



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ – ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

**ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ
ΒΟΥΣΟΥΛΦΑΝΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ
ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

ΦΩΤΕΙΝΗ Π. ΣΑΜΑΡΑ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Βαλαμή Γεωργία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ
(Υπεύθυνη Καθηγήτρια)
- **Μαρκαντώνη – Κυρούδη Σοφία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος
Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ
- **Δοκουμετζίδης Αριστείδης**, Λέκτορας του Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την παρούσα εργασία ολοκληρώνεται ο κύκλος σπουδών μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης «Κλινική Φαρμακευτική». Με αφορμή αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με στήριξαν και με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό, αλλά και κατά την εκπόνηση της Διπλωματικής Εργασίας, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής – Φαρμακοκινητικής του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας κ. Γεωργίας Βαλσαμή.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Γεωργία Βαλσαμή, αφ' ενός για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής – Φαρμακοκινητικής, και αφ' ετέρου για την πολύτιμη βοήθειά της, την συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη σ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Οι συμβουλές και η κατανόησή της συνεισέφεραν σημαντικά στην ολοκλήρωση της προσπάθειάς αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας κ. Σοφία Μαρκαντώνη – Κυρούδη και τον Λέκτορα του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας κ. Αριστείδη Δοκουμετζίδα, για την καθοδήγηση και την εκπαίδευση που μου προσέφεραν τόσο κατά τη διάρκεια φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό αλλά και κατά τη διεξαγωγή της μελέτης αυτής.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής κ. Παναγιώτη Μαχαίρα, για την ευκαιρία που μου έδωσε, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής επιλογής των μεταπτυχιακών φοιτητών, να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Κλινική Φαρμακευτική», αλλά και για τις γνώσεις που μας μετέδωσε σε όλους τους φοιτητές στο πεδίο της Βιοφαρμακευτικής και της Φαρμακοκινητικής. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής κ. Νικόλαο Δρακούλη, επίσης μέλος της τριμελούς επιτροπής επιλογής των μεταπτυχιακών φοιτητών, για την επιλογή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και για τις γνώσεις που μου παρείχε σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Παράλληλα, ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, κ. Ελένη Αρχοντάκη, για την συνεργασία και την καθοδήγηση, τον χημικό και Υποψήφιο Διδάκτορα του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, κ. Ευθύμιο Νερούτσο, για τη βοήθεια κατά την περάτωση του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Σπυριδωνίδα, υπεύθυνο προγράμματος μεταμοσχεύσεων μυελού των οστών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών, για την παροχή των δειγμάτων των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, στη συνάδελφο και Διδάκτορα του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, κ. Γεωργία Χαρκοφτάκη, καθώς και στον κ. Αλέξανδρο Κούρεντα

για την καθοδήγηση και τη συμπαράστασή τους στα αρχικά στάδια της εκπαίδευσής μου στο εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής – Φαρμακοκινητικής.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου και την αδερφή μου, για τη συνεχή βοήθεια και συμπαράστασή τους, καθώς και για την κατανόηση και την οικονομική υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Φωτεινή Σαμαρά

ABBREVIATIONS

α) Ευρετήριο Συντμήσεων Αγγλικών Όρων

Σύντμηση	Αγγλικός Όρος	Ελληνικός Όρος
a – GVHD	Acute Graft versus Host Disease	Οξεία αντίδραση του ξενιστή κατά του μοσχεύματος
ANC	Absolute Neutrophilic Count	Απόλυτος Αριθμός Ουδετερόφιλων
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Ανεπάρκειας
ATG	Antithymocyte Globulin	Αντιθυμοκυτταρική Σφαιρίνη
AUC	Area Under the Curve	Επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου
bcl – 2	B – Cell Lymphoma 2	
BMI	Body Mass Index	Δείκτης Μάζας Σώματος
BU	Busulfan	Βουσουλφάνη
BUN	Blood Urea Nitrogen	Άζωτο Ουρίας Αίματος
c – GVHD	Chronic Graft versus Host Disease	Χρόνια αντίδραση του ξενιστή κατά του μοσχεύματος
CMV	Cytomegalovirus	Κυτταρομεγαλοϊός
CV	Coefficient of Variation	Συντελεστής Μεταβλητότητας
CY	Cyclophosphamide	Κυκλοφωσφαμίδη
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4	Κυτόχρωμα P450 Ισομορφή 3A4
CYP450	Cytochrome P450	Κυτόχρωμα P450
DDTC	Sodium diethyldithiocarbamate trihydrate	Τριϋδρικό Διαιθυλοδιθειοκαρβαμδικό Νάτριο
DMA	Dimethylacetamide	Διμεθυλακεταμίδη
DMSO	Dimethylsulfoxide	Διμέθυλσουλφοξειδίο
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EF	Ejection Fraction	Κλάσμα Εξώθησης
EFS	Event Free Survival	Επιβίωση Χωρίς Νόσο
EIA	Enzyme Immunoassay	Ενζυμοανοσοπροσδιορισμός
Flu	Fludarabine	Φλουδαραβίνη
FPIA	Fluorescence Polarization Immunoassay	Φθορισμοανοσοπροσδιορισμός
G – CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor	Παράγοντας Διέγερσης Κοκκιοκυττάρων
G1	Presynthetic Gap 1	Φάση G1 του κυτταρικού κύκλου
G2	Postsynthetic Gap 2	Φάση G2 του κυτταρικού κύκλου
GC	Gas Chromatography	Αέριος Χρωματογραφία
GC – ECD	Gas Chromatography - Electron Capture Detection	Αέριος Χρωματογραφία με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων
GC – MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry	Αέριος Χρωματογραφία με ανιχνευτή μάζας
GGT (γ-GT)	Gamma glutamyl transferase	γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση
GSH	Glutathione	Γλουταθειόνη
GST	Glutathione S – Transferase	S – τρανσφεράση της

GSTA	Glutathione S-Transferase Class Alpha	γλουταθειόνης S – τρανσφεράση της γλουταθειόνης τάξη Άλφα
GSTM	Glutathione S-Transferase Class Mu	S – τρανσφεράση της γλουταθειόνης τάξη Μι
GSTP	Glutathione S-Transferase Class Pi	S – τρανσφεράση της γλουταθειόνης τάξη Πι
GSTT	Glutathione S-Transferase Class Theta	S – τρανσφεράση της γλουταθειόνης τάξη Θήτα
GVHD	Graft versus Host Disease	Αντίδραση του ξενιστή κατά του μοσχεύματος
HD	Hodgkin's Disease	Νόσος Hodgkin
HLAs	Human Leukocyte Antigens	Ανθρώπινα Αντιγόνα Λευκοκυττάρων
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης
HPLC – MS	High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy	Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή μάζας
HPLC – UV	High-Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet Detection	Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation	Μεταμόσχευση Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων
HVOD	Hepatic Venous – Occlusive Disease	Φλεβοαποφρακτική Νόσος του Ήπατος
IV	Intravenous	Ενδοφλέβιος
LOD	Limit of Detection	Όριο Ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantification	Όριο Ποσοτικοποίησης
MDS	Myelodysplastic Syndrome	Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο
Mel	Melphalan	Μελφαλάνη
MS	Mass Spectrometry	Φασματογράφος Μάζας
NAC	N-Acetylcysteine	N –ακέτυλοκυστεΐνη
NHL	Non Hodgkin's Lymphoma	Non Hodgkin Λέμφωμα
NRM	Non Relapse Mortality	Χωρίς υποτροπή θνησιμότητα
PEG 400	Polyethylene Glycol 400	Πολυαιθυλενογλυκόλη 400
PFS	Progression Free Survival	Επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου
PO	Per Os	Από του στόματος
RIA	Radioimmunoassay	Ραδιοανοσοπροσδιορισμός
RNA	Ribonucleic Acid	Ριβονουκλεϊκό Οξύ
RRT	Regimen Related Toxicity	Τοξικότητα από τη θεραπεία
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική Τυπική Απόκλιση
SD	Standard Deviation	Τυπική Απόκλιση
TDM	Therapeutic Drug Monitoring	Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων στο Αίμα
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκου άλφα
TRM	Treatment Related Mortality	Σχετιζόμενη με την θεραπεία θνητότητα
TBI	Total Body Irradiation	Ολόσωμη Ακτινοβόληση
THT ⁺	Tetrahydrothiophenium Ion	Ιόν τετραϋδροθειφαινίου

β) Ευρετήριο Συντμήσεων Ελληνικών Όρων

Σύντμηση	Ελληνικός Όρος
ΑΑΚ	Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα
ΑΕΦ	Αιματεγκεφαλικός Φραγμός
ΕΝΥ	Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό
ΙΒΣ	Ιδανικό Βάρος Σώματος
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΜΑΑΚ	Μεταμόσχευση Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων
ΜΜΟ	Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών
ΟΛ	Οξεία Λευχαιμία
ΟΛΛ	Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
ΟΜΛ	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία
ΠΙΣΒ	προσαρμοσμένο Ιδανικό Σωματικό Βάρος
ΠΣΒ	Πραγματικό Σωματικό Βάρος
ΣΑΕ	Σοβαρές Ανεπιθύμητες Ενέργειες
ΣΒ	Σωματικό Βάρος
ΦΑΝ	Φλεβοαποφρακτική Νόσος του Ήπατος
ΦΔ	Φαρμακοδυναμική
ΦΚ	Φαρμακοκινητική
ΧΛΛ	Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία
ΧΜΛ	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ABBREVIATIONS	5
α) Ευρετήριο Συντμήσεων Αγγλικών Όρων	5
β) Ευρετήριο Συντμήσεων Ελληνικών Όρων.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	8
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
A.1. ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	12
A.1.1. Ορισμός.....	12
A.1.2. Ταξινόμηση Λευχαιμιών	12
A.1.3. Επιδημιολογία και Αιτιολογία.....	13
A.2. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	13
A.2.1. Ορισμός και Εφαρμογές της Μεταμόσχευσης Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων.....	13
A.2.2. Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και Πηγές αυτών	14
A.2.3. Είδη μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.....	14
A.2.4. Αγωγές προετοιμασίας (Conditioning Regimens ή Preparative Regimens)	15
A.2.5. Επιπλοκές της μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	16
A.3. ΒΟΥΣΟΥΛΦΑΝΗ.....	17
A.3.1. Χημική Δομή.....	17
A.3.2. Μηχανισμός Δράσης των Αλκυλιωτικών παραγόντων και της Βουσουλφάνης ..	18
A.3.3. Ανάπτυξη αντοχής και μηχανισμοί φαρμακευτικής αντίστασης στη βουσουλφάνη.....	19
A.3.4. Εισαγωγή της από του στόματος (per os) Βουσουλφάνης στα σχήματα προετοιμασίας πριν την μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	21
A.3.4.α. Ο ρόλος της Βουσουλφάνης στα σχήματα προετοιμασίας.....	21
A.3.4.β. Κλινικά Δεδομένα για την Αποτελεσματικότητα και Τοξικότητα του σχήματος per os Βουσουλφάνης/Κυκλοφωσφαμίδης και Σύγκριση με το σχήμα TBI/Κυκλοφωσφαμίδη	21
A.3.5.Εισαγωγή της Ενδοφλέβιας (IV) Βουσουλφάνης στα σχήματα προετοιμασίας πριν την μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.....	23
A.3.5.α. Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά της από του στόματος Βουσουλφάνης και παράγοντες που συμβάλλουν στη μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται.....	23

A.3.5.β. Προβλήματα σχετικά με τη χορήγηση της από του στόματος Βουσουλφάνης – Ανάγκη ανάπτυξης ενδοφλέβιου σκευάσματος	24
A.3.5.γ. Κλινικά Δεδομένα για την Ασφάλεια και Αποτελεσματικότητα της Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης.....	25
A.3.5.δ. Σύγκριση της Ενδοφλέβιας με την από του Στόματος Βουσουλφάνη στο Σχήμα προετοιμασίας με την Κυκλοφωσφαμίδη (BuCy2)	28
A.3.6. Φαρμακοκινητικά Δεδομένα Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης	29
α) Απορρόφηση.....	29
β) Κατανομή	29
γ) Μεταβολισμός.....	31
δ) Απέκκριση	32
ε) Παράγοντες που επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική της Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης – Ειδικοί πληθυσμοί.....	34
Κατανάλωση τροφής.....	34
Ηλικία	34
Α) Παιδιά και Βρέφη.....	34
Β) Ηλικιωμένοι.....	34
Βάρος ασθενών – παχυσαρκία	35
Φύλο, φυλή	35
Υποκείμενη νόσος	36
Νεφρική ανεπάρκεια.....	36
Ηπατική ανεπάρκεια	36
Αναιμία Fanconi	37
A.3.7. Αλληλεπιδράσεις κατά την Συγχορήγηση Βουσουλφάνης με άλλα Φάρμακα....	37
A.3.8. Άλλα Φαρμακοκινητικά Δεδομένα και Δεδομένα ασφάλειας της Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης – Χορήγηση μια φορά την ημέρα.....	40
A.3.9. Φαρμακογενετικά δεδομένα της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης και συσχέτιση με το τελικό αποτέλεσμα της μεταμόσχευσης	41
A.3.10. Προκλινικά Δεδομένα για την ασφάλεια της βουσουλφάνης και Ανεπιθύμητες Ενέργειες – Ειδικές Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις.....	43
A.3.10.α. Προκλινικά Δεδομένα για την ασφάλεια της Βουσουλφάνης	43
A.3.10.β. Ανεπιθύμητες Ενέργειες της Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης.....	43
A.3.10.γ. Ειδικές Προειδοποιήσεις – Προφυλάξεις	49
A.3.11. Η Βουσουλφάνη στην Κλινική Πράξη - Ενδείξεις- Δοσολογικό Σχήμα- Τρόπος χορήγησης- Αραίωση συμπυκνωμένου διαλύματος	50
A.3.12. Ανάγκη εξατομίκευσης των δόσεων της Βουσουλφάνης.....	52

A.3.12.α. Ανάγκη εξατομίκευσης των δόσεων της PER OS Βουσουλφάνης	52
A.3.12.β. Ανάγκη εξατομίκευσης των δόσεων της IV Βουσουλφάνης	54
A.4. THERAPEUTIC DRUG MONITORING (TDM) ή ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΣΤΟ ΑΙΜΑ.....	58
A.4.1. Ορισμός TDM – Κριτήρια Εφαρμογής – Εφαρμογή σε διάφορα φάρμακα – Χρήση στην Ογκολογία	58
A.4.2. Τεχνικές Εξατομίκευσης	59
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	61
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	63
B.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	63
B.1.1. Ασθενείς	63
B.1.2. Πρωτόκολλο – Συλλογή δειγμάτων από ασθενείς που έλαβαν βουσουλφάνη μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα.....	63
B.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	65
B.2.1. Οργανολογία	65
B.2.2. Διαλύτες – Αντιδραστήρια	66
Σύνθεση του 1,6 – bis(methanesulfonyloxy)hexane	66
B.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων.....	66
Διάλυμα Παρακαταθήκης Βουσουλφάνης (Stock Solution Busulfan)	66
Διαλύματα Εργασίας Βουσουλφάνης (Busulfan Working Solutions)	67
Διάλυμα Παρακαταθήκης του 1,6 – δις(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξανίου	67
Διάλυμα εργασίας του 1,6 – δις(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξανίου	67
Παρασκευή διαλύματος του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης Sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (DDTC).....	67
Παρασκευή της κινητής φάσης.....	67
B.2.4. Σύνθεση του παραγώγου της Βουσουλφάνης με το DDTC	68
B.2.5. Πλάσμα αίματος.....	68
B.2.6. Χρωματογραφικές Συνθήκες – Πορεία Ανάλυσης.....	70
B.2.6.α. Χρωματογραφικές Συνθήκες	70
B.2.6.β. Παρασκευή προτύπων δειγμάτων σε πλάσμα αίματος – Κατασκευή καμπύλης αναφοράς στο πλάσμα	71
Βήμα 1ο: Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων εργασίας της βουσουλφάνης	71
Βήμα 2ο: Παρασκευή διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου 1,6 – bis(methanesulfonyloxy)hexane	71
Βήμα3ο: Παρασκευή διαλύματος του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης.....	71

Βήμα 4ο: Προκατεργασία Δείγματος.....	71
Β.2.6.γ. Προκατεργασία άγνωστων δειγμάτων σε πλάσμα αίματος ασθενών που λάμβαναν Βουσουλφάνη	72
Β.3. ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗ ΔΟΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	73
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
Γ.1. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	76
Γ.1.1. Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς σε ασθενείς	76
Γ.1.2. Όριο Ανίχνευσης (LOD) και Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)	78
Γ.2. ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ – ΧΡΟΝΟΥ (AUC) ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΔΟΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΕΠΟΜΕΝΕΣ ΔΟΣΕΙΣ.....	79
Δ. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	88
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	95
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	97
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	111
ABSTRACT.....	112

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

A.1.1. Ορισμός

Οι λευχαιμίες είναι μια ετερογενής ομάδα αιματολογικών κακοηθειών, που εμφανίζονται όταν οι διεργασίες του πολλαπλασιασμού ή της απόπτωσης των κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού διαταράσσονται. Χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών και τη συσσώρευση άωρων λευχαιμικών κυττάρων (βλάστες) σε αυτόν. Οι βλάστες καταλαμβάνουν περισσότερο χώρο στο μυελό εις βάρος των κανονικών αιμοποιητικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών όπως αναιμία, ουδετεροπενία και θρομβοκυτταροπενία. Οι λευχαιμικές βλάστες εκτός του μυελού μπορούν να διηθήσουν και άλλους ιστούς και όργανα, όπως οι λεμφαδένες, το δέρμα, το ήπαρ, ο σπλήνας, οι νεφροί, οι όρχεις και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η κακοήθης εξαλλαγή μπορεί να συμβεί σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων του μυελού και ανάλογα με τα κύτταρα που προσβάλλονται εμφανίζονται διάφορες αιματολογικές νεοπλασίες (οξείες ή χρόνιες λευχαιμίες και λεμφώματα υψηλού ή χαμηλού βαθμού κακοήθειας). Οι περισσότερες λευχαιμίες χαρακτηρίζονται από χρωμοσωμικές ή κυτταρογενετικές ανωμαλίες που έχουν διαφορετική κατά περίπτωση προγνωστική σημασία (Craig, et al., 2005) (Leather & Poon, 2008).

A.1.2. Ταξινόμηση Λευχαιμιών

Οι λευχαιμίες διαιρούνται σε οξείες και χρόνιες, με βάση τις διαφορές στην προέλευση των κυττάρων και το βαθμό ωρίμανσής τους, την κλινική εικόνα και την ταχύτητα προόδου της αθεράπευτης νόσου, καθώς και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Στην οξεία λευχαιμία κυριαρχούν τα άωρα, μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Leather & Poon, 2008). Το ιστορικό της νόσου είναι συνήθως βραχύ και το προσδόκιμο επιβίωσης χωρίς θεραπεία πολύ μικρό (Craig, et al., 2005) και ο θάνατος μπορεί να επέλθει εντός 2 ή 3 μηνών, λόγω της ταχείας εξέλιξης της νόσου. Στις χρόνιες λευχαιμίες τα κύτταρα που κυριαρχούν είναι ώριμα και συνήθως καλώς διαφοροποιημένα (Leather & Poon, 2008). Ο ρυθμός εξέλιξης της νόσου είναι βραδύς, οι ασθενείς μπορεί να αισθάνονται αδιαθεσία επί μήνες και η επιβίωση μετριέται με τα χρόνια. Σημαντικός αριθμός χρόνιων λευχαιμιών διαγιγνώσκεται τυχαία (Craig, et al., 2005). Οι λευχαιμίες επίσης ανάλογα με την προέλευση του κυττάρου που πάσχει, διακρίνονται και σε μυελογενείς και λεμφογενείς. Με βάση τα παραπάνω οι τέσσερις κύριες κατηγορίες λευχαιμιών είναι οι εξής: Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ), Οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ), Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), Χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ) (Craig, et al., 2005) (Leather & Poon, 2008). Οι κατηγορίες αυτές ταξινομούνται περαιτέρω σε άλλες υποκατηγορίες. Η φαρμακευτική θεραπεία των δύο κύριων τύπων (λεμφικές και μυελογενείς) διαφέρει σημαντικά.

A.1.3. Επιδημιολογία και Αιτιολογία

Η λευχαιμία είναι σπάνια νόσος. Η συχνότητα όλων των τύπων στον πληθυσμό είναι περίπου 10/100000 κατ' έτος, από τις οποίες έως και το 50% είναι οξεία λευχαιμία (ΟΛ). Οι άνδρες προσβάλλονται συχνότερα από τις γυναίκες. Η σχέση είναι περίπου 3:2 για την ΟΛ, 2:1 για την ΧΛΛ και 3:1 για την ΧΜΛ. Υπάρχει και γεωγραφική διακύμανση της συχνότητας, με πιο σημαντική τη σπανιότητα της ΧΛΛ στους Κινέζους και στις συγγενείς φυλές. Η οξεία λευχαιμία εμφανίζεται σε όλες τις ηλικίες, ωστόσο η ΟΛΛ αποτελεί κυρίως παιδιατρική νόσο, καθώς εμφανίζει αύξηση της συχνότητας σε άτομα ηλικίας 1-5 ετών. Όλες οι μορφές της ΟΜΛ έχουν τη χαμηλότερη συχνότητα στην ενήλικη ζωή, αλλά υπάρχει σημαντική αύξηση της συχνότητας σε ηλικίες άνω των 50 ετών. Οι χρόνιες λευχαιμίες εμφανίζονται κυρίως στις μεγάλες ηλικίες. Η αιτία της λευχαιμίας είναι άγνωστη στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη λευχαιμίας είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία, τα κυτταροτοξικά φάρμακα και ιδίως οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, το βενζόλιο, ορισμένοι ρετροϊοί, καθώς επίσης και γενετικοί και ανοσολογικοί παράγοντες (Craig, et al., 2005).

A.2. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

A.2.1. Ορισμός και Εφαρμογές της Μεταμόσχευσης Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων

Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την ενδοφλέβια έγχυση αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων από ένα υγιή συμβατό δότη σε έναν ασθενή – λήπτη, συνήθως μετά τη χορήγηση υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας (Perkins & Yee, 2008). Αρχικά, για τη διαδικασία αυτή είχε χρησιμοποιηθεί ο όρος μεταμόσχευση μυελού των οστών (ΜΜΟ), ωστόσο σήμερα έχει αντικατασταθεί από τον όρο μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΑΚ ή ΗSCT), λόγω της δυνατότητας χρήσης περιφερικού αίματος και κυττάρων του ομφάλιου λώρου για το σκοπό αυτό. Η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων αποτελεί τη μόνη ελπίδα "ίασης" σε ασθενείς με διάφορες αιματολογικές διαταραχές και εφαρμόζεται είτε για να αντικαταστήσει ένα μη φυσιολογικό αλλά ταυτόχρονα και μη κακόηθες αιμοποιητικό σύστημα με ένα νέο από υγιή δότη, είτε για την θεραπεία μιας αιματολογικής νεοπλασματικής νόσου. Στην πρώτη περίπτωση, περιλαμβάνονται διάφορες μη νεοπλασματικές παθήσεις, στις οποίες ο μυελός των οστών ή το ανοσοποιητικό σύστημα είναι απόντα ή δεν λειτουργούν σωστά, όπως σύνδρομο μυελικής απλασίας επίκτητα ή κληρονομούμενα, στα οποία παρουσιάζεται ανεπάρκεια στην αιμοποίηση, κληρονομούμενες διαταραχές με έλλειψη παραγωγής αιμοσφαιρίων (πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες και αιμοσφαιρινοπάθειες), συγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού με έλλειψη ενζύμων ή κυτταρικών σειρών (νόσοι λυσοσωμικής αποθήκευσης, lysosomal storage diseases). Στη δεύτερη περίπτωση, περιλαμβάνονται κυρίως οι λευχαιμίες, τα λεμφώματα και οι λοιπές κακοήθειες του αιμοποιητικού ιστού (μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, πολλαπλούν μυέλωμα κλπ) (Appelbaum, 2005) και η βασική αρχή, που διέπει την εφαρμογή της, είναι η αρχή της δοσο-εξαρτώμενης θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων. Τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα έχουν σιγμοειδή σχέση δόσης ανταπόκρισης, γεγονός που υποδηλώνει ότι, ως ένα βαθμό, η αύξηση της δόσης του

φαρμάκου, θα προκαλέσει μεγαλύτερη ανταπόκριση. Με άλλα λόγια, μπορεί να υπερνικηθεί η αντίσταση στα κυτταροτοξικά φάρμακα και να εξαλειφθούν περισσότερα καρκινικά κύτταρα. Η επακόλουθη ανεπάρκεια του αιμοποιητικού ιστού, που προκαλείται από τις υψηλές δόσεις των χημειοθεραπευτικών, αίρεται με την έγχυση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Perkins & Yee, 2008).

A.2.2. Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και Πηγές αυτών

Τα αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα του αίματος (stem cells) αποτελούν πρόδρομα κύτταρα για όλα τα κύτταρα του περιφερικού αίματος, συμπεριλαμβανομένων των ερυθροκυττάρων, λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων. Διαθέτουν την ικανότητα της αυτό – ανανέωσης, δηλαδή της παραγωγής περισσότερων αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων, και του πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησής τους σε προγονικά κύτταρα, που προορίζονται για μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (Perkins & Yee, 2008). Μπορούν να εγκαθίστανται και να πολλαπλασιάζουν το μυελό του δέκτη, όταν εγχυθούν σε αυτόν, αλλά και να καταψύχονται (Appelbaum, 2005). Πηγές αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αποτελούν ο μυελός των οστών, το περιφερικό αίμα και ο ομφάλιος λώρος. Για πολλές δεκαετίες, ο μυελός των οστών υπήρξε η κύρια πηγή τέτοιων κυττάρων, σήμερα όμως έχει αντικατασταθεί από τη χρήση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από το περιφερικό αίμα. Τα κύτταρα του περιφερικού αίματος προτιμώνται, λόγω της ταχύτερης αποκατάστασης της αιμοποίησης μετά τη μεθεταμόσχευση και άρα της ελαχιστοποίησης των ανεπιθύμητων ενεργειών αυτής κατά τη φάση της πανκυτταροπενίας, της αποφυγής της νοσηρότητας που συνοδεύει τη συλλογή του μυελού των οστών και της δυνατότητας συλλογής μεγάλου αριθμού αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (10 φορές σε σχέση με τον μυελό) (Πάγκαλης, 2008).

A.2.3. Είδη μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Οι δύο βασικές κατηγορίες μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι η αλλογενής και η αυτόλογη μεταμόσχευση. Η διάκριση γίνεται με βάση τη σχέση του δότη με το λήπτη. Στην αλλογενή τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα προέρχονται από υγιή, συγγενή ή μη, δότη, ενώ στην αυτόλογη μεταμόσχευση τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή και έχουν συλλεχθεί συνήθως σε φάση ύφεσης του νοσήματός του. Σε αντίθεση με την αλλογενή μεταμόσχευση, στην αυτόλογη δεν υπάρχει κίνδυνος απόρριψης του μοσχεύματος ή ανάπτυξης GVHD (graft versus host disease), αλλά υπάρχει ο κίνδυνος υποτροπής της νόσου, λόγω της πιθανότητας παρουσίας καρκινικών κυττάρων στο μόσχευμα (Appelbaum, 2005) (Perkins & Yee, 2008) (Πάγκαλης, 2008). Η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων διακρίνεται περαιτέρω, με βάση το δότη, την πηγή των κυττάρων και την ένταση του σχήματος προετοιμασίας, όπως φαίνεται και στον πίνακα A 1, που παρατίθεται παρακάτω (Πάγκαλης, 2008).

Πίνακας Α 1. Είδη μεταμοσχεύσεων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΑΑΚ) (Πάγκαλης, 2008).

	Αλλογενής	Αυτόλογη
Ανάλογα με τον δότη	Από μονοζυγωτικό δίδυμο αδελφό	
	Από ιστοσυμβατό συγγενή δότη	
	Από μη συγγενή εθελοντή HLA- ιστοσυμβατό δότη	
	Από απλο-ιστοσυμβατό συγγενή δότη (γονέα, αδελφό)	
Ανάλογα με την πηγή των κυττάρων	Μυελός των οστών	Μυελός των οστών
	ΑΑΚ αίματος	ΑΑΚ αίματος
	Ομφάλιος λώρος	
Ανάλογα με το σχήμα προετοιμασίας	Πλήρους έντασης (Μυελοαφανιστική)	Πλήρους έντασης
	Μειωμένης έντασης	
	Μη μυελοκατασταλτική	

A.2.4. Αγωγές προετοιμασίας (Conditioning Regimens ή Preparative Regimens)

Ο ρόλος του σχήματος προετοιμασίας, που χορηγείται πριν τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, είναι διπλός και η επιλογή του εξαρτάται από την υποκείμενη νόσο και την πηγή των κυττάρων. Επειδή η πλειοψηφία των μεταμοσχεύσεων αφορά ασθενείς με νεοπλασματικές νόσους, ο κύριος στόχος της αγωγής είναι να καταστρέψει τα κακοήθη κύτταρα και αν είναι δυνατόν να γίνει εκρίζωση του λευχαιμικού κλώνου, δηλαδή εξάλειψη της υποκείμενης νόσου. Επιπλέον, στην περίπτωση της αλλογενούς μεταμόσχευσης, η αγωγή προετοιμασίας πρέπει να είναι και ανοσοκατασταλτική, για την αποφυγή της απόρριψης του μοσχεύματος. Συνήθως, τα προπαρασκευαστικά σχήματα περιλαμβάνουν υψηλές δόσεις κυτταροτοξικών φαρμάκων, όπως κυκλοφωσφαμίδη, βουσουλφάνη, μελφαλάνη, ετοποσίδη, καρμουστίνη, thiopera, ιφωσφαμίδη, cisplatin, καρβοπλατίνη, κυτταραβίνη κλπ, με ή χωρίς ολόσωμη ακτινοβολία (Appelbaum, 2005) (Perkins & Yee, 2008) (Πάγκαλης, 2008). Διακρίνονται σε μυελοαφανιστικά, μη μυελοαφανιστικά και μειωμένης έντασης. Το παλαιότερο και πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σχήμα προετοιμασίας, περιλαμβάνει ολόσωμη ακτινοβολία (total body irradiation, TBI) σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη. Η ευρεία εφαρμογή του, οφείλεται στην ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση της ακτινοβολίας και στην ικανότητά της να καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται σε περιοχές απρόσιτες στη συστηματική κυκλοφορία και άρα στα κυτταροτοξικά φάρμακα, όπως οι γονάδες και το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), και για αυτό προτιμάται σε ασθενείς με οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, εξαιτίας του αυξημένου κινδύνου συμμετοχής του ΚΝΣ κατά την πορεία της νόσου (Fisher, et al., 2006) (Sanders, 1999) (Aschan, 2007) (Perkins & Yee, 2008) (Πάγκαλης, 2008). Κύριο μειονέκτημα της TBI είναι η εμφάνιση σοβαρής τοξικότητας, που σε οξεία φάση περιλαμβάνει πυρετό, ναυτία, έμετο, διάρροια, βλεννογονίτιδα, ελαφρά διόγκωση των παρωτίδων, (Perkins &

Yee, 2008) (Chou, et al., 1996), εξάνθημα, αλωπεκία, μείωση των εκκρίσεων (σάλιο, δάκρυα), αύξηση ηπατικών δοκιμασιών και φλεβοαποφρακτική νόσο του ήπατος (ΦΑΝ ή HVOD) (Chou, et al., 1996). Στις μακροπρόθεσμες επιπλοκές της περιλαμβάνονται: δευτερογενείς κακοήθειες (συμπαγείς όγκοι, λευχαιμίες), ιδίως σε άτομα που μεταμοσχεύθηκαν σε νεαρή ηλικία, (Socie, et al., 2000) καταρράκτης, καθυστερημένη σωματική και νοητική ανάπτυξη στα παιδιά, ενδοκρινική δυσλειτουργία (θυρεοειδής, γονάδες), κλπ (Chou, et al., 1996) (Liesner, et al., 1994). Εξαιτίας της μεγάλης τοξικότητάς της για τους ασθενείς, και ιδίως τα παιδιά και όσους έχουν ακτινοβοληθεί στο παρελθόν, στα πλαίσια της θεραπείας της υποκείμενης νόσου, αλλά και της ανάγκης ειδικής υποδομής, την οποία δεν διαθέτουν τα περισσότερα κέντρα μεταμόσχευσης, η εφαρμογή της σήμερα έχει περιοριστεί (Perkins & Yee, 2008) (Πάγκαλης, 2008) και έχει πλέον αντικατασταθεί από τη χορήγηση υψηλών δόσεων κυτταροτοξικών φαρμάκων, η πλειονότητα των οποίων ανήκει στην κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων. Τα φάρμακα αυτά, προκαλούν, ακόμη και σε χαμηλές δόσεις, καταστολή του μυελού των οστών, επομένως η έκθεση σε υψηλές δόσεις αυτών δρα μυελοαφανιστικά και επιτρέπει, στη συνέχεια, την έγχυση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του δότη. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες δρουν κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλά όχι σε συγκεκριμένη φάση αυτού και δεν παρουσιάζουν διατσαυρούμενη ανθεκτικότητα. Επίσης, η σχέση δόσης αποτελέσματος είναι γραμμική: όσο μεγαλύτερη η δόση του φαρμάκου, τόσο μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων καταστρέφονται. Συνήθως χορηγούνται συνδυασμοί δύο ή τριών φαρμάκων σε μειωμένες δόσεις (50 – 70 % της μέγιστης καλώς ανεκτής δόσης για κάθε φάρμακο), ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα (Sanders, 1999). Ένα από τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα σχήματα είναι ο συνδυασμός της βουσουλφάνης με κυκλοφωσφαμίδη ή με μελφαλάνη και τα τελευταία χρόνια ο συνδυασμός βουσουλφάνη/φλουδαραβίνη (Bu/Flu), στα πλαίσια των αγωγών μειωμένης έντασης (Aschan, 2007).

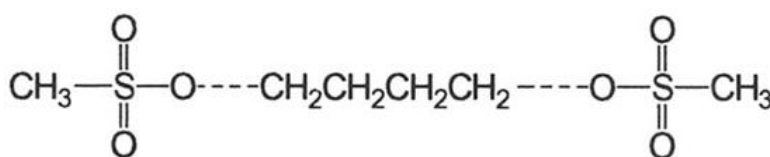
A.2.5. Επιπλοκές της μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Οι επιπλοκές ευθύνονται για μεγάλο ποσοστό θνητότητας στην αλλογενή μεταμόσχευση (>50%), σε αντίθεση με την αυτόλογη μεταμόσχευση, όπου η βασική αιτία θανάτου είναι η υποτροπή της υποκείμενης νόσου. Οι επιπλοκές διακρίνονται σε πρώιμες, που εμφανίζονται εντός του πρώτου τριμήνου μετά τη μεταμόσχευση, και όψιμες, οι οποίες παρουσιάζονται αργότερα. Οι άξονες των επιπλοκών είναι τρεις: επιπλοκές σχετιζόμενες με την τοξικότητα του σχήματος προετοιμασίας, οι λοιμώξεις και για την αλλογενή μεταμόσχευση, η νόσος του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (GVHD) (Πάγκαλης, 2008).

A.3. ΒΟΥΣΟΥΛΦΑΝΗ

A.3.1. Χημική Δομή

Η βουσουλφάνη είναι ένας διλειτουργικός αλκυλιωτικός παράγοντας, που ανήκει στην ομάδα των σουλφονούχων αλκυλίων (Busilvex, 2008). Η αναλυτική χημική ονομασία της είναι 1,4 – Butanediol dimethanesulfonate (ή 4 – Methylsulfonyloxybutyl methanesulfonate κατά IUPAC) και ο κωδικός της στα Chemical Abstracts No 55-98-1. Ο χημικός τύπος είναι $C_6H_{14}O_6S_2$ και το μοριακό της βάρος ισούται με 246,30 g/mol. Είναι λευκή, κρυσταλλική σκόνη, ελαφρώς διαλυτή στο νερό και την αιθανόλη, διαλυτή στην ακετόνη με λόγο 1/45 (WHO, 2012). Η χημική δομή της φαίνεται στην παρακάτω εικόνα A 1.



Εικόνα A 1. Χημική Δομή Βουσουλφάνης (Hall & Tilby, 1992).

Η βουσουλφάνη, σήμερα, χρησιμοποιείται ως εναλλακτικό της ολόσωμης ακτινοβόλησης (TBI) στις μυελοαφανιστικές αγωγές προετοιμασίας πριν τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, η αρχική της χρήση στην θεραπευτική αφορούσε την παρηγορητική θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, όπου χρησιμοποιήθηκε για πάνω από 30 χρόνια και στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από λιγότερο τοξικά φάρμακα, όπως η υδροξουρία, η ιντερφερόνη Α και πρόσφατα, οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης (κυρίως το imatinib mesylate) (Clarkson, et al., 2003). Η βουσουλφάνη συνετέθη, για πρώτη φορά, από τους Haddow and Timmis το 1953, κατά τη διάρκεια μελέτης της επίδρασης διαφόρων σουλφονικών εστέρων στους όγκους, καθώς πολλά παράγωγα της κατηγορίας είχε διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση και ότι αναστέλλουν τη φυσιολογική αιμοποίηση (Ciurea & Andersson, 2009). Από τότε, χρησιμοποιήθηκε ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας στην αντιμετώπιση του καρκίνου (Bishop & Wassom, 1986) και ειδικότερα ως φάρμακο εκλογής στην παρηγορητική θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ) και άλλων μυελοϋπερπλαστικών διαταραχών (Ciurea & Andersson, 2009), όπως η αληθής πολυκυτταραιμία, η μυελοϊνώση και η ιδιοπαθής θρομβοκυττάρωση (Bishop & Wassom, 1986). Η χρήση της, σε αυτές τις παθήσεις, οφείλεται στο γεγονός ότι εμφάνισε έντονα κατασταλτικές ιδιότητες στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μυελού, και συγκρινόμενη με την ακτινοβολία δεν κατέστειλε αισθητά το σχηματισμό των λεμφοκυττάρων σε δόσεις που προκαλούσαν 50 % μείωση στον αριθμό των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η καταστολή των κοκκιοκυττάρων που προκαλούσε, δεν συνοδευόταν από άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες και έτσι κατέστη δυνατή η ευρεία χρήση της στην αντιμετώπιση των παραπάνω διαταραχών

(Ciurea & Andersson, 2009). Έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν στην αντιμετώπιση της μυασθένειας Graves, της χρόνιας κοκκιωματώδους νόσου των παιδιών, σε βρογχογενές καρκίνωμα του πνεύμονα, ως γενικό ανοσοκατασταλτικό μετά από μεταμοσχεύσεις οργάνων, στη θεραπεία αυτοάνοσων νοσημάτων και ως ανασταλτικό της αναπαραγωγής για τα έντομα (Bishop & Wassom, 1986). Τη δεκαετία του 1970, παρατηρήθηκε, για πρώτη φορά, ότι ο συνδυασμός της με την κυκλοφωσφαμίδη, επέτρεπε την επιτυχή μεταμόσχευση ξένων κυττάρων σε τρωκτικά (Nath & Shaw, 2007). Σήμερα, όπως αναφέρεται και παραπάνω, χρησιμοποιείται στην αγωγή προετοιμασίας πριν την αλλογενή και αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε ενήλικες και παιδιά, σε συνδυασμό με άλλα κυτταροτοξικά φάρμακα (κυκλοφωσφαμίδη, μελφαλάνη ή φλουδαραβίνη) (Busilvex, 2008). Δεδομένου του μικρού αριθμού ασθενών, που υποβάλλονται σε αυτό το είδος θεραπείας και μεταμόσχευσης, η βουσουλφάνη έχει χαρακτηριστεί ως «ορφανό φάρμακο» (δηλαδή φάρμακο το οποίο χρησιμοποιείται σε σπάνιες ασθένειες) στις 29 Δεκεμβρίου 2000 από την Committee for Orphan Medicinal Products (COMP) (EMA, 2008).

A.3.2. Μηχανισμός Δράσης των Αλκυλιωτικών παραγόντων και της Βουσουλφάνης

Η βουσουλφάνη, όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας διπλής λειτουργίας. Στην ομάδα αυτή ανήκουν ενώσεις δομικά ανομοιογενείς, που εκδηλώνουν την κυτταροτοξική τους δράση με την προσφορά χημικών ομάδων (αλκυλομάδες) που σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τα πυρηνόφιλα συστατικά των κυττάρων (DNA, RNA, πρωτεΐνες) (Rang, et al., 2007). Οι αλκυλώσεις του DNA εντός του πυρήνα είναι, πιθανότατα, ο κύριος μηχανισμός που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (Edward & Sartorelli, 2009). Η κύρια θέση αλκυλίωσης στο DNA είναι το άτομο αζώτου στη θέση 7 (N_7) της γουανίνης, ενώ σε μικρότερο βαθμό επηρεάζονται και τα N_1 και N_3 της αδενίνης, το N_3 της κυτοσίνης και το O_6 της γουανίνης, καθώς επίσης και φωσφωρικά άτομα και πρωτεΐνες που σχετίζονται με το DNA. Δεδομένου ότι οι περισσότεροι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι διδύναμοι, διαθέτουν, δηλαδή, δύο αλκυλιωτικές ομάδες, οι αλληλεπιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα στη μια ή και στις δύο έλικες του DNA μέσω διασταυρούμενης σύνδεσης. Ο σχηματισμός των δεσμών φαίνεται ότι έχει μέγιστη σημασία για την κυτταροτοξική δράση των αλκυλιωτικών παραγόντων, καθώς είναι ιδιαίτερα επιβλαβής για τα διαιρούμενα κύτταρα. Η κύρια δράση τους, επομένως, εκδηλώνεται κατά την αντιγραφή, όταν ορισμένα τμήματα του DNA είναι σε μορφή απλής έλικας και άρα πιο ευάλωτα στην αλκυλίωση (όψιμη φάση G1 και φάση S), προκαλώντας έτσι αναστολή της φάσης G2 και επακολουθεί απόπτωση και κυτταρικός θάνατος (Rang, et al., 2007) (Edward & Sartorelli, 2009).

Η δράση της βουσουλφάνης οφείλεται στις δυο μεθανοσουλφονικές ομάδες που φέρει στα άκρα της τετρανθρακικής αλύσου και οι οποίες σε υδατικά μέσα απελευθερώνονται και παράγουν δραστικά καρβονικά ιόντα, τα οποία μπορούν να αλκυλιώσουν το DNA (Busilvex, 2008). Αντιδρά με το άτομο αζώτου στη θέση 7 (N_7) της γουανίνης, οδηγώντας στο σχηματισμό διαφόρων παραγώγων, τρία εκ των οποίων έχουν προσδιοριστεί με ανάλυση HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού και με ανιχνευτή μάζας. Η απομόνωση του διγουανινο – παραγώγου 1,4 – di(7 – guanosyl)butane επιβεβαιώνει ότι η βουσουλφάνη

σχηματίζει διασταυρούμενες συνδέσεις, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο βλάβη στο DNA (Tong & Lundlum, 1980). Οι διασταυρούμενες συνδέσεις που δημιουργεί έχει αποδειχθεί ότι είναι ενδομοριακές (Iwamoto, et al., 2004) και πιθανόν και διαμοριακές (Bedford & Fox, 1982). Επίσης, δημιουργεί δεσμούς μεταξύ του DNA και των πρωτεϊνών (Pacheco, et al., 1989), και κυρίως μεταξύ του DNA και της κυστεΐνης 114 της ιστόνης H3 (Hartley & Fox, 1986). Νεότερα στοιχεία δείχνουν ότι η δράση της δεν ασκείται μέσω αλκυλίωσης του O₆ της γουανίνης στο DNA (Westerhof, et al., 2001). Έχει βρεθεί, επίσης, ότι εστεροποιεί τις φωσφορικές ομάδες του χρωμοσωμικού DNA, συνεισφέροντας με αυτό τον τρόπο στην διάσπαση των χρωμοσωμάτων και επομένως στο συνολικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα (Buggia, et al., 1994). Ο μηχανισμός της αλκυλίωσης για τη βουσουλφάνη είναι S_N2 (Drablos, et al., 2004).

Μελέτες σε κλωνοποιημένες σειρές καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων υποδεικνύουν ότι η βουσουλφάνη σταματά συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου. Ενώ, όπως όλοι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, έτσι και η βουσουλφάνη, δρα σε όλα τα στάδια της μίτωσης, in vitro μελέτες σε σειρές καρκινικών κυττάρων έδειξαν ότι τα κύτταρα που αντιγράφονται, είναι περισσότερο ευαίσθητα στη δράση της βουσουλφάνης κατά την όψιμη φάση G1 και ο κυτταρικός κύκλος αναστέλλεται στη φάση G2. Καλλιέργειες κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S, όπου συντίθεται DNA, δεν επηρεάζονται, καθώς σε αυτή τη φάση είναι ενεργοποιημένοι οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης (Buggia, et al., 1994). Είναι κυτταροτοξική, όχι μόνο για τους ταχέως πολλαπλασιαζόμενους ιστούς, αλλά ακόμη και για τα βραδέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, καθώς επίσης και για μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (Bishop & Wassom, 1986). Έχει εκλεκτική δράση στο μυελό των οστών και σε χαμηλές δόσεις καταστέλλει το σχηματισμό κοκκιοκυττάρων και αιμοπεταλίων, ενώ σε υψηλές δόσεις εμποδίζει το σχηματισμό ερυθρών αιμοσφαιρίων. Έχει μικρή έως αμελητέα δράση στο λεμφικό ιστό και στο γαστρεντερικό σύστημα (Rang, et al., 2007). Η καταστολή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και της παραγωγής τους φαίνεται ότι γίνεται με μηχανισμό διαφορετικό από την απόπτωση (Meng, et al., 2003) και ότι η εξάντληση τους δεν εξηγείται ούτε από την απόσταση, αλλά ούτε και από τον προσανατολισμό των 2 αλκυλιωτικών ομάδων της (Westerhof, et al., 2000).

A.3.3. Ανάπτυξη αντοχής και μηχανισμοί φαρμακευτικής αντίστασης στη βουσουλφάνη

Οι μηχανισμοί που ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη αντίστασης στους αλκυλιωτικούς παράγοντες είναι κυρίως τρεις: α) η μειωμένη μεταφορά του αλκυλιωτικού παράγοντα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, λόγω της μειωμένης διαπερατότητάς της, β) η αύξηση της ενδοκυττάριας απενεργοποίησης του φαρμάκου, είτε λόγω αυξημένης παραγωγής γλουταθειόνης, η οποία αδρανοποιεί το φάρμακο μέσω σύζευξης, είτε λόγω αυξημένης δραστηριότητας της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST), η οποία καταλύει τη σύζευξη και γ) η αυξημένη ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (Edward & Sartorelli, 2009).

Για τη βουσουλφάνη, έχει διαπιστωθεί ότι αλλαγές στη μεταφορά της ή στο μεταβολισμό της μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής στο φάρμακο σε σειρά κυττάρων γλοιώματος υψηλού κινδύνου (Hare, et al., 1997). Επίσης, μελέτη σε κύτταρα του

σαρκώματος Yoshida έδειξε ότι οι διαμοριακές διασταυρούμενες συνδέσεις που δημιουργήθηκαν μετά την αλληλεπίδραση του DNA με τη βουσουλφάνη, απομακρύνθηκαν από τα ανθεκτικά, στο φάρμακο, κύτταρα μετά από 6 ώρες, ενώ στα ευαίσθητα στη βουσουλφάνη κύτταρα παρέμειναν αναλλοίωτες ακόμα και 24 ώρες μετά (Bedford & Fox, 1982).

Ένας άλλος μηχανισμός που ευθύνεται για την ανάπτυξη αντίστασης σε πολλά κυτταροτοξικά φάρμακα, μεταξύ των οποίων και αλκυλιωτικούς παράγοντες, είναι η υπερέκφραση της ομάδας γονιδίων *bcl - 2* (Rang, et al., 2007), που έχει βρεθεί ότι προστατεύει μια ποικιλία κυττάρων έναντι της απόπτωσης (Chao & Korsmeyer, 1998) (Cory & Adams, 2002). Σε μια μελέτη σε σειρές αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από ποντίκια, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση των γονιδίων αυτών αρκεί για να προστατέψει τα αιμοποιητικά κύτταρα έναντι της επαγόμενης από τη βουσουλφάνη απόπτωσης *in vivo*, χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία επιπρόσθετων γενετικών μεταβολών (Domen & Weissman, 2003). Άλλη μελέτη, σε σειρές λευχαιμικών κυττάρων ανθεκτικών στη βουσουλφάνη, κατέληξε ότι τα ανθεκτικά κύτταρα μπορούν να αποφεύγουν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 και τον κυτταρικό θάνατο, εξαιτίας της διαφοροποιημένης έκφρασης αρκετών πρωτεϊνών, της προς τα πάνω ρύθμισης της έκφρασης των αντι - αποπτωτικών γονιδίων και της προς τα κάτω ρύθμισης των προ - αποπτωτικών γονιδίων. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια και σε ανθρώπινα κύτταρα ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) (Valdez, et al., 2008).

A.3.4. Εισαγωγή της από του στόματος (per os) Βουσουλφάνης στα σχήματα προετοιμασίας πριν την μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

A.3.4.α. Ο ρόλος της Βουσουλφάνης στα σχήματα προετοιμασίας

Οι αξιοσημείωτες μυελοκατασταλτικές ιδιότητες της βουσουλφάνης οδήγησαν τους ερευνητές στη χρήση της στις αγωγές προετοιμασίας πριν τη μεταμόσχευση μυελού των οστών (Santos, et al., 1983). Είχε προηγηθεί η παρατήρηση ότι σε τρωκτικά ο συνδυασμός της μυελοαφανιστικής δράσης της βουσουλφάνης, με τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες της κυκλοφωσφαμίδης, επέτρεπε τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε αυτά. Αντίθετα, η χορήγηση του κάθε φαρμάκου ξεχωριστά δεν είχε καλά αποτελέσματα. Η βουσουλφάνη άλλωστε, όπως διαπιστώθηκε σε αρουραίους, δεν έχει έντονη δράση στο λεμφικό ιστό (Tutschka & Santos, 1975) (Tutschka & Santos, 1975).

A.3.4.β. Κλινικά Δεδομένα για την Αποτελεσματικότητα και Τοξικότητα του σχήματος per os Βουσουλφάνης/Κυκλοφωσφαμίδης και Σύγκριση με το σχήμα TBI/Κυκλοφωσφαμίδα

Βασιζόμενοι στα παραπάνω πειράματα, οι Santos et al. διεξήγαγαν κλινική μελέτη φάσης I/II με το συνδυασμό βουσουλφάνης/κυκλοφωσφαμίδης (BU/CY 4), ως σχήμα προετοιμασίας πριν τη μεταμόσχευση μυελού των οστών, σε 51 ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, στους οποίους χορηγήθηκαν 1 mg/kg από του στόματος βουσουλφάνης κάθε 6 ώρες, για 16 συνολικά δόσεις, ακολουθούμενη από ενδοφλέβια χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης σε δόση 50 mg/kg/ημέρα, για 4 ημέρες. Η χορήγηση της βουσουλφάνης ανά 6 ώρες επιλέχθηκε αφενός μεν, λόγω της εμετογόνου και ερεθιστικής της δράσης στο γαστρικό βλεννογόνο και αφετέρου, επειδή οι ασθενείς έπρεπε να λάβουν μεγάλο αριθμό δισκίων, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συστηματική έκθεση στο φάρμακο. Τα ποσοστά ύφεσης της νόσου μετά τη μεταμόσχευση ήταν 44 %, 29 % και 0 % για ασθενείς με νόσο σε 1^η ύφεση, ασθενείς με 2^η ή 3^η ύφεση ή πρόωρη υποτροπή και με νόσο τελικού σταδίου, αντίστοιχα. Κύριες αιτίες θανάτου ήταν η οξεία αντίδραση του ξενιστή στο μόσχευμα (a – GVHD) και η ιογενής πνευμονία από CMV (κυτταρομεγαλοϊός). 44% των ασθενών εμφάνισαν οξεία αντίδραση του ξενιστή στο μόσχευμα (a – GVHD) και 22 % χρόνια μορφή της νόσου (c – GVHD), 5 ασθενείς παρουσίασαν αιμορραγική κυστίτιδα και 3 φλεβοαποφρακτική νόσο του ήπατος (HVOD). Τα αποτελέσματα αυτά απέδειξαν ότι η βουσουλφάνη μπορεί να αντικαταστήσει αποτελεσματικά την TBI στις αγωγές προετοιμασίας σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία, ωστόσο η σχετιζόμενη με την θεραπεία θνητότητα (treatment related mortality, TRM) παρέμενε υψηλή (73 %) (Santos, et al., 1983). Προκειμένου να βελτιωθεί, προτάθηκε μείωση της συνολικής δόσης της κυκλοφωσφαμίδης από 200 mg/kg στα 120 mg/kg (60 mg/kg/ημέρα), χωρίς αλλαγή στη δόση της βουσουλφάνης (BU/CY 2) (Tutschka, et al., 1987) και στη μελέτη που διεξήχθη, απεδείχθη ότι η μείωση στη δόση της κυκλοφωσφαμίδης όχι μόνο δεν επηρέασε την αντιλευχαιμική δράση της αγωγής, αλλά ταυτόχρονα ελάττωσε και την τοξικότητά της (Tutschka, et al., 1987).

Τέσσερις τυχαίοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες, που διεξήχθησαν τη δεκαετία του 1990, επιχείρησαν να συγκρίνουν την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα της per os βουσουλφάνης και της ολόσωμης ακτινοβολήσης (total body irradiation, TBI), όταν

συνδυάζονται με την ενδοφλέβια χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης ως προετοιμασία πριν τη μεταμόσχευση μυελού των οστών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν αντιφατικά, καθώς σε δυο από αυτές τις μελέτες, διαπιστώθηκε ότι το διάστημα ελεύθερο νόσου και η ολική επιβίωση ήταν μεγαλύτερα με το συνδυασμό TBI/κυκλοφωσφαμίδης και ταυτόχρονα ο κίνδυνος υποτροπής και η τοξικότητα ήταν μικρότερες (Blaise, et al., 1992) (Ringden, et al., 1994), ενώ στις άλλες δυο παρατηρήθηκε ότι η τελική έκβαση είναι ισοδύναμη και για τα δύο σχήματα σε ασθενείς με ΧΜΛ σε χρόνια φάση της νόσου, και μάλιστα το σχήμα βουσουλφάνη/κυκλοφωσφαμίδη σχετίζεται με μικρότερη πρώιμη τοξικότητα (Clift, et al., 1994) (Devergie, et al., 1995). Η μετα – ανάλυση των παραπάνω τυχαιοποιημένων προοπτικών μελετών κατέληξε σε δύο συμπεράσματα: πρώτον, ότι η συνολική επιβίωση και το διάστημα ελεύθερο νόσου είναι καλύτερα, όταν η αγωγή που χρησιμοποιείται περιέχει TBI, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, και δεύτερον ότι η επίπτωση της φλεβοαποφρακτικής νόσου του ήπατος (HVOD) είναι μικρότερη (Hartman, et al., 1998). Κατά τη μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών, για διάστημα τουλάχιστον επτά ετών, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην δεκαετή συνολική επιβίωση μεταξύ των ασθενών με ΧΜΛ που έλαβαν το ένα ή το άλλο σχήμα (65 % BU/CY 2 και 63 % TBI/CY), ενώ για τους ασθενείς με ΟΜΛ υπήρχε μια μικρή αριθμητική διαφορά, η οποία ωστόσο, δεν ήταν στατιστικά σημαντική (51 % BU/CY 2 και 63 % TBI/CY). Επίσης, δεν αναφέρεται καμία διαφορά ανάμεσα στις δυο ομάδες όσον αφορά την επίπτωση της χρόνιας αντίδρασης του ξενιστή στο μόσχευμα (c – GVHD). Η εμφάνιση καταρράκτη ήταν πιο συχνή σε ασθενείς με ΧΜΛ που έλαβαν TBI/CY και επιπλέον συσχετιζόταν με την c – GVHD, ενώ οι ασθενείς που έλαβαν BU/CY 2 είχαν υψηλότερη επίπτωση μη αντιστρεπτής αλωπεκίας (Socie, et al., 2001). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν και άλλες μελέτες, οι οποίες συσχετίζουν τη βουσουλφάνη με υψηλότερη επίπτωση HVOD, αιμορραγικής κυστίτιδας, αλωπεκίας, χρόνιας αντίδρασης του ξενιστή στο μόσχευμα και αποφρακτικής βρογχιολίτιδας (Ringden, et al., 1999) (Ferry & Socie, 2003). Συνοψίζοντας, προκύπτει ότι οι αγωγές είναι ισοδύναμες για την ΧΜΛ, ενώ για την ΟΜΛ υπερτερεί ο συνδυασμός TBI/κυκλοφωσφαμίδη, ιδίως για την προχωρημένη νόσο. Τέλος, για την ΟΛΛ σε παιδιά έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός TBI/κυκλοφωσφαμίδη έχει πολύ καλύτερα αποτελέσματα συνολικής επιβίωσης σε σχέση με την βουσουλφάνη/κυκλοφωσφαμίδη (Bunin, et al., 2003) (Davies, et al., 2000).

A.3.5.Εισαγωγή της Ενδοφλέβιας (IV) Βουσουλφάνης στα σχήματα προετοιμασίας πριν την μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

A.3.5.α. Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά της από του στόματος Βουσουλφάνης και παράγοντες που συμβάλλουν στη μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται

Η φαρμακοκινητική της βουσουλφάνης άρχισε να μελετάται από τη δεκαετία του 1950, ωστόσο μέχρι και το 1980 περίπου δεν υπήρχε διαθέσιμη μέθοδος για τη μέτρηση των συγκεντρώσεών της στο πλάσμα. Αυτό οφείλεται κυρίως στη δυσκολία ανίχνευσής της λόγω των ιδιοτήτων της: είναι λιπόφιλη, με χαμηλή απορρόφηση στο υπερίωδες και χωρίς ιδιότητες φθορισμού. Έτσι, στις πρώτες μελέτες που έγιναν, οι φαρμακολογικές ιδιότητες και οι φαρμακοκινητικές παράμετροι της βουσουλφάνης, ερευνήθηκαν με τη χρήση ραδιοεπισημασμένων παραγώγων της με ^{35}S , ^{14}C και ^3H . Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι δεν ήταν σε θέση να διακρίνουν το μητρικό φάρμακο από τους μεταβολίτες του. Κατά τη δεκαετία του 1980, άρχισαν να αναπτύσσονται αναλυτικές μέθοδοι ικανές να διαχωρίσουν το μητρικό φάρμακο από τους μεταβολίτες και με αυτό τον τρόπο κατέστη δυνατή η μελέτη της φαρμακοκινητικής της βουσουλφάνης (Hassan, 1999). Η πρώτη φαρμακοκινητική μελέτη διεξήχθη το 1983 μετά από χορήγηση χαμηλών δόσεων του φαρμάκου από το στόμα σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Ehrsson, et al., 1983) και ακολούθησαν αρκετές ακόμη μελέτες, στις οποίες διαπιστώθηκε ότι το φάρμακο μεταβολίζεται έντονα στο ήπαρ (Hassan & Ehrsson, 1987) (Hassan & Ehrsson, 1987), διέρχεται τον αιματεγκεφαλικό φραγμό στον άνθρωπο και αθροίζεται στο ήπαρ και τους πνεύμονες στους πιθήκους (Hassan, et al., 1992). Η διάθεση του φαρμάκου έχει μελετηθεί ευρέως σε ενήλικες (Grochow, et al., 1989) (Hassan, et al., 1989) (Hassan, et al., 1991) και παιδιά (Hassan, et al., 1991) (Grochow, et al., 1990) (Grochow, 1993) (Vassal, et al., 1989) (Vassal, et al., 1993) (Shaw, et al., 1994) (Regazzi, et al., 1993) με κακοήθεις ή μη κακοήθεις παθήσεις (Vassal, et al., 1993) (Shaw, et al., 1994) (Regazzi, et al., 1993) (Hassan, et al., 1996). Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν μεγάλη μεταβλητότητα στις διάφορες φαρμακοκινητικές παραμέτρους του φαρμάκου, τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ του ίδιου του ασθενούς στις διαφορετικές ημέρες χορήγησής του (inter- and intra- individual variability). Αρκετοί παράγοντες συνεισφέρουν στην εμφάνιση της παρατηρούμενης μεταβλητότητας, όπως η απορρόφηση, η ηλικία, η υποκείμενη νόσος, ο κερκάρδιος ρυθμός, οι αλληλεπιδράσεις με τα συγχρηγούμενα φάρμακα κλπ (Hassan, 1999). Η βουσουλφάνη απορροφάται χορηγούμενη από το στόμα, ωστόσο σε ορισμένους ασθενείς έχει διαπιστωθεί χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Στα μικρά παιδιά παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στην βιοδιαθεσιμότητα της per os βουσουλφάνης, έως και 6 φορές με εύρος 22 – 120 %, ενώ για τους ενήλικες και τα μεγαλύτερα παιδιά το αντίστοιχο εύρος κυμαίνεται από 47 – 103 % (Hassan, et al., 1994). Στα παιδιά, ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί η μέγιστη συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,5 – 5 ώρες, ενώ ο χρόνος που μεσολαβεί από τη χορήγηση έως την απορρόφηση (*lag time*) του φαρμάκου, είναι μειωμένος όταν χορηγούνται θρυμματισμένα δισκία (Shaw, et al., 1994) (Shaw, et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε ενήλικες ασθενείς (Dix, et al., 1996) (Hassan, et al., 1989). Η ταυτόχρονη λήψη τροφής, επίσης, μειώνει τη συγκέντρωση του φαρμάκου και αυξάνει τον χρόνο απορρόφησης του (Schuler, et al., 1994). Η κάθαρση και ο όγκος κατανομής στα μικρά παιδιά είναι υψηλότερα απ' ότι στους ενήλικες και τα μεγαλύτερα παιδιά (Hassan, et al., 1991) (Regazzi, et al., 1993) (Tran, et al., 2000), αλλά η

κάθαρση παρατηρήθηκε ότι μειώνεται κατά την πρώτη δεκαετία της ζωής (Slattery, et al., 1995). Η μεγάλη αυτή διαφορά εξηγείται πιθανότατα από την αυξημένη ικανότητα μεταβολισμού μέσω σύζευξης με τη γλουταθειόνη που παρουσιάζουν τα παιδιά (Gibbs, et al., 1997). Αλλαγές στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους έχουν διαπιστωθεί και ανάλογα με την υποκείμενη νόσο. Παιδιά ηλικίας < 3 ετών με νόσους λυσοσωμικής αποθήκευσης, έχουν παρατεταμένο χρόνο ημίσειας ζωής, μεγαλύτερο όγκο κατανομής και γρηγορότερη κάθαρση (Vassal, et al., 1993). Υψηλότερη κάθαρση έως και 42 % διαπιστώθηκε και σε παιδιά με κληρονομούμενες διαταραχές σε σχέση με εκείνα που έπασχαν από λευχαιμία (Hassan, et al., 1996), ενώ ενήλικες με λέμφωμα Non Hodgkin παρουσιάζουν μειωμένη κάθαρση (32 %) σε σχέση με εκείνους που πάσχουν από ΧΜΛ (Gibbs, et al., 1999). Τέλος, έχει βρεθεί ότι παιδιά με αιμοσφαιρινοπάθειες εμφανίζουν υψηλότερη κάθαρση σε σχέση με εκείνα που πάσχουν από λευχαιμίες, μεταβολικά νοσήματα και ανοσοανεπάρκειες (Bertholle Bonnet, et al., 2007). Ορισμένες μελέτες, ακόμη, αναφέρουν διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις της βουσουλφάνης, οφειλόμενες στον κερκάρδιο ρυθμό. Σε μικρά παιδιά έχει παρατηρηθεί έως και 3 φορές υψηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου μετά τη χορήγηση της βραδινής δόσης σε σχέση με τις τιμές που μετρήθηκαν την ημέρα και τις τέσσερις ημέρες θεραπείας (Hassan, et al., 1991). Επίσης, σε παιδιά με συμπαγείς όγκους διαπιστώθηκε ότι η διάθεση του φαρμάκου ακολουθεί τον κερκάρδιο ρυθμό (Vassal, et al., 1993), ενώ διακύμανση στη συγκέντρωση της βουσουλφάνης βρέθηκε και στους ενήλικες (Grochow, 1993).

A.3.5.β. Προβλήματα σχετικά με τη χορήγηση της από του στόματος Βουσουλφάνης – Ανάγκη ανάπτυξης ενδοφλέβιου σκευάσματος

Στις μυελοαφανιστικές αγωγές προετοιμασίας, στόχος των οποίων είναι η επιτυχής μυελοκαταστροφή με την μικρότερη δυνατή τοξικότητα, η ακρίβεια στη δόση είναι μέγιστης σημασίας, ειδικά όταν πρόκειται για φάρμακα με στενό θεραπευτικό δείκτη, όπως η βουσουλφάνη. Για αυτό το λόγο προτιμάται, συνήθως, η χρήση παρεντερικών μορφών των φαρμάκων (Fisher, et al., 2006) (Ciurea & Andersson, 2009). Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα η βουσουλφάνη ήταν διαθέσιμη μόνο υπό μορφή δισκίων των 2 mg, γεγονός που προκαλούσε πολλά προβλήματα στη χορήγησή της, καθώς η συνιστώμενη δόση ήταν 1 mg/kg κάθε 6 ώρες και υπολογιζόταν με βάση το βάρος του ασθενούς, επομένως οι ασθενείς έπρεπε να λαμβάνουν μεγάλη ποσότητα δισκίων (ενήλικες και μεγαλύτερα παιδιά). Για να διευκολυνθεί η χορήγηση, πολλές φορές τα δισκία θρυμματιζόνταν και χορηγούνταν είτε μέσω ρινογαστρικού καθετήρα ως εναιώρημα νερού ή γλυκόζης, είτε ως κάψουλες που περιείχαν τη δραστική ουσία και λακτόζη, είτε μαζί με μαλακές τροφές (Fisher, et al., 2006) (Nath & Shaw, 2007). Η μέθοδος χορήγησης, όπως αναφέρεται και παραπάνω, παρατηρήθηκε ότι επηρεάζει το χρόνο που μεσολαμβάνει από τη χορήγηση έως την απορρόφηση (*lag time*) του φαρμάκου και συμβάλλει στη μεταβλητότητα που παρατηρείται. Οι δυσκολίες κατά τη χορήγηση, σε συνδυασμό με τη διακύμανση που παρατηρείται στη φαρμακοκινητική της *per os* βουσουλφάνης, επηρεάζουν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και επομένως την τελική έκβαση της μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε τοξικές ή υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις. Υψηλές συγκεντρώσεις έχουν συσχετιστεί με

αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ηπατοτοξικότητας (HVOD), καθώς και με αυξημένη διαπερατότητα του αιματεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ) και πρόκληση νευροτοξικότητας, ενώ οι χαμηλές συγκεντρώσεις ενοχοποιούνται για απόρριψη του μοσχεύματος και υποτροπή της νόσου. Για να υπερνικηθούν η απρόβλεπτη απορρόφηση και η μεγάλη μεταβλητότητα, προτάθηκε η εξατομίκευση των δόσεων της βουσουλφάνης με βάση τις μετρούμενες φαρμακοκινητικές παραμέτρους του φαρμάκου μετά την πρώτη δόση. Ωστόσο, και αυτή η διαδικασία είχε αρκετά προβλήματα, καθώς το φάρμακο είναι ιδιαίτερα ερεθιστικό για το γαστρικό βλεννογόνο, με αποτέλεσμα να προκαλεί ναυτία και έμετο μετά την πρώτη δόση, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την απορρόφησή του από το έντερο, ενώ σε ορισμένους ασθενείς παρατηρείται καθυστερημένη απορρόφηση, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του φαρμάκου να συνεχίζει να αυξάνεται και να φτάνει στις μέγιστες τιμές μετά τις 6 ώρες (Fisher, et al., 2006) (Andersson, et al., 2002). Επιπλέον, υφίσταται φαινόμενο πρώτης διόδου από το ήπαρ, γεγονός που οδηγεί σε υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου στην πυλαία φλέβα που συνεισφέρουν στην εμφάνιση ηπατικής τοξικότητας (Peters, et al., 1987). Για να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα και να βελτιωθεί η ακρίβεια στη δόση και η ασφάλεια του φαρμάκου, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενδοφλέβιου σκευάσματος από διάφορους ερευνητές. Το εγχείρημα ήταν αρκετά δύσκολο, λόγω της φτωχής διαλυτότητας της βουσουλφάνης σε υδατικά διαλύματα. Ως φορείς χρησιμοποιήθηκαν το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (Hassan, et al., 1994), η διμεθυλακεταμίδη (DMA) και η πολυαιθυλενογλυκόλη 400 (PEG 400) (Bhagwatwar, et al., 1996), τα λιποσώματα (Hassan, et al., 2001) και τα μικροκρυσταλλικά λιπίδια (Olavarria, et al., 2000). Από αυτά τα σκευάσματα, μόνο εκείνο των Bhagwatwar et al., που χρησιμοποιεί ως φορείς τη διμεθυλακεταμίδη (DMA) και την πολυαιθυλενογλυκόλη 400 (PEG 400), είναι διαθέσιμο για χορήγηση, λόγω της σταθερότητας του φαρμάκου στο χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλυτών (Bhagwatwar, et al., 1996). Η παρεντερική βουσουλφάνη βελτιώνει την ασφάλεια της αγωγής προετοιμασίας, καθώς εξασφαλίζει 100 % βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου και μειώνει τη μεγάλη διατομική μεταβλητότητα που παρατηρούταν με τα δισκία. Επιπλέον, αποφεύγει την πρώτη δίοδο από το ήπαρ, μειώνοντας τις υψηλές συγκεντρώσεις στο όργανο και τον κίνδυνο εμφάνισης HVOD. Τέλος, επιτυγχάνει καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών (EMA, 2005).

A.3.5.γ. Κλινικά Δεδομένα για την Ασφάλεια και Αποτελεσματικότητα της Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης

Η τεκμηρίωση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της ενδοφλέβιας (IV) βουσουλφάνης σε συνδυασμό με την κυκλοφωσφαμίδη στο σχήμα προετοιμασίας IV BuCy2 πριν τη αυτόλογη και αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, προκύπτει από δύο προοπτικές, μονού σκέλους, ανοικτές, μη ελεγχόμενες μελέτες φάσης II (OMC – BUS – 3 και OMC – BUS – 4, αντίστοιχα). Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με αιματολογικές διαταραχές, η πλειοψηφία των οποίων είχε προχωρημένη νόσο. Οι ασθένειες που περιελήφθησαν ήταν οξεία λευχαιμία σε πρώτη ύφεση, ή σε πρώτη υποτροπή ή σε επόμενες υποτροπές, μετά την πρώτη ύφεση (υψηλού κινδύνου) ή μετά από αποτυχία της θεραπείας εφόδου, χρόνια μυελογενής λευχαιμία σε χρόνιο ή προχωρημένο στάδιο, πρωτογενής ανθεκτική ή ανθεκτική υποτροπιάζουσα νόσος Hodgkin (HD) ή non

Hodgkin λέμφωμα (NHL) και μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS). Οι ασθενείς είχαν ηλικία από 18 – 63 ετών και 60 % ήταν άνδρες. Όλοι έλαβαν δόσεις 0,8 mg/kg βουσουλφάνης ενδοφλεβίως κάθε 6 ώρες για 16 δόσεις συνολικά, ακολουθούμενες από κυκλοφωσφαμίδη 60 mg/kg μία φορά ημερησίως επί δύο ημέρες. Οι κύριες παράμετροι αποτελεσματικότητας ήταν η μυελοκαταστολή, η πραγματοποίηση της μεταμόσχευσης, η υποτροπή και η επιβίωση. Και στις δύο μελέτες, οι ασθενείς έλαβαν 16/16 δόσεις του σχήματος, ενώ κανένας δε διέκοψε τη θεραπεία λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών που σχετίζονταν με τη βουσουλφάνη. Στην μελέτη για την αυτόλογη μεταμόσχευση όλοι οι ασθενείς (n = 42) εκδήλωσαν έντονη μυελοκαταστολή. Ο μέσος χρόνος εμφάνισης της ουδετεροπενίας (απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων, ANC < 0,5x10⁹/L) ήταν 4 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση, ενώ η αποκατάσταση επιτεύχθηκε σε 10 ημέρες (εύρος 8 – 19 ημέρες) και η μέση ουδετεροπενική περίοδος ήταν 6 ημέρες. Σε όλους τους αξιολογήσιμους ασθενείς έγινε μεταμόσχευση. Δεν υπήρχε πρωτογενής ή δευτερογενής απόρριψη μοσχεύματος και δεν υπήρξε θάνατος (Busilvex, 2008). Στη μελέτη για την αλλογενή μεταμόσχευση (n = 61), όλοι οι αξιολογήσιμοι ασθενείς (n = 60) εκδήλωσαν έντονη μυελοκαταστολή. Ο χρόνος που ο ANC ήταν μεγαλύτερος από 0,5x10⁹/L ήταν 13 ημέρες (εύρος 9 – 29 ημέρες). Ένας ασθενής πέθανε την ημέρα 20 από μυκητιασική πνευμονία (*Aspergillus*) πριν επιτευχθεί αποκατάσταση των ουδετερόφιλων και δεν αξιολογήθηκε. Και σε αυτή την μελέτη ο μέσος χρόνος εμφάνισης της ουδετεροπενίας ήταν 4 ημέρες, ενώ η μέση διάρκειά της ήταν μόλις 11 ημέρες. Η αποκατάσταση ήταν γρηγορότερη στους ασθενείς που έλαβαν παράγοντα διέγερσης κοκκιοκυττάρων (G – CSF). Σε όλους τους αξιολογήσιμους ασθενείς έγινε μεταμόσχευση και δεν αναφέρθηκε πρωτογενής ή δευτερογενής απόρριψη μοσχεύματος. Η διετής συνολική επιβίωση ήταν 67 %, ενώ το διάστημα ελεύθερο νόσου 42 %. Η συνολική θνησιμότητα καθώς και η χωρίς υποτροπή θνησιμότητα για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 100 ημερών μετά τη μεταμόσχευση ήταν (8/61) 13,1 % και (6/61) 9,8 %, αντίστοιχα (Andersson, et al., 2002). Στον πίνακα A 2 συνοψίζονται τα σημαντικότερα αποτελέσματα των δυο μελετών φάσης II για την αυτόλογη και αλλογενή μεταμόσχευση. Στον πίνακα A 3 παρατίθενται οι αιτίες θανάτου στη μελέτη της αλλογενούς μεταμόσχευσης.

Πίνακας Α 2. Σύνοψη των σημαντικότερων αποτελεσμάτων των μελετών φάσης II. Στις παρενθέσεις αναφέρεται το εύρος (Busilvex, 2008) (EMA, 2005).

	OMC – BUS – 3 (n=42)	OMC – BUS – 4 (n=61)
Μυελοκαταστολή % (myeloablation)*	100	100
Μέσος χρόνος για επίτευξη ουδετεροπενίας (ημέρες)	4 (-7, +6)	4 (-7, +5)
Μέση διάρκεια ουδετεροπενίας (ημέρες)	6 (2, 13)	9 (1, 28)
Μεταμόσχευση% (engraftment)**	100	98***
Μέσος χρόνος αποκατάστασης (ημέρες)	10 (8, 19)	13 (9, 29)

* Απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων < $0,5 \times 10^9/L$

** Απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων > $0,5 \times 10^9/L$

***Ένας ασθενής πέθανε την ημέρα 20, πριν την αποκατάσταση των ουδετερόφιλων , οπότε δεν αξιολογήθηκε.

Πίνακας Α 3. Κύριες αιτίες θανάτου κατά την περίοδο της μελέτης αλλογενούς μεταμόσχευσης (Andersson, et al., 2002).

	Περίοδος μετά την μεταμόσχευση	
	Ημέρες: -7 έως +28 , n	Ημέρες: +29 έως +100 , n
Λοίμωξη (και πνευμονία)	1	
Πνευμονία με δευτερογενή κυψελιδική αιμορραγία	1	1
HVOD		2
Διάμεση πνευμονίτιδα/ARDS		1
GVHD		
Πρόσδος νόσου		2
Σύνολο	2	6

*Επεξήγηση Πίνακα: HVOD: φλεβοαποφρακτική νόσος του ήπατος, ARDS: Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας, GvHD: Σύνδρομο μοσχεύματος έναντι ξενιστή.

A.3.5.δ. Σύγκριση της Ενδοφλέβιας με την από του Στόματος Βουσουλφάνη στο Σχήμα προετοιμασίας με την Κυκλοφωσφαμίδη (BuCy2)

Συγκριτικές, αναδρομικές, μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης είναι ασφαλέστερη σε σχέση με το από του στόματος σκεύασμα, όταν χορηγείται σε συνδυασμό με την κυκλοφωσφαμίδη (Bu/Cy 2). Σε όλες το σχήμα που περιελάμβανε την ενδοφλέβια βουσουλφάνη συσχετίστηκε με μικρότερο κίνδυνο ΗVOD και μικρότερη χωρίς υποτροπή θνησιμότητα (non relapse mortality, NRM). Οι Kashyap et al. (Kashyap, et al., 2002) συνέκριναν την επίπτωση της ΗVOD και της χωρίς υποτροπή θνησιμότητας για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 100 ημερών σε δυο ομάδες ασθενών: στην πρώτη συμμετείχαν 30 ασθενείς που έλαβαν per os βουσουλφάνη, ενώ τη δεύτερη ομάδα αποτελούσαν οι 61 ασθενείς της κλινικής μελέτης φάσης II για την αλλογενή μεταμόσχευση. Οι ερευνητές παρατήρησαν σημαντικά χαμηλότερη επίπτωση της ΗVOD στην ομάδα των ασθενών με αιματολογική κακοήθεια που έλαβαν την ενδοφλέβια βουσουλφάνη σε σχέση με την ομάδα που λάμβανε per os το φάρμακο. Οι επιπτώσεις ήταν 5/61 (8 %) και 10/30 (33 %), αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη, η θνητότητα λόγω ΗVOD ήταν 2/61 (3,3 %) για το ενδοφλέβιο και 6/30 (20 %) για το per os σκεύασμα και η συνολική επιβίωση για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 100 ημερών υψηλότερη για ενδοφλέβιο σκεύασμα. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η χορήγηση του per os σκεύασματος είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΗVOD (Kashyap, et al., 2002). Μειώσεις στην επίπτωση της ΗVOD και της χωρίς υποτροπή θνησιμότητας για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 100 ημερών μετά τη μεταμόσχευση με την ενδοφλέβια βουσουλφάνη παρατήρησαν, επίσης, οι Thall et al., σε 47 ασθενείς με ΧΜΛ που συγκρίθηκαν με δεδομένα από το Centre for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) (Thall, et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν και σε άλλες μελέτες σε ασθενείς με μυελογενή λευχαιμία, μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (Kim, et al., 2005) (Lee, et al., 2005) και non Hodgkin λέμφωμα (Aggrawal, et al., 2006). Μάλιστα, στην τελευταία μελέτη, οι Aggrawal et al. αναφέρουν ότι οι 49 ασθενείς που υπεβλήθησαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου non Hodgkin λέμφωμα μετά από χορήγηση ενδοφλέβιας βουσουλφάνης, όχι μόνο είχαν μειωμένη χωρίς υποτροπή θνησιμότητα (από 28 % στο 3 %), αλλά είχαν και σημαντική βελτίωση της συνολικής επιβίωσης και της επιβίωσης χωρίς πρόοδο νόσου (progression free survival, PFS) (Aggrawal, et al., 2006). Το τελευταίο υποστηρίζεται και από τους Dean et al., που διαπίστωσαν καλύτερη έκβαση σε ασθενείς με non Hodgkin λέμφωμα μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση (Dean, et al., 2006).

A.3.6. Φαρμακοκινητικά Δεδομένα Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης

α) Απορρόφηση

Η ενδοφλέβια βουσουλφάνη, όπως είναι αναμενόμενο, επιτυγχάνει άμεση και πλήρη διαθεσιμότητα της δόσης (100 %) (Busilvex, 2008) (Andersson, et al., 2002). Η δίωρη έγχυση της κάθε δόσης επιλέχθηκε έτσι ώστε η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου να επιτυγχάνεται σε παρόμοιο χρονικό διάστημα με την per os βουσουλφάνη, για την οποία έχει βρεθεί $T_{max} \approx 1 - 2$ ώρες (Hassan, et al., 1989) (Hassan, et al., 1991). Το παραπάνω επιβεβαιώθηκε και από την κλινική μελέτη φάσης I, όπου βρέθηκε $T_{max} = 2$ ώρες για την ενδοφλέβια μορφή και $T_{max} = 1,8$ ώρες για την από του στόματος (Andersson, et al., 2000). Κατά τη σύγκριση των συγκεντρώσεων στο πλάσμα, σε ενήλικες ασθενείς που έλαβαν από του στόματος και ενδοφλέβια βουσουλφάνη σε δόσεις 1 mg/kg και 0,8 mg/kg αντίστοιχα, παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα. Μια πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση, που διεξήχθη σε 102 ασθενείς, έδειξε χαμηλή διακύμανση μεταξύ των ασθενών (CV = 21 %) και στον ίδιο ασθενή (CV = 12 %) κατά την έκθεση στη βουσουλφάνη (Busilvex, 2008). Χρησιμοποιώντας ως σκεύασμα αναφοράς την ενδοφλέβια βουσουλφάνη, η βιοδιαθεσιμότητα της από του στόματος βουσουλφάνης υπολογίστηκε στην κλινική μελέτη φάσης I ότι αντιστοιχεί στο 69 % (εύρος < 10 % – 100 %) (Andersson, et al., 2000), αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με εκείνο που προέκυψε από τη μελέτη των Schuler et al, οι οποίοι αναφέρουν 70 % βιοδιαθεσιμότητα της από του στόματος βουσουλφάνης, χρησιμοποιώντας ως ενδοφλέβιο σκεύασμα αναφοράς βουσουλφάνη σε διαλύτη DMSO (Schuler, et al., 1998). Σε παρόμοιο αποτέλεσμα, για την από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα, κατέληξαν και οι Hassan et al (68 % για τα παιδιά και 80 % για τους ενήλικες) (Hassan, et al., 1994).

Η βουσουλφάνη ακολουθεί γραμμική φαρμακοκινητική. Η γραμμικότητα της φαρμακοκινητικής της από του στόματος βουσουλφάνης αποδείχθηκε στη μελέτη των Hassan et al, όπου παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της AUC στο πλάσμα ανάλογα με τη δόση (οι δόσεις που μελετήθηκαν ήταν 2,4,6 mg) (Ehrsson, et al., 1983). Για την ενδοφλέβια βουσουλφάνη μετά από χορήγηση μια φορά την ημέρα, παρατηρήθηκε ότι ακολουθεί γραμμική φαρμακοκινητική για δόσεις από 0,8 – 3,2 mg/kg (Russell, et al., 2002) (Madden, et al., 2007) (Almog, et al., 2011).

β) Κατανομή

Φαρμακοκινητικές μελέτες, σε ζώα και ανθρώπους, υποστηρίζουν την ταχεία κατανομή της βουσουλφάνης στα διάφορα όργανα και ιστούς του σώματος. Έχει αποδειχθεί ταχεία απομάκρυνση του φαρμάκου από την κυκλοφορία του αίματος, μετά από ένεση ραδιοεπισημασμένης ^{35}S – βουσουλφάνης και ^{14}C – βουσουλφάνης, σε αρουραίους, ποντικούς, κουνέλια και τον άνθρωπο, με μόνο το 10 % της χορηγούμενης δόσης να ανιχνεύεται στο αίμα 5 – 10 λεπτά μετά την ενδοφλέβια χορήγηση και ένα μικρό ποσοστό να παραμένει ανιχνεύσιμο για 24 – 48 ώρες (Bishop & Wassom, 1986). Ο όγκος κατανομής για την ενδοφλέβια βουσουλφάνη υπολογίστηκε κατά τις κλινικές μελέτες ότι κυμαίνεται μεταξύ 0,62 και 0,85 L/kg (Busilvex, 2008) και θεωρείται ισοδύναμος με εκείνον που είχε βρεθεί για την per os βουσουλφάνη, και ο οποίος αντιστοιχούσε στο 66 % του σωματικού

βάρους (Grochow, et al., 1989). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο όγκος κατανομής της βουσουλφάνης, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, υπολογίστηκε για πρώτη φορά την δεκαετία του 1990 από τους Hassan et al (Hassan, et al., 1994) και βρέθηκε ότι ήταν απευθείας ανάλογος με το συνολικό ύδωρ του σώματος (0,74 L/kg για τα παιδιά και 0,56 L/kg για τους ενήλικες) και ότι εξαρτάται από την ηλικία.

Η κατανομή του φαρμάκου στα διάφορα όργανα ερευνήθηκε αρχικά σε αρουραίους μετά από ενδοφλέβια χορήγηση ραδιοεπισημασμένης ^{14}C – βουσουλφάνης, όπου παρατηρήθηκε έντονη κατανομή του φαρμάκου στο ήπαρ, τους πνεύμονες, τον εγκέφαλο και τους νεφρούς (Trams, et al., 1959). Ταχεία κατανομή στον εγκέφαλο απεδείχθη και μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ραδιοεπισημασμένης ^{14}C – βουσουλφάνης σε αρουραίους. Ο λόγος των συγκεντρώσεων εγκέφαλος/πλάσμα υπολογίστηκε 0,74 στις 24 ώρες και οι χρόνοι ημίσειας ζωής στο πλάσμα και τον εγκέφαλο ήταν παρόμοιοι (Hassan, et al., 1988). Άθροιση μεγάλων ποσοτήτων βουσουλφάνης στο ήπαρ και σημαντικών ποσοτήτων της στους πνεύμονες και τον εγκέφαλο, διαπιστώθηκε και μετά από χορήγηση σε πιθήκους (*cynomolgus monkeys*) ενδοφλέβια ραδιοεπισημασμένης ^{11}C – βουσουλφάνης. Και στα τρία όργανα η κατανομή του φαρμάκου συνέβη ταχύτατα, εντός ολίγων λεπτών, και μάλιστα η άθροιση του φαρμάκου στο ήπαρ ήταν 9 φορές μεγαλύτερη από εκείνη στον εγκέφαλο. Τα επίπεδα του φαρμάκου στον εγκέφαλο μειώνονται εξίσου γρήγορα με την πάροδο του χρόνου, ενώ αντίθετα στους πνεύμονες υπάρχει τάση άθροισης (Hassan, et al., 1992).

Όσον αφορά την κατανομή του φαρμάκου στον άνθρωπο, σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε μεταμόσχευση μυελού των οστών, διαπιστώθηκε ότι η βουσουλφάνη επιτυγχάνει γρήγορα συγκεντρώσεις στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) συγκρίσιμες με εκείνες του πλάσματος, σε ενήλικες και παιδιά (Busilvex, 2008). Ο λόγος των συγκεντρώσεων βουσουλφάνης ENY/πλάσμα ισούται με 1,3 (εύρος 0,9 – 1,7) σε ενήλικες ασθενείς με ΟΜΛ που έλαβαν per os βουσουλφάνη (Hassan, et al., 1989), ενώ στα παιδιά ο αντίστοιχος λόγος ήταν 0,95 (0,5 – 1,4) (Vassal, et al., 1989). Εκτός της ταχείας εισόδου του φαρμάκου στο ENY, παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις του στον εγκέφαλο και το πλάσμα ήταν παρόμοιες και τις τέσσερις ημέρες θεραπείας (Hassan, et al., 1989). Έχει, επίσης, βρεθεί ότι μετά από χορήγηση σε άνθρωπο ραδιοεπισημασμένης ^{11}C – βουσουλφάνης, το 20 % της ενιόμενης δόσης εισήλθε στον εγκέφαλο (Hassan, et al., 1992). Επιπλέον, κατανέμεται και στο σίελο ασθενών που έλαβαν το φάρμακο, με λόγο συγκεντρώσεων σίελος/πλάσμα 1,1 (Hassan, et al., 1989) και παρουσιάζει ομοιόμορφη κατανομή ανάμεσα στο πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα (Ehrsson & Hassan, 1984). Η πρωτεϊνική της σύνδεση στο πλάσμα υπολογίστηκε περίπου 9,2 %, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ραδιοεπισημασμένης ^{14}C – βουσουλφάνης σε αρουραίους (Hassan, et al., 1988), ενώ στον άνθρωπο βρέθηκε μη σημαντική αναστρέψιμη σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, περίπου 7 % (Hassan, et al., 1989). Η μη αναστρέψιμη σύνδεση με την αλβουμίνη υπολογίστηκε 32,4 % και η σύνδεση με τα ερυθροκύτταρα 46,9 % (Ehrsson & Hassan, 1984). Η χαμηλή πρωτεϊνική σύνδεση εξηγεί, εν μέρει, και την υψηλή πρόσληψή της στον εγκέφαλο (Hassan, et al., 1989).

γ) Μεταβολισμός

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, προκύπτει ότι ο μεταβολισμός της βουσουλφάνης έχει μελετηθεί ευρέως, μετά από χορήγηση ραδιοεπισημασμένου φαρμάκου σε αρουραίους, ποντίκια και κουνέλια. Ως κύριος μεταβολίτης της βουσουλφάνης προσδιορίστηκε το 3 – hydroxy sulfolane, μετά από χορήγηση ένεσης ραδιοεπισημασμένης ^{35}S – βουσουλφάνης και ^{14}C – βουσουλφάνης στα προαναφερθέντα πειραματόζωα. Τρεις ακόμη μεταβολίτες απομονώθηκαν από ούρα αρουραίου. Ο πιθανός μηχανισμός μεταβολισμού της βουσουλφάνης, που προτάθηκε, ήταν η αντίδραση με την γλουταθειόνη (GSH) ή μια κυστεϊνική ομάδα προς σχηματισμό σουλφονικού ιόντος (Hassan, 1999).

Αργότερα, από αρουραίους απομονώθηκε η γ – γλουταμυλο – β – (S – τετραυδροθειοφeno) – αλανυλο – γλυκίνη (THT⁺) ως κύριος μεταβολίτης της βουσουλφάνης, και αποδείχθηκε ότι η αντίδρασή της με τη γλουταθειόνη είναι ενζυμικής φύσεως και καταλύεται από την S – τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), καθώς όταν η δράση της GST αναστελλόταν, η ποσότητα του μεταβολίτη μειωνόταν δραστικά (Hassan & Ehrsson, 1987). Παρόμοια μελέτη, επιβεβαίωσε ότι η βουσουλφάνη και άλλα 1,4 – διυποκατεστημένα παράγωγα του βουτανίου, όπως το 1,4 – διωδοβουτάνιο, υφίστανται σύζευξη με τη γλουταθειόνη *in vivo*. Διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση του μεταβολίτη THT στη χολή εμφανίστηκε 90 λεπτά μετά τη χορήγηση και ότι το 26 % της χορηγούμενης δόσης ανιχνεύεται στη χολή μετά από 8 ώρες υπό τη μορφή του μεταβολίτη (Marchand, et al., 1988). Τρεις κύριοι μεταβολίτες της βουσουλφάνης, απομονώθηκαν από τα ούρα αρουραίων, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ραδιοεπισημασμένης ^{14}C – βουσουλφάνης, και ήταν οι εξής: 3 – hydroxysulfolane (39 %), tetrahydrothiophene 1 – oxide (20 %) και sulfolane (13 %). Επίσης, ανιχνεύθηκε ένα μικρό ποσοστό αμετάβλητης βουσουλφάνης (6 %), τετραϋδροφουράνιο (2 %) και ένας ακόμη μεταβολίτης της βουσουλφάνης μετά από σύζευξη με τη N – ακετυλοκυστεΐνη (NAC), η N – ακετυλο – β – (S – τετραυδροθειοφeno) – L – αλανίνη, η οποία μετά από υδρόλυση έδινε τετραϋδροθειοφένιο. Η πρόκληση κυτταροτοξικότητας ελέγχθηκε *in vitro* σε κύτταρα χάμστερ και αποδείχθηκε ότι κανένας από τους μεταβολίτες δεν συνεισφέρει στην αποτελεσματικότητα ή την τοξικότητα του φαρμάκου *in vivo* (Hassan & Ehrsson, 1987). Οι τρεις αυτοί μεταβολίτες προσδιορίστηκαν, επίσης, στο πλάσμα και τον εγκέφαλο αρουραίων που έλαβαν ^{14}C – βουσουλφάνη (Hassan, et al., 1988).

Στον άνθρωπο, έχει γίνει προσπάθεια, στο παρελθόν, να μελετηθεί ο μεταβολισμός της βουσουλφάνης, ωστόσο οι πρώτες μελέτες με επισημασμένη ^{14}C – βουσουλφάνη, έδειξαν ότι 25 – 30 % της δόσης απεκκρίνεται στα ούρα, αλλά δεν μπόρεσαν να προσδιορίσουν κανέναν από τους 12 μεταβολίτες που απομονώθηκαν (Hassan, 1999). Η πρώτη μελέτη που κατάφερε να ταυτοποιήσει μεταβολίτες της βουσουλφάνης σε ούρα ανθρώπου, πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ΟΜΛ. Στη μελέτη αυτή απομονώθηκαν οι ίδιοι μεταβολίτες με εκείνους που είχαν βρεθεί στα πειραματόζωα, δηλαδή 3 – hydroxysulfolane, tetrahydrothiophene 1 – oxide και sulfolane. Επίσης, μετά από υδρόλυση των ούρων απομονώθηκε και τετραϋδροθειοφένιο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η σύζευξη με την γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της βουσουλφάνης στον άνθρωπο (Hassan, et al., 1989). Η αντίδραση σύζευξης με τη γλουταθειόνη καταλύεται από την GST, αφού όπως προκύπτει και από μελέτες που έγιναν η παραγωγή του GSH – THT⁺, του μεταβολίτη που προκύπτει από τη σύζευξη της βουσουλφάνης με τη

γλουταθειόνη, μειώνεται έως και 97 % μετά την έκθεση σε αιθακρυνικό οξύ, έναν αναστολέα της GST (Gibbs, et al., 1996). Η πλέον δραστική μορφή της GST είναι το ισοένζυμο GST A1 – 1, που αποτελεί την κύρια μορφή του ενζύμου στο ήπαρ και είναι υπεύθυνη για την σύζευξη της βουσουλφάνης με τη γλουταθειόνη. Άλλα ισοένζυμα είναι τα GSTM1 και GSTP1, τα οποία επίσης συνεισφέρουν στο μεταβολισμό, αλλά σε μικρότερο ποσοστό, καθώς διαθέτουν αντίστοιχα, το 46 % και 18 % της δραστικότητας της GST A1 – 1 (Czerwinski, et al., 1996). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της γ – γλουταμυλο – β – (S – τετραυδροθειοφeno) – αλανυλο – γλυκίνης υπολογίστηκε περίπου 5 ώρες (Gibbs, et al., 1997). Οι αδρανείς μεταβολίτες που σχηματίζονται από τη σύζευξη με τη γλουταθειόνη, στη συνέχεια υφίστανται περαιτέρω μεταβολισμό μέσω οξειδωσης στο ήπαρ, και κανένας από αυτούς δε θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στην αποτελεσματικότητα ή στην τοξικότητα του φαρμάκου (Busilvex, 2008).

δ) Απέκκριση

Μετά τη χορήγηση ραδιοεπισημασμένης ^{14}C – βουσουλφάνης, βρέθηκε ότι περίπου το 30 % της χορηγούμενης δόσης απεκκρίνεται στα ούρα σε 48 ώρες, από το οποίο 1 – 2 % απεκκρίνεται ως αμετάβλητη βουσουλφάνη, ενώ η αποβολή μέσω των κοπράνων είναι αμελητέα (Busilvex, 2008) (Hassan, et al., 1989) (Ehrsson, et al., 1983). Για τα μικρά παιδιά βρέθηκε ότι το ποσοστό του φαρμάκου που απεκκρίνεται αναλλοίωτο είναι περίπου 5 % (Vassal, et al., 1993). Η μη πλήρης ανάκτηση του φαρμάκου στα ούρα πιθανόν οφείλεται στη δημιουργία μεταβολιτών με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, καθώς και στην μη αναστρέψιμη σύνδεση με τις πρωτεΐνες (Busilvex, 2008).

Από τις κλινικές μελέτες βρέθηκε ότι η συνολική κάθαρση της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης στο πλάσμα κυμαίνεται από 2,25 – 2,74 mL/min/kg, για τους ενήλικες (Busilvex, 2008), τιμές που συμφωνούν με αυτές που έχουν αναφερθεί για την per os βουσουλφάνη (Hassan, et al., 1994) (Hassan, et al., 1991) (Hassan, et al., 1989). Στα παιδιά ηλικίας από < 6 μηνών έως 17 ετών, επαληθεύτηκε μία συνεχής ποικιλότητα της κάθαρσης που κυμαίνεται από 2,49 έως 3,92 mL/min/kg (Busilvex, 2008). Οι τιμές αυτές είναι σύμφωνες με αυτές που έχουν αναφερθεί στο παρελθόν ανεξαρτήτως ηλικίας, με εξαίρεση τα πολύ μικρά παιδιά ηλικίας κάτω των 4 ετών, τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές κάθαρσης σε σχέση με τους ενήλικες και τα μεγαλύτερα παιδιά (Hassan, et al., 1991) (Regazzi, et al., 1993) (Grochow, et al., 1990) (Vassal, et al., 1989). Ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής κυμαίνεται από 2,8 έως 3,9 ώρες στους ενήλικες και από 2,26 έως 2,52 ώρες στα παιδιά (Busilvex, 2008). Και αυτές οι τιμές επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν ως μέσο χρόνο ημίσειας ζωής τις 2,5 ώρες, με εύρος από 2,33 – 2,59 ώρες για τους ενήλικες (Grochow, et al., 1989) (Hassan, et al., 1989) (Hassan, et al., 1991) και 1,53 – 2,79 ώρες για τα παιδιά (Hassan, et al., 1991) (Vassal, et al., 1989) (Regazzi, et al., 1993) (Grochow, et al., 1990). Στην κλινική μελέτη παρατηρήθηκε, επίσης, ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στις τιμές κάθαρσης και του χρόνου ημίσειας ζωής μεταξύ των δόσεων 1 και 9 (Andersson, et al., 2002). Στον πίνακα A 4 παρατίθενται τα φαρμακοκινητικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δυο κλινικές δοκιμές φάσης II για την αλλογενή και αυτόλογη μεταμόσχευση, μετά τη χορήγηση ενδοφλέβιας βουσουλφάνης σε ενήλικες με αιματολογική κακοήθεια (EMA, 2005).

Πίνακας Α 4 : Περίληψη των Φαρμακοκινητικών Αποτελεσμάτων των κλινικών δοκιμών φάσης II, OMC_BUS 3 και OMC_BUS 4 για την αυτόλογη και την αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. (Παρατίθενται η μέση τιμή, ο συντελεστής διασποράς, και το εύρος)							
Μελέτη	Δόση	C _{max} (μg/mL)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	AUC _{inf} (δόση 1) AUC _{ss} (δόση 9) (μM*min)	CL (mL/min/kg)	V _z (L/kg)
OMC_BUS 3	Δόση 1	0.89 ± 21% (0.44-1.41)	2.09±23% (0.75-4.25)	3.20±33% (1.93-7.33)	1194±27% (607-2190)	2.37 ± 26% (1.20-4.31)	0.62 ± 18% (0.43-0.98)
	Δόση 9	1.28 ± 23% (0.94-2.26)	2.10±12% (1.58-2.53)	3.47±39% (2.07-9.42)	1225±18% (857-1711)	2.25 ± 20% (1.40-3.13)	0.68 ± 50% (0.34-2.18)
OMC_BUS 4	Δόση 1	0.95 ± 25% (0.42-1.77)	2.16±23% (0.25-4.20)	2.83±27% (1.69-6.81)	1106±29% (413-2511)	2.74 ± 30% (1.28-6.00)	0.64 ± 16% (0.38-1.02)
	Δόση 9	1.22 ± 18% (0.5-1.68)	2.16±23% (0.25-4.20)	2.99±19% (2.11-5.05)	1167±20% (556-1673)	2.52 ± 25% (1.49-4.31)	0.64 ± 31% (0.37-1.70)

ε) Παράγοντες που επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική της Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης – Ειδικοί πληθυσμοί

Κατανάλωση τροφής

Η κατανάλωση τροφής φαίνεται πως δεν επηρεάζει τη φαρμακοκινητική της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης, σε αντίθεση της από του στόματος μορφή του φαρμάκου (Nath & Shaw, 2007).

Ηλικία

A) Παιδιά και Βρέφη

Υπάρχουν αρκετά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η φαρμακοκινητική της βουσουλφάνης διαφοροποιείται αναλόγως της ηλικίας του ασθενούς και στον παιδιατρικό πληθυσμό. Έχει διαπιστωθεί, σε διάφορες μελέτες, ότι η κάθαρση του φαρμάκου είναι μεγαλύτερη στα μικρά παιδιά απ' ότι στα μεγαλύτερα παιδιά και τους εφήβους. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι παιδιά ηλικίας < 4 ή κατ' άλλους < 6 ετών παρουσιάζουν μεγαλύτερη κάθαρση ενδοφλέβιας βουσουλφάνης συγκρινόμενα με τις μεγαλύτερες ηλικίες (Zwaveling, et al., 2005) (Schechter, et al., 2007) (Tran, et al., 2004). Αλλά και ο όγκος κατανομής βρέθηκε μεγαλύτερος σε παιδιά < 1 έτους και < 4 ετών απ' ότι στα μεγαλύτερα παιδιά (Schechter, et al., 2007). Όσον αφορά τα βρέφη, μετά από προσεκτική εξέταση των αποτελεσμάτων των Dalle et al., προκύπτει ότι η μέση κάθαρση είναι σημαντικά υψηλότερη σε βρέφη < 6 μηνών συγκρινόμενα με εκείνα > 6 μηνών (Dalle, et al., 2003). Επιπλέον, συγκριτική μελέτη σε παιδιά διαφόρων ηλικιών έδειξε ότι η κάθαρση μετά από χορήγηση της βουσουλφάνης μια φορά την ημέρα ήταν 4 mL/min στα βρέφη και μειώνεται γραμμικά στα 3,5 mL/min σε ηλικία 10 ετών (~40 kg) και στα 3 mL/min στα 20 έτη (~80 kg) (Tse, et al., 2009).

B) Ηλικιωμένοι

Με βάση τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών, ασθενείς με ηλικία μεγαλύτερη των 50 ετών (n = 23) υπεβλήθησαν επιτυχώς σε θεραπεία με ενδοφλέβια βουσουλφάνη χωρίς προσαρμογή της δόσης (Busilvex, 2008). Σε όλους η χορηγούμενη δόση ήταν καλώς ανεκτή, επιτεύχθηκε μυελοκαταστολή και στη συνέχεια ανάκαμψη της αιμοποίησης, χωρίς να παρατηρηθεί αύξηση στην επίπτωση των επιπλοκών (Andersson, et al., 2002). Αν και στη μελέτη φάσης II για την αλλογενή μεταμόσχευση 5 από τους 61 ασθενείς ήταν άνω των 55 ετών (57 – 64) (Busulfex TM, 2011), παρ' όλα αυτά τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα για την ασφαλή χορήγηση της σε ασθενείς άνω των 60 ετών είναι πολύ λίγα, και για αυτό το λόγο προτείνεται σε αυτές τις ηλικίες να χρησιμοποιείται η ίδια δόση που χρησιμοποιείται και για τους ενήλικες < 50 ετών (Busilvex, 2008).

Βάρος ασθενών – παχυσαρκία

Είναι γνωστό ότι το βάρος είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους της βουσουλφάνης. Η δόση του φαρμάκου υπολογίζεται με βάση το πραγματικό σωματικό βάρος (ΠΣΒ) ή το ιδανικό βάρος σώματος (ΙΣΒ). Ωστόσο, σε παχύσαρκους ενήλικες ασθενείς πρέπει να εξετασθεί η διαμόρφωση της δοσολογίας με βάση το προσαρμοσμένο ιδανικό σωματικό βάρος (πιΣΒ) (Busilvex, 2008), και αυτό διότι έχει διαπιστωθεί ότι ο υπολογισμός της δόσης με βάση το πραγματικό σωματικό βάρος ή το ΙΣΒ οδηγεί σε σημαντικές διαφορές στην κάθαρση του φαρμάκου ανάμεσα σε ελιποβαρείς, κανονικούς, υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε 127 ενήλικες, που έλαβαν ενδοφλεβίως βουσουλφάνη πριν τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, η κάθαρση βρέθηκε μειωμένη κατά 11 % και κατά 28 % σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς, αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε το πραγματικό βάρος σώματος. Στους ίδιους ασθενείς, η κάθαρση ήταν αυξημένη κατά 13 % και 24 % σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς, αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε το ΙΣΒ. Οι διαφορές αυτές αντισταθμίστηκαν με τη χρήση προσαρμοσμένου ιδανικού σωματικού βάρους (πιΣΒ). Επομένως, δεν απαιτείται καμία προσαρμογή της δόσης στους παχύσαρκους ασθενείς όταν χρησιμοποιείται το πιΣΒ για τον υπολογισμό της δόσης (Nguyen, et al., 2006). Όσον αφορά τον παιδιατρικό πληθυσμό, η χορήγηση του φαρμάκου δεν συνιστάται σε παχύσαρκα παιδιά και εφήβους με Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI) > 30 kg/m² λόγω έλλειψης επαρκών δεδομένων (Busilvex, 2008). Πρόσφατα, διεξήχθη μελέτη σε 68 παιδιατρικούς ασθενείς ηλικίας από 2 – 19 ετών, που έλαβαν ενδοφλεβίως βουσουλφάνη μια φορά την ημέρα, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο υψηλός BMI διαφοροποιεί τη φαρμακοκινητική της βουσουλφάνης σε σύγκριση με το φυσιολογικό BMI. Βρέθηκε ότι τα παιδιά με υψηλό BMI είχαν και υψηλό AUC, όταν η δόση υπολογιζόταν με βάση το πραγματικό σωματικό βάρος και ότι απαιτούσαν μικρότερες δόσεις φαρμάκου για να επιτύχουν το ίδιο AUC με εκείνα που είχαν φυσιολογικό ή χαμηλό BMI. Επιπλέον, η χορήγηση δόσης 3,2 mg/kg πιΣΒ είχε ως αποτέλεσμα υπερδοσολόγηση των παχύσαρκων ασθενών και για αυτό προτάθηκε από τους ερευνητές η χορήγηση δοκιμαστικής δόσης ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η σωστή δοσολογία της αγωγής (Browning, et al., 2011).

Φύλο, φυλή

Δεν προτείνεται προσαρμογή της δοσολογίας της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης ανάλογα με την εθνικότητα, καθώς δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να το υποστηρίζουν (Busulfex TM, 2011). Άλλωστε, από τις υπάρχουσες μελέτες σε Κορεάτες ασθενείς δεν διαφαίνεται ουσιαστική διαφορά στα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου, σε σύγκριση με εκείνα των κλινικών δοκιμών (Cho, et al., 2007), όπως επίσης και σε μια αναδρομική μελέτη σε 145 ενήλικες ασθενείς που ταξινομήθηκαν ανάλογα με την καταγωγή σε: 106 Λευκοί μη Ισπανικής καταγωγής, 25 Λευκοί Ισπανικής καταγωγής και 14 μη Λευκοί και μη Ισπανικής καταγωγής, και στην οποία δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις (Perkins, et al., 2011). Όσον αφορά την επίδραση του φύλου, στις περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαιτέρως (Kim, et al., 2011), με εξαίρεση δυο πρόσφατες μελέτες στις οποίες αναφέρονται ορισμένες μικρές διαφορές ανάμεσα στα δυο φύλα. Στη μια περίπτωση η κάθαρση της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης είναι μεγαλύτερη στις γυναίκες (Perkins, et al., 2011), ενώ στη δεύτερη ο όγκος κατανομής ήταν μεγαλύτερος σε Κορεάτες

άνδρες ασθενείς (Choe, et al., 2012). Παρόλα αυτά, επίσης δεν προτείνεται προσαρμογή της δοσολογίας, λόγω ελλειπών στοιχείων (Busulfex TM , 2011).

Υποκείμενη νόσος

Τα δεδομένα που υπάρχουν για την επίδραση της υποκείμενης νόσου στη φαρμακοκινητική της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης είναι λίγα και αντιφατικά και αφορούν κυρίως μελέτες σε παιδιά. Διαπιστώθηκε ότι σε παιδιά με αιμοσφαιρινοπάθειες, η κάθαρση μετά την πρώτη δόση ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τις επόμενες δόσεις, γεγονός που οδηγεί σε χαμηλά AUC και ανάγκη προσαρμογής της δόσης στο 1/3 των ασθενών (Gaziev, et al., 2010). Αντίθετα, σε άλλη μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην κάθαρση και τα υπόλοιπα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης ανάμεσα σε παιδιά με κληρονομούμενες διαταραχές και εκείνα με κακοήγη νόσο (McCune, et al., 2013).

Νεφρική ανεπάρκεια

Η επίδραση της νεφρικής δυσλειτουργίας στη διαθεσιμότητα της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης δεν έχει αξιολογηθεί, καθώς δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Δεδομένου ότι έχει μέτρια απέκκριση από τα ούρα, δεν αναμένεται ιδιαίτερη διαφοροποίηση των φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών της σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία και γι' αυτό δεν προτείνεται τροποποίηση της δόσης σε αυτή την ομάδα ασθενών. Παρ' όλα αυτά, συνιστάται περιοδικός έλεγχος της νεφρικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Busilvex, 2008). Σε μια μελέτη φάσης I σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνωμα του νεφρού και ένα λειτουργικό νεφρό, στους οποίους χορηγήθηκε ενδοφλέβια βουσουλφάνη 3,2 mg/kg μια φορά την ημέρα σε συνδυασμό με φλουδαραβίνη ως αγωγή προετοιμασίας πριν τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, παρατηρήθηκε τοξικότητα σοβαρότερη από την αναμενόμενη και η μελέτη διεκόπη (Shaughnessy, et al., 2006). Υπήρξαν, επίσης, δύο αναφορές ότι η βουσουλφάνη είναι δυνατόν να απομακρυνθεί με αιμοκάθαρση σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια (Busilvex, 2008), ωστόσο η κάθαρση του φαρμάκου κατά την αιμοδιύλιση είναι παρόμοια με εκείνη χωρίς την αιμοδιύλιση (Ullery, et al., 2000).

Ηπατική ανεπάρκεια

Η επίδραση της ηπατικής δυσλειτουργίας στη διαθεσιμότητα της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης δεν έχει αξιολογηθεί. Ωστόσο, ο κίνδυνος της ηπατικής τοξικότητας μπορεί να είναι αυξημένος σε αυτό τον πληθυσμό. Εφόσον η βουσουλφάνη μεταβολίζεται κυρίως δια της ηπατικής οδού, συνιστάται ιδιαίτερη προσοχή, όταν χρησιμοποιείται σε ασθενείς με προϋπάρχουσα ηπατική βλάβη, ιδιαίτερα σε αυτούς με σοβαρή ηπατική ανεπάρκεια. Όταν υποβάλλονται σε αγωγή αυτοί οι ασθενείς, συνιστάται να παρακολουθούνται συστηματικά έως και 28 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση, για έγκαιρη ανίχνευση ηπατοτοξικότητας, οι τρανσαμινάσες ορού, η αλκαλική φωσφατάση και η χολερυθρίνη (Busilvex, 2008). Δυο μελέτες σε παιδιατρικούς ασθενείς με επηρεασμένη ηπατική λειτουργία λόγω της υποκείμενης νόσου (στη μια με αιμοσφαιρινοπάθειες και στη δεύτερη με διάφορες

διαγνώσεις) δεν έδειξαν καμία διαφορά στη φαρμακοκινητική της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης (Gaziev, et al., 2010) (Paci, et al., 2012).

Αναιμία Fanconi

Τα κύτταρα της αναιμίας Fanconi παρουσιάζουν υπερευαισθησία στους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Υπάρχει περιορισμένη κλινική εμπειρία με τη χρήση της βουσουλφάνης ως συστατικού παράγοντα μιας θεραπείας προετοιμασίας πριν από τη συμβατική μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (MAAK ή HSCT) στα παιδιά με αναιμία Fanconi. Συνεπώς, θα χρησιμοποιείται με προσοχή σε αυτή την κατηγορία ασθενών (Busilvex, 2008). Μικρή μελέτη σε ασθενείς με αναιμία Fanconi που έλαβαν ένα καινούριο σχήμα που περιλαμβάνει φλουδαραβίνη σε συνδυασμό με χαμηλή δόση βουσουλφάνης και αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ATG) έδωσε καλά αποτελέσματα με ασφάλεια, μικρή τοξικότητα και επαρκή ανοσοκαταστολή (Maschan, et al., 2004).

A.3.7. Αλληλεπιδράσεις κατά την Συγχορήγηση Βουσουλφάνης με άλλα Φάρμακα

Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, λαμβάνουν μια πληθώρα φαρμάκων, όπως χημειοθεραπευτικά, ανοσοκατασταλτικά, αντιμικροβιακά κλπ, τα οποία όταν συγχορηγούνται μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις. Η βουσουλφάνη, όπως αναφέρεται και παραπάνω, μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ μέσω σύζευξης με τη γλουταθειόνη, η οποία καταλύεται από τις S – τρανσφεράσες της γλουταθειόνης. Παρόλο που οι μελέτες στα ζώα δεν έχουν αποδείξει το ρόλο του CYP450 στον οξειδωτικό μεταβολισμό του φαρμάκου, είναι γνωστό ότι ο μεταβολισμός της βουσουλφάνης επηρεάζεται από επαγωγείς του CYP3A4, όπως η φαινυτοΐνη. Για αυτό το λόγο θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη χορήγηση φαρμάκων που συναγωνίζονται τη βουσουλφάνη για την σύζευξη με τη γλουταθειόνη ή αλληλεπιδρούν με το CYP3A4 (Glotzbecker, et al., 2012). Επειδή η βουσουλφάνη διέρχεται γρήγορα τον ΑΕΦ και επιτυγχάνει συγκεντρώσεις στο ΕΝΥ, παρόμοιες με εκείνες στο πλάσμα, έχουν αναφερθεί περιστατικά επιληπτικών κρίσεων, κυρίως μετά την θεραπεία με υψηλές δόσεις του φαρμάκου, και για αυτό συνιστάται η χορήγηση προφυλακτικής αντισπασμωδικής αγωγής (Busilvex, 2008). Ως αντιεπιληπτική αγωγή έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα φάρμακα, μεταξύ των οποίων η φαινοβαρβιτάλη, η φαινυτοΐνη και οι βενζοδιαζεπίνες (κλοναζεπάμη, λοραζεπάμη) (Ciurea & Andersson, 2009). Οι ασθενείς που συμμετείχαν στις κλινικές δοκιμές, που έγιναν με την ενδοφλέβια βουσουλφάνη, έλαβαν προφυλακτικά για τους σπασμούς είτε φαινυτοΐνη, είτε βενζοδιαζεπίνες (Busilvex, 2008). Η φαινυτοΐνη έχει βρεθεί ότι είναι ισχυρός επαγωγέας των ηπατικών ενζύμων (CYP450), ωστόσο οι απόψεις των διαφόρων ερευνητών, όσον αφορά την πραγματική επίδρασή της στο μεταβολισμό της βουσουλφάνης, δίστανται. Σε ορισμένες μελέτες, παρατηρήθηκε ότι οδηγεί σε αυξημένη κάθαρση της βουσουλφάνης, χαμηλές συγκεντρώσεις της στο πλάσμα και μικρότερο χρόνο απομάκρυνσης της τελευταίας δόσης σε σχέση με την πρώτη δόση (Hassan, et al., 1993), και μάλιστα στη μια από αυτές βρέθηκε 13 % υψηλότερη κάθαρση της βουσουλφάνης μετά την πρώτη δόση και 28 % υψηλότερη κάθαρση μετά την τελευταία δόση (Sandstrom, et al., 2001). Αντίθετα, σε άλλες μελέτες δεν αναφέρεται καμία αλλαγή

στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους της βουσουλφάνης κατά την ταυτόχρονη χορήγηση φαινυτοΐνης (Madden, et al., 2007). Όσον αφορά τις βενζοδιαζεπίνες, έχουν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά ως προφυλακτική αντισπασμωδική αγωγή η διαζεπάμη, κλοναζεπάμη και λοραζεπάμη, λόγω της μη επαγωγικής τους δράσης στα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό. Δεν έχει παρατηρηθεί καμία αλληλεπίδραση με τη βουσουλφάνη κατά τη συγχορήγησή τους (Hassan, et al., 1993). Στις κλινικές μελέτες για την ενδοφλέβια βουσουλφάνη, δεν παρατηρήθηκε καμία ένδειξη επαγωγικής δράσης της φαινυτοΐνης. Έγινε μια κλινική δοκιμή φάσης II προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της θεραπείας προφύλαξης για τους σπασμούς στη φαρμακοκινητική της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης. Σε αυτή τη μελέτη, 24 ενήλικες ασθενείς έλαβαν κλοναζεπάμη (0,025 – 0,03 mg/kg/ημέρα ως συνεχόμενες ενδοφλέβιες εγχύσεις) ως αντιεπιληπτική θεραπεία και τα φαρμακοκινητικά δεδομένα αυτών των ασθενών συγκρίθηκαν με ιστορικά δεδομένα που συλλέχθηκαν σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε θεραπεία με φαινυτοΐνη. Η ανάλυση των δεδομένων μέσω μιας μεθόδου πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής δεν έδειξε καμία διαφορά στην κάθαρση της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης μεταξύ της θεραπείας με φαινυτοΐνη και της θεραπείας με κλοναζεπάμη και επομένως, επετεύχθησαν οι ίδιες εκθέσεις στη βουσουλφάνη του πλάσματος ανεξαρτήτως του τύπου προφύλαξης για τους σπασμούς (Busilvex, 2008). Κατά την περίοδο της ουδετεροπενίας, επίσης, είναι πιθανόν να απαιτηθεί προφυλακτική ή εμπειρική χρήση αντιβιοτικών, αντιμυκητιασικών και αντικών φαρμάκων για την πρόληψη και αντιμετώπιση των λοιμώξεων. Από τα αντιμυκητιασικά έχει παρατηρηθεί αλληλεπίδραση με την ιτρακοναζόλη. Δεν πραγματοποιήθηκαν ειδικές κλινικές δοκιμές για να αξιολογήσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ ενδοφλέβιας βουσουλφάνης και ιτρακοναζόλης. Από δημοσιευμένες μελέτες σε ενήλικες, αναφέρεται ότι η χορήγηση ιτρακοναζόλης σε ασθενείς που λαμβάνουν υψηλές δόσεις βουσουλφάνης, μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη κάθαρση της βουσουλφάνης (Busilvex, 2008), έως και 20 % και αυξημένες τιμές συγκεντρώσεων της στο πλάσμα, καθώς η ιτρακοναζόλη, όπως και τα υπόλοιπα ιμιδαζολικά αντιμυκητιασικά, είναι αναστολέας του κυτοχρώματος P450 (ισομορφή CYP3A4), που εμπλέκεται στο μεταβολικό μονοπάτι της βουσουλφάνης (Buggia, et al., 1996). Για την ενδοφλέβια δεν έχει αναφέρει κάτι παρόμοιο (Madden, et al., 2007), ωστόσο οι ασθενείς που λαμβάνουν αντιμυκητιασική προφύλαξη με ιτρακοναζόλη, θα πρέπει να παρακολουθούνται για πιθανή εμφάνιση συμπτωμάτων τοξικότητας της βουσουλφάνης (Busilvex, 2008). Αντιθέτως, η φλουκοναζόλη δεν φαίνεται να προκαλεί τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις κατά την ταυτόχρονη χορήγησή της με τη βουσουλφάνη (Busilvex, 2008) (Nguyen, et al., 2006) (Buggia, et al., 1996). Όσον αφορά, τέλος, τη βορικοναζόλη, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για το αν επηρεάζει ή όχι τη φαρμακοκινητική της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης (Madden, et al., 2007). Θεωρητικά, ωστόσο, επειδή είναι αναστολέας του CYP3A4, πιθανόν να μειώνει την κάθαρση της βουσουλφάνης (Glotzbecker, et al., 2012). Η ταυτόχρονη χορήγηση μετρονιδαζόλης με την per os βουσουλφάνη, πρέπει να αποφεύγεται, καθώς η πρώτη αυξάνει τις trough συγκεντρώσεις της τελευταίας έως και 80 %, και μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή τοξικότητα ή/και αυξημένη θνητότητα σχετιζόμενη με την θεραπεία. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε ομάδα των ασθενών που έλαβαν ταυτόχρονα και τα δυο φάρμακα, παρατηρήθηκε αύξηση των βιοχημικών δεικτών λειτουργίας του ήπατος και τρεις εξ' αυτών παρουσίασαν HVD (Nilsson, et al., 2003). Η αλληλεπίδραση αυτή είναι, πιθανόν, αποτέλεσμα της αναστολής του CYP3A4 από τη μετρονιδαζόλη ή του συναγωνισμού των δύο ουσιών για τη

γλουταθειόνη, καθώς οι μεταβολίτες της μετρονιδαζόλης ακολουθούν αυτό το μεταβολικό μονοπάτι. Συνιστάται μάλιστα να μη χορηγείται μετρονιδαζόλη 72 ώρες πριν και μετά το πέρας της θεραπείας με βουσουλφάνη (Glotzbecker, et al., 2012). Έχει αναφερθεί ένα περιστατικό ενός επτάχρονου παιδιού, το οποίο έλαβε ενδοφλέβια βουσουλφάνη και την επομένη per os μετρονιδαζόλη και παρουσίασε 46 % μείωση στην κάθαρση της βουσουλφάνης, αύξηση 86 % του ημερήσιου AUC και 24 % του συνολικού (Gulbis, et al., 2011). Μια άλλη αλληλεπίδραση που έχει παρατηρηθεί είναι με την κετοβεμιδόνη, ένα συνθετικό οπιοειδές αναλγητικό. Σε έναν ασθενή με ΟΜΛ διαπιστώθηκε ότι η συγχορήγηση κετοβεμιδόνης κατά τη διάρκεια θεραπείας με βουσουλφάνη, σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα της τελευταίας στο πλάσμα και ότι τα επίπεδά της μειώνονταν, όταν μειωνόταν η δόση της κετοβεμιδόνης. Γι' αυτό συνιστάται ιδιαίτερη προσοχή όταν συνδυάζονται τα δυο φάρμακα (Busilvex, 2008) (Hassan, et al., 2000). Είναι, επίσης, γνωστό ότι η παρακεταμόλη μειώνει τα επίπεδα γλουταθειόνης στο αίμα και στους ιστούς και κατά συνέπεια μπορεί να μειώσει την κάθαρση βουσουλφάνης, όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό (Busilvex, 2008). Πρόκειται για μια θεωρητική αλληλεπίδραση, ωστόσο προτείνεται να μη χορηγείται η παρακεταμόλη 72 ώρες πριν την έναρξη και το πέρας της χορήγησης της βουσουλφάνης, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος τοξικότητας (Glotzbecker, et al., 2012). Βέβαια, υπάρχει μελέτη που κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η παρακεταμόλη δεν επηρεάζει την κάθαρση της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης (Nguyen, et al., 2006). Κατά την θεραπεία με βουσουλφάνη, οι ασθενείς λαμβάνουν και αντιεμετική αγωγή. Συνήθως, χρησιμοποιούνται οι ανταγωνιστές ΗΤ3 υποδοχέων σεροτονίνης και κυρίως η ονδασετρόνη και η γανισετρόνη, για τις οποίες όμως δεν αναφέρονται αλληλεπιδράσεις (Busilvex, 2008) (Nguyen, et al., 2006). Επίσης, δεν αναφέρεται κάποια ιδιαίτερη αλληλεπίδραση κατά την ταυτόχρονη λήψη από του στόματος αντιουλληπτικών (Madden, et al., 2007). Η βουσουλφάνη, επίσης, επηρεάζει την κάθαρση της κυκλοφωσφαμίδης, η οποία χορηγείται μαζί με την πρώτη ως σχήμα προετοιμασίας πριν τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε ενήλικες ασθενείς. Η κυκλοφωσφαμίδη μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450 προς τοξικούς μεταβολίτες, που απομακρύνονται από τον οργανισμό μέσω σύζευξης με τη γλουταθειόνη. Η επίδραση αυτή πραγματοποιείται πιθανότατα μέσω μείωσης των επιπέδων GST και γλουταθειόνης ή μέσω αναστολής του κυτοχρώματος P450 (Hassan, et al., 2000). Έχει διαπιστωθεί ότι το χρονικό διάστημα μεταξύ της χορήγησης της τελευταίας δόσης βουσουλφάνης και της πρώτης δόσης κυκλοφωσφαμίδης μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη τοξικότητας και κυρίως της φλεβοαποφρακτικής νόσου του ήπατος και της βλεννογονίτιδας. Εάν το διάστημα είναι μεγαλύτερο των 24 ωρών, ο κίνδυνος εμφάνισης ΗVOD και βλεννογονίτιδας είναι σημαντικά μικρότερος από εκείνον όταν το χρονικό διάστημα είναι μικρότερο των 12 ωρών (Busilvex, 2008) (Hassan, et al., 2000). Στα παιδιά, το σχήμα περιλαμβάνει βουσουλφάνη και μελφαλάνη, και έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση της μελφαλάνης νωρίτερα των 24 ωρών από την τελευταία χορήγηση της από του στόματος βουσουλφάνης, μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη τοξικότητας (Busilvex, 2008). Εκτός των παραπάνω συνδυασμών, η βουσουλφάνη επίσης δίνεται μαζί και με φλουδαραβίνη. Σε μελέτες που έγιναν αποδείχθηκε ότι η φλουδαραβίνη δεν επηρεάζει τη φαρμακοκινητική της βουσουλφάνης (Almog, et al., 2011).

A.3.8. Άλλα Φαρμακοκινητικά Δεδομένα και Δεδομένα ασφάλειας της Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης – Χορήγηση μια φορά την ημέρα

Παρότι η ενδοφλέβια βουσουλφάνη έχει πάρει ένδειξη για χορήγηση σε δόση 3,2 mg/kg/ημέρα χωρισμένη σε 4 δόσεις, όπως ίσχυε και για το per os σκεύασμα, υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η επίτευξη θεραπευτικών επιπέδων του φαρμάκου είναι καλύτερη με χορήγηση της συνολικής δόσης του φαρμάκου μια φορά ημερησίως. Επίσης, έδειξαν ότι τόσο το φαρμακοκινητικό προφίλ όσο και το προφίλ τοξικότητας του φαρμάκου είναι παρόμοια με εκείνα του εξάωρου σχήματος. Μια μη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη συνέκρινε τη χορήγηση 3,2 mg/kg μια φορά την ημέρα (n = 20) με τη χορήγηση της ίδιας συνολικής δόσης διαιρεμένης σε τέσσερις δόσεις (n = 11) και την χορήγηση του αντίστοιχου σχήματος από το στόμα (n = 25), ακολουθούμενο από τη χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης. Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι ήταν παρόμοιες και στις τρεις ομάδες ασθενών και παρόμοιες με εκείνες της κλινικής μελέτης φάσης II. Συγκρίσιμες ήταν και η τοξικότητα, η εμφύτευση του μοσχεύματος (engraftment) και η υποτροπή στις πρώτες 100 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση. Η μόνη διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν ότι η επίπτωση του a – GVHD 3^{ου} και 4^{ου} βαθμού είναι μικρότερη στο σχήμα χορήγησης μια φορά την ημέρα, απ' ό,τι με το εξάωρο σχήμα (Mamlouk, et al., 2005). Παρόμοιο αποτέλεσμα είχε και μια ακόμη μη ελεγχόμενη μελέτη σε 12 ασθενείς που έλαβαν τη βουσουλφάνη ανά 12 ώρες ή ανά 24 ώρες σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η μέση AUC ήταν 3390 μM*min στους 6 ασθενείς που έλαβαν δυο φορές την ημέρα το φάρμακο και 5561 μM*min στους άλλους 6 που έλαβαν μια φορά την ημέρα το φάρμακο. Η διακύμανση μεταξύ των δόσεων στον ίδιο ασθενή ήταν μικρή (1 – 10 %) και δεν παρατηρήθηκε καθόλου άθροιση του φαρμάκου. Η αλλαγή στο δοσολογικό σχήμα δεν οδήγησε σε αύξηση της τοξικότητας, παρ' όλο που οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα ήταν μεγαλύτερες (Fernandez, et al., 2002). Δυο ακόμη μη ελεγχόμενες, συγκριτικές μελέτες διερεύνησαν την ασφάλεια στη χορήγηση βουσουλφάνης ενδοφλεβίως μια φορά την ημέρα σε συνδυασμό με φλουδαραβίνη. Η μέση τιμή για την AUC ήταν 4973 μM*min με δόση 3.2 mg/kg/ημέρα (n = 12) (Russell, et al., 2002) και 4871 μM*min με δόση 130 mg/m²/ημέρα (n = 45) (de Lima, et al., 2004). Και στις δυο μελέτες η χορήγηση της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης μια φορά την ημέρα ήταν καλώς ανεκτή και δεν παρουσιάστηκε αύξηση στην τοξικότητα. Η διατομική και η ενδοατομική μεταβλητότητα στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους ήταν μικρότερη σε σχέση με το per os σκεύασμα. Επίσης, δεν διέφεραν ιδιαίτερα σε σχέση με αυτές που υπολογίστηκαν στην κλινική μελέτη φάσης II. Το θεραπευτικό παράθυρο AUC 900 – 1500 μM*min, είναι ισοδύναμο με το 3600 – 6000 μM*min για το σχήμα χορήγησης μια φορά την ημέρα (de Lima, et al., 2004). Η διετής επιβίωση ήταν 37 – 88 % και ο ρυθμός υποτροπής της νόσου 18 – 66 %, ανάλογα τη σταδιοποίηση της νόσου πριν τη μεταμόσχευση (Russell, et al., 2002). Σε μια άλλη μελέτη που συνέκρινε τη χορήγηση κάθε 6 ώρες με τη χορήγηση κάθε 24 ώρες, τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά ήταν ίδια με εξαίρεση τη συγκέντρωση που ήταν 3 φορές μεγαλύτερη και το AUC που ήταν 4 φορές μεγαλύτερο για τη χορήγηση μια φορά την ημέρα. Η ενδοατομική μεταβλητότητα στην κάθαρση ήταν < 20 % και δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση του φαρμάκου (Madden, et al., 2007). Τέλος, τυχαιοποιημένη συγκριτική μελέτη, απέδειξε ότι το φαρμακοκινητικό προφίλ της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης, όταν χορηγείται μια φορά την ημέρα, είναι παρόμοιο με εκείνο που εμφανίζει το εξάωρο δοσολογικό σχήμα (Ryu, et al., 2007). Στη μελέτη συμμετείχαν 60 ασθενείς: 30 έλαβαν δόση

0,8 mg/kg ενδοφλεβίως 4 φορές την ημέρα (ανά 6 ώρες) και αποτέλεσαν την ομάδα BU4, και 30 έλαβαν δόση 3,2 mg/kg ενδοφλεβίως 1 φορά την ημέρα και ήταν η ομάδα BU1. Και στις δυο ομάδες παρατηρήθηκε γραμμική κινητική με χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ασθενών για όλες τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους (CV < 20 %), οι οποίες ήταν παρόμοιες και στις δυο ομάδες. Μόνο η C_{max} για την ομάδα που έλαβε μια φορά την ημέρα το φάρμακο ήταν τετραπλάσια από την C_{max} που βρέθηκε για το εξάωρο σχήμα. Το ίδιο ισχύει και για την επιφάνεια υπό την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου (AUC). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα δυο σχήματα χορήγησης είναι ισοδύναμα ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Όσον αφορά την τοξικότητα, επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στις ομάδες (Ryu, et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που αναφέρουν αύξηση της τοξικότητας με τη χορήγηση της βουσουλφάνης μια φορά την ημέρα σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη (Williams, et al., 2004) (Geddes, et al., 2008).

A.3.9. Φαρμακογενετικά δεδομένα της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης και συσχέτιση με το τελικό αποτέλεσμα της μεταμόσχευσης

Μεγάλο μέρος της διακύμανσης της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης ανάμεσα στους ασθενείς εξηγείται από τον πολυμορφισμό στις GST, ένζυμα που καταλύουν το μεταβολισμό της. Ορισμένες ισομορφές της GST, όπως GSTM1 και GSTT1, εμφανίζουν έντονο γενετικό πολυμορφισμό και σε ορισμένους πληθυσμούς παρατηρείται ομόζυγη έλλειψη και των δυο γονιδίων, με αποτέλεσμα ο μηδενικός (*null*) γονότυπος να χαρακτηρίζεται από πλήρη έλλειψη της αντίστοιχης πρωτεΐνης (Nath & Shaw, 2007). Η φαρμακογενετική αξιολόγηση των γονιδίων που εμπλέκονται στη φαρμακοκινητική των φαρμάκων, θεωρείται αποτελεσματική μέθοδος εξατομίκευσης της θεραπείας συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και τη μείωση της τοξικότητας του φαρμάκου (Evans & McLeod, 2003). Οι διαφορές στην έκφραση των ισομορφών της GST στον πληθυσμό και η επίδρασή τους στη φαρμακοκινητική της βουσουλφάνης έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για πολλούς συγγραφείς. Τα δεδομένα, που προέρχονται κυρίως από μελέτες σε παιδιατρικούς πληθυσμούς, είναι αντιφατικά. Δύο μελέτες σε παιδιατρικούς πληθυσμούς έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου GSTA1 και της κάθαρσης της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης. Στην πρώτη, διαπιστώθηκε ότι οι φορείς του GSTA1*B γονότυπου παρουσιάζουν 2,6 φορές υψηλότερη συγκέντρωση φαρμάκου στη σταθεροποιημένη κατάσταση και 30 % μείωση στην κάθαρση, ενώ στη δεύτερη, για τον ίδιο γονότυπο βρέθηκε κάθαρση 10 % μικρότερη (Johnson, et al., 2008) (Gaziev, et al., 2010). Συσχέτιση του γονότυπου GSTA1*B και της κάθαρσης της βουσουλφάνης αναφέρεται, επίσης, και σε 12 ενήλικες Ιάπωνες ασθενείς μετά τη χορήγηση δισκίων βουσουλφάνης, αλλά και σε ενήλικες Κορεάτες ασθενείς που έλαβαν ενδοφλεβίως το φάρμακο. Όσοι απ' αυτούς είχαν το γονότυπο GSTA1*B παρουσίαζαν σημαντική μείωση στην κάθαρση (Kusama, et al., 2006) (Kim, et al., 2011). Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες, σε άλλη έρευνα για τους πολυμορφισμούς των GSTA1, GSTM1 και GSTP1 διαπιστώθηκε ότι μόνο ο μηδενικός γονότυπος της GSTM1 (GSTM1 null) επηρεάζει τη φαρμακοκινητική της βουσουλφάνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε παιδιά και μάλιστα σχετίζεται με υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα και χαμηλότερη κάθαρση (Ansari, et al., 2010). Τα αιτία των διαφορών αυτών δεν είναι απόλυτα σαφή. Εκτός όμως από τα

παραπάνω, η φαρμακοκινητική της βουσουλφάνης φαίνεται να επηρεάζεται και από συγκεκριμένους συνδυασμούς γονοτύπων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε συσχέτιση της φαρακοκινητικής της βουσουλφάνης και της ταυτόχρονης παρουσίας των μηδενικών γονοτύπων GSTT1/GSTM1 (GSTT1/GSTM1 null), παρ' όλο που ο κάθε γονότυπος ξεχωριστά δεν επηρέαζε την κάθαρση του φαρμάκου. Αλλά και ο ταυτόχρονος συνδυασμός γονοτύπου GSTA1*B και μηδενικών γονοτύπων GSTT1/GSTM1 (GSTT1/GSTM1 null) συνδέεται με την κάθαρση και το AUC της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης. Με βάση αυτά, προτείνεται ότι ο φαρμακογενετικός προσδιορισμός των γονοτύπων της GST, είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για τη βελτιστοποίηση του δοσολογικού σχήματος της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης (Kim, et al., 2011). Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν και ορισμένες μελέτες που έρχονται σε αντίθεση, καθώς σε αυτές δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση των πολυμορφισμών της GST, ούτε των συνδυασμών τους στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης (Zwaveling, et al., 2008) (Abbasi, et al., 2011).

Εκτός από τους πολυμορφισμούς της GST και η συγκέντρωση της γλουταθειόνης του πλάσματος πριν τη χορήγηση βουσουλφάνης ενδοφλεβίως φαίνεται να συσχετίζεται με την κάθαρση του φαρμάκου μετά την πρώτη δόση (Almog, et al., 2011).

Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, υπάρχει συσχέτιση των πολυμορφισμών της GST με την έκβαση της μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, αλλά και σε αυτή την περίπτωση τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Για παράδειγμα, σε παιδιά με β – θαλασσαιμία που έλαβαν βουσουλφάνη per os πριν τη μεταμόσχευση, επιβεβαιώθηκε ότι η ομόζυγη έλλειψη των γονιδίων της GSTM1, δηλαδή ο μηδενικός γονότυπος (GSTM1 null), προδιαθέτει για φλεβοαποφρακτική νόσο του ήπατος (HVOD). Φαρμακοκινητική ανάλυση στους ασθενείς αυτούς, αποκάλυψε σημαντικά υψηλότερη κάθαρση του φαρμάκου σε εκείνους που εμφάνισαν HVOD, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι οι ασθενείς με έλλειψη της GSTM1, εκφράζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την GSTA1 (Srivastava, et al., 2004). Αντίθετα, κατά τη μελέτη 29 παιδιών, 10 % των οποίων εμφάνισε την επιπλοκή (3/29), μόνο δύο από αυτά είχαν γονότυπο GSTA1*B και HVOD, με αποτέλεσμα να μην έχει επιβεβαιωθεί κάποια συσχέτιση (Johnson, et al., 2008). Σε πρόσφατες μελέτες, παρατηρήθηκε συσχέτιση της εμφάνισης αντίδρασης του ξενιστή στο μόσχευμα (GVHD) με την παρουσία των γονοτύπων GSTM1 null και GSTT1 null. Επιπλέον, και η παρουσία της GSTM1 (positive) φαίνεται να συνεπάγεται αυξημένη επίπτωση της θνητότητας που σχετίζεται με τη θεραπεία (Elhasid, et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, η παρουσία του γονοτύπου GSTA1*A/*A προφυλάσσει από την εμφάνιση αντίδρασης του ξενιστή στο μόσχευμα (GVHD) (Kim, et al., 2011).

A.3.10. Προκλινικά Δεδομένα για την ασφάλεια της βουσουλφάνης και Ανεπιθύμητες Ενέργειες – Ειδικές Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις

A.3.10.α. Προκλινικά Δεδομένα για την ασφάλεια της Βουσουλφάνης

Η βουσουλφάνη είναι μεταλλαξεογόνος και κλαστογόνος ουσία. Σε *in vitro* δοκιμές προκάλεσε μεταλλάξεις στη *Salmonella typhimurium*, στη *Drosophila melanogaster* και στη βρώμη. Επίσης, έχουν αναφερθεί χρωμοσωμικές μεταβολές *in vitro*, σε κύτταρα τρωκτικών και ανθρώπου, και *in vivo* σε τρωκτικά και ανθρώπους. Ποικιλία χρωμοσωμικών αλλοιώσεων έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα ασθενών που έλαβαν από του στόματος βουσουλφάνη για την θεραπεία της ΧΜΛ (Busilvex, 2008) και αφορούσαν κυρίως τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, αλλά και τα κύτταρα του μυελού των οστών (Bishop & Wassom, 1986). Η βουσουλφάνη ανήκει σε μία κατηγορία ουσιών, τους αλκυλιωτικούς παράγοντες, που με βάση το μηχανισμό δράσης τους είναι δυνητικά καρκινογόνες. Τα διαθέσιμα δεδομένα στα ζώα υποστηρίζουν την πιθανή καρκινογόνο δράση της βουσουλφάνης. Η ενδοφλέβια χορήγησή της σε επίμυες αυξάνει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του θύμου αδένος και των ωοθηκών (Busilvex, 2008), ενώ σε συνδυασμό με την ακτινοβολία η επίπτωση των λεμφωμάτων του θύμου αδένος αυξάνεται περισσότερο (WHO, 2012). Αντίθετα, τα δεδομένα που υπάρχουν μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση βουσουλφάνης είναι αντικρουόμενα, καθώς ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης λεμφωμάτων, ενώ άλλες απέτυχαν να αποδείξουν ότι αυξάνει την εμφάνιση διαφόρων όγκων (WHO, 2012) (Bishop & Wassom, 1986). Όσον αφορά την επίδρασή της στην αναπαραγωγή, μελέτες έχουν δείξει ότι η βουσουλφάνη είναι τερατογόνος σε αρουραίους, ποντικούς και κουνέλια. Οι δυσπλασίες και ανωμαλίες που προκαλεί περιλαμβάνουν σημαντικές μεταβολές του μυοσκελετικού συστήματος, αύξηση του σωματικού βάρους και του μεγέθους. Σε εγκύους αρουραίους η βουσουλφάνη προκαλεί στειρότητα, τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς απογόνους, λόγω της απουσίας βλαστικών κυττάρων στους όρχεις και στις ωοθήκες. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί στειρότητα στα τρωκτικά. Η βουσουλφάνη προκαλεί εξασθένηση στα ωκύτταρα των θηλυκών αρουραίων και στειρότητα στους άρρενες αρουραίους καθώς και στους κρικητούς (Busilvex, 2008).

A.3.10.β. Ανεπιθύμητες Ενέργειες της Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης

Οι πληροφορίες για τις ανεπιθύμητες ενέργειες προκύπτουν από δύο κλινικές δοκιμές σε 103 ενήλικες ασθενείς και μια ακόμη κλινική μελέτη σε 55 παιδιατρικούς ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκε ενδοφλέβια βουσουλφάνη σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη ή μελφαλίνη. Σοβαρή τοξικότητα, που συμπεριλαμβάνει το αιματολογικό, ηπατικό και αναπνευστικό σύστημα, θεωρήθηκε ως αναμενόμενη συνέπεια της αγωγής προετοιμασίας και της διαδικασίας της μεταμόσχευσης. Στην τοξικότητα αυτή, συμπεριλαμβάνονται η λοίμωξη και η αντίδραση του ξενιστή (GVHD) στο μόσχευμα, τα οποία παρότι δεν ήταν άμεσα συσχετιζόμενα, ήταν οι κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας, ιδιαίτερα στην αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες, που αναφέρθηκαν στους ενήλικες και στους παιδιατρικούς ασθενείς κατά τις κλινικές μελέτες και οι οποίες περιλαμβάνουν περισσότερες της μιας μεμονωμένες αναφορές, καταγράφονται στον πίνακα Α 5 και είναι ταξινομημένες ανά κατηγορία οργάνου

συστήματος και συχνότητα εμφάνισης. Εντός κάθε ομάδας συχνότητας εμφάνισης, οι ανεπιθύμητες ενέργειες παρουσιάζονται με σειρά φθίνουσας σοβαρότητας. Η συχνότητα προσδιορίζεται ως: πολύ συχνή ($\geq 1/10$), συχνή ($\geq 1/100 < 1/10$), όχι συχνή ($\geq 1/1.000, < 1/100$), μη γνωστές (δεν μπορούν να αξιολογηθούν από τα διαθέσιμα δεδομένα). Επίσης, στην τελευταία κατηγορία καταγράφηκαν και οι ανεπιθύμητες ενέργειες που εμφανίστηκαν μετά την κυκλοφορία του ενδοφλέβιου σκευάσματος Busilvex[®], καθώς και ανεπιθύμητες ενέργειες που έχουν αναφερθεί για το από του στόματος σκεύασμα Myleran[®] (Busilvex, 2008).

Πίνακας Α 5. Ανεπιθύμητες Ενέργειες Βουσουλφάνης (Busilvex, 2008).

Κατηγορία οργανικού συστήματος	Πολύ συχνή ($\geq 1/10$)	Συχνή ($\geq 1/100 < 1/10$)	Όχι συχνή ($\geq 1/1.000, < 1/100$)	Μη γνωστές
Λοιμώξεις/ παρασιτώσεις	Ρινίτιδα, Φαρυγγίτιδα			
Διαταραχές αιμοποιητικού/ λεμφικού συστήματος	Ουδετεροπενία, Θρομβοκυτταροπενία, Εμπύρετη ουδετεροπενία, Αναιμία, Πανκυτταροπενία			
Διαταραχές ανοσοποιητικού συστήματος	Αλλεργική αντίδραση			
Διαταραχές μεταβολισμού/ θρέψης	Ανορεξία, Υπεργλυκαιμία, Υπασβεστιαμία, Υποκαλαιμία, Υπομαγνησιαμία, Υποφωσφαταιμία	Υπονατριάμια		
Ψυχιατρικές διαταραχές	Άγχος, Αϋπνία, Κατάθλιψη	Σύγχυση	Παραλήρημα, Νευρική κρίση, Διέγερση, Ψευδαισθήσεις	
Διαταραχές νευρικού συστήματος	Πονοκέφαλος, Ζάλη		Επιληπτική κρίση, Εγκεφαλοπάθεια, Εγκεφαλική αιμορραγία	
Οφθαλμικές διαταραχές				Καταρράκτης, Λέπτυνση κερατοειδούς, Διαταραχές του φακού ***
Καρδιακές διαταραχές	Ταχυκαρδία	Αρρυθμία, Κολπική μαρμαρυγή, Καρδιομεγαλία, Περικαρδιακή συλλογή, Περικαρδίτιδα	Κοιλιακές έκτακτες συστολές, Βραδυκαρδία	
Αγγειακές διαταραχές	Υπέρταση, Υπόταση, Θρόμβωση, Αγγειοδιαστολή		Θρόμβωση μηριαίας αρτηρίας, Σύνδρομο τριχοειδούς διάχυσης	
Διαταραχές αναπνευστικού συστήματος, θώρακα και μεσοθωρακίου	Δύσπνοια, Επίσταξη, Βήχας, Λόξυγκας	Υπεραερισμός, Αναπνευστική ανεπάρκεια, Κυψελιδικές αιμορραγίες, Άσθμα, Ατελεκτασία, Πλευριτικό εξίδρωμα	Υποξία	
Διαταραχές γαστρεντερικού	Στοματίτιδα, Διάρροια, Κοιλιακό άλγος, Ναυτία,	Αιματέμεση, Ειλεός, Οισοφαγίτιδα	Αιμορραγία από το γαστρεντερικό	

συστήματος	Έμετος, Δυσπεψία, Ασκίτης, Δυσκοιλιότητα, Δυσφορία έδρας			
Διαταραχές ήπατος/ χοληφόρων	Ηπατομεγαλία, Ίκτερος	Φλεβοαποφρακτική ηπατοπάθεια*		
Διαταραχές δέρματος/ υποδόριου ιστού	Εξάνθημα, Κνησμός, Αλωπεκία	Απολέπιση δέρματος, Ερύθημα, Μελαγχρωματικές διαταραχές		
Διαταραχές μυοσκελετικού συστήματος/ συνδετικού ιστού	Μυαλγία, Αρθραλγία, Οσφυαλγία			
Διαταραχές νεφρών/ ουροφόρων οδών	Δυσουρία, Ολιγουρία	Αιματοουρία, Μέτριου βαθμού νεφρική ανεπάρκεια		
Διαταραχές αναπαραγωγικού συστήματος				Πρώιμη εμμηνόπαυση, Ωοθηκική ανεπάρκεια**
Γενικές διαταραχές/ καταστάσεις της οδού χορήγησης	Αδυναμία, Ρίγη, Πυρετός, Πόνος, Θωρακικό άλγος, Οίδημα, Οίδημα γενικό, Πόνος ή φλεγμονή στην περιοχή της ένεσης, Βλεννογονίτιδα			
Παρακλινικές Εξετάσεις	Αύξηση τρανσαμινασών, χολερυθρίνης, γ-GT, κρεατινίνης, αλκαλικής φωσφατάσης, Αύξηση βάρους, Ακανόνιστοι αναπνευστικοί ήχοι	Αύξηση του BUN, Μειωμένο κλάσμα εξώθησης (EF)		

* η φλεβοαποφρακτική ηπατοπάθεια είναι πιο συχνή στον παιδιατρικό πληθυσμό.

** αναφέρθηκε μετά την κυκλοφορία της ενδοφλέβιας (IV) βουσουλφάνης.

*** αναφέρθηκε μετά την κυκλοφορία της από του στόματος (per os) βουσουλφάνης.

Όλοι οι ασθενείς που πήραν μέρος στις κλινικές μελέτες έλαβαν 16/16 δόσεις ενδοφλέβιας βουσουλφάνης και κανένας δε διέκοψε την θεραπεία λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών (Busilnex, 2008). Οι ανεπιθύμητες ενέργειες ελέγχθηκαν ως προς το φύλο, την ηλικία, την εθνικότητα, τη διάγνωση και την προηγούμενη θεραπεία της νόσου. Η μόνη διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν ότι οι γυναίκες εμφάνισαν πιο συχνά αλλεργικές αντιδράσεις, υπόταση, δυσκοιλιότητα, ρινίτιδα, βήχα, φαρυγγίτιδα, εξάνθημα και ωταλγία, ενώ οι άνδρες εμφάνισαν σε μεγαλύτερο ποσοστό λοιμώξεις, υπασβεστιαϊμία και αύξηση των ηπατικών ενζύμων. Επίσης, η αναφορά ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη σε άτομα > 50 ετών, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικές αυτές οι διαφορές (EMA, 2005). Οι περισσότερες ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν ήπιου ή μέτριου βαθμού. Εκτός της αιματολογικής τοξικότητας που παρατηρείται μετά τη χορήγηση της βουσουλφάνης, οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες από άλλα όργανα και συστήματα, που αναφέρθηκαν κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών, ήταν κυρίως από το γαστρεντερικό σύστημα: ναυτία (98 %), στοματίτιδα (97 %), έμετος (95 %), ανορεξία (85 %) και διάρροια (84 %). Επίσης αυξημένη επίπτωση είχαν η αϋπνία (84 %) και ο πυρετός (80 %) (Busulfex TM, 2011) (EMA, 2005).

Η γαστρεντερική τοξικότητα, γενικά, είναι πολύ συχνό φαινόμενο κατά τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Όπως φαίνεται και στην προηγούμενη παράγραφο, οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών αφορούσαν το γαστρεντερικό σύστημα, και λίγες από αυτές χαρακτηρίστηκαν ως σοβαρές. Στην μελέτη για την αλλογενή μεταμόσχευση (n = 61) κανένας από τους ασθενείς δεν παρουσίασε βαθμού 4 τοξικότητα, εκτός από έναν ασθενή με ανορεξία (2 %), 7 % (4/61) εμφάνισαν βαθμού 3 ναυτία και 2 % (1/61) βαθμού 3 έμετο. Η συνολική επίπτωση των εμέτων κατά τη χορήγηση ενδοφλέβιας βουσουλφάνης ήταν 43 % και σε όλες τις περιπτώσεις θεωρήθηκε ήπιου βαθμού. 44 % (27/61) των ασθενών εμφάνισαν στοματίτιδα 2^{ου} βαθμού και 26 % (16/61) 3^{ου} βαθμού (Andersson, et al., 2002). Διάρροια 3^{ου} και 4^{ου} βαθμού αναφέρεται στο 5 % των ασθενών, ενώ ήπιου/μέτριου βαθμού στο 75 %. Ακόμη, παρατηρήθηκαν ήπιος κοιλιακός πόνος στο 69 % και σοβαρός στο 3 % καθώς και δυσπεψία ήπιας/μέτριας μορφής στο 44 % (Busulfex TM, 2011).

Το 15 % των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών (ΣΑΕ) της βουσουλφάνης περιλάμβαναν ηπατική τοξικότητα. Η φλεβοαποφρακτική νόσος του ήπατος (ΦΑΝ ή HVOD) είναι μία αναγνωρισμένη πιθανή επιπλοκή οποιασδήποτε θεραπείας προετοιμασίας πριν τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Στις δύο κλινικές μελέτες, έξι από τους 103 ασθενείς που συμμετείχαν, (6 %) εκδήλωσαν φλεβοαποφρακτική νόσο, πέντε εκ των οποίων υπεβλήθησαν σε αλλογενή μεταμόσχευση (5/61 ή 8,2 %) και ένας σε αυτόλογη (1/42 ή 2,5 %) (Busilvex, 2008). Από τους πέντε ασθενείς με αλλογενή μεταμόσχευση, στους δύο η HVOD ήταν θανατηφόρος (3,3 %), ενώ στους υπόλοιπους τρεις αντιμετωπίστηκε επιτυχώς. Επιπλέον, τρεις από τους πέντε ασθενείς που εμφάνισαν HVOD πληρούσαν τα κριτήρια Jones (Andersson, et al., 2002), δηλαδή υπερχολερυθριναιμία συνοδευόμενη από δύο εκ των επόμενων τριών ευρημάτων: ηπατομεγαλία, ασκίτης, > 5 % αύξηση του βάρους (Jones, et al., 1987). Επίσης, παρατηρήθηκαν αυξημένη χολερυθρίνη (n = 3) και αυξημένες τρανσαμινάσες (n = 1). Δύο, από τους ανωτέρω τέσσερις ασθενείς με σοβαρά ευρήματα ηπατοτοξικότητας στον ορό, ήταν μεταξύ των ασθενών με διαγνωσμένη HVOD (Busilvex, 2008). Στον επόμενο πίνακα (πίνακας Α 6) φαίνονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών που υπεβλήθησαν σε αλλογενή μεταμόσχευση και εμφάνισαν HVOD, και η τελική έκβαση της νόσου.

Πίνακας Α 6. Χαρακτηριστικά και έκβαση των ασθενών με αλλογενή μεταμόσχευση που ανέπτυξαν φλεβοαποφρακτική νόσο του ήπατος (HVOD) (Andersson, et al., 2002).

Νόσος ασθενούς	AUC 1 ^{ης} δόσης	AUC 9 ^{ης} δόσης	Προηγούμενη Θεραπεία	Κριτήρια Jones**	HVOD*	Αποτέλεσμα
HD	1256	1170	R,C,T	ΟΧΙ	ΝΑΙ	Επιτυχής
AML	1106	1194	C	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Πέθανε
MDS	1225	978	R	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Επιτυχής
MDS	1644	1617	R,C,T	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Πέθανε
CML	1567	1604	R	ΟΧΙ	ΝΑΙ	Επιτυχής

Επεξήγηση πίνακα: R: προηγούμενη ακτινοθεραπεία, C: > 3 προηγούμενες χημειοθεραπείες, T: προηγούμενη μεταμόσχευση. HD: Νόσος Hodgkin, AML: οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, MDS: Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο, CML: Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία.

*Διάγνωση HVOD βασισμένη στην κλινική εξέταση και τα εργαστηριακά ευρήματα.

**Διάγνωση HVOD βασισμένη στα κριτήρια Jones.

Η φλεβοαποφρακτική νόσος του ήπατος (ΦΑΝ ή HVOD) είναι μια σημαντική αιτία νοσηρότητας και πρόωρης θνητότητας μετά την HSCT. Εμφανίζεται εντός 30 ημερών από την HSCT και χαρακτηρίζεται από ηπατομεγαλία, υπερχολερυθριναιμία, πόνο στο άνω δεξιό τεταρτημόριο και κατακράτηση υγρών με αποτέλεσμα ασκίτη ή ανεξήγητη αύξηση του βάρους. Η σοβαρή μορφή της, μπορεί να οδηγήσει σε πολυοργανική ανεπάρκεια, που χαρακτηρίζεται από νεφρική ανεπάρκεια, πνευμονικό οίδημα και εγκεφαλοπάθεια. Η βαρύτητα της νόσου χαρακτηρίζεται αναδρομικά και ταξινομείται σε ήπια, μέτρια και σοβαρή, με βάση την τελική έκβασή της. Η διάγνωσή της γίνεται με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά (Corpell, et al., 2003). Η επίπτωση της νόσου ποικίλει και έχει βρεθεί ότι κυμαίνεται από 10 – 50 % και η θνητότητα αγγίζει το 47 % (Kashgar, et al., 2002) (Jones, et al., 1987). Η εμφάνισή της, σχετίζεται με διάφορους παράγοντες κινδύνου, όπως η προϋπάρχουσα βλάβη του ήπατος, λόγω προηγούμενης ακτινοβόλησης στην κοιλιακή χώρα, η προγενέστερη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (αυξάνει 20 % την επίπτωση της νόσου), η αλλογενής μεταμόσχευση, η αγωγή προετοιμασίας, οι γενετικοί πολυμορφισμοί (γλουταθειόνη, TNF α) και η ταυτόχρονη χορήγηση άλλων ηπατοτοξικών φαρμάκων. Η παθοφυσιολογία της νόσου εμπλέκει διάφορους μηχανισμούς και προκαλείται λόγω βλάβης στα ηπατοκύτταρα και τα κολποειδή ενδοθηλιακά κύτταρα της ζώνης 3 της ηπατικής αδενοκυψέλης (*liver acinus*), όπου βρίσκονται μεγάλες ποσότητες των ενζύμων (κυτόχρωμα P450 και γλουταθειόνη) που εμπλέκονται στο μεταβολισμό (Corpell, et al., 2003). Κατά τη χορήγηση αγωγής προετοιμασίας που περιλαμβάνει βουσουλφάνη σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη, και τα δυο φάρμακα χρησιμοποιούν τα παραπάνω ένζυμα προκειμένου να μεταβολιστούν, οπότε είναι πιο εύκολο να προκληθεί ηπατική βλάβη. Επίσης, επειδή η βουσουλφάνη είναι λιπόφιλη και συνδέεται σε μικρό ποσοστό με τις πρωτεΐνες, μπορεί να επιτύχει υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ (Nath & Shaw, 2007). Ο ρόλος της στην πρόκληση της νόσου δεν είναι απόλυτα σαφής. In vitro μελέτες έδειξαν ότι εξαντλεί τα αποθέματα γλουταθειόνης του ήπατος και σε υψηλές δόσεις επάγει μηχανισμούς οξειδωτικού stress (DeLeve & Wang, 2000). Ένας από τους μεταβολίτες της, το σουλφονικό ιόν της γλουταθειόνης, μεταβολίζεται περαιτέρω προς τεταϋδροθειοφαίνιο,

που είναι ηπατοτοξικό. Οι πολυμορφισμοί των ισομορφών GST, όπως η έλλειψη της GSTM1 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης HVD σε παιδιά με θαλασσαιμία (Srivastava, et al., 2004). Η βουσουλφάνη, επίσης, επηρεάζει την κάθαρση της κυκλοφωσφαμίδης, πιθανότατα μέσω μείωσης των επιπέδων GST και γλουταθειόνης ή μέσω αναστολής του κυτοχρώματος P450 (Hassan, et al., 2000). Η κυκλοφωσφαμίδα μεταβολίζεται προς ένα ηπατοτοξικό προϊόν, το οποίο συζεύγνυται με τη γλουταθειόνη και έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για HVD, πιθανότατα λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων γλουταθειόνης. Τέλος, η προσθήκη και τρίτου χημειοθεραπευτικού παράγοντα στο σχήμα, αυξάνει περισσότερο τον κίνδυνο (Nath & Shaw, 2007).

Επειδή διέρχεται τον αιματεγκεφαλικό φραγμό και επιτυγχάνει γρήγορα επίπεδα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, παρόμοια με εκείνα στο πλάσμα, έχει ενοχοποιηθεί για πρόκληση νευροτοξικότητας, που εκδηλώνεται συνήθως υπό μορφή γενικευμένων επιληπτικών κρίσεων και η επίπτωσή της εκτιμάται περίπου 10 % στους ενήλικες και 7 % στα παιδιά. Είναι πιο συχνή με την αύξηση της ηλικίας και φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη σε παιδιά και ενήλικες (Ciurea & Andersson, 2009). Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή όταν το φάρμακο χορηγείται σε ασθενείς με ιστορικό επιληπτικών σπασμών. Όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να λαμβάνουν πλήρη αντιεπιληπτική προφύλαξη, με φάρμακα όπως η φαινοytoΐνη και οι βενζοδιαζεπίνες, πριν την έναρξη της θεραπείας με βουσουλφάνη. Επίσης, ιδιαίτερη προσοχή συνιστάται σε άτομα με προδιάθεση για εμφάνιση σπασμών, ιστορικό επιληψίας, τραύμα κεφαλής, κλπ (Busilnex, 2008).

Όσον αφορά την καρδιακή τοξικότητα της βουσουλφάνης, έχει αναφερθεί στο παρελθόν καρδιακός επιπωματισμός σε 8 παιδιά (8/400 ή 2 % των ασθενών) με β – θαλασσαιμία που λάμβαναν per os βουσουλφάνη σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδα ως αγωγή προετοιμασίας για τη μεταμόσχευση. Οι έξι περιπτώσεις ήταν θανατηφόρες, ενώ δύο σώθηκαν χάρη στη γρήγορη παρακέντηση του περικαρδιακού υγρού, που είναι και η μόνη θεραπεία. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από κυκλοφορικό shock και καρδιακή κάμψη (Angelucci, et al., 1992). Για την ενδοφλέβια βουσουλφάνη δεν έχει αναφερθεί καρδιακός επιπωματισμός ή άλλη ειδική καρδιακή τοξικότητα σχετιζόμενη με τη βουσουλφάνη. Ωστόσο, η καρδιακή λειτουργία θα πρέπει να ελέγχεται συστηματικά στους ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με αυτήν (Busilnex, 2008). Η πιο συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια κατά τις κλινικές δοκιμές από το καρδιαγγειακό σύστημα ήταν ήπια / μέτρια ταχυκαρδία στο 44 % των ασθενών και μάλιστα σε 7 από αυτούς (11 %) εμφανίστηκε μετά την πρώτη δόση (Busulfex TM, 2011).

Στις κλινικές δοκιμές, αναφέρθηκε η εμφάνιση συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, με εξέλιξη σε αναπνευστική ανεπάρκεια, που σχετιζόταν με διάμεση πνευμονική ίνωση, σε έναν ασθενή ο οποίος κατέληξε, χωρίς όμως να βρεθεί καμία σαφής αιτιολογία. Επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει πνευμονική τοξικότητα, η οποία μπορεί να είναι αθροιστική της δράσης άλλων κυτταροτοξικών παραγόντων. Συνεπώς, πρέπει να δίνεται προσοχή σε αυτή την πνευμονολογική παράμετρο, ιδιαίτερα σε ασθενείς με προγενέστερο ιστορικό ακτινοβολίας στο μεσοθωράκιο ή στον πνεύμονα. Το 39 % των ασθενών (40/103) εκδήλωσαν ένα ή περισσότερα επεισόδια λοίμωξης, από τα οποία το 83 % (33/40) κρίθηκαν ως ήπια ή μέτρια. Η πνευμονία ήταν θανατηφόρος στο 1 % (1/103) και απειλητική για τη ζωή στο 3 % των ασθενών. Άλλες λοιμώξεις θεωρήθηκαν σοβαρές στο 3 %

των ασθενών. Πυρετός αναφέρθηκε στο 87 % των ασθενών και ήταν ήπιος/μέτριος στο 84 % και σοβαρός στο 3 %. Το 47 % των ασθενών εκδήλωσε ρίγη, τα οποία ήταν ήπιας/μέτριας μορφής στο 46 % και σοβαρής μορφής στο 1 %. Τα δεδομένα της συχνότητας εμφάνισης οξείας αντίδρασης του ξενιστή (a-GVHD) στο μόσχευμα συλλέχθηκαν στη μελέτη OMC – BUS – 4 για την αλλογενή μεταμόσχευση, στην οποία συμμετείχαν 61 ασθενείς. Συνολικά, 11 ασθενείς (18 %) εκδήλωσαν οξεία αντίδραση του ξενιστή στο μόσχευμα, εκ των οποίων 13 % (8/61) παρουσίασαν βαθμό τοξικότητας I – II, ενώ 5 % (3/61) βαθμό τοξικότητας III – IV, βρέθηκε δε σοβαρή σε τρεις ασθενείς. Η χρόνια αντίδραση του ξενιστή στο μόσχευμα, αναφέρθηκε ως σοβαρής μορφής ή ως αιτία θανάτου σε τρεις ασθενείς (Busilvex, 2008).

Μετά την κυκλοφορία της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης, παρατηρήθηκαν και αναφέρθηκαν επιπλέον, εμπύρετος ουδετεροπενία, θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, σύνδρομο λύσης όγκου, σοβαρές βακτηριακές, ιϊκές (π.χ. από κυτταρομεγαλοϊό, CMV) και μυκητιασικές λοιμώξεις και σήψη. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες προέρχονται από αυθόρμητες αναφορές για τις οποίες δεν μπορεί να εκτιμηθεί η συχνότητα και επομένως δεν μπορεί να θεωρηθεί βέβαιη η ύπαρξη αιτιολογικής σχέσης με την έκθεση στο φάρμακο (Busulfex TM , 2011).

A.3.10.γ. Ειδικές Προειδοποιήσεις – Προφυλάξεις

Όπως αναφέρεται και στην παράγραφο A.3.10.α, η βουσουλφάνη με βάση τα δεδομένα στους ανθρώπους, έχει ταξινομηθεί από την Διεθνή Επιτροπή για την Έρευνα στον Καρκίνο (IARC) ως καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συμπέρανε ότι υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης στη βουσουλφάνη και της εμφάνισης καρκίνου. Οι ασθενείς με λευχαιμία υπό αγωγή με βουσουλφάνη αναπτύσσουν αρκετές κυτταρολογικές ανωμαλίες και κάποιοι αναπτύσσουν καρκινώματα. Η βουσουλφάνη πιστεύεται ότι είναι λευχαιμιογόνος (Busilvex, 2008). Αναφέρονται 4 περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας μετά από χορήγηση βουσουλφάνης ως συμπληρωματικής χημειοθεραπείας μετά την χειρουργική εκτομή βρογχογενούς καρκινώματος σε μια ομάδα 243 ασθενών. Από αυτούς, 19 παρουσίασαν πανκυτταροπενία και 4 εξ' αυτών εμφάνισαν οξεία μυελογενή λευχαιμία και πέθαναν (WHO, 2012) (Bishop & Wassom, 1986). Επίσης, μελέτες σε ασθενείς με αληθή πολυκυτταραιμία και ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση, δείχνουν αυξημένη συχνότητα εκτροπής της νόσου προς λευχαιμία μετά τη θεραπεία με per os βουσουλφάνη (WHO, 2012). Συνεπώς, θα πρέπει να εξηγηθεί στον ασθενή ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης μιας δεύτερης κακοήθειας μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (Busilvex, 2008).

Η βουσουλφάνη μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα. Γι' αυτό, συνιστάται οι άνδρες υπό θεραπεία με βουσουλφάνη να μην τεκνοποιούν κατά τη διάρκεια της θεραπείας και έως έξι μήνες από την ολοκλήρωση της θεραπείας και να συμβουλεύονται για τη δυνατότητα κρυογονικής συντήρησης του σπέρματος πριν τη θεραπεία, λόγω της πιθανότητας μη αναστρέψιμης μείωσης της γονιμότητας που οφείλεται στη θεραπεία με το φάρμακο. Καταστολή της λειτουργίας των ωοθηκών και αμηνόρροια με εμμηνοπαυσιακά συμπτώματα απαντώνται συχνά σε προ – εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η θεραπεία με βουσουλφάνη σε προ – εφηβικά κορίτσια αναστέλλει την εμφάνιση της εφηβείας λόγω μη ανάπτυξης των ωοθηκών. Σε αγόρια ασθενείς έχουν αναφερθεί ανικανότητα, στειρότητα, αζωοσπερμία και ατροφία όρχεων. Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

αντενδείκνυται στις εγκύους, συνεπώς η χορήγηση ενδοφλέβιας βουσουλφάνης αντενδείκνυται κατά την εγκυμοσύνη. Σε προηγούμενη παράγραφο του κεφαλαίου αυτού, αναφέρεται ότι οι μελέτες σε ζώα έχουν δείξει αναπαραγωγική τοξικότητα (εμβρυϊκή θνησιμότητα και δυσμορφίες). Τα κλινικά δεδομένα σχετικά με τη χρήση βουσουλφάνης σε έγκυες γυναίκες είναι περιορισμένα. Έχουν αναφερθεί λίγες περιπτώσεις συγγενών ανωμαλιών με χαμηλή δόση per os βουσουλφάνης, οι οποίες, ωστόσο, δεν αποδίδονται απαραίτητα στη δραστική ουσία και η έκθεση κατά το τρίτο τρίμηνο μπορεί να σχετίζεται με μειωμένη ενδομήτρια αύξηση. Οι γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας πρέπει να χρησιμοποιούν αποτελεσματική αντισύλληψη κατά τη διάρκεια της θεραπείας και έως 6 μήνες μετά τη θεραπεία. Είναι άγνωστο εάν η βουσουλφάνη απεκκρίνεται στο ανθρώπινο γάλα. Επειδή έχει δείχθει η πιθανότητα καρκινογένεσης, σε μελέτες με ανθρώπους και ζώα, ο θηλασμός πρέπει να διακόπτεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Busilvex, 2008).

A.3.11. Η Βουσουλφάνη στην Κλινική Πράξη - Ενδείξεις- Δοσολογικό Σχήμα- Τρόπος χορήγησης- Αραίωση συμπυκνωμένου διαλύματος

Η ενδοφλέβια βουσουλφάνη έχει λάβει έγκριση για χορήγηση ακολουθούμενη από τη χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης (Bu/Cy2) ως θεραπεία προετοιμασίας πριν από τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε ενήλικες ασθενείς, όταν ο συνδυασμός θεωρείται η καλύτερη διαθέσιμη επιλογή. Επίσης, ακολουθούμενη από τη χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης (Bu/Cy4) ή μελφαλάνης (Bu/Mel), ενδείκνυται ως θεραπεία προετοιμασίας πριν από τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε παιδιατρικούς ασθενείς. Η συνιστώμενη δόση και το δοσολογικό σχήμα είναι 0,8 mg/kg σωματικού βάρους (ΣΒ) βουσουλφάνης, σε έγχυση δύο ωρών κάθε 6 ώρες, επί 4 διαδοχικές ημέρες, για ένα σύνολο 16 δόσεων, ακολουθούμενο από τη χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης 60 mg/kg/ημέρα επί 2 ημέρες, αρχόμενης τουλάχιστον 24 ώρες μετά από τη χορήγηση της 16^{ης} δόσης της βουσουλφάνης. Στα παιδιά ηλικίας από 0 – 17 ετών, η συνιστώμενη δοσολογία φαίνεται στον επόμενο πίνακα Α 7:

Πίνακας Α 7. Συνιστώμενη δοσολογία ενδοφλέβιας βουσουλφάνης σε παιδιατρικούς ασθενείς.

Παρόν σωματικό βάρος (kg)	Δόση Ενδοφλέβιας Βουσουλφάνης (mg/kg)
<9	1,0
9 έως < 16	1,2
16 έως 23	1,1
> 23 έως 34	0,95
> 34	0,8

Η χορήγηση της βουσουλφάνης ακολουθείται από 4 κύκλους των 50 mg/kg σωματικού βάρους κυκλοφωσφαμίδης (Bu/Cy 4) ή μία χορήγηση 140 mg/m² μελφαλάνης (Bu/Mel), αρχόμενης τουλάχιστον 24 ώρες μετά από τη χορήγηση της 16ης δόσης της βουσουλφάνης.

Συνιστάται η χορήγηση αντιεπιληπτικών (συνήθως φαινυτοΐνης ή βενζοδιαζεπινών) 12 ώρες πριν τη χορήγηση του φαρμάκου έως και 24 ώρες μετά την τελευταία χορήγησή του, καθώς και αντιεμετικών πριν την πρώτη δόση και να συνεχισθούν σε σταθερό πρόγραμμα, σύμφωνα με την εκάστοτε νοσοκομειακή πρακτική, κατά τη χορήγηση του φαρμάκου. Το διατιθέμενο στο εμπόριο σκεύασμα ενδοφλέβιας βουσουλφάνης πρέπει να αραιώνεται πριν από τη χορήγηση, είτε με χλωριούχο νάτριο 9 mg/mL (0,9 %) ενέσιμο διάλυμα ή με ενέσιμο διάλυμα γλυκόζης 5 %, ώστε να επιτυγχάνεται τελική συγκέντρωση περίπου 0,5 mg/mL βουσουλφάνης. Η ποσότητα του διαλύτη πρέπει να είναι 10 φορές ο όγκος του συμπυκνωμένου διαλύματος. Για παράδειγμα, για έναν ασθενή με Y kg βάρος σώματος η ποσότητα του συμπυκνωμένου διαλύματος είναι:

$$\frac{Y(\text{kg}) * \Delta (\text{mg/kg})}{6 (\text{mg/mL})} = A \text{ mL Διαλύματος προς διάλυση}$$

όπου Y : σωματικό βάρος του ασθενή σε kg, Δ : δόση του συμπυκνωμένου διαλύματος.

Η ποσότητα διαλύτη είναι: $(A \text{ mL συμπυκνωμένου Διαλύματος}) * 10 = B \text{ mL Διαλύτη}$

Για να ετοιμασθεί το τελικό διάλυμα για έγχυση χρησιμοποιείται μη πολυκαρβονική σύριγγα με προσαρμοσμένη βελόνα και ο υπολογισμένος όγκος συμπυκνωμένου διαλύματος πρέπει να ληφθεί από το φιαλίδιο και να μεταφερθεί σε ενδοφλέβιο σάκο (ή σύριγγα) που ήδη περιέχει την υπολογισμένη ποσότητα του διαλύτη που έχει επιλεγεί. Πρέπει πάντα το συμπυκνωμένο διάλυμα να προστίθεται στο διαλύτη, όχι ο διαλύτης στο συμπυκνωμένο διάλυμα. Το αραιωμένο διάλυμα πρέπει να αναμειχθεί πολύ καλά αναστρέφοντας αρκετές φορές και να είναι διαυγές άχρωμο διάλυμα. Ελλείψει μελετών σχετικά με τη συμβατότητα, δεν πρέπει να αναμειγνύεται με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα εκτός αυτών που αναφέρονται παραπάνω, ούτε να εγχέεται συγχρόνως με άλλο ενδοφλέβιο διάλυμα. Απαγορεύονται, επίσης, οι πολυκαρβονικές σύριγγες. Πρέπει πάντα να χορηγείται με ενδοφλέβια έγχυση μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα και αντενδείκνυται ταχεία ενδοφλέβια ένεση εφόδου (bolus) ή ενέσεις σε περιφερικές φλέβες. Για την παρασκευή του διαλύματος, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι διαδικασίες σωστού χειρισμού και απόρριψης αντικαρκινικών φαρμάκων και όλες οι διαδικασίες μεταφοράς απαιτούν αυστηρή τήρηση άσηπτων τεχνικών. Πρέπει να δίνεται προσοχή στον χειρισμό και την παρασκευή του διαλύματος: Συνιστάται η χρήση γαντιών και προστατευτικού ρουχισμού. Εάν το φάρμακο έλθει σε επαφή με το δέρμα ή τους βλεννογόνους, πρέπει να πλυθούν αμέσως και πολύ καλά με νερό. Η χημική και φυσική σταθερότητα κατά τη χρήση μετά την αραιώση έχει αποδειχθεί για 8 ώρες (συμπεριλαμβανομένου του χρόνου έγχυσης), όταν φυλάσσεται στους $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και για 12 ώρες μετά την αραιώση, όταν φυλάσσεται στους $2 \text{ }^{\circ}\text{C} - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ακολουθούμενες από 3 ώρες φύλαξης στους $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (συμπεριλαμβανομένου του χρόνου έγχυσης) (Busilvex, 2008).

A.3.12. Ανάγκη εξατομίκευσης των δόσεων της Βουσουλφάνης

A.3.12.α. Ανάγκη εξατομίκευσης των δόσεων της PER OS Βουσουλφάνης

Στοιχεία από τις υπάρχουσες μελέτες, συνηγορούν υπέρ του ότι η συνολική έκθεση στη βουσουλφάνη, εκφραζόμενη είτε ως συγκέντρωση στη σταθεροποιημένη κατάσταση (C_{ss}), είτε ως περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου (AUC), αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την έκβαση της μεταμόσχευσης, αφού έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση τοξικότητας, την απόρριψη του μοσχεύματος, την υποτροπή της νόσου και την επιβίωση (Nath & Shaw, 2007). Η φαρμακοκινητική της από του στόματος βουσουλφάνης παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις, τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ του ίδιου του ασθενούς στις διαφορετικές ημέρες χορήγησης του φαρμάκου. Είναι, επίσης, γνωστό ότι έχει ένα αρκετά στενό θεραπευτικό εύρος, το οποίο έχει γίνει προσπάθεια να προσδιοριστεί σε ενήλικες και παιδιά. Χαμηλά επίπεδα του φαρμάκου συνδέονται με απόρριψη μοσχεύματος και υποτροπή της υποκείμενης νόσου σε όλες τις ηλικίες, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου στη σταθεροποιημένη κατάσταση (C_{ss}) έχουν συσχετιστεί με αυξημένη τοξικότητα, κυρίως ηπατική (HVOD) και νευρολογική (Ciurea & Andersson, 2009).

Η συσχέτιση της συγκέντρωσης της βουσουλφάνης στη σταθεροποιημένη κατάσταση (C_{ss}) με την έκβαση της μεταμόσχευσης έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες. Σε μια από αυτές, προτάθηκε ότι τιμές συγκεντρώσεων στη σταθεροποιημένη κατάσταση (C_{ss}) τουλάχιστον 200 ng/mL είναι απαραίτητες προκειμένου αποφευχθεί η απόρριψη του μοσχεύματος από συμβατό αδελφό δότη, ενώ για να εξασφαλιστεί εμφύτευση του μοσχεύματος σε περιπτώσεις μερικής συμβατότητας ή μη συγγενών δοτών οι τιμές αυτές έπρεπε να είναι 600 ng/mL (Slattery, et al., 1995). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και δυο ακόμη μελέτες σε παιδιά, με διαφορετικές διαγνώσεις, στις οποίες διαπιστώθηκε ότι συγκεντρώσεις βουσουλφάνης στη σταθεροποιημένη κατάσταση (C_{ss}) μικρότερες από 600 ng/mL σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο απόρριψης του μοσχεύματος (Bolinger, et al., 2000) (McCune, et al., 2002). Επιπλέον, προτάθηκε η εφαρμογή TDM (Therapeutic Drug Monitoring) και η επακόλουθη προσαρμογή της δόσης, έτσι ώστε να επιτευχθούν και να διατηρηθούν συγκεντρώσεις μεταξύ 600 – 900 ng/mL, καθώς παρατηρήθηκε ότι βελτιώνει το ποσοστό επιτυχίας της εμφύτευσης (engraftment) από 74 % σε 94 % (Bolinger, et al., 2001). Ομοίως, σε παιδιά με β – θαλασσαιμία, που παρουσίαζαν χαμηλές συγκεντρώσεις στη σταθεροποιημένη κατάσταση και στα trough επίπεδα της πρώτης δόσης, παρατηρήθηκε απόρριψη του μοσχεύματος και προτάθηκε εφαρμογή TDM και προσαρμογή της δόσης, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος απόρριψης (Chandy, et al., 2005). Όσον αφορά την υποτροπή της νόσου, στα παιδιά, με οξεία μυελογενή λευχαιμία, δεν έχει διαπιστωθεί κάποια συσχέτιση με την AUC της βουσουλφάνης (Baker, et al., 2000) (Shaw, et al., 2004). Αντίθετα, στους ενήλικες, με χρόνια μυελογενή λευχαιμία, έχει βρεθεί ότι συγκεντρώσεις βουσουλφάνης στη σταθεροποιημένη κατάσταση (C_{ss}) μικρότερες από τη διάμεση τιμή (917 ng/mL) συνδέονται με αυξημένο ρυθμό υποτροπής της νόσου έως 38 % σε σχέση συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της διάμεσης τιμής και για το λόγο αυτό προτείνεται στόχευση συγκεκριμένης τιμής συγκέντρωσης του φαρμάκου (>900 ng/mL) (Slattery, et al., 1997).

Από την άλλη πλευρά, η ύπαρξη σχέσης μεταξύ της συστηματικής έκθεσης στη βουσουλφάνη και της εμφάνισης φλεβοαποφρακτικής νόσου του ήπατος (HVOD), παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Grochow et al. το 1989, κατά τη μελέτη μιας ομάδας 30 ασθενών που υπεβλήθησαν σε θεραπεία με βουσουλφάνη. Έξι από αυτούς, παρουσίασαν HVOD και οι πέντε εξ αυτών, είχαν υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου στο αίμα (Grochow, et al., 1989). Οι ίδιοι ερευνητές, στη συνέχεια, προσδιόρισαν το όριο έκθεσης στη βουσουλφάνη, πάνω από το οποίο ο κίνδυνος εμφάνισης HVOD αυξάνεται σημαντικά, και το οποίο ήταν τιμές $AUC > 1500 \mu M \cdot \min$ (Grochow, 1993). Μάλιστα, παρατήρησαν ότι η μέτρηση των επιπέδων του φαρμάκου και η επακόλουθη προσαρμογή της δόσης, οδήγησε στη μείωση της επίπτωσης της HVOD από 75 % σε 18 % σε αυτούς τους ασθενείς. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν και άλλοι ερευνητές, που αναφέρουν ότι 33 % των ασθενών με αρχικές τιμές $AUC > 1500 \mu M \cdot \min$ ανέπτυξαν τη συγκεκριμένη ηπατοτοξικότητα, έναντι 3 % των ασθενών με $AUC < 1500 \mu M \cdot \min$ (Dix, et al., 1996). Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που δεν υποστηρίζουν τη σχέση τοξικότητας και αυξημένης έκθεσης στη βουσουλφάνη (Schuler, et al., 1994), αλλά και μια μελέτη σε παιδιά με β – θαλασσαιμία που έδειξε το ακριβώς αντίθετο, ότι δηλαδή η επίπτωση της HVOD ήταν μεγαλύτερη στα παιδιά που είχαν χαμηλές τιμές AUC (Chandy, et al., 2005). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων είναι δοσοεξαρτώμενη στα παιδιά (Vassal, et al., 1990).

Η εφαρμογή TDM και η επακόλουθη προσαρμογή της δόσης της βουσουλφάνης, ώστε να επιτευχθεί έκθεση εντός του καθορισμένου θεραπευτικού εύρους, φαίνεται ότι μπορεί να βελτιώσει την έκβαση των ασθενών, μειώνοντας τον κίνδυνο της σχετιζόμενης με τη θεραπεία θνητότητας (Ljungman, et al., 1997). Σε παρόμοιο αποτέλεσμα καταλήγει συγκριτική μελέτη σε ασθενείς, με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, που έλαβαν αγωγή με per os βουσουλφάνη και επακόλουθη προσαρμογή της δόσης ώστε να επιτευχθεί C_{ss} 600 – 900 ng/mL. Σε σύγκριση με τους ασθενείς στους οποίους δεν εφαρμόστηκε TDM, αλλά και με εκείνους που έλαβαν διαφορετική αγωγή προετοιμασίας, παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή TDM για την per os βουσουλφάνη και η εξατομίκευση της δόσης της, με βάση τις μετρούμενες συγκεντρώσεις, μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο θνητότητας που δεν σχετίζεται με την υποτροπή της νόσου και βελτιώνει την επιβίωση (Deeg, et al., 2000). Αλλά και μελέτες σε παιδιατρικούς ασθενείς, που έλαβαν το φάρμακο, αποδεικνύουν ότι η κλινική έκβαση των παιδιών, μετά τη μεταμόσχευση μυελού των οστών, μπορεί να βελτιωθεί περισσότερο με την εφαρμογή TDM και τη χορήγηση δόσης προσαρμοσμένης στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους του ασθενούς. Διαπιστώθηκε ότι η εξατομίκευση της δόσης της per os βουσουλφάνης βελτιώνει την έκβαση κατά την πρώιμη φάση μετά τη μεταμόσχευση, όπως φαίνεται από τη χαμηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης HVOD (3,4 % με προσαρμογή δόσης έναντι 24 % χωρίς προσαρμογή), και την επιβίωση την ημέρα 90 μετά τη μεταμόσχευση (Bleyzac, et al., 2001). Βελτίωση της τελικής έκβασης της μεταμόσχευσης και μείωση της τοξικότητας παρατηρήθηκε και σε παιδιά με προχωρημένο στάδιο αιματολογικής κακοήθειας, μετά από προσαρμογή της δόσης της βουσουλφάνης με βάση τα φαρμακοκινητικά δεδομένα της πρώτης δόσης. Ωστόσο, η μεγάλη μεταβλητότητα στην απορρόφηση και η εμετογόνος δράση του φαρμάκου συνεχίζουν να παραμένουν σημαντικά προβλήματα που είναι δύσκολο να επιλυθούν (Tran, et al., 2000). Εξαιτίας αυτού, δημιουργούνται μεγάλες διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων τόσο μεταξύ των

ασθενών, αλλά και στον ίδιο ασθενή από δόση σε δόση, που οδηγούν σε επισφαλείς εκτιμήσεις, με αποτέλεσμα σε ορισμένες περιπτώσεις παρά την εφαρμογή του TDM και τη προσαρμογή των δόσεων σημαντικός αριθμός ασθενών παραμένει έκτος θεραπευτικού εύρους συγκεντρώσεων (Nath & Shaw, 2007). Η εξατομίκευση, επομένως, της δόσης για την per os βουσουλφάνη με βάση τα παραπάνω, θεωρείται αρκετά διακινδυνευμένη. Αντίθετα, με την ενδοφλέβια χορήγηση παρατηρείται μικρότερη διακύμανση μεταξύ των ασθενών και μεταξύ των διαφορετικών ημερών χορήγησης (Andersson, et al., 2000), με αποτέλεσμα η στόχευση των επιπέδων να είναι πιο εύκολη. Εκτός αυτού, η ενδοφλέβια βουσουλφάνη μπορεί να χορηγηθεί μια φορά την ημέρα, κάτι το οποίο δεν είναι και τόσο εύκολο με το per os σκεύασμα που διατίθεται μόνο σε δισκία των 2 mg.

A.3.12.β. Ανάγκη εξατομίκευσης των δόσεων της IV Βουσουλφάνης

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το θεραπευτικό παράθυρο της βουσουλφάνης είναι μεταξύ 900 και 1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ για την περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου (AUC). Κατά τη διάρκεια κλινικών δοκιμών φάσης II με ενδοφλέβια βουσουλφάνη, το 90 % των τιμών AUC των ασθενών ήταν κάτω του ανώτερου ορίου AUC ($< 1500 \mu\text{M} \cdot \text{min}$) και τουλάχιστον το 80 % ήταν εντός του στοχευόμενου θεραπευτικού παράθυρου (900 – 1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) (Busilvex, 2008). Σε ενήλικες, με ΧΜΛ, διαπιστώθηκε συσχέτιση της τοξικότητας από τη θεραπεία (Regimen Related Toxicity, RRT) με την συστηματική έκθεση στην ενδοφλέβια βουσουλφάνη (AUC). Η συχνότητα εμφάνισης βλεννογονίτιδας, γαστρεντερικής τοξικότητας, ηπατοτοξικότητας (υπερχοληρυθριναιμία) και οξείας αντίδρασης του ξενιστή στο μόσχευμα (a – GVHD) αυξήθηκε με την αύξηση των τιμών της AUC. Επιπλέον, ο κίνδυνος θανάτου μετά τη μεταμόσχευση ήταν μειωμένος για τους ασθενείς με τιμές AUC εντός του εύρους 950 – 1520 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, ενώ αυξανόταν σημαντικά όταν οι τιμές AUC ήταν χαμηλότερες ή υψηλότερες από τα παραπάνω επίπεδα. Το τελευταίο, επιβεβαιώνει την ύπαρξη θεραπευτικού παραθύρου για την ενδοφλέβια βουσουλφάνη, το οποίο αποτελεί και το μοναδικό προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση των ασθενών με ΧΜΛ μετά τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με το σχήμα ενδοφλέβια βουσουλφάνη/κυκλοφωσφαμίδη (IV Bu/Cy2) (Andersson, et al., 2002). Στον πίνακα A 8 φαίνεται η κατανομή της τοξικότητας στους 36 ασθενείς που συμμετείχαν στην παραπάνω μελέτη.

Πίνακας A 8 : Κατανομή των Σοβαρών Ανεπιθύμητων Ενεργειών (Andersson, et al., 2002).

Κατανομή των Σοβαρών Ανεπιθύμητων Ενεργειών				
	Βλεννογονίτιδα (στοματίτιδα)	Γαστρεντερική Τοξικότητα	Ηπατοτοξικότητα	a GvHD
Αριθμός περιστατικών (%)	7 (19,4%)	6 (16,7%)	10 (27,8%)	12 (33,3%)

Συσχέτιση των επιπέδων της βουσουλφάνης με την εμφάνιση ηπατοτοξικότητας αναφέρεται και μετά τη χορήγηση ενδοφλέβιας βουσουλφάνης σε δόση 3,2 mg/kg μια φορά την ημέρα σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη. Λόγω αυξημένης έκθεσης στη βουσουλφάνη ($AUC > 6000 \mu M \cdot \text{min}$), παρατηρείται αυξημένη επίπτωση ΗVOD (Williams, et al., 2004). Προσφάτως, η κυκλοφωσφαμίδη αντικαταστάθηκε στις αγωγές προετοιμασίας, από ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο, τη φλουδαραβίνη, προκειμένου να μειωθεί η τοξικότητα. Και για αυτό το προπαρασκευαστικό σχήμα, έχει βρεθεί σύνδεση της συγκέντρωσης της βουσουλφάνης με την έκβαση της μεταμόσχευσης. Όπως φαίνεται από μελέτη σε 130 ασθενείς, που έλαβαν ενδοφλέβια βουσουλφάνη μια φορά την ημέρα με φλουδαραβίνη, οι 16 ασθενείς με τιμές $AUC > 6000 \mu M \cdot \text{min}$ παρουσίασαν μεγαλύτερη χωρίς υποτροπή θνησιμότητα (non relapse mortality, NRM) 100 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση σε σχέση με εκείνους που είχαν χαμηλότερα επίπεδα. Η αυξημένη έκθεση στη βουσουλφάνη συνδέεται με χειρότερη συνολική επιβίωση και επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (Progression Free Survival, PFS) και επομένως, η εφαρμογή TDM και η προσαρμογή τη δόσης συμβάλλει στην αποφυγή της τοξικότητας (Geddes, et al., 2008). Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζει και η μελέτη των Perkins et al. (Perkins, et al., 2011), σύμφωνα με τους οποίους η προσαρμογή της δόσης της βουσουλφάνης, με βάση τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους, μειώνει τους κινδύνους που σχετίζονται με τα υποθεραπευτικά ή τα τοξικά επίπεδα του φαρμάκου, όταν αυτό χορηγείται σε συνδυασμό με τη φλουδαραβίνη.

Όσον αφορά τον παιδιατρικό πληθυσμό, η επιτυχής ανάκαμψη μυελού που επιτεύχθηκε σε όλους τους ασθενείς ($n = 55$) κατά τις δοκιμές φάσης II, δεν επέτρεψε την αξιολόγηση των φαρμακοκινητικών/φαρμακοδυναμικών σχέσεων (ΦΚ/ΦΔ) με την αποτυχία της μεταμόσχευσης. Υποδηλώνει, όμως, την καταλληλότητα των στοχευμένων επιπέδων της περιοχής υπό την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου. Η εμφάνιση ΗVOD δε συσχετίστηκε με την παρατεταμένη έκθεση, καθώς από τους έξι ασθενείς, που εμφάνισαν την επιπλοκή αυτή, μόνο ένας είχε $AUC > 1500 \mu M \cdot \text{min}$. Στους ασθενείς με αυτόλογη μεταμόσχευση ($n = 27$), παρατηρήθηκε συσχέτιση ΦΚ/ΦΔ μεταξύ της στοματίτιδας και της περιοχής υπό την καμπύλη. Πιο συγκεκριμένα, 26/27 (96 %) παρουσίασαν ένα ή περισσότερα επεισόδια στοματίτιδας: 37 % (10/27) βαθμού 4, 37 % βαθμού 3 και 22 % βαθμών 1 ή 2. Μάλιστα, οι τιμές AUC έτειναν να αυξάνονται με τη σοβαρότητα της στοματίτιδας. Η μέση τιμή AUC στους ασθενείς με βαθμού 4 στοματίτιδα ήταν αρκετά μεγαλύτερη απ' ό,τι σε αυτούς με βαθμό < 4 ($1325 \pm 178 \mu M \cdot \text{min}$ για τους 10 ασθενείς και $1123 \pm 144 \mu M \cdot \text{min}$ για τους υπόλοιπους 17 ασθενείς, αντίστοιχα, $P < 0.05$) (Vassal, et al., 2008). Επιπλέον, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της χολερυθρίνης και της AUC, κατά την ανάλυση που περιλάμβανε ασθενείς με αυτόλογη και αλλογενή μεταμόσχευση (Busilvex, 2008). Όπως αναφέρεται και παραπάνω, το θεραπευτικό παράθυρο της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης για τους ενήλικες είναι μεταξύ 950 – 1520 $\mu M \cdot \text{min}$, μετά από χορήγηση κάθε 6 ώρες (Andersson, et al., 2002). Στα παιδιά, ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί απόλυτα. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι πιθανόν να ισχύει και στα παιδιά εκείνο των ενηλίκων, δηλαδή 950 – 1500 $\mu M \cdot \text{min}$ (Tran, et al., 2000) (Bleyzac, et al., 2001) (Hoffer, et al., 2004), ενώ άλλες υποστηρίζουν ένα στενότερο εύρος μεταξύ 900 – 1350 $\mu M \cdot \text{min}$ (Booth, et al., 2007) (Gaziev, et al., 2010). Έχει διαπιστωθεί ότι μεγάλο ποσοστό παιδιατρικών ασθενών (30 – 60 %) δεν μπορούν να επιτύχουν συγκεντρώσεις ή τιμές AUC εντός των παραπάνω ορίων μετά

την πρώτη δόση και απαιτείται προσαρμογή των επόμενων δόσεων για να επιτευχθεί ο στόχος (Dalle, et al., 2003). Προσομοιώσεις με τη μέθοδο Monte Carlo, που έγιναν για να αξιολογηθούν τα διάφορα δοσολογικά σχήματα και να προσδιοριστεί το βέλτιστο, έδειξαν ότι μόνο 56 – 60 % των ασθενών επιτυγχάνει τιμές AUC εντός του θεραπευτικού εύρους μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης, γεγονός που σημαίνει ότι ένα 40 % των ασθενών είναι θεωρητικά εκτεθειμένο σε τοξικές ή υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις, με τους κινδύνους που πιθανόν να συνεπάγεται αυτό. Το παραπάνω εύρημα, υποδεικνύει την ανάγκη εφαρμογής TDM στα παιδιά που λαμβάνουν ενδοφλεβίως βουσουλφάνη, ώστε να εξασφαλιστεί ότι σε εκείνους τους ασθενείς που βρίσκονται εκτός θεραπευτικού εύρους θα γίνει η κατάλληλη προσαρμογή της δόσης και θα βελτιωθεί το τελικό αποτέλεσμα, μέσω μείωσης του κινδύνου τοξικότητας ή απόρριψης ου μοσχεύματος. Για το σκοπό αυτό, προτάθηκε η συλλογή τριών δειγμάτων αίματος 2, 4 και 6 ώρες μετά την έναρξη χορήγησης της πρώτης δόσης, προκειμένου να υπολογιστεί το AUC (Booth, et al., 2007). Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων, έδειξαν ότι το βέλτιστο δοσολογικό σχήμα είναι 0,8 mg/kg για παιδιά ≤ 12 kg και 1,1 mg/kg για παιδιά > 12 kg. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες έρχονται σε αντίθεση με τα παραπάνω, καθώς κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των ίδιων ασθενών με διαφορετικό τρόπο, παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών (76,4 %) επιτυγχάνει μετά την πρώτη δόση AUC εντός θεραπευτικού παραθύρου, το οποίο μάλιστα ορίζεται ότι είναι 33 % ευρύτερο σε σχέση με το 900 – 1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, δηλαδή 900 – 1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$. Παρόμοιο αποτέλεσμα είχε και άλλη μελέτη σε 55 ασθενείς, όπου 91 % επιτυγχάνει το ευρύτερο παράθυρο AUC 900 – 1500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ μετά την πρώτη δόση. Και στις δυο αυτές μελέτες, οι δόσεις που χορηγήθηκαν είχαν ταξινομηθεί σε πέντε κατηγορίες ανάλογα με το βάρος των παιδιών και δεν εφαρμόστηκε TDM (Vassal, et al., 2008) (Nguyen, et al., 2004).

Μελέτη, σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες (0,2 – 21 ετών), έδειξε καλύτερη συνολική επιβίωση και επιβίωση χωρίς νόσο (Event Free Survival, EFS) με την εφαρμογή TDM και τη στόχευση ενός θεραπευτικού παραθύρου, με εύρος AUC 74 – 82 $\text{mg} \cdot \text{h/L}$ (4500 – 5000 $\text{mmol} \cdot \text{min/day}$) (Bartelink, et al., 2009), που είναι αντίστοιχο εκείνου των ενηλίκων (60 – 100 $\text{mg} \cdot \text{h/L}$ ή 3600 – 6000 $\text{mmol} \cdot \text{min/day}$) (Andersson, et al., 2002). Για τις τιμές αυτές, διαπιστώθηκε επίσης, μικρότερος κίνδυνος για απόρριψη του μοσχεύματος ή υποτροπή της νόσου, σε αντίθεση με τιμές AUC < 74 $\text{mg} \cdot \text{h/L}$, ενώ αυξημένη έκθεση στη βουσουλφάνη συνδέεται με μεγαλύτερη επίπτωση οξείας GVHD 2^{ου} – 4^{ου} βαθμού. Η προσθήκη μελφαλάνης στο σχήμα αυξάνει ακόμη περισσότερο την τοξικότητα, ενώ η επίπτωση τόσο της οξείας GVHD, όσο και της HVOD είναι τρεις φορές μεγαλύτερη στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με βουσουλφάνη (> 74 $\text{mg} \cdot \text{h/L}$), κυκλοφωσφαμίδη και μελφαλάνη, σε σχέση με εκείνους που είχαν την ίδια AUC βουσουλφάνης, αλλά δεν πήραν μελφαλάνη. Η επίπτωση και των δυο επιπλοκών, στους ασθενείς που έλαβαν το τριπλό σχήμα, ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα με AUC βουσουλφάνης > 74 $\text{mg} \cdot \text{h/L}$ απ' ό,τι σε εκείνους με AUC βουσουλφάνης < 74 $\text{mg} \cdot \text{h/L}$. Η τοξικότητα από τους πνεύμονες δεν συσχετίστηκε με τη βουσουλφάνη (Bartelink, et al., 2009). Αυξημένη ηπατοτοξικότητα, 3^{ου} /4^{ου} βαθμού, αναφέρεται και σε ασθενείς με ολικό AUC > 77000 $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$ (18757 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$), ενώ AUC < 74000 $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$ (18026 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$) ενοχοποιούνται για απόρριψη μοσχεύματος, γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη για εντατική εφαρμογή TDM και εξατομίκευση της δόσης προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η έκβαση της μεταμόσχευσης (Lee, et al., 2012). Αντίθετα,

σε κάποιες μελέτες δεν παρατηρήθηκε σαφής συσχέτιση μεταξύ της AUC και της ηπατοτοξικότητας σε παιδιά (Zwaveling, et al., 2005), ενώ σε άλλες οι ασθενείς που εμφάνισαν HVD είχαν χαμηλότερες μέγιστες συγκεντρώσεις C_{max} (Schechter, et al., 2007). Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι χαμηλά επίπεδα ενδοφλέβιας βουσουλφάνης ($AUC < 862 \mu M \cdot \min$) συνεισφέρουν σε μερικό χημεισμό, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα ($AUC > 1018 \mu M \cdot \min$) συσχετίζονται με πλήρη και συνεχόμενο χημεισμό σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία και επομένως, η στόχευση των επιπέδων της βουσουλφάνης συνεισφέρει στην εμφύτευση του μοσχεύματος σε αυτή την κατηγορία των ασθενών (McPherson, et al., 2011).

Την ανάγκη, όμως, για εφαρμογή TDM κατά τη διάρκεια θεραπείας με ενδοφλέβια βουσουλφάνη, υποστηρίζουν και άλλες μελέτες σε παιδιά. Μεγάλη διατομική και ενδοατομική μεταβλητότητα στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους (κάθαρση και AUC) της βουσουλφάνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση μια φορά την ημέρα, συγκρίσιμη με εκείνη του *per os* σκευάσματος, παρατηρήθηκε σε παιδιατρικούς ασθενείς και μάλιστα, οι διακυμάνσεις ήταν μεγαλύτερες στα παιδιά με ανοσοανεπάρκειες. Το αποτέλεσμα αυτό, υποδεικνύει ότι η εφαρμογή TDM είναι χρήσιμη για την ενδοφλέβια βουσουλφάνη, όπως επίσης και η ανάγκη προσδιορισμού των θεραπευτικών τιμών AUC για ομοιογενείς πληθυσμούς ασθενών (Nath, et al., 2008). Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι η εντατική μέτρηση των επιπέδων της βουσουλφάνης στο πλάσμα, για την εξατομίκευση της δόσης της, είναι απαραίτητη και συμβάλλει στην μείωση του κινδύνου για απόρριψη του μοσχεύματος, ενώ ταυτόχρονα μεγιστοποιεί το αντιλευχαιμικό αποτέλεσμα. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξε μελέτη, στην οποία παρά την εφαρμογή TDM, συνέχιζε να υπάρχει μεγάλη διατομική και ενδοατομική μεταβλητότητα και οι ασθενείς με χαμηλά και υψηλά επίπεδα βουσουλφάνης εμφάνισαν απόρριψη του μοσχεύματος και τοξικότητα, αντίστοιχα. Ο CV % για την κάθαρση του φαρμάκου κυμαινόταν από 7,7 – 38,7 % για κάθε ασθενή (διάμεση τιμή 14,3 %), ενώ για την AUC της πρώτης δόσης ήταν 26,5 % (Lee, et al., 2012). Το αποτέλεσμα αυτό, επιβεβαίωσε προηγούμενες παρατηρήσεις ερευνητών, οι οποίοι συστήνουν την εφαρμογή TDM κατά τη διάρκεια θεραπείας με ενδοφλέβια βουσουλφάνη χορηγούμενη δυο φορές την ημέρα, καθώς βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της αγωγής και μειώνει σημαντικά την τοξικότητα και τη θνητότητα που οφείλονται στη θεραπεία με υψηλές δόσεις βουσουλφάνης (Malar, et al., 2011). Επίσης, φαίνεται ότι βελτιώνει και τη συνολική επιβίωση των ασθενών μετά τη μεταμόσχευση, ιδίως στις ομάδες υψηλού κινδύνου για απόρριψη του μοσχεύματος ή υποτροπή της υποκείμενης νόσου (Bartelink, et al., 2008). Μελέτη, που συνέκρινε την έκβαση της μεταμόσχευσης σε 30 παιδιά που έλαβαν ενδοφλέβια βουσουλφάνη μια φορά την ημέρα με εφαρμογή TDM και σε 30 παιδιά που έλαβαν *per os* βουσουλφάνη χωρίς εφαρμογή TDM, κατέληξε ότι η ομάδα στην οποία μετρήθηκαν τα επίπεδα του φαρμάκου και προσαρμόστηκε κατάλληλα η δόση, είχε υψηλότερη επιβίωση χωρίς νόσο (Event Free Survival, EFS) και ρυθμό επιβίωσης (EFS: 30 % έναντι 83 %, $P < 0.001$, επιβίωση: 53 % έναντι 83 %, $P = 0.016$). Σε παρόμοιο αποτέλεσμα, καταλήγει και άλλη μελέτη σε παιδιά, η οποία υποστηρίζει ότι η χορήγηση βουσουλφάνης ενδοφλεβίως δυο φορές την ημέρα σε συνδυασμό με φλουδαραβίνη είναι αποτελεσματική και ασφαλής όταν πραγματοποιείται TDM (Tse, et al., 2009).

A.4. THERAPEUTIC DRUG MONITORING (TDM) ή ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

A.4.1. Ορισμός TDM – Κριτήρια Εφαρμογής – Εφαρμογή σε διάφορα φάρμακα – Χρήση στην Ογκολογία

Η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων φαρμάκου στο αίμα ή Therapeutic Drug Monitoring (TDM) περιλαμβάνει τη μέτρηση και ερμηνεία της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στα βιολογικά υγρά, με σκοπό την εξατομίκευση της δόσης του φαρμάκου για έναν συγκεκριμένο ασθενή (de Jonge, et al., 2005), προκειμένου να βελτιστοποιηθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα, να ελαχιστοποιηθεί η τοξικότητα του φαρμάκου ή και τα δύο (Alnaim, 2007). Η ερμηνεία του αποτελέσματος, που προέκυψε, απαιτεί τη γνώση των διαφόρων παραγόντων που μπορεί να το επηρεάσουν, όπως η κλινική κατάσταση του ασθενούς και τα δημογραφικά στοιχεία του, τα φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου, η ώρα δειγματοληψίας κλπ (Ghiculescu, 2008). Για να εφαρμοστεί TDM σε ένα φάρμακο, αυτό θα πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια όπως: η παρουσία σημαντικής ενδοατομικής ή διατομικής μεταβλητότητας στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους του, η ύπαρξη τεκμηριωμένης σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης του φαρμάκου και του φαρμακολογικού αποτελέσματος και ο στενός θεραπευτικός δείκτης. Επίσης, θα πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη, αξιόπιστη, αναλυτική μέθοδος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του φαρμάκου στα βιολογικά υγρά. Το TDM εφαρμόζεται σε διάφορες κατηγορίες φαρμάκων, όπως φάρμακα του καρδιαγγειακού συστήματος (διγοξίνη και αντιαρρυθμικά: πχ φλεκαϊνίδη, αμιωδαρόνη), αντιεπιληπτικά (βαλπροϊκό νάτριο, φαινυτοΐνη, λαμοτριγίνη, καρβαμαζεπίνη), αντιβιοτικά (αμινογλυκοσίδες, βανκομυκίνη), βρογχοδιασταλτικά (θεοφυλλίνη), ορισμένα ΜΣΑΦ, μερικά αντικαρκινικά (μεθοτρεξάτη), ανοσοκατασταλτικά (κυκλοσπορίνη, τακρόλιμους, σιρόλιμους) και αντικαταθλιπτικά φάρμακα (τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά και λίθιο) (Alnaim, 2007) (de Jonge, et al., 2005) (Ghiculescu, 2008). Για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων φαρμάκων στο πλάσμα, έχουν αναπτυχθεί αρκετές αναλυτικές μέθοδοι, και κυρίως χρωματογραφικές μέθοδοι (αέριος χρωματογραφία – GC, και υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC) και ανοσοχημικοί προσδιορισμοί (ραδιοανοσοπροσδιορισμός – RIA, ενζυμοανοσοπροσδιορισμός – EIA, φθορισμοανοσοπροσδιορισμός – FPIA) (de Jonge, et al., 2005).

Η εφαρμογή του TDM, στην ογκολογία, είναι περιορισμένη για διάφορους λόγους, ο σημαντικότερος εκ των οποίων είναι η έλλειψη καθορισμένου θεραπευτικού εύρους συγκεντρώσεων για πολλά από αυτά τα φάρμακα. Η εύρεση του θεραπευτικού παραθύρου για ένα συγκεκριμένο ογκολογικό φάρμακο δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι για τη θεραπεία του καρκίνου χορηγούνται, συνήθως, συνδυασμοί φαρμάκων, επομένως η ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ συγκέντρωσης και αποτελέσματος για ένα φάρμακο μπορεί να μην ισχύει ή να μην είναι η ίδια όταν χορηγείται σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά. Παρ' όλα αυτά, όμως, φαίνεται ότι το TDM μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση του κλινικού αποτελέσματος της χημειοθεραπείας, καθώς τα περισσότερα κυτταροτοξικά φάρμακα πληρούν τα κριτήρια του TDM, δηλαδή παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα στη φαρμακοκινητική τους και έχουν στενό θεραπευτικό δείκτη. Άλλωστε, τα τελευταία 15 χρόνια, έχουν διεξαχθεί μελέτες που καταδεικνύουν την ύπαρξη σχέσης

μεταξύ της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα και της τοξικότητας ή θεραπευτικών αποτελεσμάτων, για μια σειρά κυτταροτοξικών φαρμάκων. Οι περισσότερες, βέβαια, μελέτες περιορίζονται κυρίως στη σχέση έκθεσης στο φάρμακο και τοξικότητας, πρώτον λόγω της μεγάλης ετερογένειας των διαφόρων μορφών καρκίνου και δεύτερον, διότι ο χρόνος που μεσολαβεί από τη μέτρηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα μέχρι την εκτίμηση του κλινικού αποτελέσματος είναι πολύ μεγάλος σε σχέση με την εμφάνιση της τοξικότητας. Φάρμακα για τα οποία έχει αποδειχθεί το παραπάνω είναι η μεθοτρεξάτη, η 5 – φθοριουρακίλη, η καρβοπλατίνη, η βουσουλφάνη, η cisplatin, η ετοποσίδη, τενιποσίδη, τοποτεκάνη, μελφαλάνη, η κυτταραβίνη, η πακλιταξέλη (Alnaim, 2007) (de Jonge, et al., 2005).

A.4.2. Τεχνικές Εξατομίκευσης

Για την εξατομίκευση της δοσολογίας των φαρμάκων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι, οι οποίες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: 1) a priori τεχνικές, 2) δοκιμαστική δόση και 3) a posteriori τεχνικές (Alnaim, 2007). Οι a priori μέθοδοι δεν απαιτούν τη χρήση δεδομένων συγκέντρωσης, αλλά λαμβάνουν υπόψη μόνο τους παράγοντες του ασθενούς που είναι γνωστό ότι την επηρεάζουν. Επιτρέπουν, δηλαδή, την εκτίμηση της δόσης που πρέπει να χορηγηθεί σε έναν ασθενή για να επιτευχθεί η έκθεση – στόχος στο φάρμακο, στηριζόμενες σε μορφολογικά, βιολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του ατόμου, όπως το φύλο, ηλικία, βάρος σώματος, κρεατινίνη ορού, GFR κλπ. Χρησιμοποιώντας αυτά τα χαρακτηριστικά, μπορούν να αναπτυχθούν εξισώσεις ή τύποι από τους οποίους υπολογίζεται η βέλτιστη δόση, όπως συμβαίνει για την καρβοπλατίνη. Αλλά και οι εξελίξεις που έχουν σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στο πεδίο της φαρμακογενετικής, επιτρέπουν την εκτίμηση της καταλληλότητας και του κινδύνου της χορήγησης ενός φαρμάκου πριν την έναρξη της θεραπείας. Η εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας και των γονιδιακών μεταλλάξεων συμβάλλουν σημαντικά στον προσδιορισμό του βέλτιστου δοσολογικού σχήματος (Alnaim, 2007) (de Jonge, et al., 2005).

Η προσαρμογή της δόσης μπορεί να γίνει και με τη χορήγηση μιας δοκιμαστικής δόσης πριν την έναρξη της κανονικής θεραπείας (de Jonge, et al., 2005). Η διαδικασία περιλαμβάνει δυο στάδια: αρχικά, χορηγείται μια ενδιάμεσης κλίμακας μεγέθους δοκιμαστική δόση, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των φαρμακοκινητικών παραμέτρων, μετά από συλλογή δειγμάτων και στη συνέχεια, με βάση τους υπολογισμούς που έγιναν προσδιορίζεται η δόση που πρέπει να χορηγηθεί, ώστε να επιτευχθεί η έκθεση – στόχος στο φάρμακο (Alnaim, 2007). Η μέθοδος εφαρμόζεται για φάρμακα που ακολουθούν γραμμική κινητική (Alnaim, 2007) (de Jonge, et al., 2005) και συνήθως απαιτεί τη συλλογή αρκετών δειγμάτων αίματος, ενώ πολλές φορές συντελεί και στην καθυστέρηση της έναρξης της κανονικής θεραπείας (Alnaim, 2007).

Εκτός, όμως, των παραπάνω τεχνικών, για την εξατομίκευση της δόσης έχουν χρησιμοποιηθεί και τα νομογράμματα, τα οποία στηρίζονται στην ύπαρξη προηγουμένως τεκμηριωμένης σχέσης μεταξύ της μετρούμενης συγκέντρωσης σε κάποια χρονική στιγμή και μιας φαρμακοδυναμικής παραμέτρου. Με βάση αυτές τις σχέσεις μπορούν να προσδιοριστούν οι φαρμακοκινητικές παράμετροι για τον ασθενή και να υπολογιστεί η

απαιτούμενη δόση φαρμάκου. Η μέθοδος, η οποία έχει εφαρμοστεί για την 5 – φθοριουρακίλη, έχει αρκετά μειονεκτήματα, καθώς δεν λαμβάνει υπόψη τις διαφοροποιήσεις των άλλων φαρμακοκινητικών παραμέτρων για τον συγκεκριμένο ασθενή (de Jonge, et al., 2005).

Μια ακόμη μέθοδος προσαρμογής της δόσης των φαρμάκων περιλαμβάνει τον ακριβή προσδιορισμό των φαρμακοκινητικών παραμέτρων συγκεκριμένου ασθενούς και στη συνέχεια, με βάση αυτές, τον υπολογισμό του απαιτούμενου δοσολογικού σχήματος. Από τις μετρούμενες συγκεντρώσεις στη σταθεροποιημένη κατάσταση (όπου, ο ρυθμός χορήγησης του φαρμάκου ισούται με το ρυθμό απομάκρυνσης) μπορεί να υπολογιστεί η κάθαρση του φαρμάκου για τον συγκεκριμένο ασθενή,

$$\frac{CL}{F} (\text{ασθενούς}) = \frac{\text{dosing rate}}{C_{ss}(\text{μετρούμενη})} \quad \text{Εξίσωση (1)}$$

Όπου: CL η κάθαρση του ασθενούς, F η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, dosing rate ο ρυθμός χορήγησης του φαρμάκου (ισούται με $Dosing Rate = Dose/T$, όπου T = μεσοδιάστημα χορήγησης δόσεων) και C_{ss} η συγκέντρωση του φαρμάκου στη σταθεροποιημένη κατάσταση (Brunton, et al., 2008).

Στην πιο απλή περίπτωση της γραμμικής κινητικής, όπου η C_{ss} μεταβάλλεται ανάλογα με τη δόση, μπορεί να εφαρμοστεί η παρακάτω σχέση για τον υπολογισμό της νέας δόσης:

$$D_{new} = D_{old} * \left(\frac{C_{ss} \text{ target}}{C_{ss} \text{ measured}} \right) \quad \text{Εξίσωση (2)}$$

Όπου: D_{new} η προσαρμοσμένη δόση, D_{old} η δόση που χορηγούνταν πριν την προσαρμογή, $C_{ss} \text{ measured}$ η συγκέντρωση του φαρμάκου στη σταθεροποιημένη κατάσταση που μετρήθηκε και $C_{ss} \text{ target}$ η επιθυμητή συγκέντρωση σταθεροποιημένης κατάστασης.

Η μέθοδος αυτή, υπολογίζει με μεγάλη ακρίβεια την απαιτούμενη δόση, αλλά απαιτεί συλλογή πολλών δειγμάτων αίματος κατά τη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου και μετά το πέρας αυτής, προκειμένου να προσδιοριστούν οι φαρμακοκινητικές παράμετροι και επομένως απαιτεί σημαντική πειραματική εργασία. Αυτό, συντελεί σε δυσκολία εφαρμογής της στην κλινική πράξη. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα, αναπτύχθηκαν στρατηγικές που περιλαμβάνουν τη λήψη μικρού αριθμού δειγμάτων ικανών όμως για να προσδιοριστούν με ακρίβεια και γρήγορα οι παράμετροι.

Στη βάση αυτή, για την εξατομίκευση της δοσολογίας χρησιμοποιείται και η Μπαεσιανή προσέγγιση. Με βάση αυτήν, κατά την εκτίμηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων ενός ασθενούς, λαμβάνεται υπόψη η προϋπάρχουσα πληροφορία (prior) που έχει προκύψει από ένα πληθυσμιακό φαρμακοκινητικό μοντέλο. Το μεγάλο της πλεονέκτημα είναι ότι μπορεί να γίνει εκτίμηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων ενός ασθενούς με μεγάλη ακρίβεια ακόμη και με ένα μόνο σημείο δειγματοληψίας (Alnaim, 2007) (de Jonge, et al., 2005).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός, της παρούσας εργασίας, ήταν η διεξαγωγή μιας αναδρομικής μελέτης με στόχο την ανάπτυξη αξιόπιστης μεθόδου εξατομίκευσης της δοσολογίας της βουσουλφάνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε ασθενείς που λαμβάνουν το φάρμακο σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη ή άλλο κυτταροτοξικό παράγοντα, ως αγωγή προετοιμασίας πριν την αυτόλογη ή αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η βουσουλφάνη μέχρι πρόσφατα ήταν διαθέσιμη μόνο υπό μορφή δισκίων των 2 mg και η χορήγηση της γινόταν σε δόση 1 mg/kg βάρους σώματος κάθε 6 ώρες επί τέσσερις συνεχόμενες ημέρες και ακολουθούσε η χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης ενδοφλεβίως σε δόση 60 mg/kg/ημέρα για δυο ημέρες. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί μεγάλη διακύμανση στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους της από του στόματος (per os) βουσουλφάνης σε παιδιά και ενήλικες. Η βουσουλφάνη έχει ένα αρκετά στενό θεραπευτικό παράθυρο (εκφραζόμενο ως επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου, AUC), γεγονός που σημαίνει ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις πλάσματος συνδέονται με απόρριψη του μοσχεύματος και αύξηση των υποτροπών της υποκείμενης νόσου, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις έχουν συσχετιστεί με αυξημένη τοξικότητα, κυρίως από το ήπαρ (φλεβοαποφρακτική νόσος του ήπατος, HVOD) και από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε και εγκρίθηκε από τον FDA και στη συνέχεια από τον EMA ένα ενδοφλέβιο (IV) σκεύασμα βουσουλφάνης (Busilvex®) με το οποίο επιτυγχάνονται σταθερότερα και πιο προβλέψιμα επίπεδα πλάσματος σε σχέση με την από του στόματος μορφή. Το συνιστώμενο δοσολογικό σχήμα είναι 3,2 mg/kg διαιρεμένα σε 4 δόσεις την ημέρα (άρα 0,8 mg/kg κάθε 6 ώρες) για 4 συνεχόμενες ημέρες. Η χορήγηση γίνεται με δίωρη έγχυση μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα. Τελευταία, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η επίτευξη επιπέδων φαρμάκου στα πλαίσια του θεραπευτικού παραθύρου επιτυγχάνεται καλύτερα με χορήγηση της συνολικής δόσης του φαρμάκου μια φορά ημερησίως, δηλαδή 3,2 mg/kg/ημέρα με τρίωρη έγχυση μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα. Παρόλα αυτά, ακόμα και με την ενδοφλέβια βουσουλφάνη σε ορισμένες ομάδες ασθενών, όπως είναι τα παιδιά, παρατηρούνται αρκετές διακυμάνσεις των επιπέδων πλάσματος τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ του ίδιου ασθενούς στις διαφορετικές ημέρες χορήγησης του φαρμάκου. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η συγχορήγηση και άλλων φαρμάκων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα επίπεδα τόσο της per os όσο και της IV βουσουλφάνης. Για όλους αυτούς τους λόγους, αλλά και για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού θεραπευτικού αποτελέσματος (επιτυχής μεταμόσχευση, εξάλειψη της υποκείμενης νόσου, μείωση της τοξικότητας) θεωρείται χρήσιμη η μέτρηση των επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα την πρώτη ημέρα θεραπείας και η προσαρμογή της δοσολογίας κατά τη χορήγηση του φαρμάκου τις επόμενες ημέρες. Το θεραπευτικό παράθυρο για τη βουσουλφάνη έχει υπολογιστεί με βάση φαρμακοκινητικές μελέτες σε παιδιά και ενήλικες, που υπόκεινται σε μεταμόσχευση και συμμετείχαν σε κλινικές δοκιμές, και έχει εύρος 900 – 1350 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$. Για τη χορήγηση μια φορά την ημέρα τα όρια τετραπλασιάζονται και είναι 3600 – 5400 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$. Με αφορμή τα παραπάνω συλλέχθηκαν δείγματα αίματος ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ενδοφλέβια βουσουλφάνη, με δοσολογικό σχήμα 3,2 mg/kg βάρους σώματος μια φορά την ημέρα, για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες και προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, HPLC. Υπολογίστηκαν οι επιφάνειες κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου μετά την πρώτη δόση και έγινε

αξιολόγηση των τελευταίων σε σύγκριση με το θεραπευτικό εύρος. Στη συνέχεια, στους ασθενείς που εμφάνισαν υποθεραπευτικά ή τοξικά επίπεδα έγινε εικονική εξατομίκευση, υπολογίστηκε δηλαδή η δόση που έπρεπε να είχε χορηγηθεί, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό AUC. Επίσης, έγινε προσπάθεια ελέγχου της επαναληψιμότητας των τιμών AUC στις διαφορετικές ημέρες χορήγησης, ενώ τέλος αξιολογήθηκαν και σχολιάστηκαν οι δυσκολίες και τα πιθανά λάθη κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

B.1.1. Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά τέσσερις ασθενείς, οι οποίοι έπασχαν από κάποια κακοήγη ή μη, αιματολογική νόσο και υπεβλήθησαν σε αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών με σχήμα προετοιμασίας (*preparative regimen*) που περιελάμβανε τη χορήγηση ενδοφλέβιας βουσουλφάνης σε συνδυασμό με κάποιον άλλο κυτταροτοξικό παράγοντα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το μεταμοσχευτικό κέντρο μυελού των οστών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πάτρας (Ρίου), υπό την επίβλεψη του υπεύθυνου προγράμματος και Επίκουρου Καθηγητή κ. Αλέξανδρου Σπυριδωνίδη. Η επιλογή και η ένταξη των ασθενών στη μελέτη διήρκησε από τον Δεκέμβριο 2010 μέχρι και τον Ιούλιο 2012.

Σύμφωνα με τις οδηγίες, ο κάθε ασθενής πριν τη μεταμόσχευση μυελού των οστών λαμβάνει αγωγή προετοιμασίας (συνήθως με υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας) για 5 – 7 ημέρες και ακολουθεί μετά από 1 – 2 ημέρες η χορήγηση του μυελικού μοσχεύματος. Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι ασθενείς έλαβαν για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες βουσουλφάνη ενδοφλεβίως και ακολούθησε η χορήγηση του δεύτερου κυτταροτοξικού παράγοντα. Σύμφωνα με την ένδειξη, όλοι οι ασθενείς έλαβαν δόση βουσουλφάνης 3,2 mg/kg μια φορά την ημέρα με τρίωρη ενδοφλέβια έγχυση μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα. Η θεραπεία με βουσουλφάνη διήρκεσε τέσσερις συνεχόμενες ημέρες. Σε όλους τους ασθενείς με βάση τις οδηγίες προηγήθηκε χορήγηση αντιεπιληπτικής αγωγής για πρόληψη της εμφάνισης σπασμών και αντιεμετικής αγωγής.

B.1.2. Πρωτόκολλο – Συλλογή δειγμάτων από ασθενείς που έλαβαν βουσουλφάνη μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα

Από κάθε ασθενή που έλαβε βουσουλφάνη στα πλαίσια της αγωγής προετοιμασίας πριν τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, επιδιώχθηκε να ληφθούν δεκαέξι συνολικά δείγματα, τέσσερα για κάθε ημέρα θεραπείας. Η συλλογή των δειγμάτων γινόταν ακριβώς πριν τη χορήγηση του φαρμάκου, αμέσως μετά τη διακοπή της ενδοφλέβιας έγχυσης, μια και έξι ώρες μετά τη διακοπή της χορήγησης της βουσουλφάνης. Το πρώτο δείγμα που συλλέχθηκε πριν τη χορήγηση της πρώτης δόσης της βουσουλφάνης αποτέλεσε το blank sample του κάθε ασθενούς. Τα υπόλοιπα δείγματα της πρώτης ημέρας συλλέχθηκαν 3, 4, 9 ώρες μετά την έναρξη της χορήγησης, ώστε να αντιστοιχούν στις προαναφερθείσες ώρες δειγματοληψίας. Για τις υπόλοιπες τρεις ημέρες θεραπείας, το δειγματοληπτικό σχήμα επαναλήφθηκε κατά τον ίδιο τρόπο, δηλαδή συλλέγονταν τέσσερα δείγματα κάθε ημέρα ως εξής: ακριβώς πριν την έναρξη χορήγησης της επόμενης δόσης του φαρμάκου (trough επίπεδα), μόλις διεκόπη η έγχυση (peak επίπεδα), 1 ώρα και 6 ώρες μετά τη διακοπή της χορήγησης. Η χορήγηση του φαρμάκου γίνεται με τρίωρη έγχυση μέσω

κεντρικού φλεβικού καθετήρα, ενώ η αιμοληψία πρέπει να γίνεται από περιφερική φλέβα. Μετά τη συλλογή κάθε δείγματος αίματος σε κατάλληλο σωληνάκι, όγκου 5 mL, με αντιπηκτικό (EDTA), ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές/min (rpm) για 10 λεπτά στους 20°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης παραλαμβάνονταν με προσοχή το πλάσμα και μεταφερόταν σε πλαστικούς σωλήνες τύπου erendorf, οι οποίοι φυλάσσονταν στον υπερκαταψύκτη στους - 70 °C, μέχρι να γίνει η ανάλυση. Κάθε περιέκτης έφερε ετικέτα με τα στοιχεία του ασθενούς από τον οποίο είχε παραληφθεί το δείγμα, το χρονικό σημείο αιμοληψίας και την ημέρα χορήγησης της υπό προσδιορισμό ουσίας.

Για δυο ασθενείς συλλέχθηκαν δεκαέξι δείγματα συνολικά, ενώ για τους άλλους δυο υπήρχαν μόνο δώδεκα δείγματα. Στον έναν από αυτούς, τα δείγματα αφορούσαν τις ημέρες χορήγησης 1, 2 και 3 (ασθενής No 1), ενώ στο άλλο (ασθενής No 2) δεν υπήρχαν δείγματα για την πρώτη ημέρα χορήγησης του φαρμάκου και μετρήθηκαν μόνο εκείνα των ημερών 2, 3 και 4.

B.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

B.2.1. Οργανολογία

- Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)
 - ✓ Αυτόματος δειγματολήπτης SIL-HTC AUTOSAMPLER SHIMADZU
 - ✓ Αντλία UFLC SHIMADZU, μοντέλο LC 20 AD Prominence (Shimadzu USA, Inc Canby, OR, USA)
 - ✓ Ανιχνευτής υπεριώδους ορατού GBC LC 1210 UV/Vis
 - ✓ Ηλεκτρονικός Υπολογιστής εξοπλισμένος με το πρόγραμμα LC SOLUTIONS
- Χρωματογραφική Στήλη Hypersil BDS – C18 με διάμετρο σωματιδίων 5 μm και διαστάσεις 150 x 4.6 mm (Thermo Scientific) και προσθήκη Hypersil BDS – C18 διαστάσεων 10 x 4.6 mm, διάμετρος σωματιδίων 5 μm
- Λουτρό Υπερήχων ELMA S 100H Elmasonic
- Συσκευή διήθησης διαλυτών υπό κενό αντλίας KNF LAB Laborport, με φίλτρα μεμβράνης Nylon, μεγέθους πόρων 47 mm x 0,45 μm (Chronus Filter, UK)
- Σύστημα παροχής ύδατος υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (για αναλύσεις HPLC) Labconco® water Pro PS (18 MΩ*cm)
- Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός Kern AEJ, με δυνατότητα ζύγισης ποσοτήτων από 10 mg έως 220 g, (Kern, Balingen, Germany)
- Συσκευή περιδίνησης (Vortex) IKA® MS 3 BASIC, 0 – 3000 1/min
- Φυγόκεντρος Digi Cen 20, RPM max 16500 με κεφαλή 18 θέσεων
- Συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αζώτου Techne Dri Block® DB – 3 Sample Concentrator, με διακόπτη ρύθμισης της θερμοκρασίας.

Άλλα υλικά και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της ανάλυσης και της κατεργασίας των δειγμάτων ήταν: Φυγοκεντρικά γυάλινα σωληνάκια με κωνικό πάτο, μικροί και μεγάλοι δοκιμαστικοί σωλήνες, γυάλινες πιπέτες Pasteur, σπάτουλα ζύγισης, γυάλινα σιφώνια των 10 mL και 25 mL, πουάρ, μικρό ποτήρι ζέσεως για απόρριψη της περίσσειας διαλυτών. Επίσης, ογκομετρικές φιάλες των 10 mL και 25 mL, ογκομετρικός κύλινδρος 1 L, γυάλινα μπουκάλια φύλαξης 1 L και 2 L για την κινητή φάση και των 100 mL για τη φύλαξη των διαλυμάτων παρακαταθήκης και των άλλων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν, πιπέτες Transferpette® S Brand με δυνατότητα μέτρησης όγκου 20 – 200 μL, 100 – 1000 μL και 0,5 – 5 mL και τα αντίστοιχα tips.

B.2.2. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

- ✓ Ύδωρ (H₂O), υψηλής αναλυτικής καθαρότητας καθαρότητας, για αναλύσεις HPLC.
- ✓ Μεθανόλη (MeOH), βαθμού καθαρότητας 99,99 %, για χρωματογραφική ανάλυση HPLC, της εταιρείας Fischer Chemical (UK).
- ✓ Οξικός αιθυλεστέρας (CH₃COOCH₂CH₃), βαθμού καθαρότητας 99,8 %, για χρωματογραφική ανάλυση HPLC, της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany).
- ✓ Διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), βαθμού καθαρότητας 99,99 %, για χρωματογραφική ανάλυση HPLC, της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany).
- ✓ Βου σουλφάνη (Busulfan), καθαρή ουσία της εταιρείας Sigma Aldrich (Austria – Chemobiotin, Athens), Lot No BCBF0893V, CAS No 55-98-1
- ✓ Sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (DDTC) (C₅H₁₀NNaS₂*3H₂O) Mr = 225,31 g/mol, καθαρότητας ≥97%, της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany)
- ✓ 1,6 – δις(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξάνιο [1,6 bis(methanesulfonyloxy)hexane]

Σύνθεση του 1,6 – bis(methanesulfonyloxy)hexane

Το 1,6 – bis(methanesulfonyloxy)hexane, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο κατά τη μέθοδο προσδιορισμού της βου σουλφάνης σε πλάσμα αίματος ασθενών, παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ από τον κ. Σταύρο Τζίμα. Η αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας περιέχεται στη Διατριβή Ειδίκευσης της κ. Ειρήνης Παναγοπούλου (Παναγοπούλου, 2012) και είναι παραλλαγή της διαδικασίας που παρουσιάζεται στην βιβλιογραφία (Chen, et al., 1988) (Rifai, et al., 1997).

B.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων

Διάλυμα Παρακαταθήκης Βου σουλφάνης (Stock Solution Busulfan)

Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης της βου σουλφάνης, ζυγίζονται 15 mg πρότυπης ουσίας και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Ακολουθεί διάλυση και αραιώση με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι τη χαραγή της φιάλης, ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 600 µg/mL (ppm). Το διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution) μεταφέρεται στη συνέχεια σε γυάλινο μπουκάλι των 100 mL και φυλάσσεται στο ψυγείο στους 4 °C.

Διαλύματα Εργασίας Βουσουλφάνης (Busulfan Working Solutions)

Από το παραπάνω διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευάζονται κάθε φορά τα διαλύματα εργασίας (working solutions) της βουσουλφάνης, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς σε πλάσμα ασθενών. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας της βουσουλφάνης παρασκευάζονταν για 7 επίπεδα συγκεντρώσεων με εύρος από 5 έως 187,5 µg/mL (5, 15, 30, 50, 70, 125, 187,5 µg/mL). Οι τιμές αυτές συγκεντρώσεων αντιστοιχούν σε τελικές συγκεντρώσεις σε πλάσμα αίματος 0,2 – 7,5 µg/mL (0,2 , 0,6 , 1,2 , 2,0 , 2,8 , 5,0 , 7,5 µg/mL). Η τελική αραιώση γίνεται με οξικό αιθυλεστέρα σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL. Για το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης κατασκευάζονταν 3 δείγματα και λαμβανόταν υπόψη ο μέσος όρος τους.

Διάλυμα Παρακαταθήκης του 1,6 – δις(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξανίου

Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου, ζυγίζονται 15 mg του 1,6 – δις(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξανίου και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Ακολουθεί διάλυση και αραιώση με οξικό αιθυλεστέρα μέχρι τη χαραγή, ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 600 µg/mL (ppm). Το διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution) μεταφέρεται στη συνέχεια σε γυάλινο μπουκάλι των 100 mL και φυλάσσεται στο ψυγείο στους 4 °C.

Διάλυμα εργασίας του 1,6 – δις(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξανίου

Από το παραπάνω διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευαζόταν κάθε φορά διάλυμα εργασίας (working solution) 1,6 – δις(μεθανοσουλφονυλοξυ)εξανίου τελικής συγκέντρωσης 45 µg/mL. Η παρασκευή γινόταν με μεταφορά 750 µL του διαλύματος παρακαταθήκης σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώση μέχρι τη χαραγή με οξικό αιθυλεστέρα.

Παρασκευή διαλύματος του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης Sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (DDTC)

Το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης (DDTC) φυλάσσεται στο ψυγείο στους 2 – 8 °C. Από αυτό ζυγίζονται 410 mg και μεταφέρονται σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα, όπου διαλύονται σε 5 mL ύδατος βαθμού καθαρότητας HPLC, με ταυτόχρονη έντονη περιδίγιση (vortex). Το διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 82 mg/mL παρασκευάζεται λίγα λεπτά πριν τη χρήση του.

Παρασκευή της κινητής φάσης

Πρόκειται για μίγμα μεθανόλης και νερού σε εκατοστιαία αναλογία 80:20 v/v. Η παρασκευή της γίνεται με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου και με ιδιαίτερη φροντίδα ως προς την ακρίβεια της αναλογίας. Η κινητή φάση πριν τη διοχέτευσή της στο χρωματογραφικό σύστημα υφίσταται διήθηση υπό κενό, σε συσκευή διήθησης διαλυτών υπό κενό αντλίας

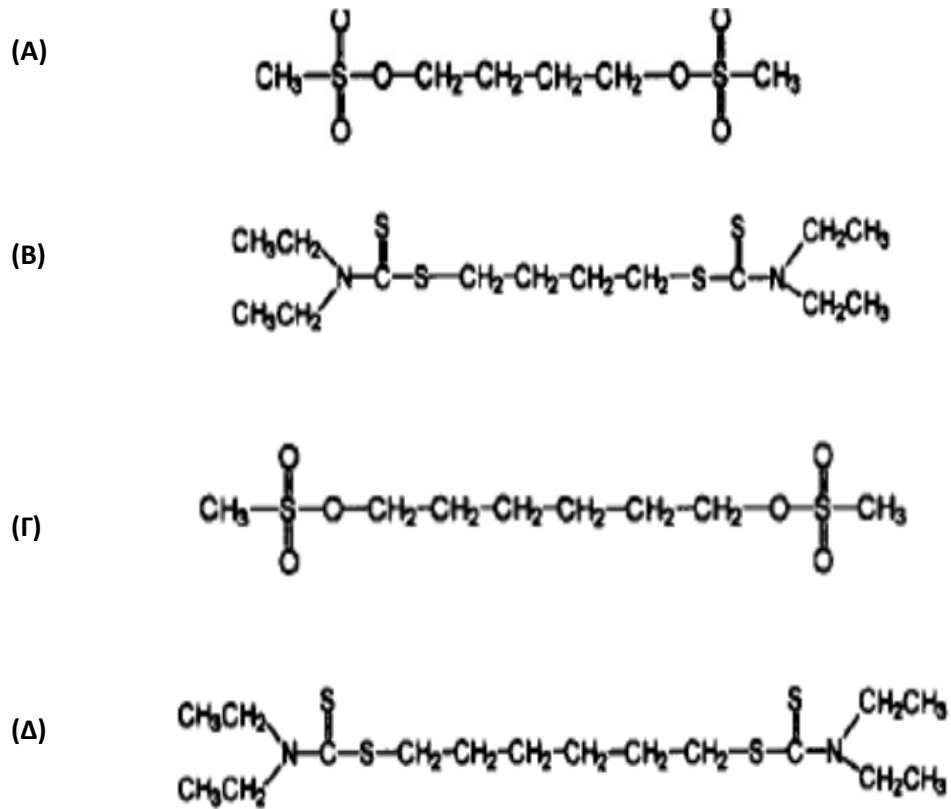
KNF LAB Laborport, μέσω φίλτρων μεμβράνης Nylon, μεγέθους πόρων 47 mm x 0,45 μm (Chronus Filter, UK), με σκοπό την εξασφάλιση της μέγιστης δυνατής καθαρότητας της, ώστε να αποφευχθεί η απόφραξη της στήλης και των υπόλοιπων στενών σωληνώσεων από τυχόν σωματίδια. Ταυτόχρονα, με τη διήθηση υπό κενό επιτυγχάνεται και σε ένα βαθμό απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να περιορίζεται ο κίνδυνος βλάβης του χρωματογραφικού συστήματος από τη διέλευση φυσαλίδων αέρα. Στη συνέχεια υπερηχείται σε λουτρό υπερήχων ELMA S 100H Elmasonic για 20 λεπτά.

B.2.4. Σύνθεση του παραγώγου της Βου σουλφάνης με το DDTC

Η σύνθεση του 1,4 – δις(δισουλφιδιοκαρβαμοϋλ)βουτανίου, του παραγώγου της βου σουλφάνης με το DDTC, πραγματοποιείται με τον παρακάτω τρόπο: αφού γίνει η εκχύλιση της βου σουλφάνης από το πλάσμα με διχλωρομεθάνιο και η εξάτμιση μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου (N₂) στους 50 – 60 °C, ακολουθεί προσθήκη 125 μL από το διάλυμα του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης που παρασκευάστηκε με τον τρόπο που αναφέρεται στην προηγούμενη παράγραφο. Στη συνέχεια, γίνεται vortex για μερικά δευτερόλεπτα και ακολουθεί ήπια ανάδευση για 5 λεπτά. Ταυτόχρονα γίνεται παραγωγοποίηση και του εσωτερικού προτύπου. Στην εικόνα Β 1 φαίνονται οι χημικοί τύποι της βου σουλφάνης, του εσωτερικού προτύπου και των παραγώγων τους με το DDTC.

B.2.5. Πλάσμα αίματος

Για την παρασκευή εμβολιασμένων πρότυπων δειγμάτων βου σουλφάνης σε πλάσμα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε πλάσμα από ετερογενή ομάδα ατόμων, που δεν είχαν λάβει το φάρμακο. Το πλάσμα φυλασσόταν στην υπερκατάψυξη στους – 70° C και αποψυχόταν την ημέρα της ανάλυσης περίπου 30 – 60 λεπτά πριν τη χρήση προκειμένου να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα Β 1. Χημική Δομή της Βουσουλφάνης (Α), του παραγώγου της με το DDTC 1,4 – δις(διαιθυλδιθειοκαρβαμοϋλ)βουτανίου (Β), του εσωτερικού προτύπου 1,6 – δις(μεθανοσουλφονοξυ)εξάνιου (Γ) και του παραγώγου του με το DDTC 1,6 – δις(διαιθυλδιθειοκαρβαμοϋλ)εξανίου (Δ) (Heggie, et al., 1997).

B.2.6. Χρωματογραφικές Συνθήκες – Πορεία Ανάλυσης

B.2.6.α. Χρωματογραφικές Συνθήκες

Η στήλη και η προστήλη που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στην ενότητα B.2.1. Η κινητή φάση είναι μίγμα μεθανόλης και νερού σε εκατοστιαία αναλογία 80:20 v/v. Με αυτή την κινητή φάση επιτυγχάνεται έκλυση της παραγωγοποιημένης βουσουλφάνης [1,4 – δις(δισουλφιδιοκαρβαμοϋλ)βουτανίου] και του παραγωγοποιημένου εσωτερικού προτύπου [1,6 – δις(δισουλφιδιοκαρβαμοϋλ)εξανίου], στα 7,5 min και στα 13,5 min, αντίστοιχα. Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 15 min. Πριν τη χρήση της η κινητή φάση διηθείται υπό κενό μέσω φίλτρων μεμβράνης Nylon, μεγέθους πόρων 47 mm x 0,45 μm, και ταυτόχρονα απαερώνεται σε ένα βαθμό, ενώ στη συνέχεια υπερηχείται για 20 λεπτά. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίζεται σε 1 mL/min και το χρωματογραφικό σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει τουλάχιστον για 1 ώρα πριν την ανάλυση. Ο ενιόμενος όγκος του δείγματος από τη βελόνα του αυτόματου δειγματολήπτη είναι 20 μL. Η απορρόφηση του παραγώγου της βουσουλφάνης μετράται με ρύθμιση του μήκους κύματος (λ) του ανιχνευτή στα 251 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, στους 25° C. Μετά το τέλος της ανάλυσης η στήλη ξεπλένεται με την κινητή φάση και την ίδια ροή για μία περίπου ώρα. Στον πίνακα B 1 παρατίθενται συνοπτικά οι συνθήκες του χρωματογραφήματος.

Πίνακας B 1. Συνθήκες χρωματογραφήματος.

Χρόνος	15 min
Μήκος κύματος UV	251 nm
Στήλη	BDS C18 150 x 4.6 mm, διάμετρος σωματιδίων 5 μm
Προστήλη	BDS C18 10 x 4.6 mm, διάμετρος σωματιδίων 5 μm
Κινητή φάση	MeOH / H ₂ O (80/20 v/v)
Ροή	1 mL/min

B.2.6.β. Παρασκευή προτύπων δειγμάτων σε πλάσμα αίματος – Κατασκευή καμπύλης αναφοράς στο πλάσμα

Βήμα 1ο: Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων εργασίας της βουσουλφάνης

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της βουσουλφάνης σε πλάσμα αίματος ασθενών, παρασκευάζονταν 7 επίπεδα συγκεντρώσεων πρότυπων διαλυμάτων εργασίας του φαρμάκου, με μεταφορά 80, 250, 500, 850, 1000, 2000, 3000 µL αντίστοιχα από το διάλυμα παρακαταθήκης της βουσουλφάνης σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL και αραιώση με οξικό αιθυλεστέρα. Οι όγκοι που αναφέρονται είναι τροποποιημένοι, για να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια στην παραλαβή τους με τις αυτόματες πιπέτες. Οι πραγματικοί όγκοι ήταν 83.33, 250, 500, 833.33, 1166.66, 2083, 3125 µL. Επομένως, οι τροποποιημένες συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων είναι 4.8, 15, 30, 51, 60, 120, 180 µg/mL και αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 0.192, 0.6, 1.2, 2.04, 2.4, 4.8, 7.2 µg/mL στον τελικό όγκο πλάσματος.

Βήμα 2ο: Παρασκευή διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου 1,6 – bis(methanesulfonyloxy)hexane

Το διάλυμα εργασίας του εσωτερικού προτύπου 1,6 – bis(methanesulfonyloxy)hexane παρασκευάζεται όπως αναφέρεται στην παράγραφο Β.2.3, δηλαδή με αραιώση κατάλληλης ποσότητας από το αντίστοιχο διάλυμα παρακαταθήκης με οξικό αιθυλεστέρα σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL.

Βήμα 3ο: Παρασκευή διαλύματος του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης

Η παρασκευή του συγκεκριμένου διαλύματος γίνεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο Β.2.3. Η προσθήκη του γίνεται για να μπορέσει να ανιχνευτεί η προσδιοριζόμενη ουσία, καθώς η βουσουλφάνη εμφανίζει πολύ ασθενή απορρόφηση στην υπεριώδη ακτινοβολία (Hassan, 1999). Αντίθετα, το παράγωγο της βουσουλφάνης με το DDTC απορροφά έντονα στο υπεριώδες και μπορεί να ανιχνευτεί στο χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος.

Βήμα 4ο: Προκατεργασία Δείγματος

Για την προκατεργασία των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ακολουθούνται τα εξής βήματα: 500 µL πλάσματος, που έχει μείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 – 60 min ώστε να ξεπαγώσει, μεταφέρονται με προσοχή με αυτόματη πιπέτα από το γυάλινο περιέκτη, σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα με κωνικό πάτο. Προστίθενται 20 µL πρότυπου διαλύματος εργασίας βουσουλφάνης της εκάστοτε συγκέντρωσης (από το βήμα 1) και 20 µL διαλύματος εργασίας εσωτερικού προτύπου (από το βήμα 2) και ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος με vortex για 10 sec. Στη συνέχεια, προστίθενται 2 mL διχλωρομεθανίου και ακολουθεί έντονο vortex για 30 sec, για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του πλάσματος και τη μεταφορά της λιπόφιλης βουσουλφάνης από το πλάσμα στον οργανικό διαλύτη. Το vortex πρέπει να είναι συνεχόμενο, διότι υπάρχει κίνδυνος σχηματισμού γαλακτώματος που είναι δύσκολο να διασπαστεί. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 1900 – 2000

στροφές στους 25 °C και παραλαμβάνεται με πολλή προσοχή η οργανική στιβάδα (κάτω στιβάδα, ~2 mL), η οποία μεταφέρεται σε μικρό κυλινδρικό δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί νέα προσθήκη 2 mL διχλωρομεθανίου στο γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα με κωνικό πάτο και έντονο vortex 30 sec, νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, παραλαβή της οργανικής στιβάδας και μεταφορά της στο μικρό κυλινδρικό δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με την προηγούμενη εκχύλιση και εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου (N₂) στους 50 – 60 °C για το σύνολο της οργανικής στιβάδας. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το διάλυμα του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (βήμα 3), προστίθενται 125 μL στο δοκιμαστικό σωλήνα και γίνεται έντονο vortex για 20 sec. Έπειτα, προστίθενται 200 μL μεθανόλης και 2 mL οξικού αιθυλεστέρα, γίνεται έντονο vortex 20 sec και εν συνεχεία ήπια ανάδευση για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1900 – 2000 στροφές στους 25 °C, παραλαβή 1 mL διαλύματος, μεταφορά αυτού σε μικρό κυλινδρικό δοκιμαστικό σωλήνα και εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού (N₂) στους 50 – 60 °C. Μετά την εξάτμιση γίνεται ανασύσταση με 100 μL μεθανόλης και vortex για 15 sec. Όλη η ποσότητα μεταφέρεται σε κατάλληλα φιαλίδια εφοδιασμένα με insert, τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη.

B.2.6.γ. Προκατεργασία άγνωστων δειγμάτων σε πλάσμα αίματος ασθενών που λάμβαναν Βουσουλφάνη

Για την προκατεργασία των αγνώστων δειγμάτων, από τα οποία θα προσδιοριστεί η συγκέντρωση της βουσουλφάνης στο αίμα των ασθενών που αποτελούν την ομάδα της μελέτης, ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο B.2.6.β. – Βήμα 4^ο για τα πρότυπα δείγματα, με μια όμως διαφορά: παραλείπεται το στάδιο της προσθήκης της βουσουλφάνης και αντ' αυτής προστίθενται στον κωνικό σωλήνα 20 μL οξικού αιθυλεστέρα βαθμού καθαρότητας HPLC. Στη συνέχεια η διαδικασία ακολουθείται όπως ακριβώς αναφέρεται και για τα πρότυπα δείγματα.

B.3. ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗ ΔΟΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Μετά τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της βουσουλφάνης στο πλάσμα στις διάφορες χρονικές στιγμές, κατασκευάστηκαν οι γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο για κάθε ασθενή. Η μέγιστη συγκέντρωση της βουσουλφάνης στο πλάσμα για κάθε ημέρα χορήγησης αντιστοιχούσε στο τέλος της τρίωρης έγχυσης (C_{max}) και η ελάχιστη συγκέντρωση (C_{min}) ή επίπεδα trough ήταν ακριβώς πριν τη χορήγηση της επόμενης δόσης (δηλαδή το επόμενο πρωί, αφού η βουσουλφάνη χορηγούταν κάθε 24 ώρες). Στη συνέχεια, ακολούθησε ο προσδιορισμός, για κάθε ασθενή, της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου (AUC) μετά την πρώτη δόση, χωρίς τη θεώρηση συγκεκριμένου φαρμακοκινητικού μοντέλου. Η εκτίμηση έγινε “γραφικά” κατευθείαν από τα πειραματικά δεδομένα της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα δείγματα αίματος που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν τα εξής: πριν την έναρξη χορήγησης, αμέσως μετά τη διακοπή της τρίωρης ενδοφλέβιας έγχυσης, 1 ώρα και 6 ώρες μετά από αυτήν, και εφαρμόστηκε ο παρακάτω τύπος:

$$AUC_{infinity} = AUC_{0-9h} + AUC_{extrapolated} , \quad \text{Εξίσωση (3)}$$

όπου το AUC_{0-9h} υπολογίζεται από τον γραμμικό κανόνα των τραπεζίων, ενώ το $AUC_{extrapolated}$ από το λόγο της συγκέντρωσης του φαρμάκου που μετρήθηκε στο χρονικό σημείο που αντιστοιχεί στις 9 ώρες, C_9 (μg/mL), προς τη σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης, k_{el} , h^{-1} . Η k_{el} υπολογίζεται από το τελικό τμήμα της καμπύλης συγκέντρωσης χρόνου με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των τριών τελευταίων σημείων. Επομένως, με βάση αυτά η εξίσωση (3) γράφεται:

$$AUC_{infinity} = AUC_{0-9h} + \frac{C_9}{k_{el}} , \quad \text{Εξίσωση (4)}$$

Σύμφωνα με τον κανόνα των τραπεζίων, η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη διαιρείται σε τραπέζια που σχηματίζονται, όταν τα πειραματικά σημεία ενωθούν με ευθείες γραμμές και έπειτα τραβηχτούν κάθετες προς τον άξονα του χρόνου που έχουν σαν αρχή τα πειραματικά σημεία. Η επιφάνεια κάθε τραπεζίου υπολογίζεται με βάση το τύπο:

$$AUC_i = (C_i + C_{i+1}) * \frac{(t_{i+1} - t_i)}{2} , \quad \text{Εξίσωση (5)}$$

Είναι προφανές λοιπόν ότι η ολική επιφάνεια κάτω από την καμπύλη είναι το άθροισμα των επιμέρους επιφανειών που υπολογίζονται από τα τραπέζια.

$$AUC = \sum_{i=0}^{n-1} AUC_i , \quad \text{Εξίσωση (6)}$$

Θεωρητικά, ο υπολογισμός της επιφάνειας πρέπει να γίνει από $t=0$ (έναρξη χορήγησης) μέχρι το άπειρο ($t \rightarrow \infty$). Αυτό πραγματοποιείται με τη θεωρητική επέκταση της πειραματικής καμπύλης από το τελευταίο πειραματικό σημείο έως το άπειρο, οπότε και υπολογίζεται και η επιφάνεια του τελευταίου τριγώνου. Η συγκέντρωση που μετράται στο τελευταίο δειγματοληπτικό σημείο n , έστω C_n , θα μειώνεται εκθετικά από $t=t_n$ έως $t \rightarrow \infty$, άρα το $AUC_{t_n \rightarrow \infty}$ του τελευταίου τριγώνου θα ισούται με C_n / k_{el} . Η k_{el} υπολογίζεται από το

τελικό τμήμα της καμπύλης συγκέντρωσης – χρόνου με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των τριών τελευταίων σημείων (Μαχαίρας & Συμιλλίδου, 2007).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου για κάθε εικοσιτετράωρο, με σκοπό να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα ανάμεσα στις ημέρες χορήγησης. Ο υπολογισμός έγινε με δυο τρόπους: στην πρώτη περίπτωση, εφαρμόστηκε ο γραμμικός κανόνας των τραπεζίων, όπως αναφέρεται παραπάνω για τα πειραματικά σημεία από 0 – 24 ώρες, 24 – 48 ώρες, 48 – 72 ώρες και 72 – 96 ώρες για τις ημέρες χορήγησης 1, 2, 3 και 4 αντίστοιχα. Για τις ίδιες ημέρες, στη δεύτερη περίπτωση, εφαρμόστηκε συνδυασμός του γραμμικού και του λογαριθμικού κανόνα των τραπεζίων. Για την αρχική φάση της χορήγησης του φαρμάκου, δηλαδή από 0 – 3 ώρες, η AUC εκτιμήθηκε με το γραμμικό κανόνα, ενώ μετά τη διακοπή της χορήγησης (3 – 24 ώρες) χρησιμοποιήθηκε ο λογαριθμικός κανόνας των τραπεζίων. Σύμφωνα με αυτόν δυο διαδοχικές συγκεντρώσεις C_i και C_{i+1} δεν συνδέονται γραμμικά μεταξύ τους, αλλά εκθετικά και η AUC_i υπολογίζεται από την σχέση:

$$AUC_i = \frac{(C_i - C_{i+1}) * (t_{i+1} - t_i)}{\ln\left(\frac{C_i}{C_{i+1}}\right)}, \quad \text{Εξίσωση (7)}$$

Η συνολική AUC είναι το άθροισμα των επιμέρους AUC_i , που υπολογίζεται για το σύνολο των πειραματικών σημείων, από την εξίσωση (7). Ο συνδυασμός των δυο κανόνων εφαρμόστηκε, διότι η θεωρητική επέκταση της πειραματικής καμπύλης από τις 9 ώρες, όπου πραγματοποιήθηκε η τελευταία δειγματοληψία, έως το άπειρο υπερεκτιμά την υπολογιζόμενη AUC. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι κατά την εφαρμογή του κανόνα των τραπεζίων θεωρείται ότι οι διαδοχικές συγκεντρώσεις συνδέονται γραμμικά μεταξύ τους, κάτι που, φυσικά, δεν ισχύει στην περίπτωση που η συγκέντρωση μειώνεται εκθετικά. Όταν συμβαίνει το τελευταίο, η λογαριθμική μέθοδος δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Για να είναι, επομένως, πιο σωστές οι εκτιμήσεις των AUC προτιμάται ο συνδυασμός των δυο μεθόδων και μάλιστα, όταν η συγκέντρωση αυξάνεται ή παραμένει ίδια εφαρμόζεται ο γραμμικός κανόνας και όταν μειώνεται ο λογαριθμικός (Μαχαίρας & Συμιλλίδου, 2007).

Αφού ολοκληρώθηκαν οι υπολογισμοί των τιμών AUC για κάθε ασθενή, ελέγχθηκε εάν το AUC_{∞} βρίσκεται εντός του θεραπευτικού παραθύρου. Το θεραπευτικό παράθυρο είναι 900 – 1350 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, όταν το φάρμακο χορηγείται ανά 6 ώρες, δηλαδή διαιρεμένο σε 4 δόσεις (Busulfex TM, 2011). Με τη χορήγηση μια φορά την ημέρα, οι τιμές αυτές είναι τετραπλάσιες, δηλαδή 3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$. Όλοι οι ασθενείς, που πήραν μέρος στη μελέτη, έλαβαν βουσουλφάνη σε δόση 3,2 mg/kg μια φορά την ημέρα, για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες. Για όσους ασθενείς τα υπολογιζόμενα AUC μετά την πρώτη δόση ήταν εκτός θεραπευτικού παραθύρου, προσδιορίστηκε η δόση που έπρεπε να είχε χορηγηθεί, ώστε να επιτύγχαναν την επιθυμητή τιμή, 4500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, που αντιστοιχεί στο μέσο του θεραπευτικού παραθύρου. Ο υπολογισμός της δόσης που έπρεπε να χορηγηθεί έγινε με βάση τον παρακάτω τύπο:

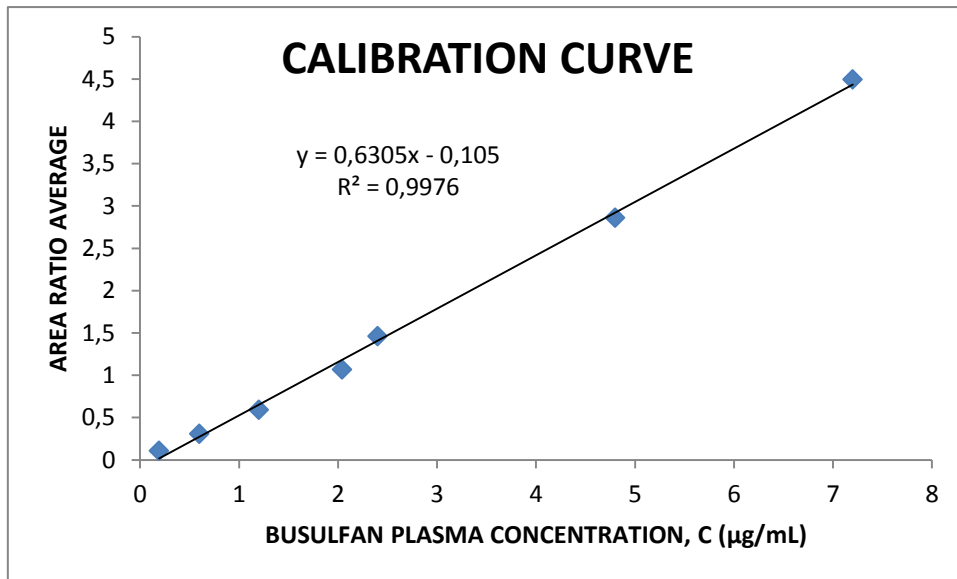
Προσαρμοσμένη Δόση (mg)

$$= \text{Χορηγούμενη Δόση (mg)} * \text{Στοχευμένο} \frac{\text{AUC}(\mu\text{M} * \text{min})}{\text{Μετρούμενο AUC}(\mu\text{M} * \text{min})}$$

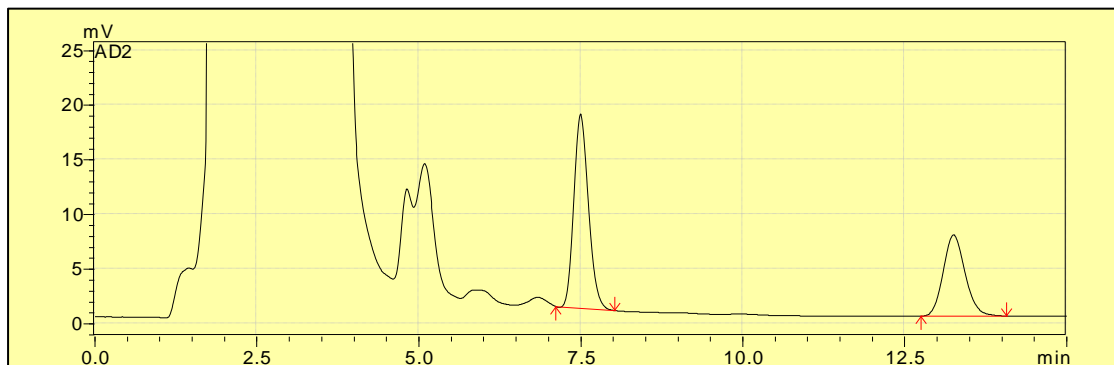
Εξίσωση (8),

όπου η χορηγούμενη δόση είναι 3,2 mg/kg βάρους σώματος και το AUC στόχος τα 4500 μΜ*min.

Επίσης, σε μια τελευταία προσπάθεια, θεωρήθηκε ότι πριν τη χορήγηση κάθε δόσης βουσουλφάνης, η τιμή της ελάχιστης συγκέντρωσης (C_{\min}) ή trough ήταν πολύ μικρή και σχεδόν ίση με το μηδέν. Επειδή όμως, η τιμή μηδέν για τις συγκεντρώσεις δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, καθώς με αυτό τον τρόπο δεν θα μπορούσε να εφαρμοστεί ο λογαριθμικός κανόνας των τραπεζίων, αφού ο λογάριθμος του μηδέν δεν ορίζεται, αντί αυτής θεωρήθηκε ότι η trough συγκέντρωση κάθε πρωί ήταν ίση με 0,01 μg/mL και έγιναν πάλι οι παραπάνω υπολογισμοί.



Εικόνα Γ 1. Καμπύλη αναφοράς για τα πειράματα προσδιορισμού των συγκεντρώσεων βουσουλφάνης σε πλάσμα ασθενών.



Εικόνα Γ 2. Ενδεικτικό χρωματογράφημα από την καμπύλη αναφοράς στο πλάσμα (C= 70 µg/mL, η κορυφή στα 7,5 min αντιστοιχεί στην παραγωγοποιημένη Βουσουλφάνη και η κορυφή στα 13,5 min στο παραγωγοποιημένο 1,6 bis(methanesulfonyloxy)hexane)).

Γ.1.2. Όριο Ανίχνευσης (LOD) και Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης που υπολογίστηκαν με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του φαρμάκου. Από αυτήν, εξάγεται η τυπική απόκλιση της τομής b , S_b ή η τυπική απόκλιση των υπολοίπων $S_{y/x}$. Οι σχέσεις που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των ορίων είναι:

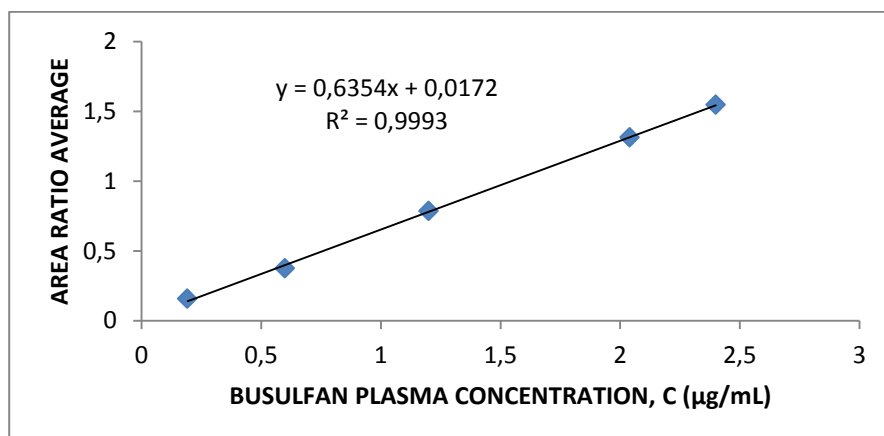
$$LOD = 3.3 * \frac{SD}{a} , \text{Εξίσωση (9)}$$

$$LOQ = 10 * \frac{SD}{a} , \text{Εξίσωση (10)}$$

Όπου: a η κλίση της καμπύλης αναφοράς και SD η τυπική απόκλιση της τομής S_b ή η τυπική απόκλιση των υπολοίπων $S_{y/x}$ (Κουμπάρης , 2008). Τα δεδομένα της καμπύλης αναφοράς, που χρησιμοποιήθηκε για αυτό το σκοπό, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα Γ 2, ενώ στην εικόνα Γ 3 παρατίθεται η καμπύλη αναφοράς. Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκαν από τις παραπάνω σχέσεις, όπου SD η τυπική απόκλιση της τομής S_b , και ήταν: $LOD = 0,0759 \mu\text{g/mL}$ και $LOQ = 0,2300 \mu\text{g/mL}$.

Πίνακας Γ 2. Επίπεδα συγκέντρωσης και αντίστοιχες αποκρίσεις.

Συγκέντρωση βουσουλφάνης, C (μg/mL)	Area ratio average	SD	% RSD
0.192	0.157	0.0074	4.74
0.6	0.374	0.0192	5.13
1.2	0.784	0.0816	10.41
2.04	1.312	0.0612	4.66
2.4	1.546	0.0674	4.36



Εικόνα Γ 3. Καμπύλη αναφοράς για την εκτίμηση ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου. ($y=0.6354x \pm 0.0095 + 0.0172 \pm 0.0146$)

Γ.2. ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΠΥΛΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ – ΧΡΟΝΟΥ (ΑUC) ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΔΟΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΕΠΟΜΕΝΕΣ ΔΟΣΕΙΣ

Οι επιμέρους συγκεντρώσεις της βουσουλφάνης στο πλάσμα στα διάφορα χρονικά σημεία σε όλους τους ασθενείς, όπως αυτές μετρήθηκαν με την ανάλυση HPLC, παρουσιάζονται στο πίνακα Γ 3. Στην εικόνα Γ 4, φαίνεται ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα της πειραματικής ανάλυσης για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων βουσουλφάνης στο πλάσμα των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη, όπως καταγράφεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και στην εικόνα Γ 5 φαίνεται το χρωματογράφημα του ίδιου ασθενούς πριν τη χορήγηση της βουσουλφάνης – BLANK ασθενούς. Στη συνέχεια, παρατίθενται τα διαγράμματα συγκέντρωσης χρόνου για όλες τις ημέρες χορήγησης του φαρμάκου, με βάση τις τιμές συγκέντρωσης που μετρήθηκαν και στους τέσσερις ασθενείς (Σχήμα Γ 1). Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της βουσουλφάνης σε συνάρτηση με το χρόνο για την πρώτη ημέρα χορήγησης φαίνεται στο Εικόνα Γ 6.

Πίνακας Γ 3. Μετρούμενες συγκεντρώσεις βουσουλφάνης στο πλάσμα ασθενών στις ώρες δειγματοληψίας.

		ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ C (μg/mL)			
ΑΣΘΕΝΗΣ	ΩΡΑ ΔΕΙΓ/ΨΙΑΣ (h)	ΗΜΕΡΑ 1 ^η	ΗΜΕΡΑ 2 ^η	ΗΜΕΡΑ 3 ^η	ΗΜΕΡΑ 4 ^η
1	0	0	0,0797 ± 0,0004	0,5692 ± 0,0086	-
	3	4,6543 ± 0,1938	39,3791 ± 0,4846	2,3062 ± 0,0502	-
	4	2,8363 ± 0,0518	3,7073 ± 0,0606	2,0648 ± 0,0568	-
	9	0,6232 ± 0,0097	0,6215 ± 0,0115	0,7076 ± 0,0171	-
2	0	-	0,0127 ± 0,0038	2,4719 ± 0,0023	0,0510 ± 0,0003
	3	-	4,4516 ± 0,0062	7,7990 ± 0,0081	3,9777 ± 0,0007
	4	-	3,0244 ± 0,0038	3,6229 ± 0,0252	2,9265 ± 0,0029
	9	-	0,9852 ± 0,0004	1,3823 ± 0,0024	0,9449 ± 0,0007
3	0	0	0,4822 ± 0,0041	0,8263 ± 0,0022	0,1903 ± 0,0005
	3	2,9453 ± 0,0097	2,4647 ± 0,0074	2,9358 ± 0,0124	2,3553 ± 0,0188
	4	1,8033 ± 0,0273	1,7875 ± 0,0055	2,0254 ± 0,0008	1,2863 ± 0,0098
	9	0,5012 ± 0,0058	0,4489 ± 0,0031	0,4822 ± 0,0015	0,4219 ± 0,0040
4	0	0	0,0570	0,1781	1,8658
	3	3,4412	4,3710	3,5149	51,7921
	4	2,5096	2,5377	3,3974	3,2886
	9	0,7395	1,0781	1,2640	1,1921

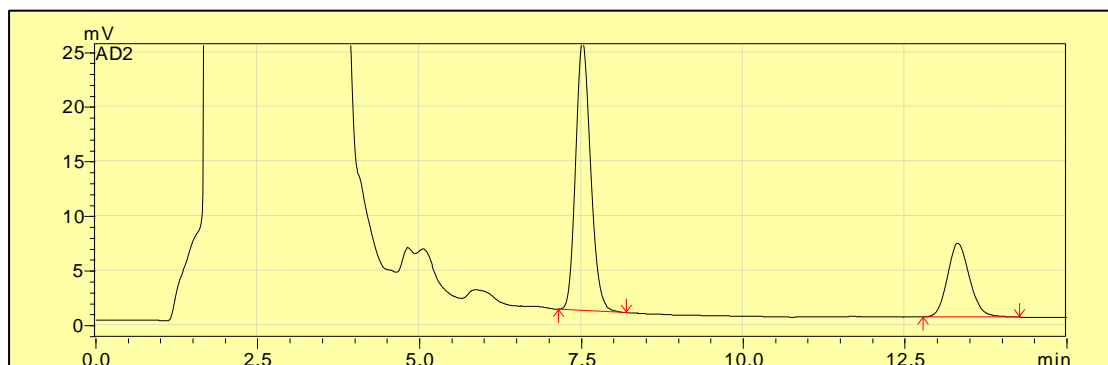
Επεξηγήσεις πίνακα:

0: ακριβώς πριν την έναρξη της έγχυσης

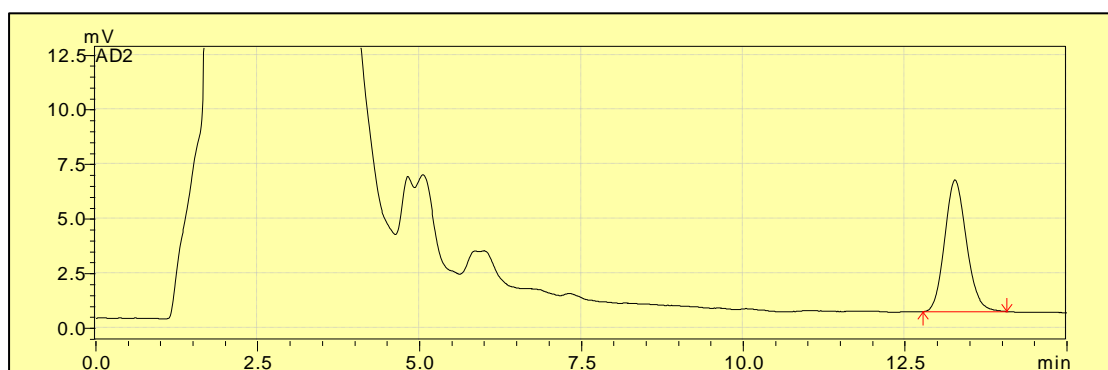
3: αμέσως μετά τη διακοπή της έγχυσης

4: 1 ώρα μετά τη διακοπή της έγχυσης

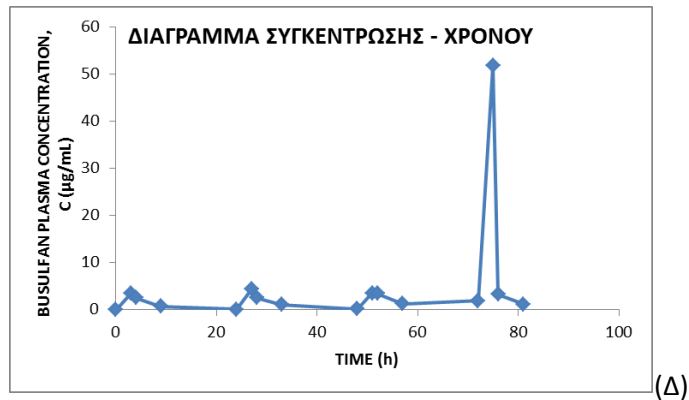
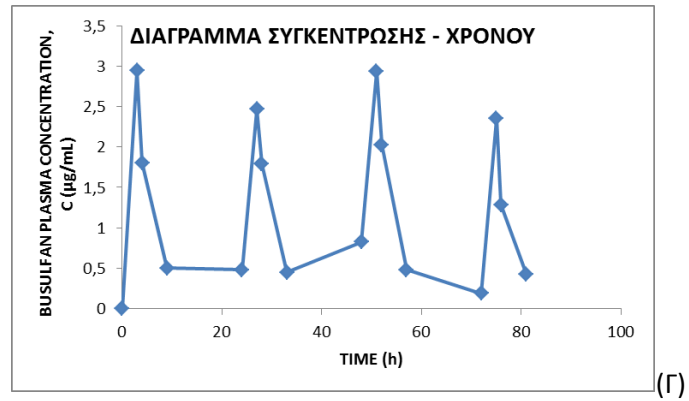
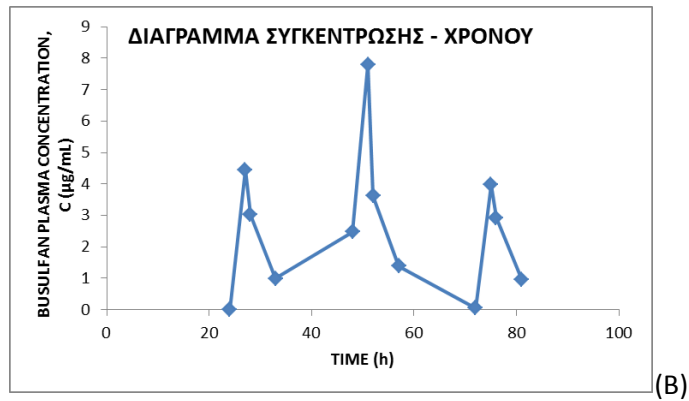
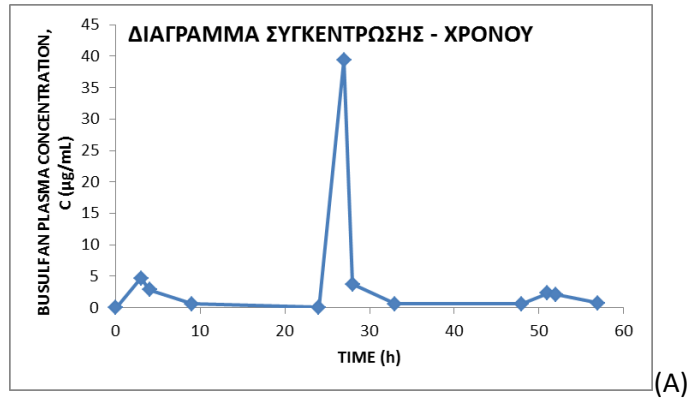
9: 6 ώρες μετά τη διακοπή της έγχυσης



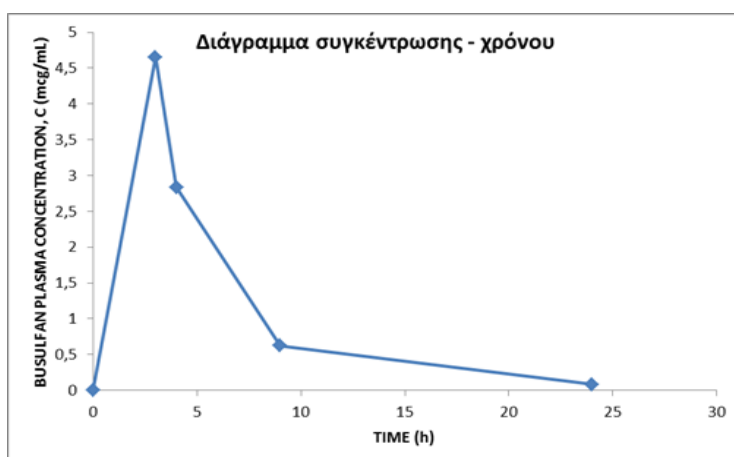
Εικόνα Γ 4. Ενδεικτικό χρωματογράφημα της συγκέντρωσης βουσουλφάνης στο πλάσμα ασθενούς. [ασθενής Νο 1, 1^η ημέρα χορήγησης, δείγμα 2^ο, ώρα λήψης: μόλις διεκόπη η ενδοφλέβια έγχυση βουσουλφάνης, η κορυφή στα 7,5 min αντιστοιχεί στη βουσουλφάνη και η κορυφή στα 13,5 min στο 1,6 bis(methanesulfonyloxy)hexane)].



Εικόνα Γ 5. Ενδεικτικό χρωματογράφημα ασθενούς πριν την χορήγηση του φαρμάκου – BLANK ασθενούς. [ασθενής Νο 1, 1^η ημέρα χορήγησης, δείγμα 1^ο, ώρα λήψης: ακριβώς πριν την έναρξη έγχυσης της βουσουλφάνης, η κορυφή στα 13,5 min αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο, το 1,6 bis(methanesulfonyloxy)hexane)].



Σχήμα Γ 1. Διαγράμματα συγκέντρωσης χρόνου για όλες τις ημέρες χορήγησης του φαρμάκου, (A) Ασθενής 1, (B) Ασθενής 2, (Γ) ασθενής 3, (Δ) Ασθενής 4.



Εικόνα Γ 6. Ενδεικτικό διάγραμμα συγκέντρωσης – χρόνου μετά την πρώτη δόση βουσουλφάνης, [ασθενής No 1, 1η ημέρα χορήγησης].

Αφού προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα στις διάφορες χρονικές στιγμές, έπειτα εκτιμήθηκαν οι επιφάνειες κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου. Ο υπολογισμός των επιφανειών αυτών για την πρώτη δόση σε κάθε ασθενή έγινε όπως αναφέρεται και παραπάνω στην παράγραφο Β.2.4., γραφικά από τα πειραματικά δεδομένα, με εφαρμογή του γραμμικού κανόνα των τραπεζίων και θεωρητική επέκταση στο άπειρο για τους ασθενείς 1,3 και 4. Για τον ασθενή 2, στον οποίο δεν υπήρχαν δείγματα για την πρώτη ημέρα χορήγησης, ο υπολογισμός της AUC έγινε από τη δεύτερη ημέρα και μετά, δηλαδή από $t = 24 \text{ h}$ έως $t \rightarrow \infty$, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Παρακάτω, στον πίνακα Γ 4, αναφέρονται οι τιμές AUC_{∞} , που υπολογίστηκαν για κάθε ασθενή που συμμετείχε στη μελέτη, καθώς και το θεραπευτικό παράθυρο, που αντιστοιχεί σε $3600 - 5400 \mu\text{M} \cdot \text{min}$. Όπως προκύπτει από τα δεδομένα για τις υπολογιζόμενες τιμές AUC_{∞} , οι ασθενείς 1 και 4 είχαν τιμές εντός του αποδεκτού θεραπευτικού εύρους ($5187,39 \mu\text{M} \cdot \text{min}$ και $4674,75 \mu\text{M} \cdot \text{min}$, αντίστοιχα) και για αυτούς δεν απαιτείται προσαρμογή της δοσολογίας της βουσουλφάνης. Αντίθετα, οι άλλοι δυο ασθενείς που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη, όπως σημειώνεται και στον πίνακα Γ 4, εμφάνισαν τιμές AUC_{∞} εκτός των ορίων $3600 - 5400 \mu\text{M} \cdot \text{min}$. Πιο συγκεκριμένα, ο ασθενής 3 είχε AUC_{∞} χαμηλότερη από το κατώτερο όριο του θεραπευτικού παραθύρου ($AUC_{\infty} = 3490,13 \mu\text{M} \cdot \text{min}$), ενώ ο ασθενής 2, για τον οποίο όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως υπολογίστηκε AUC_{∞} από τη δεύτερη ημέρα και έπειτα, εμφάνισε τιμή ίση με $5973,06 \mu\text{M} \cdot \text{min}$, που είναι υψηλότερη από το ανώτερο όριο του θεραπευτικού παραθύρου. Και οι δυο, επομένως, έχρηζαν προσαρμογής της δόσης τους.

Πίνακας Γ 4. Συγκεντρωτικός πίνακας των υπολογιζόμενων επιφανειών κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου (AUC_{∞}) των ασθενών.

ΑΣΘΕΝΗΣ	AUC_{∞} ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$)	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΕΥΡΟΣ
1	5187,39	3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$
3	3490,13	3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$
4	4674,75	3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$
2	5973,06	3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$

Προσαρμογή Δόσης στους ασθενείς 2 και 3

Η δόση βουσουλφάνης, που έπρεπε να χορηγηθεί για να επιτευχθεί τιμή AUC 4500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, υπολογίστηκε από την εξίσωση (8), όπως αναφέρεται στην παράγραφο Β.3. Για τον ασθενή 3 που είχε χαμηλότερη τιμή έκθεσης, υπολογίστηκε ότι η δόση που έπρεπε να είχε χορηγηθεί είναι μεγαλύτερη από τα 3,2 mg/kg που χορηγήθηκαν, και ίση με:

$$\text{Προσαρμοσμένη Δόση (mg/kg)} = 3.2 \text{ (mg/kg)} * \frac{4500(\mu\text{M} * \text{min})}{3490.13(\mu\text{M} * \text{min})} = 4.13 \text{ mg/kg}$$

Για τον ασθενή 2, στον οποίο η AUC ήταν υψηλότερη, βρέθηκε ότι η απαιτούμενη δόση για να επιτευχθεί η τιμή – στόχος 4500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, είναι μικρότερη από τη συνιστώμενη δόση και υπολογίστηκε:

$$\text{Προσαρμοσμένη Δόση (mg/kg)} = 3.2(\text{mg/kg}) * \frac{4500(\mu\text{M} * \text{min})}{5973.06(\mu\text{M} * \text{min})} = 2.41 \text{ mg/kg}$$

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια υπολογισμού των τιμών AUC για κάθε εικοσιτετράωρο σε όλους τους ασθενείς, προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των μετρούμενων τιμών για κάθε ημέρα θεραπείας. Σε αυτή την περίπτωση, εφαρμόστηκαν ο απλός κανόνας των τραπεζίων και ο συνδυασμός του με τον λογαριθμικό. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατίθενται στον πίνακα Γ 5. Ωστόσο, λόγω των προβλημάτων που παρουσιάστηκαν στις μετρούμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου στο πλάσμα των ασθενών, όπως αναφέρεται παραπάνω στον πίνακα Γ 3, δεν μπόρεσε να μελετηθεί η επαναληψιμότητα των τιμών AUC ανάμεσα στις διαφορετικές ημέρες χορήγησης. Στους τρεις από τους τέσσερις ασθενείς, οι τιμές AUC βρίσκονται εξαιρετικά μεγάλες και φυσικά εκτός θεραπευτικού εύρους, διότι είτε κάποιο trough επίπεδο ήταν αρκετά υψηλό, είτε υπήρχε επιμόλυνση του δείγματος με το εγχέομενο φάρμακο. Η μόνη περίπτωση, στην οποία θα μπορούσαμε πιθανότατα να ελέγξουμε την επαναληψιμότητα είναι ο ασθενής 3, στον οποίο επίσης, με βάση τις μετρήσεις του πίνακα Γ3, εμφανίζονται υψηλά trough επίπεδα. Έτσι σε αυτό τον ασθενή, για τις τρεις πρώτες ημέρες χορήγησης η διακύμανση (CV %) είναι 6,4 % (όταν εφαρμόζεται ο λογαριθμικά γραμμικός κανόνας των τραπεζίων) και 5,85 % (όταν εφαρμόζεται ο γραμμικός κανόνας των τραπεζίων).

Πίνακας Γ 5. Συγκεντρωτικός πίνακας των υπολογιζόμενων τιμών AUC για κάθε εικοσιτετράωρο χορήγησης σε όλους τους ασθενείς.

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΕΙΚΟΣΙΤΕΤΡΑΩΡΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	AUC _{24h} (μM*min)	AUC _{24h, Log} (μM*min)	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΕΥΡΟΣ
1	0-24 h	6004,19	5339,32	3600 – 5400 μM*min
	24-48 h	24478,47	22374,89	3600 – 5400 μM*min
	48 – 57 h	3271,57	3126,25	3600 – 5400 μM*min
2	24 – 48 h	11300,06	10650,80	3600 – 5400 μM*min
	48 – 72 h	10811,26	9386,81	3600 – 5400 μM*min
	72 – 81 h	4670,89	4441,67	3600 – 5400 μM*min
3	0 – 24 h	4854,72	4678,39	3600 – 5400 μM*min
	24 – 48 h	5286,49	5030,32	3600 – 5400 μM*min
	48 – 72 h	4734,75	4429,01	3600 – 5400 μM*min
	72 – 81 h	2414,03	2305,14	3600 – 5400 μM*min
4	0 – 24 h	5416,27	4713,94	3600 – 5400 μM*min
	24 – 48 h	6956,64	6342,45	3600 – 5400 μM*min
	48 – 72 h	10748,55	10466,62	3600 – 5400 μM*min
	72 – 81 h	29044,81	26409,58	3600 – 5400 μM*min

Επεξήγηση πίνακα: AUC_{24h}: η επιφάνεια υπό την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου με βάση τον γραμμικό κανόνα των τραπεζίων. AUC_{24h, Log}: η επιφάνεια υπό την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου με συνδυασμό του γραμμικού και του λογαριθμικού κανόνα των τραπεζίων.

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα Γ 3, οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν για κάθε ασθενή σε όλες τις ημέρες χορήγησης για τις οποίες υπήρχαν δείγματα, παρουσίασαν αρκετά προβλήματα. Στον πίνακα έχουν σημειωθεί με έντονο χρώμα τα κελιά που περιέχουν τέτοιες μετρήσεις. Ορισμένες από τις συγκεντρώσεις, που προσδιορίστηκαν με την ανάλυση HPLC, είναι εξαιρετικά υψηλές, όπως η μέγιστη συγκέντρωση (δηλαδή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη χρονική στιγμή αμέσως μόλις διακοπεί η ενδοφλέβια έγχυση) τη δεύτερη ημέρα χορήγησης του φαρμάκου στον ασθενή 1 και η μέγιστη συγκέντρωση την τέταρτη ημέρα χορήγησης στον ασθενή 4. Οι τιμές που μετρήθηκαν ήταν 39,3791 μg/mL και 51,7921 μg/mL, αντίστοιχα. Και για τις δυο πιθανολογείται επιμόλυνση του δείγματος με το εγχεόμενο φάρμακο, καθώς αυτές οι αφύσικα μεγάλες τιμές δεν μπορούν να δικαιολογηθούν με άλλο τρόπο. Θεωρήθηκε ότι η δειγματοληψία έγινε από τον κεντρικό φλεβικό καθετήρα, αντί από περιφερική φλέβα, όπως ήταν καθορισμένο με βάση το πρωτόκολλο, και επομένως το δείγμα επιμολύνθηκε με το φάρμακο που μόλις είχε χορηγηθεί.

Επιπλέον, σε όλους τους ασθενείς, παρατηρήθηκε ότι μια τουλάχιστον τιμή trough επιπέδων ήταν μεγαλύτερη από το αναμενόμενο, και μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις πολύ υψηλή. Η βουσουλφάνη έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής που κυμαίνεται από 2,8 – 3,9 ώρες. Έχει, επίσης, βρεθεί σε μελέτες ότι κατά τη χορήγηση μια φορά την ημέρα δεν παρατηρείται άθροιση του φαρμάκου στον οργανισμό (Madden, et al., 2007) (Russell, et al., 2002). Επομένως, σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία, πριν τη χορήγηση της επόμενης δόσης

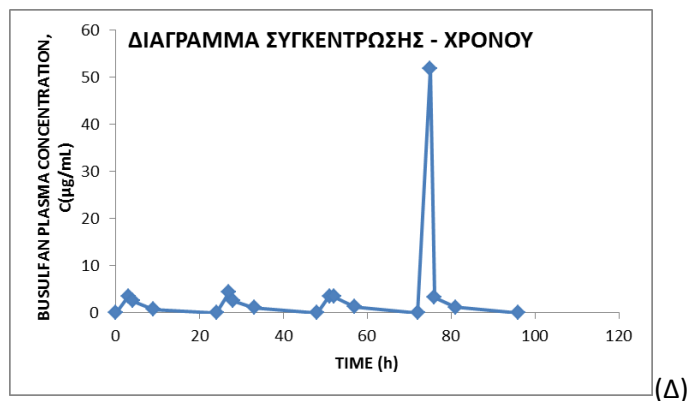
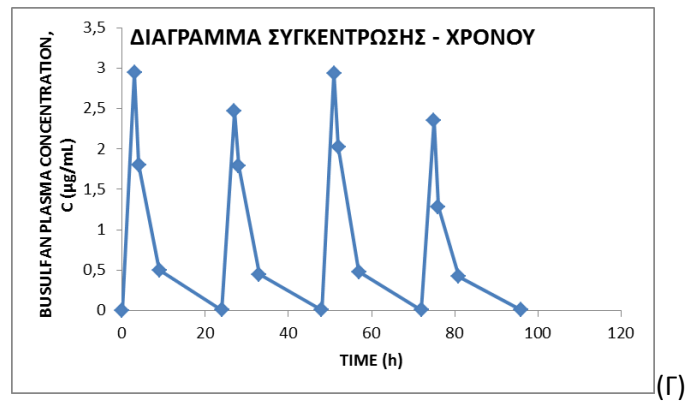
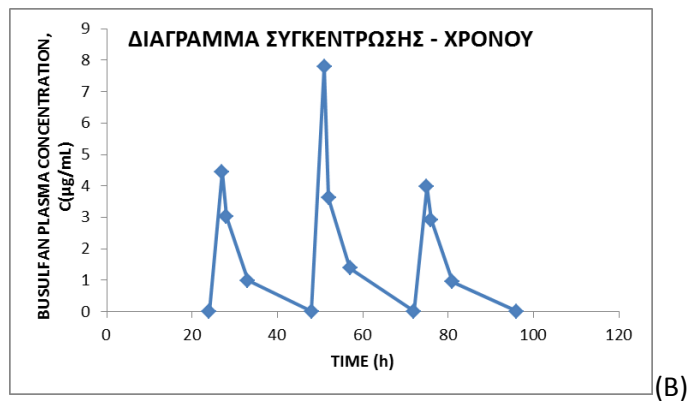
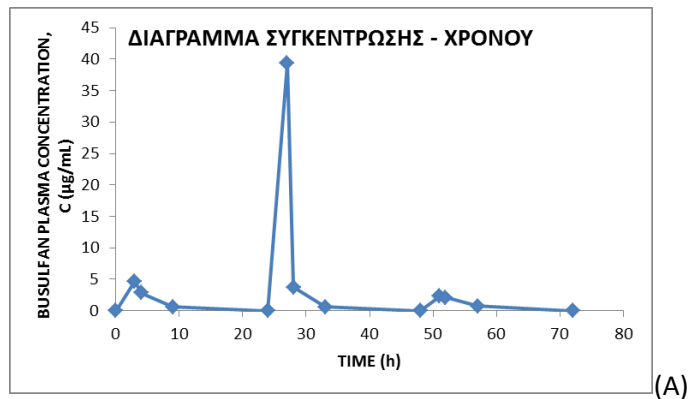
βουσουλφάνης πρακτικά η συγκέντρωσή της στο πλάσμα πρέπει να είναι πολύ μικρή αν όχι μηδενική. Παρ' όλα αυτά στον ασθενή 2, την τρίτη ημέρα χορήγησης της βουσουλφάνης η τιμή συγκέντρωσης πριν την έναρξη της έγχυσης ήταν 2,4719 $\mu\text{g}/\text{mL}$, πολύ μεγαλύτερη από την τελευταία μέτρηση της προηγούμενης ημέρας που ήταν $C_{2,9} = 0,9852 \mu\text{g}/\text{mL}$, και χωρίς να μεσολαβήσει νέα χορήγηση φαρμάκου. Το ίδιο πρόβλημα παρατηρήθηκε και στον ασθενή 3 κατά την τρίτη ημέρα χορήγησης του φαρμάκου, όποτε η συγκέντρωση $C_{3,0} = 0,8263 \mu\text{g}/\text{mL}$ και ήταν μεγαλύτερη από εκείνη που είχε στην προηγούμενη μέτρηση, αλλά και στον ασθενή 4 την τέταρτη ημέρα χορήγησης με $C_{4,0} = 1,8658 \mu\text{g}/\text{mL}$. Εκτός από αυτές τιμές, που φαινόταν ξεκάθαρα ότι υπάρχει κάποιο πρόβλημα, επιπλέον θεωρήθηκαν "ύποπτες" και τα trough του ασθενούς 1 πριν την τρίτη δόση, του ασθενούς 3 πριν τη δεύτερη και τέταρτη δόση και του ασθενούς 4 πριν την τρίτη δόση. Σε αυτές τις μετρήσεις θεωρήθηκε πολύ πιθανό να έχει γίνει λάθος στην ώρα της δειγματοληψίας, δηλαδή η πρωινή αιμοληψία κάθε μέρα, από τη δεύτερη ημέρα θεραπείας και έπειτα, γινόταν από περιφερική φλέβα όπως έπρεπε, αλλά αφότου είχε ξεκινήσει η έγχυση της νέας δόσης της βουσουλφάνης και για αυτό να είναι μεγάλες οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Σε μια τελευταία προσπάθεια υπολογισμού των AUC, υποτέθηκε ότι μετά από 24 ώρες η συγκέντρωση βουσουλφάνης στο πλάσμα θα είναι μικρή και γι' αυτό αντί των πραγματικών μετρήσεων στα trough επίπεδα θεωρήθηκε ότι είναι ίσα με 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Με βάση αυτή την τιμή σε όλες τις πρωινές μετρήσεις από τη δεύτερη ημέρα και μετά, τα υπολογιζόμενα AUC παρατίθενται στον πίνακα Γ 6. Από τα αποτελέσματα αυτά αν προσπαθήσουμε να ελέγξουμε σε κάθε ασθενή την επαναληψιμότητα των AUC για τις διάφορες ημέρες χορήγησης, παρατηρούμε ότι στον ασθενή 2, ο CV % ήταν 24,48 % για τον γραμμικό κανόνα των τραπεζίων και 24,94 % για τον συνδυασμό του με τον λογαριθμικό. Για τον ασθενή 3 αντίστοιχα βρέθηκε CV % 11,76 % και 11,48 %. Για τον ασθενή 4, τις τρεις πρώτες ημέρες χορήγησης, οι CV % ήταν 15,58 % και 13,53 %, αντίστοιχα. Η τέταρτη ημέρα δεν συμπεριλήφθηκε, λόγω της επιμόλυνσης του δείγματος που οδήγησε σε μεγάλες τιμές AUC. Το ίδιο ισχύει και για τη δεύτερη ημέρα χορήγησης στον ασθενή 1. Επίσης, στο σχήμα Γ 3, δίνονται οι γραφικές παραστάσεις για όλες τις ημέρες χορήγησης σε όλους τους ασθενείς με 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ στα trough επίπεδα.

Πίνακας Γ 6. Συγκεντρωτικός πίνακας των υπολογιζόμενων τιμών AUC για κάθε εικοσιτετράωρο χορήγησης σε όλους τους ασθενείς, με την προϋπόθεση ότι οι trough συγκεντρώσεις ήταν 0,01 µg/mL.

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΕΙΚΟΣΙΤΕΤΡΑΩΡΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	AUC _{24h} (µM*min)	AUC _{24h, Log} (µM*min)	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΕΥΡΟΣ
1	0-24 h	5876,89	4915,98	3600-5400 µM*min
	24-48 h	23431,31	20716,40	3600-5400 µM*min
	48 – 72 h	4378,36	3520,40	3600-5400 µM*min
2	24 – 48 h	6797,44	5521,49	3600-5400 µM*min
	48 – 72 h	9836,70	8030,08	3600-5400 µM*min
	72 – 96 h	6400,62	5177,77	3600-5400 µM*min
3	0 – 24 h	3992,07	3340,52	3600-5400 µM*min
	24 – 48 h	3622,49	3019,25	3600-5400 µM*min
	48 – 72 h	4106,99	3428,66	3600-5400 µM*min
	72 –96 h	3137,21	2641,44	3600-5400 µM*min
4	0 – 24 h	5330,36	4360,22	3600-5400 µM*min
	24 – 48 h	6632,39	5332,86	3600-5400 µM*min
	48 – 72 h	7296,53	5704,93	3600-5400 µM*min
	72 –96 h	30562,98	26634,95	3600-5400 µM*min

Επεξήγηση πίνακα: AUC_{24h}: η επιφάνεια υπό την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου με βάση τον γραμμικό κανόνα των τραπεζίων. AUC_{24h, Log}: η επιφάνεια υπό την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου με συνδυασμό του γραμμικού και του λογαριθμικού κανόνα των τραπεζίων.



Σχήμα Γ 2. Διαγράμματα συγκέντρωσης χρόνου για όλες τις ημέρες χορήγησης του φαρμάκου με την προϋπόθεση ότι οι trough συγκεντρώσεις ήταν 0,01 µg/mL, (A) Ασθενής 1, (B) Ασθενής 2, (Γ) ασθενής 3, (Δ) Ασθενής 4.

Δ. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα, αναδρομική μελέτη, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μια αξιόπιστης μεθόδου εξατομίκευσης της δόσης της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης, σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε μεταμόσχευση μυελού των οστών. Η διαδικασία εξατομίκευσης της δόσης της βουσουλφάνης, απαιτεί τη μέτρηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα, σε διάφορες χρονικές στιγμές, προκειμένου να υπολογιστεί η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου και να χρησιμοποιηθεί η πληροφορία, που προκύπτει από αυτήν, για την προσαρμογή των επόμενων δόσεων. Για το σκοπό αυτό, γίνεται παραλαβή δειγμάτων σε καθορισμένα χρονικά σημεία, σύμφωνα πάντα με το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο. Από τους τέσσερις ασθενείς, που συμμετείχαν στη μελέτη αυτή, οι δυο, με βάση τις μετρήσεις που έγιναν για την πρώτη ημέρα χορήγησης, έχριζαν προσαρμογής της δόσης που λάμβαναν, προκειμένου να επιτευχθεί η τιμή έκθεσης – στόχου, που αντιστοιχούσε σε 4500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$. Στον έναν από αυτούς τους ασθενείς, βρέθηκε τιμή AUC μεγαλύτερη από το ανώτερο θεραπευτικό όριο και στον άλλο μικρότερη από το κατώτερο όριο. Και στις δυο περιπτώσεις εφαρμόστηκε η εξίσωση (8) για υπολογισθεί η δόση που έπρεπε να είχε χορηγηθεί. Στους υπόλοιπους ασθενείς, οι τιμές AUC, που υπολογίστηκαν, βρίσκονταν εντός των ορίων του θεραπευτικού παραθύρου, 3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$. Ο υπολογισμός των επιφανειών κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου για τα υπόλοιπα εικοσιτετράωρα χορήγησης της βουσουλφάνης διενεργήθηκε για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της έκθεσης στο φάρμακο τις διάφορες ημέρες χορήγησης. Ωστόσο, από αυτή τη διαδικασία δεν προέκυψε αξιόπιστο αποτέλεσμα, καθώς σε δυο ασθενείς μια από τις μέγιστες συγκεντρώσεις ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από τις αναμενόμενες, ενώ το ίδιο παρουσιάστηκε και στις trough συγκεντρώσεις σε όλους τους ασθενείς. Οι ύποπτες τιμές συγκεντρώσεων θεωρήθηκε ότι αντανakλούσαν σε πιθανά λάθη κατά τη διάρκεια της συλλογής των δειγμάτων και σε δυο περιπτώσεις σε επιμόλυνση του δείγματος από το φάρμακο που μόλις είχε εγχυθεί, λόγω πιθανής αιμοληψίας από τον κεντρικό καθετήρα.

Γενικά, η υποψία για λάθη κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας τίθεται σε τρεις περιπτώσεις. Πρώτον, όταν η υπολογιζόμενη έκθεση στο φάρμακο είναι εξαιρετικά υψηλή ή χαμηλή και εκτός θεραπευτικού εύρους και γι' αυτό είναι σημαντικό να επιβεβαιώνεται ότι η διαδικασία λήψης των δειγμάτων έχει γίνει με ακρίβεια. Δεύτερον, εάν η συγκέντρωση της βουσουλφάνης στο τέλος της έγχυσης (δηλαδή στις 3 ώρες) είναι εξαιρετικά υψηλή, τότε πιθανότατα η λήψη αίματος έγινε από τον κεντρικό καθετήρα απ' όπου γίνεται και η χορήγηση του φαρμάκου και υπολογίστηκε ψευδώς υψηλή συγκέντρωση. Τέλος, εάν οι συγκεντρώσεις είναι χαμηλές συνεχώς, τότε ίσως να μην έχει χορηγηθεί όλη η δόση του φαρμάκου, ή η ώρα που αναφέρεται να μην είναι η πραγματική ώρα της διακοπής της έγχυσης ή το δείγμα να μην είναι όντως αυτό (Fisher, et al., 2006).

Στην μελέτη αυτή, σε δυο περιπτώσεις στο τέλος της έγχυσης, οι τιμές που μετρήθηκαν στο πλάσμα ήταν αφύσικα υψηλές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συλλογή του δείγματος έγινε από τον κεντρικό καθετήρα και χωρίς να έχει προηγηθεί έκπλυση αυτού με φυσιολογικό ορό. Επίσης, και στους τέσσερις ασθενείς, παρατηρήθηκε ότι στις διάφορες ημέρες χορήγησης, οι ελάχιστες συγκεντρώσεις ήταν πολύ μεγαλύτερες από το αναμενόμενο, και

θεωρήθηκε πιθανό η δειγματοληψία να γινόταν μεν από περιφερική φλέβα, αλλά αφότου είχε ξεκινήσει η έγχυση της νέα δόσης βουσουλφάνης. Σε όλες τις τιμές των trough επιπέδων, που αντιστοιχούσαν στα δείγματα που λαμβάνονταν πριν τη χορήγηση της επόμενης δόσης του φαρμάκου, έγινε προσπάθεια υπολογισμού της ώρας που πιθανόν να πραγματοποιήθηκε η λανθασμένη αιμοληψία, με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$C = C_{ss} * (1 - e^{-k_{el} * t}) \quad \text{Εξίσωση (11)}$$

όπου C_{ss} η συγκέντρωση στη σταθεροποιημένη κατάσταση, C η συγκέντρωση του φαρμάκου τη χρονική στιγμή t και k_{el} η σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης. Η εξίσωση (11) ισχύει στην περίπτωση της ενδοφλέβιας έγχυσης σταθερού ρυθμού, όπως συμβαίνει και με τη βουσουλφάνη, η οποία χορηγείται με τρίωρη έγχυση. Η C_{ss} υπολογίζεται από τον τύπο

$$C_{ss} = \frac{R_{inf}}{CL} \quad \text{Εξίσωση (12)}$$

όπου R_{inf} ο ρυθμός έγχυσης και CL η κάθαρση του φαρμάκου (Μαχαίρας & Συμιλλίδου, 2007).

Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν, συνοψίζονται στον πίνακα Δ 1, από τον οποίο φαίνεται ότι στον ασθενή νούμερο 3 την τρίτη ημέρα χορήγησης η δειγματοληψία έγινε περίπου 45 λεπτά μετά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση αυτή τη χρονική στιγμή να είναι πολύ μεγαλύτερη από όσο έπρεπε. Επίσης, στον ασθενή νούμερο 2 την τρίτη ημέρα χορήγησης της βουσουλφάνης, η αιμοληψία έγινε περίπου 1,5 ώρες μετά την έναρξη χορήγησης. Ομοίως και στον ασθενή 4 για την τελευταία χορήγηση.

Πίνακας Δ 1: Πιθανές ώρες δειγματοληψίας, έτσι όπως υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση (11) για όλες τις αμφιλεγόμενες μετρήσεις πριν την έναρξη χορήγησης του φαρμάκου.

ΑΣΘΕΝΗΣ	C (μg/mL)	ΩΡΑ ΔΕΙΓ/ΨΙΑΣ (h) ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ	ΗΜΕΡΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΜΕΝΗ ΩΡΑ ΔΕΙΓ/ΨΙΑΣ (h/min)
1	0,0797	Πριν την έναρξη έγχυσης	2	0,045 / 2,7
	0,5692	Πριν την έναρξη έγχυσης	3	0,34 / 20
2	2,4719	Πριν την έναρξη έγχυσης	3	1,45 / 87
3	0,4822	Πριν την έναρξη έγχυσης	2	0,43 / 26
	0,8263	Πριν την έναρξη έγχυσης	3	0,77 / 46
	0,1903	Πριν την έναρξη έγχυσης	4	0,16 / 9,8
4	0,0570	Πριν την έναρξη έγχυσης	2	0,04 / 2
	0,1781	Πριν την έναρξη έγχυσης	3	0,11 / 6,8
	1,8658	Πριν την έναρξη έγχυσης	4	1,39 / 83

Τα λάθη αυτά, είχαν ως αποτέλεσμα να επηρεαστούν οι υπολογισμοί της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου και σε πολλές περιπτώσεις οι τιμές που βρέθηκαν δεν ήταν απλώς εκτός θεραπευτικού παραθύρου, αλλά αντιστοιχούσαν και σε έκθεση μεγαλύτερη από τη συνολική και για τις τέσσερις ημέρες χορήγησης της βουσουλφάνης. Το θεραπευτικό εύρος, όπως προαναφέρθηκε, έχει προσδιοριστεί σε 3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ για μια ημέρα χορήγησης και άρα, η συνολική έκθεση και τις 4 ημέρες χορήγησης είναι 14400 – 21600 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$. Όπως φαίνεται, παραπάνω, στον πίνακα Γ 5, σε έναν ασθενή (νούμερο 1) το υπολογιζόμενο AUC για το δεύτερο εικοσιτετράωρο ήταν 24478 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ με το γραμμικό κανόνα των τραπεζίων και 22374 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ με το συνδυασμό του με το λογαριθμικό κανόνα. Η τιμή αυτή είναι, όπως φαίνεται άλλωστε, υψηλότερη και της μέγιστης συνολικής έκθεσης με βάση τα παραπάνω όρια. Ομοίως και ο ασθενής 4, παρουσίασε τη τελευταία ημέρα χορήγησης της βουσουλφάνης ανάλογες τιμές AUC 29044 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ (γραμμικός κανόνας τραπεζίων) και 26409 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ (συνδυασμός γραμμικού και λογαριθμικού κανόνα τραπεζίων).

Για να αποφευχθούν στο μέλλον τέτοιου είδους λάθη και προβλήματα, όπως αυτά που αντιμετωπίστηκαν σε αυτή τη μελέτη, και να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις που γίνονται, θα πρέπει να τηρηθεί κατά γράμμα το πρωτόκολλο δειγματοληψίας. Στην προκειμένη περίπτωση, τα δείγματα έπρεπε να λαμβάνονται στις παρακάτω χρονικές στιγμές: ακριβώς πριν τη χορήγηση της βουσουλφάνης, αμέσως μόλις διεκόπη η ενδοφλέβια έγχυση του φαρμάκου, 1 ώρα και 6 ώρες μετά τη διακοπή της χορήγησης του φαρμάκου. Ο τρόπος με τον οποίο διενεργείται η δειγματοληψία είναι μέγιστης σημασίας, καθώς τυχόν λάθη μπορεί να επηρεάσουν δραματικά τα αποτελέσματα. Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται στις προκαθορισμένες ώρες και να σημειώνεται ο ακριβής χρόνος δειγματοληψίας, πράγμα που δεν κατέστη εφικτό στην προκειμένη περίπτωση. Επιπλέον, για τη συλλογή τους πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο περιφερική φλέβα. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει δυνατότητα τοποθέτησης περιφερικής φλεβικής γραμμής στον ασθενή, για τον οποιοδήποτε λόγο, πχ μη εύρεση καλής φλέβας ή μη συμμόρφωση του ασθενούς κλπ, και για τη συλλογή του δείγματος χρησιμοποιείται ο κεντρικός φλεβικός καθετήρας, από τον οποίο γίνεται και η χορήγηση του φαρμάκου, τότε οποιαδήποτε ποσότητα του φαρμάκου έχει μείνει στο εσωτερικό του αυλού του καθετήρα, μπορεί να απελευθερωθεί κατά τη συλλογή των δειγμάτων, επιμολύνοντάς τα, και να οδηγήσει σε λανθασμένα υψηλή συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα, εκείνη τη χρονική στιγμή. Για αποφευχθεί αυτό, πρέπει να επισημανθεί με κάποιο τρόπο ο αυλός του καθετήρα που χρησιμοποιείται για την έγχυση της βουσουλφάνης. Συνήθως, οι καθετήρες που χρησιμοποιούνται έχουν δύο ή τρεις αυλούς, άρα εφόσον επισημανθεί ο αυλός από τον οποίο χορηγείται το φάρμακο, τότε ο άλλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δειγματοληψία (Friese, 2011). Εάν ο καθετήρας έχει μόνο έναν αυλό, τότε οπωσδήποτε πρέπει να τοποθετηθεί και περιφερική φλέβα, από την οποία θα συλλέγονται τα δείγματα. Η δειγματοληψία δεν πρέπει να γίνεται ποτέ κατά τη διάρκεια της έγχυσης της βουσουλφάνης, διότι, επίσης, υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης με το εγχέομενο φάρμακο, ειδικά στην περίπτωση που δεν υπάρχει περιφερική φλέβα και η συλλογή δειγμάτων γίνεται από τον κεντρικό καθετήρα. Για γίνει αιμοληψία από τον κεντρικό φλεβικό καθετήρα θα πρέπει να ολοκληρωθεί πρώτα η χορήγηση του φαρμάκου και να αποσυνδεθεί ο σάκος που περιείχε το διάλυμα του φαρμάκου. Στη συνέχεια, γίνεται

καλή έκπλυση του αυλού από τον οποίο χορηγούταν το φάρμακο, με τουλάχιστον 5 mL φυσιολογικού ορού. Αφού γίνουν τα παραπάνω, τότε μόνο μπορεί να γίνει λήψη από τον κεντρικό καθετήρα, μετά από απόρριψη των πρώτων 3 mL αίματος πριν τη λήψη του δείγματος (Busulfex TM, 2011).

Επισημαίνεται ότι η έκπλυση του αυλού του κεντρικού καθετήρα με φυσιολογικό ορό δεν γίνεται μόνο για να αποφευχθεί η επιμόλυνση του δείγματος, αλλά επιπλέον και διότι η ακρίβεια στη δόση είναι πρωταρχικής σημασίας για το συγκεκριμένο φάρμακο. Επομένως, πρέπει η ποσότητα του φαρμάκου που έμεινε στις σωληνώσεις του καθετήρα μετά τη διακοπή της έγχυσης, να χορηγηθεί με κάποιο τρόπο στον ασθενή. Για επιτευχθεί αυτό, πρέπει να αφαιρείται ο σάκος που περιείχε το διάλυμα του φαρμάκου και να τοποθετείται στη θέση του σάκος με ενέσιμο φυσιολογικό ορό, ο οποίος θα χορηγείται με τον ίδιο ρυθμό, λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα του φαρμάκου που παραμένει στις σωληνώσεις (περίπου 2 mL), ώστε να εξασφαλιστεί πλήρης έγχυση της δόσης (Friese, 2011).

Το πιο σημαντικό, όμως, στάδιο κατά τη χορήγηση της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης είναι η ακρίβεια στο χρόνο χορήγησής της. Πρέπει να σημειώνονται επακριβώς οι ώρες έναρξης και διακοπής της έγχυσης του φαρμάκου, να τηρούνται με προσοχή οι καθορισμένες ώρες δειγματοληψίας και να σημειώνονται και αυτές, καθώς διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο για την ακρίβεια της φαρμακοκινητικής ανάλυσης. Ο χρόνος δειγματοληψίας υπολογίζεται από την έναρξη της έγχυσης, έτσι ώστε το δείγμα στις 3 ώρες να λαμβάνεται ακριβώς μετά τη διακοπή της έγχυσης του φαρμάκου. Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει ο νοσηλευτής που είναι υπεύθυνος για την έγχυση της βουσουλφάνης, να κρατά ημερολόγιο χορηγήσεων / δειγματοληψίας, στο οποίο θα αναγράφονται λεπτομερώς η ωρολογιακή ώρα έναρξης της τρίωρης έγχυσης και της διακοπής αυτής, καθώς επίσης και οι αντίστοιχες ώρες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες. Για παράδειγμα, εάν η έγχυση ξεκινήσει στις 09:05 το πρωί θα πρέπει να σημειωθεί αυτή η ώρα στο ημερολόγιο και όχι 09:00. Ομοίως, εάν το δείγμα που λαμβάνεται με βάση το πρωτόκολλο 1 ώρα μετά τη διακοπή της χορήγησης, ληφθεί 13:45, αντί για 13:05 που έπρεπε κανονικά, αν η έγχυση ξεκινούσε στις 09:05, θα πρέπει να σημειωθεί η ώρα 13:45 και όχι ότι πάρθηκε δείγμα μια ώρα μετά τη διακοπή. Αυτό συνιστάται, διότι μια καθυστερημένη δειγματοληψία (όπως στο παράδειγμα όπου καθυστέρησε 40 λεπτά), για την οποία όμως είναι γνωστή η ακριβής ώρα που έγινε, θα επηρεάσει λιγότερο το υπολογιζόμενο AUC, ενώ η αντίθετη περίπτωση, δηλαδή να υπάρχει καθυστερημένη δειγματοληψία, αλλά να μην αναφέρεται η ωρολογιακή ώρα στην οποία έγινε, δημιουργεί σημαντικά σφάλματα κατά την εκτίμηση του AUC. Επίσης, συστήνεται η χρήση του ίδιου κάθε φορά ρολογιού από τον υπεύθυνο χορήγησης και συλλογής των δειγμάτων, προκειμένου να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια κατά τη δειγματοληψία. Η ακριβής ώρα δειγματοληψίας πρέπει να αναγράφεται και στον περιέκτη που αποθηκεύεται το δείγμα (Fisher, et al., 2006) (Friese, 2011).

Πρέπει, επομένως, να δοθούν σαφείς οδηγίες και συστάσεις όσον αφορά τις ώρες συλλογής δειγμάτων, τον τρόπο συλλογής τους, την καταγραφή τους σε ημερολόγιο μαζί με τα υπόλοιπα στοιχεία που είναι χρήσιμα για την περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπως το βάρος του ασθενούς, την ηλικία του, τη νόσο, τη δόση του φαρμάκου που χορηγήθηκε, το θεραπευτικό παράθυρο και το AUC – στόχο, κλπ. Το τελευταίο έχει μεγάλη σημασία, επειδή πολλές φορές τα δείγματα δεν αναλύονται σε

εργαστήριο του νοσοκομείου, αλλά αποστέλλονται σε εξωτερικά εργαστήρια, όπως συνέβη και στην προκειμένη περίπτωση. Ο αναλυτής αλλά και όλοι οι συμμετέχοντες στις διαδικασίες που προηγούνται της ανάλυσης (νοσηλεύτες, γιατροί, φαρμακοποιοί) θα πρέπει να έχουν πρόσβαση στα στοιχεία αυτά, ο καθένας βέβαια για διαφορετικούς λόγους. Η κατάλληλη εκπαίδευση των παραπάνω ατόμων και ιδίως του νοσηλευτικού και ιατρικού προσωπικού, μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη μείωση των λαθών κατά τη συλλογή των δειγμάτων αίματος. Καλό θα ήταν, επίσης, ένας μόνο νοσηλεύτης να αναλάβει τη χορήγηση του φαρμάκου και τη δειγματοληψία, ώστε να αποφεύγονται τα λάθη λόγω ασυνεννοησίας μεταξύ του νοσηλευτικού προσωπικού και φυσικά να χρησιμοποιείται πάντοτε το ίδιο ρολόι για τον έλεγχο της ώρας.

Όσον αφορά τη μέθοδο ανάλυσης, με στόχο τη μείωση της μεταβλητότητας, για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης κατασκευάζονταν τρία δείγματα και υπολογιζόταν ο μέσος όρος τους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης βουσουλφάνης εκφράζονται με την αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση (RSD %) που υπολογίζεται από τον τύπο $RSD \% = (SD/AVERAGE) \times 100$, όπου SD η τυπική απόκλιση των λόγων των εμβαδών και AVERAGE ο μέσος όρος τους. Στον πίνακα Δ 2, παρατίθενται οι τιμές RSD % για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης για όλες τις καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν. Για τους ασθενείς έπρεπε να κατασκευάζονται τρία δείγματα για κάθε ώρα δειγματοληψίας, ωστόσο αυτό δεν ήταν εφικτό καθώς δεν υπήρχε επαρκής ποσότητα δείγματος για να αναλυθεί τρεις φορές. Μόνο σε έναν ασθενή υπήρχε ποσότητα που έφτανε για παρασκευή δύο δειγμάτων (ασθενής 1). Σε αυτό τον ασθενή οι τιμές RSD % για την πρώτη ημέρα χορήγησης ήταν 7,13 %, 3,16 % και 2,94 % για τη δειγματοληψία που αντιστοιχούσε στη διακοπή της έγχυσης, 1 και 6 ώρες μετά από αυτήν. Για τη δεύτερη και τρίτη ημέρα χορήγησης ήταν 4,55 % και 2,89 %, 2,08 % και 3,78 %, 2,81 % και 4,8 %, 3,5 % και 4,5 % για τις χρονικές στιγμές που αντιστοιχούσαν ακριβώς πριν την έγχυση, αμέσως μετά τη διακοπή της, 1 και 6 ώρες μετά από αυτήν. Λόγω του αναδρομικού χαρακτήρα της μελέτης, δεν υπήρξε η δυνατότητα συνεννόησης για λήψη μεγαλύτερης ποσότητας αίματος, καθώς οι ασθενείς είχαν μεταμοσχευθεί αρκετό καιρό πριν πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις και διαπιστωθεί η διακύμανση. Στο μέλλον, θα πρέπει να ζητηθεί από το συνεργαζόμενο ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό η λήψη μεγαλύτερης ποσότητας αίματος που να επαρκεί για τις απαιτούμενες μετρήσεις. Δεδομένου ότι, για κάθε δείγμα απαιτείται όγκος πλάσματος 500 μL, θα πρέπει να λαμβάνεται από τον ασθενή όγκος αίματος ικανός να παρέχει τουλάχιστον 1,5 mL πλάσματος, αν όχι περισσότερο, δηλαδή ≈ 5 mL αίματος ανά δείγμα.

Πίνακας Δ 2. Τιμές RSD % για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης στις καμπύλες αναφοράς.

Επίπεδο συγκέντρωσης (μg/mL)	RSD%			
	Καμπύλη 1	Καμπύλη 2	Καμπύλη 3	Καμπύλη 4
5	-	9.404	7.761	14.994
15	5.208	6.493	10.798	0.934
30	6.341	21.432	23.497	5.579
50	2.689	3.051	4.938	6.456
70	4.586	2.452	22.356	3.922
125	-	-	6.971	2.463
187.5	-	-	3.259	2.242

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, γίνεται φανερό ότι είναι εφικτή η παρακολούθηση των επιπέδων της βουσουλφάνης στο αίμα των ασθενών που λαμβάνουν το φάρμακο, και η μετέπειτα χρήση τους για την εξατομίκευση των δόσεων της, με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή υπεριώδους (HPLC – UV). Γενικά, για την ανάλυση της βουσουλφάνης και τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεών της στο πλάσμα, εκτός από την HPLC – UV (Heggie, et al., 1997) (Rifai, et al., 1997), έχουν αναπτυχθεί και αναφέρονται στη βιβλιογραφία αρκετές μέθοδοι όπως αέριος ή υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή μάζας (GC – MS και HPLC – MS), αέριος χρωματογραφία με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC – ECD), HPLC με ανιχνευτή φθορισμού, κλπ (Hara, et al., 2000) (Chen, et al., 1988). Η παρούσα μέθοδος προϋποθέτει φθηνότερη οργανολογία. Ένας βασικός περιορισμός της μεθόδου είναι ότι απαιτεί αρκετό χρόνο, καθώς η ανάλυση ενός δείγματος απαιτεί 15 λεπτά, ενώ στο σύνολό της η διαδικασία, συμπεριλαμβανομένης της προκατεργασίας των δειγμάτων, της ανάλυσης και της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, χρειάζεται για να ολοκληρωθεί τουλάχιστον 8 ώρες. Αυτό σημαίνει ότι τα αποτελέσματα που προκύπτουν μπορούν να γίνουν γνωστά στο ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό λίγες ώρες πριν τη χορήγηση της επόμενης δόσης, όταν πρόκειται για χορήγηση μια φορά την ημέρα και πριν την έναρξη χορήγησης της πρώτης δόσης της δεύτερης ημέρας όταν πρόκειται για χορήγηση ανά εξάωρο. Και φυσικά αν ληφθεί υπόψη και η διαδικασία της συλλογής των δειγμάτων και της χορήγησης του φαρμάκου, η διαδικασία εξατομίκευσης της δόσης της βουσουλφάνης διαρκεί περίπου 24 ώρες.

Όσον αφορά την εξατομίκευση της δόσης, στους δυο ασθενείς που παρουσίαζαν τιμές εκτός των θεραπευτικών ορίων, αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση τις μετρήσεις της πρώτης ημέρας χορήγησης της βουσουλφάνης. Ωστόσο, επειδή ο χαρακτήρας της μελέτης ήταν αναδρομικός και επομένως, η εξατομίκευση πραγματοποιήθηκε εικονικά, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε τι θα γινόταν μετά τη χορήγηση της νέας – διορθωμένης δόσης της βουσουλφάνης στους ασθενείς αυτούς. Αν, δηλαδή, μετά τη χορήγηση της προσαρμοσμένης δόσης η έκθεση στο φάρμακο βελτιωνόταν και ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ή εάν συνέχιζε να παραμένει στα ίδια χαμηλά ή υψηλά επίπεδα, με εκείνα που παρατηρήθηκαν με βάση τις μετρήσεις της πρώτης ημέρας και άρα απαιτείται περαιτέρω προσαρμογή αυτής. Τίθεται, λοιπόν, το ερώτημα κατά πόσο πραγματοποιείται ορθά η εξατομίκευση της δόσης της βουσουλφάνης σε έναν ασθενή, που βασίζεται στα

αποτελέσματα των συγκεντρώσεων της πρώτης ημέρας χορήγησης, και εάν είναι απαραίτητο στη συνέχεια μετά τη χορήγηση της προσαρμοσμένης δόσης να μετρώνται εκ νέου οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι έχει επιτευχθεί ο στόχος, δηλαδή τιμή AUC 3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$. Επιπλέον, εάν απαιτείται κάτι τέτοιο, τίθεται και το ερώτημα πόσα χρονικά σημεία δειγματοληψίας είναι επαρκή για να προκύψει ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα. Τα παραπάνω ερωτήματα μένουν προς διερεύνηση και απάντηση σε μελέτη που είναι σε εξέλιξη στο εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής του ΕΚΠΑ.

Η αναγκαιότητα για την προσαρμογή της δόσης κατά τη χορήγηση της βουσουλφάνης έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για πολλούς ερευνητές. Η εξατομίκευση του δοσολογικού σχήματος φαίνεται ότι μπορεί να βελτιώσει την έκβαση των ασθενών, μειώνοντας τον κίνδυνο τοξικότητας, που προκαλείται όταν παρατηρείται υπερέκθεση, αλλά και την απόρριψη του μοσχεύματος ή την υποτροπή της νόσου σε περιπτώσεις υποθεραπευτικών δόσεων. Μελέτες προτείνουν την εφαρμογή TDM με επακόλουθη τροποποίηση της δόσης σε ορισμένες κατηγορίες ασθενών. Σε αυτούς, ανήκουν οι πληθυσμοί με ασθένειες για τις οποίες υπάρχει ένα καθορισμένο εύρος τιμών έκθεσης στη βουσουλφάνη που να σχετίζεται με καλό θεραπευτικό αποτέλεσμα, όπως συμβαίνει σε ενήλικες με χρόνια μυελογενή λευχαιμία που λαμβάνουν ενδοφλεβίως βουσουλφάνη κάθε έξι ώρες. Για τους ασθενείς αυτούς, έχει διαπιστωθεί ότι τιμές AUC εκτός των ορίων 950 – 1520 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$ συνδέονται με κατακόρυφη αύξηση της θνητότητας και επομένως η εξατομίκευση της δόσης του φαρμάκου θα βοηθούσε. Μια άλλη κατηγορία ασθενών, για τους οποίους η παραπάνω διαδικασία έχει οφέλη, είναι εκείνοι στους οποίους παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους της βουσουλφάνης μεταξύ των ασθενών, όπως συμβαίνει στα παιδιά. Τέλος, σε υψηλού κινδύνου ασθενείς με αργούς ρυθμούς εμφύτευσης του μοσχεύματος (engraftment), αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας και μεγάλη διακύμανση στην έκθεση στη βουσουλφάνη, όπως είναι τα παιδιά με γενετικές παθήσεις, είναι χρήσιμη η προσαρμογή της δόσης, προκειμένου να επιτευχθεί η τιμή στόχος που συνδέεται με θετική έκβαση (Nath & Shaw, 2007).

Με βάση τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η παρακολούθηση των επιπέδων της βουσουλφάνης και η εξατομίκευση της δόσης της είναι απαραίτητη για τον υποψήφιο προς μεταμόσχευση ασθενή. Δεδομένων των διαφορετικών οδηγιών και πρωτοκόλλων χορήγησης της βουσουλφάνης που ακολουθούνται στα διάφορα μεταμοσχευτικά κέντρα που λειτουργούν στην Ελλάδα, θα πρέπει το πρωτόκολλο της συνολικής διαδικασίας δειγματοληψίας και εξατομίκευσης της δοσολογίας να προσαρμόζεται κάθε φορά στις συνθήκες και τις ανάγκες του εκάστοτε κέντρου μεταμόσχευσης μυελού των οστών. Για παράδειγμα, μπορεί να ισχύουν και να εφαρμόζονται διαφορετικές οδηγίες, είτε ως προς το δοσολογικό σχήμα, δηλαδή χορήγηση βουσουλφάνης ενδοφλεβίως μια φορά την ημέρα ή ανά 6 ώρες, είτε ως προς το είδος των κεντρικών φλεβικών καθετήρων που χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση και τη συλλογή των δειγμάτων (πχ Hickman, Broviac, Groshong, κλπ) και θα πρέπει και η διαδικασία εξατομίκευσης να προσαρμοστεί ανάλογα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στην παρούσα αναδρομική μελέτη έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μιας αξιόπιστης μεθόδου εξατομίκευσης της δοσολογίας της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Στους 4 ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη είχε χορηγηθεί βουσουλφάνη ενδοφλεβίως σε δόση 3,2 mg/kg βάρους σώματος μια φορά την ημέρα για 4 συνεχόμενες ημέρες, ακολουθούμενη από τη χορήγηση και άλλου κυτταροτοξικού παράγοντα.
- Προσδιορίστηκε η έκθεση στη βουσουλφάνη για κάθε ασθενή, με τον υπολογισμό της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου (AUC) μετά την πρώτη δόση και ελέγχθηκε αν η υπολογιζόμενη τιμή AUC βρισκόταν εντός του καθορισμένου θεραπευτικού εύρους (3600 – 5400 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$). Στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε, έγινε εικονική εξατομίκευση της δόσης της βουσουλφάνης, προσδιορίστηκε δηλαδή, η δόση που απαιτούνταν για να επιτευχθεί η τιμή – στόχος του AUC (4500 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$).
- Δυο ασθενείς παρουσίασαν τιμές εκτός των παραπάνω ορίων. Ένας από αυτούς είχε υψηλές τιμές και ο άλλος χαμηλές, και επομένως απαιτούνταν μείωση και αύξηση της δόσης, αντίστοιχα.
- Είναι εφικτή η παρακολούθηση των επιπέδων της βουσουλφάνης στο αίμα των ασθενών που λαμβάνουν το φάρμακο με τη χρήση της φθηνότερης οργανολογίας της HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού (UV).
- Περιορισμό της μεθόδου αποτελεί ο χρόνος που απαιτεί η συνολική διαδικασία εξατομίκευσης, αφού η προκατεργασία των δειγμάτων, η ανάλυση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, ολοκληρώνεται σε περίπου 8 ώρες.
- Επιδιώχθηκε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των τιμών AUC για κάθε εικοσιτετράωρο χορήγησης, χωρίς όμως να υπάρξει αξιόπιστο αποτέλεσμα, καθώς διαπιστώθηκε πως πολλές τιμές συγκεντρώσεων και ιδίως στα trough επίπεδα ήταν πολύ μεγαλύτερες από το αναμενόμενο.
- Αξιολογήθηκε η όλη διαδικασία δειγματοληψίας. Θεωρήθηκε πιθανή η συλλογή δειγμάτων σε λάθος χρονικές στιγμές και πιο συγκεκριμένα στις μετρήσεις που αντιστοιχούσαν στα trough επίπεδα η αιμοληψία είναι πιθανό να έλαβε χώρα μετά την έναρξη της χορήγησης της νέας δόσης.
- Έγινε προσπάθεια υπολογισμού της ώρας που πραγματοποιήθηκε η λανθασμένη δειγματοληψία και σε κάποιες περιπτώσεις ήταν πολύ αργότερα από την προκαθορισμένη ώρα.
- Σε δυο περιπτώσεις στις οποίες παρατηρήθηκαν πολύ υψηλά μέγιστα (peak) θεωρήθηκε πιθανή συλλογή από τον κεντρικό καθετήρα και όχι από περιφερική φλέβα όπως ενδείκνυται με αποτέλεσμα την επιμόλυνση των δειγμάτων με το εγχεόμενο φάρμακο.
- Η εξατομίκευση των δόσεων είναι απαραίτητη σε ορισμένες κατηγορίες ασθενών, όπως είναι οι παιδιατρικοί ασθενείς. Η αυστηρή τήρηση του πρωτοκόλλου

δειγματοληψίας, αφ' ενός και η κατάλληλη εκπαίδευση του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού, αφ' ετέρου, θα συμβάλλει σημαντικά στην αποφυγή λαθών που υπήρξαν στην προκειμένη περίπτωση.

- Κρίνεται απαραίτητη η τήρηση ημερολογίου στο οποίο θα αναφέρονται λεπτομερώς οι ώρες έναρξης και διακοπής της χορήγησης και της δειγματοληψίας καθώς επίσης και όλα τα στοιχεία που είναι απαραίτητα για την περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων, ώστε να υπολογιστεί και να αξιολογηθεί σωστά η τιμή AUC και να γίνει η εξατομίκευση στη συνέχεια.
- Δεδομένου ότι για κάθε δείγμα πρέπει να γίνουν τρεις μετρήσεις και για την παρασκευή απαιτείται όγκος πλάσματος 500 μ L κρίνεται αναγκαίο να λαμβάνεται μεγαλύτερος όγκος αίματος από τον ασθενή, περίπου 5 mL, ώστε να μπορεί να παρέχει 1,5 mL πλάσματος.
- Η εξατομίκευση των δόσεων της βουσουλφάνης είναι απαραίτητη για τον ασθενή και θα πρέπει το πρωτόκολλο της συνολικής διαδικασίας να προσαρμόζεται κάθε φορά στις συνθήκες και τις ανάγκες του εκάστοτε κέντρου μεταμόσχευσης μυελού των οστών, καθώς σε κάθε νοσοκομείο ισχύουν και εφαρμόζονται διαφορετικές οδηγίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbasi, N. και συν., 2011. Pharmacogenetics of Intravenous and Oral Busulfan in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *J Clin Pharmacol*, 51(10), pp. 1429-1438.

Aggrawal, C. και συν., 2006. Improved outcomes in intermediate- and high-risk aggressive non-Hodgkin lymphoma after autologous hematopoietic stem cell transplantation substituting intravenous for oral busulfan in a busulfan, cyclophosphamide, and etoposide preparative regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*, Τόμος 12, pp. 770-777.

Almog, S. και συν., 2011. Linearity and stability of intravenous busulfan pharmacokinetics and the role of glutathione in busulfan elimination. *Biol Blood Marrow Transplant*, Jan, 17(1), pp. 117-123.

Alnaim, L., 2007. Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy. *J Oncol Pharm Pract*, Dec, 13(4), pp. 207-221.

Andersson, B. και συν., 2002. Conditioning therapy with intravenous busulfan and cyclophosphamide (IV BuCy2) for hematologic malignancies prior to allogenic stem cell transplantation: a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8(3), pp. 145-154.

Andersson, B. και συν., 2000. Acute safety and pharmacokinetics of intravenous busulfan when used with oral busulfan and cyclophosphamide as pretransplantation conditioning therapy: a phase I study. *Biol Blood Marrow Transplant.*, 6(5A), pp. 548-554.

Andersson, B. και συν., 2002. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: defining a therapeutic window for i.v. BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8(9), pp. 477-485.

Angelucci, E. και συν., 1992. Sudden cardiac tamponade after chemotherapy for marrow transplantation in thalassaemia. *Lancet*, 1 Feb, 339(8788), pp. 287-289.

Ansari, M. και συν., 2010. Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children. *Bone Marrow Transplant*, Feb, 45(2), pp. 261-267.

Appelbaum, F. R., 2005. Hematopoietic Cell Transplantation. Στο: Harrison 's, επιμ. *Principles of Internal Medicine*. 16th επιμ. USA: McGraw Hill Companies, pp. 668-673.

Aschan, J., 2007. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Conditioning. *Best Pract Res Clin Haematol*, Jun, 20(2), pp. 295-310.

Baker, K. και συν., 2000. Busulfan pharmacokinetics do not predict relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*, Sep, 26(6), pp. 607-614.

Bartelink, I. και συν., 2009. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, Feb, 15(2), pp. 231-241.

Bartelink, I. και συν., 2008. Once-daily intravenous busulfan with therapeutic drug monitoring compared to conventional oral busulfan improves survival and engraftment in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, Jan, 14(1), pp. 88-98.

Bedford, P. & Fox, B., 1982. Repair of DNA interstrand crosslinks after busulphan: a possible mode of resistance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 8(1), pp. 3-7.

Bertholle Bonnet, V. και συν., 2007. Influence of Underlying Disease on Busulfan Disposition in Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients: A Nonparametric Population Pharmacokinetic Study. *Ther Drug Monit*, Apr, 29(2), pp. 177-184.

Bhagwatwar, H., Phadungpojna, S., Chow, D. & Andersson, B., 1996. Formulation and stability of busulfan for intravenous administration in high-dose chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 37(5), pp. 401-408.

Bishop, J. & Wassom, J., 1986. Toxicological review of busulfan (Myleran). *Mutat Res*, Jul, 168(1), pp. 15-45.

Blaise, D. και συν., 1992. Allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of a busulfan-cytosin versus cytosin-total body irradiation as preparative regimen: a report from the Groupe d' Etudes de la Greffe de Moelle Osseuse. *Blood*, 15 May, 79(10), pp. 2578-2582.

Bleyzac, N. και συν., 2001. Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant*, Oct, 28(8), pp. 743-751.

Bolinger, A. M. και συν., 2001. Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 28(11), pp. 1013-1018.

Bolinger, A. και συν., 2000. An evaluation of engraftment, toxicity and busulfan concentration in children receiving bone marrow transplantation for leukemia or genetic disease. *Bone Marrow Transplant*, May, 25(9), pp. 925-930.

Booth, B. και συν., 2007. Population pharmacokinetic- based dosing of intravenous busulfan in pediatric patients. *J Clin Pharmacol*, Jan, 47(1), pp. 101-111.

Browning, B. και συν., 2011. Busulfan Dosing in Children with BMIs $\geq 85\%$ Undergoing HSCT: A New Optimal Strategy. *Biol Blood Marrow Transplant*, Sep, 17(9), pp. 1-7.

Brunton, L. L., Parker, K. L., Blumenthal, D. K. & Buxton, I. L., 2008. PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Action and Elimination. Στο: Goodman & Gilman's, επιμ. *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. San Diego, CA: McGraw Hill Companies, pp. 1-14.

Buggia, I., Locatelli, F., Regazzi, M. & Zecca, M., 1994. Busulfan. *Ann Pharmacother*, Sep, 28(9), pp. 1055-1062.

- Buggia, I. και συν., 1996. Itraconazole can increase systemic exposure to busulfan in patients given bone marrow transplantation. *Anticancer Res*, Jul-Aug, 16(4A), pp. 2083-2088.
- Bunin, N. και συν., 2003. Randomized trial of busulfan vs total body irradiation containing conditioning regimens for children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Bone Marrow Transplant*, Sep, 32(6), pp. 543-548.
- Busilvex, 2008. *SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS*. Last update: 22/08/2012.
- Busulfex TM , 2011. *Package Insert*. Rockville, MD 20850: Otsuka America Pharmaceuticals.
- Chandy, M. και συν., 2005. Randomized trial of two different conditioning regimens for bone marrow transplantation in thalassemia--the role of busulfan pharmacokinetics in determining outcome. *Bone Marrow Transplant*, Nov, 36(10), pp. 839-845.
- Chao, D. & Korsmeyer, S., 1998. bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, Τόμος 16, pp. 395-419.
- Chen, T., Grochow, L., Hurowitz, L. & Brundrett, R. B., 1988. Determination of busulfan in human plasma by gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr*, 18 Mar, 425(2), pp. 303-309.
- Choe, S. και συν., 2012. A Simple Dosing Scheme for Intravenous Busulfan Based on Retrospective Population Pharmacokinetic Analysis in Korean Patients. *Korean J Physiol Pharmacol*, Aug, 16(4), pp. 273-280.
- Chou, R. και συν., 1996. Toxicities of total body irradiation for bone marrow transplantation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1 Mar, 34(4), pp. 843-851.
- Cho, Y. και συν., 2007. Pharmacokinetics and tolerability of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant*, May-Jun, 21(3), pp. 417-422.
- Ciurea, S. & Andersson, B., 2009. Busulfan in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Bone Marrow Transplant*, May, 15(5), pp. 523-526.
- Clarkson, B. και συν., 2003. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*, Jul, 17(7), pp. 1211-1262.
- Clift, R. και συν., 1994. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide. *Blood*, 15 Sep, 84(6), pp. 2036-2043.
- Coppell, J., Brown, S. & Perry, D., 2003. Veno-occlusive disease: cytokines, genetics, and haemostasis. *Blood Rev*, Jun, 17(2), pp. 63-70.
- Cory, S. & Adams, J. M., 2002. The bcl-2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nat Rev Cancer*, Sep, 2(9), pp. 647-656.

Craig, J., Haynes, A., McClelland, D. & Lundlam, C., 2005. Νοσήματα του Αίματος. Στο: Davidson's, επιμ. *Γενικές Αρχές και Κλινική Πράξη της Ιατρικής Παθολογίας*. 19th Έκδοση- 2η Ελληνική επιμ. s.l.:Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνος, pp. 966-967, 971-973.

Czerwinski, M., Gibbs, J. & Slattey, J., 1996. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metab Dispos*, Sep, 24(9), pp. 1015-1019.

Dalle, J. και συν., 2003. Intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants: clinical and pharmacokinetic results. *Bone Marrow Transplant*, Oct, 32(7), pp. 647-651.

Davies, S. και συν., 2000. Comparison of preparative regimens in transplants for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, Jan, 18(2), pp. 340-347.

de Jonge, M. και συν., 2005. Individualised Cancer Chemotherapy: Strategies and Performance of Prospective Studies on Therapeutic Drug Monitoring with Dose Adaptation. *Clin Pharmacokinet*, 44(2), pp. 147-173.

de Lima, M. και συν., 2004. Once daily intravenous busulfan and fludarabine: clinical and pharmacokinetic results of a myeloablative, reduced toxicity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in AML and MDS. *Blood*, 1 Aug, 104(3), pp. 857-864.

Dean, R., Pohlman, B. & Sweetenham, J., 2006. The use of intravenous compared with oral busulfan in high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT) for lymphoma is associated with improved relapse-free survival. *Blood*, 16 Nov, 108(11), p. 868a.

Deeg, H. J. και συν., 2000. Allogeneic and syngeneic marrow transplantation for myelodysplastic syndrome in patients 55 to 66 years of age. *Blood*, 15 Feb, 95(4), pp. 1188-1194.

DeLeve, D. & Wang, X., 2000. Role of oxidative stress and glutathione in busulfan toxicity in cultured murine hepatocytes. *Pharmacology*, Apr, 60(3), pp. 143-154.

Devergie, A. και συν., 1995. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase: a randomized trial of busulfan-cytosan versus cytosan-total body irradiation as preparative regimen: a report from the French Society of Bone Marrow Graft (SFGM). *Blood*, 15 Apr, 85(8), pp. 2263-2268.

Dix, S. και συν., 1996. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant*, Feb, 17(2), pp. 225-230.

Domen, J. & Weissman, I., 2003. Hematopoietic stem cells and other hematopoietic cells show broad resistance to chemotherapeutic agents in vivo when overexpressing bcl-2. *Exp Hematol*, Jul, 31(7), pp. 631-639.

Drablos, F. και συν., 2004. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, 2 Nov, 3(11), pp. 1389-1407.

Edward, C. & Sartorelli, A., 2009. Χημειοθεραπεία του Καρκίνου. Στο: Β. G. Katzung, επιμ. *ΒΑΣΙΚΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ*. 9η επιμ. ΑΘΗΝΑ: ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π.Χ.ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.

Ehrsson, H. & Hassan, M., 1984. Binding of busulfan to plasma proteins and blood cells. *J Pharm Pharmacol*, Oct, 36(10), pp. 694-696.

Ehrsson, H., Hassan, M., Ehrnebo, M. & Beran, M., 1983. Busulfan kinetics. *Clin Pharmacol Ther*, Jul, 34(1), pp. 86-89.

Elhasid, R. και συν., 2010. Influence of Glutathione S-Transferase A1, P1, M1, T1 Polymorphisms on Oral Busulfan Pharmacokinetics in Children With Congenital Hemoglobinopathies Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Pediatr Blood Cancer*, 1 Dec, 55(6), pp. 1172-1179.

EMA, 2005. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000472/WC500052062.pdf. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://www.ema.europa.eu>
[Πρόσβαση 03 Oct 2012].

EMA, 2008. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000472/WC500052060.pdf. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://www.ema.europa.eu>
[Πρόσβαση 3 Oct 2012].

Evans, W. & McLeod, H., 2003. Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, 6 Feb, 348(6), pp. 538-549.

Fernandez, H. και συν., 2002. Evaluation of safety and pharmacokinetics of administering intravenous busulfan in a twice-daily or daily schedule to patients with advanced hematologic malignant disease undergoing stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8(9), pp. 486-492.

Ferry, C. & Socie, G., 2003. Busulfan-cyclophosphamide versus total body irradiation-cyclophosphamide as preparative regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: what have we learned?. *Exp Hematol*, Dec, 31(12), pp. 1182-1186.

Fisher, V., Barnes, Y. & Nuss, S., 2006. Pretransplant Conditioning in Adults and Children: Dose Assurance With Intravenous Busulfan. *Oncol Nurs Forum*, 3 Nov, 33(2), pp. 36-46.

Friese, C., 2011. *Nursing Considerations with Pharmacokinetics-directed Therapy of Intravenous Busulfan*, Massachusetts: CME University.

Gaziev, J. και συν., 2010. Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic profile with therapeutic drug monitoring. *Blood*, 3 Jun, 115(22), pp. 4597-4606.

- Geddes, M. και συν., 2008. High busulfan exposure is associated with worse outcomes in daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*, Feb, 14(2), pp. 220-228.
- Ghiculescu, R., 2008. Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. *Aust Prescr*, Τόμος 31, pp. 42-44.
- Gibbs, J., Czerwinski, M. & Slattery, J., 1996. Busulfan-glutathione conjugation catalyzed by human liver cytosolic glutathione S-transferases. *Cancer Res*, 15 Aug, 56(16), pp. 3678-3681.
- Gibbs, J. και συν., 1999. The Impact of Obesity and Disease on Busulfan Oral Clearance in Adults. *Blood*, 15 Jun, 93(12), pp. 4436-4440.
- Gibbs, J. και συν., 1997. Age-dependent tetrahydrothiophenium ion formation in young children and adults receiving high-dose busulfan. *Cancer Res*, 15 Dec, 57(24), pp. 5509-5516.
- Glantzbecker, B. και συν., 2012. Important Drug Interactions in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: What Every Physician Should Know. *Biol Blood Marrow Transplant*, Jul, 18(7), pp. 989-1006.
- Grochow, L., 1993. Busulfan disposition: the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol*, Aug, 20 (4 Suppl 4), pp. 518-526.
- Grochow, L. και συν., 1989. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol*, 25(1), pp. 55-61.
- Grochow, L., Krivit, W., Whitley, C. & Blazar, B., 1990. Busulfan disposition in children. *Blood*, 15 Apr, 75(8), pp. 1723-1727.
- Gulbis, A., Culotta, K., Jones, R. & Andersson, B., 2011. Busulfan and Metronidazole: An Often Forgotten but Significant Drug Interaction. *Ann Pharmacother*, Jul, 45(7-8), p. 39.
- Hall, A. & Tilby, M., 1992. Mechanisms of action of and modes of resistance to alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev*, Sep, 6(3), pp. 163-173.
- Hara, S. και συν., 2000. High-performance liquid chromatographic quantification of busulfan in human serum after fluorescence derivatization by 2 - naphthalenethiol. *Anal Sci*, 16(3), pp. 287-291.
- Hare, C. και συν., 1997. Characterization of the mechanisms of busulfan resistance in a human glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40(5), pp. 409-414.
- Hartley, J. & Fox, B., 1986. Cross-linking between histones and DNA following treatment with a series of dimethane sulphonate esters. *Cancer Chemother Pharmacol*, 17(1), pp. 56-62.
- Hartman, A., Williams, S. & Dillon, J., 1998. Survival, disease-free survival and adverse effects of conditioning for allogeneic bone marrow transplantation with

busulfan/cyclophosphamide vs total body irradiation: a meta-analysis. *Bone Marrow Transplant*, Sep, 22(5), pp. 439-443.

Hassan, M., 1999. The role of busulfan in bone marrow transplantation. *Med Oncol*, Sep, 16(3), pp. 166-176.

Hassan, M. & Ehrsson, H., 1987. Metabolism of ¹⁴C-busulfan in isolated perfused rat liver. *Eur J Drug Metab. Pharmacokinet*, Jan-Mar, 12(1), pp. 71-76.

Hassan, M. & Ehrsson, H., 1987. Urinary metabolites of busulfan in rat. *Drug Metab Dispos*, May-Jun, 15(3), pp. 399-402.

Hassan, M. και συν., 1989. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of busulfan during high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant*, Jan, 4(1), pp. 113-114.

Hassan, M., Ehrsson, H., Wallin, I. & Eksborg, S., 1988. Pharmacokinetic and metabolic studies of busulfan in rat plasma and brain. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, Oct-Dec, 13(4), pp. 301-305.

Hassan, M. και συν., 1996. Busulphan kinetics and limited sampling model in children with leukemia and inherited disorders. *Bone Marrow Transplant*, Nov, 18(5), pp. 843-850.

Hassan, M. και συν., 1994. Busulfan bioavailability. *Blood*, 1 Oct, 84(7), pp. 2144-2150.

Hassan, M. και συν., 2000. The effect of busulfan on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and its 4-hydroxy metabolite: time interval influence on therapeutic efficacy and therapy-related toxicity. *Bone Marrow Transplant*, May, 25(9), pp. 915-924.

Hassan, M. και συν., 1991. Pharmacokinetics of high dose busulfan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol*, 28(2), p. 130.

Hassan, M. και συν., 1993. Influence of prophylactic anticonvulsant therapy on highdose busulphan kinetics. *Cancer Chemother Pharmacol*, 33(3), pp. 181-186.

Hassan, M. και συν., 1989. Pharmacokinetics and metabolic studies of high dose busulfan in adults. *Eur J Clin Pharmacol*, 36(5), p. 525.

Hassan, M. και συν., 1992. In vivo distribution of [¹¹C]-busulfan in cynomolgus monkey and in the brain of a human patient. *Cancer Chemother Pharmacol*, 30(2), pp. 81-85.

Hassan, M. και συν., 2000. Ketobemidone may alter busulfan pharmacokinetics during high-dose therapy. *Ther Drug Monit*, Aug, 22(4), pp. 383-385.

Hassan, Z. και συν., 2001. Pharmacokinetics of liposomal busulphan in man. *Bone Marrow Transplant*, Mar, 27(5), pp. 479-485.

Heggie, J. και συν., 1997. Validation of a high – performance liquid chromatographic assay method for pharmacokinetic evaluation of busulfan. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 9 May, 692(2), pp. 437-444.

Hoffer, E. και συν., 2004. A simple approximation for busulfan dose adjustment in adult patients undergoing bone marrow transplantation. *Ther Drug Monit*, Jun, 26(3), pp. 331-335.

Iwamoto, T. και συν., 2004. DNA intrastrand cross-link at the 50-GA-30 sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Sci*, May, 95(5), pp. 454-458.

Johnson, L. και συν., 2008. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol*, Sep, 48(9), pp. 1052-1062.

Jones, R. και συν., 1987. Venoocclusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation*, Dec, 44(6), p. 778.

Kashyap, A. και συν., 2002. IV versus Oral Busulfan as Part of a Busulfan/ Cyclophosphamide Preparative Regimen for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Decreased Incidence of Hepatic Venoocclusive Disease (HVOD), HVOD-Related Mortality and Overall 100-Day Mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8(9), pp. 493-500.

Kim, S. και συν., 2005. Morbidity and non-relapse mortality after allogeneic bone marrow transplantation in adult leukemia patients conditioned with busulfan plus cyclophosphamide: a retrospective comparison of oral versus intravenous busulfan. *Haematologica*, Feb, 90(2), pp. 285-286.

Kim, S. και συν., 2011. Influence of GST gene polymorphisms on the clearance of intravenous busulfan in adult patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, Aug, 17(8), pp. 1222-1230.

Kusama, M. και συν., 2006. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clin Chim Acta*, Jun, 368(1-2), pp. 93-98.

Leather , H. L. & Poon, B. B., 2008. Acute Leukemias. Στο: J. T. DiPiro, και συν. επιμ. *Pharmacotherapy: A Pathophysiological Approach*. 7th επιμ. USA: McGraw Hill Companies, pp. 2259-2280.

Lee, J. και συν., 2005. Decreased incidence of hepatic veno-occlusive disease and fewer hemostatic derangements associated with intravenous busulfan vs oral busulfan in adults conditioned with busulfan 1 cyclophosphamide for allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol*, May, 84(5), pp. 321-330.

Lee, J. και συν., 2012. Highly Variable Pharmacokinetics of Once-Daily Intravenous Busulfan When Combined with Fludarabine in Pediatric Patients: Phase I Clinical Study for Determination of Optimal Once-Daily Busulfan Dose Using Pharmacokinetic Modeling. *Biol Blood Marrow Transplant*, Jun, 18(6), pp. 944-950.

Liesner, R. J., Leiper, A. D., Hann, I. M. & Chessells, A. M., 1994. Late effects of intensive treatment for acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *J Clin Oncol*, May, 12(5), pp. 916-924.

Ljungman, P. και συν., 1997. High busulfan concentrations are associated with increased transplant - related mortality in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant*, Dec, 20(11), pp. 909-913.

Madden, T. και συν., 2007. Pharmacokinetics of once daily IV Busulfan as a part of pretransplantation preparative regimens: a comparison with an every 6-hour dosing schedule. *Biol Blood Marrow Transplant*, Jan, 13(1), pp. 56-64.

Malar, R. και συν., 2011. Therapeutic drug monitoring is essential for intravenous busulfan therapy in pediatric hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant*, Sep, 15(6), pp. 580-588.

Mamlouk, K. και συν., 2005. Modification of the Bu/Cy myeloablative regimen using daily parenteral busulfan: reduced toxicity without the need for pharmacokinetic monitoring. *Bone Marrow Transplant*, Apr, 35(8), pp. 747-754.

Marchand, D., Rimmel, R. & Abdel-Monem, M., 1988. Biliary excretion of a glutathione conjugate of busulfan and 1,4-diiodobutane in the rat. *Drug Metab Dispos*, Jan-Feb, 16(1), pp. 85-92.

Maschan, A. A. και συν., 2004. Fludarabine, low-dose busulfan and antithymocyte globulin as conditioning for Fanconi anemia patients receiving bone marrow transplantation from HLA-compatible related donors. *Bone Marrow Transplant*, Aug, 34(4), pp. 305-307.

McCune, J. S. και συν., 2013. Variation in Prescribing Patterns and Therapeutic Drug Monitoring of Intravenous Busulfan in Pediatric Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *J Clin Pharmacol*, Mar, 53(3), pp. 264-275.

McCune, J. S. και συν., 2002. Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, Aug, 30(3), pp. 167-173.

McPherson, M. E. και συν., 2011. Safety and efficacy of targeted busulfan therapy in children undergoing myeloablative matched sibling donor BMT for sickle cell disease. *Bone Marrow Transplant*, Jan, 46(1), pp. 27-33.

Meng, A. και συν., 2003. Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. *Exp Hematol*, Dec, 31(12), pp. 1348-1356.

Nath, C. E. και συν., 2008. Variability in the pharmacokinetics of intravenous busulphan given as a single daily dose to paediatric blood or marrow transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*, Jul, 66(1), pp. 50-59.

Nath, C. & Shaw, P., 2007. Busulfan in Blood and Marrow Transplantation: Dose, Route, Frequency and Role of Therapeutic Drug Monitoring. *Curr Clin Pharmacol*, Jan, 2(1), pp. 75-91.

- Nguyen, L. και συν., 2004. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant*, May, 33(10), pp. 979-987.
- Nguyen, L., Leger, F., Lennon, S. & Puozzo C, 2006. Intravenous busulfan in adults prior to hematopoietic stem cell transplantation: a population pharmacokinetic study. *Cancer Chemother Pharmacol*, Jan, 57(2), pp. 191-198.
- Nilsson, C. και συν., 2003. The effect of metronidazole on busulfan pharmacokinetics in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, Mar, 31(6), pp. 429-435.
- Olavarria, E. και συν., 2000. A phase I/II study of multiple-dose intravenous busulfan as myeloablation prior to stem cell transplantation. *Leukemia*, Nov, 14(11), pp. 1954-1959.
- Pacheco, J., Stratton, N. & Gibson, N., 1989. Comparison of the mechanism of action of busulfan with hepsulfam, a new antileukemic agent, in the L1210 cell line. *Cancer Res*, Sep, 49(18), pp. 5108-5110.
- Paci, A. και συν., 2012. Pharmacokinetic Behavior and Appraisal of Intravenous Busulfan Dosing in Infants and Older Children: The Results of a Population Pharmacokinetic Study From a Large Pediatric Cohort Undergoing Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Ther Drug Monit*, Apr, 34(2), pp. 198-208.
- Perkins, J. B. & Yee, G. C., 2008. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Στο: J. T. DiPiro, και συν. επιμ. *Pharmacotherapy: A Pathophysiological Approach*. 7th επιμ. USA: McGraw Hill Companies, pp. 2331-2347.
- Perkins, J. και συν., 2011. Pharmacokinetic targeting of i.v. BU with fludarabine as conditioning before hematopoietic cell transplant: the effect of first-dose area under the concentration time curve on transplant-related outcomes. *Bone Marrow Transplant*, Nov, 46(11), pp. 1418-1425.
- Peters, W. P. και συν., 1987. Clinical and pharmacologic effects of high dose single agent busulfan with autologous bone marrow support in the treatment of solid tumors. *Cancer Res*, 1 Dec, 47(23), pp. 6402-6406.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. & Moore, P. K. επιμ., 2007. Στο: *ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ*. 5η επιμ. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ ΑΕ, pp. 754-756.
- Regazzi, M. B. και συν., 1993. Disposition of high-dose busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, Jul, 54(1), pp. 45-52.
- Rifai, N., Sakamoto, M., Lafi, M. & Guinan, E., 1997. Measurement of plasma busulfan concentration by high - performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit*, Apr, 19(2), pp. 169-174.
- Ringden, O. και συν., 1999. Increased risk of chronic graft-versus-host disease, obstructive bronchiolitis, and alopecia with busulfan versus total body irradiation: long-term results of a

randomized trial in allogeneic marrow recipients with leukemia. *Blood*, 1 Apr, 93(7), pp. 2196-2201.

Ringden, O. και συν., 1994. A randomized trial comparing busulfan with total body irradiation as conditioning in allogeneic marrow transplant recipients with leukemia—a report from the Nordic Bone Marrow Transplantation Group. *Blood*, 1 May, 83(9), pp. 2723-2730.

Russell, J. A. και συν., 2002. Once-daily intravenous busulfan given with fludarabine as conditioning for allogeneic stem cell transplantation: study of pharmacokinetics and early clinical outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8(9), pp. 468-476.

Ryu, S. και συν., 2007. Randomized comparison of four-times-daily versus once-daily intravenous busulfan in conditioning therapy for hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, Sep, 13(9), pp. 1095-1105.

Sanders, J. E., 1999. Stem-cell transplant preparative regimens. *Pediatr Transplant*, 3(Suppl 1), pp. 23-34.

Sandstrom, M. και συν., 2001. Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulfan in bone marrow transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant.*, Oct, 28(7), pp. 657-664.

Santos, G. W. και συν., 1983. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med*, 1 Dec, 309(22), pp. 1347-1353.

Schechter, t. και συν., 2007. Pharmacokinetic Disposition and Clinical Outcomes in Infants and Children Receiving Intravenous Busulfan for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, Mar, 13(3), pp. 307-314.

Schuler, U. και συν., 1994. Busulfan pharmacokinetics in bone marrow transplant patients: is drug monitoring warranted?. *Bone Marrow Transplant*, Nov, 14(5), pp. 759-765.

Schuler, U. S. και συν., 1998. Pharmacokinetics of intravenous busulfan and evaluation of the bioavailability of the oral formulation in conditioning for haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, Aug, 22(3), pp. 241-244.

Shaughnessy, P. και συν., 2006. Phase I and pharmacokinetic study of once-daily dosing of intravenously administered busulfan in the setting of a reduced-intensity preparative regimen and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as immunotherapy for renal cell carcinoma. *Mil Med*, Feb, 171(2), pp. 161-165.

Shaw, P. J., Nath, C. E., Berry, A. & Earl, J. W., 2004. Busulphan given as four single daily doses of 150 mg/m² is safe and effective in children of all ages. *Bone Marrow Transplant*, Aug, 34(3), pp. 197-205.

Shaw, P. J., Scharping, C. E., Brian, R. J. & Earl, J. W., 1994. Busulfan pharmacokinetics using a single daily high-dose regimen in children with acute leukemia. *Blood*, 1 Oct, 84(7), pp. 2357-2362.

Slattery, J. T. και συν., 1997. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood*, 15 Apr, 89(8), pp. 3055-3060.

Slattery, J. T. και συν., 1995. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics (published erratum appears in Bone Marrow Transplant 1996 Oct;18(4):829). *Bone Marrow Transplant*, Jul, 16(1), pp. 31-42.

Socie, G. και συν., 2001. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood*, 15 Dec, 98(13), pp. 3569-3574.

Socie, G. και συν., 2000. New malignant diseases after allogeneic marrow transplantation for childhood acute leukemia. *J Clin Oncol*, Jan, 18(2), pp. 348-357.

Srivastava, A. και συν., 2004. Glutathione S-transferase M1 polymorphism: A risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. *Blood*, 1 Sep, 104(5), pp. 1574-1577.

Thall, P. F., Champlin, R. E. & Andersson, B. S., 2004. Comparison of 100-day mortality rates associated with IV busulfan and cyclophosphamide vs other preparative regimens in allogeneic bone marrow transplantation for CML: Bayesian sensitivity analyses of confounded treatment and center effects. *Bone Marrow Transplant*, Jun, 33(12), pp. 1191-1199.

Tong, W. P. & Lundlum, D. B., 1980. Crosslinking of DNA by Busulfan. Formation of diguanyl derivatives. *Biochim Biophys Acta*, 27 Jun, 608(1), pp. 174-181.

Trams, E. και συν., 1959. Dimethanesulphonoxybutane (Myleran), preliminary studies on distribution and metabolic fate in the rat. *Biochem Pharmacol*, May, 2(1), pp. 7-16.

Tran, H. και συν., 2004. Pharmacokinetics and Individualized Dose Adjustment of Intravenous Busulfan in Children with Advanced Hematologic Malignancies Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, Nov, 10(11), pp. 805-812.

Tran, H. T. και συν., 2000. Individualizing high-dose oral busulfan: prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant*, Sep, 26(5), pp. 463-470.

Tse, W. T. και συν., 2009. Age-dependent pharmacokinetic profile of single daily dose i.v. busulfan in children undergoing reduced-intensity conditioning stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant*, Aug, 44(3), pp. 145-156.

- Tutschka, P. J., Copelan, E. A. & Klein, J. P., 1987. Bone marrow transplantation for acute leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood*, Nov, 70(5), pp. 1382-1388.
- Tutschka, P. J. & Santos, G. W., 1975. Bone marrow transplantation in the busulfan-treated rat. I. Effect of cyclophosphamide and rabbit antirat thymocyte serum as immunosuppression. *Transplantation*, Aug, 20(2), pp. 101-106.
- Tutschka, P. J. & Santos, G. W., 1975. Bone marrow transplantation in the busulfan-treated rat. II. Effect of cyclophosphamide and antithymic serum on the presensitized state. *Transplantation*, Aug, 20(2), pp. 116-122.
- Ullery, L. L. και συν., 2000. Busulfan clearance in renal failure and hemodialysis. *Bone Marrow Transplant*, Jan, 25(2), pp. 201-203.
- Valdez, B. C. και συν., 2008. Altered gene expression in busulfan - resistant human myeloid leukemia. *Leuk Res*, Nov, 32(11), pp. 1684-1697.
- Vassal, G. και συν., 1993. Chronopharmacology of High-Dose Busulfan in Children. *Cancer Res*, 1 Apr, 53(7), pp. 1534-1537.
- Vassal, G. και συν., 1990. Dose-dependent Neurotoxicity of High-Dose Busulfan in Children: A Clinical and Pharmacological Study. *Cancer Res*, 1 Oct, 50(19), pp. 6203-6207.
- Vassal, G. και συν., 1993. Busulfan disposition below the age of three: alteration in children with lysosomal storage disease. *Blood*, 1 Aug, 82(3), pp. 1030-1034.
- Vassal, G. και συν., 1989. Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol*, 24(6), pp. 386-390.
- Vassal, G. και συν., 2008. Prospective validation of a novel IV busulfan fixed dosing for paediatric patients to improve therapeutic AUC targeting without drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol*, Jan, 61(1), pp. 113-123.
- Westerhof, G. R. και συν., 2001. O6-Benzylguanine potentiates BCNU but not busulfan toxicity in hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, May, 29(5), pp. 633-638.
- Westerhof, G. R. και συν., 2000. Comparison of different busulfan analogues for depletion of hematopoietic stem cells and promotion of donor-type chimerism in murine bone marrow transplant recipients. *Cancer Res*, 1 Oct, 60(19), pp. 5470-5478.
- WHO, 2012. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. Στο: *International Agency for Research on Cancer. Pharmaceuticals. A Review of Human Carcinogens*. Lyon, France: s.n., pp. 39-46.
- Williams, C. B. και συν., 2004. Dose Modification Protocol Using Intravenous Busulfan (Busulfex) and Cyclophosphamide Followed by Autologous or Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Patients with Hematologic Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*, Sep, 10(9), pp. 614-623.

Zwaveling, J. και συν., 2005. Intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics in association with early clinical outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant*, Jan, 35(1), pp. 17-23.

Zwaveling, J. και συν., 2008. Glutathione S-transferase polymorphisms are not associated with population pharmacokinetic parameters of busulfan in pediatric patients. *Ther Drug Monit*, Aug, 30(4), pp. 504-510.

Κουππάρης, Μ. Α., 2008. *Σημειώσεις Χημειομετρίας - Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων*. Αθήνα : Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Χημική Ανάλυση - Έλεγχος Ποιότητας.

Μαχαίρας, Π. & Συμλλίδου, Μ., 2007. Στο: *Φαρμακοκινητική*. Αθήνα: Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), pp. 40-45, 53-62.

Πάγκαλης, Γ. Α., 2008. Μεταμόσχευση Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων. Στο: Γ. Α. Πάγκαλης, επιμ. *Αιματολογία στην Κλινική Πράξη*. Γ 'ανατύπωση επιμ. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης, pp. 1097-1166.

Παναγοπούλου, Ε., 2012. *Διατριβή: Βελτιστοποίηση και Επικύρωση Μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό του φαρμάκου Busulfan σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος*. Αθήνα: Πρόγραμμα Χημική Ανάλυση - Έλεγχος Ποιότητας, ΕΚΠΑ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου εξατομίκευσης της δοσολογίας της ενδοφλέβιας βουσουλφάνης σε ασθενείς, που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Μέθοδοι: Οι ασθενείς έλαβαν ενδοφλέβια βουσουλφάνη σε δόση 3,2 mg/kg μια φορά την ημέρα για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, με τρίωρη έγχυση μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα. Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος μετά την πρώτη δόση, άλλα και μετά τις επόμενες δόσεις (12 – 16 για κάθε ασθενή), μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις της βουσουλφάνης στο πλάσμα των ασθενών, με πρόσφατα ανεπτυγμένη HPLC μέθοδο, υπολογίστηκαν οι τιμές AUC μετά την πρώτη δόση και αξιολογήθηκαν συγκρινόμενες με το θεραπευτικό εύρος (3600 – 5400 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). Στους ασθενείς που εμφάνισαν υποθεραπευτικά ή τοξικά επίπεδα, έγινε εικονική εξατομίκευση της δόσης. Ακολούθως, υπολογίστηκαν οι τιμές AUC για τις υπόλοιπες ημέρες θεραπείας, ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα αυτών, και αξιολογήθηκε η διαδικασία δειγματοληψίας.

Αποτελέσματα: Δύο ασθενείς εμφάνισαν τιμές AUC εκτός θεραπευτικού εύρους και έχρηζαν προσαρμογής της δόσης της βουσουλφάνης. Ο ένας παρουσίασε υποθεραπευτικά επίπεδα ($\text{AUC}_{\text{infinity}} = 3490,13 \mu\text{M}\cdot\text{min}$) και απαιτούσε υψηλότερη δόση (4,13 mg/kg), ενώ ο δεύτερος εμφάνισε τοξικές τιμές ($\text{AUC}_{\text{infinity}} = 5973,06 \mu\text{M}\cdot\text{min}$) και απαιτούσε μείωση δόσης (2,41 mg/kg). Ο έλεγχος επαναληψιμότητας δεν κατέστη δυνατός, λόγω πιθανών λαθών κατά τη διαδικασία δειγματοληψίας, που οδήγησαν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τις αναμενόμενες σε διάφορες χρονικές στιγμές και κυρίως στα trough επίπεδα.

Συμπεράσματα: Αν και απαιτεί αρκετές ώρες, είναι δυνατή η παρακολούθηση των επιπέδων βουσουλφάνης στο αίμα με μέθοδο HPLC – UV. Απαιτείται προσοχή κατά τη συλλογή των δειγμάτων αίματος, κατάλληλη εκπαίδευση του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού και προσαρμογή του πρωτοκόλλου στις συνθήκες του εκάστοτε νοσοκομείου, καθώς η τήρησή του συμβάλλει άμεσα στο σωστό προσδιορισμό των AUC και στη σωστή εξατομίκευση των δόσεων.

Λέξεις Κλειδιά: Βουσουλφάνη, Εξατομίκευση Δοσολογίας, Μεταμόσχευση Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων, Πρωτόκολλο Δειγματοληψίας, HPLC – UV.

ABSTRACT

Objectives: To develop a reliable dose individualization method for intravenous busulfan administration in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

Methods: All patients received a 3.2 mg/kg intravenous infusion of busulfan over 3 hours, once daily for 4 days, via a central venous catheter. Blood samples were collected after the first and following doses (a total of 12 – 16 samples for each patient), concentrations were measured using a recently developed HPLC method, and the AUC values were calculated for the first dose and compared with those of the established therapeutic range (3600 – 5400 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). For patients with subtherapeutic or toxic levels the required dose for achieving the desired AUC value was estimated. Subsequently, the AUC values were calculated for the remaining days of treatment in order to check their repeatability, and the process of blood sample collection was evaluated.

Results: Two patients achieved AUC values out of the therapeutic range indicated that busulfan dose adjustment. One of them had subtherapeutic levels ($\text{AUC}_{\text{infinity}} = 3490.13 \mu\text{M}\cdot\text{min}$) and required a higher dose (4.13 mg/kg) while the other achieved toxic levels ($\text{AUC}_{\text{infinity}} = 5973.06 \mu\text{M}\cdot\text{min}$) and required a smaller dose (2.41 mg/kg). The repeatability of AUC estimations could not be ascertained due to errors during the sampling process, resulting in higher than expected concentrations at various time points, particularly trough levels.

Conclusions: Although it requires several hours, it is feasible to use the HPLC – UV analytical method for monitoring busulfan blood levels. Care should be taken during blood sample collection, to ensure appropriate training of health professionals and to adapt monitoring protocols in accordance with hospital policy, because strict compliance with sampling protocols directly contributes to the correct determination of AUCs and dose individualization.

Keywords: Busulfan, Dose Individualization, HSCT, Sampling Protocols, HPLC – UV.