

## ZÁVAŽNÁ A NEOČEKÁVANÁ CNS TOXICITA U DÍTĚTE LÉČENÉHO HIGH DOSE METHOTREXÁTEM – OTÁZKY Z MINULOSTI ZŮSTÁVAJÍ NEZODPOVĚZENY

### SIGNIFICANT AND UNEXPECTED TOXICITY IN A CHILD TREATED WITH HIGH-DOSE THERAPY WITH METHOTREXATE – PAST QUESTIONS REMAINING UNANSWERED

VALÍK D.<sup>1</sup>, ZAPLETAL O.<sup>2</sup>, DEMLOVÁ R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, BRNO

<sup>2</sup> DĚTSKÁ NEMOCNICE FN BRNO, ODDĚLENÍ DĚTSKÉ ONKOLOGIE

<sup>3</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÝCH STUDIÍ, BRNO

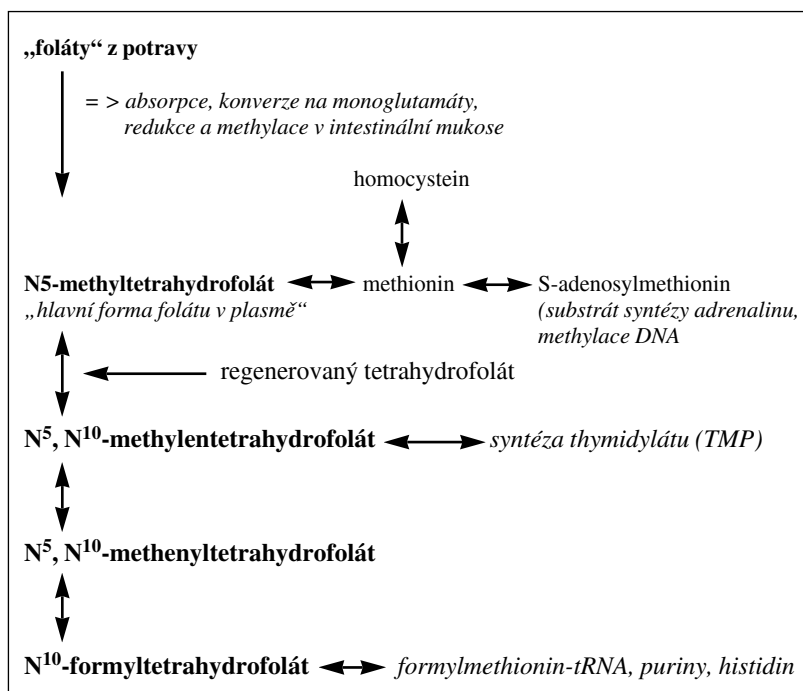
**Souhrn: Východiska:** Methotrexát je jedním z nejvíce používaných cytostatik v dětské onkologii. Rozpětí terapeuticky používaných dávek je ve srovnání s jinými cytostatiky neobvykle široké. Navzdory dlouhodobému používání MTX je dosud v klinické praxi mnoho empirie a nejasností. **Typ studie a soubor:** Autoři shrnuli současné poznatky o metabolismu MXT a pokusili se zhodnotit možnosti predikce klinické efektivity i toxicity. Uvádějí kazuistiku neočekávané a klinicky velmi závažné CNS toxicity, která se objevila v souvislosti s podáním MTX. **Metody a výsledky:** Na Oddělení dětské onkologie FN Brno je léčen devítiletý chlapec s akutní hybridní, bcr-abl pozitivní leukémií dle protokolu ALL-BFM 95 pro vysoké riziko. Jeho součástí je i blok high-dose methotrexátu v dávce 5 g/m<sup>2</sup>. Čtvrtý den prvního bloku se objevila vysoce závažná neurotoxicita, křeče s kvantitativní poruchou vědomí (Glasgow coma scale 5) vyžadující resuscitační péči s umělou plicní ventilací v délce 30 hodin. Pokles hladin MTX v séru byl významně prodloužen. **Závěry:** Neočekávaná, až život ohrožující toxicita se nevyhýbá ani dlouhodobě úspěšně používaným cytostatikům. U preparátů v klinické onkologii dosud nepostradatelných, by bylo potřebné mít k dispozici spolehlivější metodické nástroje, které predikují případný – a potenciálně fatální – nežádoucí efekt podávané terapie.

**Summary: Background:** Methotrexate is one of the most frequently used cytotoxic drugs in pediatric oncology. Its dosing range used in the clinic is unusually broad comparing with other commonly used anticancer drugs. Despite the longterm use of methotrexate in treatment of selected malignancies, its clinical use is still covered with a lot of empirics and its dosage and metabolism poorly substantiated by relevant subject-oriented data. **Type of study and cohort:** Current knowledge on methotrexate metabolism was reviewed and potential of efficacy and toxicity prediction outlined. A case report of unexpected and clinically serious CNS toxicity that followed administration of high-dose methotrexate is presented. **Methods and results:** A nine year old boy is treated for acute hybrid bcr-abl positive leukemia using the protocol ALL-BFM95 containing a block of 5 g.m<sup>-2</sup> high-dose methotrexate. On the fourth day of the first block an episode of severe neurotoxicity occurred with convulsions and deep coma (Glasgow grade 5) requiring emergent resuscitation care with artificial ventilation for a period of 30 hours. We observed a markedly prolonged decrease of plasma methotrexate levels. **Conclusions:** Unexpected and sometimes life-threatening toxicity is a complication of treatment of even those anticancer drugs with proven efficacy record. For such drugs as of yet indispensable in clinical oncology, it is important to concentrate effort to devise methods capable of predicting potential and possibly fatal therapy-related side effect.

#### Úvod

Methotrexát (MTX) je v dětské onkologii jedním z nejvíce používaných cytotoxických léčiv. Jeho klinický efekt byl prokázán v léčbě ALL, NHL, histiocytóz, osteosarkomů a dalších malignit. Methotrexát je podáván řadou různých způsobů, vč. cesty orální, intratekální nebo intravenózní. Intravenózně se v současnosti podává velmi široké dávkové rozpětí od bolusu 10 mg až po dávky dosahující 33 000 mg/m<sup>2</sup>. Jako „high-dose MTX therapy“ se obvykle označuje dávkový režim nad 1 g/m<sup>2</sup> povrchu těla (BSA – body surface area). Podávání high-dose MTX je spojeno s následnou selektivní „rescue“ terapií pomocí nízkých dávek leukovorinu (5-formyltetrahydrofolát), aby se zabránilo nežádoucí toxicitě při zachování klinické účinnosti (18, 21). Methotrexát je strukturním analogem kyseliny listové, která je esenciálním kofaktorem pro syntézu purinového kruhu, thymidinových nukleotidů, kofaktorem interkonverze aminokyselin serin/glycin a substrátem remethylace homocys-

teinu za vzniku methioninu (obr. 1). Methotrexát je silným inhibitorem dihydrofolátreduktázy (DHFR), enzymu, který je odpovědný za konverzi různých forem folátu na biologicky aktivní formu – tetrahydrofolát (8). Jsou-li v buňce přítomny vysoké koncentrace MTX, dojde k depleci tetrahydrofolátu, která vede k následné depleci substrátů kriticky důležitých k syntéze DNA. Determinantou cytotoxicity methotrexátu se zdá být míra inhibice syntézy thymidylové kyseliny, protože syntéza thymidylátu z uridylyátu je jedinou reakcí, která oxiduje tetrahydrofolátový kofaktor na jeho inaktivní dihydrofolátovou formu (18). Jinou determinantou může být i nadbytek vazebných míst na DHFR, jelikož intracelulární hladiny tohoto cílového enzymu jsou 20-30 x vyšší než hladiny potřebné k udržení nezbytné metabolicky směřitelné hotovosti tetrahydrofolátu (9). Methotrexát sdílí membránové transportní procesy a intracelulární metabolické cesty s přirozeně se vyskytujícími formami folátu. Po vstupu do buňky je methotrexát rychle vázán na DHFR



a jeho vychytávání je jednosměrné, dokud nedojde k saturaci vazebných míst na cílovém enzymu (8). Po dosažení stavu saturace je nadbytek volného léku (jako u přirozených folátů) přeměněn na polyglutamátové formy (MTX+Glu<sub>5-7</sub>), které nemohou jednoduše opustit intracelulární prostředí. Tvorba polyglutamátů přispívá jak k cytotoickému efektu MTX tak k jeho nežádoucím účinkům (9). Metabolismus methotrexátu se liší u dospělých a dětí (16). U dětí byl např. zjištěn větší distribuční objem a dle některých studií byly plasmatické koncentrace léku nižší než u dospělých. Účinná látka byla u dětí i rychleji vylučována (21, 26). Normalizovaná clearance methotrexátu je u dětí také vyšší, a navíc věkově závislá (7). Methotrexát je primárně eliminován v nezměněné podobě ledvinami. Renální clearance methotrexátu může překročit clearance kreatininu (18). Methotrexát je také metabolizován v játrech na 7-hydroxymethotrexát (27), pravděpodobně některým z enzymových systémů genové rodiny CYP. Ačkoli jde o minoritní cestu eliminace methotrexátu, může tvorba tohoto méně cytotoického metabolitu přispívat ke snížené protinádorové aktivitě parentální látky, pravděpodobně kompeticí o buněčný transport a polyglutamylaci. Celková clearance methotrexátu však nebývá podstatněji ovlivněna jaterní dysfunkcí. Experimentálně zjištěné způsoby resistance na methotrexát jsou snížený membránový transport, zvýšené hladiny cílového enzymu spojené s amplifikací genu pro DHFR, alterace afinity DHFR k methotrexátu, snížení polyglutamylace a snížení aktivity thymidylátsynthasy, kterou může nahrazovat tzv. „salvage pathway“ prostřednictvím zvýšené aktivity thymidinkinasy (9). Primárními toxickými účinky vysokodávkovaného methotrexátu je myelosuprese, orointestinální mukosidita, která se objevuje za 5–14 dnů po podání léku, s častým rozvojem febrilní neutropenie (24). Paušální podávání hemopoetických růstových faktorů po monoterapii vysokodávkovaným MTX nepřineslo pacientům žádnou léčebnou výhodu, v případech kombinované polychemoterapie, kde je HD MTX jedním z řady léků v bloku chemoterapie, je použití hemopoetických růstových faktorů již poněkud racionálnější (23). Vývoj toxických reakcí po podání je úměrný dávce léku a trvání expozice (3). Nejzávažnějším projevům toxicity lze většinou zabránit včasným podáním leukovorinu (12), jehož předpokladem je důsledné monitorování plasmatických hladin MTX. Hepatotoxicita po MTX

je také obvyklým jevem. Dochází především k elevaci ALT, AST, bilirubin bývá zvýšen méně často. V některých protokolech – např. protokol pro terapii osteosarkomu u dětí POG9351 – se s paušální hepatotoxicitou přímo počítá a kontraindikací k podání high-dose MTX je elevace ALT na více než 10-násobek normy. Elevace jaterních enzymů bývá však ve většině případů přechodným jevem, který odezní po vysazení léku. Přetrvávání laboratorních známek poškození jater by pak mělo být spíše důvodem k pátrání po jiných příčinách, např. virových. V průběhu high-dose terapie se může objevit i nefrotoxicita. Poškození ledvin může být způsobeno precipitací MTX nebo 7-OH-MTX v kyselé moči, nebo může být následkem přímého působení MTX na tubulární buňky (1). Navzdory klinickému úspěchu tohoto léku, který byl v předchozích dekáдах dosažen, neurotoxicita nejasné etiologie je dalším problémem, který se u high-dose terapie může objevit (19, 25). Předpokládá se, že neurotoxicita MTX může být způsobena interferencí MTX s recyklací bipterinů s následkem poruchy syntézy dopaminu a serotoninu (15). Bylo dále prokázáno, že MTX způsobuje akumulaci adenosinu, látky s významnými neuromodulačními vlastnostmi (6).

V souladu s tímto nálezem bylo pozorováno, že podání methoxanthinů, které jsou antagonisty adenosinových receptorů, snižuje akutní toxicitu způsobenou methotrexátem (2, 19). Methotrexát pohotově zvyšuje hladiny plasmatického homocysteinu (2,5,20). Důležitost tohoto pozorování tkví také ve skutečnosti, že se homocystein zdá být toxický pro vaskulární endotel; řada prací ukazuje na roli homocysteinu v indukci předčasného výskytu kardiovaskulárního onemocnění (14). Neurologické následky terapie MTX, které zahrnují fokální neurologický deficit, mineralizující mikroangiopathii a léze bílé hmoty daly vzniknout dalším spekulacím, že mikrovaskulární léze způsobené homocysteinem mohou být alespoň zčásti odpovědné za CNS toxicitu methotrexátu (17). Stručně shrnuto, navzdory více než 50 roků výzkumu a klinického používání není optimální dávkování methotrexátu doposud známo (11). Současné dávkovací schéma založené na BSA (opakuje se) zajišťuje dostatečnou přesnost, nikoli správnost dávkování, jelikož nebere v úvahu reakci jednotlivce na podaný lék. Z hlediska farmakokinetiky je výše plasmatické hladiny MTX dána hlavně mírou renální eliminace a transformace na jeho 7-hydroxyderivát enzymovým cytochromovým systémem v játrech. Jaterní cytochromové systémy jsou v poslední době předmětem zvýšeného odborného zájmu, protože se ukazuje, že genetické vlivy v expresi, resp. v aktivitě těchto enzymů mohou významně měnit individuální odpověď jedince na podaný lék. V poslední době se v klinické onkologii objevují některé nové aktivity, které se soustřeďují na hodnocení odezvy tumoru na podanou léčbu – prediktivní onkologie. Jiným novým přístupem je sledování reakce hostitele tumoru (pacienta) na podanou terapii – jde o tzv. farmakogenetiku (také se používá termín farmakogenomika). Společným jmenovatelem těchto dvou přístupů je snaha individualizovat terapii jednak vzhledem k onemocnění (tj. použít daný lék na ten či onen nádor, kde lze předpokládat efektivitu) a jednak vzhledem k pacientovi, tj. použít takový režim, kterým způsobí nejmeně škod, ale bude mít pokud možno měřitelný efekt.

### Kazuistika

Na Oddělení dětské onkologie DN FNB je léčen devítiletý chlapec s akutní, hybridní, bcr-abl pozitivní leukémií, s delecí chromosomu 7, s aberantní expresí CD 13, CD 66c, CD 7 a CD

**Tabulka: hladiny MTX v séru v jednotlivých časových intervalech (čas T0 až T120 hod) od začátku infuze HDMTX (mikromol/l)**

| Hodina                                  | 24             | 36   | 42   | 48   | 54   | 60   | 66   | 72   | 78   | 84   | 90  | 96   | 102  | 108 | 114  | 120  |
|-----------------------------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|
| <b>Hladiny MTX (μmol/l) 1. aplikace</b> | > 100          | 9    | 5    | 3,9  | 1,98 | 1,34 | 0,88 | 0,87 | 0,84 | 0,52 | 0,5 | 0,39 | 0,39 | 0,2 | 0,19 | 0,09 |
| <b>Hladiny MTX 2. aplikace</b>          | 17 (h 28: 4.0) | 0.55 | 0.26 | 0.21 | 0.12 |      |      |      |      |      |     |      |      |     |      |      |

5a hyperexpresi CD 10. Rodinná i osobní anamnéza jsou pro nynější onemocnění nevýznamné. Dva dny před stanovením diagnózy byl pacient vyšetřen u svého dětského lékaře pro výsev petechií. V krevním obrazu byla leukocytosa  $54 \times 10^9/l$ , trombocytopenie  $61 \times 10^9/l$  a hemoglobin 122 g/l. Iničiální infiltrace kostní dřeni blasty dosáhla 74%. Léčba byla zahájena začátkem září 2001 a je vedena dle protokolu ALL-BFM 95 pro vysoké riziko (HR). Zpočátku probíhala léčba bez komplikací. Ode dne 25 Protokolu IA pokračoval pacient v chemoterapii ambulantně. V den 31 Protokolu IA byl přijat na naše oddělení s febrilní neutropenií, která byla komplikována katetrovou sepsi s nutností extrakce centrálního venosního katetru. Stav se podařilo zvládnout kombinovanou antibiotickou a antimykotickou léčbou. Den 33 Protokolu IA nebylo dosaženo dřeňové remise onemocnění. Znovu byl zaveden tunelizovaný CVK a pacient zahájil plánovaný blok chemoterapie. Jeho součástí (blok HR 1) je i podání vysokodávkovaného methotrexátu  $5 \text{ g/m}^2$  ve 24 hodinové kontinuální infuzi (HD MTX). Na začátku infuze HD MTX byla rovněž provedena lumbální punkce s aplikací 12 mg MTX, 30 mg Cytosinarabinosidu a 10 mg Prednisolonu. V mozkomíšním moku byl normální biochemický i cytologický nále. Další dny pokračoval blok nízkodávkovaným Cyklofosfamidem. Monitorovali jsme hladiny MTX a podávali leukovorin dle protokolu ALL BFM 95. Hladiny MTX byly vysoké a klesaly jen pomalu, jak je patrné z tabulky. Proto byla hodinu 36 od začátku HD MTX zvýšena hydratace na  $4500 \text{ ml/m}^2/\text{den}$  a hodinu 42 bylo zahájeno podávání leukovorinu ve zvýšených dávkách dle protokolu. Čtvrtý den bloku dopoledne, přibližně hodinu 70 od začátku infuze HD MTX, se pacient začal cítit „divně“. Somatický nále i laboratorní hodnoty byly v mezích normy. Asi po hodině došlo ke zhoršení stavu, nastoupila kvalitativní a posléze i kvantitativní porucha vědomí, Glasgow coma scale (GCS) kleslo na 5. Po inhalaci kyslíku se stav zlepšil, pacient se přechodně probíral. Neurolog konstatoval hypotonický syndrom s globální š.o. hyporeflexií, bez paréz, bez meningeálních jevů a poruchu vědomí na úrovni soporu. Oční vyšetření neprokázalo patologii na očním pozadí, akutní laboratorní odběry byly v mezích normy. Pro podezření na akutní CNS toxicitu HD MTX byla aplikována infuze Syntophyllinu,  $3 \text{ mg/kg/dávku}$ , bez viditelného efektu. Objevily se záškuby obličejového svalstva a poté i tonicko-klonické křeče končetin, které nereagovaly na podání Diazepam. Pacient začal slinit a hypoventilovat. Asi 2 hodiny po začátku potíží byl zaintubován a přeložen na ARO k umělé plicní ventilaci. Kromě již zavedené terapie byla podávána antiedematózní terapie. Po 30 hodinách byl pacient odtlumen a extubován. Při překladu zpět na naše oddělení byl plně při vědomí, orientován. Akutní CT i MR vyšetření neprokázala intrakraniální ložiskovou ani difúzní patologii. Hladiny MTX poklesly pod sledovanou hranici  $0,25 \text{ μmol/l}$  až hodinu 108. Vzhledem k prodloužené eliminaci MTX byla i hepatotoxicita výrazně vyšší. Před blokem HR1 byly hodnoty jaterních testů v normě, postupné zvyšování nastalo od hodiny 66 a maximum hodnot jsme pozorovali 9 dní po začátku infuze HD MTX,

kdy dosáhly hodnoty ALT  $40 \text{ μkat/l}$ , AST  $14,8 \text{ μkat/l}$  a GMT  $11,6 \text{ μkat/l}$  i přes hepatoprotektivní léčbu. Blok chemoterapie HR1 byl při začátku potíží přerušen a nebyl již dokončen. Druhý blok chemoterapie proběhl již bez komplikací – sérové hladiny MTX viz tabulka.

## Diskuse

Interindividuální (a intraindividuální) variabilita v odpovědi na podanou dávku léčiva na straně jedné a v indukované toxicitě na straně druhé jsou v klinické praxi dva zásadní problémy. Tato variabilita je v řadě případů podmíněna genetickými faktory (farmakogenetické „polymorfismy“), které vedou k alteraci metabolismu léčiva nebo k alteraci receptoru pro dané léčivo (4). Polymorfismy enzymů zajišťujících metabolismus léčiva (tj. farmakokinetický polymorfismus) se zdají být ve srovnání s receptorovými polymorfismy (tj. farmakodynamický polymorfismus) častější (10). Jedním z hlavních problémů v onkologické farmakologii je predikce účinnosti terapie, jednak v rovině odpovědi tumoru jednak v rovině toxicity pro hostitele. Farmakogeneticky podmíněná variabilita enzymů metabolizujících chemoterapeutika je jednou z hlavních determinant, která určuje benefit terapie pro pacienta. Nepředpověditelná dispozice s léčivem, k níž může in vivo docházet, může vyústit v nedostatečné dávkování léku s následným selháním kurativního záměru onkologa, nebo v excesivní toxicitě preparátu danou opožděnou eliminací léku obvykle s úzkým terapeutickým rozpětím (13,22). Současná praxe v onkologii je dávkovat chemoterapii na základě výšky a povrchu těla, což lze považovat za postup přesný („precise“ v metrológickém slova smyslu = zajistí reprodukovatelnost a srovnatelnost dávkování), nikoli správný („accurate“ = neodráží biologickou kapacitu hostitele metabolizovat podanou dávku a její frakci využít k vlastnímu protinádorovému působení). Farmakogeneticky modifikovaná dávkovací schémata mohou být novou a zajímavou alternativou tradičním a problematickým dávkovacím postupům. Paleta toxických příznaků, kterou pozorujeme po high-dose MTX terapii, je velmi široká a v některých případech progreduje až do život ohrožujícího stavu, jak plyne z prezentované kazuistiky. Syntophyllin, doporučený pro zvládnutí akutní neurotoxicity při HDMTX, neměl v případě našeho pacienta žádný okamžitý efekt. Nelze ani uspokojivě vysvětlit, proč se míra toxické odezvy u pacienta tak podstatně liší mezi jednotlivými cykly. Není v současné době způsob, kterým bychom mohli v klinické praxi zjistit, že pacient bude na jinak standardní dávku terapeutika odvozenou od platného protokolu, reagovat neadekvátní odpovědí. U léků, jako je MTX, které jsou pro chemoterapii v dětské onkologii v současnosti nepostradatelné, by bylo proto potřebné mít k dispozici spolehlivé metodické nástroje, které s nejvyšší možnou správností predikují případný – a potenciálně fatální – nežádoucí efekt.

**Acknowledgement: práce byla zčásti podpořena prostředky projektů MZČR065269705 a NC7104-3/2002**

## Literatura

1. Allegra CJ. Antifolates. In: Chabner BA, Collins JM. Eds.: *Cancer Chemotherapy Principles and Practice*. Philadelphia: JB Lippincott 1990, 110.
2. Bernini JC, Fort SW, Griener JC. Et al.: Aminophylline for methotrexate-induced neurotoxicity. *Lancet* 345, 1995, 544-547.
3. Bleyer WA.: The Clinical Pharmacology of Methotrexate. *Cancer* 41, 1978, 36-42.
4. Boddy I., Idle J.: The role of pharmacogenetics in chemotherapy: modulation of tumor response and host toxicity. *Cancer Sur.* 1993, 17, 79-104.
5. Broxson EH., Stork LC., Allen RH et al.: Changes in plasma methionine and total homocysteine levels in patients receiving methotrexate infusion. *Cancer Res* 49, 1989, 5879-5883.
6. Cronstein BN., Naime D., Ostad E.: The antiinflammatory mechanism of methotrexate: Increased adenosine release at inflamed sites diminished leucocyte accumulation in and in vivo model of inflammation. *J Clin Invest* 92, 1992, 2675-2682.
7. Donelli MG., Zuchetti M., Robatto A., et al.: Pharmacokinetics of HD-MTX in infants, children and adolescents with non-B acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 24, 1995, 154-159.
8. Goldman ID, Matherly LH.: The cellular pharmacology of methotrexate. *Pharmacol Ther.* 28, 1985, 77-81.
9. Jolivet J., Cowan KH., Curt GA.: The pharmacology and Clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 309, 1983, 1094-1104.
10. Kalow W.: Pharmacogenetics: its biological roots and the medical challenge. *Clin. Pharmacol. Ther* 1993, 54 235-241.
11. Keefe DA., Capizzi RL., Rudnick SA. Methotrexate cytotoxicity for L5178Y/Asn- Lymphoblasts: Relationship of dose and duration of exposure to tumor cell viability
12. Klener P.: Protinádorová chemoterapie, Galén 1996, 283-284.
13. Kobayashi K., Ratain M.: Individualizing dosing for cancer chemotherapy. *Semin Oncol.* 1993, 20, 30-42
14. Malinow MR. Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *J Intern Med* 236, 1994, 603-617.
15. Millot J., Dhondt J-L., Mazingue F et al.: Changes of cerebral bipterin and biogenic amine metabolism in leukemic children receiving 5 g/m2 intravenous methotrexate. *Pediatr Res* 37, 1995, 151-154.
16. Najjar TA., Al Fawaz IM.: Pharmacokinetics in children with acute lymphoblastic leukemia. *Chemotherapy* 39, 1993, 242-245.
17. Phantumchida K., Intragumtorchai T., Kasantikul V.: Stroke-like syndrome, mineralizing microangiopathy and neuroaxonal dystrophy following intrathecal methotrexate therapy. *Neurology* 41. 1991, 1847-1848.
18. Pizzo PA., Poplack DG. Eds.: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 3rd edition, Lippincott-Raven Publishers, 1997, 237-240.
19. Quinn CT., Griener JC., Bottiglieri T., Hyland K., Farrow A., Kamen BA.: Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF in children who receive methotrexate for the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 15, 1997, 8, 2800-2806.
20. Refsum H. Wesenberg F, Ueland P.: Plasma homocysteine in children with ALL: Changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res.* 51, 1991, 828-835.
21. Slaný J., Grundmann M., Brozmanová H., Blažek B., Štěrba J.: High-Dose Methotrexate for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma II.*, Harwood Acad. Publishers, ISBN 3-7186-5934-4, ISSN 1074-3944, 1997, 183-188.
22. Štěrba J., Bajciová V.: Is it necessary to develop specific therapeutic approaches for Middle East pediatric lymphomas? (Pediatric lymphomas in Kuwait Cancer Control Centre-KCCC), *Medical and Pediatric Oncology*, 5, 1997, 451.
23. Štěrba J, Dembická D.: Aktuální pohled na roli hemopoetických růstových faktorů granulocytární řady při standardně dávkované chemoterapii u dětí. *Klinická onkologie*, 3, 2000, 91-95.
24. Štěrba J., Mayer J., Kořístek Z., Krejčí M., Dembická D.: Febrilní neutropenie u dětí. *Česko-slovenská pediatrie*, 9, 1998, 570-575.
25. Walker RW., Allen JC., Rosen G. Et al.: Transient cerebral dysfunction secondary to high-dose methotrexate. *J Clin Oncol* 4, 1986, 1845-1850.
26. Wang YM., Kim PY., Latin E.: Degradation and clearance of methotrexate in children with osteosarcoma receiving high-dose infusion. *Med Pediatr Oncol.* 4, 1978, 221-223.
27. Wolfrom C., Hepp R., Hartmann R.: Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid, and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol.* 39, 1990, 377-383.