

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Małgorzata Czogała

Ocena przydatności oznaczania poziomu amoniaku w surowicy krwi
w trakcie podawania L-asparaginazy u dzieci z ostrą białaczką
limfoblastyczną.

Praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Walentyna Balwierz, prof. UJ

Pracę wykonano w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik jednostki dr hab. med. Walentyna Balwierz, prof. UJ

Kraków, 2010

*Pani Profesor Walentynie Balwierz wyrażam szczególną wdzięczność
za cierpliwą pomoc, poświęcony czas i wszechstronne wsparcie
w trakcie realizacji badań i pisania niniejszej pracy.*

Pani Profesor Krystynie Sztefko dziękuję za cenne uwagi merytoryczne.

*Pani Doktor Iwonie Rogatko i Pani Doktor Dorocie Kalfas-Paluch
z Zakładu Biochemii Klinicznej dziękuję za owocną współpracę.*

*Mojej Rodzinie, szczególnie Mężowi,
dziękuję za cierpliwość i wszechstronne wsparcie.*

SPIS TREŚCI

1. Wstęp.....	8
1.1.Ostra białaczka limfoblastyczna	8
1.2.L-asparaginaza	9
1.2.1. Mechanizm działania	9
1.2.2. Formy asparaginazy	10
1.2.2.1.Natywne asparaginazy	10
1.2.2.2.PEG-asparaginaza	10
1.2.3. Drogi podawania L-ASPA	11
1.2.4. Dystrybucja, metabolizm i eliminacja leku	12
1.2.5. Zależność skuteczności terapii od aktywności L-ASPA	12
1.2.6. Dawkowanie asparaginaz	13
1.2.6.1.Natywne asparaginazy	13
1.2.6.2.PEG-asparaginaza	15
1.2.7. Reakcje nadwrażliwości	16
1.2.8. Powikłania stosowania asparaginaz	19
1.2.8.1.Zaburzenia krzepnięcia	19
1.2.8.2.Ostre zapalenie trzustki (OZT)	21
1.2.8.3.Dyslipidemia	21
1.2.8.4.Hiperglikemia	22
1.2.8.5.Zaburzenia funkcji wątroby	22
1.2.8.6.Neutropenia	22
1.2.8.7.Hiperamonemia	22
1.2.9. Interakcje	23
1.2.10. Monitorowanie leczenia	23
1.2.10.1. Pomiar aktywności L-ASPA w surowicy	23
1.2.10.2. Pomiar stężenia amoniaku jako produktu rozpadu asparaginy	24
1.2.10.3. Pomiar stężenia asparaginy i/lub glutaminy	24
1.2.10.4. Oznaczanie przeciwciał przeciw L-ASPA	25
1.2.10.5. Monitorowanie powikłań leczenia L-ASPA	25
1.3.Podsumowanie	25
2. Cele pracy	26
3. Pacjenci i metody	27
3.1.Pacjenci	27

3.2.	Charakterystyka metody leczenia według programu ALL IC-BFM-2002	30
3.3.	Zastosowanie L-ASPA w programie ALL IC-BFM-2002	32
3.4.	Ocena działań niepożądanych	34
3.5.	Ocena wyników leczenia	35
3.6.	Badania laboratoryjne	35
3.6.1.	Oznaczanie aktywności asparaginazy	35
3.6.2.	Oznaczanie stężenia amoniaku	37
3.6.3.	Inne badania laboratoryjne	37
3.6.4.	Oznaczenie przeciwciał przeciw L-asparaginazie	37
3.7.	Ocena przyrostu stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA do osocza w badaniu <i>in vitro</i> ...	37
3.8.	Analiza statystyczna	37
4.	Wyniki	40
4.1.	Realizacja protokołu	40
4.2.	Aktywność L-ASPA	40
4.3.	Reakcje nadwrażliwości	47
4.4.	Stężenia przeciwciał przeciw L-ASPA	53
4.5.	Ocena przydatności oznaczenia stężenia amoniaku	59
4.6.	Działania niepożądane	77
4.6.1.	Zaburzenia krzepnięcia	77
4.6.2.	Ostre zapalenie trzustki	90
4.6.3.	Hepatotoksyczność	91
4.6.4.	Nefrotoksyczność	92
4.6.5.	Zaburzenia gospodarki węglowodanowej	93
4.7.	Ocena wyników leczenia i czasów przeżycia	94
4.7.1.	Uzyskanie I remisji całkowitej	94
4.7.2.	Czas przeżycia całkowitego (OS)	94
4.7.3.	Czas przeżycia wolnego od niekorzystnych wydarzeń (EFS)	95
4.7.4.	Czas przeżycia wolnego od choroby (DFS)	95
4.7.5.	Czas przeżycia wolnego od wznowy (RFS)	98
4.8.	Przyrost stężenia amoniaku w surowicy po dodaniu L-ASPA w badaniu <i>in vitro</i>	99
5.	Dyskusja	105
5.1.	Aktywność L-ASPA	105
5.1.1.	Metody pośredniej oceny aktywności L-ASPA	106
5.2.	Reakcje nadwrażliwości na L-ASPA	109

5.2.1. Wskaźniki zwiększonego ryzyka wystąpienia reakcji alergicznej na L-ASPA ...	109
5.3. Działania niepożądane L-ASPA	111
5.4. Wyniki leczenia ALL	112
5.5. Przyrost stężenia amoniaku w osoczu po dodaniu L-ASPA w badaniu wykonanym <i>in vitro</i>	113
5.6. Podsumowanie	114
6. Wnioski	115
7. Streszczenie	117
8. Abstract	122
9. Piśmiennictwo	126
10. Spis tabel	135
11. Spis rysunków	137

Indeks skrótów

- ALL – ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *acute lymphoblastic leukaemia*)
- ALL IC-BFM-2002 – akronim programu terapeutycznego ostrej białaczki limfoblastycznej (ang. *ALL Intercontinental-BFM 2002*)
- allo-HSCT – allogeniczne przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych (ang. *allogenic hematopoietic stem cell transplantation*)
- ALT – aminotransferaza alaninowa
- APTT – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (ang. *activated partial thromboplastin time*)
- ARA-C – arabinozyd cytozyny
- ASA – 13-semialdehyd asparaginowy
- AST – aminotransferaza asparaginowa
- ATIII – antytrombina III
- BCP-ALL – ostra białaczka limfoblastyczna z linii prekursorów limfocytów B (ang. *B cell precursors ALL*)
- cALL – ostra białaczka limfoblastyczna typu common
- CI – przedział ufności (ang. *confidence interval*)
- DFS – czas przeżycia wolnego od choroby (ang. *disease free survival*)
- DGN – dolna granica normy
- DONV – 5-diazo-4-okso-L-norwalina
- *E.coli* – *Escherichia coli*
- EFS – czas przeżycia wolnego od niekorzystnych wydarzeń (ang. *event free survival*)
- EORTC-CLG - European Organization for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group
- *Erwinia* – *Erwinia chryzantemi*
- FISH – immunofluorescencyjna hybrydyzacja in situ (ang. *immunofluorescence in situ hybridization*)
- GGN – górna granica normy
- HDL – lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*)
- HRG – grupa wysokiego ryzyka (ang. *high risk group*)
- i.m. – domięśniowy (ang. *intramuscular*)
- i.th. – dokanałowy (ang. *intrathecal*)
- i.v. – dożylny (ang. *intravenous*)

- INR – międzynarodowy współczynnik znormalizowany (ang. *international normalized ratio*)
- Ig – immunoglobulina
- IRG – grupa pośredniego ryzyka (ang. *intermediate risk group*)
- L-ASPA – L-asparaginaza
- LR+ – wskaźnik wiarygodności wyniku dodatniego (ang. *likelihood ratio*)
- LR- – wskaźnik wiarygodności wyniku ujemnego (ang. *likelihood ratio*)
- MAAT – test do oznaczenia aktywności L-ASPA firmy Medac (niem. *Medac Asparaginase-Aktivitäts-Test*)
- 6MP – 6-merkaptopuryna
- MTX – metotreksat
- OS — czas przeżycia całkowitego (ang. *overall survival*)
- OUN – ośrodkowy układ nerwowy
- OZT – ostre zapalenie trzustki
- PEG-ASPA – asparaginaza poddana procesowi pegylacji
- PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy
- PT – czas protrombinowy (ang. *prothrombine time*)
- PV+ – wartość predykcyjna wyniku dodatniego (ang. *predictive value*)
- PV- – wartość predykcyjna wyniku ujemnego (ang. *predictive value*)
- RC – remisja całkowita
- RFS – czas przeżycia wolnego od wznowy (ang. *relapse free survival*)
- RR – ryzyko względne (ang. *relative risk*)
- SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)
- SRG – grupa standardowego ryzyka (ang. *standard risk group*)
- T-ALL – ostra białaczka limfoblastyczna z komórek T
- VCR – winkrystyna
- VLDL – lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low density lipoproteins*)
- WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

1. WSTĘP

1.1 Ostra białaczka limfoblastyczna

Białaczki stanowią najczęstszą grupę (30%) nowotworów wieku dziecięcego. Wśród nich 85% to ostre białaczki limfoblastyczne (acute lymphoblastic leukemia – ALL). Istotą tej choroby jest klonalny, nieprawidłowy rozrost niedojrzałych, znajdujących się na różnych etapach różnicowania prekursorów limfocytów T i B (limfoblastów), niepodlegający mechanizmom regulującym, co powoduje zahamowanie prawidłowej czynności szpiku kostnego [21, 23, 49].

W Polsce współczynnik zapadalności na białaczki wynosi około 35,4:1000000 dzieci, rocznie występuje około 350 nowych zachorowań na ALL [48]. Zastosowanie obecnych wielolekowych programów terapii pozwala na uzyskanie remisji choroby u 95-98% pacjentów. Jednakże u około 15-20% dzieci dochodzi do wznowy ALL, a wyniki leczenia nawrotów, pomimo intensyfikacji terapii, są ciągle złe. Obecnie prawdziwym wyzwaniem jest nie tylko dalsze obniżanie wskaźnika niepowodzeń leczenia, ale również redukcja toksyczności terapii [21, 49, 59]. Może to zostać osiągnięte przez wprowadzanie nowych terapii celowanych (np. immunoterapii), jak również przez identyfikację czynników określających bardziej precyzyjnie ryzyko zagrożenia nawrotem choroby. Opierając się na tych czynnikach można indywidualnie dostosować intensywność leczenia do wrażliwości klonu białaczkowego, co mogłoby zwiększyć szansę na pełne wyleczenie, przy jednoczesnym zminimalizowaniu ryzyka wystąpienia toksycznych powikłań związanych z terapią.

Do obecnie uznanych czynników rokowniczych w ALL zalicza się: wiek, płeć, immunofenotyp i kariotyp komórek białaczkowych, liczbę leukocytów i komórek białaczkowych przy rozpoznaniu, jak również wczesną odpowiedź na leczenie ocenianą jako liczba blastów białaczkowych w krwi obwodowej po 7 dniach steroidoterapii oraz w szpiku kostnym w 15. i 33. dniu leczenia indukcyjnego. Niestety żaden z czynników biologicznych wykorzystywanych aktualnie do oceny ryzyka niepowodzenia leczenia nie jest idealny. Nadal poważnym problemem pozostają niepożądane skutki terapii przeciwnowotworowej, dlatego istnieje konieczność monitorowania leczenia pod względem powikłań [21, 49, 59]. Nie bez znaczenia jest odpowiednia realizacja programu terapeutycznego zarówno pod względem dawki poszczególnych leków, jak i czasu ich podania.

Jednym z podstawowych leków stosowanych w leczeniu ALL, ale również innych nowotworów (chłoniaków nieziarniczych) jest L-asparaginaza (L-ASPA).

1.2. L-asparaginaza

1.2.1. Mechanizm działania

L-ASPA katalizuje hydrolityczny rozkład aminokwasu asparaginy do kwasu asparaginowego i amoniaku. Według koncepcji pochodzącej sprzed około pięćdziesięciu lat, przeciwbiałaczkowy efekt działania L-ASPA jest związany ze szczególnym niedoborem enzymatycznym w komórkach białaczkowych. Nowotworowe blasty, w przeciwieństwie do większości zdrowych tkanek, wykazują zmniejszoną ekspresję enzymu syntetazy asparaginy i dlatego nie są w stanie wyprodukować wystarczającej ilości tego aminokwasu [72]. Komórki nowotworowe brakuje do produkcji białek substrat pobierają z krążenia. Podanie L-ASPA powoduje hydrolityczny rozkład zawartej w osoczu asparaginy. W związku z brakiem tego aminokwasu w komórkach białaczkowych zostaje zahamowana biosynteza białek, w wyniku czego dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego i śmierci komórek nowotworowych [22].

Ostatnio prowadzone badania dotyczące ekspresji syntetazy asparaginy w komórkach białaczkowych i jej związku z wrażliwością na L-ASPA sugerują, że mechanizm ten jest bardziej złożony. W badaniach *in vitro* na zwierzęcych liniach komórkowych zauważono zależność pomiędzy ekspresją syntetazy na poziomie mRNA a wrażliwością komórek na L-ASPA [57], natomiast wyniki badań na komórkach ludzkich były niejednoznaczne [30, 40, 83, 84]. Wykazano polimorfizm dotyczący aktywności syntetazy asparaginy w komórkach ALL, stwierdzając istotnie wyższą aktywność w przypadku T-komórkowych ALL w porównaniu z białaczkami z linii B [43]. Szczególnie dobrym rokowaniem i wrażliwością na L-ASPA cechuje się ALL z prekursorów komórek B i translokacją t(12;21), w wyniku której powstaje gen fuzyjny TEL/AML. Podejrzewano, że może to wynikać z niskiej ekspresji syntetazy asparaginy w tych komórkach, natomiast Stams i wsp. stwierdzili istotnie wyższą ekspresję syntetazy asparaginy na poziomie mRNA w komórkach białaczkowych pacjentów z t(12;21), w porównaniu z pacjentami bez t(12;21), a także ze zdrowymi osobami. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji syntetazy a wrażliwością na L-ASPA wykazano wyłącznie u pacjentów bez translokacji t(12;21) [83, 84]. W innych badaniach stwierdzono, że narażenie na L-ASPA powoduje zwiększenie ekspresji mRNA dla syntetazy asparaginy w komórkach, ale poziom ekspresji nie koreluje z odpowiedzią na L-ASPA [9, 30]. Wykazano ponadto, że w odpowiedzi na L-ASPA zaangażowanych jest znacznie więcej genów w tym m. in. geny białek transportowych i czynników aktywujących transkrypcję [30]. Su i wsp. przeprowadzili badanie na liniach komórkowych białaczek T- i B-komórkowych, oceniając nie tylko ekspresję na poziomie mRNA, ale także na poziomie białka. Wykazali, że chociaż ekspresja na poziomie mRNA nie korelowała z wrażliwością komórek na L-ASPA, to zależność taką można było wykazać dla ekspresji syntetazy na poziomie białka [87].

L-ASPA może powodować również deplecję glutaminy, fakt ten uznawany jest za dodatkowy mechanizm terapeutycznego i toksycznego działania tego leku, gdyż glutamina jest potrzebna do syntezy asparaginy w tkankach [19, 34]. Natomiast wzrost transportu glutaminy, a także zwiększenie aktywności syntetazy glutaminy może spowodować wytworzenie oporności na L-ASPA [13].

Istotną rolę w oporności komórek białaczkowych na lek może odgrywać mikrośrodowisko w szpiku, które tworzą m.in. komórki mezenchymalne. W komórkach tych stwierdzono wysoką ekspresję syntetazy asparaginy, a ich obecność w hodowli komórek białaczkowych zmniejszała cytotoksyczność L-ASPA [41].

1.2.2. Formy asparaginazy

L-ASPA uzyskiwana jest z bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*) bądź *Erwinia chryzantemi* (*Erwinia*) [91]. Dostępne są preparaty natywnej, nie zmienionej chemicznie L-ASPA oraz asparaginazy poddanej procesowi pegylacji czyli połączenia z glikolem polietylenowym – PEG-asparaginaza (PEG-ASPA).

1.2.2.1. Natywne asparaginazy

Początkowo natywne asparaginazy pochodzące z różnych źródeł bakteryjnych stosowano wymiennie. Lekiem pierwszego rzutu była zwykle asparaginaza z *E.coli*, natomiast asparaginaza pochodząca z *Erwinia* używana była w przypadku uczulenia na tą pierwszą formę leku. Monitorowanie aktywności asparaginazy pochodzącej z różnych źródeł bakteryjnych wykazało, że zastosowanie asparaginazy z *Erwinia* w takim samym schemacie dawkowania wiązało się z istotnie niższą aktywnością leku w surowicy i mniejszym odsetkiem pełnej deplecji asparaginy [47, 78]. W grupie pacjentów leczonych tą formą leku stwierdzono ponadto mniejszą skuteczność w osiągnięciu remisji całkowitej, wyższy odsetek wznów oraz krótsze przeżycie całkowite (OS – *overall survival*) i przeżycie wolne od niekorzystnych zdarzeń (EFS – *event free survival*), takich jak: progresja, wznowa lub zgon w porównaniu z grupą pacjentów otrzymujących takie same dawki L-ASPA z *E.coli* [27]. Różnice te wynikały z krótszego okresu półtrwania L-ASPA z *Erwinia* (0,65 dnia) w porównaniu do L-ASPA z *E.coli* (1,24 dnia) [15]. W związku z tym obecnie zaleca się zmianę schematu stosowania tego leku (wyższa dawka, krótszy odstęp pomiędzy kolejnymi podaniami) przy zmianie preparatu z *E.coli* na *Erwinia*. Wykazano, że dzięki takiej modyfikacji utrzymana zostaje porównywalna skuteczność leczenia [6, 90].

1.2.2.2. PEG-asparaginaza

Dołączenie glikolu monometoksypolietylenu (PEG) o masie 5000 daltonów do pochodzącej z *E. coli* L-ASPA, powoduje zmniejszenie klirensu nerkowego oraz powstanie

osłony zabezpieczającej lek przed rozkładem enzymatycznym i zmniejszającej jego immunogenność. Zmienia to znacząco farmakokinetykę L-ASPA, wydłuża okres półtrwania do około 6 dni (5 razy dłuższy niż dla formy natywnej asparaginazy z *E.coli* i 9 razy dłuższy niż dla tego enzymu pochodzącego z *Erwinia*) oraz zmniejsza całkowity klirens przy utrzymaniu podobnej objętości dystrybucyjnej [15]. Umożliwia to podawanie preparatu pegylowanego w niższych dawkach i w dłuższych odstępach czasu w porównaniu z preparatami natywnej asparaginazy, co dodatkowo wpływa na zmniejszenie ryzyka rozwinięcia się reakcji immunologicznej. PEG-ASPA w dawkach 1000-2500 IU/m² (około dziesięć razy mniejszych w porównaniu z natywną formą leku), jeden raz w tygodniu lub co dwa tygodnie, stosowana jest głównie jako lek drugiego rzutu w przypadku nadwrażliwości na natywną asparaginazę [64, 92], ale ostatnio również w pierwszej linii leczenia zarówno u dzieci jak i dorosłych [19, 76].

W Polsce dostępne są obecnie 3 preparaty L-ASPA: Asparaginaza Medac (natywna L-ASPA z *E. coli*), Oncaspar (PEG-ASPA) oraz Erwinaza (natywna L-ASPA z *Erwinia chrysanthemi*).

1.2.3. Drogi podawania L-ASPA

W praktyce klinicznej L-ASPA może być podawana dożylnie i domięśniowo [91]. W przypadku natywnych form leku, pochodzących zarówno z *E.coli*, jak i z *Erwinia*, wyniki prac dotyczących wpływu drogi podawania leku na jego skuteczność nie są jednoznaczne. W badaniu przeprowadzonym przez Rizzari i wsp. sposób podania preparatów Erwinaza i L-ASPA Medac w dawce 10000 IU/m², co 3 dni nie wpływał istotnie na aktywność enzymu w surowicy [78]. Natomiast Albertsen i wsp. stosujący Erwinazę w czasie indukcji w dawce 30000 IU/m² codziennie, stwierdzili istotnie wyższe aktywności w przypadku podawania leku dożylnie w porównaniu z podaniem domięśniowym. W tym samym badaniu w trakcie reinducji podawano Erwinazę 2 razy w tygodniu w dawce 30000 IU/m² i wykazano, że droga podania nie wpływała istotnie na osiąganą w surowicy aktywność leku [6].

Badania porównujące skuteczność podawanych domięśniowo preparatów natywnej i pegylowanej L-ASPA przeprowadził Avramis i wsp. Stwierdzono, wolniejszą absorpcją po podaniu domięśniowym PEG-ASPA (szczyt aktywności - około 5 dni po podaniu leku) w porównaniu z natywną asparaginazą (szczyt aktywności około 1-2 dni od podania). Różnica ta mogłaby wynikać z większej masy cząsteczkowej PEG-ASPA [19]. Znacząco inne wyniki uzyskali Vieira Pinheiro i wsp. oraz Muller i wsp., którzy szczytowe wartości aktywności PEG-ASPA obserwowali w pierwszej dobie po dożylnym podaniu leku [64, 93]. Różnice te wynikać mogły nie tylko z innej drogi podania leku, ale także z faktu, że stosowane preparaty

pochodziły od innych producentów (Merck w badaniu Avramisa i wsp., Medac w badaniach Mullera i Vieira Pinheiro) [18, 92].

Droga podania leku może mieć również wpływ na wystąpienie reakcji alergicznej. Przeprowadzono retrospektywne badanie porównujące częstość występowania reakcji alergicznej wśród pacjentów leczonych według protokołu BFM (L-ASPA podawana dożylnie) i protokołu AIEOP (L-ASPA podawana domięśniowo). Stwierdzono istotnie większą częstość reakcji nadwrażliwości po dożylnym podaniu leku (46%, reakcje uogólnione o różnym nasileniu), w porównaniu z podaniem domięśniowym (7%, ciężkie reakcje uogólnione) [77].

1.2.4. Dystrybucja, metabolizm i eliminacja leku

Dystrybucja L-ASPA odbywa się wewnątrznaczyniowo, a duża masa cząsteczkowa znacznie utrudnia przenikanie poprzez barierę krew-mózg [69], jedynie przy bardzo wysokich dawkach leku bardzo niska aktywność enzymu może być oznaczalna w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR), stanowiąc mniej niż 0,2% aktywności oznaczanej we krwi [74]. Przypuszcza się, że w przypadku PEG-ASPA większa masa cząsteczkowa całkowicie uniemożliwia przemieszczenie się leku przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy, nawet w najmniejszych ilościach [76].

Nie ma pewnych danych dotyczących metabolizmu i eliminacji L-ASPA. Przypuszcza się, że za eliminację tego leku odpowiedzialny jest układ siateczkowo-śródbłonkowy [69, 91]. Badania wykazują znaczną zmienność międzyosobniczą, jeśli chodzi o farmakokinetykę. Poza klasycznymi czynnikami takimi jak masa ciała, czy przyjmowane równocześnie inne leki, znaczący wpływ na procesy eliminacji może mieć także supresja układu siateczkowo-śródbłonkowego oraz obecność specyficznych przeciwciał [97].

1.2.5. Zależność skuteczności terapii od aktywności L-ASPA

Skuteczność leczenia L-ASPA związana jest ze stopniem i czasem trwania deplecji asparaginy w surowicy i w PMR, które zależą z kolei od osiągniętej aktywności enzymu. W 1981 r. Riccardi na podstawie przeprowadzonych m.in. na zwierzętach badań ustalił próg aktywności L-ASPA na poziomie wartości 100 IU/l, powyżej której dochodzi do całkowitej deplecji asparaginy zarówno w surowicy jak i płynie mózgowo-rdzeniowym [74]. Monitorowanie leczenia L-ASPA w kolejnych badaniach potwierdzało to spostrzeżenie. Przy aktywności tego leku powyżej 100 IU/l wykazano pełną deplecję asparaginy [47, 76, 78]. Jednakże całkowitą deplecję obserwowano także u wielu chorych z aktywnością L-ASPA poniżej 100 IU/l [47, 76, 78]. Rizzari i wsp. stwierdzili całkowitą deplecję asparaginy w surowicy i w PMR u wszystkich pacjentów

leczonych L-ASPA Medac oraz Erwinazą w 8 dawkach po 10000 IU/m², także przy aktywności enzymu poniżej 50 IU/l [78]. W innym badaniu, gdzie stosowano Erwinazę w 9 dawkach po 20000 IU/m², całkowitą lub prawie całkowitą deplecję asparaginy wykazywano w 49 z 50 próbek o aktywności poniżej 100 IU/l [90], natomiast Albersten i wsp. stwierdzili całkowitą deplecję tego aminokwasu tylko w 67,3% próbek z taką aktywnością [6]. Z kolei w badaniu przeprowadzonym w Czechach, gdzie stosowano Kidrolazę w trakcie indukcji (protokół I) 8 razy w dawce 5000 IU/m², w reindukcji (protokół II) czterokrotnie w dawce 10000 IU/m², a w przypadku reakcji alergicznej - Erwinazę w takiej samej dawce, wykazano całkowitą deplecję asparaginy w surowicy w większości badanych próbek (dla Kidrolase 89,6% w protokole I i 92,6% w protokole II, a dla Erwinase 80% w protokole II), pomimo znacznego odsetka próbek o aktywności asparaginazy poniżej 100 IU/l (dla Kidrolazy: 72% w protokole I i 64% w protokole II; dla Erwinazy 80% w protokole II) [47].

Tsurusawa zbadał zależność pomiędzy aktywnością enzymu (także dla niższych jej wartości) a poziomem asparaginy w surowicy. Minimalna aktywność L-ASPA konieczna do całkowitej deplekcji asparaginy wyniosła w tym badaniu 6-180 IU/l z medianą 16 IU/l, a w zakresie 2-32 IU/l stężenie asparaginy ujemnie korelowało z aktywnością enzymu [89]. Wykazanie skutecznej deplekcji asparaginy przy niższej niż 100 IU/l aktywności L-ASPA ma duże znaczenie kliniczne ze względu na zależność między aktywnością leku w surowicy a jego toksycznością [2, 91, 98].

1.2.6. Dawkowanie asparaginaz

1.2.6.1. Natywne asparaginazy

Na podstawie badań aktywności asparaginazy oraz stężenia asparaginy w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono istotne różnice pomiędzy poszczególnymi preparatami początkowo stosowanymi według jednakowych schematów. Istotnych danych dostarczyły badania przeprowadzone w ramach grupy Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) opracowującej schematy protokołów leczenia dla dziecięcej ALL. Trzy dostępne wówczas w Europie preparaty L-ASPA (Crasnitin i L-ASPA Medac z *E.coli* oraz Erwinaza z *Erwinia chrysanthemi*) stosowane były w dawce 10000 IU/m² *i.v.*, zwykle co 3 dni. Oba preparaty z *E.coli* prowadziły w trakcie indukcji do całkowitej deplekcji asparaginy w surowicy, ale preparat L-ASPA Medac wykazywał istotnie wyższą średnią aktywność w surowicy w porównaniu z Crasnitin (475 IU/l vs 74 IU/l). Podobnie w trakcie reindukcji stwierdzono znaczne różnice w aktywności obu preparatów (528 IU/l dla L-ASPA Medac vs 49 IU/l dla Crasnitin). W przypadku stosowania Erwinazy średnia aktywność była poniżej progu oznaczalności (<20 IU/l). Całkowitą deplecję asparaginy w trakcie reindukcji

obserwowano w 90%, 60% i 26% pacjentów leczonych odpowiednio: L-ASPA Medac, Crasnitin i Erwinazą [24]. Stosując Erwinazę jako lek pierwszego rzutu w dawkach rekomendowanych dla asparaginazy *E.coli* w trakcie indukcji stwierdzono pełną deplecję asparaginy w 80% przypadków, natomiast w trakcie reindukcji tylko w 25% przypadków [31]. W innym badaniu porównującym skuteczność L-ASPA Medac i Erwinazy wykazano w grupie Medac aktywność enzymu powyżej 100 IU/l w 90% przypadków w porównaniu z 40% w grupie otrzymującej Erwinazę. Jednak w obu grupach u wszystkich pacjentów, w tym z aktywnością poniżej 50 IU/l, obserwowano całkowitą deplecję asparaginy zarówno w surowicy, jak i w PMR [78]. Ze względu na wysokie aktywności enzymu uzyskiwane przy leczeniu preparatem L-ASPA Medac przeprowadzono próbę redukcji dawki z 10000 IU/m² do 5000 IU/m² (11 pacjentów), a następnie do 2500 IU/m² (15 pacjentów) pod kontrolą farmakokinetyczną i farmakodynamiczną. Stosując dawkę 5000 IU/m² uzyskano całkowitą deplecję asparaginy w 96% próbek, ze średnią aktywnością enzymu wynoszącą 265 IU/l, natomiast dla dawki 2500 IU/m² całkowitą deplecję asparaginy stwierdzono w 97% próbek, a średnia aktywność L-ASPA wyniosła 102 IU/l. Stężenie asparaginy w PMR oceniono u chorych otrzymujących L-ASPA w dawce 2500 IU/m², stwierdzając całkowitą deplecję asparaginy we wszystkich badanych próbkach. U pacjentów leczonych L-ASPA w dawce 2500 IU/m² stwierdzono istotnie mniejsze zmiany stężenia fibrynogenu [2].

W celu porównania efektywności leczenia oraz toksyczności L-ASPA pochodzącej z *E. coli* oraz z Erwinia stosowanej w tej samej dawce (10000 IU/m² 2 razy w tygodniu) European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group (EORTC-CLG) przeprowadziła randomizowane badanie obejmujące 700 dzieci. Stwierdzono, że pacjenci otrzymujący Erwinazę częściej nie osiągnęli remisji całkowitej (4,9% vs 2%, p=0,038), częstość wznów w tej grupie była wyższa prowadząc do niższego odsetka 6-letniego EFS (59,8% vs 73,4%) oraz OS (75,1% vs 83,9%). Badanie to wykazało natomiast, że stosowanie Erwinazy wiązało się z istotnie mniejszą częstością zaburzeń krzepnięcia w porównaniu z L-ASPA *E.coli* (11,9% vs 30,2%, p<0,0001) [27].

Na podstawie przeprowadzonych badań w protokołach ALL-BFM zarekomendowano dla preparatu L-ASPA Medac dawkę 5000 IU/m² stosowaną co 3 dni, natomiast dla Erwinazy 20000 IU/m² co drugi dzień [90]. W późniejszych badaniach przeprowadzonych w Skandynawii, gdzie w trakcie indukcji podawano Erwinazę codziennie w dawce 30000 IU/m² obserwowano w 90% przypadków aktywność enzymu powyżej 500 IU/l oznaczaną przed kolejnym podaniem leku. Natomiast w trakcie reindukcji, kiedy ta sama dawka podawana była 2 razy w tygodniu, odsetek przypadków z aktywnością powyżej 100 IU/l, oznaczaną przed kolejną dawką wynosił tylko 30%, ale w około 65% zbadanych próbek stwierdzono całkowitą deplecję asparaginy w surowicy [6].

1.2.6.2. PEG-asparaginaza

Pegylowana asparaginaza różni się znacznie farmakokinetyką od form natywnych, dlatego konieczne było przeprowadzenie odrębnych badań w celu ustalenia najbardziej skutecznego schematu leczenia z zastosowaniem tej formy leku. Porównywano skuteczność leczenia pegylowaną i natywną asparaginazą. W randomizowanym badaniu, przeprowadzonym przez Dana-Faber Cancer Institute ALL Consortium, nie stwierdzono istotnej różnicy w 5-letnim EFS pomiędzy grupą otrzymującą PEG-ASPA 15 razy co 2 tygodnie w dawce 2500 IU/m², a grupą leczoną natywną asparaginazą stosowaną co 7 dni 30 razy w dawce 25000 IU/m² [81]. Podobnie, badanie Children's Cancer Group porównujące skuteczność pojedynczego podania i.m. PEG-ASPA w dawce 2500 IU/m² z 9 podaniami i.m. natywnej asparaginazy w dawce 6000 IU/m² nie wykazało istotnej różnicy w 3-letnim EFS [19]. Abshire i wsp. porównali natomiast skuteczność PEG-ASPA w leczeniu wznowy ALL w zależności od długości czasu (tydzień lub dwa tygodnie) pomiędzy kolejnymi podaniami leku w dawce 2500 IU/m². Znacząco wyższy odsetek remisji całkowitych uzyskano w grupie otrzymującej lek w odstępie tygodniowym [1]. W innym badaniu, w czasie leczenia wznowy udało się uzyskać u 69% badanych pacjentów utrzymującą się przez tydzień aktywność enzymu powyżej 100 U/l przy użyciu pojedynczej dawki 500 IU/m² PEG-ASPA [93]. Z kolei w protokole COALL-06-97 w leczeniu konsolidującym zastosowano pojedynczą dawkę PEG-ASPA 2500 IU/m² i.v. w miejsce natywnej asparaginazy w dawce 45000 IU/m² z protokołu COALL-05-92, uzyskując utrzymywanie się co najmniej 5 tygodni mediany stężenia asparaginy w surowicy poniżej progu wykrywania u 81% pacjentów w porównaniu z 65% pacjentów leczonych według protokołu COALL-05-92 [96]. Pomimo dużej skuteczności PEG-ASPA w wywoływaniu pełnej deplecji asparaginy w surowicy, u większości pacjentów nie dochodzi do pełnej deplecji tego aminokwasu w płynie mózgowo-rdzeniowym, niezależnie od dawki i drogi podania tego leku [11, 19, 75, 76, 94]. W duńskim badaniu w ramach programu DCLSG-ALL-9 podawano jednorazowo PEG-ASPA w dawce 1000 IU/m² i.v. 5 dni przed rozpoczęciem indukcji i pomimo utrzymującej się przynajmniej 10 dni aktywności enzymu powyżej 100 IU/l i pełnej deplecji (<0,2 μM) asparaginy w surowicy, nie osiągnęto deplecji asparaginy w PMR (oznaczenie wykonywano w 5. i w 19. dniu po podaniu leku) [11]. Rizzari i wsp. stosujący w trakcie indukcji PEG-ASPA dwukrotnie w dawce 1000 IU/m² i.v. oraz jednorazowo w trakcie reindukcji, wykazali pełną deplecję asparaginy w PMR tylko u kilku pacjentów pomimo pełnej deplecji tego aminokwasu w surowicy uzyskanej u wszystkich [76]. Zastosowanie wyższej dawki leku (2500 IU/m²) w protokole COALL-06-97 także nie zapewniło odpowiedniej deplecji w PMR [94]. Podobnie niedostateczną deplecję asparaginy w PMR stwierdzili Avramis i wsp. stosujący PEG-ASPA domięśniowo w dawce 2500 IU/m² [19].

Sytuacja ta może być tłumaczona wysoką masą cząsteczkową PEG-ASPAs, co może uniemożliwiać przedostanie się leku poprzez barierę krew-mózg nawet w najmniejszej ilości [76], a obserwowana częściowa deplecja asparaginy w CSF w trakcie leczenia PEG-ASPAs może być efektem wymiany pomiędzy osoczem a PMR. Nie ustalono dotychczas, czy brak pełnej deplecji asparaginy w PMR może mieć wpływ na zabezpieczenie przed wznową w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [75], zwłaszcza, że obecnie protokoły leczenia zapewniają skuteczną profilaktykę wznowy w OUN przez leczenie dokanałowe oraz stosowanie metotreksatu dożylnie w wysokich dawkach i w wybranych przypadkach również radioterapii.

Obecnie uznaje się, że pojedyncze podanie PEG-ASPAs w dawce 500-1000 IU/m² może zastąpić 4 podania natywnej L-ASPAs w dawce 5000-10000 IU/m². Ponieważ niezależnie od wysokości dawki PEG-ASPAs, aktywność tego leku obniża się zwykle po około 3 tygodniach od jego podania, to w przypadkach zwiększonego ryzyka wystąpienia reakcji alergicznej, bądź cichej inaktywacji, bardziej uzasadnionym wydaje się zmniejszenie odstępu czasowego pomiędzy dawkami niż zwiększanie dawki [75, 91].

1.2.7. Reakcje nadwrażliwości

L-ASPAs jako obcogatunkowe białko może powodować tworzenie przeciwciał, głównie klasy IgG. Częstość występowania przeciwciał przeciwko L-ASPAs oraz klinicznie jawnej reakcji nadwrażliwości jest zróżnicowana w poszczególnych badaniach (45%-70%) [46, 97]. Miano przeciwciał narasta wraz z liczbą podań leku [97]. Reakcja nadwrażliwości może być klinicznie jawna w postaci objawów miejscowych (ból, obrzęk, pokrzywka, rumień, świąd) lub uogólnionych (rumień, pokrzywka, świąd, duszność, gorączka, ból pleców, brzucha, obrzęk naczynioruchowy, utrata przytomności, wstrząs anafilaktyczny) [63, 64, 97]. Obecność przeciwciał w surowicy jednak nie zawsze daje objawy kliniczne. W badaniu Woo i wsp. stwierdzono wystąpienie reakcji u 56% pacjentów z wykrywalnymi przeciwciałami, a ich miano korelowało z ryzykiem wystąpienia objawów nadwrażliwości. W tym samym badaniu u 18% pacjentów bez wykrywalnych przeciwciał wystąpiły objawy nadwrażliwości. Powstanie przeciwciał może wywołać również tzw. „cichą inaktywację”, której wynikiem jest zmniejszenie aktywności enzymatycznej L-ASPAs i skrócenie okresu półtrwania leku, przy braku objawów klinicznych. [31, 63, 64, 91, 97]. Przypuszcza się również, że przeciwciała neutralizujące mogą zmieniać zależność pomiędzy aktywnością L-ASPAs a stężeniem asparaginy w surowicy [42]. Jarrar i wsp. nie wykazali zależności pomiędzy poziomem przeciwciał a aktywnością enzymu, ani pomiędzy aktywnością leku a poziomem asparaginy u pacjentów leczonych PEG-ASPAs z powodu wznowy ALL, u których uprzednio stosowano natywną formę leku. Stwierdzili natomiast

znamienną ujemną korelację pomiędzy mianem przeciwciał przeciwko natywnej i pegylowanej asparaginazie a poziomem asparaginy w surowicy [42]. W tym samym badaniu wykazano związek pomiędzy poziomem asparaginy (w 14. dniu indukcji) a wynikiem leczenia ocenianym w 35. dniu [42].

Prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji immunologicznej zależy od rodzaju preparatu, wysokości dawki, drogi podania leku, liczby podań leku w trakcie jednego etapu leczenia.

Szczególnie wysokie ryzyko wystąpienia reakcji immunologicznej istnieje po dłuższej przerwie od podania poprzedniej dawki, na przykład w trakcie reindukcji lub w leczeniu wznowy [63, 64, 77, 91, 97]. Według niektórych specjalistów codzienne podawanie L-ASPA może skutecznie zapobiegać wystąpieniu reakcji nadwrażliwości [6]. Taki schemat stosowany był w protokole NOPHO-92 w trakcie indukcji, gdzie podawano Erwinazę w dawce 30000 IU/m² przez 10 kolejnych dni i nie obserwowano klinicznie jawnej nadwrażliwości [6].

Spośród preparatów L-ASPA najmniej immunogenna jest PEG-ASPA, zwłaszcza jeśli stosowana jest jako lek pierwszego rzutu, bez uprzedniego podawania innych preparatów asparaginazy [19]. Avramis i wsp. oceniali obecność przeciwciał oraz ich wpływ na aktywność leku u pacjentów randomizowanych do leczenia PEG-ASPA lub natywną asparaginazą. Stwierdzili istotnie niższe średnie miano przeciwciał w grupie leczonej PEG-ASPA (1,9 vs 3,0; p=0,001) oraz rzadsze występowanie wysokiego (>2,5) miana przeciwciał (2% vs 26%). Dotyczyło to pierwszej opóźnionej intensyfikacji. Ponadto w przypadku natywnej asparaginazy wykazano związek pomiędzy wysokim mianem przeciwciał a niską aktywnością leku w surowicy, takiej zależności nie stwierdzono w grupie leczonej PEG-ASPA [19].

W przypadku PEG-ASPA istotną rolę w reakcji alergicznej mogą odgrywać przeciwciała skierowane przeciw glikolowi monometoksy polietylenowi (anty-PEG). Przeciwciała takie stwierdzono u 25% zdrowych dawców krwi i u 80% pacjentów z niską aktywnością PEG-ASPA [12]. Wykazano ścisły związek pomiędzy obecnością przeciwciał anty-PEG a przyspieszonym klirensiem PEG-ASPA u pacjentów leczonych tym preparatem [12]. Nie stwierdzono natomiast wpływu obecności przeciwciał anty-PEG na farmokokinetykę natywnej postaci leku [12].

Istotny wpływ na częstość reakcji nadwrażliwości może mieć droga podania leku. Stwierdzono istotnie większą częstość reakcji alergicznych po podaniu dożylnym w porównaniu z domięśniowym podaniem leku [77].

Przy stosowaniu wyższych dawek L-ASPA istnieje większe prawdopodobieństwo klinicznie jawnej reakcji nadwrażliwości, natomiast przy niższych dawkach leku, konieczne jest monitorowanie w kierunku wystąpienia cichej inaktywacji [2, 24, 63]. Inne leki stosowane równocześnie w protokole mogą mieć wpływ na częstość pojawienia się reakcji immunologicznej.

Na przykład podawane w trakcie indukcji sterydy poprzez działanie immunosupresyjne, mogą zmniejszać częstość reakcji [26, 29].

Pojawienie się reakcji nadwrażliwości, a także cichej inaktywacji najczęściej wymaga odstawienia dotąd stosowanego preparatu i zamiany go na inny. W przypadku reakcji w odpowiedzi na natywny preparat pochodzący z *E. coli* zalecane jest użycie PEG-ASPA lub Erwinazy [63, 64, 93, 97]. Przy niewielkim nasileniu objawów nadwrażliwości w niektórych ośrodkach kontynuowano podawanie tego samego preparatu z zastosowaniem premedykacji (difenhydramina, glikokortykosterydy) [97], jednak w protokole ALLIC-BFM 2002nie jest to zalecane, ponieważ premedykacja nie zapobiega wystąpieniu cichej inaktywacji.

W badaniach *in vitro* nie stwierdzono dotąd reakcji krzyżowej pomiędzy asparaginazami pochodzącymi z różnych źródeł bakteryjnych, możliwa jest natomiast krzyżowa reakcja pomiędzy natywną i pegylowaną formą preparatów z *E. coli* [91, 95]. Wykazano, że obecność przeciwciał IgG przeciw natywnej L-ASPA z *E.coli* może być związana ze skróceniem okresu półtrwania PEG-ASPA [51, 91]. Natomiast Vieira i wsp. nie stwierdzili wpływu na farmakokinetykę PEG-ASPA uprzedniej reakcji alergicznej na natywną postać L-ASPA z *E. coli* i na Erwinazę, w badaniu tym jednak nie oznaczano przeciwciał [93].

Z danych klinicznych wynika, że u pewnego odsetka pacjentów po zmianie preparatu asparaginazy dochodzi powtórnie do reakcji nadwrażliwości. Według Woo i wsp. dotyczy to 14% pacjentów otrzymujących Erwinazę po wcześniejszym stosowaniu L-ASPA z *E. coli* [97]. Natomiast w przypadku PEG-ASPA ostre reakcje alergiczne występują u niewielkiej grupy pacjentów po wcześniejszej ekspozycji na natywną postać, natomiast szacuje się, że u ponad 60% pojawiają się przeciwciała, które mogą spowodować skrócenie okresu półtrwania leku [19].

Wyniki badań dotyczących wpływu wystąpienia reakcji immunologicznej w odpowiedzi na L-ASPA na wyniki leczenia nie są jednoznaczne. W jednej z prac opisującej niejednorodną 30-osobową grupę obejmującą dzieci i dorosłych z ALL i AML stwierdzono korzystny wpływ pojawienia się przeciwciał przeciw L-ASPA na uzyskanie remisji [46]. Inny wynik uzyskali Cheung i wsp., którzy wśród 13 badanych dzieci opisali większą częstość wznów i wyższą śmiertelność u pacjentów z wysokim poziomem przeciwciał [26]. Z kolei Zalewska-Szewczyk i wsp. w 47-osobowej grupie dzieci z ALL stwierdzili niższą aktywność enzymu w trakcie reindukcji (mediana 37 IU/l vs 355 IU/l; $p = 0,001$) oraz większą częstość reakcji alergicznej na lek u pacjentów z dodatnim wynikiem przeciwciał w trakcie reindukcji. W badaniu tym wykazano także związek pomiędzy obecnością przeciwciał w trakcie indukcji, a krótszym EFS i całkowitym przeżyciem [99, 100], zależności takiej nie stwierdzono w przypadku oznaczeń przeciwciał wykonywanych w trakcie reindukcji. W ocenianej w tym badaniu grupie chorych wyniki leczenia

pacjentów z reakcją alergiczną na L-ASPA nie różniły się od wyników leczenia pozostałych pacjentów. W innych badaniach, nie stwierdzono wpływu pojawienia się przeciwciał oraz kliniczne jawnej nadwrażliwości na wyniki leczenia zarówno u dzieci [97], jak i dorosłych [52]. Skutki uboczne takiej reakcji mogły być tam minimalizowane dzięki szybkiej zmianie preparatu w przypadku wystąpienia nadwrażliwości, tak, aby ogólna liczba podań (z odpowiednią modyfikacją uwzględniającą odmienną farmakokinetykę poszczególnych preparatów) odpowiadała protokołowi [97]. W badaniu retrospektywnym wykazano, że EFS u pacjentów z grupy SR, u których z powodu powikłań leczenia podano mniej niż połowę przewidzianych dawek L-ASPA, był istotnie niższy w porównaniu do chorych, którzy otrzymali większość dawek tego leku (EFS odpowiednio: 74,1% i 92,9%, $p=0,025$) [68].

W związku ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji nadwrażliwości przy podaniu asparaginazy *E.coli* po dłuższej przerwie, w niektórych ośrodkach podjęto próbę stosowania Erwinazy lub PEG-ASPA w trakcie reindukcji [64, 90], a także przy leczeniu wznowy [32, 93]. W badaniach oceniających takie postępowanie w trakcie reindukcji z zastosowaniem Erwinazy stwierdzono reakcję nadwrażliwości tylko u 1 z 21 pacjentów, a u 2 innych przypuszczalnie wystąpiła cicha inaktywacja [90]. W przypadku PEG-ASPA u żadnego z badanych pacjentów nie wystąpiła nadwrażliwość, natomiast u około jednej trzeciej obserwowano szybsze obniżenie aktywności leku (aktywność po 14 dniach poniżej 100 IU/l, po 21 dniach nieoznaczalna) [64]. Dla porównania przy konwencjonalnej terapii reindukcyjnej (natywna L-ASPA w dawce 10000 IU/m²) odsetek reakcji nadwrażliwości wynosił 24%, nie obserwowano natomiast cichej inaktywacji [63]. W przypadku leczenia wznowy z zastosowaniem PEG-ASPA w dawce 500 IU/m² kliniczne objawy nadwrażliwości stwierdzono u 8 z 28 pacjentów (28,5%), natomiast u 25% pacjentów wystąpiło gwałtowne zmniejszenie aktywności leku po podaniu kolejnej dawki [93]. Nie stwierdzono wpływu na farmakokinetykę PEG-ASPA uprzedniej nadwrażliwości na natywne asparaginazy [93].

1.2.8. Powikłania stosowania asparaginaz

1.2.8.1. Zaburzenia krzepnięcia

U pacjentów leczonych L-ASPA występuje zwiększone ryzyko epizodów zakrzepowych. Objawowa zakrzepica jako powikłanie terapii tym lekiem stwierdzana jest u 0-11% pacjentów [5, 16, 62, 65, 67, 85], natomiast wiele epizodów zakrzepowych pozostaje nierozpoznanych z powodu braku objawów klinicznych. Mitchel i wsp. w badaniu prospektywnym (PARKAA Study) u wszystkich pacjentów leczonych L-ASPA przeprowadzali obrazowanie górnej części ciała za pomocą obustronnej wenografii lub rezonansu magnetycznego (MRI) oraz ultrasonografii,

a także wykonywali echokardiografię oraz MRI głowy w celu zdiagnozowania bezobjawowej zakrzepicy. Objawową zakrzepicę potwierdzano również badaniami obrazowymi. Na tej podstawie stwierdzono epizody zakrzepowe łącznie u 22 (36,7%) wśród 60 ocenianych pacjentów, w tym 3 (5%) osoby prezentowały objawy kliniczne. Wśród wszystkich epizodów zakrzepowych 95,5% dotyczyło układu żylnego górnej części ciała. Natomiast w badaniach oceniających objawową zakrzepicę najczęstszą lokalizacją (>50%) był OUN [39, 45]. W badaniu PARKAA w większości przypadków stwierdzano rozległy zakrzep, w 33% przypadków obejmujący powyżej 75% największego wymiaru naczynia. U 60% pacjentów z zakrzepicą wykazano obecność krążenia obwodowego, co mogło zminimalizować liczbę osób z obecnymi objawami klinicznymi [62]. Nie oceniono dotychczas długoterminowych skutków bezobjawowej zakrzepicy w populacji dziecięcej, ale wydaje się, że może mieć istotny wpływ na chorobowość przez długi okres czasu.

Uważa się, że istnieje wiele mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększone ryzyko zakrzepicy u dzieci leczonych z powodu ALL, w tym: sama choroba podstawowa, leczenie L-ASPA, glikokortykosterydami, a także obecność innych wrodzonych i nabytych czynników ryzyka nadkrzepliwości (mutacje genu protrombiny, czynnik V Leiden, przeciwciała antyfosfolipidowe, podwyższony poziom lipoprotein) [10, 16, 62, 65, 67]. Na podstawie badań porównujących częstość epizodów zakrzepowych podczas stosowania różnych schematów leczenia ALL u dzieci stwierdzono, że stosowanie L-ASPA jednocześnie z prednizonem w porównaniu z równoważną dawką deksametazonu istotnie zwiększa ryzyko zakrzepicy (11,5% vs 2,6%; $p=0,005$ [67] i 10,4% vs 1,8%; $p=0,028$ [65]) Znamienne zmniejszenie poziomu fibrynogenu i aktywności antytrombiny III (ATIII), plazminogenu i białka S w okresie największej aktywności asparaginazy wykazano tylko w grupie leczonej prednizonem [65].

Zmiany poziomu czynników krzepnięcia podczas leczenia L-ASPA dotyczą najczęściej ATIII oraz fibrynogenu [38]. Mechanizm tych zaburzeń nie jest do końca poznany. Bushman i wsp. stwierdzili w badaniach *in vitro*, że L-ASPA nie zmniejsza aktywności ATIII w surowicy, natomiast może mieć wpływ na jej wytwarzanie poprzez zaburzenie translacji i/lub sekrecji tego białka w komórkach wątrobowych [25]. Podobnie, Hernandez i wsp. na podstawie badań na linii komórkowej HepG2 oraz na modelu mysim wykazali, że L-ASPA nie ma wpływu na konformację i funkcję dojrzałej ATIII w surowicy, natomiast powoduje wewnątrzkomórkową akumulację nowo zsyntetyzowanej ATIII [33].

Wykazano wpływ wysokości dawki leku na zmniejszenie stężenia fibrynogenu, plazminogenu i $\alpha 2$ -antyplazminy [66, 2], natomiast nie stwierdzono bezpośredniej korelacji pomiędzy aktywnością L-ASPA a poziomem czynników krzepnięcia [65].

Opinie na temat profilaktycznego podawania osocza i koncentratów ATIII w zaburzeniach krzepnięcia towarzyszących leczeniu L-ASPA są podzielone [5, 28, 35, 38, 58]. Matsuzaki i wsp. stwierdzili, że podawanie koncentratu ATIII w dawce 34,5 +/- 7,6 IU/kg zwiększa aktywność ATIII w surowicy o 2+/-0,6% na jednostkę ATIII na kg masy ciała, co może minimalizować ryzyko nadkrzepliwości [58]. Z kolei Hongo i wsp. na podstawie wielośrodkowego badania nie wykazali istotnych pozytywnych efektów profilaktycznego podawania koncentratu ATIII lub świeżo mrożonego osocza w zapobieganiu epizodów zakrzepowych [35]. Najistotniejsze jest ściśle monitorowanie parametrów krzepnięcia i wykonanie badań obrazowych przy wystąpieniu nawet łagodnych objawów neurologicznych w celu wczesnego wykrycia ewentualnych epizodów naczyniowo-mózgowych [45].

W przypadku wystąpienia zakrzepicy konieczne jest przerwanie terapii L-ASPA i wprowadzenie leczenia przeciwkrzepliwego [61]. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych w surowicy dzieci z ALL i niedoborem ATIII spowodowanym leczeniem L-ASPA stwierdzono lepszy efekt przeciwwakrzepowy w przypadku zastosowania bezpośrednich inhibitorów trombiny działających niezależnie od ATIII w porównaniu z heparyną niskocząsteczkową [50]. Przebycie epizodu zakrzepowego nie jest przeciwwskazaniem do stosowania L-ASPA po całkowitym ustąpieniu objawów zakrzepicy [45].

1.2.8.2. Ostre zapalenie trzustki (OZT)

OZT jest znanym powikłaniem leczenia L-ASPA, stwierdzanym z częstością 2-18% [7, 80], jednak patomechanizm tego zaburzenia nie został do końca wyjaśniony. Nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem tego powikłania a liczbą podań i wysokością dawki leku. Prawdopodobnie znaczenie ma indywidualna wrażliwość pacjentów [80]. Postępowanie lecznicze jest standardowe jak w OZT wywołanym innymi przyczynami. Wystąpienie OZT stanowi przeciwwskazanie do kontynuowania leczenia jakąkolwiek formą asparaginazy [7].

1.2.8.3. Dyslipidemia

Asparaginaza w monoterapii lub w połączeniu z prednizonem może powodować zaburzenia metabolizmu lipidów, od hipocholesterolemii i hipotriglicydemii do hipercholesterolemii i hipertriglicydemii [17, 56, 60, 71]. Zwykle są to zaburzenia łagodne i przemijające, jednakże opisano przypadki ciężkiej hipertriglicydemii z towarzyszącym zespołem nadmiernej lepkości wymagające intensywnego leczenia [17]. Parsons i wsp. przeprowadzili seryjnie badania stężeń lipidów i lipoprotein na czczo u dzieci z ALL przed, w trakcie i po leczeniu L-ASPA. Oceniali również populację osób po przebytej w dzieciństwie terapii ALL. Stwierdzono silny czasowy związek pomiędzy leczeniem asparaginazą i hipertriglicydemią, natomiast zmiany stężenia cholesterolu nie wykazywały związku

czasowego z terapią L-ASPA. Średnie szczytowe stężenie triglicerydów podczas leczenia L-ASPA (465 mg/dl) było istotnie wyższe ($p=0,003$) od stężenia przed rozpoczęciem terapii tym lekiem (108 mg/dl). Podczas tego leczenia 67% nowo zdiagnozowanych pacjentów miało stężenie triglicerydów na czczo powyżej 200 mg/dl. Częstość występowania hipertriglicerydemii nie różniła się w zależności od rodzaju stosowanej L-ASPA. Żaden z 7 pacjentów ze stężeniem triglicerydów powyżej 1000 mg/dl nie rozwinął zapalenia trzustki. W grupie osób po przebytych leczeniu ALL nie stwierdzono hipertriglicerydemii. Stężenie lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) było istotnie niższe od wartości prawidłowych w obu badanych populacjach (dzieci w trakcie leczenia ALL oraz osób po przebytej w dzieciństwie terapii ALL); 25% osób z grupy z przebytych leczeniem ALL miało stężenie HDL poniżej 35 mg/dl [71].

1.2.8.4. Hiperglikemia

Leczenie L-ASPA zwłaszcza równoległe z podawaniem glikokortykosterydów może prowadzić do hiperglikemii, a nawet cukrzycy. Powikłanie to występuje u około 1-2% pacjentów. Chorzy mogą wymagać insulinoterapii, ale zwykle jest to zaburzenie przemijające. Patomechanizm hiperglikemii nie został do końca wyjaśniony [8, 36, 82]. Cukrzyca może być także następstwem uszkodzenia trzustki w wyniku polekowego zapalenia [37].

1.2.8.5. Zaburzenia funkcji wątroby

Podobnie jak wiele leków przeciwnowotworowych L-ASPA może powodować uszkodzenie komórek wątroby, objawiające się podwyższeniem aktywności enzymów wątrobowych oraz hiperbilirubinemią. Najczęściej są to zaburzenia łagodne i przemijające, nie wymagają przerywania terapii. Opisywane są jednak pojedyncze przypadki ciężkiego uszkodzenia wątroby, wtedy najczęściej dochodzi do jej stłuszczenia [79].

1.2.8.6. Neutropenia

Chociaż L-ASPA jest uważana za lek stosunkowo mało mielotoksyczny, jednym z powikłań leczenia L-ASPA może być neutropenia. Wykazano, że stopień neutropenii zależy od aktywności L-ASPA w surowicy. Ylikangas i wsp. stwierdzili, że neutropenia była tym cięższa im większe było pole pod krzywą wykresu zależności aktywności enzymu i czasu, jaki upłynął od podania leku i im wyższa była szczytowa aktywność L-ASPA [98].

1.2.8.7. Hiperamonemia

Amoniak jest bezpośrednim produktem rozkładu asparaginy przez L-ASPA. Dotychczas przeprowadzono nieliczne badania oceniające wpływ terapii tym lekiem na stężenie amoniaku w surowicy. Steiner i wsp. ocenili wahania stężenia amoniaku u 10 pacjentów leczonych L-ASPA, stwierdzając w pierwszym dniu po podaniu leku wzrost do stężeń przekraczających 7-krotnie górną granicę normy, a następnie stopniowy spadek do wartości wyjściowych w ciągu kolejnych

2 dni [86]. W badaniu tym nie obserwowano toksyczności dotyczących OUN wywołanych przez hiperamonemię. Ciężką encefalopatię z towarzyszącą znaczną hiperamonemią w następstwie leczenia asparaginazą opisali Leonard i Kay, ale jest to bardzo rzadko występujące powikłanie [54].

1.2.9. Interakcje

Podanie L-ASPA bezpośrednio przed podaniem metotreksatu (MTX) może zredukować tworzenie poliglutaminianu metotreksatu i hamować przebieg cyklu komórkowego w fazie S, czyniąc w ten sposób komórki mniej wrażliwymi na działanie leków. Natomiast komórki białaczkowe stają się bardziej wrażliwe na MTX, jeśli jest on podawany 10 dni po leczeniu L-ASPA. Zastosowanie tego leku bezpośrednio po podaniu MTX jeszcze bardziej zwiększa jego efektywność [55].

Równoczesne leczenie L-ASPA i epipodofilotoksynami (etopozyd, tenipozyd) zwiększa ryzyko hepatotoksyczności, ciężkich powikłań infekcyjnych i wtórnych białaczek. Prawdopodobnie L-ASPA poprzez zmniejszenie całkowitego poziomu białek powoduje zwiększenie ilości niezwiązanych epipodofilotoksyn, zmniejsza ich systemowy klirens i produkcję enzymów naprawczych DNA [73].

Ze względu na działanie hepatotoksyczne L-ASPA może zaburzać klirens wątrobowy winkrystyny (VCR). Dlatego, aby umożliwić metabolizm tego leku i zmniejszyć ryzyko neuropatii związanej z VCR, zaleca się podanie L-ASPA nie wcześniej niż 12 godzin po zastosowaniu VCR [21].

1.2.10. Monitorowanie leczenia

Ze względu na potencjalne toksyczności związane z L-ASPA, a także możliwość wystąpienia cichej inaktywacji skutkującej brakiem właściwego efektu terapeutycznego wskazane jest monitorowanie terapii tym lekiem. Znanych jest kilka metod monitorowania.

1.2.10.1. Pomiar aktywności L-ASPA w surowicy

Do pomiaru aktywności enzymu w surowicy zwykle wykorzystywana jest metoda spektrofotometryczna (przy długości fali 450 nm) z użyciem odczynnika Nesslera (dolna granica oznaczenia – 20 IU/l) [2, 47, 63, 78]. Obecnie coraz częściej do oznaczeń wykorzystuje się szeroko dostępny gotowy test ELISA (test MAAT firmy Medac - granica oznaczeń – 30 IU/l, pomiar przy długości fali 700 nm). Istnieją również dokładniejsze metody (granica oznaczenia 2 IU/l), jednak bardziej skomplikowane i przez to mało przydatne do rutynowych oznaczeń [Tsurusava]. Opisano także enzymatyczną metodę kinetycznego oznaczania aktywności

L-asparaginazy oraz asparaginy za pomocą elektrody wykrywającej lotny amoniak [70, 88].

1.2.10.2. Pomiar stężenia amoniaku jako produktu rozpadu asparaginy

Głównym źródłem amoniaku krążącego we krwi jest przewód pokarmowy. Związek ten powstaje w okrężnicy w wyniku działania bakteryjnych proteaz, ureaz i amiknooksydaz, a także z hydrolizy glutaminy zarówno w jelicie cienkim jak i grubym. Stężenie amoniaku w żyły wrotnej jest 5- do 10-razy wyższe niż w krążeniu systemowym. W normalnych warunkach większość amoniaku jest w hepatocytach metabolizowana w cyklu Krebsa do mocznika. Amoniak może dyfundować biernie do tkanek OUN, co przy znacznej hiperamonemii może doprowadzić do rozwoju encefalopatii. Wśród przyczyn hiperamonemii można wyróżnić wrodzone (niedobory enzymów cyklu mocznikowego) jak i nabyte: niewydolność wątroby oraz niewydolność nerek (poprzez zwiększenie stężenia azotu mocznikowego, który następnie dyfunduje przewodu pokarmowego i jest tam rozkładany do amoniaku). Dodatkowo zwłaszcza u pacjentów z niewydolnością wątroby hiperamonemii mogą sprzyjać: krwawienie z przewodu pokarmowego (produkcja amoniaku przez rozkład białek krwi przez bakterie w jelicie grubym), zwiększenie zawartości białka w diecie, zaparcia, zakażenia, zaburzenia równowagi elektrolitowej i kwasowo-zasadowej oraz niektóre leki [44].

Stwierdzono, że po podaniu L-ASPA występują znaczne wahania stężenia amoniaku, w zakresie wartości przekraczających normę, nawet 7-krotnie [86]. Amoniak powstający jako produkt rozkładu asparaginy przez asparaginazę mógłby służyć do pośredniego oszacowania aktywności L-ASPA we krwi. Oznaczanie stężenia amoniaku jest powszechnie dostępnym, możliwie szybkim do wykonania i stosunkowo tanim badaniem. Dotąd nie opublikowano jednak danych opisujących zależność stężenia amoniaku w surowicy od aktywności asparaginazy. Ponieważ aktywność L-ASPA i produkcja amoniaku utrzymują się *in vitro*, co może prowadzić do zawyżenia wyniku [53], bardzo istotna jest standaryzacja procedur przedanalitycznych. Laterza i wsp. stwierdzili u pacjentów leczonych L-ASPA wzrost stężenia amoniaku w próbówce średnio o 24% w ciągu 12 minut w porównaniu z pomiarem wykonanym zaraz po pobraniu materiału. Istnieją specyficzne inhibitory asparaginazy (13-semialdehyd asparaginowy - ASA, 5-diazo-4-okso-L-norwalina – DONV), których użycie mogłoby całkowicie wyeliminować opisany wyżej błąd, lecz nie są dostępne w komercyjnej sprzedaży [14]. Przed przystąpieniem do monitorowania konieczne jest również oznaczenie wyjściowego stężenia amoniaku we krwi oraz ocena czynności wątroby [53].

1.2.10.3. Pomiar stężenia asparaginy i/lub glutaminy

Metodą stosowaną obecnie jedynie do celów badawczych w terapii L-ASPA jest pomiar stężenia asparaginy i glutaminy, oraz kwasu asparaginowego i glutaminowego [14, 91].

Wykazano, że L-ASPA działa nie tylko na asparaginę, ale również na inny aminokwas - glutaminę, hydrolizując ją do kwasu glutaminowego i amoniaku. Pomiar stężenia aminokwasów odbywa się w oparciu o metodę RP-HPLC, a kwasu asparaginowego i glutaminowego – HPLC [24]. Ograniczeniem tych metod jest ciągła hydroliza asparaginy zachodząca również *ex vivo*, dlatego również przy tej metodzie zaleca się stosowanie inhibitorów L-ASPA (ASA, DONV) [14, 24].

1.2.10.4. Oznaczanie przeciwciał przeciw L-ASPA

Oznaczanie przeciwciał przeciw L-ASPA przy użyciu testu ELISA z wykorzystaniem poliklonanej antyludzkiej surowicy koziej, najczęściej IgG, sprzężonej z peroksydzą chrzanową jest metodą, która może pomóc w wykryciu cichej inaktywacji i przewidywaniu reakcji alergicznych [97].

1.2.10.5. Monitorowanie powikłań leczenia L-ASPA

W celu wczesnego wykrycia działań niepożądanych L-ASPA konieczne jest monitorowanie funkcji wątroby, układu krzepnięcia, enzymów trzustkowych, poziomu glukozy i lipidów. Niezbędna jest także wnikliwa obserwacja pacjentów w kierunku zaburzeń neurologicznych, a w razie ich wystąpienia wykonanie badań obrazowych celem wczesnego rozpoznania ewentualnych powikłań naczyniowo-mózgowych [45].

1.3. Podsumowanie

Pomimo, że L-ASPA jest od wielu lat jednym z podstawowych leków stosowanych w terapii ALL, nadal prowadzone są dyskusje na temat optymalnych schematów stosowania poszczególnych jej preparatów [91]. Nie ma również zadowalających standardów monitorowania terapii tym lekiem. Dotąd nie przedstawiono zależności stężenia amoniaku od aktywności L-ASPA, a ocena tego parametru mogłaby być pomocna w szybkim oszacowaniu aktywności leku. Dlatego podjęto badania w tym temacie.

2. CELE PRACY:

Celem pracy była odpowiedź na następujące pytania:

1. Czy oznaczanie stężenia amoniaku we krwi może służyć do pośredniej oceny aktywności asparaginazy?
2. Czy można wyodrębnić grupy ryzyka występowania powikłań leczenia asparaginazą, szczególnie reakcji nadwrażliwości i dzięki temu zminimalizować ich następstwa?
3. Czy oznaczenia stężenia amoniaku i aktywności ATIII mogą być pomocne w podejmowaniu decyzji o konieczności zmiany preparatu L-ASPA celu zapobiegania reakcji alergicznej i zapewnienia skuteczności leczenia?
4. Czy obniżenie aktywności asparaginazy ma wpływ na wyniki leczenia?

L-ASPA jest od wielu lat stosowana w leczeniu ostrej białaczki i niektórych postaci nieziarnicznych chłoniaków. Pomimo to, nie ma optymalnych standardów monitorowania terapii tym lekiem, zarówno pod względem jego skuteczności, jak i bezpieczeństwa stosowania.

Przeprowadzone badania mają umożliwić opracowanie schematu monitorowania terapii asparaginazą, pozwalającego na optymalizację leczenia i zmniejszenie ryzyka powikłań.

3. PACJENCI I METODY

3.1. Pacjenci

W okresie od czerwca 2005 r. do października 2008 r. w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym (USD) w Krakowie leczeniem według międzynarodowego programu ALL IC-BFM-2002 objęto 97 dzieci z ALL. Do badania dotyczącego oznaczenia aktywności L-ASPA włączono 87 dzieci.

Kryteria kwalifikacji do badania obejmowały:

- Rozpoznanie ostrej białaczki limfoblastycznej z linii prekursorów limfocytów B (BCP-ALL) lub limfocytów T (T-ALL)
- Wiek w momencie rozpoznania powyżej 1 r.ż. i poniżej 18 r.ż.
- Diagnoza ALL postawiona w oparciu o badanie cytomorfologiczne, cytochemiczne oraz immunofenotypowe szpiku kostnego, w korelacji z obrazem klinicznym
- Uzyskanie świadomej zgody na udział w badaniu
- Leczenie według programu ALL IC-BFM-2002
- Uzyskanie materiału (krwi obwodowej) przed rozpoczęciem leczenia L-ASPA oraz 24 godziny i 3 dni po kolejnych podaniach leku w trakcie indukcji (I protokół).

Przedstawiane badanie jest elementem „Programu leczenia dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną ALL IC-BFM-2002”, uzupełnionego o oznaczanie aktywności L-ASPA według metody przedstawionej poniżej. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie (Nr. KBET/393/L/2003 z dn. 27.03.2003 r., z poprawką z dn. 23.06.2005 r.) na przeprowadzenie badań.

Ogólną charakterystykę dzieci przedstawiono w tabelach 1-2. W analizowanej grupie było 45 chłopców (52%) i 42 dziewczynki (48%) w wieku 1,2-17 (mediana: 6, średnia: 7; odchylenie standardowe /SD/: 4,3) lat. U 71 pacjentów (81,6%) rozpoznano common B-ALL (cALL), u 3 (3,4%) pro-B ALL, u 2 (2,3%) przejściową (*transitional*) ALL, a u 11 (12,7%) T-ALL.

Dzieci klasyfikowano do odpowiednich terapeutycznych grup ryzyka na podstawie kryteriów programu ALL IC-BFM-2002, uwzględniających wiek chorego, liczbę leukocytów w krwi obwodowej, obecność niekorzystnych zaburzeń cytogenetycznych oraz odpowiedź na leczenie ocenianą w 8., 15. i 33. dniu leczenia.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna 87 pacjentów ocenianych w badaniu

Parametr		cALL	proB-ALL	Przejęciowa ALL	T-ALL	Razem
Liczba pacjentów (odsetek)		71 (81,6)	3 (3,4)	2 (2,3)	11 (12,7)	87 (100)
Wiek: mediana (zakres) [lata]		5,5 (1,7-17)	14 (3,5-16)	1,5 (1,2-1,9)	7,5 (2-13,5)	6 (1,2-17)
Liczba pacjentów (odsetek)						
Grupa ryzyka	SRG	25 (35)	1 (33)	2 (100)	0	28 (32)
	IRG	31 (44)	2 (67)	0	7 (64)	40 (46)
	HRG	15 (21)	0	0	4 (36)	19 (22)
Zespół Downa		4 (5,6)	0	0	0	4 (4,6)
HSCT w pierwszej linii leczenia		2 (2,8)	0	0	3 (27)	5 (5,7)
Wznowa choroby		4 (5,6)	1 (33)	0	0	5 (5,7)
Progresja choroby, przed uzyskaniem I remisji		1 (1,4)	0	0	0	1 (1,1)
Utrzymująca się I remisja		66 (93)	2 (67)	1 (50)	10 (91)	79 (91)
Utrzymująca się II remisja		3 (4,2)	1 (33)	0	0	4 (4,6)
Utrzymująca się III remisja		1 (1,4)	0	0	0	1 (1,1)
Zgony		1 (1,4)	0	1 (50)	1 (9)	3 (3,4)
• z powodu ALL		0	0	0	0	0
• z powodu powikłań		1 (1,4)	0	1 (50)	1 (9)	3 (3,4)

U 59 chorych (67,8%) w dniu diagnozy liczba leukocytów w krwi obwodowej nie przekraczała 20 000/ μ l. Trzynastu (14,9%) pacjentów źle odpowiedziało na profazę sterydową (>1000 blastów/ μ l w krwi obwodowej w 8. dniu leczenia indukcyjnego). W grupie 71 dzieci z cALL było 4 pacjentów z zespołem Downa. U 12 chorych stwierdzono nieprawidłowy kariotyp komórek białaczkowych (tabela 2.). Niekorzystne zaburzenia genetyczne stwierdzono u 7 dzieci (5 z cALL, 1 z przejściową ALL i 1 z T-ALL), natomiast korzystne aberracje chromosomalne (liczbowe) u 5 pacjentów z cALL. W 2 przypadkach z cALL i 21 z T-ALL stwierdzono oprócz zaburzeń liczby chromosomów również dodatkowe zmiany w zakresie rearanżacji genów (del 12p, t(11;14), t(1;19)). W tabeli nie uwzględniano t(12;21), ponieważ nie wykonywano badań w kierunku tej translokacji metodą FISH.

Tabela 2. Obecność zaburzeń cytogenetycznych w komórkach białaczkowych pacjentów z badanej grupy

Rodzaj zaburzeń chromosomalnych	cALL (n=71)	proB-ALL (n=3)	Przejściowa ALL (n=2)	T-ALL (n=11)	Razem (n=87)
	Liczba pacjentów (odsetek)				
Translokacja BCR/ABL	1 (1,4)	0	0	0	1 (1,1)
Rearanżacja genu MLL	0	0	1 (50)	0	1 (1,1)
Hipoploidia	2 (2,8)	0	0	0	2 (2,3)
Hiperploidia	5 (7)	0	0	0	5 (5,7)
Inne zaburzenia: del12p, t(7;17;19), t(8;14)	2 (2,8)	0	0	1 (9)	3 (3,4)

Spośród 71 badanych pacjentów z cALL 25 zakwalifikowano do grupy standardowego (SRG), 31 do pośredniego (IRG) i 15 do wysokiego ryzyka (HRG). Jedno dziecko z proB-ALL oraz 2 z przejściową postacią ALL należało do SRG, 2 chorych z proB-ALL oraz 7 z T-ALL do IRG, a 4 z T-ALL do HRG (tabela 1.).

W badanej grupie chorych u 5 dzieci doszło do wznowy, u 1 chorego do progresji choroby przed uzyskaniem pierwszej remisji całkowitej. Troje dzieci zmarło z powodu powikłań leczenia.

Allo-HSCT przeprowadzono u 5 dzieci w pierwszej remisji (1 z HRG z cALL, 3 z HRG z T-ALL, 1 z cALL z progresją choroby na początku leczenia).

Obserwację pacjentów zakończono 31.07.2009 roku. Czas obserwacji wynosił 3,5-50 (średnia: 31, mediana: 32) miesięcy. Biorąc pod uwagę dzieci żyjące, czas obserwacji wyniósł 10-50 (średnia: 32, mediana - 33,5) miesięcy. W dniu zakończenia obserwacji 79 dzieci pozostawało w pierwszej remisji choroby; trwającej 8-48 (mediana: 29,5) miesięcy.

3.2. Charakterystyka metody leczenia według programu ALL IC-BFM-2002

Wszystkie objęte badaniem dzieci były leczone według międzynarodowego programu ALL IC-BFM-2002 (ogólny schemat leczenia przedstawiono na rysunku 1.). W tym protokole wyróżnia się kilka etapów postępowania:

- Indukcja (Protokół I) ma za zadanie zniszczenie jak największej liczby komórek nowotworowych.

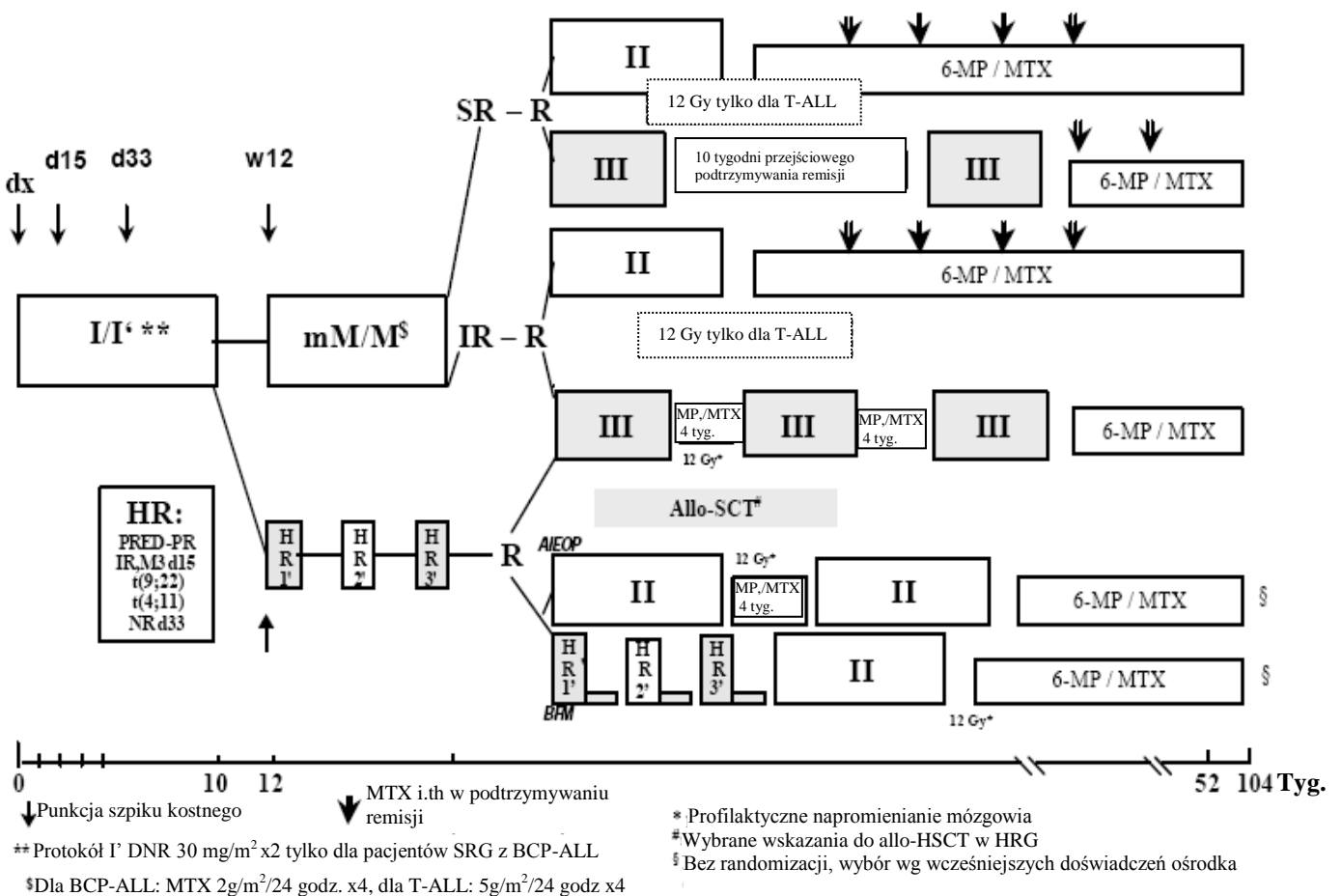
Leki stosowane w indukcji to: prednizon (przez pierwsze 7 dni podawane w monoterapii jako tzw. profaza sterydowa), VCR, daunorubicyna, L-ASPA, cytarabina (ARA-C), cyklofosfamid, 6-merkaptopuryna (6-MP), MTX i.th.

- Konsolidacja (Protokół mM lub M) z MTX w postaci dożylniej (w dawce 2 lub 5 g/m²) i dokanałowej oraz z 6-MP lub bloki HR1, HR2, HR3.
- Reindukcja (Protokół II lub III, Protokół HR1, HR2, HR3) oraz leczenie podtrzymujące remisję mają na celu usunięcie jak największej liczby pozostałych komórek białaczkowych.

Leki stosowane w reindukcji: deksametazon, doksorubicyna, L-ASPA, cyklofosfamid, ARA-C, 6-tioguanina, MTX i.th.

- Leki stosowane w trakcie podtrzymywania remisji: 6-MP i MTX w formie doustnej.

Rysunek 1. Ogólny schemat programu leczenia ALL IC-BFM 2002



W trakcie leczenia prowadzone było postępowanie zapobiegające rozwinięciu się jawnej białaczki OUN, polegające na stosowaniu leków do kanału rdzeniowego i dożylnie MTX w wysokich dawkach. W przypadku zajęcia OUN oraz u dzieci, u których istnieje wysokie ryzyko rozwoju wznowy choroby w OUN przeprowadzano napromienianie mózgowia.

W zależności od zakwalifikowania pacjenta na podstawie standardowych czynników prognostycznych do odpowiedniej grupy ryzyka, określającej zagrożenie wznową choroby, prowadzona była odpowiednio intensywna terapia.

Wszyscy pacjenci niezależnie od grupy ryzyka otrzymywali 9-tygodniowe leczenie indukcyjne. Po 2 tygodniach przerwy w leczeniu od 12 tygodnia terapii (78 dzień leczenia) pacjenci z grup SRG i IRG rozpoczynali leczenie konsolidacyjne (8 tygodni) polegające na stosowaniu MTX 5 g/m² i 2 g/m² odpowiednio u chorych z T-ALL i BCP-ALL. U dzieci z grupy HRG terapia konsolidacyjna składała się z 3 bloków wielolekowej chemioterapii. Po 2 tygodniach przerwy od leczenia konsolidacyjnego wszyscy chorzy z wyjątkiem podgrupy HRG B otrzymywali podobny schemat leczenia reindukcyjnego (różnice wynikały z randomizacji do

odpowiedniej podgrupy ryzyka w ramach programu badawczego ALL IC-BFM-2002 oceniającego efekt terapeutyczny w zależności od intensywności terapii reindukcyjnej w obrębie tych samych grup ryzyka). Leczenie podtrzymujące remisję, identyczne dla wszystkich grup ryzyka, kontynuowano do 2 lat od początku leczenia. Dzieci, u których wykonano allo-HSCT nie miały leczenia podtrzymującego remisję.

Wskazania do allo-HSCT obejmowały:

- chorych o słabej odpowiedzi na steroidoterapię u chorych z T-ALL lub proB-ALL, lub ze wstępną liczbą leukocytów powyżej 100 000/ μ l lub z obecnością genu BCR/ABL lub MLL/AF4
- chorych o dobrej odpowiedzi na steroidoterapię z obecnością genu BCR/ABL
- chorych, którzy nie osiągnęli z remisji w dniu 33.

Od 2007 roku wskazania do allo-HSCT zostały rozszerzone.

3.3. Zastosowanie L-ASPA w programie ALL IC-BFM-2002

L-asparaginaza podawana była w trakcie leczenia indukcyjnego (protokół I), reindukcyjnego (protokoły II i III) oraz w blokach HR (tabela 3.).

Pacjenci wstępnie otrzymywali L-ASPA firmy Medac, w protokole I: 8 podań w dawce 5000 IU/m² *i.v.*, w protokole II, III(1), III(2) i III(3): po 4 podania w dawce 10000 IU/m² *i.v.* oraz w blokach HR dwukrotnie w dawce 25000 IU/m² *i.v.* Protokoły w trakcie, których stosowano L-ASPA przedstawiono w tabeli 3. W przypadku wystąpienia reakcji alergicznej stosowano postać pegylowaną (Oncaspar) w dawce 1000 IU/m², w protokole I: 1- lub 2-krotnie (w zależności od momentu wystąpienia reakcji alergicznej) zamiast 4-8 podań L-ASPA Medac, w protokołach II lub III: jednorazowo zamiast 4 podań L-ASPA Medac, w przypadku bloków HR jednorazowo zamiast 2 podań L-ASPA Medac. U pacjentów uczulonych również na tę formę L-ASPA stosowano Erwinazę w dawce 10000 IU/m², w protokole I: 6 podań co drugi dzień zamiast czterech L-ASPA Medac; w protokołach II lub III: 7 podań co drugi dzień zamiast czterech L-ASPA Medac; w przypadku bloków HR: 6 podań co drugi dzień zamiast dwóch L-ASPA Medac.

Tabela 3. Protokoły, w trakcie których podawana była L-ASPA

Protokół I	Metotreksat i.th.	1., 12., 33., 45., 59. dzień (przy zajęciu OUN dodatkowo dzień 18. i 27.)
	Prednizon	60 mg/m ² /dobę – 1.-7.↑ ; 8.-28.; od 29. dnia ↓
	Winkrystyna	1,5 mg/m ² /dobę – 8., 15., 22., 29. dzień
	Daunorubicyna	30 mg/m ² /dobę – 8., 15., 22., 29. dzień (T-ALL), 8. i 15. dzień (SR – BCP ALL)
	L-asparaginaza	5000 IU/m²/dobę – 12., 15., 18., 21., 24., 27., 30., 33. dzień
	Cyklofosamid	1000 mg/m ² /dobę – 36. i 63. dzień
	Cytarabina	75 mg/m ² /dobę – 38.-41., 45.-48., 52.-55., 59.-62. dzień
	6-merkaptopuryna	60 mg/m ² /dobę – 36.-63. dzień
Protokół II	Deksametazon	10 mg/m ² /dobę – 1.-21. dzień.
	Winkrystyna	1,5 mg/m ² /dobę – 8., 15., 22., 29. dzień
	Doksorubicyna	30 mg/m ² /dobę – 8., 15., 22., 29. dzień
	L-asparaginaza	10000 IU/m²/dobę – 8., 11., 15., 18. dzień
	Cyclofosamid	1000 mg/m ² /dobę – 36. dzień
	6-tioguanina	60 mg/m ² /dobę – 36.-49. dzień
	Cytarabina	75 mg/m ² /dobę – 38.-41., 45.-48. dzień
	Metotreksat i.th.	38. i 45. dzień (dla OUN 2/3 – dodatkowo 1. i 8. dzień)
Protokół III	Deksametazon	10 mg/m ² /dobę – 1.-14. dzień
	Winkrystyna	1,5 mg/m ² /dobę – 1. i 8. dzień
	Doksorubicyna	30 mg/m ² /dobę – 1. i 8. dzień
	L-asparaginaza	10000 IU/m²/dobę – 1., 4., 8., 11. dzień
	Cyclofosamid	500 mg/m ² /dobę – 15. dzień
	6-tioguanina	60 mg/m ² /dobę – 15.-28. dzień
	Cytarabina	75 mg/m ² /dobę – 17.-20., 24.-27. dzień
	Metotreksat i.th.	17. i 24. dzień (przy zajęciu OUN dodatkowo dzień 1.)
HR 1	Deksametazon	20 mg/m ² /dobę – 1.-5. dzień
	Winkrystyna	1,5 mg/m ² /dobę – 1. i 6. dzień
	Metotreksat	5000 mg/m ² /dobę – 1. dzień
	Cyclofosamid	5x200 mg/m ² co 12 godzin – 2.-4. dzień
	Cytarabina	2x2000 mg/m ² co 12 godzin – 5. dzień
	L-asparaginaza	25000 IU/m²/dobę – 6. i 11. dzień
	Metotreksat i.th.	1. dzień
	Cytarabina i.th.	1. dzień
	Prednizolon i.th.	1. dzień
HR 2	Deksametazon	20 mg/m ² /dobę – 1.-5. dzień
	Windezyna	3 mg/m ² /dobę – 1. i 6. dzień
	Metotreksat	5000 mg/m ² /dobę – 1. dzień
	Ifosfamid	5x800 mg/m ² co 12 godzin – 2.-4. dzień
	Daunorubicyna	30 mg/m ² co 12 godzin – 5. dzień
	L-asparaginaza	25000 IU/m²/dobę – 6. i 11. dzień
	Metotreksat i.th.	1. dzień
	Cytarabina i.th.	1. dzień
	Prednizolon i.th.	1. dzień
HR 3	Deksametazon	20 mg/m ² /dobę – 1.-5. dzień
	Cytarabina	4x2000 mg/m ² co 12 godzin – 1. i 2. dzień
	L-asparaginaza	25000 IU/m²/dobę – 6. i 11. dzień
	Etopozyd	5x100 mg/m ² – 3.-5. dzień
	Metotreksat i.th.	1. dzień
	Cytarabina i.th.	1. dzień
	Prednizolon i.th.	1. dzień

3.4. Ocena działań niepożądanych

W trakcie realizacji każdego cyklu leczenia częstość występowania powikłań po zastosowaniu L-ASPA oceniano na podstawie objawów klinicznych oraz badań laboratoryjnych z wykorzystaniem kryteriów stopni toksyczności WHO (tabela 4.).

Tabela 4. Kryteria stopni toksyczności leczenia wg WHO

Oceniany parametr (zakres normy)	Stopień 1	Stopień 2	Stopień 3	Stopień 4
APPT (25-45sek)	1.01 -1.66 x GGN (45-75 sek)	1.67 - 2.33 x GGN (75-105 sek)	2.34 - 3 x GGN (105-135 sek)	> 3 x GGN (>135 sek)
Fibrynogen (1,8-3,5 g/l)	0.75 - 0.99 X DGN (1,35-1,8 g/l)	0.50 - 0.74 x DGN (0,9-1,35 g/l)	0.25 - 0.49 x DGN (0,45-0,9 g/l)	< 0.25 x DGN (<0,45 g/l)
D-dimery	20-40 mg/l	41-50 mg/l	51-60 mg/l	> 60 mg/l
AST (14-59 IU/l)	1.25 - 2.5 x GGN (75-150 IU/l)	2.6 - 5 x GGN (150-300 IU/l)	5.1 - 10 x GGN (300-600 IU/l)	> 10 x GGN (>600 IU/l)
ALT (11-66 IU/l)	1.25 - 2.5 x GGN (82,5-165 IU/l)	2.6 - 5 x GGN (165-330 IU/l)	5.1 - 10 x GGN (330-660 IU/l)	> 10 x GGN (>660 IU/l)
Amylaza (30-110/l)	1.1 - 1.5 x GGN (110-165 IU/l)	1.6 - 2.0 x GGN (165-220 IU/l)	2.1 - 5.0 x GGN (220-550 IU/l)	> 5.1 x GGN >550 IU/l
Bilirubina (3-22 μmol/l)	1.1 - 1.5 x GGN (24-33 μmol/l)	1.6 - 2.5 x GGN (33-55 μmol/l)	2.6 - 5 x GGN (55-110 μmol/l)	> 5 x GGN >110 μmol/l
Mocznik (2,5-7,1 mmol/l)	1.25 - 2.5 x GGN (8,9-17,7 mmol/l)	2.6 - 5 x GGN (17,7-35,5 mmol/l)	5.1 - 10 x GGN (35,5-71 mmol/l)	> 10 x GGN >70 mmol/l
Kreatynina	1.1 x 1.5 x GGN	1.6 - 3.0 x GGN	3.1 - 6 x GGN	> 6 x GGN lub konieczność dializy
Reakcja alergiczna	Świąd bez wysypki	Zlokalizowana pokrzywka	Uogólniona pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy	Wstrząs anafilaktyczny

GGN – górna granica normy

DGN – dolna granica normy

3.5. Ocena wyników leczenia

Wyniki leczenia indukcyjnego oceniano na podstawie odsetka blastów w szpiku kostnym w 33. dniu protokołu I.

Całkowitą remisję definiowano jako:

1. szpik M1: < 5% z prawidłową lub tylko nieznacznie zmniejszoną komórkowością, z cechami odnowy hematopoezy
2. brak zlokalizowanych nacieków białaczkowych w badaniu klinicznym i/lub badaniach obrazowych
3. brak komórek białaczkowych w PMR uzyskanym w czasie terapeutycznej punkcji w 33. dniu leczenia.

Oszacowano następujące czasy przeżycia:

- czas przeżycia całkowitego (OS - *overall survival*) – obliczony od daty rozpoczęcia leczenia do daty zakończenia obserwacji lub zgonu
- czas przeżycia wolnego od niekorzystnych wydarzeń (EFS – *event free survival*) – obliczony od daty rozpoczęcia leczenia do daty zakończenia obserwacji lub wystąpienie niekorzystnego wydarzenia (wstępna progresja, wznowa, zgon z jakiegokolwiek powodu)
- czas przeżycia wolnego od choroby (DFS – *disease free survival*) - obliczony od daty rozpoczęcia leczenia do daty zakończenia obserwacji lub wystąpienia niepowodzenia leczenia (wznowa lub wczesna progresja choroby stwierdzona przed uzyskaną remisją)
- czas przeżycia wolnego od wznowy (RFS - *relapse free survival*) - obliczony od daty uzyskania remisji do daty zakończenia obserwacji lub daty wznowy choroby (dotyczy pacjentów, którzy uzyskali wcześniej remisję całkowitą).

Badania porównawcze wykonano tylko w zakresie wpływu niskich (poniżej 100 IU/l) oraz nieoznaczalnych (<30 IU/l) aktywności L-ASPA i reakcji alergicznej na DFS.

3.6. Badania laboratoryjne

3.6.1. Oznaczanie aktywności asparaginazy

Krew do oznaczenia aktywności L-ASPA pobierano przed każdym kolejnym podaniem leku w I protokole. Zgodnie z programem leczenia odstępy pomiędzy dawkami wynosiły 3 dni. Po odwirowaniu osocze mrożono w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu wykonania badania. Oznaczenie aktywności L-ASPA wykonywano w Zakładzie Biochemii Klinicznej USD w Krakowie przy użyciu testu MAAT (Medac Asparaginase-Aktivitäts-Test) firmy Medac.

Test opierał się na rozkładzie przez zawartą w badanej próbce asparaginazę substratu, analogu asparaginy, do dwóch produktów. Jeden z produktów po połączeniu z chromogenem tworzył barwny kompleks, który był mierzony spektrofotometrycznie.

W skład zestawu wchodziły:

1.4. mikro płytki: 6x8 dołków

1.5. kontrola: 2 fiołki po 0,5 ml każda, zawierające liofilizowaną Asparaginazę Medac pochodząca z *E. coli*. w surowicy ludzkiej

1.6. kalibratory: po 0,5 ml każdy, zawierające liofilizowaną Asparaginazę Medac pochodząca z *E. coli*. w surowicy ludzkiej o określonej aktywności: 600 IU/l, 300 IU/l, 50 IU/l, 0 IU/l

2. rozcieńczalnik oznaczanych próbek: 110 ml, PBS/TWEEN/BSA, o pH 7,2-7,4, gotowy do użycia, zawierający ProClin™ 300

3. substrat: 2 fiołki po 0,75 ml każda, gotowe do użycia, zawierające ProClin™ 300

4. chromogen: 2 fiołki po 1 ml każda, skoncentrowane, zawierające dwumetylosulfotlenek

5. rozcieńczalnik chromogenu: 2 fiołki po 2 ml każda, gotowe do użycia.

Wykonanie oznaczenia

Próbki osocza rozcieńczano w stosunku 1:10 za pomocą zawartego w zestawie rozcieńczalnika. Kontrolę i kalibratory przygotowano dodając do liofilizatów po 0,5 ml rozcieńczalnika. Do dołków mikro płytki nakładano pipetą po 20 µl roztworów kontroli, kalibratorów i badanych próbek. Następnie do każdego dołka dodawano po 20 µl substratu. Przykrytą mikro płytkę inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej (22°C). Po tym czasie do wszystkich dołków mikro płytki dodano po 100 µl przygotowanego przez rozcieńczenie w stosunku 1:2 chromogenu i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej (22°C) przez 60 minut. Po zakończeniu inkubacji natychmiast dokonywano odczytu za pomocą spektrofotometru (czytnik płytek Microplate Manager Version 5.2 User Guide Benchmark firmy BIO-RAD) przy długości fali 700 nm. Aktywność L-ASPA odczytywano z krzywej kalibracyjnej.

Zakres oznaczenia aktywności wynosił 30-600 IU/l. W przypadku aktywności powyżej progu oznaczenia, próbkę rozcieńczano i ponownie oznaczano aktywność. Aktywność poniżej progu oznaczalności (<30 IU/l) do celów analizy statystycznej traktowano jako 0 IU/l.

Aktywność terapeutyczną L-ASPA przyjęto jako aktywność powyżej 100 IU/l.

3.6.2. Oznaczanie stężenia amoniaku

Poziom amoniaku oznaczano przed każdą dawką oraz 24 godziny po podaniu leku. Krew pobierano do kapilary heparynizowanej (heparyna litowa), transportowano na lodzie do laboratorium Zakładu Biochemii Klinicznej USD w Krakowie, gdzie natychmiast wykonywano oznaczenie (analizator Vitros, metoda suchej chemii), aby zminimalizować efekt działania asparaginazy *in vitro*.

3.6.3. Inne badania laboratoryjne

Badania biochemiczne (aktywność AST, ALT, stężenie bilirubiny całkowitej, mocznika, kreatyniny, amylazy i białka całkowitego) wykonywano w Zakładzie Biochemii Klinicznej USD w Krakowie przed każdym podaniem L-ASPA. Parametry krzepnięcia (APTT, ATIII, fibrynogen, PT, INR oraz D-dimery) oceniano 24 godziny po każdej dawce L-ASPA.

3.6.4. Oznaczenie przeciwciał przeciw L-asparaginazie

Badanie stężenia przeciwciał przeciw L-ASPA w klasie IgG, IgM i IgE wykonano metodą ELISA w Klinice Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Ogółem wykonano 35 oznaczeń u 21 pacjentów, w tym 15 przed 3. dawką leku i 20 przed ostatnią (8.) dawką leku w I protokole. Wynik dodatni definiowano jako stężenie przeciwciał powyżej 31,67 µg/ml dla klasy IgG, powyżej 4,81 µg/ml dla klasy IgM i powyżej 1,04 µg/ml dla klasy IgE.

3.7. Ocena przyrostu stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA do osocza w badaniu *in vitro*

Od 2 zdrowych osób pobrano po 20 ml krwi do probówek heparynizowanych oraz zawierających EDTA. Krew odwirowano odpowiednio natychmiast po pobraniu, 30 minut po pobraniu oraz 60 minut po pobraniu. Niezwłocznie po odwirowaniu oznaczano poziom amoniaku następnie do 2,5 ml osocza dodawano po 0,025 IU L-ASPA i oznaczano poziom amoniaku w czasie 0, po 10, 30, 45 i 60 minutach. Porównywano uzyskane wyniki w zależności od zastosowanego antykoagulantu oraz czasu, jaki upłynął od pobrania krwi do jej odwirowania i dodania L-ASPA.

3.8. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu arkuszy kalkulacyjnych Microsoft Excel (statystyka opisowa) oraz pakietu STATISTICA 8.

Ze względu na brak rozkładu normalnego cech mierzalnych (ocena z użyciem testu

Shapiro-Wilka) zastosowano testy nieparametryczne. Ocena wzrostu stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA została dokonana z użyciem testu kolejności par Wilcoxa. Za pomocą testu U Manna-Whitneya przeprowadzono analizę porównawczą wartości mierzalnych (parametry biochemiczne, poziom przeciwciał, ilość blastów w 33. dniu) w dwóch grupach (m.in. pacjenci z terapeutyczną i obniżoną aktywnością L-ASPA oraz z reakcją alergiczną i bez reakcji alergicznej). W przypadku analizy wartości mierzalnych w wielu grupach (m.in. poszczególne zakresy aktywności L-ASPA i ATIII) stosowano test ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Zależność pomiędzy aktywnością L-ASPA a stężeniem amoniaku, innymi parametrami biochemicznymi oraz stężeniem przeciwciał oceniono poprzez analizę korelacji Spearmana. Analizy porównawczej cech niemierzalnych wykonano przy użyciu testu niezależności chi-kwadrat, w określonych przypadkach stosowano test V-kwadrat, test chi-kwadrat z poprawką Yatesa lub dokładny test Fishera. Przyrost stężenia amoniaku w czasie w badaniu *in vitro* oceniono za pomocą układu ANOVA z powtarzanymi pomiarami.

Analizę funkcji przeżycia przeprowadzono za pomocą oceny krzywych przeżycia metodą Kaplana-Meiera. Dla porównania grup użyto testu log-rank.

Wartość testów diagnostycznych (pomiaru stężenia amoniaku oraz aktywności ATIII) w wyodrębnianiu pacjentów z niską (poniżej 100 IU/l) i nieoznaczalną (poniżej 30 IU/l) aktywnością L-ASPA oraz zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej oceniono za pomocą analizy krzywych ROC. Powierzchnia pola pod krzywą ROC określa trafność testu (wysoka: >0,9; umiarkowana: 0,7-0,9; niska: 0,5-0,7; brak przydatności testu: <0,5) [4]. Jako optymalny punkt odcięcia przyjęto poziom wyznaczony przez wskaźnik J Youdena ($J = \max \{ \text{czułość} + \text{swoistość} - 1 \}$) [4]. Dla wyznaczonego punktu odcięcia określono:

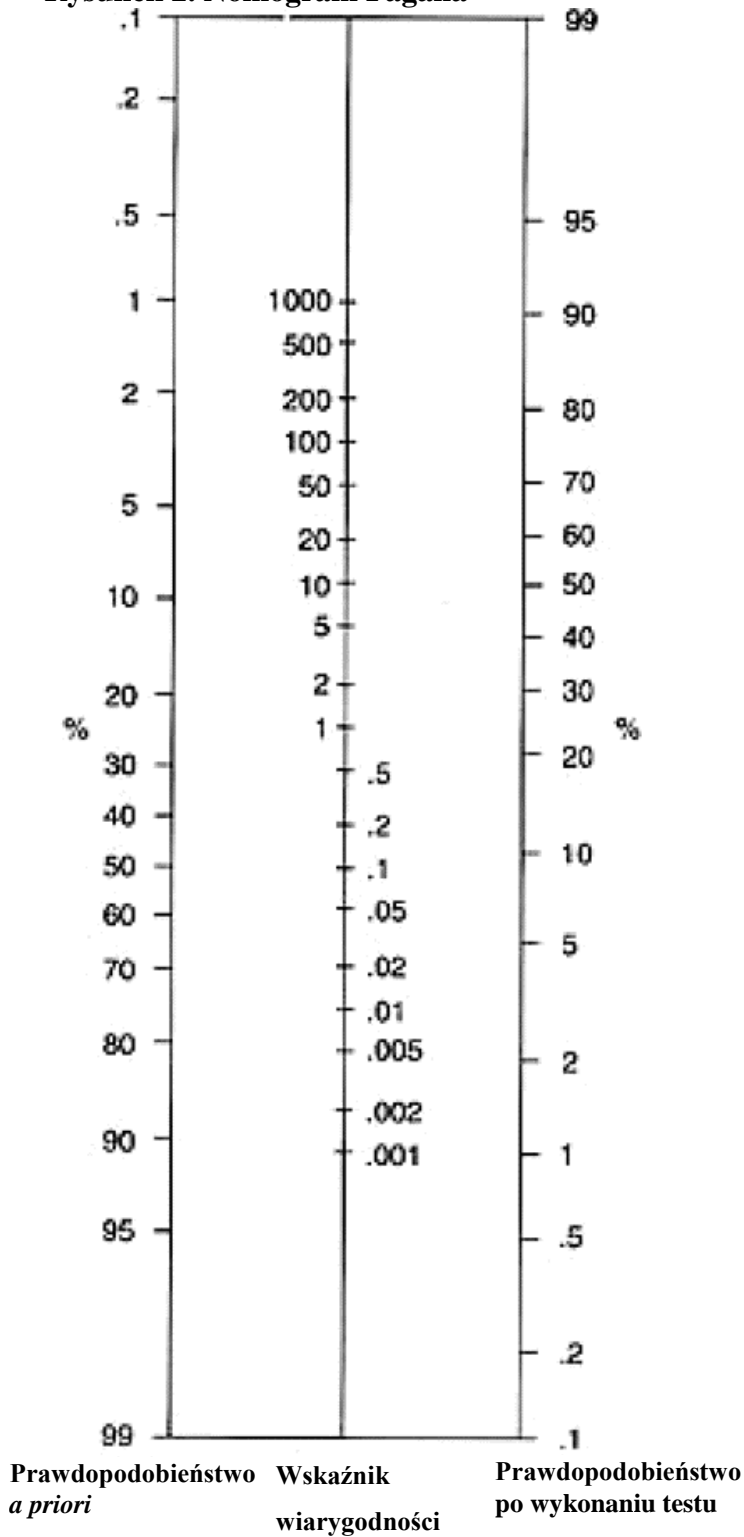
- czułość (odsetek wyników dodatnich wśród osób, u których występuje diagnozowany stan)
- swoistość (odsetek wyników ujemnych u osób, u których nie występuje diagnozowany stan)
- wartości predykcyjne (ang. *predictive value* – PV) wyniku dodatniego i ujemnego (odsetek wyników prawdziwych odpowiednio wśród wyników dodatnich lub ujemnych)
- wskaźniki wiarygodności (ang. *likelihood ratios* – LR) wyniku dodatniego i ujemnego (zdolność wyniku testu do zmiany prawdopodobieństwa obecności określonego stanu).

Na podstawie nomogramu Fagana (rysunek 2.), posługując się prawdopodobieństwem *a priori* (ang. *pre-test probability*) wystąpienia danego stanu (niskich lub nieoznaczalnych aktywności L-ASPA oraz reakcji nadwrażliwości) oraz wskaźnikami wiarygodności testu, określono prawdopodobieństwo obecności diagnozowanego stanu po wykonaniu testu [3]. Jako prawdopodobieństwo *a priori* uznano częstość występowania określonego stanu w obserwowanej grupie (aktywność L-ASPA poniżej 100 IU/l – 21%; aktywność L-ASPA <30 IU/l – 8%;

wystąpienie reakcji alergicznej – 48%).

Jako poziom istotności przy testowaniu hipotez statystycznych przyjęto $\alpha=0,05$. Przy wartości pomiędzy 0,05 a 0,1 wyniki interpretowano jako istnienie trendu.

Rysunek 2. Nomogram Fagana



4. WYNIKI

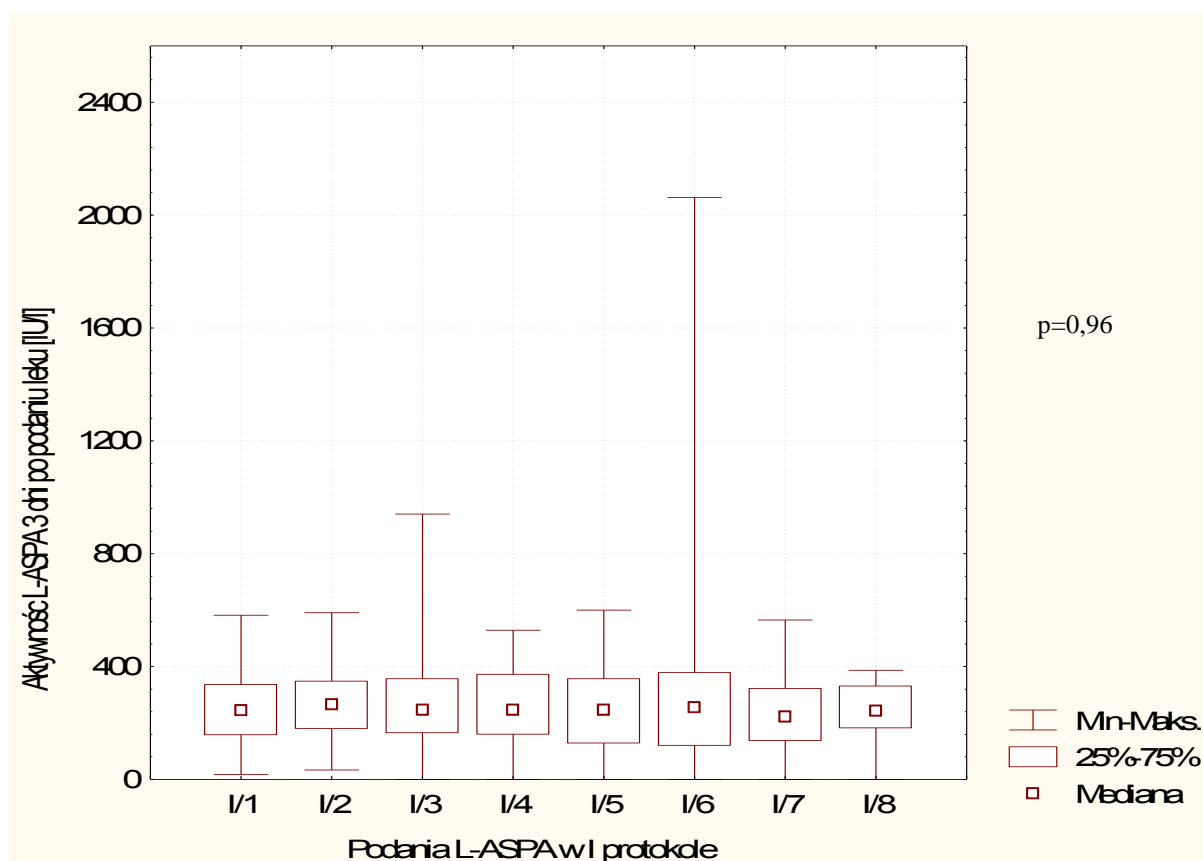
4.1. Realizacja protokołu

Spośród 87 włączonych do badania pacjentów 84 zakończyło wszystkie przewidziane w programie ALL IC-BFM-2002 cykle terapii L-ASPA. Dwoje dzieci zmarło przed ukończeniem leczenia L-ASPA, w trakcie realizacji bloków HR. Jeden pacjent, u którego po 7. podaniu L-ASPA z protokołu I wystąpiło OZT, został zdyskwalifikowany z dalszego stosowania tego leku. U 45 (52%) pacjentów stwierdzono przynajmniej 1 dłuższe niż 1 dzień opóźnienie w podaniu L-ASPA, u 12 (14%) osób było więcej niż 1 takie opóźnienie. Opóźnienia ≥ 7 dni wystąpiły u 19 (22%) pacjentów. Wszystkie opóźnienia wynikały z wystąpienia powikłań leczenia, najczęściej zakażeń.

4.2. Aktywność L-ASPA

Obserwowani pacjenci w ramach I protokołu otrzymali łącznie 668 podań L-ASPA Medac. Wykonano 404 oznaczenia aktywności L-ASPA, w tym 374 w 3-dniowym odstępie od podania leku. Braki oznaczeń wynikały ze względów organizacyjnych (m.in. podania leków przypadające na dni wolne od pracy, zbyt mała objętość krwi pobranej od pacjenta). Średnia aktywność L-ASPA we wszystkich oznaczeniach wynosiła 236 (odchylenie standardowe - SD: 173), mediana 227 (zakres: 0-2063) IU/l, dla oznaczeń wykonywanych 3 dni po podaniu L-ASPA średnia aktywność wynosiła 257 (SD: 168), mediana – 248 (zakres: 0-2063) IU/l, a powyżej 3 dni (4-19, mediana 6 dni) średnia – 62 (SD: 106), mediana – 12 (zakres: 0-572) IU/l. Nie stwierdzono istotnych różnic aktywności L-ASPA oznaczanej 3 dni po podaniu kolejnych dawek leku w czasie realizacji I protokołu (rysunek 3.).

Rysunek 3. Aktywność L-ASPA po poszczególnych podaniach leku w I protokole



Podanie L-ASPA	I/1	I/2	I/3	I/4	I/5	I/6	I/7	I/8
Mediana aktywności L-ASPA [IU/l]	244	266	247	247	247	255	222	243

W 78 % oznaczeń przed podaniem L-ASPA stwierdzono aktywność leku powyżej 100 IU/l, a w 90% oznaczeń powyżej 30 IU/l. Najczęstszą przyczyną niskiej aktywności L-ASPA (≤ 100 IU/l) oznaczanej przed kolejną dawką leku było opóźnienie w podaniu L-ASPA. W przypadku odstępu dłuższego niż 6 dni aktywność była już nieznaczalna we wszystkich wykonanych badaniach. Biorąc pod uwagę pomiary aktywności dokonywane w odstępie 3 dni od podania L-ASPA aktywność poniżej 100 IU/l stwierdzono łącznie w 59 (16%) spośród 374 badanych próbek, u 19 (21%) z 87 pacjentów, u których wykonano oznaczenia aktywności L-ASPA. W 15 (4%) próbkach aktywność była nieznaczalna (< 30 IU/l). Dotyczyło to 7 (8%) dzieci. W tabeli 5. przedstawiono charakterystykę pacjentów z niską aktywnością L-ASPA. Grupa ta nie różniła się istotnie pod względem płci, wieku, fenotypu białaczki oraz grupy ryzyka od grupy pacjentów z terapeutyczną aktywnością leku. Znamiennych różnic nie stwierdzono również pomiędzy chorymi z nieznaczalną aktywnością L-ASPA w przynajmniej 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku a chorymi z aktywnością powyżej 30 IU/l we wszystkich oznaczeniach w 3 dniowym odstępie od podania leku. Porównanie grup pacjentów z niską i terapeutyczną aktywnością L-ASPA przedstawiono w tabeli 6., a w tabeli 7. porównano grupy chorych z nieznaczalną aktywnością L-ASPA i aktywnością leku powyżej 30 IU/l.

Tabela 5. Pacjenci z niską aktywnością L-ASPA

L.p.	Pacjent	Zakres aktywności L-ASPA 3 dni po podaniu leku [IU/l]	Liczba oznaczeń L-ASPA ≤100 U/l (<30 IU/l)	Liczba opóźnień w podaniach L-ASPA > 1 dnia	Średnie stężenie amoniaku [μmol/l]			Przeciwciała przeciw L-ASPA		Reakcja alergiczna
					24 godziny po podaniu L-ASPA	3 dni po podaniu L-ASPA	Przyrost po podaniu L-ASPA	Przed 3. podaniem L-ASPA	Przed 8. podaniem L-ASPA	
1	B.A.	<30-298	4/6 (4)	1	42	23,5	31	b.d.	b.d.	+
2	C.A.	35,2-263	3/6	-	110	25,9	81,3	b.d.	b.d.	+
3	G.N.	45-128	5/6	-	70	35	36	b.d.	b.d.	+
4	G.D.	<30-202	4/7 (2)	-	89	27	61,6	b.d.	b.d.	+
5	L.M.	71-114	4/6	-	43	16	20	b.d.	b.d.	-
6	Sl.J.	<30-222	4/5 (1)	1	90	27	63,6	b.d.	b.d.	+
7	D.D.	41-159	2/3	2	75	33	25,8	b.d.	b.d.	+
8	S.P.	33-107	3/4	1	113	34	80,2	b.d.	b.d.	-
9	K.J.	<30-659	2/6 (2)	-	81	32	45,4	b.d.	IgM(+) IgG (+) IgE (+)	+
10	Pi.M.	65-291	1/4	-	63	21	16,7	b.d.	b.d.	-
11	Po.M.	76-259	1/6	-	62	30	30,8	b.d.	b.d.	-
12	G.M.	51-121	2/3	1	56	31	17	IgM (+) IgG (+) IgE (-)	IgM (+) IgG (+) IgE (-)	+
13	Sr.J.	<30	4/4 (4)	1	46	20	26	IgM (+) IgG (+) IgE (+)	IgM (+) IgG (+) IgE (+)	+
14	Ł.J.	<30-69	5/5 (2)	-	53	12	42	b.d.	b.d.	+
15	S.A.	72-137	2/4	1	70	10	53	b.d.	b.d.	+
16	K.D.	<30-333	1/2 (1)	3	74	32	35	b.d.	b.d.	+
17	B.D.	71-196	1/3	2	91	27	67	b.d.	b.d.	+
18	W.M.	38-138	3/5	-	84	30	64	IgM (+) IgG (-) IgE (-)	IgM (+) IgG (-) IgE (-)	+
19	Pa.M.	83-212	1/4	1	69	21	70	b.d.	b.d.	L-ASPA przeciw-wskazana po OZT

L-ASPA – L-asparaginaza

b.d. – brak danych

OZT – ostre zapalenie trzustki

Tabela 6. Porównanie grup pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (>100 IU/l) aktywnością L-ASPA

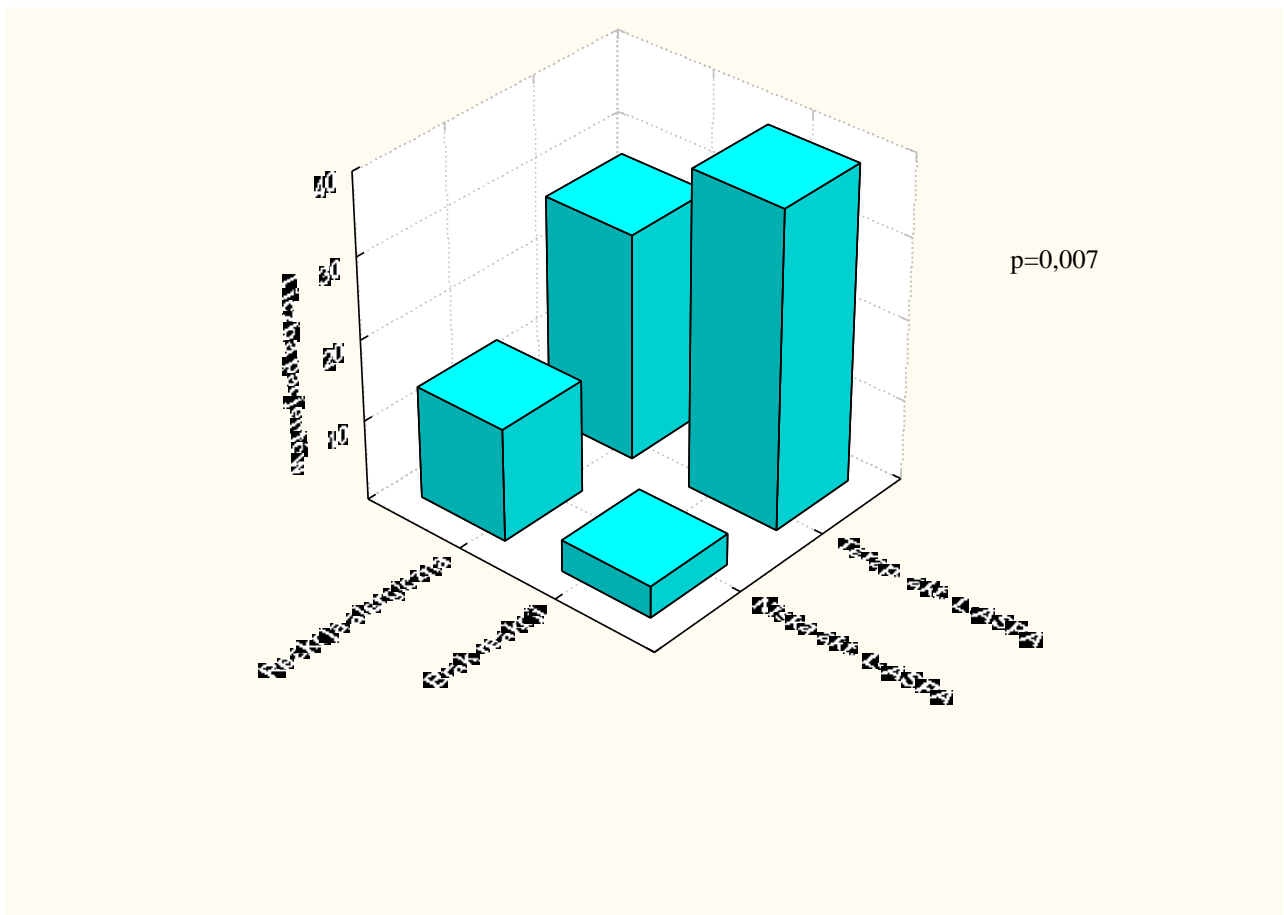
Grupa pacjentów	Wiek [lata]: mediana (zakres)	Płeć		Fenotyp białaczki				Grupa ryzyka		
		M	K	cALL	proB ALL	Przejścio- wa ALL	T-ALL	SR	IR	HR
	Liczba (odsetek) pacjentów									
Pacjenci z niską aktywnością L-ASPA (n=19)	5,5 (1-13)	9 (47)	10 (53)	14 (74)	0	1 (5)	4 (21)	6 (31,5)	9 (47,5)	4 (21)
Pacjenci z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (n=68)	6 (2-17)	37 (54)	31 (46)	57 (74)	3 (4,5)	1 (1,5)	7 (10)	22 (32,5)	31 (45,5)	15 (22)
p	0,86	0,59		0,51				0,99		

Tabela 7. Porównanie grup pacjentów z nieoznaczalną (<30 IU/l) aktywnością L-ASPA i aktywnością powyżej 30 IU/l.

Grupa pacjentów	Wiek [lata]: mediana (zakres)	Płeć		Fenotyp białaczki				Grupa ryzyka		
		M	K	cALL	proB	Przejścio- wa ALL	T-ALL	SR	IR	HR
	Liczba (odsetek) pacjentów									
Pacjenci z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA (n=7)	5,5 (2,5-8)	2 (28,5)	5 (71,5)	7 (100)	0	0	0	4 (57)	2 (29)	1 (14)
Pacjenci z aktywnością L-ASPA >30 IU/l (n=80)	6 (1-17)	44 (55)	36 (45)	64 (80)	3 (3,75)	2 (2,5)	11 (13,75)	24 (30)	38 (47,5)	18 (22,5)
p	0,50	0,34		0,79				0,34		

Stwierdzono, że w grupie 18 pacjentów z niską aktywnością L-ASPA (≤ 100 IU/l) w przynajmniej 1 oznaczeniu 3 dni po podaniu leku w trakcie indukcji (I protokół) statystycznie istotnie częściej (test V-kwadrat: $p=0,007$) występowała reakcja alergiczna (u 14 /78%/ dzieci) w porównaniu do 67 chorych z terapeutyczną aktywnością leku (u 28 /42%/ pacjentów) (rysunek 4.). W analizie nie uwzględniono pacjentów, u których nie wystąpiła reakcja nadwrażliwości, ale nie otrzymali wszystkich przewidzianych w programie podań L-ASPA (1 dziecko z niską aktywnością L-ASPA zdyskwalifikowane z podawania tego leku po OZT oraz 1 chory z terapeutyczną aktywnością leku, który zmarł w trakcie realizacji bloków HR).

Rysunek 4. Zależność pomiędzy niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA w I protokole a wystąpieniem reakcji alergicznej przy kolejnych podaniach leku



Niska akt. L-ASPA – grupa pacjentów, u których przynajmniej w 1 oznaczeniu 3 dni po podaniu L-ASPA stwierdzono aktywność ≤ 100 IU/l (n=18)

Terap. akt. L-ASPA – grupa pacjentów, u których we wszystkich oznaczeniach 3 dni po podaniu L-ASPA stwierdzono aktywności > 100 IU/l (n=67)

Ryzyko względne wystąpienia reakcji alergicznej w przypadku wcześniejszego stwierdzenia aktywności L-ASPA poniżej 100 IU/l wyniosło 1,86 (95% przedział ufności (CI): 1,22-2,36), pozostałe wskaźniki oceniające przydatność tego parametru w wykrywaniu późniejszej reakcji alergicznej przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Niska (≤ 100 IU/l) aktywność L-ASPA w przynajmniej 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku w trakcie indukcji a ryzyko wystąpienia reakcji alergicznej

Oceniany parametr	Wartość parametru (95% CI)
Ryzyko względne	1,86 (1,22-2,36)
Czułość	0,33 (0,25-0,39)
Swoistość	0,91 (0,82-0,96)
PV+	0,79 (0,57-0,91)
PV-	0,58 (0,53-0,61)
LR+	3,58 (1,38-9,91)
LR-	0,73 (0,64-0,92)

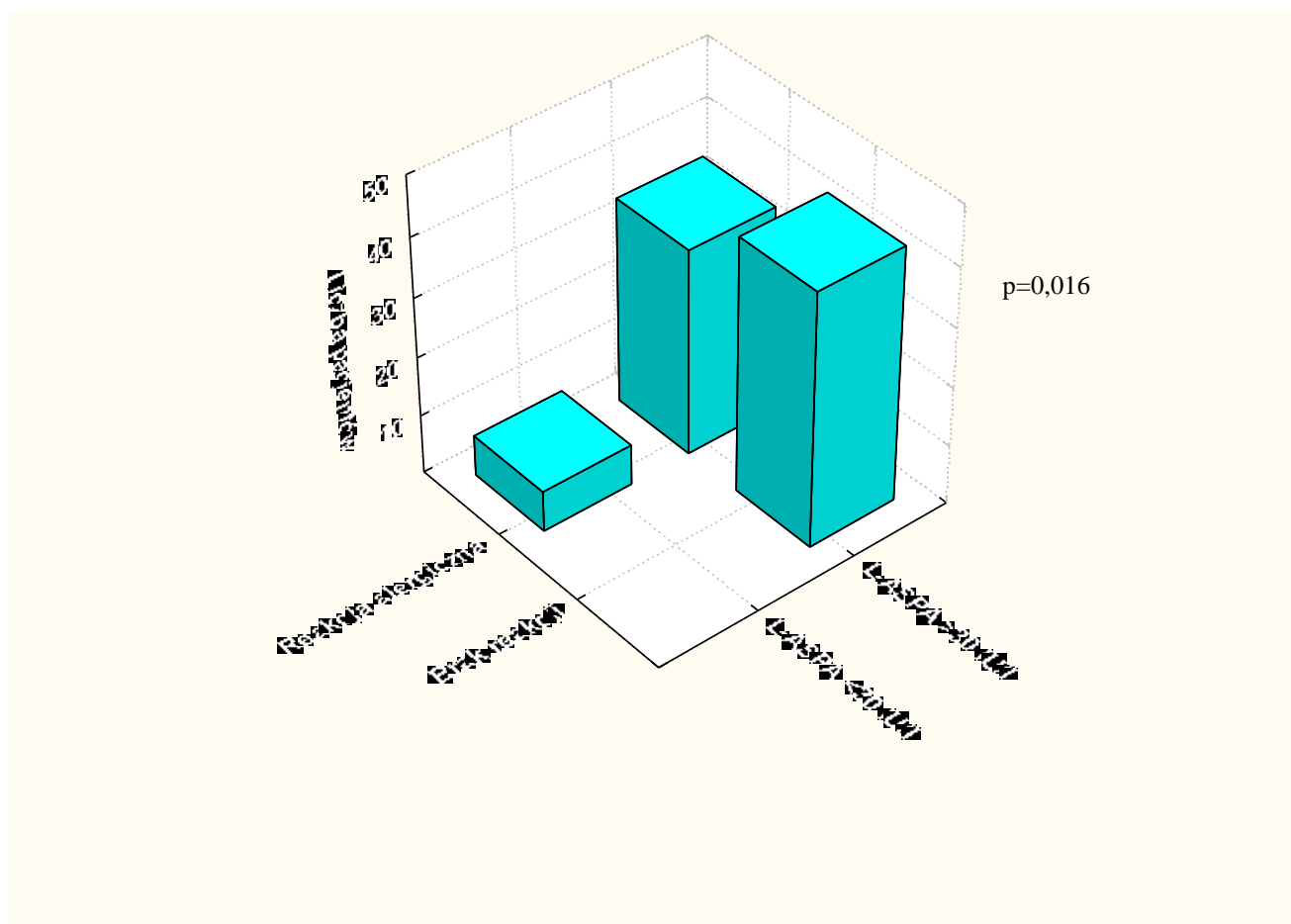
Posługując się nomogramem Fagana, stwierdzono, że prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji alergicznej u pacjenta, u którego stwierdzono przynajmniej w jednym oznaczeniu 3 dni po podaniu L-ASPA aktywność poniżej 100, wzrasta z 48% (za prawdopodobieństwo *a priori* uznano częstość reakcji alergicznej w badanej grupie pacjentów) do około 75%. W przypadku stwierdzenia terapeutycznej aktywności L-ASPA we wszystkich oznaczeniach prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji alergicznej maleje do około 30 %.

U wszystkich 7 pacjentów z grupy, w której w przynajmniej 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu L-ASPA w trakcie indukcji stwierdzono nieoznaczalną (< 30 IU/l) aktywność tego leku, doszło do reakcji alergicznej. Dla porównania wśród 78 pozostałych chorych, którzy we wszystkich oznaczeniach aktywności L-ASPA uzyskali wynik powyżej 30 IU/l, reakcję nadwrażliwości obserwowano u 35 (45%) dzieci (test chi-kwadrat z poprawką Yatesa: $p=0,016$) (rysunek 5.). Z analizy wykluczono 2 dzieci z aktywnością L-ASPA powyżej 30 IU/l, u których nie doszło do reakcji alergicznej, ale nie otrzymali wszystkich przewidzianych w programie leczenia dawek tego leku. Ryzyko względne wystąpienia reakcji alergicznej w przypadku wcześniejszego stwierdzenia aktywności L-ASPA poniżej 30 IU/l wynosiło 2,23 (95% CI: 1,38-2,23), pozostałe wskaźniki oceniające przydatność tego parametru w wykrywaniu późniejszej reakcji alergicznej przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Nieoznaczalna (<30 IU/l) aktywność L-ASPA przynajmniej w jednym oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku w trakcie indukcji a ryzyko wystąpienia reakcji alergicznej

Oceniany parametr	Wartość parametru (95% CI)
Ryzyko względne	2,23 (1,38-2,23)
Czułość	0,17 (0,11-0,17)
Swoistość	1 (0,94-1)
PV+	1 (0,66-1),
PV-	0,55 (0,52-0,55)
LR+	niemożliwe oznaczenie
LR-	0,83 (0,83-0,94)

Rysunek 5. Zależność pomiędzy nieoznaczalną (<30 IU/l) aktywnością L-ASPA w I protokole a wystąpieniem reakcji alergicznej



L-ASPA <30 IU/l – grupa pacjentów, u których przynajmniej w 1 oznaczeniu 3 dni po podaniu L-ASPA stwierdzono aktywność <30 IU/l (n=7)

L-ASPA >30 – grupa pacjentów, u których we wszystkich oznaczeniach 3 dni po podaniu L-ASPA stwierdzono aktywności ≥ 30 IU/l (n=78)

4.3. Reakcje nadwrażliwości

Reakcję nadwrażliwości na L-ASPA Medac obserwowano u 42 (49%) spośród 85 pacjentów (z analizy wyłączono 2 pacjentów, u których nie doszło do reakcji alergicznej, ale nie otrzymali wszystkich przewidzianych w protokole podań: 1 dziecko z powodu OZT, jeden pacjent zmarł z powodu posocznicy w przebiegu neutropenii). U wszystkich 42 dzieci była to reakcja uogólniona, u większości pod postacią rumienia skóry, często z towarzyszącym obrzękiem. U 14 osób wystąpiły objawy obturacji dróg oddechowych, u 9 pacjentów bóle w okolicy lędźwiowej. Obserwowano również wystąpienie gorączki, wymiotów, bólu brzucha i kończyn dolnych. Charakterystykę pacjentów, u których doszło do reakcji alergicznej przedstawiono w tabeli 10. Stwierdzono, istotny związek pomiędzy płcią żeńską a wystąpieniem reakcji alergicznej (test chi-kwadrat: $p=0,042$), nie wykazano natomiast różnic pod względem wieku, fenotypu białaczki ani grup ryzyka pomiędzy grupami chorych z reakcją alergiczną i bez reakcji. Wyniki przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 10. Pacjenci z reakcją nadwrażliwości na L-ASPA w różnych etapach leczenia programem ALL IC-BFM-2002

Lp	Pacjent	Protokół/ podanie L-ASPA	Objawy	Aktywność L-ASPA w I protokole: średnia (zakres) [IU/l]	Przeciwciała przeciw L-ASPA	Stężenie amoniaku [umol/l]		Opóźnienia w podaniach L-ASPA [dni]	Ilość podań PEG- ASPA	Reakcja na PEG-ASPA (objawy)
						24 godz. po L- ASPA	3 dni po L- ASPA			
1	C.A.	1.III/1	Uogólniona pokrzywka	130 (35- 263)	b.d.	110	29	-	3	-
2	K.P.	I/3 (op.)	Pokrzywka, obturacyja	324	b.d.	106	34	1	2	+ (obrzęk twarzy)
3	L.E.	1.III/1	Zaczerwienienie twarzy, niepokój, kaszel, wymioty	177 (137- 159)	b.d.	132	23	1	2	-
4	N.S.	II/1	b.d.	235 (162- 291)	b.d.	76	35	1	1	-
5	S.D.	I/8	b.d.	246 (231- 262)	b.d.	126	35	2	1	-
6	P.A.	III/1	Rumień	363 (307- 393)	b.d.	84	48	1	3	-
7	K.K.	I/8 (op.)	Pobudzenie, duszność, sinica	205 (199- 209)	b.d.	84	38	4	3	-

8	K.D.	II/1	Rumień twarzy, uszu, drapanie w gardle	360 (232-427)	b.d.	109	45	-	1	-
9	P.K.	1.HR/1	b.d.	342 (249-430)	b.d.	123	37	-	2	+ (reakcja anafilaktyczna)
10	P.M.	I/6	Obrzęk krtani	143 (112-168)	b.d.	142	42	2	1	-
11	B.A.	II/1	b.d.	94 (<30-298)	b.d.	42	25	2	1	-
12	G.N.	II/4	Obrzęk warg, odruch wymiotny, tachykardia, duszność, ból pleców	74 (45-128)	b.d.	70	35	-	-	-
13	T.M.	II/1	Rumień	320 (229-416)	b.d.	146	41	-	1	-
14	B.D.	II/1	Rumień	133 (71-196)	b.d.	91	27	3	1	-
15	S.J.	II/1	Rumień, duszność, ból w okolicy lędźwiowej	88 (<30-222)	b.d.	91	29	1	1	-
16	D.D.	II/1	Niepokój, obrzęk, zaczerwienienie twarzy	95 (41-159)	b.d.	75	44	2	1	-
17	M.K.	1.III/1	Zaczerwienienie twarzy, kaszel, duszność	406 (373-417)	b.d.	74	38	1	1	+ (zaczerwienienie twarzy, kaszel, ból brzucha, niepokój)
18	K.D.	I/6	Rumień	166 (<30-333)	b.d.	73	32	3	1	+ (b.d.)
19	G.D.	II/1	Rumień twarzy, duszność, ból pleców, brzucha	83 (0-202)	b.d.	89	29	-	1	-
20	K.J.	II/1	Rumień, obrzęk warg, ból w okolicy lędźwiowej	273 (<30-659)	Przed 8.podaniem: IgG (+), IgM (+), IgE (+)	81	41	1	1	-
21	S.P.	II/1	Silny ból pleców, dreszcze, nudności	266 (230-283)	b.d.	115	36	1	1	-
22	W.K.	II/1	Obrzęk twarzy, kaszel	306 (208-365)	Przed 3. podaniem: IgM (+), IgG (-), IgE (-)	145	59	1	1	-

23	B.M.	I/5	Plamista wysypka	206 (180-237)	Przed 3. podaniem: IgM (-), IgG (-), IgE (-); przed 5. podaniem: IgM (+), IgG (+), IgE (-)	54	29	1	1	-
24	K.A.	II/1	Rumień, odruch wymiotny	409 (320-591)	Przed 3. podaniem: IgM (-), IgG (+), IgE (-)	67	38	-	1	-
25	Z.K.	1.HR/2 (op.)	Rumień	224 (165-274)	Przed 8. podaniem: IgM (-), IgG (-), IgE (-)	128	29	2	2	+ (obrzęk Quinckiego)
26	G.M.	1.HR/2 (op.)	Rumień, gorączka	77 (51-121)	Przed 3. podaniem: IgM (+), IgG (+), IgE (-); przed 8 podaniem: IgM (+), IgG (+), IgE (-)	56	30	2	5	+ (ból brzucha, dreszcze)
27	W.M.	1.HR/1	Rumień, duszność	79 (38-138)	Przed 3. podaniem: IgM (+), IgG (-), IgE (-); przed 8. podaniem: IgM (+), IgG (-), IgE (-)	76	28	-	2	+ (rumień)
28	P.A.	II/1	Duszność, rumień, ból pleców	286 (225-329)	Przed 8. podaniem: IgM (+), IgG (+), IgE (-)	109	32	-	1	-
29	S.A.	II/1	b.d.	108 (72-137)	b.d.	70	10	1	1	-
30	P.K.	II/1	Duszność, rumień twarzy	549 (485-582)	Przed 3. podaniem: IgM (-), IgG (+), IgE (-); przed 8. podaniem: IgM (+), IgG (+), IgE (-)	154	68	-	1	-

31	G.A.	2.HR/1	Ból brzucha, dreszcze	378 (251- 438)	Przed 3. podaniem: IgM (+), IgG (-), IgE (+); przed 8. podaniem: IgM (+), IgG (-), IgE (-)	183	55	-	6	-
32	S.J.	I/7	Kaszel, rumień twarzy, niepokój	338 (226- 387)	b.d.	76	39	1	2	-
33	D.I.	II/1	Obrzęk twarzy, szyi, duszność, niepokój, bóle pleców, nóg	333 (144- 515)	b.d.	158	52	2	1	-
34	O.B.	II/1	Rumień, świąd	403 (379- 427)	b.d.	125	74	-	1	-
35	B.A.	1.HR/1	b.d.	288 (196- 349)	b.d.	98	45	-	2	+ (rumień, obrzęk twarzy, hipoksja, kwasica)
36	S.J.	II/1	b.d.	<30	Przed 3. podaniem: IgM (+), IgG (+), IgE (+); przed 8. podaniem: IgM (+), IgG (+), IgE (+)	45	20	1	1	-
37	P.G.	1.HR/1	b.d.	249 (140- 314)	b.d.	134	65	1	2	+ (b.d.)
38	B.W.	II/1	Rumień	327 (323- 332)	b.d.	90	64	-	1	-
39	L.P.	3.HR/1	Rumień	312	b.d.	221	49	-	1	-
40	C.W.	II/1	b.d.	364 (163- 940)	b.d.	47	14	1	1	-
41	Ł.J.	2.HR/1	b.d.	35 (<30-68)	b.d.	53	12	-	3	+ (b.d.)
42	K.K.	II/1	b.d.	390 (340- 459)	b.d.	99	72	-	1	-

op. – opóźnione podanie L-ASPA

b.d. – brak danych

Tabela 11. Porównanie grup pacjentów z reakcją alergiczną i bez reakcji

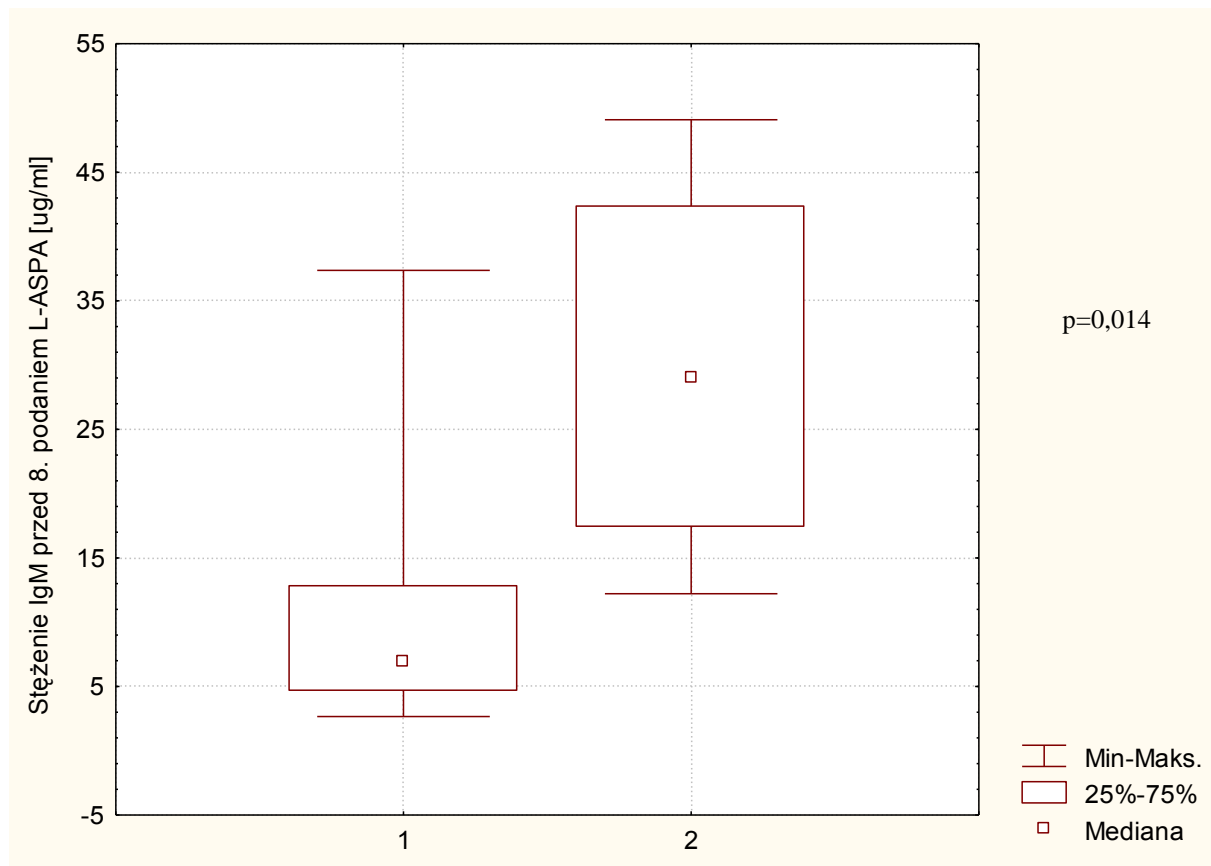
Grupa pacjentów	Wiek [lata]: mediana (zakres)	Płeć		Fenotyp białaczki				Grupa ryzyka		
		M	K	cALL	ProB	Przejściowa ALL	T-ALL	SR	IR	HR
	Liczba (odsetek) pacjentów									
Pacjenci reakcją alergiczną (n=42)	6 (2-16)	17 (40)	25 (60)	35 (83)	2 (5)	1 (2,5)	4 (9,5)	12 (28)	20 (48)	10 (24)
Pacjenci bez reakcji alergicznej (n=43)	4,5 (1-16,5)	27 (63)	16 (37)	35 (81)	1 (2,5)	1 (2,5)	6 (14)	16 (37)	19 (44)	8 (19)
p	0,70	0,039		0,87				0,67		

W większości przypadków (32 /76%/ z 42 chorych) reakcja nadwrażliwości wystąpiła w czasie podawania leku po dłuższej (około 3 miesięcznej) przerwie od poprzednich dawek, przy pierwszym podaniu w II, III protokole lub w bloku HR. Spośród 10 pozostałych dzieci u 7 pacjentów reakcja wystąpiła jeszcze w trakcie realizacji I protokołu, u 1 pacjentki w czasie czwartego podania L-ASPA w II protokole, u 2 osób w czasie drugiego podania w bloku HR. U 4 pacjentów z tej grupy podanie L-ASPA, przy którym wystąpiły objawy alergii poprzedzała dłuższa niż wynika to z protokołu przerwa (10-25 dni) od poprzedniego podania leku, u pozostałych 6 chorych takie opóźnienia występowały przy poprzedzających reakcję nadwrażliwości podaniach L-ASPA. W 14 przypadkach (33% pacjentów z reakcją alergiczną) wystąpienie objawów nadwrażliwości w trakcie realizacji II/III protokołu lub bloku HR mogła poprzedzać cicha inaktywacja, stwierdzano bowiem niskie aktywności L-ASPA (poniżej 100 IU/l, w tym u 7 chorych poniżej 30 IU/l) po podaniu tego leku w I protokole. Obserwowano trend w kierunku niższej średniej aktywności L-ASPA u pacjentów z reakcją nadwrażliwości w porównaniu do pacjentów, u których nie doszło do reakcji alergicznej (mediana /zakres/ odpowiednio: 201 IU/l (<30 IU/l-549 IU/l) vs 252 IU/l (65 IU/l - 644 IU/l), p=0,08). U 4 pacjentów z reakcją nadwrażliwości poprzedzoną niskimi aktywnościami L-ASPA oznaczono stężenie przeciwciał przeciw L-ASPA przed 3. i 8. podaniem leku, stwierdzając u wszystkich dodatni wynik w klasie IgM oraz u 3 na 4 chorych w klasie IgG. Wykazano również, że stężenie przeciwciał klasy IgM i IgG oceniane przed 8. podaniem L-ASPA w tej grupie dzieci było

statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych 16 pacjentów, u których także wykonano oznaczenia stężenia przeciwciał (chorzy bez reakcji alergicznej oraz pacjenci z reakcją alergiczną, ale terapeutyczną aktywnością L-ASPA) (dla klasy IgM: $p=0,014$; dla klasy IgG: $p=0,047$). Wyniki przedstawiono na rysunkach 6. i 7.

Spośród 42 pacjentów z reakcją nadwrażliwości na natywną L-ASPA, 41 było później leczonych PEG-ASPA (preparatu tego nie otrzymywało dziecko, u którego reakcja nadwrażliwości wystąpiła w trakcie podawania ostatniej przewidzianej w programie leczenia dawki L-ASPA). Jedenastu (27%) z nich po otrzymaniu od 1 do 5 podań PEG-ASPA uczuliło się również na tą postać leku i otrzymywało następnie Erwinazę, na którą w badanej grupie nie obserwowano reakcji alergicznej.

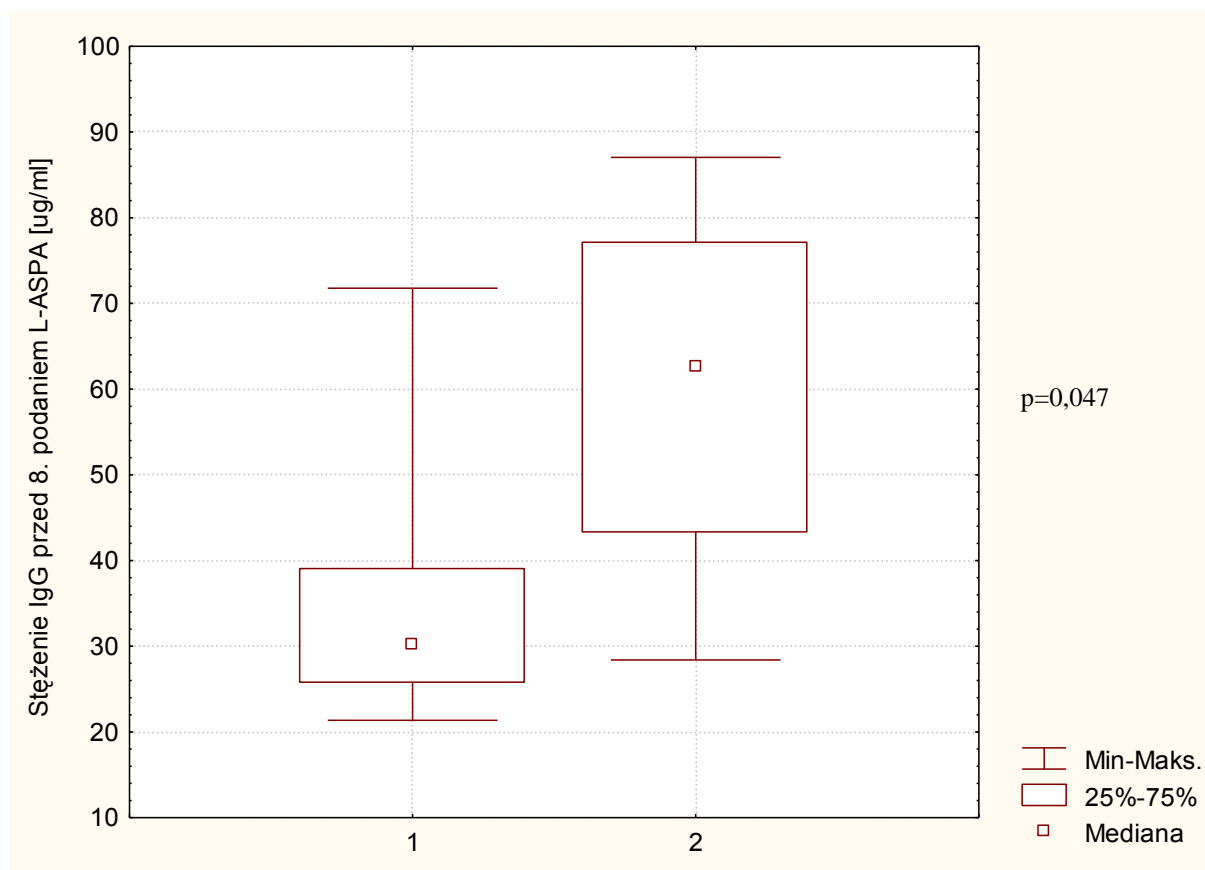
Rysunek 6. Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z reakcją poprzedzoną niskimi (≤ 100 IU/l) aktywnościami leku w porównaniu do pozostałych pacjentów



- 1- pacjenci bez reakcji alergicznej oraz chorzy z reakcją alergiczną nie poprzedzoną niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA
- 2- pacjenci z reakcją alergiczną poprzedzoną niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA

Grupa pacjentów	Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA [$\mu\text{g/ml}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
1 (n=16)	2,7	37,4	4,5	12,8	6,9
2 (n=4)	12,2	49,1	17,3	42,4	29,1

Rysunek 7. Stężenie IgG przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z reakcją poprzedzoną niskimi (≤ 100 IU/l) aktywnościami w porównaniu do pozostałych pacjentów



- 1- pacjenci bez reakcji alergicznej oraz chorzy z reakcją alergiczną nie poprzedzoną niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA
- 2- pacjenci z reakcją alergiczną poprzedzoną niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA

Grupa pacjentów	Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA [$\mu\text{g/ml}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
1 (n=17)	21	72	26	39	30
2 (n=4)	28	87	43	77	63

4.4. Stężenia przeciwciał przeciw L-ASPA

Oznaczenie stężenia przeciwciał przeciw L-ASPA wykonano u 21 pacjentów w 35 próbkach.

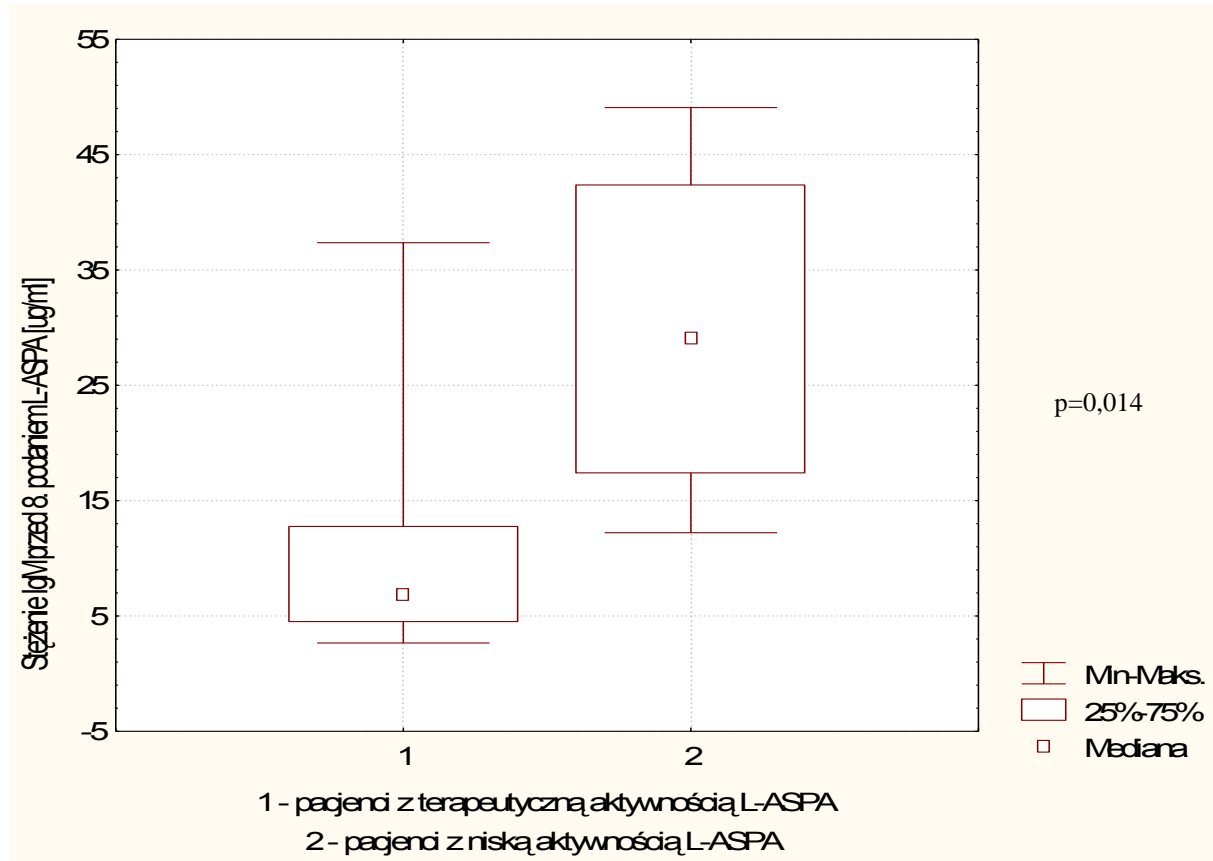
Spośród 35 badanych próbek w 28 (80%) stwierdzono dodatni wynik w przynajmniej jednej z klas przeciwciał przeciw L-ASPA, w tym w 10 (67%) z 15 próbek pobranych przed 3. podaniem leku oraz w 18 (90%) z 20 pobranych przed 8. podaniem. U 19 (90%) z 21 pacjentów, u których wykonano oznaczenia, wykazano przynajmniej 1 dodatni wynik. Biorąc pod uwagę klasy przeciwciał, w oznaczeniach wykonanych przed 3. i 8. podaniem leku dodatni wynik stwierdzono odpowiednio: dla klasy IgG u 7 (47%) z 15 i 10 (50%) z 20 pacjentów, dla klasy IgM u 7 (47%) z 15 i 16 (80%) z 20 dzieci i dla klasy IgE odpowiednio u 5 (33%) z 15 i 6 (30%) z 20 chorych.

W przypadku pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej 100 IU/l dodatni wynik przeciwciał stwierdzono w klasie IgM we wszystkich 3 próbkach pobranych przed 3. i wszystkich 4 przed 8. podaniem I protokołu oraz w klasie IgG w 2 (67%) na 3 próbki pobrane przed 3. podaniem i w 3 (75%) z 4 próbek przed podaniem 8. U pacjentów z terapeutyczną aktywnością L-ASPA dodatnie przeciwciała w klasie IgM stwierdzono w 4 (33%) z 12 i 12 (75%) z 16 próbek pobranych odpowiednio przed 3. i 8. podaniem L-ASPA protokołu I, a w klasie IgG odpowiednio w 5 (42%) z 12 i w 7 (44%) z 16 próbek. Przy użyciu dokładnego testu Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej zależności pomiędzy dodatnim wynikiem przeciwciał a niską aktywnością L-ASPA, blisko granicy istotności była zależność dla przeciwciał IgM oznaczanych przed 3. podaniem L-ASPA ($p=0,076$). Stwierdzono, że stężenie przeciwciał w klasie IgM i IgG oznaczanych u chorych przed 8. podaniem L-ASPA w protokole I było istotnie wyższe (odpowiednio $p=0,014$ i $p=0,047$) w grupie dzieci z niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA w porównaniu do pacjentów z prawidłową aktywnością L-ASPA (rysunek 8. i 9.). Dla oznaczeń IgM i IgG wykonanych przed 3. podaniem L-ASPA oraz dla klasy IgE w obu punktach czasowych nie wykazano statystycznie znamiennej zależności. Wyniki przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Niskie (≤ 100 IU/l) aktywności L-ASPA w I protokole a przeciwciała przeciw L-ASPA

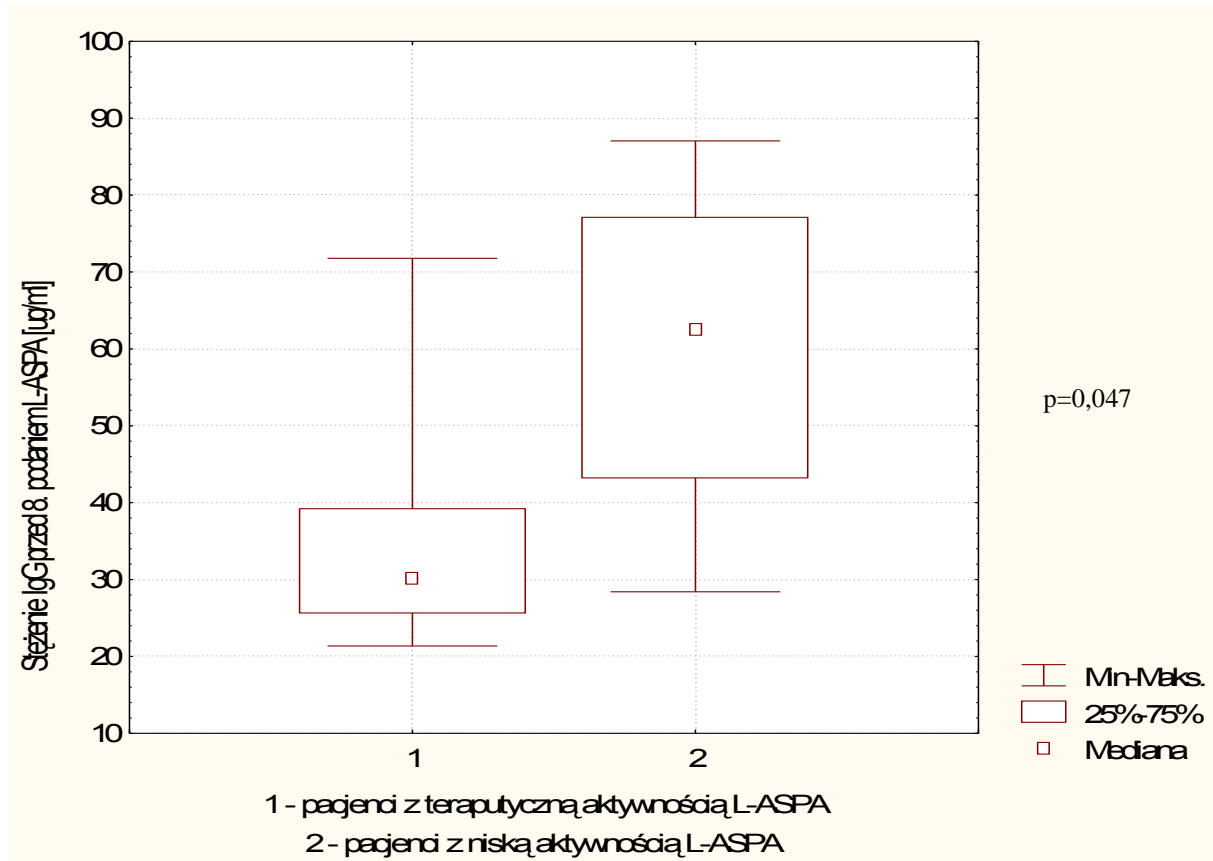
Punkt czasowy badania i klasa przeciwciał przeciw L-ASPA			Aktywność L-ASPA		p
			≤ 100	> 100	
Przed 3. podaniem L-ASPA	IgM	Dodatni wynik	3 pacjentów	4 pacjentów	0,08
		Ujemny wynik	0 pacjentów	8 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	10,37	4,29	0,11
	IgG	Dodatni wynik	2 pacjentów	5 pacjentów	0,45
		Ujemny wynik	1 pacjent	7 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	63,52	30,65	0,56
	IgE	Dodatni wynik	1 pacjent	4 pacjentów	0,76
		Ujemny wynik	2 pacjentów	8 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	0,90	0,86	0,39
Przed 8. podaniem L-ASPA	IgM	Dodatni wynik	4 pacjentów	12 pacjentów	0,37
		Ujemny wynik	0 pacjentów	4 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	29,07	6,89	0,014
	IgG	Dodatni wynik	3 pacjentów	7 pacjentów	0,33
		Ujemny wynik	1 pacjent	9 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	62,58	30,22	0,047
	IgE	Dodatni wynik	2 pacjentów	4 pacjentów	0,34
		Ujemny wynik	2 pacjentów	12 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	1,50	1,00	0,85

Rysunek 8. Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (>100 IU/l) aktywnością L-ASPA



Grupa pacjentów	Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA [µg/ml]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
1 (n=16)	2,7	37,4	4,5	12,8	6,9
2 (n=4)	12,2	49,1	17,3	42,4	29,1

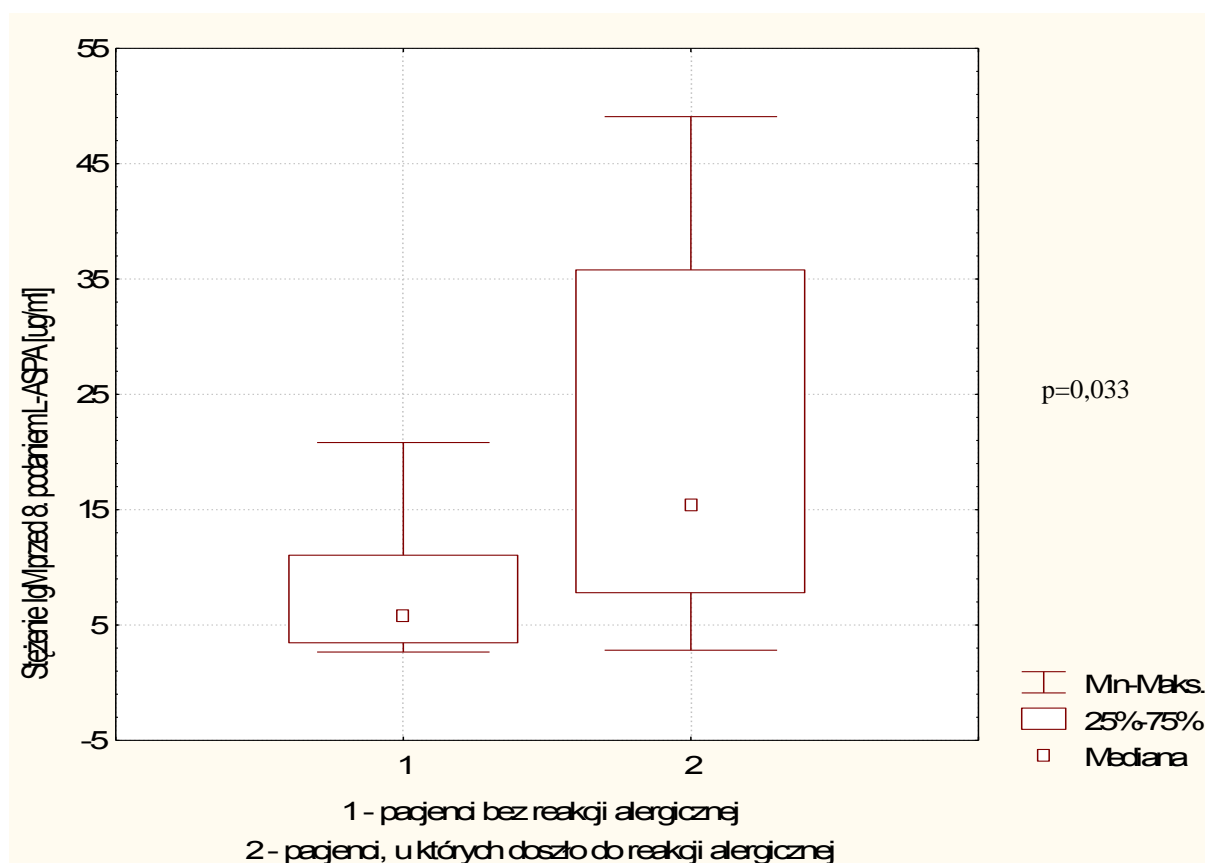
Rysunek 9. Stężenie IgG przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (>100 IU/l) aktywnością L-ASPA



Grupa pacjentów	Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA [µg/ml]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
1 (n=16)	21	72	26	39	30
2 (n=4)	28	87	43	77	63

Wykazano, że stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA I protokołu w grupie pacjentów, u których wystąpiła klinicznie jawna reakcja nadwrażliwości było istotnie wyższe w porównaniu z grupą pacjentów bez tej reakcji (mediana /zakres/ odpowiednio: 15 /3-49/ $\mu\text{g/ml}$ / i 6 /3-21/ $\mu\text{g/ml}$; $p=0,023$) (rysunek 10.). Takiej zależności nie stwierdzono dla klasy IgM w oznaczeniu wykonanym przed 3. podaniem L-ASPA ani dla klasy IgG ani IgE w żadnym z oznaczeń. Przy użyciu dokładnego testu Fishera nie stwierdzono znamiennej statystycznej zależności pomiędzy dodatnim wynikiem przeciwciał żadnej z klas a wystąpieniem reakcji alergicznej, blisko granicy istotności były różnice dla przeciwciał IgG oznaczanych przed 8. podaniem L-ASPA ($p=0,07$). Wyniki przedstawiono tabeli 13.

Rysunek 10. Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z reakcją alergiczną i pacjentów bez reakcji nadwrażliwości



Grupa pacjentów	Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA [$\mu\text{g/ml}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
1 (n=10)	2,7	21	3,4	11,1	5,9
2 (n=10)	2,8	49	7,7	35,7	15,3

Tabela 13. Zależność pomiędzy wystąpieniem reakcji alergicznej a wynikiem oznaczenia przeciwciał przeciw L-ASPA

Punkt czasowy badania i klasa przeciwciał przeciw L-ASPA			Reakcja alergiczna		p
			+	-	
Przed 3. podaniem L-ASPA	IgM	Dodatni wynik	4 pacjentów	3 pacjentów	0,40
		Ujemny wynik	3 pacjentów	5 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	6,98	3,88	0,56
	IgG	Dodatni wynik	4 pacjentów	3 pacjentów	0,40
		Ujemny wynik	3 pacjentów	5 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	34,04	30,65	0,82
	IgE	Dodatni wynik	2 pacjentów	3 pacjentów	0,57
		Ujemny wynik	5 pacjentów	5 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	0,90	0,88	1,0
Przed 8. podaniem L-ASPA	IgM	Dodatni wynik	9 pacjentów	7 pacjentów	0,29
		Ujemny wynik	1 pacjentów	3 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	15,35	5,86	0,023
	IgG	Dodatni wynik	6 pacjentów	4 pacjentów	0,33
		Ujemny wynik	4 pacjentów	6 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	38,89	27,67	0,07
	IgE	Dodatni wynik	2 pacjentów	4 pacjentów	0,31
		Ujemny wynik	8 pacjentów	6 pacjentów	
		Mediana stężenia [$\mu\text{g/ml}$]	0,46	0,81	0,17

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnią aktywnością L-ASPA w grupach pacjentów z dodatnimi lub ujemnymi przeciwciałami żadnej z klas. Wyniki przedstawiono w tabeli 14.

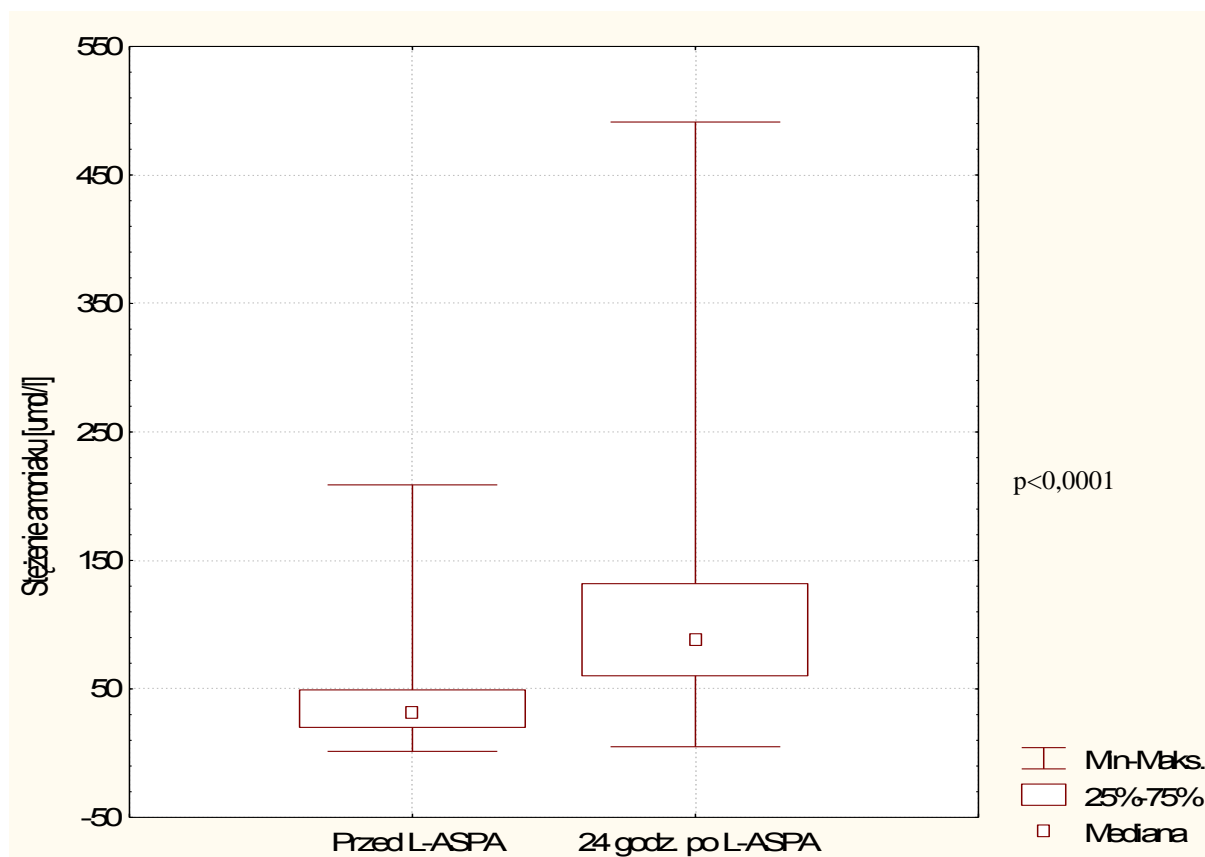
Tabela 14. Aktywność L-ASPA w I protokole w zależności od wyniku oznaczeń przeciwciał przeciw L-ASPA

Punkt czasowy badania i klasa przeciwciał przeciw L-ASPA	Średnie aktywności L-ASPA w I protokole [IU/l]		p	
	Mediana (zakres)			
	Pacjenci z dodatnim wynikiem przeciwciał (n=liczba pacjentów)	Pacjenci z ujemnym wynikiem przeciwciał (n=liczba pacjentów)		
Badanie przed 3. podaniem L-ASPA	IgM	175 (0-378); n=7	250 (163-549); n=8	0,16
	IgG	365 (0-549); n=7	195 (79-378); n=8	0,25
	IgE	357 (0-378); n=5	223 (77-549); n=10	0,90
Badanie przed 8. podaniem L-ASPA	IgM	279 (0-549); n=16	216 (160-236); n=4	0,30
	IgG	269 (0-549); n=10	229 (79-458), n=10	1,0
	IgE	241 (0-365); n=6	250 (77-549); n=14	0,56

4.5. Ocena przydatności oznaczenia stężenia amoniaku

U wszystkich pacjentów po podaniu L-ASPA występowała przemijająca hiperamonemia. Stwierdzono statystycznie istotny przyrost stężenia amoniaku 24 godziny po podaniu tego leku w stosunku do stężenia oznaczonego przed podaniem (mediana /zakres/ odpowiednio: 88 /5-491/ $\mu\text{mol/l}$ i 32 /1-209/ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,0001$) (rysunek 11.).

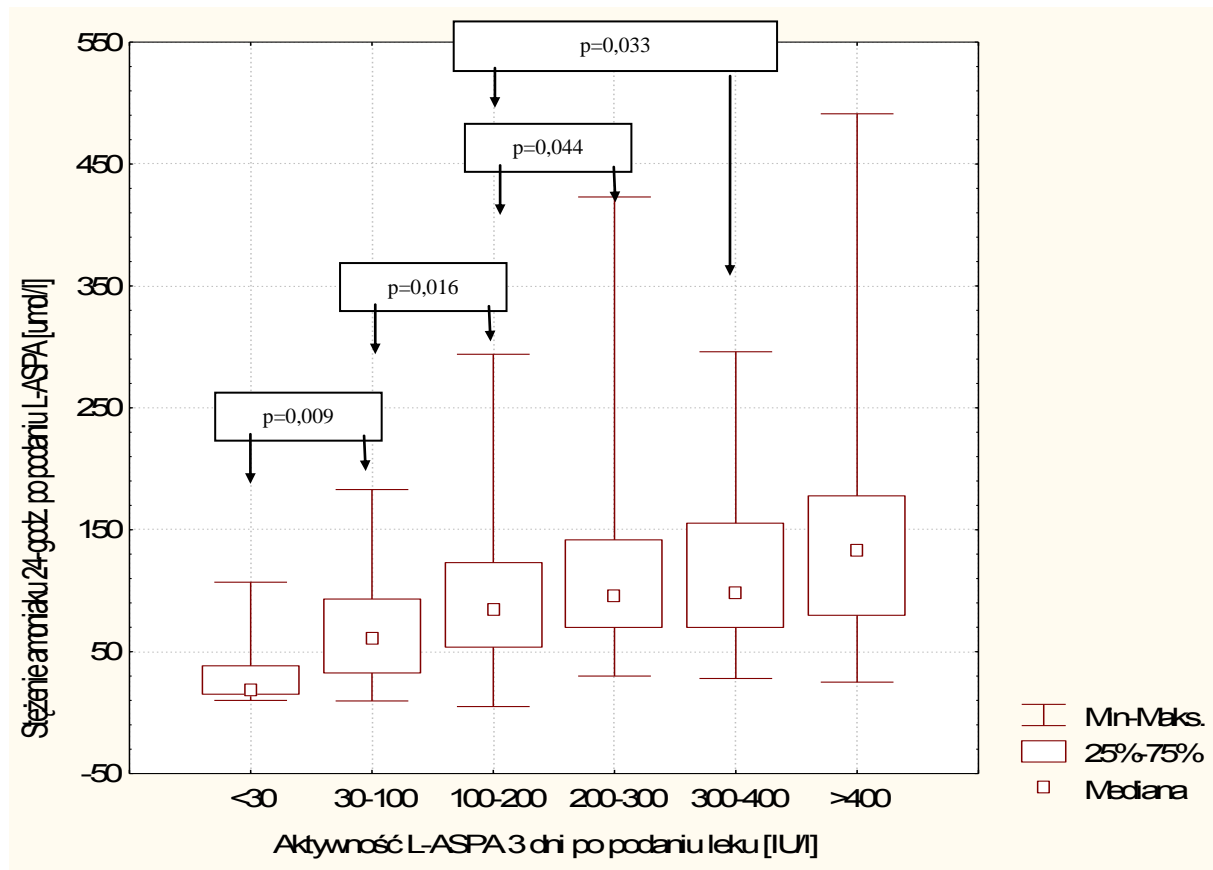
Rysunek 11. Przyrost stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA



Czas wykonania oznaczenia	Stężenie amoniaku [$\mu\text{mol/l}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
przed L-ASPA	1	209	20	49	32
24 godz. po L-ASPA	5	491	60	132	88

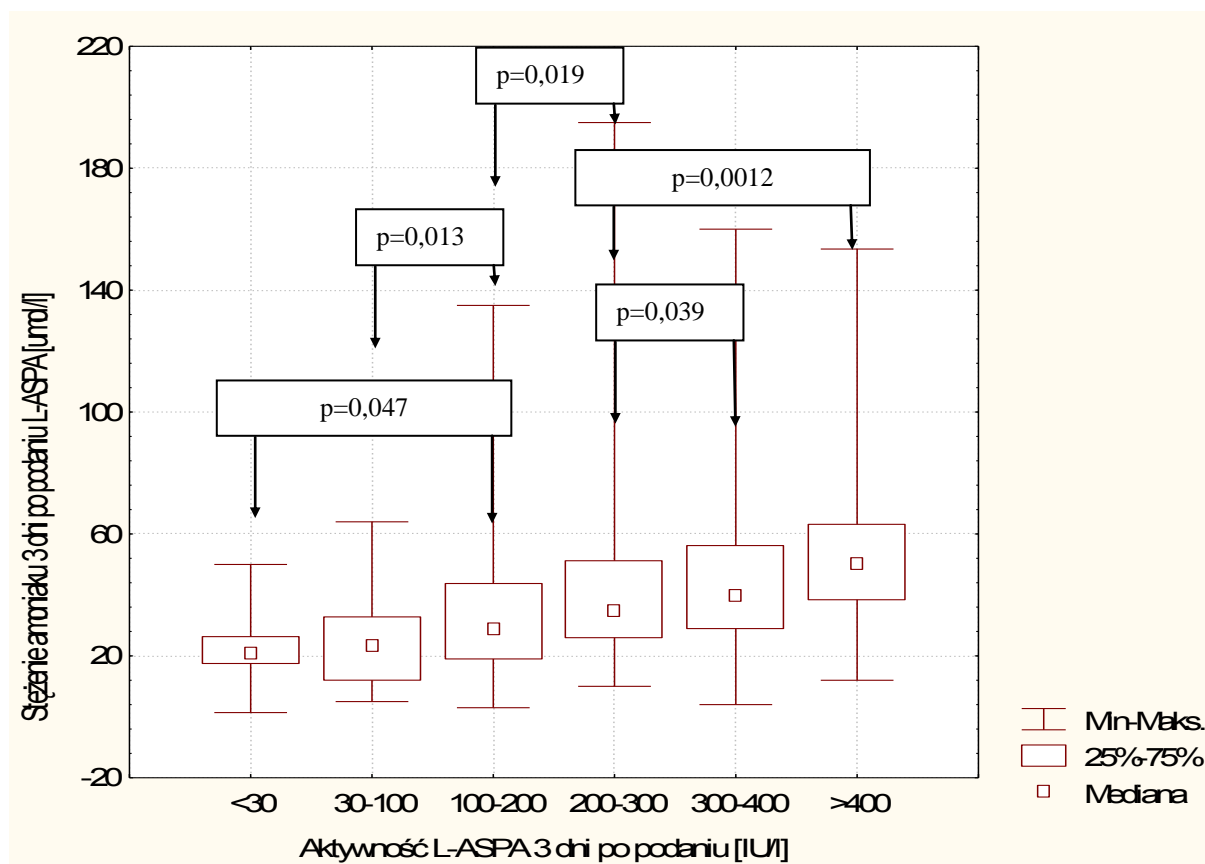
Stwierdzono również istotne różnice pomiędzy medianami stężeń amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA dla poszczególnych zakresów aktywności L-ASPA oznaczonej 3 dni po podaniu leku (rysunek 12. i 13.).

Rysunek 12. Stężenie amoniaku 24 godz. po podaniu L-ASPA dla poszczególnych zakresów aktywności tego leku ocenianej 3 dni po jego podaniu



Zakres aktywności L-ASPA [IU/l]	Stężenie amoniaku 24 godz. po podaniu L-ASPA [µmol/l]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
<30	10	107	14	38	18
30-100	10	183	32	93	61
100-200	5	294	54	123	84
200-300	30	423	69	141	96
300-400	28	296	70	155	98
>400	25	491	80	178	133

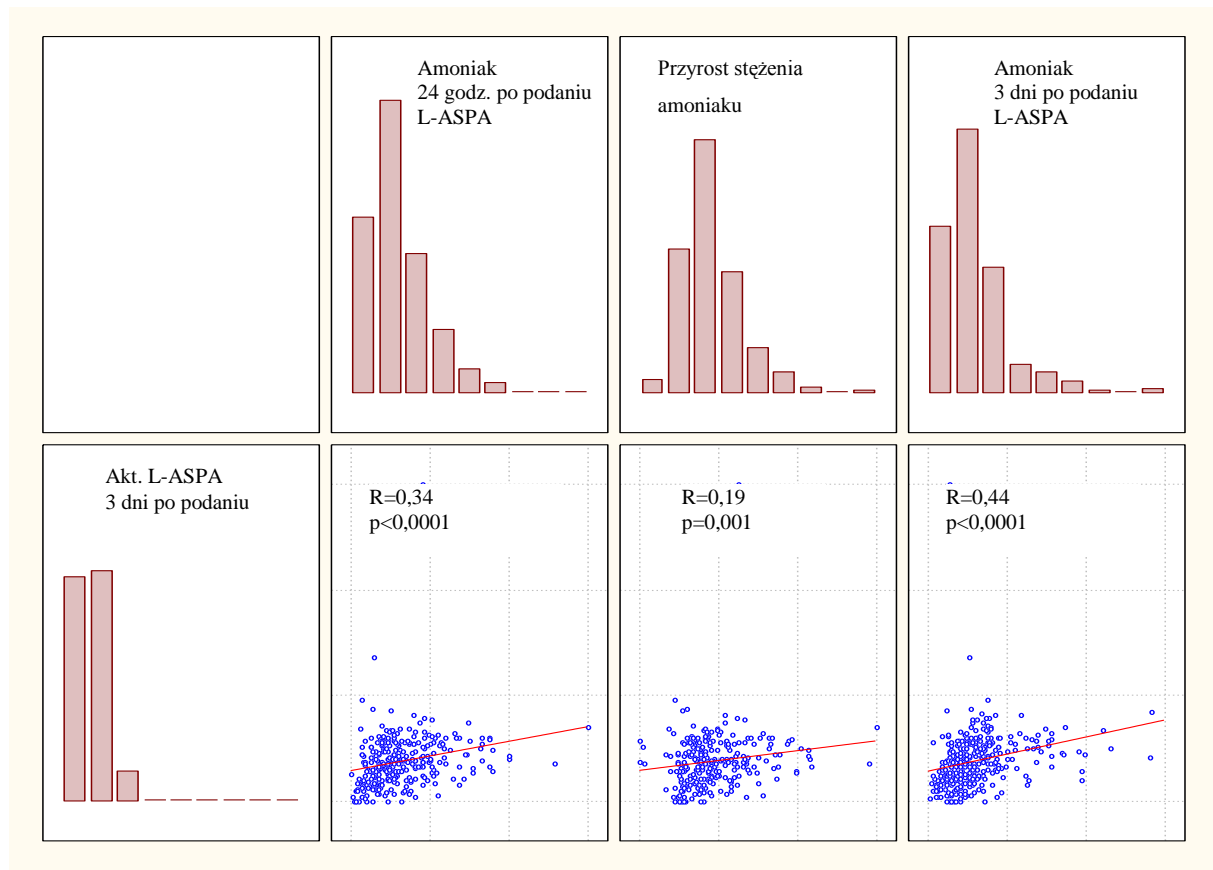
Rysunek 13. Stężenie amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA dla poszczególnych zakresów aktywności tego leku ocenianej 3 dni po jego podaniu



Zakres aktywności L-ASPA [IU/l]	Stężenie amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA [µmol/l]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
<30	1	50	17	26	21
30-100	5	64	12	33	23
100-200	3	135	19	44	29
200-300	10	195	26	51	35
300-400	4	197	30	59	41
>400	12	153	38	63	50

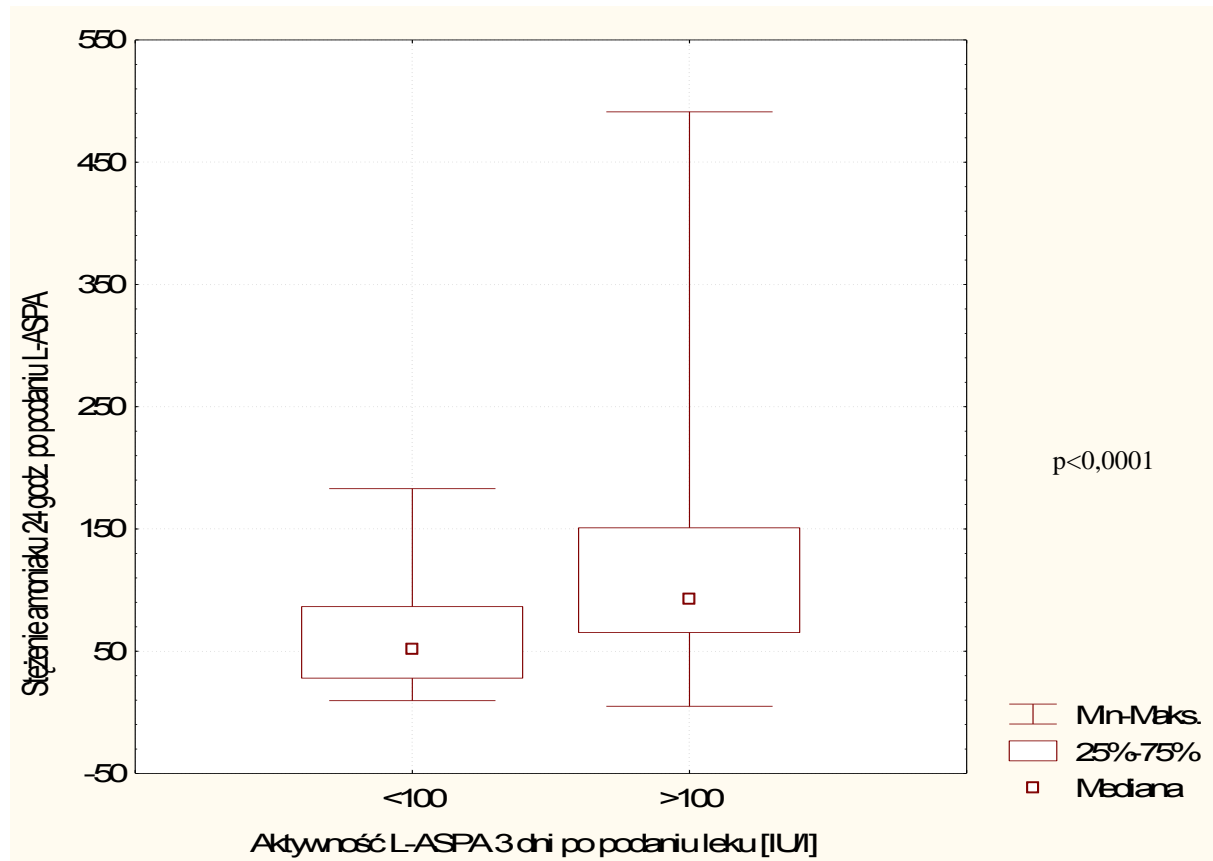
Stężenie amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu leku korelowało dodatnio z aktywnością L-ASPA oznaczaną 3 dni po jej podaniu (R Spearman odpowiednio 0,34 i 0,44; $p < 0,0001$). Słabszą korelację obserwowano pomiędzy aktywnością L-ASPA a przyrostem stężenia amoniaku (R Spearman = 0,19; $p = 0,001$) (rysunek 14.).

Rysunek 14. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA ocenianą 3 dni po podaniu a stężeniem amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu leku oraz przyrostem stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA



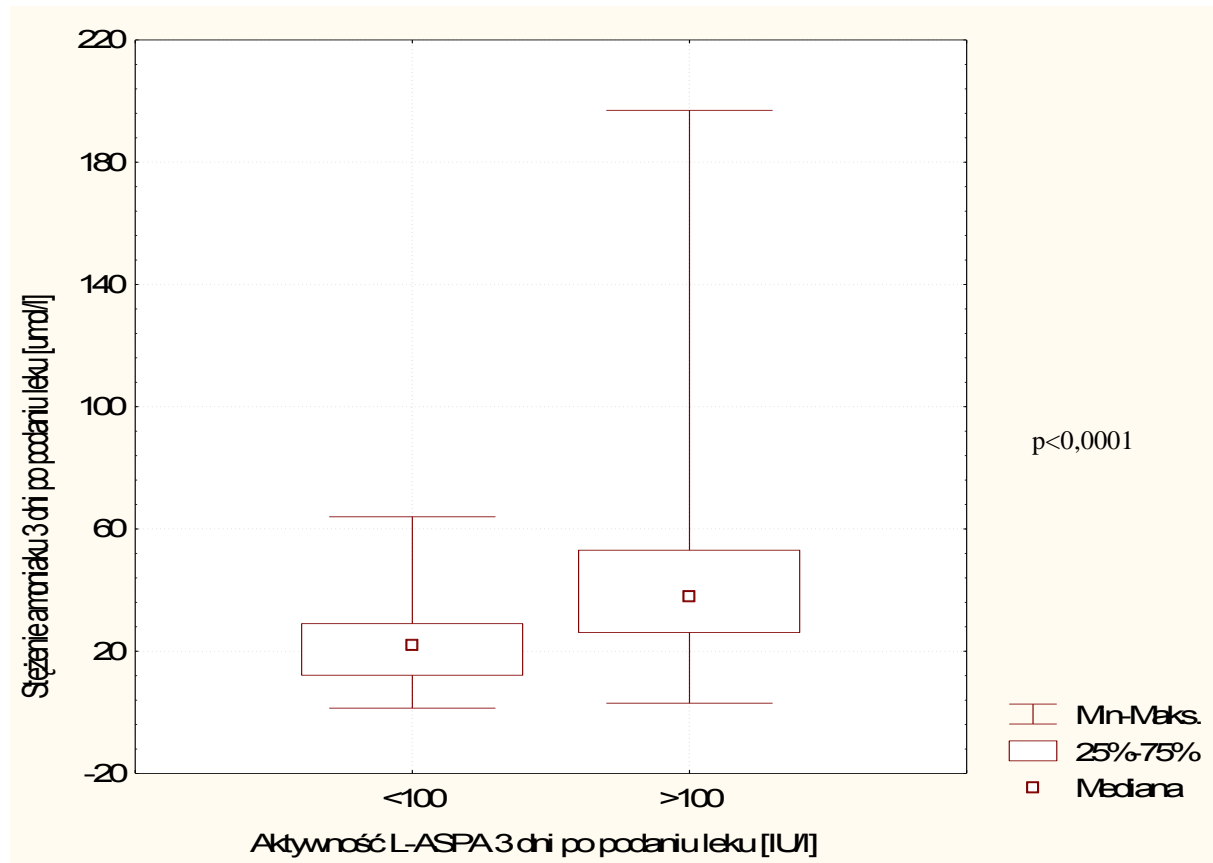
Przy aktywności asparaginazy poniżej 100 IU/l w porównaniu z aktywnością powyżej 100 IU/l stwierdzano istotnie niższe stężenie amoniaku 24 godziny (mediana /zakres/ odpowiednio: 52 /10-183/ $\mu\text{mol/l}$ i 93 /5-491/ $\mu\text{mol/l}$; $p<0,0001$) i 3 dni po podaniu L-ASPA (mediana /zakres/ odpowiednio: 22 /1-63/ $\mu\text{mol/l}$ i 38 /3-197/ $\mu\text{mol/l}$; $p<0,0001$) oraz istotnie niższy przyrost stężenia amoniaku po podaniu leku (mediana /zakres/odpowiednio: 23 (-31-174/ $\mu\text{mol/l}$ i 59 /-87-414/ $\mu\text{mol/l}$; $p<0,0001$) (rysunek 15., 16. i 17.).

Rysunek 15. Stężenie amoniaku oceniane 24 godziny po podaniu L-ASPA w zależności od aktywności leku



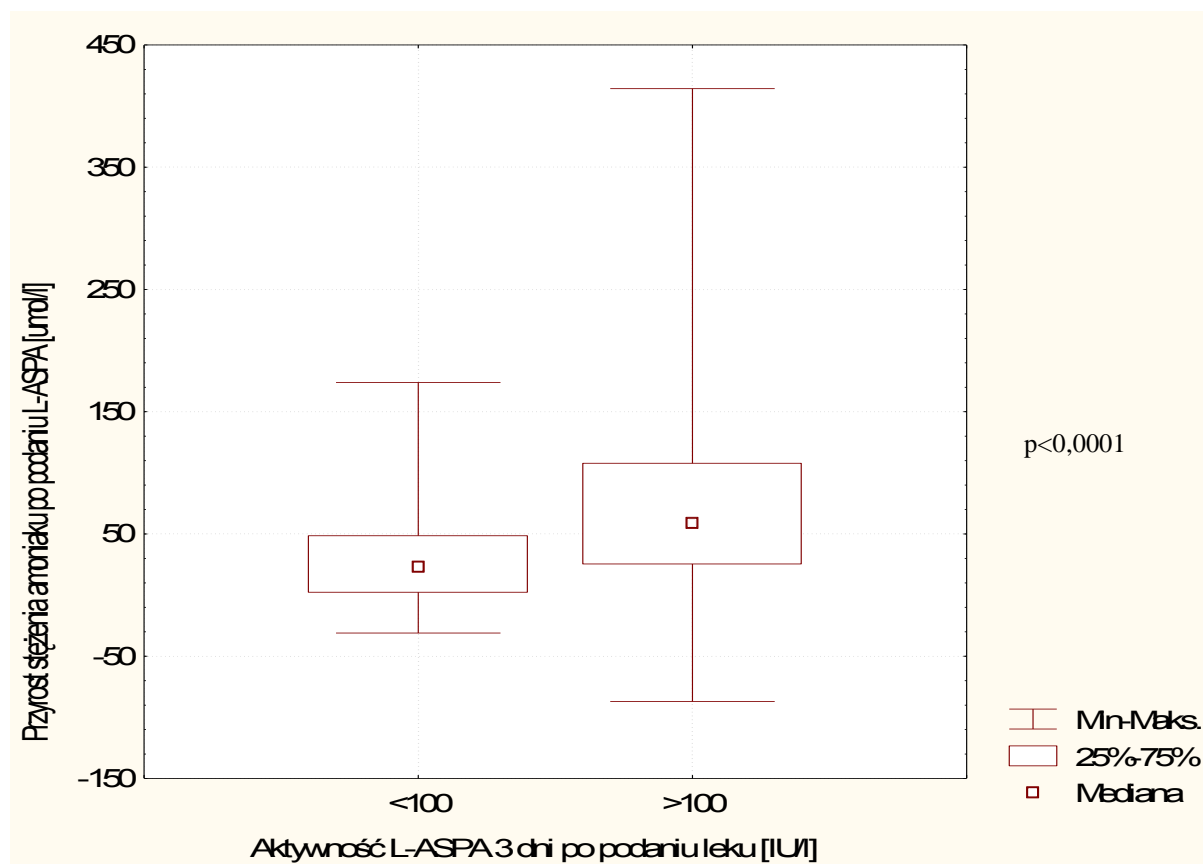
Zakres aktywności L-ASPA [IU/l]	Stężenie amoniaku 24 godziny po podaniu L-ASPA [$\mu\text{mol/l}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
≤ 100	10	183	27	86	52
> 100	5	491	65	151	93

Rysunek 16. Stężenie amoniaku oceniane 3 dni po podaniu L-ASPA w zależności od aktywności leku



Zakres aktywności L-ASPA [IU/l]	Stężenie amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA [$\mu\text{mol/l}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
≤ 100	1	63	12	29	22
> 100	3	197	26	53	38

Rysunek 17. Przyrost stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA w zależności od aktywności leku

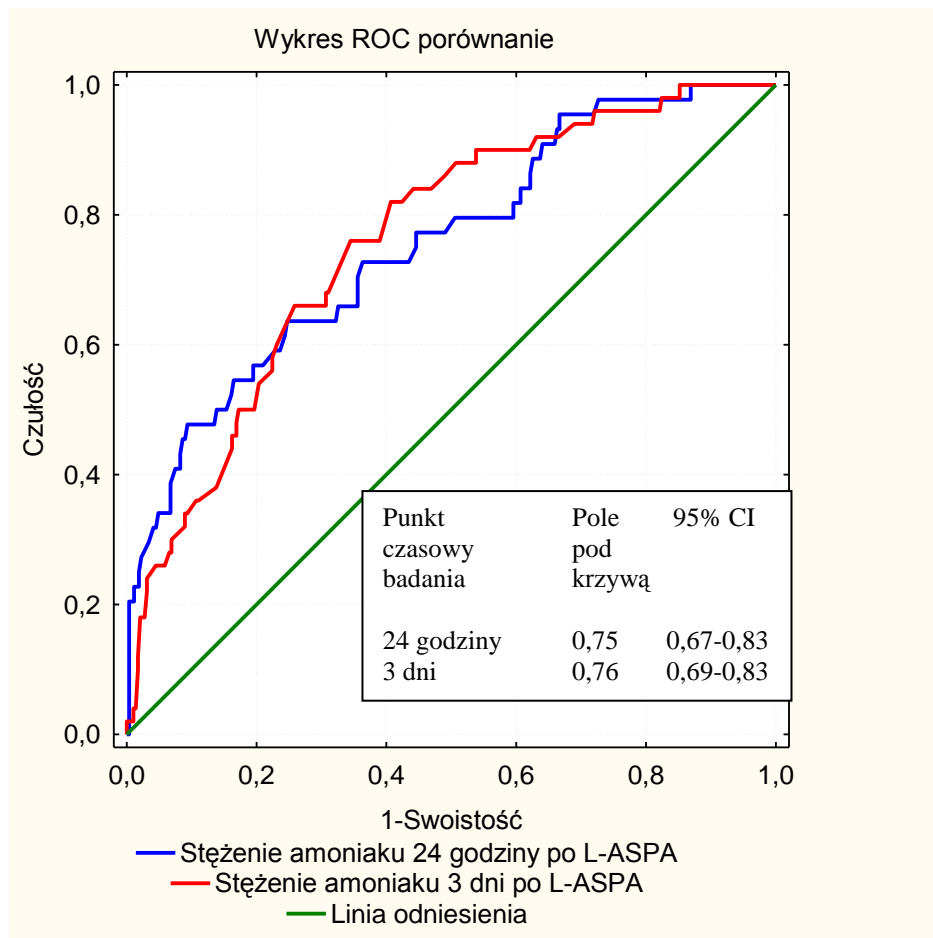


Zakres aktywności L-ASPA [IU/l]	Przyrost stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA [$\mu\text{mol/l}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
≤ 100	-31	174	2	49	23
> 100	-87	414	25	108	59

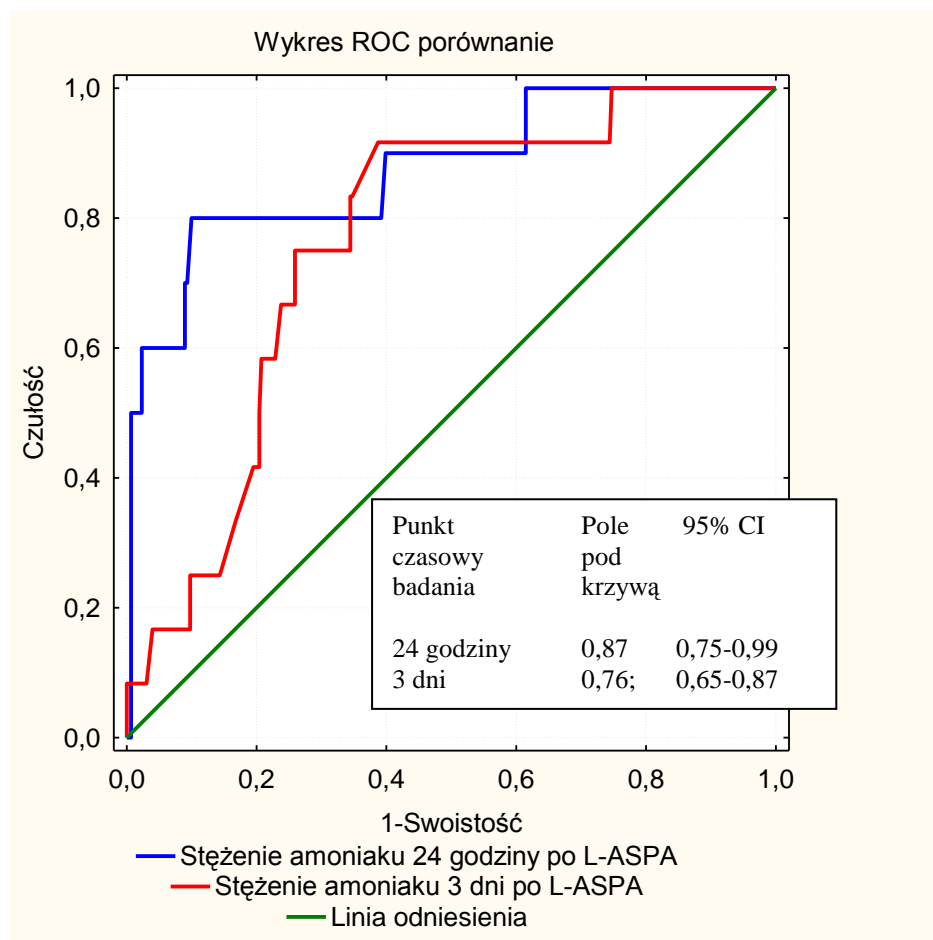
Ocenę użyteczności oznaczenia stężenia amoniaku (24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA) w wykrywaniu niskiej i nieznaczalnej aktywności leku badanej 3 dni po odpowiednim jego podaniu przeprowadzono poprzez analizę krzywych ROC (rysunek 18. i 19.). Dla obu punktów czasowych (24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA) pole powierzchni pod krzywą ROC było większe od 0,5 (odpowiednio: 0,75; 95% CI: 0,67-0,83; $p < 0,0001$ i 0,76; 95% CI: 0,69-0,83; $p < 0,0001$ dla aktywności L-ASPA < 100 IU/l oraz 0,87; 95% CI: 0,75-0,99 i 0,76; 95% CI: 0,65-0,87 dla nieznaczalnej aktywności L-ASPA). Wartości te odpowiadają umiarkowanej trafności testu diagnostycznego. Różnice w powierzchni pól pod krzywą ROC dla obu punktów czasowych nie były istotne statystycznie ($p = 0,91$). Dla obu punktów czasowych wyznaczono punkt odcięcia stężenia amoniaku dla optymalnych wartości czułości i swoistości wykrycia niskich aktywności L-ASPA, który wyniósł dla pomiaru wykonywanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA

odpowiednio: 64 $\mu\text{mol/l}$ i 29 $\mu\text{mol/l}$. W przypadku aktywności <30 IU/l próg ten wyniósł odpowiednio: 38 $\mu\text{mol/l}$ i 24 $\mu\text{mol/l}$.

Rysunek 18. Krzywe ROC dla trafności pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA w wykrywaniu aktywności L-ASPA poniżej 100 IU/l



Rysunek 19. Krzywe ROC dla trafności pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA w wykrywaniu aktywności L-ASPA poniżej 30 IU/l



Parametry oceniające wartość testów diagnostycznych w wykrywaniu niskiej i nieoznaczalnej aktywności L-ASPA po danym podaniu leku dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku ocenianego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA przedstawiono w tabeli 15. i 16.

Tabela 15. Ocena wartości testów diagnostycznych w wykrywaniu niskiej aktywności L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)

Oceniany parametr	Stężenie amoniaku po podaniu L-ASPA	
	24 godziny $\leq 64 \mu\text{mol/l}$	3 dni $\leq 29 \mu\text{mol/l}$
Czulość	0,64 (0,51-0,76)	0,76 (0,62-0,87)
Swoistość	0,75 (0,72-0,76)	0,65 (0,59-0,71)
PV+	0,30 (0,24-0,35)	0,27 (0,22-0,30)
PV-	0,93 (0,90-0,95)	0,94 (0,91-0,96)
LR+	2,54 (1,86-3,25)	2,20 (1,67-2,51)
LR-	0,48 (0,31-0,67)	0,37 (0,23-11,09)
Youden J	0,39 (0,24-0,53)	0,41 (0,21-0,58)

Przyjmując, że prawdopodobieństwo *a priori* wystąpienia niskiej aktywności L-ASPA 3 dni po danym podaniu L-ASPA wynosi 16% (odsetek wyników poniżej 100 IU/l w oznaczeniach wykonywanych 3 dni po podaniu leku w badanym materiale) i posługując się nomogramem Fagana, ustalono, że prawdopodobieństwo to zwiększa się do około 28% przy stwierdzeniu stężenia amoniaku poniżej 64 $\mu\text{mol/l}$ lub poniżej 29 $\mu\text{mol/l}$ odpowiednio 24 godziny lub 3 dni po podaniu leku i maleje do ok. 7% dla stężeń amoniaku powyżej tych wartości.

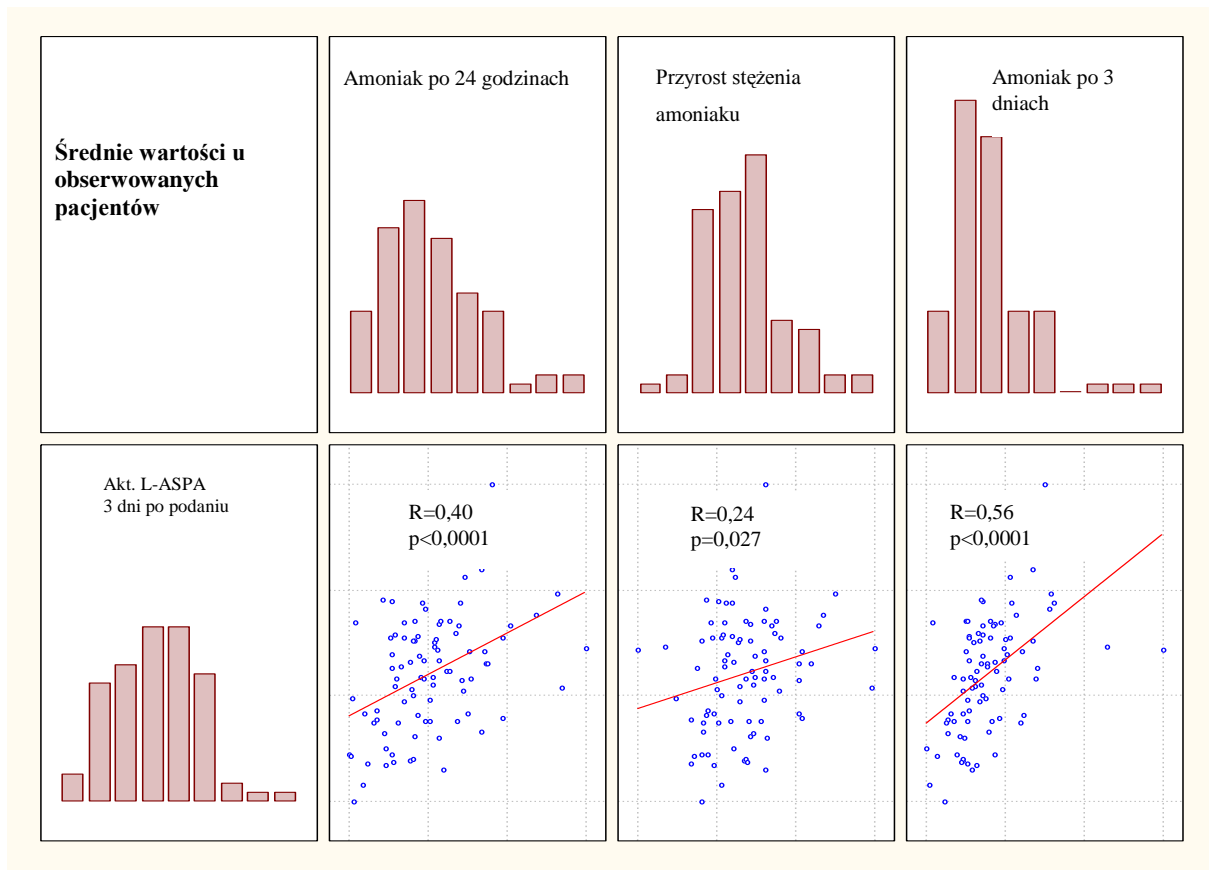
Tabela 16. Ocena wartości testów diagnostycznych w wykrywaniu nieoznaczalnej (<30 IU/l) aktywności L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)

Oceniany parametr	Stężenie amoniaku po podaniu L-ASPA	
	24 godziny \leq 38 $\mu\text{mol/l}$	3 dni \leq 24 $\mu\text{mol/l}$
Czułość	0,80 (0,50-0,94)	0,75 (0,47-0,91)
Swoistość	0,90 (0,89-0,90)	0,74 (0,73-0,75)
PV+	0,21 (0,13-0,25)	0,09 (0,06-0,12)
PV-	0,99 (0,98-1,0)	0,99 (0,97-1,0)
LR+	8,03 (4,59-9,93)	2,89 (1,76-3,59)
LR-	0,22 (0,06-0,56)	0,34 (0,12-0,72)
Youden J	0,70 (0,39-0,85)	0,49 (0,20-0,66)

W przypadku nieoznaczalnej aktywności L-ASPA prawdopodobieństwo *a priori* wynosiło 4%. Przy stwierdzeniu stężenia amoniaku 24 godziny po podaniu leku poniżej 38 $\mu\text{mol/l}$ i w oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu poniżej 24 $\mu\text{mol/l}$ prawdopodobieństwo to zwiększa się odpowiednio do 21% i 9%, natomiast dla wartości stężenia amoniaku powyżej ustalonych progów odcięcia prawdopodobieństwo to maleje do ok. 1%

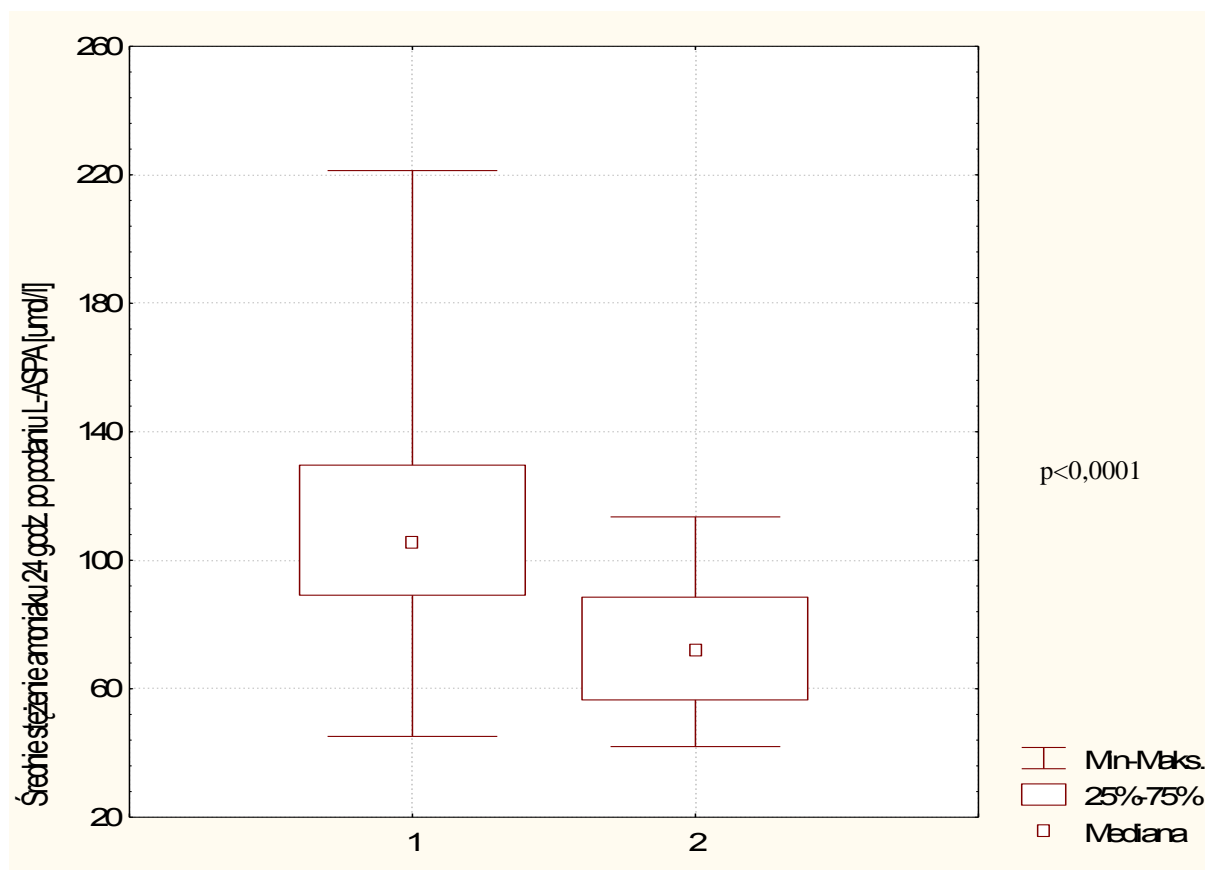
Stwierdzono istotną korelację średnich dla każdego z pacjentów wartości aktywności L-ASPA oznaczanej 3 dni po podaniu leku w I protokole a średnim stężeniem amoniaku oznaczanym 24 godziny i 3 dni po podaniu leku oraz średnim przyrostem stężenia amoniaku (R Spearman odpowiednio: 0,41; $p < 0,0001$; 0,56; $p < 0,0001$ i 0,24; $p = 0,027$) (rysunek 20.).

Rysunek 20. Korelacja pomiędzy średnimi aktywnościami L-ASPA w I protokole u obserwowanych pacjentów a średnimi stężeniami amoniaku ocenianymi 24 godziny i 3 dni po podaniu leku oraz średnimi przyrostami stężenia amoniaku



W grupie pacjentów, u których występowały niskie aktywności L-ASPA w porównaniu z grupą dzieci, u których aktywność leku była terapeutyczna, obserwowano istotnie niższe średnie stężenia amoniaku oznaczanego 24 godziny ($p < 0,00001$) i 3 dni po kolejnych podaniach leku w I protokole ($p < 0,00001$) oraz niższy średni przyrost stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA ($p = 0,009$) (rysunek 21., 22., 23.).

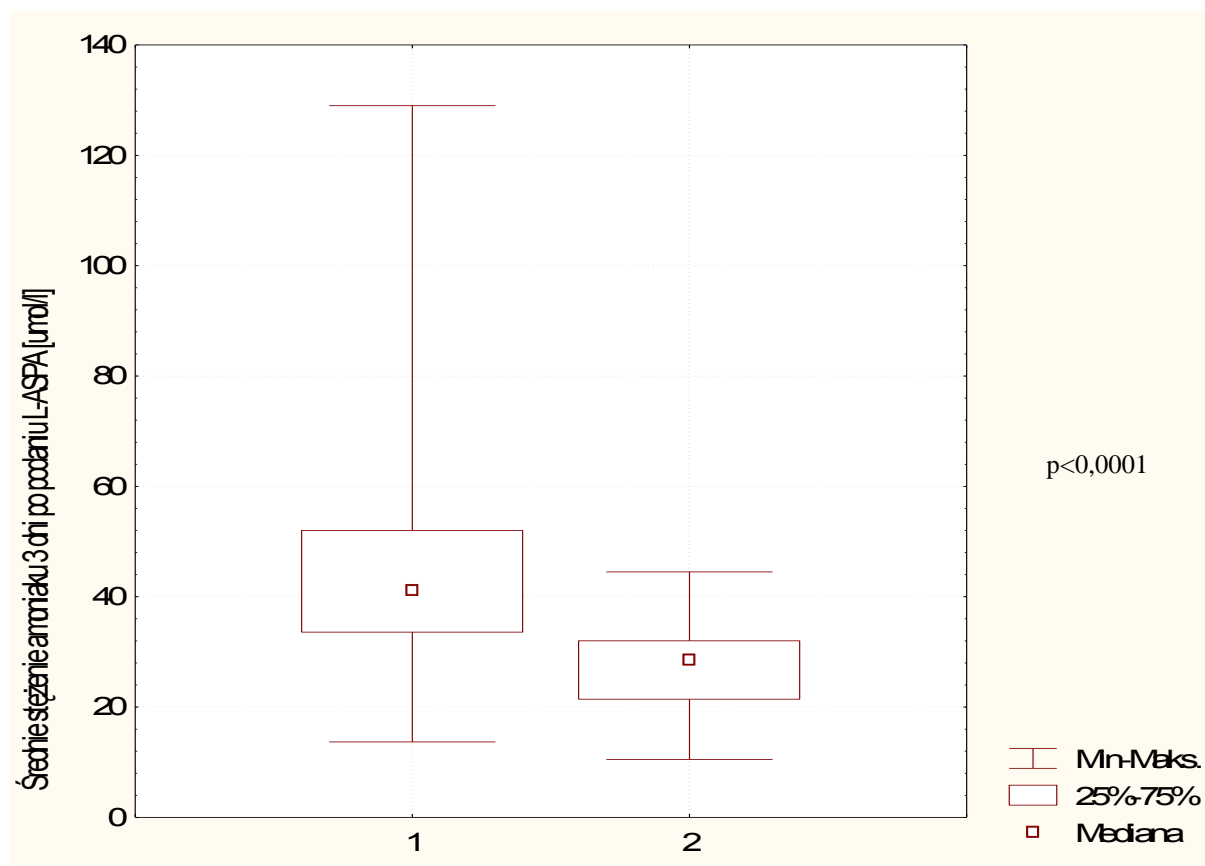
Rysunek 21. Średnie stężenia amoniaku 24 godziny po podaniu L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (>100 IU/l) aktywnością L-ASPA



1 – pacjenci z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (>100 IU/l) we wszystkich oznaczeniach 3 dni po podaniu leku
 2 – pacjenci z aktywnością L-ASPA ≤ 100 IU/l w minimum 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku

Grupa pacjentów	Średnie stężenia amoniaku 24 godziny po podaniu L-ASPA [$\mu\text{mol/l}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
Z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (n=68)	45	221	89	130	106
Z niską aktywnością L-ASPA (n=19)	42	113	56	89	70

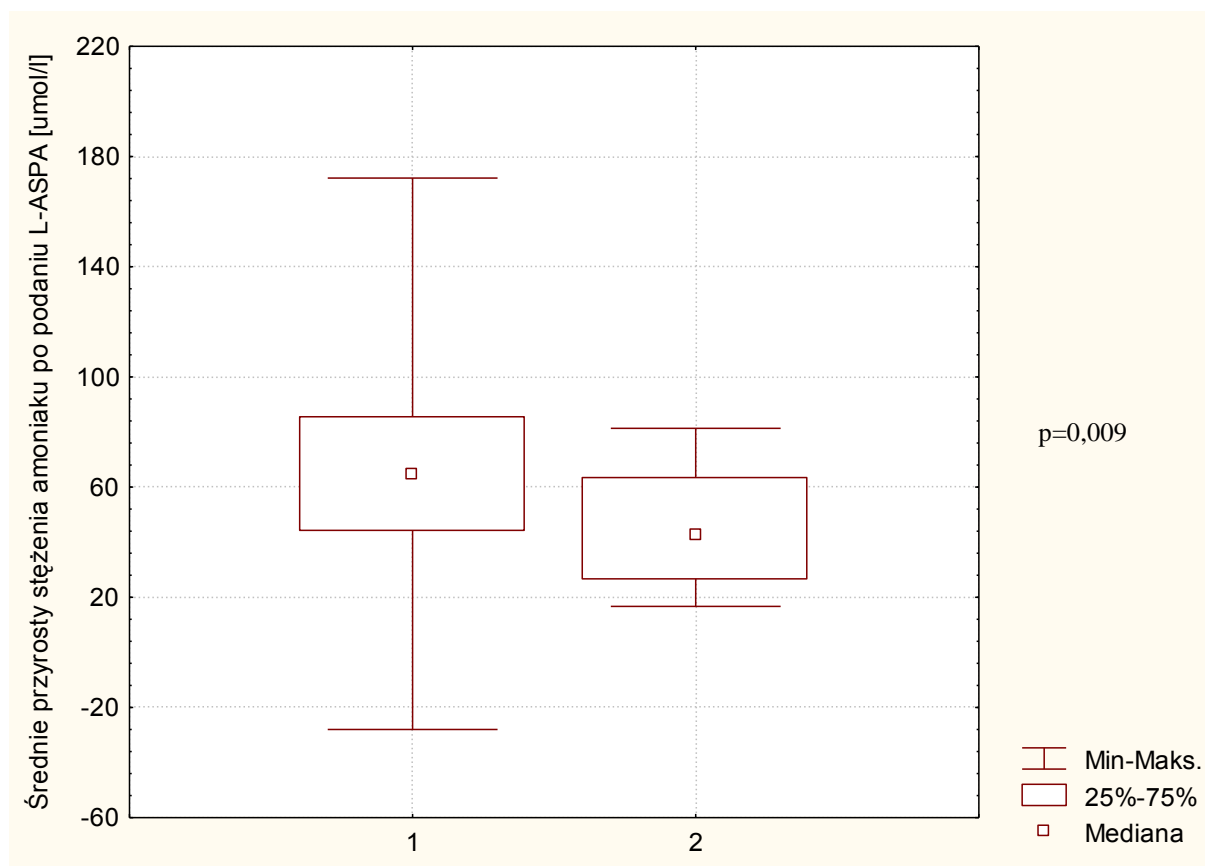
Rysunek 22. Średnie stężenia amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (>100 IU/l) aktywnością L-ASPA



1 – pacjenci z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (>100 IU/l) we wszystkich oznaczeniach 3 dni po podaniu leku
 2 – pacjenci z aktywnością L-ASPA ≤ 100 IU/l w minimum 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku

Grupa pacjentów	Średnie stężenia amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA [$\mu\text{mol/l}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
Z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (n=68)	14	129	33	52	42
Z niską aktywnością L-ASPA (n=19)	10	44	21	32	29

Rysunek 23. Średnie przyrosty stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (>100 IU/l) aktywnością L-ASPA



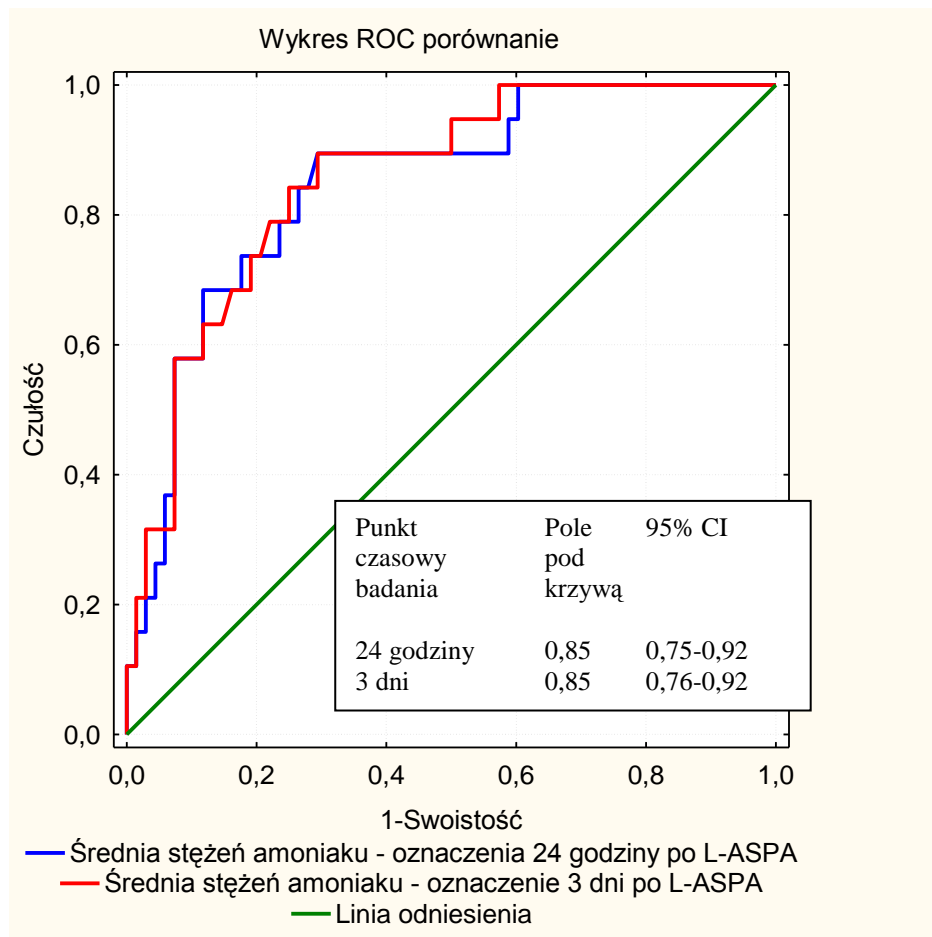
1 – pacjenci z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (>100 IU/l) we wszystkich oznaczeniach 3 dni po podaniu leku
 2 – pacjenci z aktywnością L-ASPA ≤ 100 IU/l w minimum 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku

Grupa pacjentów	Średnie przyrosty stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA [$\mu\text{mol/l}$]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
Z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (n=68)	-28	172	44	65	65
Z niską aktywnością L-ASPA (n=19)	17	81	26	64	43

Celem oceny trafności oznaczeń średniego stężenia amoniaku w wyodrębnieniu pacjentów z niską aktywnością L-ASPA wyznaczono krzywe ROC (rysunek 24.). Dla obu punktów czasowych badania (24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA) pole powierzchni pod krzywą ROC wynosiło odpowiednio: 0,85; 95%CI: 0,75-0,92; $p < 0,0001$ i 0,85; 95%CI: 0,76-0,92; $p < 0,0001$, co świadczy o umiarkowanej trafności tych testów diagnostycznych. Różnice w powierzchni pola po krzywą ROC dla obu punktów czasowych pomiaru stężenia amoniaku nie były istotne statystycznie ($p=0,79$). Dla obu punktów czasowych wyznaczono optymalny punkt odcięcia stężenia amoniaku dla czułości i swoistości w identyfikacji pacjentów z niską aktywnością L-ASPA, który wyniósł dla pomiaru wykonywanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA

odpowiednio: 91 $\mu\text{mol/l}$ i 36 $\mu\text{mol/l}$. Biorąc pod uwagę wartości predykcyjne najkorzystniejszy punkt odcięcia dla pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA wyniósł odpowiednio: 46 $\mu\text{mol/l}$ i 20 $\mu\text{mol/l}$.

Rysunek 24. Krzywe ROC dla średnich wartości pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA – ocena trafności w wyodrębnieniu pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej 100 IU/l



W tabeli 17 przedstawiono parametry oceniające wartość testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z niską aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku ocenianego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA.

Tabela 17. Ocena wartości testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)

Oceniany parametr	Średnie stężenie amoniaku			
	24 godziny po podaniu L-ASPA		3 dni po podaniu L-ASPA	
	$\leq 46 \mu\text{mol/l}$	$\leq 91 \mu\text{mol/l}$	$\leq 20 \mu\text{mol/l}$	$\leq 36 \mu\text{mol/l}$
Czułość	0,17 (0,04-0,41)	0,89 (0,67-0,99)	0,22 (0,06-0,48)	0,89 (0,67-0,99)
Swoistość	0,99 (0,92-1,0)	0,70 (0,58-0,81)	0,99 (0,92-1,0)	0,70 (0,58-0,81)
PV+	0,75 (0,19-0,99)	0,46 (0,28-0,63)	0,80 (0,28-0,99)	0,46 (0,30-0,60)
PV-	0,82 (0,72-0,89)	0,96 (0,86-0,99)	0,83 (0,73-0,90)	0,96 (0,89-0,99)
LR+	11,5 (4,1-32,3)	3,04 (2,40-3,80)	15,33 (6,5-36,4)	2,92 (1,97-3,41)
LR-	0,85 (0,1-6,0)	0,15 (0,04-0,60)	0,79 (0,1-5,6)	0,16 (0,04-0,47)
Youden's J	0,16 (-0,06-0,41)	0,59 (0,25-0,80)	0,21 (-0,02-0,48)	0,58 (0,34-0,68)

Na podstawie uzyskanych wyników, posługując się nomogramem Fagana, stwierdzono, że dla danego pacjenta prawdopodobieństwo wystąpienia niskich aktywności L-ASPA, wynoszące *a priori* 21%, wzrasta do około 70% w przypadku stwierdzenia średniego stężenia amoniaku $\leq 46 \mu\text{mol/l}$ (24 godziny po podaniu L-ASPA) lub $\leq 20 \mu\text{mol/l}$ (3 dni po podaniu leku) i do około 40% przy średnim stężeniu amoniaku $\leq 91 \mu\text{mol/l}$ (24 godziny po podaniu L-ASPA) lub $\leq 36 \mu\text{mol/l}$ (3 dni po podaniu leku). Prawdopodobieństwo to maleje do około 2%, jeśli średnie stężenie amoniaku oznaczane 24 godziny po podaniu L-ASPA wynosi powyżej $91 \mu\text{mol/l}$, a dla oznaczeń wykonywanych 3 dni po podaniu leku powyżej $36 \mu\text{mol/l}$.

Oceniono również przydatność pomiaru stężenia amoniaku w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA. Dla obu punktów czasowych pomiaru (24 godz. i 3 dni po podaniu L-ASPA) powierzchnia pola pod krzywą ROC wyniosła odpowiednio 0,84 (95%CI: 0,74-0,91; $p < 0,0001$) i 0,82 (95%CI: 0,66-0,97; $p < 0,0001$), co odpowiada umiarkowanej trafności testu. Krzywe ROC przedstawiono na rysunku 25. Różnice w powierzchni pola pod krzywą ROC dla obu punktów czasowych pomiaru stężenia amoniaku nie były istotne statystycznie ($p = 0,74$). Dla obu punktów czasowych wyznaczono optymalny punkt odcięcia stężenia amoniaku dla czułości i swoistości w identyfikacji pacjentów z niską aktywnością L-ASPA, który wyniósł dla pomiaru wykonywanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA odpowiednio: $90,5 \mu\text{mol/l}$ i $29 \mu\text{mol/l}$. Biorąc pod uwagę wartości predykcyjne punkt odcięcia dla pomiaru stężenia amoniaku 24 godz. i 3 dni po podaniu L-ASPA odpowiednio: $53 \mu\text{mol/l}$ i $14 \mu\text{mol/l}$. W tabeli 18 przedstawiono parametry oceniające wartość testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku ocenianego 24 godz. i 3 dni po podaniu L-ASPA.

Rysunek 25. Krzywe ROC dla średnich wartości pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA – ocena trafności w wyodrębnieniu pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej 30 IU/l

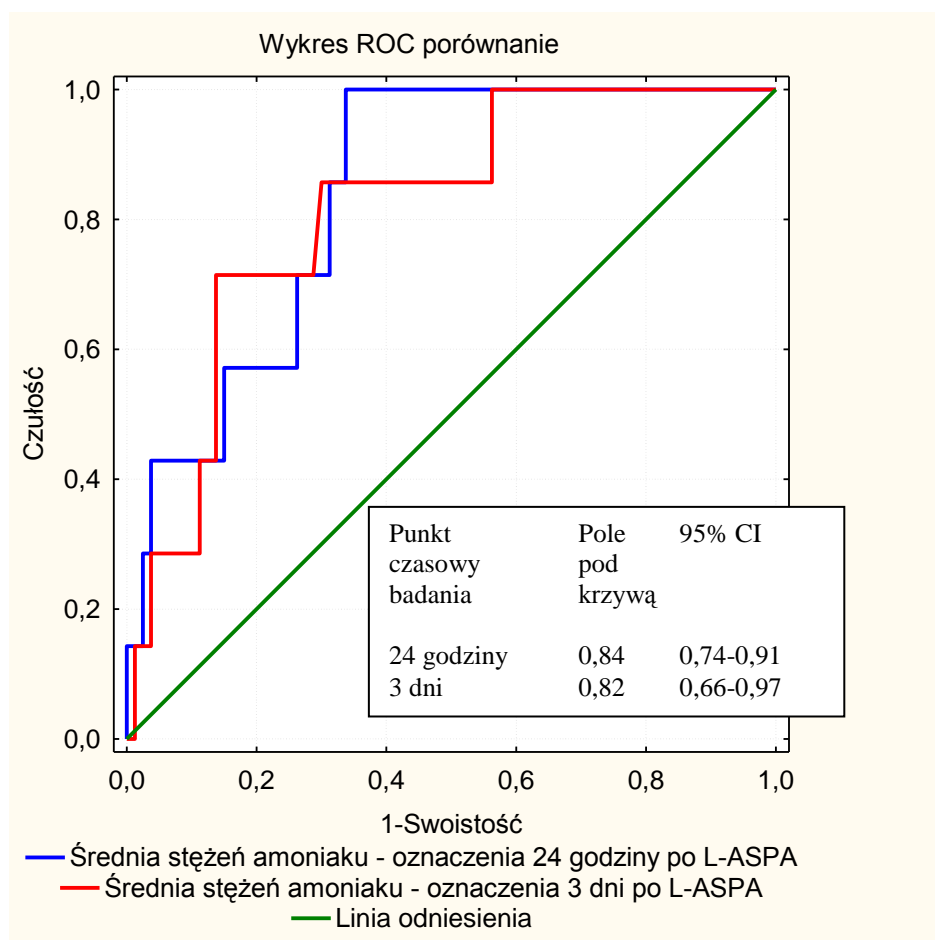


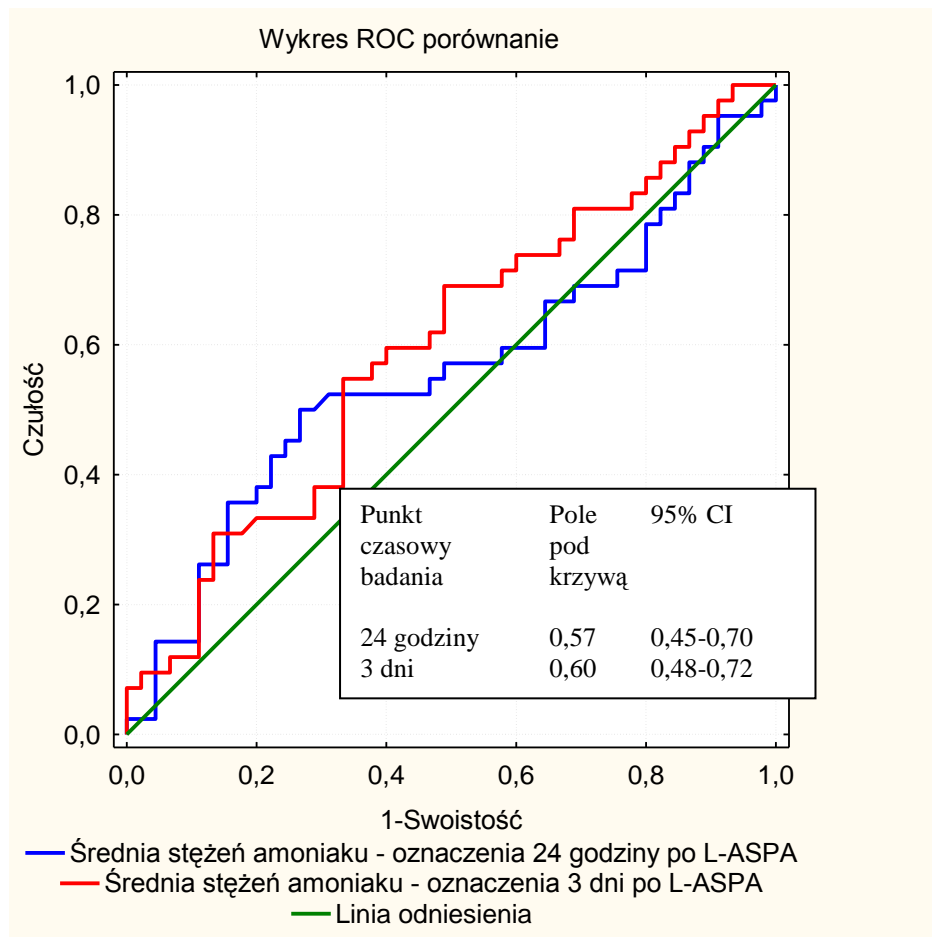
Tabela 18. Parametry oceniające wartość testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną (<30 IU/l) aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)

Oceniany parametr	Średnie stężenie amoniaku			
	24 godziny po podaniu L-ASPA		3 dni po podaniu L-ASPA	
	≤53 μmol/l	≤90,5 μmol/l	≤14 μmol/l	≤29 μmol/l
Czulość	0,43 (0,10-0,82)	1,0 (0,59-1,0)	0,14 (0,01-0,58)	0,71 (0,29-0,96)
Swoistość	0,96 (0,89-0,99)	0,66 (0,55-0,76)	0,99 (0,93-1,0)	0,86 (0,77-0,93)
PV+ ₋	0,50 (0,12-0,88)	0,21 (0,08-0,38)	0,50 (0,13-0,99)	0,31 (0,11-0,59)
PV-	0,95 (0,88-0,99)	1,0 (0,93-1,0)	0,93 (0,85-0,97)	0,97 (0,90-1,0)
LR+	11,43 (4,9-26,9)	2,96 (2,5-3,5)	11,43 (1,9-70)	5,19 (3,2-8,4)
LR-	0,59 (0,2-2,1)	0	0,87 (0,1-6,2)	0,33 (0,09-1,2)
Youden's J	0,39 (-0,01-0,81)	0,66 (0,14-0,76)	0,13 (-0,06-0,58)	0,57 (0,16-0,89)

Prawdopodobieństwo wystąpienia nieoznaczalnych aktywności L-ASPA u pacjenta ze średnim stężeniem amoniaku poniżej 53 $\mu\text{mol/l}$ 24 godziny po podaniu L-ASPA lub poniżej 14 $\mu\text{mol/l}$ 3 dni po podaniu leku wyznaczone przy pomocy nomogramu Fagana wyniosło ok. 55% (prawdopodobieństwo *a priori* – 8%). W przypadku średniego stężenia amoniaku powyżej 90,5 $\mu\text{mol/l}$ w oznaczeniach wykonywanych 24 godziny po podaniu L-ASPA prawdopodobieństwo to spada praktycznie do zera.

Pomiar stężenia amoniaku okazał się mniej użyteczny do wyodrębnienia pacjentów ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji alergicznej. Pole pod krzywą ROC (rysunek 26.) dla oznaczenia wykonywanego 24 godz. i 3 dni po podaniu L-ASPA wynosiło odpowiednio: 0,57 (95% CI: 0,45-0,70; $p=0,13$) i 0,60 (95% CI: 0,48-0,72; $p=0,046$), co odpowiada niskiej trafności testu. Różnice w powierzchni pola pod krzywą ROC dla obu punktów czasowych pomiaru stężenia amoniaku nie były istotne statystycznie ($p=0,63$).

Rysunek 26. Krzywe ROC dla średnich wartości pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA – ocena trafności w wyodrębnieniu pacjentów zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej na L-ASPA



Optymalnym punktem odcięcia ze względu na czułość i swoistość pomiaru stężenia amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA w wyodrębnieniu pacjentów ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji alergicznej wyniósł 37 $\mu\text{mol/l}$.

Parametry oceniające wartość testu diagnostycznego w identyfikacji pacjentów ze zwiększonym ryzykiem reakcji alergicznej dla wyznaczonego punktu odcięcia stężenia amoniaku ocenianego 3 dni po podaniu L-ASPA przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Ocena wartości testów diagnostycznych w wyodrębnieniu pacjentów ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji alergicznej dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)

Oceniany parametr	Średnie stężenie amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA
	$\leq 37 \mu\text{mol/l}$
Czułość	0,56 (0,40-0,71)
Swoistość	0,67 (0,51-0,80)
PV+	0,60 (0,43-0,76)
PV-	0,62 (0,47-0,76)
LR+	1,68 (1,2-2,4)
LR-	0,66 (0,4-1,1)
Youden's J	0,23 (-0,09-0,51)

Posługując się nomogramem Fagana, stwierdzono, że dla pacjentów ze średnim stężeniem amoniaku poniżej 37 $\mu\text{mol/l}$ prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji alergicznej wzrasta z 48% (prawdopodobieństwo *a priori*) do około 65%, a w przypadku średniego stężenia amoniaku powyżej 37 $\mu\text{mol/l}$ maleje do około 30%.

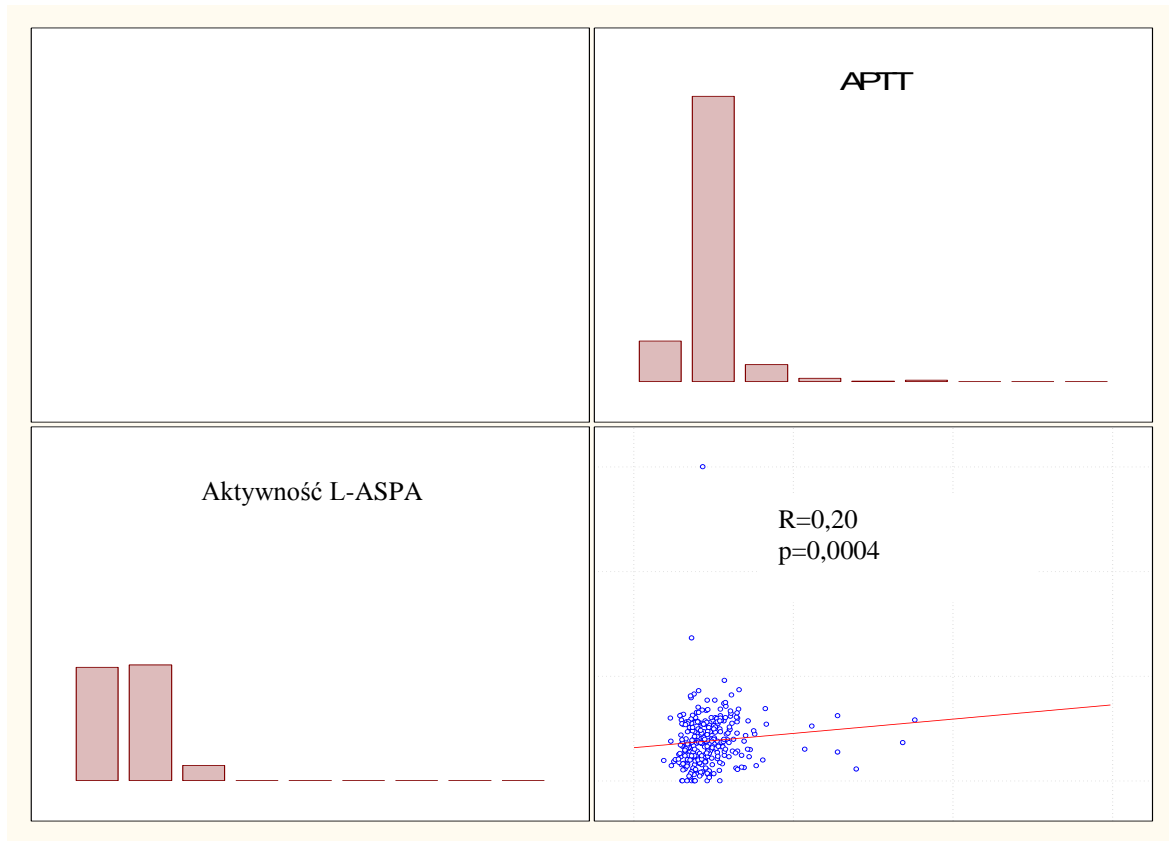
4.6. Działania niepożądane

4.6.1. Zaburzenia krzepnięcia

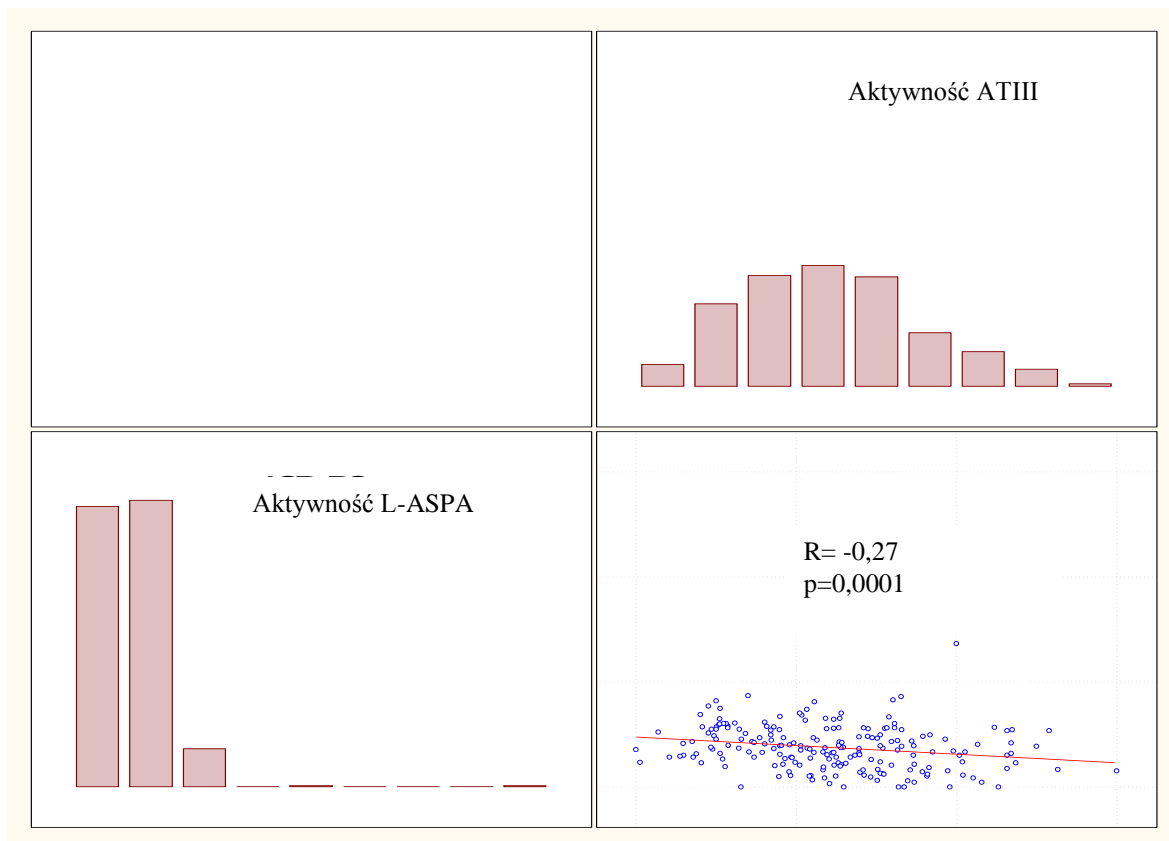
U 77 pacjentów (88%) występowały zaburzenia w układzie krzepnięcia, ale u większości z nich bezobjawowe. Objawową zakrzepicę rozpoznano u 4 (4,6%) dzieci. Najczęściej obserwowano niskie stężenie fibrynogenu oraz niską aktywność ATIII, wtedy u chorych stosowano świeżo mrożone osocze (FFP) i w wybranych przypadkach koncentrat ATIII.

Aktywność ATIII mierzona 24 godziny po podaniu L-ASPA korelowała ujemnie z aktywnością tego leku oznaczaną 3 dni po jego podaniu (R Spearman=-0,27; p=0,0001), natomiast w odniesieniu do APTT stwierdzono dodatnią korelację (R Spearman=0,20; p=0,0004). Wyniki przedstawiono na rysunku 27. i 28.

Rysunek 27. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA a APTT

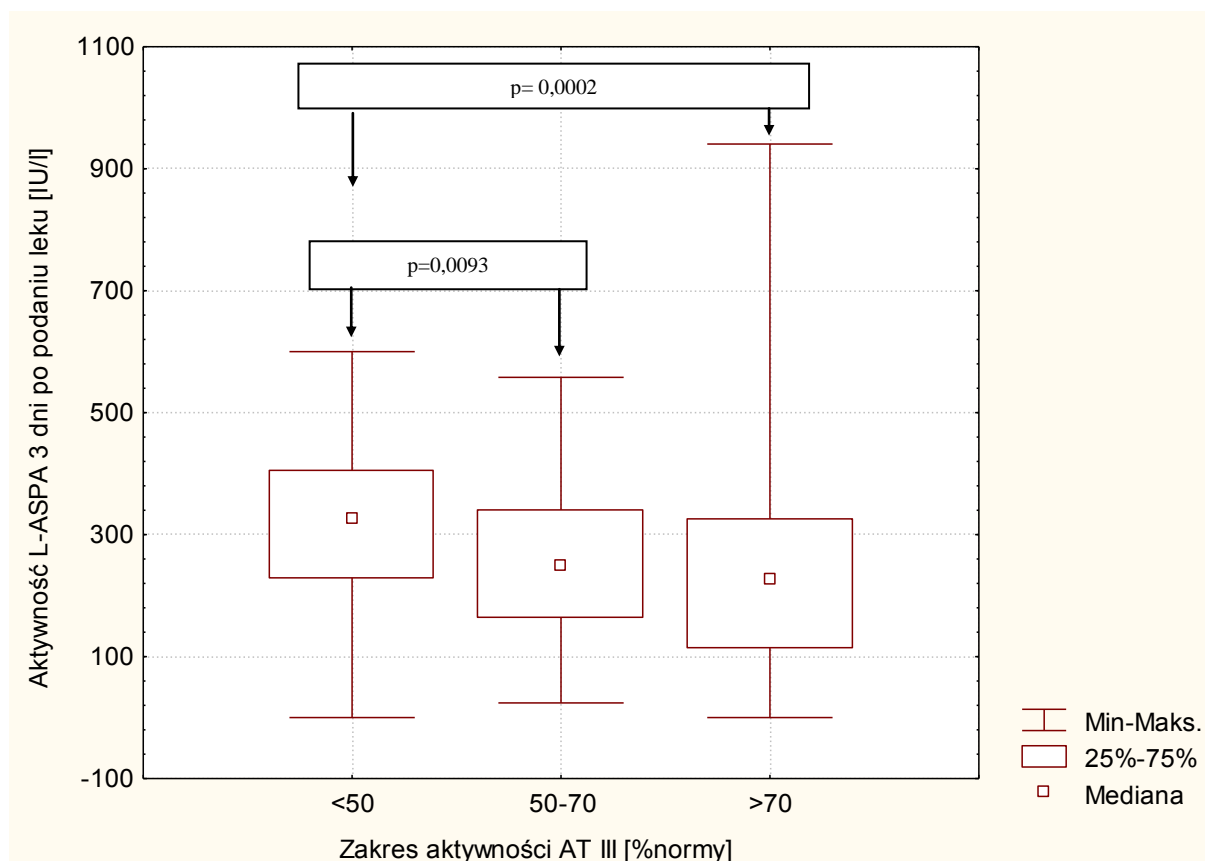


Rysunek 28. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA a aktywnością ATIII



Stwierdzono statystycznie istotną różnicę aktywności L-ASPA w zależności od aktywności ATIII. Wyniki przedstawiono na rysunku 29.

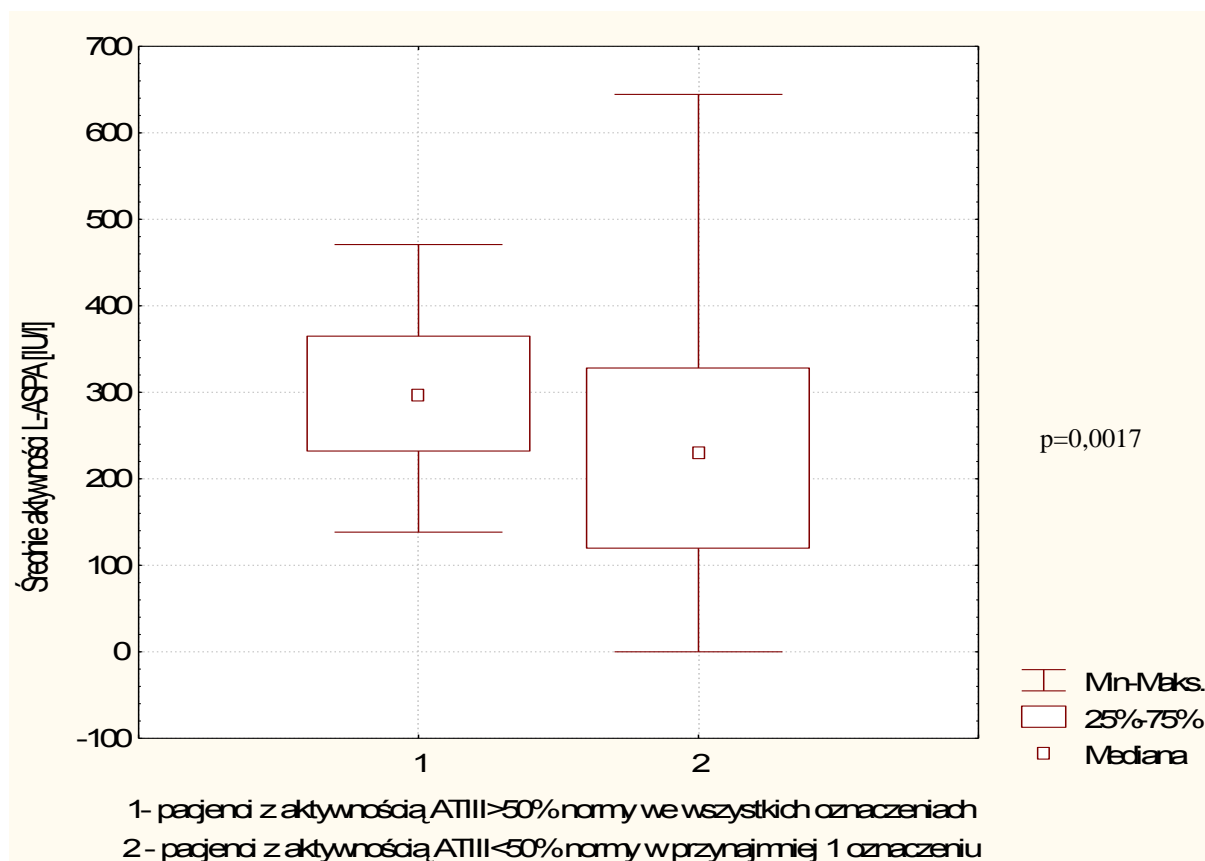
Rysunek 29. Różnice aktywności L-ASPA w zależności od aktywności ATIII



Zakres aktywności ATIII ocenianej 24 godz. po podaniu L-ASPA	Aktywność L-ASPA 3 dni po podaniu leku [IU/l]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
<50%	<30	600	225	405	325
50-70%	<30	558	162	341	248
>70%	<30	940	111	327	226

W grupie 48 pacjentów, u których przynajmniej w 1 oznaczeniu stwierdzono aktywność ATIII poniżej 50% normy, aktywność L-ASPA była istotnie wyższa w porównaniu do 39 chorych, u których we wszystkich oznaczeniach aktywność ATIII była wyższa lub równa 50% (mediana: 296 IU/l vs 229 IU/l; p=0,0017). W analizie uwzględniono 83 pacjentów, u których wykonywano oznaczenia aktywności ATIII. Wyniki przedstawiono na rysunku 30.

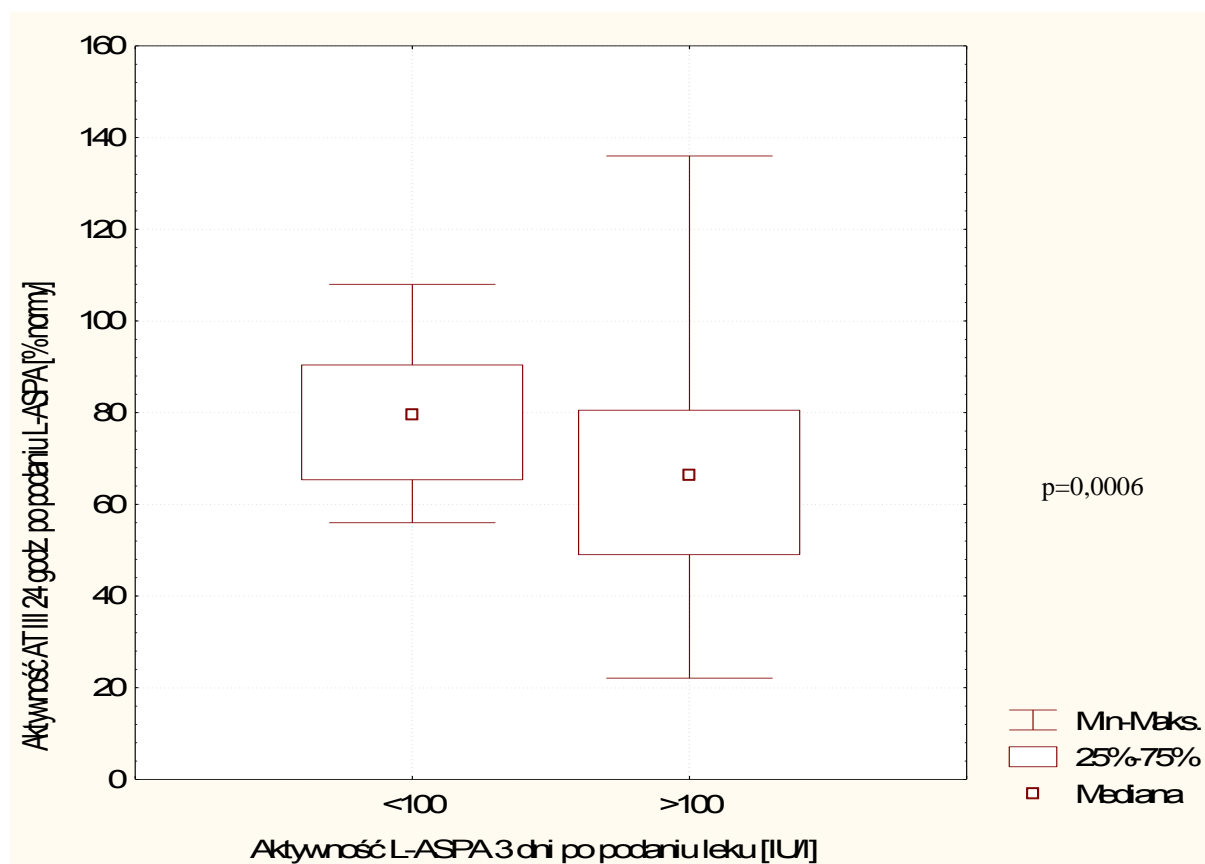
Rysunek 30. Średnia aktywność L-ASPA u obserwowanych pacjentów w zależności od aktywności ATIII



Grupa pacjentów	Średnie aktywności L-ASPA				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
Z aktywnością ATIII $\geq 50\%$ we wszystkich oznaczeniach (n=39)	138	471	231	366	296
Z aktywnością ATIII $< 50\%$ w przynajmniej 1 oznaczeniu (n=44)	<30	644	119	327	229

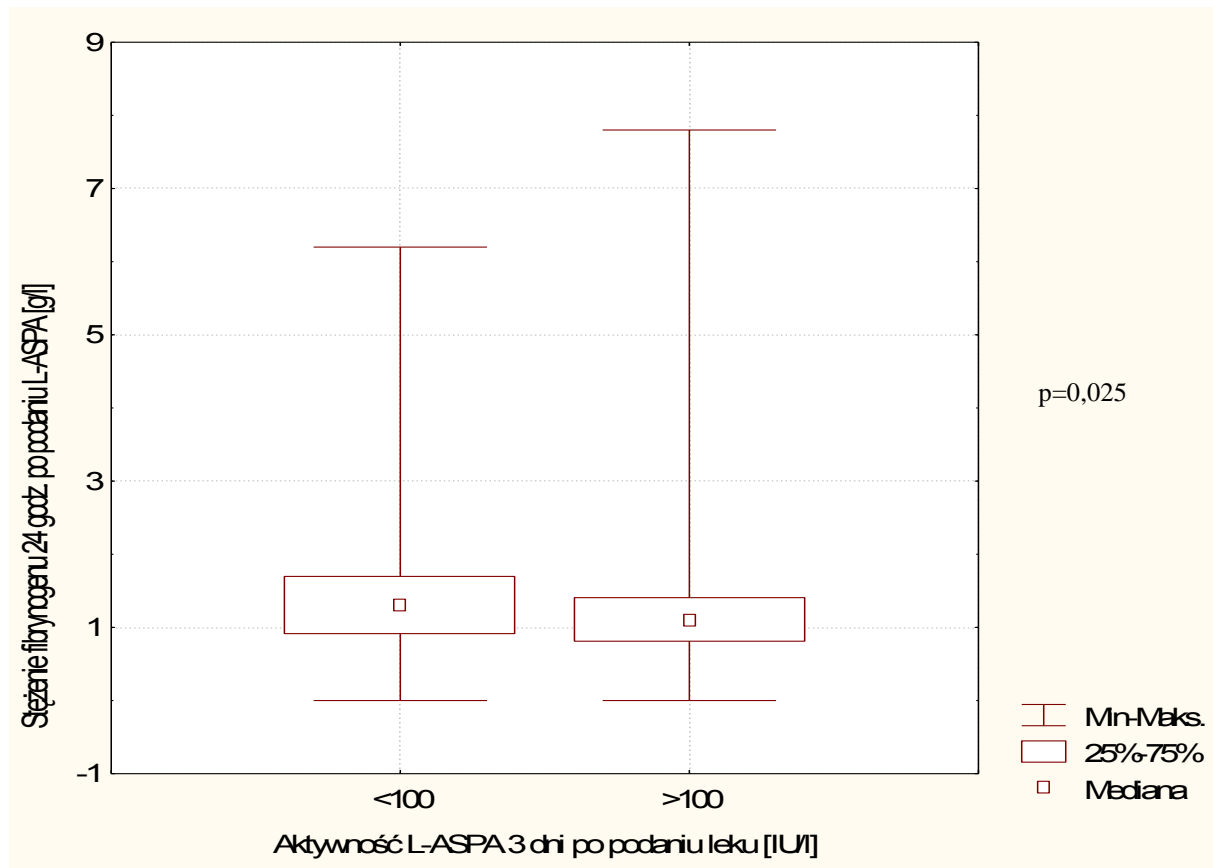
Przy aktywności asparaginazy poniżej 100 IU/l w porównaniu z aktywnością powyżej 100 IU/l obserwowano istotnie wyższą aktywność ATIII (mediana /zakres/ odpowiednio: 80% /56%-108%/ i 66% /22%-136%/, $p=0,0006$) oraz stężenie fibrynogenu (mediana /zakres/ odpowiednio: 1,3 /<0,5-6,2/ i 1,1 /<0,5-7,8/ g/l; $p=0,025$). Wyniki przedstawiono na rysunku 31. i 32.

Rysunek 31. Aktywność ATIII w zależności od aktywności L-ASPA



Aktywność L-ASPA 3 dni po podaniu leku [IU/l]	Aktywność ATIII 24 godziny po podaniu leku [% normy]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
≤100	56	108	65	90	80
>100	22	136	49	81	66

Rysunek 32. Stężenie fibrynogenu w zależności od aktywności L-ASPA



Aktywność L-ASPA 3 dni po podaniu leku [IU/l]	Stężenie fibrynogenu 24 godziny po podaniu leku [g/l]				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
≤100	<0,5	6,2	0,9	1,7	1,3
>100	<0,5	7,8	0,8	1,4	1,1

Objawowa zakrzepica wystąpiła u 4 (4,6%) pacjentów. U jednego z pacjentów zakrzepica wystąpiła po 6. dawce I protokołu, dotyczyła żyły udowej, biodrowej zewnętrznej i biodrowej wspólnej prawej. U drugiego z pacjentów powikłanie to pojawiło się dwukrotnie. W trakcie realizacji protokołu I obserwowano bardzo niskie stężenie ATIII (20% normy), wtedy stosowano osocze oraz koncentrat ATIII. W badaniach obrazowych nie stwierdzono cech zakrzepicy. Około jeden miesiąc po podaniu ostatniej dawki L-ASPA w ramach I protokołu, w USG wykazano skrzeplinę na pograniczu spływu żyły podobojczykowej prawej oraz żyły szyjnej wewnętrznej i w początkowym odcinku żyły ramiennie głowowej. Zastosowano dekstran oraz nadroparynę uzyskując po 10 dniach regresję zmian oraz normalizację w układzie krzepnięcia. Przed podaniem kolejnej dawki L-ASPA (blok HR1) w badaniach obrazowych ponownie stwierdzono zakrzepicę w żyły szyjnej wewnętrznej prawej bez towarzyszących zaburzeń w układzie krzepnięcia. Wstrzymano podanie L-ASPA, zastosowano leczenie uzyskując regresję zmian. Kolejne dawki L-ASPA podano bez powikłań. U innego pacjenta po 7 dniach po ostatniej dawce L-ASPA z II

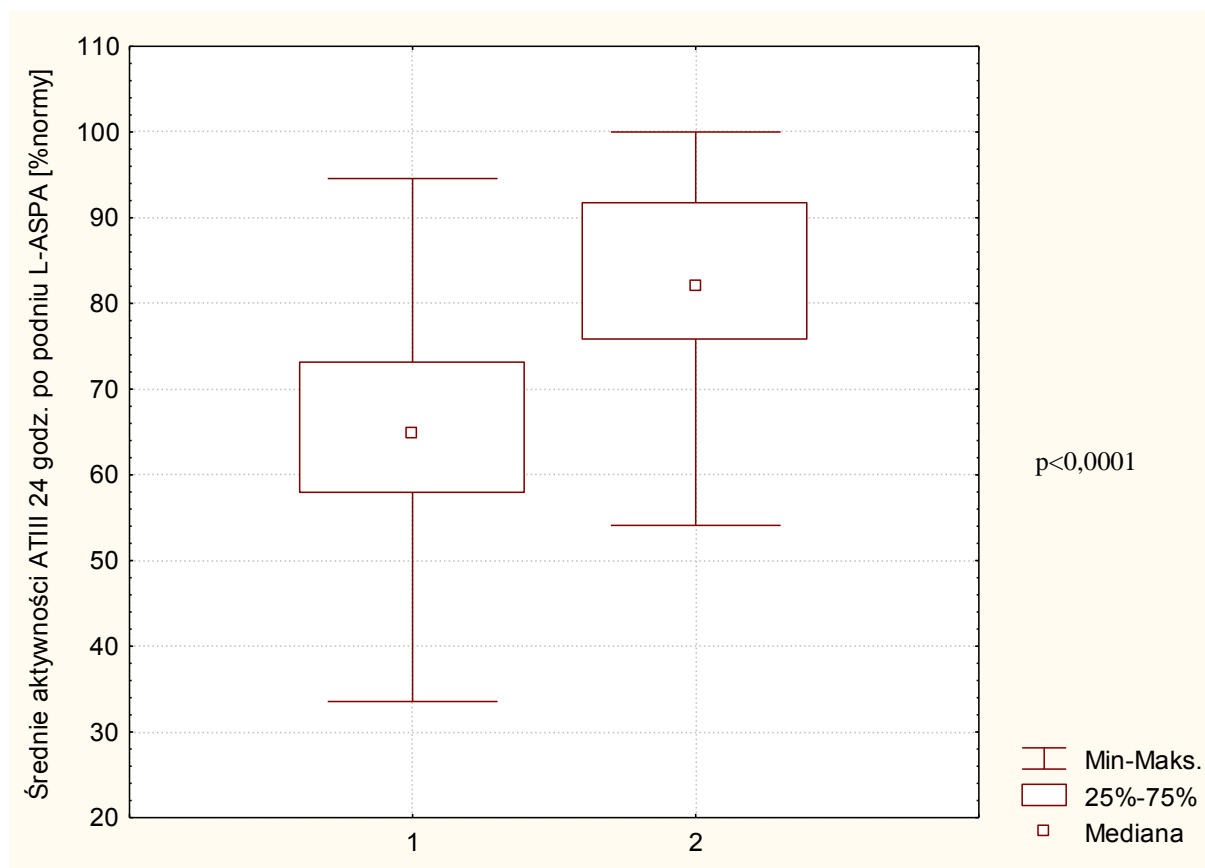
protokołu wystąpiły drgawki z utratą przytomności, na podstawie badań obrazowych rozpoznano zawał niedokrwienny, a badania układu krzepnięcia wykazały obniżony poziom ATIII (51,9%). U czwartego pacjenta po 10 dniach od podania ostatniej dawki L-ASPA wystąpiły drgawki, również wynikające ze zmian niedokrwiennych w OUN.

Pomimo istnienia zależności pomiędzy aktywnością L-ASPA a zaburzeniami krzepnięcia (obniżenie aktywności ATIII i stężenia fibrynogenu, wydłużenie APTT), nie stwierdzono różnicy w średniej aktywności leku pomiędzy pacjentami z objawową zakrzepicą a chorymi, u których nie wystąpiło to powikłanie (mediana /zakres/ odpowiednio: 198 /138-366/ i 271 /0-644/ IU/l; $p=0,5$).

W grupie pacjentów, u których występowały niskie aktywności L-ASPA wykazano znamienne wyższą średnią aktywność ATIII w porównaniu do pacjentów z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (odpowiednio mediana (zakres): 82% (54%-100%) vs 65% (33%-95%); $p<0,0001$). W analizie uwzględniono 83 pacjentów, którzy mieli oznaczoną aktywność L-ASPA i ATIII. Wyniki przedstawiono na rysunku 33.

Wykazano również istotną ujemną korelację średniej aktywności ATIII i średniej aktywności L-ASPA dla pacjenta (R Spearman: -0,41; $p<0,0001$). Wyniki przedstawiono na rysunku 34.

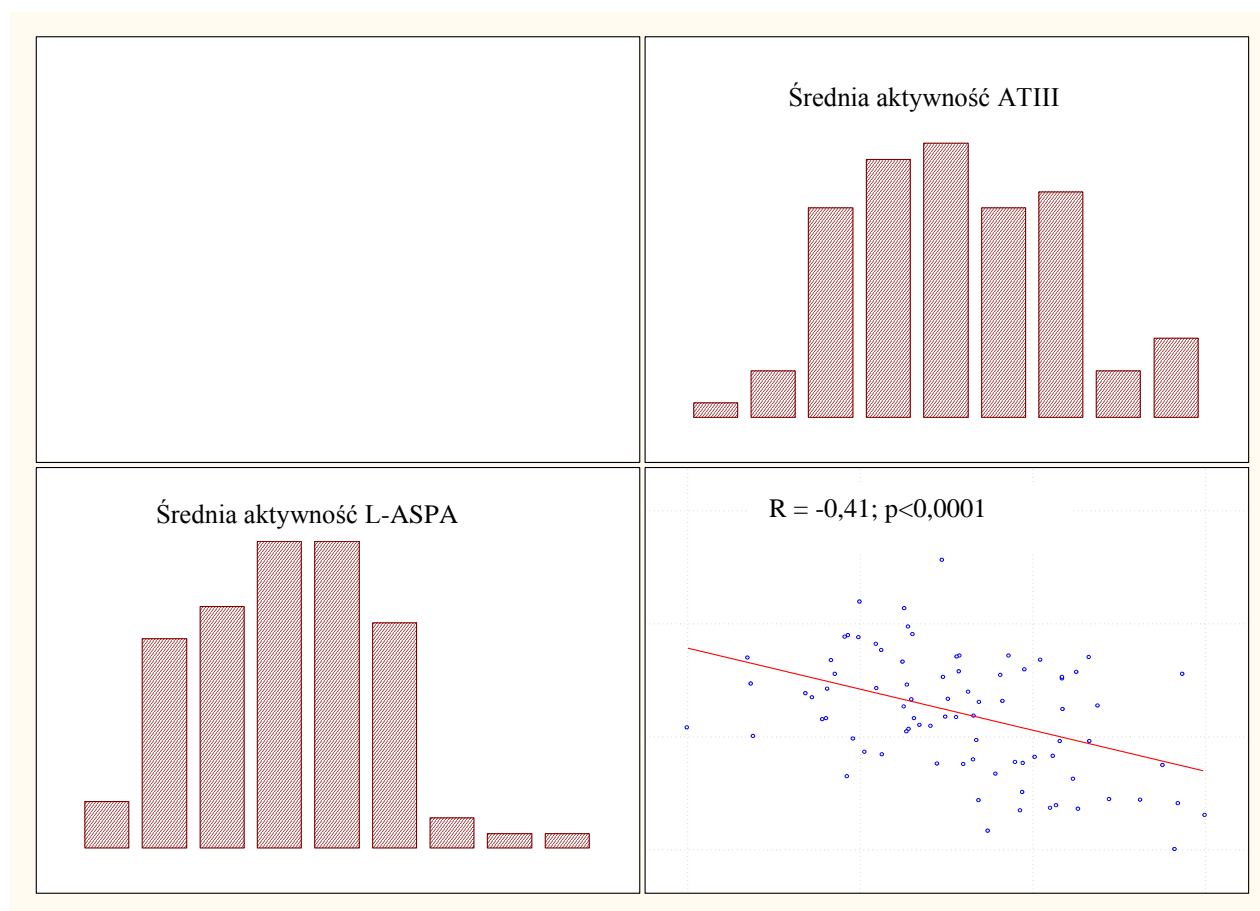
Rysunek 33. Średnie aktywności ATIII u pacjentów z terapeutyczną (>100 IU/l) i obniżoną (≤100 IU/l) aktywnością L-ASPA



1 – pacjenci z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (>100 IU/l) we wszystkich oznaczeniach 3 dni po podaniu leku
 2 – pacjenci z aktywnością L-ASPA ≤100 IU/l w minimum 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku

Grupa pacjentów	Aktywność ATIII 24 godziny po podaniu leku				
	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
Z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (n=65)	33	95	58	73	65
Z niską aktywnością L-ASPA (n=18)	54	100	76	92	82

Rysunek 34. Korelacja pomiędzy średnią aktywnością ATIII a średnią aktywnością L-ASPA



W związku z wykazaniem tych zależności przeprowadzono analizę krzywej ROC w celu oceny użyteczności pomiaru aktywności ATIII w wyodrębnieniu pacjentów z niską aktywnością L-ASPA. Powierzchnia pola pod krzywą ROC (rysunek 35.) wynosiła 0,87 (95% CI: 0,77-0,96), $p < 0,0001$), co odpowiada umiarkowanej trafności testu. Powierzchnia pola pod krzywą ROC dla pomiaru ATIII była większa od pól pod krzywymi ROC dla pomiarów stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA, jednak różnice te nie były istotne statystycznie (odpowiednio: $p = 0,507$ i $p = 0,735$). Wyznaczono punkt odcięcia wartości aktywności ATIII dla optymalnej czułości i swoistości pomiaru ATIII w wykryciu pacjentów z niską aktywnością L-ASPA, który wyniósł 71% normy. Biorąc pod uwagę wartości predykcyjne optymalny punkt odcięcia wyniósł 86% normy. W tabeli 20. przedstawiono parametry oceniające wartość testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z niską aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia aktywności ATIII.

Rysunek 35. Krzywa ROC dla średnich wartości aktywności ATIII – ocena trafności w wyodrębnieniu pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej 100 IU/l

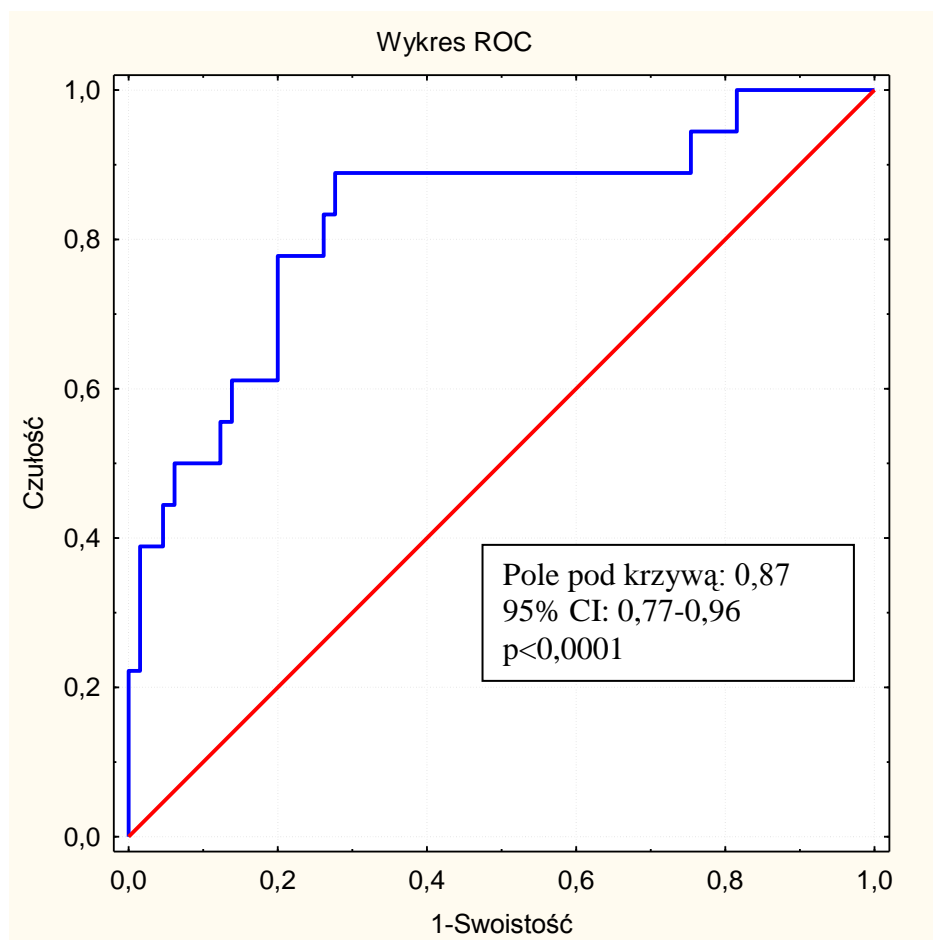


Tabela 20. Ocena wartości testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia aktywności ATIII badanej 24 godziny po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)

Oceniany parametr	Średnia aktywność ATIII 24 godz. po podaniu L-ASPA	
	≥ 71 % normy	≥ 86 % normy
Czułość	0,94 (0,71-1,0)	0,41 (0,18-0,47)
Swoistość	0,73 (0,60-0,83)	0,98 (0,92-1,00)
PV+	0,47 (0,29-0,65)	0,87 (0,44-1,0)
PV-	0,98 (0,89-1,0)	0,87 (0,77-0,93)
LR+	3,45 (2,90-4,20)	27,18 (15,4-48,0)
LR-	0,08 (0,01-0,60)	0,60 (0,08-4,3)
Youden's J	0,67 (0,31-0,83)	0,39 (0,10-0,47)

Posługując się nomogramem Fagana, stwierdzono, że prawdopodobieństwo wystąpienia niskiej aktywności L-ASPA dla pacjentów ze średnią aktywnością ATIII powyżej 71% normy i powyżej 86% wzrasta z 21% (prawdopodobieństwo *a priori*) odpowiednio do około 40% i 85%.

W przypadku średniej aktywności ATIII poniżej 71% normy prawdopodobieństwo to maleje do 1,5%, a dla średniej poniżej 86% normy prawdopodobieństwo wynosi około 10%.

Oceniono również przydatność pomiaru aktywności ATIII w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA. Powierzchnia pola pod krzywą ROC wyniosła 0,92 (95% CI: 0,82-1,0; $p < 0,0001$), co odpowiada wysokiej trafności i testu. Powierzchnia ta była większa od powierzchni pod krzywymi ROC dla oznaczeń stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA, jednak różnice te nie były istotne statystycznie (odpowiednio: $p = 0,373$ i $p = 0,195$). Krzywą przedstawiono na rysunku 36. Wyznaczono optymalny punkt odcięcia aktywności ATIII dla czułości i swoistości w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA, który wyniósł 80,5% normy. Biorąc pod uwagę wartości predykcyjne punkt odcięcia wyniósł 94,5% normy. W tabeli 21. przedstawiono parametry oceniające wartość testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia aktywności ATIII.

Posługując się nomogramem Fagana i przyjmując, że prawdopodobieństwo *a priori* wystąpienia u pacjenta nieoznaczalnej aktywności L-ASPA wynosi 8%, ustalono prawdopodobieństwo w zależności od średniego wyniku aktywności ATIII. Dla pacjentów ze średnią aktywnością ATIII powyżej 80,5% normy i powyżej 94,5% normy prawdopodobieństwo to wynosi odpowiednio: około 35% i około 75%, natomiast w przypadku średnich wartości ATIII poniżej 80,5% normy i poniżej 94,5% normy prawdopodobieństwo maleje odpowiednio do około 1,5% i 6%.

Rysunek 36. Krzywa ROC dla średnich wartości aktywności ATIII – ocena trafności w wyodrębnianiu pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej 30 IU/l

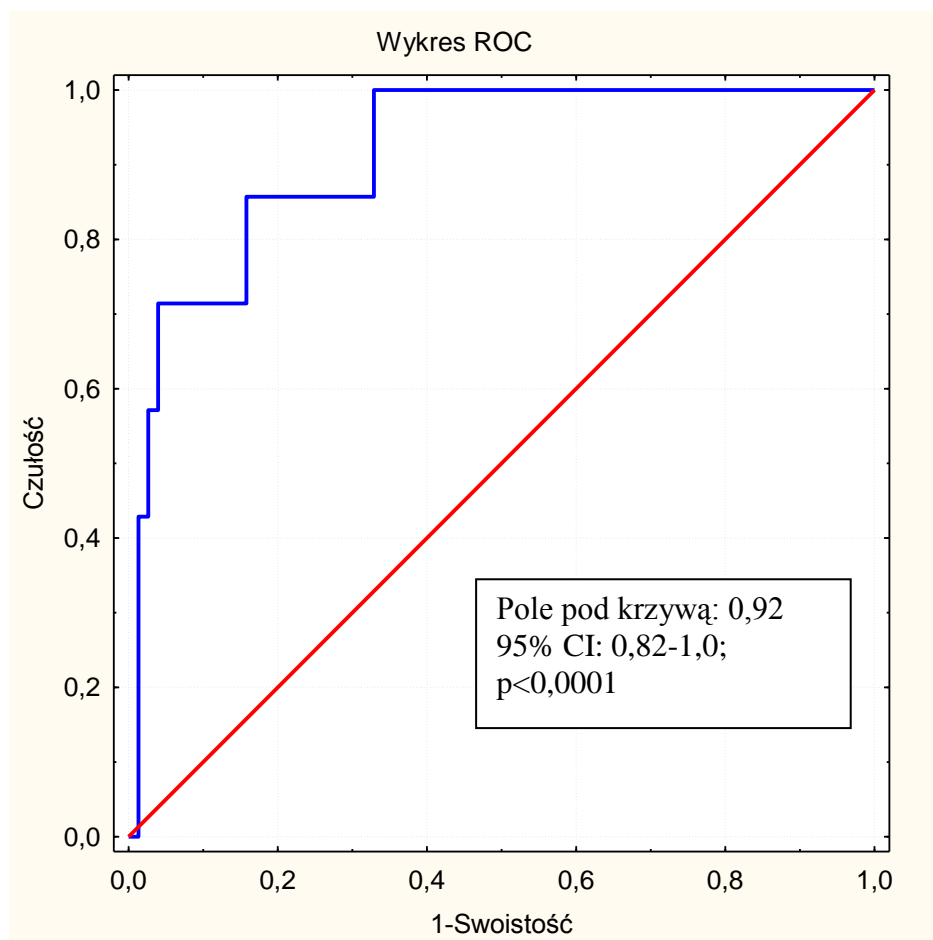


Tabela 21. Ocena wartości testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną (<30 IU/l) aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia aktywności ATIII badanej 24 godziny po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)

Oceniany parametr	Średnia aktywność ATIII 24 godz. po podaniu L-ASPA	
	≥80,5 % normy	≥94,5 % normy
Czułość	0,86 (0,42-0,99)	0,43 (0,10-0,82)
Swoistość	0,84 (0,74-0,92)	0,99 (0,93-1,0)
PV+	0,33 (0,13-0,59)	0,75 (0,13-0,99)
PV-	0,98 (0,92-1,0)	0,95 (0,87-0,99)
LR+	5,43 (4,0-7,50)	32,6 (13,8-76,7)
LR-	0,17 (0,03-1,1)	0,58 (0,07-4,5)
Youden's J	0,70 (0,16-0,91)	0,42 (0,03-0,82)

Wyznaczono także krzywą ROC w celu oceny użyteczności pomiaru aktywności ATIII w wyodrębnieniu pacjentów ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji alergicznej (rysunek 37.). Pole pod krzywą ROC wyniosło 0,62 (95% CI: 0,49-0,75; p=0,03) i było większe

od pola pod krzywymi dla oznaczeń stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA, różnice te jednak nie były istotne statystycznie (odpowiednio: $p=0,511$ i $p=0,484$). Punkt odcięcia dla optymalnych wartości czułości i swoistości tego testu wyniósł 71% normy, natomiast biorąc pod uwagę wartości predykcyjne najkorzystniejszy punkt odcięcia to 84% normy. Parametry oceniające wartość testów diagnostycznych dla powyższych punktów odcięcia aktywności ATIII przedstawiono w tabeli 22.

Rysunek 37. Krzywa ROC dla średnich wartości aktywności ATIII – ocena trafności w wyodrębnianiu pacjentów zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej na L-ASPA

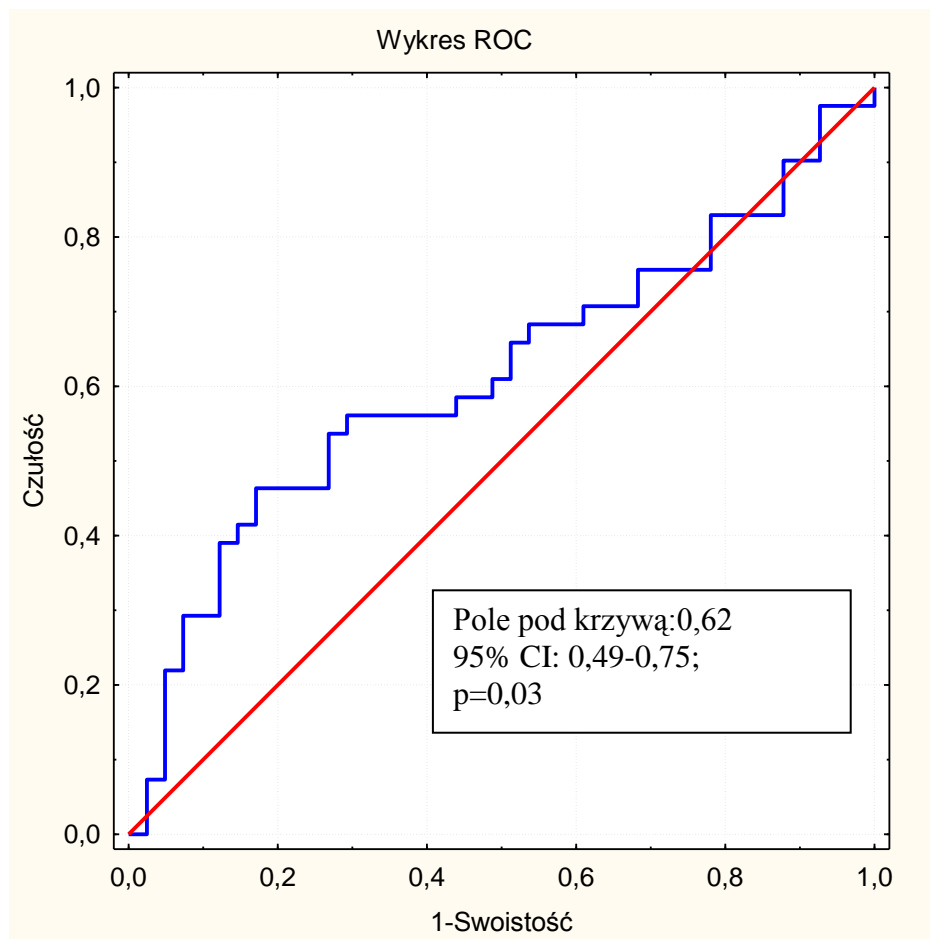


Tabela 22. Ocena wartości testów diagnostycznych w wyodrębnieniu pacjentów ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji alergicznej dla wyznaczonych punktów odcięcia aktywności ATIII badanej 24 godziny po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)

Oceniany parametr	Średnia aktywność ATIII 24 godz. po podaniu L-ASPA	
	≥70,5% normy	≥84% normy
Czułość	0,57 (0,41-0,73)	0,22 (0,11-0,38)
Swoistość	0,71 (0,54-0,84)	0,95 (0,83-0,99)
PV+	0,66 (0,48-0,81)	0,82 (0,48-0,98)
PV-	0,63 (0,47-0,77)	0,56 (0,43-0,68)
LR+	1,96 (1,4-2,7)	4,61 (2,6-8,2)
LR-	0,60 (0,3-1,1)	0,81 (0,2-3,2)
Youden's J	0,28 (-0,05-0,57)	0,17 (-0,06-0,37)

Posługując się nomogramem Fagana stwierdzono, że u pacjenta ze średnią aktywnością ATIII powyżej 70,5% normy prawdopodobieństwo reakcji nadwrażliwości wzrasta z wyjściowego wynoszącego 48% do około 65%, a dla średniej aktywności ATIII powyżej 84% normy prawdopodobieństwo to wynosi około 80%. W przypadku średniej aktywności ATIII poniżej 70,5% normy prawdopodobieństwo pojawienia się reakcji nadwrażliwości wynosi około 35%, a dla średniej poniżej 84% normy praktycznie nie różni się od prawdopodobieństwa *a priori* i wynosi około 45%.

4.6.2. Ostre zapalenie trzustki

OZT wystąpiło u 4 pacjentów (4,6%). U 1 pacjenta OZT rozpoznano po 7. dawce L-ASPA w trakcie realizacji protokołu I, został on zdyskwalifikowany z dalszego podawania tego leku. U innych 2 chorych objawy OZT pojawiły się po ostatniej dawce protokołu II i trzeciego protokołu III, w momencie wystąpienia powikłania zakończyli oni już wszystkie cykle leczenia obejmującego L-ASPA. U czwartego dziecka OZT wystąpiło po podaniu PEG-ASPA w trakcie leczenia wznowy, został on zdyskwalifikowany z dalszej terapii tym lekiem. U 3 obserwowanych pacjentów stwierdzono postać obrzękową OZT. Stosowano standardowe leczenie, blokery pompy protonowej, antybiotyk, początkowo ścisłą dietę, żywienie pozajelitowe, następnie w zależności od przebiegu choroby stopniowo rozszerzano żywienie doustne. U wszystkich 3 dzieci z obrzękową postacią OZT uzyskano ustąpienie objawów. W przypadku pacjenta z OZT po podaniu PEG-ASPA w leczeniu wznowy obserwowano ciężką postać martwiczą tego powikłania, z przejściową wtórną cukrzycą, wymagającą insulinoterapii.

Nie stwierdzono istotnej różnicy w średniej aktywności L-ASPA u pacjentów, u których doszło do OZT w porównaniu do pozostałych pacjentów (mediana (zakres): 205 IU/l (138 IU/l – 322 IU/l) vs 269 IU/l (0 IU/l – 644 IU/l); $p=0,53$).

4.6.3. Hepatotoksyczność

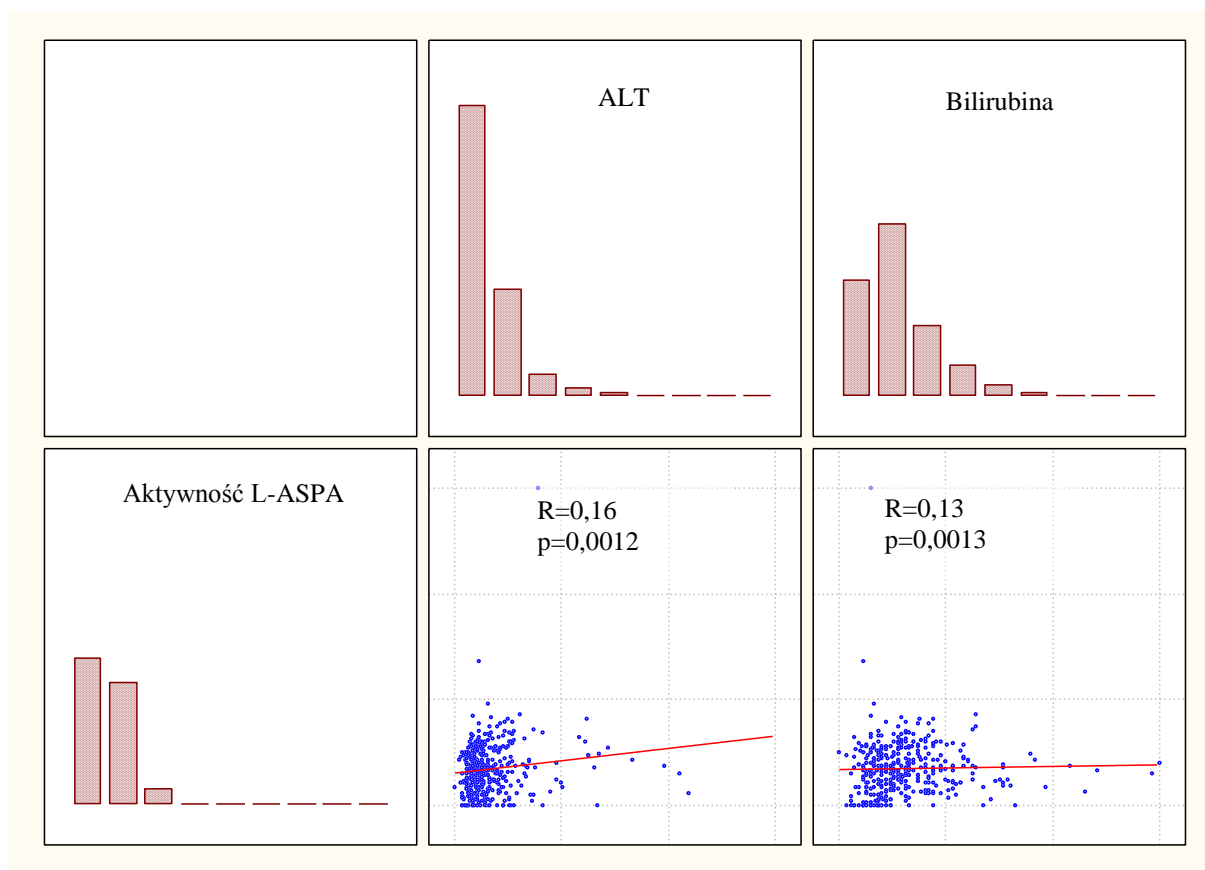
U 61 (70%) pacjentów aktywność enzymów wątrobowych w trakcie leczenia L-ASPA utrzymywała się w granicach normy lub była nieznacznie podwyższona odpowiadając I stopniowi toksyczności wg WHO (AST<150 IU/l, ALT<165 IU/l). Aktywność ALT pomiędzy 165 IU/l a 330 IU/l (II stopień toksyczności) w przynajmniej 1 z oznaczeń stwierdzono u 21 (24%) chorych (w tym u 1 dziecka równocześnie aktywność AST odpowiadała II stopniowi toksyczności – 150 U/l – 300 IU/l), aktywność ALT pomiędzy 330 IU/l a 600 IU/l (III stopień toksyczności) wystąpiła u 4 (4,6%) pacjentów, natomiast powyżej 600 IU/l (IV stopień) u 1 dziecka, u którego równocześnie aktywność AST odpowiadała III stopniowi toksyczności (300 IU/l – 600 IU/l). Poziom bilirubiny u 3 (3,4%) pacjentów przekraczał 55 µmol/l, co odpowiada III stopniowi toksyczności wg WHO (55 µmol/l –110 µmol/l). U wszystkich były to zaburzenia przemijające. Podsumowanie wyników badań oceniających funkcję wątroby obserwowanych pacjentów w trakcie leczenia L-ASPA zamieszczono w tabeli 23.

Tabela 23. Parametry oceniające funkcję wątroby u obserwowanych pacjentów w trakcie leczenia L-ASPA

Oceniany parametr	AST	ALT	Bilirubina
Średnia	34 IU/l	66 IU/l	15 µmol/l
Mediana	28 IU/l	48 IU/l	12 µmol/l
Wartość minimalna	9 IU/l	8 IU/l	1 µmol/l
Wartość maksymalna	487 IU/l	822 IU/l	82 µmol/l
Odchylenie standardowe	25 IU/l	61 IU/l	11 µmol/l

Wykazano statystycznie istotną słabo dodatnią korelację pomiędzy aktywnością L-ASPA badaną przed podaniem kolejnej dawki leku a ocenianą w tym samym czasie aktywnością ALT (R Spearman=0,16; p=0,0012) oraz stężeniem bilirubiny (R Spearman = 0,13; p=0,013). Wyniki przedstawiono na rysunku 39. Aktywność L-ASPA w oznaczeniach wykonanych w tym samym czasie, kiedy stwierdzano aktywność AST, ALT lub stężenie bilirubiny odpowiadające III i IV stopniowi toksyczności, nie różniła się istotnie od aktywności L-ASPA w oznaczeniach odpowiadających niższym wartościom parametrów oceniających funkcję wątroby (odpowiednio mediana /zakres/odpowiednio: 144,5 /80–209/ IU/l i 229 /0–940/ IU/l; p=0,39). Porównano również średnią aktywność L-ASPA u pacjentów, u których obserwowano III lub IV stopień hepatotoksyczności ze średnią aktywnością tego leku u chorych, u których nie wystąpiło to powikłanie, nie stwierdzono znamienych różnic (mediana /zakres/ odpowiednio: 240 /164–423/ IU/l i 249 /0-644/ IU/l; p=0,75).

Rysunek 39. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA a aktywnością ALT i stężeniem bilirubiny



4.6.4. Nefrotoksyczność

Parametry oceniające funkcję nerek (mocznik, kreatynina) u większości pacjentów mieściły się w granicach normy lub były nieznacznie podwyższone (I stopień toksyczności wg WHO), u jednego pacjenta w 1 oznaczeniu stwierdzono stężenie mocznika (20,9 mmol/l) i kreatyniny (121 μ mol/l) odpowiadające II stopniowi toksyczności wg WHO, u żadnego z obserwowanych chorych wartości parametrów nerkowych nie osiągnęły poziomu odpowiadającego III lub IV stopniowi toksyczności wg WHO. Wykazano statystycznie istotną słabo dodatnią korelację pomiędzy aktywnością asparaginazy badaną przed podaniem kolejnej dawki leku a ocenianym w tym samym czasie stężeniem mocznika (R Spearman=0,25; $p<0,0001$). Wyniki przedstawiono na rysunku 40.

Podsumowanie wyników badań oceniających funkcję nerek w trakcie leczenia L-ASPA u obserwowanych pacjentów przedstawiono w tabeli 23.

Rysunek 40. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA a stężeniem mocznika

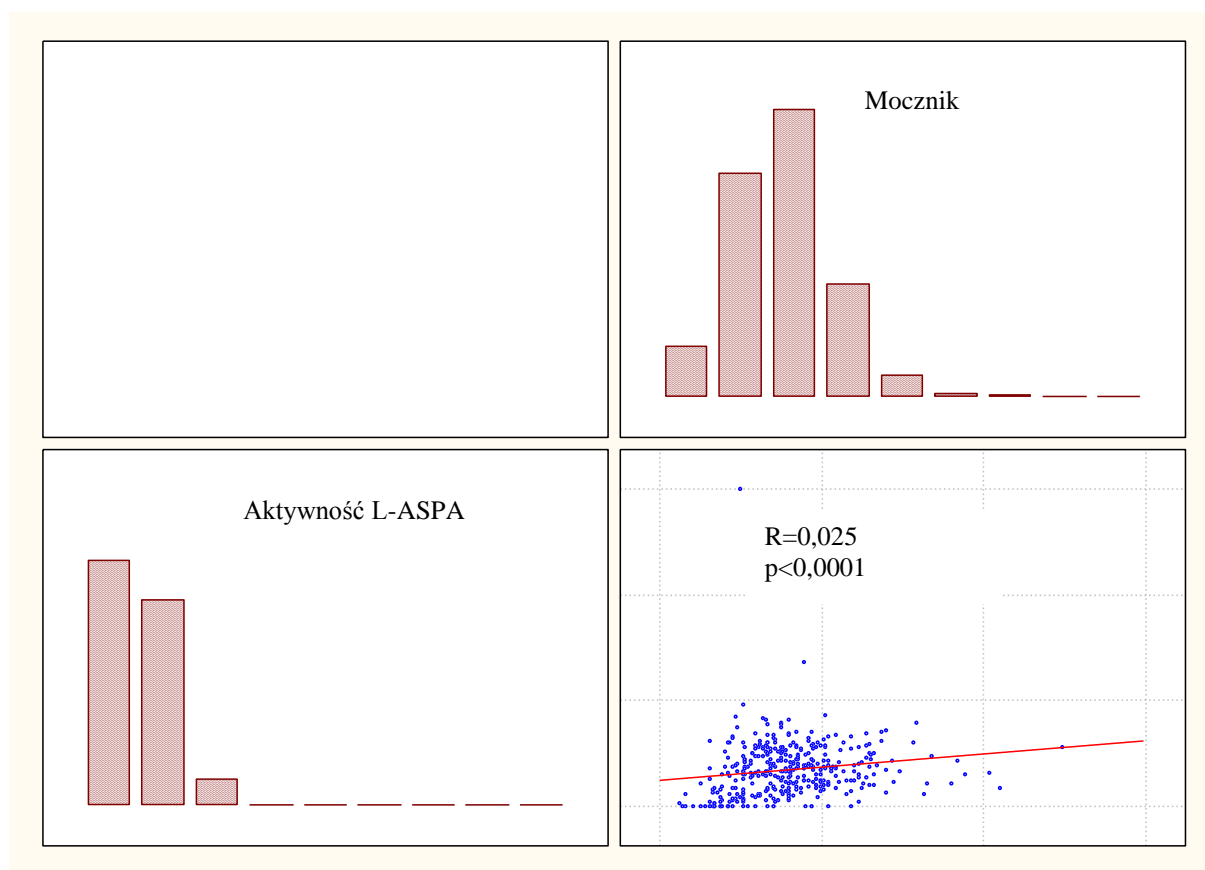


Tabela 24. Parametry oceniające funkcję nerek u obserwowanych pacjentów w trakcie leczenia L-ASPA

Oceniany parametr	Mocznik	Kreatynina
Średnia	6,4 mmol/l	37 μ mol/l
Mediana	6,3 mmol/l	34 μ mol/l
Wartość minimalna	1,6 mmol/l	1 μ mol/l
Wartość maksymalna	20,9 mmol/l	121 μ mol/l
Odchylenie standardowe	2,2 mmol/l	14 μ mol/l

4.6.5. Zaburzenia gospodarki węglowodanowej

U 1 pacjentki w czasie leczenia L-ASPA obserwowano cukrzycę wymagającą przejściowo insulinoterapii. U innego dziecka wystąpiła przemijająca hiperglikemia, chory ten nie wymagał leczenia. Pacjenci ci nie różnili się od pozostałych pod względem średniej aktywności L-ASPA (mediana /zakres/ odpowiednio: 274 /180–368/ IU/l i 266 /0–644/ IU/l; $p=0,73$).

4.7. Ocena wyników leczenia z uwzględnieniem czasów przeżycia

4.7.1. Uzyskanie I remisji całkowitej

U 85 (98%) pacjentów status szpiku kostnego w 33. dniu indukcji określono jako M1 (<5% blastów), a u 2 dzieci jako M2 (7% i 12% blastów). Pięćdziesięciu jeden chorych (59%) w 33. dniu leczenia indukcyjnego osiągnęło pierwszą RC. U 31 (36%) dzieci w związku z opóźnieniem odnowy hematopoezy pierwsza RC ustalona była później. W 3 innych przypadkach, w których status szpiku w 33. dniu określono jako M1, w kolejnych punkcjach szpiku po odnowie hematopoezy odsetek blastów był wyższy od 5% (8%; 8,5% i 9,7% - status M2). U 2 z tych pacjentów I RC ustalono po przeprowadzeniu bloku HR. W trzecim przypadku doszło do progresji choroby, u tego dziecka odsetek blastów w kolejnych punkcjach szpiku wyniósł 19 i 27%, remisję choroby uzyskano po zastosowaniu leczenia wg protokołu dla wznów ALL. Pacjenci, u których status szpiku kostnego w 33. dniu indukcji określono jako M2, uzyskali pierwszą RC przed zakończeniem leczenia indukcyjnego (I protokół). Grupa 5 pacjentów, u których odsetek blastów szpiku kostnym przekraczał 5 w 33. dniu indukcji, lub później po uzyskaniu odnowy hematopoezy, nie różniła się istotnie od grupy pozostałych 82 dzieci pod względem średniej aktywności L-ASPA (mediana /zakres/ odpowiednio: 224 /94–423/ IU/l i 269 /0–644/ IU/l; $p=0,61$). Nie stwierdzono również istotnego związku pomiędzy występowaniem aktywności L-ASPA poniżej 100 IU/l ani poniżej granicy oznaczalności a wynikiem punkcji szpiku (M1 vs M2) w 33. dniu indukcji lub w kolejnym badaniu po uzyskaniu odnowy hematopoezy (test chi-kwadrat z poprawką Yatesa - odpowiednio: $p=0,60$ i $p=0,87$).

4.7.2. Czas przeżycia całkowitego (OS)

Mediana OS w obserwowanej grupie 87 chorych wynosiła 32 (zakres: 3,5-50) miesiące. Prawdopodobieństwo ponad 4-letniego OS wynosiło 96% (95% CI: 94%-98%). Spośród obserwowanych 87 pacjentów 3 (3,4%) dzieci zmarło. U 2 z nich przyczyną zgonu była posocznica w okresie neutropenii w trakcie realizacji bloków HR (3,5 i 6 miesięcy od rozpoznania, odpowiednio 2,5 i 5 miesięcy od uzyskania IRC). W jednym przypadku przyczyną zgonu w I RC był zespół hemofagocytarny (HS), który wystąpił w trakcie podtrzymywania remisji, 26 miesięcy od rozpoznania ALL. Charakterystykę zmarłych pacjentów przedstawiono w tabeli 25.

Aktywność L-ASPA u pacjentów, którzy zmarli, nie różniła się znamienne od aktywności tego leku w grupie pozostałych chorych (mediana /zakres/ odpowiednio: 231 /65-312/ IU/l i 269 /0–644/ IU/l; $p=0,38$).

Tabela 25. Charakterystyka zmarłych pacjentów

Pacjent	Rozpoznanie	Grupa ryzyka	Czas przeżycia od rozpoznania	Przyczyna zgonu	Ilość podań L-ASPA	Aktywność L-ASPA [IU/l]: średnia (zakres)
Ł.P.	T-ALL	HR	3,5 miesiąca	posocznica	2	312 (276-382)
S.B.	cALL	HR	6 miesięcy	posocznica	9	231 (160-281)
S.P.	przejściowa ALL	SR	25 miesięcy	zespół hemofagocytarny	12	65 (33-107)

4.7.3. Czas przeżycia wolnego od niekorzystnych wydarzeń (EFS)

Mediana EFS w obserwowanej grupie 87 pacjentów wynosiła 32 (zakres: 2 -50) miesiące. Prawdopodobieństwo ponad 4-letniego EFS wynosiło 85% (95% CI: 80%-90%). Niekorzystne wydarzenia wystąpiły u 9 pacjentów (3 zgony z powodu powikłań, 5 wznów, 1 wczesna progresja).

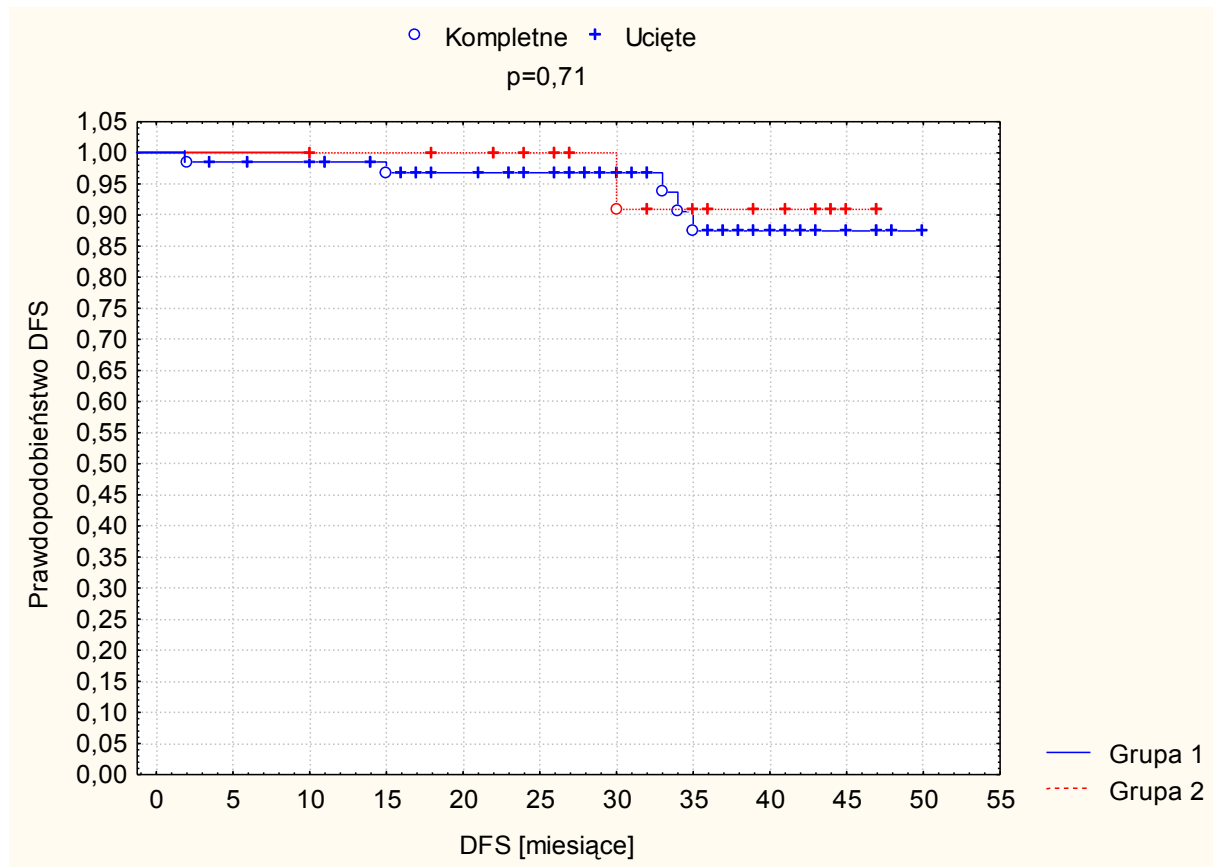
4.7.4. Czas przeżycia wolnego od choroby (DFS)

W obserwowanej grupie pacjentów DFS wynosił od 2 do 50 (mediana 32) miesięcy. Prawdopodobieństwo ponad 4-letniego DFS wynosiło 88,5% (95% CI: 84-93%). Niepowodzenie leczenia (1 wczesna progresja, 5 wznów) wystąpiło u 6 (6,9%) spośród 87 dzieci. U jednego z chorych do progresji choroby doszło przed uzyskaniem pierwszej RC, w czasie realizacji I protokołu programu ALL IC-BFM-2002. Pierwszą remisję uzyskano po zastosowaniu protokołu dla wznów ALL, a następnie przeprowadzono allo-HSCT. W momencie zakończenia obserwacji dziecko pozostawało w pierwszej RC. Wznowę stwierdzono u 5 dzieci. U jednego z pacjentów z proB-ALL (IRG) izolowaną wznowę szpikową rozpoznano 4 miesiące po zakończeniu leczenia (pierwsza RC utrzymywała się 32 miesiące), pacjent ten żyje w drugiej RC po leczeniu wg programu dla wznów ALL, po allo-HSCT. U jednej chorej z cALL (IRG) wznowę szpikową stwierdzono w trakcie badań przed zakończeniem leczenia (pierwsza RC utrzymywała się 29 miesięcy), u tej pacjentki zastosowaniu program leczenia dla wznów, osiągnięto drugą RC, w momencie zakończenia obserwacji planowano HSCT. U trzeciego z pacjentów z cALL (IRG) do wznowy doszło w trakcie leczenia podtrzymującego remisję 15 miesięcy od rozpoznania, 14 miesięcy od uzyskania pierwszej RC, zastosowano leczenie wg programu dla wznów ALL oraz allo-HSCT, drugą wznowę szpikową z zajęciem jąder rozpoznano 22,5 miesiąca po uzyskaniu drugiej RC, w momencie zakończenia obserwacji u pacjenta po drugim allo-HSCT od 7 miesięcy

utrzymywała się trzecia RC. U kolejnego pacjenta z cALL (IRG) wznowę szpikową z zajęciem jąder stwierdzono 8 miesięcy po zakończeniu leczenia, 33 miesiące po osiągnięciu pierwszej RC. W momencie zakończenia obserwacji pacjent był w trakcie leczenia wg programu dla wznów ALL, od 5,5 miesiąca pozostawał w drugiej RC. U kolejnego dziecka wznowę (zajęcie szpiku oraz OUN) rozpoznano 11 miesięcy po zakończeniu leczenia (pierwsza RC utrzymywała się 32 miesiące), drugą RC uzyskano 2 miesiące przed zakończeniem obserwacji.

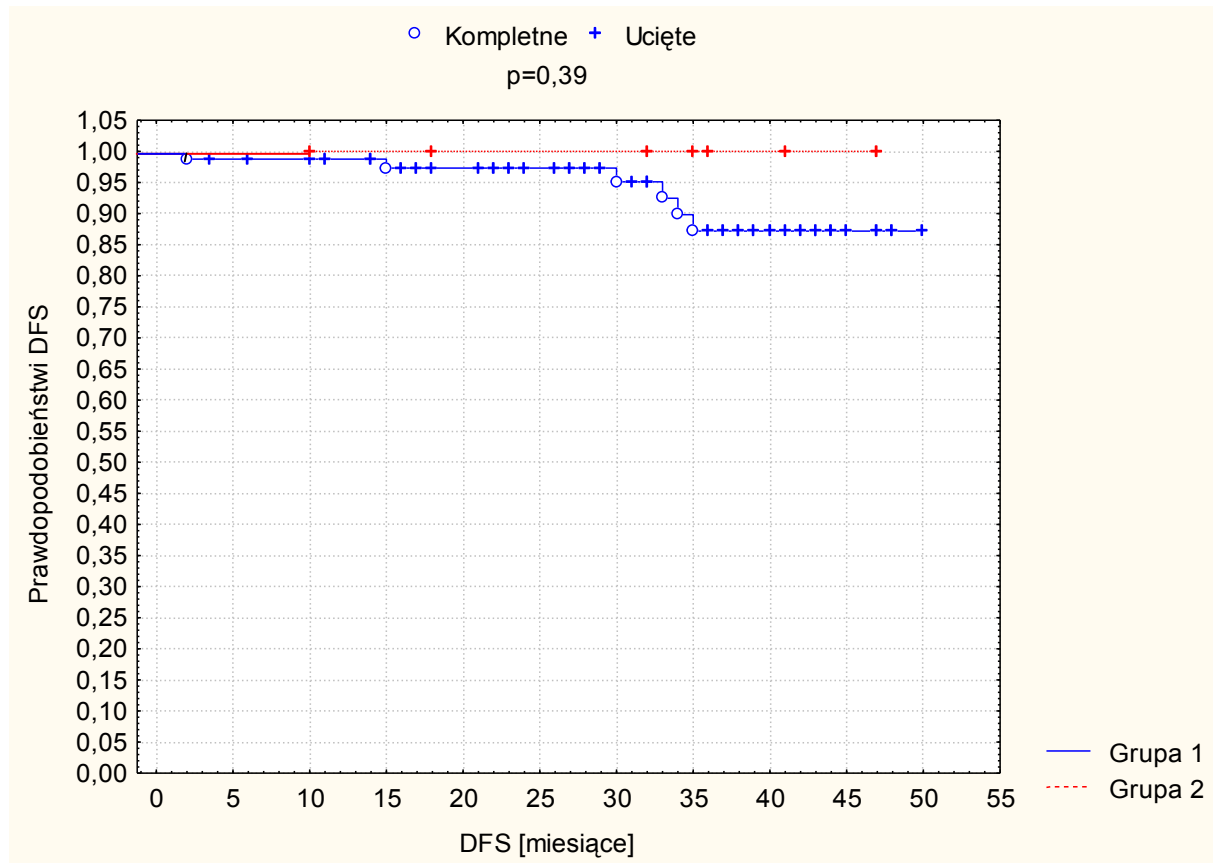
Nie stwierdzono istotnych różnic w prawdopodobieństwie ponad 4-letniego DFS pomiędzy grupami z terapeutyczną i niską aktywnością L-ASPA (odpowiednio: 86% i 90%; $p=0,71$), z aktywnością nieoznaczalną i aktywnością powyżej 30 IU/l (odpowiednio 100% i 86%, $p=0,39$), ani pomiędzy grupą pacjentów z reakcją alergiczną i bez reakcji (odpowiednio 89% i 84%; $p=0,88$). Krzywe przeżycia przedstawiono na rysunku 41., 42. i 43.

Rysunek 41. Czas przeżycia wolnego od choroby (DFS) w grupie pacjentów z terapeutyczną (>100 IU/l) i obniżoną (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA



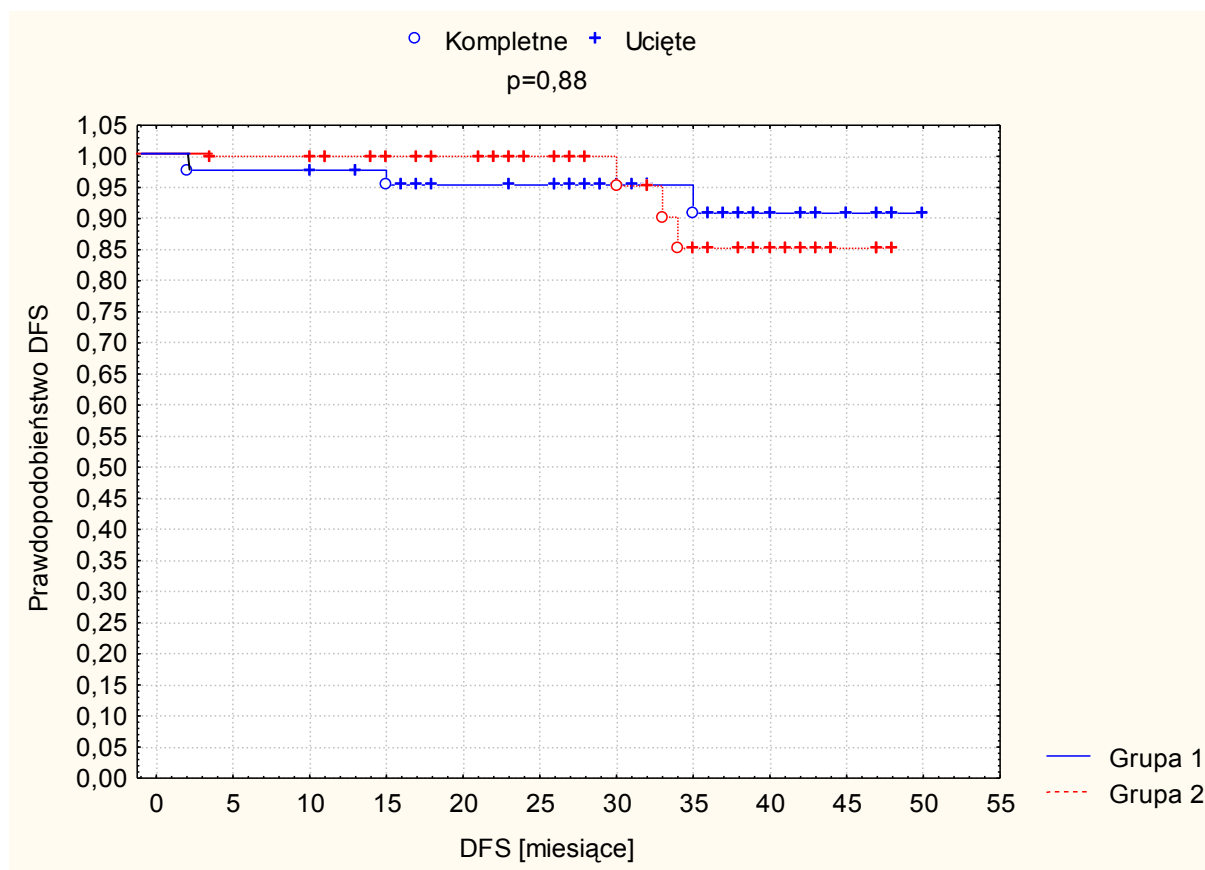
Grupa 1 – pacjenci z terapeutyczną aktywnością L-ASPA (n=68)
Grupa 2 – pacjenci z niską aktywnością L-ASPA (n=19)

Rysunek 42. Czas przeżycia wolnego od choroby (DFS) w grupie pacjentów z nieoznaczalną (<30 IU/l) aktywnością L-ASPA i aktywnością powyżej 30 IU/l



Grupa 1 – pacjenci z aktywnością L-ASPA powyżej 30 IU/l we wszystkich oznaczenia 3 dni po podaniu leku (n=80)
 Grupa 2 – pacjenci z aktywnością L-ASPA poniżej 30 IU/l w przynajmniej 1 oznaczeniu 3 dni po podaniu leku (n=7)

Rysunek 43. Czas przeżycia wolnego od choroby (DFS) w grupie pacjentów, u których doszło do reakcji alergicznej i w grupie pacjentów bez reakcji



Grupa 1 – pacjenci bez reakcji alergicznej (n=43)

Grupa 2 – pacjenci, u których doszło do reakcji alergicznej (n=42)

W grupie pacjentów, u których doszło do niepowodzenia leczenia, średnie wartości aktywności L-ASPA nie różniły się znamienne od tych wartości u pozostałych pacjentów (mediana /zakres/ odpowiednio: 322 /95–644/ IU/l i 266 /0–549/ IU/l; $p=0,34$). Nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem niskich i nieoznaczalnych aktywności L-ASPA oraz pojawieniem się reakcji nadwrażliwości a niepowodzeniem leczenia (test chi-kwadrat z poprawką Yatesa - odpowiednio: $p=0,85$; $p=0,98$ i $p=0,74$).

4.7.5. Czas przeżycia wolnego od wznowy (RFS)

Spośród 87 obserwowanych dzieci z ALL, pierwszą RC w czasie realizacji protokołu I lub bloku HR uzyskało 86 (99%) pacjentów. W jednym przypadku pierwszą RC ustalono po zastosowaniu protokołu dla wznów ALL z powodu wystąpienia progresji choroby w trakcie realizacji protokołu I terapii pierwszej linii, jeszcze przed uzyskaniem pierwszej RC. Troje dzieci zmarło w pierwszej RC z powodu powikłań. Wznowę rozpoznano u 5 pacjentów (tabela 26.). W dniu zakończenia obserwacji w pierwszej remisji choroby pozostawało 79 (91%) chorych. RFS

wynosił od 1 do 48 (mediana 29) miesięcy. Prawdopodobieństwo 4-letniego RFS wyniosło 89,5% (95% CI: 85%-94%).

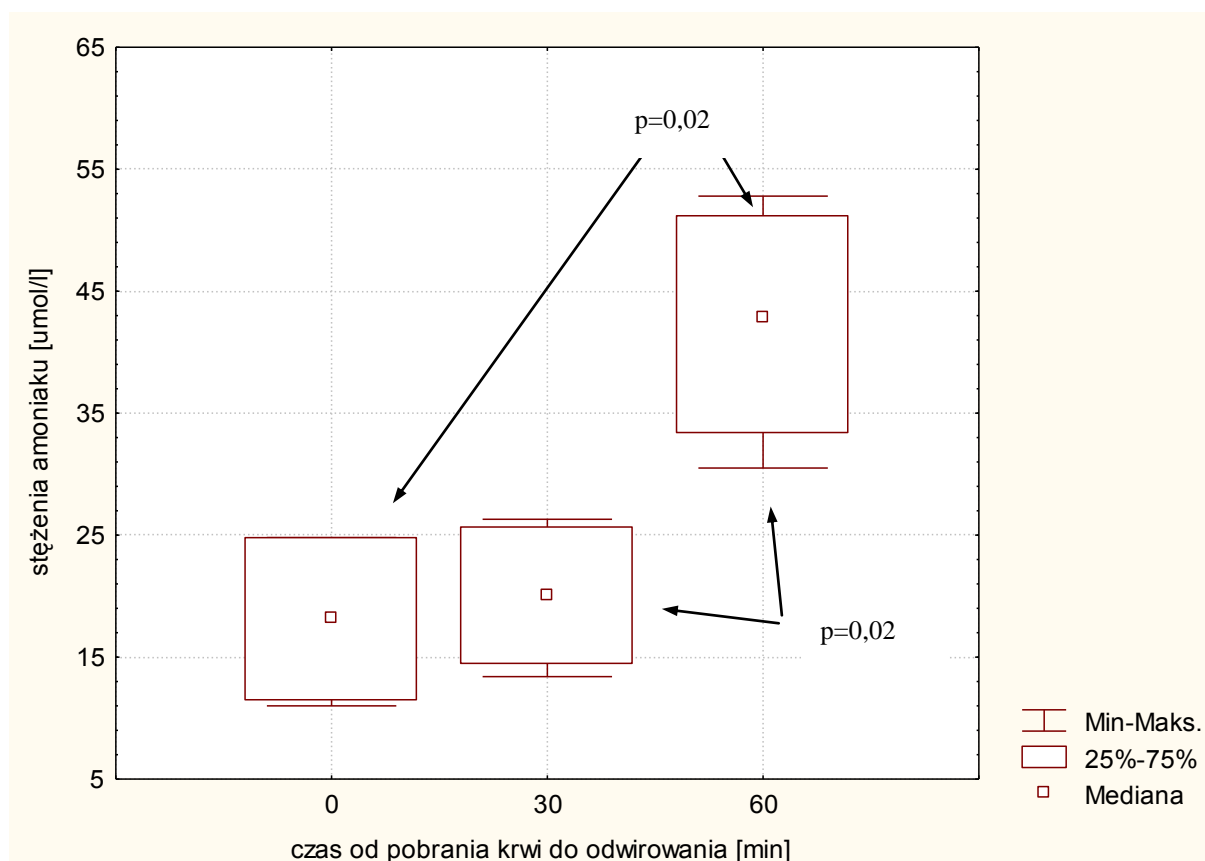
Tabela 26. Charakterystyka pacjentów, u których doszło do wznowy ALL

Pacjent	Rozpoznanie	Grupa ryzyka	Czas przeżycia wolnego od wznowy	Lokalizacja wznowy	Aktywność L-ASPA [IU/l]: średnia (zakres)
P.A.	proB-ALL	IR	32 miesiące	szpik kostny	364 (308-394)
D.D.	cALL	IR	29 miesięcy	szpik kostny	95 (41-159)
M.W.	cALL	IR	14 miesięcy	szpik kostny	644 (231-2063)
T.M.	cALL	IR	33 miesiące	szpik kostny, jądra	320 (229-416)
K.S.	cALL	IR	32 miesiące	szpik kostny, OUN	471 (261-558)

4.8. Ocena przyrostu stężenia amoniaku po dodaniu L-ASPA do osocza *in vitro*

W wykonanym doświadczeniu wykazano różnicę wyjściowego stężenia amoniaku w zależności od czasu, jaki upłynął od pobrania krwi do jej odwirowania: natychmiast, 30 minut i 60 minut po pobraniu. Mediana stężenia amoniaku wynosiła odpowiednio: 18 $\mu\text{mol/l}$, 20 $\mu\text{mol/l}$ i 43 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,02$) – rysunek 44. Potwierdza to konieczność wykonywania oznaczania niezwłocznie po pobraniu materiału do badania. Nie stwierdzono wpływu zastosowanego antykoagulantu na wyniki oznaczeń wstępnego stężenia amoniaku.

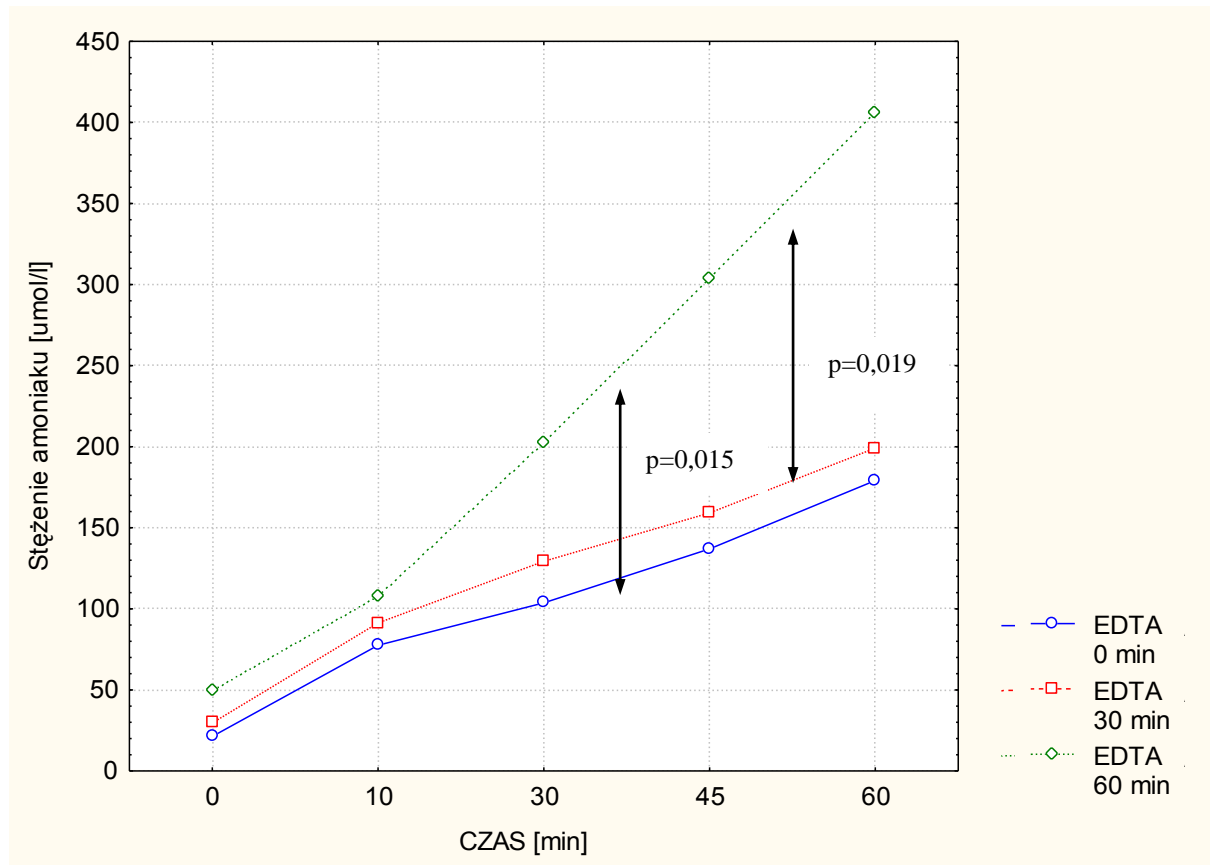
Rysunek 44. Zależność stężenia amoniaku od czasu od pobrania do odwirowania krwi



Czas od pobrania krwi do odwirowania	Min	Max	Kwartyle		Mediana
			25%	75%	
0 min	11	24,8	11,4	25,7	18,2
30 min	13,4	26,3	14,3	25,6	20,1
60 min	30,5	52,8	33,3	51,1	42,8

Po dodaniu 0,025 IU L-ASPA do 2,5 ml osocza stwierdzono przyrost stężenia amoniaku. Przyrost ten był wyższy w osoczu krwi pobranej na heparynę w porównaniu do osocza krwi pobranej na EDTA i wyniósł po 60 minutach odpowiednio: 239,5-510 $\mu\text{mol/l}$ (4-8,5 $\mu\text{mol/l/min}$) i 135,8-447 $\mu\text{mol/l}$ (2,3-7,4 $\mu\text{mol/l/min}$). Wykazano wpływ czasu od pobrania krwi do odwirowania i dodania L-ASPA na przyrost stężenia amoniaku w czasie dla próbek pobranych na EDTA. Przyrost stężenia amoniaku był istotnie większy w przypadku osocza krwi odwirowanej po 60 minutach od pobrania w porównaniu do osocza krwi odwirowanej natychmiast ($p=0,015$) i 30 minut po pobraniu ($p=0,019$) (rysunek 45.). W przypadku heparyny obserwowano podobny trend, lecz różnice nie były statystycznie istotne (rysunek 46.).

Rysunek 45. Przyrost stężenia amoniaku w czasie w zależności od momentu odwirowania krwi pobranej na EDTA

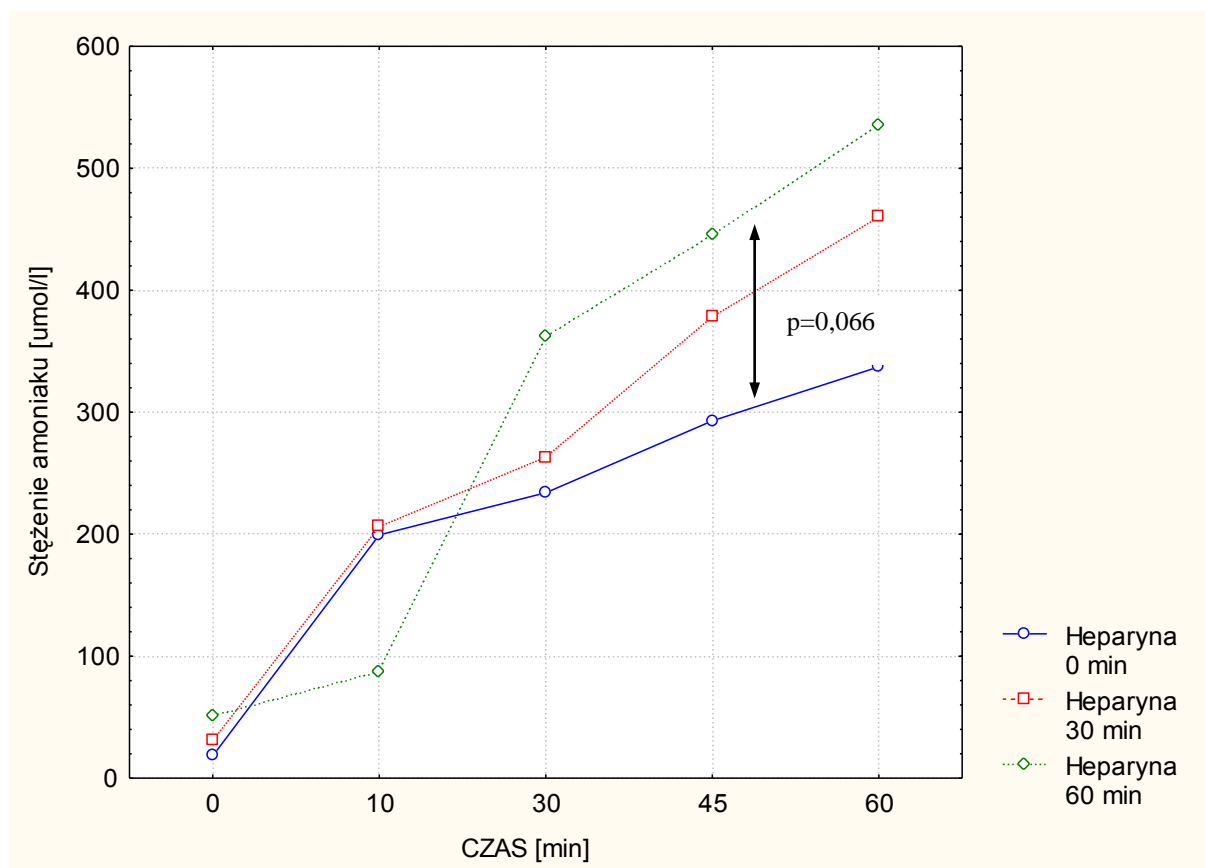


EDTA 0 min – krew pobrana na EDTA, krew odwirowano i dodano L-ASPA natychmiast po pobraniu.

EDTA 30 min – krew pobrana na EDTA, krew odwirowano i dodano L-ASPA 30 minut po pobraniu.

EDTA 60 min - krew pobrana na EDTA, krew odwirowano i dodano L-ASPA 60 minut po pobraniu.

Rysunek 46. Przyrost stężenia amoniaku w czasie w zależności od momentu odwirowania krwi pobranej na heparynę



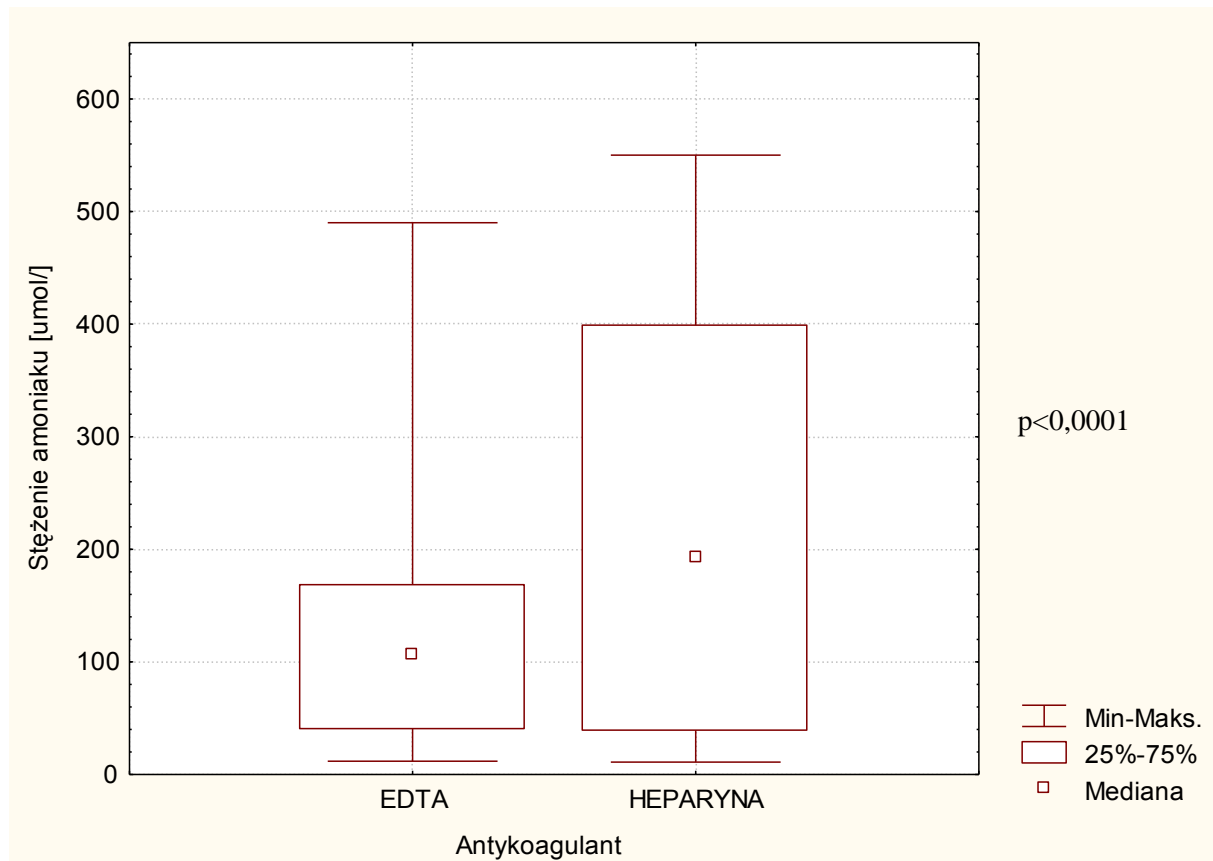
Heparyna 0 min – krew pobrana na heparynę, krew odwirowano i dodano L-ASPA natychmiast po pobraniu.

Heparyna 30 min – krew pobrana na heparynę, krew odwirowano i dodano L-ASPA 30 minut po pobraniu.

Heparyna 60 min - krew pobrana na heparynę, krew odwirowano i dodano L-ASPA 60 minut po pobraniu.

Wyniki pomiarów stężenia amoniaku w przypadku EDTA były istotnie niższe w porównaniu z pomiarami wykonywanymi dla analogicznych (taki sam czas od pobrania krwi do odwirowania i czas od dodania L-ASPA do osocza do wykonania oznaczenia) próbek osocza krwi pobranej do probówek heparynizowanych (mediana odpowiednio: 106 µmol/l i 192 µmol/l, $p < 0,0001$). Wyniki przedstawiono na rysunku 47. i 48.

Rysunek 47. Stężenie amoniaku w zależności od zastosowanego antykoagulantu w probówkach analogicznych pod względem czasu od pobrania krwi do odwirowania i od dodania L-ASPA do wykonania oznaczenia



Antykoagulant	Rozstęp		Kwartyle		Mediana
	Min	Max	25%	75%	
EDTA	11,8	490,1	38,6	168,7	106,4
Heparyna	11,0	550,1	38,1	398,9	192,4

5. DYSKUSJA

L-asparaginaza jest jednym z podstawowych leków stosowanych w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej. Na podstawie dotąd przeprowadzonych badań opracowano schematy leczenia z zastosowaniem różnych preparatów L-ASPA zapewniające u większości pacjentów optymalną skuteczność. Jednak, ze względu na zmienność aktywności enzymu u poszczególnych chorych, a także ryzyko inaktywacji leku w wyniku reakcji immunologicznej, monitorowanie terapii poprzez systematyczne oznaczanie aktywności asparaginazy jest niezwykle istotne [76, 78, 91]. Ponadto, biorąc pod uwagę ryzyko działań niepożądanych, występujących w trakcie terapii L-ASPA, istnieje potrzeba wykonywania regularnych kontroli parametrów oceniających funkcję wątroby, nerek oraz trzustki i układu krzepnięcia, konieczna jest także obserwacja pacjenta w kierunku ewentualnych klinicznych objawów powikłań leczenia.

5.1. Aktywność L-ASPA

Na podstawie obecnie przedstawianego badania stwierdzono, że w analizowanej grupie chorych zastosowanie L-ASPA wg protokołu leczenia ALL IC-BFM-2002 zapewnia u większości (79%) pacjentów osiągnięcie terapeutycznych wartości aktywności tego leku. Najczęstszą przyczyną niskiej aktywności oznaczanej przed kolejną dawką leku było opóźnienie jej podania wynikające z powikłań leczenia i związane z tym przedłużenie odstępu pomiędzy podaniami L-ASPA.

U 19 (21%) z 87 pacjentów uzyskano w co najmniej 1 pomiarze, wykonywanym 3 dni po podaniu tego leku, wynik poniżej 100 IU/l, w tym u 7 (8%) dzieci aktywność była nieoznaczalna. Przyczyną niskich aktywności leku u tych pacjentów mogła być „cicha inaktywacja”. Związek pomiędzy obecnością przeciwciał a obniżoną aktywnością L-ASPA opisywano we wcześniejszych publikacjach [97, 99, 100]. Zalewska-Szewczyk i wsp. stwierdzili, że w trakcie reindukcji u pacjentów z dodatnim wynikiem przeciwciał przeciw L-ASPA aktywność tego leku była istotnie niższa w porównaniu do pacjentów z ujemnym wynikiem oznaczenia przeciwciał (mediana /zakres/ odpowiednio: 3 /20–180/ IU/l i 355 /141–499/ IU/l, $p=0,001$), natomiast w trakcie indukcji różnice te nie były statystycznie znamienne ($p=0,1$) [100]. W obecnie przedstawianej pracy oznaczenia wykonywano tylko w trakcie indukcji i nie stwierdzono istotnej różnicy w średniej aktywności L-ASPA pomiędzy pacjentami z dodatnim i ujemnym wynikiem przeciwciał, ani znamiennej zależności pomiędzy dodatnim wynikiem przeciwciał a niską aktywnością L-ASPA w dokładnym teście Fishera, co mogło wynikać z małej liczebności grupy (35 oznaczeń u 21 pacjentów). Wykazano natomiast, że w grupie pacjentów z niską aktywnością L-ASPA poziom przeciwciał w klasie IgM i IgG, oceniany przed 8. dawką w I protokole, był

istotnie wyższy w porównaniu z grupą pacjentów z terapeutyczną aktywnością leku (odpowiednio: $p=0,014$ i $p=0,047$) (rysunek 8, 9; tabela 12).

W materiale własnym u większości (78%) dzieci z aktywnością L-ASPA poniżej 100 IU/l, w co najmniej 1 oznaczeniu, wykonywanym 3 dni po podaniu leku, przy kolejnym podaniu L-ASPA w trakcie II/III protokołu lub bloku HR wystąpiły objawy nadwrażliwości na ten lek. Dawka leku w pierwszym protokole (5000 IU/m^2) jest niższa niż w kolejnych etapach leczenia (II/III protokół – 10000 IU/m^2 , bloki HR 25000 IU/m^2), dlatego jedynym objawem nadwrażliwości w trakcie indukcji może być obniżenie aktywności leku. Dopiero podanie wyższych dawek L-ASPA, dodatkowo poprzedzone kilkumiesięczną przerwą w narażeniu na to obcogatunkowe białko, skutkowało objawami uczulenia. Jest to zgodne z obserwacjami Mullera i wsp., którzy zauważyli, że przy niższych dawkach leku dochodzi raczej do „cichej inaktywacji”, natomiast w przypadku większych dawek reakcja nadwrażliwości jest klinicznie jawna. [63]

Wartość 100 IU/l jest powszechnie uznana za próg, powyżej którego dochodzi do całkowitej deplecji asparaginy w surowicy [74]. W wielu badaniach wykazano jednak, że przy aktywności poniżej tego progu w większości przypadków również osiągnięta jest całkowita deplecja asparaginy. [47, 76, 78]. W badaniach własnych wykazano, że aktywność L-ASPA poniżej 100 IU/l nie wiązała się z pogorszeniem wyników leczenia (prawdopodobieństwo ponad 4-letniego DFS - rysunek 41), ale stanowiło istotny czynnik ryzyka wystąpienia reakcji nadwrażliwości przy kolejnym podaniu leku. U pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej progu oznaczalności, w przynajmniej 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku, prawdopodobieństwo pojawienia się reakcji nadwrażliwości sięgało 100%. Dlatego w tej grupie pacjentów w celu uniknięcia alergii należałoby rozważyć profilaktycznie zmianę preparatu przy kolejnym podaniu L-ASPA.

5.1.1. Metody pośredniej oceny aktywności L-ASPA

W przedstawionej obecnie pracy analizowano metody pośredniej oceny aktywności L-ASPA. Bezpośrednie oznaczenie aktywności enzymu jest kosztowne i nie wszędzie dostępne (wykonanie oznaczeń za pomocą gotowego zestawu MAAT wymaga zastosowania spektrofotometru wykonującego pomiaru przy długości fali 700 nm).

Amoniak jest produktem reakcji katalizowanej przez L-ASPA. Steiner i wsp. ocenili wahania stężenia amoniaku u 10 pacjentów leczonych L-ASPA, stwierdzając w pierwszym dniu po podaniu leku wzrost do stężeń przekraczających 7-krotnie górną granicę normy, a następnie stopniowy spadek do wartości wyjściowych w ciągu kolejnych 2 dni [86]. Dotąd nie opublikowano jednak danych opisujących zależność stężenia amoniaku w surowicy od aktywności

L-ASPA. Ze względu na niski koszt i powszechną dostępność, oznaczenie stężenia amoniaku mogłoby być przydatne do pośredniej oceny aktywności L-ASPA. W badaniach własnych analizowano pomiary stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA oraz przyrost stężenia amoniaku po podaniu tego leku (różnica stężenia przed podaniem i 24 godziny po podaniu L-ASPA). Stwierdzono istotną korelację pomiędzy stężeniami amoniaku w obu punktach czasowych oraz przyrostem stężenia amoniaku a aktywnością leku. Najwyższy współczynnik korelacji wykazano dla pomiaru stężenia amoniaku w 3-dniowym odstępie od podania L-ASPA ($R=0,44$; $p<0,0001$). Oceniono przydatność pomiaru stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA w wykrywaniu niskich i nieoznaczalnych aktywności leku 3 dni po jego podaniu. Na podstawie analizy krzywych ROC stwierdzono umiarkowaną trafność testu diagnostycznego dla obu punktów czasowych oznaczenia (pole pod krzywą ROC dla oznaczeń wykonanych 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA odpowiednio: 0,75 i 0,76 dla niskiej aktywności L-ASPA oraz 0,87 i 0,76 dla nieoznaczalnych aktywności leku). Optymalny dla czułości i swoistości testu próg stężenia amoniaku dla dyskryminacji pomiędzy terapeutyczną i niską aktywnością L-ASPA wyniósł 64 $\mu\text{mol/l}$ i 29 $\mu\text{mol/l}$ dla pomiarów wykonywanych odpowiednio 24 godziny i 3 dni po podaniu leku. Przy takich założeniach pomiar stężenia amoniaku wykonany 24 godziny po podaniu L-ASPA pozwala na wykrycie niskiej aktywności leku z czułością i swoistością wynoszącą odpowiednio 0,64 i 0,75, natomiast w przypadku oznaczenia wykonanego 3 dni po podaniu L-ASPA parametry te wynoszą odpowiednio: 0,76 i 0,65. W obu przypadkach jednak stosunkowo niskie są wartości predykcyjne wyników dodatnich (odpowiednio 0,30 i 0,27), co oznacza znaczny odsetek wyników fałszywie dodatnich. Biorąc pod uwagę nieoznaczalną aktywność L-ASPA, optymalny dla czułości i swoistości punkt odcięcia stężenia amoniaku wyniósł dla pomiaru wykonywanego 24 godziny i 3 dni po podaniu leku odpowiednio 38 $\mu\text{mol/l}$ i 24 $\mu\text{mol/l}$. Testy te charakteryzują się stosunkowo wysoką czułością i swoistością (odpowiednio: 0,80 i 0,90 dla oznaczeń 24 godziny po L-ASPA oraz 0,75 i 0,74 dla oznaczeń 3 dni po L-ASPA), jednak wartości predykcyjne wyników dodatnich są niskie (odpowiednio: 0,21 i 0,09). Aby zmniejszyć odsetek wyników fałszywie dodatnich można przesunąć próg odcięcia stężenia amoniaku w kierunku niższych jego wartości zwiększając w ten sposób wartość predykcyjną wyniku dodatniego jednak kosztem zmniejszenia czułości testu.

W obecnie przedstawianej pracy wykazano również znamienne korelację pomiędzy średnimi dla poszczególnych pacjentów wartościami aktywności L-ASPA w trakcie indukcji a średnimi stężeniami amoniaku. Na podstawie analizy krzywych ROC stwierdzono, że parametr ten może być przydatny w wyodrębnieniu pacjentów z niską (pole pod krzywą dla pomiaru w obu punktach czasowych: 0,85) i nieoznaczalną aktywnością L-ASPA (pole pod krzywą dla pomiaru

wykonanego 24 godziny i 3 dni po podaniu leku odpowiednio: 0,84 i 0,82). Optymalny dla czułości i swoistości testu próg odcięcia stężenia amoniaku dla oznaczeń wykonywanych 24 godziny i 3 dni po podaniu leku wyniósł odpowiednio 91 $\mu\text{mol/l}$ i 36 $\mu\text{mol/l}$ (czułość - 0,89, swoistość - 0,70, PV (+) - 0,46) dla niskich aktywności L-ASPA oraz 90,5 $\mu\text{mol/l}$ (czułość - 1,0, swoistość 0,66, PV(+)- 0,21) i 29 $\mu\text{mol/l}$ (czułość - 0,71, swoistość - 0,86, PV(+)- 0,31) dla nieoznaczalnych aktywności leku. Zmniejszenie odsetka wyników fałszywie dodatnich można uzyskać przez obniżenie progów odcięcia. Średnie stężenie amoniaku poniżej 46 $\mu\text{mol/l}$ i 20 $\mu\text{mol/l}$ w oznaczeniach wykonywanych odpowiednio 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA pozwala na wykrycie pacjentów z niską aktywnością L-ASPA z prawdopodobieństwem odpowiednio: 75% i 80%, jednak przy takich założeniach, czułość testu spada odpowiednio do: 0,17 i 0,22. W przypadku nieoznaczalnej aktywności L-ASPA obniżenie progu odcięcia średniego stężenia amoniaku do 53 $\mu\text{mol/l}$ (oznaczenia 24 godziny po L-ASPA) i 14 $\mu\text{mol/l}$ (3 dni po L-ASPA) powoduje zwiększenie odsetka wyników prawdziwych wśród dodatnich do 50%, przy zmniejszeniu czułości testu odpowiednio do: 0,43 i 0,14.

Ze względu na stwierdzenie w badaniu własnym znamiennej zależności pomiędzy aktywnością L-ASPA a aktywnością ATIII przeprowadzono analizę krzywych ROC stwierdzając przydatność również tego pomiaru w wyodrębnieniu pacjentów z niską i nieoznaczalną aktywnością leku. Powierzchnie pól pod krzywą ROC dla pomiaru ATIII (0,87 dla niskich aktywności L-ASPA i 0,92 dla aktywności nieoznaczalnych) były większe od pól pod krzywymi ROC dla pomiarów stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu leku, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Optymalny punkt odcięcia dla ATIII wyniósł 71% normy (czułość - 0,94, swoistość - 0,73, PV(+)- 0,47) dla pacjentów z niską aktywnością L-ASPA i 80,5% normy dla pacjentów z nieoznaczalną aktywnością leku (czułość - 0,86, swoistość - 0,84, PV(+)- 0,33). Podwyższenie punktów odcięcia aktywności ATIII do 86% (niska aktywność L-ASPA) i 94,5% (nieoznaczalna aktywność L-ASPA) pozwala na zwiększenie odsetka wyników prawdziwych wśród dodatnich odpowiednio do 87% i 75%, jednak kosztem zmniejszenia czułości testu (odpowiednio do 41% i 43%). W trakcie stosowania L-ASPA konieczne jest kontrolowanie aktywności ATIII ze względu na wysokie ryzyko jej obniżenia się i zagrożenia wystąpienia zakrzepicy. Równoczesne wykorzystanie tego badania do pośredniej oceny aktywności L-ASPA mogłoby ograniczyć koszty monitorowania terapii tym lekiem.

Wyodrębnienie pacjentów z niską (<100 IU/l), a szczególnie nieoznaczalną (<30 IU/l) aktywnością L-ASPA na podstawie pośrednich oznaczeń (stężenia amoniaku, aktywności ATIII) mogłoby służyć podjęciu ewentualnej decyzji o zmianie preparatu L-ASPA w celu zapewnienia skuteczności leczenia. Na podstawie analizy krzywych ROC stwierdzono, że trafność ocenianych

testów była porównywalna, jednak aby uniknąć niepotrzebnej zmiany leku należałoby wybrać test o wysokiej wartości predykcyjnej wyniku dodatniego, przy zachowaniu równocześnie jak najwyższej czułości testu. Wśród ocenianych testów najwyższą wartością predykcyjną charakteryzowało się badanie aktywności ATIII.

5.2. Reakcje nadwrażliwości na L-ASPA

W obecnie przedstawianych badaniach reakcja nadwrażliwości wystąpiła u 42 (49%) spośród 85 pacjentów (z analizy wyłączono 2 pacjentów, u których nie doszło do reakcji alergicznej, ale nie otrzymali wszystkich, przewidzianych w programie leczenia, podań L-ASPA), nieco powyżej górnego zakresu częstości przedstawianej w piśmiennictwie (0-46%) [63, 77, 95, 97, 99]. W materiale własnym do reakcji nadwrażliwości dochodziło najczęściej po dłuższej przerwie od poprzednio podanej L-ASPA, w kolejnych etapach leczenia: pierwsza dawka protokołu II, III lub bloków HR lub jeszcze w trakcie indukcji, w przypadku opóźnień w realizacji protokołu i wydłużenia przez to odstępów czasowych pomiędzy kolejnymi podaniami leku. Podobną obserwację opisano w innych publikacjach [63, 64, 77, 91, 97]. Rzadsze występowanie alergii podczas leczenia indukcyjnego w porównaniu z reindukcją może być wyjaśnione niższą dawką leku na tym etapie terapii. Uważa się, że przy stosowaniu niższych dawek L-ASPA efektem wytworzenia przeciwciał jest raczej cicha inaktywacja, natomiast wyższe dawki zwiększają prawdopodobieństwo klinicznie jawnej reakcji nadwrażliwości [2, 24, 63].

5.2.1 Wskaźniki zwiększonego ryzyka wystąpienia reakcji alergicznej na L-ASPA

W pracy własnej oceniono wartość różnych testów diagnostycznych mogących służyć do wyodrębnienia pacjentów szczególnie zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej, u których mogłaby być wskazana zmiana preparatu L-ASPA w celu zapobieżenia alergii i zapewnienia skuteczności leczenia.

W dotąd przedstawionych publikacjach wykazano, że do reakcji nadwrażliwości częściej dochodzi u pacjentów z obecnymi przeciwciałami przeciwko L-ASPA [95, 97, 99, 100]. Woo i wsp. opisali reakcję alergiczną u 30 z 54 pacjentów z dodatnim wynikiem przeciwciał oznaczanych 10 dni po ostatniej 9. dawce L-ASPA w trakcie indukcji, w porównaniu do 18 z 98 pacjentów bez obecnych przeciwciał ($p < 0.001$) [97]. Z kolei Zalewska-Szewczyk i wsp. wykazali związek pomiędzy wystąpieniem reakcji alergicznej a obecnością przeciwciał w trakcie reindukcji, zależności takiej nie stwierdzono dla oznaczeń przeciwciał wykonywanych w trakcie leczenia indukcyjnego [100].

W badaniach własnych, u pacjentów z reakcją alergiczną, stwierdzono istotnie wyższe stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA I protokołu w porównaniu z grupą pacjentów bez reakcji ($p=0,023$). Przy użyciu dokładnego testu Fishera nie stwierdzono jednak znamiennej statystycznie zależności pomiędzy dodatnim wynikiem żadnej z badanych klas przeciwciał a wystąpieniem reakcji alergicznej (blisko granicy istotności była zależność dla przeciwciał IgG oznaczanych przed 8. podaniem L-ASPA), co mogło wynikać z małej liczebności grupy chorych, u których wykonano oznaczenia przeciwciał.

Większe ryzyko wystąpienia reakcji nadwrażliwości dotyczyło pacjentów, u których uprzednio stwierdzano niską aktywność leku w przynajmniej 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu L-ASPA (ryzyko względne: 1,86 (95% CI: 1,22-2,36)). Parametr ten pozwala przewidzieć wystąpienie nadwrażliwości ze swoistością wynoszącą 0,91, czułością - 0,33 i wartością predykcyjną wyniku dodatniego - 0,79. Pojawienie się nieoznaczalnej aktywności L-ASPA w przynajmniej 1 oznaczeniu po 3 dniach od podania leku wiązało się jeszcze z wyższym ryzykiem reakcji nadwrażliwości (w obserwowanej grupie alergii u wszystkich dzieci). W tym przypadku swoistość testu wyniosła 1,0; czułość - 0,17, wartość predykcyjna wyniku dodatniego - 1,0. Dla porównania na podstawie danych z publikacji Woo i wsp. oszacowano, że dla oznaczeń przeciwciał przeciw L-ASPA parametry te wyniosły: czułość - 0,62; swoistość - 0,77 [97]. Wyniki badań własnych świadczą o bardzo wysokim ryzyku wystąpienia reakcji alergicznej w przypadku stwierdzenia w przynajmniej jednym oznaczeniu aktywności L-ASPA poniżej 30 IU/l, co mogłoby być przesłanką do zastosowania u tych pacjentów w kolejnym podaniu innej formy preparatu, w celu uniknięcia reakcji nadwrażliwości i utrzymania odpowiedniej aktywności leku.

Spośród innych badań w przedstawianej obecnie pracy przydatność w wyodrębnieniu pacjentów zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej na L-ASPA oceniono dla stężenia amoniaku i aktywności ATIII. Na podstawie analizy krzywych ROC dla średnich wartości stężeń lub aktywności oznaczanych w trakcie indukcji, największą trafność testu stwierdzono w przypadku aktywności ATIII (powierzchnia pola pod krzywą ROC dla oznaczeń aktywności ATIII 0,62 vs 0,57 i 0,60 dla oznaczeń stężenia amoniaku odpowiednio 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA), chociaż różnica pola pod krzywą pomiędzy oznaczeniami ATIII i amoniaku nie była statystycznie istotna. Ustalono, że przyjmując próg aktywności ATIII 70,5% normy można przewidzieć wystąpienie reakcji alergicznej z czułością 0,57 (95% CI: 0,41-0,73) i swoistością 0,71 (95% CI: 0,54-0,84), wartość predykcyjna wyniku dodatniego wynosi wówczas 0,66. Optymalny dla wartości predykcyjnych testu punkt odcięcia wyniósł 84% normy, przy takim założeniu parametry testu były równe: czułość - 0,22, swoistość - 0,96, PV(+) - 0,82.

5.3. Działania niepożądane L-ASPA

W przedstawionym obecnie materiale zaburzenia w układzie krzepnięcia obserwowano u większości pacjentów (88%), jednak tylko u 4 (4,6%) dzieci rozpoznano objawową zakrzepicę. Podobnie jak w innych badaniach, najczęściej stwierdzano niskie stężenie fibrynogenu i obniżoną aktywność ATIII [10, 25, 62]. W przypadku wystąpienia zaburzeń w układzie krzepnięcia stosowano świeżo mrożone osocze, a w wybranych przypadkach również koncentrat ATIII. Wykazano zależność pomiędzy aktywnością L-ASPA a parametrami oceniającymi układ krzepnięcia (ATIII, fibrynogen, APTT). Szczególnie ścisły związek z aktywnością leku stwierdzono w przypadku ATIII. Pacjenci, u których aktywność ATIII wynosiła poniżej 50% normy mieli istotnie wyższą aktywność L-ASPA (mediana: 296 IU/l vs 229 IU/l; $p=0,0017$), natomiast u pacjentów z niską aktywnością L-ASPA aktywność ATIII była znamiennej wyższa w porównaniu do pacjentów z terapeutyczną aktywnością leku (mediana (zakres): 82% (54%-100%) vs 65% (33%-95%); $p<0,0001$). Zależność tę wykorzystano w celu zbadania przydatności oznaczenia ATIII w pośredniej ocenie aktywności L-ASPA i w przewidywaniu ryzyka wystąpienia reakcji alergicznej na ten lek, jak to opisano wyżej.

Objawowa zakrzepica w obecnie przedstawianym badaniu wystąpiła u 4 (4,6%) pacjentów. W innych badaniach powikłanie to występowało z podobną częstością (0-10,9 % chorych) [62, 65, 67, 85]. W badaniu PARKAA stwierdzono, że znacznie częściej pojawiają się bezobjawowe epizody zakrzepowe [62], jednak w bieżącym opracowaniu nie wykonywano badań obrazowych u bezobjawowych pacjentów, więc nie można oszacować częstości takich epizodów u obserwowanych chorych. Pomimo istnienia zależności pomiędzy aktywnością L-ASPA a parametrami układu krzepnięcia, nie wykazano związku objawowej zakrzepicy z aktywnością leku. Wystąpienie tego powikłania jest najprawdopodobniej zależne od indywidualnej wrażliwości pacjentów. Szczególnie narażeni na powikłania zakrzepowe są chorzy obciążeni wrodzonymi lub nabytymi czynnikami ryzyka nadkrzepliwości (mutacje genu protrombiny, czynnik V Leiden, przeciwciała antyfosfolipidowe) [10, 62, 65, 67], jednak w badanej grupie dzieci nie wykonywano rutynowo badań w tym kierunku.

W badaniu własnym stwierdzono także zależność pomiędzy aktywnością L-ASPA a parametrami laboratoryjnymi oceniającymi funkcję wątroby (ALT, bilirubina) i nerek (mocznik). Jednakże, wystąpienie ciężkich powikłań leczenia L-ASPA (OZT, cukrzyca, znaczne zaburzenia czynności wątroby – III i IV stopień toksyczności) nie wiązało się z istotnie wyższymi wartościami aktywności L-ASPA i zależało prawdopodobnie od indywidualnej wrażliwości chorych.

5.4. Wyniki leczenia ALL

Wyniki leczenia przedstawianej obecnie grupy pacjentów były zgodne z danymi literaturowymi [20, 49, 59]. Spośród 87 pacjentów u 85 (98%) status szpiku kostnego w 33. dniu indukcji określono jako M1. Osiemdziesięciu sześciu (99%) chorych uzyskało remisję całkowitą w trakcie leczenia indukcyjnego lub konsolidacji (bloki HR) wg programu ALL IC-BFM-2002. Prawdopodobieństwo ponad 4-letniego OS, EFS, DFS i RFS wynosiło odpowiednio: 96% (95% CI: 94%-98%), 85% (95% CI: 80%-90%), 88,5% (95% CI: 84-93%) i 89,5% (95% CI: 85%-94%).

Na podstawie oceny punkcji szpiku w 33. dniu leczenia (M1 vs M2) oraz prawdopodobieństwa ponad 4-letniego DFS porównano wyniki leczenia u pacjentów z niską i terapeutyczną aktywnością L-ASPA oraz w grupach chorych z reakcją alergiczną i bez reakcji.

Pacjenci z niską aktywnością L-ASPA w przynajmniej jednym oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku w trakcie indukcji nie różnili się pod względem wyników leczenia od pozostałych chorych (wynik punkcji szpiku w 33. dniu leczenia - M1 vs M2: $p=0,60$; prawdopodobieństwo ponad 4-letniego DFS: 90% vs 86%; $p=0,71$). Brak wpływu obniżenia aktywności leku na wynik terapii w obecnie przedstawionych badaniach można tłumaczyć m.in. możliwością działania leku również przy niższej jego aktywności. Próg, powyżej którego aktywność uznaje się za terapeutyczną, został ustalony w 1981 roku [74], natomiast w wielu późniejszych badaniach całkowitą deplecję asparaginy niezbędną do działania przeciwnowotworowego obserwowano także u większości chorych z aktywnością leku poniżej 100 IU/l [47, 76, 78]. Minimalna aktywność L-ASPA konieczna do całkowitej deplecji asparaginy w badaniu Tsurusawy i wsp. wynosiła 6-180 IU/l z medianą 16 IU/l [89]. W materiale własnym w grupie pacjentów z niską aktywnością L-ASPA u większości chorych (12/19) aktywność leku była powyżej progu oznaczalności, dlatego mogła być wystarczająca do zapewnienia pełnej deplecji asparaginy. Ponadto niska aktywność stwierdzana była tylko w części oznaczeń (średnio w 68% oznaczeń wykonanych u danego pacjenta). Dodatkowo u 78% chorych z niską aktywnością L-ASPA, ze względu na wystąpienie objawów nadwrażliwości w kolejnych etapach leczenia, zmieniono preparat Medac L-ASPA na PEG-ASPA, co prawdopodobnie (w badaniu nie oceniano aktywności PEG-ASPA) zapewniało utrzymanie terapeutycznej aktywności leku.

Niespodziewanie, grupa 7 pacjentów, u których w co najmniej jednym oznaczeniu stwierdzono nieoznaczalną aktywność L-ASPA, uzyskała bardzo dobre wyniki leczenia. W 33. dniu leczenia indukcyjnego u wszystkich chorych z tej grupy status szpiku kostnego określono jako M1. Czworo dzieci uzyskało pierwszą remisję całkowitą w tym punkcie leczenia, pozostałych 3 w dalszym etapie leczenia indukcyjnego, po uzyskaniu odnowy hematopoezy. U

żadnego pacjenta z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA nie doszło do niepowodzenia leczenia (wczesna progresja, wznowa choroby) – rysunek 42. W tej grupie chorych nie było również zgonu z powodu powikłań terapii. Wśród 7 pacjentów z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA w co najmniej jednym oznaczeniu, dzieci z grupy SR stanowiły 57%, w porównaniu do 30% wśród chorych z aktywnością L-ASPA powyżej 30 IU/l (tabela 7.). Różnice w rozkładzie grup ryzyka nie były statystycznie znamienne, ale mogło to wynikać z małej liczebności grupy z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA (7 pacjentów). Nieoznaczalną aktywność stwierdzano zwykle tylko po 1 (2 chorych) lub 2 (3 dzieci) ostatnich podaniach leku w trakcie indukcji. Tylko u 2 pacjentów nieoznaczalną aktywność wykazano w większości wykonanych oznaczeń (4/6 i 5/5) (tabela 5.). U wszystkich 7 pacjentów, w kolejnym etapie leczenia, ze względu na wystąpienie reakcji alergicznej, stosowano PEG-ASPA, co prawdopodobnie zapewniało utrzymanie terapeutycznej aktywności leku i miało korzystny wpływ na ostateczne wyniki leczenia.

W badaniu własnym nie wykazano również wpływu wystąpienia reakcji alergicznej na uzyskany wynik leczenia. Prawdopodobieństwo ponad 4-letniego DFS w grupie pacjentów z reakcją nadwrażliwości i bez tej reakcji wynosiło odpowiednio: 89% i 84%; $p=0,88$). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi w innych badaniach [97, 99, 100]. Efekt reakcji nadwrażliwości mógł być minimalizowany przez szybką zmianę preparatu w przypadku wystąpienia alergii, dzięki czemu ogólna liczba podań L-ASPA (z odpowiednią modyfikacją uwzględniającą odmienną farmakokinetykę poszczególnych preparatów) odpowiadała protokołowi.

5.5. Przyrost stężenia amoniaku w osoczu po dodaniu L-ASPA w badaniu wykonanym *in vitro*

Wykonano własne badanie oceniające przyrost stężenia amoniaku w osoczu po dodaniu L-ASPA *in vitro*. Krew pobierano na dwa różne antykoagulanty (EDTA i heparynę). Dodatkowo porównywano uzyskane wyniki w zależności od czasu, jaki upłynął od pobrania krwi do jej odwirowania i dodania L-ASPA. Stwierdzono, że wyjściowe stężenia amoniaku (przed dodaniem L-ASPA) w osoczu krwi odwirowanej natychmiast i 30 minut po pobraniu nie różnią się istotnie, natomiast stężenie to jest wyższe w przypadku odwirowania krwi po upływie 60 minut od pobrania. Przyrost stężenia amoniaku w próbce krwi może wynikać z produkcji tego związku przez deaminację aminokwasów takich jak glutamina. Dlatego zaleca się umieszczanie próbki pobranej krwi na lodzie oraz odwirowanie i wykonanie oznaczenia w czasie nie dłuższym niż 10-15 minut od pobrania materiału [44].

W doświadczeniu własnym dodawano 0,025 IU L-ASPA do 2,5 ml osocza, co powinno odpowiadać aktywności 10 IU/l w otrzymanym roztworze i produkcji amoniaku w ilości

10 $\mu\text{mol/l}$ w ciągu 1 minuty. Stwierdzono, że przyrost stężenia amoniaku był wyższy w osoczu krwi pobranej na heparynę (4-8,5 $\mu\text{mol/l/min}$) w porównaniu do osocza krwi pobranej na EDTA (2,3-7,4 $\mu\text{mol/l/min}$). Nie wykazano różnic w wyjściowym stężeniu amoniaku w zależności od zastosowanego antykoagulantu. Ponadto stwierdzono, że przyrost stężenia amoniaku był większy w osoczu krwi odwirowanej po 60 minutach od pobrania w porównaniu do osocza krwi odwirowanej natychmiast i 30 minut po pobraniu. Różnice te były istotne w przypadku EDTA. Do oznaczeń stężenia amoniaku dopuszczalne jest stosowanie obu antykoagulantów, choć wyniki mogą się nieznacznie różnić [44]. Wyjaśnienie różnic w przyroście stężenia amoniaku w zależności od zastosowanego antykoagulantu wymagałoby dodatkowych badań.

5.6. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań własnych stwierdzono, że zastosowane leczenie wg protokołu ALL IC-BFM-2002 zapewniło u większości pacjentów terapeutyczne wartości aktywności L-ASPA. Niska a nawet nieoznaczalna aktywność tego leku nie powodowały pogorszenia wyników leczenia. Natomiast niska aktywność L-ASPA istotnie zwiększała ryzyko wystąpienia reakcji nadwrażliwości na ten lek. Nie wykazano związku pomiędzy aktywnością L-ASPA a obecnością poważnych powikłań terapii tym lekiem (OZT, cukrzyca, nasilona hepatotoksyczność). Prawdopodobnie pojawienie się tych niepożądanych skutków leczenia zależy od indywidualnej predyspozycji pacjenta i wpływu innych czynników, w tym innych równocześnie stosowanych leków. Z tego względu konieczne jest kontrolowanie parametrów oceniających funkcję wątroby, nerek, trzustki i układu krzepnięcia.

Wykazano przydatność pomiaru stężenia amoniaku oraz aktywności ATIII w pośredniej ocenie aktywności L-ASPA. Im niższe stężenie amoniaku i im wyższa aktywność ATIII u pacjenta leczonego L-ASPA, tym większe jest prawdopodobieństwo niskiej aktywności tego leku i wystąpienia reakcji alergicznej przy kolejnych jego podaniach. U chorych, u których stwierdza się niską, a zwłaszcza nieoznaczalną aktywność L-ASPA, a w przypadku braku możliwości oznaczenia aktywności leku, niskie stężenia amoniaku i/lub wysoką aktywność ATIII, można rozważyć zmianę preparatu w kolejnych etapach leczenia w celu zapobieżenia reakcji alergicznej i zapewnienia terapeutycznej aktywności tego leku.

Uzyskane wyniki analiz w obecnie przedstawianej pracy wymagają potwierdzenia w badaniach obejmujących większą liczbę pacjentów oraz oznaczeń aktywności L-ASPA i stężenia przeciwciał u wszystkich badanych.

6. WNIOSKI

- Wykazano, że stężenie amoniaku dodatnio korelowało z aktywnością L-ASPA i może służyć do pośredniej oceny aktywności tego leku i wyodrębnienia chorych z niską i nieoznaczalną aktywnością L-ASPA.
- Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono ujemną korelację aktywności ATIII z aktywnością L-ASPA. Pomiar aktywności ATIII może również służyć do pośredniej oceny aktywności L-ASPA.
- Reakcja nadwrażliwości na L-ASPA jest najczęstszym powikłaniem terapii tym lekiem. W badanej grupie wystąpiła niemal u połowy pacjentów.
- Istotnymi czynnikami pozwalającym wyodrębnić grupę pacjentów z dużym ryzykiem wystąpienie objawów alergii są: niska, a szczególnie nieoznaczalna aktywność L-ASPA, wysokie (powyżej 84% normy) średnie wartości aktywności ATIII i niskie (poniżej 37 $\mu\text{mol/l}$) średnie wartości stężenia amoniaku oznaczanego 3 dni po podaniu L-ASPA.
- Spośród badanych przeciwciał przeciw L-ASPA, najbardziej przydatne w rozpoznawaniu cichej inaktywacji i przewidywaniu wystąpienia reakcji alergicznej może być stężenie przeciwciał w klasie IgM, oznaczone przed 3. i 8. podaniem L-ASPA, a IgG przed 8. podaniem leku.
- Wystąpienie ciężkich powikłań leczenia L-ASPA (ostre zapalenie trzustki, cukrzyca, objawowa zakrzepica, znaczne zaburzenia czynności wątroby – III i IV stopień toksyczności) nie wiązało się z istotnie wyższymi wartościami aktywności L-ASPA i zależało prawdopodobnie od indywidualnej wrażliwości chorych, dlatego w czasie podawania tego leku istnieje potrzeba regularnej kontroli parametrów oceniających funkcję życiowo ważnych narządów oraz układu krzepnięcia, a także wnikliwa obserwacja pacjentów w kierunku ewentualnych klinicznych objawów powikłań leczenia.
- Uzyskane wyniki leczenia są porównywalne z przedstawianymi w literaturze. Obniżenie aktywności L-ASPA, a nawet nieoznaczalna jej aktywność w przebiegu I protokołu, a także pojawienie się reakcji nadwrażliwości na ten lek nie spowodowały pogorszenia wyników leczenia ALL w obserwowanej grupie chorych, co mogło wynikać ze zmiany preparatu L-ASPA po reakcji alergicznej, która dotyczyła większości pacjentów z niską i wszystkich z nieoznaczalną aktywnością leku.

- W celu potwierdzenia uzyskanych wyników badań i zastosowania ich w praktyce należy wykonać analizę obejmującą większą, dłużej obserwowaną grupę dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną.

7. STRESZCZENIE

Wprowadzenie: L-asparaginaza jest jednym z podstawowych leków stosowanych w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej. Na podstawie wyników dotąd przeprowadzonych badań opracowano schematy leczenia z zastosowaniem różnych preparatów L-ASPA zapewniające u większości pacjentów optymalną skuteczność. Jednak, ze względu na zmienność aktywności enzymu u poszczególnych chorych, a także ryzyko inaktywacji leku w wyniku reakcji immunologicznej, monitorowanie terapii poprzez regularną kontrolę aktywności asparaginazy wydaje się być niezwykle istotne. Dodatkowo, biorąc pod uwagę ryzyko działań niepożądanych, w trakcie terapii L-ASPA konieczna jest ocena funkcji wątroby, nerek, trzustki i układu krzepnięcia, a także obserwacja w kierunku ewentualnych klinicznych objawów powikłań leczenia.

Celem pracy była ocena przydatności oznaczania stężenia amoniaku w pośredniej ocenie aktywności L-ASPA. Kolejny cel to wyodrębnienie grup ryzyka wystąpienia powikłań terapii tym lekiem, szczególnie reakcji nadwrażliwości oraz ocena użyteczności oznaczeń stężenia amoniaku i aktywności ATIII w podejmowaniu decyzji o konieczności zmiany preparatu L-ASPA w celu zapobiegania reakcji alergicznej i zapewnienia skuteczności terapii. Analizowano również wpływ obniżenia aktywności L-ASPA na wyniki leczenia ALL.

Material i metody: Do badania włączono 87 spośród 97 dzieci objętych leczeniem według międzynarodowego programu ALL IC-BFM-2002 w okresie od czerwca 2005 r. do października 2008 r. w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Krakowie. W obserwowanej grupie było 45 chłopców i 42 dziewczynki w wieku od 14 miesięcy do 17 lat (mediana - 6 lat). U 71 pacjentów rozpoznano cALL, u 3 pro-B ALL, u 2 przejściową ALL, a u 11 T-ALL. Mediana czasu obserwacji wynosiła 32 miesiące. W trakcie indukcji u pacjentów wykonywano oznaczenia aktywności L-ASPA (test MAAT), stężenia amoniaku oraz monitorowano parametry oceniające funkcję wątroby, nerek, trzustki oraz układu krzepnięcia, w tym oznaczanie aktywności ATIII. U 21 chorych wykonano także oznaczenia przeciwciał przeciw L-ASPA. Podczas realizacji wszystkich etapów leczenia zawierających L-ASPA (indukcja, reindukcja, bloki HR) obserwowano pacjentów w kierunku wystąpienia klinicznych objawów toksyczności L-ASPA, szczególnie reakcji nadwrażliwości. Wyniki leczenia indukcyjnego oceniano na podstawie odsetka blastów w szpiku kostnym w 33. dniu protokołu i uzyskania remisji całkowitej. Obliczono również odsetki ponad 4-letniego przeżycia całkowitego (OS), przeżycia wolnego od niekorzystnych wydarzeń (EFS) oraz wolnego od choroby (DFS) i wolnego od wznowy (RFS). Ponadto przeprowadzono doświadczenie oceniające przyrost stężenia

amoniaku po podaniu L-ASPA do osocza *in vitro*. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel (statystyka opisowa) oraz pakietu STATISTICA 8.

Wyniki: Mediana aktywności L-ASPA we wszystkich oznaczeniach wyniosła 227 (zakres: 0-2063) IU/l, dla oznaczeń wykonywanych 3 dni po podaniu leku - 248 (zakres: 0-2063) IU/l, a powyżej 3 dni – 12 (zakres: 0-572) IU/l. W 78 % oznaczeń stwierdzono aktywność leku powyżej 100 IU/l, w 90% oznaczeń powyżej 30 IU/l. Najczęstszą przyczyną niskiej aktywności L-ASPA oznaczanej przed podaniem kolejnej dawki leku było wydłużenie odstępu pomiędzy podaniami L-ASPA, wynikające z powikłań leczenia. W pomiarach dokonywanych w odstępie 3 dni od podania L-ASPA aktywność poniżej 100 IU/l stwierdzono łącznie w 59 (16%) spośród 374 badanych próbek, u 19 (21%) z 87 pacjentów, u których wykonano oznaczenia aktywności L-ASPA. W 15 (4%) oznaczeniach wykonanych u 7 (8%) dzieci aktywność była nieoznaczalna (<30 IU/l). W grupie pacjentów z niską aktywnością L-ASPA statystycznie istotnie częściej ($p=0,007$) występowała reakcja alergiczna (78% dzieci) w porównaniu do pacjentów z terapeutyczną aktywnością leku (42%). Reakcja alergiczna wystąpiła u wszystkich chorych z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA. U pacjentów tych można podejrzewać “cichą inaktywację”. U 4 pacjentów z niską aktywnością L-ASPA wykonano oznaczenia przeciwciał przeciw L-ASPA stwierdzając u wszystkich dodatni wynik w klasie IgM i u 3 dzieci w klasie IgG. Stwierdzono, że stężenie przeciwciał w klasie IgM i IgG badanych przed 8. podaniem L-ASPA w protokole I było istotnie wyższe (odpowiednio $p=0,014$ i $p=0,047$) w grupie dzieci z niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA w porównaniu do pacjentów z prawidłową aktywnością leku.

Uogólniona reakcja nadwrażliwości na L-ASPA Medac wystąpiła u 42 (49%) pacjentów. W większości przypadków (32 /76%/ z 42 chorych) reakcja alergiczna wystąpiła przy podaniu leku po dłuższej przerwie od poprzednich dawek (protokół II, III lub bloki HR). W 14 przypadkach (33%) wystąpienie objawów nadwrażliwości mogła poprzedzać cicha inaktywacja, obserwowano bowiem niskie aktywności L-ASPA (poniżej 100 IU/l, w tym u 7 chorych poniżej 30 IU/l) po podaniu leku w I protokole. Przeciwciała przeciw L-ASPA oceniono u 10 pacjentów z reakcją nadwrażliwości. Wykazano, że stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA I protokołu w tej grupie pacjentów było istotnie wyższe w porównaniu z grupą pacjentów bez reakcji ($p=0,023$). Jednak w dokładnym teście Fishera nie stwierdzono znamiennej statystycznej zależności pomiędzy dodatnim wynikiem przeciwciał żadnej z klas a wystąpieniem reakcji alergicznej. Czterdziestu jeden pacjentów po reakcji nadwrażliwości było leczonych PEG-ASPA. U jednego dziecka reakcja alergiczna wystąpiła przy ostatnim przewidzianym w protokole podaniu L-ASPA i nie otrzymywało ono już tego leku. Jedenastu (27%) z 41 chorych po otrzymaniu od 1 do 5 podań

PEG-ASPA uczuliło się również na tą postać leku i otrzymywało następnie Erwinazę. Nie obserwowano reakcji alergicznej na ten preparat w przedstawionej grupie pacjentów.

Stwierdzono statystycznie istotny wzrost stężenia amoniaku 24 godziny po podaniu L-ASPA w stosunku do stężenia wyjściowego (mediana: 88 $\mu\text{mol/l}$ vs 32 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,0001$). Stężenie amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu leku korelowało dodatnio z aktywnością L-ASPA oznaczaną 3 dni po jej podaniu (R odpowiednio 0,34 i 0,44; $p < 0,0001$). Stwierdzono także znamiennej korelację średniej dla danego pacjenta wartości stężenia amoniaku w I protokole i średniej aktywności L-ASPA (R odpowiednio: 0,41 i 0,56; $p < 0,0001$). Na podstawie oceny krzywych ROC stwierdzono przydatność pojedynczego pomiaru stężenia amoniaku w wykrywaniu niskiej i nieoznaczalnej aktywności L-ASPA (pole pod krzywą dla pomiaru 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA odpowiednio: 0,75 i 0,76 dla niskiej aktywności leku i 0,87 i 0,76 dla aktywności nieoznaczalnej) oraz średniej wartości stężeń amoniaku w trakcie indukcji w wyodrębnieniu pacjentów z niską i nieoznaczalną aktywnością L-ASPA (pole pod krzywą odpowiednio 0,85 i 0,84). Dla oznaczeń po poszczególnych podaniach L-ASPA istotny próg stężenia amoniaku dla dyskryminacji pomiędzy terapeutyczną i niską aktywnością L-ASPA wyniósł 64 $\mu\text{mol/l}$ i 29 $\mu\text{mol/l}$ dla pomiarów wykonywanych odpowiednio 24 godziny i 3 dni po podaniu leku. Biorąc pod uwagę średnią wartość stężeń amoniaku najbardziej optymalny punkt odcięcia wyniósł dla oznaczenia 24 godziny po podaniu L-ASPA: 91 $\mu\text{mol/l}$ (pacjenci z niską aktywnością L-ASPA) i 90,5 $\mu\text{mol/l}$ (chorzy z nieoznaczalną aktywnością leku), a w przypadku pomiaru 3 dni po podaniu L-ASPA odpowiednio 36 $\mu\text{mol/l}$ i 29 $\mu\text{mol/l}$.

Niższą trafność oznaczeń stężenia amoniaku stwierdzono w wyodrębnianiu pacjentów zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej (pole pod krzywą ROC dla średniej stężeń oznaczanych 3 dni po podaniu L-ASPA – 0,60). W tym przypadku optymalny punkt odcięcia wyniósł 37 $\mu\text{mol/l}$.

U 77 (88%) pacjentów występowały zaburzenia w układzie krzepnięcia. Najczęściej obserwowano niski poziom fibrynogenu oraz obniżoną aktywność ATIII. Aktywność ATIII korelowała ujemnie z aktywnością L-ASPA ($R = -0,27$; $p = 0,0001$), natomiast w przypadku APTT stwierdzono korelację dodatnią (0,20; $p = 0,0004$).

Na podstawie analizy krzywej ROC wykazano, że pomiar aktywności ATIII może być przydatny w wyodrębnieniu pacjentów z niską i nieoznaczalną aktywnością L-ASPA (pole pod krzywą odpowiednio: 0,87 i 0,92) oraz zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej (0,62). Powierzchnie pól pod krzywymi ROC wyznaczone dla ATIII nie różniły się istotnie od pól pod analogicznymi krzywymi ROC dla pomiaru stężenia amoniaku. Optymalne punkty odcięcia średnich wartości aktywności ATIII wyniosły: 71% normy (chorzy z niską aktywnością L-ASPA),

80,5% normy (pacjenci z nieoznaczalną aktywnością leku) i 70,5% normy (dzieci zagrożone wystąpieniem reakcji nadwrażliwości).

Spośród poważnych powikłań leczenia L-ASPA objawowa zakrzepica wystąpiła u 4 (4,6%) pacjentów, u 4 (4,6%) dzieci rozpoznano OZT, u 5 chorych (5,7%) stwierdzono w co najmniej oznaczeniu aktywność AlAT >330 IU (III stopień toksyczności wg WHO), poziom bilirubiny u 3 pacjentów (3,4%) przekraczał 55 $\mu\text{mol/l}$ (III stopień toksyczności wg WHO), u 1 pacjentki rozwinęła się cukrzyca. Pacjenci, u których wystąpiły te powikłania nie różnili się od pozostałych pod względem aktywności L-ASPA.

Wyniki leczenia w obserwowanej grupie pacjentów były porównywalne do uzyskiwanych w wiodących ośrodkach na świecie. U 85 (98%) pacjentów status szpiku kostnego w 33 dniu indukcji określono jako M1. Spośród 87 badanych pacjentów remisję całkowitą uzyskało 86 (99%) w trakcie leczenia wg programu ALL IC-BFM-2002. Jeden pacjent osiągnął remisję dopiero po zastosowaniu, ze względu na wczesną progresję choroby, programu dla wznów. Prawdopodobieństwo ponad 4-letniego OS, EFS, DFS i RFS wynosiło odpowiednio: 96% (95% CI: 94%-98%), 85% (95% CI: 80%-90%), 88,5% (95% CI: 84-93%) i 89,5% (95% CI: 85%-94%). Spośród obserwowanych 87 pacjentów 3 (3,4%) zmarło, 2 z powodu posocznicy w okresie neutropenii w przebiegu realizacji bloków HR, a 1 dziecko z powodu zespołu hemofagocytarnego w trakcie podtrzymywania remisji. Niepowodzenia leczenia (1 wczesna progresja, 5 wznów) wystąpiły łącznie u 6 (6,9%) dzieci. Na podstawie oceny mielogramu w 33. dniu leczenia (M1 vs M2) oraz prawdopodobieństwa ponad 4-letniego DFS nie stwierdzono wpływu na uzyskane wyniki leczenia wystąpienia w trakcie leczenia indukcyjnego niskiej lub nieoznaczalnej aktywności L-ASPA, ani pojawienia się reakcji nadwrażliwości na ten lek.

Wnioski: W analizowanej grupie chorych zastosowany protokół leczenia ALL IC-BFM-2002 zapewnił u większości pacjentów osiągnięcie terapeutycznych wartości aktywności L-ASPA. Pojawienie się niskiej a nawet nieoznaczalnej aktywności L-ASPA nie wiązało się z pogorszeniem wyników leczenia ALL, stanowiło to jednak istotny czynnik ryzyka wystąpienia reakcji nadwrażliwości na ten lek. Nie wykazano związku pomiędzy aktywnością L-ASPA a wystąpieniem innych poważnych powikłań terapii tym lekiem (OZT, cukrzyca, nasilona hepatotoksyczność), prawdopodobnie ich pojawienie się zależy od indywidualnej wrażliwości pacjenta. Stwierdzono przydatność pomiaru stężenia amoniaku oraz aktywności ATIII w pośredniej ocenie aktywności L-ASPA. Im niższe stężenie amoniaku i wyższa aktywność ATIII u pacjenta leczonego L-ASPA, tym większe prawdopodobieństwo niskiej aktywności leku i wystąpienia reakcji alergicznej przy kolejnych jego podaniach. U chorych, u których stwierdza się niską, a zwłaszcza nieoznaczalną aktywność L-ASPA, a w przypadku braku możliwości

oznaczenia aktywności leku, niskie stężenia amoniaku i/lub wysoką aktywność ATIII, można rozważyć zmianę preparatu w kolejnych etapach leczenia w celu zapobieżenia reakcji alergicznej i zapewnienia utrzymania terapeutycznej aktywności L-ASPA.

8. ABSTRACT

Introduction: L-asparaginase (L-ASPA) is one of the most important agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. On the basis of previous studies, application schemes assuring in most patients clinical efficacy were established for different L-ASPA preparations. However, taking into account variability of L-ASPA activity in patients and risk of the drug inactivation as a result of immune reaction, monitoring of the therapy by regular L-ASPA activity determination seems to be very important. Moreover, there is need of systematic monitoring of coagulation, liver, kidney and pancreas function, and close clinical observation to assure early diagnosis of the treatment complications.

The objective of the study was to assess utility of ammonia level determination in indirect L-ASPA activity evaluation. The second objective was to distinguish risk factors of toxicities of L-ASPA, especially hypersensitivity reactions, and to analyse the utility of ammonia concentration and ATIII activity determinations in deciding about necessity of change of L-ASPA preparation. Influence of decreased L-ASPA activity on clinical outcome of ALL in children was also analysed.

Material and methods: Between June 2005 and October 2008 ninety seven patients with newly diagnosed ALL were treated according to the ALL IC-BFM-2002 protocol in the Pediatric Oncology and Hematology Clinic of the Children's University Hospital in Cracow. Eighty seven of them were enrolled the study. There were 45 male and 42 female, the age range was 14 months to 17 years (median 6 years). Seventy one children were diagnosed with cALL, 3 with pro-B ALL, 2 with transitional ALL, and 11 with T-ALL. The median observation time was 32 months. During induction therapy L-ASPA activity (MAAT test), ammonia concentration and parameters assessing function of liver, kidney, pancreas and coagulation system were determined. In 21 patients anti-asparaginase antibodies were also measured. All patients were closely observed for early recognition of clinical signs of L-ASPA toxicities, especially allergic reaction, during realization of all stages of the treatment protocol comprising this drug administration. Results of the induction therapy were assessed on the basis of blast count in the bone marrow on the day 33 of the treatment protocol and achievement of complete remission. Overall survival, event free survival, disease free survival, relapse free survival were analysed. Assay evaluating ammonia increase in the plasma after adding L-ASPA *in vitro* was also conducted. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel and Statistica 8.0 software.

Results: Median L-ASPA activity in all samples was 227 IU/l (range: 0-2063 IU/l), in samples withdrawn in 3-day interval from the drug administration it was 248 IU/l (range: 0-2063 IU/l), and

for more than 3-day interval – 12 IU/l (range: 0-572 IU/l). In 78% of samples the drug activity was above 100 IU/l (in 90% above 30 IU/l). Low L-ASPA activity (<100 IU/l) before subsequent dose of the drug was usually a result of a delay in realization of the treatment protocol and prolonged interval between administrations of L-ASPA. L-ASPA activity below 100 IU/l was noted in 59 (16%) of 374 samples withdrawn in 3-day interval from the drug administration, in 19 (21%) of 87 patients whose plasma was available for L-ASPA activity determination. In 15 (4%) samples, in 7 (8%) children, activity was below the detection limit (<30 IU/l). In the patients with low L-ASPA activity the frequency of allergic reaction was significantly higher when compared with the children with the therapeutic drug's activity (78% vs 42%, $p=0,007$). Hypersensitivity reactions were noted in all patients with undetectable L-ASPA activity. In those patients silent inactivation can be suspected. Determination of anti-asparaginase antibodies was performed in 4 patients with low L-ASPA activity. All of them were positive in IgG class and 3 out of 4 in IgM class. The level of antibodies before 8. administration of L-ASPA in the I protocol was significantly higher in patients with low L-ASPA activity when compared with children with therapeutic activity of the drug ($p=0,014$ for IgG class and $p=0,047$ for IgM class).

Hypersensitivity to L-ASPA was noted in 42 (49%) of patients. In most cases (32 /76%/ of 42 children) it was preceded by long interval from the prior administration of L-ASPA (first dose of the II, III protocol or HR block). In 14 cases (33%) it could be preceded by silent inactivation, since low L-ASPA activity (below 100 IU/l, comprising 7 patients with activity below 30 IU/l) was noted in the I protocol. Anti-asparaginase antibodies were determined in 10 children with allergic reaction. The level of IgM antibodies before 8. administration of L-ASPA in the I protocol was significantly higher in that group of patients compared with children without hypersensitivity ($p=0,023$). However, in Fisher exact test no association between positive antibodies of any class and hypersensitivity was found. In 41 patients after allergic reaction the drug was changed to PEG-ASPA. In one child the hypersensitivity reaction occurred after the last dose of the drug, so she did not receive any other preparation. Eleven (27%) of 41 patients receiving PEG-ASPA developed allergy to this preparation after 1 to 5 administrations and enzyme was change to Erwinase. There was no hypersensitivity to this form of the drug observed.

Significant increase of the ammonia concentration 24 hours after L-ASPA administration with reference to initial concentration was found (median: 88 $\mu\text{mol/l}$ vs 32 $\mu\text{mol/l}$; $p<0,0001$). There was positive correlation between ammonia concentration 24 hours and 3 days after L-ASPA administration and activity of the drug 3 days after administration (R Spearman respectively: 0,34 and 0,44; $p<0,0001$). Moreover, significant correlation between mean ammonia concentration in the I protocol in individual patient and mean L-ASPA activity was found (R Spearman 0,41;

$p < 0,0001$ and $0,56$; $p < 0,0001$ respectively). On the basis of ROC curves analysis usefulness of ammonia concentration determination in detection of low and undetectable L-ASPA activity was stated (area under the curves for ammonia determination 24 hours and 3 days after L-ASPA administration: $0,75$ and $0,76$ respectively for low L-ASPA activity; $0,87$ and $0,76$ respectively for undetectable L-ASPA activity). Mean ammonia concentration during induction was found to be useful to distinguish between patients with therapeutic and low or undetectable L-ASPA activity (area under the curves for low and undetectable L-ASPA activity: $0,85$ and $0,84$ respectively). Optimal cut-off point for detection of low L-ASPA activity was $64 \mu\text{mol/l}$ and $29 \mu\text{mol/l}$ respectively for ammonia determination 24 hours and 3 days after L-ASPA administration. To identify patients with low and undetectable L-ASPA activity optimal cut-off point for mean ammonia concentration determined 24 hours after L-ASPA administration was $91 \mu\text{mol/l}$ and $90,5 \mu\text{mol/l}$ respectively and for mean ammonia concentration determined 3 days after L-ASPA administration $36 \mu\text{mol/l}$ and $29 \mu\text{mol/l}$ respectively. Worse accuracy of mean ammonia concentrations was found for identification of patients endangered with allergic reaction (area under the curves for ammonia determination 3 days after the drug administration – $0,60$), optimal cut-off point was $37 \mu\text{mol/l}$.

Alterations in hemostasis were observed in 77 (88%) patients. Most often it was ATIII and fibrinogen deficiency. Negative correlation between ATIII and L-ASPA activity ($R = -0,27$; $p = 0,0001$), and a positive correlation between APTT and L-ASPA activity ($R = 0,20$; $p = 0,0004$) were found. On a basis of ROC curve analysis it was found that ATIII activity determination can be useful to distinguish patients with low and undetectable L-ASPA activity (area under the curve respectively: $0,87$ and $0,92$) and patients at high risk of hypersensitivity (area under the curve: $0,62$). The areas under ROC curves for ATIII did not differ significantly from curves for ammonia concentration. Optimal cut-off points for mean ATIII activity were 71% for patients with low L-ASPA activity, 80,5% for patients with undetectable L-ASPA activity and 70,5% for patient endangered with allergy.

Severe adverse reaction related to L-ASPA included: symptomatic thrombotic events (4 (4,6%) patients), acute pancreatitis (4 (4,6%) children), hepatotoxicity (ALT activity above 330 IU/l - 5 (5,7%) patients, bilirubin concentration above $55 \mu\text{mol/l}$ - 3 (3,4%) children), diabetes (1 patient). There was no significant difference in L-ASPA activity in those patients when compared with children without such complications.

The outcome in observed cohort did not differ from literature data. In 85 (98%) patients bone marrow status in 33. day of induction therapy was M1. Eighty six (99%) of 87 patients achieved complete remission during realization of the ALL IC-BFM-2002 program. One patients achieved

remission after therapy for ALL relapse because of early progression of disease. Probabilities of 4-years OS, EFS, DFS and RFS were: 96% (95% CI: 94%-98%), 85% (95% CI: 80%-90%), 88,5% (95% CI: 84-93%) and 89,5% (95% CI: 85%-94%) respectively.

Three (3,4%) of 87 children died, 2 of them because of sepsis in neutropenia during HR blocks realization, one patients died in course of hemophagocytic syndrome during supporting remission. Treatment failure (1 progression, 5 relapses) occurred in 6 (6,9%) patients. No influence of low or undetectable L-ASPA activity and allergic reaction to the drug on treatment results assessed on the basis of bone marrow status on the day 33. of induction (M1 vs M2) and probability of DFS was found.

Conclusions: In the studied group of patients the treatment protocol ALL IC-BFM-2002 assured in most patients therapeutic activity of L-ASPA. Occurrence of low and even undetectable L-ASPA activity had no influence on clinical outcome of ALL in studied group, but was significant risk factor of hypersensitivity to this drug. No association between L-ASPA activity and severe adverse reaction to the drug (acute pancreatitis, diabetes, severe hepatotoxicity) was found. Probably, occurrence of toxicities depends on individual susceptibility of patients. Utility of ammonia concentration and ATIII activity determination in indirect L-ASPA activity evaluation was revealed. The lower ammonia concentration and higher ATIII activity the higher probability of low L-ASPA activity and allergic reaction during consecutive administrations of the drug. In patients with low and especially undetectable L-ASPA activity or low ammonia concentration and/or high ATIII activity, change of L-ASPA preparation might be considered to avoid hypersensitivity reaction and assure therapeutic activity of the drug.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Abshire TC, Pollock BH, Billett AL et al.: Weekly polyethylene glycol conjugated L-Asparaginase compared with biweekly dosing produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group study. *Blood* 2000; 96(5): 1709-1715.
2. Ahlke E., Nowak-Goettl U., Schulze-Westhoff P et al.: Dose reduction of asparaginase under pharmacokinetic and pharmacodynamic control during induction therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 1997; 96: 675-681.
3. Akobeng A.K.: Understanding diagnostic tests 2: likelihood ratios, pre- and post-test probabilities and their use in clinical practice. *Acta Paediatrica* 2006; 96: 487–491.
4. Akobeng A.K.: Understanding diagnostic tests 3: receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatrica* 2007; 96: 644–647.
5. Alberts S.R., Bretscher M., Wiltsie J.C. et al: Thrombosis related to the use of L-asparaginase in adults with acute lymphoblastic leukemia: a need to consider coagulation monitoring and clotting factor replacement. *Leuk Lymphoma* 1999; 32: 489-496.
6. Albertsen B.K., Schröder H., Jakobsen P. et al.: Monitoring of *Erwinia* asparaginase therapy in childhood ALL in the Nordic countries. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52: 433-437.
7. Alvarez O.A., Zimmerman G.: Pegaspargase-induced pancreatitis. *Med Pediatr Oncol* 2000; 34: 200-205.
8. Alves C., Chaves C., Souza M.: Transient diabetes mellitus related to L-asparaginase therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007; 51:635-638.
9. Appel I.M., den Boer M.L., Meijerink J.P. et al.: Up-regulation of asparagine synthetase expression is not linked to the clinical response L-asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006; 107: 4244-4249.
10. Appel I.M., Hop W., Pieters R.: Coagulation and fibrinolysis in children with acute lymphoblastic leukemia; influences of dexamethasone and L-asparaginase. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005; 106: Abstract 2146.
11. Appel I.M., Vieira Pinheiro J.P., den Boer M.L. et al.: Lack of asparagine depletion in the cerebrospinal fluid after intravenous dose of PEG-asparaginase: a window study at initial diagnosis of childhood ALL. *Leukemia* 2003; 17: 2254-2256.

12. Armstrong J.K., Hempel G., Koling S. i wsp.: Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 2007; 110: 103-111.
13. Aslanian A.M., Kilberg M.S.: Multiple adaptive mechanisms affect asparagine synthetase substrate availability in asparaginaseresistant MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem J* 2001; 358: 59–67
14. Asselin B.L., Lorenson M.Y., Whitin J.C. et al.: Measurement of serum L-asparagine in the presence of L-asparaginase requires the presence of an L-asparaginase inhibitor. *Cancer Res.* 1991; 51:6568-6573.
15. Asselin B.L., Whitin J.C., Coppola D.J. et al.: Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1780-1786.
16. Athale U.H., Siciliano S.A., Crowther M. et al.: Thromboembolism in children with acute lymphoblastic leukaemia treated on Dana-Farber Cancer Institute protocols: effect of age and risk stratification of disease. *Br J Haemtol* 2005; 129: 803-810.
17. Athanassiadou F., Kourti M., Papageorgiou T. et al.: Severe hyperlipidemia in a child with acute lymphoblastic leukemia treated with L-asparaginase and prednisone. *Pediatr Int* 2004; 46: 743-744.
18. Avramis V., Holcenberg J.S.: PEG-asparaginase and deamination of serum asparagine in children with standard-risk lymphoblastic leukaemia (CCG-1962). (author reply) *Blood* 2002; 100: 1924-1925.
19. Avramis V., Sencer S., Periclou A.P. et al.: A randomised comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 2002; 99:1986-1994.
20. Balwierz W.: Ostre białaczki. W: Wybrane zagadnienia z pediatrii, red. Pietrzyk J.J., Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2005, 123-136.
21. Baxter K (ed). *Vinca alkaloids; Vincristine + Asparaginase: Stockleys Drug Interactions.* RPS Publishing, London, UK, Dostępne na stronie: <http://www.medicinescomplete.com/mc>.
22. Becker F.F., Broome J.D.: L-asparaginase: inhibition of early mitosis in regenerating rat liver. *Science* 1967, 156, 1602–1603.
23. Bogusławska-Jaworska J.: Ostre białaczki u dzieci. W: *Onkologia kliniczna*, red. Krzekowski M., Wyd. Borgis, Warszawa 2001, 604-632.

24. Boos J., Werber G., Ahlke E. et al.; Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer* 1996; 32:1544-1550.
25. Bushman J.E., Palmieri D., Whinna H.C., Church F.C.: Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of antithrombin III in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2000; 24: 559-565.
26. Cheung N.K., Chau I.Y., Coccia P.F.: Antibody response to *Escherichia coli* L-asparaginase. Prognostic significance and clinical utility of antibody measurement. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1986; 8: 99-104.
27. Duval M., Suci S., Ferster A. et al.: Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: result of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* 2002; 99: 2734-2739.
28. Elhasid R., Lanir N., Sharon R. et al.: Prophylactic therapy with enoxaparin during L-asparaginase treatment in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 367-370.
29. Evans W.E., Tsiatis A., Rivera G. et al: Anaphylactoid reactions to *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukemia and lymphoma. *Cancer* 1982; 49:1378-1383.
30. Fine B.M., Kaspers G.J.L., Ho M. et al.: A genome-wide view of the in vitro response to L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005; 65:291-299.
31. Gentili D., Conter V., Rizzari C. et al.: L-asparagine depletion in plasma and cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia during subsequent exposures to *Erwinia*-Asparaginase. *Ann Oncol* 1996; 7: 725-730.
32. Hawkins D.S., Park J.R., Thomson B.G. et al.: Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5335-5341.
33. Hernandez-Espinoza D., Minano A., Martinez C. et al.: L-asparaginase-induced antithrombin I deficiency: implications for conformational diseases. *Am J Pathol* 2006; 169: 142-153.
34. Holland J.F., Ohnuma T.: Asparaginase and amino acids in cancer therapeutics. *Cancer Treat Rep* 1981; 65 (Suppl 4): 123-130.

35. Hongo T., Okada S., Ohzeki T. et al.: Low plasma levels of hemostatic proteins during the induction phase in children with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective study by the JACLS. *Pediatr Int* 2002; 44: 293-299.
36. Howard S.C. Pui C.H.: Endocrine complications in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev* 2002; 16: 225-243.
37. Hsu Y.J, Chen Y.C., Ho C.L. et al.: Diabetic ketoacidosis and persistent hyperglycemia as long-term complications of L-asparaginase-induced pancreatitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 2002; 65:441-445.
38. Hunault-Berger M., Gruel Y., Harousseau J. et al.: Evolution of antithrombin (AT) and fibrinogen (Fg) levels during induction chemotherapy with L-asparaginase (Asp) in adult patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) or lymphoblastic lymphoma (LBL). clinical outcomes and use of coagulation supportive treatments: the CAPELAL study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004; 104: Abstract 4486.
39. Imamura T., Morimoto A., Kato R. et al.: Cerebral thrombotic complications in adolescent leukemia/lymphoma patients treated with L-asparaginase-containing chemotherapy. *Leuk Lymphoma* 2005; 46: 729-735.
40. Irino T., Kitoh T., Koami K. et al.: Establishment of real-time polymerase chain reaction method for quantitative analysis of asparagine synthetase expression. *J Mol Diagn* 2004; 6: 217-224.
41. Iwamoto S., Mihara K., Downing J.R. et al.: Mesenchymal cells regulate response of acute lymphoblastic leukaemia cells to asparaginase. *J Clin Invest* 2007; 117: 1049-1057.
42. Jarrar M., Gaynon P.S., Periclou A.P. et al.: Asparagine depletion after pegylated *E. coli* asparaginase treatment and induction outcome in children with acute lymphoblastic leukemia in first bone marrow relapse: A Children's Oncology Group study (CCG-1941). *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47: 141-146.
43. Jiang H, Gu LJ, Xue HL et al.: Asparagine synthetase activity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2006; 8:272-274.
44. Keith G., Tolman M.D., Robert R.: Ammonia metabolism. In: Burtis C.A., Ashwood E.R., editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. WB Saunders Company: Philadelphia; 1999: 1146-1147.
45. Kieslich M., Porto L., Lanfermann H. et al.: Cerebrovascular complications of L-asparaginase in the therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 484-487.

46. Killander D., Dohlwitz A., Engstedt L. et al: Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer* 1976; 37: 220-228.
47. Konečná P., Klejdus B., Hrstková H.: Monitoring the asparaginase activity and asparagine levels in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with different asparaginase preparations. *Scr Med (Brno)* 2004; 77: 55-62
48. Kowalczyk J.R.: Epidemiologia nowotworów złośliwych u dzieci. W: *Onkologia i hematologia dziecięca*, red. Chybicka A., Sawicz-Birkowska K., Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2009, 3-7.
49. Kowalczyk J.R.: Ostra białaczka limfoblastyczna. W: *Onkologia i hematologia dziecięca*, red. Chybicka A., Sawicz-Birkowska K., Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2009, 205-219.
50. Kuhle S., Lau A., Bajzar L. et al.: Comparison of anticoagulant effect of a direct thrombin inhibitor and low molecular weight heparin in an acquired antithrombin deficiency in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with L-asparaginase: an in vitro study. *Br J Haematol* 2006; 134: 526-531.
51. Kurtzberg J., Asselin B., Poplack D. et al: Antibodies to asparaginase alter pharmacokinetics and decrease enzyme activity in patients on asparaginase therapy. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1993, 34, 304.
52. Larson RA, Fretzin MH, Dodge RK, et al: Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 660-665.
53. Laterza O.F., Gerhardt G., Sokoll L.J.: Measurement of plasma ammonia is affected in patients receiving asparaginase therapy. *Clin Chem* 2003; 49: 1710-1711.
54. Leonard J.V., Kay J.D.S.: Acute encephalopathy and hyperammonaemia complicating treatment of acute lymphoblastic leukaemia with asparaginase. *Lancet* 1986; 1:162-163.
55. Lobel J.S., O'Brien R.T., McIntosh S. et al.: Methotrexate and asparaginase combination chemotherapy in refractory acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Cancer* 1979; 43: 1089-1094.
56. Mak C.M., Pang R.W., Chan G.C., Wong W.K., Tam S.: Serial lipoprotein electrophoresis reveals the lipid changes in L-asparaginase-induced chylomicronaemia syndrome. *Br J Biomed Sci* 2005; 62: 95-97.
57. Martin J.K., Sun W., Maraga D. et al: An investigation into the mechanism of Lasparaginase resistance in L5178Y murine leukemia cells. *Amino Acids* 1993; 5: 51-69.

58. Matsuzaki A., Suminoe A., Hara T.: Antithrombin supplementation III in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with L-asparaginase. *Pediatr Hematol Oncol* 2002; 19: 601-603.
59. Matysiak M., Krenke K.: Choroby nowotworowe układu krwiotwórczego. W: *Hematologia w praktyce pediatrycznej* (Matysiak M., red.) Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002; 93-114.
60. Meyer B., Hagen W., Scheithauer W et al.: L-asparaginase-associated hyperlipidemia with hyperviscosity syndrome in a patient with T-cell lymphoblastic lymphoma. *Ann Oncol* 2003; 14: 658-659.
61. Mitchell L.G., Kuhlem S., Vegh P., Lau A.: Comparison of the anticoagulant effect of Melagatran and LMWH in an acquired antithrombin deficiency in children with ALL treated with L-asparaginase. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004; 104: Abstract 1860.
62. Mitchell L.G. And the PARKAA Group: A prospective cohort study determining the prevalence of thrombotic events in children with acute lymphoblastic leukemia and central venous line who are treated with asparaginase. *Cancer* 2003; 97: 508-516.
63. Müller H.J., Beier R., Löning L. et al.: Pharmacokinetics of native *Escherichia coli* asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment. *Br J Haematol* 2001; 114: 794-799.
64. Müller H.J., Löning L., Horn A. et al.: Pegylated asparaginase (Oncospar™) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM 95 protocols. *Br J Haematol* 2000; 110: 379-384.
65. Nowak-Göttl U., Ahlke E., Fleischhack G. et al.: Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): prednisone versus dexamethasone administration. *Blood* 2003; 10: 2529-2533.
66. Nowak-Göttl U., Ahlke E., Schulze-Westhoff P., Boos J.: Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood ALL: a two-step dose reduction of one *E. coli* asparaginase preparation. *Br J Haematol* 1996; 95: 123-126.
67. Nowak-Göttl U., Heinecke A., von Kries R. et al.: Thrombotic events revisited in children with acute lymphoblastic leukemia impact of concomitant *Escherichia coli* Asparaginase/Prednisone administration. *Thromb Res* 2001; 103: 165-172.
68. Ogawa C., Ohara A., Manabe A. et al.: Treatment outcome of discontinued L-asparaginase in children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: Tokyo Children's Cancer

- Study Group (TCCSG) Study L99-15. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005; 106: Abstract 878.
69. Ohnuma T., Holland J.F., Freeman A., Sinks L.F.: Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res* 1970; 30: 2297–2305.
 70. Orsonneau J.L., Brassart E.A., Lecame M. et al.: Automated kinetic assay of plasmatic L-asparaginase activity undergoing therapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004; 62: 568-572.
 71. Parsons S.K., Skapek S.X., Neufeld E.J. et al.: Asparaginase-associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 89: 1886-1895.
 72. Prager, M.D., Bachynsky, N.: Asparagine synthetase in normal and malignant tissues: correlation with tumor sensitivity to asparaginase. *Arch Biochem Bioph* 1968; 127: 645–654.
 73. Pui C.h., Relling M.V., Behm F.G. et al.: L-asparaginase may potentiate the leukemogenic effect of the epipodophyllotoxins. *Leukemia* 1995; 9: 1680-1684.
 74. Riccardi R., Holcenberg J.C. Glaubiger D.L. et al.: L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. *Cancer Res* 1981; 41: 4554-4558.
 75. Rizzari C., Chiesa R., Citterio M. et al.: Uso della PEG asparaginasi nell'età pediatrica. *Haematologica* 2004; 89 (supplement 10): 89-91.
 76. Rizzari C., Citterio M., Zucchetti M. et al.: A pharmacological study on pegylated asparaginase used in front-line treatment of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Haematologica* 2006; 91: 24-31
 77. Rizzari C., Moericke A., Silvestri D. et al.: Analisi comparative delle reazioni allergiche alla L-asparaginasi (ASP) attiva osservate in bambini affetti da leucemia linfoblastica acuta trattati nei protocolli AIEOP e BFM ALL 2000. *Haematologica* 2004; 89 (supplement 10): 115-116.
 78. Rizzari C., Zucchetti M., Conter V. et al.: L-asparagine depletion and asparagine activity in children with acute lymphoblastic leukemia receiving i.m. or i.v. *Erwinia C.* or *E. coli* L-asparaginase as first exposure. *Ann of Oncol* 2000; 11: 189-193.
 79. Sahoo S., Hart J.: Histopathological features of L-asparaginase-induced liver disease. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 295-299.
 80. Sahu S., Saika S., Pai S.H., Advani S.H.: L-asparaginase (Leunase) induced pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1998; 15: 533-558.

81. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana Farber Consortium protocol 91-01. *Blood* 2001; 97: 1211-1218.
82. Skomra S., Przybylska T. et al.: Transient diabetes mellitus with ketoacidosis in a child during the treatment of acute lymphoblastic leukemia with L-asparaginase. *Pol Tyg Lek (Wars)* 1992; 47: 31-32.
83. Stams W.A., den Boer M.L., Beverloo H.B. et al.: Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)⁺ pediatric ALL. *Blood* 2003; 101: 2743-2747.
84. Stams W.A., den Boer M.L., Holleman A. et al.: Asparagine synthetase expression is linked with L-asparaginase resistance in TEL-AML1-negative but not TEL-AML1-positive pediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2005; 105: 4223-4225.
85. de Stefano V., Sora F., Rossi E. et al.: The risk of thrombosis in patients with acute leukemia: occurrence of thrombosis at diagnosis and during treatment. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1985-1992.
86. Steiner M., Attarbaschi A., Kastner U. et al.: Distinct fluctuations of ammonia levels during asparaginase therapy for childhood acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 49: 640-642.
87. Su N., Pan Y.X., Zhou M. et al.: Correlation between asparaginase sensitivity and asparagine synthetase protein content, but not mRNA, in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Pediatric Blood Cancer* 2008; 50: 274-279.
88. Tagami S., Matsuda K.: An enzymatic method for the kinetic measurement of L-asparaginase activity and L-asparagine with an ammonia gas-sensing electrode. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1990; 38: 153-155.
89. Tsurusawa M., Chin M., Iwai A. et al.: L-asparagine depletion levels and L-asparaginase activity in plasma of children with acute lymphoblastic leukemia under asparaginase treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53: 204-208.
90. Vieira Pinheiro J. P., Ahlke E., Nowak-Göttl U. et al.: Pharmacokinetic dose adjustment of *Erwinia* asparaginase in protocol of the paediatric ALL/NHL-BFM treatment protocols. *Br J Haematol* 1999; 104: 313-320.
91. Vieira Pinheiro J. P., Boos J.: The best way to use L-asparaginase in childhood acute lymphatic leukaemia – still to be defined. *Br J Haematol* 2004; 125: 117-127.

92. Vieira Pinheiro J. P., Lavrens C., Würthwein G., Boos J.: Pharmacology of PEG-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) [To the editor]. *Blood* 2002, 100: 1923-1924.
93. Vieira Pinheiro J. P., Müller H.J., Schwabe D. et al.: Drug monitoring of low-dose PEG-asparaginase (OncosparTM) in children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113: 115-119.
94. Vieira Pinheiro J. P., Wenner K., Escherich G. et al.: Serum asparaginase activities and asparagine concentrations in the cerebrospinal fluid after a single infusion of 2500 IU/m² PEG asparaginase in children with ALL treated according to protocol COALL-06-97. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46: 18-25.
95. Wang B., Relling M.V., Storm M.C. et al: Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia* 2003, 17, 1583–1588.
96. Wenner K.A., Vieira Pinheiro J.P., Escherich G. et al.: Asparagine concentration in plasma after 2500 IU/m² PEG-asparaginase i.v. in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Klin Pediatr* 2005; 217: 321-326.
97. Woo M.H., Hak L.J., Storm M.C. et al.: Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1525-1532.
98. Ylikangas P., Mononen I.: Serious neutropenia in ALL patients treated with L-asparaginase may be avoided by therapeutic monitoring of the enzyme activity in the circulation. *Ther Drug Monit* 2002; 24:502-506.
99. Zalewska-Szewczyk B., Andrzejewski W., Bodalski J.: Development of anti-asparaginase antibodies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 3: 600-602.
100. Zalewska-Szewczyk B., Andrzejewski W., Młynarski W. et al.: The anti-asparaginase antibodies correlate with L-asparaginase activity and may affect clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 931-936.

10. SPIS TABEL

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna 90 pacjentów ocenianych w badaniu	28
Tabela 4. Obecność zaburzeń cytogenetycznych w komórkach białaczkowych pacjentów z badanej grupy	29
Tabela 3. Protokoły, w trakcie których podawana była L-ASPA	33
Tabela 4. Kryteria stopni toksyczności leczenia wg WHO	34
Tabela 5. Pacjenci z niską aktywnością L-ASPA	42
Tabela 6. Porównanie grup pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (> 100 IU/l) aktywnością L-ASPA	43
Tabela 7. Porównanie grup pacjentów z nieoznaczalną (< 30 IU/l) aktywnością L-ASPA i aktywnością powyżej 30 IU/l	43
Tabela 8. Niska (≤ 100 IU/l) aktywność L-ASPA w przynajmniej 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku w trakcie indukcji a ryzyko wystąpienia reakcji alergicznej	45
Tabela 9. Nieoznaczalna (< 30 IU/l) aktywność L-ASPA w przynajmniej 1 oznaczeniu wykonanym 3 dni po podaniu leku w trakcie indukcji a ryzyko wystąpienia reakcji alergicznej	46
Tabela 10. Pacjenci z reakcją nadwrażliwości na L-ASPA w różnych etapach leczenia programem ALL IC-BFM-2002	47
Tabela 11. Porównanie grup pacjentów z reakcją alergiczną i bez reakcji	51
Tabela 12. Niskie (≤ 100 IU/l) aktywności L-ASPA w I protokole a przeciwciała przeciw L-ASPA	54
Tabela 13. Zależność pomiędzy wystąpieniem reakcji alergicznej a wynikiem oznaczenia przeciwciał przeciw L-ASPA	58
Tabela 14. Aktywność L-ASPA w I protokole w zależności od wyniku oznaczeń przeciwciał przeciw L-ASPA	58
Tabela 15. Ocena wartości testów diagnostycznych w wykrywaniu niskiej aktywności L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)	67
Tabela 16. Ocena wartości testów diagnostycznych w wykrywaniu nieoznaczalnej (< 30 IU/l) aktywności L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)	68

Tabela 17. Ocena wartości diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)	74
Tabela 18. Parametry oceniające wartość testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną (< 30 IU/l) aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)	75
Tabela 19. Ocena wartości testów diagnostycznych w wyodrębnieniu pacjentów ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji alergicznej dla wyznaczonych punktów odcięcia stężenia amoniaku badanego 3 dni po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)	77
Tabela 20. Ocena wartości testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia aktywności ATIII badanej 24 godziny po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)	86
Tabela 21. Ocena wartości testów diagnostycznych w identyfikacji pacjentów z nieoznaczalną aktywnością L-ASPA dla wyznaczonych punktów odcięcia aktywności ATIII badanej 24 godziny po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)	88
Tabela 22. Ocena wartości testów diagnostycznych w wyodrębnieniu pacjentów ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji alergicznej dla wyznaczonych punktów odcięcia aktywności ATIII badanej 24 godziny po podaniu L-ASPA (w nawiasach podano 95% CI)	90
Tabela 23. Parametry oceniające funkcję wątroby u obserwowanych pacjentów w trakcie leczenia L-ASPA	91
Tabela 24. Parametry oceniające funkcję nerek u obserwowanych pacjentów w trakcie leczenia L-ASPA	93
Tabela 25. Charakterystyka zmarłych pacjentów	95
Tabela 26. Charakterystyka pacjentów, u których doszło do wznowy ALL	99

11. SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Ogólny schemat programu leczenia ALL IC-BFM 2002	31
Rysunek 2. Nomogram Fagana	39
Rysunek 3. Aktywność L-ASPA po poszczególnych podaniach leku w I protokole	41
Rysunek 4. Zależność pomiędzy niską (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA w I protokole a wystąpieniem reakcji alergicznej przy kolejnych podaniach leku	44
Rysunek 5. Zależność pomiędzy nieoznaczalną (< 30 IU/l) aktywnością L-ASPA w I protokole a wystąpieniem reakcji alergicznej	46
Rysunek 6. Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z reakcją poprzedzoną niskimi (≤ 100 IU/l) aktywnościami w porównaniu do pozostałych pacjentów	52
Rysunek 7. Stężenie IgG przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z reakcją poprzedzoną niskimi (≤ 100 IU/l) aktywnościami w porównaniu do pozostałych pacjentów	53
Rysunek 8. Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (> 100 IU/l) aktywnością L-ASPA	55
Rysunek 9. Stężenie IgG przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (> 100 IU/l) aktywnością L-ASPA	56
Rysunek 10. Stężenie IgM przed 8. podaniem L-ASPA u pacjentów z reakcją alergiczną i pacjentów bez reakcji nadwrażliwości	57
Rysunek 11. Przyrost stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA	59
Rysunek 12. Stężenie amoniaku 24 godz. po podaniu L-ASPA dla poszczególnych zakresów aktywności tego leku ocenianej 3 dni po jego podaniu	60
Rysunek 13. Stężenie amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA dla poszczególnych zakresów aktywności tego leku ocenianej 3 dni po jego podaniu	61
Rysunek 14. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA ocenianą 3 dni po podaniu a stężeniem amoniaku 24 godziny, i 3 dni po podaniu leku oraz przyrostem stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA	62
Rysunek 15. Stężenie amoniaku oceniane 24 godziny po podaniu L-ASPA w zależności od aktywności leku	63
Rysunek 16. Stężenie amoniaku oceniane 3 dni po podaniu L-ASPA w zależności od aktywności leku	64
Rysunek 17. Przyrost stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA w zależności od aktywności leku	65
Rysunek 18. Krzywe ROC dla trafności pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA w wykrywaniu aktywności L-ASPA poniżej 100 IU/l	66

Rysunek 19. Krzywe ROC dla trafności pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA w wykrywaniu aktywności L-ASPA poniżej 30 IU/l	67
Rysunek 20. Korelacja pomiędzy średnimi aktywnościami L-ASPA w I protokole u obserwowanych pacjentów a średnimi stężeniami amoniaku ocenianymi 24 godziny i 3 dni po podaniu luku oraz średnimi przyrostami stężenia amoniaku	69
Rysunek 21. Średnie stężenia amoniaku 24 godziny po podaniu L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (> 100 IU/l) aktywnością L-ASPA	70
Rysunek 22. Średnie stężenia amoniaku 3 dni po podaniu L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (> 100 IU/l) aktywnością L-ASPA	71
Rysunek 23. Średnie przyrosty stężenia amoniaku po podaniu L-ASPA u pacjentów z niską (≤ 100 IU/l) i terapeutyczną (> 100 IU/l) aktywnością L-ASPA	72
Rysunek 24. Krzywe ROC dla średnich wartości pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA – ocena trafności w wyodrębnieniu pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej 100 IU/l	73
Rysunek 25. Krzywe ROC dla średnich wartości pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA – ocena trafności w wyodrębnieniu pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej 30 IU/l	75
Rysunek 26. Krzywe ROC dla średnich wartości pomiaru stężenia amoniaku 24 godziny i 3 dni po podaniu L-ASPA – ocena trafności w wyodrębnieniu pacjentów zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej na L-ASPA	76
Rysunek 27. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA a APTT	78
Rysunek 28. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA a aktywnością ATIII	78
Rysunek 29. Różnice aktywności L-ASPA w zależności od zakresu aktywności ATIII	79
Rysunek 30. Średnia aktywność L-ASPA u obserwowanych pacjentów w zależności od aktywności ATIII	80
Rysunek 31. Aktywność ATIII w zależności od aktywności L-ASPA	81
Rysunek 32. Stężenie fibrynogenu w zależności od aktywności L-ASPA	82
Rysunek 33. Średnie aktywności ATIII u pacjentów z terapeutyczną (> 100 IU/l) i obniżoną (≤ 100 IU/l) aktywnością L-ASPA	84
Rysunek 34. Korelacja pomiędzy średnią aktywnością ATIII a średnią aktywnością L-ASPA	85
Rysunek 35. Krzywa ROC dla średnich wartości pomiarów aktywności ATIII – ocena trafności w wyodrębnieniu pacjentów z aktywnością L-ASPA poniżej 100 IU/l	86

Rysunek 36. Krzywa ROC dla średnich wartości pomiarów aktywności L-ASPA – ocena trafności w wyodrębnianiu pacjentów z aktywności L-ASPA poniżej 30 IU/l	88
Rysunek 37. Krzywa ROC dla średnich wartości pomiarów aktywności L-ASPA – ocena trafności w wyodrębnianiu pacjentów zagrożonych wystąpieniem reakcji alergicznej na L-ASPA ...	89
Rysunek 39. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA a aktywnością ALT i stężeniem bilirubiny	92
Rysunek 40. Korelacja pomiędzy aktywnością L-ASPA a stężeniem mocznika	93
Rysunek 41. DFS w grupie pacjentów z terapeutyczną (>100 IU/l) i obniżoną (\leq 100 IU/l) aktywnością L-ASPA	96
Rysunek 42. DFS w grupie pacjentów z nieoznaczalną (<30 IU/l) aktywnością L-ASPA i aktywnością powyżej 30 IU/l	97
Rysunek 43. DFS w grupie pacjentów, u których doszło do reakcji alergicznej i w grupie pacjentów bez reakcji	98
Rysunek 44. Zależność stężenia amoniaku od czasu od odwirowania krwi	100
Rysunek 45 Przyrost stężenia amoniaku w czasie w zależności od momentu odwirowania krwi pobranej na EDTA	101
Rysunek 46 Przyrost stężenia amoniaku w czasie w zależności od momentu odwirowania krwi pobranej na heparynę	102
Rysunek 47. Stężenie amoniaku w zależności od zastosowanego antykoagulantu w próbkach analogicznych pod względem czasu od pobrania krwi do odwirowania i od dodania L-ASPA do wykonania oznaczenia	103
Rysunek 48. Wyniki poszczególnych oznaczeń stężenia amoniaku w zależności od zastosowanego antykoagulantu w próbkach analogicznych pod względem czasu od pobrania do odwirowania oraz od dodania L-ASPA do wykonania oznaczenia	104