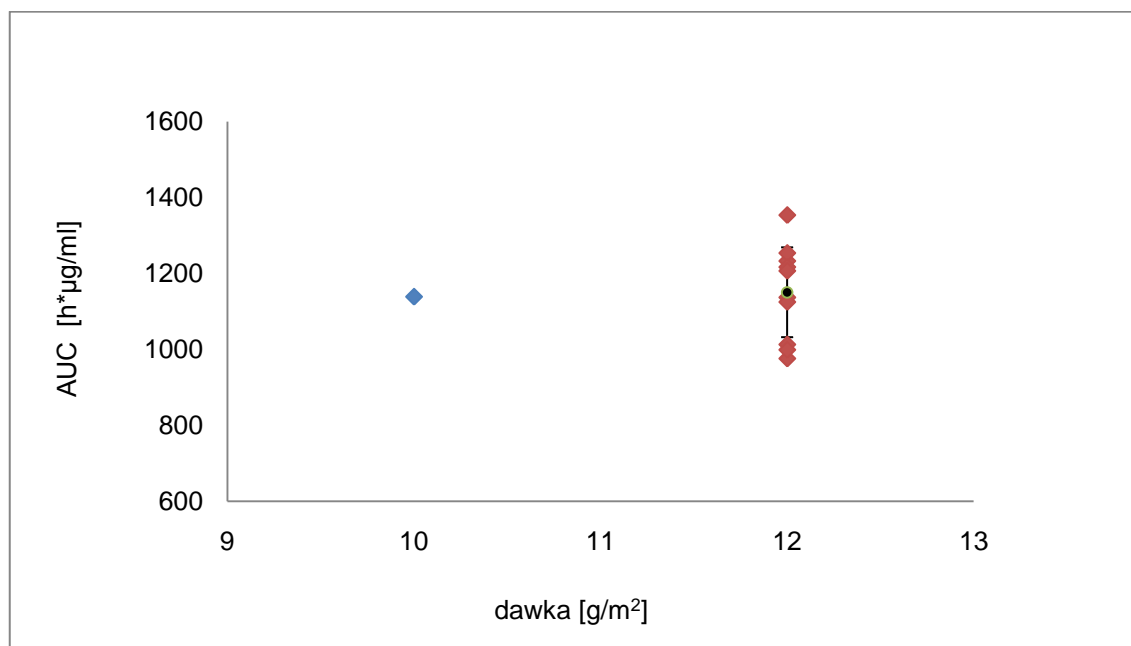
Ryc. 38. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 16 po podaniu 20 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Tab. 54. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 16

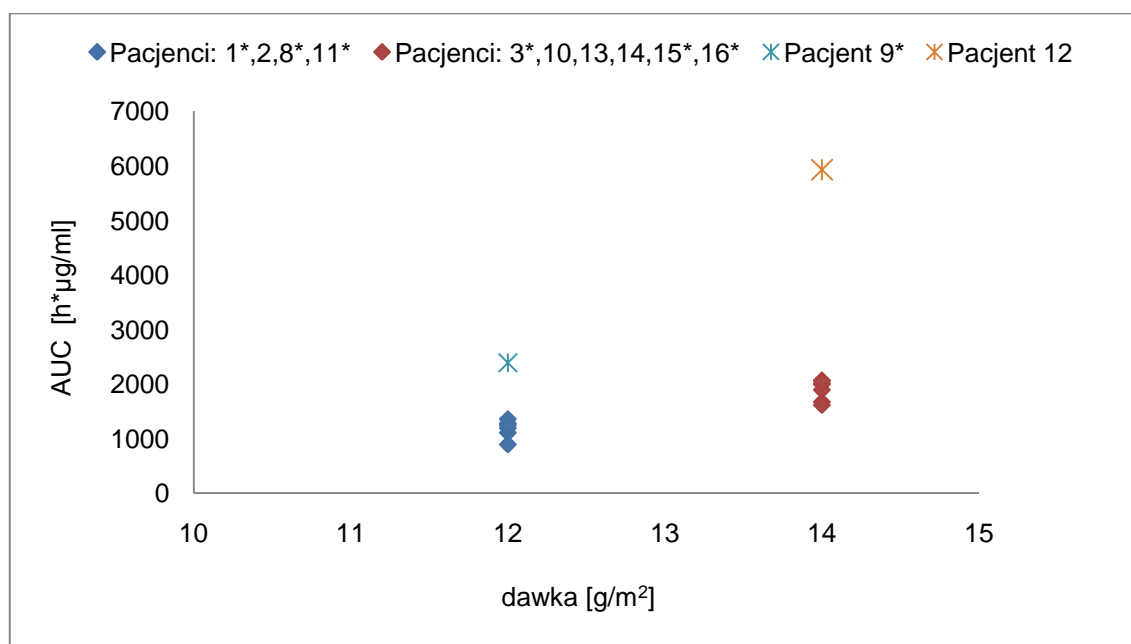
Charakterystyka pacjenta	
Wiek [lata]	14
Płeć	M
Waga [kg]	52
Dawka TREO [g/m ²]	12,3
Dawka TREO norm. [g/m ²]	14
Całkowita dawka [g/dzień]	20
Dzień podania TREO	-4
Czas wlewu [h]	2
Parametry farmakokinetyczne	
Osocze	
C _{max ozn} [µg/ml]	471
C _{max} [µg/ml]	536
t _{0,5} [h]	1,56
V _{ss} [ml]	27027
AUC _{ozn} [h*µg/ml]	1418
AUC [h*µg/ml]	1613
Cl _{tot} [ml/h]	14095
MRT [h]	1,91
Mocz	
k _{ner} [1/h]	0,43
t _{0,5} [h]	1,58
Ilość wydalonego leku [g]	7,99
Wyeliminowany % dawki	39,95

5.3.3.2 Zależności parametrów farmakokinetycznych

Zależność AUC od dawki TREO

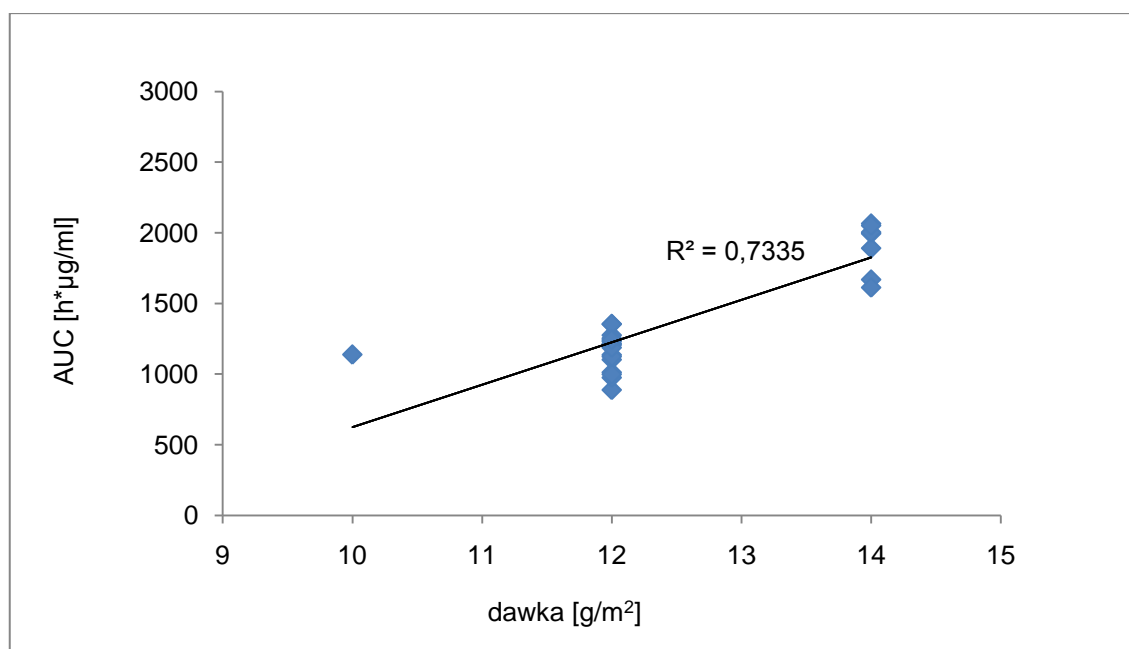


Ryc. 39. Zależność znormalizowanych AUC od deklarowanej dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku), którym podano lek w postaci 1 h wlewu dożylnego.

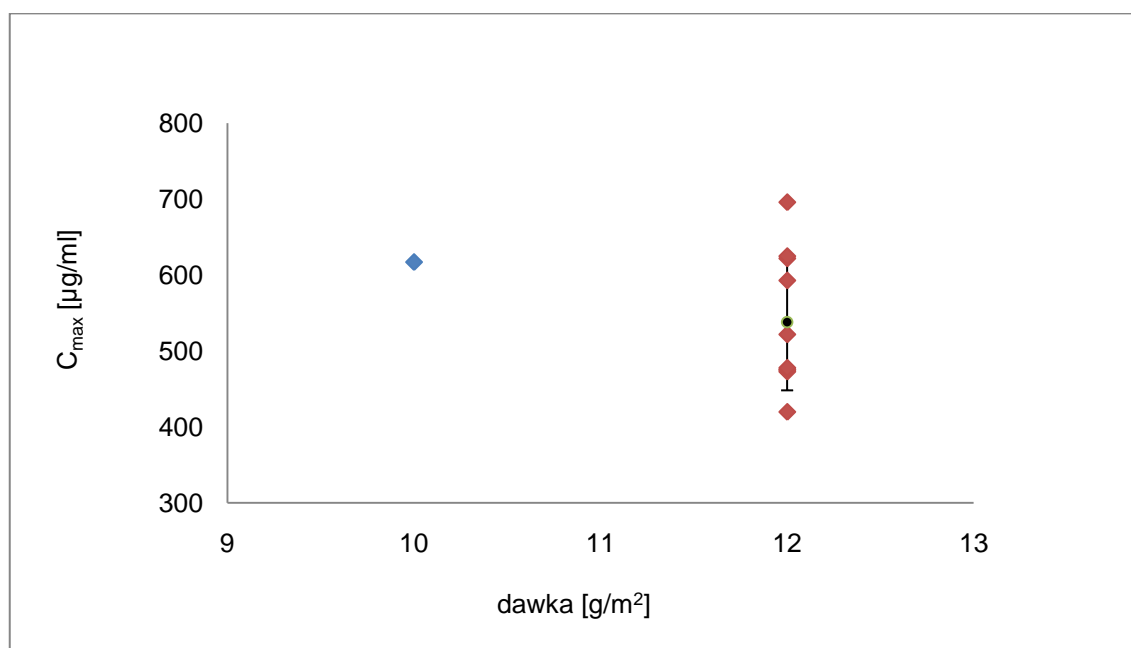


*pacjent po normalizacji dawki

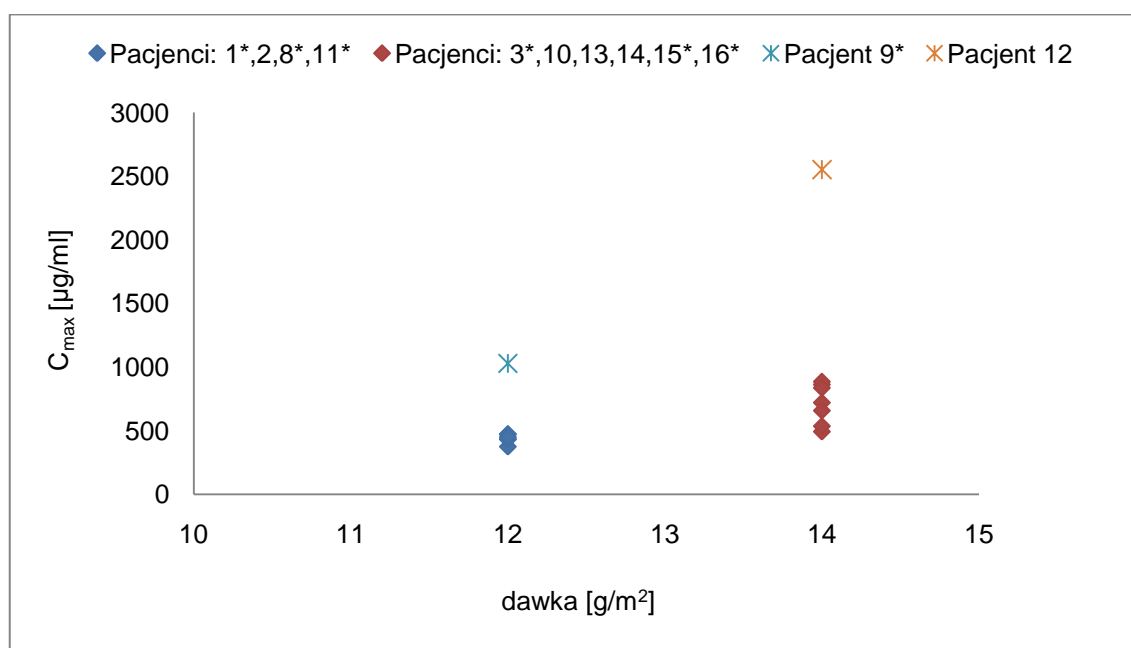
Ryc. 40. Zależność znormalizowanych AUC od deklarowanej dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku), którym podano lek w postaci 2 h wlewu dożylnego.



Ryc. 41. Zależność znormalizowanych AUC od deklarowanej dawki TREO dla 14 pacjentów (24 podania leku), którym podano lek w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego (nie uwzględniono pacjenta 9 i 12).

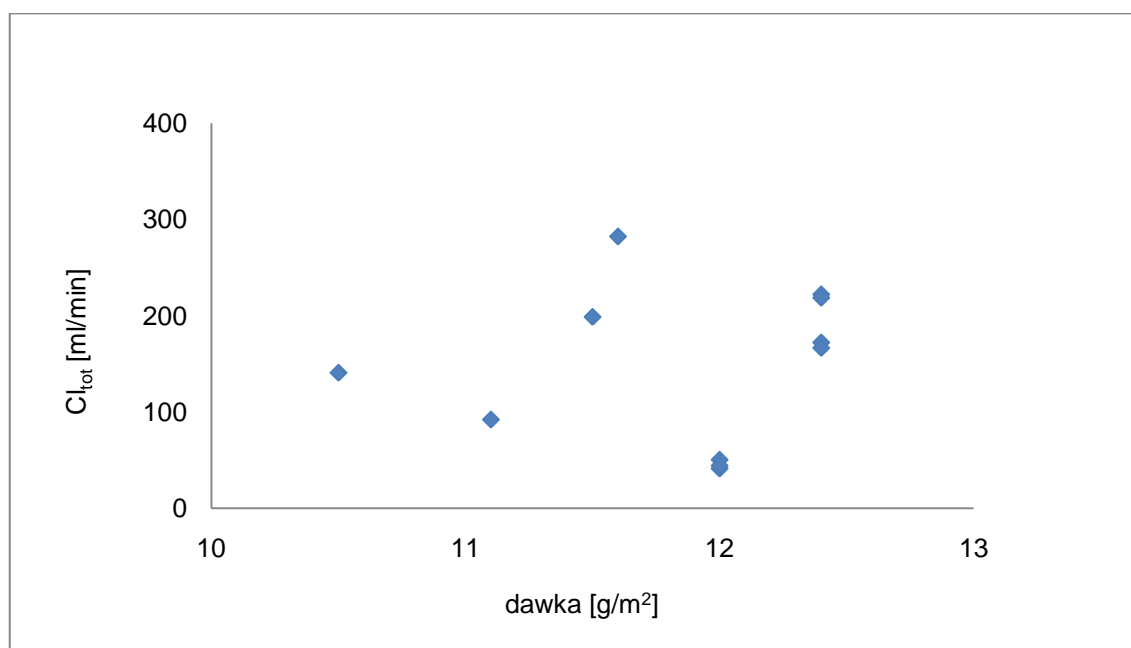
Zależność C_{max} od dawki TREO

Ryc. 42. Zależność znormalizowanych wartości C_{max} od deklarowanej dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku), którym podano lek w postaci 1 h wlewu dożylnego.

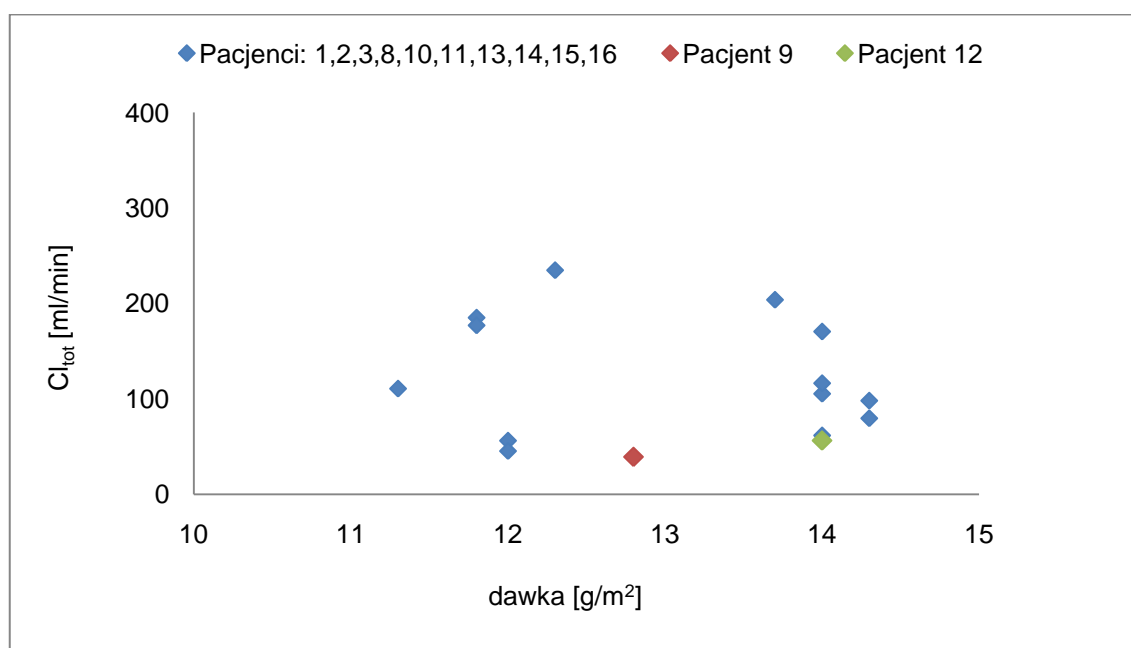


*pacjent po normalizacji dawki

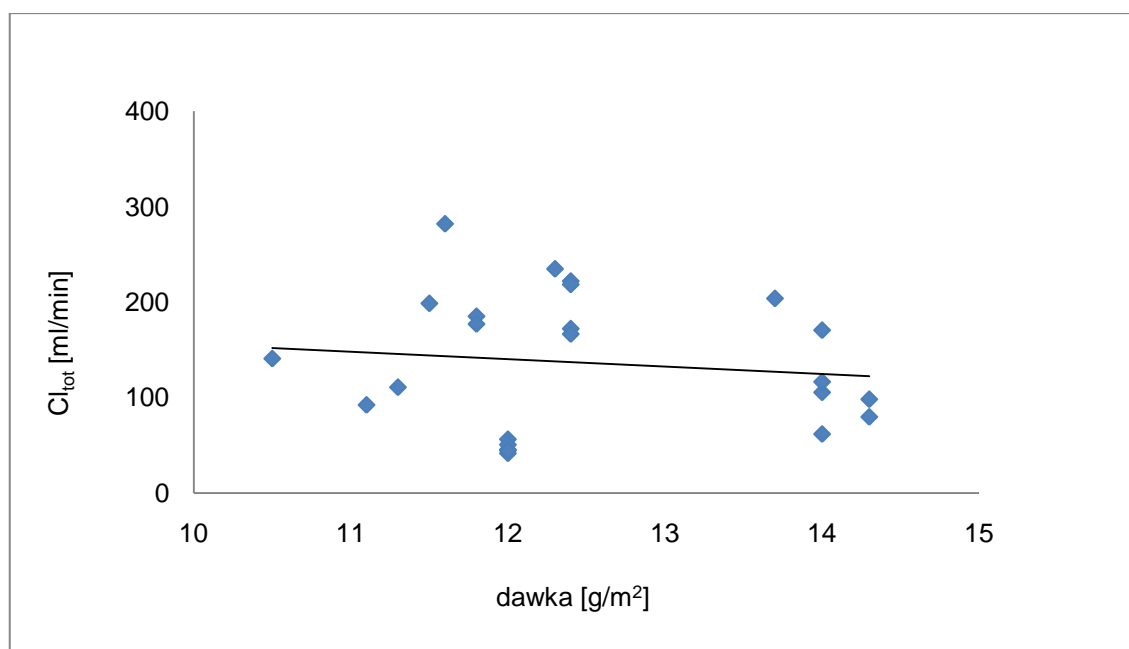
Ryc. 43. Zależność znormalizowanych wartości C_{max} od deklarowanej dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku), którym podano lek w postaci 2 h wlewu dożylnego.

Zależność Cl_{tot} od dawki TREO

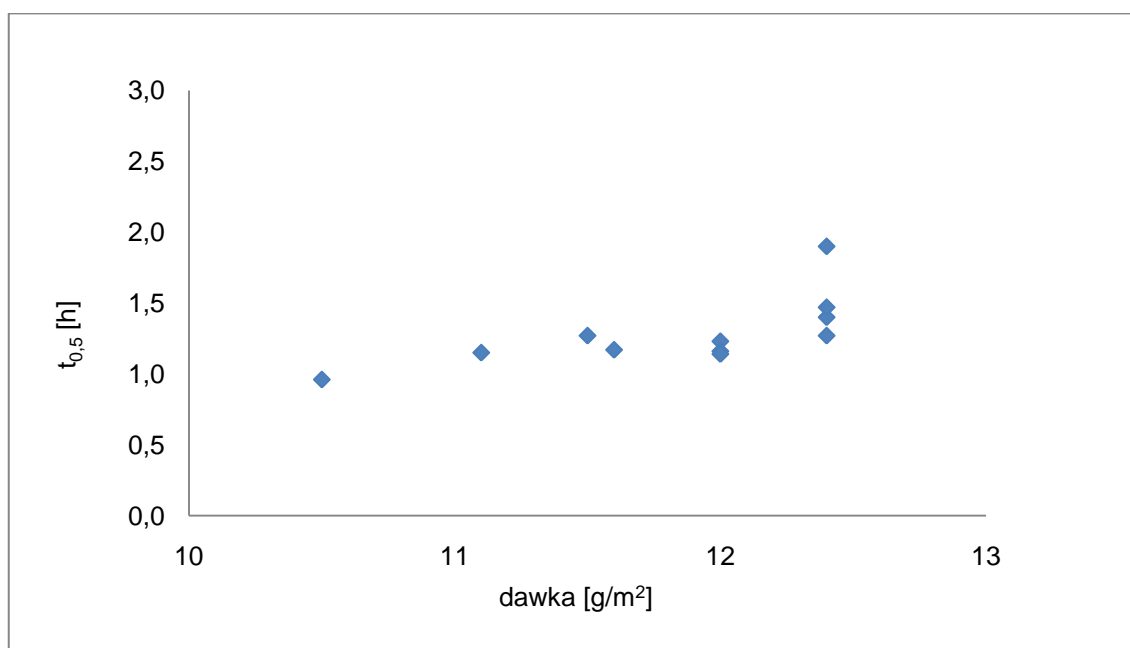
Ryc. 44. Zależność Cl_{tot} od dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku) po podaniu leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.



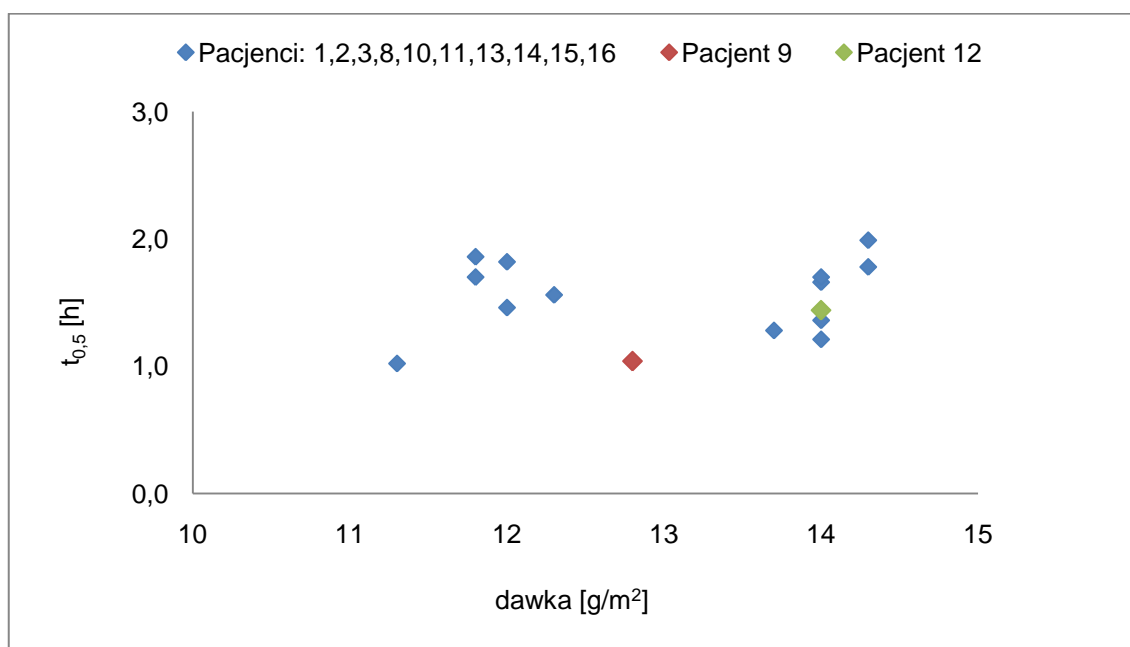
Ryc. 45. Zależność Cl_{tot} od dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku) po podaniu leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.



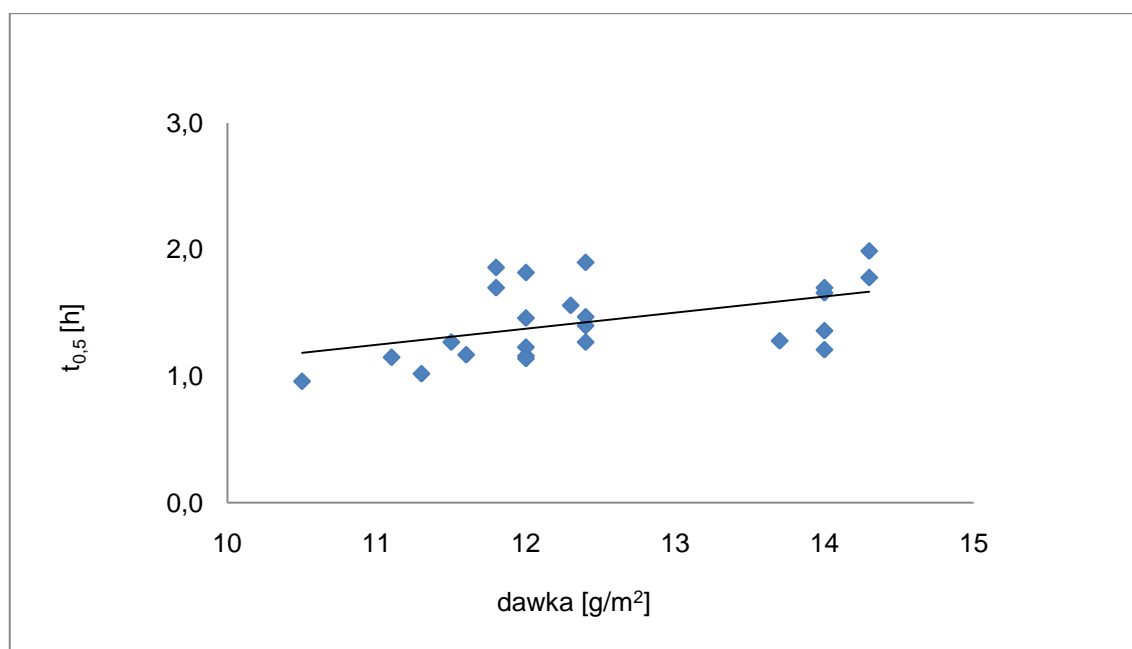
Ryc. 46. Zależność Cl_{tot} od dawki TREO dla 14 pacjentów (24 podania leku) po podaniu leku w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego (nie uwzględniono pacjenta 9 i 12).

Zależność $t_{0,5}$ od dawki TREO

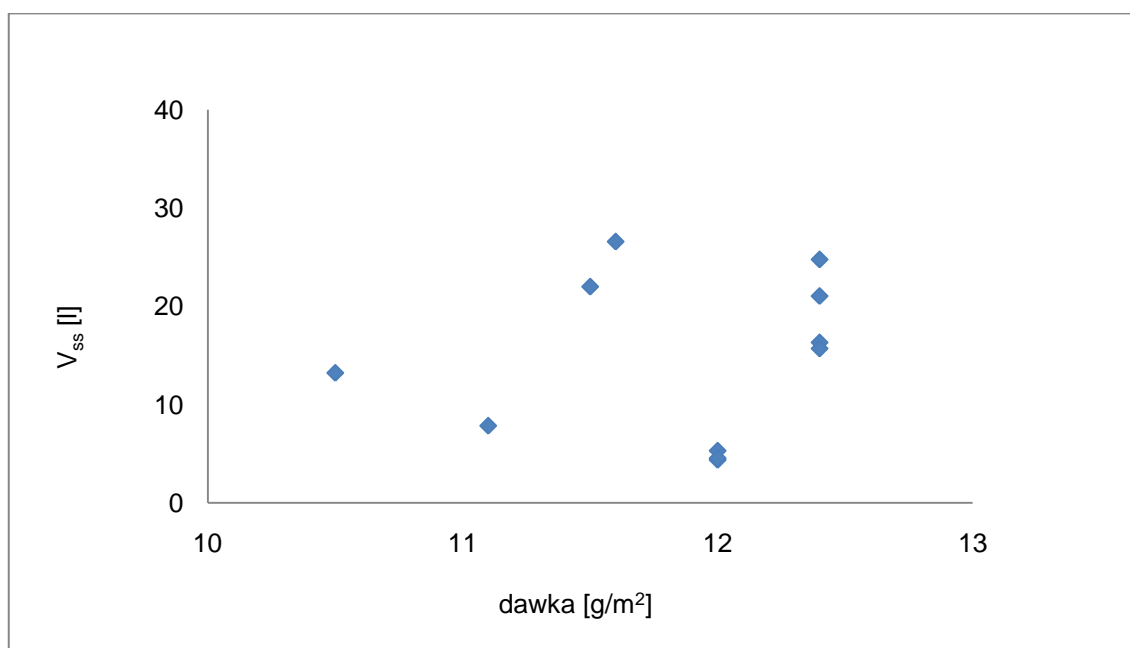
Ryc. 47. Zależność $t_{0,5}$ od dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku) po podaniu leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.



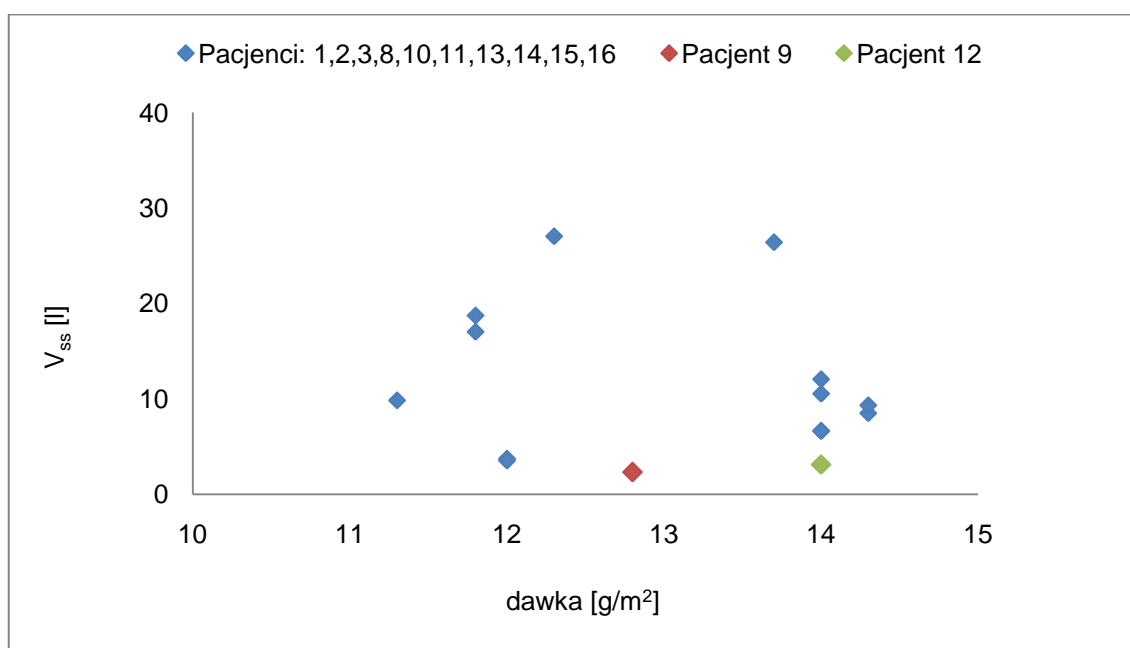
Ryc. 48. Zależność $t_{0,5}$ od dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku) po podaniu leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.



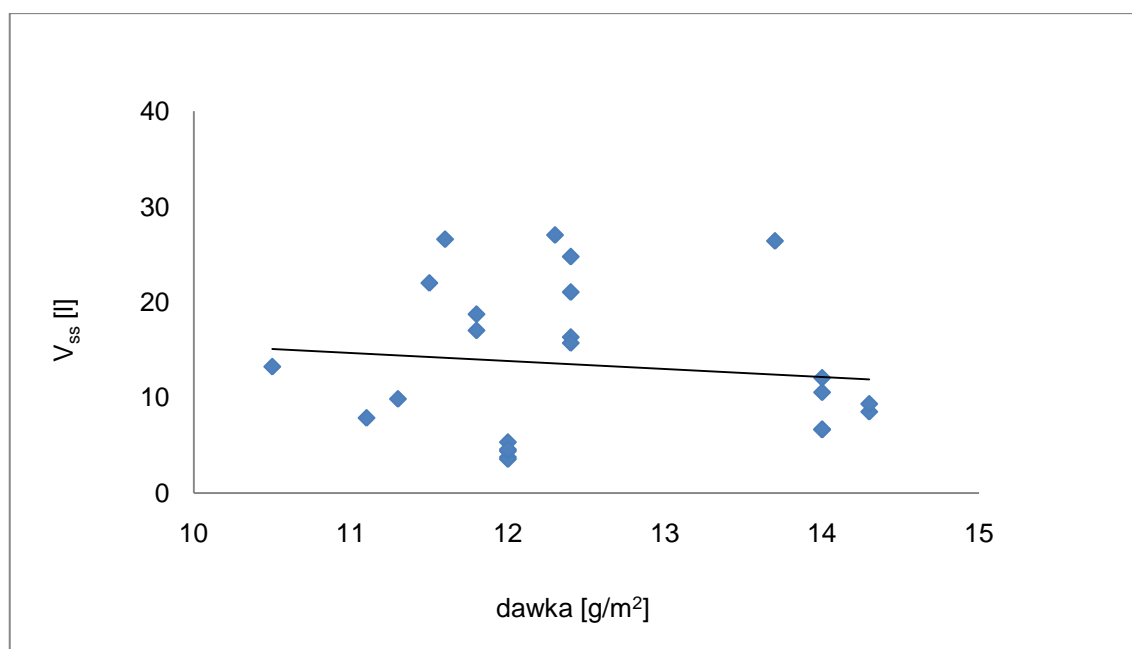
Ryc. 49. Zależność $t_{0,5}$ od dawki TREO dla 14 pacjentów (24 podania leku), którym podano lek w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego (nie uwzględniono pacjenta 9 i 10).

Zależność V_{ss} od dawki TREO

Ryc. 50. Zależność V_{ss} od dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku) po podaniu leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.



Ryc. 51. Zależność V_{ss} od dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku) po podaniu leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.



Ryc. 52. Zależność V_{ss} od dawki TREO dla 14 pacjentów (24 podania leku) po podaniu leku w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego (nie uwzględniono pacjenta 9 i 10).

5.3.3.3 Zestawienie parametrów farmakokinetycznych badanej grupy pacjentów

Parametry farmakokinetyczne TREO w osoczu i moczu po 1 i 2 h wlewie dożylnym u dzieci w terapii mieloablacyjnej poprzedzającej HSCT zestawiono wg deklarowanych dawek: 10 g/m² (wlew 1 h), 12 g/m² (wlew 1 i 2 h) i 14 g/m² (wlew 2 h) (Tab. 55), natomiast w Tab. 56 przedstawiono porównanie parametrów farmakokinetycznych pacjentów, którym podano 12 g/m² TREO w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego. Dodatkowo w Tab. 57 dokonano porównania parametrów farmakokinetycznych pacjentów, którym podano TREO w dawce 12 i 14 g/m². Do oceny statystycznej różnic między parametrami farmakokinetycznymi wykorzystano metodę analizy wariancji (ANOVA), przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Różnice między parametrami farmakokinetycznymi były istotne statystycznie, gdyż wyznaczona wartość testowa $F > F_{kryt}$. W omawianych zestawieniach nie uwzględniono pacjentów 9 i 12 ponieważ wartości C_{max} i AUC odbiegały statystycznie od reszty wyników, co zostało potwierdzone testem Dixona ($\alpha = 0,05$).

Tab. 55. Parametry farmakokinetyczne ($x \pm SD$) pacjentów uzyskane z wszystkich podań TREO dla deklarowanej dawki 10 g/m², 12 g/m² i 14 g/m²

Parametry farmakokinetyczne	Dawka 10 g/m ² (n = 1)	Dawka 12 g/m ² (n = 16)	Dawka 14 g/m ² (n = 7)
	OSOCZE		
C_{max} [μ g/ml]	617	538 \pm 89 (wlew 1 h) 439 \pm 36 (wlew 2 h)	713 \pm 158
$t_{0,5}$ [h]	1,15	1,37 \pm 0,29	1,61 \pm 0,24
V_{ss} [l]	7,9	13,5 \pm 7,8	13,8 \pm 9,1
AUC [h* μ g/ml]	1139	1160 \pm 135	1898 \pm 185
Cl_{tot} [ml/min]	92,2	138 \pm 75	137 \pm 65
MRT [h]	1,41	1,60 \pm 0,19	1,61 \pm 0,42
MOCZ			
k_{ner} [1/h]	0,36	0,38 \pm 0,08*	0,43 \pm 0,11
$t_{0,5}$ [h]	1,92	1,85 \pm 0,35*	1,63 \pm 0,29
Wyeliminowany % dawki	17,57	27,49 \pm 16,79*	31,66 \pm 11,78

* n = 8,

Tab. 56. Porównanie parametrów farmakokinetycznych ($x \pm SD$) pacjentów uzyskanych z wszystkich podań deklarowanej dawki 12 g/m^2 TREO w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego

Parametry farmakokinetyczne	Dawka 12 g/m^2 (n = 10)	Dawka 12 g/m^2 (n = 6)	ANOVA $\alpha = 0,05$
	Wlew 1 h	Wlew 2 h	
C_{\max} [$\mu\text{g/ml}$]	538 ± 89	439 ± 36	S, $p = 0,023$
$t_{0,5}$ [h]	$1,29 \pm 0,25$	$1,51 \pm 0,34$	NS
V_{ss} [l]	$15,38 \pm 8,39$	$12,59 \pm 6,40$	NS
AUC [$\text{h} \cdot \mu\text{g/ml}$]	1151 ± 124	1175 ± 163	NS
Cl_{tot} [ml/min]	153 ± 83	113 ± 58	NS
MRT [h]	$1,67 \pm 0,12$	$1,47 \pm 0,23$	S, $p = 0,031$

Tab. 57. Porównanie parametrów farmakokinetycznych ($x \pm SD$) pacjentów uzyskanych z wszystkich podań deklarowanej dawki 12 g/m^2 i 14 g/m^2 TREO

Parametry farmakokinetyczne	Dawka 12 g/m^2 (n = 16)	Dawka 14 g/m^2 (n = 7)	ANOVA $\alpha = 0,05$
	OSOCZE		
C_{\max} [$\mu\text{g/ml}$]	538 ± 89 (wlew 1 h) 439 ± 36 (wlew 2 h)*	- 713 ± 158	S, $p = 0,001$
$t_{0,5}$ [h]	$1,37 \pm 0,29$	$1,61 \pm 0,24$	NS
V_{ss} [l]	$13,5 \pm 7,8$	$13,8 \pm 9,1$	NS
AUC [$\text{h} \cdot \mu\text{g/ml}$]	1160 ± 135	1898 ± 185	S, $p = 0,00054$
Cl_{tot} [ml/min]	138 ± 75	137 ± 65	NS
MRT [h]	$1,60 \pm 0,19$	$1,61 \pm 0,42$	NS
MOCZ			
k_{ner} [1/h]	$0,38 \pm 0,08^*$	$0,43 \pm 0,11$	NS
$t_{0,5}$ [h]	$1,85 \pm 0,35^*$	$1,63 \pm 0,29$	NS
Wyeliminowany % dawki	$27,49 \pm 16,79^*$	$31,66 \pm 11,78$	NS

*n = 8

6 OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

TREO - związek alkilujący zsyntezowany w 1961 roku przez P. Feita, wykazuje szeroki zakres działania przeciwnowotworowego [44,45]. Jest zarejestrowany i stosowany w terapii II rzutu lub terapii paliatywnej zaawansowanego platynoopornego raka jajnika [4,5,102-105]. Jego dobry efekt mieloablacyjny, niska toksyczność narządowa a w przypadku chorób rozrostowych dobry efekt przeciwnowotworowy powodują, że TREO stał się interesującym lekiem do włączenia w procedurę kondycjonowania, jako główna składowa mieloablacyjna. Po raz pierwszy TREO został zastosowany u dzieci w 2000 r. przez zespół prof. Jacka Wachowiaka w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wyniki pierwszych prób polskich ośrodków transplantacyjnych, zaprezentowane na 29th Annual Meeting of the EBMT w Istambule, wskazywały na konieczność zwiększenia dawki całkowitej TREO oraz potrzebę oceny jego farmakokinetyki [43].

Celem niniejszej pracy była ocena farmakokinetyki TREO w osoczu i moczu dzieci w terapii mieloablacyjnej poprzedzającej HSCT. Dostępne w piśmiennictwie specjalistycznym wstępne badania farmakokinetyki TREO u pacjentów pediatrycznych prowadzone były przez zespół prof. Franciszka Główki [10]. Włączenie do badań kolejnych pacjentów pozwoli na poszerzenie wiedzy na temat farmakokinetyki TREO u dzieci i w zamierzeniu przyczyni się do optymalizacji dawki. Dotychczas stosowane dawki u dzieci oparte są na danych uzyskanych od dorosłych pacjentów. Badania prowadzono we współpracy z Kliniką Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej UM w Poznaniu. Brak rejestracji leku w Polsce powoduje, że ilość transplantacji szpiku z wykorzystaniem TREO u dzieci jest mocno ograniczona. Fakt ten w powiązaniu z licznymi trudnościami w pobieraniu próbek krwi i moczu u najmniejszych pacjentów, spowodował potrzebę nawiązania współpracy z dodatkowym ośrodkiem klinicznym, który również wykorzystuje procedurę kondycjonowania z wykorzystaniem TREO - Katedrą i Kliniką Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Część wyników badań farmakokinetyki TREO u pacjentów pediatrycznych z moim udziałem została opublikowana w Bone Marrow Transplantation [183] i Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis [187].

Badania farmakokinetyki TREO u pacjentów pediatrycznych prowadzone były również przez Beier i wsp. a wyniki zaprezentowane zostały po zakończeniu moich

badania, tj. podczas 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation w Genewie w 2012 r. [11].

TREO jest pro-lekiem i ulega transformacji do aktywnych pochodnych epoksydowych po wprowadzeniu do krążenia ustrojowego na drodze nieenzymatycznej. Jak wynika z danych literaturowych, przemiana ta jest zależna jedynie od pH i temperatury środowiska [57]. Aby zapobiec tworzeniu aktywnych metabolitów poza ustrojem, natychmiast do każdej zebranej od pacjenta próbki krwi i moczu dodawano 50 μ l roztworu 1 mol/l kwasu cytrynowego na 1 ml krwi/moczu. Taka ilość kwasu cytrynowego gwarantuje uzyskanie pH próbki 5,5, w którym dochodzi do zatrzymania procesu transformacji TREO do pochodnych epoksydowych: S,S-EBDM i S,S-DEB [57,58].

Do oznaczenia poziomów TREO w osoczu i moczu przystosowano wcześniej opracowaną metodę HPLC z detektorem refraktometrycznym [10]. W zmodyfikowanej przeze mnie metodzie zastosowano próbki do ultrafiltracji osocza o innej budowie niż poprzednio stosowane oraz zmniejszono objętości z 500 μ l do 350 μ l próbki moczu do analizy. Z tego względu, przed przystąpieniem do oznaczania TREO w próbkach klinicznych przeprowadzono walidację metody. Krzywe wzorcowe w osoczu i moczu były liniowe w badanym zakresie stężeń: 10,0 – 2000,0 μ g/ml i 62,5 – 10000,0 μ g/ml (odpowiednio dla osocza i moczu) o czym świadczy współczynnik korelacji r bliski jedności (Tab. 9 i 15). Liniowość potwierdzono testem Mandela, w którym wartość testowa (TV) była zawsze mniejsza od F_{kryt} (osocze: 0,36 < 21,19, moc: 2,14 < 21,19). Wartości współczynników regresji b nie różniły się istotnie od zera, dlatego przyjęto równanie $y = ax$ dla prostych przechodzących przez początek układu współrzędnych. Krzywe wzorcowe obejmowały zakresy stężeń TREO w osoczu i moczu przewidywane po podaniu dożylnym dawki 10 - 14 g/m^2 . Wyznaczone równania krzywych wzorcowych wykorzystano do obliczenia stężeń TREO w osoczu i moczu. Granica wykrywalności metody wyznaczona dla analitu w osoczu wynosiła 5,0 μ g/ml przy stosunku wysokości piku do wysokości linii szumu detektora (S/N) 3:1, natomiast dla moczu 12,5 μ g/ml przy (S/N) 2:1. LOQ oznaczone z odpowiednią precyzją i dokładnością wynosiło 10,0 i 62,5 μ g/ml, odpowiednio dla osocza i moczu. Ponadto metoda jest odpowiednio dokładna (błąd oznaczeń w zakresie 0,04 – 13,97 %) i precyzyjna (Wz w zakresie 0,93 – 13,06 %) (Tab. 11 i 17). Odzysk TREO był stosunkowo wysoki i mieścił się w zakresie 75 – 76 % przy Wz poniżej 5,93 % (Tab. 12). Odzysk był znacznie większy w porównaniu z wcześniejszymi badaniami (40-48 %) [10] dzięki zastosowaniu próbek do ultrafiltracji charakteryzujących się inną lokalizacją wewnętrznych filtrów, zapobiegając w ten sposób ich zatykaniu się. Zbadano również stabilność TREO, podczas trzykrotnego procesu zamrażania i rozmrażania próbek osocza i moczu. Oznaczone stężenia TREO z wysoką

precyzją ($Wz \leq 3,46 \%$) i dokładnością (błąd oznaczeń $\leq 2,21 \%$) potwierdzają trwałość analitu w opisanych warunkach przechowywania (Tab. 13 i 18). Metoda jest odpowiednio dokładna, precyzyjna, selektywna i spełnia wymagania stawiane metodom analitycznym, przeznaczonym do oznaczania leków w płynach biologicznych.

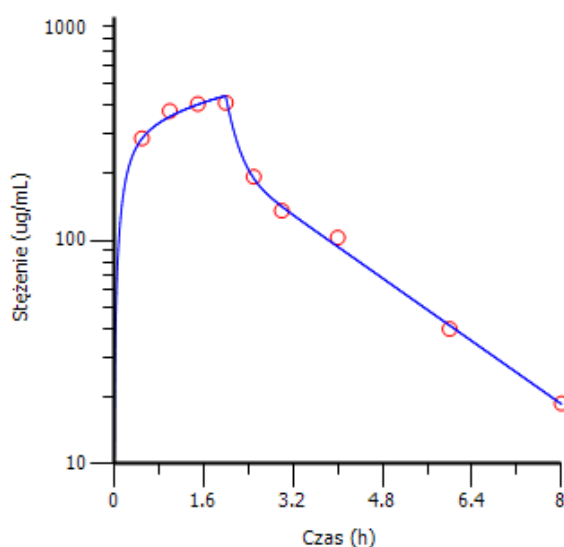
Zwalidowaną metodę HPLC oznaczania TREO w osoczu i moczu zastosowano w badaniach farmakokinetycznych u 16 pacjentów pediatrycznych (4 dziewczynek i 12 chłopców) z różnymi chorobami nowotworowymi i nienowotworowymi (Tab. 7). Pacjentom w wieku od 5 mies. do 18 r. ż. (mediana 7,5 lat), podawano TREO w postaci 1 lub 2 h wlewu dożylnego przez trzy kolejne dni terapii, w odstępach 24 godzinnych. W zależności od wskazań lekarskich i stanu zdrowia chorego, zbiórka krwi i moczu prowadzona była w jednym, dwóch lub trzech kolejnych dniach podawania TREO. Rzeczywiste dobowe dawki TREO podane pacjentom mieściły się w zakresie 3 – 21 g i w oparciu o wskaźnik BSA (Body Surface Area) wynosiły $10,5 \text{ g/m}^2$ – $14,3 \text{ g/m}^2$. Deklarowane sumaryczne dawki podawane przez 3 kolejne dni terapii wynosiły 30 g/m^2 ($3 \times 10 \text{ g/m}^2$), 36 g/m^2 ($3 \times 12 \text{ g/m}^2$) oraz 42 g/m^2 ($3 \times 14 \text{ g/m}^2$) (Tab. 6). U tych pacjentów, u których rzeczywiste dobowe dawki TREO były różne od deklarowanych (10 , 12 i 14 g/m^2) przeprowadzono normalizację dawki, co pozwoliło to na porównanie poziomów oznaczeń TREO w zależności od zastosowanej dawki. Uzyskane parametry farmakokinetyczne TREO, z wyjątkiem AUC i C_{\max} , obliczono z oznaczonych poziomów TREO w materiale biologicznym. Natomiast wartości AUC_{ozn} i $C_{\max \text{ ozn}}$ znormalizowano do deklarowanej dawki leku (AUC i C_{\max}). Pozwoliło to na porównanie parametrów farmakokinetycznych w obrębie badanej grupy pacjentów a także odniesienie ich do prac innych autorów. Takie postępowanie stosowano również w innych publikacjach dotyczących TREO i VP-16 [3,185,186].

Harmonogram zbiórek krwi i moczu pacjentów obejmował 12 h przedziały czasowe. Częstotliwość pobrań próbek osocza od pacjentów zależała od tego, czy próbki pobierane były tylko jednego dnia czy przez dwa lub trzy kolejne dni terapii. W celu zminimalizowania utraty krwi u najmniejszych pacjentów, zmodyfikowano harmonogram zbiórek próbek osocza poprzez ograniczenie punktów czasowych do niezbędnego, wymaganego minimum. Liczba próbek moczu w danym przedziale czasowym uzależniona była od liczby mikcji.

Wartości oznaczonych stężeń TREO uzyskanych w osoczu poddano normalizacji do deklarowanej dawki 10 g/m^2 (Tab. 19 i 20), 12 g/m^2 (Tab. 21, 22, 23, 24) oraz 14 g/m^2 (Tab. 25 i 26). Zmiany stężeń TREO dla poszczególnych dawek zostały zilustrowane na Ryc. 11 (10 g/m^2), Ryc. 12 i 13 (12 g/m^2) oraz Ryc. 14 (14 g/m^2). Zaobserwowano znaczne różnice w przebiegu zmian stężeń TREO między poszczególnymi pacjentami. Zmiany średnich stężeń TREO po podaniu deklarowanych dawek przedstawiono

na Ryc. 15 i 16. Omawiając poziomy stężenie TREO u dzieci należy wspomnieć o utrudnieniach w zbiórce krwi u niektórych najmniejszych pacjentów. Trudności te wynikały z ich naturalnej aktywności ruchowej. Dość często zapychał się cewnik żyły podobojczykowej, który wymagał przepłukiwania płynem fizjologicznym.

Zmiany stężeń TREO w osoczu najlepiej opisuje otwarty model dwukompartментowy, a fazy dystrybucji i eliminacji przebiegają zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu [4,5,6]. Przebieg zmian stężenia TREO po zakończeniu dwugodzinnego wlewu z wyraźną fazą dystrybucji i eliminacji przedstawiono na Ryc. 53.



Ryc. 53. Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 11 po podaniu 13 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego, uzyskany w programie WinNonlin 6.2.

Obserwowano wzrost wartości AUC wraz z podaną dawką leku (Ryc. 41). Wskazuje to na liniowy charakter farmakokinetyki TREO i jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi [3,4,6]. Należy zaznaczyć, że wskazane publikacje dotyczą badań farmakokinetyki TREO u pacjentów dorosłych. Uzyskane z badań u dzieci wartości AUC wzrastają wraz z dawką i wynoszą: 1139 h*µg/ml dla 10 g/m² (1 podanie TREO), 1160 h*µg/ml dla 12 g/m² (średnia uzyskana z 16 podań TREO u 7 pacjentów) i 1898 h*µg/ml dla 14 g/m² (średnia uzyskana z 7 podań TREO u 6 pacjentów) (Tab. 55). W porównaniu z wcześniej uzyskanymi wynikami u dzieci [10], AUC dla dawki 12 g/m² jest nieznacznie mniejsze (1390 h*µg/ml), natomiast dla 10 g/m² jest wyraźnie większe (735 h*µg/ml). Należy jednak dodać, iż zarówno we wcześniejszych jak i obecnych badaniach tylko jeden pacjent otrzymywał TREO w dawce 10 g/m². Trzeba też zauważyć,

że uzyskane wartości AUC pacjentów pediatrycznych poddanych terapii TREO przed HSCT były wyższe od danych literaturowych uzyskiwanych u dorosłych pacjentów przy zastosowaniu tych samych dawek: 10 g/m^2 - $940 \text{ h} \cdot \mu\text{g/ml}$ [4], 12 g/m^2 - $898 \text{ h} \cdot \mu\text{g/ml}$ i 14 g/m^2 - $1104 \text{ h} \cdot \mu\text{g/ml}$ [3]. Można to wytłumaczyć lepiej funkcjonującym mechanizmem obronnym u dorosłych niż u dzieci. Podobną tendencję zaobserwowano w badaniach prowadzonych przez Beier i wsp., gdzie uzyskano wyższe wartości AUC u noworodków po dawce $3 \times 12 \text{ g/m}^2$ (AUC = $2203 \text{ mg} \cdot \text{h/l}$) niż u starszych dzieci po większej dawce $3 \times 14 \text{ g/m}^2$ (AUC = $1507 \text{ mg} \cdot \text{h/l}$) [11].

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach zauważyłem, że C_{\max} również wzrasta wraz z podaną dawką (12 g/m^2 , 14 g/m^2) za wyjątkiem najmniejszej dawki 10 g/m^2 , zastosowanej tylko u jednego pacjenta (Ryc. 42 i 43). Średnie wartości C_{\max} dla 2 h podania TREO we wlewie wynosiły $439 \mu\text{g/ml}$ (12 g/m^2) i $713 \mu\text{g/ml}$ (14 g/m^2). Skrócenie czasu trwania wlewu u pacjentów przyjmujących TREO w dawce 12 g/m^2 do 1 h powoduje podwyższenie C_{\max} do $538 \mu\text{g/ml}$ (Tab. 55 i 56). Natomiast biologiczny okres półtrwania fazy eliminacji leku uzyskany w badaniach próbek osocza dzieci był porównywalny w całym przedziale stosowanych dawek, a średnie jego wartości były w zakresie 1,15 – 1,61 (Ryc. 47-49). $T_{0,5}$ nie zależy więc od podanej dawki leku, co także potwierdza liniowy charakter farmakokinetyki TREO. Uzyskane wyniki są porównywalne z wcześniej opublikowanymi pracami u dorosłych pacjentów [3,4,6]. Cl_{tot} był w zakresie 39 - 282 ml/min i wykazywał znaczną zmienność międzyosobniczą, niezależnie od podanej dawki leku i czasu trwania wlewu (Ryc. 44-46). Podobnie, wyznaczona V_{ss} wykazuje znaczną zmienność wyników i mieści się w granicach 2,3 – 27 l (Ryc. 50-52).

U dwóch pacjentów, którym podano TREO w deklarowanej dawce 12 g/m^2 (pacjent 9) i 14 g/m^2 (pacjent 12), zaobserwowano bardzo wysokie wartości AUC wynoszące odpowiednio 2390 i 5929 $\text{h} \cdot \mu\text{g/ml}$, które znacznie odbiegają od wartości uzyskanych u pozostałych dzieci. Spowodowane to było najprawdopodobniej upośledzonym wydalaniem leku z ustroju o czym może świadczyć niska wartości Cl_{tot} (pacjent 9 – 2,4 l/h, pacjent 12 – 3,4 l/h). U tych osób zaobserwowano również bardzo wysokie poziomy C_{\max} , które wynosiły 1029 i 2552 $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio dla pacjenta 9 i 12. Zastosowanie wysokiej dawki TREO tak jak w przypadku pacjenta 12 (14 g/m^2) w powiązaniu z ograniczoną możliwością buforowania przez fizjologiczny bufor krwi może prowadzić do kwasicy metabolicznej [62]. Tłumaczyć to można zwiększonym uwalnianiem mocnego kwasu metanosulfonowego, który powoduje zakwaszenie środowiska krwi [6]. Obniżenie pH powoduje zahamowanie transformacji TREO do mono i diepoksydu, reakcji zależnej od pH środowiska. Może prowadzić to do zwiększenia poziomów TREO we krwi, co przekłada się na wzrost wartości AUC. Warto jednak zaznaczyć, że tak wysokie AUC pacjenta 12 może być także wynikiem powtarzalnego błędu ludzkiego, który mógł

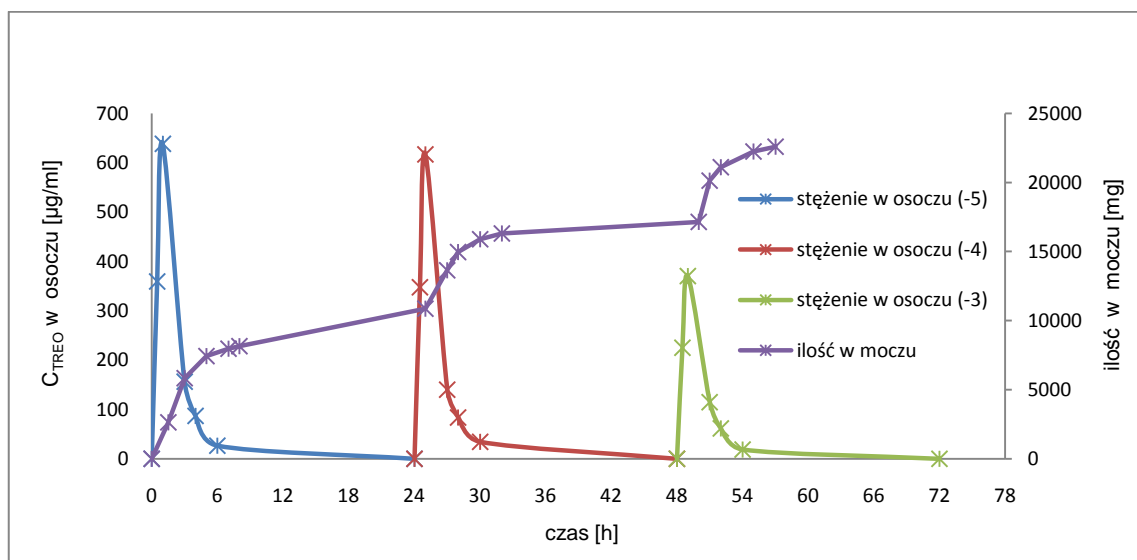
polegać np. na nie odciążeniu dostatecznie dużej ilości krwi przed właściwą zbiórką do probówki, która była poddana dalszej analizie farmakokinetycznej. Cechą bowiem cewnika żyły podobojczykowej typu Seldingera jest możliwość wykonania zarówno wlewu leku jak i zbiórki krwi korzystając z jednego dostępu naczyniowego. Najbardziej jednak przekonującym wytłumaczeniem bardzo wysokich poziomów stężeń TREO i związanych z tym dużych wartości AUC u pacjentów 9 i 12 wydaje się być niewydolność narządowa. W karcie pacjenta 12 wskazano na liczne wcześniejsze narządowe powikłania toksyczne po zastosowaniu chemioterapii. Warto zauważyć, że podane dawki TREO były w górnym zakresie stosowanych dawek, tj. $3 \times 14 \text{ g/m}^2$. Wyrazem zmniejszonej funkcji nerek jest niska wartość klirensu kreatyniny. U tego pacjenta zaobserwowano obniżenie Cl_{kreat} z poziomu 90 do 50 ml/min na 1 dzień przed rozpoczęciem kondycjonowania, natomiast u 2 letniego pacjenta 9 prawdopodobnie nie wykonano badania, bądź zapisu (brak danych w karcie pacjenta). U pacjenta 9 czynnikiem ryzyka powikłań toksycznych był bardzo młody wiek, w którym obserwowana jest niska aktywność narządowa (nerki, wątroba), czego dowodem są wyniki badań farmakokinetyki TREO u noworodków i dzieci starszych uzyskane przez zespół dr Beier [11]. Test Dixona potwierdził, że wartości AUC i C_{max} pacjentów 9 i 12 odbiegają od wyników badanej grupy, stąd nie zostały one uwzględnione w dalszych obliczeniach statystycznych.

Oznaczone w moczu pacjentów poziomy TREO w poszczególnych przedziałach czasowych poddano normalizacji do dawki 10 g/m^2 (Tab. 28), 12 g/m^2 (Tab. 31 i 34) oraz 14 g/m^2 (Tab. 37). Zaobserwowano, że skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu deklarowanych dawek, wykazują znaczny rozrzut wyników (Ryc. 22-25). Indywidualne ilości leku wyeliminowanego z moczem były w przedziale 1,11 – 9,06 g, a wyeliminowany % podanej dawki leku mieścił się w zakresie 8,53 - 49,55 % i uzależniony był od prawidłowego funkcjonowania nerek (Ryc. 21 i 22).

Średnie ilości wyeliminowanego z moczem leku, przedstawione jako % podanej dawki wyniosły: 17,57 % (10 g/m^2), 27,49 % (12 g/m^2) i 31,66 % (14 g/m^2), z tego około 95 % leku zostało wydalone w pierwszych 6 h od podania TREO (Tab. 55). Uzyskane wyniki są porównywalne z danymi literaturowymi u pacjentów dorosłych, które zostały zebrane w Tab. 3 [3,4,6]. Warto zauważyć jednak, że ilość TREO wyeliminowana z moczem pacjenta 12 nie odbiegała znacznie od innych pacjentów przyjmujących podobną dawkę i wynosiła 41% podanej dawki leku, z tego 90 % leku zostało wydalone w pierwszych 6 h od rozpoczęcia wlewu (Tab. 50). Stąd też, trudno jest jednoznacznie ocenić przyczyny tak wysokich wartości AUC pacjenta 12. Średnie wartości $t_{0,5}$, uzyskane w badaniach próbek moczu pacjentów były podobne do wyników uzyskanych z próbek osocza tychże dzieci i wyniosły: 1,92 h (10 g/m^2), 1,85 h (12 g/m^2) i 1,63 h (14 g/m^2) (Tab. 55). Należy więc stwierdzić, że zarówno $t_{0,5}$, V_{ss} , Cl_{tot} jak i ilość wyeliminowanego

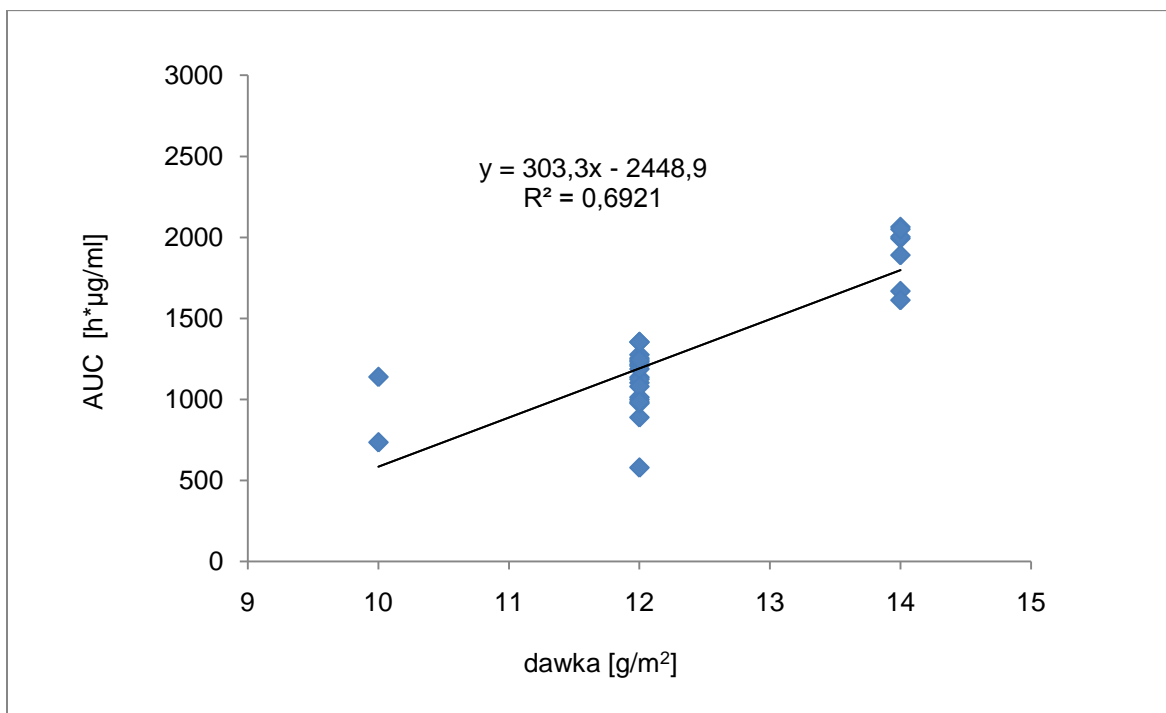
leku z moczem nie zależą od dawki leku ani czasu trwania wlewu. Podobne spostrzeżenia wysunęli inni autorzy, na podstawie wyników badań farmakokinetyki TREO u pacjentów dorosłych [3,4,6-9]. Ponadto, wydłużenie czasu wlewu z 1 h do 2 h nie zmienia znacznie AUC u pacjentów przyjmujących dawkę 12 g/m² (Ryc. 39 i 40). Obserwacja jest zgodna z wynikami prac Hilgera i wsp. [4].

Analiza parametrów farmakokinetycznych TREO po podaniu wielokrotnych dawek w dwóch lub trzech kolejnych dniach terapii prowadzona była u 6 pacjentów. Dowodzi ona, że wartości AUC, C_{max}, MRT, t_{0,5}, V_{ss}, Cl_{tot} nie zmieniają się w sposób znaczący między dniami (Tab. 41,43-45). Wynika z tego też, że dawkowanie wielokrotne TREO nie prowadzi do jego kumulacji ani przyspieszonej eliminacji (Ryc. 54). Dlatego też, parametry farmakokinetyczne obliczono z każdego dobowego profilu zmian stężenia leku we krwi, traktowanego jako niezależne podanie TREO. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w pracach Beelena i wsp., które dotyczą jednak tylko pacjentów dorosłych [3,9].



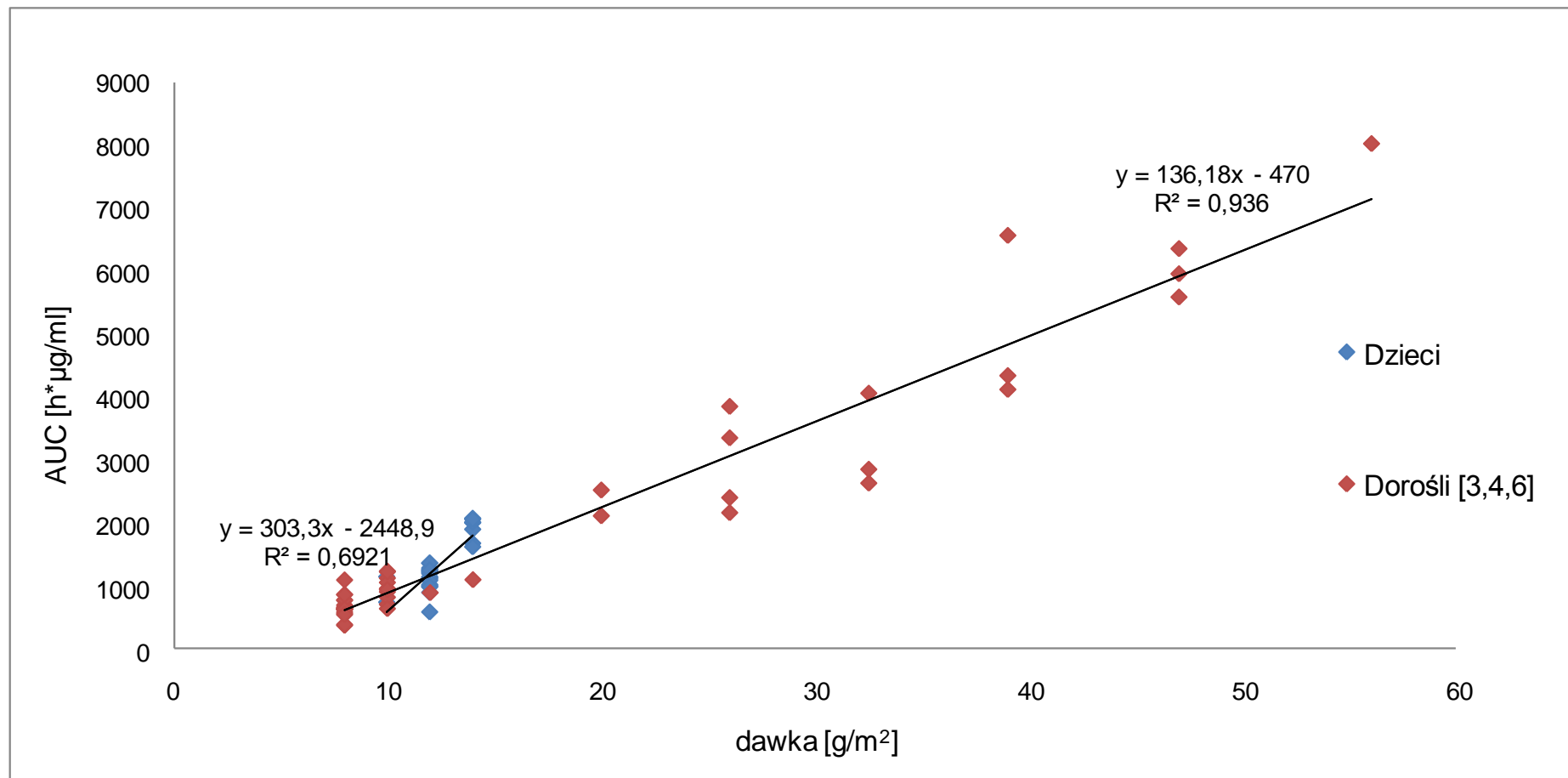
Ryc. 54. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu oraz ilość wyeliminowanego TREO z moczem u pacjenta 5, po podaniu 17 g (-5, -4) i 16 g (-3) leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.

Zebrane wartości AUC uzyskane na podstawie zmian stężenia TREO w osoczu u dzieci przechodzących leczenie mieloablacyjne przed HSCT w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2004-2006 [10] i 2007-2011, a także w Katedrze i Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w latach 2009-2011 przedstawione na Ryc. 55, wskazują na liniową farmakokinetykę TREO.



Ryc. 55. Zależność AUC od dawki TREO u pacjentów pediatrycznych przechodzących leczenie mieloablacyjne przed HSCT (n=28 podań TREO we wlewie).

Wyniki badań farmakokinetyki TREO u dzieci będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej oraz wcześniejsze wyniki zespołu prof. Głównki wskazują na liniowy charakter farmakokinetyki i są porównywalne w tym względzie z wynikami prac autorów badających farmakokinetykę TREO u dorosłych pacjentów [3,4,6-10,183] (Ryc. 56). Warto jednak zauważyć, iż opublikowane prace farmakokinetyki TREO u pacjentów dorosłych obejmują znacznie szerszy zakres stosowanych dawek (8 – 56 g/m²) niż dawki używane u dzieci. Zwraca uwagę też fakt, że w przypadku dzieci, zmiany zależności AUC=f(dawka) przebiegają z większym nachyleniem (a=303,3) niż u dorosłych (a=136,18), co wskazuje na większą podatność młodego organizmu na podaną dawkę leku i związane z tym większe ryzyko wystąpienia objawów ubocznych. Zastanawiającym jest też fakt występowania ujemnych wartości przecięcia wykresu z osią rzędną i większy u dzieci (b=-2448,9) niż u dorosłych (b=-470) (Ryc. 56). Może to wskazywać na nie do końca zasadne twierdzenie o liniowym charakterze farmakokinetyki TREO. Wymaga to jednak przeprowadzenia oceny profili farmakokinetycznych TREO przy zastosowaniu niższych dawek leku niż obecnie analizowane.



Ryc. 56. Porównanie zależności AUC od dawki TREO dla pacjentów pediatrycznych i dorosłych, którzy otrzymywali lek w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego.

7 WNIOSKI

1. Obserwowana zmienność międzysobnicza parametrów farmakokinetycznych, uzyskanych na podstawie zmian stężenia treosulfanu we krwi jak i ilości wyeliminowanego leku z moczem u dzieci poddanych leczeniu mieloablacyjnemu przed przeszczepem komórek hematopoetycznych, wskazuje na potrzebę ustalania indywidualnego schematu podawania treosulfanu uwzględniającego wiek, stan fizjologiczny narządów oraz ich powikłania po stosowanej chemioterapii.
2. Ustalając farmakoterapię treosulfanem u dzieci należy uwzględnić większą ich podatność na zmiany farmakokinetyki tego leku niż u dorosłych.
3. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na liniowy charakter farmakokinetyki treosulfanu u dzieci.
4. Dawkowanie wielokrotne, przy podaniu tej samej dawki treosulfanu w kolejnych dniach, nie wpływa na zmianę jego farmakokinetyki. Można więc uzyskać miarodajne parametry farmakokinetyczne do ustalenia optymalnego schematu dawkowania już przy jednokrotnym podaniu i jednocześnie obniżyć uciążliwość prowadzonych badań, szczególnie doświadczanych przez leczone dzieci.
5. Stosowana metoda HPLC z detekcją refraktometryczną oznaczania treosulfanu w osoczu i moczu spełnia kryteria walidacyjne dla metod przeznaczonych do oznaczania leków w płynach ustrojowych

8 STRESZCZENIE

Transplantacja komórek krwiotwórczych, która znajduje zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych u dzieci, poprzedzona jest kondycjonowaniem biorcy. Pozwala to na nieodwracalne zniszczenie „chorego” szpiku i daje szansę usunięcia wszystkich rezydualnych komórek nowotworowych wrażliwych na leczenie. Ponieważ najwyższym ryzykiem powikłań obarczone są dzieci, poszukuje się takiego kondycjonowania, które charakteryzowałoby się odpowiednim efektem mieloablacyjnym, immunosupresyjnym i przeciwnowotworowym, przy jednocześnie niewielkiej toksyczności narządowej oraz przewidywalnym profilu farmakokinetycznym. Wydaje się, że treosulfan (TREG) jest interesującym lekiem do włączenia w procedurę kondycjonowania, jako główna składowa mieloablacyjna. Ciągłe jednak brakuje wystarczającej liczby badań farmakokinetyki TREG u dzieci, na podstawie których można byłoby należycie ocenić optymalne schematy dawkowania TREG.

Do oceny farmakokinetyki TREG w osoczu i moczu dzieci w terapii mieloablacyjnej poprzedzającej transplantację komórek hematopoetycznych (HSCT) przystosowano metodę HPLC z detektorem refraktometrycznym. Po przeprowadzeniu walidacji, metodę zastosowano do badań farmakokinetyki TREG u 16 pacjentów pediatrycznych, którym podano lek w dawce: $3 \times 10 \text{ g/m}^2$, $3 \times 12 \text{ g/m}^2$ lub $3 \times 14 \text{ g/m}^2$ w postaci 1 lub 2 h wlewu dożylnego w celu uzyskania efektu mieloablacyjnego przed HSCT. Oznaczone poziomy stężeń TREG wykazywały znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi pacjentami przy tej samej dawce leku. Z wyliczonych stężeń TREG obliczono parametry farmakokinetyczne: $t_{0,5}$, Cl_{tot} , V_{ss} , MRT (osocze) i k_{ner} , $t_{0,5}$, wyeliminowany % dawki (mocz). Wartości AUC i C_{max} znormalizowano do deklarowanej dawki leku, co pozwoliło na porównanie wyników między pacjentami. Parametry farmakokinetyczne wyznaczono przy zastosowaniu programu WinNonlin 6.2.

Obserwowano liniowy wzrost wartości AUC z podaną dawką leku. Zauważono, że wartości AUC pacjentów pediatrycznych poddanych terapii TREG były wyższe od danych literaturowych uzyskiwanych u pacjentów dorosłych, przy zastosowaniu tych samych dawek w g/m^2 . Podobnie przedstawia się zależność $C_{max}=f(\text{dawka})$, która rośnie w zakresie dawek 12 - 14 g/m^2 . Ilości wyeliminowanego z moczem leku przedstawione jako % podanej dawki mieściły się w zakresie 8,43 - 49,55%, z tego około 95 % leku zostało wydalone w pierwszych 6 h od podania leku. Parametry takie jak: $t_{0,5}$, Cl_{tot} , V_{ss} jak i wyeliminowany % dawki, nie zależą od dawki leku ani czasu trwania wlewu. Ponadto wydłużenie czasu wlewu z 1 do 2 h stosowane tylko w przypadku dawki 12 g/m^2

nie zmienia istotnie wartości AUC. Analiza parametrów farmakokinetycznych (AUC, C_{max} , MRT, $t_{0,5}$, V_{ss} , Cl_{tot}) uzyskanych po podaniu wielokrotnych dawek - w dwóch lub trzech kolejnych dniach terapii, nie wykazała znaczących różnic między nimi. Zaobserwowane u dwóch pacjentów bardzo wysokie wartości AUC i C_{max} znacząco odbiegały od pozostałych. Prawdopodobnie było to spowodowane wcześniejszymi narządowymi powikłaniami toksycznymi po zastosowaniu chemioterapii.

Zaobserwowana duża zmienność międzyosobnicza wyznaczonych parametrów farmakokinetycznych, wskazuje na potrzebę indywidualnego schematu podawania TREO pacjentom, uwzględniając wiek i stan fizjologiczny narządów. Podczas ustalenia schematu dawkowania należy brać pod uwagę większą podatność dzieci na zmiany farmakokinetyki TREO niż u dorosłych.

9 ABSTRACT

Pharmacokinetics of treosulfan in children undergoing treosulfan-based preparative regimen prior to hematopoietic stem cell transplantation

Hematopoietic cell transplantation used in the treatment of cancer in children has to be preceded by a conditioning process of the recipient. The conditioning process ensures the irreversible elimination of “sick” bone marrow and enables removal of all residual cancer cells that are susceptible to treatment. The children are exposed to the highest risk of conditioning process complications. Therefore, the most desirable procedure of conditioning would be the one with the best myeloablative, immunosuppressive and anticancer effects together with the lowest organ toxicity and predictable pharmacokinetic profile. Treosulfan (TREO) seems to be a very promising drug to be used as the main myeloablative component in conditioning procedure. However, there is still a lack of sufficient data about TREO pharmacokinetics in children that could be applied to evaluate the optimal TREO dosage regimens.

The pharmacokinetics of TREO (in plasma and urine) in children undergoing myeloablative therapy prior to HSCT was evaluated using HPLC method with refractometric detection. The analytical method was validated and applied to the analysis of TREO pharmacokinetics in humans. The study group included 16 pediatric patients who received TREO in myeloablative therapy prior to HSCT. TREO was administered in 1 or 2-hour intravenous infusions in the following regimens: 3 x 10 g/m², 3 x 12 g/m² or 3 x 14 g/m². The analysis of TREO levels determined in plasma showed significant differences between patients receiving the same dose of the drug. The evaluated TREO concentrations were used in calculations of the following pharmacokinetic parameters: $t_{0.5}$, Cl_{tot} , V_{ss} , MRT (plasma) and k_{ren} , $t_{0.5}$, % of the dose eliminated in urine (urine). The values of AUC and C_{max} were normalized considering the stated dose of the drug to ensure the reliable comparison of the results between patients. The pharmacokinetic parameters were estimated using WinNonlin 6.2 software.

There was a linear increase in AUC value with the dose of the drug. The AUC values in pediatric patients receiving TREO were higher than the previously reported results obtained from adults after administration of the same dose of TREO in g/m². The similar dependence was found between C_{max} and the dose of the drug. The increase of C_{max} was observed with the increasing dose of TREO (the administered doses were in the range 12-14 g/m²). The amount of the drug eliminated in urine was presented as the % of the

administered dose. The results were in the range 8,43 – 49,55 %, of which approximately 95 % of the drug was excreted in the first 6 hours after administration. It was found that $t_{0,5}$, Cl_{tot} , V_{ss} and % of dose eliminated in urine did not depend on the dose of the drug or the duration of the infusion. Moreover, the prolonged infusion from 1 to 2 hours in the case of the dose 12 g/m^2 did not alter significantly the AUC. The analysis of pharmacokinetic parameters did not show the significant differences between values of AUC, C_{max} , MRT, $t_{0,5}$, V_{ss} , and Cl_{tot} estimated from different days during multiple TREO administration (two or three following days of therapy). Very high values of AUC and C_{max} , significantly exceeding the other results were observed in two cases. Most probably, it was a consequence of organ complications after previously administered chemotherapy.

High inter-individual variability of pharmacokinetic parameters observed in the study indicated that individual dosage regimen of TREO is undoubtedly required with consideration of age and the physiological state of organs of the patient. Moreover, children should be considered as more susceptible to changes in TREO pharmacokinetics than adults during evaluating the dosage regimens of TREO.

10 PIŚMIENICTWO

1. Harstrick A, Wilke H, Eberhardt W, Klaassen U, Strumberg D, Korn M, Scheulen ME, Baumgart J, Seeber SA: *Phase I dose escalation trial of intravenous treosulfan in refractory cancer*. *Oncologie* 1996; 19: 153-156.
2. Casper J, Knauf W, Kiefer T, Wolf D, Steiner B, Hammer U, Wegener R, Kleine HD, Wilhelm S, Knopp A, Hartung G, Dölken G, Freund M: *Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood* 2004; 103: 725-731.
3. Beelen DW, Trenchel R, Casper J, Freund M, Hilger RA, Scheulen ME, Basara N, Fauser AA, Hertenstein B, Mylius HA, Baumgart J, Pichlmeier U, Hahn R, Holler E: *Dose-escalated treosulphan in combination with cyclophosphamide as a new preparative regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with an increased risk for regimen-related complications*. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 233-241.
4. Hilger RA, Harstrick A, Eberhardt W, Oberhoff C, Skorzec M, Baumgart J, Seeber S, Scheulen ME: *Clinical pharmacokinetics of intravenous treosulfan in patients with advanced solid tumors*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 42: 99-104.
5. Hilger RA, Jacek G, Oberhoff C, Kredtke S, Baumgart J, Seeber S, Scheulen ME: *Investigation of bioavailability and pharmacokinetics of treosulfan capsules in patients with relapsed ovarian cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 483-488.
6. Schuelen ME, Hilger RA, Oberhoff C, Casper J, Freund M, Josten KM, Bornhauser M, Ehninger G, Berdel WE, Baumgart J, Hastrick A, Bojko P, Wolf HH, Schindler AE, Seeber S: *Clinical phase I dose escalation and pharmacokinetic study of high-dose chemotherapy with treosulfan and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced malignancies*. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4209-4216.
7. Welsch J, Stuart JFB, Soukop M, Cunningham D, Blackie R, Sangster G, Calman KC: *The pharmacokinetics of oral and iv treosulfan*. *Br J Cancer* 1982; 46: 467.
8. Müller H, Hilger R: *Curative and palliative aspects of regional chemotherapy in combination with surgery*. *Support Care Cancer* 2003; 11: 1-10.

9. Hilger RA, Baumgart J, Scheulen ME, Trenchel R, Strumberg D, Seeber S, Beelen DW: *Pharmacokinetics of treosulfan in a myeloablative combination with cyclophosphamide prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Int J Clin Pharmacol and Therap 2004; 42: 654-655.
10. Główka F, Karaźniewicz-Łada M, Grund G, Wachowiak J: *Determination of treosulfan in plasma and urine by HPLC with refractometric detection; pharmacokinetic studies in children undergoing myeloablative treatment prior to haematopoietic stem cell transplantation*. J of Chromatography B 2007; 850: 569-574.
11. http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=146565&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=160&XNMASKEN_ID=900, data wejścia 1.07.2012 r.
12. Gutiérrez MI, Siraj AK, Ibrahim MM, Hussain A, Bhatia K: *Childhood and adult ALL: differences in epigenetic lesions associated with cell cycle genes*. American J Haemat 2005; 80: 158-160.
13. <http://mediweb.pl/diseases/wyswietl.php?id=266>, data wejścia 16.12.2011 r.
14. Urbano-Ispizua A, Schmitz N, de Witte T: *Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe*. Bone Marrow Transplant 2002; 29: 639-646.
15. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, Einsele G, Gaspar HB, 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: *Allogenic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: current practice in Europe 2009*. Bone Marrow Transplant 2010; 45: 219-234.
16. http://www.wum.edu.pl/informacje/2008/pliki/2008.06.27_prof_holowiecki_wyklad.pdf, data wejścia 16.09.2008 r.
17. Turkiewicz D: *Przeszczepienie allogenicznych komórek krwiotwórczych (transplantacja komórek krwiotwórczych od dawcy)*. Postęp w hematologii, onkologii i transplantacjach szpiku u dzieci. Akademia Medyczna, Wrocław 2003: 197-205.
18. Styczyński J: *Reduced toxicity and intensity conditioning In stem cell transplantation: role of treosulfan*. Pediatr Pol 2011; 86(5): 523-531.
19. Kułakowski A, Skowrońska-Gardas A: *Chemioterapia nowotworów*. Onkologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003: 69-75.

20. Dabrowski Z: Apoptoza w układzie hemopoetycznym ^A. *Przeszczepianie szpiku kostnego* ^B. *Fizjologia krwi*. Wydawnictwo Naukowe PWN; Warszawa 1998: 286-309^A, 357-360^B.
21. Apperley J, Carreras E, Gluckman E: *Haematopoietic stem cell transplantation*. Revised Edition 2004: 127-144.
22. Kowalczyk JR, Radwańska U: *Epidemiologia i etiopatogeneza białaczek. Białaczki u dzieci. Volumed*. Wrocław 1998: 17-39.
23. Qureshi A, Marshall L, Lancaster D: *Defibrotide in the prevention and treatment of veno-occlusive disease in autologous and allogeneic stem cell transplantation in children*. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50(4): 831-832.
24. Ho VT, Revta C, Richardson PG: *Hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation: update on defibrotide and other current investigational therapies*. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41(3): 229-237.
25. Buchali A, Feyer P, Groll J, Massenkeil G., Arnold R, Budach V: *Immediate toxicity during fractionated total body irradiation as conditioning for bone marrow transplantation*. *Radiother Oncol* 2000; 54(2): 157-162.
26. Marigny K, Aubin F, Burgot G, Le Gall E, Gandemer V: *Particular cutaneous side effects with etoposide-containing courses: is VP-16 or etoposide phosphate responsible?*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55(3): 244-250.
27. McDonald GB, Slattery JT, Bouvier ME, Ren S, Batchelder AL, Kalthorn TF, Schoch HG, Anasetti C, Gooley T: *Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood* 2003; 101(5): 2043-2048.
28. Sanders J: *Growth and development after hematopoietic cell transplant in children*. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41(2): 223-227.
29. Rutter M, Rose S: *Long-term endocrine sequel of childhood cancer*. *Curr Opin Pediatr* 2007; 19(4): 480-487.
30. Ferry C, Gemayel G, Rocha V, Labopin M: *Long-term outcomes after allogeneic stem cell transplantation for children with hematological malignancies*. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40(3): 219-224.
31. Faraci M, Barra S, Cohen A, Lanino E, Grisolia F, Miano M, Foppiano F, Sacco O, Cabria M, De Marco R, Stella G, Dallorso S, Baqnasco F, Vitale V, Dini G, Haupt R:

- Very late nonfatal consequences of fractionated TBI in children undergoing bone marrow transplant.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005; 63(5): 1568-1575.
32. Berger C, Le-Gallo B, Donadieu J, Richard O, Davergie A, Galambrun C, Bordigoni P, Vilmer E, Plouvier E, Perel Y, Michel G, Stephan JL: *Late thyroid toxicity in 153 long-term survivors of allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukaemia.* Bone Marrow Transplant 2005; 35(10): 991-995.
 33. Graziutti ML, Dong L, Miceli MH, Krischna SG, Kiwan E, Syed N, Fassas A, van Rhee F, Klaus H, Barlogie B, Anaisie EJ: *Oral mucositis in myeloma patients undergoing melphalan-based autologous stem cell transplantation: incidence, risk factors and a severity predictive model.* Bone Marrow Transplant 2006; 38(7): 501-506.
 34. Ritchie DS, Seymour JF, Roberts AW, Szer J, Grigg AP: *Acute left ventricular failure following melphalan and fludarabine conditioning.* Bone Marrow Transplant 2001; 28(1): 101-103.
 35. Tricot G, Alberts DS, Johnson C, Roe DJ, Dorr RT, Bracy D, Vesole DH, Jagannath S, Meyers R, Barlogie B: *Safety of autotransplants with high-dose melphalan in renal failure: a pharmacokinetic and toxicity study.* Clin Cancer Res 1996; 2(6): 947-952.
 36. Kałwak K: *Postęp w hematologii, onkologii i transplantacjach szpiku u dzieci.* AM Wrocław 2003: 26-30.
 37. Bartelink IH, Bredius RG, Ververs TT, Raphael MF, van Kesteren C, Bierings M, Rademaker CM, den Hartigh J, Uiterwaal CS, Zwaveling J, Boelens JJ: *Once-daily intravenous busulfan with therapeutic drug monitoring compared to conventional oral busulfan improves survival.* Blood Marrow Transplant 2008; 14(1): 88-98.
 38. Hoy SM, Lyseng-Williamson: *Intravenous busulfan: in the conditioning treatment of pediatric patients prior to hematopoietic stem cell transplantation.* Paediatr Drugs 2007; 9(4): 271-278.
 39. Geddes M, Kangarloo SM, Naveed F, Quinlan D, Chaudhry MA, Stevart D, Savoie ML, Bahlis NJ, Brown Ch, Storek J: *High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen.* Biol Blood Marrow Transplant 2008; 14: 220-228.
 40. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/busilvex/H-472-PI-pl.pdf>, data wejścia 15.09.2008 r.

41. Sjö F, Hassan Z, Abedi-Valugerdi M, Griskevicius L, Nilsson C, Remberger M, Aschan J, Concha H, Gaughan U, Hassan M: *Myeloablative and immunosuppressive properties of treosulfan in mice*. Exp Hematol 2006; 34: 115-121.
42. Główka FK, Romanski M, Wachowiak J: *Hight-dose treosulfan In conditioning prior to hematopoietic stem cell transplantation*. Expert Opin Investig Drugs 2010; 19: 1275-1295.
43. Wachowiak J, Chybicka A, Kowalczyk J, Boruczkowski D, Gorczyńska E, Wójcik B, Leda M, Drabko K, Pieczonka A, Turkiewicz D, Kałwak K, Choma M: *Does treosulfan-based preparative regimen allow safe and effective allogeneic HSCT for advanced hematologic malignancies in children demonstrating high risk of conventional regimen related toxicity?* Bone Marrow Transplant 2003; 31(supl.1): 25.
44. Feit PW: *Stereoisomere 1,4-di-O-methansulfonyl-butane-1,2,3,4-tetrole*. Tetrahedron Lett 1961; 20: 716-717.
45. Feit PW: *1,4-Bismethanesulfonates of the stereoisomeric butanetetraols and related compounds*. J Med Chem 1964; 7: 14-17.
46. Zając M, Pawełczyk E, Jelińska A: *Chemia leków: dla studentów farmacji i farmaceutów*. AM Poznań 2006: 554-555.
47. Zając M, Pawełczyk E: *Chemia leków*. AM Poznań 2000: 773-774.
48. Janiec W, Krupińska J: *Farmakodynamika. Farmakodynamika leków stosowanych w leczeniu nowotworów*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995: 641-666.
49. <http://en.wikipedia.org/wiki/Treosulfan>, data wejścia 24.04.2008 r.
50. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/ChemInfo.jsp?type=names>, data wejścia 13.08.2008 r.
51. <http://cameochemicals.noaa.gov/chemical/21136>, data wejścia 16.02.2012 r.
52. Drzewoski J, Robak T: *Farmakologia kliniczna leków alkilujących. Farmakologia kliniczna leków przeciwnowotworowych*. Wydawnictwo Nauka, Warszawa 1991; 32-33.
53. *Treosulfan – the alternative alkylating agent*. Medac Research News 2002.
54. Boobis A, Rawlins M, Thomas S, Wilkins M: C. Dollery (Ed.) *Treosulfan, The Drugs*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999: 161-163.
55. http://www.treosulfan.com/treosulfan_dosage/, data wejścia 18.10.2008 r.

56. <http://emc.medicines.org.uk/emc/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=6431>, data wejścia 15.10.2008 r.
57. Feit PW, Rastrup-Andersen N, Matagne R: *Studies on epoxideformation from (2S,3S)-threitol-1,4-bismethanesulfonate. The preparation and biological activity of (2S,3S)-1,2-epoxy-3,4-butanediol-4-methanesulfonate.* J Med Chem 1970; 13: 1173-1175.
58. Hartley JA, O'Hare CC, Baumgart J: *DNA alkylation and interstrand crosslinking by treosulfan.* Br Journal Cancer 1999; 79(2): 264-266.
59. McMurry J: *Etery, epoksydy i sulfidy; Chemia organiczna.* Red. Jurkowska K; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000: 683-693.
60. David W, Ross WCJ: *The formation of epoxides from cytotoxic polyol methanesulphonates under physiological conditions.* Biochem Pharmacol 1963; 12: 915-917.
61. Morrison RT, Boyd RN: *Etery i epoksydy; Chemia organiczna.* Red. Modrzewska D, Galusowa M; Tom 1; Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 1997: 648-657.
62. Masding J, Sarkar TK, White WF, Barley VL, Chawla SL, Boesen E, Rostom AY, Menday AP: *Intravenous treosulfan versus intravenous treosulfan plus cisplatinum in advanced ovarian carcinoma.* Br J Obstet Gynaecol 1973; 97: 342-351.
63. Park S, Tretyakova N: *Structural characterization of the major DNA-DNA cross-link of 1,2,3,4-diepoksybutane.* Chem Res Toxicol 2004; 17: 129-136.
64. Millard JT, Hanly TC, Murphy K, Tretyakova N: *The 5'-GNC item for DNA interstrand cross-linking is conserved for diepoxybutane stereoisomers.* Chem Res Toxicol 2006; 19(1): 16-19.
65. Park S, Anderson C, Loeber R, Seetharaman M, Jones R, Tretyakova N: *Interstrand and interstrand DNA-DNA cross linking by 1,2,3,4-diepoksybutane: Role of stereochemistry.* J Am Chem Soc 2005; 127: 14355-14365.
66. Warwick GP: *The machanism of action of alkylating agents.* Cancer Res 1963; 23: 1315-1333.
67. Ponti M, Souhami RL, Fox BW, Hartley JA: *DNA interstrand crosslinking and sequence selectivity of dimethanesulphonates.* Br J Cancer 1991; 63: 743-747.
68. Mattes WB, Hartley JA, Kohn KW: *DNA sequence selectivity of guanine N-7 alkylation by nitrogen mustards.* Nucl Acids Res 1986; 14: 2971-2987.

69. Hartley JA: *Selectivity in alkylating agent DNA interactions. In Molecular Aspects of Anticancer Drug DNA interactions.* Macmillan Press: Basingstoke 1993: 1-31.
70. Brookes P, Lawley PD: *The alkylation of guanosine and guanylic acid.* J Chem Soc 1961: 3923-3927.
71. Tretyakova N, Lin Y, Sangaiah R, Upon PB, Swenberg JA: *Identification and quantitation of DNA adducts from calf thymus DNA exposed to 3,4-epoksy-1-butene.* Carcinogenesis 1997; 18: 137-147.
72. Tretyakova N, Sangaiah R, Yen TY, Swenberg JA: *Synthesis, characterization, and in vivo quantitation of N-7-guanine adducts of diepoksybutane.* Chem Res Toxicol 1997; 10: 779-785.
73. Tretyakova N, Sangaiah R, Yen TY, Gold A, Swenberg JA: *Adenine adduct with diepoksybutane: isolation and analysis in exposed calf thymus DNA.* Chem Res Toxicol 1997; 10: 1171-1179.
74. Park S, Hodge J, Anderson C, Tretyakova N: *Guanine-adenine DNA cross-linking by 1,2,3,4-diepoksybutane: potential basis for biological activity.* Chem Res Toxicol 2004; 17: 1638-1651.
75. Lawley PD, Brookes P: *Molecular mechanism of the cytotoxic action of difunctional alkylating agents and of resistance to this action.* Nature 1965; 206: 480-483.
76. Lawley PD, Brookes P: *Interstrand cross-linking of DNA by difunctional alkylating agents.* J Mol Biol 1967; 25: 143-160.
77. Rajski SR, Williams RM: *DNA cross-linking agents as antitumor drugs.* Chem Rev 1998; 98: 2723-2796.
78. Sawyer GA, Frederick ED, Millard JT: *Flanking sequences modulate diepoxide and mustard cross-linking efficiencies at the 5'-GNC site.* Chem Res Toxicol 2004; 17: 1057-1063.
79. Millard JT, White MM: *Diepoxybutane cross-links DNA at 5'-GNC sequences.* Biochemistry 1993; 32: 2120-2124.
80. Carmical JR, Kowalczyk A, Zou Y, Van Houten B, Nechev L, Harris CM, Harris TM, Lloyd RS: *Butadiene-induced intrastrand DNA cross-links: a possible role in deletion mutagenesis.* J Biol Chem 2000; 275: 19482-19489.
81. Carmical JR, Zhang M, Nechev L, Harris CM, Harris TM, Lloyd RSJ: *Mutagenic potential of guanine N(2) adducts of butadiene mono- and diepoxide.* Chem Res Toxicol 2000; 13: 18-25.

82. Zheng H, Wang X, Warren AJ, Legerski RJ, Nairn RS, Hamilton JW, Li L: *Nucleotide excision repair- and polymerase eta-mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links*. Mol Cell Biol 2003; 23: 754-761.
83. Henderson RF, Thornton-Manning JR, Bechtold WE, Dahl AR: *Metabolism of 1,3-butadiene: species differences*. Toxicology 1996; 113: 17-22.
84. Elfarra AA, Krause RJ, Selzer RR: *Biochemistry of 1,3-butadiene metabolism and its relevance to 1,3-butadiene induced carcinogenicity*. Toxicology 1996; 113: 23-30.
85. http://www.pharmacy.umn.edu/print/faculty/tretyakova_natalia/home.html, data wejścia 27.09.2008 r.
86. Fischhaber PL, Gall AS, Duncan JA, Hopkins PB: *Direct demonstration in synthetic oligonucleotides that N,N'-bis(2-chloroethyl)nitrosourea cross links N1 of deoxyguanosine to N3 of deoxycytidine on opposite strands of duplex DNA*. Cancer Res 1999; 59: 4363-4368.
87. Yarema KJ, Lippard SJ, Essigmann JM: *Mutagenic and genotoxic effect of DNA adducts formed by the anticancer drug cis-diamminedichloroplatinum (II)*. Nucleic Acids Res 1995; 23: 4066-4072.
88. Składanowski A, Koba M, Konopa J: *Does the antitumor cyclopropylpyrroloindole antibiotic CC-1065 crosslink DNA in tumor cells*. Biochem Pharmacol 2001; 21: 67-72.
89. Naser LJ, Pinto AL, Lippard SJ, Essigmann JM: *Chemical and biological studies of the major DNA adduct of cis-diamminedichloroplatinum (II), cis-[Pt(NH₃)₂d(GpG)], built into a specific site in a viral genome*. Biochemistry 1988; 27: 4357-4367.
90. Kim HY, Stermitz FR, Li JK, Coulombe RA: *Comparative DNA cross-linking by activated pyrrolizidine alkaloids*. Food Chem Toxicol 1999; 37: 619-625.
91. Zhu S, Zeiger E: *Mutagenicity of the humancarcinogen treosulfan and its hydrolysis product 1,2,3,4-diepoxybutane in mammalian cells*. Environ Mol Mutagen 1993; 21: 95-99.
92. Verly WG, Brakier L, Feit P: *Inactivation of the T7 coliphage by the diepoxybutane stereoisomers*. Biochim Biophys Acta 1971; 228: 400-406.
93. Kawiak J, Mirecka J, Olszewska M, Warchoń J: *Podstawy cytofizjologii. Uszkodzenie i śmierć komórki*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998: 376-394.
94. Brockmann WG, Kostoryz EL, Eick JD: *Correlation of apoptotic potential of simple oxiranes with cytotoxicity*. Toxicology in Vitro 2006; 20: 729-735.

95. Łabędzka K, Grzanka A, Izdebska M: *Mitochondrium a śmierć komórki*. Postępy Hig Med Dośw 2006; 60: 439-446.
96. Werner S, Mendoza A, Hilger RA, Erlacher M, Reichardt W, Lissat A, Konanz C, Uhl M, Niemeyer CM, Khanna C, Kontny U: *Preclinical studies of treosulfan demonstrate potent activity in Ewing's sarcoma*. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 62(supl.1): 19-31.
97. Meinhardt G, Dayyani F, Jahrsdörfer B, Baumgart J, Emmerich B, Schmidmaier R: *Treosulfan is an effective inducer of cell death in myeloma cell lines and primary myeloma cells from patients*. Br J Hematol 2003; 122: 892-899.
98. Schmidmaier R, Oellerich M, Baumgart J, Emmerich B, Meinhardt G: *Treosulfan induced apoptosis in AML cells is accompanied by translocation of PKC delta and enhanced by Bryostatín-1*. Exp Hematol 2004; 32: 76-86.
99. Munkelt D, Koehl U, Kloess S, Zimmermann SY, Kalaoui RE, Wehner S, Schwabe D, Lehrnbecher T, Schubert R, Kreuter J, Klingebiel T, Esser R: *Cytotoxic effect of treosulfan and busulfan against leukemic cells of pediatric patients*. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 62: 821-830.
100. Bosanquet AG, Burlton AR: *Airborne cytotoxicity in the DiSC assay caused by solutions of treosulfan but not busulphan*. Cytotechnology 1994; 16: 131-136.
101. Lanvers-Kaminsky C, Bremer A, Dirksen U, Jürgens H, Boos J: *Cytotoxicity of treosulfan and busulfan on pediatric tumor cell lines*. Anticancer Drugs 2006; 17: 657-662.
102. Gropp M, Meier W, Hepp H: *Treosulfan as an effective second-line therapy in ovarian cancer*. Gynecol Oncol 1998; 71: 94-98.
103. Keilholz U, Schuster R, Schmittel A, Bechrakis N, Siehl J, Foerster MH, Thiel E: *A clinical phase I trial of gemcitabine and treosulfan in uveal melanoma and other solid tumours*. Eur J Cancer 2004; 40: 2047-2052.
104. Kopf-Maier P, Sass G: *Antitumor activity of treosulfan in human lung carcinomas*. Cancer Chemother Pharmacol 1996; 37: 211-221.
105. White WF, Masding JE: *Treosulfan chemotherapy in advanced ovarian cancer: a long-term evaluation in previously untreated disease*. Br J Cancer 1983; 46: 491-495.
106. Abdulla U, Makanji HH, Cox C, Alsaidi TK, White WF, Masding JE: *Intravenous treosulfan in advanced ovarian cancer: a multicenter pilot study*. Br J Cancer 1982; 46: 500.

107. Breitbach GP, Villena C, Schwickerath J, Kunzt T, Hurst U, Schmid-Rhode P, Friederich EJ, Artmeyer E, Schroder M, Eberl M, Franck J, Meinen K, Schiller S, Wernicke K, Sasse G, Schmid H, Bastert G: *Treosulfan bei fortgeschrittenem Ovarialcarcinom: Eine Phase III-studie*. Arch Gynecol Obstet 1994; 225(supl.1): 80.
108. Duncan ID, Clayton LA: *Combination chemotherapy of ovarian carcinoma with cisplatin and treosulfan – a phase II study*. Br J Obstet Gynaecol 1985; 92: 762-767.
109. Merkle E, Bahr I, Buhner M, Martus P, Lang N: *Therapie des fortgeschrittenem Ovarialkarzinoms mit Cisplatin und Treosulfan*. Tumordiagn Ther 1993; 14: 175-180.
110. Fichtner I: *Antileukemic activity of treosulfan in animal experiments*. EPO, Berlin-Buch; Report to Medac, 2000.
111. Styczyński J, Wysocki M, Dębski R, Kubicka M, Balwierz W, Juraszewska E, Rokicka-Milewska R, Malinowska I, Matysiak M, Stańczak E, Balcerska A, Płoszyńska A, Kowalczyk JR, Stefaniak J, Małek U, KołECKI P, Mazur B, Sońta-Jakimczyk D, Szczepański T, Chybicka A, Raś M: *Profil oporności in vitro na cytostatyki w ostrej białaczkę limfoblastycznej u dzieci w świetle wartości centylowych*. Acta Haematol Pol 2001; 32(supl.2): 496.
112. Köpf-Maier P: *The alkylator treosulfan shows activity towards human renal-cell carcinoma in vivo and in vitro*. In Vivo 1998; 12: 275-288.
113. Köpf-Maier P, Sass G: *Antitumor activity of treosulfan against human breast carcinomas*. Cancer Chemother Pharmacol 1992; 31: 103-110.
114. Köpf-Maier P, Sass G: *Antitumor activity of treosulfan in human lung carcinomas*. Cancer Chemother Pharmacol 1996; 37: 211-221.
115. Loeb V: *Dihydroxybusulfan (NSC-39069) in chronic myelocytic leukemia and miscellaneous malignant neoplasms*. Chemother Pharmacol Rep 1964; 42: 39-43.
116. Guschall WR, Dittrich I, Gatzemeier U, Serke M, Riedel U, Mehl B, Baumgart J, Drings P: *Clinical Phase II trial of intravenous treosulfan in patients with non-pretreated metastatic small-cell lung cancer*. Lung Cancer 1999; 25: 34.
117. Fennelly J: *Treosulfan (dihydroksybusulphan) in the management of ovarian carcinoma*. Br J Obstet Gynaecol 1977; 84: 300-303.
118. Ploemacher RE, Johnson KW, Rombouts EJC, Etienne K, Westerhof GR, Baumgart J, White-Scharf ME, Down JD: *Addition of treosulfan in a non-myeloablative conditioning regimen results in enhanced chimerism and immunological tolerance in*

- an experimental allogenic bone marrow transplant model.* Biol Blood Marrow Transplant 2004; 10: 236-245.
119. Blau IW, Schmidt-Hieber M, Leschinger N, Göldner H, Knauf W, Hopfenmüller W, Thiel E, Blau O: *Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-intensity conditioning with fludarabine and treosulfan before allogeneic stem cell transplantation.* Ann Hematol 2007; 86: 583-589.
120. Atzpodien J, Terfloth K, Fluck M, Reitz M: *Cisplatin, gemcitabine and treosulfan is effective in chemotherapy-pretreated relapsed stage IV uveal melanoma patients.* Cancer Chemother Pharmacol 2008; 62: 685-688.
121. Cree IA, Neale MH, Reinhold U, Kurbacher CM: *Treosulfan and gemcitabine.* J Cancer Res Clin Oncol 2005; 131: 329-330.
122. Fichtner I, Becker M, Baumgart J: *Antileukemic activity of treosulfan in xenografted human acute lymphoblastic leukemias (ALL).* Eur J Cancer 2003; 39: 801-807.
123. Neuber K, tom Dieck A, Blödorn-Schlicht N, Itschert G, Karnbach C: *Treosulfan is an effective alkylating cytostatic for malignant melanoma in vitro and in vivo.* Melanoma Res 1999; 9: 125-132.
124. Reber U, Wüllner U, Trepel M, Baumgart J, Seyfried J, Klockgether T, Diehgans J, Weller M: *Potentiation of treosulfan toxicity by the glutathione-depleting agent buthionine sulfoximine in human malignant glioma cells: the role of bcl-2.* Biochem Pharmacol 1998; 55: 349-359.
125. Neale MH, Myatt N, Cree IA, Kurbacher CM, Foss AJE, Hungerford JL, Plowman PN: *Combination chemotherapy for choroidal melanoma: ex vivo sensitivity to treosulfan with gemcitabine or cytosine arabinoside.* Br J Cancer 1999; 79: 1487-1493.
126. Feyerabend S, Feil G, Krug J, Kassen A, Stenzl A: *Cytotoxic effects of treosulfan on prostate cancer cell lines.* Anticancer Res 2007 ; 27(4B): 2403-2408.
127. Kopadze T, Dehmel T, Mylius HA, Hartung HP, Wiendl H, Kieseier BC: *Treosulfan impedes the migration of immunocompetent cells.* J Neurol 2007; 254: 1457-1458.
128. Wiendl H, Kieseier B, Weissert R, Mylius HA, Pichmeier U, Hartung HP, Melms A, Kuker W, Weller M: *Treatment of active secondary progressive multiple sclerosis with treosulfanu.* J Neurol 2007; 254: 884-889.
129. Weissert R, Wiendl H, Pfrommer H, Storch MK, Schreiner B, Barth S, Seifert T, Melms A, Dichgans J, Weller M: *Action of treosulfan*

- in myelin-oligodendrocyte-glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis and human lymphocytes*. Journal of Neuroimm 2003; 144: 28-37.
130. Westerhof GR, Pleomacher RE, Boudewijn A, Blokland I, Dillingh JH, McGown AT, Hadfield JA, Dawson MJ, Down JD: *Comparison of different busulfan analogues for depletion of hematopoietic stem cells and promotion of donor-type chimerism in murine bone marrow transplant recipients*. Cancer Res 2000; 60: 5470-5478.
131. Pleomacher RE, Westerhof GR, Blokland I, Baumgart J, Down J: *Treosulfan as an alternative conditioning agent in bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant 2000; 25(supl.1): 141.
132. Casper J, Wilhelm S, Steiner B, Hammer U, Wegener M, Freund M: *Treosulfan and fludarabine conditioning for allogeneic blood stem cell transplantation*. 26th Annual Meeting European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT); 5-8 March 2000.
133. Wachowiak J, Chybicka A, Boruckowski D, Gorczyńska E, Kałwak K, Leda M, Pieczonka A, Toporski J, Turkiewicz D, Witt M: *Intravenous treosulfan in conditioning regimen for allogeneic HSCT from MSD in children with high risk of toxic complications related to conventional preparative*. Bone Marrow Transplant 2002; 30(supl.1): 12.
134. Cutting R, Mirelman A, Vora A: *Treosulphan as an alternative to busulfan for myeloablative conditioning in paediatric allogeneic transplantation*. Br J Haematol 2008; 143: 748-751.
135. Sauer M, Zeidler C, Meissner B, Rehe K, Hanke A, Welte K, Lohse P, Sykora KW: *Substitution of cyclophosphamide and busulfan by fludarabine, treosulfan and melphalan in a preparative regimen for children and adolescents with Schwachman-Diamond syndrome*. Bone Marrow Transplant 2007; 39: 143-147.
136. Giebel S, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Markiewicz M, Wylezoł I, Severyn M, Hołowiecka-Góral A, Hołowiecki J: *Treosulfan, cyclophosphamide and antithymocyte globulin for allogeneic hematopoietic cell transplantation in acquired severe aplastic anemia*. Ann Transplant 2006; 11: 23-27.
137. Wachowiak J, Chybicka A, Kowalczyk J, Grund G, Boruckowski D, Gorczyńska E, Wójcik B, Leda M, Turkiewicz D, Drabko K: *Treosulfan-based preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with increased risk of conventional regimen toxicity*. Blood 2005; 106: 500a

138. Wachowiak J, Grund G, Sykora KW, Wynn RF, Kowalczyk J, Drabko K, Smiers F, Bredius RGM, Veys P, Chybicka A, Kałwak K, Steward C: *Treosulfan-based conditioning regimen for allogeneic transplantation in children congenital non-malignant disorders - retrospective study*. Bone Marrow Transplant 2008; 41(supl.1): 295.
139. Bernardo ME, Zecca M, Piras E, Vacca A, Giorgiani G, Cugno C, Caocci G, Comolo P, Mastronuzzi A, Merli P, La Nasa G, Locatelli F: *Treosulfan-based conditioning regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with thalassaemia major*. Br J Haematol 2008; 143: 548-551.
140. Greystoke B, Bonanomi S, Carr TF, Gharib M, Khalid T, Coussons M, Jagani M, Naik P, Rao K, Goulden N, Amrolia P, Wynn RF, Veys PA: *Treosulfan-containing regimens achieve high rates of engraftment associated with low transplant morbidity and mortality in children with non-malignant disease and significant co-morbidities*. Br J Haematol 2008; 142: 257-262.
141. Meissner B, Borkhardt A, Dilloo D, Fuchs D, Friedrich W, Handgretinger R, Peters C, Schrauder A, Schuster FR, Vormoor J, Maecker B, Sykora KW, Zintl F, Welte K, Sauer M: *Relapse, not regimen-related toxicity, was the major cause of treatment failure in 11 children with Down syndrome undergoing haematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia*. Bone Marrow Transplant 2007; 40: 945-949.
142. Drabko K, Zawitkowska-Klaczynska J, Wojcik B, Choma M, Zaucha-Prazmo A, Kowalczyk J, Gorczyńska E, Toporski J, Kałwak K, Turkiewicz D, Chybicka A: *Megachemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in children with Ewing's sarcoma*. Pediatr Transplant 2005; 9: 618-621.
143. Klaudel-Dreszler MA, Kalwak K, Kurenko-Deptuch M, Wolska-Kuśnierz B, Heropolitańska-Pliszka E, Pietrucha B, Mikoluc B, Gorczyńska E, Ussowicz M, Chybicka A, Bernatowska E: *Treosulfan-based conditioning regimen in a second matched unrelated peripheral blood stem cell transplantation for a pediatric patient with CGD and invasive aspergillosis, who experienced initial graft failure after RIC*. Int J Hematol 2009; 90: 571-575.
144. Casper J, Knauf K, Kiefer T, Wolff D, Steiner B, Hammer U, Wegener R, Kleine HD, Wilhelm S, Knoop A, Hartung G, Dolken G, Freund M: *Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Blood 2004; 103: 725-731.
145. Beelen DW, Trenschele R, Casper J, Freund M, Hilger RA, Scheulen ME, Basara N, Fauser AA, Hertenstein B, Mylius HA, Baumgart J, Pichmeier U, Hahn JR:

- Conditioning. Dose-escalated treosulphan in combination with cyclophosphamide as a new preparative regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with an increased risk for regimen-related complications.* Bone Marrow Transplant 2005; 35: 233-241.
146. Koenigsman M, Mohren M, Jentsch-Ullrich K, Franke A, Becker E, Heim M, Freun M, Casper J: *Conditioning regimens. High-dose treosulfan in patients with relapsed or refractory high-grade lymphoma receiving tandem autologous blood stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant 2004; 34: 477-483.
147. Wagner H, Baumgart J, Andreesen R, Reichle A: *Dose-escalation of treosulfan in a high-dose-protocol: a classical alkylating agent new in high-dose combination chemotherapy.* Proc Am Soc Clin Oncol 2000; 19: abstract 208.
148. Baynes R, Parchment R, Dansey R, Klein J, Karanes C, Hamm C, Abella E, Cassels L, LeVeque G, Baumgart J, Bach F, Peters W: *Phase I evaluation of high dose melphalan, DTIC and treosulfan (MDT) in previously treated metastatic breast and ovarian cancer.* Proc Am Soc Clin Oncol 2000; 19: abstract 585.
149. Shimoni A, Hardan I, Shem-Tov N, Rand A, Yerushalmi R, Nagler A: *Fludarabine and treosulfan: a novel modified myeloablative regimen for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with effective antileukemia activity in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.* Leuk Lymphoma 2007; 48: 2352-2359.
150. Kroger N, Shimoni A, Zabelina T, Schieder H, Panse J, Ayuk F, wolschke C, Renques H, Dahlke J, Atanackovic D, Nagler A, Zander A: *Reduced-toxicity conditioning with treosulfan, fludarabine and ATG as preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) in elderly patients with secondary acute myeloid leukemia (sAML) or myelodysplastic syndrome (MDS).* Bone Marrow Transplant 2006; 37: 339-344.
151. Holowiecki J, Giebel S, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Markiewicz M, Hołowiecka-Góral A, Freund M, Casper J: *Treosulfan and fludarabine low-toxicity conditioning for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia.* Br J Haematol 2008; 142: 284-292.
152. Schmidt-Hieber M, Blau IW, Tenschel R, Andreesen R, Stuhler G, Einsele H, Kanz L, Keiholz U, Marinets O, Beelen DW, Fauser AA, Volin L, Ruutu T, Uharek L, Fietz T, Knauf W, Hopfenmuller W, Thiel E, Freund M, Casper J: *Reduced-toxicity conditioning with fludarabine and treosulfan prior to allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma.* Bone Marrow Transplant 2007; 39: 389-396.

153. Baronciani D, Rambaldi A, Iori AP, Di Bartolomeo P, Pilo F, Pettinau M, Depau C, Mico C, Santarone S, Angelucci E: *Treosulfan/fludarabine as an allogeneic stem cell transplant conditioning regimen for high-risk patients*. Am J Hematol 2008; 83: 717-720.
154. Blau IW, Schmidt-Hieber N, Leschinger N, Goldner H, Knauf W, Hopfenmuller W, Thiel E, Blau O: *Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-intensity conditioning with fludarabine and treosulfan before allogeneic stem cell transplantation*. Ann Hematol 2007; 86: 583-589.
155. Markiewicz M, Wojciechowska M, Wylezol I, Giebel S, Woźniczka K, Wojnar J, Mendek-Czajkowska E, Hołowiecki J: *First two successful unrelated bone marrow transplantations for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Poland*. Ann Transplant 2005; 10: 26-30.
156. Fruehauf S, Buss EC, Topaly J, Kreipe HH, Ho AD: *Myeloablative conditioning in myelofibrosis using i.v. treosulfan and autologous peripheral blood stem cell transplantation with high doses of CD34+ cells results in hematologic response follow-up of three patients*. Haematologica 2005; 90: 17-20.
157. Shimoni A, Rand A, Shem-Tov N: *Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation using fludarabine/ treosulfan conditioning regimen compared with busulfan-based myeloablative and reduced-intensity conditioning in patients with AML and MDS; relative outcomes depend on disease status at transplantation [abstract 3358]*. 51st ASH Annual Meeting and Exposition; 5 - 8 December 2009.
158. Van Pel M, van Breugel DWJG, Vos W, Ploemacher RE, Boog CJP: *Towards a myeloablative regimen with clinical potential: I. Treosulfan conditioning and bone marrow transplantation allow induction of donor-specific tolerance for skin grafts across full MHC-barriers*. Bone Marrow Transplantat 2003; 32: 15-22.
159. Schetelig J, Kroger N, Held TK, Thiede C, Krusch A, Zabelina T, Dubiel M, Rick O, Bornhauser M, Ehninger G, Zander AR, Siegert W: *Allogeneic transplantation after reduced conditioning in high risk patients is complicated by a high incidence of acute and chronic graft-versus-host disease*. Haematologica 2002; 87: 299-305.
160. Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, Petersen FB, Fisher LD, Clift RA, Thomas ED: *Regimen – related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation*. J Clin Oncol 1988; 6: 1562-1568.
161. http://ctep.cancer.gov/forms/CTCv20_4-30-992.pdf, data wejścia 18.10.2008 r.

162. Schmittl A, Schidt-Hieber M, Martus P, Bechrakis NE, Schuster R, Siehl JM, Foerster MH, Thiel E, Keiholz U: *A randomized phase II trial of gemcitabine plus treosulfan versus treosulfan alone in patients with metastatic uveal melanoma*. Ann of Oncology 2006; 17: 1826-1829.
163. Breidenbach M, Rein D, Schondorf T, Schmidt T, Konig E, Valter M, Kurbacher C: *Hematological side-effect profiles of individualized chemotherapy regimen for recurrent ovarian cancer*. Anticancer Drugs 2003; 14: 341-346.
164. Kröger N, Shimoni A, Zabelina T, Schieder H, Panse J, Ayuk F, Wolschke C, Renges H, Dahlke J, Atanackovic D, Nagler A, Zander A: *Reduced-toxicity conditioning with treosulfan, fludarabine and ATG as preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) in elderly patients with secondary acute myeloid leukemia (sAML) or myelodysplastic syndrome (MDS)*. Bone Marrow Transplant 2006; 37: 339-344.
165. Hołowiecki J, Giebel S, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Markiewicz M, Hołowiecka-Góral A, Freund M, Casper J: *Treosulfan and fludarabine low-toxicity conditioning for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in chronic myeloid leukaemia*. British J Haematology 2008; 142: 284-292.
166. Plunkett W, Gandhi V: *Purine and pyrimidine nucleoside analogs*. Cancer Chemother Biol Response Modif 2001; 19: 21-45.
167. Keating MJ: *Progress in CLL: chemotherapy, antibodies and transplantation*. Biomed Pharmacother 2001; 55: 524-528.
168. Wick W, Stock J, Seyfried J, Baumgart J, Wullner U, Weller M: *CD95/CD95 ligand-independent potentiation of treosulfan cytotoxicity by BSO in malignant glioma cells in vitro and in vivo*. Int J Oncol 2002; 21: 213-220.
169. Topaly J, Fruehauf S, Ho AD, Zeller WJ: *Rationale for combination therapy of chronic myelogenous leukaemia with imatinib and irradiation or alkylating agents: implications for pretransplant conditioning*. Br J Cancer 2002; 86: 1487-1493.
170. Kanfer EJ, Petersen FB, Buckner CD, Steward P, Storb R, Hill RS, Appelbaum FR, Clift RA, Doney KC, Schulman HM: *Phase I study of high-dose dimethylbusulfan followed by autologous bone marrow transplantation in patients with advanced malignancies*. Cancer Treat Rep 1987; 71: 101-102.
171. Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, Braine HG, Chen TL, Seral R, Santos GW, Colvin OM: *Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in*

- patients undergoing bone marrow transplantation. Cancer Chemother* 1989; 25: 55-61.
172. Nagler A, Slavin S, Varadi G, Naparstek E, Samuel S, Or R: *Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using a fludarabine-based low intensity conditioning regimen for malignant lymphoma. Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 1021-1028.
173. Bornhauser M, Kiehl M, Siegert W, Schetelig J, Hertenstein B, Martin H, Schwerdtfeger F, Sayer HG, Runde V, Kroger N, Theuser C, Ehninger G, The Cooperative German Transplant Study Group: *Dose-reduced conditioning for allografting in 44 patients with chronic myeloid leukaemia: a retrospective analysis. Br J Haematology* 2001; 115: 119-124.
174. Ritchie DS, Seymour JF, Roberts AW, Szer J, Grigg AP: *Acute left ventricular failure following melphalan and fludarabine conditioning. Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 101-103.
175. Pedersen-Bjergaard J, Nissen NI, Sørensen HM, Hou-Jensen K, Larsen MS, Ernst P, Ersbøl J, Knudtzon S, Rose C: *Acute non-lymphocytic leukemia in patients with ovarian carcinoma following long-term treatment with Treosulfan(= dihydroxybusulfan). Cancer* 1980; 45: 19-29.
176. Lee DH, Kim TH, Lee SY, Kim HJ, Rhee SK, Yoon BS, Pfeifer GP, Lee CS: *Mutations induced by 1,3-butadiene metabolites, butadiene diolepoxide, and 1,2,3,4-diepoxybutane at the Hprt locus in CHO-K1 cells. Mol Cells* 2002; 14: 411-419.
177. Hecht SS: *Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. J Natl Cancer Inst* 1999; 14: 1194-1210.
178. Rice JM, Boffetta P: *1,3-Butadiene, isoprene and chloroprene: reviews by the IARC monographs programme, outstanding issues, and research priorities in epidemiology. Chem Biol Interact* 2001; 135-136: 11-26.
179. Kobylińska K: *Walidacja metody analitycznej dla badań równoważności biologicznej. Red. Marzec A, Wydawnictwo Oinpharma, Warszawa 2007.*
180. Van Loco J, Elskens M, Croux C, Beernaert H: *Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. Accred Qual Assur* 2002; 7: 281-285.
181. Sinatra RS, Jahr JS, Reynolds LW, Viscusi ER, Groudine SG: *Efficacy and safety of Single and Repeated Administration of 1 Gram Intravenous Acetaminophen Injection (Paracetamol) for Pain Management after Major Orthopedic Surgery. Anesthesiology* 2005; 102: 822-831.

182. Szczepaniak W: *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002: 65-72.
183. Głowska FK, Karaźniewicz-Łada M, Grund G, Wróbel T, Wachowiak J: *Pharmacokinetics of high-dose i.v. treosulfan in children undergoing treosulfan-based preparative regimen for allogeneic haematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplant 2008; 42: 67-70.
184. Głowska FK, Romański M, Tężyk A, Żaba C, Wróbel T: *HPLC method for determination of biologically active epoxy-transformers of treosulfan in human plasma; pharmacokinetic application*. J Pharm Biomed Anal 2012; 62: 105-113.
185. Mross K, Reifke J, Bewermeier P, Kruger W, Hossfeld DK, Zander A: *The pharmacokinetics and toxicity of two application schedules with high-dose VP-16 in patients an allogeneic bone marrow transplantation*. Ann of Oncology 1996; 7: 83-88.
186. Wurthwein G, Klingebiel T, Krumpelmann 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.

11 SPIS RYCIN I TABEL

Spis rycin

Ryc. 1. Wzór strukturalny 1,4-bismetanosulfonianu butano-1,2,3,4-tetraolu.	26
Ryc. 2. Wzory strukturalne TREO i Bu.	26
Ryc. 3. Transformacja TREO do aktywnych farmakologicznie związków epoksydowych.....	29
Ryc. 4. Drogi alkilacji DNA z wytworzeniem monoadduktu S,S-N7-THBG.	31
Ryc. 5. Typy wiązań tworzonych przez S,S-DEB [74,77].	34
Ryc. 6. Liniowa zależność $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ od dawki TREO [6].....	44
Ryc. 7. Przebieg zmiany stężeń TREO w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz ilości wydalonego leku z moczem jako funkcja czasu w modelu dwukompartментowym u pojedynczego pacjenta, któremu podano TREO w dawce 14 g/m^2 przez trzy kolejne dni terapii w postaci wlewu dożylnego [9].	47
Ryc. 8. Zmiany stężeń TREO w osoczu i skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem po podaniu doustnym i dożylnym w dawce $1,1 \text{ g/m}^2$ jako funkcja czasu u jednego pacjenta [5].....	48
Ryc. 9. Chromatogramy otrzymane po mikrofiltracji osocza ludzkiego.	69
Ryc. 10. Chromatogramy uzyskane po analizie próbek moczu.	75
Ryc. 11. Wykres zależności zmiany stężenia TREO w osoczu pacjenta jako funkcja czasu po podaniu deklarowanej dawki 10 g/m^2 TREO w postaci 1 h wlewu dożylnego.	80
Ryc. 12. Wykres zależności zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m^2 w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	82
Ryc. 13. Wykres zależności zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m^2 w postaci 2 h wlewu dożylnego (A – wszyscy pacjenci, B – z wyłączeniem pacjenta 9).....	85
Ryc. 14. Wykres zależności zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu deklarowanej dawki 14 g/m^2 w postaci 2 h wlewu dożylnego (A – wszyscy pacjenci, B – z wyłączeniem pacjenta 12).....	88
Ryc. 15. Zależność średnich zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu 10 g/m^2 , 12 g/m^2 i 14 g/m^2 leku w postaci 1 lub 2 h wlewu dożylnego.....	89

Ryc. 16. Półlogarytmiczna zależność średnich zmian stężeń TREO w osoczu pacjentów jako funkcja czasu po podaniu 10 g/m ² , 12 g/m ² i 14 g/m ² leku w postaci 1 lub 2 h wlewu dożylnego.	89
Ryc. 17. Wykres zależności skumulowanej ilości TREO wyeliminowanej z moczem pacjenta od czasu, po podaniu deklarowanej dawki 10 g/m ² leku w postaci wlewu 1 h.	92
Ryc. 18. Wykres zależności skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem pacjentów od czasu, po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m ² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.	96
Ryc. 19. Wykres zależności skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem pacjentów od czasu, po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m ² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	99
Ryc. 20. Wykres zależności skumulowanych ilości TREO wyeliminowanych z moczem pacjentów od czasu, po podaniu deklarowanej dawki 14 g/m ² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	103
Ryc. 21. Całkowita ilość TREO wyeliminowana z moczem u 12 pacjentów.	104
Ryc. 22. Ilość TREO wyeliminowana z moczem wyrażona jako % podanej dawki u 12 pacjentów.	104
Ryc. 23. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 1 po podaniu 7,5 g (dzień -7; A), 8 g (dzień -6; B) i 10 g (dzień -5; C) leku w postaci 1 h (A) oraz 2 h (B, C) wlewu dożylnego.	106
Ryc. 24. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 2 (A = dzień -7, B = dzień -6) po podaniu w kolejnych dniach 3 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	107
Ryc. 25. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 3 (A = dzień -7, B = dzień -5) po podaniu w kolejnych dniach 12 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	108
Ryc. 26. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 4 po podaniu 7 g leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.	109
Ryc. 27. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 5 (A = dzień -5, B = dzień -4, C = dzień -3) po podaniu 17 g (A, B) i 16 g (C) leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.	110
Ryc. 28. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 6 (A = dzień -7, B = dzień -6, C = dzień -5) po podaniu 14 g (A, B) i 13 g (C) leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.	111

Ryc. 29. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 7 (A = dzień -6, B = dzień -5, C = dzień -4) po podaniu w kolejnych dniach 3 g leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.	112
Ryc. 30. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 8 po podaniu 13 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	113
Ryc. 31. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 9 po podaniu 6 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	114
Ryc. 32. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 10 po podaniu 7 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	115
Ryc. 33. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 11 po podaniu 13 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	116
Ryc. 34. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 12 po podaniu 20 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	117
Ryc. 35. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 13 po podaniu 14 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	118
Ryc. 36. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 14 po podaniu 21 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	119
Ryc. 37. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 15 po podaniu 20 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	120
Ryc. 38. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 16 po podaniu 20 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	121
Ryc. 39. Zależność znormalizowanych AUC od deklarowanej dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku), którym podano lek w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	122
Ryc. 40. Zależność znormalizowanych AUC od deklarowanej dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku), którym podano lek w postaci 2 h wlewu dożylnego.....	122
Ryc. 41. Zależność znormalizowanych AUC od deklarowanej dawki TREO dla 14 pacjentów (24 podania leku), którym podano lek w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego (nie uwzględniono pacjenta 9 i 12).....	123
Ryc. 42. Zależność znormalizowanych wartości C_{max} od deklarowanej dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku), którym podano lek w postaci 1 h wlewu dożylnego. ...	124

Ryc. 43. Zależność znormalizowanych wartości C_{max} od deklarowanej dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku), którym podano lek w postaci 2 h wlewu dożylnego.....	124
Ryc. 44. Zależność Cl_{tot} od dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku) po podaniu leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	125
Ryc. 45. Zależność Cl_{tot} od dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku) po podaniu leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.	125
Ryc. 46. Zależność Cl_{tot} od dawki TREO dla 14 pacjentów (24 podania leku) po podaniu leku w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego (nie uwzględniono pacjenta 9 i 12).	126
Ryc. 47. Zależność $t_{0,5}$ od dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku) po podaniu leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	127
Ryc. 48. Zależność $t_{0,5}$ od dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku) po podaniu leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.....	127
Ryc. 49. Zależność $t_{0,5}$ od dawki TREO dla 14 pacjentów (24 podania leku), którym podano lek w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego (nie uwzględniono pacjenta 9 i 10).	128
Ryc. 50. Zależność V_{ss} od dawki TREO dla 5 pacjentów (11 podań leku) po podaniu leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	129
Ryc. 51. Zależność V_{ss} od dawki TREO dla 12 pacjentów (15 podań leku) po podaniu leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.....	129
Ryc. 52. Zależność V_{ss} od dawki TREO dla 14 pacjentów (24 podania leku) po podaniu leku w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego (nie uwzględniono pacjenta 9 i 10).	130
Ryc. 53. Półlogarytmiczny wykres zmian stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu u pacjenta 11 po podaniu 13 g leku w postaci 2 h wlewu dożylnego, uzyskany w programie WinNonlin 6.2.	136
Ryc. 54. Profil stężenia TREO w osoczu jako funkcja czasu oraz ilość wyeliminowanego TREO z moczem u pacjenta 5, po podaniu 17 g (-5, -4) i 16 g (-3) leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	139
Ryc. 55. Zależność AUC od dawki TREO u pacjentów pediatrycznych przechodzących leczenie mieloablacyjne przed HSCT (n=28 podań TREO we wlewie).....	140
Ryc. 56. Porównanie zależności AUC od dawki TREO dla pacjentów pediatrycznych i dorosłych, którzy otrzymywali lek w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego.	141

Spis tabel

Tab. 1. Zastosowanie TREO w chorobach nowotworowych i nienowotworowych u dzieci i dorosłych	39
Tab. 2. Wzrost toksyczności w zależności od dawki TREO [6].....	42
Tab. 3. Porównanie parametrów farmakokinetycznych TREO po podaniu różnych dawek w jednorazowym wlewie dożylnym u pacjentów dorosłych [3,4,6].....	45
Tab. 4. Stężenia roztworu wzorcowego TREO i IS w próbkach osocza	57
Tab. 5. Stężenia roztworu wzorcowego TREO i IS w próbkach moczu	58
Tab. 6. Schemat przygotowania pacjenta do HSCT	63
Tab. 7. Charakterystyka pacjentów	64
Tab. 8. Stosunki P_{TREO} i P_{IS} odpowiadające stężeniom TREO na podstawie siedmiu krzywych wzorcowych w osoczu	70
Tab. 9. Równanie krzywej wzorcowej TREO w osoczu	70
Tab. 10. Precyzja i dokładność oznaczeń TREO w osoczu wykonywanych w ciągu 1 dnia.....	71
Tab. 11. Precyzja i dokładność oznaczeń TREO w osoczu między dniami (n=7).....	72
Tab. 12. Odzysk TREO z osocza	72
Tab. 13. Test stabilności próbek biologicznych z TREO w osoczu podczas procesu zamrażania i rozmrażania	73
Tab. 14. Stosunki P_{TREO} i P_{IS} odpowiadające stężeniom TREO na podstawie krzywych wzorcowych w moczu	76
Tab. 15. Równanie krzywej wzorcowej TREO w moczu.....	76
Tab. 16. Precyzja i dokładność oznaczeń TREO w moczu wykonywanych w ciągu 1 dnia.....	77
Tab. 17. Precyzja i dokładność oznaczeń TREO w moczu między dniami (n=7).....	78
Tab. 18. Test stabilności próbek biologicznych z TREO w moczu podczas procesu zamrażania i rozmrażania	78
Tab. 19. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjenta po podaniu rzeczywistej dawki 11,1 g/m ² w postaci 1 h wlewu dożylnego	79

Tab. 20. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjenta po uwzględnieniu normalizacji do deklarowanej dawki 10 g/m ²	80
Tab. 21. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 10,5 - 12,4 g/m ² w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	81
Tab. 22. Oznaczone stężenia TREO w osoczu po uwzględnieniu normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m ²	81
Tab. 23. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 10,5-12,8 g/m ² w postaci 2 h wlewu dożylnego.....	83
Tab. 24. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po uwzględnieniu normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m ²	84
Tab. 25. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 13,7 - 14,3 g/m ² w postaci 2 h wlewu dożylnego.....	86
Tab. 26. Oznaczone stężenia TREO w osoczu pacjentów po uwzględnieniu normalizacji do deklarowanej dawki 14 g/m ²	87
Tab. 27. Ilość TREO wyeliminowana z moczem pacjenta po podaniu rzeczywistej dawki 11,1 g/m ² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego	90
Tab. 28. Ilość TREO wyeliminowana z moczem pacjenta po normalizacji do deklarowanej dawki 10 g/m ²	91
Tab. 29. Skumulowana ilość TREO wyeliminowana z moczem pacjenta po podaniu deklarowanej dawki 10 g/m ² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	91
Tab. 30. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 11,5 - 12,4 g/m ² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego	93
Tab. 31. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m ²	94
Tab. 32. Skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m ² leku w postaci 1 h wlewu dożylnego.....	95
Tab. 33. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu rzeczywistej dawki 11,8 g/m ² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego	97
Tab. 34. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po normalizacji do deklarowanej dawki 12 g/m ²	98
Tab. 35. Skumulowane ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu deklarowanej dawki 12 g/m ² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.....	98

Tab. 36. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu rzeczywistych dawek 12,3 - 14,3 g/m ² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego	100
Tab. 37. Ilości TREO wyeliminowane z moczem pacjentów po normalizacji do deklarowanej dawki 14 g/m ²	101
Tab. 38. Skumulowane ilości leku wyeliminowane z moczem pacjentów po podaniu deklarowanej dawki 14 g/m ² leku w postaci 2 h wlewu dożylnego.....	102
Tab. 39. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 1.....	106
Tab. 40. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 2.....	107
Tab. 41. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 3.....	108
Tab. 42. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 4.....	109
Tab. 43. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 5.....	110
Tab. 44. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 6.....	111
Tab. 45. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 7.....	112
Tab. 46. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 8.....	113
Tab. 47. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 9.....	114
Tab. 48. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 10.....	115
Tab. 49. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 11.....	116
Tab. 50. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 12.....	117
Tab. 51. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 13.....	118
Tab. 52. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 14.....	119
Tab. 53. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 15.....	120
Tab. 54. Charakterystyka i parametry farmakokinetyczne pacjenta 16.....	121
Tab. 55. Parametry farmakokinetyczne ($x \pm SD$) pacjentów uzyskane z wszystkich podań TREO dla deklarowanej dawki 10 g/m ² , 12 g/m ² i 14 g/m ²	131
Tab. 56. Porównanie parametrów farmakokinetycznych ($x \pm SD$) pacjentów uzyskanych z wszystkich podań deklarowanej dawki 12 g/m ² TREO w postaci 1 i 2 h wlewu dożylnego.	132
Tab. 57. Porównanie parametrów farmakokinetycznych ($x \pm SD$) pacjentów uzyskanych z wszystkich podań deklarowanej dawki 12 g/m ² i 14 g/m ² TREO.....	132

12 WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW

ZAŁĄCZNIK I

ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

ZAŁĄCZNIK II

INFORMACJA DLA PACJENTA I RODZICÓW LUB PRZEDSTAWICIELA NAUKOWEGO

ZAŁĄCZNIK III

FORMULARZ ZGODY PACJENTA LUB JEGO PRZEDSTAWICIELA USTAWOWEGO NA ZASTOSOWANIE TREO

ZAŁĄCZNIK IV

WYNIKI OZNACZEŃ TREO W OSOCZU I MOCZU PACJENTÓW (TABELA 1.1 – 16.2)

ZAŁĄCZNIK V

WYNIKI ODZYSKU TREO W OSOCZU

ZAŁĄCZNIK I



AKADEMIA MEDYCZNA IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
**KOMISJA BIOETYCZNA PRZY AKADEMII MEDYCZNEJ
 IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU**

Adres :
 ul. Fredry 10
 61-701 Poznań

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

KB nr 207/07

Na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996r. o zawodzie lekarza i lekarza dentystry (t.j. Dz.U.z 2002r. Nr 21, poz.204 ze zm.); 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 2005r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz.U. Nr 57, poz. 300); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz.U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 01 lutego 2007 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

prof. dr hab. med. Jacek Wachowiak

w sprawie prowadzenia badań w

**Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej
 AM w Poznaniu**

Główny badacz: **lek. med. Grzegorz Grund**

Dotyczy badania:

**„Treosulfan mieloablacyjnej terapii przed allogeniczną
 transplantacją komórek krwiotwórczych u dzieci z wysokim
 ryzykiem powikłań konwencjonalnej procedury transplantacyjnej”**

Komisja wyraziła zgodę na :

- rozszerzenie badań o badania farmakokinetyki metabolitów treosulfanu;
- włączenie do zespołu badawczego Pana dr hab. Franciszka Główkę oraz mgr Tomasza Wróbla.

Przewodniczący Komisji

Prof. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

ZAŁĄCZNIK II**Informacja dla pacjenta i rodziców lub przedstawiciela ustawowego**

Konieczne jest przeprowadzenie transplantacji szpiku, która obecnie stanowi najskuteczniejszą metodę leczenia w rozpoznanej chorobie. Jednak ze względu na współistniejące z chorobą poważne zaburzenia czynności niektórych narządów istnieje zbyt wysokie niebezpieczeństwo wystąpienia groźnych powikłań związanych z użyciem busulfanu lub napromieniania całego ciała zwykle stosowanych w przygotowaniu do transplantacji.

Stąd ażeby zmniejszyć ryzyko wspomnianych powikłań i móc bezpiecznie przeprowadzić transplantację zamiast busulfanu/napromieniania planowane jest zastosowanie leku dożylnego o nazwie treosulfan (Ovostat) produkowanego przez niemiecką firmę Medac. Jak wykazują dotychczasowe spostrzeżenia poczynione u dorosłych pacjentów oraz wstępne obserwacje własne u dzieci, treosulfan jest znacznie mniej toksyczny aniżeli busulfanu i napromienianie całego ciała, a jednocześnie wystarczająco przygotowuje organizm pacjenta do przyjęcia przeszczepianego szpiku.

Poznań, dnia

Podpis rodziców:

Podpis pacjenta:

ZAŁĄCZNIK III

Formularz świadomej zgody pacjenta lub jego przedstawiciela ustawowego

Po zapoznaniu się z pisemną informacją dotyczącą zastosowania treosulfanu (Ovastatu) wyrażam świadomą zgodę na zastosowanie tego leku w przygotowaniu mojego dziecka/mnie do planowanej transplantacji szpiku.

Poznań, dnia

Podpis rodziców:

Podpis pacjenta:

ZAŁĄCZNIK IV

Pacjent 1

Tabela 1.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 1, dzień -7

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}	C _{TREO} [µg/ml]
0,5	99948,9	525818	0,1901	238,05
1	183885	544045	0,3380	423,29
3	41495,5	490047	0,0847	106,04
4	31725,1	519489	0,0611	76,48
6	7051,94	550902	0,0128	16,03
8	1915,25	538412	0,0036	< LOQ

Tabela 1.2. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 1, dzień - 6

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}	C _{TREO} [µg/ml]
0,5	55748,3	605799	0,0920	115,25
1	112510	581628	0,1934	242,25
3	124540	660839	0,1885	236,01
4	57470,4	535560	0,1073	134,39
6	15163,9	568071	0,0267	33,43
8	3322,28	550090	0,0060	< LOQ

Tabela 1.3. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 1, dzień -5

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}	C _{TREO} [µg/ml]
0,5	101313	529228	0,1914	239,74
1	150858	572301	0,2636	330,12
3	125858	550094	0,2288	286,53
4	82524,9	592011	0,1394	174,57
6	20923,5	535045	0,0391	48,97
8	4430	614883	0,0072	< LOQ

Pacjent 2

Tabela 2.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 2, dzień - 7

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]
0,5	74457	619585	0,1202	150,5
1	200250	890730	0,2248	281,55
3	89772	624644	0,1437	179,98
4	28389	620529	0,0457	57,29
6	6007	601598	0,0100	12,50
8	1676	725660	0,0023	< LOQ

Tabela 2.2. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 2, dzień - 6

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]
1	137604	604559	0,2276	285,05
3	109684	602132	0,1822	228,13
4	40653	572475	0,0710	88,93
6	11016	617315	0,0178	22,35
8	6469	760828	0,0085	10,65

Pacjent 3

Tabela 3.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 3, dzień -7

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]
0,5	168717	620477	0,2719	340,53
1	340641	676006	0,5039	631,06
3	230136	632856	0,3636	455,41
4	101948	594665	0,1714	214,70
6	47367	701782	0,0675	84,53
8	16421	616013	0,0267	33,38

Tabela 3.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 3, dzień -7

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
1	222666	541281	0,4114	1485,09	80	118,81	118,81
2	842212	486494	1,7312	6249,77	130	812,47	931,28
4	1297740	434996	2,9833	10770,17	180	1938,63	2869,91
6	523315	472704	1,1071	3996,63	230	919,23	3789,13
8	315734	449114	0,7030	2537,96	160	406,07	4195,21

Pacjent 3

Tabela 3.3. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 3, dzień -5

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]
0,5	127635	629251	0,2028	254,02
1	293921	666794	0,4408	552,03
3	179843	594776	0,3024	380,02
4	124326	781892	0,1590	199,13
6	33912	749151	0,0453	56,69
8	8526	608224	0,0140	17,56

Tabela 3.4. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 3, dzień -5

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
1	48775	488038	0,0999	360,80	300	108,24	108,24
3	874588	399061	2,1916	7911,97	200	1582,39	1690,63
4	903055	454314	1,9877	7175,93	150	1076,39	2767,02
6	588353	455899	1,2905	4658,97	270	1257,92	4024,94
8	441024	453575	0,9723	3510,21	180	631,84	4656,78

Pacjent 4

Tabela 4.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 4, dzień -6

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]
0,5	215753	613862	0,3515	440,16
1,5	179596	555872	0,3231	404,62
2	124402	578099	0,2152	269,49
4	43626	597177	0,0731	91,49
5	14871	521174	0,0285	35,73
7	6246	584151	0,0107	13,39
9	883	558245	0,0016	< LOQ

Tabela 4.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 4, dzień -6

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
0,5	167352	453804	0,3688	1331,32	50	66,57	66,57
1,5	850687	451055	1,8860	6808,64	50	340,43	407,00
2	792061	446878	1,7724	6398,67	50	319,93	726,94
4	570380	462408	1,2335	4453,07	80	356,25	1083,18
5	158670	449864	0,3527	1273,31	80	101,86	1185,05
7	47521	461282	0,1030	371,91	75	27,89	1212,94
9	23905	471326	0,0507	183,10	80	14,65	1227,59

Pacjent 5

Tabela 5.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 5, dzień - 5

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]
0,5	135318	456652	0,2963	371,10
1	244733	464814	0,5265	659,38
3	61018	472968	0,1290	161,57
4	31704	440917	0,0719	90,05
6	9315	422997	0,0220	27,58
8	2097	430279	0,0049	< LOQ

Tabela 5.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 5, dzień - 5

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
1,5	436753	446098	0,9791	3534,48	750	2650,86	2650,86
3	1001580	485723	2,0620	7444,19	430	3201,00	5851,86
5	696157	473959	1,4688	5302,57	300	1590,77	7442,63
7	158466	483705	0,3276	1182,70	450	532,22	7974,85
8	39197	449360	0,0872	314,90	550	173,20	8148,05

Pacjent 5 c.d.

Tabela 5.3. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 5, dzień - 4

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]
0,5	109032	380218	0,2868	359,13
1	235292	462588	0,5086	637,00
3	53576	462825	0,1158	144,97
4	32541	468562	0,0694	86,97
6	12785	448692	0,0285	35,68
8	1582	484909	0,0033	< LOQ

Tabela 5.4. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 5, dzień - 4

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
1	539405	449043	1,2012	4336,58	650	2818,78	2818,18
3	643579	445141	1,4458	5219,45	550	2870,70	5688,88
4	336355	446497	0,7533	2719,57	500	1359,78	7048,66
6	251375	426494	0,5894	2127,79	450	957,51	8006,17
8	130563	452365	0,2886	1041,96	400	416,78	8422,95

Pacjent 5 c.d.

Tabela 5.5. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 5, dzień - 3

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]
0,5	82110	471938	0,1740	217,89
1	145229	508011	0,2859	358,02
3	45887	516132	0,0889	111,34
4	23758	495805	0,0479	60,01
6	5910	404595	0,0146	18,28
8	888,5	446380	0,0020	< LOQ

Tabela 5.6. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 5, dzień - 3

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
2	407356	455633	0,8940	3227,60	250	806,90	806,90
3	702871	438738	1,6020	5783,50	500	2891,75	3698,65
4	506779	484399	1,0462	3776,90	250	944,23	4642,87
7	262188	482948	0,5429	1959,89	560	1097,54	5740,41
9	64921	446442	0,1454	524,98	650	341,24	6081,65

Pacjent 6

Tabela 6.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 6, dzień - 7

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]
0,5	173748	581832	0,2986	373,98
1	323715	570289	0,5676	710,87
3	56478	522620	0,1081	135,34
4	33521	527039	0,0636	79,65
6	13330	589510	0,0226	28,32
8	4352	536216	0,0081	10,16

Tabela 6.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 6, dzień - 7

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
0,5	693702	428091	1,6205	5850,02	25	146,25	146,25
1	994016	452383	2,1973	7932,45	80	634,60	780,85
4	678992	424935	1,5979	5768,49	130	749,90	1530,75
6	283429	431779	0,6564	2369,75	85	201,43	1732,18

Pacjent 6 c.d.

Tabela 6.3. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 6, dzień - 6

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
0,5	222110	602441	0,3687	461,72
1	300602	550041	0,5465	684,42
3	73470	577529	0,1272	159,32
4	37509	566036	0,0663	82,99
6	13458	566376	0,0238	29,76
8	5421	601972	0,0090	11,28

Tabela 6.4. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 6, dzień - 6

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
0,5	981128	416674	2,3547	8500,60	75	637,54	637,54
1	635874	432703	1,4695	5305,20	60	318,31	955,85
3	745498	448492	1,6622	6000,84	100	600,08	1555,94
4	712328	428671	1,6617	5998,96	40	239,96	1795,89

Pacjent 6 c.d.

Tabela 6.5. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 6, dzień - 5

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]
0,5	94256	561553	0,1678	210,21
1	173993	631861	0,2754	344,85
3	82647	588494	0,1404	175,88
4	42727	567370	0,0753	94,31
6	14910	565391	0,0264	33,03
8	4523	565834	0,0080	10,01

Tabela 6.6. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 6, dzień - 5

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [$\mu\text{g/ml}$]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
0,5	253720	424623	0,5975	2157,11	120	258,85	258,85
1	428897	425455	1,0081	3639,31	80	291,15	550,00
3	78794	435491	0,1809	653,18	170	111,04	661,04
4	252228	441953	0,5707	2060,33	60	123,62	784,66
6	204225	455049	0,4488	1620,21	140	226,83	1011,49
8	76161	418870	0,1818	656,41	150	98,46	1109,95

Pacjent 7

Tabela 7.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 7, dzień - 6

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}	C _{TREO} [µg/ml]
0,5	132444	578928	0,2288	286,51
1	280516	676772	0,4145	519,09
3	74716	556344	0,1343	168,19
4	31811	676240	0,0470	58,91
6	10450	678932	0,0154	19,28
8	3224	671726	0,0048	< LOQ

Tabela 7.2. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 7, dzień - 5

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}	C _{TREO} [µg/ml]
0,5	89138	556522	0,1602	200,59
1	195101	552012	0,3534	442,63
3	66941	541247	0,1237	154,89
4	64670	1037620	0,0623	78,05
6	11944	618603	0,0193	24,18
8	3037	604067	0,0050	< LOQ

Tabela 7.3. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 7, dzień - 4

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}	C _{TREO} [µg/ml]
0,5	81267	400415	0,2030	254,17
1	193259	470218	0,4110	514,71
3	50975	394182	0,1293	161,95
4	51792	701786	0,0738	92,42
6	9152	448941	0,0204	25,53
8	1833	429846	0,0043	< LOQ

Pacjent 8

Tabela 8.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 8

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]
1	111843	509760	0,2194	274,77
2	255730	553158	0,4623	578,97
2,5	108432	528053	0,2053	257,16
3	78775	538782	0,1462	183,11
4	46006	584776	0,0787	98,53
6	14335	539990	0,0265	33,25
8	7538	622521	0,0121	15,16
12	656	610523	0,0011	< LOQ

Tabela 8.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 8

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
0,5	249341	479493	0,5200	1877,29	180	337,91	337,91
1	469204	494959	0,9480	3422,26	140	479,12	817,03
2	1152410	470980	2,4468	8833,34	160	1413,33	2230,36
3	1004750	485706	2,0686	7468,01	185	1381,58	3611,94
3,25	399451	462679	0,8633	3116,76	185	576,60	4188,55
6	210172	476927	0,4407	1590,90	120	190,91	4379,45
12	19799	514250	0,0385	138,99	250	34,75	4414,20

Pacjent 9

Tabela 9.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 9

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]
0,5	214712	472783	0,4541	568,75
1	390700	499310	0,7825	979,94
1,5	489964	540295	0,9068	1135,69
2	343777	456207	0,7536	943,71
2,5	269497	519178	0,5191	650,07
3	127085	557800	0,2278	285,33
4	62309	548490	0,1136	142,27
6	14548	567925	0,0256	32,08

Pacjent 10

Tabela 10.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 10

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	P_{TREO}/P_{IS}	C_{TREO} [µg/ml]
0,5	90088	473571	0,1902	238,24
1	197892	520255	0,3804	476,36
1,5	229818	485205	0,4737	593,18
2	281645	476768	0,5907	739,81
2,5	152724	430759	0,3545	444,02
3	119320	478281	0,2495	312,43
4	65313	459066	0,1423	178,18
6	24368	438368	0,0556	69,62

Tabela 10.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 10

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	P_{TREO}/P_{IS}	C_{TREO} [µg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{TREO} = f(t)$
0,5	155275	481543	0,3225	1164,09	50	58,20	58,20
1	254902	487561	0,5228	1887,40	140	264,24	322,44
1,5	361492	510593	0,7080	2555,90	165	421,72	744,16
2,5	481685	484756	0,9937	3587,24	85	304,92	1049,08
6	72828	494024	0,1474	532,19	140	74,51	1123,59
8	11665	508864	0,0229	82,76	150	12,41	1136,00

Pacjent 11

Tabela 11.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 11

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]
0,5	121510	532625	0,2281	285,70
1	156507	516616	0,3029	379,39
1,5	157031	482616	0,3254	407,48
2	152426	462786	0,3294	412,48
2,5	72835,9	473889	0,1537	192,48
3	54023	498785	0,1083	135,64
4	39751,5	483803	0,0822	102,90
6	16318,9	509485	0,0320	40,11
8	7562,19	508375	0,0149	18,63

Tabela 11.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 11

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
2,5	764895	534514	1,4310	5166,10	240	1239,86	1239,86
3	154907	538960	0,2874	1037,61	370	383,92	1623,78
5,5	151142	524741	0,2880	1039,83	350	363,94	1987,72
6	58645,3	526058	0,1115	402,46	270	108,66	2096,38
6,5	20337,6	517973	0,0393	141,75	250	35,44	2131,82
7	5796,22	525462	0,0110	< LOQ	640	< LOQ	< LOQ
8,5	68535	547605	0,1252	451,82	170	76,81	2208,63

Pacjent 12

Tabela 12.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 12

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]
0,5	594322	509827	1,1657	1459,90
1	857921	502091	1,7087	2139,88
1,5	1727814	587234	2,9423	3684,77
2	1934034	531168	3,6411	4559,92
2,5	312338	509554	0,6130	767,64
3	176504	538059	0,3280	410,82
4	117910	572861	0,2058	257,77
6	55119	526791	0,1046	131,04
8	13559	503803	0,0269	33,70

Tabela 12.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 12

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
2	334878	524210	0,6388	2306,22	670	1545,17	1545,17
4	1265900	550318	2,3003	8304,36	570	4733,48	6278,65
4,5	210845	537366	0,3924	1416,49	560	793,23	7071,89
5	110582	547249	0,2021	729,49	500	364,75	7436,63
6	188458	532188	0,3541	1278,41	370	473,01	7909,64
11	80963,2	529782	0,1528	551,71	560	308,96	8218,60

Pacjent 13

Tabela 13.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 13

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]
0,5	189665	470057	0,4035	505,31
1	282018	467217	0,6036	755,93
2	389673	547339	0,7119	891,60
3	85538,6	546541	0,1565	196,00
4	29100,9	505532	0,0576	72,09
6	4086,18	479314	0,0085	10,68

Tabela 13.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 13

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{WZ}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
0,5	5577,29	517360	0,0108	< LOQ	50	< LOQ	< LOQ
1,58	1223770	462291	2,6472	9556,63	95	907,88	907,88
2,92	1537360	473017	3,2501	11733,27	60	704,00	1611,88
5,25	890088	493488	1,8037	6511,43	50	325,57	1937,45

Pacjent 14

Tabela 14.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 14

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]
0,5	204514	502470	0,4070	509,73
1	291718	546727	0,5336	668,22
1,5	306531	526541	0,5822	729,07
2	360383	525313	0,6860	859,15
3	105882	540813	0,1958	245,19
4	50906	542468	0,0938	117,52
6	19198	559095	0,0343	43,00
8	3278	482793	0,0068	< LOQ
12	189	524175	0,0004	< LOQ

Tabela 14.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 14

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
1	305447	433986	0,7038	2540,86	250	635,21	635,21
1,25	496022	438412	1,1314	4084,50	280	1143,66	1778,87
2	928675	428655	2,1665	7821,25	230	1798,89	3577,76
3	784424	445078	1,7624	6362,61	250	1590,65	5168,41
3,35	740710	411415	1,8004	6499,63	220	1429,92	6598,33
5,75	686330	443407	1,5479	5587,93	395	2207,23	8805,56
7	70553	449076	0,1571	567,17	280	158,81	8964,37
8	36272	449537	0,0807	291,29	330	96,13	9060,50
12	7883	469434	0,0168	< LOQ	155	< LOQ	< LOQ

Pacjent 15

Tabela 15.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 15

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]
0,5	47481	517294	0,0918	114,95
1	101567	606291	0,1675	209,80
1,5	186417	577207	0,3230	404,46
2	379645	808040	0,4698	588,40
2,5	236540	564809	0,4188	524,48
4	93118	597061	0,1560	195,32
6	38338	634580	0,0604	75,66
8	12867	615345	0,0209	26,19

Tabela 15.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 15

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [μg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
1,5	341084	454909	0,7498	2706,81	340	920,31	920,31
2,5	1048490	443400	2,3647	8536,68	290	2475,64	3395,95
4	594461	441659	1,3460	4859,11	400	1943,64	5339,59
6	359320	448905	0,8004	2889,66	360	1040,28	6379,87
7,25	131842	437618	0,3013	1087,62	350	380,67	6760,54
8,5	85920	471210	0,1823	658,26	350	230,39	6990,93

Pacjent 16

Tabela 16.1. Stężenie TREO w osoczu u pacjenta 16

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]
0,5	69569	506516	0,1373	172,01
1	154968	551290	0,2811	352,04
1,5	181417	508497	0,3568	446,80
2	203763	555329	0,3669	459,52
2,5	179091	654487	0,2736	342,69
3	108134	597730	0,1809	226,56
4	62307	558666	0,1115	139,67
6	29387	604034	0,0487	60,93
8	10002	564722	0,0177	22,18
10	1907	532024	0,0036	< LOQ

Tabela 16.2. Stężenie TREO w moczu i wydalona ilość leku u pacjenta 16

Czas od rozpoczęcia wlewu [h]	P_{TREO}	P_{IS}	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS}}$	C_{TREO} [µg/ml]	Objętość wydalonego moczu [ml]	X_{TREO} [mg]	$X_{\text{TREO}} = f(t)$
1	207767	436250	0,4763	1719,34	400	687,74	687,74
1,5	294581	445066	0,6619	2389,46	200	477,89	1165,63
2	492266	458531	1,0736	3875,71	200	775,14	1940,77
2,83	827140	450748	1,8350	6624,69	380	2517,38	4458,15
3,83	421931	444104	0,9501	3429,86	350	1200,45	5658,60
4,75	278101	442516	0,6285	2268,79	380	862,14	6520,74
5,5	207605	467043	0,4445	1604,73	380	609,80	7130,54
7	164759	443898	0,3712	1339,94	400	535,97	7666,52
7,5	75993	470289	0,1616	583,35	250	145,83	7812,35
8,5	60779	436327	0,1393	502,88	360	181,07	7993,39

ZAŁĄCZNIK V

Stężenie TREO [µg/ml]	Seria 1 (S ₁)			Seria 2 (S ₂)			Odzysk [%]	Średnia [%]	SD	Wz
	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}				
1000	432566	533562	0,8107	509856	492563	1,0351	78,32	75,32	1,75	2,32
1000	423245	536523	0,7889	516533	487566	1,0594	74,46			
1000	389732	484233	0,8048	516302	482857	1,0693	75,27			
1000	401946	504960	0,7960	512174	480210	1,0666	74,63			
1000	442218	548776	0,8058	507157	465041	1,0906	73,89			

Stężenie TREO [µg/ml]	Seria 1 (S ₁)			Seria 2 (S ₂)			Odzysk [%]	Średnia [%]	SD	Wz
	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}	P _{TREO}	P _{IS}	P _{TREO} /P _{IS}				
50	17456	536899	0,0325	21465	496589	0,0432	75,22	76,34	4,53	5,93
50	18207	529761	0,0344	23010	514391	0,0447	76,83			
50	17896	563566	0,0318	23656	516594	0,0458	69,35			
50	19108	535096	0,0357	22754	503379	0,0452	79,00			
50	20790	547598	0,0380	23914	512045	0,0467	81,29			