



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET

DOKTORSKE AKADEMSKE STUDIJE

**FARMAKOKINETIKA
METOTREKSATA KOD DECE**
DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Jovanka Kolarović
Prof. dr Jovan Popović

Kandidat: Jela Tošić

Novi Sad, 2015. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET NOVI SAD

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Jela Tošić
AU

Mentor, komentor: Jovanka Kolarović
MN Jovan Popović

Naslov rada: Farmakokinetika metotreksata kod dece
NR

Jezik publikacije: srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2015.
GO

Izdavač: autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
MS

Fizički opis rada: 7 poglavlja, 196 strana, 99 literaturna
FO citata, 96 tabela, 44 grafikona, 4 slike

Naučna oblast: OB	Medicina
Naučna disciplina: DI	pedijatrija, hematologija sa onkologijom
Predmetna odrednica/ključne reči: PO	Metotreksat; Farmakokinetika; Deca; Toksikokinetika; Praćenje leka; Antineoplastični protokoli
UDK	616.155.392:615.277.015
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: ID	

Metotreksat kao antagonista folne kiseline ima široku upotrebu za lečenje brojnih maligniteta, primenjen u visokim dozama i u kombinaciji sa leukovorinom. Iako je terapija visokim dozama metotreksata drastično poboljšala prognozu pacijenata sa malignitetom, teški neželjeni efekti terapije predstavljaju stalan klinički problem.

Ciljevi istraživanja bili su određivanje serumske koncentracije metotreksata i izračunavanje farmakokinetičkih parametara metotreksata kod dece obolele od malignih bolesti koja su na terapiji visokim dozama metotreksata (2 g/m^2 i 5 g/m^2); ispitivanje postojanja uticaja primenjene doze metotreksata, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika na koncentracije i farmakokinetičke parametare. Ispitivano je prisustvo i stepen kliničkih i laboratorijskih znakova toksičnosti metotreksata, kao i uticaj primenjene doze metotreksata i demografskih karakteristika ispitanika na pojavu i stepen toksičnosti.

U okviru retrospektivno-prospektivne studije uključeno je četrdeset i dva pedijatrijska pacijenta uzrasta od 0,75 do 17,75 godina (medijana 5,75 godina). Svi pacijenti su lečeni u Službi za hematologiju i onkologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine (Novi Sad, Srbija) u periodu od juna 2004. godine do juna 2012. godine. Trideset i osam ispitanika je lečeno pod dijagnozom akutne limfoblastne leukemije prema dva uzastopna protokola ALL IC-BFM 2002 i ALL IC-BFM 2009 Internacionalne BFM studijske grupe „I-BFM-SG“ (International

Berlin-Frankfurt-Münster Study Group) za proučavanje i lečenje dečje non-B akutne limfoblastne leukemije. Četvoro je imalo dijagnozu non-Hodgkin limfoma i bili su uključeni u protokol NHL-BFM 95. Istraživanje je obuhvatilo 113 ciklusa terapije metotreksatom (1–4 ciklusa po pacijentu) sa 386 izmerenih serumskih koncentracija metotreksata. Raspon primenjenih doza metotreksata kretao se od 800 do 10.000 mg.

Koncentracije metotreksata su merene 24, 36 i 42 sata nakon započinjanja infuzije metotreksata, a po potrebi i u dužim vremenskim intervalima. Za izračunavanje farmakokinetičkih parametara korišćen je dvokompartmanskih farmakokinetički model posle obustavljanja intravenske infuzije, gde postoje relacije za farmakokinetičke tačke. Podaci o kliničkim i laboratorijskim znacima toksičnosti metotreksata prikupljeni su iz medicinske dokumentacije, a za stepenovanje toksičnosti korišćen je skor sistem - Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Version 4.0, U.S. Department of health and human services, National Institute of Health, National Cancer Institute. U cilju utvrđivanju uticaja karakteristika ispitanika, primenjene doze i prisustva produžene eliminacije na posmatrane parametre, vršeno je poređenje tri grupe pacijenata (doza 2 g/m² bez produžene eliminacije, 5 g/m² bez produžene eliminacije i 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata).

Za celokupnu grupu ispitanika, medijane koncentracije metotreksta bile su 25,82 μmol/l u 24. satu, 0,68 μmol/l u 36. satu i 0,24 μmol/l u 42. satu merenja. Najizraženija interindividualna varijabilnost u koncentracijama metotreksata bila je u 42. satu merenja, dok je intraindividualna varijabilnost bila najizraženija u 36. satu merenja. Medijana klirensa metotreksata bila je 8,32 l/h. Farmakokinetički parametri redom bili su: medijana volumena centralnog kompartmana V₁ 28,47 l, medijane konstanti k₁₀ 0,206, k₁₂ 0,0245, k₂₁ 0,1114.

Najizraženiji uticaj primenjene doze na koncentracije metotreksata pokazan je u 24. satu merenja, dok uticaj doze na klirens metotreksata nije pokazan. Prisustvo produžene eliminacije metotreksata dovodi do smanjenih vrednosti konstanta k₁₀ i k₂₁. Nije pokazana statistički značajna interakcija ispitivanih demografskih karakteristika (uzrast, telesna površina i pol) i koncentracija metotreksata, kao ni klirensa metotreksata. Pokazana je značajna interakcija između koncentracija metotreksata i nivoa laktat dehidrogenaze, kao i klirensa metotreksata i nivoa kreatinina i laktat dehidrogenaze.

Većina ispoljenih toksičnosti bila je umerenog stepena (< 3 stepena). Najzastupljeniji klinički znak toksičnosti bio je oralni mukozitis, koji je bio većeg

stepena u grupi sa većom primenjenom dozom metotreksata (5 g/m²). Najzastupljeniji laboratorijski toksični efekti metotreksata bili su leukopenija i anemija. Najteži stepeni laboratorijskih znakova toksičnosti (leukopenija, anemija, porast AST, ALT i GGT) nalazili su se u grupi sa većom dozom (5 g/m²) i sa produženom eliminacijom metotreksata.

Osnov za kliničko vođenje pacijenata na terapiji visokim dozama metotreksata je terapijsko praćenje leka (therapeutic drug monitoring – TDM) zbog velikih interindividualnih i intraindividualnih varijabilnosti u farmakokinetici leka. Rutinsko praćenje koncentracija metotreksata važno je za identifikaciju pacijenata sa povećanim rizikom od razvoja toksičnosti, te je TDM standardna praksa za smernice spasavanja leukovorinom, naročito za pacijente za koje se zna da imaju smanjen klirens metotreksata ili druge rizike povezane sa prolongiranim citotoksičnim koncentracijama (bubrežna ili jetrena oštećenja, kolekcije tečnosti u “trećem prostoru”, gastrointestinalna opstrukcija). Veliki broj istraživanja kod pedijatrijskih pacijenata pokazao je vezu između sistemskog izlaganja metotreksatu i efikasnosti i toksičnosti metotreksata. Ipak, ne postoji dovoljno informacija o farmakokinetici metotreksata kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije. Takođe, ova istraživanja nisu do sada sprovedena kod dece koja su lečena u našoj sredini.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 6.4.2011.
DP

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
(naučni stepen, ime i prezime, fakultet)

Predsednik: prof. dr Nada Konstantinidis, Medicinski fakultet u Novom Sadu
Član: prof. dr Dragan Katanić, Medicinski fakultet u Novom Sadu
Član: prof. dr Mira Popović, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu
Član: prof. dr Aleksandar Savić, Medicinski fakultet u Novom Sadu
Član: doc. dr Ivana Urošević, Medicinski fakultet u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
MEDICAL FACULTY NOVI SAD
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document of record: Monographic documentation
DR

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: Ph.D thesis
CC

Author: Jela Tošič
AU

Menthor, co-menthor: Jovanka Kolarović
MN Jovan Popović

Title: Pharmacokinetics of Methotrexate in
TI Children

Language of text: Serbian (Roman)
LT

Language of abstrect: Serbian (Roman)/English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2015.
PY

Publisher: authors reprint
PU

Publication place: Medical Faculty, Hajduk Veljkova 3
PP 21000 Novi Sad, Serbia

Physical description: 7 chapters, 196 pages, 99 citations,
PD 96 tables, 44 graphs, 4 photos

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Pediatrics, Haematology and Oncology
SD

Subject/key words: Methotrexate; Pharmacokinetics; Child;
SKW Toxicokinetics; Drug Monitoring;
Antineoplastic Protocols

UDK
616.155.392:615.277.015

Holding data: Library of Medical Faculty Novi Sad
HD Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad,
Serbia

Note:
N

Abstract:
AB

Methotrexate is an antifolate drug widely used for treatment of various malignant tumours. It is used at high doses and in combination with leucovorin rescue. Although high-dose MTX therapy dramatically improves the prognosis of patients with malignancies, severe adverse events are constant clinical concern.

The aims of this study were to determine the serum concentration of methotrexate and to calculate the pharmacokinetic parameters of methotrexate in children suffering from malignant diseases who are treated with high doses of methotrexate (2 g/m^2 i 5 g/m^2); furthermore, to investigate the effects of the applied doses of methotrexate, and demographic and clinical characteristics of the examinees on the concentration and pharmacokinetic parameters of the drug. The study investigated the presence and the degree of clinical and laboratory signs of methotrexate toxicity, as well as the effect of the applied doses, and demographic characteristics of the examinees on the appearance and the degree of toxicity.

The retrospective-prospective study included 42 pediatric patients aged from 0.75 to 17.75 years (median 5.75 years). All patients were treated at the Children and Youth Health Care Institute of Vojvodina (Novi Sad, Serbia), Hematology and Oncology Section, in the period from June 2004 to June 2012. 38 examinees diagnosed as acute lymphoblastic leukemia were treated according to two subsequent protocols, ALL IC-BFM 2002 and ALL IC-BFM 2009 of the International BFM study group „I-BFM-SG“ (International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group) for management of childhood non-B acute lymphoblastic leukemia. 4 examinees

diagnosed as non-Hodgkin lymphoma were treated according to the NHL-BFM 95 protocol. The study included 113 cycles of therapy with methotrexate (1-4 cycles per patient) with 386 measured serum concentrations of methotrexate. The range of the applied doses was between 800 and 10,000 mg.

The concentration of methotrexate was measured 24, 36 and 42 hours after the initiation of the methotrexate infusion, as well as in longer time intervals when needed. To calculate the pharmacokinetic parameters, the study applied the two-compartment pharmacokinetic model after the termination of intravenous infusion, when relations for pharmacokinetic points existed. Data on clinical and laboratory signs of methotrexate toxicity were collected from medical documentation, and the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Version 4.0, U.S. Department of health and human services, National Institute of Health, National Cancer Institute, was used as the score system for toxicity ranking. In order to determine the effects of the examinees' characteristics, applied doses and the presence of prolonged elimination on the parameters of interest, three groups of patients were compared (2 g/m² dose without prolonged elimination, 5 g/m² without prolonged elimination and 5 g/m² with prolonged elimination of methotrexate).

In the entire group of examinees, the median concentration of methotrexate was 25.82 µmol/l in the 24th hour, 0.68 µmol/l in the 36th hour and 0.24 µmol/l in the 42nd hour of observation. The largest inter-individual variability of methotrexate concentration was observed in the 24th hour while the largest intra-individual variability was recorded in the 36th hour of observation. The median clearance of methotrexate was 8.32l/h. Pharmacokinetic parameters were the following: median volume of the central compartment V_1 28.47 l, median constants k_{10} 0,206, k_{12} 0,0245, k_{21} 0,1114, respectively.

The strongest influence of the applied dose on the methotrexate concentration was recorded in the 24th hour of observation while no influence on the methotrexate clearance was found. The presence of prolonged elimination of methotrexate causes lower constants k_{10} and k_{21} . There was no statistically significant interaction between the investigated demographic characteristics (age, body surface and gender) and the methotrexate concentration, nor between the demographic characteristics and the methotrexate clearance. A significant interaction was found between methotrexate concentration and lactat dehydrogenase level, as well as between methotrexate clearance and creatinine and lactate dehydrogenase level, respectively.

Most of the observed toxicities were of moderate degree (< 3 degrees). Oral mucositis was the most represented clinical sign of toxicity, and it was of higher degree in the group where the applied dose of methotrexate was higher (5 g/m²). Leucopenia and anemia were the most represented laboratory toxic effects. The most severe laboratory signs of toxicity (leucopenia, anemia, increase in AST, ALT and GGT activity) were observed in the group with the higher dose (5 g/m²) and prolonged methotrexate elimination.

Due to high inter- and intra-individual variability of the drug pharmacokinetics, the basis for the clinical care of patients on high methotrexate dosage therapy is therapeutic drug monitoring – TDM. Routine monitoring of methotrexate serum concentration is important for the identification of patients with a high risk of toxicity, and thus TDM is used as a standard procedure which provides guidelines for leucovorin rescue, particularly for patients with a lower methotrexate clearance or other risks associated with prolonged cytotoxic concentrations (kidney or liver damage, body fluid accumulation in the “third space”, gastrointestinal obstruction). Numerous studies involving pediatric patients have documented the link between a systemic methotrexate exposure on one hand, and the efficiency and toxicity of methotrexate on the other hand. However, there is no sufficient data on the methotrexate pharmacokinetics in children suffering from acute lymphoblastic leukemia. Moreover, this type of research, involving children treated in the geographical region of this study, have not been conducted.

Accepted by Scientific Board on:
ASB

April 6th, 2011.

Defended on:
DE

Thesis defend board:
(Degree, name, surname, title, faculty)

President: prof. dr Nada Konstantinidis, Medicinski fakultet u Novom Sadu
Member: prof. dr Dragan Katanić, Medicinski fakultet u Novom Sadu
Member: prof. dr Mira Popović, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu
Member: prof. dr Aleksandar Savić, Medicinski fakultet u Novom Sadu
Member: doc. dr Ivana Urošević, Medicinski fakultet u Novom Sadu

SPISAK SKRAĆENICA KOJE SU KORIŠĆENE U TEKSTU
POREĐANE PREMA ABECEDNOM REDU

AICARFT	aminoimidazol karboksamid ribonukleotid transformilaza
ALL	akutna limfoblastna leukemija
ALT	alanin aminotransferaza
AMP	adenozin monofosfat
ANLL	akutna nelimfoblastna leukemija
AST	aspartat aminotransferaza
Cl _{Cr}	klirens kreatinina
C _{max}	maksimalna koncentracija
Cl _R	renalni klirens
CNS	centralni nervni sistem
CPDG	karboksipeptidaza G
CST	cerebrospinalna tečnost
dAMPA	pteroat, 4-amino-4-deoksi-N10-metilpteroična kiselina
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dTMP	deoksitimidin monofosfat
dUMP	deoksiuridin monofosfat
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
FPGS	folilpoliglutamat sintetaza
GARFT	glicinamid ribonukleotid transformilaza
GIT	gastrointestinalni trakt
GMP	guanozin monofosfat
GGH	γ-glutamil hidrolaza
HDMTX	high dose methotrexate
HML	hronične mijeloidne leukemije
IDMTX	intermediate dose methotrexate
i.m.	Intramuskularno
IMP	inozin monofosfat
i.t.	Intratekalno
i.v.	Intravenski
LDMTX	Low dose methotrexate

LV	Leukovorin
MSE	Mean standard error
MTHFR	metilen tetrahidrofolat reduktaza
MTRR	metionin sintaza reduktaza
MTX	Metotreksat
MTXPG	metotreksat poliglutamati
RNK	ribonukleinska kiselina
RFC	reduced protein nosač redukovanih folata folate carrier
s.c.	Subkutano
SHMT1	serin hidroksimetil transferaza
SNP	single nucleotide polymorphism
$t_{1/2}$	poluvreme eliminacije
t_{max}	maksimalno vreme
TDM	therapeutic drug monitoring (terapijsko praćenje lekova)
TS	timidilat sintaza
7-OH-MTX	7-hidroksi-metotreksat

SADRŽAJ

I. UVOD	1
1. ISTORIJA	1
2. HEMIJSKA STRUKTURA I OSOBINE	2
3. MEHANIZAM DELOVANJA	3
4. FARMAKOKINETIKA	6
4.1. RESORPCIJA	6
4.2. DISTRIBUCIJA	7
4.3. ELIMINACIJA	8
4.3.1. METABOLIZAM	9
4.3.2. EKSKRECIJA	11
5. VISOKE DOZE METOTREKSATA	12
6. LEUKOVORIN	15
7. REZISTENCIJA NA METOTREKSAT	17
8. FARMAKOGENETIKA	18
9. TOKSIČNOST TERAPIJE METOTREKSATOM	21
10. TERAPIJSKO PRAĆENJE LEKOVA	28
11. AKUTNA LEUKEMIJA	31
12. NON-HODGKIN LIMFOMI	35
13. TERAPIJA	39
13.1. AKUTNA LIMFOBLASTNA LEUKEMIJA	39
13.2. NON-HODGKIN LIMFOMI	49
II. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA:	55
III. MATERIJAL I METODOLOGIJA	57
1. ISPITANICI	57
2. DIZAJN ISTRAŽIVANJA	59
1. I studija – karakteristike ispitanika	61
2. II studija – koncentracije metotreksata	62
3. III studija – klirens metotreksata	63
4. IV studija – farmakokinetički parametri metotreksata:	64
5. V studija – klinički znaci toksičnosti metotreksata	71
6. VI studija – laboratorijski znaci toksičnosti metotreksata	73
IV. REZULTATI	75
1. STUDIJA I	75

KARAKTERISTIKE ISPITANIKA.....	75
1. Demografske karakteristike ispitanika.....	75
1.1. Razlike između grupa u odnosu na uzrast i telesnu površinu	78
1.2. Razlike između grupa u odnosu na pol	79
2. Kliničke karakteristike ispitanika uključenih u studiju.....	80
2.1. Razlike između grupa u laboratorijskim nalazima.....	85
2. STUDIJA II.....	94
KONCENTRACIJE METOTREKSATA.....	94
1. Koncentracije metotreksata.....	94
2. Razlike u koncentracijama metotreksata između formiranih grupa	98
2.1. Razlike u odnosu na demografske karakteristike.....	101
2.2. Razlika u odnosu na laboratorijske parametre	105
3. STUDIJA III	113
KLIRENS METOTREKSATA	113
1. Klirens metotreksata	113
2. Razlike u klirensu metotreksata između grupa	115
2.1. Razlike u odnosu na demografske karakteristike.....	116
2.2. Povezanost sa demografskim karakteristikama ispitanika.....	118
2.3. Razlike u odnosu na laboratorijske parametre	120
1. STUDIJA IV	124
FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI METOTREKSATA	124
1. Demografske karakteristike ispitanika i koncentracije metotreksata.....	124
2. Farmakometrikinetički parametri.....	127
3. Razlike između grupa u odnosu na farmakokinetičke parametre	131
4. Povezanost sa demografskim karakteristikama ispitanika.....	135
1. STUDIJA V	136
KLINIČKI ZNACI TOKSIČNOSTI METOTREKSATA	136
1. Ciklusi metotreksata sa kliničkim znacima toksičnosti	136
2. Stepni toksičnosti	137
3. Razlika u stepenu ispoljavanja toksičnosti metotreksata između grupa	143
4. Razlike u stepenu ispoljavanja toksičnosti u odnosu na koncentracije metotreksata	147
5. Povezanost sa demografskim karakteristikama ispitanika.....	149
2. STUDIJA VI.....	150
LABORATORIJSKI ZNACI TOKSIČNOSTI METOTREKSATA	150

1. Ciklusi metotreksata sa laboratorijskim znacima toksičnosti	150
2. Stepeni toksičnosti	153
3. Razlike u stepenu ispoljavanja toksičnosti između grupa.....	158
4. Razlike u stepenu ispoljavanja toksičnosti u odnosu na koncentracije metotreksata	163
5. Povezanost sa demografskim karakteristikama ispitanika.....	165
V. DISKUSIJA	167
VI. ZAKLJUČAK	186
VII. LITERATURA.....	188

I. UVOD

METOTREKSAT

1. ISTORIJAT

Početak 1940. godine izolovana je folna kiselina. Otkriveno je da terapija folnom kiselinom može da dovede do izlječenja pacijenata sa megaloblastnom anemijom kod kojih je lečenje vitaminom B12 bilo neuspešno. S obzirom da su pojedine morfološke karakteristike dečje akutne leukemije bile slične megaloblastnoj anemiji, u terapiju akutnih leukemija kod dece uvedene su folna kiselina i konjugati folata. Ovi pokušaji ne samo da su bili neuspešni nego je nova terapija pogoršavala bolest. Međutim, uporedo sa ovim otkrićem uočeno je da deficit folne kiseline, usled načina ishrane, dovodi do smanjenja broja leukemijskih ćelija. Ova saznanja podstakla su dalja istraživanja i potrebu za sintezom antifolata (1).

Prvi slučajevi remisije akutne limfoblastne leukemije (ALL) objavljeni su 1948. godine u radu Farber S. i saradnika (2). U pedijatrijskoj onkologiji remisija bolesti postignuta je primenom aminopterina, antagoniste folne kiseline. Mehanizam delovanja aminopterina je u to vreme bio nepoznat; naknadno se pokazalo da ima snažno inhibitorno dejstvo na dihidrofolat reduktazu (EC 1.5.1.3), enzim koji vrši konverziju folne kiseline u redukovane folate. Dihidrofolat reduktaza (DHFR) i folat zavisni enzimi, zbog esencijalne uloge u sintezi prekursora dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), postali su glavna meta hemoterapije.

Nakon otkrića aminopterina sintetisani su i drugi analozi folne kiseline koji su imali selektivnije dejstvo: pirimetamin i trimetoprim (selektivna inhibicija parazitarne DHFR, selektivna inhibicija bakterijske DHFR, redom). Do 1956. godine aminopterin je bio glavni lek za kliničku upotrebu. Te godine je eksperimentima na obolelim miševima pokazano da novi analog folata, metotreksat, ima superiorniji terapijski indeks. Nadalje, metotreksat je zamenio aminopterin u kliničkoj upotrebi i našao svoje mesto ne samo u lečenju leukemije nego i u terapiji drugih maligniteta (non-Hodgkin limfomi, karcinomi dojke, karcinomi glave i vrata) i pojedinih autoimunih bolesti (reumatoidni artritis, psorijaza) (1).

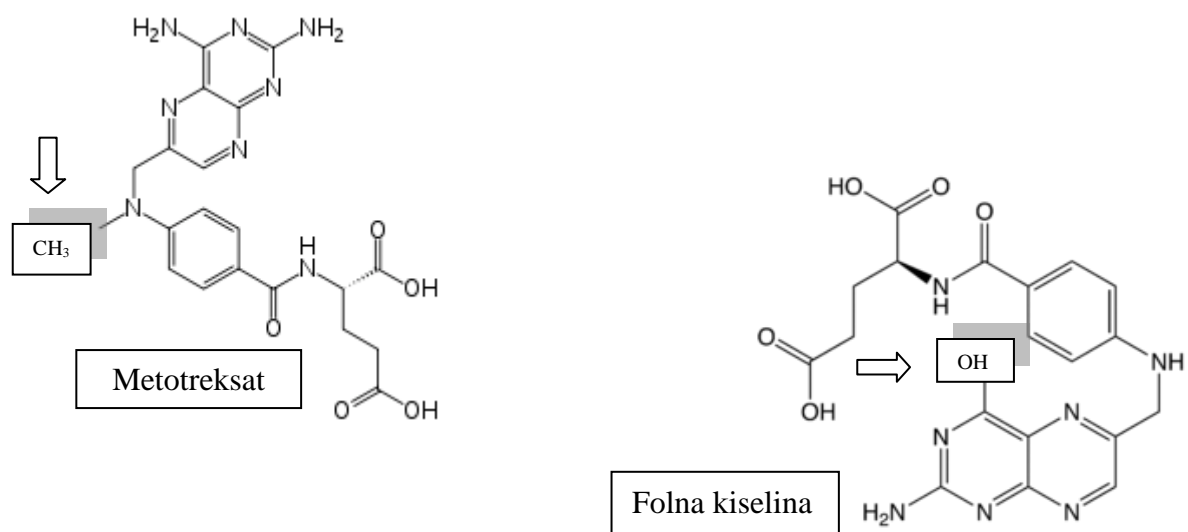
2. HEMIJSKA STRUKTURA I OSOBINE

Metotreksat (MTX) je 4-amino-N10-metil-pteroilglutaminska kiselina.

Razlika između folne (pteroilglutaminske) kiseline i metotreksata je u tome što se na mestu C4 pteridinskog prstena folne kiseline nalazi hidroksilna grupa dok je kod metotreksata prisutna amino grupa; na poziciji N10, za razliku od MTX, folna kiselina nema metil grupu (slika 1).

Metotreksat je takođe poznat i kao ametopterin. Razlikuje se od aminopterina (4-amino analog folne kiseline) u prisustvu metil grupe na N10 poziciji.

S obzirom na sličnosti i razlike molekulske strukture, smatra se da je aktivno mesto ovih jedinjenja pteridinski prsten (3).



Slika 2.1. Molekulska formula metotreksata i folne kiseline

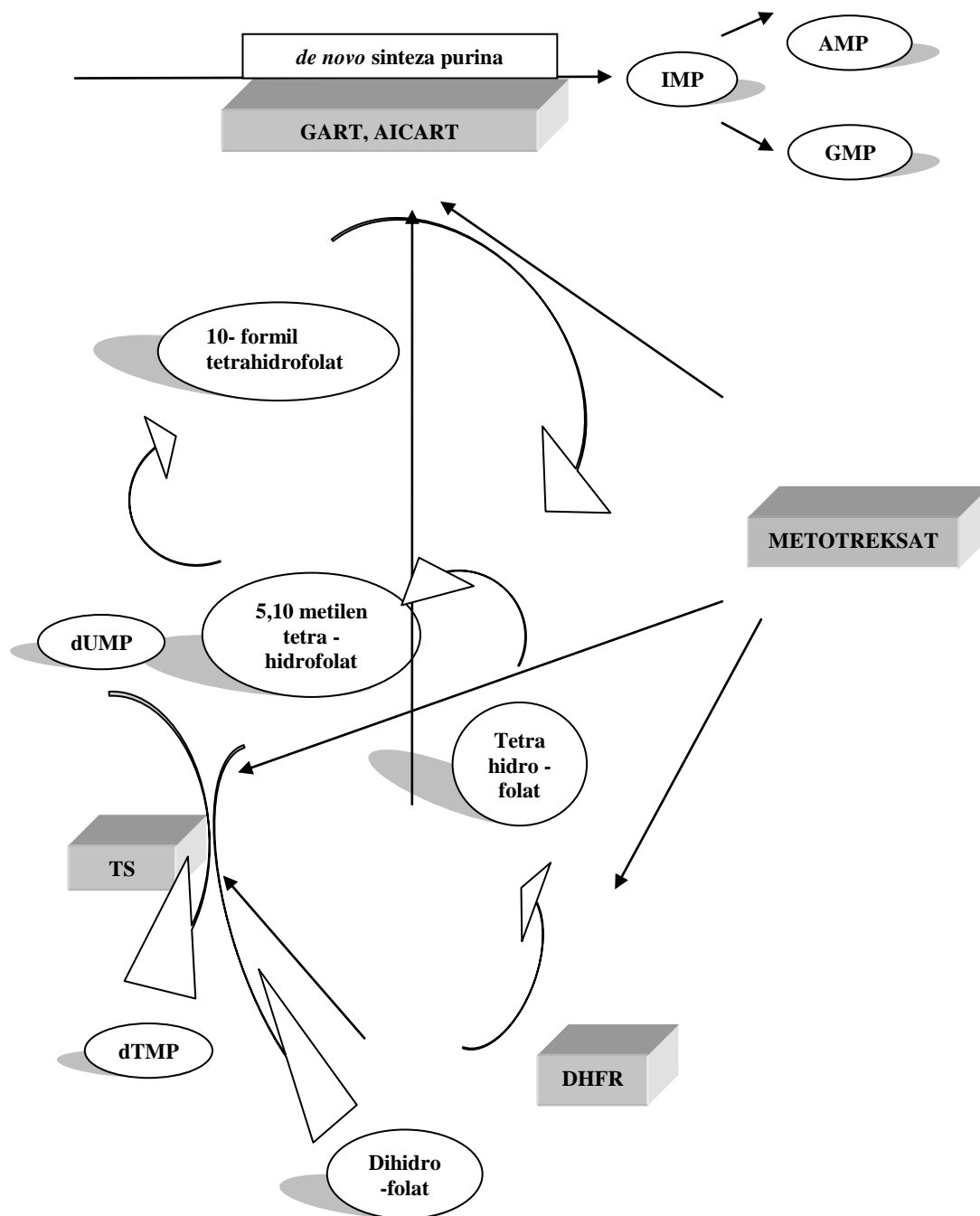
Molekulska masa metotreksata je 454,44. To je slaba bikarboksilna kiselina sa pK_a u rasponu od 4,8 – 5,5. Na fiziološkim vrednostima pH, jonizovan je i nerastvorljiv u lipidnim rastvaračima. Rastvorljiv je u vodi. Rastvoren u vodi na sobnoj temperaturi podleže termalnoj dekompoziciji. Nakon izlaganja ultraljubičastom svetlu dolazi do fotodegradacije metotreksata. U humanom urinu rastvorljivost je direktno proporcionalna pH. Precipitira u kiselom urinu kada mu koncentracija pređe 2×10^{-3} mola, dok je rastvorljivost na pH 7 deset puta veća. S obzirom da terapija visokim dozama neretko daje koncentracije metotreksata u urinu u ovom opsegu, lek se može taložiti u bubrezima i dovesti do njihovog oštećenja. Alkalizacija urina predstavlja prevenciju taloženja metotreksata i posledične nefropatije (3,4).

3. MEHANIZAM DELOVANJA

Metotreksat je antagonista folne kiseline. Po svom antagonističkom dejstvu pripada klasi citotoksičnih agenasa, grupi antimetabolita.

Metotreksat i njegovi metaboliti kompetitivno inhibišu više enzima u metaboličkom putu folne kiseline: dihidrofolat-reduktazu, timidilat sintazu (TS) (EC 2.1.1.45), glicinamid ribonukleotid transformilazu (GARFT) (EC 2.1.2.2) i aminoimidazol karboksamid ribonukleotid transformilazu (AICARFT) (EC 2.1.2.3).

Osnovna aktivnost metotreksata jeste inhibicija dihidrofolat-reduktaze, enzima koji redukuje dihidrofolnu u tetrahidrofolnu kiselinu. Veza je čvrsta ali reverzibilna i MTX je u kompeticiji sa dihidrofolatom u vezivanju za DHFR (4,5). Tetrahidrofolati su neophodni za prenos atoma ugljenika u reakcijama *de novo* sinteze timidilata (prekursor DNK) i purina (adenozin i guanozin, prekursori DNK i RNK). N5-N10-metilen tetrahidrofolat je kofaktor u konverziji deoksiuridin monofosfata (dUMP) u deoksitimidin monofosfat (dTMP), reakcije katalizovanoj enzimom timidilat sintazom (TS). N10-formil tetrahidrofolat donira svoje formil grupe u *de novo* biosintezi purina. U reakcijama biosinteze purina dva enzima odgovorna za dodavanja ugljenika u prstenastu strukturu purina - glicinamid ribonukleotid transformilaza (GARFT) i aminoimidazol karboksamid ribonukleotid transformilaza (AICARFT), predstavljaju ključne mete antifolata (6,7).



Slika 3.1. Shematski prikaz mehanizma delovanja metotreksata. DHFR - dihidrofolat-reduktaza, TS - timidilat sintaza, GARFT - glicinamid ribonukleotid transformilaza, AICARFT - aminoimidazol karboksamid transformilaza, dUMP - deoksiuridin monofosfat, dTMP - deoksitimidin monofosfat, IMP - inozin monofosfat, AMP - adenozin monofosfat, GMP - guanozin monofosfat.

Rezultat inhibicije ovih enzima jeste akumulacija dihidrofolata, deplecija tetrahidrofolata i inhibicija sinteze timidilata i purinskih nukleotida. Krajnji ishod je inhibicija replikacije DNK i smrt ćelije (6,8,9). U osnovi apoptoze uzrokovane metotreksatom jeste oštećenje lanca DNK i njegova neefektivna reparacija, kao posledica deplecije intracelularnih purinskih nukleotida. Apoptoza nastaje i kada se akumuliran dUMP, usled inhibicije timidilat sintaze, inkorporira kao faličan timidin u DNK (7).

Metotreksat uzrokuje i oštećenja sinteze proteina jer su redukovani folati kofaktori u konverziji glicina u serin i homocisteina u metionin. Citotoksičnost može biti pojačana smanjenjem citoplazmatskog nivoa serina i metionina bilo direktno ili indirektno putem povećane osetljivosti ćelije na druge citotoksične efekte metotreksata (7).

Stoga, inhibicija biosinteze DNK metotreksatom je multifaktorijalna i podrazumeva direktni i indirektni put inhibicije. Prvo je direktna inhibicija enzimskih procesa u metabolizmu folne kiseline, dok deplecija redukovanih folata predstavlja indirektni put jer ostavlja intracelularni rezervoar folata u neredukovanom i tako biološki neaktivnom obliku (7,9).

U ljudskom organizmu MTX inhibiše sintezu DNK u većoj meri nego sintezu RNK što upućuje na to da je inhibicija sinteze timidilata najvažniji mehanizam citotoksičnosti. Tako je dejstvo MTX zavisno od ciklusa ćelije delujući primarno tokom S-faze (faza DNK sinteze). Zbog toga su citocidalnom efektu MTX najpodložnija tkiva u kojima se ćelije najbrže dele, sa velikim brojem ćelija u ciklusu (3,5,10).

Sinteza redukovanih folata se nastavlja dok se ne obustavi 95% aktivnosti DHFR (7,11). Zbog inhibicije DHFR povećava se koncentracija dihidrofolata koji su prirodni supstrat timidilat sintaze, pa su za inhibiciju TS potrebne vrlo visoke koncentracije MTX, veće od koncentracije potrebne za blokiranje DHFR (7). Dalje, za inhibiciju sinteze RNK potrebne su još veće koncentracije slobodnog MTX nego za inhibiciju sinteze DNK, a tek iznad ovih koncentracija metotreksata nastupa prestanak sinteze proteina. Ova zapažanja potvrđuju da je za postizanje maksimalnog efekta potrebno održavati ekstracelularni nivo MTX iznad kritične tačke (3).

Ćelijska smrt uzrokovana metotreksatom zavisi od njegove koncentracije i perzistencije, stope influksa u ćeliju, obima poliglutamacije, stope hidrolize poliglutamata u MTX, stope efluksa, kao i prisustva faktora koji inhibišu apoptozu (8).

4. FARMAKOKINETIKA

4.1. RESORPCIJA

Doze metotreksata koje se koriste u terapiji maligniteta su često značajno više od doza u terapiji autoimunih bolesti. Zbog toga se i način administracije može razlikovati kod onkoloških i neonkoloških pacijenata. U onkologiji MTX se najčešće daje intravenskim putem, kao i intratekalnom injekcijom (za prevenciju i terapiju bolesti centralnog nervnog sistema). Pri niskim dozama, ispod 50 mg, daje se uglavnom oralno (12).

Nakon oralne administracije MTX se aktivno apsorbuje preko sluznice proksimalnog jejunuma. Apsorpcija MTX u tankom crevu je ograničenog kapaciteta. Ovaj proces je dozno zavisian i saturabilan, zbog čega biološka iskoristljivost MTX opada grubo linearno sa povećanjem doze (4,13,14). Ranije studije su ukazivale na to da je apsorpcija MTX brza i kompletna nakon oralne administracije doza manjih od 30 mg/m², dok je apsorpcija doza preko 80 mg/m² protrahovana i inkompletna (3,15,16). Novija istraživanja pokazuju da apsorpcija MTX nakon oralne administracije ima raspon biološke iskoristljivosti od 13 do 76%. Pri dozama ispod 40 mg/m² oralna apsorpcija je veća, sa biološkom iskoristljivošću 42%, nego pri dozama iznad 40 mg/m², sa biološkom iskoristljivošću 18% (12). Ipak, postoji naglašena interindividualna varijabilnost u stopi i obimu apsorpcije oralnog MTX (13,14,17). Tako apsolutna biološka iskoristljivost leka može biti manja od 50% i pri niskim dozama MTX od 10-15 mg/m² (13).

Procentualno, interindividualna varijabilnost se kreće od 30 do 90 % (13), odnosno pokazan je četvorostruki raspon u apsorbovanoj dozi i petostruki raspon u vremenu dostizanja maksimalne koncentracije u serumu (17). Nakon oralne administracije leka našte, maksimalna serumska koncentracija (C_{max}) MTX kreće se između 0,3 i 1,6 μmol/l i javlja se na maksimalnom vremenu (t_{max}) 0,75 do 2 sata nakon adinistracije (13). Nasuprot tome, intraindividualna varijabilnost je umerena čak i u dugom vremenskom periodu (13,14). Ispitivanja farmakokinetike niskih doza MTX date oralnim putem kod dece sa ALL takođe je pokazala zavisnost od doze i visoku varijabilnost među decom. Pri dozama ispod 30 mg/m², 70-80% oralne doze je apsorbovano, a pri dozama preko 80 mg/m² apsorbovano je 50-70% oralne doze (15).

Lek se brže resorbuje i dostiže više koncentracije u serumu nakon intramuskularne (i.m.) ili subkutane (s.c.) administracije u poređenju sa oralnim putem davanja (13). Kod dugotrajne upotrebe, u inflamatornim oboljenjima i u terapiji održavanja kod leukemije, MTX se davao intramuskularno. Resorpcija nakon i.m. administracije je brza i kompletna; maksimalna koncentracija u serumu se postiže za oko 1 sat. Unutar doznog ranga od 7,5 do 25 mg, farmakokinetika intramuskularne primene MTX je linearna (4).

MTX se može davati i subkutano. Pri niskim dozama bioraspoloživost s.c. datog MTX je ekvivalentna oralno datom MTX, ali kod srednjih doza (40 mg/m^2), bioraspoloživost je oko tri puta veća nego kod iste doze date oralnim putem. Komparativne studije sa i.m. i s.c. davanjem MTX pokazale su jednaku bioraspoloživost (4), odnosno komparabilne farmakokinetike, pa su ova dva puta administracije međusobno izmenjiva (4,14).

Nakon administracije u cerebrospinalnu tečnost (intratekalno), resorpcija MTX iz centralnog nervnog sistema (CNS) u plazmu sporo napreduje. Posledica je održavanje nivoa leka u plazmi iznad citotoksičnog praga, zbog čega je potencijal za sistemsku toksičnost MTX posle intratekalne administracije veći nego nakon iste doze date sistemski (3).

4.2. DISTRIBUCIJA

Zbog varijacija u apsorpciji, MTX se pri većim dozama daje intravenski (i.v.) (6,7,12). Nakon i.v. administracije MTX se vezuje za serumske proteine, pretežno albumine. U humanoj plazmi je oko 50 % MTX vezano za serumske albumine (Bleyer (3): 50 do 70 %, Bannwarth (14): 42 do 57%, Grim (13): 30 do 70%, Green (7): 50%, Walling (6): 60 %). Kratko nakon i.v. primene, MTX se distribuira unutar inicijalnog volumena od približno 18% telesne mase. Volumen ravnotežnog stanja iznosi 40 do 80% telesne mase (3,18), odnosno prema Bannwarth (14): oko 1 l/kg, Green (7): 0,2 do 0,8 l/kg, Grim (13): 0,87 do 1,43 l/kg. Poluvreme distribucije za visoke doze MTX je oko 0,75 sata nakon i.v. administracije (7).

Metotreksat se distribuira u tkiva i ekstravaskularne kompartmane (14). Najviše tkivne koncentracije MTX postižu se u jetri, bubrezima i gastrointestinalnom traktu. Koncentracije MTX se linearno povećavaju sa povećanjem doze (4). Ulazak sistemski datog MTX u CNS usporava

krvno-moždana barijera (3), i zavisan je od doze. Citocidalne koncentracije u cerebrospinalnoj tečnosti (CST) se postižu tek pri dozama od 500 mg/m² i višim (18). Kao napomenuto, nakon intratekalne administracije, resorpcija MTX u sistemsku cirkulaciju sporo napreduje sa poluvremenom eliminacije ($t_{1/2}$) 8-10 h (3,18) zbog čega je potencijal za sistemsku toksičnost MTX veći nego nakon iste doze date sistemski (3). Poluživot metotreksata u CNS, mereno preko koncentracije MTX u CST, iznosi 7 do 16 sati, zavisno od propustljivosti krvno-moždane barijere (7). Vezivanje metotreksata za proteine intersticijske tečnosti je u rasponu od 0 do 17 % (3).

U tečnost trećeg prostora (pleuralni i perikardijalni izliv, ascites), MTX ulazi polako sa karakteristikama koje podsećaju na pasivni transportni sistem (7). Ravnotežno stanje sa plazmom se postiže nakon približno 6 sati (6). Mesta trećeg prostora se mogu ponašati kao rezervoari i uzrokovati produženo povišene nivoe MTX, kako pasivno difunduje iz trećeg prostora u cirkulaciju. Čak i mala kolekcija tečnosti u trećem prostoru može dovesti do produženo povišenih nivoa serumskog MTX (3,7).

Nakon distribucije u tkiva MTX se transportuje u ćelije gde se metaboliše (14).

4.3. ELIMINACIJA

Eliminacija MTX iz plazme se odvija u tri faze. Inicijalna faza predstavlja brzu distribuciju leka u tkiva, koja je opisana u prethodnom poglavlju. Poluvreme eliminacije inicijalne faze ($t_{1/2}$) je Egan (4): približno pola sata, Kufe (18): 0,5 do 0,75 h, Bleyer (3): 0,75 ± 0,11 h. Druga faza predstavlja metabolizam i ekskreciju (renalnu i bilijarnu) metotreksata sa poluvremenom eliminacije prema Egan (4): 3,5 h, Kufe (18): 3 do 4 h, Bleyer (3): 2,06 ± 0,16 h. Terminalana faza eliminacije (eliminacija i klirens iz trećeg prostora i enterohepatična recirkulacija) ima poluvreme – Kufe (18): 6 do 20 h, Walling (6): 8 do 27 h i produženo je kod pacijenata sa renalnom disfunkcijom ili akumulacijom u trećem prostoru, Bleyer (3): 10,4±1,8h. Počinje kada se koncentracija u plazmi približi 10⁻⁷ mola, oko 6-24 h nakon administracije konvencionalne doze, odnosno 30-48 h nakon terapije visokom dozom MTX (3). Autor Grim (14) u svom radu navodi da se eliminacija MTX iz plazme pokazala kao bifazična ili trifazična zavisno od dužine perioda sakupljanja uzoraka, sa srednjim $t_{1/2}$ od 6-15 h (u studijama Levêque (13): $t_{1/2}$ MTX približno 8-15

h, i Bannwarth (14): 5 do 8 sati). Sa produženim vremenom uzorkovanja duži je očitani poluživot eliminacije, verovatno zbog intracelularnog nagomilavanja leka, poliglutamacije i sporog otpuštanja MTX nazad u plazmu (13). Sistemska eliminacija MTX ne zavisi samo od organske funkcije već i od količine ukupne doze. Doze manje od 30 mg/m^2 imaju poluživot ukupnog klirensa 3-10 sati, dok doze veće od 30 mg/m^2 imaju poluživot ukupnog klirensa 8-12 h. Sa visokim dozama MTX, vreme polueliminacije može biti i duže (7).

4.3.1. METABOLIZAM

Postoje dva glavna puta metabolizma metotreksata: 7-hidroksilacija i poliglutamacija.

Reakciju 7-hidroksilacije katalizuje jetrena aldehyd-oksidaza pri čemu nastaje 7-hidroksi-metotreksat (7-OH-MTX) (3,5,19). Efekat prvog prolaza MTX kroz jetru je nizak, oko 10 %, kao što je i metabolički klirens MTX u 7-OH-MTX: 5-7 % doze se detektuje u urinu nakon širokog raspona administrovanih doza. Međutim, zbog sporije stope urinarne ekskrecije, koncentracije 7-OH-MTX u plazmi obično budu više od početnih koncentracija MTX unutar 8-10 sati nakon administracije. Uprkos svom ekstenzivnom vezivanju za serumske albumine (91-93%), 7-OH-MTX ne utiče na vezivanje MTX za albumin (13). Iako 10 puta slabijeg dejstva na DHFR (13), 7-OH-MTX potentniji je inhibitor aminoimidazol-karboksamid transformilaze (AICARFT) od MTX (4). U humanom urinu je četiri puta manje rastvorljiv od MTX zbog čega je odgovoran za nefrotoksičnost koja se može javiti pri terapiji visokim dozama metotreksata (3,5,19).

Reakcija poliglutamacije obuhvata i MTX i 7-OH-MTX. Predstavlja metabolički put koji omogućava selektivno zadržavanje antifolata unutar ćelije (19). Poliglutamacija se odigrava intracelularno, a MTX može biti transportovan u ćelije preko dva energetska zavisna sistema. Endocitoza je prvi način ulaska MTX u ćeliju i odvija se preko folatnih receptora vezanih za ćelijsku membranu. Formirane vezikule se invaginiraju i migriraju u citoplazmu gde se kompleks MTX-folatni receptor prekida oslobađajući MTX. Ovaj sistem je manjeg kapaciteta i ima veći afinitet za redukovane folate nego za MTX. Drugi, predominantan transporter MTX u većini malignih ćelija je proteinski nosač redukovanih folata (RFC - reduced folate carrier). Ima veći afinitet za redukovane folate i MTX u poređenju sa folnom kiselinom (7,9,20). Transport putem RFC je bidirekcion, velikog kapaciteta i zavisan od pH, energije i temperature (5). Na kraju, MTX

može ući u ćelije i pasivnim putem kada mu je ekstracelularna koncentracija mnogo veća od intracelularne koncentracije slobodnog MTX (7).

Pošto je u ćeliji, MTX podleže poliglutamaciji koja se odvija posredstvom enzima folilpoliglutamat sintetaze - FPGS (EC 6.3.2.17). Dodajući glutamil grupe metotreksatu, FPGS gradi aktivne metabolite zvane poliglutamati. Metotreksat poliglutamati (MTXPG) deluju unutar ćelije (naročito u hepatocitima, eritrocitima i tumorskim ćelijama (11)) i predstavljaju više od 50% intracelularnog leka 24 sata nakon administracije. MTXPG su potentni inhibitori DHFR i imaju velik značaj u inhibiciji folat zavisnih enzima distalno od DHFR: timidilat-sintaze, glicinamid-ribonukleotid transformilaze i aminoimidazol-karboksamid ribonukleotid formiltransferaza (4,8,9,21). Potentnost poliglutamata u inhibiciji DHFR je ista ili nešto veća u odnosu na MTX, dok se dejstvo na druge folat zavisne enzime povećava sa porastom dužine lanca, odnosno brojem dodatih glutamil grupa (6). Tako su poliglutamati dugačkog lanca snažniji inhibitori ciljnih enzima i zadržavaju se u ćeliji duži vremenski period prolongirajući antifolatno dejstvo (21). Broj dodatih rezidua na MTX je u funkciji vremena; veći broj se dodaje sa dužim intracelularnim zadržavanjem (7). MTXPG mogu imati dodatih - Gorlick (8): pet, Green (7) i Grim (13): šest, Panetta (21): sedam i Walling (6): osam glutamat rezidua. Istraživanja pokazuju da ćelije moraju biti izložene metotreksatu 12 do 24 sata na serumskoj koncentraciji većoj od 2 $\mu\text{mol/l}$ pre nego što dođe do signifikantne poliglutamacije (7).

Koncentracija MTXPG unutar ćelije kontrolisana je ravnotežom između aktivnosti folilpoliglutamat sintetaze i γ -glutamil hidrolaze (EC 3.4.19.9) (22). Dejstvo egzopeptidaze γ -glutamil hidrolaze (GGH) ispoljava se u lizozomima gde katalizuje hidrolizu unutarćelijskih poliglutamata. Nastali monoglutamat oblici metotreksata brzo izlaze iz lizozoma i napuštaju ćeliju (9).

Poliglutamacija je značajan faktor toksičnosti jer su MTXPG snažni inhibitori enzima metaboličkog puta folne kiseline. Sposobnost ćelija da akumuliraju intracelularne metabolite metotreksata važan je faktor njegovog antileukemijskog efekta (23).

Postoji i treći put metabolizma MTX koji se dešava u gastrointestinalnom traktu. Intestinalne bakterije hidrolizuju MTX do pteroata, 4-amino-4-deoksi-N10-metilpteroična kiselina (dAMPA) i glutaminske kiseline. Ovaj metabolit je relativno neaktivan, ima tek dvestoti deo afiniteta MTX za DHFR. Obuhvata manje od 5% date doze koja se detektuje u urinu i vrlo retko se može detektovati u plazmi (13,18).

4.3.2. EKSKRECIJA

Nakon uklanjanja rezidua glutamata, MTX ponovo ulazi u cirkulaciju gde se ekskretuje bubrezima ili se metaboliše u jetri. Kada je u krvi u visokoj koncentraciji MTX ulazi u gastrointestinalni trakt i u enterohepatičnu cirkulaciju. Kako je navedeno, u gastrointestinalnom traktu MTX se metaboliše do 4-amino-4-deoksi-N10-metilpteroične kiseline (dAMPA), što predstavlja 5 % pa i do 10 % (kod visokih doza MTX) ukupne eliminacije. Drugi metabolit, 7-OH-MTX nastao degradacijom MTX u jetri, obuhvata do 10 % ukupnog klirensa MTX (7). Na ovaj način, aktivna bilijarna ekskrecija obuhvata, prema autorima - Grim (13): 10 do 30 % ukupnog klirensa MTX, - Groninger (15): 10 % totalnog sistemskog klirensa i važna je kod pacijenata sa gastrointestinalnom opstrukcijom jer prolongirana reapsorpcija MTX u ovim slučajevima povećava terminalni poluživot MTX u serumu. Međutim, samo 1 do 2 % i.v. datog leka se ekskretuje fecesom, što ukazuje na ekstenzivnu enterohepatičku recirkulaciju MTX, odnosno da se većina leka izlučena u žuč reapsorbuje u crevnoj mukozi (3,4,13). Kod oralne administracije, fekalna ekskrecija je proporcionalna dozi, što je predodređeno limitom intestinalne apsorpcije, sa 4,6% od totalne doze pri primeni 30 mg/m² i 28,6% ukupne doze od 80 mg/m² (3,4).

Osnovni put ukupnog klirensa MTX odvija se putem renalne ekskrecije. Lek se filtrira u glomerulima bubrega i dodatno podleže bidirekcionom transportu preko renalnih tubula, aktivnom sekrecijom i aktivnom reapsorpcijom (3,7,13,14). Postoje tri faze renalnog klirensa MTX. Prva faza se dešava brzo, odvija se glomerularnom filtracijom ali dovodi do vrlo malog klirensa. Druga faza obuhvata i glomerularnu filtraciju i tubularnu sekreciju, ima poluživot 2-3 h i traje 12 do 24 h. Do 90% ukupne renalne ekskrecije se dešava tokom ove faze. Treća faza renalne ekskrecije je tubularna sekrecija, ima poluživot 1,5-2 sata i traje do 10 h (7).

Na serumskim koncentracijama MTX od 0,1-0,4 µmol/l, tubularna sekrecija preovladava reapsorpciju koja postaje zasićena. Prema tome, renalni klirens (Cl_R) obično prevazilazi klirens kreatinina (Cl_{Cr}). Na koncentracijama od 0,6-1 µmol/l renalni klirens se izjednačava sa klirensom kreatinina (80-120 ml/min) odražavajući saturaciju aktivne tubularne sekrecije MTX. Postoji značajna interindividualna varijacija u tački saturacije i sekrecije i reapsorpcije u tubulima. Oba procesa mogu biti povremeno saturisana čak i na niskim koncentracijama MTX u plazmi u rasponu od 0,1-1 µmol/l (13). Većina autora saglasna je da je farmakokinetika metotreksata linearna

(30,92,93). Međutim, zbog razlike u saturaciji ova dva procesa može postojati nelinearna eliminaciona farmakokinetika MTX (13,14). Dozno zavisna farmakokinetika MTX moguće da postoji i zbog saturacije renalne tubularne sekrecije pri višim serumskim koncentracijama MTX, što objašnjava smanjenja renalnog klirensa MTX sa povećanjem doze (15).

MTX pokazuje vrlo varijabilan ukupni klirens ($40-400 \text{ ml/min/m}^2$) (12). U uslovima očuvane renalne funkcije klirens MTX iz plazme je 110 ml/min/m^2 , od čega je renalni klirens 103 ml/min/m^2 (3). Kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije sistemski klirens MTX je visoko varijabilan nakon intermedijerne i visoke doze, sa srednjom vrednošću od 78 do $91,6 \text{ ml/min/m}^2$. Kod odraslih sistemski klirens nakon $750-1000 \text{ mg/m}^2$ i.v. doze MTX značajno je manji nego kod dece nakon 1000 mg/m^2 . Pri višim dozama MTX ($2-33,6 \text{ g/m}^2$) primećeno je smanjenje klirensa sa starijim uzrastom i kod dece obolele od ALL i osteosarkoma kao i kod odraslih. Pokazano je da je klirens MTX kod dece sa ALL zavisan i od doze. Klirens MTX pri dozi od $0,5 \text{ g/m}^2$ značajno je veći od klirensa pri dozama od 3 do $33,6 \text{ g/m}^2$. Takođe, klirens MTX je veći nakon niske doze primenjene oralno u poređenju sa i.v. davanjem HDMTX što može biti objašnjeno dozno zavisnom farmakokinetikom MTX (15).

5. VISOKE DOZE METOTREKSATA

Metotreksat, najšire korišćen antimetabolit u terapiji malignih oboljenja, ima tri karakteristike koje doprinose njegovom naznačenom mestu u terapiji maligniteta: 1. Jedini je citostatik koji ima antidot u kliničkoj upotrebi (leukovorin); 2. Ima najširi opseg doza: $3-33.600 \text{ mg/m}^2$; 3. Jedini je antikancerski lek kod kojeg se rutinski prate serumske koncentracije (24).

S obzirom na to da citotoksični efekti metotreksata mogu biti antagonizovani aktivisanom folnom kiselinom (leukovorinom), u terapiji metotreksata moguća je upotreba eskalirajućih doza za razliku od ostalih antineoplastika. U randomiziranim studijama pokazano je da su veće doze metotreksata povezane sa većim antileukemijskim efektom, ocenjeno perifernom redukcijom blasta (25).

Osnov za primenu visokih doza metotreksata (High-dose MTX, HDMTX) jeste prevazilaženje rezistencije na lek i prodiranje leka i do teže dostupnih delova organizma (26).

Terapijom HDMTX postižu se citotoksične koncentracije na udaljenim mestima ekstramedularne leukemije (cerebrospinalna tečnost, testisi) u koja se MTX pri terapiji malim dozama (Low-dose MTX, LDMTX) ne distribuira odmah (25,27). Visokim dozama metotreksata povećava se pasivna difuzija i aktivni transport metotreksata u rezistentne tumorske ćelije i postiže se veći stepen poliglutamacije metotreksata (11).

Definicija HDMTX terapije je varirala tokom vremena. U početku se pretpostavljalo da je letalna doza MTX oko 200 mg/m^2 . Međutim, sredinom 1970-tih godina doza za infuzionu primenu je povećana na 500 mg/m^2 nakon koje je sprovedena terapija spasavanja leukovorinom (LV). Ovako povećana doza metotreksata prvo je dobila naziv HDMTX; posle je termin modifikovan u „intermediate-dose“ MTX (IDMTX). Početkom 1980-tih doza intravenskog MTX je rasla, praćena intenzivnijom upotrebom LV. Na ovaj način, stopa CNS relapsa je značajno smanjena u poređenju sa IDMTX protokolima (26). Danas se HDMTX definiše kao doza prema - Treon (28) i Holmboe (29): veća od 1 g/m^2 , Faltaos (30) i Mikkelsen (31): $1\text{-}8 \text{ g/m}^2$, Schmiegelow (11): $0,5 \text{ do } 12 \text{ g/m}^2$, Fisgin (32): 4-24-satna i.v. infuzija $1\text{-}33,6 \text{ g/m}^2$. U savremenim terapijskim protokolima za dečju ALL većina zemalja sadrži HDMTX u doznom rasponu od $5 \text{ do } 8 \text{ g/m}^2$ (26).

Primenom HDMTX postižu se terapijski efektivne koncentracije što podrazumeva koncentracije metotreksata u ravnotežnom stanju od $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ (24). U svom radu Faltaos i saradnici (30) navode da je koncentracija ravnotežnog stanja iznad $16 \text{ } \mu\text{mol/l}$ povezana sa smanjenim rizikom od relapsa bolesti. Retrospektivnom studijom Xu i saradnika (33) pokazano je da vrednosti koncentracija metotreksata u plazmi kod većine dece sa ALL lečene HDMTX variraju u rasponu od $10 \text{ do } 100 \text{ } \mu\text{mol/l}$ 24 sata nakon administracije, a potom padaju na $0,1 \text{ do } 1,0 \text{ } \mu\text{mol/l}$ 48 sati, i do ispod $0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$ 96 sati nakon administracije. Benefit HDMTX terapije, u dozi $\geq 1 \text{ g/m}^2$, u suprotnosti sa konvencionalnim dozama $< 1 \text{ g/m}^2$, značajan je u terapiji pedijatrijskih ALL. MTX u konvencionalnim dozama (500 mg/m^2) ne može da štiti adekvatno od relapsa CNS-a. Ovo je najverovatnije posledica činjenice da se konvencionalnim dozama (500 mg/m^2) jedva postižu citotoksične koncentracije metotreksata u cerebrospinalnoj tečnosti ($0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$). Nasuprot tome, MTX u dozi od $33,6 \text{ g/m}^2$ dostiže čak 100 puta veće koncentracije u CST ($10 \text{ } \mu\text{mol/l}$). I manje doze HDMTX ($3\text{-}7,5 \text{ g/m}^2$) su takođe sposobne da dostignu više koncentracije u CST ($1 \text{ } \mu\text{mol/l}$) (28).

Promena doze ili trajanja infuzije HDMTX, fokus je strategije za prevazilaženje interindividualnih razlika u akumulaciji MTXPG (31), jer citotoksičan efekat metotreksata zavisi od koncentracije i od vremena izlaganja leku (28,34,35). Prilikom poređenja terapije HD i LDMTX,

pokazano je da su veće koncentracije aktivnih metabolita metotreksata u ciljnim tkivima povezane sa većim antileukemijskim efektom u B-ćelijskim ALL te da je HDMTX superiorna u odnosu na LDMTX u postizanju ovih intracelularnih koncentracija. Razlika je bila evidentna čak iako je doza LDMTX bila veća od konvencionalne LD terapije u većini protokola (180 mg/m² vs 20-40 mg/m²) (27).

Proučavanje dužine izlaganja leku, u radu Mikkelsen i saradnika (31) pokazano je da 24 - satna infuzija proizvodi znatno više koncentracije MTXPG u leukemijskim ćelijama kosne srži *in vivo* u poređenju sa 4 - satnom infuzijom HDMTX (1 g/m²). Vreme izlaganja metotreksatu iznad 1 µmol/l bilo je 2,5 puta duže za 24 h-infuziju što je značajno povezano sa nivoom MTXPG u leukemijskim ćelijama. Nalaz je u skladu sa hipotezom da zbog saturacije, preuzimanja i metabolizma metotreksata, duže izlaganje umerenim koncentracijama u prednosti je od kratkog izlaganja vrlo visokim koncentracijama metotreksata (31). Međutim, poznato je da postoje i drugi faktori koji doprinose velikoj varijabilnosti u akumulaciji MTXPG: tip ALL, ploidnost, molekularni subtip, genom za ekspresiju folatnog puta (23). U pomenutoj studiji, nivo MTXPG u leukemijskim ćelijama značajno je varirao među subtipovima ALL bez obzira na dužinu infuzije. Pokazano je da je dužina infuzije imala naglašeniji efekat u T-ćelijskoj ALL a potom i u hiperploidnoj B-ćelijskoj ALL, gde je 24 h-infuzija proizvodila veću akumulaciju MTXPG u leukemijskim ćelijama kosne srži sa boljim antileukemijskim efektom, u poređenu sa kraćom infuzijom. Nasuprot tome, kod pacijenata sa t(12;21)/(ETV6-RUNX1) nije pokazana veća akumulacija MTXPG nakon 24 h-infuzije (mada je antileukemijski efekat bio komparabilan sa drugim subtipovima ALL uprkos manjoj akumulaciji MTXPG), što ukazuje da bi HDMTX tokom 4 h-infuzije mogla biti adekvatna za ove pacijente (31).

HDMTX terapija zajedno sa intratekalnom administracijom metotreksata prihvaćena je generalno kao efikasan režim u prevenciji zahvatanja CNS-a kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije, odnosno alternativu zračenja kranijuma kao profilaktičke terapije leukemije CNS-a, a koja uzrokuje ozbiljne neželjene efekte na mozgu (26,33). Tokom 1960-tih godina u porastu je bio broj preživlele dece sa dijagnozom ALL, kao rezultat dugotrajnih terapija. Na nesreću, više od polovine je razvilo relaps bolesti CNS-a, zbog čega je zračenje kranijuma uvedeno kao profilaktička mera početkom 1970-tih godina i to je dramatično poboljšalo prognozu ALL. Tada je većina protokola za decu uključivala kombinaciju kranijalne radioterapije, intratekalne i intravenske primene metotreksata i dugoročno „preživljavanje bez bolesti“ se postizalo u oko 70 % dece sa

ALL (26). Međutim, od sredine 1970-tih poznato je da radioterapija može izazvati sekundarne neoplazije kod 17% u periodu od dve decenije (5-25 godina nakon inicijalne dijagnoze) (36). Pored tumora, zračenje mozga može izazvati i neurotoksičnost kod više od 80% dece. Ovakav ishod je promenio fokus pažnje na kvalitet života preživelih, kao i na redukciju dugoročnih sekvela uzrokovanih terapijom. Zbog ovih štetnih efekata većina protokola za ALL su limitirala standarde za profilaksu CNS-a na kombinaciju intratekalne i intravenske primene metotreksata. Dodavanje radioterapije kao profilakse CNS-a je uglavnom ograničeno na mali broj slučajeva koji su klasifikovani kao visoko rizični, to jest kod pacijenata u ozbiljnoj opasnosti od razvoja relapsa CNS-a (26).

6. LEUKOVORIN

Na ukupni antileukemijski efekat terapije metotreksata, pored doze i trajanja administracije (dužina infuzije) utiče i intenzitet spasavanja folnom kiselinom, leukovorinom (11,25). Terapijski režimi HDMTX, inače letalnih doza, bili bi smrtonosni da nisu praćeni multiplim dozama leukovorina (LV) u cilju sprečavanja toksičnog efekta metotreksata, odnosno zaobilaska metaboličke blokade izazvane metoteksatom. Otuda termin „spasavanje leukovorinom“. Uspešno spasavanje leukovorinom zavisi od brzine renalne eliminacije metotreksata koji zahteva agresivnu hidraciju pre i posle terapije uz alkalizaciju urina. Kao navedeno, upotreba leukovorina olakšala je povećavanje doza metotreksata do postizanja visokih koncentracija u plazmi sa poboljšanjem antikancerskog kao i citotoksičnog efekta (29). Upotreba leukovorina je započeta nakon što je pokazano da je smrtnost usled leka značajno manja kad je LV dat zajedno sa metoteksatom miševima kojima su inokulisane leukemijske ćelije. Međutim, sveukupno preživljavanje se popravilo samo kod onih životinja koje su LV primile odloženo, 12 h nakon MTX injekcije, a ne istovremeno sa metoteksatom. Vreme „spasavanja“, pak, značajno utiče na sveukupno preživljavanje bez bolesti, popravljajući odnos spasavanja normalnih nasuprot malignih ćelja (28).

Leukovorin, N5-formil- tetrahidrofolat, biohemijski je antidot metoteksatu (37). *In vivo*, pretvara se u N5-metil-tetrahidrofolat (MTHF), koji je glavni redukovani folat u cirkulaciji i ima ulogu u popunjavanju intracelularnog rezervoara redukovanih folata neophodnih za sintezu purina i timidilata (28,37). Pored nadoknade intracelularnog rezervoara redukovanih folata, ekstracelularne

koncentracije LV u višku se takođe takmiče sa metotreksatom za aktivni transport u ćelije. Spasavanje MTHF-om je takodje dokazano, međutim, LV, mnogo stabilnija forma redukovanog folata, poželjniji je farmakološki lek za poništavanje toksičnosti uzrokovane metotreksatom. LV je mešavina stereoizomera od kojih je L-izomer metabolički aktivan, tako da samo oko 50 % date doze je stvarno aktivan lek (28).

Započinjanje, doza i frekvencija spasavanja leukovorinom je razvijena empirijski i razlikuje se u zavisnosti od režima terapije HDMTX (28). U terapiji dečjih ALL, LV se najčešće uključuje 36 do 42 sata od započinjanja terapije HDMTX. Trajanje LV spasavanja je takođe važan momenat i nastavlja se sve dok koncentracija metotreksata u serumu ne padne ispod 0,1-0,25 $\mu\text{mol/l}$ (38). Treon i saradnici (28) navode da je kritična koncentracija metotreksata u serumu 0,01 $\mu\text{mol/l}$, jer veće koncentracije inhibišu proliferaciju kosne srži. Tek pri koncentraciji metotreksata ispod 0,01 $\mu\text{mol/l}$, prirodni cirkulišući folati dovoljni su da spreče citotoksičnost. U svom radu Bleyer (3) navodi da terapija leukovorinom može biti prekinuta kada koncentracije metotreksata padnu ispod 0,1 $\mu\text{mol/l}$, optimalno ispod 0,08 $\mu\text{mol/l}$. Serumske koncentracije metotreksata iznad 0,1 $\mu\text{mol/l}$ 48 sati nakon i.v. administracije smatraju se toksičnim i zahtevaju veće doze uz eventualno kontinuiranu terapiju leukovorinom zbog kratkog poluživota L-diastereoizomera (37).

Međutim, istraživanja *in vivo* i *in vitro* upućuju na to da više doze LV ili ranija administracija mogu biti povezane sa većim rizikom od relapsa bolesti, verovatno spasavajući maligne ćelije od efekta HDMTX. U istraživanju na pedijatrijskoj populaciji sa ALL sakupljenih iz baze NOPHO (Nordic society of pediatric haematology and oncology), Skärby i saradnici (38) su pokazali da su visoke doze LV povezane sa povećanim rizikom od relapsa uprkos činjenici da su doze LV korelisane sa visokim nivoima metotreksata i dužoj eliminaciji metotreksata. Rezultati upućuju da izbor doza metotreksata i leukovorina mora biti balansiran između efekta i kontraefekta i da doze LV moraju biti smanjene što je moguće više (bez netolerabilnog toksičnog efekta). Iako mehanizmi nisu u potpunosti shvaćeni, rezultati ove studije su imali uticaja na dizajn novog protokola NOPHO (NOPHO ALL 2000) u kojima je doza LV smanjena u odnosu na prethodni protokol iz 1992. godine.

Alternativa terapiji spasavanja može biti primena timidina čija je uloga popunjavanje intracelularnog depoa timidilata. Može biti kombinovan sa leukovorinom kod pacijenata sa toksičnim nivoima metotreksata. Mora biti primenjen u visokim dozama u kontinuiranoj infuziji zbog brzog klirensa. U terapiji spasavanja takođe se može koristiti i karboksipeptidaza G (CPDG)

(EC 3.4.17.11). Uloga CPDG je smanjenje ekstracelularne koncentracije metotreksata razlažući ga do neaktivnih metabolita (glutamat i dAMPA). Istraživane su i ekstrarenalne metode kao što su hemodijaliza, hemoperfuzija i hemodiafiltracija (37).

Zbog svega navedenog, pitanje optimalne doze metotreksata, adekvatne dužine infuzije leka i adekvatno spasavanje leukovorinom ostaje kontroverzno (25,26,28).

7. REZISTENCIJA NA METOTREKSAT

Metotreksat je ključni lek u terapiji dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom, dok je kod pacijenata sa akutnom mijeloidnom leukemijom (AML) samo u 10 % slučajeva efikasan. Razvoj rezistencije na metotreksat je ograničavajući faktor upotrebe ovog leka. Mehanizam urođene ili stečene rezistencije na MTX je proučavan u eksperimentalnim sistemima i kod pacijenata obolelih od leukemije u cilju sticanja informacija koje bi mogle dovesti do poboljšanja u upotrebi metotreksata kao i razvoju boljih lekova (9).

In vitro i *in vivo* studijama, izlaganje povećanim dozama metotreksata dovodi do smrti većine tumorskih ćelija pa selekcijom preživljavaju samo rezistentne ćelije (8). Opisani su razni mehanizmi rezistencije, urođeni i stečeni: 1) defektan transport metotreksata, 2) povišen nivo DHFR, 3) smanjen afinitet metotreksata za DHFR, 4) smanjena akumulacija MTXPG, 5) povećan efluks metotreksata (8,9,22) .

Defektan transport metotreksata je čest mehanizam stečene rezistencije na MTX; može biti važan faktor rezistencije u ALL kod dece (9). Nastaje zbog smanjene količine ili funkcije proteina nosača redukovanih folata (RFC), a posledica je smanjene transkripcije ili mutacije u genu za RFC. Na ovaj način influx metotreksata u ćelije je smanjen (8).

Povišen nivo DHFR drugi je najčešći mehanizam stečene rezistencije na MTX. Ovako povećana aktivnost ovog enzima nastaje zbog amplifikacije njegovog gena i povećane translacije dihidrofolat reduktaze (8,9,22).

Smanjen afinitet metotreksata ili MTXPG za DHFR-u nastaje zbog mutacije u enzimu DHFR i takođe je primećen u tumorima. Dok je mutiran enzim DHFR relativno neuobičajen uzrok

rezistencije tumorskih ćelija, rezistencija na folatni antagonist pirimetamin u terapiji malarije je često povezan sa mutacijama u DHFR genu (8).

Smanjena akumulacija MTXPG nastaje zbog smanjene sinteze ili njegove povećane degradacije. Uzrok smanjene sinteze je smanjenje nivoa ili aktivnosti folilpoliglutamata sintetaze (FPGS). Genotipski nastaje zbog smanjene transkripcije, a moguća je i mutacija FPGS (8). Pacijenti sa hiperdiploidnom B ćelijskom ALL za koje se smatra da imaju povoljnu prognozu, akumuliraju veće koncentracije metotreksata dugih lanaca. Blast ćelije pacijenata sa AML, pokazuju niske nivoe akumulacije dugačkih lanaca kada se inkubiraju sa metotreksatom. Pronađene razlike u aktivnosti enzima FPGS u AML i ALL mogu se objasniti razlikom u FPGS genu (9). Uzrok povećane degradacije MTXPG je povećana aktivnosti γ -glutamil hidrolaze (8). Smanjenje dugačkih lanaca MTX poliglutamata se smatra urođenim mehanizmom rezistencije na MTX (8,9).

Takođe, otkrivena je povezanost urođene rezistencije i gubitka funkcionalnog proteina tumor supresorskog gena, što može dovesti do rezistencije na antimetabolite. Ćelije koje nemaju ovaj protein mogu imati povišene nivoe enzima povezanih sa proliferacijom, kao što je DHFR i TS (8,9).

8. FARMAKOGENETIKA

Farmakogenetika podrazumeva proučavanje nasleđene varijabilnosti u odgovoru na lek. Najčešća forma genske varijacije je polimorfizam jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism - SNP), gde je samo jedna baza nukleotida promenjena ili izbačena, ili je ubačena dodatna baza. Procenjeno je da se ovakva promena (ili polimorfizam) dešava na svakih 500 do 1000 nukleotidnih baza u humanom genu. SNP se može desiti u kodirajućem ili nekodirajućem delu gena. Promene u kodirajućem delu gena mogu dovesti do promena sekvence aminokiselina. Promene u nekodirajućem delu gena mogu uticati na transkripciju gena, spajanje gena i stabilnost RNK. Genotipizacijom je moguće videti veliki broj ovih polimorfizama u ljudskom genomu koji mogu imati uticaj na terapijski odgovor (39).

Genetska konstitucija je važan uzrok individualne varijacije u toleranciji i odgovoru na terapiju. Ove varijacije često nastaju usled mutacija u genima koji kodiraju enzime, nosače, receptore i ciljne ćelije u metabolizmu leka i imaju za posledicu velike razlike u eliminaciji leka i

farmakološkim efektima, a tako i uticaj na efikasnost i /ili toksičnost antileukemijskih lekova (40). Do danas su brojna istraživanja ukazala na potencijalne gene koji mogu biti povezani sa toksičnim efektima ili odgovorom na terapiju metotreksatom. Međutim, mnoge od ovih veza su pokazane samo u jednoj kohorti ali su otkrića nedosledna u više studija (39).

Poznato je da MTX ulazi u ćelije aktivnim transportom preko nosača redukovanih folata (RFC - reduced folate carrier). Kada je reč o farmakogenetici nosača, identifikovan je polimorfizam koji dovodi do zamene arginina za histidin u kodonu 27 RFC proteina (RFC G80A). Iako su funkcionalni efekti ovog SNP nepoznati, istraživanja upućuju da ovaj polimorfizam može imati uticaja na efikasnost metotreksata. U jednom istraživanju na 204 dece obolele od leukemije, pacijenti koji su bili homozigoti za RFC G80A varijantu imali su veće nivoe metotreksata u plazmi od pacijenata sa drugim genotipovima (39).

Kada je reč o efluksu, MTX izlazi iz ćelije putem nekoliko nosača-transportera ABC (ATP-binding cassette), naročito ABCC1-5 i ABCG2. Istraživanja pokazuju da se polimorfizam u ovim nosačima često javlja, mada do danas nije sistematski ispitan njihov uticaj na MTX terapiju (39).

U istraživanjima ćelijske farmakogenetike utvrđen je polimorfizam u promoteru gena γ -glutamil hidrolaze (GGH C401T) (EC 3.4.19.9). U pojedinim istraživanjima je pokazano da nosioci ovog polimorfizma imaju niže nivoe MTXPG u poređenju sa drugim genotipovima, dok druga istraživanja nisu potvrdila ovaj uticaj. Opisan je i drugi polimorfizam u GGH - C452T za koji se smatra da smanjuje GGH aktivnost, mada postoje i studije koje nisu našle povezanost između ovog polimorfizma i efikasnosti i toksičnosti metotreksata (39).

Tandem ponavljanje sekvenci (ponavljanje obrasca od dva ili više nukleotida sa ponavljajućim sekvencama direktno jedna pored druge) identifikovane su u genu timidilat sintaze (5'-untranslated region, 5'UTR). Sa povećanim brojem ponavljanih sekvenci povećani su i mRNK ekspresija i enzimaska aktivnost. Pronađeno je da su pacijenti koji su homozigoti za dve kopije ponovljenih sekvenci imali bolji odgovor na MTX, mada ova otkrića nisu potvrđena. Takođe je pronađeno da pacijenti koji su homozigoti za tri kopije ponovljenih sekvenci zahtevaju veće doze metotreksata nego pacijenti homozigoti za dve kopije. Otkriven je i drugi polimorfizam (6 bp delecija u 3'UTR) te da pacijenti homozigoti sa ovom delecijom imaju smanjenu ekspresiju enzima (39).

Najbolje ispitan gen do danas u odnosu na metabolizam metotreksata je metilen tetrahidrofolat reduktaza (EC 1.5.1.20) (39). Enzim 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza

(MTHFR) reguliše homeostazu folata i homocisteina. Katališe redukciju 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metilentetrahidrofolat, predominantnu cirkulišuću formu folata. 5-MTHF daje metil grupu za metilaciju homocisteina, dok su 5,10 - MTHF i njegovi derivati esencijalni kofaktori za sintezu timidilata i de novo sintezu purina. Promene u zalihama folata utiču na sintezu nukleinske kiseline, reparaciju DNA i metilaciju (40,41).

Težak deficit MTHFR ima za posledicu hiperhomocisteinuriju sa posledičnim oštećenjem CNS i vaskularnog sistema. Međutim, genotip koji vodi do umerene MTHFR deficijencije je od najvećeg interesa za metabolizam metotreksata jer su ovi pacijenti fenotipski normalni iako mogu imati biohemijski defekt u metabolizam folata. Opisano je bar 15 polimorfizama u MTHFR genu mada ne postoje podaci o njihovoj funkciji. Najproučavaniji polimorfizmi su C677T i A1298C. Polimorfizam C677T dovodi do promene alanina u valin u kodonu 222. Funkcionalni efekat je stvaranje enzima sa smanjenom aktivnošću. Drugi čest polimorfizam je A1298C koji zamenjuje glutaminsku kiselinu sa alaninom u kodonu 429, za koji je takođe pokazano da vodi do smanjene enimske aktivnosti. Na brojnim studijama rezultati pokazuju da C677T može biti marker za toksičnost MTX terapije, naročito hepatotoksičnost (39). U svom istraživanju Aplenc i saradnici (42) pokazuju da je MTHFR C677T varijanta alela statistički značajno povezana sa relapsom bolesti i da ima značajnu ulogu kao prediktor relapsa bolesti; nije bio povezan sa povećanim rizikom od toksičnosti ili infekcije. Nasuprot tome, drugi ispitivan polimorfizam A1298C nije povezan sa promenjenim rizikom od relapsa, toksičnosti ili infekcije. U zaključku istraživanja sprovedenog u nekoliko centara Zapadne Evrope gde su podaci dobijeni na 157 pedijatrijskih pacijenata sa ALL, navodi se da su polimorfizmi u genima povezanih sa metabolizmom folata-MTRR (metionin sintaza reduktaza) (EC 1.16.1.8), MTHFR (metilen tetrahidrofolat reduktaza) (EC 1.5.1.20) i SHMT1 (serin hidrosimetil transferaza) (EC 2.1.2.1) povezani *in vitro* sa osetljivošću odnosno rezistenciji na MTX terapiju kod ovih pacijenata (43).

Istrživanja vezana za enzim DHFR su pokazala da nizak nivo amplifikacije gena DHFR ili mutacija u enzimu može biti mehanizam stečene rezistencije na MTX (39).

Metotreksat ima potentni efekat na metabolizam adenozina što ga čini novom metom farmakogenetskih ispitivanja. Pronađena su tri polimorfizma sa dobrim kliničkim odgovorom na MTX: adozin monofosfat deaminaza (AMPD1; C34T), AICAR transformilaza (ATIC 347CC) i inozin trifosfat pirofosfataza (ITPA 94CC). Takođe se čini da postoji aditivni efekat polimorfizama i da pacijenti koji nose sva tri favorabilna genotipa imaju povišenu verovatnoću dobrog ishoda (39).

Poboljšanje izlječenja postiže se modifikacijom intenziteta terapije baziranoj na stečenim genetskim karakteristikama ALL, koristeći intenzivniju terapiju za ALL sa molekularnim markerima koji ukazuju na rezistentnu leukemiju. Stečene genetske karakteristike ćelija ALL se koriste u individualizaciji terapije, dok se urođene genetske karakteristike generalno ne koriste. (44). Do danas, folatni status pacijenata ili farmakogenetska pozadina se ne uzima rutinski u obzir pri određivanju intenziteta terapije metotreksata (43). S obzirom da na ishod ALL mogu uticati umerene promene u dozi leka ili dužine davanja leka, ukoliko se bolje definiše varijabilnost između pacijenata u farmakodinamici leka, kreiranje terapije bazirano na urođenim genetskim karakteristikama ćelija ALL može dalje poboljšati ishod. Jer, urođeni polimorfizmi u genima koji kodiraju proteine uključene u farmakodinamiku antileukemijskih lekova su česti sa frekvencijom varijante alela od 5 do 50% (44). Identifikacija predskazivača senzitivnosti na MTX može voditi razvoju individualizacije terapijskih strategija sa poboljšanjem efikasnosti i redukcijom toksičnosti (41,43).

9. TOKSIČNOST TERAPIJE METOTREKSATOM

Antineoplastični lekovi u terapiji maligniteta imaju uzan terapijski indeks. Stoga, količina leka neophodna za značajnu redukciju tumora obično izaziva i ozbiljne toksičnosti. Toksičnosti usled hemoterapije kao što su supresija kosne srži i mukozitis, a koje se zbrinjavaju odgovarajućom terapijom i negom, javljaju se često prilikom antikancerske terapije. Težina toksičnosti koja se smatra prihvatljivom uglavnom je u vezi sa ciljevima terapije, pa je veća toksičnost prihvatljivija tokom kurativne u odnosu na palijativnu terapiju (45). Toksičnost uzrokovana terapijom ALL može biti ne samo opasna po život već je i jedan od glavnih razloga za trajni ili privremeni prekid terapije što može povećati rizik od relapsa bolesti. Štetni efekti terapije utiču na kvalitet života pacijenata tokom i nakon antikancerske terapije (46).

Predviđanje toksičnosti je teško zbog velikih varijacija među pacijentima u farmakokinetici i farmakodinamici antileukemijskih supstanci (46). Rutinsko praćenje koncentracije metotreksata tokom HDMTX terapije važno je za identifikaciju pacijenata sa povećanim rizikom od razvoja toksičnosti. Ipak, istraživanja su pokazala da u relativno visokom procentu HDMTX terapija, praćenje samo koncentracije metotreksata nije dovoljno za predviđanje toksičnosti (47).

Optimizacija terapije i smanjenje toksičnosti podrazumeva prilagođavanje doze leka sa karakteristikama pacijenta koji modulišu farmakokinetiku i farmakodinamiku ovih lekova (45). Međutim, slično drugim antimetabolitima, kritična determinanta citotoksičnosti metotreksata, pored koncentracije leka, jeste i dužina izlaganja leku (47). Visoke koncentracije metotreksata mogu se dobro tolerisati kratak vremenski period, dok izlaganje niskim koncentracijama duži vremenski period može dovesti do toksičnosti koja potencijalno ugrožava život. Izlaganje milimolarnim koncentracijama metotreksata od nekoliko minuta do nekoliko sati može dovesti do akutnog toksičnog oštećenja jetre, bubrega i centralnog nervnog sistema; izlaganje mikromolarnim koncentracijama metotreksata (0,01 i 0,005 μM) tokom više od 24 sata može dovesti do toksičnog oštećenja koštane srži i gastrointestinalnog epitela (48).

Najčešće opisivani sporedni efekti terapije metotreksata su mukozitis, mijelosupresija i akutna toksičnost jetre sa prolazno povišenim nivoima serumske aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT), nefrotoksičnost i neurotoksičnost. Smrtni ishodi usled toksičnosti se retko dešavaju, ali se ostali sporedni efekti često prijavljuju. Oni mogu uzrokovati gubitak apetita, malaksalost, bol, povećan rizik od infekcije i odlaganje planirane terapije (32,47,49,50, 51). Tokom 1970-tih godina, pre rutinskog praćenja koncentracija metotreksata u plazmi i spasavanja leukovorinom zasnovanog na farmakokinetici metotreksata, mortalitet povezan sa HDMTX terapijom bio je između 4,6 i 6 %. Podaci i zaključci istraživanja rađeni u ovom periodu doveli su do formiranja uniformnih stavova u primeni agresivne hidracije, alkalizacije urina i farmakokinetički vođenog spasavanja leukovorinom. Tako su nastali nomogrami za trajanje i stepen spasavanja leukovorinom bazirani na koncentracijama metotreksata u serumu u funkciji vremena administracije leka i koriste se u onkološkim kliničkim studijama gde se koristi HDMTX (48).

Usled deficita folata i sledstvene inhibicije sinteze timidilata i purina, najviše su pogođena tkiva koja se brzo dele: kosna srž, površine prekrivene epitelnim ćelijama i gonade (52).

Malignitet i antineoplastična terapija imaju veoma velik uticaj na funkciju gastrointestinalnog trakta (GIT). Mukozitis je među najčešćim komplikacijama brojnih terapija koje se koriste kod hematoloških maligniteta. Najviše pogađa pacijente na intenzivnoj hemoterapiji. Metotreksat spada među lekove sa najviše zabeleženih mukotoksičnih efekata. Najvažnija komplikacija povezana sa mukozitisom kod hematoonkoloških pacijenata na mijelosupresivnoj terapiji je infekcija (53), a gastrointestinalno krvarenje je konstantna mogućnost kod pacijenata sa oštećenom mukozom (54). Mukozitis oralne regije je glavna toksičnost povezana sa HDMTX terapijom dece sa ALL i

osteosarkomom. Uprkos upotrebi leukovorina i alkalizacije urina, oralni mukozitis je česta i ozbiljna sekvela MTX terapije. Incidenca oralnog mukozitisa se procenjuje na 50% dece na terapiji metotreksatom. Klinički, oralni mukozitis se karakteriše generalizovanim eritemom, pseudomembranoznom degeneracijom, ulceracijama i hemoragijom. Za neke pedijatrijske pacijente, težak oralni mukozitis može biti uzrok limitacije doze metotreksata (55). Oralni simptomi (blaga do teška disfagija, mučnina, povraćanje, sijaloreja, bol, krvarenje i infekcija) se tipično javljaju pet do osam dana po započinjanju administracije hemoterapije i traju sedam do četrnaest dana. Simptomi mukozitisa distalnih delova gastrointestinalnog trakta su visceralna bol, hipermotilitet sa dijarejom, počev od trećeg do sedmog dana započinjanja terapije. Ova klinička slika uglavnom prolazi nakon hemoterapije. Suportativna terapija (totalna parenteralna ishrana, analgetici) i praćenje simptoma najvažniji su aspekti u tretmanu pacijenata sa mukozitisom (53).

Pored mukozitisa, među najčešćim toksičnim efektima hemoterapije je supresija kosne srži. Težina mijelosupresije takođe koreliše sa koncentracijom metotreksata u plazmi tokom vremena (45). Zbog supresije kosne srži dolazi do pada broja crvenih i belih krvnih ćelija i trombocita, delom usled smrti njihovih prekursora u kosnoj srži (neefektivna hematopoeza) a delom zbog skraćenog preživljavanja ćelija koje stignu u periferni krvotok. Cirkulišući eritrociti su makrocitni a njihovi prekursori megaloblastni; neutrofilu pokazuju hipersegmentiranost jedara; u kosnoj srži su prisutni gigantski metamijelociti i hipersegmentirani megakariociti. Step en anemije, leukopenije i trombocitopenije zavisi kako od težine nedostatka odnosnih ćelija tako i od brzine nastanka nedostatka. U slučaju terapije HDMTX, deficit je težak i akutan, verovatnije je da se jave trombocitopenija i leukopenija zbog kraćeg veka trombocita i neutrofila u cirkulaciji (52). Pojava leukopenije i trombocitopenije se uglavnom javlja između sedmog i dvanaestog dana nakon administracije leka. Oporavak se obično vidi unutar nekoliko dana, iako može trajati i duže u slučaju deficita folne kiseline (5).

Hemostatski poremećaji su nađeni u 50 % pacijenata sa malignitetom. Hemostatske promene u malignitetu mogu se javiti usled samog procesa bolesti ili kao rezultat hemoterapije. Mogući uzroci hemostatskih poremećaja su abnormalna aktivacija puta koagulacije, promene u aktivaciji i agregaciji trombocita, smanjena jetrene sinteza faktora koagulacije i antikoagulanata (zbog maligne infiltracije jetre ili hemoterapije), oslobađanje aktivatora plazminogena. Najčešći hemostatski poremećaj kod pacijenata sa leukemijom je hemoragija, a mnogo ređi tromboza. Objavljeno je da se hemoragične i tromboembolijske komplikacije javljaju u 1-11% pacijenata sa malignitetom (32).

Metotreksat ispoljava i hepatotoksični efekat u vidu akutnog i hroničnog oštećenja jetre. Akutno povišenje nivoa jetrenih enzima i/ili hiperbilirubinemija viđaju se u više od 50% pacijenata na HDMTX terapiji, ali se normalizacija testova jetrene funkcije očekuje unutar jedne ili dve nedelje nakon diskontinuacije terapije. Teška hepatotoksičnost se retko javlja. Ranije studije su utvrdile da hepatotoksičnost indukovana HDMTX može biti potpuno reverzibilna i da ne dovodi hronične bolesti jetre (47). Hronična administracija metotreksata (kao što je slučaj kod pacijenata sa psorijazom) može biti komplikovana fibrozom jetre, a moguća je i evolucija u cirozu, što je u korelaciji sa dužinom terapije i kumulativnom dozom. Intermitentna upotreba je povezana sa manjom incidencom poremećaja jetrene funkcije (49,54).

Nefrotoksičnost je takođe jedan od potencijalno neželjenih efekata terapije metotreksatom (45,56). Oštećenje bubrežne funkcije uzrokovano metotreksatom dovodi do usporene bubrežne ekskrecije i produžene ekspozicije metotreksata što može biti uzrok neefektivnog spasavanja leukovorinom i povećanja drugih toksičnosti metotreksata, naročito mijelosupresije, mukozitisa, hepatitisa i dermatitisa (48,57,58). Najčešće prihvaćen mehanizam nefrotoksičnosti je precipitacija metotreksata ili njegovih metabolita u distalnim tubulima bubrega sa sekundarnom intrarenalnom opstruktivnom uropatijom. Naročito tokom HDMTX terapije, koncentracija MTX i 7-OH-MTX može prevazići hidrosolubilnost ovih lekova na pH urina. Ova hipoteza je podržana mogućnošću smanjivanja incidence i težine nefrotoksičnosti alkalizacijom urina i hidracijom. Direktna toksičnost na tubule bubrega i smanjena glomerularna filtracija takođe mogu biti komponente nefrotoksičnosti MTX terapije (45,56).

Najveći deo metotreksata, 90%, eliminiše se putem bubrega. Metotreksat je slabo rastvorljiv na kiselim pH vrednostima, a njegovi metaboliti 7-OH-MTX i dAMPA su 6 do 10 puta manje rastvorljivi od metotreksata. Na fiziološkim pH lek je potpuno jonizovan, ali kad je pH rastvora snižen na 5,7 formiraju se gusti precipitati. Tokom urinarne ekskrecije, precipitacija leka se javlja kako se urin koncentruje i acidifikuje u tubulima (45,56). Povećanje pH urina sa 6,0 na 7,0 dovodi do 5 do 8 puta veće rastvorljivosti metotreksata i njegovih metabolita, što je nalaz u osnovi preporuke za i.v. hidraciju (2,5 do 3,5 l tečnosti za 24 sata, injicirano 12 sati pre započinjanja infuzije metotreksata i koje se nastavlja narednih 24-48 sati) i alkalizaciju urina (40-50 mEq natrijum-bikarbonata po litri tečnosti za hidraciju) pre, tokom i posle administracije HDMTX. Kraća dužina infuzije HDMTX dovodi do većih koncentracija metotreksata u plazmi i u urinu i nosi povećan rizik od oštećenja bubrežne funkcije (48).

Većina pacijenata sa bubrežnim oštećenjem su inicijalno asimptomatski i uglavnom ispoljavaju kliničku sliku neoligurijske renalne insuficijencije. Strm rast serumskog kreatinina tokom ili kratko nakon infuzije metotreksata ukazuje na razvoj renalne insuficijencije i može dovesti do značajnog rasta koncentracije metotreksata u plazmi. Pregledom literature posle 1980. godine, kada su hidracija i alkalizacija urina postale rutina pri administraciji HDMTX, procenjena incidenca oštećenja bubrega iznosi 1,8% (48).

Dodatak intratekalne administracije (i.t.) metotreksata ili i.v. primena HDMTX u protokolima za lečenje leukemije povezane su sa povećanom stopom prežiljavanja kod dece sa ALL. Međutim, MTX ima i značajan toksični efekat na CNS i potencijalno može voditi do teškog neurološkog morbiditeta (59).

Dve česte kliničke manifestacije neurotoksičnosti metotreksata su cerebralni napadi i događaji nalik vaskularnim okluzijama. Cerebralni napadi su većinom sporadični, sa manjim brojem pacijenata kod kojih poremećaj progredira u hroničnu epilepsiju. Događaji nalik vaskularnim okluzijama imitiraju tranzitorne ishemične atake, nekada čak i sa perzistentnom parezom ili paralizom; dijagnoza se potvrđuje prisustvom infarkta bele moždane mase neuroradiološkim tehnikama. Opisane su i druge manifestacije: ataksija, tremor, somnolencija, glavobolje, kognitivni i psihijatrijski poremećaji. Periferno su viđene radikulopatije nakon intratekalnog tretmana. Studije sa evociranim potencijalima su pokazale oštećenje perifernog nervnog sistema tokom terapije ALL, sa aditivnim efektom metotreksata (59).

Prema radu Tuxena i Hansenta (60), intravenska HDMTX terapija povezana je sa dve forme neurotoksičnosti: akutna encefalopatija i hronična leukoencefalopatija. Kad je reč o intratekalno primenjenom metotreksatu (lumbalnom punkcijom ili intraventrikularnom injekcijom u profilaksi meningealne leukemije i protiv leptomeningealne karcinomatoze), neurotoksičnost se može klasifikovati u tri klinička obrasca: akutni, subakutni i odloženi (hronični).

Akutna tranzitorna cerebralna disfunkcija se karakteriše cerebralnim napadima, konfuzijom, hemiparezom, poremećajem govora i gubitkom svesti; akutnim početkom i reverzibilnošću (60). Većina pacijenata se oporavi bez permanentnih neuroloških sekvela nakon 1-7 dana, iako 10-56 % pacijenata mogu ponovo imati tegoba pri narednoj terapiji MTX (50). Sveukupna incidenca akutne neurotoksičnosti izazvane metotreksatom može se proceniti na, prema Shuper (59): 3-11% lečene dece, Inaba (50): 3-15%, Tuxen (60): 15 % lečene dece.

Najčešća neurološka reakcija nakon intratekalne primene metotreksata je aseptički meningitis ili hemijski arahnoiditis (poznat i kao akutni toksični sindrom). Javlja se u 5-40% profilaktičkih i.t. kurseva metotreksata, odnosno kod 10% pacijenata na intratekalnoj terapiji (61), a subklinički arahnoiditis se može javiti kod većeg broja pacijenata. Obično počinje unutar nekoliko sati od i.t. administracije metotreksata. Kliničke manifestacije uključuju glavobolju, mučninu, povraćanje, povišenu temperaturu, bol u leđima, vrtoglavicu, meningizam i druge znake povišenog intrakranijalnog pritiska (60). Simptomi traju 12-72 sata. Iako je klinička slika obično benigna, objavljeni su i slučajevi sa progresivnom mijelopatijom i fatalnom encefalomijelopatijom kod pedijatrijskih pacijenata nakon arahnoiditisa. Sindrom bi se mogao prevenirati i.t. koadministracijom hidrokortizona sa metotreksatom ili premedikacijom oralnim kortikosteroidima (61).

Subakutna neurotoksičnost, sa mijelopatijom i encefalopatijom, može se javiti kroz nekoliko dana ili nedelja nakon započinjanja terapije. Karakteriše se paraparezom/plegijom, demencijom, konfuzijom, tremorom, ataksijom, iritabilnošću, somnolencijom. Ovaj sindrom se javlja najviše kod pacijenata sa čestom i.t. primenom metotreksata (2-3 puta nedeljno) (60).

Klinički ispoljena hronična odložena leukoencefalopatija obično počinje nekoliko meseci nakon započinjanja hemoterapije sa diskretnim promenama ličnosti praćeno progresivnom demencijom, fokalnim cerebralnim napadima, spasticitetom i promenom stanja svesti. Alteracije u stanju svesti se javljaju od blagog stupora do delirijuma. Različiti stepeni neuroloških deficita mogu da perzistiraju, iako se većina pacijenata oporavi nakon diskontinuacije metotreksata. Moguć mehanizam nastanka uključuje depresiju moždanog metaboliza glukoze i alteraciju u funkciji krvno-moždane barijere (60). Patološkim pregledom otkrivaju se difuzne bilateralne nekrotizujuće lezije, demijelinacija, reaktivna astrocitoza i depoziti kalcijuma (59).

Poznato je da su redukovani folati kofaktori u konverziji glicina u serin i homocisteina u metionin. Deficit tetrahidrofolata, kao posledica inhibicije DHFR, značajno utiče na reakcije transmetilacije, koje su krucijalne za stvaranje proteina, lipida i mijelina i verovatno vodi do demijelinizacije. Nivoi metionina i S-adenosil metionina u cerebrospinalnoj tečnosti padaju a nivoi S-adenosil homocisteina i homocisteina rastu. Zna se da su povišeni nivoi homocisteina u krvi povezani sa oštećenjem endotelijalnih ćelija i infarktom. Mogu takođe biti povezani sa cerebralnim napadima. Međutim značaj hiperhomocistinemije u oštećenju neurona nije do kraja rasvetljen kao

ni povezanost promena u procesima transmetilacije sa različitim prezentacijama MTX neurotoksičnosti (59).

Takođe, prijavljene su i akutne hipersenzitivne reakcije tokom inicijalne administracije metotreksata: pruritus, urtikarija i angioedem. U literaturi je objavljeno oko 20 slučajeva anafilaktičnih ili anafilaktoidnih reakcija na MTX. Većina slučajeva odnosilo se na intravensku primenu metotreksata, ali je prijavljena i anafilaksa nakon intratekalne administracije. Jedna studija je pokazala pozitivne kožne probe i specifičan imunoglobulin E (IgE) na MTX. Reakcija na MTX se tipično javlja nakon ponavljane administracije, ali je zabeleženo nekoliko slučajeva teških reakcija na prvu dozu (49,62). Kožne promene su primećene u 20% pacijenata lečenih metotretksatom. Mogu se javiti kao izolovani simptom ili u kombinaciji sa drugim formama toksičnosti. Javlja se u vidu makulopapuloznog egzantema sa predilekcionim mestima na vratu i gornjem delu trupa iako se može proširiti i na druge delove tela (5).

Metotretksat je takođe je povezivan i sa toksičnim plućnim oštećenjima (49). Iako plućna toksičnost može biti povezana sa izvesnim hemoterapijskim lekovima, kod pacijenata na intenzivnoj terapiji etiologija plućnog oštećenja je često kompleksna. Radijacioni pneumonitis, infekcija, malignitet, plućna hemoragija i srčana bolest su česte komplikacije koje pogađaju ove pacijente i moraju se uzeti u obzir u diferencijalnoj dijagnozi. U kliničkoj slici obično se javljaju prodromi sa glavoboljom, slabošću, dispneom i suvim kašljem koji progrediraju do često teške pneumonije sa difuznim bilateralnim infiltratima. Međutim, diferenciranje ovih nalaza od infekcije može biti teško (54). Na početku bolesti radiološke promene se uočavaju pretežno intersticijalno, ali se može naći i zahvatanje alveola praćeno eozinofilijom. Po pravilu ove abnormalnosti nestaju spontano, ali se neke infiltracije mogu održavati hronično. Fatalni ishod je prijavljen u 11% slučajeva objavljenih u literaturi (5).

Prilikom hemoterapije opisan je i akralni eritem ili sindrom palmoplantarne eritrodizestezije, što je dobro definisana reakcija na neke hemoterapeutike. Najčešće se javlja na visoke doze citarabina, doxorubicina, fluorouracila, metotreksata i bleomicina. Navodi se da je incidenca akralnog eritema od 6-72% i pretežno je bolest kod odraslih, dok je kod dece akralni eritem retko opisivano stanje. Karakteriše se simetričnim, jasno ograničenim, bolnim eritemom dlanova (63).

10. TERAPIJSKO PRAĆENJE LEKOVA

Terapijsko praćenje lekova (therapeutic drug monitoring - TDM) koristi se u kliničkoj praksi od 1960-tih godina. Podrazumeva merenje koncentracije lekova u biološkim tečnostima i individualizaciju doze ili rasporeda lekova u cilju maksimalnog uspeha ishoda terapije i minimalizacije toksičnosti. U teoriji, da bi TDM bio od značaja, lek treba da ispuni nekoliko kriterijuma: prisustvo značajne interindividualne i intraindividualne varijabilnosti farmakokinetike, postojanje definisane veze između koncentracije leka i farmakološkog efekta, uzan terapijski indeks i mogućnost precizne kvantifikacije u biološkim tečnostima (64).

Klinički značaj TDM u terapiji karcinoma u sadašnjosti ograničava nekoliko faktora. Prvo, ne postoji savršeno razumevanje farmakokinetike i farmakodinamike većine antineoplastičnih lekova. Drugo, koncentracija leka u plazmi je indirektna mera količine leka u ciljnom tkivu jer je mesto delovanja leka često udaljeno od intravaskularnih prostora, naročito uz činjenicu da solidni tumori mogu imati sopstveno snabdevanje krvlju. Treće, normalno postoji duži period između merenja leka u krvnoj plazmi i evaluacije definitivnog farmakodinamskog efekta. Ukoliko se poboljšanje u stopi izlečenja koristi kao varijabla ishoda potrebno je obično najmanje pet godina praćenja da se proceni ishod. Zbog navedenih razloga, istraživanja zahtevaju više vremena i više kompleksnog procesa koji se značajno razlikuje od ispitivanja lekova sa bržim efektom, kao što su antibiotici. Četvrto, postoji poteškoća u identifikaciji veze koncentracija-efekat jer se antineoplastici skoro uvek daju u kombinaciji sa drugim lekovima. Zbog toga je veoma teško tačno definisati farmakodinamiku svakog leka ponaosob. Takođe, kombinovana terapija komplikuje i farmakodinamiku toksičnosti leka. Peto, kanceri su heterogena grupa bolesti sa inherentnim karakteristikama koje utiču na vezu koncentracija-efekat za antineoplastike. Pokazuju heterogenost u ćelijskim karakteristikama i snabdevanju krvlju, što vodi do različitih nivoa u senzitivnosti i rezistenciji na antineoplastične lekove (64).

Samo nekoliko lekova ispunjavaju preduslove za TDM zbog nedostatka dobro definisane veze između efikasnosti i sistemskog izlaganja leku. Ove veze su pokazane za neke parove lekova i bolesti, kao što je MTX i ALL (B ćelijska), karboplatin i karcinom ovarijuma i 5-fluorouracil i kolorektalne metastaze karcinoma glave i vrata (64).

Mnoge klinička istraživanja terapije karcinoma pokazuju korist maksimuma intenziteta hemoterapije, ističući potrebu za lečenjem dozama koje će proizvesti koncentracije na gornjem pragu netoksičnog raspona u cilju povećanja verovatnoće odgovora ili izlečenja. Farmakokinetička optimizacija protokola za mnoge klase citotoksičnih lekova postoje u specijalizovanim centrima i neki od ovih protokola su sad deo velikih multicentričnih studija. TDM pored individualizacije hemoterapije u poboljšanju efikasnosti i izbegavanju toksičnosti ima dodatne pogodnosti: poboljšanje usklađenosti i minimalizaciju farmakokinetičke varijabilnosti među pacijentima, prilagođavanje doze kod pacijenata sa poremećajem funkcije jetre ili bubrega. Veoma je važno uspostaviti najveću efikasnost hemoterapije jer suboptimalna terapija može znatno smanjiti verovatnoću izlečenja izlečivih pacijenata. TDM pravi osnovu za odluke o vremenu započinjanja i nastavka spasavanja leukovorinom i varijetete rasporede doza (19,64).

Farmakokinetika leka zavisi od tri osnovna procesa: apsorpcije, distribucije i eliminacije (metabolizam i ekskrecija). Ovi procesi se razlikuju među pacijentima i dovode do znatnih razlika u koncentracijama leka u plazmi iste doze. Šta više, varijabilnost u farmakokinetici se može naći kao posledica dnevnih promena u individualnoj sposobnosti pacijenta da metaboliše ili ekskretuje lek. Intraindividualna varijabilnost se može objasniti delom kao nesaradnja pacijenta, interakcija lekova, i u svim slučajevima zahteva promenu doze koje bi zadovoljile trenutne potrebe specifičnog pacijenta. Koncentracija leka u plazmi ne oslikava uvek koncentraciju leka na ćelijskom nivou, što je mesto delovanja većine lekova. Farmakodinamika takođe pokazuje velike interindividualne i intraindividualne varijabilnosti. U praksi, koncentracije leka u plazmi su uglavnom merljive za definisanje farmakokinetičkih parametara kao što je sistemski klirens, ravnotežna koncentracija i površina ispod krive koncentracija-vreme (64).

Od razvoja efektivne hemoterapije za decu obolelu od karcinoma, uviđeno je da odgovor na izgled identične terapije može znatno da varira kako u pogledu efikasnosti tako i toksičnosti. Razumevanje interindividualnih razlika u metabolizmu i distribuciji leka kao značajnih determinanti odgovora na terapiju nastavlja da se razvija. Sve veći broj kliničkih istraživanja je fokusiran na sticanje boljeg razumevanja različitosti metabolizma leka i puta eliminacije. Analizirajući kako na eliminaciju leka utiču karakteristike pacijenta kao što su godine, pol, rasa, funkcija organa, interakcije leka, i možda i najvažnije genski polimorfizam, sada je rutinska komponenta ispitivanja lekova. Inicijalna evaluacija distribucije antineoplastičnih lekova kod obolele dece uključuje detaljnu procenu procesa apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije.

Ovim se dobijaju podaci koji su osnova za racionalni terapijski protokol. Distribucija leka kod dece se mora interpretirati i u kontekstu razvojnih faktora. Normalne dinamičke promene koje se dešavaju u funkcionisanju organa u razvoju od neonatalnog perioda, odojčadskog, školskog preko adolescencije mogu značajno menjati distribuciju leka. Promene u funkcionalnom kapacitetu i enzimskim sposobnostima organa mogu značajno promeniti klirens leka. Slično, promene u sastavu tela (odnos masti, proteina i vode) koje se javljaju tokom rasta i razvoja mogu direktno uticati na distribuciju leka (65).

Brojne su praktične limitacije za izvođenje kliničkih farmakokinetičkih ispitivanja kod odojčadi i male dece. Osnov za interpretaciju distribucije leka kod pacijenta je definisati krivu koncentracija-vreme. Važne promenljive, naročito relevantne za pedijatrijska farmakokinetička ispitivanja, jesu volumen krvi neophodan za svaki uzorak i potreban broj uzoraka krvi. Tako, senzitivnost i preciznost analitičke metodologije korišćene za merenje leka u željenoj sredini (krvna plazma, urin) je važan aspekt dizajna pedijatrijskih farmakokinetičkih studija. Ovo je nasuprot studijama kod odraslih gde je volumen i frekvencija uzimanja uzoraka retko primarna stavka (65).

Osnov za kliničko vođenje pacijenata na terapiji HDMTX je terapijsko praćenje leka, zbog velikih interindividualnih i intraindividualnih varijacija kao i zbog dobro razjašnjene veze između efikasnosti, toksičnosti i farmakokinetike metotreksata (30,66). Kod primene infuzija HDMTX, TDM je standardna praksa za smernice spasavanja leukovorinom, naročito za pacijente za koje se zna da imaju smanjen klirens metotreksata ili druge rizike povezane sa prolongiranim citotoksičnim koncentracijama (bubrežna ili jetrena oštećenja, kolekcije tečnosti u “trećem prostoru”, gastrointestinalna opstrukcija). Zajedno sa merama za olakšavanje ekskrecije metotreksata, TDM je pomogao u sveukupnom smanjenju incidence fatalnih toksičnosti povezanih sa HDMTX (67). Sistemska toksičnost je direktno povezana sa koncentracijom metotreksata u plazmi, vremenu izlaganja i površini ispod krive vreme-koncentracija. Zavisí i od doze i rasporeda administracije leukovorina. Ovo objašnjava značaj strogog praćenja koncentracija metotreksata u plazmi tokom hospitalizacije do dostizanja bezbednog nivoa leka (30). Veliki broj istraživanja kod pedijatrijskih pacijenata pokazao je vezu između sistemskog izlaganja leku i efikasnosti i toksičnosti metotreksata. Ipak, ne postoji dovoljno informacija o farmakokinetici metotreksata kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije; u ranijim istraživanjima uključen je mali broj dece uz mali broj izmerenih koncentracija metotreksata u plazmi (68).

11. AKUTNA LEUKEMIJA

Akutna leukemija je najčešći malignitet kod dece i obuhvata oko trećine svih maligniteta pedijatrijskog uzrasta (69). Leukemije kod dece uzrasta 0 do 14 godina čine približno jednu trećinu, a kod adolescenata (15-19 godina) obuhvataju 10% svih karcinoma (70). Od akutne leukemije oboli između 35 i 45 na milion dece svake godine (71).

Sedamdeset i pet posto akutnih leukemija u pedijatrijskom uzrastu čine akutne limfoblastne leukemije (69). U istraživanju Coebergh i saradnika (70) sprovedenom u 19 zemalja Evrope u periodu od 1988-1997. godine, sveukupna incidenca leukemija kod dece (0 do 14 godina) bila je 44, a kod adolescenata (15-19 godina) 22,6 na million osoba godišnje. Akutne limfoblastne leukemije su kod dece (0 do 14 godina) zauzimale 81%, akutne nelimfoblastne leukemije (ANLL) 15%, hronične mijeloidne leukemije (HML) 1,5% i neklasifikovane leukemije 1,3%. Kod adolescenata dečaka, ALL se javljao u oko 60% a ANLL u oko 30%, dok je kod devojčica procenat ALL iznosio 50% i ANLL 35%. Incidenca ALL je bila u porastu i kod dece za 0,6% godišnje i kod adolescenata za 1,9% godišnje. U SAD se dijagnostikuje skoro 4000 slučajeva ALL godišnje, od čega su oko 2/3 deca i adolescenti (72). Incidenca ALL u SAD iznosi približno 3,4 slučaja na 100.000 osoba ispod 15 godina života; incidenca ALL je viša kod pripadnika bele nego kod crne rase (Afroamerikanaca) u odnosu 1:8, i diskretno je viša kod dečaka nego kod devojčica (69).

Vrh incidence dečje ALL je između 3. i 4. godine života (69), odnosno između 2. i 5. godine života i postepeno opada sa godinama (73). Prema navedenom istraživanju Coebergh-a i saradnika (70) incidenca ALL najveća je od 1. do 4. godine, od 5. do 9. godine se prepolovi, potom dalje opada na oko 25 % što je isto kao i incidenca kod odojčadi i dece od 10-14 godina; dalje još lako opada kod adolescenata. Incidence kod dečaka je generalno viša nego kod devojčica i odnos muški/ženski pol raste kroz godišnje grupe od 1.0 kod odojčadi do 1.9 kod adolescenata.

Pedijatrijska ALL je heterogena grupa bolesti i sastoji se od više subtipova koje se značajno razlikuju po svojim ćelijskim i molekularnim karakteristikama kao i u svom odgovoru na terapiju i sledstvenim rizikom od relapsa (74,75). Etiologija pedijatrijske ALL ostaje i dalje slabo poznata. Inicijacija leukemogeneze započinje tokom fetalnog perioda ili rano u odojčadskom periodu i verovatno je uzrokovana brojnim faktorima okruženja i genetskim faktorima (76). Neoplastični proces koji vodi leukemogenezi karakteriše se ćelijskom i molekularnom disregulacijom. Nastala

leukemijska ćelija fenotipski se razlikuje od bilo koje normalne ćelije ali stepen diferencijacije je vrlo različit (77). Genetski faktori mogu predisponirati decu za nastanak leukemije. Genetske hromozomske abnormalnosti su povezivane sa dečjom leukemijom. Proučavani su i brojni faktori okruženja, mada definitivna veza sa razvojem dečje ALL nije uspostavljena (69).

Za razvoj ALL, kao i druge malignitete hematološkog porekla, veruje se da uključuje transformaciju u jednoj progenitornoj ćeliji koja ima mogućnost neograničenog klonalnog širenja. Transformacija se može desiti u limfoidnim ćelijama B- ili T-ćelijske loze ili u ranim prekursorima, koji se diferenciraju u različite subtipove ALL bazirano na stadijumu limfoidne diferencijacije ćelija u kojoj se transformacija desila. Oko 80% svih slučajeva ALL pripada prekursorima B-ćelijske loze. Samo 1 do 2% slučajeva ispoljavaju fenotip tipičan za zrele B-ćelije. T-ćelijske ALL obuhvataju 15 do 20 % slučajeva i često su povezane sa starijim uzrastom, predominacijom muškog pola, visokim brojem leukocita i ekstramedularnom bolešću, što sve upućuje na potrebu za intenziviranom hemoterapijom (69).

Deca sa ALL razvijaju simptome usled blastne infiltracije kosne srži, limfoidnog sistema i ekstramedularnih organa kao što je CNS. Opšti simptomi bolesti su povišena telesna temperatura (60%), umor (50%), bledilo (25%) i gubitak u telesnoj masi (26%). Infiltracija kosne srži i periosta blast ćelijama često uzrokuje bol u kostima (23%) i remećenje normalne hematopoeze. Trombocitopenija sa manje od $100 \times 10^9/l$ trombocita se javlja kod 75% pacijenata. Približno 40% pacijenata ima nivo hemoglobina u krvi ispod 70 g/l. Iako se broj leukocita iznad $50 \times 10^9/l$ javlja u 20% slučajeva, neutropenija (definisana kao apsolutni broj neutrofila ispod $0,5 \times 10^9/l$) je česta pri postavljanju dijagnoze i povezana je sa povećanim rizikom od infekcije. Infiltracija limfoidnog sistema može uzrokovati limfadenopatiju i hepatosplenomegaliju. Zahvatanje CNS-a je prisutno u manje od 5% dece pri postavljanju dijagnoze. Kada postoji, prisutne su glavobolja, povraćanje, edem papile optičkog nerva i oduzetost VI kranijalnog nerva (n. abducens) (69).

Iako nalaz blasta u perifernoj krvi uz anemiju i trombocitopeniju upućuje na dijagnozu ALL, definitivna dijagnoza se postavlja pregledom uzorka dobijenog aspiracijom kosne srži ili biopsijom, koji pokazuje više od 25% limfoblasta. Kod pacijenata sa velikim brojem leukemijskih ćelija mogu postojati biohemijski znaci lize tumora: hiperkalemija, hipokalcemija, hiperfosfatemija i laktatna acidoza. Zbog velikog raspada ćelija može biti znatno povišena mokraćna kiselina u krvi (69).

Tradicionalno su u terapijskim protokolima grupe rizika pacijenata obolelih od ALL bile definisane prema uzrastu, polu, prezentujućem broju leukocita. Međutim, pokazalo se da pacijenti u

istoj grupi rizika mogu imati različit ishod lečenja (78). Tačno određivanje grupe rizika je kritična tačka za optimalan ishod lečenja. Sadašnja procena rizika, pored demografskih (uzrast, pol) i kliničkih karakteristika - osnovnih laboratorijskih nalaza (prisustvo broja leukocita na početku bolesti ili odsustvo leukemije u cerebrospinalnoj tečnosti) uključuje takodje karakteristike leukemijskih blasta koje se dobijaju imunofenotipizacijom, citogenetskom i molekularnom dijagnostikom kao i odgovor na terapiju (74,75).

Imunofenotipizacija. Maligni limfoblasti imaju mnoge slične karakteristike normalnog limfoidnog progenitora. Leukemijske ćelije preraspoređuju svoje gene za imunoglobuline i T-ćelijske receptore i ispoljavaju molekule antigen receptora na isti način kao u normalnom razvoju B i T limfocita. Na taj način ALL može biti klasifikovana kao B- ili T- ćelijska.

Dijagnoza leukemije zrelih B-ćelija, koja zauzima samo oko 1-3 % svih slučajeva ALL, zasniva se na detekciji površinskih imunoglobulina leukemijskih blasta. Limfoblasti sa ovim fenotipom imaju karakterističnu morfologiju, sa bazofilnom citoplazmom koja sadrži naznačene vakuole. Ovaj morfološki oblik je označen sa L3 u FAB sistemu (French-American-British). Leukemiju zrelih B-ćelija treba razlikovati od ostalih B-ćelijskih ALL.

ALL prekursora B-ćelija zauzimaju oko 80% dečjih ALL i podrazumevaju limfoblaste koji na ćelijskoj površini imaju ekspresiju dva ili više površinskih antigena povezanih sa B-ćelijskom lozom (npr CD19, CD20, CD24, CD22, CD21 ili CD79). Antigen CD10 je često ispoljen, što ga čini korisnim dijagnostičkim markerom, a prisustvo aberantnog mijeloidnog markera (npr CD7) se povremeno javlja ali ima mali uticaj na prognozu. Ove ALL se dalje mogu subklasifikovati u ranu pre-B ćelijsku, pre B-ćelijsku i tranzicionu pre-B ćelijsku, ali razlikovanje ovih subtipova obično nije klinički relevantno.

T-ćelijska ALL identifikuje se ekspresijom površinskih antigena povezanih sa T-ćelijama, od kojih je specifičan citoplazmatski antigen CD3. Slučajevi T-ćelijske ALL mogu se klasifikovati prema ranim, srednjim i kasnim timocitima. Prognoza je lošija od ALL prekursora B-ćelija. Međutim, ishod za pacijente sa T-ćelijskom ALL je uporediv sa pre-B-ćelijskom ALL kada se upotrebi intenzivna hemoterapija (73).

Citogenetska i molekularna dijagnostika. Za dijagnozu ALL veoma je važno utvrditi prisustvo stečene hromozomske abnormalnosti leukemijskih blast-ćelija, zajedno sa drugim kliničkim karakteristikama, radi klasifikacije pacijenata u grupe rizika. Standardna citogenetska analiza je esencijalna za dijagnostiku svih pacijenata sa leukemijom jer kariotip leukemijskih ćelija

ima važne dijagnostičke, terapijske i prognostičke implikacije. Poslednjih dvadeset godina se zna da je kariotip nezavisan prediktor ishoda ALL, zbog čega je citogenetika postala vitalna komponenta u dijagnostici sa rastućim uticajem na izbor terapije. Abnormalni nalaz kariotipa je prijavljen kod čak 80% dece i 70% odraslih sa ALL, od kojih su mnogi vrlo kompleksni. Hromozomske abnormalnosti nastaju zbog promena u broju hromozoma ili zbog preloma hromozoma koja vode do raznih strukturalnih preuređivanja. Mnogi kariotipovi kod ALL imaju obe vrste nenormalnosti. Numeričke hromozomske promene stvaraju klonove sa previše ili premalo kopija jednog ili više hromozoma i klasifikuju se u grupe zavisno od broja hromozoma. Strukturalne hromozomske abnormalnosti uključuju translokacije, delecije, inverzije i druga preraspoređivanja zahvatajući gene sa onkogenim potencijalom. Posledica je remećenje specifične diferencijacije ili proliferacije i progresije leukemogeneze. Molekularne tehnike, uključujući fluorescentnu in situ hibridizaciju (FISH), reverznu transkriptazu - lančana reakcija polimeraze (RT-PCR) i Southern blot analizu, pomažu u identifikaciju translokacije koje nisu detektovane rutinskom analizom kariotipa i u razlikovanju lezije koje citogenetski izgledaju identične a različite su molekularno. Dalje, visoko senzitivnim molekularnim tehnikama utvrđeno je da genske promene perzistiraju u kosnoj srži i krvi nekih pacijenata sa ALL za koje se smatralo da su u remisiji. Nivo perzistiranja minimalne rezidualne bolesti (MRD) nakon terapije indukcije je tačan i pouzdan prediktor ishoda ALL. Minimalna rezidualna bolest može takođe da objasni relaps kod nekih pacijenata koji su po svojim kliničkim i citogenetskim karakteristikama u grupi sa povoljnim ishodom (79).

Od mnogih opisanih hromozomskih abnormalnosti u ALL, u 50% se javljaju $t(12;21)(p13;q22)$ ili ETV6-RUNX1 (ranije poznatu kao TEL-AML1) i hiperploidiya (iznad 50 hromozoma po ćeliji) i pružaju povoljnu prognozu. Trizomija 4, trizomija 10 i trizomija 17 ("trostruka trizomija") mogu se videti u nekim hiperploidnim ćelijama i imaju povoljan ishod. Hipoploidija (ispod 44 hromozoma po ćeliji, nađena u manje od 2 % pedijatrijskih ili adultnih slučajeva), $t(4;11)(q21;q23)$ MLL-AF4 (nađena u oko 50% slučajeva kod odojčadi, 2 % kod dece i 5-6% odraslih) i $t(9;22)(q34;q11)$ ili pozitivan Filadelfija hromozom (3 % kod dece, do 20% kod odraslih i preko 50% kod starijih od 50 godina) upućuju na lošu prognozu (72,73).

Uspešnost terapije ALL je u stalnom usponu od 1960-tih godina. Napredak u dijagnostici, terapiji i poboljšanja u terapijskim protokolima, dovela su do dugoročnog izlečenja, sa sveukupnom stopom petogodišnjeg preživljavanja od skoro 80% za decu sa ALL (69,72,80,81,82). Strategije koje

su doprinele da se postignu ovi rezultati uključuju stratifikaciju pacijenata prema prognostičkim faktorima i riziku, i intenzifikaciju terapije. Pacijenti sa velikim rizikom od relapsa naročito imaju koristi od intenzifikovane terapije. Međutim, postoje dokazi da je intenziviranje osnovne terapije takođe od koristi i deci sa ALL niskim ili standardnim rizikom, dok je, s druge strane, poznato da podgrupa pacijenata sa ALL može biti izlečena i sa manje intenzivnom terapijom i tako verovatnije sa manje komplikacija (82).

Zabrinutost zbog dugoročnih toksičnih efekata terapije dovelo je do redukcije ili eliminacije toksičnijih terapija kao što su antraciklini ili epipodofilotoksini i preventivne radioterapije mozga, održavajući istu terapijsku efikasnost (82). Usavršavanje terapijskih protokola, uključujući smanjenje rizika od toksičnosti terapije, može dalje da poboljša stopu izlečenja za pacijente sa visokim rizikom, smanjujući rizik od relapse (73). Ipak, 20 % pacijenata nemaju odgovor na sadašnje protokole lečenja i preko dve trećine preživelih imaju dugotrajne probleme uzrokovane terapijom (76).

12. NON-HODGKIN LIMFOMI

Maligni limfomi su maligne neoplazije limfoidnog sistema. Grubo se klasifikuju na Hodgkin-ovu bolest (HB) i ne Hodgkin-ske limfome (NHL), koji se međusobno razlikuju po kliničkim, patološkim i biološkim karakteristikama.

Prema klasifikaciji National Cancer instituta (NCI), većina pedijatrijskih non-Hodgkin limfoma mogu se svrstati u sledeće tipove:

- Limfoblastni limfomi
- Limfomi velikih ćelija
- Limfomi malih nerascepljenih ćelija- Burkitt limfom i non-Burkitt limfom

Non-Hodgkin limfom u dečjem uzrastu se najčešće manifestuje kao masivna ekstramedularna (obično ekstranodalna) bolest sa ili bez vidljive diseminacije. Razlika između non-Hodgkin limfoma i akutne leukemije je arbitrarna, pa se ove bolesti najbolje posmatraju u spektru od klinički lokalizovane bolesti do leukemije. U većini terapijskih protokola akutna leukemija se definiše na osnovu zahvaćenosti kostne srži, odnosno na osnovu prisustva iznad 25% blasta bez obzira na

prisustvo masivne ekstramedularne bolesti. Nasuprot tome, ekstramedularni tumor sa zahvatanjem kosne srži ispod ove granice (25% blasta) predstavlja limfom.

Etiologija NHL nije poznata, ali postoje brojni faktori koji mogu imati uzročne veze. Epidemiološki podaci pokazuju da izvesni antigeni HLA sistema, čak i određene krvne grupe mogu povećati ili smanjiti verovatnoću nastanka NHL. Pojedine epidemiološke studije sugerišu da ulogu u nastanku NHL mogu imati izvesni faktori okruženja (npr. izlaganje pesticidima), infektivni agensi (npr. Epstein-Barr, arbovirusi), imunosupresija, prethodni malignitet, genetska konstitucija.

Limfomi uopšte predstavljaju treći najčešći malignitet dečjeg uzrasta, zauzimajući 10-12% od ukupnog broja, posle akutnih leukemija (akutne limfoblaste i akutne mijelocitne leukemije) i tumora centralnog nervnog sistema (83).

NHL počinje akutno ili subakutno, za razliku od sporog toka koji karakteriše većinu limfoma kod adultne populacije. Trajanje simptoma pre postavljanja dijagnoze je uglavnom jedan mesec ili manje, sa specifičnim tegobama zavisno od mesta javljanja limfoma. Zahvatanje kosne srži kod NHL može izazvati generalizovan ili migratorni bol u kostima, ali klinički značajne citopenije nisu česte i uglavnom sugerišu na dijagnozu akutne leukemije.

Lokalizovana bolest se može manifestovati kao limfadenopatija, hipertrofija tonzila, ili tumorska masa u bilo kojoj lokalizaciji. Pacijenti sa lokalizacijom tumora iznad dijafragme (npr limfoblastni limfom) obično imaju neproduktivni kašalj, dispneju, bol u grudima i disfagiju. Abdominalni tumori (uglavnom limfom malih nerascepljenih ćelija ili B-ćelijski limfom velikih ćelija) povezani su sa abdominalnim bolom, konstipacijom, ascitesom.

Opšti simptomi (subfebrilne temperature, slabost, anoreksija, gubitak u telesnoj masi) nisu česti kod NHL izuzev kod limfoma velikih ćelija. Lezije limfoma velikih ćelija imaju raznovrsnu prezentaciju uključujući grudne i abdominalne komplikacije. U ređim slučajevima javlja se kao izolovana lezija kosti praćena bolom, otokom i rizikom za patološke frakture. Povremeno je inicijalna slika bolna kožna lezija, periferna limfadenopatija i hepatosplenomegalija. Pacijenti sa NHL povremeno, pre dijagnoze, razviju sliku zahvatanja centralnog nervnog sistema sa glavoboljom, meningizmom, paralizom kranijalnih nerava i poremećenim sensorijumom, a povremeno i znacima meningoencefalitisa.

Postoji nekoliko klasifikacija za NHL, kao što su Kiel klasifikacioni sistem i NCI Working Formulation. U današnje vreme za klasifikaciju adultnih NHL, najviše se koristi Revised European-American Lymphoma (REAL) klasifikacioni sistem. Za klasifikaciju dečjih NHL ovaj sistem je

previše komplikovan jer uključuje brojne dijagnoze koje se retko ili nikad ne javljaju kod dece. Adultni NHL se karakterišu kao limfomi niskog, intermedijernog i visokog stepena i mogu biti difuzni ili nodularni limfomi. Nasuprot tome, dečji NHL su skoro uvek visokog stepena i difuzni. Generalno, mogu biti podeljeni u tri glavne klase: limfoblastni limfomi, limfomi malih nerascepljenih ćelija i limfomi velikih ćelija, koji mogu biti B i T ćelijski. Dijagnoza se postavlja sintezom histoloških, imunohistohemijskih, citogenetskih i kliničkih analiza.

Limfoblastni limfom obuhvata oko 35% NHL kod dece. Ćelije limfoblastnog limfoma se ne mogu razlikovati od limfoblasta u ALL. Imunohistohemijskom analizom se uglavnom otkriju T-ćelijski markeri, uključujući CD5 i CD7. Povremeno je prisutan CALLA (Common ALL antigen). Manji deo NHL ispoljavaju fenotip prekursora B ćelija tipičan za dečje ALL.

Limfomi malih nerascepljenih ćelija mogu se klasifikovati kao Burkitt ili ne-Burkitt limfomi. Razlika može biti diskretna i klinički značaj nije najjasniji. Tumorske ćelije su zrele B ćelije, sa ekspresijom površinskih imunoglobulina (uglavnom M klase), CD19, CD20, i HLA-DR. CALLA je obično prisutan. Makrofazi često infiltriraju tumore, dajući karakterističnu sliku “zvezdanog neba” na patohistološkim preparatima, koja pak nije patognomonična za Burkitt limfom.

Imunofenotipski nalazi sugerišu da ćelije non-Burkitt limfoma mnogo češće ispoljavaju BCL-6 onkogen za razliku od ćelija Burkitt limfoma i pokazuju relativno nizak stepen apoptoze. Zbog opisanih karakteristika, izgleda da su non-Burkitt (Burkitt-like) limfomi biološki udaljeni od Burkitt limfoma i najverovatnije su najviše povezani sa B ćelijskim limfomima velikih ćelija.

Limfomi velikih ćelija su heterogena grupa i uglavnom se klasifikuju kao B-ćelijski i T-ćelijski. B-ćelijski limfomi velikih ćelija histološki su najbliži non-Burkitt (Burkitt-like) limfomima. Anaplastični limfomi velikih ćelija su mnogo češći od B-ćelijskih i nastaju od T ćelija, što pokazuje rearanžman njihovih TCR gena. Međutim mogu ispoljiti i nekoliko T-ćelijskih površinskih markera. Njihov znak je ispoljavanje CD30 ili Ki-1, antigen koji je prvo nađen na ćelijama Hodgkin limfoma. Drugi ćelijski markeri koji se mogu naći su HLA-DR i IL-2 receptori.

Na kraju, mali broj limfoma velikih ćelija ne pokazuju ni B ni T ćelijski fenotip. Bar neki od ovih tumora su porekla histiocita.

Nekoliko sistema za utvrđivanje stadijuma NHL postoji, ali najširu primenu ima St. Jude sistem NHL. Postoje četiri stadijuma u odnosu na obim proširenosti i zahvaćenosti različitih mesta u vreme postavljanja dijagnoze:

I stadijum

- jedan tumor (ekstranodalni) ili jedno anatomsko polje (nodalni), isključujući medijastinum ili abdomen

II stadijum

- jedan tumor (ekstanodalni) sa zahvatanjem regionalnih limfnih žlezda
- dve ili više žlezda sa iste strane dijafragme
- dva pojedinačna (ekstranodalna) tumora sa ili bez zahvatanja regionalnih žlezda sa iste strane dijafragme
- primarni tumor gastrointestinalnog trakta obično u ileocekalnom polju sa ili bez zahvatanja samo regionalnih mezenteričnih žlezda

III stadijum

- dva pojedinačna tumora sa različitih strana dijafragme (ekstranodalna)
- dva ili više nodalnih polja iznad i ispod dijafragme
- svi primarni intratorakalni tumori (medijastinum, pleura, timus)
- svi intraabdominalni oblici
- svi paraspinalni ili epiduralni tumori bez obzira na druge tumorske lokalizacije

IV stadijum - sve navedene lokalizacije sa zahvaćenošću CNS-a ili koštane srži.

Podaci o incidenci dečjih kancera u radu Kaatsch P. (84), zasnovani na bazi podataka više registara (evropskih - German childhood cancer registry, GCCR, Automated childhood cancer information system, ACCIS, EUROCARE i američkih - Surveillance, Epidemiology and End results, SEER pri National Cancer institute, NCI) objavljenim 2010. godine pokazuju da je procenat dece od 0 do 14 godina obolelih od leukemije je 34,1% (akutna limfoblastna leukemija 26,8%, akutna mijeloidna 4,7%, hronična mijeloproliferativna bolest 4,7%, mijelodisplastični sindrom i druge mijeloproliferativne bolesti 1,9%, neklasifikovane i druge specifične leukemije 0,3%) i limfoma 11,5 % (Hodgkin limfom 4,8%, NHL 5,3%, Burkitt limfom 1,3%). Odnos obolelih dečaka prema devojčicama za ALL je 1,2, sa prosečnim javljanjem u uzrastu 5 godina 10 meseci, dok je za NHL odnos obolelih dečaka prema devojčicama 2,4, sa prosečnim javljanjem u uzrastu 9 godina i 3 meseca. Stopa petogodišnjeg preživljavanja u uzrastu od 0-14 godina je prema ACCIS za leukemije je 72%, prema SEER 75%, dok je za limfome ova stopa prema ACCIS 84%, prema SEER 83% (8).

13. TERAPIJA

13.1. AKUTNA LIMFOBLASTNA LEUKEMIJA

Svi pacijenti oboleli od ALL (38 pacijenata) su lečeni prema protokolu randomizirane studije I-BFM-SG za proučavanje i lečenje dečje non-B akutne limfoblastne leukemije (International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group). Većina pacijenata (33 pacijenata) je lečena prema protokolu iz 2002. godine, ALL IC-BFM 2002, dok je jedan deo pacijenata (5 pacijenata) bio uključen u protokol iz 2009. godine, ALL IC-BFM 2009.

Prema oba protokola, iz 2002. i iz 2009. godine, pacijenti se stratifikuju u tri grupe rizika: standardni rizik (SR), intermedijarni rizik (IR) i visok rizik (HR). Stratifikacija se vrši na osnovu kliničkih i bioloških karakteristika kao i odgovora na terapiju.

Standardni rizik (SR):

- Uzrast: ≥ 1 godine < 6 godina
- Inicijalni broj Le $< 20\ 000 / \mu\text{l}$
- Apsolutni broj blasta u razmazu periferne krvi 8. dana terapije $< 1000 / \mu\text{l}$
- Procenat blasta u razmazu kosne srži 15. dan: M1 ili M2
- *15. dan kosna srž FC- MRD $< 0,1\%$
- Procenat blasta u razmazu kosne srži 33. dan: M1

Svi kriterijumi moraju biti ispunjeni.

Intermedijarni rizik (IR):

- Uzrast: < 1 godine; ≥ 6 godina ili inicijalni broj Le $\geq 20\ 000 / \mu\text{l}$
- Apsolutni broj blasta u razmazu periferne krvi 8. dana terapije $< 1000 / \mu\text{l}$
- Procenat blasta u razmazu kosne srži 15. dan: M1 ili M2
- *15. dan kosna srž FC-MRD $\geq 0.1\% < 10\%$

- Procenat blasta u razmazu kosne srži 33. dan: M1
ili

Kriterijumi za standardni rizik ali:

- 15. dan kosna srž: procenat blasta u razmazu M3 ili *FC- MRD $\geq 0.1\%$
- i procenat blasta u razmazu kosne srži 33. dan: M1

Visok rizik (high risk - HR):

- t(9;22) ili t(4;11) i / ili detekcija korespondirajućih fuzionih gena BCR/ABL - MLL/AF4 ili *hipodiploidija ≤ 45 hromozoma
- Apsolutni broj blasta u razmazu periferne krvi 8. dana terapije $> 1000 / \mu\text{l}$
- Procenat blasta u razmazu kosne srži 15. dan: M1 ili M2 ili M3
- *15. dan kosna srž FC- MRD $> 10\%$
- Procenat blasta u razmazu kosne srži 33. dan: M1 ili M2 ili M3
ili

Kriterijumi za standardni rizik ali:

- *15. dan kosna srž FC- MRD $> 10\%$
- ili procenat blasta u razmazu kosne srži 33. dan: M2 ili M3
ili

Kriterijumi za intermedijarni rizik ali:

- 15. dan kosna srž: procenat blasta u razmazu M3 ili *FC- MRD $> 10\%$
- ili procenat blasta u razmazu kosne srži 33. dan: M2 ili M3

*dopunski kriterijumi za stratifikaciju u protokolu ALL IC-BFM 2009.

- Apsolutni broj blasta u razmazu periferne krvi osmog dana nakon sedam dana prefaze (terapija prednizonom i jedne doze IT MTX prvog dana sa ili bez alopurinola) = odgovor na prednizon.
- M1= blasti $<5\%$; M2 = blasti $\geq 5- <25\%$; M3 = blasti $\geq 25\%$

Pacijenti sa Ph₁ (Filadelfija hromozom) + (BCR/ABL+) ALL ili pacijenti sa t(4;11)(MLL/AF₄+) klasifikuju se u granu visokog rizika bez obzira na odgovor na terapiju.

Pacijenti sa neprocenjivom kosnom srži 15. dana terapije zbog aplazije stratifikuju se prema ostalim kriterijumima.

Pacijenti uzrasta ispod godinu dana prema preporuci protokola, ne treba da budu u standardnoj grupi rizika.

U ovom istraživanju uključena su dva pacijenta uzrasta ispod 12 meseci. Oba pacijenta su lečena prema protokolu ALL IC-BFM 2002. Jedan pacijent svrstan je u grupu intermedijarnog rizika a drugi u grupu visokog rizika, prema kriterijumima protokola.

U dodatne kriterijume za stratifikaciju u grupe rizika, prema protokolu ALL IC-BFM 2009, spada hipoploidija sa brojem hromozoma manjim ili jednakim 45. Takođe je uvedena i procena minimalne rezidualne bolesti (MRD) koja se dijagnostikuje protočnom citometrijom (flow cytometry- FC) pomoću monoklonalnih antitela u uzorku kosne srži 15. dana terapije.

Prema protokolu **ALL IC-BFM 2002**, lečenje pedijatrijske ALL ima nekoliko faza: terapija indukcije, konsolidacije, reindukcije i održavanja. Ukupno trajanje terapije za sve pacijente iznosi 104 nedelje (24 meseca). Pre započinjanja svake faze lečenja postoje posebni uslovi koje pacijent mora da ispuni da bi terapija bila započeta, a odnosi se na opšte stanje pacijenta, prisustvo/odsustvo infekcije i laboratorijske nalaze (pre svega broj leukocita, granulocita, trombocita, potom nivo kreatinina, bilirubina, AST, ALT, faktora koagulacije). Nakon faze indukcije sprovodi se faza konsolidacije/intenzifikacije, a potom se pacijenti iz svake grupe rizika randomiziraju u jednu od dve grane terapije kasne intenzifikacije (reindukcije), kada primaju terapiju različitog intenziteta. Radioterapija se primenjuje kod određenih podgrupa pacijenata tokom ili odmah nakon reindukcije ili kao deo pripreme za alogenu transplantaciju matičnih ćelija kod odabranih pacijenata HR grupe koji imaju najmanje 2 godine. Nakon intenzivne hemoterapije sa ili bez radioterapije, svi pacijenti kojima se neće trasplantirati matične ćelije, primaju terapiju održavanja tokom preostalog perioda od 104 nedelje ukupnog tretmana.

Visoke doze MTX (5g/m²/24h) primaju pacijenti u grupi SR i IR sa T-ALL i svi pacijenti u HR grupi. Međutim, u cilju efikasnosti, pacijenti sa BCP-ALL (akutne limfoblastne leukemije B ćelijskog prekursora) u SR i IR grupi primaju ekstra IT MTX tokom faze održavanja i/ili kasne

intenzifikacije (zavisno od grane protokola), što je strategija kojom se nadopunjuje terapija nižim dozama MTX ($2\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$) u fazi konsolidacije.

Faza indukcije traje 64 dana. Sadrži **Protokol I** i **Protokol I'**. Pacijenti SR grupe sa BCP-ALL primaju samo dve doze daunorubicina, prema Protokolu I', s obzirom da svi podaci sugerišu da je ova redukcija bezbedna odnosno bez rizika za kasni relaps. Svi ostali - pacijenti sa non-BCP ALL u SR grupi, pacijenti IR i HR grupe, primaju četiri doze daunorubicina (DNR) prema Protokolu I. Izuzev navedene razlike u broju primljenih DNR ostali deo protokola I i I' je isti i sastoji se iz dve faze: "1" i "2" (I/1, I/2 i I'/1, I'/2). Faza "1" porazumeva prednizon, vinkristin, daunorubicin, asparginazu i obavezno započinjanje intratekalnog MTX. Faza „2“ uključuje ciklofosfamid, 6-merkaptopurin, citarabin i nastavak IT MTX.

Dve nedelje nakon završetka indukcione faze počinje **faza konsolidacije** koja traje 56 dana. Tokom ove faze pacijenti iz SR i IR prema imunofenotipu se dele u dve grupe: pacijenti sa BCP-ALL uključuju se u **Protokol mM**, dok se pacijenti sa T-ALL uključuju u **Protokol M**. Protokl mM podrazumeva terapiju: 6-merkaptopurin (MP), IV srednje doze MTX (MDMTX – $2\text{mg}/\text{m}^2/24\text{h}$), IT MTX i leukovorin Ca (LVC). Protokol M podrazumeva: 6-merkaptopurin, IV visoke doze MTX (HDMTX $5\text{mg}/\text{m}^2/24\text{h}$), IT MTX i LCV.

Dve nedelje nakon završene faze konsolidacije, svi pacijenti iz svih grupa rizika se randomiziraju u jednu od dve grane **faze reindukcije** (faza kasne intenzifikacije). Pacijenti iz SR-1 će primiti terapiju **Protokola II** jednom, dok će pacijenti iz grane SR-2 primiti terapiju **Protokola III**, dva puta, između sa desetonedeljnom oralnom terapijom MP/MTX. Slično ovome, pacijenti u grani IR-1 uključuju se u Protokol II, koji će se sprovesti jednom, dok će pacijenti iz grane IR-2 primiti terapiju Protokola III tri puta, između sa dve ture četvonedeljne oralne terapije MP/MTX.

Protokol II traje 49 dana i sastoji se iz dve faze. Tokom prve faze terapija podrazumeva: deksametazon, vinkristin, doksorubicin, asparginaza i IT MTX. U drugoj fazi se primenjuju: ciklofosfamid, 6-tioguanin, citarabin i IT MTX.

Protokol III traje 29 dana i takođe se sastoji iz dve faze. Tokom prve faze u terapiju su uključeni: deksametazon, vinkristin, doksorubicin i asparginaza. U drugoj fazi se primenjuju: ciklofosfamid, 6-tioguanin, citarabin i IT MTX.

Svi pacijenti koji imaju inicijalno zahvaćen CNS a imaju najmanje godinu dana, primaju terapijsku kranijalnu radioterapiju (pCRT).

Pacijenti iz **HR** grupe se leče hemoterapijom i radioterapijom. Terapija u **fazi indukcije** se sastoji od obe faze Protokola I. Nakon dve nedelje započinje **faza konsolidacije** sa tri vrlo intenzivna kratka bloka (**HR-1', HR-2', HR-3'**), uvek sa periodom oporavka od 2 nedelje nakon šestog dana svakog bloka. Potom se vrši randomizacija u jednu od dve grane terapije kasne intenzifikacije-**reindukcije**. Grana HR-1 se uključuje u Protokol III koji se ponavlja tri puta sa dve četvoronedeljne pauze održavanja između. Za granu HR-2 postoje dve opcije, za koju se odlučuje svaki centar ili nacionalna grupa. AIEOP opcija-HR-2A se sastoji od Protokola II koji se sprovodi dva puta sa četvoronedeljnom fazom održavanja između. BFM opcija-HR-2B na isti način ponavlja tri bloka (HR-1', HR-2', HR-3') koji se sprovedu tokom konsolidacije i nakon tri nedelje se nastavlja Protokol II, jednom.

Blok HR-1' traje 11 dana i podrazumeva: deksametazon, vinkristin, HDMTX MTX (5 mg/m²/24h), LCV, ciklofosamid, HD citarabin, asparginazu i IT MTX/citarabin/prednizon.

Blok HR-2' traje 11 dana i obuhvata: deksametazon, HDMTX MTX (5 mg/m²/24h), LCV, IT MTX/citarabin/prednizon, asparginazu, vindezin, ifosfamid i daunorubicin.

Blok HR-3' traje 11 dana i obuhvata: deksametazon, asparginazu, IT MTX/citarabin/prednizon, HD citarabin i etoposid.

Pored hemoterapije, većina HR pacijenata se leči i kranijalnom radioterapijom: kod CNS-negativnih pacijenata kao profilaktička (pCRT sa 12 Gy) ili kao terapijska kod CNS-pozitivnih pacijenata (tCRT 12 Gy ili 18 Gy). Radioterapijom se ne leče deca ispod uzrasta godinu dana. Pacijenti koji se pripremaju sa transplantaciju kosne srži, sa najmanje uzrasta dve godine, primaju radijaciju celog tela sa ili bez lokalne radioterapije testisa i/ili CNS-a. Pacijenti ispod dve godine, koji se pripremaju za transplantaciju kosne srži ne primaju ni totalnu ni lokalnu radioterapiju.

Na kraju, dve nedelje nakon poslednjeg intenzivnog terapijskog elementa, svi pacijenti ulaze u **fazu održavanja** koja se sastoji od oralne terapije dnevnog 6-merkaptopurina i nedeljnog MTX, tokom preostalog perioda od ukupnih 104 nedelja (24 meseca). Tokom ovog perioda, pacijenti sa BCP-ALL iz grane SR-1 i IR-1 primiče 4 doze IT MTX, a pacijenti sa BCP-ALL iz grane SR-2 će primiti 2 doze IT MTX.

Protokol **ALL IC-BFM 2009**, obuhvata sledeće faze lečenja: terapiju indukcije, rane intenzifikacije, konsolidacije, reindukcije i održavanja. Ukupno trajanje terapije za sve pacijente iznosi 104 nedelje (24 meseca). Prema ovom protokolu, randomizacija se vrši po završetku

indukcije. Tada se, 33. dana terapije, pacijenti iz grupe IR i HR randomiziraju u dve grane terapije rane intenzifikacije. Pacijenti iz grupe IR sa BCP-ALL se takođe randomiziraju za dve različite doze MTX u fazi konsolidacije. Radioterapija se sprovodi u određenim subgrupama pacijenata nakon faze reindukcije (Protokol II) ili kao deo pripreme za alogenu transplataciju matičnih ćelija (totalno zračenje + lokalna radioterapija nedelju dana ranije u slučaju zavatanja testisa i/ili CNS-a) kod pacijenata iz HR grupe koji su najmanje uzrasta dve godine. Nakon intenzivne hemoterapije sa ili bez radioterapije svi pacijenti koji se ne planiraju za transplantaciju matičnih ćelija primaju terapiju održavanja tokom preostalog vremena od ukupnih 24 meseca tretmana.

Pacijenti iz grupe SR sa BCP-ALL primaju samo dve doze DNR u fazi indukcije (Protokol I) , s obzirom da svi podaci sugerišu da je ova redukcija bezbedna. Svi ostali - pacijenti sa non-BCP ALL u SR grupi, pacijenti IR i HR grupe, primaju četiri doze daunorubicina (DNR) prema Protokolu I. Pacijenti grupe IR i HR se randomiziraju za terapiju standardne faze IB (grane IR-1, HR-1) ili faze IB augmented –pojačane (grane IR-2, HR-2). Dve nedelje nakon protokola I, počinje faza konsolidacije koja se razlikuje u zavisnosti od imunofenotipa. Pacijenti sa T-ALL bilo koje grupe rizika (SR i IR) primaju Protokol M, sa HDMTX terapijom ($5\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ u 4 doze tokom dve nedelje) kako je ovo populacija za koju farmakodinamika i klinički podaci pokazuju najveći benefit od ovih doza MTX. Pacijenti sa BCP-ALL iz IR grupe randomiziraju se da prime standardni Protokol mM (grana IR-3) sa terapijom MDMTX ($2\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ u četiri doze 2 nedelje) ili Protokol M (grana IR-4) sa terapijom HDMTX ($5\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ u četiri doze 2 nedelje). S druge strane pacijenti grupe SR sa BCP-ALL primaju standardni Protokol mM sa terapijom MDMTX ($2\text{g}/\text{m}^2/24$ u četiri doze 2 nedelje). Dve nedelje nakon završene konsolidacije, svi pacijenti svih grupa rizika primaju standardnu terapiju faze reindukcije (Protokol II). Na kraju, dve nedelje nakon faze reindukcije, svi pacijenti izuzev pacijenata spremanih za transplantaciju matičnih ćelija, primaju oralnu terapiju održavanja tokom preostalog vremena od ukupnih 24 meseca tretmana.

U cilju kompenzacije sistemske terapije nižim dozama MTX ($2\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$) u Protokolu M, pacijenti sa BCP-ALL primaju četiri puta IT MTX tokom faze održavanja. Pacijenti sa T-ALL sa brojem leukocita $< 100\ 000 / \mu\text{l}$, bilo koje grupe rizika (SR i IR), primaju terapiju konsolidacije sa HDMTX (Protokol M), ali s obzirom da ne primaju preventivnu kranijalnu radioterapiju, primaju šest puta IT MTX tokom faze održavanja. Međutim, svi pacijenti sa inicijalnim obolenjem CNS-a, koji su najmanje uzrasta godinu dana, primaju terapijsku kranijalnu radioterapiju.

Faza indukcije traje 33 dana. Sadrži **Protokol I'A** koji je dizajniran samo za pacijente SR grupe sa BCP-ALL po kojem primaju samo dve doze daunorubicina, s obzirom da svi podaci sugerišu da je ova redukcija bezbedna odnosno bez rizika za kasni relaps. Svi ostali pacijenti – SR sa T-ALL, pacijenti IR i HR, primaju četiri doze daunorubicina (DNR) prema **Protokolu IA**. Izuzev navedene razlike u broju primljenih DNR ostali deo protokola I'A i IA je isti i podrazumeva prednizon, vinkristin, daunorubicin, asparginazu i intratekalni MTX.

Rana intenzifikacija sa pacijente SR grupe je faza IB. Za pacijente grupe IR i HR, faza IB je randomizirana sa IB augmented.

Protokol IB primaju svi pacijenti SR, IR (grana-1) i HR (grana-1). Počinje 36. dana protokola I'A i IA (traje do 64. Dana). Sadrži ciklofosfamid, 6-merkaptopurin, citarabin i IT MTX.

Protokol IB augmented je randomizacijom dodeljen pacijentima IR (grana-2) i HR (grana-2). Počinje 36. dana protokola IA (traje do 92. dana). Sadrži ciklofosfamid, 6-merkaptopurin, citarabin, i.t. MTX i vinkristin, asparginazu.

Dve nedelje nakon protokola I'B / IB, počinje **faza konsolidacije** koja se razlikuje u zavisnosti od imunofenotipa i traje 56 dana. Protokol mM je dizajniran za terapiju pacijenata sa BCP-ALL iz SR i IR grupe. Svi pacijenti iz SR sa BCP-ALL primaju standardni **Protokol mM** sa terapijom MDMTX ($2\text{g}/\text{m}^2/24$ u četiri doze 2 nedelje). Osnovna razlika u odnosu na protokol ALL-IC 2002. je u tome što se pacijenti iz IR BCP-ALL randomiziraju u dve grane: grana **IR-3** koja prima terapiju standardnog Protokola mM sa MDMTX ($2\text{g}/\text{m}^2/24$ u četiri doze 2 nedelje) i grana **IR-4**, koja prima terapiju prema **Protokolu M** sa HDMTX ($5\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ u četiri doze 2 nedelje). S druge strane, potencijalni rizik manje efikasnosti kada je reč o bolesti CNS-a kompenzuje se dodatnim dozama IT MTX kroz intenzifikacionu terapiju koja sledi. Raspored spasavanja leukovorinom je indentičan u obe studije.

Protokol mM podrazumeva terapiju: 6-merkaptopurin (MP), i.v. srednje doze MTX (MDMTX – $2\text{mg}/\text{m}^2/24\text{h}$), i.t. MTX i leukovorin Ca (LVC).

Pacijenti sa T- ćelijskom ALL bilo koje grupe rizika (SR i IR) u fazi konsolidacije primaju Protokol M, sa HDMTX terapijom ($5\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ u četiri doze 2 nedelje) kako ovi pacijenti pokazuju najveći benefit od ovih doza MTX. Protokol M, kako je napomenuto, primaju i pacijenti IR BCP-ALL randomizirani za ovaj protokol (grana IR-4). Protokol M podrazumeva: 6-merkaptopurin, IV visoke doze MTX ($5\text{mg}/\text{m}^2/24\text{h}$), IT MTX i LCV.

Dve nedelje nakon završene konsolidacije, svi pacijenti svih grupa rizika primaju standardnu terapiju **faze reindukcije (Protokol II)**, tokom 49 dana. Terapijski elementi ovog protokola su identični Protokolu II studije ALL-IC 2002 i sastoji se iz dve faze, sa početkom dve nedelje nakon Protokola mM / M. Tokom prve faze terapija podrazumeva: deksametazon, vinkristin, doksorubicin, asparginazu i IT MTX. U drugoj fazi se primenjuju: ciklofosamid, 6-tioguanin, citarabin i IT MTX.

Pacijenti iz **HR** grupe se leče hemoterapijom i radioterapijom. Terapija u **fazi indukcije** podrazumeva **Protokol IA**. Za razliku od ALL-IC 2002. rana intenzifikacija je randomizirana između standardne faze **IB** (grana HR-1) i faze **IB augmented** (grana HR-2). Nakon dve nedelje, započinje faza konsolidacije, i za razliku od ALL-IC 2002, umesto tri, sa šest vrlo intenzivna kratka bloka (**HR-1'**, **HR-2'**, **HR-3'**) x 2, uvek sa periodom oporavka od 2 nedelje nakon šestog dana svakog bloka. Nakon dve nedelje od poslednjeg bloka intenzifikacija će biti nastavljena sa standardnim Protokolom II.

Blok HR-1' podrazumeva: deksametazon, vinkristin, *HD*MTX (5 mg/m²/24h), LCV, ciklofosamid, HD citarabin, asparginazu i IT MTX/citarabin/prednizon.

Blok HR-2' obuhvata: deksametazon, *HD*MTX (5 mg/m²/24h), LCV, IT MTX/citarabin/prednizon, asparginazu, vindezin, ifosfamid i daunorubicin.

Blok HR-3' obuhvata: deksametazon, asparginazu, IT MTX/citarabin/prednizon, HD citarabin i etoposid.

Pored hemoterapije, većina HR pacijenata (izuzev HR BCP-ALL sa lošim odgovorom na prednizon) se leči i kranijalnom radioterapijom: kod CNS-negativnih pacijenata starijih ili uzrasta godinu dana kao profilaktička (pCRT sa 12 Gy) ili kao terapijska kod CNS-pozitivnih pacijenata (tCRT 12 Gy ili 18 Gy) starijih ili uzrasta godinu dana. Pacijenti koji se pripremaju sa transplantaciju kosne srži, sa najmanje uzrasta dve godine, primaju radijaciju celog tela sa ili bez lokalne radioterapije testisa i/ili CNS-a. Pacijenti ispod dve godine, koji se pripremaju za transplantaciju kosne srži ne primaju ni totalnu ni lokalnu radioterapiju.

Na kraju, dve nedelje nakon faze reindukcije, svi pacijenti izuzev pacijenata spremanih za transplantaciju matičnih ćelija, primaju oralnu **terapiju održavanja** tokom preostalog vremena od ukupnih 24 meseca tretmana. Terapija IT MTX tokom faze održavanja indikovana je kod pacijenata

sa BCP-ALL koji su dodeljeni grani IR-3 (SR) i primaju četiri doze. Šest doza IT MTX primaju pacijenti sa T-ALL sa brojem leukocita $< 100\,000 / \mu\text{l}$, pošto ne primaju preventivnu radioterapiju.

Prema oba protokola prilikom terapije metotreksatom (MD i HDMTX), neophodna je :

- Adekvatna i.v. hidracija radi uspostavljanja adekvatne diureze najmanje -4 h do +72 h od započinjanja infuzije MTX
- Adekvatna i.v. alkalizacija radi održavanja pH urina > 7 , tokom perioda najmanje -4 h do +72 h od započinjanja infuzije MTX
- Održavanje balansa tečnosti tokom 12 h. Ukoliko je unos tečnosti veći od gubitka za + 400 ml/m²/12h treba dati furosemid i.v.
- 1/10 ukupne doze MTX (200 odnosno 500 mg/m²) treba dati infuzijom tokom 30 minuta kao „loading“ doza
- 9/10 ukupne doze MTX (1800 odnosno 4500 mg/m²) treba dati infuzijom tokom 23,5 h

Dalje, zbog čestih interakcija MTX sa lekovima, preporučeno je zaustavljanje ili prekidanje svih neobaveznih lekova od 24 sata pre i 72 sata nakon započinjanja infuzije MTX. Praćenje koncentracije MTX je „conditio sine qua non“ za HDMTX u cilju upravljanja mogućim toksičnostima izazvanih MTX koje mogu biti letalne.

Standardni režim spasavanja leukovorinom primenjuje se u + 42, +48 i +54 sata od započinjanja infuzije. Doza leukovorina iznosi 15 mg/m².

Tabela 13.1.1. Gornje granice koncentracije metotreksata i odgovarajući režim primene Leukovorina

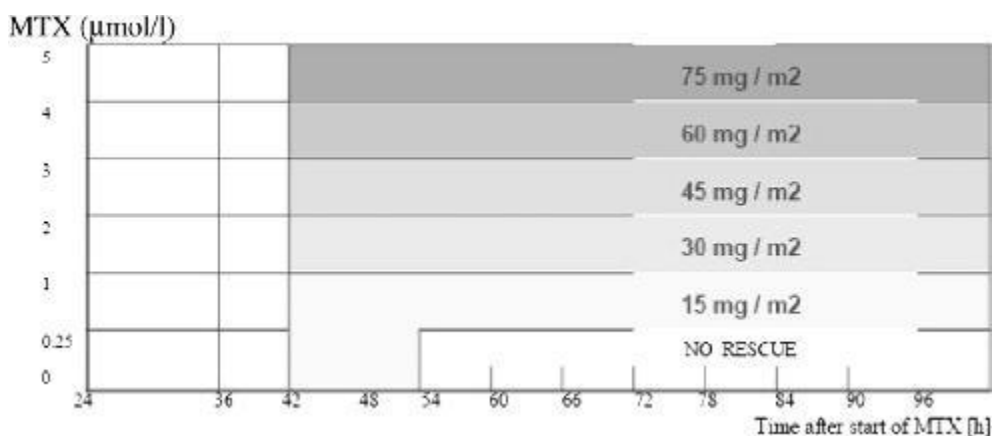
Vreme od započinjanja infuzije metotreksata (+ h)	Gornja granica koncentracije metotreksata ($\mu\text{mol/l}$)	Doza leukovorina, za intravensku primenu (mg/m^2)
24	150,0	
36	3,0	
42	1,0	15
48	0,4	15
54	0,4	15

Koncentracije metotreksata (MTX) se mere prema preporuci protokola u vremenskim intervalima: + 24, + 42, + 48 sati nakon započinjanja infuzije metotreksata. Za tačku + 36 h, uzorak se čuva za retrogradnu procenu zajedno sa uzorkom iz + 42 h. Međutim, ukoliko koncentracija metotreksata u + 24 h pređe 150 $\mu\text{mol/l}$ i/ili ako se posumnja na slabu eliminaciju metotreksata na osnovu kliničkih znakova (značajan porast kreatinina, prekomerna redukcija diureze, edemi, hipertenzija, itd.) bez odlaganja treba započeti forsiranu diurezu, alkalizaciju, praćenje vitalnih funkcija i strogu kontrolu unosa tečnosti. U ovom slučaju koncentracija MTX u +36 h se procenjuje odmah. Ukoliko u + 36 h koncentracija pređe 3 $\mu\text{mol/l}$, imperativ je započeti spasavanje leukovorinom, prema posebnom dijagramu datom u protokolu i nastaviti merenje koncentracija MTX prema utvrđenom planu. Pošto koncentracija MTX₄₂ neće još biti poznata, doza LCV₄₂ se inicijalno bazira na poznatoj koncentraciji MTX₃₆. Kada koncentracija MTX₄₂ bude poznata, doza LCV₄₂ može se naknadno korigovati. Ove mere treba nastaviti dok nivo metotreksata ne padne na najmanje 0,25 $\mu\text{mol/l}$. Ista strategija se odnosi i na visoke koncentracije MTX u + 42, + 48 i + 54 h. Ukoliko je koncentracija u tački + 42 h i posle, preko 5 $\mu\text{mol/l}$, doza leukovorina se računa prema formuli:

$$\text{Leukovorin [mg]} = \text{MTX koncentracija } [\mu\text{mol/l}] \times \text{telesna masa [kg]}.$$

Tabela 13.1.2. Spasavanje LV u slučaju neproporcionalno visokih nivoa serumskog metotreksata

MTX_{42h} 1 do $< 5,0 \mu\text{mol/l}$ ili $MTX_{48h} > 0,4 \mu\text{mol/l}$	LV i.v. na 6 h do $MTX \leq 0,25 \mu\text{mol/l}$ Doza: na osnovu dijagrama bazirajući se na nivo MTX procenjen 6 sati ranije
$MTX_{42h} > 5,0 \mu\text{mol/l}$	LV i.v. na 6 h do $MTX \leq 5,0 \mu\text{mol/l}$ Doza: Leukovorin [mg] = MTX koncentracija [$\mu\text{mol/l}$] x telesna masa [kg], bazirajući se na nivo MTX procenjen 6 sati ranije



Slika 13.1. Dijagram za doze leukovorina prema nivoima metotreksata.

13.2. NON-HODGKIN LIMFOMI

Svi pacijenti oboleli od **NHL** (5 pacijenata) su lečeni prema protokolu NHL-BFM 95, multicentrične studije u BFM grupi B-ćelijskih Non-Hodgkin limfoma za decu i adolescente.

Pacijenti se stratifikuju u četiri grupe rizika. U B-NHL-95 protokolu koristi se St. Jude sistem za utvrđivanje stadijuma NHL. Postoje četiri stadijuma u odnosu na obim proširenosti i zahvaćenosti različitih mesta u vreme posatvljanja dijagnoze:

I stadijum

- jedan tumor (ekstranodalni) ili jedno anatomsko polje (nodalni), isključujući medijastinum ili abdomen

II stadijum

- jedan tumor (ekstanodalni) sa zahvatanjem regionalnih limfnih žlezda
- dve ili više žlezda sa iste strane dijafragme
- dva pojedinačna (ekstranodalna) tumora sa ili bez zahvatanja regionalnih žlezda sa iste strane dijafragme
- primarni tumor gastrointestinalnog trakta obično u ileocekalnom polju sa ili bez zahvatanja samo regionalnih mezenteričnih žlezda

III stadijum

- dva pojedinačna tumora sa različitih strana dijafragme (ekstranodalna)
- dva ili više nodalnih polja iznad i ispod dijafragme
- svi primarni intratorakalni tumori (medijastinum, pleura, timus)
- svi intraabdominalni oblici
- svi paraspinalni ili epiduralni tumori bez obzira na druge tumorske lokalizacije

IV stadijum - sve navedene lokalizacije sa zahvaćenošću CNS-a ili kostne srži.

U protokolu se primenjuje i posebno formiranje terapijskih grana u odnosu na resekciju tumora i stadijume prema St. Jude sistemu:

Tabela 13.2.1. Terapijske grane za NHL (St. Jude sistem)

Terapijska grana	resekcija	Stadijum i LDH (U/l)
R1	Kompletna	
R2	Inkompletna	I + II III i LDH < 500 U/l
R3	Inkompletna	III i LDH od 500 do 1000 U/l IV / B-ALL i LDH < 1000 U/l i CNS negativan
R4	Inkompletna	III i LDH ≥ 1000 U/l IV / B-ALL i LDH ≥ 1000 U/l sa ili bez CNS pozitivan

Standarni terapijski plan:

Terapija u R1 grani se sastoji od dva terapijska kursa A⁴ i B⁴. U ovoj grani se ne daje citoreduktivna predfaza.

U R2 grani terapija počinje citoreduktivnom predfazom V i nastavljaju se četiri bloka A⁴- B⁴- A⁴- B⁴.

U R3 grani terapija počinje citoreduktivnom predfazom V i nastavlja se se pet blokova AA²⁴- BB²⁴-CC- AA²⁴-BB²⁴.

U R4 grani terapija počinje citoreduktivnom predfazom V i nastavlja se se šest blokova AA²⁴-BB²⁴-CC- AA²⁴-BB²⁴-CC.

Modifikovani terapijski plan za pacijente sa primarno medijastinalnim B-NHL:

- LDH < 500 U/l, metotreksat se daje u dozi 1 g / m² tokom 24 sata: A²⁴-B²⁴-A²⁴-B²⁴-A²⁴-B²⁴.

- LDH > 500 U/l, metotreksat se daje u dozi 5 g / m² tokom 24 sata: AA²⁴-BB²⁴-CC- AA²⁴-BB²⁴-CC- BB²⁴.

Modifikovani terapijski plan za pacijente sa inicijalno zahvaćenim CNS-om: AAZ1-BBZ1-CC-AAZ2-BBZ2-CC.

Za počinjanje terapije pacijent mora da ispuni određene uslove, kliničke i laboratorijske (pre svega broj leukocita i trombocita). U terapijskim granama R3 i R4 tri dana po završetku svakog bloka daje se G-CSF (colony stimulating factor). U slučaju povišene telesne temperature iznad 38⁰C i broja neutrofila < 500 G/l, C-GSF se daje i u granama R1 i R2.

Najkraći rok između dva bloka ne treba da bude manji od 16 dana.

Citoreduktivna predfaza (V) daje se u terapijskim granama R2, R3 i R4. Podrazumeva: deksametazon, ciklofosfamid i intratekalnu trojnu terapiju: metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok A⁴ traje pet dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, citarabin, etoposid, metotreksat (1 g/m² tokom 4 sata), leukovorin, ifosfamid i intratekalno (2. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok A²⁴ traje pet dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, citarabin, etoposid, metotreksat (1 g/m² tokom 24 sata), leukovorin, ifosfamid i intratekalno (2. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok AA²⁴ traje pet dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, citarabin, etoposid, metotreksat (5 g/m² tokom 24 sata), leukovorin, ifosfamid i intratekalno (2. i 5. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok AAZ1 traje 6 dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, citarabin, etoposid, metotreksat (5 g/m² tokom 24 sata), leukovorin, ifosfamid i intratekalno (2, 4. i 6. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok AAZ2 traje 6 dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, citarabin, etoposid, metotreksat (5 g/m² tokom 24 sata), leukovorin, ifosfamid i intratekalno (2, i 6. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok B⁴ traje pet dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, doksorubicin, metotreksat (1 g/m² tokom 4 sata), leukovorin, ciklofosfamid i intratekalno (2. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok B²⁴ traje pet dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, doksorubicin, metotreksat (1 g/m² tokom 24 sata), leukovorin, ciklofosfamid i intratekalno (2. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok BB²⁴ traje pet dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, doksorubicin, metotreksat (5 g/m² tokom 24 sata), leukovorin, ciklofosfamid i intratekalno (2. i 5. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok BBZ1 traje 6 dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, doksorubicin, metotreksat (5 g/m² tokom 24 sata), leukovorin, ciklofosfamid i intratekalno (2, 4. i 6. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok BBZ2 traje 6 dana i sadrži: deksametazon, vinkristin, doksorubicin, metotreksat (5 g/m² tokom 24 sata), leukovorin, ciklofosfamid i intratekalno (2. i 6. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Blok CC traje pet dana i sadrži: deksametazon, vindezin, citarabin, etoposid i intratekalno (5. dana) metotreksat, citarabin i prednizon.

Prema protokolu prilikom terapije metotreksatom neophodno je :

- Sprovesti adekvatnu IV hidracija radi uspostavljanja adekvatne diureze najmanje -4 h do +72 h od započinjanja infuzije MTX
- Sprovesti adekvatnu IV alkalizacija radi održavanja pH urina 7,0 – 7,5
- Održavanje balansa tečnosti tokom 12 h. Ukoliko je unos tečnosti veći od gubitka dati furosemid IV
- Za 24-satnu infuziju: 1/10 ukupne doze MTX dati infuzijom tokom 30 minuta kao „loading“ doza, potom dati 9/10 ukupne doze tokom 23,5 h
- Za 4-satnu infuziju: celokupnu dozu dat tokom 4- satne infuzije, bez „loading“ doze

Praćenje koncentracije MTX je dato tabelarno za sve doze metotreksata i dužine trajanja infuzije.

Tabela 13.2.2. Praćenje koncentracija MTX kod terapije NHL

MTX terapija	1 g/m ²	1 g/m ²	5 g/m ²
Vreme od započinjanja infuzije metotreksata (+h)	4h-infuzija	24h-infuzija	24h-infuzija
4	+		
24	+	+	+
36	(+)	(+)	(+)
42	+	+	+
48	+	+	+

Tabela 13.2.3. Gornje granice koncentracije MTX i režim primene LV za 4h-infuziju 1 g /m² MTX

Vreme od započinjanja infuzije metotreksata (+ h)	Gornja granica koncentracije metotreksata (μmol/l)	Doza leukovorina, za intravensku primenu (mg/m ²)
4	< 200,0	
24	< 2,0	
36	< 1,0	
42		15
48	< 0,25	15
54		15

Tabela 13.2.4. Gornje granice koncentracije MTX i odgovarajući režim primene LV za 24h-infuziju 1 g /m² MTX

Vreme od započinjanja infuzije metotreksata (+ h)	Gornja granica koncentracije metotreksata (μmol/l)	Doza leukovorina, za intravensku primenu (mg/m ²)
24	< 30,0	
36	< 1,0	
42	< 0,4	15
48	< 0,25	15
54		15

Tabela 13.2.5. Gornje granice koncentracije MTX i odgovarajući režim primene LV za 24h-infuziju 5 g /m² MTX

Vreme od započinjanja infuzije metotreksata (+ h)	Gornja granica koncentracije metotreksata (μmol/l)	Doza leukovorina, za intravensku primenu (mg/m ²)
24	< 150,0	
36	< 3,0	
42	≤ 1,0	30
48	≤ 0,4	15
54		15

Ukoliko u + 36 h koncentracija metotreksata pređe preporučenu gornju granicu, imperativ je započeti spasavanje Leukovorinom, prema posebnom dijagramu (slika 13.1) datom u protokolu i nastaviti merenje koncentracija MTX prema utvrđenom planu.

II. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA:

CILJEVI:

1. Odrediti serumske koncentracije metotreksata kod dece obolele od malignih bolesti koja u terapiji dobijaju visoke doze metotreksata: 2 g/m^2 i 5 g/m^2 .
2. Ispitati postojanje uticaja primenjene doze, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika na koncentracije metotreksata.
3. Izračunati klirens metotreksata.
4. Ispitati postojanje uticaja primenjene doze, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika na klirens metotreksata.
5. Izračunati precizne farmakokinetičke parametre metotreksata (poluvreme eliminacije, konstante transfera, volumen raspodele) koristeći jednokompartmanski i dvokompartmanski model.
6. Ispitati postojanje uticaja primenjene doze na farmakokinetičke parametre i korelaciju sa demografskim karakteristikama ispitanika.
7. Ispitati prisustvo i odrediti stepen ispoljenih kliničkih znakova toksičnosti metotreksata.
8. Ispitati postojanje uticaja primenjene doze i koncentracija metotreksata na stepen ispoljavanja kliničkih znakova toksičnosti metotreksata i korelaciju sa demografskim karakteristikama ispitanika.
9. Ispitati prisustvo i odrediti stepen ispoljenih laboratorijskih znakova toksičnosti metotreksata.
10. Ispitati postojanje uticaja primenjene doze i koncentracija metotreksata na stepen ispoljavanja laboratorijskih znakova toksičnosti metotreksata i korelaciju sa demografskim karakteristikama ispitanika.

HIPOTEZE:

1. Određivanje serumske koncentracije metotreksata kod terapije visokim dozama važno je za praćenje toksičnih efekata.
2. Primenjena doza, demografske i kliničke karakteristike ispitanika utiču na postignute koncentracije metotreksata u serumu.
3. Primenjena doza, demografske i kliničke karakteristike ispitanika utiču na klirens metotreksata.
4. Dvokompartmanski model bolje odgovara farmakokinetici metotreksata od jednokompartmanskog modela.
5. Primenjena doza utiče na farmakokinetičke parametre metotreksata (poluvreme eliminacije, konstante transfera, volumen raspodele), postoji korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika.
6. Primenjena doza i koncentracije metotreksata utiču na stepen ispoljavanja kliničkih znakova toksičnosti, postoji korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika.
7. Primenjena doza i koncentracije metotreksata utiču na stepen ispoljavanja laboratorijskih znakova toksičnosti, postoji korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika.

III. MATERIJAL I METODOLOGIJA

1. ISPITANICI

U okviru istraživanja uključeno je četrdeset i dva pedijatrijska pacijenta uzrasta od 9 meseci do 17 godina i 9 meseci. Svi pacijenti su lečeni u Službi za hematologiju i onkologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine (Novi Sad, Srbija) u periodu od juna 2004. godine do juna 2012. godine.

Istraživanje je sprovedeno u vidu retrospektivno-prospektivne studije. Retrospektivnim delom studije obuhvaćeni su pacijenti lečeni u periodu od juna 2004. godine do juna 2010. godine, ukupno trideset i tri pacijenta. Prospektivnim delom studije obuhvaćeni su pacijenti lečeni u periodu od juna 2010. godine do juna 2012. godine, ukupno devet pacijenata.

Postojala su dva uslova za uključivanje pacijenata u istraživanje. Prvi uslov ispunjavali su pacijenti koji su prema protokolu za lečenje osnovne bolesti primali dozu metotreksata od 2 g/m² ili 5 g/m². Drugi uslov je bio da svaki pacijent ima izmereno najmanje dve serumske koncentracije metotreksata tokom terapije ovim dozama.

Istraživanje je obuhvatilo 113 ciklusa terapije metoteksatom (1–4 ciklusa po pacijentu) sa 386 izmerenih serumskih koncentracija metotreksata.

Raspon primljenih doza metotreksata kretao se od 800 do 10.000 mg.

Od ukupnog broja ispitanika trideset i osam lečeno je pod dijagnozom akutne limfoblastne leukemije, a četvero je imalo dijagnozu non-Hodgkin limfoma.

Pacijenti oboleli od ALL bili su uključeni u dva uzastopna protokola ALL IC-BFM 2002 i ALL IC-BFM 2009 Internacionalne BFM studijske grupe „I-BFM-SG“ (International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group) za proučavanje i lečenje dečje non-B akutne limfoblastne leukemije. Trideset i troje je lečeno prema protokolu iz 2002. godine, ALL IC-BFM 2002, dok je njih petoro bilo uključeno u protokol iz 2009. godine, ALL IC-BFM 2009.

Četiri ispitanika sa dijagnozom NHL bila su uključena u protokol NHL-BFM 95.

Istraživanje je odobrila Etička komisija Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine u Novom Sadu i Etička komisija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Podaci o pacijentima koji su uključeni u istraživanje prikupljani su pregledom medicinske dokumentacije. Podaci su prikupljani uz prethodnu pismenu saglasnost zakonskog staratelja svakog pacijenta koji je uključen u istraživanje, a nakon davanja pune informacije o studiji i mogućim rizicima. Saglasnost za učešće svog deteta u studiji, zakonski staratelj potvrdio je potpisivanjem teksta informisanog pristanka.

Uzorkovanje krvi i merenje koncentracije metotreksata

U cilju praćenja nivoa metotreksata uzorci venske krvi uzimani su od svih pacijenata. Prema preporukama protokola koji su korišćeni u sprovođenju lečenja, koncentracije metotreksata su merene u vremenskim intervalima: + 24, + 42 i + 48 sati nakon započinjanja infuzije metotreksata. Za tačku + 36 h, uzorak se čuvao za retrogradnu procenu zajedno sa uzorkom iz + 42 h.

Ukoliko je koncentracija metotreksata u + 48 h bila iznad 0,4 $\mu\text{mol/l}$, prema preporukama protokola, uzimani su dodatni uzorci krvi i kontrolisani na 6 sati sve do pada koncentracije ispod 0,25 $\mu\text{mol/l}$ (najduži period praćenja je bio 132 sata od započinjanja infuzije). Dodatni uzorci krvi za analizu uzimani su u 16 ciklusa, kod 9 pacijenata. Takođe su uzimani dodatni uzorci u 26. satu (jedan pacijent, jedan ciklus), 28, 32. i 38. satu (jedan pacijent, jedan ciklus) od započinjanja infuzije metotreksata. Zajedno, nabrojani dodatni uzorci predstavljaju 17,4 % ukupnog broja uzoraka posmatranih u okviru istraživanja.

U ovom istraživanju analizirani su uzorci seruma, uz svetlosnu zaštitu.

Merenje koncentracije metotreksata je sprovedeno u laboratoriji Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine (Novi Sad, Srbija). Koncentracija metotreksata određivana je imunoesejom fluorescentne polarizacije (Fluorescence Polarization Immunoassay – FPIA). Korišćen je test “TDx / TDxFLx Methotrexate II” (Methotrexate II, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), koji predstavlja reagens sistem za kvantitativno merenje metotreksata u serumu ili plazmi. Senzitivnost testa (definisana kao najniža merljiva koncentracija koja se može razlikovati od nule sa 95% poverenja) je 0,02 $\mu\text{mol/l}$. „Inter-dnevna“ preciznost je 10,3%, 4,4% i 3,8% pri

koncentracijama metotreksata redom od 0,07, 5 i 500 $\mu\text{mol/l}$. Metabolit 7-OH-MTX (7- hidroksi-metotreksat) ne utiče na tačnost i preciznost određivanja nivoa metotreksata imunoesejom fluorescentne polarizacije.

Laboratorijske analize drugih posmatranih parametara (leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit, trombociti, ukupni proteini, bilirubin, alkalna fosfataza (ALP), aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), gama glutamiltransferaza (GGT), laktat dehidrogenaza (LDH), mokraćna kiselina, urea i kreatinin) su procenjivane iz uzoraka krvi uzetih pre započinjanja i po završetku ciklusa hemoterapije.

Sve procedure predviđene metodologijom rada rutinski se rade. Za potrebe ovog istraživanja nije bilo dodatnih venepunkcija niti drugih dijagnostičkih procedura.

2. DIZAJN ISTRAŽIVANJA

Celokupno istraživanje je podeljeno u šest studija. Nakon analiziranja demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika (I studija) analizirane su:

1. Koncentracije metotreksata (studija II)
2. Klirens metotreksata (studija III)
3. Farmakokinetički parametri metotreksata (studija IV)
4. Klinički znakovi toksičnosti metotreksata (studija V)
5. Laboratorijski znakovi toksičnosti metotreksata (studija VI)

U prvom koraku posmatrani parametri su analizirani u okviru celokupne grupe ispitanika (42 pedijatrijska pacijenta sa 113 ciklusa metotreksata, izuzev u IV studiji gde su uključeni samo ciklusi kod kojih su postojale izmerene najmanje četiri koncentracije metotreksata u serumu, što je obuhvatilo 15 pacijenata sa ukupno trideset i jednim ciklusom metotreksata). Drugi korak bio je formiranje tri grupe pacijenata koje su se razlikovale po primenjenoj dozi metotreksata (2 g/m^2 i 5 g/m^2) i po prisustvu ili odsustvu produžene eliminacije metotreksata. Formirane grupe su međusobno poređene u cilju ispitivanja karakteristika ispitanika (demografskih i kliničkih) između

grupa, kao i uticaja primenjene doze metotreksata i prisustva produžene eliminacije metotreksata na posmatrane parametre.

Gornja granica koncentracije serumskog metotreksata za većinu dece na terapiji metotretksatom, prema podacima iz protokola ALL IC-BFM 2002, ALL IC-BFM 2009. i NHL-BFM 95, iznose: 150,0 $\mu\text{mol/l}$ mereno u 24. satu, 3,0 $\mu\text{mol/l}$ u 36. satu, 1,0 $\mu\text{mol/l}$ u 42. satu i 0,4 $\mu\text{mol/l}$ u 48. satu nakon započinjanja infuzije metotreksata, a u 60. satu od započinjanja infuzije koncentracija metotreksata u serumu morala bi pasti ispod 0,25 $\mu\text{mol/l}$.

S obzirom na ove granične vrednosti, u grupe sa produženom eliminacijom metotreksata svrstani su oni ciklusi kod kojih je jedna ili više koncentracija serumskog metotreksata prelazila gornju granicu za datu vremensku distancu.

Grupa sa produženom eliminacijom metotreksata obuhvatila je 11 ciklusa, što iznosi 9,73 % svih ciklusa. U okviru produžene eliminacije nije bilo ciklusa sa dozom metotreksata 2 g/m^2 , dok je bilo 11 ciklusa sa dozom metotreksata 5 g/m^2 , što je 18,03 % ovih ciklusa.

Grupisanje ciklusa vršeno je u odnosu na:

1. Primljenu dozu metotreksata:
 - a. Doza metotreksata 2 g/m^2 (52 ciklusa)
 - b. Doza metotreksata 5 g/m^2 (61 ciklusa)
2. Prisustvo ili odsustvo produžene eliminacije metotreksata:
 - a. Bez produžene eliminacije metotreksata (102 ciklusa) i
 - b. Sa produženom eliminacijom metotreksata (11 ciklusa).

Na osnovu navedene podele formirane su tri grupe:

1. Doza metotreksata 2 g/m^2 , bez produžene eliminacije metotreksata (52 ciklusa),
2. Doza metotreksata 5 g/m^2 , bez produžene eliminacije metotreksata (50 ciklusa) i
3. Doza metotreksata 5 g/m^2 , sa produženom eliminacijom metotreksata (11 ciklusa).

Svi podaci su obrađeni statističkim programom IBM SPSS 19 for Windows.

1. I studija – karakteristike ispitanika

Analizirane su demografske i kliničke karakteristike ispitanika uključenih u studiju.

Pod demografskim karakteristikama podrazumevani su uzrast, pol i telesni parametri ispitanika. Telesni parametri - telesna masa [kg] i telesna visina [cm], merene su pre započinjanja svakog ciklusa terapije.

Za svakog ispitanika je određivana i telesna površina [m²] pomoću nomograma izvedenog iz Du Bois-ove formule za izračunavanje telesne površine koristeći telesnu visinu i telesnu masu (85).

U okviru kliničkih karakteristika posmatrani su laboratorijski parametri određivani pre započinjanja svakog ciklusa terapije:

- leukociti [x10⁶/l]
- eritrociti [x 10⁹/l]
- hemoglobin [g/l]
- hematokrit [%]
- trombociti [x10⁶/l]
- ukupni proteini [g/l]
- albumini [g/l]
- bilirubin [μmol/l]
- aspartat aminotransferaza – AST [μkat/l]
- alanin aminotransferaza – ALT [μkat/l]
- γ- glutamiltransferaza – GGT [μkat/l]
- laktat-dehidrogenaza – LDH [μkat/l]
- alkalna fosfataza – ALP [μkat/l]
- amilaza [μkat/l]
- mokraćna kiselina [μmol/l]
- urea [mmol/l]
- kreatinin [μmol/l].

Takođe je analiziran klirens kreatinina za svakog ispitanika, koji je računat prema formuli Schwartz-a (86).

Schwartz-ova jednačina: $ClCr [ml/min/1,73m^2] = [TD (cm) \times k] / sCr$

ClCr –klirens kreatinina

sCr – serumski kreatinin

TD – telesna dužina

k – konstanta:

k = 0,45 za decu uzrasta 1 do 52 nedelje

k = 0,55 za decu uzrasta 1 do 13 godina

k = 0,55 za adolescente ženskog pola uzrasta 13-18 godina

k = 0,7 za adolescente muškog pola uzrasta 13-18 godina

Na početku analize urađena je deskriptivna statistička obrada podataka za celokupnu grupu ispitanika u pogledu demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika.

Analizirane su razlike između grupa u odnosu na demografske i kliničke karakteristike. Razlike u odnosu na telesnu površinu (izvedena vrednost iz vrednosti telesne mase i visine) i uzrast analizirane su višesmernom analizom varijanse (MANOVA). Razlike u odnosu na laboratorijske parametre takođe su analizirane višesmernom analizom varijanse (MANOVA). Razlike u odnosu na pol između grupa analizirane su Hi kvadrat testom.

2. II studija – koncentracije metotreksata

Ispitivan je uticaj primenjene doze metotreksata, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika na nivo postignutih serumskih koncentracija metotreksata.

Koncentracije metotreksata izmerene u vremenskom periodu nakon 42. sata po započinjanja infuzije leka nisu uključene u ove analize zbog manjeg broja merenja u ovim vremenskim distancama.

Za zamenu nedostajućih podataka korišćena je regresiona analiza u dva koraka. U prvom koraku nedostajući podaci za koncentracije metotreksata merene u 36. satu nakon započinjanja infuzije leka (47 podataka) su zamenjeni predviđenim vrednostima iz regresije u kojoj je prediktor

bila koncentracija nakon 24 h, a zavisna varijabla koncentracija nakon 36 h. Ovako određen regresioni model je bio statistički značajan, a objasnio je 35% varijanse ($F(1:63) = 34.454, p < 0.01$).

U drugom koraku nedostajući podaci za koncentracije metotreksata merene u 48. satu nakon započinjanja infuzije leka (4 podatka) zamenjeni su predviđenim vrednostima iz regresije u kojoj je prediktor bila koncentracija nakon 36 h, a zavisna varijabla koncentracija nakon 48 h. Ovako određen regresioni model je bio statistički značajan, a objasnio je 77% varijanse ($F(1:107) = 393.474, p < 0.01$).

Potom je zamenjen i jedan nedostajući podatak za koncentraciju metotreksata merene u 24. satu nakon započinjanja infuzije leka korišćenjem regresione analize u kojoj je prediktor bila koncentracija nakon 36 h, a zavisna varijabla koncentracija nakon 24 h. Ovako određen regresioni model je bio statistički značajan, a objasnio je 50% varijanse ($F(1:110) = 111.380, p < 0.01$).

Analiza razlike u koncentracijama metotreksata između formiranih grupa sprovedena je u cilju utvrđivanja uticaja primenjene doze na koncentracije metotreksata. Upotrebljena je jednosmerna analiza varijanse (ANOVA).

Razlike u koncentracijama metotreksata između formiranih grupa u odnosu na demografske karakteristike pacijenata ispitivana je analizom kovarijanse sa ponovljenim merenjima (ANCOVA).

Razlike u koncentracijama metotreksata između formiranih grupa u odnosu na laboratorijske parametre ispitivana je analizom kovarijanse sa ponovljenim merenjima (ANCOVA).

3. III studija – klirens metotreksata

Ispitivan je uticaj primenjene doze metotreksata, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika na klirens metotreksata.

Klirens metotreksata (K) računat je prema formuli (87):

$$K (l / h) = \frac{v (mg / h)}{C_{ss} (mg / l)}$$

v – brzina infuzije računato prema formuli: $v (mg / l) = \frac{doza (mg)}{24 h}$

C_{ss} – ravnotežna koncentracija metotreksata (koncentracija izmerena pozavršetku 24 časovne infuzije)

U analizi razlike u klirensu metotreksata između formiranih grupa u odnosu na primenjenu dozu metotreksata korišćena je jednosmerna analiza varijanse (ANOVA).

Razlike u klirensu metotreksata između formiranih grupa u odnosu na demografske karakteristike pacijenata ispitivana je analizom kovarijanse sa ponovljenim merenjima (ANCOVA).

Razlike u koncentracijama metotreksata između formiranih grupa u odnosu na laboratorijske parametre ispitivana je analizom kovarijanse sa ponovljenim merenjima (ANCOVA).

Povezanost demografskih karakteristika ispitanika sa klirensom metotreksata procenjavana je pomoću Spearman-ovog koeficijenta korelacije.

4. IV studija – farmakokinetički parametri metotreksata:

Izračunavani su precizni farmakokinetički parametri metotreksata koristeći jednokompartmanski i dvokompartmanski model u pedijatrijskoj populaciji. Procenjavana je interindividualna i intraindividualna varijabilnost u farmakokinetičkim parametrima.

Ispitivano je postojanje uticaja primenjene doze na farmakokinetičke parametre. Analizirana je razlika između formiranih grupa u odnosu na farmakokinetičke parametre: klirens metotreksata, konstante transfera k_{10} , k_{12} i k_{21} i volumen centralnog kompartmana V_1

Ispitivano je postojanje korelacije između farmakokinetičkih parametara i demografskih karakteristika pacijenata.

Radi veće preciznosti prilikom izračunavanja farmakokinetičkih parametara u ovoj studiji uključeni su samo ciklusi kod kojih su postojale izmerene najmanje četiri koncentracije metotreksata u serumu, što je obuhvatilo ukupno trideset i jedan ciklus metotreksata (15 pacijenata).

U ovoj studiji su takođe su formirane grupe u odnosu na:

- I. Dozu metotreksata:
 1. Doza metotreksata 2 g/m^2 (13 ciklusa)
 2. Doza metotreksata 5 g/m^2 (18 ciklusa), i

II. Prisustvo ili odsustvo produžene eliminacije metotreksata:

1. Bez produžene eliminacije metotreksata (20 ciklusa) i
2. Sa produženom eliminacijom metotreksata (11 ciklusa).

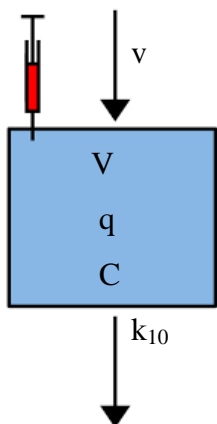
Na osnovu navedene podele formirane su tri grupe pacijenata. Grupa pacijenata koja je primala metotreksat u dozi 2 g/m^2 nije imala nijedan ciklus sa produženom eliminacijom metotreksata. Finalno su formirane tri grupe:

1. doza metotreksata od 2 g/m^2 , bez produžene eliminacije metotreksata (13 ciklusa metotreksata),
2. doza metotreksata od 5 g/m^2 , bez produžene eliminacije metotreksata (9 ciklusa)
3. doza metotreksata od 5 g/m^2 , sa produženom eliminacijom metotreksata (9 ciklusa).

S obzirom na to da su nedostajala tri podatka u vremenu 36 sati nakon započinjanja infuzije metotreksatom, nedostajući podaci su zamenjeni predviđenim vrednostima dobijenim multiplom regresionom analizom u kojoj su prediktori bile koncentracije izmerene nakon 24, 42 i 48 sati. Zavisna varijabla bila je koncentracija metotreksata nakon 36 sati. Ovako određen regresioni model bio je statistički značajan, a objasnio je 98% varijanse ($R = 0.99$, $R^2 = 0.98$, $F(3:24) = 384.694$, $p < 0.01$).

Korišćen je matematički model jednokompartmanskih i dvokompartmanskih sistema za postinfuziju (87). Upotrebljena je metoda najmanjih kvadrata za prilagođavanje farmakokinetičke krive eksperimentalnim podacima. Prema izmerenim vrednostima farmakokinetičkih parametara (poluvreme eliminacije metotreksata, klirens metotreksata i volumen raspodele metotreksata) određen je optimalni farmakokinetički model.

Jednokompartmanski farmakokinetički model posle obustavljanja intravenske infuzije



k_{10} – konstanta eliminacije, dimenzije t^{-1}
 v – brzina infuzije leka
 q – količina leka u kompartmanu
 C – koncentracija leka u kompartmanu
 V – volumen leka u kompartmanu

Grafikon 4.1. Grafički model jednokompartanskog farmakokinetičkog modela posle obustavljanja intravenske infuzije

Matematički model:

$$\frac{dq}{dt} = -k_{10} q \quad (1.1.)$$

Rešavanje matematičkog modela:

$$\frac{dq}{dt} = -k_{10} q ,$$

$$\frac{dq}{q} = -k_{10} dt ,$$

$$\int_{q_0}^q \frac{dq}{q} = -k_{10} \int_{t_0}^t dt , \quad q_0 - \text{početna količina leka u kompartmanu} = D$$

$$\ln q \Big|_{q_0}^q = -k_{10} \cdot t \Big|_{t_0}^t ,$$

$$\ln q - \ln q_0 = -k_{10} \cdot t + k_{10} t_0 ,$$

$$\ln \frac{q}{q_0} = -k_{10} t ,$$

$$\frac{q}{q_0} = -e^{-k_{10} t} ,$$

Rešenje matematičkog modela je dato izrazom, $\frac{v}{k_{10}}$ = početna količina leka u kompartmanu:

$$q = \frac{v}{k_{10}} \cdot e^{-k_{10}t} \quad (1.2.)$$

Rešenje modela dato izrazom (1.2.) se može deobom leve i desne strane izraza sa V ($C = \frac{q}{V}$) napisati i u sledećem obliku:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{10}t} \quad (1.3.)$$

Logaritmovanjem izraza (1.3.) dobijamo:

$$\log C = -0,4343 \cdot k_{10} \cdot t + \log C_0 \quad (1.4.)$$

Poluvreme eliminacije leka ($t_{0,5}$) se može odrediti:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{10}} \quad (1.5.)$$

Tako se iz izraza (1.5.) može izračunati konstanta eliminacije k_{10} :

$$k_{10} = \frac{\ln 2}{t_{0,5}}$$

K - klirens leka se izračunava iz brzine infuzije (v) i stacionarne (ravnotežne) koncentracije - C_{ss} :

$$K (l / h) = \frac{v (mg / h)}{C_{ss} (mg / l)}, \quad (1.6.)$$

Ili je dat izrazom:

$$K = V_d k_{10} \quad (1.7.)$$

V_d - volumen distribucije leka (za jednokompartmanski model važi $V_d = V$) se izračunava na sledeći način:

$$V_d = \frac{D}{C_0} \quad (1.8.)$$

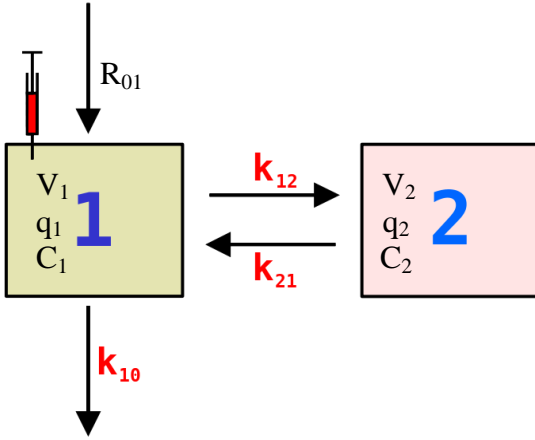
C_0 se može dobiti ekstrapolacijom $\log C - t$ prave do ordinatne ose.

Drugi način izračunavanja volumena distribucije leka je preko izraza (1.7.):

$$\begin{aligned} V_d &= \frac{K}{k_{10}}, \\ V_d &= \frac{K}{\frac{\ln 2}{t_{0,5}}}, \\ V_d &= \frac{K t_{0,5}}{\ln 2}. \end{aligned} \quad (1.9.)$$

Dvokompartmanskih farmakokinetički model posle obustavljanja intravenske infuzije

Grafički model:



k_{10} – konstanta eliminacije, dimenzije t^{-1}
 R_{01} – brzina kontinuirane infuzije leka u kompartman 1
 q – količina leka u kompartmanu
 C – koncentracija leka u kompartmanu
 V – volumen leka u kompartmanu

Grafikon 4.2. Grafički model dvokompartmanskog farmakokinetičkog modela posle obustavljanja intravenske infuzije

Matematički model:

$$\frac{dq_1}{dt} = -(k_{12} + k_{10})q_1 + k_{21}q_2, \quad (1.10.)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = -k_{12}q_1 - k_{21}q_2,$$

Početni uslovi su $q_1(0) = Q_1$, $q_2(0) = Q_2$, a s obzirom da Q_1 i Q_2 predstavljaju količinu leka u momentu veštačkog stacionarnog stanja pilikom prethodne kontinuirane infuzije usistem, tada se iz prethodnog modela zna da je:

$$q_1(0) = Q_1 = q_{2(ss)} \frac{R_{01}}{k_{10}} \quad (1.11.)$$

$$q_2(0) = Q_2 = q_{2(ss)} = \frac{R_{01}k_{12}}{k_{21}k_{10}} \quad (1.12.)$$

X i Y dobijamo iz uslova:

$$X + Y = Q_1$$

$$\lambda_2 X + \lambda_1 Y = (Q_1 + Q_2)k_{21}$$

$$X = \frac{Q_1 \lambda_1 - k_{21}(Q_1 + Q_2)}{\lambda_1 - \lambda_2}$$

Zamenom iz (1.11.) i (1.12):

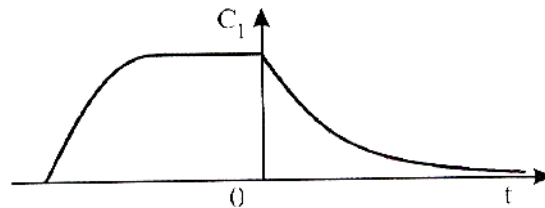
$$X = \frac{R_{01}}{k_{10}} \frac{\lambda_1 - k_{21} - k_{12}}{\lambda_1 - \lambda_2}$$

$$Y = \frac{(Q_1 + Q_2)k_{21} - Q_1 \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2}$$

Rešenje matematičkog modela za prvi kompartman, C_1 koncentracija leka u centralnom kompartmanu posle obustavljanja infuzije brzine R_{01} :

$$C_1 = \frac{R_{01}}{V_1 k_{10}} \left(\frac{k_{10} - \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_1 t} + \frac{\lambda_1 - k_{10}}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_2 t} \right)$$

Jednačina u Dekartovom koordinatnom sistemu može se predstaviti na sledeći način:



Slika 4.1. Dvokompartmanskog modela posle obustavljanja intravenske infuzije - rešenje

Rešenje matematičkog modela za drugi – periferni kompartman se može pisati:

$$q_2 = \frac{R_{01} k_{12}}{k_{21} k_{10}} \left(\frac{\lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_2 t} - \frac{\lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_1 t} \right)$$

X , Y , λ_1 i λ_2 su parametri eksponencijalnih članova rešenja matematičkog modela i mogu se odrediti iz eksperimentalnih $C - t$ podataka.

$$c_1 = X \cdot e^{-\lambda_1 t} + Y \cdot e^{-\lambda_2 t}$$

Poluvreme raspodele leka ($t_{0,5\lambda_1}$) se može odrediti:

$$t_{0,5\lambda_1} = \frac{\ln 2}{\lambda_1} \Rightarrow \lambda_1 = \frac{\ln 2}{t_{0,5\lambda_1}}$$

Poluvreme eliminacije leka ($t_{0,5\lambda_2}$) se može odrediti:

$$t_{0,5\lambda_2} = \frac{\ln 2}{\lambda_2} \Rightarrow \lambda_2 = \frac{\ln 2}{t_{0,5\lambda_2}}$$

Konstante transfera (k) se određuju na sledeći način:

$$k_{21} = \frac{X\lambda_2 + Y\lambda_1}{X + Y}$$

$$k_{12} = \lambda_1 + \lambda_2 - (k_{21} + k_{10})$$

$$k_{10} = \frac{X + Y}{\frac{X}{\lambda_1} + \frac{Y}{\lambda_2}}$$

V_d za jednokompartmaski sistem je V_{deq} za dvokompartmaski sistem, pa se odatle određuje V_1 – volumen centralnog kompartmana.

$$V_{deq} = V_1 \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}} \right)$$

$$V_1 = \frac{V_{deq}}{\left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}} \right)}$$

Za analizu razlika između tri formirane grupe, odnosno uticaja doze metotreksata, produžene eliminacije metotreksata i interakcije ova dva faktora u odnosu na posmatrane farmakokinetičke parametre korišćena je jednosmerna multivarijatna analiza varijanse (MANOVA).

S obzirom na manji broj ispitanika i nejednaku distribuciju po grupama, u analizi povezanosti farmakokinetičkih parametara i demografskih karakteristika korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije ρ . Spearman kao neparametrijski test ima manje zahtevne pretpostavke, ali sa druge strane i manju statističku snagu (verovatnoća da će odbaciti nultu hipotezu kada ona nije tačna).

5. V studija – klinički znaci toksičnosti metotreksata

Ispitivano je prisustvo i određivan stepen ispoljenih kliničkih znakova toksičnosti usled terapije visokim dozama metotreksata.

Ispitivan je uticaj primenjene doze metotreksata i serumskih koncentracija metotreksata na prisustvo i stepen ispoljavanja kliničkih znakova toksičnosti metotreksata i korelacija sa demografskim (uzrast, telesna površina i pol) karakteristikama ispitanika.

Podaci o štetnim efektima, kliničkim i laboratorijskim, prikupljeni su iz medicinske dokumentacije. Posmatrani vremenski period bio je sedam dana od momenta započinjanja terapije metotreksatom s obzirom da je hospitalizacija za većinu pacijenata od momenta započinjanja terapije metotreksatom trajala sedam dana.

Za stepenovanje kliničkih znakova toksičnosti metotreksata korišćen je skor sistem - Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Version 4.0 (objavljen 28. maja 2009. godine) od strane U.S. Department of health and human services, National Institute of Health, National Cancer Institute (NIH Publication No. 09-5410, Revised June 2010, Reprinted June 2010) (88).

Navedeni kriterijumi za štetna dejstva Nacionalnog Instituta SAD za kancer predstavljaju deskriptivnu terminologiju koja se može koristiti za prijavljivanje štetnih efekata (AE-adverse event). Skala za stepenovanje (jačinu) postoji za svaki štetni efekat koji je definisan kao nepovoljan i nenamerno izazvan znak (uključujući i patološke laboratorijske nalaze), simptom ili bolest povezanih vremenski sa medicinskom terapijom ili procedurom a koji se mogu i ne moraju smatrati povezanim sa medicinskom terapijom ili procedurom. Štetni efekat je pojam koji predstavlja jedinstvenu pojavu specifičnog efekta, korišćen za medicinsku dokumentaciju i naučnu analizu.

Stepeni se odnose na jačinu štetnih efekata. CTCAE prikazuje stepene od 1 do 5 sa jedinstvenim kliničkim opisom jačine za svaki štetan efekat, bazirano na generalnim smernicama:

Stepen 1 – blag; asimptomatski ili blagi simptomi; samo kliničko ili dijagnostičko zapažanje; nije indikovana intervencija.

Stepen 2 – umeren; indikovana minimalna, lokalna ili neinvazivna intervencija; ograničena svakodnevna aktivnost (u skladu sa uzrastom).

Stepen 3 – težak ili medicinski značajan ali ne neposredno životno ugrožavajuć; indikovana hospitalizacija ili produžetak hospitalizacije; onesposobljavajuć; ograničena svakodnevna aktivnost i briga o sebi (u skladu sa uzrastom).

Stepen 4 – životno ugrožavajuće posledice; indikovana hitna intervencija.

Stepen 5 – smrt povezana sa štetnim efektom.

Posmatrano je prisustvo i stepen ispoljavanja sledećih kliničkih znakova toksičnosti metotreksata:

- 1) oralni mukozitis
- 2) dijareja
- 3) povraćanje
- 4) febrilnost
- 5) infekcija

U analizi prisustva ili odsustva kliničkih znakova toksičnosti metotreksata korišćena je deskriptivna statistika -logistička regresija.

Za analizu razlika između grupa, odnosno uticaja doze metotreksata, produžene eliminacije metotreksata i interakcije ova dva faktora na ispoljavanje stepena toksičnosti kliničkih efekata, upotrebljena je jednosmerna analiza varijanse (ANOVA).

Za određivanje razlike u stepenu ispoljavanja kliničkih znakova toksičnosti u odnosu na koncentracije metotreksata korišćen je Metod generalizovane jednačine ocena (Generalized estimating equations - GEE) za svaku od zavisnih varijabli ponaosob.

Za analizu povezanosti stepena kliničkih znakova toksičnosti metotreksata i demografskih karakteristika ispitanika (uzrast, telesna površina i pol) korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije ρ .

6. VI studija – laboratorijski znaci toksičnosti metotreksata

Ispitivano je prisustvo i određivan stepen ispoljenih laboratorijskih znakova toksičnosti usled terapije visokim dozama metotreksata.

Ispitivan je uticaj primenjene doze metotreksata i serumskih koncentracija metotreksata na prisustvo i stepen ispoljavanja laboratorijskih znakova toksičnosti metotreksata i korelacija sa demografskim (uzrast, telesna površina i pol) karakteristikama ispitanika.

Informacije o prikupljanju podataka i stepenovanju štetnih efekata date su u opisu metodologije za petu studiju (III Materijal i metodologija, 2. Dizajn istraživanja, V studija).

Posmatrano je prisustvo i stepen ispoljavanja znakova toksičnosti metotreksata na:

- 1) Leukocite ($\times 10^6/l$)
- 2) Hemoglobin (g/l)
- 3) Trombocite ($\times 10^6/l$)
- 4) Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)
- 5) AST ($\mu\text{kat/l}$)
- 6) ALT ($\mu\text{kat/l}$)
- 7) GGT ($\mu\text{kat/l}$)
- 8) ALP ($\mu\text{kat/l}$)

U analizi prisustva ili odsustva kliničkih znakova toksičnosti metotreksata korišćena je deskriptivna statistika -logistička regresija.

Za analizu razlika između grupa, odnosno uticaja doze metotreksata, produžene eliminacije metotreksata i interakcije ova dva faktora na ispoljavanje laboratorijskih znakova toksičnosti, upotrebljena je jednosmerna analiza varijanse –ANOVA.

Za određivanje razlike u stepenu ispoljavanja laboratorijskih znakova toksičnosti u odnosu na koncentracije metotreksata korišćen je Metod generalizovane jednačine ocena (Generalized estimating equations - GEE) za svaku od zavisnih varijabli ponaosob.

Za analizu povezanosti stepena laboratorijskih znakova toksičnosti metotreksata i demografskih karakteristika ispitanika (uzrast, telesna površina i pol) korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije ρ .

IV. REZULTATI

1. STUDIJA I

KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

1. Demografske karakteristike ispitanika

U istraživanje je uključeno četrdeset i dva pedijatrijska pacijenta čije su demografske karakteristike sumirane u tabeli 1.1. Medijana uzrasta ispitanika je bila 5,75 godina, u rasponu od 0,75 do 17,75 godina (minimalna i maksimalna vrednost).

Muški pol je činilo 59,52 % pacijenata (25 dečaka), a ženski pol je obuhvatio 40,48 % pacijenata (17 devojčica).

Istraživanjem su obuhvaćena 113 ciklusa metotreksata (1 do 4 ciklusa po pacijentu) sa izmerenih 386 koncentracija metotreksata.

Tabela 1.1. Demografske karakteristike svih ispitanika uključenih u istraživanje

	m	SD	medijana	IQR	min	max	N
Telesna masa (kg)	26.06	15.24	20	13.3	8.0	70.50	113
Telesna visina (cm)	119.08	26.14	115	24	68.0	188.0	113
Telesna površina (m ²)	0.92	0.37	0.8	0.3	.40	2.00	113
Uzrast (godine)	6.39	3.43	5.75	3.75	.75	17.75	113

m - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, IQR - interkvartilna razlika, min - minimalna vrednost, max - maksimalna vrednost, N - broj ciklusa MTX

Ciklusi metotreksata su grupisani u odnosu na dozu metotreksata i prisustvo i odustvo produžene eliminacije metotreksata, te su finalno formirane tri grupe pacijenata (III Materijal i metodologija, 2. Dizajn istraživanja):

1. Doza metotreksata 2 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata (52 ciklusa),
2. Doza metotreksata 5 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata (50 ciklusa) i
3. Doza metotreksata 5 g/m², sa produženom eliminacijom metotreksata (11 ciklusa).

Demografske karakteristike ispitanika u okviru svake grupe prikazane su tabelarno (1.2.-1.4.) i grafički (grafikon 1.1.-1.3.).

Tabela 1.2. Demografske karakteristike ispitanika, Grupa 1 (doza metotreksata 2 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata)

Grupa 1, N = 52	m	SD	medijana	IQR	min	max
Telesna masa (kg)	23.51	13.75	18.5	11.9	8.0	67.0
Telesna visina (cm)	116.63	26.01	114.5	24.5	68.0	186.0
Telesna površina (m ²)	0.86	0.34	0.75	0.28	.40	1.90
Uzrast (godina)	5.58	2.8	5.29	3.21	.75	14.58

m - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, IQR – interkvartilna razlika, min - minimalna vrednost, max - maksimalna vrednost, N - broj ciklusa MTX

Tabela 1.3. Demografske karakteristike ispitanika, Grupa 2 (doza metotreksata 5 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata)

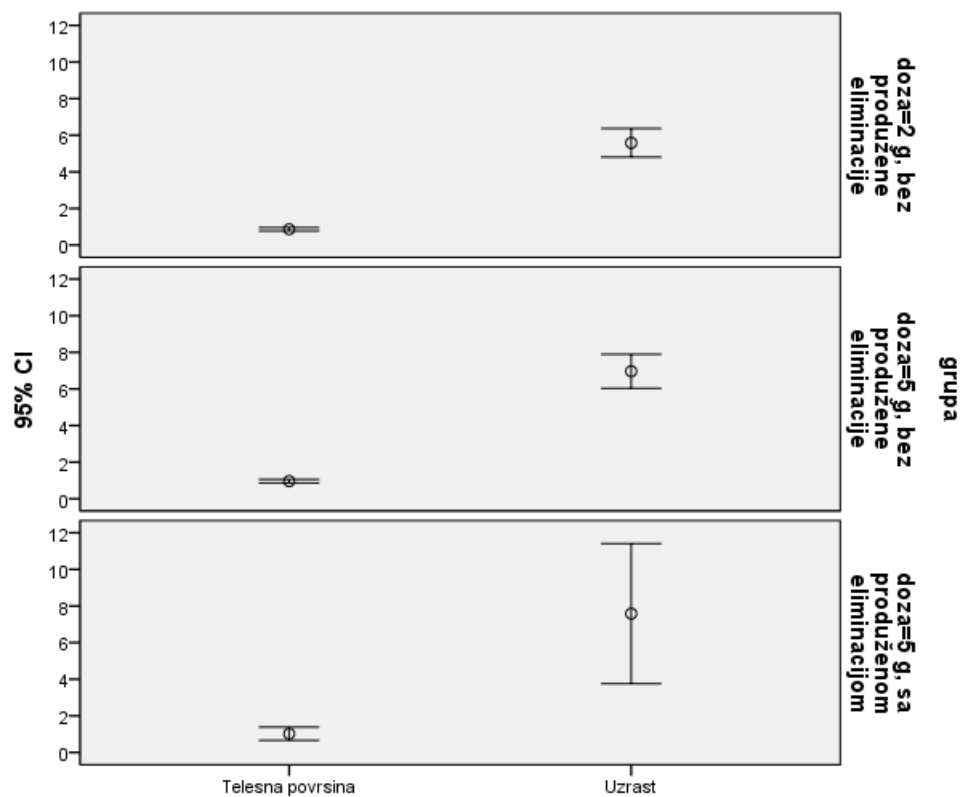
Grupa 2, N = 50	m	SD	medijana	IQR	min	max
Telesna masa (kg)	27.51	14.84	23	11	11.0	70.50
Telesna visina (cm)	121.45	23.28	116.5	20	80.0	188.0
Telesna površina (m ²)	0.96	0.35	0.85	0.25	0.55	2.00
Uzrast (godina)	6.96	3.28	6.13	3.67	3.08	16.33

m - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, IQR – interkvartilna razlika, min - minimalna vrednost, max - maksimalna vrednost, N - broj ciklusa MTX

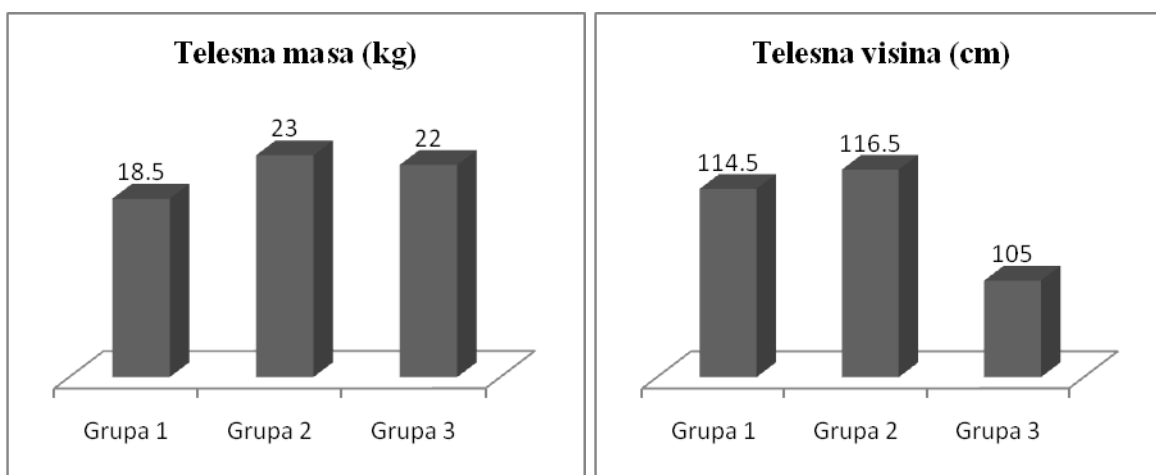
Tabela 1.4. Demografske karakteristike ispitanika, Grupa 3 (doza metotreksata 5 g/m², produžena eliminacija metotreksata)

Grupa 3, N = 11	m	SD	medijana	IQR	min	max
Telesna masa (kg)	31.59	21.84	22	43	12.0	69.0
Telesna visina (cm)	119.82	38.6	105	79	80.0	181.0
Telesna površina (m ²)	1.02	0.54	0.8	1.05	0.55	1.90
Uzrast (godina)	7.58	5.7	4.08	8.25	3.08	17.75

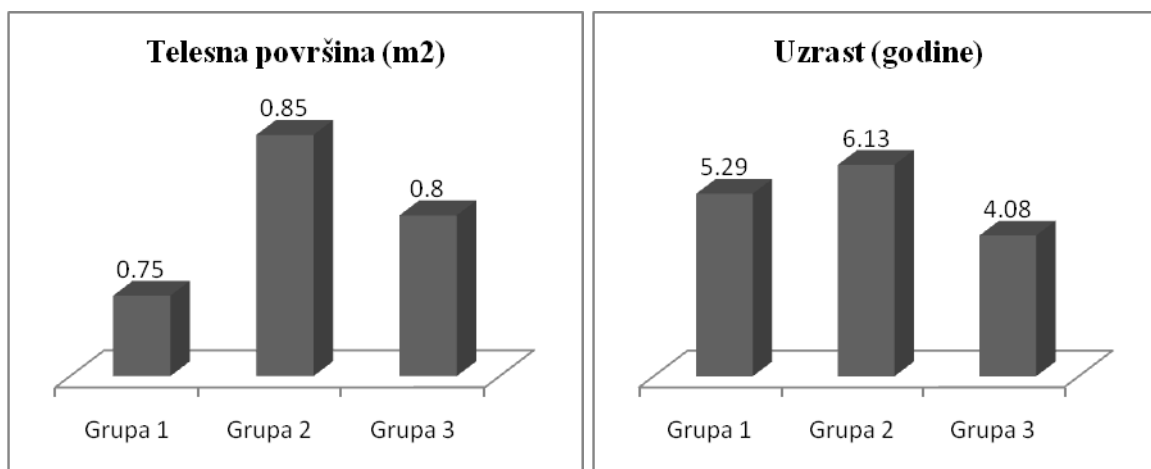
m - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, IQR – interkvartilna razlika, min - minimalna vrednost, max - maksimalna vrednost, N - broj ciklusa MTX



Grafikon 1.1. Interval poverenja širine 95% za aritmetičke sredine telesne površine i uzrasta u okviru posmatranih grupa



Grafikon 1.2. Medijane telesne mase i telesne visine u okviru posmatranih grupa



Grafikon 1.3. Medijane telesne površine i uzrasta u okviru posmatranih grupa

1.1. Razlike između grupa u odnosu na uzrast i telesnu površinu

Višesmernom analizom varijanse (MANOVA) gde su kriterijumske varijable bile telesna površina (vrednost izvedena iz vrednosti telesne visine i telesne mase) i uzrast, a kategorička prediktorska varijabla grupa, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između tri posmatrane grupe, $F(4;218) = 1,894$, $p = 0,113$ (tabela 1.1.1.).

Tabela 1.1.1. Multivarijantni test

Efekat	Wilksova Lambda	F	Broj stepena slobode		p
			hipoteza	greška	
Konstanta	.174	258.216	2.000	109.000	.000
Grupa	.934	1.894	4.000	218.000	.113

Testom efekata između ispitanika (tabela 1.1.2.) pokazano je da se grupe ne razlikuju u odnosu na posmatrane demografske karakteristike: za telesnu površinu $F(2;110) = 1,389$, $p = 0,254$; za uzrast $F(2;110) = 2,899$, $p = 0,059$.

Tabela 1.1.2. Test efekata između ispitanika

Izvor	Zavisna varijabla	Suma kvadrata	s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Korigovani model	Telesna površina	.375 ^a	2	.188	1.389	.254
	Uzrast	65.998 ^b	2	32.999	2.899	.059
Konstanta	Telesna površina	62.180	1	62.180	460.102	.000
	Uzrast	3113.741	1	3113.741	273.518	.000
Grupa	Telesna površina	.375	2	.188	1.389	.254
	Uzrast	65.998	2	32.999	2.899	.059
Greška	Telesna površina	14.866	110	.135		
	Uzrast	1252.244	110	11.384		
Ukupno	Telesna površina	111.087	113			
	Uzrast	5930.224	113			
Korigovano ukupno	Telesna površina	15.241	112			
	Uzrast	1318.242	112			

a. $R^2 = .025$ (Adjusted $R^2 = .007$)

b. $R^2 = .050$ (Adjusted $R^2 = .033$)

s.s. - stepen slobode

1.2. Razlike između grupa u odnosu na pol

Distribucija po polu u okviru tri posmatrane grupe prikazana je u tabeli 1.2.1.

Tabela 1.2.1. Distribucija po polu u tri posmatrane grupe

	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	ukupno
	2 g/m ² , bez produžene eliminacije	5 g/m ² , bez produžene eliminacije	5 g/m ² , sa produženom eliminacijom	
muško	31 44.9%	29 42.0%	9 13.0%	69 100.0%
žensko	21 47.7%	21 47.7%	2 4.5%	44 100.0%
ukupno	52 46.0%	50 44.2%	11 9.7%	113 100.0%

Razlike među grupama u odnosu na pol analizirane su Hi kvadrat testom (tabela 1.2.2.).

Sprovedenom analizom nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između posmatranih grupa u odnosu na pol ($\chi^2(df=2) = 2,236$, $p = 0,327$). Uslov da 20% ćelija sme imati očekivanu vrednost manju od 5 je zadovoljen (samo 16,7% ćelija ima očekivani broj manji od 5).

Tabela 1.2.2. Razlike između grupa u odnosu na pol

	Broj ciklusa MTX	Vrednost	Stepen slobode	p
Pearson Chi-Square	113	2.236 ^a	2	.327

a. 16,7% ima očekivani broj manji od 5. Minimalni očekivani broj je 4,28.

2. Kliničke karakteristike ispitanika uključenih u studiju

Laboratorijski nalazi ispitanika pre započinjanja terapije metotreksatom

Posmatrani laboratorijski parametri u okviru istraživanja analizirani su pre započinjanja svakog ciklusa terapije metotreksatom. Uključeno je osamnaest parametara: ukupan broj leukocita, eritrocita i trombocita, nivo hematokrita, hemoglobina, serumskih proteina, albumina, bilirubina, alkalne fosfataze (ALP), aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), γ -glutamilttransferaze (GGT), laktat dehidrogenaze (LDH), amilaze, mokraćne kiseline, uree i kreatinina. Takođe je za svaki ciklus metotreksata izračunat klirens kreatinina.

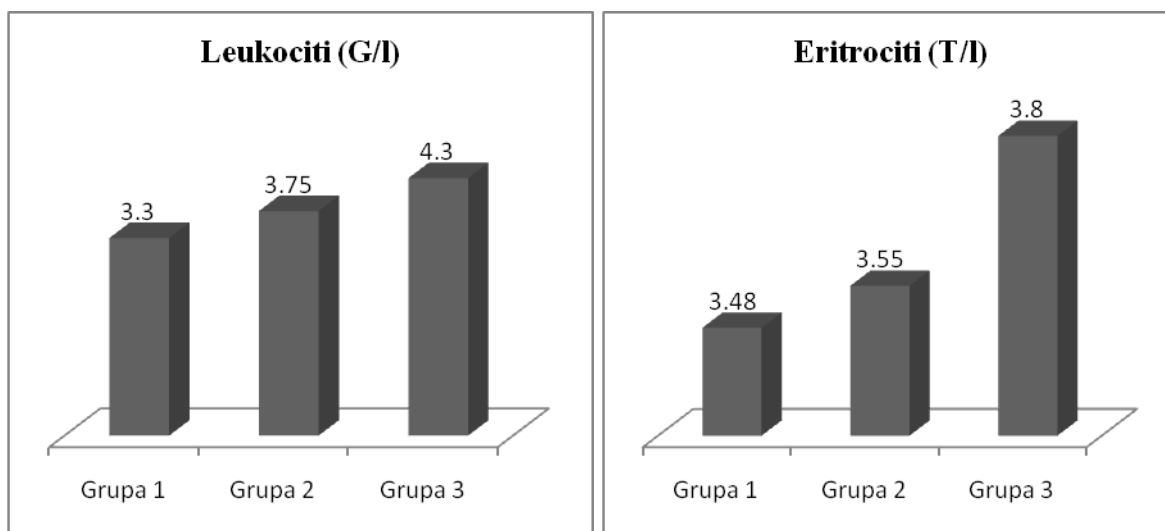
Tabela 2.1. prikazuje aritmetičku sredinu i medijanu za svaki parametar, kao i broj ciklusa metotreksata u kojima su dati parametri izmereni.

U tabelama 2.2.-2.4. prikazani su laboratorijski nalazi ispitanika u okviru tri grupe, analizirani pre započinjanja terapije metotreksatom. Grafički prikaz tabelarnih vrednosti predstavljen je grafikonima 2.1.-2.3.

Tabela 2.1. Laboratorijski nalazi svih ispitanika uključenih u istraživanje pre započinjanja terapije metotreksatom

	m	SD	medijana	IQR	min	max	N
Leukociti (x 10 ⁶ /l)	4.11	2.3	3.5	2	0.85	16.1	113
Eritrociti (x 10 ⁹ /l)	3.54	0.45	3.52	0.6	2.53	5.32	113
Hemoglobin (g/l)	107.13	10.95	107	13	82	149	113
Hematokrit (%)	31.58	3.33	31.3	3.7	23.1	44.2	113
Trombociti (x 10 ⁶ /l)	264.52	168.91	232	161	40	1200	110
AST (μkat/l)	0.56	0.27	0.51	0.27	0.24	2.03	108
ALT (μkat/l)	0.85	1	0.55	0.7	0.11	7.57	108
GGT (μkat/l)	0.46	0.52	0.35	0.26	0.13	4.81	102
Kreatinin (μmol/l)	31.39	11.77	29	15.3	6.1	69.4	103
ClCr (ml/min/1,73m ²)	207.2	63.58	200.72	76.18	111.87	490.22	102
Albumini (g/l)	43.54	4.71	43.6	6.1	32.7	52.6	45
Bilirubin (μmol/l)	9.12	7.7	6.99	3.76	0.3	64.61	106
ALP (μkat/l)	4.36	2.06	4.14	3.22	1.54	9.55	89
Amilaza (μkat/l)	1.04	0.7	0.89	0.28	0.13	5.37	50
Ac. uricum (μmol/l)	215.6	60.44	213.5	67	24	385	104
Proteini (g/l)	67.52	6.55	67.6	7.5	53.5	82.7	95
Urea (mmol/l)	3.57	1.26	3.3	1.5	1	7.1	105
LDH (μkat/l)	6.49	2.65	6.25	3.91	2.13	14.44	103

m – aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, IQR – interkvartilna razlika, min - minimalna vrednost, max - maksimalna vrednost, N - broj ciklusa MTX; AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT - γ-glutamilttransferaza, ClCr – klirens kreatinina, ALP – alkalna fosfataza, Ac.uricum – mokraćna kisleina, LDH – laktat dehidrogenaza

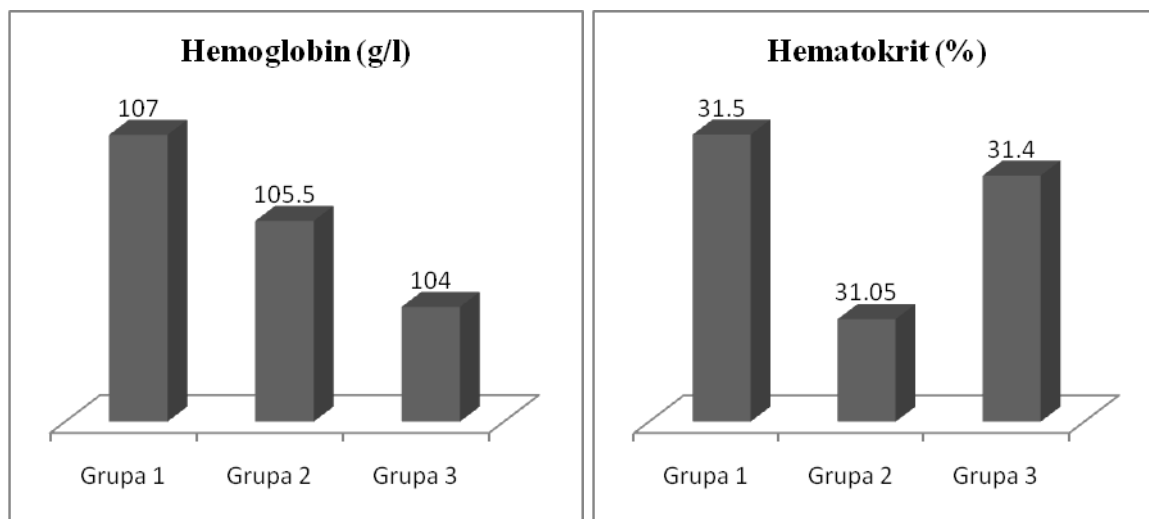


Grafikon 2.1. Medijane broja leukocita i eritrocita u okviru posmatranih grupa

Tabela 2.2. Grupa 1 (doza metotreksata 2 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata)

	m	SD	medijana	IQR	min	max	N
Leukociti (x 10 ⁶ /l)	3.61	1.79	3.3	1.95	0.85	10.4	52
Eritrociti (x 10 ⁹ /l)	3.51	0.41	3.48	0.47	2.6	4.49	52
Hemoglobin (g/l)	108.42	10.39	107	11.5	87	129	52
Hematokrit (%)	31.87	3.1	31.5	3.6	25	38	52
Trombociti (x 10 ⁶ /l)	257.13	121.27	251.5	146	40	600	52
AST (μkat/l)	0.53	0.25	0.52	0.25	0.24	1.72	49
ALT (μkat/l)	0.9	1.19	0.55	0.75	0.11	7.57	49
GGT (μkat/l)	0.49	0.69	0.35	0.28	0.13	4.81	45
Kreatinin (μmol/l)	31.47	11.59	30.5	15.4	6.1	58.7	48
ClCr (ml/min/1,73m ²)	199.6	66.51	191.36	86.98	111.87	482.58	47
Albumini (g/l)	44.34	6.07	43.25	8.2	33.8	52.6	8
Bilirubin (μmol/l)	10.45	10.34	7.44	4.27	0.3	64.61	48
ALP (μkat/l)	5.88	1.64	5.78	2.05	2.51	9.55	41
Amilaza (μkat/l)	0.91	0.31	0.91	0.26	0.13	1.64	17
Ac. uricum (μmol/l)	195.13	52.48	204	50	24	322	47
Proteini (g/l)	69.13	5.1	69.5	5.8	54.5	79.5	35
Urea (mmol/l)	3.13	1.15	2.95	1.45	1	6.7	48
LDH (μkat/l)	7.57	2.42	7.34	1.94	2.3	14.44	46

m – aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, IQR – interkvartilna razlika, min -minimalna vrednost, max - maksimalna vrednost, N - broj ciklusa MTX; AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT - γ-glutamilttransferaza, ClCr – klirens kreatinina, ALP – alkalna fosfataza, Ac.uricum – mokraćna kisleina, LDH – laktat dehidrogenaza

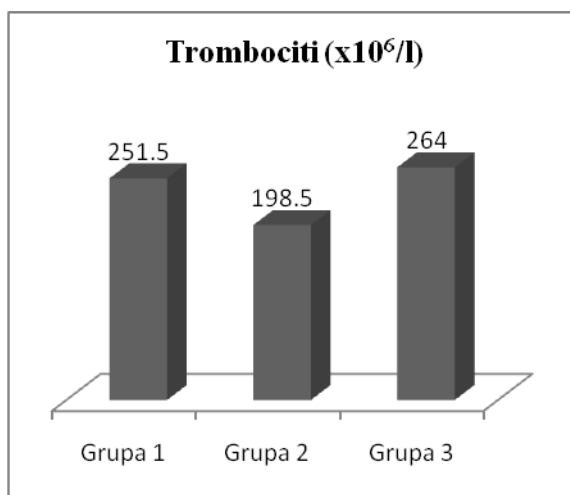


Grafikon 2.2. Medijane vrednosti hemoglobina i hematokrita u okviru posmatranih grupa

Tabela 2.3. Grupa 2 (Doza metotreksata 5 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata)

	m	SD	medijana	IQR	min	max	N
Leukociti (x 10 ⁶ /l)	4.46	2.53	3.75	2	1.7	16.1	50
Eritrociti (x 10 ⁹ /l)	3.51	0.4	3.55	0.6	2.53	4.24	50
Hemoglobin (g/l)	105.24	9.19	105.5	10	82	126	50
Hematokrit (%)	31	2.81	31.05	3.8	23.1	35.9	50
Trombociti (x 10 ⁶ /l)	245.06	154.41	198.5	162.5	44	640	48
AST (μkat/l)	0.61	0.31	0.51	0.29	0.29	2.03	48
ALT (μkat/l)	0.89	0.88	0.66	0.76	0.15	4.18	48
GGT (μkat/l)	0.43	0.34	0.33	0.23	0.14	2.1	47
Kreatinin (μmol/l)	29.58	9.93	27.95	13.15	12.1	50.3	44
ClCr (ml/min/1,73m ²)	223.99	61.53	216.2	60.42	112.73	490.22	44
Albumini (g/l)	43.54	4.54	44.3	7.2	32.7	50.6	30
Bilirubin (μmol/l)	8.41	4.61	6.78	4.86	3.61	22.28	47
ALP (μkat/l)	2.94	1.28	2.62	0.8	1.54	7.13	38
Amilaza (μkat/l)	1.14	0.89	0.89	0.24	0.71	5.37	26
Ac. uricum (μmol/l)	228.54	60.5	227.5	77	97	385	46
Proteini (g/l)	67.2	7.1	67.2	7.1	53.5	82.7	49
Urea (mmol/l)	3.85	1.24	3.65	1.7	1.7	7.1	46
LDH (μkat/l)	5.48	2.53	4.43	2.79	2.13	14.25	46

m – aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, IQR – interkvartilna razlika, min - minimalna vrednost, max - maksimalna vrednost, N - broj ciklusa MTX; AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT - γ-glutamilttransferaza, ClCr – klirens kreatinina, ALP – alkalna fosfataza, Ac.uricum – mokraćna kisleina, LDH – laktat dehidrogenaza



Grafikon 2.3. Medijane broja trombocita u okviru posmatranih grupa

Tabela 2.4. Grupa 3 (doza metotreksata 5 g/m², produžena eliminacija metotreksata)

	m	SD	medijana	IQR	min	max	N
Leukociti (x 10 ⁶ /l)	4.94	2.94	4.3	5.5	1.6	9.5	11
Eritrociti (x 10 ⁹ /l)	3.76	0.72	3.8	0.85	2.78	5.32	11
Hemoglobin (g/l)	109.64	18.56	104	26	87	149	11
Hematokrit (%)	32.87	5.69	31.4	7.2	24	44.2	11
Trombociti (x 10 ⁶ /l)	396.3	340.66	264	349	72	1200	10
AST (μkat/l)	0.47	0.15	0.44	0.24	0.25	0.7	11
ALT (μkat/l)	0.5	0.29	0.44	0.26	0.23	1.27	11
GGT (μkat/l)	0.46	0.17	0.43	0.16	0.22	0.84	10
Kreatinin (μmol/l)	38.23	17.08	27.9	30.4	20.3	69.4	11
ClCr (ml/min/1,73m ²)	172.57	37.03	161.39	50.06	115.76	251.48	11
Albumini (g/l)	42.61	4.25	43.2	6.7	34.7	46.8	7
Bilirubin (μmol/l)	6.36	1.61	6.15	2.13	3.82	8.86	11
ALP (μkat/l)	3.51	1.7	3.12	3.03	1.68	6.27	10
Amilaza (μkat/l)	1.01	0.55	0.72	0.77	0.65	2.11	7
Ac. uricum (μmol/l)	248.91	67.27	241	79	115	346	11
Proteini (g/l)	63.77	6.95	62.9	7	54.8	80	11
Urea (mmol/l)	4.34	1.19	3.7	2.4	3	6.3	11
LDH (μkat/l)	6.16	2.56	5.85	4.57	2.67	10.27	11

m – aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, IQR – interkvartilna razlika, min - minimalna vrednost, max - maksimalna vrednost, N - broj ciklusa MTX; AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT - γ-glutamilttransferaza, ClCr – klirens kreatinina, ALP – alkalna fosfataza, Ac.uricum – mokraćna kisleina, LDH – laktat dehidrogenaza

2.1. Razlike između grupa u laboratorijskim nalazima pre terapije metotreksatom

Jednosmernom multivarijantnom analizom varijanse (MANOVA) gde je nezavisna (prediktorska) varijabla grupa, a zavisne (kriterijumske) varijable su laboratorijski parametri, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u početnim laboratorijskim nalazima između tri posmatrane grupe, $F(36;186) = 4,050$, $p = 0,00$ (tabela 2.1.1).

Tabela 2.1.1 Multivarijantni test

Efekat	Wilksova Lambda	F	Broj stepena slobode		p
			(hipoteza)	(greška)	
Konstanta	.003	1924.546	18.000	93.000	.000
Grupa	.314	4.050	36.000	186.000	.000

Testom efekata između ispitanika (tabela 2.1.2.) pokazano je da se grupe razlikuju u odnosu na:

- 1) broj trombocita ($F(2;110) = 3,342$, $p = 0,039$),
- 2) klirens kreatinina ($F(2;110) = 3,827$, $p = 0,025$),
- 3) nivo alkalne fosfataze ($F(2;110) = 32,775$, $p = 0,00$),
- 4) nivo mokraćne kiseline ($F(2;110) = 6,016$, $p = 0,003$),
- 5) nivo proteina ($F(2;110) = 3,171$, $p = 0,046$),
- 6) nivo uree ($F(2;110) = 6,965$, $p = 0,001$),
- 7) nivo laktat dehidrogenaze ($F(2;110) = 8,026$, $p = 0,001$).

Tabela 2.1.2. Test efekata između ispitanika

Izvor	Zavisna varijabla	Suma kvadrata	s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Korigovani model/grupa	Leukociti	26.685 ^a	2	13.342	2.598	.079
	Eritrociti	.641 ^b	2	.320	1.617	.203
	Hemoglobin	334.651 ^c	2	167.326	1.405	.250
	Hematokrit	39.670 ^d	2	19.835	1.819	.167
	Trombociti	178154.049 ^e	2	89077.024	3.342	.039*
	AST	.223 ^f	2	.112	1.564	.214
	ALT	1.549 ^g	2	.775	.808	.448
	GGT	.079 ^h	2	.040	.162	.850
	Kreatinin	640.866 ⁱ	2	320.433	2.613	.078
	ClCr	26560.414 ^j	2	13280.207	3.827	.025*
	Albumini	4.586 ^k	2	2.293	.260	.772
	Bilirubin	184.216 ^l	2	92.108	1.678	.191
	ALP	138.864 ^m	2	69.432	32.775	.000**
	Amilaza	.226 ⁿ	2	.113	.524	.594
	Ac. uricum	37099.219 ^o	2	18549.609	6.016	.003**
	Proteini	220.056 ^p	2	110.028	3.171	.046*
	Urea	18.571 ^q	2	9.285	6.965	.001**
LDH	91.206 ^r	2	45.603	8.026	.001**	
Konstanta	Leukociti	1299.983	1	1299.983	253.121	.000
	Eritrociti	893.870	1	893.870	4511.038	.000
	Hemoglobin	803155.376	1	803155.376	6745.928	.000
	Hematokrit	70424.389	1	70424.389	6459.021	.000
	Trombociti	6049589.503	1	6049589.503	226.994	.000
	AST	19.819	1	19.819	277.925	.000
	ALT	39.970	1	39.970	41.675	.000
	GGT	14.460	1	14.460	59.043	.000
	Kreatinin	76058.431	1	76058.431	620.273	.000
	ClCr	2719210.586	1	2719210.586	783.509	.000
	Albumini	130160.189	1	130160.189	14755.573	.000
	Bilirubin	4867.064	1	4867.064	88.681	.000
	ALP	1187.304	1	1187.304	560.458	.000
	Amilaza	74.430	1	74.430	344.781	.000
	Ac. uricum	3485628.291	1	3485628.291	1130.517	.000
	Proteini	306085.440	1	306085.440	8822.224	.000
	Urea	986.303	1	986.303	739.866	.000
LDH	2822.732	1	2822.732	496.782	.000	

Izvor	Zavisna varijabla	Suma kvadrata	s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Konstanta	Leukociti	1299.983	1	1299.983	253.121	.000
	Eritrociti	893.870	1	893.870	4511.038	.000
	Hemoglobin	803155.376	1	803155.376	6745.928	.000
	Hematokrit	70424.389	1	70424.389	6459.021	.000
	Trombociti	6049589.503	1	6049589.503	226.994	.000
	AST	19.819	1	19.819	277.925	.000
	ALT	39.970	1	39.970	41.675	.000
	GGT	14.460	1	14.460	59.043	.000
	Kreatinin	76058.431	1	76058.431	620.273	.000
	ClCr	2719210.586	1	2719210.586	783.509	.000
	Albumini	130160.189	1	130160.189	14755.573	.000
	Bilirubin	4867.064	1	4867.064	88.681	.000
	ALP	1187.304	1	1187.304	560.458	.000
	Amilaza	74.430	1	74.430	344.781	.000
	Ac. uricum	3485628.291	1	3485628.291	1130.517	.000
	Proteini	306085.440	1	306085.440	8822.224	.000
	Urea	986.303	1	986.303	739.866	.000
	LDH	2822.732	1	2822.732	496.782	.000
Greška	Leukociti	564.939	110	5.136		
	Eritrociti	21.797	110	.198		
	Hemoglobin	13096.358	110	119.058		
	Hematokrit	1199.359	110	10.903		
	Trombociti	2931597.415	110	26650.886		
	AST	7.844	110	.071		
	ALT	105.499	110	.959		
	GGT	26.939	110	.245		
	Kreatinin	13488.302	110	122.621		
	ClCr	381761.167	110	3470.556		
	Albumini	970.320	110	8.821		
	Bilirubin	6037.094	110	54.883		
	ALP	233.030	110	2.118		
	Amilaza	23.746	110	.216		
	Ac. uricum	339153.820	110	3083.217		
	Proteini	3816.430	110	34.695		
	Urea	146.639	110	1.333		
	LDH	625.023	110	5.682		

AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT - γ -glutamiltransferaza, ClCr – klirens kreatinina, ALP – alkalna fosfataza, Ac.uricum – mokraćna kiselina, LDH – laktat dehidrogenaza, s.s.- stepen slobode, p vrednost < 0,05 je statistički značajna, * p<0.05,** p<0.01

a. $R^2 = .045$ (Adjusted $R^2 = .028$) h. $R^2 = .003$ (Adjusted $R^2 = -.015$) n. $R^2 = .009$ (Adjusted $R^2 = -.009$)
b. $R^2 = .029$ (Adjusted $R^2 = .011$) i. $R^2 = .045$ (Adjusted $R^2 = .028$) o. $R^2 = .099$ (Adjusted $R^2 = .082$)
c. $R^2 = .025$ (Adjusted $R^2 = .007$) j. $R^2 = .065$ (Adjusted $R^2 = .048$) p. $R^2 = .055$ (Adjusted $R^2 = .037$)
d. $R^2 = .032$ (Adjusted $R^2 = .014$) k. $R^2 = .005$ (Adjusted $R^2 = -.013$) q. $R^2 = .112$ (Adjusted $R^2 = .096$)
e. $R^2 = .057$ (Adjusted $R^2 = .040$) l. $R^2 = .030$ (Adjusted $R^2 = .012$) r. $R^2 = .127$ (Adjusted $R^2 = .111$)
f. $R^2 = .028$ (Adjusted $R^2 = .010$) m. $R^2 = .373$ (Adjusted $R^2 = .362$) g. $R^2 = .014$ (Adjusted $R^2 = -.003$)

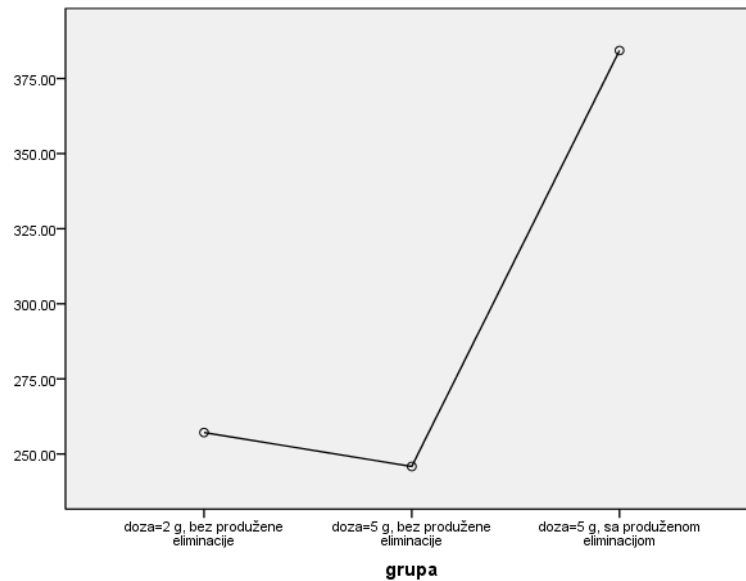
Daljom analizom pomoću testa kontrastiranja (Tukey HSD test, tabela 2.1.3.) pokazano je da su razlike u odnosu na:

- 1) broj trombocita značajne između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), p = 0,06, kao i između Grupe 2 (5 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), p = 0,04 (grafikon 2.1.1.).
- 2) klirens kreatinina – ClCr, značajne između Grupe 2 (5 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), p = 0,04 (grafikon 2.1.2.).
- 3) nivo alkalne fosfataze – ALP, značajne između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 2 (5 g/m², bez produžene eliminacije), p = 0,00, kao i između Grupe 1 i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), p = 0,00 (grafikon 2.1.3.).
- 4) nivo mokraćne kiseline značajne između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 2 (5 g/m², bez produžene eliminacije), p = 0,02, kao i između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), p = 0,02, (grafikon 2.1.4.).
- 5) nivo serumskih proteina značajne između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), p = 0,05 (grafikon 2.1.5.).
- 6) nivo uree značajne između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 2 (5 g/m², bez produžene eliminacije), p = 0,01, kao i između Grupe 1 i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), p = 0,01 (grafikon 2.1.6.).
- 7) nivo laktat dehidrogenaze – LDH, značajne između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 2 (5 g/m², bez produžene eliminacije), p = 0,00, (grafikon 2.1.7.).

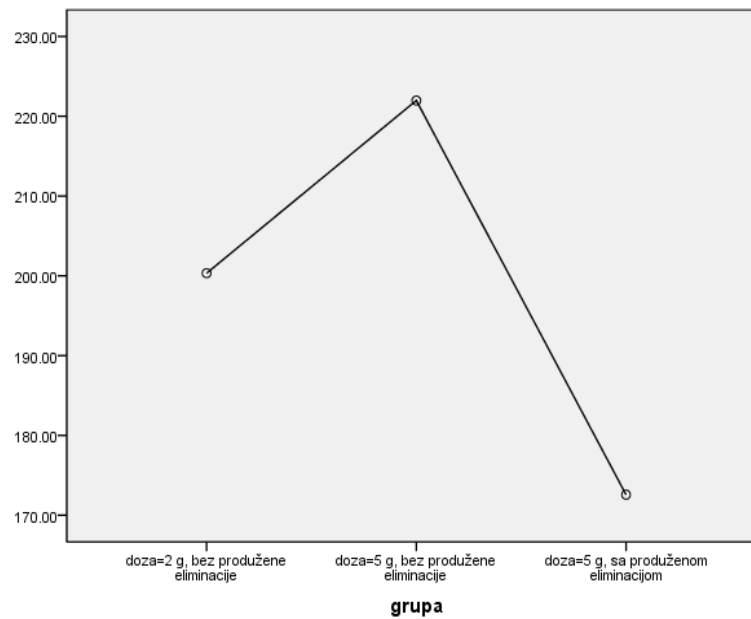
Tabela 2.1.3. Tukey HSD test

Zavisna varijabla	(I) grupa	(J) grupa	Razlika aritmetičkih sredina (I-J)	SE	p
Trombociti	Grupa 1	Grupa 2	11.29	32.33	1.00
		Grupa 3	-127.19*	54.18	0.06
	Grupa 2	Grupa 3	-138.4791*	54.37	0.04
Klirens kreatinina	Grupa 1	Grupa 2	-21.65	11.67	0.20
		Grupa 3	27.75	19.55	0.48
	Grupa 2	Grupa 3	49.4016*	19.62	0.04
Alkalna fosfataza	Grupa 1	Grupa 2	2.2728*	0.29	0.00
		Grupa 3	1.9653*	0.48	0.00
	Grupa 2	Grupa 3	-0.31	0.48	1.00
Mokraćna kiselina	Grupa 1	Grupa 2	-30.4119*	11.00	0.02
		Grupa 3	-51.8133*	18.43	0.02
	Grupa 2	Grupa 3	-21.40	18.49	0.75
Proteini	Grupa 1	Grupa 2	1.39	1.17	0.71
		Grupa 3	4.8286*	1.95	0.05
	Grupa 2	Grupa 3	3.44	1.96	0.25
Urea	Grupa 1	Grupa 2	-0.67*	0.23	0.01
		Grupa 3	-1.1750*	0.38	0.01
	Grupa 2	Grupa 3	-0.50	0.38	0.58
Laktat dehidrogenaza	Grupa 1	Grupa 2	1.8784*	0.47	0.00
		Grupa 3	1.28	0.79	0.33
	Grupa 2	Grupa 3	-0.60	0.79	1.00

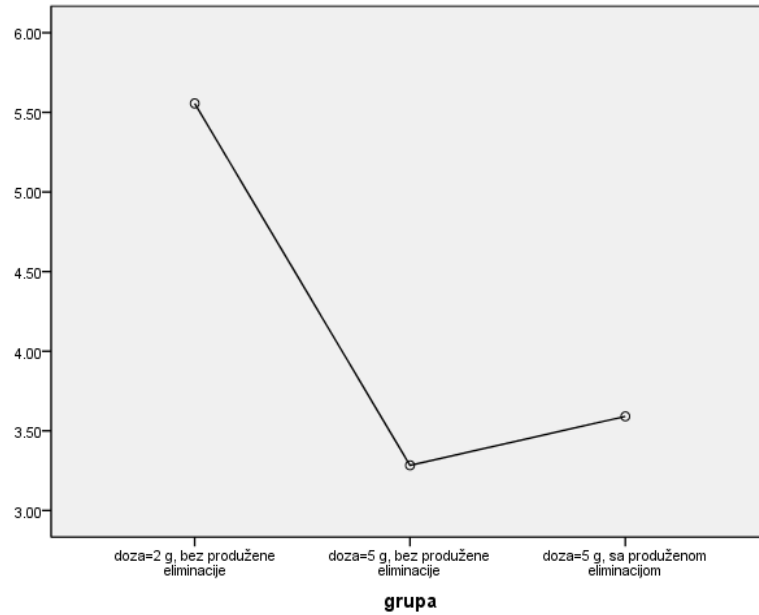
SE-standardna greška



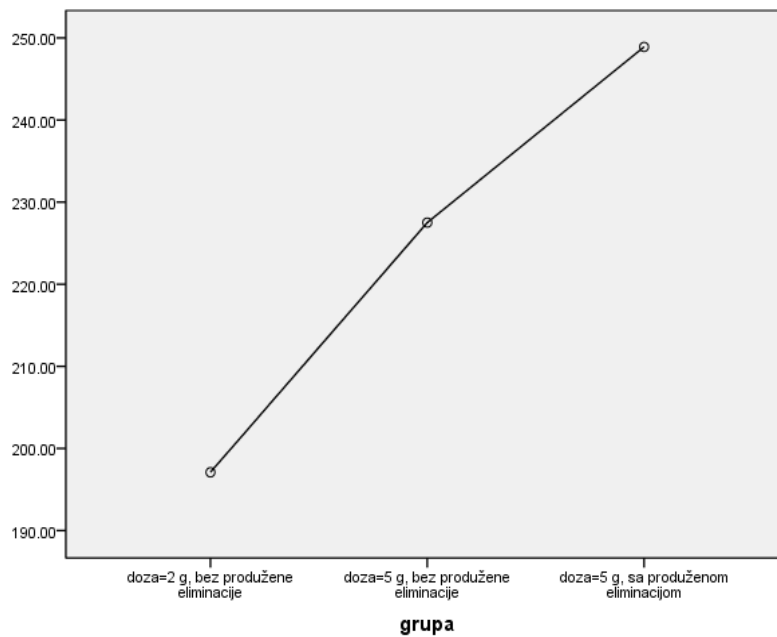
Grafikon 2.1.1. Interakcija tri grupe u odnosu na broj trombocita (x 10⁶/l)



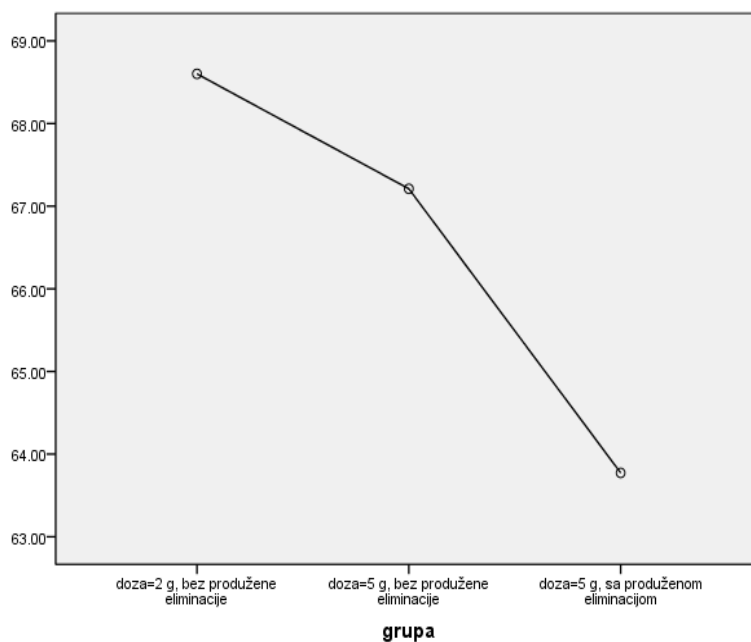
Grafikon 2.1.2. Interakcija tri grupe u odnosu na vrednost klirensa kreatinina (ml/min/1,73m²)



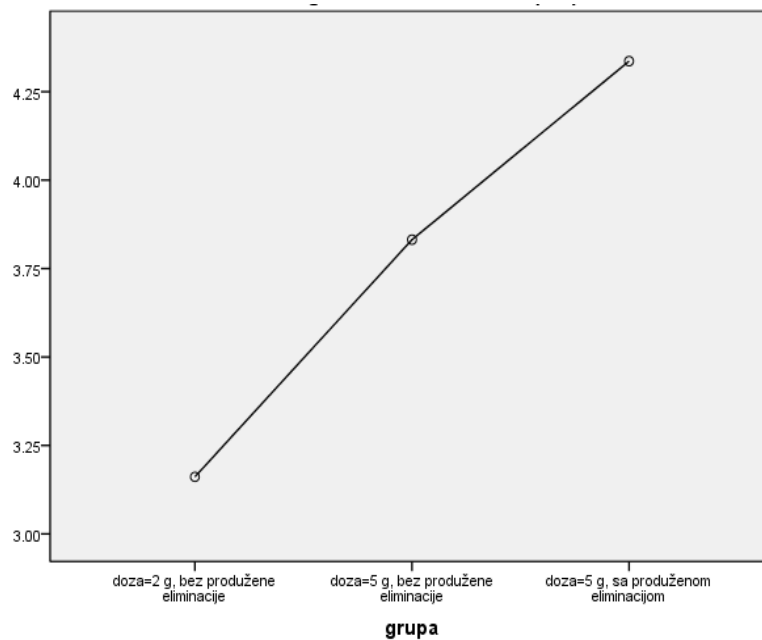
Grafikon 2.1.3. Interakcija tri grupe u odnosu na nivo alkalne fosfataze ($\mu\text{kat/l}$)



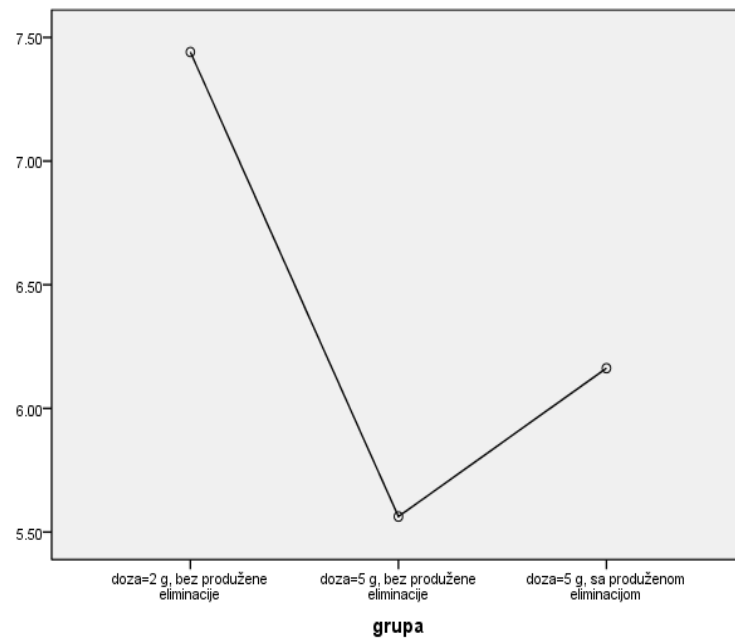
Grafikon 2.1.4. Interakcija tri grupe u odnosu na nivo mokraćne kiseline ($\mu\text{mol/l}$)



Grafikon 2.1.5. Interakcija tri grupe u odnosu na nivo proteina (g/l)



Grafikon 2.1.6. Interakcija tri grupe u odnosu na nivo uree (mmol/l)



Grafikon 2.1.7. Interakcija tri grupe u odnosu na nivo laktat dehidrogenaze ($\mu\text{kat/l}$)

2. STUDIJA II

KONCENTRACIJE METOTREKSATA

Uticaj primenjene doze metotreksata, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika

1. Koncentracije metotreksata

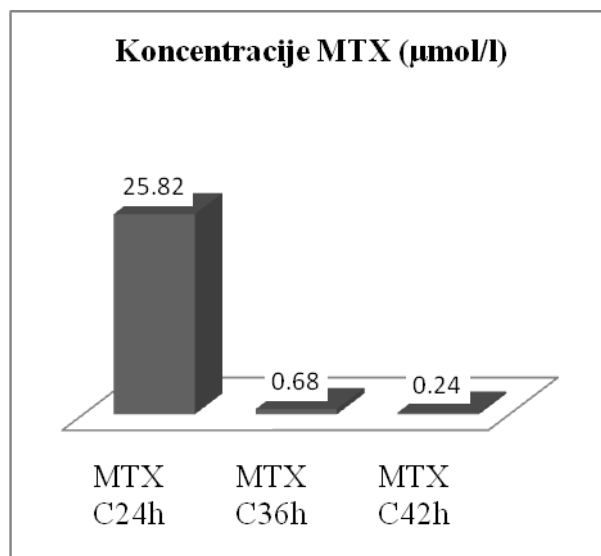
Tabelarno su prikazane koncentracije metotreksata izmerene u 24, 36. i 42. satu od započinjanja infuzije metotreksata (tabela 1.1.). Koncentracije metotreksata izmerene u vremenskom periodu nakon 42. sata po započinjanju infuzije leka nisu uključene u ove analize zbog manjeg broja merenja.

Pokazana je značajna interindividualna varijabilnost u izmerenim koncentracijama metotreksata koja je najizraženija u 42. satu od započinjanja infuzije (160,53 %). Intraindividualna varijabilnost je znatno manja u odnosu na interindividualnu i najviše izražena kod koncentracije metotreksata u 36. satu i iznosi 43,28 %.

Tabela 1.1. Koncentracije metotreksata celokupne grupe ispitanika

	m	SD	medijana	IQR	min	max	CV inter. %	CV intra. %	N
MTX C _{24h} (μ mol/l)	35.23	23.1	25.82	35.55	5.82	89.32	65.57	37.08	113
MTX C _{36h} (μ mol/l)	1	1.03	0.68	0.85	0.07	8.19	103	43.28	113
MTX C _{42h} (μ mol/l)	0.38	0.61	0.24	0.21	0.00	5.03	160.53	40.58	113

m-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, IQR-interkvartilna razlika, min-minimalna vrednost, max-maksimalna vrednost, CV intra-intraindividualni koeficijent varijabilnosti, CV inter-interindividualni koeficijent varijabilnosti, N-broj ciklusa MTX



Grafikon 1.1. Medijane koncentracija metotreksata u 24, 36. i 42. satu za celu grupu ispitanika

Koncentracije metotreksata u okviru tri grupe ispitanika formirane u odnosu na dozu metotreksata i prisustvo ili odsustvo produžene eliminacije metotreksata (III Materijal i metodologija, 2. Dizajn istraživanja) sumirane su u tabelama 1.2. - 1.4. Prikazane su interindividualne varijabilnosti za svako merenje koncentracija metotreksata (u 24, 36. i 42. satu).

Tabela 1.2. Koncentracije metotreksata, Grupa 1 (doza metotreksata 2 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata)

	m	SD	medijana	IQR	min	max	CV inter. %	N
MTX C _{24h} (µmol/l)	18.07	6.65	17.75	8.53	8	34.92	36.80	52
MTX C _{36h} (µmol/l)	0.49	0.2	0.45	0.26	0.12	0.97	40.82	52
MTX C _{42h} (µmol/l)	0.19	0.09	0.18	0.1	0.00	0.41	47.37	52

m-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, IQR-interkvartilna razlika, min-minimalna vrednost, max-maksimalna vrednost, CV intra-intraindividualni koeficijent varijabilnosti, CV inter-interindividualni koeficijent varijabilnosti, N-broj ciklusa MTX

Tabela 1.3. Koncentracije metotreksata, Grupa 2 (doza metotreksata 5 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata)

	m	SD	medijana	IQR	min	max	CV inter. %	N
MTX C _{24h} (μmol/l)	47.23	21.33	50.32	34.02	5.82	85.4	45.16	50
MTX C _{36h} (μmol/l)	1.16	0.67	0.98	0.95	0.07	2.57	57.76	50
MTX C _{42h} (μmol/l)	0.31	0.14	0.28	0.16	0.03	0.66	45.16	50

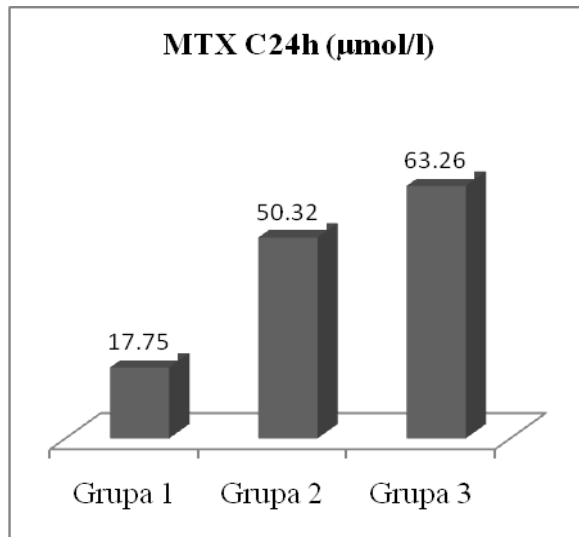
m-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, IQR-interkvartilna razlika, min-minimalna vrednost, max-maksimalna vrednost, CV intra-intraindividualni koeficijent varijabilnosti, CV inter-interindividualni koeficijent varijabilnosti, N-broj ciklusa MTX

Tabela 1.4. Koncentracije metotreksata, Grupa 3 (doza metotreksata 5 g/m², produžena eliminacija metotreksata)

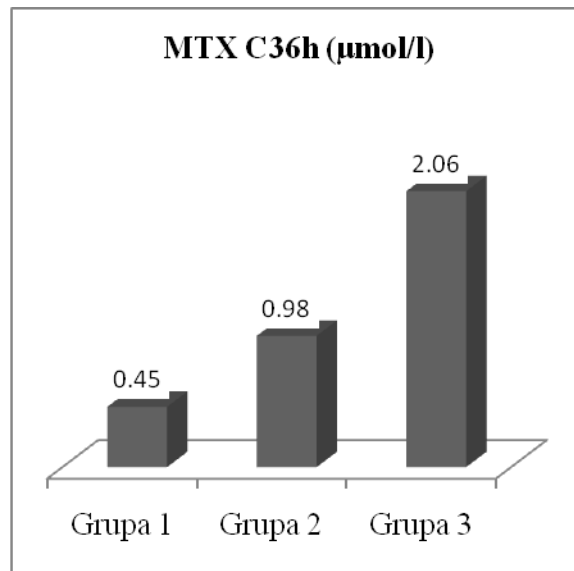
	m	SD	medijana	IQR	min	max	CV inter. %	N
MTX C _{24h} (μmol/l)	61.85	22.21	63.26	40.93	25.82	89.32	35.91	11
MTX C _{36h} (μmol/l)	2.71	2.18	2.06	1.71	0.83	8.19	80.44	11
MTX C _{42h} (μmol/l)	1.58	1.5	0.93	1.6	0.29	5.03	94.94	11

m-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, IQR-interkvartilna razlika, min-minimalna vrednost, max-maksimalna vrednost, CV intra-intraindividualni koeficijent varijabilnosti, CV inter-interindividualni koeficijent varijabilnosti, N-broj ciklusa MTX

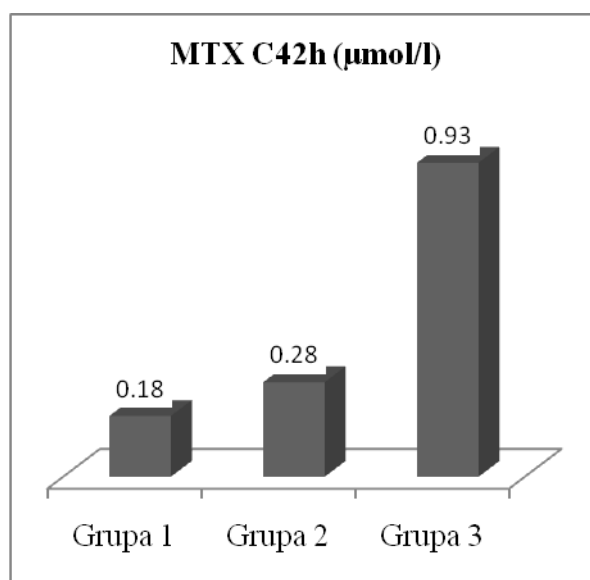
Napomena: Intraindividualna varijabilnost se ne može računati prilikom analize koncentracija metotreksata po grupama s obzirom da nisu svi ciklusi jednog ispitanika svrstani u istu grupu.



Grafikon 1.2. Medijane koncentracija metotreksata u 24. satu po grupama



Grafikon 1.3. Medijane koncentracija metotreksata u 36. satu po grupama



Grafikon 1.4. Medijane koncentracija metotreksata u 42. satu po grupama

2. Razlike u koncentracijama metotreksata između formiranih grupa

Analiza razlike u koncentracijama metotreksata između formiranih grupa sprovedena je u cilju utvrđivanja uticaja primenjene doze na koncentracije metotreksata. Upotrebljena je ANOVA (jednosmerna analiza varijanse) gde je nezavisna varijabla bila grupa a zavisne varijable su bile koncentracije metotreksata (tabela 2.1.).

Tabela 2.1. Multivarijantni test

Efekat	Wilksova Lambda	F	Broj stepena slobode		p
			hipoteza	greška	
Koncentracija	.193	227.274	2.000	109.000	.000
Koncentracija * grupa	.496	22.853	4.000	218.000	.000

Multivarijantnim testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentracijama metotreksata između tri posmatrane grupe, $F(4;218) = 1,894$, $p = 0,00$.

Mauchlijev test sferičnosti pokazuje da postoji značajna razlika ($\chi^2(2) = 714,150$, $p = 0,00$) u kovarijansama između pojedinih merenja. U ovakvom slučaju primenjuje se korekcija; preporuka je da se koristi Greenhouse Geisserova korekcija ako je epsilon Greenhouse Geisserov ispod 0,50. Korigovani test je prikazan kao Test efekata unutar ispitanika u tabeli 2.3.

Tabela 2.2. Mauchlijev test sferičnosti

Efekat unutar ispitanika	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	s.s.	p	Epsilon		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
Koncentracija	.001	714.150	2	.000	.500	.510	.500

s.s. - stepen slobode

Tabela 2.3. Test efekata unutar ispitanika (Greenhouse-Geisser test)

Izvor	Suma kvadrata	Broj s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Koncentracija	78688.372	1.001	78632.209	456.723	.000
Koncentracija * grupa	19202.035	2.001	9594.165	55.726	.000
Greška (koncentracija)	18951.784	110.079	172.166		

s.s. - stepen slobode

Testom efekta unutar ispitanika pokazana je značajna interakcija između koncentracije metotreksata i formiranih grupa, $F(2,001; 110,079) = 55,726$, $p = 0,00$.

Tabela 2.4. Test efekata između ispitanika

Izvor	Suma kvadrata	Broj s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Konstanta	45701.319	1	45701.319	473.419	.000
grupa	11164.706	2	5582.353	57.827	.000
Greška	10618.811	110	96.535		

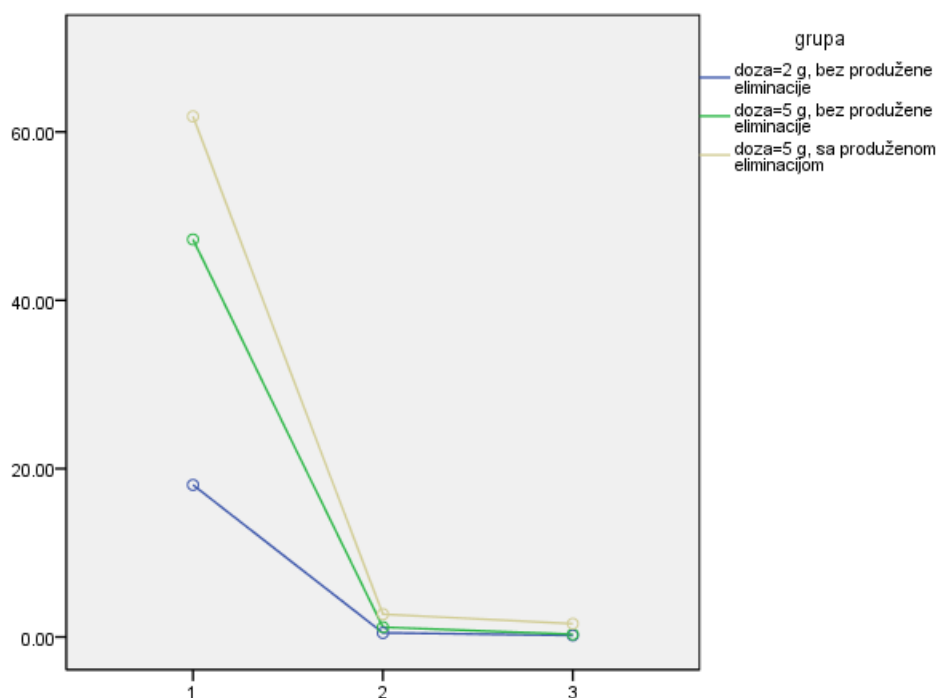
s.s. - stepen slobode

Testom efekta između ispitanika pokazana je značajna razlika između grupa u koncentracijama metotreksata, $F(2;107) = 57,827$, $p = 0,00$.

Tabela 2.5. Post hoc - Tukey HSD test

(I) grupa	(J) grupa	Razlika aritmetičkih sredina (I-J)	Standardna greška	p
Grupa 1	Grupa 2	-9.9863	1.12356	.000
	Grupa 3	-15.7945	1.88258	.000
Grupa 2	Grupa 3	-5.8083	1.88914	.007

Daljom analizom pomoću Post hoc - Tukey HSD testa (tabela 2.5.) pokazane su statistički značajne razlike u izmerenim koncentracijama metotreksata između sve tri grupe: Grupa 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije), $p = 0,00$, Grupa 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), $p = 0,00$, Grupa 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije) i 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), $p = 0,007$.



Grafikon 2.1. Razlike u izmerenim koncentracijama metotreksata ($\mu\text{mol/l}$) u 24, 36. i 42. satu u okviru tri grupe
(merenje 1 - koncentracije MTX izmerene nakon 24 h; merenje 2 - koncentracije MTX izmerene nakon 36 h; merenje 3 - koncentracije MTX izmerene nakon 42 h.)

2.1. Razlike u koncentracijama metotreksata u odnosu na demografske karakteristike

U cilju utvrđivanja hipoteze po kojoj postoji razlika u koncentracijama metotreksata u odnosu na demografske karakteristike ispitanika korišćena je analiza kovarijanse sa ponovljenim merenjima (ANCOVA). Kategorički prediktor (nezavisna varijabla) je bila grupa, a kontinuirani prediktori (kovarijati) telesna površina, uzrast i pol. Skup kriterijumskih (zavisnih) varijabli su činile koncentracije metotreksata izmerene u 24, 36. i 42 satu (tabela 2.1.1.).

Tabela 2.1.1. Multivarijatni test

Efekat	Wilksova Lambda	F	Broj stepena slobode		p
			hipoteza	greška	
Koncentracija	.683	24.574	2	106	.000
Koncentracija * uzrast	.997	.149	2	106	.861
Koncentracija * telesna površina	.980	1.058	2	106	.351
Koncentracija * pol	.987	.682	2	106	.508
Koncentracija * grupa	.513	21.030	4.000	212.000	.000

Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između posmatranih grupa, ($F(4;212) = 21,030$, $p = 0,00$), što je potvrda prethodne analize.

Nije postojala statistički značajna interakcija koncentracija metotreksata i demografskih karakteristika (uzrast, telesna površina i pol).

Mauchlijev test sferičnosti pokazuje da postoji značajna razlika ($\chi^2(2) = 695.689$, $p = 0,00$) u kovarijansama između pojedinih merenja. U ovakvom slučaju primenjuje se korekcija; preporuka je da se koristi Greenhouse Geisserova korekcija ako je epsilon Greenhouse Geisserov ispod 0,50. Korigovani test je prikazan kao Test efekata unutar ispitanika u tabeli 2.1.3.

Tabela 2.1.2. Mauchlijev test sferičnosti

Efekat unutar ispitanika	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	s.s.	p	Epsilon		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
Koncentracija	.001	695.689	2	.000	.500	.524	.500

s.s. - stepen slobode

Tabela 2.1.3. Test efekata unutar ispitanika (Greenhouse-Geisser test)

Izvor	Suma kvadrata	Broj s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Koncentracija	7823.331	1.001	7817.809	45.234	.000
Koncentracija * uzrast	39.753	1.001	39.725	.230	.633
Koncentracija * telesna površina	195.578	1.001	195.439	1.131	.290
Koncentracija * pol	43.338	1.001	43.308	.251	.618
Koncentracija * grupa	17562.367	2.001	8774.986	50.772	.000
Greška (koncentracija)	18505.955	107.076	172.831		

s.s. - stepen slobode

Testom efekta unutar ispitanika pokazana je značajna razlika u tri merenja (24, 36 i 42 sata nakon započinjanja infuzije metotreksata), odnosno trend opadanja koncentracija tokom vremena, $F(2,001;107,076) = 50,772$, $p = 0,00$.

Nije postojala statistički značajna interakcija koncentracija metotreksata i demografskih karakteristika (uzrast, telesna površina i pol).

Tabela 2.1.4. Test efekata između ispitanika

Izvor	Suma kvadrata	Broj s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Konstanta	4525.241	1	4525.241	46.785	.000
uzrast	38.099	1	38.099	.394	.532
telesna površina	140.892	1	140.892	1.457	.230
pol	17.713	1	17.713	.183	.670
grupa	10269.199	2	5134.599	53.085	.000
Greška	10349.413	107	96.723		

s.s. - stepen slobode

Testom efekata između ispitanika je pokazana značajna razlika između grupa u koncentracijama metotreksata, $F(2;107) = 53.085$, $p = 0,00$.

Nije postojala statistički značajna razlika u demografskim karakteristikama (uzrast, telesna površina i pol) između grupa.

Posmatrano za koncentracije metotreksata izmerenih 24 sata nakon započinjanja infuzije nije pokazan efekat nijednog posmatranog demografskog parametra (tabela 2.1.5.).

Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između Grupe 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), $p = 0,00$ i Grupe 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), $p = 0,009$.

Tabela 2.1.5. Procena parametra: Efekat demografskih karakteristika i pola na koncentracije metotreksata u 24. satu merenja

Parametar	b	SE (b)	t	p
Konstanta	54.112	6.878	7.868	.000
uzrast	-.617	1.162	-.531	.596
telesna površina	11.859	10.645	1.114	.268
pol	1.569	3.299	.476	.635
grupa 1	-43.448	5.558	-7.817	.000
grupa 2	-14.636	5.514	-2.654	.009

b –koeficijent regresije, SE–standardna greška; grupa 3 je bazna vrednost.

Posmatrano za koncentracije metotreksata izmerenih 36 sati nakon započinjanja infuzije nije pokazan efekat nijednog posmatranog demografskog parametra (tabela 2.1.6.).

Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između Grupe 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p = 0.00 i Grupe 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p = 0.00.

Tabela 2.1.6. Procena parametra: Efekat demografskih karakteristika na koncentracije metotreksata u 36. satu merenja

Parametar	b	SE (b)	t	p
Konstanta	2.315	.337	6.874	.000
uzrast	-.079	.057	-1.384	.169
telesna površina	.965	.521	1.851	.067
pol	.002	.162	.011	.991
grupa 1	-2.221	.272	-8.159	.000
grupa 2	-1.531	.270	-5.672	.000

b –koeficijent regresije, SE–standardna greška; Grupa 3 je bazna vrednost.

Tabela 2.1.7. Procena parametra: Efekat demografskih karakteristika na koncentracije metotreksata u 42. satu merenja

Parametar	b	SE (b)	t	p
Konstanta	1.528	.194	7.894	.000
uzrast	-.062	.033	-1.885	.062
telesna površina	.525	.300	1.751	.083
pol	-.104	.093	-1.118	.266
grupa 1	-1.405	.156	-8.982	.000
grupa 2	-1.245	.155	-8.021	.000

b –koeficijent regresije, SE–standardna greška; Grupa 3 je bazna vrednost.

Posmatrano za koncentracije metotreksata izmerenih 42 sata nakon započinjanja infuzije nije pokazan efekat nijednog posmatranog demografskog parametra (tabela 2.1.7.).

Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između Grupe 1 i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p = 0.00 i Grupe 2 i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p = 0.00.

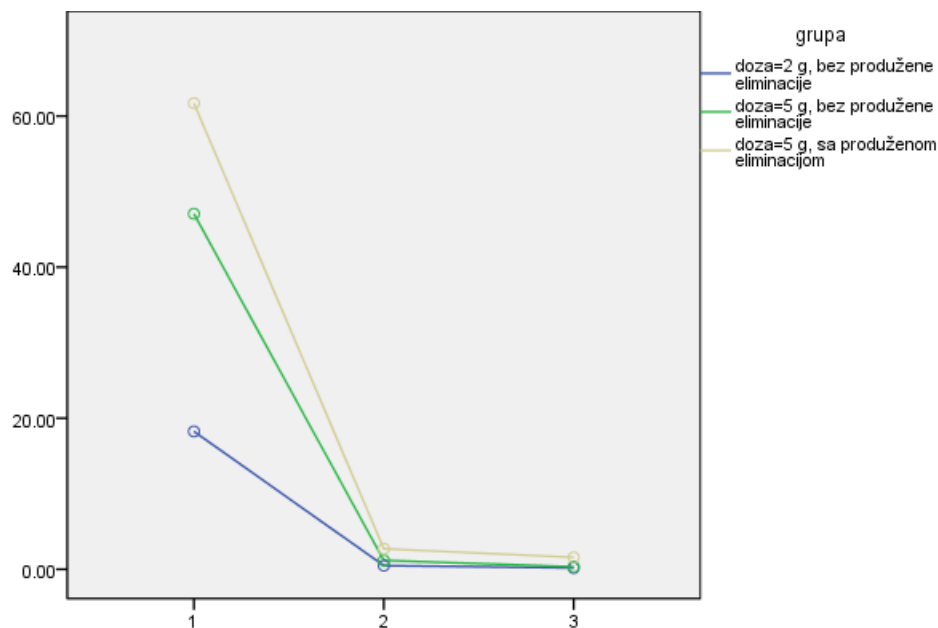
S obzirom da je F-test bio statistički značajan, testom kontrastiranja (K Matrix) provereno je između kojih grupa postoji statistički značajna razlika.

Testom kontrastiranja (tabela 2.8.) pokazane su statistički značajne razlike u izmerenim koncentracijama metotreksata između sve tri grupe: Grupa 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije), p=0,00, Grupa 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p=0,00, Grupa 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije) i 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p=0,003.

Tabela 2.1.8. Test kontrastiranja (K Matrix)

Grupa 1 vs Grupa 2	Aritmetička sredina (m)
Razlika (Ocenjena - Pretpostavljena)	-9.887
SE	1.157
P	.000
<hr/>	
Grupa 1 vs Grupa 3	
Razlika (Ocenjena - Pretpostavljena)	-15.691
SE	1.925
P	.000
<hr/>	
Grupa 2 vs Grupa 3	
Razlika (Ocenjena - Pretpostavljena)	-5.804
SE	1.910
P	.003

SE – standardna greška



Grafikon 2.1.1. Razlike u izmerenim koncentracijama metotreksata ($\mu\text{mol/l}$) u 24, 36. i 42. satu u okviru tri grupe ujednačene u odnosu na demografske parametre

(merenje 1 - koncentracije MTX izmerene nakon 24 h; merenje 2 - koncentracije MTX izmerene nakon 36 h; merenje 3 - koncentracije MTX izmerene nakon 42 h. Kovarijati su procenjivani na srednjim vrednostima: uzrast = 6,3886, telesna površina = 0,9210, pol = 0,39.)

2.2. Razlika u koncentracijama metotreksata u odnosu na laboratorijske parametre

U cilju utvrđivanja hipoteze da postoji razlika u koncentracijama metotreksata u odnosu na laboratorijske parametre korišćena je analiza kovarijanse sa ponovljenim merenjima (ANCOVA). Laboratorijski parametri su bili kontinuirani prediktori (kovarijati), kategorička prediktorska (nezavisna) varijabla je bila grupa, skup kriterijumskih (zavisnih) varijabli su činile koncentracije metotreksata izmerene u 24, 36. i 42 satu.

Tabela 2.2.1. Multivarijantni test

Efekat	Wilksova Lambda	F	Broj stepena slobode		p
			hipoteza	greška	
koncentracija	.976	1.132	2.000	91.000	.327
koncentracija * leukociti	.997	.124	2.000	91.000	.883
koncentracija * eritrociti	.950	2.397	2.000	91.000	.097
koncentracija * hemoglobin	.986	.623	2.000	91.000	.539
koncentracija * hematokrit	.982	.848	2.000	91.000	.432
koncentracija * trombociti	.987	.580	2.000	91.000	.562
koncentracija * AST	.995	.224	2.000	91.000	.799
koncentracija * ALT	1.000	.005	2.000	91.000	.995
koncentracija * GGT	.999	.038	2.000	91.000	.962
koncentracija * kreatinin	.998	.103	2.000	91.000	.903
koncentracija * ClCr	.989	.491	2.000	91.000	.614
koncentracija * albumin	.987	.621	2.000	91.000	.540
koncentracija * bilirubin	.997	.156	2.000	91.000	.855
koncentracija * ALP	.993	.308	2.000	91.000	.735
koncentracija * amilaza	.996	.168	2.000	91.000	.846
koncentracija * ac.uricum	.994	.271	2.000	91.000	.763
koncentracija * protein	.988	.537	2.000	91.000	.586
koncentracija * urea	.990	.467	2.000	91.000	.628
koncentracija * LDH	.922	3.846	2.000	91.000	.025
koncentracija * grupa	.600	13.263	4.000	182.000	.000

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT– γ -glutamiltransferaza, ClCr–klirens kreatinina, ALP–alkalna fosfataza, ac.uricum–mokraćna kisleina, LDH–laktat dehidrogenaza

Multivarijantnim testom utvrđeno je postojanje statistički značajne interakcije koncentracije metotreksata i laktat dehidrogenaze, $F(2;91) = 3,846$, $p = 0,025$. Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između posmatranih grupa, ($F(4;182) = 13,263$, $p = 0,00$).

Tabela 2.2.2. Mauchlijev test sferičnosti

Efekat unutar ispitanika	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	s.s	p	Epsilon		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
koncentracija	.001	592.080	2	.000	.500	.610	.500

s.s. - stepen slobode

Mauchlijev test sferičnosti je pokazao da postoji značajna razlika ($\chi^2(2) = 592,080$, $p = 0,00$) u kovarijansama između pojedinih merenja. U ovakvom slučaju primenjuje se korekcija; preporuka je da se koristi Greenhouse Geisserova korekcija ako je epsilon Greenhouse Geisserov ispod 0,50. Korigovani test je prikazan kao Test efekata unutar ispitanika u tabeli 2.2.3.

Tabela 2.2.3. Test efekata unutar ispitanika (Greenhouse-Geisser test)

Izvor	Suma kvadrata	Broj s.s.	Prosek kvadrata	F	p
koncentracija	3.162	1.001	3.16	0.018	0.893
koncentracija * leukociti	23.268	1.001	23.25	0.135	0.714
koncentracija * eritrociti	481.123	1.001	480.764	2.8	0.098
koncentracija * hemoglobin	204.659	1.001	204.506	1.191	0.278
koncentracija * hematokrit	20.637	1.001	20.621	0.12	0.73
koncentracija * trombociti	64.392	1.001	64.344	0.375	0.542
koncentracija * AST	1.511	1.001	1.51	0.009	0.926
koncentracija * ALT	0.321	1.001	0.321	0.002	0.966
koncentracija * GGT	6.937	1.001	6.932	0.04	0.841
koncentracija * kreatinin	3.407	1.001	3.404	0.02	0.888
koncentracija * ClCr	38.615	1.001	38.586	0.225	0.637
koncentracija * albumin	10.271	1.001	10.263	0.06	0.808
koncentracija * bilirubin	0.112	1.001	0.112	0.001	0.98
koncentracija * ALP	99.126	1.001	99.052	0.577	0.45
koncentracija * amilaza	54.465	1.001	54.424	0.317	0.575
koncentracija * ac.uricum	0.574	1.001	0.573	0.003	0.954
koncentracija * protein	181.947	1.001	181.811	1.059	0.306
koncentracija * urea	161.988	1.001	161.867	0.943	0.334
koncentracija * LDH	1335.807	1.001	1334.81	7.774	0.006
koncentracija * grupa	10396.08	2.001	5194.155	30.25	0.00
greška(koncentracija)	15809.05	92.069	171.709		

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT- γ -glutamiltransferaza, ClCr–klirens kreatinina, ALP–alkalna fosfataza, ac.uricum–mokraćna kisleina, LDH–laktat dehidrogenaza, s.s. – stepeni slobode

Testom efekta unutar ispitanika utvrđena je interakcija koncentracije metotreksata sa laktat dehidrogenazom – LDH, $F(1,001; 92,069) = 7,774$, $p = 0,006$. Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između posmatranih grupa, $F(1,001; 92,069) = 30,25$, $p = 0,00$.

Testom efekata između ispitanika (tabela 3.4.), utvrđena je statistički značajna razlika u nivoima laktat dehidrogenaze između grupa, $F(1;92) = 7,105$, $p = 0,009$. Pokazana je značajna razlika između izmerenih koncentracija metotreksata između grupa, $F(2;92) = 31,150$, $p = 0,009$.

Tabela 2.2.4. Test efekata između ispitanika

Izvor	Suma kvadrata	Broj s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Konstanta	3.367	1	3.367	.035	.852
Leukociti	7.063	1	7.063	.073	.787
Eritrociti	319.730	1	319.730	3.315	.072
Hemoglobin	119.396	1	119.396	1.238	.269
Hematokrit	19.059	1	19.059	.198	.658
Trombociti	24.390	1	24.390	.253	.616
AST	2.170	1	2.170	.022	.881
ALT	.583	1	.583	.006	.938
GGT	4.528	1	4.528	.047	.829
Kreatinin	4.548	1	4.548	.047	.829
ClCr	24.679	1	24.679	.256	.614
Albumini	2.822	1	2.822	.029	.865
Bilirubin	.006	1	.006	.000	.994
ALP	44.918	1	44.918	.466	.497
Amilaza	24.566	1	24.566	.255	.615
M. kiselina	3.740	1	3.740	.039	.844
Proteini	85.682	1	85.682	.888	.348
Urea	105.067	1	105.067	1.089	.299
LDH	685.267	1	685.267	7.105	.009
Grupa	6008.385	2	3004.193	31.150	.000
greška	8872.799	92	96.443		

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT– γ -glutamiltransferaza, ClCr–klirens kreatinina, ALP–alkalna fosfataza, LDH–laktat dehidrogenaza, s.s. – stepeni slobode

U tabelama 2.2.5. – 2.2.7, prikazan je efekat laboratorijskih parametara na koncentracije metotreksata u 24, 36. i 42. satu. Posmatrano za svaku vremensku distancu posebno, na koncentracije metotreksata izmerenih 24 sata nakon započinjanja infuzije metotreksata pokazan je efekat laktat dehidrogenaze ($b = 2,253$, $p = 0,007$). Sa višim vrednostima laktat dehidrogenaze, u 24. satu merenja mogu se očekivati veće koncentracije metotreksata. Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između Grupe 1 (2 g/m^2 bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m^2 sa produženom eliminacijom), $p = 0.00$ i Grupe 2 (5 g/m^2 bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m^2 sa produženom eliminacijom), $p = 0.017$.

Tabela 2.2.5. Procena parametara: Efekat laboratorijskih parametara na koncentracije metotreksata u 24. satu merenja

Parametar	b	SE	t	p
Konstanta	15.527	38.545	.403	.688
Leukociti	-.301	.900	-.335	.739
Eritrociti	-17.960	10.406	-1.726	.088
Hemoglobin	.579	.526	1.100	.274
Hematokrit	.685	1.801	.380	.705
Trombociti	-.007	.012	-.575	.567
AST	.959	8.512	.113	.911
ALT	-.174	3.154	-.055	.956
GGT	1.040	5.035	.207	.837
Kreatinin	-.041	.244	-.167	.867
CICr	-.020	.041	-.486	.628
Albumini	-.151	.690	-.219	.827
Bilirubin	-.003	.253	-.012	.990
ALP	-.911	1.242	-.734	.465
Amilaza	2.023	3.723	.543	.588
M. kiselina	.004	.037	.105	.917
Proteini	.354	.354	1.000	.320
Urea	1.499	1.503	.997	.321
LDH	2.253	.820	2.749	.007
grupa 1	-48.639	7.201	-6.754	.000
grupa 2	-15.178	6.265	-2.423	.017

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT- γ -glutamilttransferaza, cr–kreatinin, CICr–klirens kreatinina, ALP–alkalna fosfataza, LDH–laktat dehidrogenaza, b – koeficijent regresije, SE – standardna greška; osnovna grupa je grupa 3

Na koncentracije metotreksata u 36. satu od započinjanja infuzije pokazan je efekat eritrocita ($b = -1.195$, $p = 0,024$). Sa nižim vrednostima eritrocita, u 36. satu merenja mogu se očekivati veće koncentracije metotreksata. Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između Grupe 1 (2 g/m^2 bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m^2 sa produženom eliminacijom), $p = 0.00$ i Grupe 2 (5 g/m^2 bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m^2 sa produženom eliminacijom), $p = 0.00$.

Tabela 2.2.6. Procena parametara: Efekat laboratorijskih parametara na koncentracije metotreksata u 36. satu merenja

Parametar	b	SE	t	p
Konstanta	-.247	1.923	-.129	.898
Leukociti	.018	.045	.390	.698
Eritrociti	-1.195	.519	-2.302	.024
Hemoglobin	.019	.026	.716	.476
Hematokrit	.105	.090	1.165	.247
Trombociti	.000	.001	.209	.835
AST	.254	.425	.598	.551
ALT	-.039	.157	-.246	.807
GGT	.046	.251	.182	.856
Kreatinin	-.006	.012	-.517	.606
ClCr	-.001	.002	-.300	.764
Albumini	.021	.034	.607	.546
Bilirubin	.001	.013	.076	.940
ALP	.009	.062	.148	.883
Amilaza	-.009	.186	-.049	.961
M. kiselina	.002	.002	1.175	.243
Proteini	.000	.018	.026	.979
Urea	.080	.075	1.072	.286
LDH	.031	.041	.752	.454
grupa 1	-2.251	.359	-6.266	.000
grupa 2	-1.486	.313	-4.755	.000

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT– γ -glutamiltransferaza, cr–kreatinin, ClCr–klirens kreatinina, ALP–alkalna fosfataza, LDH–laktat dehidrogenaza; b – koeficijent regresije, SE – standardna greška; Grupa 3 je bazna vrednost.

Na koncentracije metotreksata u 42. satu od započinjanja infuzije nije pokazan efekat nijednog laboratorijskog parametra. Pokazana je značajna razlika u koncentracijama metotreksata između Grupe 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p = 0.00 i Grupe 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p = 0.00.

Tabela 2.2.7. Procena parametara: Efekat laboratorijskih parametara na koncentracije metotreksata u 42. satu merenja

Parametar	b	SE	t	p
Konstanta	.648	1.075	.602	.548
Leukociti	.030	.025	1.204	.232
Eritrociti	-.553	.290	-1.904	.060
Hemoglobin	.011	.015	.774	.441
Hematokrit	.044	.050	.866	.389
Trombociti	.000	.000	1.474	.144
AST	.115	.237	.485	.629
ALT	-.042	.088	-.480	.632
GGT	.049	.140	.346	.730
Kreatinin	-.008	.007	-1.173	.244
ClCr	-.001	.001	-.917	.362
Albumini	.007	.019	.385	.701
Bilirubin	.004	.007	.592	.555
ALP	.020	.035	.590	.556
Amilaza	-.059	.104	-.572	.569
M. kiselina	.002	.001	1.485	.141
Proteini	-.007	.010	-.754	.453
Urea	.052	.042	1.251	.214
LDH	-.011	.023	-.491	.624
grupa 1	-1.257	.201	-6.258	.000
grupa 2	-1.127	.175	-6.448	.000

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT– γ -glutamilttransferaza, cr–kreatinin, ClCr–klirens kreatinina, ALP–alkalna fosfataza, LDH–laktat dehidrogenaza; b – koeficijent regresije, SE – standardna greška; Grupa 3 je bazna vrednost.

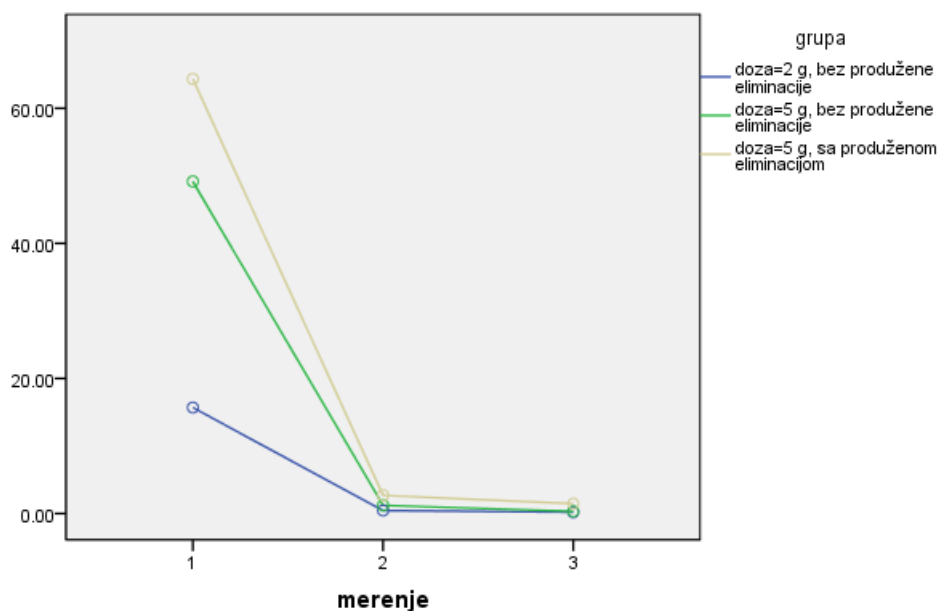
S obzirom da je F-test bio statistički značajan, testom kontrastiranja (K Matrix) provereno je između kojih grupa postoji statistički značajna razlika.

Testom kontrastiranja (tabela 3.8.) pokazane su statistički značajne razlike u izmerenim koncentracijama metotreksata između sve tri grupe: Grupa 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije), p=0,00, Grupa 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p=0,00, Grupa 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije) i 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom), p=0,008.

Tabela 2.2.8. Test kontrastiranja (K Matrix)

Grupa 2 vs Grupa 1	Aritmetička sredina (m)
Razlika (Ocenjena - Pretpostavljena)	11.452
SE	1.687
p	.000
Grupa 1 vs Grupa 3	Aritmetička sredina (m)
Razlika (Ocenjena - Pretpostavljena)	-17.383
SE	2.497
p	.000
Grupa 2 vs Grupa 3	Aritmetička sredina (m)
Razlika (Ocenjena - Pretpostavljena)	-5.930
SE	2.172
p	.008

SE – standardna greška



Grafikon 2.2.1. Razlike u izmerenim koncentracijama metotreksata ($\mu\text{mol/l}$) u 24, 36. i 42. satu u okviru tri grupe ujednačene u odnosu na laboratorijske parametre

(merenje 1 - koncentracije MTX izmerene nakon 24 h; merenje 2 - koncentracije MTX izmerene nakon 36 h; merenje 3 - koncentracije MTX izmerene nakon 42 h. Kovarijati su procenjivani na srednjim vrednostima: leukociti = 4,119, eritrociti = 3,5352, hemoglobin = 107,1327, hematokrit = 31,5788, trombociti = 264,5128, AST = 0,5569, ALT = 0,8534, GGT = 0,4581, Cr = 31,3854, ClCr = 207,2044, albumin = 43, 5378, bilirubin = 9,1232, ALP = 4,3592, amilaza = 1,0416, mokraćna kiselina = 215,5962, proteini = 67,5158, urea = 3,5724, LDH = 6,4854.)

3. STUDIJA III

KLIRENS METOTREKSATA

Uticaj primenjene doze metotreksata, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika

1. Klirens metotreksata

U ovoj studiji analizirano je ukupno 113 ciklusa metotreksata (42 pedijatrijska pacijenta, 1 – 4 ciklusa po pacijentu) posmatranih u okviru tri grupe formiranih spram primenjene doze i prisustva produžene eliminacije metotreksata (III Materijal i metodologija, 2. Dizajn istraživanja).

U tabeli 1.1. je prikazan klirens metotreksata za sve ispitanike (113 ciklusa) uključene u ovo istraživanje. Medijana klirensa metotreksata je 8,32 l/h, IQR = 6,63.

Klirens metotreksata okviru tri grupe ispitanika dat je u tabelama 1.2. – 1.4, uz grafički prikaz medijana klirensa metotreksata na grafikonu 1.1.

Tabela 1.1. Klirens metotreksata za sve analizirane cikluse

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	N
K MTX (l/h)	10.97	8.2	8.32	6.63	2.37	66.87	113

K MTX-klirens MTX, m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N–broj ciklusa MTX

Tabela 1.2. Klirens metotreksata. Grupa 1 - doza metotreksata 2 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	N
K MTX (l/h)	9.87	4.83	8.13	6.55	2.37	23.51	52

K MTX-klirens MTX, m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N–broj ciklusa MTX

Tabela 1.3. Klirens metotreksata. Grupa 2 - doza metotreksata 5 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata

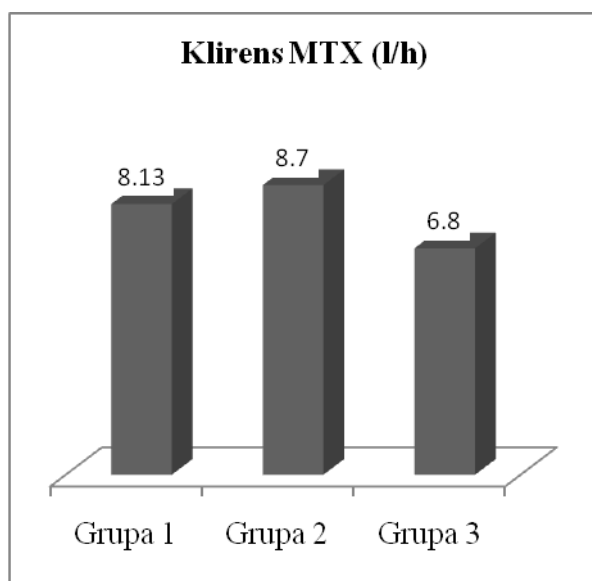
	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	N
K MTX (l/h)	12.54	10.65	8.7	8.62	4.4	66.87	50

K MTX-klirens MTX, m–aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N-broj ciklusa MTX

Tabela 1.4. Klirens metotreksata. Grupa 3 - doza metotreksata 5 g/m², produžena eliminacija metotreksata

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	N
K MTX (l/h)	9.03	7.46	6.8	7.7	2.820	28.93	11

K MTX-klirens MTX, m–aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N-broj ciklusa MTX



Grafikon 1.1. Medijane klirensa metotreksata u tri grupe ispitanika

2. Razlike u klirensu metotreksata između grupa

Ova analiza je sprovedena u cilju utvrđivanja razlike među grupama u klirensu metotreksata te posredne procene uticaja primenjene doze metotreksata na klirens. Upotrebljena je ANOVA (jednosmerna analiza varijanse) gde je nezavisna varijabla bila grupa a zavisne varijable su bili klirensi metotreksata (tabela 2.1.).

Analizom nije pokazana razlika među grupama u odnosu na klirens metotreksata, što je potvrđeno i neparametrijskim testom - Kruskal Wallis (tabela 2.2.) i post hoc testom – Tukey HSD test (tabela 2.3.).

Tabela 2.1. Razlike između grupa u klirensu metotreksata

	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Prosek kvadrata	F	p
Između grupa	228.259	2	114.130	1.720	.184
Unutar grupa	7299.006	110	66.355		
Ukupno	7527.265	112			

Tabela 2.2. Kruskal Wallis–ov test: Razlike između grupa u klirensu metotreksata

	χ^2	Stepeni slobode	Asimp. p
Klirens MTX	2.685	2	.261

Tabela 2.3. Tukey HSD test - Razlike između grupa u klirensu metotreksata

(I) grupa	(J) grupa	Razlika aritmetičkih sredina (I-J)	Standardna greška	p
Grupa 1	Grupa 2	-2.675	1.613	0.226
Grupa 1	Grupa 3	0.836	2.703	0.949
Grupa 2	Grupa 3	3.512	2.713	0.401

2.1. Razlike u klirensu metotreksata između grupa u odnosu na demografske parametre

Korišćena je analiza kovarijanse sa ponovljenim merenjima (ANCOVA), gde je nezavisna varijabla bila grupa, kovarijati demografski parametri, a zavisnu varijablu činio je klirens metotreksata.

Testom efekata između ispitanika (tabela 2.1.1.) nije pokazana statistički značajan efekat demografskih karakteristika ispitanika na klirens metotreksata. Nije utvrđena razlika u klirensima metotreksata između grupa u odnosu na demografske karakteristike ispitanika.

Tabela 2.1.1. Test efekata između ispitanika

Izvor	Suma kvadrata	Broj s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Korigovani model	977.000 ^a	5	195.400	3.192	.010
konstanta	284.100	1	284.100	4.641	.033
Uzrast	15.543	1	15.543	.254	.615
telesna površina	37.840	1	37.840	.618	.433
Pol	45.773	1	45.773	.748	.389
Grupa	196.222	2	98.111	1.603	.206
Greška	6550.265	107	61.217		
Ukupno	21124.223	113			
Korigovano ukupno	7527.265	112			

a. $R^2 = .130$ (Adjusted $R^2 = .089$). s.s. – stepeni slobode

Procenom parametara (tabela 2.1.2.) nije pokazan efekat nijednog demografskog parametra na klirens metotreksata, kao ni razlika među grupama u klirensu metotreksata.

Tabela 2.1.2. Procena parametara

Parametar	b	Standardna greška	t	p
konstanta	3.075	3.282	.937	.351
Uzrast	.279	.554	.504	.615
telesna površina	3.994	5.080	.786	.433
Pol	-1.361	1.574	-.865	.389
Grupa 1	2.341	2.653	.883	.379
Grupa 2	4.258	2.631	1.618	.109

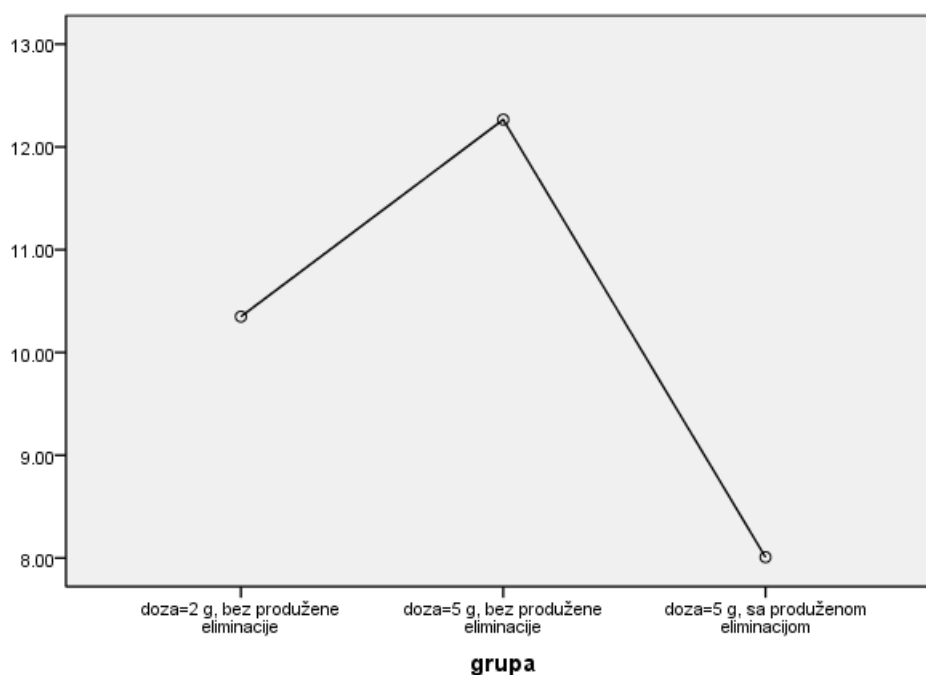
Osnovna grupa je Grupa 3.

Komparacijom među grupama (tabela 2.1.3.) nisu pokazane statistički značajne razlike u klirensu metotreksata između grupa u odnosu na demografske parametre.

Tabela 2.1.3. Komparacija klirensa metotreksata između grupa ispitanika kada su ispitanici ujednačeni u odnosu na demografske parametre

(I) grupa	(J) grupa	Razlika aritmetičkih sredina (I-J)	Standardna greška	p
Grupa 1	Grupa 2	-1.917	1.595	.232
Grupa 1	Grupa 3	2.341	2.653	.379
Grupa 2	Grupa 3	4.258	2.631	.109

Na grafikonu 2.1.1. prikazane su razlike u klirensima metotreksata između tri posmatrane grupe kada su one ujednačene u odnosu na demografske parametre. Prikazane razlike nisu pokazale statističku značajnost.



Grafikon 2.1.1. Razlike u klirensu metotreksata (l/h) između grupa ujednačenih u odnosu na demografske parametre (Kovarijati su procenjivani na srednjim vrednostima: uzrast = 6,3886, telesna površina = 0,9210, pol = 0,39.)

2.2. Povezanost klirensa metotreksata sa demografskim karakteristikama ispitanika

S obzirom da analizom kovarijanse sa ponovljenim merenjima nije pokazan uticaj demografskih parametara na klirens metotreksata, urađena je dodatna analiza koja ispituje povezanost između varijabli u cilju ispitivanja odnosa demografskih karakteristika ispitanika i klirensa metotreksata. Korišćena je analiza pomoću Spearman-ovog koeficijenta korelacije (ρ), koji kao neparametrijski test ima manje zahtevne pretpostavke, ali sa druge strane i manju statističku snagu (verovatnoća da će odbaciti nultu hipotezu kada ona nije tačna).

Tabela 2.2.1. predstavlja podatke za celu grupu ispitanika uključenih u istraživanje.

Tabela 2.2.1. Povezanost klirensa metotreksata i demografskih karakteristika za sve ispitanike (Spearman-ov koeficijent korelacije)

	Klirens MTX	
Uzrast	ρ	.492**
	p	0
	N	113
Pol	ρ	-0.166
	p	0.08
	N	113
Telesna masa	ρ	.535**
	p	0
	N	113
Telesna visina	ρ	.542**
	p	0
	N	113
Telesna površina	ρ	.551**
	p	0
	N	113

* Korelacija je značajna na nivou značajnosti 0.05.

** Korelacija je značajna na nivou značajnosti 0.01.

N-broj ciklusa MTX

Pokazana je povezanost uzrasta i klirensa metotreksata ($\rho = 0,492$, $p = 0,00$). Klirens metotreksata povećava se sa starijim uzrastom.

Pokazana je povezanost telesne mase ($\rho = 0.535$, $p = 0,00$) i klirensa metotreksata. Klirens metotreksata povečava se sa povećanjem telesne mase.

Pokazana je povezanost telesne visine ($\rho = 0.542$, $p = 0,00$) i klirensa metotreksata. Klirens metotreksata povečava se sa povećanjem telesne visine.

Pokazana je povezanost telesne površine ($\rho = 0.551$, $p = 0,00$) i klirensa metotreksata. Klirens metotreksata povečava se sa povećanjem telesne površine.

Nije pokazana povezanost pola i klirensa metotreksata.

2.3. Razlike u klirensu metotreksata između grupa u odnosu na laboratorijske parametre

Korišćena je analiza kovarijanse sa ponovljenim merenjima (ANCOVA), gde je nezavisna varijabla bila grupa, kovarijati laboratorijski parametri, a zavisnu varijablu činio je klirens metotreksata.

U ovu analizu je kao nezavisna varijabla uvrštena i grupa radi analiziranja razlike u klirensima metotreksata u odnosu na primljenu dozu metotreksata.

Tabela 2.3.1. Test efekata između ispitanika

Izvor	Suma kvadrata	Broj s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Korigovani model	2109.994	20	105.500	1.792	.033
Konstanta	36.130	1	36.130	.614	.435
Leukociti	.960	1	.960	.016	.899
Eritrociti	219.030	1	219.030	3.720	.057
Hemoglobin	158.557	1	158.557	2.693	.104
Hematokrit	4.589	1	4.589	.078	.781
Trombociti	51.327	1	51.327	.872	.353
AST	8.189	1	8.189	.139	.710
ALT	32.524	1	32.524	.552	.459
GGT	43.681	1	43.681	.742	.391
Kreatinin	486.114	1	486.114	8.256	.005
ClCr	109.119	1	109.119	1.853	.177
Albumini	28.302	1	28.302	.481	.490
Bilirubin	67.297	1	67.297	1.143	.288
ALP	2.894	1	2.894	.049	.825
Amilaza	.828	1	.828	.014	.906
M. kiselina	9.984	1	9.984	.170	.681
Proteini	9.250	1	9.250	.157	.693
Urea	.835	1	.835	.014	.905
LDH	333.935	1	333.935	5.671	.019
Grupa	280.272	2	140.136	2.380	.098
Greška	5417.271	92	58.883		
Ukupno	21124.223	113			
Korigovano ukupno	7527.265	112			

$R^2 = .280$ (Adjusted $R^2 = .124$)

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT– γ -glutamilttransferaza, ClCr–klirens kreatinina, ALP–alkalna fosfataza, LDH–laktat dehidrogenaza

s.s. – stepeni slobode, p-značajnost

Testom efekata između ispitanika (tabela 2.3.1.) na klirens metotreksata utvrđen je statistički značajan uticaj: nivo kreatinina, $F(1;92) = 8,256$, $p = 0,005$ i nivo laktat dehidrogenaze - LDH, $F(1; 92) = 5,671$, $p = 0,019$.

Nije postojala statistički značajna razlika među grupama u klirensu metotreksata.

Procenom parametara (tabela 2.3.2.) pokazan je efekat kreatinina ($b = 0,329$, $p = 0,005$) i laktat dehidrogenaze ($b = -0,916$, $p = 0,019$) na klirens metotreksata. Prema nalazima, sa višim vrednostima nivoa kreatinina očekuje se veći klirens metotreksata. Slučaj je obrnut sa laktat dehidrogenazom: sa višim nivoima LDH očekuje se manji klirens metotreksata.

Tabela 2.3.2. Procena parametara

Parametar	b	Standardna greška	t	p
Konstanta	9.699	18.088	.536	.593
Leukociti	-.054	.422	-.128	.899
Eritrociti	9.418	4.883	1.929	.057
Hemoglobin	-.405	.247	-1.641	.104
Hematokrit	.236	.845	.279	.781
Trombociti	.005	.006	.934	.353
AST	-1.490	3.994	-.373	.710
ALT	1.100	1.480	.743	.459
GGT	-2.035	2.363	-.861	.391
Kreatinin	.329	.114	2.873	.005
ClCr	.026	.019	1.361	.177
Albumini	-.225	.324	-.693	.490
Bilirubin	.127	.119	1.069	.288
ALP	-.129	.583	-.222	.825
Amilaza	-.207	1.747	-.119	.906
M. kiselina	.007	.018	.412	.681
Proteini	-.066	.166	-.396	.693
Urea	.084	.705	.119	.905
LDH	-.916	.385	-2.381	.019
Grupa 1	6.644	3.379	1.966	.052
Grupa 2	6.167	2.940	2.098	.039

Osnovna grupa je Grupa 3.

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT– γ -glutamilttransferaza, ClCr–klirens kreatinina, ALP–alkalna fosfataza, LDH–laktat dehidrogenaza, p–značajnost

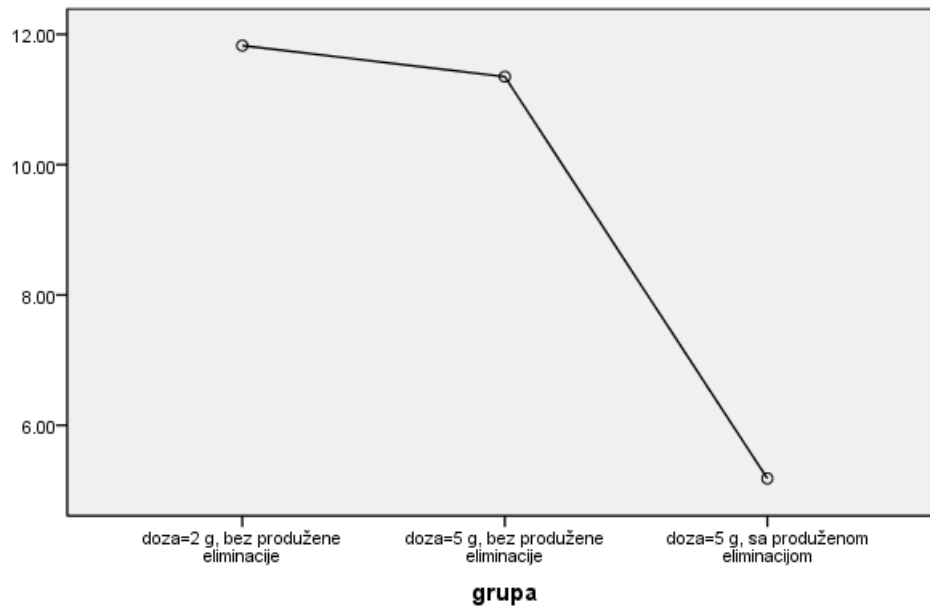
Takođe je pokazana značajna razlika među grupama u klirensu metotreksata, između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata), b = 6,644, p = 0,052, i Grupe 2 (doza 5 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata), b = 6,167, p = 0,032.

Komparacijom među grupama (tabela 2.3.3.) pokazane su statistički značajne razlike u klirensu metotreksata između grupa u odnosu na laboratorijske parametre: Grupe 1 (2 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata), p = 0,052, i Grupe 2 (5 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata), p = 0,039.

Tabela 2.3.3. Komparacija klirensa metotreksata između grupa

(I) grupa	(J) grupa	Razlika aritmetičkih sredina (I-J)	Standardna greška	p
Grupa 1	Grupa 2	.476	2.284	.835
Grupa 1	Grupa 3	6.644	3.379	.052
Grupa 2	Grupa 3	6.167	2.940	.039

Na grafikonu 2.3.1. prikazane su razlike u klirensima metotreksata između tri posmatrane grupe kada su one ujednačene u odnosu na laboratorijske parametre. Prikazane razlike pokazale su statističku značajnost između grupa bez produžene eliminacije (doza 2 i 5 g/m²) i grupe sa produženom eliminacijom metotreksata (doza 5 g/m²), gde je klirens bio značajnije manjih vrednosti što je u skladu sa očekivanim.



Grafikon 2.3.1. Razlike u klirensu metotreksata (l/h) između grupa ujednačenih u odnosu na laboratorijske parametre

(Kovarijati su procenjivani na srednjim vrednostima: leukociti = 4,1129, eritrociti = 3,5352, hemoglobin = 107,1327, hematokrit = 31,5788, trombociti = 264,5182, AST = 0,5569, ALT = 0,8534, GGT = 0,4581, Cr = 31,3854, ClCr = 207,2044, albumin = 43,5378, bilirubin = 9,1232, ALP = 4,3592, amilaza = 1,0416, mokraćna kiselina = 215,5962, proteini = 67,5158, urea = 3,5724, LDH = 6,4854.)

1. STUDIJA IV

FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI METOTREKSATA

Uticaj primenjene doze metotreksata na farmakokinetičke parametre metotrksata i korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika

1. Demografske karakteristike ispitanika i koncentracije metotreksata

Radi veće preciznosti prilikom izračunavanja farmakokinetičkih parametara u ovu studiju su uključeni samo ciklusi kod kojih su postojale izmerene najmanje četiri koncentracije metotreksata u serumu, što je obuhvatilo ukupno trideset i jedan ciklus metotreksata (15 pacijenata).

Tabela 1.1. predstavlja prikaz demografskih karakteristika, a tabela 1.2. prikaz koncentracija metotreksata u 24, 36. i 42. satu cele grupe ispitanika posmatranih u ovoj studiji.

Tabela 1.1. Demografske karakteristike grupe sa najmanje četiri izmerene koncentracije metotreksata

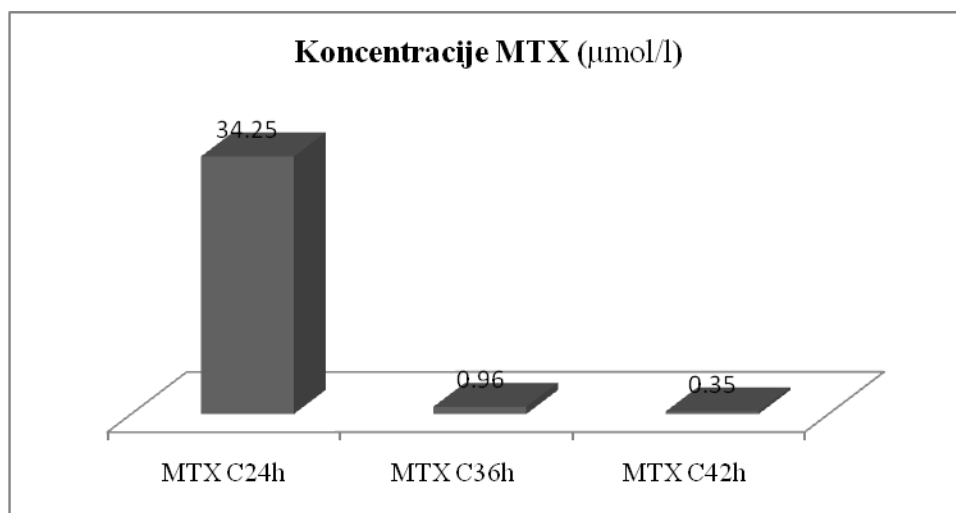
	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	N
Telesna masa (kg)	20.94	9.6	18.5	9.5	11.5	57	31
Telesna visina (cm)	108	18	105	11	80	159	31
Telesna površina (m ²)	0.78	0.22	0.75	0.1	0.55	1.6	31
Uzrast (godine)	5.25	2.16	4.5	2.16	2.83	12.17	31

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N–broj ciklusa MTX

Tabela 1.2. Koncentracije metotreksata ciklusa sa najmanje četiri izmerene vrednosti

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	CV inter. %	N
MTX C _{24h} (μmol/l)	42.99	25.2	34.25	48.94	11.09	89.32	58.61	31
MTX C _{36h} (μmol/l)	1.38	1.6	0.96	0.94	0.27	8.19	116.09	31
MTX C _{42h} (μmol/l)	0.7	1.07	0.35	0.36	0.09	5.03	153.06	31

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CV inter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX



Grafikon 1.1. Medijane koncentracije metotreksata za celu grupu ispitanika u 24, 36. i 42. satu

U ovoj studiji su takođe su formirane grupe u odnosu odnosu na primenjenu dozu metotreksata (2 i 5 g/m²) i prisustvo ili odsustvo produžene eliminacije metotreksata (III Materijal i metodologija, 2. Dizajn istraživanja, IV studija – farmakokinetički parametri metotreksata):

1. doza metotreksata od 2 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata (13 ciklusa metotreksata),
2. doza metotreksata od 5 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata (9 ciklusa)
3. doza metotreksata od 5 g/m², sa produženom eliminacijom metotreksata (9 ciklusa).

Demografske karakteristike, koncentracije metotreksata i interindividualne varijabilnosti u koncentracijama metotreksata po grupama prikazani su tabelarno (tabela 1.3. – 1.8.).

Grupa 1. Doza metotreksata 2 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata

Tabela 1.3. Demografske karakteristike

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	N
Telesna masa (kg)	18.46	4.7	18.5	3	11.5	26	13
Telesna visina (cm)	108.38	12	105	10	87	125	13
Telesna površina (m ²)	0.75	0.13	0.75	0.05	0.55	0.95	13
Uzrast	5.35	1.87	4.58	1.83	2.83	8.17	13

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N–broj ciklusa MTX

Tabela 1.4. Koncentracije metotreksata

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	CV inter. %	N
MTX C _{24h} (μmol/l)	20.3	5.23	19.41	4.74	11.09	30.46	25.74	13
MTX C _{36h} (μmol/l)	0.55	0.23	0.46	0.25	0.27	0.97	42.42	13
MTX C _{42h} (μmol/l)	0.2	0.08	0.2	0.11	0.09	0.37	42.92	13

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CVinter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX

Grupa 2. Doza metotreksata 5 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata

Tabela 1.5. Demografske karakteristike

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	N
Telesna masa (kg)	21.52	7.7	18.5	5.5	14	40	9
Telesna visina (cm)	109.22	15	108	3	80	136	9
Telesna površina (m ²)	0.79	0.18	0.75	0.1	0.55	1.2	9
Uzrast	5.03	1.72	4.83	0.92	3.17	8.5	9

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N–broj ciklusa MTX

Tabela 1.6. Koncentracije metotreksata

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	CVinter. %	N
MTX C _{24h} (μmol/l)	53.54	18.59	60.94	31.54	28.29	78.05	34.72	9
MTX C _{36h} (μmol/l)	1.08	0.29	0.99	0.31	0.74	1.67	27.28	9
MTX C _{42h} (μmol/l)	0.4	0.09	0.42	0.13	0.28	0.56	23.72	9

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CVinter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX

Grupa 3. Doza metotreksata 5 g/m², produžena eliminacija metotreksata

Tabela 1.7. Demografske karakteristike

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	N
Telesna masa (kg)	23.94	15.2	18	11.5	12	57	9
Telesna visina (cm)	106.22	27	105	28	80	159	9
Telesna površina (m ²)	0.83	0.35	0.7	0.25	0.55	1.6	9
Uzrast	5.33	3.05	4	0.83	3.08	12.17	9

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N–broj ciklusa MTX

Tabela 1.8. Koncentracije metotreksata

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	CVinter. %	N
MTX C _{24h} (μmol/l)	65.22	21.84	70.95	28.89	25.82	89.32	33.49	9
MTX C _{36h} (μmol/l)	2.87	2.39	2.06	1.39	0.69	8.19	83.39	9
MTX C _{42h} (μmol/l)	1.72	1.61	0.93	1.31	0.35	5.03	93.39	9

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CVinter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX

2. Farmakometrikinetički parametri

U ovoj studiji ponovljeno je izračunavanje klirensa metotreksata, koji je za celokupnu grupu pacijenata iznosio 6,8 l/h (medijana, tabela 2.1.) sa interindividualnom razlikom 42,13%. Nalaz je u saglasnosti sa prethodnom studijom (III Klirens metotreksata) gde je medijana klirensa metotreksata za celu grupu ispitanika bila je 8,32 l/h (za grupu 2 g/m² bez produžene eliminacije 8,13 l/h, za grupu 5 g/m² bez produžene eliminacije 8,7 l/h, za grupu 5 g/m² sa produženom eliminacijom 6,8 l/h).

Tabela 2.1. Klirens metotreksata za celu grupu ispitanika

	m	SD	medijana	IQR	minimum	maximum	CVinter. %	N
Klirens MTX	7.28	3.07	6.80	2.72	2.82	14.83	42.13	31

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CVinter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX

Tabela 2.2. Klirens metotreksata u okviru tri posmatrane grupe

	m	SD	medijana	IQR	min	max	CVinter. %	N
Grupa 1 2 g/m ² , bez prod.eliminacije	7.37	1.64	7.03	1.26	5.43	11.56	22.27	13
Grupa 2 5 g/m ² , bez prod.eliminacije	7.82	4.17	5.26	4.03	4.40	14.83	53.34	9
Grupa 3 5 g/m ² , sa prod.eliminacijom	6.60	3.60	5.16	3.36	2.82	12.41	54.54	9

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CVinter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX

Koristeći jednokompartmanski farmakokinetički model, određeno je poluvreme eliminacije leka ($t_{0,5}$), konstanta eliminacije (k_{10}) i volumen distribucije (V_d), prema Rešenju matematičkog modela za jednokompartmanski farmakokinetički model (IV Metodologija, 2. Dizajn istraživanja, IV studija – farmakokinetički parametri metotreksata).

Aritmetičke sredine nabrojanih farmakokinetičkih parametara:

$$t_{0,5} = 4,40 \text{ h}$$

$$k_{10} = 0,19$$

$$V_d = 43,30 \text{ l}$$

Koristeći dvokompartmanski farmakokinetički model, određena su poluvremena eliminacije metotreksata ($t_{0,5 \ 1}$ i $t_{0,5 \ 2}$), parametri eksponencijalnih članova rešenja matematičkog modela (X , Y , λ_1 i λ_2), konstante transfera (k_{10} , k_{12} i k_{21}) i volumen centralnog kompartmana (V_1), prema Rešenju matematičkog modela za dvokompartmanski farmakokinetički model (IV Metodologija, 2. Dizajn istraživanja, IV studija – farmakokinetički parametri metotreksata).

Aritmetičke sredine nabrojanih farmakokinetičkih parametara su:

$$t_{0,5\ 1} = 2,41 \text{ h}$$

$$t_{0,5\ 2} = 7,98 \text{ h}$$

$$X = 39,07$$

$$Y = 3,49$$

$$\lambda_1 = 0,2944$$

$$\lambda_2 = 0,0988$$

Srednja standardna greška – MSE (mean standard error) za jednokompartmanski model iznosi 28,845182, dok je za dvokompartmanski model MSE 0,001303, što pokazuje da dvokompartmanski model bolje odgovara farmakokinetici metotreksata, odnosno eksperimentalni podaci bolje odgovaraju dvokompartmanskome modelu.

U daljoj analizi posmatrani su farmakokinetički parametri dobijeni koristeći dvokompartmanski model: volumen centralnog kompartmana (V_1) i konstante eliminacije (k_{12} , k_{21} , k_{10}).

Tabela 2.3. k_{12} , k_{21} , k_{10} i V_1 cele grupe ispitanika sa interindividualnom i intraindividualnom varijabilnosti u parametrima

	m	SD	medijana	IQR	min	max	CV inter. %	CV (intra. %)	N
k_{10}	0.1931	0.0551	0.206	0.0459	0.0372	0.2567	28.53	28.70	31
k_{12}	0.0246	0.0083	0.0245	0.0115	0.0096	0.0473	33.74	32.64	31
k_{21}	0.1143	0.0336	0.1114	0.0425	0.039	0.203	29.40	26.81	31
V_1	33.23	15.95	28.47	19.63	14.07	68.74	48.00	31.41	31

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CV inter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX

Farmakokinetički parametri (k_{12} , k_{21} , k_{10} i V_1) po grupama prikazani su u tabelama 2.4.-2.6.

Tabela 2.4. Grupa 1 (2 g/m^2 , bez produžene eliminacije metotreksata) - k_{12} , k_{21} , k_{10} i V_1

	m	SD	medijana	IQR	min	max	CV inter. %	N
k_{10}	0.2135	0.0237	0.2088	0.0335	0.1851	0.2567	11.10	13
k_{12}	0.0236	0.0065	0.0248	0.0091	0.0096	0.0313	27.54	13
k_{21}	0.1162	0.0226	0.1134	0.0349	0.0894	0.157	19.45	13
V_1	28.91	7.69	26.20	5.46	19.63	48.03	26.60	13

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CV inter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX

Tabela 2.5. Grupa 2 (5 g/m^2 , bez produžene eliminacije metotreksata) - k_{12} , k_{21} , k_{10} i V_1

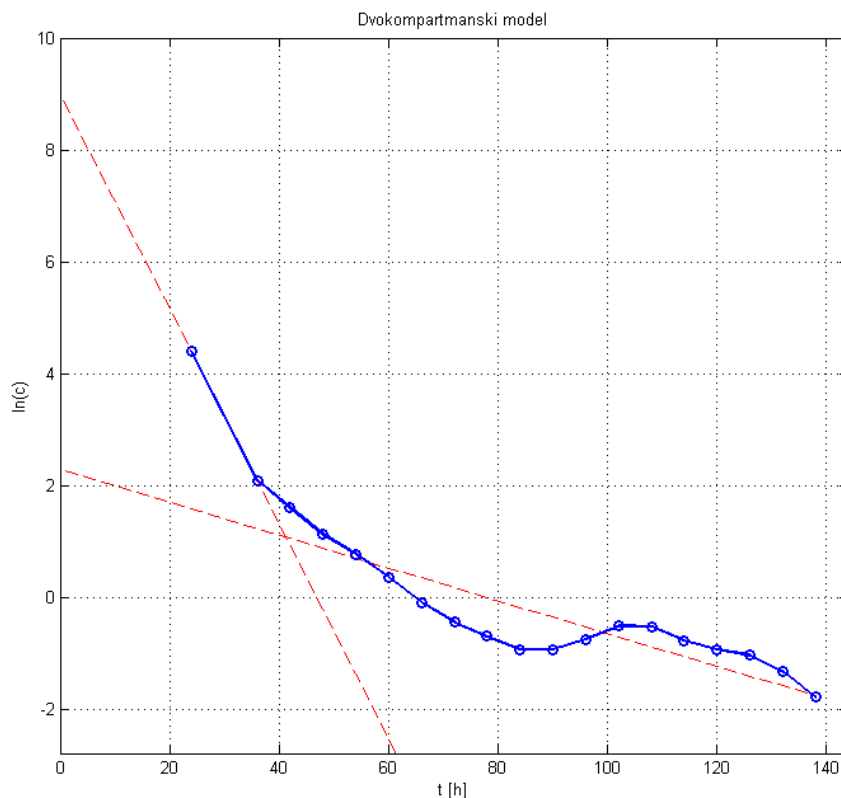
	m	SD	medijana	IQR	min	max	CV inter. %	N
k_{10}	0.2295	0.0166	0.2297	0.0146	0.2027	0.2542	7.23	9
k_{12}	0.0213	0.0041	0.0216	0.0053	0.0147	0.0273	19.25	9
k_{21}	0.1408	0.0331	0.1332	0.0333	0.092	0.203	23.51	9
V_1	29.99	17.16	20.37	18.35	14.75	58.16	57.22	9

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CV inter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX

Tabela 2.6. Grupa 3 (5 g/m^2 , sa produženom eliminacijom metotreksata) - k_{12} , k_{21} , k_{10} i V_1

	m	SD	medijana	IQR	min	max	CV inter. %	N
k_{10}	0.1273	0.0566	0.1503	0.088	0.0372	0.1864	44.46	9
k_{12}	0.0296	0.0116	0.0299	0.0186	0.0148	0.0473	39.19	9
k_{21}	0.0851	0.025	0.0932	0.0318	0.039	0.1198	29.38	9
V_1	42.72	20.67	38.98	28.62	14.07	68.74	48.39	9

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, CV inter.–interindividualna varijabilnost, N–broj ciklusa MTX



Grafikon 2.1. Koncentracije metotreksata tokom vremena u polulogaritamskom koordinatnom sistema (dvokompartmaski model)

3. Razlike između grupa u odnosu na farmakokinetičke parametre: klirens metotreksata, konstante transfera k_{10} , k_{12} i k_{21} i volumen centralnog kompartmana V_1

Za analizu razlika između tri formirane grupe, odnosno uticaja doze metotreksata u odnosu na posmatrane farmakokinetičke parametre korišćena je jednosmerna multivarijatna analiza varijanse (MANOVA), gde su skup kriterijumskih (zavisnih) varijabli činili klirens metotreksata (K MTX), konstante transfera (k_{10} , k_{12} i k_{21}) i volumen centralnog kompartmana (V_1), a nezavisna varijabla (kategorički prediktor) je bila grupa.

Utvrđeno je da postoje značajne razlike između posmatranih grupa u odnosu na konstante k_{10} ($F(2;28) = 22,803$, $p = 0,00$) i k_{21} ($F(2;28) = 9,914$, $p = 0,001$).

Tabela 3.1. Razlike između grupa u odnosu na klirens MTX, k_{10} , k_{12} , k_{21} i V_1

Izvor	Zavisna varijabla	Suma kvadrata	s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Korigovani Model	k_{10}	.056 ^a	2	.028	22.803	.000
	k_{12}	.000 ^b	2	.000	2.710	.084
	k_{21}	.014 ^c	2	.007	9.914	.001
	K MTX	6.881 ^d	2	3.441	.350	.708
	V_1	1148.159 ^e	2	574.080	2.479	.102
Konstanta	k_{10}	1.088	1	1.088	880.049	.000
	k_{12}	.019	1	.019	300.206	.000
	k_{21}	.391	1	.391	551.723	.000
	K MTX	1588.848	1	1588.848	161.548	.000
	V_1	34514.125	1	34514.125	149.064	.000
Grupe	k_{10}	.056	2	.028	22.803	.000
	k_{12}	.000	2	.000	2.710	.084
	k_{21}	.014	2	.007	9.914	.001
	K MTX	6.881	2	3.441	.350	.708
	V_1	1148.159	2	574.080	2.479	.102
Greška	k_{10}	.035	28	.001		
	k_{12}	.002	28	6.163E-5		
	k_{21}	.020	28	.001		
	K MTX	275.384	28	9.835		
	V_1	6483.071	28	231.538		
Ukupno	k_{10}	1.247	31			
	k_{12}	.021	31			
	k_{21}	.439	31			
	K MTX	1925.667	31			
	V_1	41861.729	31			
Korigovano ukupno	k_{10}	.091	30			
	k_{12}	.002	30			
	k_{21}	.034	30			
	K MTX	282.266	30			
	V_1	7631.231	30			

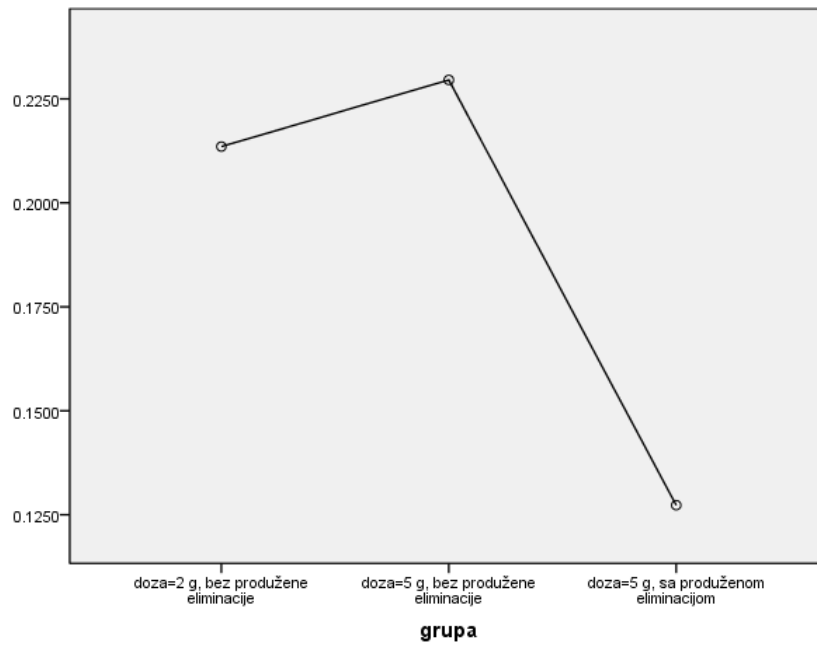
a. $R^2 = .620$ (Korigovan $R^2 = .592$)b. $R^2 = .162$ (Korigovan $R^2 = .102$)c. $R^2 = .415$ (Korigovan $R^2 = .373$)d. $R^2 = .024$ (Korigovan $R^2 = -.045$)e. $R^2 = .150$ (Korigovan $R^2 = .090$)

Post hoc testom - Tukey HSD test, pokazano je da razlike između grupa u odnosu na konstantu k_{10} postoje između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), $p = 0,00$ i između Grupe 2 (5 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), $p = 0,00$.

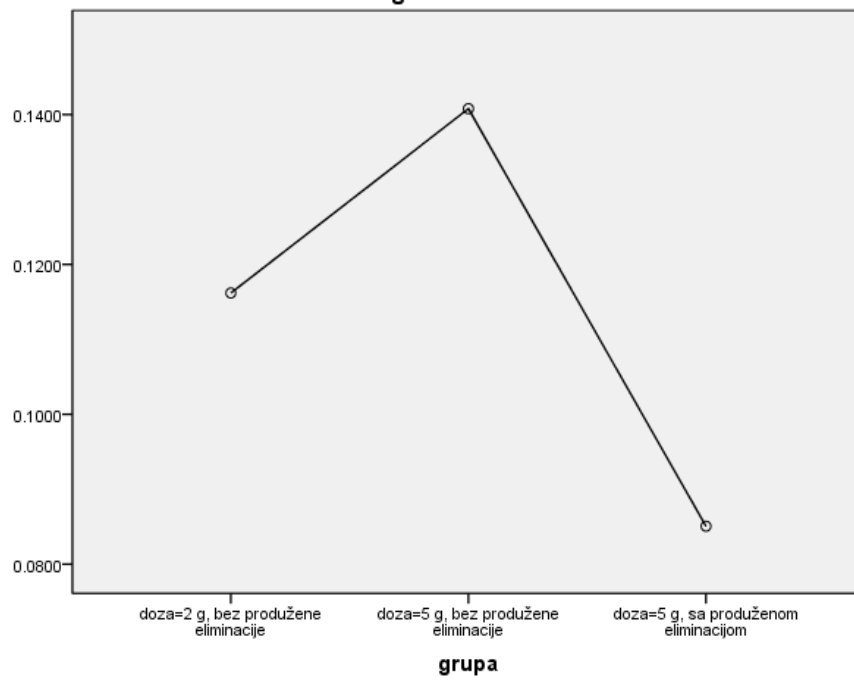
Razlike između grupa u odnosu na konstantu k_{21} postoje između Grupe 1 (2 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), $p = 0,03$ i između Grupe 2 (5 g/m², bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (5 g/m², sa produženom eliminacijom), $p = 0,00$.

Tabela 3.2. Tukey -HSD test

Zavisna varijabla			Razlike aritmetičkih sredina	St. greška	p
k10	Grupa 1	Grupa 2	-0.02	0.02	0.55
		Grupa 3	0.09	0.02	0.00
	Grupa 2	Grupa 3	0.10	0.02	0.00
k12	Grupa 1	Grupa 2	0.00	0.00	0.78
		Grupa 3	-0.01	0.00	0.20
	Grupa 2	Grupa 3	-0.01	0.00	0.08
k21	Grupa 1	Grupa 2	-0.02	0.01	0.10
		Grupa 3	0.03	0.01	0.03
	Grupa 2	Grupa 3	0.06	0.01	0.00
Cl	Grupa 1	Grupa 2	-0.45	1.36	0.94
		Grupa 3	0.77	1.36	0.84
	Grupa 2	Grupa 3	1.22	1.48	0.69
V1	Grupa 1	Grupa 2	-1.08	6.60	0.99
		Grupa 3	-13.81	6.60	0.11
	Grupa 2	Grupa 3	-12.73	7.17	0.20



Slika 3.1. Konstanta k_{10} u okviru tri posmatrane grupe



Slika 3.2. Konstanta k_{21} u okviru tri posmatrane grupe

4. Povezanost demografskih karakteristika i farmakokinetičkih parametra

Za analizu povezanosti farmakokinetičkih parametra i demografskih karakteristika ispitanika korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije ρ koji kao neparametrijski test ima manje zahtevne pretpostavke, s obzirom na mali broj ispitanika i nejednaku distribuciju po grupama.

Tabela 4.1. Povezanosti demografskih karakteristika i farmakokinetičkih parametra cele grupe

		k_{10}	k_{12}	k_{21}	V_1
Telesna masa	ρ	.267	-.320	.133	.424*
	p	.146	.080	.476	.017
	N	31	31	31	31
Telesna visina	ρ	.424*	-.437*	.251	.294
	p	.017	.014	.173	.109
	N	31	31	31	31
Telesna površina	ρ	.270	-.357*	.126	.416*
	p	.141	.049	.500	.020
	N	31	31	31	31
Uzrast	ρ	.346	-.370*	.294	.203
	p	.057	.040	.108	.273
	N	31	31	31	31
Pol	ρ	-.062	-.108	.301	-.031
	p	.742	.563	.100	.869
	N	31	31	31	31

**Korelacija značajna na nivou 0.01. *Korelacija značajna na nivou 0.05. N-broj ciklusa MTX

Unutar cele grupe pokazana je povezanost:

- telesne mase i V_1 ($\rho = 0,424$, $p = 0,017$); sa većom telesnom masom mogu se očekivati veće vrednosti V_1 .
- telesne visine i k_{10} ($\rho = 0,424$, $p = 0,017$) i k_{12} ($\rho = 0,424$, $p = 0,014$); sa većom telesnom visinom mogu se očekivati veće vrednosti k_{10} i k_{12}
- telesne površine i k_{12} ($\rho = -0,357$, $p = 0,049$) i V_1 ($\rho = 0,416$, $p = 0,020$); sa većom telesnom površinom mogu se očekivati veće vrednosti k_{12} i V_1 .
- uzrasta i k_{12} ($\rho = -0,370$, $p = 0,040$); sa starijim uzrastom mogu se očekivati manje vrednosti k_{12} .
- Nijedna od posmatranih konstanti nije bila povezana sa polom.

1. STUDIJA V

KLINIČKI ZNACI TOKSIČNOSTI METOTREKSATA

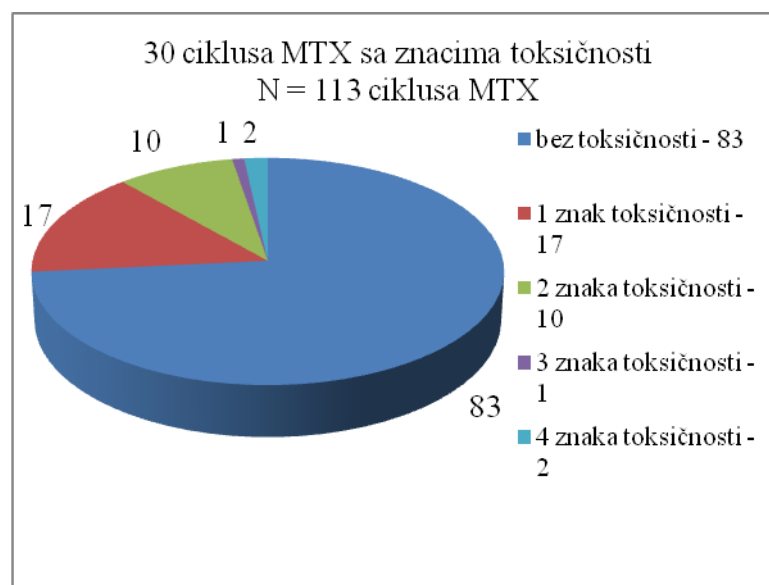
Uticaj primenjene doze metotreksata, serumskih koncentracija metotreksata i korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika

1. Ciklusi metotreksata sa kliničkim znacima toksičnosti

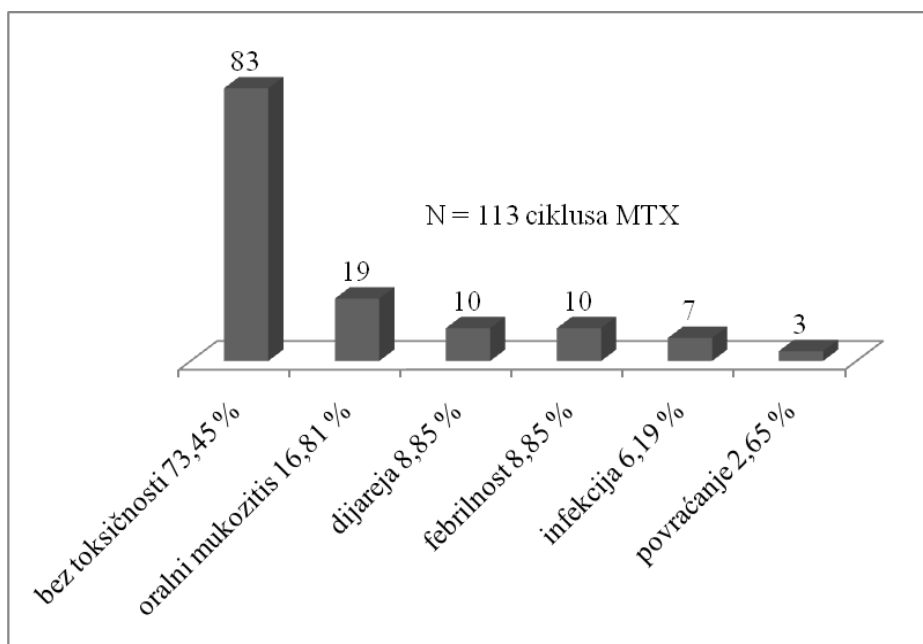
U ovoj studiji analizirano je 113 ciklusa metotreksata (42 pacijenta, 1 do 4 ciklusa po pacijentu) raspoređenih u tri grupe, u zavisnosti od doze i prisustva produžene eliminacije metotreksata (III Materijal i metodologija, 2. Dizajn istraživanja).

Od ukupno 113 analiziranih ciklusa metotreksata u 30 ciklusa (26,55 %) su zabeležena toksična dejstva leka.

Grafički je prikazana struktura ispitanika prema prisustvu i ukupnom broju toksičnosti metotreksata u jednom ciklusu (grafikon 1.1.) i prema broju i procentu ciklusa u kojima su se javile posmatrane toksičnosti: oralni mukozitis, dijareja, povraćanje, febrilnost i infekcija (grafikon 1.2.).



Grafikon 1.1. Broj ciklusa metotreksata sa kliničkim znacima toksičnosti



Grafikon 1.2. Posmatrane toksičnosti metotreksata sa brojem i procentom ciklusa u kojima su se javile

2. Stepeni toksičnosti

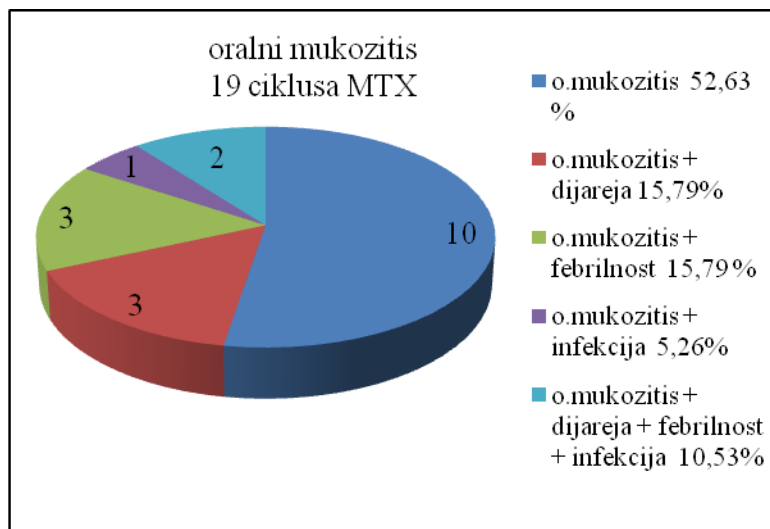
Distibucija kliničkih znakova toksičnosti prema stepenu ispoljavanja prikazan je u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Distibucija kliničkih znakova toksičnosti prema stepenima ispoljavanja za sve ispitanike

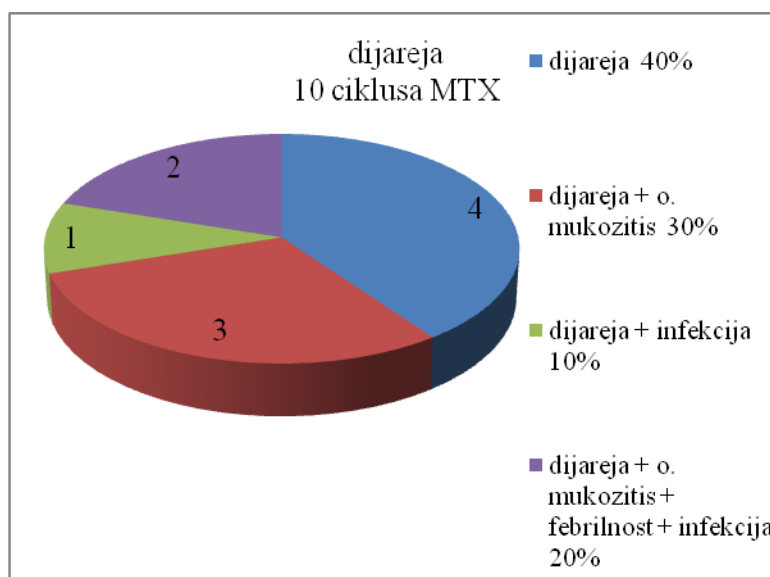
Stepen toksičnosti	Broj ciklusa MTX				
	Mukozitis	Dijareja	Povraćanje	Febrilnost	Infekcija
0	94	103	110	103	106
1	2	5	2	7	1
2	16	5	1	2	2
3	1	0	0	1	4
Ukupno ciklusa	113	113	113	113	113

Oralni mukozitis se javio u 19 ciklusa metotreksata (16,81 % svih ciklusa). U dva ciklusa toksičnost je bila I stepena, kod šesnaest ciklusa toksičnost je bila II stepena, a u jednom ciklusu toksičnost III stepena.

Grafički je prikazan udeo ciklusa u kojima se oralni mukozitis javio samostalno ili u kombinaciji sa drugim kliničkim znacima toksičnosti (grafikon 2.1.).



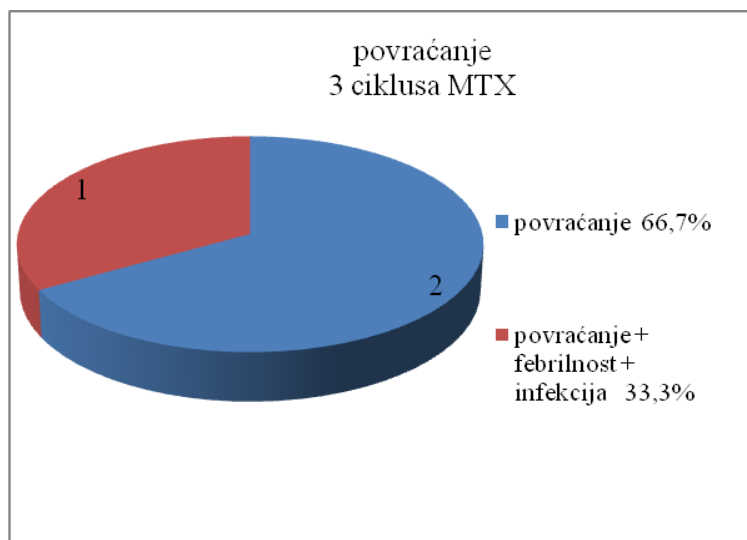
Grafikon 2.1. Broj ciklusa sa toksičnim efektom metotreksata (oralni mukozitis)



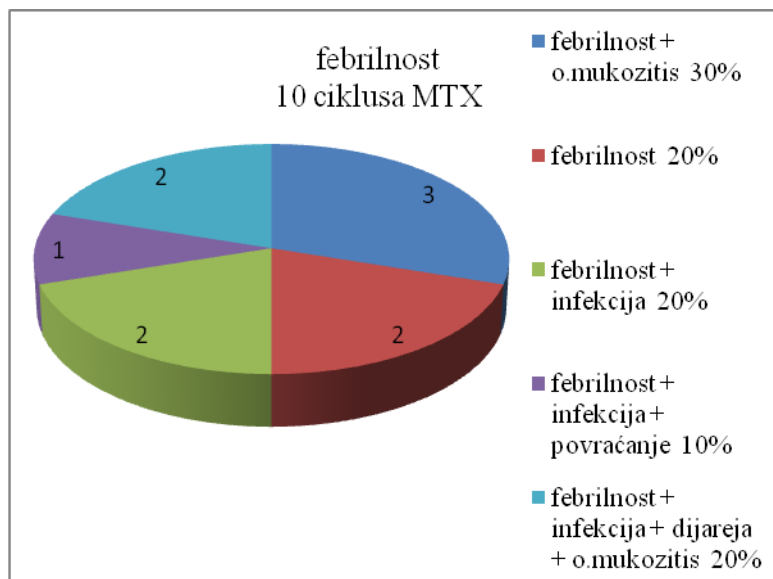
Grafikon 2.2. Broj ciklusa sa toksičnim efektom metotreksata (dijareja)

Dijareja se javila u 10 ciklusa metotreksata (8,85 % svih ciklusa). U pet ciklusa toksičnost je bila I stepena i kod pet ciklusa toksičnost je bila II stepena.

Grafički je prikazan udeo ciklusa u kojima se dijareja javila samostalno ili u kombinaciji sa drugim kliničkim znacima toksičnosti (grafikon 2.2.).



Grafikon 2.3. Broj ciklusa sa toksičnim efektom metotreksata (povraćanje)



Grafikon 2.4. Broj ciklusa sa toksičnim efektom metotreksata (febrilnost)

Povraćanje je zabeleženo u tri ciklusa metotreksata (2,65 % svih ciklusa). U dva ciklusa toksičnost je bila I stepena, kod jednog ciklusa toksičnost je bila II stepena.

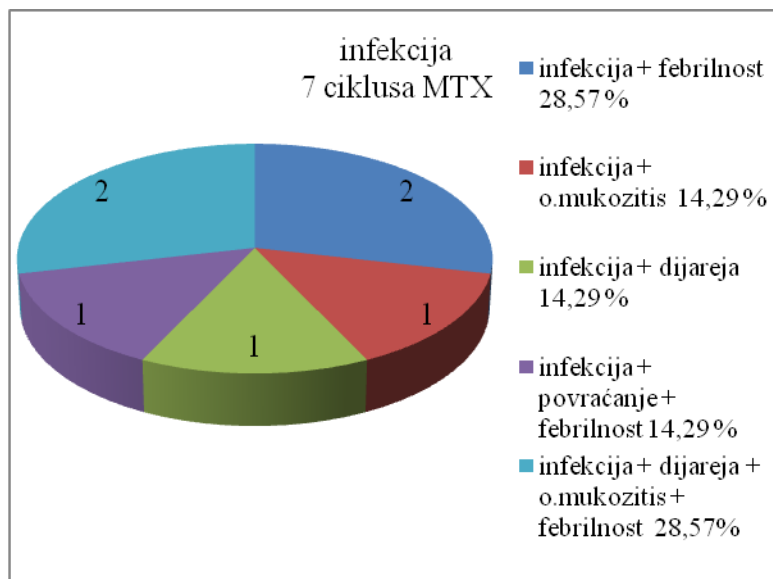
Grafički je prikazan udeo ciklusa u kojima se povraćanje javilo samostalno ili u kombinaciji sa drugim kliničkim znacima toksičnosti (grafikon 2.3.).

Febrilnost je zabeležena u deset ciklusa metotreksata (8,85 % svih ciklusa). U sedam ciklusa toksičnost je bila I stepena, kod dva ciklusa toksičnost je bila II stepena, a u jednom ciklusu toksičnost III stepena.

Grafički je prikazan udeo ciklusa u kojima se febrilnost javila samostalno ili u kombinaciji sa drugim kliničkim znacima toksičnosti (grafikon 2.4.).

Infekcija je zabeležena u sedam ciklusa metotreksata (6,19 % svih ciklusa). U jednom ciklusu toksičnost je bila I stepena, kod dva ciklusa toksičnost je bila II stepena, a u četiri ciklusa toksičnost III stepena.

Grafički je prikazan udeo ciklusa u kojima se infekcija javila samostalno ili u kombinaciji sa drugim kliničkim znacima toksičnosti (grafikon 2.5.).



Grafikon 2.5. Broj ciklusa sa toksičnim efektom metotreksata (infekcija)

Deskriptivnom statistikom prikazana je analiza prosečnog stepena kliničkih sporednih efekata terapije metotreksatom za sve ispitanike a potom u okviru svake grupe ispitanika ponaosob.

Posmatrano za sve analizirane pacijente najteže stepene ispoljavanja pokazao je oralni mukozitis ($0,33 \pm 1,5$, $m \pm 2SD$), a potom gotovo ujednačeno su se javile infekcija, dijareja i febrilnost, dok je najmanji stepen toksičnosti zabeležen kod povraćanja.

Tabela 2.2. Prosečan stepen kliničkih znakova toksičnosti za sve ispitanike

	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Broj ciklusa MTX
Mukozitis	0.33	0.75	113
Dijareja	0.13	0.45	113
Povraćanje	0.04	0.23	113
Febrilnost	0.12	0.45	113
Infekcija	0.15	0.62	113

Tabela 2.3. Prosečan stepen kliničkih znakova toksičnosti u okviru grupa

		Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Broj ciklusa MTX
Grupa 1	Mukozitis	0.15	0.57	52
	Dijareja	0.04	0.19	52
	Povraćanje	0.08	0.33	52
	Febrilnost	0.12	0.51	52
	Infekcija	0.12	0.58	52
Grupa 2	Mukozitis	0.46	0.84	50
	Dijareja	0.14	0.45	50
	Povraćanje	0.00	0.00	50
	Febrilnost	0.14	0.40	50
	Infekcija	0.12	0.52	50
Grupa 3	Mukozitis	0.55	0.93	11
	Dijareja	0.55	0.93	11
	Povraćanje	0.00	0.00	11
	Febrilnost	0.09	0.30	11
	Infekcija	0.45	1.04	11

Najizraženiji klinički toksični efekat lečenja metotreksatom ispoljio je **oralni mukozitis**. Najviše teških stepena oralnog mukozitisa bilo je prisutno u Grupi 3 ($0,55 \pm 1,86$, $m \pm 2SD$), potom u Grupi 2 ($0,46 \pm 1,68$) i najmanje u Grupi 1 ($0,15 \pm 1,14$).

Analizom stepena **dijareje** ispoljene u okviru tri grupe pacijenata pokazano je da je u Grupi 3 bilo najviše teških stepena dijareje ($0,55 \pm 1,86$), potom u Grupi 2 ($0,14 \pm 0,90$) i najmanje prisutni teški klinički slučajevi bili su u Grupi 1 ($0,04 \pm 0,38$).

Kada je reč o **povraćanju** kao toksičnom efektu lečenja metotreksatom, pokazano je da je bilo prisutno samo u Grupi 1 ($0,08 \pm 0,66$).

Analiza stepena **febrilnosti** pokazala je približnu ujednačenost u stepenu ispoljavanja toksičnosti između grupa: Grupa 1 ($0,12 \pm 1,02$), Grupa 2 ($0,14 \pm 0,80$), Grupa 3 ($0,09 \pm 0,60$).

Najviše teških stepena **infekcije** bili su prisutni u Grupi 3 ($0,45 \pm 2,08$), dok su u Grupi 1 ($0,12 \pm 1,16$) i Grupi 2 ($0,12 \pm 1,04$) bili gotovo ujednačeni.

3. Razlika u stepenu ispoljavanja kliničkih znakova toksičnosti metotreksata između grupa

Za analizu razlika između grupa, odnosno uticaja primenjene doze metotreksata, produžene eliminacije metotreksata i interakcije ova dva faktora na ispoljavanje stepena toksičnosti posmatranih efekata, upotrebljena je jednosmerna analiza varijanse (ANOVA), gde je nezavisna varijabla bila grupa, a zavisne varijable klinički znaci toksičnosti (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Razlika između grupa i stepena ispoljavanja toksičnosti

		Suma kvadrata	s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Oralni mukozitis	Između grupa	2.968	2	1.484	2.725	.070
	Unutar grupa	59.917	110	.545		
	Ukupno	62.885	112			
Dijareja	Između grupa	2.338	2	1.169	6.222	.003
	Unutar grupa	20.670	110	.188		
	Ukupno	23.009	112			
Povraćanje	Između grupa	.166	2	.083	1.605	.206
	Unutar grupa	5.692	110	.052		
	Ukupno	5.858	112			
Febrilnost	Između grupa	.029	2	.014	.071	.932
	Unutar grupa	22.237	110	.202		
	Ukupno	22.265	112			
Infekcija	Između grupa	1.128	2	.564	1.501	.227
	Unutar grupa	41.315	110	.376		
	Ukupno	42.442	112			

s.s. - stepen slobode

Pokazana je značajna razlika između grupa u stepenu ispoljavanja dijareje, $F(2;110) = 6,222$, $p = 0,003$.

Pokazana je marginalno značajna razlika između grupa u stepenu ispoljavanja oralnog mukozitisa, $F(2;110) = 2,725$, $p = 0,070$.

Nije pokazana razlika između grupa u stepenu ispoljavanja povraćanja, febrilnosti i infekcije.

Daljom analizom, post hoc testovima - Tukey HSD test (tabela 3.2.), pokazano je da u odnosu na stepen ispoljavanja dijareje postoje razlike između Grupe 1 (doza 2 g/m² bez produžene

eliminacije) i Grupe 3 (doza 5 g/m² sa produženom eliminacijom), p = 0,002, kao i između Grupe 2 (doza 5 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 3 (doza 5 g/m² sa produženom eliminacijom), p = 0,016.

Korišćenjem post hoc testa sa blažim kriterijumima – LSD test (Least Significant Difference) pokazana je i statistički značajna razlika u stepenu ispoljavanja oralnog mukozitisa, između Grupe 1 (doza 2 g/m² bez produžene eliminacije) i Grupe 2 (doza 5 g/m² bez produžene eliminacije), p = 0,039 (tabela 3.3.).

Grafički su pomenute razlike između grupa prikazane na grafikonima 3.1. i 3.2.

Tabela 3.2. Tukey HSD test

Zavisna varijabla	(I) grupa	(J) grupa	Razlika aritmetičkih sredina (I-J)	Standardna greška	p	95% interval poverenja	
						Donja granica	Gornja granica
Oralni mukozitis	Grupa 1	Grupa 2	-.306	.146	.096	-.65	.04
		Grupa 3	-.392	.245	.250	-.97	.19
	Grupa 2	Grupa 3	-.085	.246	.936	-.67	.50
Dijareja	Grupa 1	Grupa 2	-.102	.086	.466	-.31	.10
		Grupa 3	-.507*	.144	.002	-.85	-.17
	Grupa 2	Grupa 3	-.405*	.144	.016	-.75	-.06
Povraćanje	Grupa 1	Grupa 2	.077	.045	.207	-.03	.18
		Grupa 3	.077	.075	.567	-.10	.26
	Grupa 2	Grupa 3	.000	.076	1.000	-.18	.18
Febrilnost	Grupa 1	Grupa 2	-.025	.089	.959	-.24	.19
		Grupa 3	.024	.149	.985	-.33	.38
	Grupa 2	Grupa 3	.049	.150	.943	-.31	.40
Infekcija	Grupa 1	Grupa 2	-.005	.121	.999	-.29	.28
		Grupa 3	-.339	.203	.222	-.82	.14
	Grupa 2	Grupa 3	-.335	.204	.234	-.82	.15

Napomena:

* Post hoc test indikuje da je značajnost razlika između grupa na nivou poverenja manjem od 0,05

** Post hoc test indikuje da je značajnost razlika između grupa na nivou poverenja manjem od 0,01

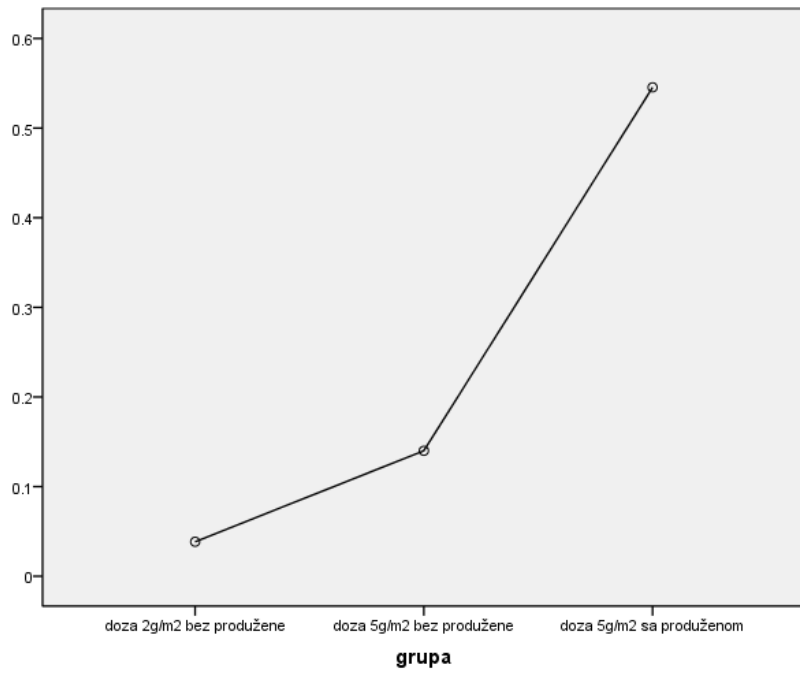
Tabela 3.3. LSD test

Zavisna varijabla	(I) grupa	(J) grupa	Razlika aritmetičkih sredina (I-J)	Standardna greška	p	95% interval poverenja	
						Donja granica	Gornja granica
Oralni mukozitis	Grupa 1	Grupa 2	-.306*	.146	.039	-.60	-.02
		Grupa 3	-.392	.245	.113	-.88	.09
	Grupa 2	Grupa 3	-.085	.246	.729	-.57	.40
Dijareja	Grupa 1	Grupa 2	-.102	.086	.240	-.27	.07
		Grupa 3	-.507*	.144	.001	-.79	-.22
	Grupa 2	Grupa 3	-.405*	.144	.006	-.69	-.12
Povraćanje	Grupa 1	Grupa 2	.077	.045	.091	-.01	.17
		Grupa 3	.077	.075	.310	-.07	.23
	Grupa 2	Grupa 3	.000	.076	1.000	-.15	.15
Febrilnost	Grupa 1	Grupa 2	-.025	.089	.783	-.20	.15
		Grupa 3	.024	.149	.870	-.27	.32
	Grupa 2	Grupa 3	.049	.150	.744	-.25	.35
Infekcija	Grupa 1	Grupa 2	-.005	.121	.970	-.25	.24
		Grupa 3	-.339	.203	.098	-.74	.06
	Grupa 2	Grupa 3	-.335	.204	.104	-.74	.07

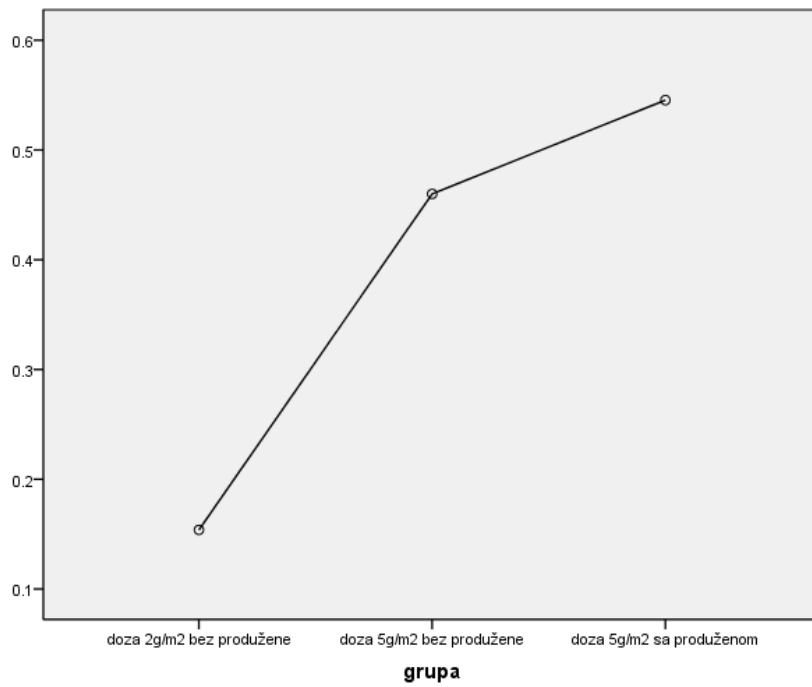
Napomena:

* Post hoc test indikuje da je značajnost razlika između grupa na nivou poverenja manjem od 0,05

** Post hoc test indikuje da je značajnost razlika između grupa na nivou poverenja manjem od 0,01



Grafikon 3.1. Razlike između grupa u odnosu na stepen dijareje



Grafikon 3.2. Razlike između grupa u odnosu na stepen oralnog mukozitisa

4. Razlike u stepenu ispoljavanja kliničkih znakova toksičnosti u odnosu na koncentracije metotreksata

U ovoj analizi korišćen je Metod generalizovane jednačine ocena (Generalized estimating equations, GEE) za svaku od zavisnih varijabli ponaosob.

S obzirom da su zavisne varijable ordinalne (mukozitis, dijareja, povraćanje, febrilnost, infekcija), pretpostavljeno je da imaju multinomijalnu distribuciju, a kao link funkcija pretpostavljena je kumulativna logit funkcija. Kontrolisan je efekat ispitanika, a pretpostavljeno je da je struktura radne matrice promenljiva. Distribucija ispitanika na zavisnim ordinalnim varijablama prikazana je u Tabeli 2.1.

Kvantitativni prediktori (nezavisne varijable) bile su koncentracije metotreksata izmerene u tri vremena (24, 36 i 42 sata nakon započinjanja infuzije leka), a kategorijalni prediktor je bila grupa. Kriterijumske (zavisne) varijable su bile redom: mukozitis, dijareja, povraćanje, febrilnost, infekcija.

Analize nisu bile moguće za varijable povraćanje i infekcija.

Ovaj metod ima značajnu prednost nad jednostavnijim metodama jer je primenljiv kada ima korelisanih podataka tj. kada su neki od podataka dobijeni na istim ispitanicima u nekoliko merenja, kao što je reč u ovom istraživanju.

Tabela 4.1. Testiranje značajnosti modela i ocene parametara

		s.s.	Mukozitis			Dijareja				
			b	SE(b)	χ^2	p	b	SE(b)	χ^2	p
Prag	0	1	2.478	1.2926	3.674	.055	2.851	2.0587	1.917	.166
	1	1	2.630	1.3149	3.999	.046	4.734	1.8879	6.287	.012
	2	1	5.758	1.3699	17.667	.000				
grupa	2				1.675	.433			1.930	.381
Grupa 1	1		-.339	1.2215	.077	.782	-.014	1.3835	.000	.992
Grupa 2	1		.534	.7355	.527	.468	.943	1.3232	.508	.476
C MTX 24	1		.039	.0188	4.380	.036	.004	.0395	.013	.910
C MTX 36	1		-1.518	.7666	3.924	.048	-2.695	1.2941	4.337	.037
C MTX 42	1		1.908	1.1405	2.798	.094	5.475	1.7233	10.092	.001
		s.s.	Febrilnost							
			b	SE(b)	χ^2	p				
Prag	0	1	2.425	1.6025	2.290	.130				
	1	1	3.416	1.7743	3.705	.054				
	2	1	4.808	1.7864	7.243	.007				
grupa	2				.103	.950				
Grupa 1	1		-.446	1.4135	.100	.752				
Grupa 2	1		-.111	1.1229	.010	.921				
C MTX 24	1		.013	.0285	.194	.659				
C MTX 36	1		.063	.7412	.007	.932				
C MTX 42	1		-.698	1.2373	.318	.573				

Grupa 3 (doza 5g/m² sa produženom eliminacijom) je bazna vrednost.

b – koeficijent regresije, s.s. – stepen slobode, SE (b) – standardna greška koeficijenta regresije

Testiranje efekta modela je pokazalo da su na stepen oralnog mukozitisa značajan efekat imale koncentracije metotreksata izmerene u 24. (b = 0,039, p = 0,036) i 36. satu (b = - 1,518, p = 0,048).

Takođe je pokazano da su na stepen dijareje značajan efekat imale koncentracije metotreksata izmerene u 36. (b = -2,695, p = 0,037) i 42. satu (b = 5,475, p = 0,001).

5. Povezanost stepena kliničkih znakova toksičnosti metotreksata i demografskih karakteristika (uzrasta, telesna površina i pola)

Za analizu povezanosti kliničkih znakova toksičnosti i demografskih karakteristika ispitanika korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije ρ koji kao neparametrijski test ima manje zahtevne pretpostavke, s obzirom na mali broj ispitanika sa ispoljenim toksičnostima i nejednaku distribuciju po grupama.

Tabela 5.1. Povezanost stepena kliničkih znakova toksičnosti metotreksata sa uzrastom, polom i telesnom površinom izražena Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ

		Oralni mukozitis	Dijareja	Povraćanje	Febrilnost	Infekcija
Uzrast	ρ	.011	-.179	.091	.010	-.246**
	p	.904	.058	.338	.917	.009
	N	113	113	113	113	113
Pol	ρ	.025	.129	-.132	.067	.017
	p	.794	.174	.164	.479	.861
	N	113	113	113	113	113
Telesna površina	ρ	-.071	-.146	.072	-.044	-.237*
	p	.456	.123	.450	.642	.011
	N	113	113	113	113	113

N – broj ciklusa MTX

Napomena

* Korelacija je značajna na nivou značajnosti 0.05.

** Korelacija je značajna na nivou značajnosti 0.01.

Utvrđeno je postojanje granične povezanosti uzrasta sa stepenom dijareje ($\rho = -0,179$, $p = 0,058$) i značajne povezanosti sa stepenom infekcije ($\rho = -0,245$, $p = 0,009$). U mlađem uzrastu bili su teži stepeni dijareje i infekcije.

Postojala je značajna povezanost stepena infekcije i telesne površine ($\rho = -0,237$, $p = 0,011$). Sa manjom telesnom površinom javljali su se teži stepeni infekcije.

Nije pokazana povezanost nijednog kliničkog znaka toksičnosti metotreksata sa polom.

2. STUDIJA VI

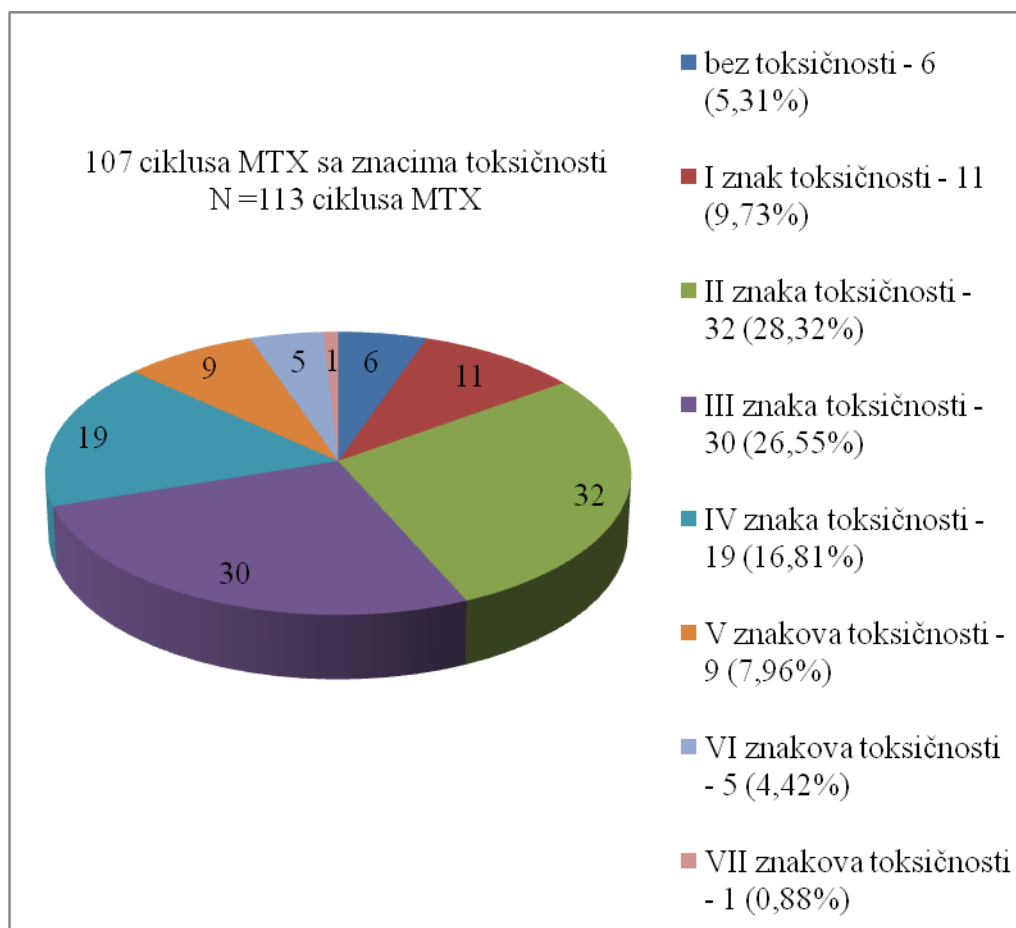
LABORATORIJSKI ZNACI TOKSIČNOSTI METOTREKSATA.

Uticaj primenjene doze metotreksata, serumskih koncentracija metotreksata i korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika

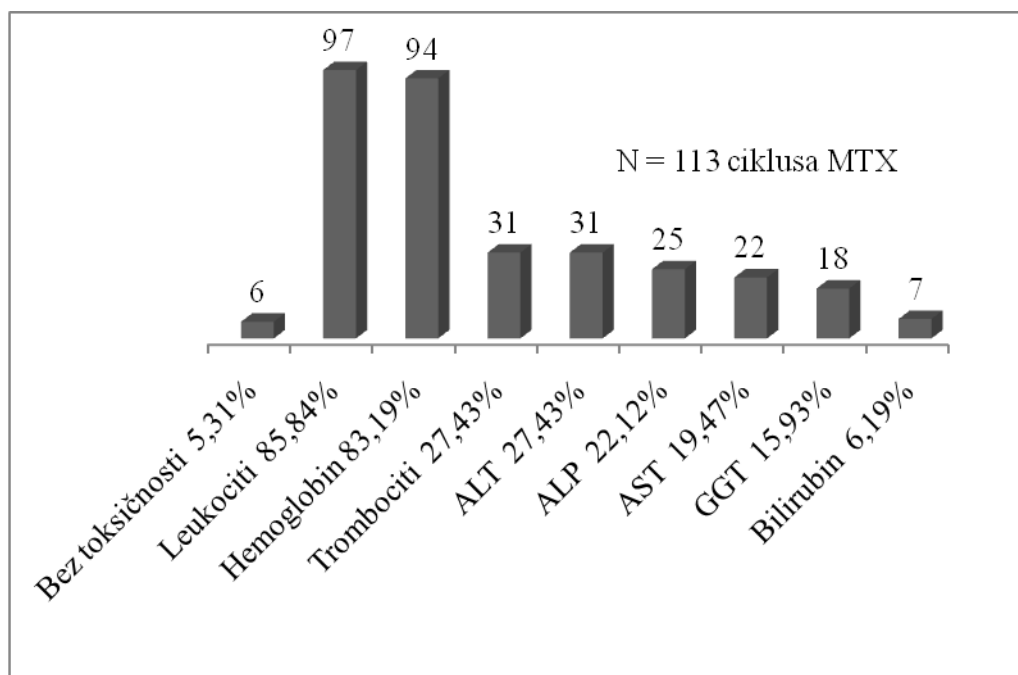
1. Ciklusi metotreksata sa laboratorijskim znacima toksičnosti

U ovoj studiji od ukupno 113 analiziranih ciklusa metotreksata (42 pacijenta) u 107 ciklusa (94,69 %) su zabeležena toksična dejstva leka.

Grafički je prikazana struktura ciklusa prema prisustvu i ukupnom broju toksičnosti metotreksata u jednom ciklusu (grafikon 1.1.) i prema broju i procentu ciklusa u kojima su se javile posmatrane toksičnosti ispoljene u laboratorijskim nalazima: leukocita, hemoglobina, trombocita, bilirubina, aspartat aminotransferaze - AST, alanin aminotransferaze - ALT, γ -glutamilttransferaze – GGT i alkalne fosfataze - ALP (grafikon 1. 2.).



Grafikon 1.1. Broj ciklusa metotreksata sa laboratorijskim znacima toksičnosti



Grafikon 1.2. Posmatrane toksičnosti metotreksata sa brojem i procentom ciklusa u kojima su se javile

Analizirane grupe, u zavisnosti od doze i prisustva produžene eliminacije metotreksata, kako je ranije navedeno (III Materijal i metodologija, 2. Dizajn istraživanja).

2. Stepeni toksičnosti

Tabela 2.1. Distribucija laboratorijski znakova toksičnosti prema stepenima ispoljavanja

	Stepen toksičnosti	Broj ciklusa MTX	Procenat ciklusa
Leukopenija	0	12	11.0
	1	32	29.4
	2	33	30.3
	3	22	20.2
	4	10	9.2
Pad hemoglobina	0	18	16.4
	1	85	77.3
	2	7	6.4
Trombocitopenija	0	73	70.2
	1	19	18.3
	2	3	2.9
	3	6	5.8
	4	3	2.9
Porast AST	0	58	72.5
	1	18	22.5
	2	1	1.3
	3	3	3.8
Porast ALT	0	42	57.5
	1	23	31.5
	2	4	5.5
Porast GGT	3	4	5.5
	0	46	71.9
	1	15	23.4
Porast Bilirubin	2	3	4.7
	0	64	90.1
	1	4	5.6
	2	2	2.8
Porast ALP	3	1	1.4
	0	34	57.6
	1	25	42.4

Deskriptivnom statistikom (tabele 2.2. i 2.3) prikazana je analiza prosečnog stepena laboratorijskih sporednih efekata terapije metotreksatom, za sve pacijente i u okviru svake grupe ispitanika.

Tabela 2.2. Prosečan stepen laboratorijskih znakova toksičnosti za sve pacijente

	m	SD	medijana	IQR	N
Leukopenija	1.87	1.14	2	2	109
Pad hemoglobina	0.9	0.47	1	0	110
Trombocitopenija	0.53	1	0	1	104
Porast AST	0.36	0.7	0	1	80
Porast ALT	0.59	0.83	0	1	73
Porast GGT	0.33	0.56	0	1	64
Porast bilirubina	0.15	0.53	0	0	71
Porast ALP	0.42	0.5	0	1	59

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N–ukupan broj ciklusa MTX, AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT- γ -glutamilttransferaze, ALP–alkalna fosfataza

Tabela 2.3. Prosečan stepen laboratorijskih znakova toksičnosti u okviru grupa

		m	SD	medijana	IQR	N
Leukopenija	Grupa 1	1.7	0.89	2	1	50
	Grupa 2	2.06	1.26	2	2	48
	Grupa 3	1.82	1.54	2	3	11
Pad hemoglobina	Grupa 1	0.76	0.47	1	1	51
	Grupa 2	0.98	0.39	1	0	48
	Grupa 3	1.18	0.6	1	1	11
Trombocitopenija	Grupa 1	0.27	0.67	0	0	49
	Grupa 2	0.84	1.28	0	1	45
	Grupa 3	0.4	0.52	0	1	10
Porast AST	Grupa 1	0.15	0.36	0	0	33
	Grupa 2	0.5	0.8	0	1	38
	Grupa 3	0.56	1.01	0	1	9
Porast ALT	Grupa 1	0.58	0.76	0	1	31
	Grupa 2	0.59	0.86	0	1	34
	Grupa 3	0.63	1.06	0	1	8
Porast GGT	Grupa 1	0.23	0.43	0	0	26
	Grupa 2	0.39	0.62	0	1	31
	Grupa 3	0.43	0.79	0	1	7
Porast bilirubina	Grupa 1	0.19	0.59	0	0	32
	Grupa 2	0.16	0.51	0	0	32
	Grupa 3	0	0	0	0	7
Porast ALP	Grupa 1	0.82	0.39	1	0	28
	Grupa 2	0	0	0	0	25
	Grupa 3	0.33	0.52	0	1	6

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartilna razlika, N–ukupan broj ciklusa, AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT- γ -glutamiltransferaze, ALP–alkalna fosfataza

Kada se nedostajući podaci zamene aritmetičkom sredinom, dobijaju se bliski rezultati, što je omogućilo da svi ispitanici učestvuju u sledećim analizama. Date vrednosti su prikazane u Tabelama 2.4. i 2.5.

Tabela 2.4. Prosečan stepen laboratorijskih znakova toksičnosti za sve pacijente, sa zamenom nedostajućih podataka

	m	SD	medijana	IQR	N
Leukopenija	1.88	1.12	2	2	113
Pad hemoglobina	0.9	0.46	1	0	113
Trombocitopenija	0.49	0.97	0	1	113
Porast AST	0.26	0.61	0	0	113
Porast ALT	0.38	0.72	0	1	113
Porast GGT	0.19	0.45	0	0	113
Porast bilirubina	0.1	0.42	0	0	113
Porast ALP	0.22	0.42	0	0	113

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartalna razlika, N–ukupan broj cikklusa, AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT– γ -glutamiltransferaze, ALP–alkalna fosfataza

Najizraženiji toksični efekat lečenja metotreksatom bila je **leukopenija**, $1,88 \pm 2,24$, $m \pm 2SD$. Najviše teških stepena leukopenije bilo je u Grupi 2 ($2,06 \pm 2,48$), dok su u Grupi 1 ($1,7 \pm 1,74$) i Grupi 3 ($1,83 \pm 3,08$) bili gotovo ujednačeni.

Analizom stepena **anemije - pada hemoglobina** pokazano je da je ovaj toksični efekat lečenja metotreksatom bio na drugom mestu, $0,9 \pm 0,92$, $m \pm 2SD$. U okviru tri grupe pacijenata najviše teških stepena bilo je u Grupi 3 ($1,18 \pm 1,2$), potom u Grupi 2 ($0,98 \pm 0,76$) i manji stepen toksičnosti u Grupi 1 ($0,77 \pm 0,94$).

Analizom stepena **trombocitopenije** (za sve ispitanike, $0,49 \pm 1,94$), najviše teških stepena pokazano je u Grupi 2 ($0,76 \pm 2,48$), a značajno manje u Grupi 3 ($0,36 \pm 1,00$) i Grupi 1 ($0,25 \pm 1,30$).

U Grupi 2 ($0,38 \pm 1,46$) i Grupi 3 ($0,45 \pm 1,86$) bio je približan prosečan stepen toksičnosti kada se posmatra aspartat aminotransferaza – **porast nivoa AST** (za sve ispitanike, $0,26 \pm 1,22$), i znatno manje izrežen u Grupi 1 ($0,1 \pm 0,6$).

Kada je reč o alanin aminotransferazi – **porast nivoa ALT** (za sve ispitanike, $0,38 \pm 1,44$), prosečan stepen toksičnosti bio je najmanji u Grupi 1 ($0,35 \pm 1,3$) potom u Grupi 2 ($0,40 \pm 1,52$) i nešto veći u Grupi 3 ($0,45 \pm 1,86$).

Analizom stepena **porasta γ -glutamiltransferaze – GGT** (za sve ispitanike, $0,19 \pm 0,9$), pokazan je približno isti broj težih stepena toksičnosti u Grupi 2 ($0,24 \pm 1,04$) i Grupi 3 ($0,27 \pm 1,3$) i znatno manji u Grupi 1 ($0,12 \pm 0,64$).

U Grupi 1 ($0,12 \pm 0,64$) i Grupi 2 ($0,1 \pm 0,84$) približno isti je bio prosečan stepen toksičnosti kada se posmatra bilirubin – **porast nivoa ukupnog bilirubina** (za sve ispitanike, $0,1 \pm 0,84$), dok u Grupi 3 nije zabeležen toksični efekat leka.

Prosečan stepen toksičnosti kada se posmatra laboratorijski parametar alkalna fosfataza – **porast ALP** (za sve ispitanike, $0,22 \pm 0,84$), bio je naviši u Grupi 1 ($0,44 \pm 1,0$), znatno manji u Grupi 3 ($0,18 \pm 0,8$) dok u Grupi 2 nije zabeležen toksični efekat leka.

Tabela 2.5. Prosečan stepen laboratorijskih znakova toksičnosti u okviru grupa, sa zamenom nedostajućih podataka

		m	SD	medijana	IQR	N
Leukopenija	Grupa 1	1.71	0.87	2	1	52
	Grupa 2	2.06	1.24	2	2	50
	Grupa 3	1.82	1.54	2	3	11
Pad hemoglobina	Grupa 1	0.77	0.47	1	0	52
	Grupa 2	0.98	0.38	1	0	50
	Grupa 3	1.18	0.6	1	1	11
Trombocitopenija	Grupa 1	0.25	0.65	0	0	52
	Grupa 2	0.76	1.24	0	1	50
	Grupa 3	0.36	0.5	0	1	11
Porast AST	Grupa 1	0.1	0.3	0	0	52
	Grupa 2	0.38	0.73	0	1	50
	Grupa 3	0.45	0.93	0	1	11
Porast ALT	Grupa 1	0.35	0.65	0	1	52
	Grupa 2	0.4	0.76	0	1	50
	Grupa 3	0.45	0.93	0	1	11
Porast GGT	Grupa 1	0.12	0.32	0	0	52
	Grupa 2	0.24	0.52	0	0	50
	Grupa 3	0.27	0.65	0	0	11
Porast bilirubina	Grupa 1	0.12	0.47	0	0	52
	Grupa 2	0.1	0.42	0	0	50
	Grupa 3	0	0	0	0	11
Porast ALP	Grupa 1	0.44	0.5	0	1	52
	Grupa 2	0	0	0	0	50
	Grupa 3	0.18	0.4	0	0	11

m–aritmetička sredina, SD–standardna devijacija, IQR–interkvartalna razlika, N–ukupan broj ciklusa, AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT- γ -glutamiltransferaze, ALP–alkalna fosfataza

3. Razlike u stepenu ispoljavanja laboratorijskih znakova toksičnosti između grupa

Za analizu uticaja doze metotreksata, produžene eliminacije metotreksata i interakcije ova dva faktora na ispoljavanje stepena toksičnosti posmatranih efekata, upotrebljena je jednosmerna analiza varijanse (ANOVA), gde je nezavisna varijabla grupa, a zavisne varijable laboratorijski znaci toksičnosti (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Razlike između grupa u stepenu ispoljavanja toksičnosti

		Suma kvadrata	s.s.	Prosek kvadrata	F	p
Leukopenija	Između grupa	3.136	2	1.568	1.258	.288
	Unutar grupa	137.129	110	1.247		
	Ukupno	140.265	112			
Pad hemoglobina	Između grupa	2.082	2	1.041	5.242	.007
	Unutar grupa	21.847	110	.199		
	Ukupno	23.929	112			
Trombocitopenija	Između grupa	6.815	2	3.407	3.770	.026
	Unutar grupa	99.415	110	.904		
	Ukupno	106.230	112			
Porast AST	Između grupa	2.531	2	1.266	3.567	.032
	Unutar grupa	39.027	110	.355		
	Ukupno	41.558	112			
Porast ALT	Između grupa	.141	2	.070	.132	.876
	Unutar grupa	58.497	110	.532		
	Ukupno	58.637	112			
Porast GGT	Između grupa	.488	2	.244	1.187	.309
	Unutar grupa	22.610	110	.206		
	Ukupno	23.097	112			
Porast bilirubina	Između grupa	.122	2	.061	.337	.714
	Unutar grupa	19.808	110	.180		
	Ukupno	19.929	112			
Porast ALP	Između grupa	5.006	2	2.503	19.035	.000
	Unutar grupa	14.463	110	.131		
	Ukupno	19.469	112			

AST–aspartat aminotransferaza, ALT–alanin aminotransferaza, GGT- γ -glutamilttransferaze, ALP–alkalna fosfataza

Pokazana je značajna razlika između grupa u stepenu pada hemoglobina, $F(2;110) = 5,242$, $p = 0,007$.

Pokazana je značajna razlika između grupa u stepenu trombocitopenije, $F(2;110) = 3,770$, $p = 0,026$.

Pokazana je i značajna razlika između grupa u stepenu porasta AST, $F(2;110) = 3,567$, $p = 0,032$.

Pokazana je i značajna razlika između grupa u stepenu porasta ALP, $F(2;110) = 19,035$, $p = 0,00$.

Nije pokazana razlika između grupa i ostalih posmatranih znakova toksičnosti.

Daljom analizom LSD post hoc testom (tabela 3.2.), pokazano je da postoje razlike u odnosu na stepen pada hemoglobina između Grupe 1 i Grupe 2, $p = 0,019$ i Grupe 1 i Grupe 3, $p = 0,006$.

Pokazana je i razlika između Grupe 1 i Grupe 2 u odnosu na stepen trombocitopenije, $p = 0,008$.

Takođe je utvrđeno da postoje razlike u odnosu na stepen porasta AST, između Grupe 1 i Grupe 2, $p = 0,018$, kao i granična između Grupe 1 i Grupe 3, $p = 0,073$.

U odnosu na stepen porasta ALP, pokazane su razlike između Grupe 1 i Grupe 2, $p = 0,00$ i Grupe 1 i Grupe 3, $p = 0,033$.

Grafički su pomenute razlike između grupa prikazane na grafikonima 3.1. - 3.4.

Tabela 3.2. LSD test

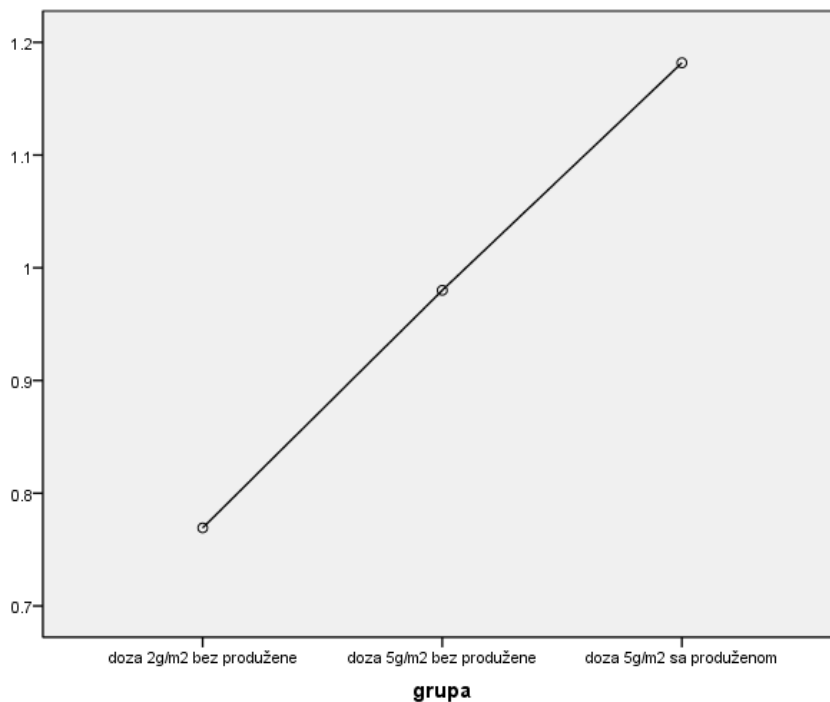
Zavisna varijabla	(I) grupa	(J) grupa	Razlika m (I-J)	SE	p	95% interval poverenja	
						Donja granica	Donja granica
Pad hemoglobina	Grupa 1	Grupa 2	-.211*	.088	.019	-.39	-.04
		Grupa 3	-.413*	.148	.006	-.71	-.12
	Grupa 2	Grupa 3	-.202	.148	.177	-.50	.09
Trombocitopenija	Grupa 1	Grupa 2	-.510*	.188	.008	-.88	-.14
		Grupa 3	-.114	.316	.719	-.74	.51
	Grupa 2	Grupa 3	.396	.317	.213	-.23	1.02
Porast AST	Grupa 1	Grupa 2	-.284*	.118	.018	-.52	-.05
		Grupa 3	-.358	.198	.073	-.75	.03
	Grupa 2	Grupa 3	-.075	.198	.708	-.47	.32
Porast ALP	Grupa 1	Grupa 2	.442*	.072	.000	.30	.58
		Grupa 3	.260*	.120	.033	.02	.50
	Grupa 2	Grupa 3	-.182	.121	.135	-.42	.06

m-aritmetička sredina SE-standardna greška, AST–aspartat aminotransferaza, ALP–alkalna fosfataza, p vrednost < 0,05 je statistički značajna

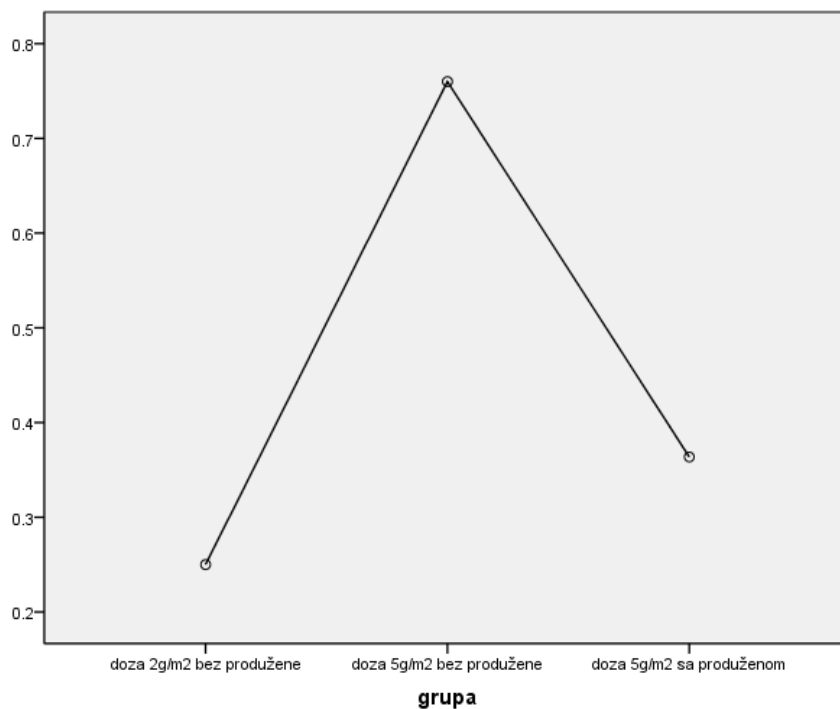
Napomena:

* Razlika je statistički značajna na nivou poverenja manjem od 0.05

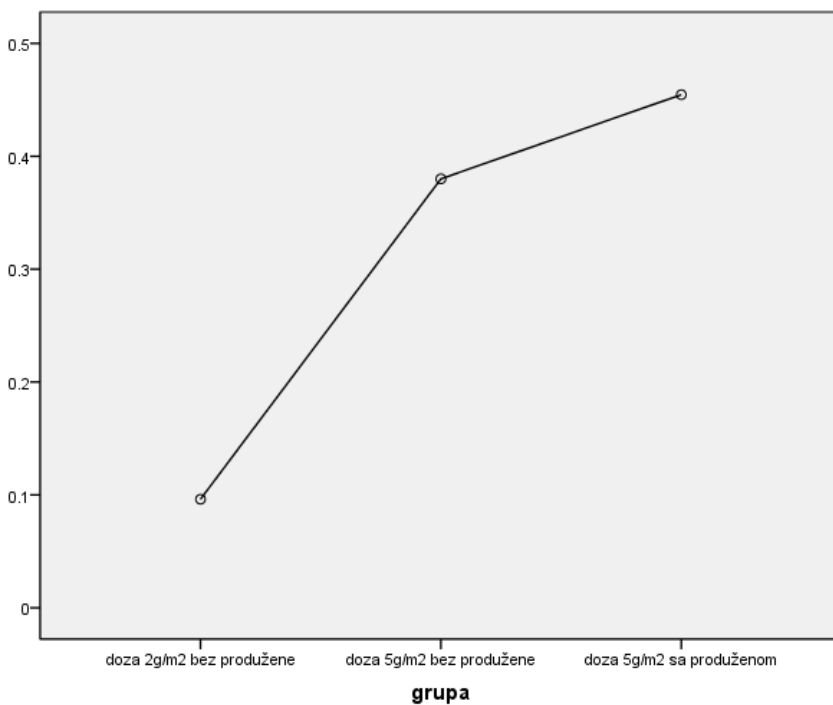
** Razlika je statistički značajna na nivou poverenja manjem od 0.01



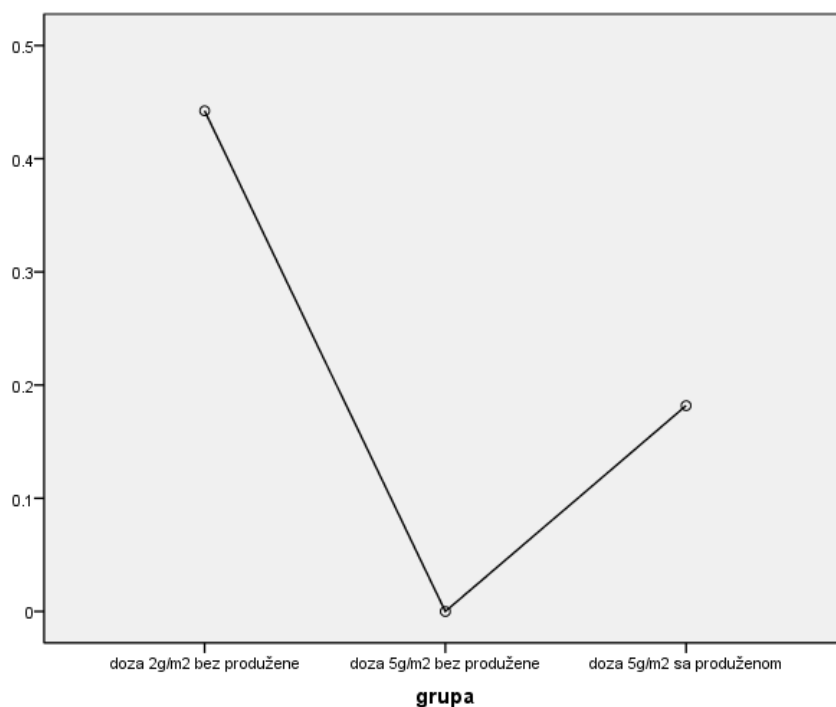
Grafikon 3.1. Razlike između grupa u odnosu na stepen pada hemoglobin



Grafikon 3.2. Razlike između grupa u odnosu na stepen trombocitopenije



Grafikon 3.3. Razlike između grupa u odnosu na stepen porasta AST



Grafikon 3.4. Razlike između grupa u odnosu na stepen porasta ALP

Neparametrijskim testom (KruskalWallis) izvršena je provera urađene ANOVA analize, čime je potvrđena utvrđena razlika među grupama za date toksičnosti terapije metotreksatom: pad hemoglobina $\chi^2(df = 2) = 9.468$, $p = 0.009$, trombocitopenija $\chi^2(df = 2) = 5.678$, $p = 0.058$, porast AST $\chi^2(df = 2) = 6.284$, $p = 0.043$, i ALP $\chi^2(df = 2) = 28.797$, $p = 0.00$.

Tabela 3.3. Kruskal Wallis–ov test:

	χ^2	Stepeni slobode	p
Leukociti	2.204	2	.332
Hemoglobin	9.468	2	.009
Trombociti	5.678	2	.058
AST	6.284	2	.043
ALT	.038	2	.981
GGT	1.572	2	.456
Bilirubin	.906	2	.636
ALP	28.797	2	.000

4. Razlike u stepenu ispoljavanja laboratorijskih znakova toksičnosti u odnosu na koncentracije metotreksata

U ovoj analizi korišćen je Metod generalizovane jednačine ocena (Generalized estimating equations, GEE) za svaku od zavisnih varijabli ponaosob.

S obzirom da su zavisne varijable ordinalne (Leukociti, Hemoglobin, Trombociti, AST, ALT, GGT, Bilirubin, ALP) pretpostavljeno je da imaju multinomijalnu distribuciju, a kao link funkcija pretpostavljena je kumulativna logit funkcija. Kontrolisan je efekat ispitanika, a pretpostavljeno je da je struktura radne matrice promenljiva. Distribucija ispitanika na zavisnim ordinalnim varijablama prikazana je u tabeli 2.1.

Kvantitativni kategorički prediktori (nezavisne varijable) bile su koncentracije metotreksata izmerene u tri vremena (24, 36 i 42 sata nakon započinjanja infuzije leka), a kategorijalni prediktor je bila grupa. Kriterijumske (zavisne) varijable su bile ordinalne: leukociti, hemoglobin, trombociti, AST, ALT, GGT, bilirubin, ALP.

Tabela 4.1. Testiranje značajnosti modela i ocene parametara

Leukocitopenija						Pad hemoglobina			
	df	b	SE(b)	χ^2	p	b	SE(b)	χ^2	p
konstanta	1	1.930	.6259	9.506	.000	.762	.2386	10.197	.001
grupa	2			.382	.793			1.934	.380
Grupa 1	1	-.348	.5628	.435	.537	-.066	.2331	.081	.776
Grupa 2	1	-.333	.5047	9.506	.509	.087	.2083	.173	.677
C MTX 24	1	.002	.0075	.041	.840	.002	.0028	.551	.458
C MTX 36	1	.716	.3362	4.532	.033	-.041	.1184	.120	.729
C MTX 42	1	-1.339	.5577	5.766	.016	.238	.2033	1.367	.242
Trombocitopenija						Porast AST			
		b	SE(b)	χ^2	p	b	SE(b)	χ^2	p
konstanta		.592	.4015	2.172	.141	.010	.4312	.001	.982
grupa	2			2.647	.266			14.030	.001
Grupa 1	1	-.496	.3725	1.774	.183	.056	.3330	.028	.866
Grupa 2	1	.102	.3210	.100	.751	.544	.2205	6.077	.014
C MTX 24	1	.017	.0109	2.439	.118	.023	.0072	10.526	.001
C MTX 36	1	-.676	.4726	2.046	.153	-1.021	.1642	38.624	.000
C MTX 42	1	.406	.4895	.688	.407	1.098	.2271	23.395	.000
scale		.967				.624			
Porast ALT						Porast GGT			
		b	SE(b)	χ^2	p	b	SE(b)	χ^2	p
konstanta		.213	.4028	.280	.596	.567	.4391	1.669	.196
grupa	2			.495	.781			.671	.715
Grupa 1	1	.263	.3738	.494	.482	-.253	.4107	.381	.537
Grupa 2	1	.186	.3604	.267	.606	-.136	.4236	.103	.748
C MTX 24	1	.001	.0065	.019	.890	.000	.0054	.006	.939
C MTX 36	1	.169	.1855	.834	.361	.000	.1526	.000	.998
C MTX 42	1	-.120	.2978	.163	.687	-.123	.2469	.249	.617
Scale		.729				.335			
Porast bilirubina						Porast ALP			
		b	SE(b)	χ^2	p	b	SE(b)	χ^2	p
konstanta		-.280	.3170	.779	.377	.273	.2153	1.606	.205
grupa	2			2.417	.299			108.860	.000
Grupa 1	1	.422	.3343	1.592	.207	.535	.2223	5.795	.016
Grupa 2	1	.305	.1965	2.408	.121	-.281	.1647	2.907	.088
C MTX 24	1	.005	.0055	.703	.402	.001	.0030	.113	.736
C MTX 36	1	-.144	.2239	.414	.520	-.052	.1282	.164	.686
C MTX 42	1	.230	.3281	.492	.483	.085	.2118	.161	.688
Scale		.289				.102			

Grupa 3 (doza 5g/m2 sa produženom eliminacijom) je bazna vrednost.

b –koeficijent regresije, SE – standardna greška

Testiranje efekta modela je ukazalo da su na stepen leukopenije značajan efekat imale koncentracije metotreksata izmerene u 36. satu ($b = 0,716$, $p = 0,033$) i 42. satu ($b = - 1,339$, $p = 0,016$), kao i da su na stepen porasta AST značajan efekat imale koncentracije metotreksata izmerene u 24. ($b = 0,023$, $p = 0,001$), 36. ($b = - 1,021$, $p = 0,00$) i 42. satu ($b = 1,098$, $p = 0,00$).

Pokazana razlika u porastu AST između Grupe 2 i Grupe 3, kao i razlika u porastu ALP između Grupe 1 i Grupe 3. Razlike među grupama u odnosu na druge toksične efekte nisu pokazane.

5. Povezanost stepena laboratorijskih znakova toksičnosti metotreksata i demografskih karakteristika (uzrasta, telesne površine i pola)

Za analizu povezanosti laboratorijskih znakova toksičnosti i demografskih karakteristika ispitanika korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije ρ koji kao neparametrijski test ima manje zahtevne pretpostavke, s obzirom na mali broj ispitanika sa ispoljenim toksičnostima i nejednaku distribuciju po grupama.

Utvrđeno je postojanje povezanosti uzrasta sa stepenom porasta AST ($\rho = 0,188$, $p = 0,046$), kao i povezanosti telesne površine sa porastom nivoa serumskog bilirubina ($\rho = 0,216$, $p = 0,021$).

Nije pokazana povezanost nijednog laboratorijskog znaka toksičnosti metotreksata sa polom.

Tabela 5.1. Povezanost stepena laboratorijskih znakova toksičnosti metotreksata sa uzrastom, telesnom površinom i polom

		Uzrast	Pol	Telesna površina
Leukopenija	ρ	.095	.137	.068
	p	.316	.147	.476
	N	113	113	113
Pad hemoglobina	ρ	-.023	-.144	-.039
	p	.806	.128	.685
	N	113	113	113
Trombocitopenija	ρ	.065	.134	.024
	p	.493	.157	.803
	N	113	113	113
Porast AST	ρ	.188*	.032	.152
	p	.046	.740	.107
	N	113	113	113
Porast ALT	ρ	.005	.047	.059
	p	.957	.618	.536
	N	113	113	113
Porast GGT	ρ	-.123	-.098	-.124
	p	.195	.301	.190
	N	113	113	113
Porast bilirubina	ρ	.111	.088	.216*
	p	.242	.355	.021
	N	113	113	113
Porast ALP	ρ	-.054	.055	-.052
	p	.573	.561	.586
	N	113	113	113

**korelacija na nivou značajnosti 0,01

* korelacija na nivou značajnosti 0,05

N–broj ciklusa MTX

V. DISKUSIJA

Studija I. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika.

U istraživanje je uključeno četrdeset i dva pedijatrijska pacijenta sa medijanom uzrasta 5,75 godina, u rasponu od 0,75 do 17,75 godina (minimalna i maksimalna vrednost). Muški pol je činilo 59,52 % pacijenata (25 dečaka), a ženski pol je obuhvatio 40,48 % pacijenata (17 devojčica). Istraživanjem su obuhvaćena 113 ciklusa metotreksata (1 do 4 ciklusa po pacijentu) sa ukupno 386 izmerenih koncentracija metotreksata.

Posmatrajući ispitanike spram demografskih karakteristika nije utvrđeno postojanje razlike u odnosu na telesnu površinu i uzrast između tri posmatrane grupe (2 g/m² bez produžene eliminacije, 5 g/m² bez produžene eliminacije, 5 g/m² sa produženom eliminacijom). Takođe nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između posmatranih grupa u odnosu na pol.

Analiziranjem laboratorijskih karakteristika ispitanika koji su određivani pre započinjanja svakog ciklusa terapije metotreksatom, pokazano je da postoji statistički značajna razlika u sedam laboratorijskih parametara: broj trombocita, klirens kreatinina, nivo alkalne fosfataze, mokraćne kiseline, ukupnih proteina, uree i laktat dehidrogenaze. Utvrđene razlike među grupama uticale su na interpretiranje određenih nalaza tokom daljeg istraživanja.

Veličina uzorka je u okvirima analiziranog broja u vodećim radovima koji se bave ovom tematikom: Aumente i sarad. (68) 49, Borsi i Moe (24) 58, Fisgin (32) 20, Wall (95) 29 ispitanika pedijatrijske populacije.

Studija II. Koncentracije metotreksata. Uticaj primenjene doze metotreksata, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika.

Oderedene **medijane koncentracija** metotreksta za celokupni uzorak bile su **25,82** $\mu\text{mol/l}$ u 24. satu, **0,68** $\mu\text{mol/l}$ u 36. satu i **0,24** $\mu\text{mol/l}$ u 42. satu merenja.

Medijane koncentracija za grupu sa primenjenom dozom metotreksata od 2 g/m² bez produžene eliminacije bile su **17,75** $\mu\text{mol/l}$ u 24. satu, **0,45** $\mu\text{mol/l}$ u 36. satu i **0,18** $\mu\text{mol/l}$ u 42. satu merenja. Za grupu sa dozom metotreksata od 5 g/m² bez produžene eliminacije bile su u 24. satu **50,32** $\mu\text{mol/l}$, **0,98** $\mu\text{mol/l}$ u 36. satu i **0,28** $\mu\text{mol/l}$ u 42. satu merenja. Za grupu sa dozom metotreksata od 5 g/m² sa produženom eliminacijom medijane koncentracije metotreksta bile su u 24. satu **63,26** $\mu\text{mol/l}$, **2,06** $\mu\text{mol/l}$ u 36. satu i **0,93** $\mu\text{mol/l}$ u 42. satu merenja.

Dobijeni nalazi medijana koncentracija bili su uporedivi sa nalazima u drugim radovima koji su analizirali iste primenjene doze metotreksata. U radu Csordas i sarad. (90) medijana koncentracija za grupu sa dozom metotreksata od 2 g/m² (uključena 88 pedijatrijska pacijenta) u 24. satu bila je 24,77 $\mu\text{mol/l}$ i u 36. satu 0,84 $\mu\text{mol/l}$, dok je za grupu sa dozom metotreksata od 5 g/m² (šezdeset petoro dece) u 24. satu bila 72,26 $\mu\text{mol/l}$ i u 36. satu 1,51 $\mu\text{mol/l}$. Xu i sarad. (33) dobijaju medijanu koncentracije metotreksata pri dozi 3 g/m² bez produžene eliminacije u 24. satu 33,74 $\mu\text{mol/l}$, dok je u grupi sa produženom eliminacijom koncentracija 47,17 $\mu\text{mol/l}$. Za grupu sa dozom od 5 g/m² bez produžene eliminacije u 24. satu 46,3 $\mu\text{mol/l}$, dok je u grupi sa produženom eliminacijom koncentracija 81,17 $\mu\text{mol/l}$. Kod analize šezdeset devetoro dece sa dozom metotreksata od 5 g/m², Martelli i sarad. (89) u 24. satu dobijaju medijanu koncentracije metotreksata 56 $\mu\text{mol/l}$, u 36. satu 1,4 $\mu\text{mol/l}$, u 48. 0,38 $\mu\text{mol/l}$. U radu Aumente i sarad. (68) medijana koncentracije metotreksata pri dozi 3 g/m² u 23. satu bila je 42,27 $\mu\text{mol/l}$ i 0,47 $\mu\text{mol/l}$ u 42. satu u ispitvanoj grupi sa 37 pacijenata, i 36 $\mu\text{mol/l}$ i 0,42 $\mu\text{mol/l}$ u 42. satu u validacionoj grupi sa 12 pacijenata.

Interindividualna varijabilnost (65,57 % u 24 h, 103 % u 36 h, 160,53 % u 42 h) i **intraindividualna varijabilnost** (37,08 % u 24 h, 43,28 % u 36 h, 40,58 % u 42 h) visoke su u svim merenim tačkama u postignutim koncentracijama metotreksata. Najizraženija interindividualna varijabilnost bila je u 42. satu merenja, dok je intraindividualna varijabilnost bila

najizraženija u 36. satu merenja. Minimalna vrednost ravnotežnih koncentracije metotreksata (koncentracije izmerene u 24. satu, po obustavljanju infuzije metotreksata) bila je 5,82 $\mu\text{mol/l}$, a maksimalna 89,32 $\mu\text{mol/l}$.

Vrlo velike interindividualne i intraindividualne razlike dobijaju Csordas i sarad. (90), Wysocki i sar. (98), kao i Borsi i Moe (24), gde su ove varijabilnosti prisutne i u svim doznim rasponima (0,5 g to 33,6 g/m^2 kod dece sa ALL). U radu Martelli i saradnika (89) u 24. satu je postojala velika interindividualna varijabilnost, sa rasponom koncentracija od 10 do 380 $\mu\text{mol/l}$. Piard i saradnici (91) potvrđuju visoku varijabilnost u koncentracijama metotreksata između pacijenata u svim tačkama merenja (24, 48, 72 i 78 h).

U ovom istraživanju **primenjene doze metotreksata** u odnosu na telesnu površinu bile su 2 g/m^2 i 5 g/m^2 . Raspon ukupne primenjene doze kretao se od 800 do 10.000 mg. Multivarijantnim testom analizirana je razlika u koncentracijama metotreksata između formiranih grupa u cilju utvrđivanja uticaja primenjene doze na koncentracije metotreksata. Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentracijama metotreksata između sve tri posmatrane grupe (2 g/m^2 bez produžene eliminacije, 5 g/m^2 bez produžene eliminacije, 5 g/m^2 sa produženom eliminacijom), $p = 0,00$. S obzirom na navedene razlike među grupama može se zaključiti da je primenjena doza uticala na nivo serumske koncentracije metotreksata. Sa povećanjem primenjene doze metotreksata nalaze se veće izmerene serumske koncentracije metotreksata. Najizraženiji uticaj primenjene doze pokazan je u 24. satu merenja, gde je postojala najznačajnija razlika u koncentracijama metotreksata između sve tri grupe: koncentracije su bile najniže u grupi sa dozom metotreksata od 2 g/m^2 bez produžene eliminacije, a najviše u grupi sa dozom metotreksata od 5 g/m^2 sa produženom eliminacijom. U drugom i trećem merenju (36 h i 42 h) razlike između grupa se smanjuju.

Literaturni podaci potvrđuju dobijeni rezultat istraživanja. U radu Csordas i sar. (90) pokazano je da su serumske koncentracije metotreksata značajno više u grupi koja je primala dozu 5 g/m^2 u odnosu na grupu sa dozom od 2 g/m^2 , u 24, 36. i 48. satu merenja. Isti nalaz dobijaju Xu i sarad. (33), gde su koncentracije metotreksata bile veće u grupi pacijenata koji su primali 5 g/m^2 u odnosu na grupu sa primljenom dozom od 3 g/m^2 , kod dužine infuzije 24 h. U svom radu Borsi i Moe (24) praćenjem doza od 0,5 do 33,6 g/m^2 kod dece sa ALL, nalaze da je povećanje srednje vrednosti ravnotežne koncentracije proporcionalno primenjenim dozama, ali je ustanovljeno i da je proporcionalnost izraženija u nižem doznom rangu (0,5 – 4,0 g/m^2), a manje izražena u većim doznim rangovima. Međutim, nije nađena značajna razlika između ravnotežnih koncentracija

postignutih sa dozama od 4 g/m² do 8 g/m² do 12 g/m² ili od 20 do 25 do 33,6 g/m² zbog velikih varijacija u vrednostima. U radu Wysocki i sarad. (98) pokazano je da veće doze (0,5, 1 i 5 g/m² tokom 24-satne infuzije) dovode do značajno većih nivoa ravnotežnih koncentracija metotreksata.

Grupa sa **produženom eliminacijom** metotreksata obuhvatila je 11 ciklusa, što iznosi 9,73 % svih ciklusa (113 ciklusa), odnosno 18,03 % ciklusa u grupi ispitanika koji su primali 5 g/m². Kod ciklusa gde je primenjena doza bila 2 g/m² nije bio nijedan ciklus sa produženom eliminacijom metotreksata.

U rezultatima rada Xu i sarad. (33) procenat ciklusa sa produženom eliminacijom kod primenjenih doza metotreksata 3 i 5 g/m² bio je sličan - 12,1 % ukupnog broja (497 ciklusa), dok je u radu Rask i sarad. (47) nađen veći procenat - 36% ciklusa sa produženom eliminacijom, s obzirom da su analizirane grupe sa primenjenim dozama 5 i 8 g/m².

Proverom interakcije koncentracija metotreksata i ispitivanih **demografskih karakteristika** (uzrast, telesna površina i pol) multivarijantnim testom, nije dobijena statistička značajnost na našem uzorku posmatrano za sve grupe i za svaki mereni nivo koncentracija (u 24, 36 i 42. satu).

U saglasnosti je istraživanje Min i sarad. (93) koji ne nalaze uticaj pola na parametre metotreksata, dok izostanak uticaja uzrasta objašnjavaju malim brojem uključenih pacijenata, što može biti slučaj i u našem istraživanju. U radu Borsi i Moe (24) utvrđeno je da su starija deca imala veću ravnotežnu koncentraciju metotreksata kada je doza bila 8 g/m², dok nije postojala statistički značajna razlika u dozi 1 g/m². Csordaz i sar. (90) nalaze da su se u 48. satu merenja veći nivoi metotreksata javljali češće kod adolescenata (> 14 godina) nego kod dece mlađe od 6 godina u obe grupe (2 i 5 g/m²).

Pri analiziranju interakcije koncentracije metotreksata i ispitivanih **laboratorijskih nalaza** procenjivanih pre započinjanja terapije (ukupan broj leukocita, eritrocita i trombocita, nivo hematokrita, hemoglobina, ukupnih serumskih proteina, albumina, ukupnog bilirubina, alkalne fosfataze, aspartat aminotransferaze, alanin aminotransferaze, γ -glutamilttransferaze, laktat dehidrogenaze, amilaze, mokraćne kiseline, uree, kreatinina, klirens kreatinina) utvrđena je statistički značajna interakcija između koncentracija metotreksata i laktat dehidrogenaze - LDH. Procenom parametara za svaku merenu tačku (24 h, 36 h, 42 h) pokazano da je efekat LDH na koncentracije metotreksata prisutan samo u prvom merenju tj. 24 sata nakon započinjanja infuzije metotreksata, kada se sa višim vrednostima laktat dehidrogenaze mogu očekivati veće koncentracije metotreksata, uprkos inicijalnom nalazu da su vrednosti LDH u grupi sa dozom 2 g/m² bile znatno

više od grupe sa dozom 5 g/m^2 (gde su izmerene koncentracije metotreksata bile više). Rezultat možemo tumačiti činjenicom da metabolit 7-OH-MTX nastao degradacijom MTX u jetri, obuhvata do 10 % ukupnog klirensa MTX (13), te aktivna bilijarna ekskrecija obuhvata 10 do 30 % ukupnog klirensa metotreksata (13,15) i važna je kod pacijenata sa gastrointestinalnom opstrukcijom jer prolongirana reapsorpcija MTX u ovim slučajevima povećeva terminalni poluživot MTX u serumu

Pored ovog nalaza, u 36. satu od započinjanja infuzije pokazan je značajan efekat broja eritrocita na koncentracije metotreksata kada se sa nižim vrednostima eritrocita mogu se očekivati veće koncentracije metotreksata. Ne postoji jasno objašnjenje ovog nalaza, ali bi se mogao delom tumačiti nalazom Holmboe (29) da će akutne toksičnosti usled HDMTX pre razviti pacijenti sa slabim folatnim statusom pre terapije s obzirom da se MTX nadmeće sa folatima za ulazak u ćelije i za metabolizam. Usled deficita folata i sledstvene inhibicije sinteze timidilata i purina, najviše su pogođena tkiva koja se brzo dele: kosna srž, površine prekrivene epitelnim ćelijama i gonade (52).

Ne postoje mnoge studije koje su se bavile istraživanjem uticaja laboratorijskih nalaza na koncentracije metotreksata, iako Min i sarad. (93) u svom istraživanju farmakokinetike metotreksata pri visokim dozama ne nalaze uticaj laboratorijskih parametara (AST, ALT, ukupni protein, albumin, ALP, ukupni bilirubin, LDH) na parametre metotreksata.

Studija III. Klirens metotreksata. Uticaj primenjene doze metotreksata, demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika.

Medijana klirensa metotreksata za celu grupu ispitanika bila je **8,32 l/h**. Za grupu 2 g/m^2 bez produžene eliminacije **8,13 l/h**, za grupu 5 g/m^2 bez produžene eliminacije **8,7 l/h**, za grupu 5 g/m^2 sa produženom eliminacijom **6,8 l/h**. Dobijene vrednosti nalaze se u rasponu vrednosti u objavljenim radovima: Aumente i sarad. (68) 5,29 l/h, Min i sarad. (93) 7,45 l/h, Odoul i sarad. (96) 3,5 l/h, Rousseau i sarad. (92) 7,114 l/h, Piard i sarad. (91) 8,71 l/h, Faltaos i sarad. (30) 7,11 l/h.

Analizom razlika između posmatranih grupa pacijenata nije pokazana statistički značajna razlika u odnosu na klirens metotreksata. Na osnovu ovog rezultata može se zaključiti da doza metotreksata nije uticala na njegov klirens, te u odsustvu povezanosti doze i klirensa metotreksata govori se o linearnoj kinetici leka.

Većina autora saglasna je da je farmakokinetika metotreksata linearna (30,92,93). Međutim, postoje i suprotna mišljenja, odnosno da sistemska eliminacija MTX ne zavisi samo od organske funkcije već i od količine ukupne doze (7), te da dozno zavisna farmakokinetika MTX postoji i zbog saturacije renalne tubularne sekrecije pri višim serumkim koncentracijama MTX, što objašnjava smanjenja renalnog klirensa MTX sa povećanjem doze (15).

Analizom kovarijanse sa ponovljenim merenjima nije pokazana razlika među grupama u odnosu na klirens metotreksata ni statistički značajan **uticaj demografskih karakteristika ispitanika na klirens metotreksata**. Analizom povezanosti između varijabli pomoću Spearman-ovog koeficijenta korelacije koji ima manje zahtevne pretpostavke, ali sa druge strane i manju statističku snagu, dobija se pozitivna korelacija klirensa metotreksata i uzrasta, telesne mase, telesne visine i telesne površine. Nije pokazana povezanost pola i klirensa metotreksata.

Aumente i sarad. (68) nalaze da uzrast i telesna masa imaju uticaj na klirens metotreksata, dok uticaj telesne visine, telesne površine i pola nije pokazan. U našoj studiji je dobijeno da se klirens metotreksata povećava sa uzrastom. Nalaz je u skladu sa nalazom da se povećanjem veličine tela (telesna masa, telesna visina, telesna površina) povećava i klirens. Isti nalaz dobijaju u svom radu Odoul i sarad. (96). Međutim, većina literaturnih podataka su suprotni, a objašnjenje je dato u radu Aumente i sarad. (68): s obzirom da je uzrast tesno povezan sa telesnom masom, uticaj oba kovarijata je suvišan u analizi efekta karakteristika na klirens metotreksata. Ali, ako se napravi granica (cut-off point) u uzrastu 10 godina i tako populacija podeli na dve grupe, dobijaju se značajna poboljšanja u modelu. Ovako, za istu telesnu masu, deca ispod 10 godina imaju ukupni klirens (l/h) oko 30% veći od procenjenog klirensa dece starije od 10 godina. U radu Donelli i sarad. (94) je pokazano da kod dece starije od 10 godina metotreksat dostiže veće koncentracije leka, ali da progresivno opada sa godinama, kao i da bolja tolerancija HDMTX kod dece može imati osnovu u farmakokinetici. Brža eliminacija metotreksata kod odojčadskog uzrasta, koji imaju najlošiju prognozu, sugerise da pune doze mogu biti bezbedno korišćene u cilju maksimiziranja antileukemijskog efekta bez visokog rizika za toksičnost. Wall i sarad. (95) su pokazali je uzrast stariji od šest godina korelisao sa smanjenjem klirensa metotreksata, kao i ženski pol. U svom radu Faltaos i sarad. (30) na adultnoj populaciji pokazali su da klirens metotreksata opada sa godinama, dok Rousseau i sarad. (92) ne nalaze značajnu povezanost klirensa i uzrasta.

U analizi **uticaja kliničkih karakteristika na klirens metotreksata** pokazana je značajna razlika među grupama u klirensu metotreksata kada su one ujednačene u odnosu na laboratorijske parametre (s obzirom da su inicijalno grupe pokazale međusobne razlike u pojedinim varijablama). Klirensi metotreksata bili su statistički značajnije viši u grupama sa dozom 2 i 5 g/m² bez produžene eliminacije u odnosu na grupu sa dozom 5 g/m² sa produženom eliminacijom, što je u skladu sa očekivanim, odnosno definicijom produžene eliminacije leka. Utvrđen je značajan uticaj nivoa kreatinina i nivoa laktat dehidrogenaze – LDH na klirens metotreksata. Sa višim vrednostima nivoa serumskog kreatinina na analiziranom uzorku očekuje se veći klirens metotreksata. S obzirom da je nađeni uticaj suprotan očekivanom, nalaz bi se mogao objasniti razlikama u klirensu kreatinina između grupa u inicijalnim laboratorijskim nalazima gde su pokazane značajno više vrednosti u grupi sa dozom 5 g/m² bez produžene eliminacije (gde je klirens metotreksata viši) u odnosu na grupu sa dozom 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata (gde je klirens metotreksata niži).

Nađeni uticaj nivoa laktat dehidrogenaze na klirens metotreksata gde se sa višim nivoima LDH očekuje manji klirens metotreksata proističe iz pokazanog efekta LDH na koncentracije metotreksata, tj. da se sa višim vrednostima mogu očekivati veće koncentracije.

U svom radu Faltaos i sarad. (30) na adultnoj populaciji pokazali su da klirens metotreksata opada sa serumskim kreatininom. Ukazano je na neophodnost strogog praćenja serumskog kreatinina kao prediktora eliminacije metotreksata. Nije nađen uticaj AST, ALT, GGT, ukupnog bilirubina, ALP, proteinemije na farmakokinetičke parametre. Uticaj kreatinina na klirens metotreksata takođe nalaze Min i sarad. (93) Wall i sarad. (95) su pokazali da nijedan faktor nije predviđao snižen klirens leka bolje od inicijalnog klirensa metotreksata tokom infuzije.

Studija IV. Farmakokinetički parametri metotreksata. Uticaj primenjene doze metotreksata na farmakokinetičke parametre metotreksata i korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika.

U okviru ove studije zbog veće preciznosti prilikom izračunavanja farmakokinetičkih parametara analiziran je 31 ciklus metotreksata (15 pacijenata sa 1 do 4 ciklusa po pacijentu). **Medijana koncentracije** metotreksata za grupu sa dozom 2 g/m² bez produžene eliminacije metotreksata u 24. satu bila je **19,41** µmol/l, u 36. satu **0,46** µmol/l i u 42. satu **0,2** µmol/l. Grupa sa dozom 5 g/m², bez produžene eliminacije metotreksata imala je u 24. satu medijanu koncentracije **60,94** µmol/l, u 36. satu 0,99 µmol/l i u 42. satu **0,42** µmol/l. Grupa sa dozom 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata imala je u 24. satu medijanu koncentracije **70,95** µmol/l, u 36. satu **2,06** µmol/l i u 42. satu **0,93** µmol/l. Dobijeni nalazi takođe odgovaraju literaturnim podacima (već navedeni u okviru diskusije Studije II), bez obzira na znatno manji uzorak.

Interindividualna varijabilnost u postignutim koncentracijama metotreksata: **58,61** % u 24 h, **116,09** % u 36 h, **153,06** % u 42 h je takođe visoka u svim merenim tačkama, i bez bitnih odstupanja u odnosu na vrednosti dobijene na celokupnom uzorku od 113 ciklusa (43 pacijenta). Najizraženija interindividualna varijabilnost bila je u 42. satu merenja (kao i u II studiji), minimalna vrednost koncentracije metotreksata u prvom merenju (24 h) bila je 11,09 µmol/l, a maksimalna 89,32 µmol/l.

Kako je istaknuto u III studiji koja je detaljno analizirala klirens metotreksata, **medijana klirensa** za celu grupu i u ovoj studiji od **6,8** l/h sa interindividualnom varijabilnošću od **42,13** % (grupa sa dozom 2 g/m² bez produžene eliminacije: **7,03** l/h, grupa sa dozom 5 g/m², bez produžene eliminacije: **5,26** l/h, grupa sa dozom 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata: **5,16** l/h) odgovara literaturnim podacima. Takođe, analizom klirensa metotreksata između grupa nije pokazana statistički značajna razlika.

Za izračunavanje ostalih farmakokinetičkih parametara za celu grupu ispitanika u ovoj studiji rezultati dobijeni koristeći jednokompartmanski farmakokinetički model bili su: poluvreme eliminacije leka (**t_{0,5}**) **4,40** h, konstanta eliminacije (**k₁₀**) **0,19** i volumen distribucije (**Vd**) **43,30** l.

Koristeći dvokompartmanski farmakokinetički model, određena su poluvremena eliminacije leka ($t_{0,5\ 1} = 2,41$ h i $t_{0,5\ 2} = 7,98$ h), parametri eksponencijalnih članova rešenja matematičkog modela ($X = 39,07$, $Y = 3,49$, $\lambda_1 = 0,2944$, $\lambda_2 = 0,0988$).

Kako je srednja standardna greška – MSE (mean standard error) za jednokompartmanski model iznosila 28,845182, dok je za dvokompartmanski model bila 0,001303, pokazano je da dvokompartmanski model bolje odgovara farmakokinetici metotreksata, odnosno eksperimentalni podaci bolje odgovaraju dvokompartmanskom modelu, što je u skladu sa većinom prikazanih radova (30, 66, 68, 89, 93, 96).

Dalje izračunati parametri (medijane), koristeći dvokompartmanski farmakokinetički model, bile su konstante transfera ($k_{10} = 0,206$, $k_{12} = 0,0245$ i $k_{21} = 0,1114$) i volumen centralnog kompartmana ($V_1 = 28,47$ l). Najveća **interindividualna varijabilnost** postoji u odnosu na volumen centralnog kompartmana V_1 - 48%. Najveća **intraindividualna varijabilnost** pokazana je kod konstante k_{12} – 32,54 %

Slični nalazi dobijeni su u okviru drugih radova koji obrađuju ovu temu. Fukuhara i sarad. (66) pokazuju da dvokompartmanski model najbolje odgovara farmakokinetici metotreksata, izračunat volumen centralnog kompartmana (V_1) je bio 25,7 l. **Volumen centralnog kompartmana (V_1)** u ostalim radovima iznosio je: Rousseau i sarad. (92) 18,24 l (interindividualna varijabilnost 54%), Piard i sarad. (91) 26,8 l (interindividualna varijabilnost 48%), Min i sarad. (93) 25,9 l (interindividualna varijabilnost 52%), Faltaos i sarad. (30) 25,1 l (interindividualna varijabilnost 22,5%), Fukuhara (66) 25,7 l.

Poluvreme eliminacije metotreksata (brza faza eliminacije: $t_{0,5\ 1} = 2,41$ h i spora faza eliminacije: $t_{0,5\ 2} = 7,98$ h) odgovara literaturnim podacima. Prema Holmboe i sarad. (29) eliminacija metotreksata iz plazme protiče kroz dve faze sa dva poluvremena $t_{0,5a}$ 2,49 h, $t_{0,5b}$ 8,38 h, što odgovara nalazima u našoj studiji. U radu Borsi i Moe (24), za pacijente sa primljenom dozom 2 g/m² dobijaju $t_{0,5}$ 8,5 h, za grupu sa dozom 4 g/m² 7,3 h, međutim parametar se nije razlikovao između mladih i starijih. Piard i sarad. (91) za $t_{0,5}$ dobijaju vrednost 11,9 h.

Medijane za **konstante eliminacije** u našoj studiji su bile za $k_{12} = 0,0245$ (h⁻¹), interindividualna varijabilnost 33,74 %, a za $k_{21} = 0,1114$ (h⁻¹), interindividualna varijabilnost 29,40 %, $k_{10} = 0,206$ (h⁻¹), interindividualna varijabilnost 28,53 %. U radu Odoul i sarad. (96) dobijaju za $k_{12} = 0,0044$ (interindividualna varijabilnost 105%), $k_{21} = 0,039$ (interindividualna varijabilnost 25%). Aumente i sarad. (68) dobijaju za $k_{12} = 0,0155$ (interindividualna varijabilnost 20,76%), $k_{21} =$

0,0724 (interindividualna varijabilnost 35,21%). Rousseau i sarad. (92) $k_{12} = 0,0168$ (interindividualna varijabilnost 68,68 %), $k_{21} = 0,1069$ (interindividualna varijabilnost 61,28%), $k_{10} = 0,41$ (interindividualna varijabilnost 21,62%), Piard i sarad. (91) $k_{12} = 0,0225$ (interindividualna varijabilnost 41%), $k_{21} = 0,0629$ (interindividualna varijabilnost 24%).

U analizi razlika između tri formirane grupe utvrđeno je da postoje značajne razlike između posmatranih grupa u odnosu na konstante k_{10} i k_{21} . Post hoc testovima - Tukey HSD test, pokazano je da razlike između grupa u odnosu na konstantu k_{10} kao i konstantu k_{21} postoje između grupe sa dozom 2 g/m² bez produžene eliminacije i grupe sa dozom 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata, kao i između grupe sa dozom 5 g/m² bez produžene eliminacije i grupe sa dozom 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata. S obzirom da razlika između grupe sa dozom 2 g/m² bez produžene eliminacije i 5 g/m² bez produžene eliminacije nije bila značajna, ne može se tvrditi da je primenjena doza imala značajan uticaj na farmakokinetičke parametre, što je rezultat saglasan sa zaključkom o linearnoj farmakokinetici metotreksata. Međutim, postojanje razlike između grupa bez i sa produženom eliminacijom metotreksata upućuje na to da se kod prisustva produžene eliminacije metotreksata očekuju manje vrednosti konstante k_{10} i konstante k_{21} , što je u skladu sa očekivanjem.

Za analizu **povezanosti demografskih karakteristika** i farmakokinetičkih parametra korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije ρ . Pokazana je povezanost telesne mase i telesne površine sa volumenom centralnog kompartmana V_1 . Sa većom telesnom masom i telesnom površinom mogu se očekivati veće vrednosti V_1 . Prisutna je i korelacija konstante k_{10} i telesne visine, kada se sa većom telesnom visinom mogu se očekivati veće vrednosti k_{10} . Konstanta k_{12} je takođe bila u pozitivnoj korelaciji sa telesnom visinom, telesnom površinom i uzrastom. Nijedna od posmatranih konstanti nije bila povezana sa polom.

U saglasnosti je rad Piard i sarad. (91) koji navode da je telesna masa imala najbolju korelaciju sa V_1 , kao i da nije ustanovljena razlika između dečaka i devojčica u klirensu metotreksata i volumena centralnog kompartmana. Min i sarad. (93) nalaze uticaj telesne mase na V_1 , ali ne i uzrasta na farmakokinetičke parametre metotreksata. Aumente i sarad. (68) nalaze da uzrast i telesna masa imaju uticaj na volumen centralnog kompartmana. Za razliku, Faltaos i sarad. (30) nisu našli nikakav efekat telesne mase i telesne površine na farmakokinetičke parametre. Međutim, rezultat da efekat pola izostaje, potvrđen je i u našoj studiji.

Studija V. Klinički znaci toksičnosti metotreksata. Uticaj primenjene doze metotreksata, serumskih koncentracija metotreksata i korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika.

Najčešće opisivani sporedni efekti terapije metotretksatom su mukozitis, mijelosupresija, akutna toksičnost jetre, nefrotoksičnost i neurotoksičnost. Kada je reč o **toksičnim efektima ispoljenim u kliničkom nalazu**, u ovom istraživanju registrovani su u 30 (26,55 %) od ukupno 113 analiziranih ciklusa metotreksata. Najzastupljeniji od pet praćenih neželjenih kliničkih efekata bio je oralni mukozitis (16,81% ciklusa). Na drugom mestu je bile su dijareja (8,85 % ciklusa) i febrilnost (8,85 % ciklusa), potom infekcija (6,19 % ciklusa), dok je povraćanje bilo na poslednjem mestu (2,65 % ciklusa).

Smrtni ishodi usled toksičnosti retko se dešavaju, ali se ostali sporedni efekti često prijavljuju. Radovi koji se bave ovom temom uglavnom prikazuju pojavu kliničkih znakova toksičnosti umerenog stepena, < 3 stepena (33, 88) ili umerenog i teškog stepena, ≤ 3 stepena (29,41). Na našem uzorku takođe je većina ispoljenih toksičnosti bila umerenog **stepena** (< 3 stepena). Posmatrano za sve analizirane pacijente, najteže stepene ispoljavanja pokazao je oralni mukozitis ($0,33 \pm 1,5$, $m \pm 2SD$), a potom gotovo ujednačeno infekcija ($0,15 \pm 1,24$), dijareja ($0,13 \pm 0,9$) i febrilnost ($0,12 \pm 0,9$), dok je najmanji stepen toksičnosti zabeležen kod povraćanja ($0,04 \pm 0,46$).

Mukozitis oralne regije je glavna toksičnost povezana sa HDMTX terapijom dece sa ALL. Uprkos upotrebi leukovorina i alkalizacije urina, oralni mukozitis je česta i ozbiljna sekvela terapije metotretksatom, kod koje se incidenca procenjuje na 50% dece na terapiji. Za neke pedijatrijske pacijente, težak oralni mukozitis može biti uzrok limitacije doze metotreksata. Analizom **prosečnog stepena javljanja kliničkih znakova toksičnosti** pokazano je da su najteži stepeni oralnog mukozitisa, dijareje i infekcije nalazili u grupi sa dozom 5 g/m^2 i produženom eliminacijom metotreksata. Povraćanje je zabeleženo samo u grupi sa dozom 2 g/m^2 bez produžene eliminacije, a febrilnost gotovo ujednačeno u stepenu ispoljavanja u sve tri grupe. Uticaj **primenjene doze metotreksata na težinu pojave neželjenih efekata** analiziran je razlikom između ispitivanih grupa. Statistički značajna razlika između grupa postojala je u stepenu ispoljavanja dijareje, a marginalna

značajnost pokazana je i u stepenu ispoljavanja oralnog mukozitisa. Post hoc testovima - Tukey HSD test, pokazano je da je razlika kod dijareje postojala između grupa sa dozom metotreksata 2 g/m² bez produžene eliminacije i 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata, kao i između grupa sa dozom 5 g/m² bez produžene eliminacije i 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata. Post hoc testovima sa blažim kriterijumima – testom najmanjih značajnih razlika (Least significant difference) pokazana je i statistički značajna razlika u stepenu ispoljavanja oralnog mukozitisa između grupa sa dozom 2 i 5 g/m² bez produžene eliminacije metotreksata. Na osnovu ovih rezultata zaključuje se da je stepen ispoljavanja oralnog mukozitisa bio veći u grupi sa većom primenjenom dozom metotreksata (5 g/m²) ukazujući na značajnost uticaja primenjene doze na stepen toksičnosti. Stepen dijareje bio je teži u grupi sa većom dozom (5 g/m²) i sa produženom eliminacijom metotreksata. Ovde nalazi upućuju da je u riziku od ispoljavanja težih stepena dijareje važnost imala kako doza metotreksata tako i produžena eliminacija metotreksata, odnosno dužina izlaganja većim koncentracijama metotreksata.

Mukozitis se u velikom procentu javljanja kod terapije metotretksatom pominje kod drugih autora: Fisgin i sarad. (32) analizom 20 pedijatrijskih pacijenata koji su primali dozu 2 g/m² prikazali su da je 20 % imalo mukozitis; Rask i sarad. (47) kao najčešće sporedne kliničke efekte u analizi 44 ciklusa metotreksata (doze 5 i 8 g/m²) navode oralni mukozitis sa javljanjem u čak 52% ciklusa, ali sa većim procentom javljanja kod ciklusa sa prisustvom produžene eliminacije metotreksata. Slične rezultate dobijaju Xu i sarad. (33) gde je pri dozi 3 g/m² teži oralni mukozitis bio u slučaju prisustva produžene eliminacije nego bez produžene eliminacije (u procentima javljanja: 28,95 % ciklusa bez i 44,89 % sa produženom eliminacijom). U grupi sa dozom 5 g/m² nije bilo značajnih razlika za klinički izražene efekte između postojanja ili odsustva produžene eliminacije. Takođe je, za povraćanje i mučninu, pokazana razlika u težini javljanja između grupa sa različitim dozama (3 i 5 g/m²). Nalazi sugerišu da je faktor rizika za pojavu oralnog mukozitisa pored doze bila i produžena eliminacija metotreksata. Kanbayashi i sard. (97) nalaze da su visoke doze i kombinovana hemoterapijaznačajni prediktori za pojavu stomatitisa.

Direktna analiza uticaja serumskih **koncentracija metotreksata na težinu pojave kliničkih štetnih dejstava terapije** metodom generalizovane jednačine ocena, nije pokazala statistički značajnu razliku između grupa, ali je pokazan značajan efekat koncentracija u pojedinim merenjima na stepen oralnog mukozitisa: koncentracije metotreksata u 24. satu (b = 0,039, p = 0,036) i 36. satu (b = - 1,518, p = 0,048). Na stepen dijareje značajan efekat imale su koncentracije metotreksata

izmerene u 36. satu ($b = -2,695$, $p = 0,037$) i 42. satu ($b = 5,475$, $p = 0,001$). Iako je efekat koncentracije metotreksata na težinu pojave ovih toksičnosti izvestan, nedostatak perzistentnosti kroz merenja i u predznaku korelacije može biti objašnjen neujednačenim brojem ispitanika po grupama, kao i manjim brojem pacijenata sa neželjenim efektima terapije nego bez.

Csordas i sarad. (90) zaključuju da su pacijenti sa visokim koncentracijama metotreksata u većem riziku za razvoj toksičnosti zbog čega treba da prime dodatne doze folne kiseline dok koncentracije metotreksata ne padnu ispod dozvoljenih nivoa. Kanbayashi i sarad. (97) u analizi 32 hematološka pacijenta dolaze do zaključka da vrednost serumske koncentracije metotreksata samo u 48. satu nema prediktivnu vrednost za neželjene kliničke efekte HDMTX terapije, ali da su visoke doze metotreksata i kombinovana hemoterapija prediktori za pojavu stomatitisa. Pokazano je da je 24 - časovna kontinuirana infuzija značajni prediktor za neželjene efekte (umor i neutropeniju), potvrđujući navode da za citotoksičnost metotreksata važna i doza i dužina izlaganja leku. U radu Cheng (55) rezultati su pokazali da je veliki deo dece sa oralnim mukozitisom ≥ 2 stepena imao koncentracije metotreksata u plazmi u 42. satu $\geq 1,0 \mu\text{mol/l}$. Međutim interval poverenja od 95% sugeriše da to ne mora biti faktor rizika za oralni mukozitis. Šezdesetčetiri procenata dece sa oralnim mukozitisom ≥ 2 stepena imao je koncentracije metotreksata u plazmi u 66. satu iznad definisane gornje granice, što ukazuje da ovaj nalaz povećava rizik kod dece za razvoj oralnog mukozitisa. Iako je moguće da intenzivnije i duže spasavanje leukovorinom smanji oralni mukozitis kod dece sa produženom eliminacijom u 66. satu, to bi moglo dovesti do “prekomernog spasavanja” (“over rescue”) i smanjiti željeni antitumorski efekat te povećati stopu relapsa.

Vrlo malo je radova koji analiziraju korelacije stepena kliničkih toksičnih efekata i **demografskih karakteristika pacijenata**, kojim bi uporedili dobijene nalaze na našem uzorku. Upotrebom Spearman-ovog koeficijenta korelacije pokazana je povezanost mlađeg uzrasta i težih stepena infekcije i dijareje, kao i povezanost manje telesne površine i težeg stepena infekcije. Pol nije pokazao povezanost ni sa jednim kliničkim neželjenim efektom metotreksata.

Csordas i sarad. (90) nalaze da su se toksični efekti terapije metoteksatom (što je odgovaralo većim nivoima metotreksata u 48. satu merenja) javljali češće kod adolescenata (> 14 godina) nego kod dece mlađe od 6 godina u obe grupe (doza metotreksata 2 i 5 g/m^2). Holmboe i sarad. (29) u poređenju pedijatrijskih i adultnih pacijenata sa osteosarkomom (srednja primenjena doza je bila 12 g/m^2 u vidu četiričasovne infuzije) prikazuju više adultnih pacijenata sa oralnim mukozitisom, ali korelacija mukozitisa i pola, doze metotreksata, farmakokinetičkih parametara, broja ciklusa

metotreksata i renalnetoksičnosti nije nađena. Neslaganje sa ovim navodima koje proističe iz prezentovane studije moguće da leži u manjem uzorku, neujednačenim brojem ispitanika po grupama, te manjim brojem pacijenata sa neželjenim efektima nego bez posmatranih reakcija na terapiju.

Studija VI. Laboratorijski znaci toksičnosti metotreksata. Uticaj primenjene doze metotreksata, serumskih koncentracija metotreksata i korelacija sa demografskim karakteristikama ispitanika.

Pored mukozitisa, supresija kosne srži je među najčešćim toksičnim efektima hemoterapije. Zbog supresije kosne srži dolazi do pada broja eritrocita, leukocita i trombocita, delom usled smrti njihovih prekursora u kosnoj srži (neefektivna hematopoeza) a delom zbog skraćenog preživljavanja kada krvne ćelije stignu u periferni krvotok. Metotreksat ispoljava i hepatotoksični efekat u vidu akutnog oštećenja jetre. Akutno povišenje nivoa jetrenih enzima i/ili hiperbilirubinemija viđaju se u više od 50% pacijenata na HDMTX terapiji, ali se normalizacija testova jetrene funkcije očekuje unutar jedne ili dve nedelje nakon diskontinuacije terapije. Teška hepatotoksičnost se retko javlja. Ranije studije su utvrdile da hepatotoksičnost indukovana HDMTX može biti potpuno reverzibilna i da ne dovodi hronične bolesti jetre (47).

U analizi toksičnih efekata terapije metotreksatom u ovom istraživanju, od ukupno 113 analiziranih ciklusa, toksična dejstva terapije ispoljena u laboratorijskim nalazima zabeležena su u 107 ciklusa metotreksata (94,69 %). Najzastupljeniji od osam posmatranih neželjenih laboratorijskih efekata bili su leukopenija (85,84 %) i anemija - pad nivoa hemoglobina (83,19 %), a potom trombocitopenija (27,34 %) i porast enzima ALT (27,34 %), ALP (22,12 %), AST (19,47 %), GGT (15,93 %). Na poslednjem mestu nalazio se porast ukupnog bilirubina (6,19 %).

U radu Fisgin i sarad. (32) kod terapije HDMTX dece sa ALL, leukopenija i anemija su se javile u 65%. Prolazna hepatotoksičnost, izražena kao porast AST i ALT javila se u 70 %. Rask i sarad. (47) opisuju hematološke toksičnosti, od kojih se najčešće javljala leukopenija i prolazni porast enzima jetrenog sistema - povišen nivo serumske ALT (64 %), dok je bilirubin retko bio

povišen (9%), a ALP nijednom. Cheng (55) u analizi HDMTX terapije nalazi porast AST i ALT u 60 % lečene dece.

Većina ispoljenih toksičnosti bila je umerenog **stepena** (< 3 stepena) izuzev leukopenije koja je imala 22 ciklusa stepena 3 i 10 ciklusa stepena 4. Stepen 3 toksičnosti javio se i kod trombocitopenije u 6 ciklusa metotreksata, a stepenom 4 u 3 ciklusa metotreksata. Posmatrano za sve analizirane pacijente, najteže stepene toksičnosti ispoljila je leukopenija ($1,88 \pm 2,24$, $m \pm 2SD$) i anemija - pad hemoglobina ($0,9 \pm 0,92$), a potom trombocitopenija ($0,49 \pm 1,94$) i porast enzima ALT ($0,38 \pm 1,44$), AST ($0,26 \pm 1,22$), ALP ($0,22 \pm 0,84$), GGT ($0,19 \pm 0,9$). Na poslednjem mestu prema težini bio je porast ukupnog bilirubina ($0,1 \pm 0,84$). Izuzevši alkalnu fosfatazu i bilirubin, najteži stepeni posmatranih toksičnosti (leukopenija, pad hemoglobina, porast AST, ALT i GGT) nalazili su se u grupi sa dozom 5 g/m^2 i produženom eliminacijom metotreksata.

Isti nalaz dobijaju Csordas i sarad. (90) koji u analizama grupa sa dozom metotreksata 2 i 5 g/m^2 (65 dece), pokazuju da su se leukopenija i teške hepatotoksičnosti (porast ALT, GGT ili bilirubina, stepeni 3-4) javljali značajno više u grupi sa dozom 5 g/m^2 . U radu Xu i sarad. (33) pokazano je da razlika između grupa sa različitom dozom metotreksata - 3 i 5 g/m^2 , kako je već navedeno, postoji samo za kliničke efekte (mučnina i povraćanje). Pojava trombocitopenije bila je teža u grupi sa produženom eliminacijom metotreksata nego bez produžene eliminacije i kod doze 3 g/m^2 i kod doze 5 g/m^2 . Nije pokazana razlika za druge neželjene efekte u laboratorijskim nalazima (leukopenija, porast ALT, porast kreatinina).

Uticaj **primenjene doze metotreksata na težinu pojave neželjenih efekata** analiziran je razlikom između ispitivanih grupa. Statistički značajna razlika između grupa postojala je u stepenu ispoljavanja pada hemoglobina, trombocitopenije, porasta AST i ALP. Testom najmanjih značajnih razlika (Least significant difference) pokazano je da su kod stepena anemije, trombocitopenije i porasta AST razlike bile značajne između grupa sa dozom metotreksata 2 i 5 g/m^2 . Ovi rezultati ukazuju na to da veće primenjene doze mogu biti faktor rizika za pojavu težih stepena anemije i trombocitopenije, kao i hepatotoksičnosti (porast AST).

Direktna analiza uticaja serumskih **koncentracija metotreksata** na pojavu laboratorijskih štetnih dejstava terapije (GEE) pokazala je značajnu razliku u stepenu porasta AST između grupa sa dozom metotreksata 5 g/m^2 bez produžene eliminacije i 5 g/m^2 sa produženom eliminacijom metotreksata. Ovi rezultati potvrđuju zaključke da više serumske koncentracije metotreksata mogu biti faktor rizika za pojavu težih stepena toksičnosti, što je ovde pokazano za AST. Istom analizom

pokazan je efekat koncentracija metotreksata na stepen leukopenije u 36. satu ($b = 0,716$, $p = 0,033$) i 42. satu ($b = -1,339$, $p = 0,016$), i na stepen porasta AST u 24. ($b = 0,023$, $p = 0,001$), 36. ($b = -1,021$, $p = 0,00$) i 42. satu ($b = 1,098$, $p = 0,00$). Iako je efekat koncentracije metotreksata na težinu pojave ovih toksičnosti izvestan, kao i u slučaju kliničkih znakova toksičnosti, nedostatak perzistentnosti kroz merenja i u predznaku korelacije može biti objašnjen neujednačenim brojem ispitanika po grupama, kao i manjim brojem pacijenata sa neželjenim efektima terapije nego bez efekata.

Holmboe i sarad. (29) nalaze asocijaciju između visokih nivoa transaminaza i visokih koncentracija metotreksata i smanjenog klirensa metotreksata.

Analizom korelacije stepena laboratorijskih toksičnih efekata i **demografskih karakteristika pacijenata** (Spearman-ov koeficijent korelacije) pokazana je povezanost starijeg uzrasta sa porastom AST, kao i povezanost veće telesne površine sa porastom nivoa ukupnog bilirubina. Nije pokazana povezanost nijednog laboratorijskog znaka toksičnosti metotreksata sa polom.

Već je navedeno da Csordaz i sarad. (90) nalaze da su se toksični efekti terapije metotretksatom (što je odgovaralo većim nivoima metotreksata u 48. satu merenja) javljali češće kod adolescenata (> 14 godina) nego kod dece mlađe od 6 godina u obe grupe (2 i 5 g/m^2), što u je u skladu sa našom analizom za hepatotoksičnost, izraženu kroz porast AST. U grupi sa dozom 5 g/m^2 deca starija od 14 godina su imala značajno više toksičnih nivoa kreatinina od dece mlađe od 6 godina. U grupi sa dozom od 2 g/m^2 deca starija od 14 godina su imala značajno više hepatotoksičnosti, od dece mlađe od 6 godina. Rask i sar. (47) za značajne faktore rizika za elevaciju ALT navode stariji uzrast i dugo izlaganje visokim koncentracijama metotreksata, dok za leukopeniju nalaze da nije korelisala ni sa jednim kliničkim ni farmakokinetičkim faktorom. Suprotno ovim navodima, studija Holmboe i sarad. (29) nalaze značajnu pozitivnu korelaciju između akutne hepatotoksičnosti i mlađeg uzrasta.

Cilj celokupnog istraživanja bio je da prikaže farmakokinetiku metotreksata kod dece lečene visokim dozama metotreksata u našoj sredini s obzirom da slični podaci do sada nisu objavljeni. Prikazano je da su svi analizirani elementi u okviru šest studija koje je obuhvatilo ovo istraživanje u skladu sa prikazanim rezultatima u istraživanjima u pregledanoj literaturi.

Praćene koncentracije metotreksata u dva dozna ranga (2 i 5 g/m²) kao i procenat ciklusa sa produženom eliminacijom metotreksata u okvirima su rezultata drugih studija koje su se bavile ovom tematikom.

U ovom istraživanju korišćen je dvokompartmanski model za određivanje farmakokinetičkih parametara metotreksata s obzirom da smo došli do zaključka dvokompartmanski model bolje odgovara farmakokinetici metotreksata od jednokompartmanskog modela. Klirens metotreksata i svi određeni farmakokinetički parametri ovim modelom (poluvreme eliminacije, konstante transfera i volumen centralnog kompartmana) u saglasnosti su sa prikazanim nalazima drugih istraživača.

Ispitivani uticaji primenjenih doza metotreksata na postignute serumske koncentracije i farmakokinetičke parametre, kao i korelacije posmatranih varijabli sa demografskim i kliničkim karakteristikama metotreksata u velikoj meri pokazuju slične zaključke.

Značaj terapije visokim dozama metotreksata (HDMTX) pokazan je u lečenju brojnih maligniteta: osteosarkoma, limfoma u dečjem uzrastu i određenih limfoma adultne populacije. Takođe, HDMTX terapija zajedno sa intratekalnom administracijom metotreksata prihvaćena je generalno kao efikasan režim u prevenciji zahvatanja CNS-a kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije, odnosno alternativu zračenja kranijuma kao profilaktičke terapije leukemije CNS-a, a koja uzrokuje ozbiljne neželjene efekte na mozgu (26,33). Međutim, HDMTX terapija dovodi do visokih serumskih koncentracija metotreksata i povezana je sa povećanom toksičnošću, produženim klirensom metotreksata kao i odlaganjem narednih kurseva hemoterapije.

Stepeni javljanja posmatranih toksičnosti u ovom istraživanju, ispoljene klinički i laboratorijski, ne razlikuju se po težini ispoljavanja od prikazanih toksičnosti kod dece lečene u drugim centrima. Isto se odnosi i na vrstu toksičnosti, odnosno najčešće ispoljena neželjena dejstva terapije kao i njihovu povezanost sa primenjenom dozom i koncentracijama metotreksata. Pojedina neslaganja sa rezultatima drugih istraživanja u okviru korelacije toksičnosti sa demografskim karakteristikama pacijenata moguće je objasniti manjim uzorkom, neujednačenim brojem ispitanika

po grupama, kao i malim brojem pacijenata sa neželjenim efektima u odnosu na broj pacijenata bez posmatranih reakcija na terapiju.

Ipak, savremeni protokoli koji sadrže sigurnosne smernice postigli su da HDMTX generalno postane hemoterapija koja se dobro toleriše. Ove smernice obuhvataju pažljivu selekciju pacijenata, adekvatnu hidraciju i alkalizaciju urina, izbegavanje interakcije lekova, drenažu tečnosti is trećeg prostor (kada postoji) i praćenje koncentracija metotreksata sa odgovarajućem primenom leukovorina.

Uprkos povišenom spasavanju leukovorinom, većina toksičnosti su češće u kursevima sa višim koncentracijama metotreksata. Moguće je još intenzivnijom upotrebom leukovorina redukovati toksičnosti kod pacijenata sa produženom eliminacijom metotreksata ali tad ostaje rizik za redukciju terapijskog efekta metotreksata (47). Intraindividualna varijabilnost (varijabilnost od kursa do kursa) farmakokinetike metotreksata sugerije da prvi kurs ne mora da bude prediktivan za farmakokinetiku u sledećim kursevima. Zbog toga, praćenje metotreksata ne može biti korišćeno za predviđanje kliničkog ishoda u narednim kursevima (89).

S obzirom da individualne razlike u klirensu leka mogu dovesti do razlike u efikasnosti a mogle bi delom biti prevaziđene individualizacijom terapije, terapijsko praćenje leka (TDM) ostaje obavezan alat za ranu detekciju produžene eliminacije u cilju izbegavanja sistemskih toksičnosti i predstavlja dobru strategiju za individualizaciju terapije kod HDMTX (93). Naročito bitan faktor u pedijatrijskoj populaciji je odabrati strategiju koja dozvoljava smanjenje broja uzoraka i vremena hospitalizacije za uzorkovanje. Dostupnost komercijalnih eseja za metotreksat omogućava individualizaciju terapije, što bi bio naročito razuman pristup za pacijente sa prethodno dugotrajnom hemoterapijom i subkliničkom renalnom disfunkcijom. Serumske koncentracije metotreksata je važno održavati unutar citotoksičnih okvira za leukemijske blaste, ali ispod nivoa sa velikom toksičnošću (99). Prednost praćenja metotreksata kod pacijenata na HDMTX terapiji uključuje prevenciju previše-terapije (over treatment) i sledstvenih toksičnosti i prevenciju manje terapije (under treatment) i sledstvenog mogućeg relapsa (29).

S obzirom da na ishod lečenja mogu uticati umerene promene u dozi leka ili dužine davanja leka, ukoliko se bolje definiše varijabilnost između pacijenata u farmakokinetici i farmakodinamici metotreksata, kreiranje terapije bazirano na urođenim genetskim karakteristikama ćelija ALL može dalje poboljšati ishod. Jer, urođeni polimorfizmi u genima koji kodiraju proteine uključene u farmakodinamiku antileukemijskih lekova su česti sa frekvencijom varijante alela od 5 do 50%

(44). Identifikacija predskazivača senzitivnosti na metotreksat može voditi razvoju individualizacije terapijskih strategija sa poboljšanjem efikasnosti i redukcijom toksičnosti (41,43).

Za zadovoljavajuć ishod terapije visokim dozama meotreksata potrebno je sprovesti prospektivnu studiju koja bi odredila optimalne smernice za praćenje leka (TDM).

VI. ZAKLJUČAK

Koncentracije metotreksata

1. Određivanje serumske koncentracije metotreksata tokom terapije visokim dozama važno je za praćenje toksičnih efekata metotreksata.
2. Primenjena doza metotreksata uticala je na nivo serumske koncentracije metotreksata.
3. Nije pokazan uticaj ispitivanih demografskih karakteristika na koncentracije metotreksata.
4. Pokazan je uticaj nivoa laktat dehidrogenaze i broja eritrocita na koncentracije metotreksata.

Klirens metotreksata

1. Medijana klirensa celokupne grupe ispitanika je bila 8,32 l/h. Medijana klirensa za grupu sa primenjenom dozom metotreksata od 2 g/m² bez produžene eliminacije bila je 8,13 l/h, za grupu sa primenjenom dozom metotreksata od 5 g/m² bez produžene eliminacije 8,7 l/h i za grupu sa dozom od 5 g/m² sa produženom eliminacijom metotreksata 6,8 l/h.
2. Nije pokazan uticaj primenjene doze metotreksata na klirens metotreksata.
3. Nije utvrđen uticaj demografskih karakteristika ispitanika na klirens metotreksata.
4. Na klirens metotreksata pokazan je uticaj kreatinina i laktat dehidrogenaze.

Farmakokinetika metotreksata

1. Koristeći jednokompartmanski farmakokinetički model, određeno je (aritmetičke sredine): poluvreme eliminacije leka $t_{0,5} = 4,40$ h, konstanta eliminacije $k_{10} = 0,1$ i volumen distribucije $V_d = 43,30$ l.
2. Koristeći dvokompartmanski farmakokinetički model, određena su (aritmetičke sredine): poluvremena eliminacije $t_{0,5\ 1} = 2,41$ h i $t_{0,5\ 2} = 7,98$ h, parametri eksponencijalnih članova rešenja matematičkog modela $X = 39,07$ i $Y = 3,49$, $\lambda_1 = 0,2944$ i $\lambda_2 = 0,0988$, konstante transfera $k_{10} = 0,1931$, $k_{12} = 0,0246$ i $k_{21} = 0,1143$ i volumen centralnog kompartmana $V_1 = 33,23$ l.
3. Dvokompartmanski model bolje odgovara farmakokinetici metotreksata od jednokompartmanskog modela.

4. Nije pokazan uticaj doze metotreksata na farmakokinetičke parametre.
5. Pokazana je povezanost demografskih karakteristika i pojedinih farmakokinetičkih parametara: telesne mase i volumena centralnog kompartmana (V_1), telesne visine i konstanti transfera (k_{10} i k_{12}), telesne površine i konstante transfera (k_{12}) i volumena centralnog kompartmana (V_1), uzrasta i konstante transfera (k_{12}). Nijedna od posmatranih konstanti nije bila povezana sa polom.

Klinički znaci toksičnosti metotreksata

1. Većina ispoljenih toksičnosti bila je umerenog stepena (< 3 stepena).
2. Najzastupljeniji klinički znak toksičnosti bio je oralni mukozitis.
3. Primenjena doza metotreksata je uticala na stepen ispoljavanja oralnog mukozitisa i dijareje.
4. Koncentracije metotreksata su uticale na stepen ispoljavanja oralnog mukozitisa i dijareje.
5. Pokazana je povezanost uzrasta i stepena infekcije i dijareje i povezanost telesne površine i stepena infekcije. Pol nije pokazao povezanost ni sa jednim kliničkim neželjenim efektom metotreksata.

Laboratorijski znaci toksičnosti metotreksata

1. Većina ispoljenih toksičnosti bila je umerenog stepena (< 3 stepena).
2. Najzastupljeniji laboratorijski toksični efekti metotreksata bili su leukopenija i anemija.
3. Primenjena doza metotreksata je uticala na stepen anemije, trombocitopenije, porasta AST i ALP.
4. Koncentracije metotreksata su uticale na stepen leukopenije i porasta AST.
6. Pokazana je povezanost uzrasta sa porastom nivoa AST i povezanost telesne površine sa porastom nivoa ukupnog bilirubina. Pol nije pokazao povezanost ni sa jednim kliničkim neželjenim efektom metotreksata.

VII. LITERATURA

1. Cronstein BN, Bertino JR, eds. Methotrexate. Basel: Birkhäuser. 2000. Available: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-8452-5_1#page-1 [Accessed 12.01.2010.]
2. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *N Eng J Med* 1948;238(23):787-793.
3. Bleyer WA. The clinical pharmacology of methotrexate; New application of an old drug. *Cancer* 1978; 41(1):36-51.
4. Egan LJ, Sandborn WJ. Methotrexate for Inflammatory bowel disease: Pharmacology and preliminary results. *Mayo Clin Proc* 1996;71:69-80.
5. Schornagel JH, McVie JG. The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer Treat Rev* 1983;10:53-75.
6. Walling J. From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. *Invest New Drug* 2006;24:37-77.
7. Green MR, Chowdhary S, Lombardi KM, Chalmers LM, Chamberlain M. Clinical utility and pharmacology of high-dose methotrexate in the treatment of primary CNS lymphoma. *Expert Rev Neurother* 2006;6(5):635-52.
8. Gorlick R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR. Review article: Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukaemia. *N Eng J Med* 1996;335:1041-48.
9. Giuseppe SA, Joseph RB. Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. *Haematologica* 2001;86:121-27.
10. Hryniuk WM. The mechanism of action of methotrexate in cultured L5178Y leukemia cells. *Canc Resear* 1975;35:1085-92.
11. Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Brit J Haematol* 2009;146:489-503.

12. Levêque D, Santucci R, Gourieux B, Herbrecht R. Pharmacokinetic drug-drug interactions with methotrexate in oncology. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011;4(6):743-750.
13. Grim J, Chládek J, Martínková J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet* 2003;42(2):139-51.
14. Bannwarth B, Pehourcq F, Schaefferbeke T, Dehais J. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacokinet* 1996;30(3):194-210.
15. Groninger E, Proost JH, Graaf SSN. Pharmacokinetic studies in children with cancer. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2004;52:173-97.
16. Wan SH, Huffman DH, Azarnoff DL, et al. Effect of route of administration and effusions on methotrexate pharmacokinetics. *Cancer Res* 1974;34:3487-91.
17. Balis FM, Savitch JL, Bleyer WA. Pharmacokinetics of oral methotrexate in children. *Cancer Res* 1983;43:2342-45.
18. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al, editors. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
19. Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47(2):131-143.
20. Gorlick R, Goker E, Trippett T, Steinherz P, Elisseyeff Y, Mazumdar M et al. Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood* 1997;89(3):1013-18.
21. Panetta JC, Wall A, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Methotrexate intracellular disposition in acute lymphoblastic leukemia: A mathematical model of γ -glutamyl hydrolase activity. *Clin Can Research* 2002;8:2423-29.
22. Bertino JR, Göker E, Gorlick R, Li WW, Banerjee D. Advances in cancer treatment: the Chabner symposium. Resistance mechanisms to methotrexate in tumors. *Onco* 1996;1(4):223-6.
23. Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. *Plos Comput Biol* 2010;6(12):1-13. e1001019.

24. Borsi JD, Moe PJ. A comparative study on the pharmacokinetics of methotrexate in a dose range of 0.5 g to 33.6 g/m² in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1987;60(1):5-13.
25. Von Stackelberg A, Hartmann R, Bühner C, Rüdiger F, Janka-Schaub G, Reiter A, et al. High-dose compared with intermediate-dose methotrexate in children with a first relapse of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2008;111(5):2573-80.
26. Moe PJ, Holen A. High-dose methotrexate in childhood ALL. *Ped Hemat Oncol* 2000;17(8):615-22.
27. Mason E, Relling MV, Synold TW, Liu Q, Schuetz JD, Sandlund JT et al. Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. *J Clin Invest* 1996;97(1):73-80.
28. Treon SP, Chabner BA. Concept in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* 1996;42(8):1322-9.
29. Holmboe L, Andersen AM, Mørkrid L, Slørdal L, Hall KS. High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br J Clin Pharmacol* 2011;73(1):106-14.
30. Faltaos DW, Hulot JS, Urien S, Morel V, Kaloshi G, Fernandez C et al. Population pharmacokinetic study of methotrexate in patient with lymphoid malignancy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:626-33.
31. Mikkelsen TS, Sparreboom A, Cheng C, Zhou Y, Boyett JM, Raimondi SC et al. Shortening infusion time for high-dose methotrexate alters antileukemic effects: A randomized prospective clinical trial. *J Clin Oncol* 2011;29(13):1771-8.
32. Fisgin T, Yarali N, Kara A, Bozkurt C, Birken D, Erten U et al. Hemostatic side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Haematol Oncol* 2004;21:77-83.
33. Xu W, Tang Y, Song H, Shi S, Yang S. Retrospective study on elimination delay of methotrexate in high-dose therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia in China. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:688-93.
34. Djerassi I, Farber S, Abir E, Neikirk W. Continuous infusion of methotrexate in children with acute leukemia. *Cancer* 1967;20(2):233-42.

35. Aquerreta I, Aldaz A, Giráldez J, Sierrasesúmaga. Methotrexate pharmacokinetics and survival in osteosarcoma. *Pediatr Blood Canc* 2004;42:52-8.
36. Li FP, Cassidy JR, Jaffe N. Risk of secondary tumors in survivors of childhood leukemia. *Cancer* 1975;35:1230-35.
37. Van den Bongard DH, Mathot RA, Boogerd W, Schornagel JH, Soesan N, Schellens JH et al. Successful rescue with leucovorin and thymidine in a patient with high-dose methotrexate induced acute renal failure. *Cancer Chemoth Pharm* 2001;47(6):537-40.
38. Skärby TVCh, Anderson H, Kanerva J, Seidel H, Schmiegelow K. High leucovorin doses during high-dose methotrexate treatment may reduce the cure rate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2006;20:1955-1962.
39. Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology* 2007;46:1520-4.
40. Yong WP, Innocenti F, Ratain MJ. The role of pharmacogenetics in cancer therapeutics. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62(1):35-46.
41. Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D et al. Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21(16):3084-91.
42. Aplenc R, Thompson J, Han P, La M, Zhao H, Lange B et al. Methylentetrahydrofolate reductase polymorphism and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005;65(6):28482-87.
43. De Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, Jansen G, van Zantwijk CH, Kaspers GJL et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;106(2):717-20.
44. Rocha JCC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105(12):4752-8.
45. Kintzel PE, Dorr RT. Anticancer drug renal toxicity and elimination: dosing guidelines for altered renal function. *Cancer Treat Rew* 1995;21:33-64.
46. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH et al. Clinical trials and observations. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood* 2007;109(10):4151-7.
47. Rask C, Albertioni F, Bentzen SM, Schreder H, Peterson C. Clinical and pharmacokinetic risk factors for high-dose methotrexate-induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Oncol* 1998;37(3):277-84.

48. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *The Oncologist* 2006;11:694-703.
49. Van Outryve S, Schrijvers D, van den Brande J, Wilmes P, Bogers J, van Marck E, et al. Methotrexate-associated liver toxicity in a patient with breast cancer: case report and literature review. *Neth J Med* 2002; 60(5):216-22.
50. Inaba H, Khan RB, Laningham FH, Crews KR, Pui CH, Daw NC. Clinical and radiological characteristics of methotrexate-induced acute encephalopathy in pediatric patients with cancer. *Ann Oncol* 2008;19(1):178-84.
51. Kaur I, Dogra S, De D, Kanwar AJ. Systemic methotrexate treatment in childhood psoriasis: Further experience in 24 children from India. *Ped Dermat* 2008;25(2):184-88.
52. Roenigk HH, Auerbach R, Maibach HI, Weinstein GD. Methotrexate guidelines-revised. *J Am Acad Dermatol* 1982;6(2):145-55.
53. Hoffbrand A. Pathology of folate deficiency. *Proc R Soc Med* 1977;70(2):82-4.
54. Niscola P, Romani C, Cupelli L, Scaramucci L, Tendas T, Dentamaro T et al. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. *Haema* 2007;92:222-31.
55. Skelton J, Pizzo PA. Problems of intensive therapy in childhood cancer. *Cancer* 1986;58:488-503.
56. Cheng KK-F. Association of plasma methotrexate, neutropenia, hepatic dysfunction, nausea/vomiting and oral mucositis in children with cancer. *Eur J Cancer Care* 2008;17:306-11.
57. Weiss RB, Poster DS. The renal toxicity of cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Treat Rew* 1982;9:37-56
58. Estève MA, Devictor-Pierre B, Galy G, André N, Coze C, Lacarelle B et al. Severe acute toxicity associated with high-dose methotrexate (MTX) therapy: use of therapeutic drug monitoring and test-dose to guide carboxypeptidase G2 rescue and MTX continuation. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;63:39-42.
59. Cecyn KZ, Lee J, Ogurro T, Petrilli AS, Bordin JO. Use of plasma exchange in methotrexate removal in a patient with osteosarcoma and acute renal insufficiency. *Am J Hematol* 2003;72:209-211.

59. Shuper A, Stark B, Kornreich L, Cohen IJ, Avrahami G, Yaniv I. Methotrexate-related neurotoxicity in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *IMAJ* 2002;4:1050-3.
60. Tuxen MK, Hansent SW. Neurotoxicity secondary to antineoplastic drugs. *Cancer Treat Rev* 1994;20:191-214.
61. Vagace JM, De la Maya MD, Caceres-Marzal C, De Murillo SG, Gervasini G. Central nervous system chemotoxicity during treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2012;84(2):274-86.
62. MacGinnitie AJ, Walensky LD, Turvey SE, Orange JS, Bonilla FA, Silverman LB et al. Management of an anaphylactoid reaction to methotrexate with a stepwise graded challenge. *Pediatr Allergy Immunol* 2003;14:409-11.
63. Demircioğlu F, Ören H, Yılmaz Ş, Arslasoyu S, Eren S, İrken G. Case report: Chemotherapy-induced acral erythema in a pediatric patient with acute monoblastic leukemia. *Pediatr Haematol Oncol* 2008;25:211-15.
64. Alnaim Lamaya. Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy. *J Oncol Pharm Practice* 2007;13:207-21.
65. Panetta JC, Iacono LC, Adamson PC, Stewart CF. The importance of pharmacokinetic limited sampling models for childhood cancer drug development. *Clin Can Res* 2003;9:5068-77.
66. Fukuhara K, Ikawa K, Morikawa N, Kumagai K. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in Japanese adult patients with malignancies: a concurrent analysis of the serum and urine concentration data. *J Clin Pharm Ther* 2008;33:677-84.
67. Galpin AJ, Evans WE. Therapeutic drug monitoring in cancer management. *Clin Chem* 1993;39(11B):2419-30.
68. Aumente D, Santos Buelga D, Lukas JC, Gomez P, Torres A, Jose Garcia M. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. Original research article. *Clin Pharmacokinet* 2006;45(12):1227-38.
69. Esparza SD, Sakamoto KM. Topics in Pediatric Leukemia – Acute Lymphoblastic Leukemia. *MedGenMed* 2005;7(1):23. Published online 2005 February 25. PMID: PMC1681386.
70. Coebergh JWW, Reedijk AMJ, de Vries E, Martos C, Jakab Z, Steliarova-Foucher E et al. Leukemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997.

Report from the automated childhood cancer information system project. *Eur J of Cancer* 2006;42:2019-36.

71. Vijazakrishnan J, Houlston S. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Hematologica* 2010;95(8):1405-14.
72. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354:166-78.
73. Satake N, Yoon JM. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *E medicine Pediatric: medscape.com*.
74. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff A, Girtan K, Williams WK et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003;102(8):2951-9.
75. Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133-43.
76. Healy J, Richer C, Bourgey M, Kritikou EA, Sinnott D. Replication analysis confirms the association of ARID5B with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010;95(9):1608-11.
77. Czuczman MS, Dodge RK, Stewart CC, Frankel SR, Davez FR, Powell BL et al. Value of Immunophenotype in intensivez treated adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and leukemia group B study 8364. *Blood* 1999; 93(11):3931-9.
78. Hamouda F, El-Sissy AH, Radwan AK, Hussein H, Gadallah FH, Al-Sharkawy N. Correlation of karyotype and immunophenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia; Experience at the national cancer institute, Cairo University, Egypt. *J Egypt Nat Cancer Inst* 2007;19(2):87-95.
79. Harrison CJ, Foroni L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Hematol* 2002;6(2):91-113.
80. Pui C-H, Relling MV, Downing JR. Acute Lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1535-48.

81. Roberts KG, Mullighan CG. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. *Curr Opin Pediatr* 2011;23:34-40.
82. Ortega J-J, Ribera J-M, Oriol A, Bastida P, Gonzales M-E, Calvo C et al. Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 TRIAL. *Haematologica* 2001;86:586-95.
83. Johnston JM. Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma. *E medicine Pediatric*: medscape.com.
84. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Canc Treat Rev* 2010;36:277-85.
85. Nomogram [internet]. Science Museum of Minnesota: Habits of the hart; 2000 [cited 2009 May 30]. Available from: <http://www.smm.org/heart/tools/nomogram.html>
86. Schwartz GJ, Gauthier B. A simple estimate of glomerular filtration rate in adolescent boys. *J Pediatr* 1985;106(3):522-6.
87. Popovic J. 1999. Matematički principi u farmakokinetici, kompartmentnoj analizi i biofarmaciji. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet.
88. U.S. National Institute of Health, National Cancer Institute CTCAE v4.0. 2009 [cited 2014 Jun 15]. Available from: http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf
89. Martelli N, Mathieu O, Margueritte G, Bozonnet MC, Daurès JP, Bressolles F et al. Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value? *J Clin Pharm Ther* 2011;36:237-45.
90. Csordas K, Hegyi M, Eipel OT, Muller J, Erdelyi DJ, Kovacs GT. Comparison of pharmacokinetics and toxicity after high-dose methotrexate treatments in children with acute lymphoblastic leukemia. *Anti-cancer Drugs* 2013;24(2):189-97.
91. Piard C, Bressolle F, Fakhoury M, Zhang D, Yacouben K, Rieutord A et al. A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;60:609-620.
92. Rousseau A, Sabot C, Delepine N, Delepine G, Debord J, Lachatre G et al. Bayesian estimation of methotrexate pharmacokinetic parameters and area under curve in children and young adults with localised osteosarcoma. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(13):1095-1104.

93. Min Y, Quiang F, Zhu Z. High dose methotrexate population pharmacokinetics and Bayesian estimation in patients with lymphoid malignacy. *Biopharm Drug Dispos* 2009;30:437-447.
94. Donelli MG, Zucchetti M, Robatto A, Perlangeli V, D'Incalci M, Masera G et al. Pharmacokinetics of HD-MTX in infants, children, and adolescents with non-B acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1995;24(3):154-9.
95. Wall AM, Gajjar A, Link A, Mahmoud H, Pui CH, Relling MV. Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14(2):221-5.
96. Odoul F, Le Guellec C, Lamagnère JP, Breilh D, Saux MC, Paintaud G et al. Prediction of methotrexate elimination after high dose infusion in children with acute lymphoblastic leukaemia using a population pharmacokinetic approach. *Fundam clin Pharmacol* 1999;13(5):595-604.
97. Kanbayashi Y, Nomura K, Okamoto K, Matsumoto Y, Horiike S, Takagi T et al. Statistical examination to determine whether only 48-h value for serum concentration of high-dose methotrexate therapy is a predictor for clinical adverse events using ordered logistic regression analysis. *Ann Hematol* 2010;89:965-969.
98. Wysocki M, Krzyzanowski M, Ozyński T, Pilecki O, Balcar-Boroń A, Szadujkis-Szadurski L. Studies of methotrexate pharmacokinetics in children with neoplasms of the hematopoietic system after administration of different doses of the drug. *Acta Haematol Pol* 1992, 23(3):179-183.
99. Evans W, Relling M, Rodman J, Crom W, Boyett J, Pui C. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998;338(8):499-505.