

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETER JOVIČ

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETER JOVIČ

**UPORABA BAYESOVE METODE IN UMETNIH NEVRONSKIH
MREŽ ZA NAPOVEDOVANJE FARMAKOKINETIKE
METOTREKSATA IN ODMERJANJA FOLINSKE KISLINE PRI
ZDRAVLJENJU AKUTNE LIMFOBLASTNE LEVKEMIJE**

**USE OF BAYESIAN METHOD AND ARTIFICIAL NEURAL
NETWORKS FOR PREDICTION OF METHOTREXATE
PHARMACOKINETICS AND DOSAGE ADJUSTMENT OF
FOLINIC ACID IN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC
LEUKEMIA**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvomizr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Iztoku Grabnarju mag. farm. za pomoč pri izdelavi in pisanju diplomske naloge. Hvala Vam za vse koristne nasvete ter potrpežljivost.

Najlepša hvala tudi moji družini za vso podporo v času mojega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag farm.

Peter Jovič

VSEBINA

VSEBINA	1
POVZETEK	3
ABSTRACT	4
OKRAJŠAVE	5
1. UVOD	7
1. 1. AKUTNA LIMFOBLASTNA LEVKEMIJA	8
1. 2. FOLNA KISLINA	10
1. 3. METOTREKSAT	12
1. 3. a) Mehanizem delovanja	12
1. 3. b) Mehanizem odpornosti	13
1. 3. c) Farmakokinetika	13
1. 3. d) Neželeni učinki	14
1. 4. FOLINSKA KISLINA	15
1. 4. a) Mehanizem delovanja	15
1. 5. POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA	16
1. 5. a) Variabilnosti	18
1. 5. b) Individualni in populacijski modeli	18
1. 5. c) Teoretične osnove modelov z BM	19
1. 5. d) PFK in farmakokinetika MTX	21
1. 6. UMETNE NEVRONSKE MREŽE	22
1. 6. a) Lastnosti nevronske mreže	23
1. 6. b) Učenje nevronske mreže	24
1. 7. VREDNOTENJE NAPOVEDI MODELOV	26
2. NAMEN DELA	28
3. METODE	29
3. 1. KLINIČNI DEL RAZISKAVE	29
3. 2. RAZVOJ OSNOVNIH MODELOV	31
3. 3. RAZVOJ MODELOV ZA NAPOVEDOVANJE ODMERKOV FOLINSKE KISLINE	35
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4. 1. ODVISNOST OD ČASA (ŠTEVILA ČASOVNIH PODATKOV)	37
4. 1. a) Model BM-1 na vzorcu »učni«	38

4. 1. b) Model BM-1 na vzorcu »učni – inter«	39
4. 2. PRIMERJAVA OSNOVNIH MODELOV MED CIKLUSI.....	41
4. 2. a) Odvisnost napovedne napake od višanja ciklusa.....	45
4. 2. b) Primerjava testnih napak po ciklikih.....	46
4. 2. c) Primerjava klasifikacije odmerkov folinske kisline.....	47
4. 3. PRIMERJAVA OSNOVNIH MODELOV NA »TESTNI – INTER«	48
4. 3. a) Primerjava napovedne napake	48
4. 3. b) Primerjava klasifikacije	53
4. 3. c) Direktna klasifikacija	54
4. 3. d) Direktna klasifikacija z navzkrižno validacijo	55
4. 4. MODELI S 36. URO	56
4. 4. a) Primerjava napovednih napak.....	56
4. 4. b) Primerjava klasifikacije	59
4. 4. c) Direktna klasifikacija	60
4. 5. VPLIV VARIACIJ PRI MODELIH Z UNM	60
4. 6. OCENA UPORABNOSTI MODELOV	62
4. 7. NASVETI IN IDEJE ZA PRIHODNJE RAZISKAVE.....	65
5. SKLEPI.....	66
6. LITERATURA	67

POVZETEK

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je najpogostejši tip levkemije pri otrocih in je dobro ozdravljiva. Protokoli visokoodmernega metotreksata (MTX) z reševalnimi odmerki folinske kisline so običajen način zdravljenja te bolezni. MTX spada v skupino antagonistov folne kisline. Zaradi velike intra in interindividualne variabilnosti je MTX učinkovina z največjim nadzorom nad plazemskimi koncentracijami. Za nadzor ter prilagoditve odmerkov MTX, kot tudi reševalnih odmerkov se vedno pogosteje uporabljajo metode populacijske farmakokinetike.

Cilj diplomske naloge je bil analizirati napovedi modelov z Bayesovo metodo (BM) in ju primerjati z alternativnim tipom modelov, ki so temeljili na umetnih nevronskih mrežah (UNM). Prav tako je bil naš cilj proučiti, kako različne modifikacije modelov z UNM vplivajo na njihovo napovedno zmogljivost. Želeli smo tudi oceniti praktično uporabnost modelov z BM, v primerjavi z modeli z UNM, za nadzor nad plazemskimi koncentracijami MTX, ter za prilagajanje odmerkov folinske kisline.

Za razvoj modelov smo uporabili različne variacije učnega vzorca 64 pacientov, ter za testiranje, variacije testnega vzorca 37 pacientov Pediatrice bolnišnice Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Modela z BM smo zasnovali v programu NONMEM, kot dvoprostorno strukturo z eliminacijo prvega reda s proporcionalno in aditivno rezidualno variabilnostjo. Uporabili smo metodo FOCE ter empirično BM za določitev farmakokinetičnih parametrov. Modele z UNM smo pripravili v programu Weka z uporabo algoritma z večplastnim perceptronom. Rezultate smo primerjali primarno z vidika kriterijev napovedne napake ter z grafično analizo, ter sekundarno z vidika pravilno klasificiranih odmerkov folinske kisline.

Pri analizi rezultatov modela BM-1 smo ugotovili, da v bolj oddaljenih časovnih točkah v ciklusu ni napovedoval bolje. Pri BM-2 je napovedna napaka po ciklikih upadala, vendar pa brez jasnega padca iz ciklusa v cikel. Ugotovili smo tudi, da je izmed osnovnih modelov najbolje napovedoval model BM-2. Prav tako smo ugotovili, da je na napovedi modelov z UNM najugodnejše vplivala prisotnost dodatne meritve pri 36. uri. Ocenili smo, da je model BM-2 najprimernejši za uporabo pri nadzoru plazemskih koncentracij MTX ter odmerjanju folinske kisline. Ocenili smo, da je za slednje primeren tudi model UNM-2_{36h} vendar, pa bi morali opraviti še dodatne raziskave na novih zunanjih vzorcih.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common type of leukemia in pediatric patients and is curable at a high rate. Protocols with high dose methotrexate (MTX) and folinic acid rescue are common for curing ALL. Mechanism of action of MTX is based on folic acid antagonism. High intra and interindividual variability make MTX the most monitored cytostatic agent. It has been shown, that for monitoring and adjustment of MTX and folinic acid rescue doses, the population pharmacokinetic models are a useful tool.

The goal of this thesis was first to analyze predictive performance of the Bayes method (BM) models and to compare them with alternative models, which were based on artificial neural networks (ANN). Additionally we wanted to test the impact of modifications of ANN models on their predictive performance. We also wanted to assess possibility of practical application of these models in clinical practice for therapeutic drug monitoring and adjustment of MTX and folinic rescue doses.

For these purposes we used variations of a learning sample of 64 and variations of a test sample of 37 patients treated at Pediatric hospital of University medical centre Ljubljana. The BM models were designed in NONMEM as two-compartment structural models with first order elimination and additive and proportional residual variability. We used FOCE and empirical BM for pharmacokinetic parameters assessment. ANN models were designed in program Weka, with Multilayer perceptron algorithm. We compared the outputs of models primarily according to predictive error and graphical analysis and secondarily according to correct classification of folinic rescue doses.

Our data has shown that BM-1 did not predict better at a later time in the same therapeutic cycle. With BM-2 we detected a trend of predictive error reduction between the cycles, but on the other hand didn't detect a conclusive drop of predictive error from cycle to cycle. We determined that the BM-2 model had the best predictive performance among basic models. We also determined that the addition of another measurement at 36 hours after the start of infusion improved the predictive performance of ANN models the most. We assessed that BM-2 is the most potent for practical clinical use. We also assessed that the UNM-2_{36h} represents a viable alternative for these uses, but it should be tested with additional independent test data before its practical application.

OKRAJŠAVE

10-CHOH₄PteGlu - 10-formiltetrahidrofolat

5-CH₃H₄PteGlu – metiltetrahidrofolat

5,10-CHH₄PteGlu - 5,10-meteniltetrahidrofolat

5,10-CH₂H₄PteGlu - 5,10-metilentetrahidrofolat

7-OH-MTX - 7-hidroksimetotreksat

AICARFT - aminoimidazol karboksamid ribonukleotid formil transferaza

ALL – akutna limfoblastna levkemija

BM – Bayesova metoda

Bias – povprečna napaka napovedi

CŽS – centralni živčni sistem

DAMPA - 2,4-diamino-N-10-metilpteroinska kislina

DHFR – dihidrofolat reduktaza

DK – direktna klasifikacija

dTMP – timidilat

dUMP – deoksiuridilat

FK – farmakokinetika/farmakokinetični

FOCE – pogojna ocenjevalna metoda prvega reda

FPGS - folil-poliglutamat sintetaza

GAR - glicinamid ribonukleozid

GARFT - glicinamid ribonukleozid formiltransferaza

H₂PteGlu – dihidrofolna kislina/dihidrofolat

H₄PteGlu – tetrahidrofolna kislina/tetrahidrofolat

HD-MTX – visokoodmerni metotreksat

IMP - inozin monofosfat

IT-MTX – intratekalno apliciran metotreksat

MAE – povprečna absolutna napaka

MAPE – povprečna relativna napaka

mFBP – membranski protein za vezavo folatov

MLP – večplastni perceptron

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza

MTX – metotreksat

MTXPG – metotreksat poliglutamat

NONMEM – nelinearni modeli mešanih učinkov
NSAID – nesteroidni antirevmatiki
NV – navzkrižna validacija
PFK – populacijska farmakokinetika
PteGlu – folna kislina
RFC – prenašalec za reducirane folate
RMSE – efektivna napaka
RMSPE – efektivna relativna napaka
TDM – terapevtski nadzor odmerkov zdravila
THF – tetrahidrofolna kislina/tetrahidrofolat
TS - timidin sintetaza
UNM – umetne nevronske mreže
WHO – svetovna zdravstvena organizacija

1. UVOD

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je najbolj pogost tip levkemije pri majhnih otrocih [1] in predstavlja 35% vseh rakavih obolenj ter 80-85% vseh levkemij v skupini pediatričnih bolnikov [2]. Ta bolezen lahko doleti tudi starejšo populacijo, še posebej starejše od 65 let [1]. Pri otrocih gre za dobro ozdravljivo bolezen, saj petletno preživetje doseže 80% otrok. Običajno zdravljenje ALL temelji na terapiji z indukcijo remisije, ki ji sledi konsolidacijska in vzdrževalna terapija [3].

Intravenska terapija z visokimi odmerki metotreksata (HD-MTX) je pomembna komponenta v veliko protokolih kemoterapije [3]. Uporaba HD-MTX z reševalnim odmerkom folinske kisline se uporablja pri zdravljenju limfoidnih malignih obolenj (Burkittovega limfoma, velikoceličnega limfoma in akutne limfoblastne levkemije) [4]. Standardni odmerek lahko povzroči tudi do 7 kratno razliko v razponu koncentracije metotreksata v plazmi pri različnih pacientih [2]. Zaradi velike inter in tudi intraindividualne variabilnosti farmakokinetike MTX in zaradi dobro poznane odnosa med učinkovitostjo, toksičnostjo in farmakokinetiko MTX [4], je v klinični praksi priporočljivo terapevtsko spremljanje plazemske koncentracije MTX [2].

Pediatrični bolniki predstavljajo še posebej ranljivo skupino pacientov, zato se za raziskave na tej populaciji zahtevajo posebni ukrepi, da se zaščitijo njihove pravice [5]. Razlike v absorpciji, volumnu distribucije, metabolizmu in eliminaciji učinkovine imajo velik vpliv na biološko uporabnost pri otrocih. Dodatno sta pri populaciji pediatričnih pacientov pomembna dejavnika tudi raznolikost v starosti in stopnji razvoja. Vse to moramo upoštevati, da preprečimo izpostavljenost pediatričnih pacientov nepotrebnim tveganjem [6].

Smernice za izvajanje farmakokinetičnih študij na pediatričnih bolnikih priporočajo, da se volumen vzorcev krvi zmanjša na minimum. Za zmanjšanje količine odvzete krvi in/ali števila vbodov se lahko uporabijo naslednji pristopi:

- uporaba občutljivih metod, tako da lahko uporabljamo manjše količine krvi na vzorec
- pridobivanje rutinskih vzorcev za biokemične analize, kadar je možno, istočasno z vzorci potrebnimi za farmakokinetične študije

- uporaba venskih katetrov za zmanjšanje stresa in števila vbodov
- uporaba populacijske farmakokinetične analize in optimizacije vzorčenja, da zmanjšamo število vzorcev pri posameznem pacientu na minimum [5].

1. 1. AKUTNA LIMFOBLASTNA LEVKEMIJA

Akutne levkemije so zelo raznolika skupina klonalnih bolezni. Ključni bolezenski dogodek je novonastala somatska mutacija, ki ji nato sledi nenadzorovana proliferacija multipotentne krvotvorne matične celice. Če gre za okvaro mieloične multipotentne celice, govorimo o akutni mieloični levkemiji, če pa je okvarjena limfatična multipotentna celica, gre za akutno limfoblastno levkemijo [7].

ALL je najbolj pogosta vrsta raka pri pediatričnih bolnikih [8]. Je rezultat klonske proliferacije in akumulacije levkemičnih limfoblastov v kostnem mozgu in drugih limfoidnih tkivih. Širjenje nezrelih prekurzorjev v vseh stopnjah hematopoetskega razvoja je možno iz okvarjenih matičnih celic, ki nimajo sposobnosti diferenciacije. To je lahko posledica motene regulacije aktiviranih genov za rastne dejavnike, ali produkcije odvečnih rastnih dejavnikov s strani blastov. Alternativno se levkemija lahko razvije iz ene poškodovane matične celice, ki povzroči nastanek malignih potomskih celic s procesom nenadzorovanega samoobnavljanja [9]. Posledica tega je nastanek velikega števila limfoblastov, nadomeščanje normalnega kostnega mozga z malignimi celicami in ker so ti limfoblasti prenosljivi po krvi tudi infiltracija ostalih organov, kot na primer jeter, vranice, bezgavk, CŽS, ledvic in spolnih žlez [8].

Klinični znaki ALL so predvsem rezultat omenjene akumulacije limfoblastov v kostnem mozgu ter infiltracije bezgavk, jeter ter vranice. V veliko primerih so simptomi podobni virusni okužbi, torej rahlo povišana temperatura, slabo počutje, anoreksija, letargija in neprijeten občutek v trebuhu. Pri 50% bolnikov pride do krvavitev, modric ter bledice, kar je povezano s trombocitopenijo in anemijo. Pri večini so simptomi opazni v največ 6 mesecih pred diagnozo [9].

Preglednica I: Razdelitev ALL (povzeto po WHO) [10, 11].

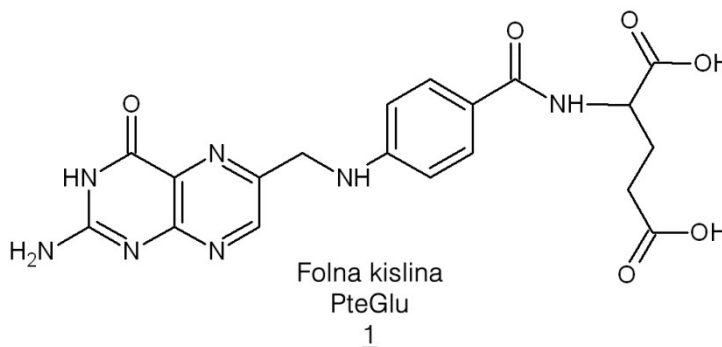
AKUTNE LIMFOIDNE LEVKEMIJE	
PreB-celična akutna limfoblastna levkemija	
	t(9;22)(a34;q11); BCR/ABL – Philadelphia kromosom
	t(v;11q23); preureditev gena MLL
	t(1;19)(q23;p13) E2A/PBX1
	t(12;21)(p12;q22) ETV/CBF α
PreT-celična akutna limfoblastna levkemija	
B-celična levkemija (Burkittova levkemija)	
Akutna bifenotipska levkemija	

ALL lahko razdelimo na različne podtipе. Najsodobnejša razdelitev narejena pod okriljem WHO vključuje fenotipsko kot tudi genotipsko razdelitev in je predstavljena v preglednici I [10]. Ne glede na prognostične faktorje je verjetnost začetne remisije $\geq 95\%$ pri otrocih in 70-90% pri odraslih. Okrog 75% pri otrocih in 30-40% pri odraslih ima neprekinjeno boleznj prosto petletno preživetje. Pri bolnikih s slabimi prognostičnimi faktorji po navadi izberemo intenzivnejše terapije, saj povečanje tveganja in večja toksičnost terapije odtehtata tveganje neuspešnega zdravljenja in posledično smrti [8].

Namen terapije pri ALL je uničiti levkemične celice in obnoviti normalno hematopoezo. To naredimo tako, da induciramo remisijo, pri čemer poskusimo uničiti 99% levkemičnih celic. Nadaljujemo s konsolidacijsko terapijo in terapijo CŽS, če je potrebna (po navadi metotreksat intratekalno). Nato se terapija nadaljuje z vzdrževalno terapijo. Povprečna življenjska doba pri bolnikih z ALL brez zdravljenja je bila 2 meseca po diagnozi. Nato so leta 1947 Farber in sodelavci odkrili, da je za produkcijo levkemičnih celic pomembna folna kislina, kar so potrdili z izboljšanjem stanja pacientov, ki so jih zdravili z aminopterinom, ki je antagonist folne kisline. Kasneje so razvili še druge podobne učinkovine, kot je na primer MTX, ki prav tako deluje na metabolizem folne kisline, 6-merkaptopurin, asparaginaza, doksorubicin, vinkristin in druge [9].

1. 2. FOLNA KISLINA

Folna kislina (vitamin B₉/PteGlu) je esencialna spojina, ki jo moramo s prehrano vnašati v organizem. Najdemo jo predvsem v sveži zelenjavi, jetrih, kvasovkah in nekaterem sadju. Pri tem je potrebno dodati, da daljše kuhanje uniči tudi do 90% vsebnosti folatov v takšni prehrani. Sestavljena je iz pteridinskega obroča, ki je preko metilenskega mostu



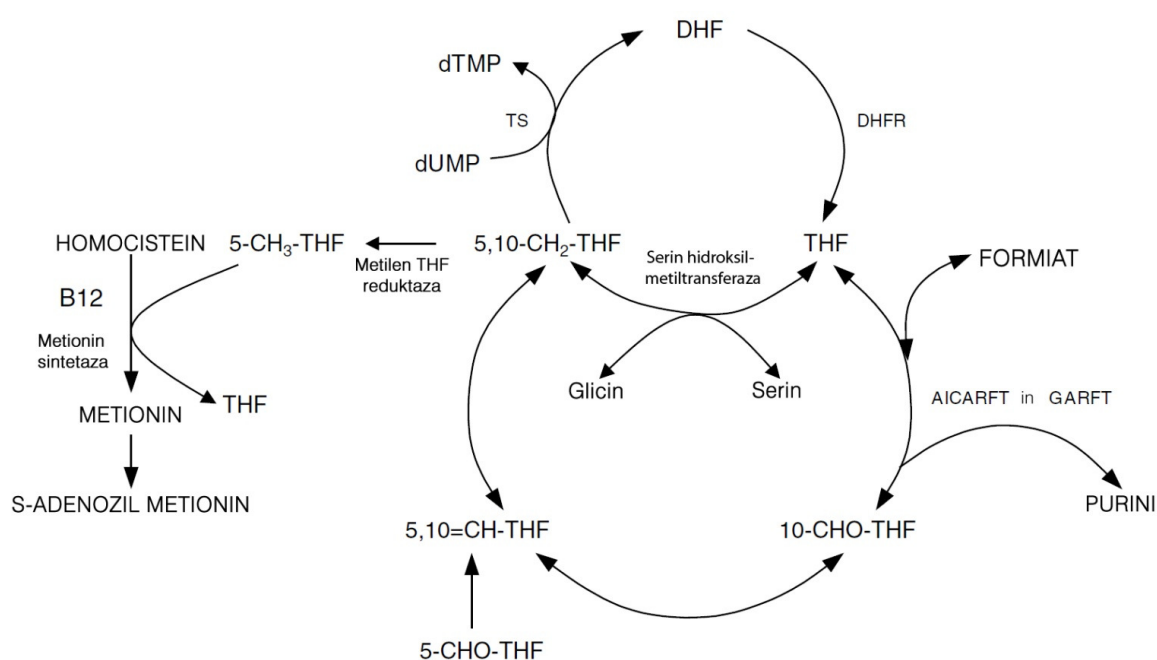
povezan z NH₂ skupino paraaminobenzojske kisline, preko COOH skupine pa je le-ta naprej vezana na NH₂ skupino glutaminske kisline (PteGlu). To je najpogostejša kemijska oblika, ki jo najdemo v farmacevtskih izdelkih za zdravljenje pomanjkanja folne kisline. Vendar pa to ni prevladujoča oblika spojine, ki jo najdemo v hrani, kot tudi ne oblika, ki je aktivna v intracelularnem metabolizmu. Tetrahidrofolna kislina (H₄PteGlu/THF) je reduciran derivat folne kisline in je spojina, ki deluje kot akceptor skupin z enim ogljikom. Le-te se po navadi vežejo na dušik 5 ali dušik 10, ali pa ju poveže v obroč [13].

Folna kislina ima v celicah vpliv na veliko metabolnih procesov (slika 1). Da pa lahko sodeluje v teh procesih se mora metabolizirati do dihidrofolata (H₂PteGlu), ki se nato pretvori v H₄PteGlu v reakciji z dihidrofolat reduktazo (DHFR). H₄PteGlu nato deluje kot akceptor skupine z enim ogljikom in sodeluje pri pomembnih reakcijah v celici:

- pri pretvorbi serina v glicin, kjer nastane 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10-CH₂H₄PteGlu). Slednji sodeluje pri sintezi timidilata (dTMP) iz deoksiuridilata (dUMP), ki jo katalizira timidin sintetaza (TS). To je izjemno pomembna reakcija za sintezo DNK in predstavlja mesto delovanja za 6-merkaptopurin ter 5-fluorouracil. Pri tej reakciji se 5,10-metilentetrahidrofolat pretvori v H₂PteGlu. Cikel se zaključi, ko H₂PteGlu vstopa v reakcijo z DHFR, ki ga pretvori v H₄PteGlu.
- pri sintezi purinov, ki so prav tako bistveni za sintezo DNK in RNK. V začetnih stopnjah *de novo* sinteze purinov se glicinamid ribonukleoizid (GAR) formilira, pri čemer sodeluje 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10-CHH₄PteGlu),

reakcijo pa katalizira glicinamid ribonukleozid formiltransferaza (GARFT). Prav tako pa 10-formiltetrahidrofolat (10-CHOH₄PteGlu) sodeluje v reakciji nastanka inozin monofosfata (IMP). To reakcijo katalizira aminoimidazol karboksamid ribonukleotid formil transferaza (AICARFT). IMP je prekurzor za nastanek gvanin in adenozin monofosfata.

- Ob prisotnosti vitamina B₁₂ je H₄PteGlu pomembna še pri sintezi metionina, saj 5-CH₃H₄PteGlu donira CH₃- skupino vitaminu B₁₂ za pretvorbo homocisteina v metionin.
- pri metabolizmu histidina, kjer se pretvarja formiminoglutaminska v glutaminsko kislino



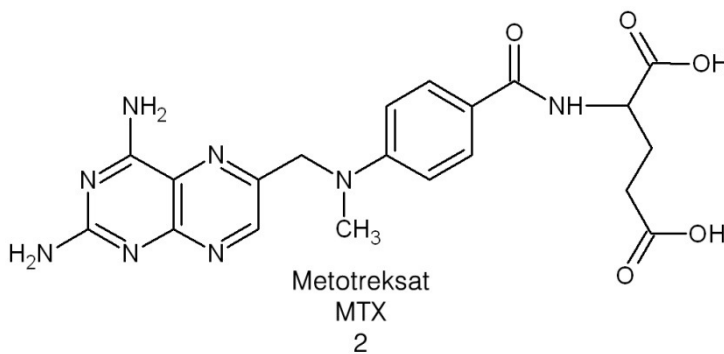
Slika 1: Metabolni procesi derivatov folne kisline

5-CH₃H₄PteGlu je prevladujoča oblika folatov v krvi. Jetra namreč reducirajo in metilirajo folno kislino, kot tudi di- in tetrahidrofolno kislino. Skozi žolč se nato 5-CH₃H₄PteGlu vrnejo v prebavila od tam pa po krvi po celim telesu [12]. Po vstopu v celico, so folati izpostavljeni intracelularni poliglutamaciji s strani folil-poliglutamat sintetaz (FPGS). Večina intracelularnih folatov je v obliki poliglutamatov z različnim številom pripetih enot glutaminske kisline, ki se povezujejo med α-NH₂ in γ-COOH skupino. Najučinkoviteje reakcija poteče s H₄PteGlu, kljub temu pa so možni substrati tudi ostali folati (5-CH₃H₄PteGlu, PteGlu, tudi metotreksat). Posledice teh reakcij so opazne pri vezavi poliglutamatov na druge encime, do katerih imajo po večini večjo

afiniteto, kot njihovi monoglutamati. Poliglutamacija omogoča folatom tudi daljše zadrževanje v celici, zaradi povečevanja negativnega naboja [13].

1. 3. METOTREKSAT

Metotreksat (MTX) je antimetabolit folne kisline. V primerjavi s folno kislino je, kot je razvidno iz slike spojine 2, pri metotreksatu OH skupina na atomu C4 zamenjana z NH₂ skupino, ter metilna skupina dodana na N10.



1. 3. a) Mehanizem delovanja

MTX prehaja v celice s pasivno difuzijo ter preko RFC (*ang. reduced folate carrier/SLC19A1*) in mFBP (*ang. membrane-associated folate binding protein*) transportnih sistemov. Kot že ime pove so naravni substrat za RFC reducirani folati, prav tako pa ima visoko afiniteto do njega tudi MTX [14], in predstavlja preferenčno pot MTX za vstop v celico [15].

Pri reakciji sinteze timidilata, ki jo katalizira TS, gre za prenos 1-C skupine s 5,10-CH₂H₄PteGlu na dUMP. Pri tem se 5,10-CH₂H₄PteGlu oksidira do H₂PteGlu. Da se lahko ponovno vključi v reakcije kot kofaktor, mora DHFR reducirati H₂PteGlu do H₄PteGlu. Ker ima MTX večjo afiniteto za vezavo na DHFR kot H₂PteGlu, blokira to redukcijo. Prenos skupin z enim ogljikom je tako blokiran, posledično pa tudi sinteza dTMP, kar pomeni motnje v sintezi DNK [12]. Posebno vlogo pri učinku MTX imajo tudi poliglutamati metotreksata (MTXPG). MTXPG se zaradi negativnega naboja in posledično manjše afinitete do folatnega transportnega sistema dalj časa zadržujejo v celicah [14]. Poliglutamacija MTX ne vpliva bistveno na afiniteto njegove vezave na DHFR oz. ima MTXPG le minimalno povišano afiniteto do encima [16]. Vendar pa je MTXPG sposoben inhibirati tudi TS, GARFT in AICARFT. Novejše raziskave kažejo tudi vpliv MTX na metionin sintetazo [14]. To pomeni, da MTXPG zavira večino

reakcij v katerih sodelujejo derivati $H_4PteGlu$. Pri tem je potrebno poudariti, da je poliglutamacija obsežnejša v tumorskih, kot v normalnih celicah [14].

1. 3. b) Mehanizem odpornosti

Odpornost na MTX se lahko pojavi zaradi:

- okvarjenega transporta MTX preko membrane
- nastanka spremenjene oblike DHFR, ki ima zmanjšano afiniteto za MTX
- povečanja koncentracije DHFR v celici s spremenjeno regulacijo genov
- zmanjšane sposobnosti tvorbe poliglutamatnega MTX
- zmanjšane aktivnosti TS
- zadostne dostopnosti timidilata in purinov [16, 12]

1. 3. c) Farmakokinetika

DISTRIBUCIJA

Po intravenski aplikaciji je distribucijski volumen približno 18% telesne mase (0,18 L/kg). Volumen distribucije v stacionarnem stanju pa je od 40-80% telesne mase. Začetni, distribucijski, razpolovni čas je od 30-45 minut; eliminacijski 3-4 ure; ter eliminacijski iz tretjega prostora in enterohepatičnega cikla od 6-20 ur [17]. Podaljšani časi eliminacije so vzrok za glavne neželene učinke [14]. Metotreksat se lahko porazdeljuje po celotni telesni tekočini tudi v plevralne in peritonealne izlive, ki delujejo kot rezervoar iz katerega se MTX počasi sprošča in dalj časa vzdržuje koncentracije MTX v plazmi. To je še posebej problematično pri protokolih z visokimi odmerki MTX. V teh primerih je potrebno podaljšano reševanje s folinsko kislino [17], in predhodno drenažo omenjenih izlivov. MTX zaradi visoke polarnosti zelo slabo prehaja hemato-encefalno bariero. Po dolgotrajni infuziji je v stacionarnem stanju koncentracija MTX v likvorju le 1-5% serumske koncentracije. Citotoksične koncentracije v likvorju lahko dosežemo, če damo MTX v visokih odmerkih intravensko ali pa če ga damo intratekalno (IT-MTX) [14].

METABOLIZEM

MTX se presnavlja v zelo majhnem deležu. Glavni metabolit je 7-hidroksimetotreksat (7-OH-MTX), ki nastaja pretežno v jetrih, pod vplivom nespecifičnih aldehyd oksidaz

[14]. Njegova vodotopnost je 3-5 krat manjša od MTX [18], prav tako pa je več kot 100-krat manjša tudi njegova afiniteta do DHFR. 7-OH-MTX lahko vstopa v reakcije poliglutamacije, kar poveča afiniteto do DHFR, ter do drugih encimov (TS, GARFT, AICARFT) [19]. Zaradi manjše topnosti je soodgovoren za nefrotoksičnost terapije z MTX. Drug, manj pomemben, metabolit pa je 2,4-diamino-N-10-metilpteroinska kislina (DAMPA), ki nastaja pod vplivom intestinalnih bakterij in ima 200-krat manjšo afiniteto za DHFR [14].

ELIMINACIJA

Kar 90% MTX se izloči skozi ledvice v nespremenjeni obliki v 48 urah po prenehanju terapije. Približno 10% se ga izloča z žolčem v prebavni trakt, od koder se izloča z blatom. V ledvicah se izloča predvsem z glomerulno filtracijo in aktivno tubulno sekrecijo. Očistek MTX znaša 72% očistka kreatinina. Pri terapiji s HD-MTX prihaja do visokih koncentracij MTX v urinu. Če je presežena njegova topnost v urinu, pride do tvorbe kristalčkov, ki se odlagajo v ledvicah, kar lahko vodi v njihovo odpoved. To preprečujemo z dobro hidracijo in alkalizacijo urina. Nekatere učinkovine lahko vplivajo na delovanje ledvic (zmanjšanje krvnega pretoka skozi ledvice zaradi nesteroidnih antirevmatikov (NSAID); nefrotoksičnost zaradi cisplatina; šibke kisline), tako da se podaljša čas izločanja MTX. To lahko vpliva tako na supresijo kostnega mozga, kot na dodatne poškodbe ledvic zaradi odlaganja MTX [14].

1. 3. d) Neželeni učinki

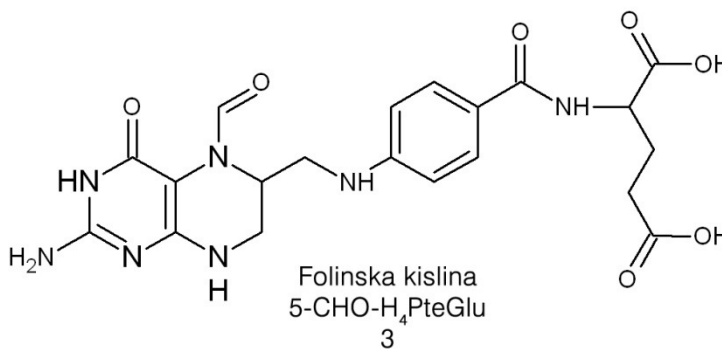
MTX je le delno selektivno toksičen za tumorske celice. Deluje tudi na hitro deleče se zdrave celice, kot so na primer celice prebavnega epitelija, kostnega mozga, bukalne sluznice ter sečnega mehurja [12, 18], pri čemer je za glavne neželene učinke (levkopenija, anemija, mukozitis) odgovoren vpliv na prvi dve vrsti celic [14]. MTX in ostali antagonisti folne kisline uničujejo celice v S fazi celičnega cikla [12], torej v fazi v kateri prihaja do replikacije DNK [20].

Kot že omenjeno imata MTX in njegov metabolit 7-OH-MTX nefrotoksične učinke zaradi nastanka kristalčkov v ledvičnih tubulih. MTX povzroča tudi akutno in kronično hepatotoksičnost. Pri HD-MTX terapiji se pogosto pojavijo zvišane vrednosti jetrnih encimov. Dolgotrajno zdravljenje, na primer pri zdravljenju psoriaze,

lahko vodi v nastanek fibroze in ciroze jeter. Natančen mehanizem hepatotoksičnosti še ni poznan. Pri intratekalni aplikaciji lahko pride do akutnega kemijskega arahnoiditisa, subakutne oblike nevrotoksičnosti ter kronične demielinizirajoče encefalopatije. Pri HD-MTX terapiji se občasno pojavi akutna prehodna cerebralna disfunkcija, ki se kaže s simptomi pareze, afazije in sprememb v obnašanju. Ti simptomi se pojavijo v roku 6 dni in izzvenijo v 2-3 dneh [14]. Pri nosečnicah povzroča abortus, zato se ženskam odsvetuje nosečnost vsaj še en ovulacijski cikel po koncu terapije [21].

1. 4. FOLINSKA KISLINA

Folinska kislina je derivat tetrahidrofolne kisline in sicer gre za 5-formil-tetrahidrofolno kislino (5-CHOH₄PteGlu/Leucovorin/LCV). Uporablja se za reševanje pri terapiji z antagonistom folne kisline. Po navadi se v ta namen uporablja 1:1 racemna zmes obeh izomerov, čeprav je učinkovit le L-izomer [14]. Na trgu pa je tudi zdravilo, ki vsebuje le L-izomer. Ta je bolj učinkovita, ker ne vsebuje D-izomera, ki tekmuje za transport v celico in s tem zmanjšuje transport aktivnega L-izomera [22].



1. 4. a) Mehanizem delovanja

5-CHOH₄PteGlu deluje kot vir reduciranih folatnih kofaktorjev. Ker MTX blokira DHFR, pomanjkanja kofaktorjev ne moremo nadomeščati s folno kislino, saj ni mogoča pretvorba folne kisline v reducirane derivate. Folinska kislina je že reducirana in lahko vstopa v reakcije, kljub inhibiciji DHFR [12]. Čeprav se 5-CHOH₄PteGlu pogosto uporablja, njen natančen mehanizem delovanja ni popolnoma poznan. Najverjetneje gre za vstop 5-CHOH₄PteGlu v celične reakcije, ki zaradi blokade DHFR ne bi bile možne, hkrati pa za kompeticijo z MTX na DHFR [23]. Kateri kofaktor neposredno sodeluje v teh procesih še ni natančno znano, kot kaže, pa ne gre

za $H_2PteGlu$, ampak za enega izmed reduciranih folatov, ki nastanejo iz 5- $CHOH_4PteGlu$ [16, 24].

Selektivna toksičnost kombinacije MTX z reševalnimi odmerki 5- $CHOH_4PteGlu$ temelji na razliki v tvorbi MTXPG. V tumorskih celicah namreč prihaja do večjega obsega poliglutamacije, kot v normalnih celicah. Ker MTXPG zavira večino encimov vključenih v reprodukciji celice (DHFR, TS, AICARFT, GARFT) ima posledično 5- $CHOH_4PteGlu$ manjši učinek v tumorskih celicah, saj so reakcije v katere se le-ta vključuje zavrte. Po drugi strani pa je v normalnih celicah več monoglutamiranega MTX, ki ga z dodatkom reduciranih folatov izrivamo iz aktivnega mesta na DHFR. V tumorskih celicah, kjer je več MTXPG, pa pride do izrivanja v veliko manjšem obsegu [16].

V klinični praksi so mnenja glede odmerjanja folinske kisline deljena, saj obstaja relativno veliko število različnih protokolov odmerjanja HD-MTX in 5- $CHOH_4PteGlu$, ki se med seboj razlikujejo tako v intervalih odmerjanja kot tudi odmerkih 5- $CHOH_4PteGlu$. Režimi odmerjanja so večinoma določeni empirično [14].

1. 5. POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA

Populacijska farmakokinetika (PFK) je pomemben faktor v oskrbi pacientov, saj je vedno bolj uporabljano orodje pri načrtovanju režimov odmerjanja. Vedno bolj so namreč uporabljani modeli z BM za ocene individualnih farmakokinetičnih (FK) parametrov pri nadzorovanju terapevtskih odmerkov (TDM). Vedno pogosteje se PFK uporablja v razvoju zdravil za opredelitev farmakokinetike učinkovine pri ciljni skupini pacientov, ki jim je zdravilo namenjeno in za opredelitev razmerja med odmerkom, koncentracijo in učinkom. PFK je področje klinične farmakologije, ki se ukvarja s kvantifikacijo tipičnih vrednosti FK parametrov (eliminacijski in distribucijski očistek, volumni porazdelitve, hitrostna konstanta absorpcije) v populaciji bolnikov in njihove interindividualne ter rezidualne variabilnosti. Namen PFK je pridobivanje kvantitativnih in semi kvantitativnih smernic za individualizacijo oz. optimizacijo odmerjanja učinkovine. Velikokrat so podatki o plazemskih koncentracijah učinkovine redki. V takšnih primerih je PFK pomembno orodje za

oceno individualnih FK parametrov pri prilagajanju odmerkov posameznemu bolniku [25].

V splošnem poznamo dva tipa populacijskih modelov. Prvi je mehanistični, ki temelji na fizikalnih in fizioloških principih in bi naj vseboval čim več značilnosti opisovanega sistema, ki jih učni podatki dovoljujejo. Drugi je empirični, ki ne potrebuje veliko predpostavk o učnih podatkih (teoretičnega ozadja). Slednji so najbolj uporabni, ko natančno ne poznamo fizikalnega in fiziološkega ozadja, pa moramo kljub temu podati neke ugotovitve glede proučevanih podatkov [26]. Modele lahko uporabimo na dva načina in sicer za opis procesov ali pa za napovedovanje. Opisni modeli nam omogočajo kvantitativno podajanje informacij o farmakokinetični variabilnosti na proučevani populaciji bolnikov in določitev FK parametrov pri posamezniku. Za opisne modele je potrebno oceniti kakovost prilaganja eksperimentalnim vrednostim, njihovo zanesljivost in stabilnost [27].

Druga vrsta modelov so napovedni modeli. Napovedni modeli so ekstrapolirani čez meje osnovne populacije na kateri je bil model razvit. Torej je enako obnašanje modela predpostavljeno tudi izven populacije za katero imamo eksperimentalne podatke. Za napovedne modele je zelo pomemben proces validacija napovedne zmogljivosti. Validacije lahko razdelimo na 2 tipa: eksterne in interne. Eksterne validacije so najbolj strog tip. Gre za validacije, kjer je model razvit na učni množici podatkov, napoved modela pa se preveri na testni množici podatkov. Pri interni validaciji pa gre za metode deljenja podatkov (*ang. data splitting*) in navzkrižne validacije (*ang. cross-validation*) ter Kljukčeva metoda (*ang. bootstrapping*). Interna validacija je uporabna v primeru, ko ne moremo pridobiti testnega vzorca iz želene populacije (npr. pri redkejših populacijah, kot so otroci, bolniki z redkimi boleznimi, itd.). Pri deljenju podatkov se pojavlja problem, da se moramo pri deljenju populacije na učni in testni vzorec odločiti v kakšnih deležih bomo populacijo razdelili. Slabost tega postopka je, da ta odločitev zelo pogosto temelji na intuiciji. Navzkrižna validacija in Kljukčeva metoda sta zato veliko boljša postopka, saj uporabljata vse pridobljene podatke in zato na njiju ne vpliva naključno deljenje vzorca. Pri navzkrižni validaciji je del vzorca (ena ali več meritev) odstranjen iz celotne zbirke podatkov, model pa je razvit na preostalih meritvah. Vzorec razdelimo na k delov, $k-1$ delov se uporabi za razvoj modela (učni vzorec), 1 del pa za testiranje (testni vzorec).

Ta proces ponovimo k -krat, torej je vsak izmed k podvzorcev uporabljen enkrat kot testni vzorec. Rezultati k napovedi so nato povprečeni v enoten rezultat. Prednost pred naključnim deljenjem podatkov je, da se vse meritve uporabijo za učenje in testiranje, ter da se vsaka meritev pojavi v testnem vzorcu natanko enkrat. Najbolj običajna je desetkratna navzkrižna validacija [27].

1. 5. a) Variabilnosti

Vzroke razlik med z modelom napovedanimi in eksperimentalno izmerjenimi koncentracijami lahko razdelimo v dve skupini:

- Interindividualno variabilnost, kjer gre za odmikanje napovedi od populacijskega povprečja zaradi razlik med osebami.
- Rezidualno variabilnost, v katero so združeni vsi ostali vzroki za razlike:
 - Intraindividualna variabilnost in variabilnost med dogodki (cikli zdravljenja), kjer gre za variabilnost znotraj iste osebe v dveh različnih časovnih točkah.
 - Napaka pri pridobivanju podatkov, kjer gre za mersko napako analitske metode, odmik od točnega časa odvzetega vzorca, ipd.
 - Napaka modela, kjer gre za napako v strukturi modela.

Kadar imamo na voljo primerne podatke, lahko nekatere variabilnosti razločimo iz rezidualne variabilnosti (npr. variabilnost med cikli zdravljenja) [25].

1. 5. b) Individualni in populacijski modeli

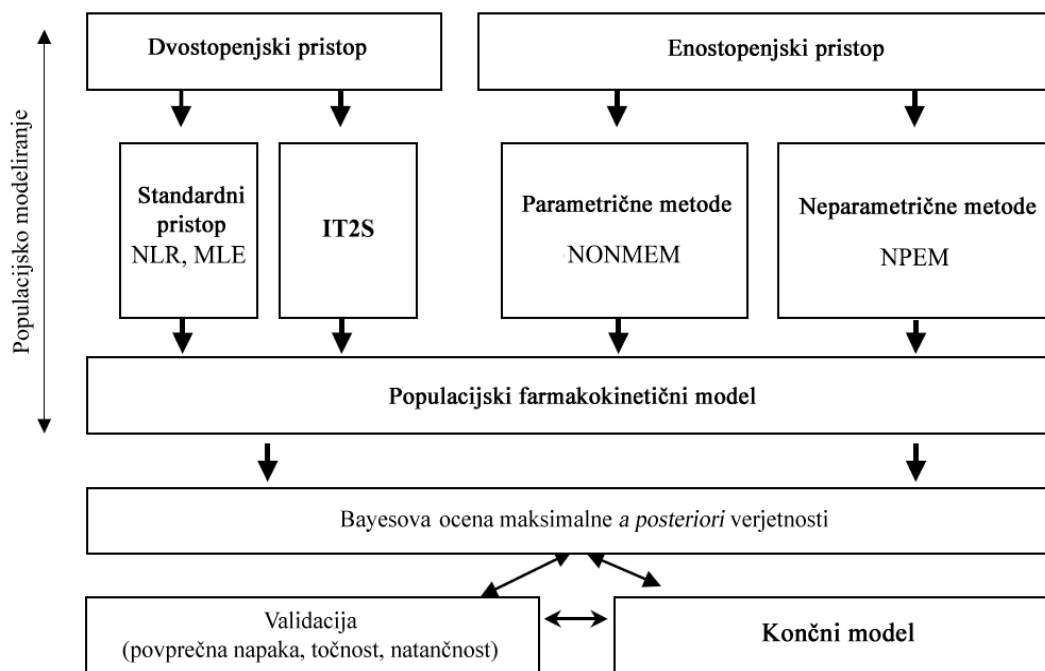
Razlikujemo med dvema tipoma kliničnih raziskav in sicer med eksperimentalnimi in opazovalnimi raziskavami. Pri eksperimentalnih, kamor uvrščamo tudi tradicionalne farmakokinetične raziskave, so pogoji odmerjanja natančno kontrolirani s protokolom, pogosto in natančno predpisano pa je tudi jemanje vzorcev za opis FK profilov. PFK podatki pa so pogosto zbrani kot del neke klinične raziskave, ki se izvaja z nekim drugim namenom in je analiza FK sekundarni cilj, ali pa pri rutinskih kliničnih preiskavah. Za PFK podatke je značilno, da so večinoma slabo kontrolirani in imajo zato mnoge omejitve: režimi odmerjanja se od pacienta do pacienta razlikujejo, majhno je število odvzetih vzorcev na pacienta, običajno 1-6, njihovo število in časi odvzema se lahko razlikujejo od pacienta do pacienta [25].

Pri individualnih modelih se pogosto meri plazemsko koncentracijo pri posameznem bolniku, da se lahko določi individualne FK parametre [25]. Za opis FK v populaciji bolnikov nato po navadi uporabimo dvostopenjski pristop, kjer najprej določimo FK parametre za vsakega pacienta posebej, v drugi stopnji pa populacijsko povprečje teh parametrov ter njihovo kovarianco [28]. Pomanjkljivost tega postopka je, da je potrebnih veliko meritev, da lahko določimo individualne FK parametre [25].

PFK na drugi strani lahko deluje tako z osebki s pogostimi meritvami, kot tudi s takšnimi z redkimi. Zato je PFK zelo pomembno orodje na primer pri raziskavah na otrocih, starejših, pacientih z AIDS, bolnikih na intenzivni negi, onkoloških bolnikih, oziroma kjer smo omejeni s številom vzorcev iz zdravstvenih, etičnih, tehničnih ali ekonomskih razlogov. V tem primeru zaradi redkosti meritev individualnih parametrov ne moremo direktno izračunati [25]. Za PFK analizo zato uporabimo enostopenjski pristop (slika 2). Pri tem upoštevamo meritve pri vseh pacientih hkrati in izračunamo tipične vrednosti parametrov in variabilnost v enem koraku [28].

1. 5. c) Teoretične osnove modelov z BM

Pri PFK modelih, kjer poskušamo opisovati kompleksne biološke probleme, najpogosteje govorimo o nelinearnih modelih mešanih učinkov (*ang. nonlinear mixed effects models*). To pomeni, da imamo nelinearen problem s stalnimi in naključnimi učinki [29]. Običajen proces razvoja PFK modela je prikazan na sliki 2.



Slika 2: Razvoj mehanističnega PFK modela [28]

Pri nelinearnih modelih z mešanimi učinki gre za parametrično metodo, ki predpostavlja neko teoretično porazdelitev vrednosti parametrov (običajno normalna ali log-normalna). Meritve so pri PFK raziskavah preredke za izračun individualnih vrednosti FK parametrov, zato se pri teh modelih lotevamo analize podatkov za vse paciente hkrati, ob tem pa upoštevamo možne interindividualne razlike, ki so naključne [29].

Zaradi redkosti meritev je potreben pri PFK modelih precej kompleksen statistični model. Odziv (npr. plazemsko koncentracijo) pri pacientu lahko v splošnem opišemo z enačbo:

$$y_{ij} = f_{ij}(\varphi_{ij}, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad \text{Enačba 1.1}$$

kjer je y_{ij} i-ta meritev učinkovine v plazmi pri j-tem osebk, x_{ij} predstavlja čas, φ_{ij} predstavlja FK parametre pri j-tem osebk, f_{ij} predstavlja funkcijo med neodvisno (x_{ij}) in odvisno spremenljivko in ε_{ij} , ki predstavlja rezidualno variabilnost [25]. Rezidualna variabilnost je lahko:

- aditivna (Enačba 1.1),
- proporcionalna: $y_{ij} = f_{ij}(\varphi_{ij}, x_{ij})(1 + \varepsilon_{ij})$ Enačba 1.2

- kombinirana aditivna in proporcionalna: $y_{ij} = f_{ij}(\varphi_{ij}, x_{ij})(1 + \varepsilon_{ij1}) + \varepsilon_{ij2}$

Enačba 1.3

- eksponentna: $y_{ij} = f_{ij}(\varphi_{ij}, x_{ij}) e^{\varepsilon_{ij}}$ *Enačba 1.4 [26]*

Za FK parametre predpostavljamo, da so v populaciji spremenljivi in se pri posameznikih gibljejo okrog populacijskih vrednosti z določeno variabilnostjo. To matematično zapišemo z enačbo:

$$\varphi_j = g(\theta, z_j) + \eta_j \quad \text{Enačba 1.5}$$

Pri čemer g predstavlja funkcijo, ki pripisuje pacientu individualne farmakokinetične parametre iz θ , ki predstavlja vektor populacijskih FK parametrov ter z_j , ki predstavlja specifične individualne spremenljivke (telesna masa, starost, stanje bolezni, kreatininski očistek, vpliv drugih zdravil,...). η_j predstavlja naključno variacijo individualnih FK parametrov okrog vrednosti populacijskih FK parametrov (interindividualna variabilnost FK parametrov) [25].

Parametre modelov z mešanimi učinki ocenjujemo z metodo največjega verjetja. Na uporabljenem vzorcu verjetnost zapišemo kot funkcijo parametrov modela. To pomeni, da so najboljše ocene parametrov tiste, pri katerih imajo meritve v vzorcu največje verjetje. Vendar pa je izračun verjetja zelo težaven, saj gre za nelinearno povezavo med meritvami in naključnimi parametri (η_j in ε_{ij}). Zato se za izračun verjetja uporablja več različnih aproksimacijskih metod. Ena izmed teh je FOCE (*ang. first-order conditional estimation*), pri kateri zanemarimo člene Taylorjeve vrste, ki so višji od prvega reda in predstavlja eno izmed metod linearizacije [29]. Za oceno stalnih in naključnih parametrov se pri pristopu FOCE uporablja empirična Bayesova metoda [27]. Z njo ocenimo vrednosti stalnih in naključnih parametrov z iterativnim postopkom ocenjevanja verjetja posteriornih porazdelitev verjetnostni. Model z največjim verjetjem se najboljše prilega meritvam, s tem pa pridobimo najboljše ocene, tako stalnih kot tudi naključnih parametrov. Zaradi iterativnosti procesa in kompleksnih izračunov verjetja je metoda FOCE računsko zelo zahteven proces [30].

1. 5. d) PFK in farmakokinetika MTX

Zaradi velikega nadzora nad farmakokinetiko MTX je na področju PFK te učinkovine kar nekaj raziskav. Ker je MTX široko uporabljana učinkovina in sicer v različnih protokolih za zdravljenje različnih rakavih obolenj, se tudi raziskave na tem področju

precej razlikujejo. Razlike so v bolezni, ki so jo zdravili, uporabljeni strukturi modela in validaciji napovednih zmogljivosti. Večina raziskav na tem področju se ukvarja predvsem z opisovalnim vidikom PFK mehanističnih modelov, hkrati pa, po navadi na koncu, uporabijo modele tudi v napovednem smislu. Tako kot je raznoliko področje teh raziskav, tako so raznoliki tudi napovedni parametri in kriteriji ocenjevanja le-teh. *Aumente in sodelavci* so proučevali farmakokinetiko MTX na 49 pediatričnih bolnikih z ALL. Uporabili so nelinearni model z mešanimi učinki z dvoprostorno strukturo in eliminacijo prvega reda ter FOCE za ocenjevanje parametrov. Ugotovili so, da zaradi velike nepojasnjene variabilnosti niso mogli zasnovati modela, ki bi dovolj dobro *a priori* napovedoval koncentracije MTX in odmerjanje folinske kisline. Zato je še vedno potrebna omejena strategija zbiranja plazemskih koncentracij za individualizacijo terapije. Zaključili so, da kljub temu uporaba PFK doprinese k manjšemu številu vzorcev za napoved koncentracije pri določeni uri, ter k boljšemu odmerjanju reševalnih odmerkov folinske kisline [2]. Z vidika validacije napovedne zmogljivosti je zanimiva študija *Monjanel-Mouterde in sodelavcev*, v kateri so proučevali farmakokinetiko MTX na 64 pacientih z rakom dojke z dvostopenjskim postopkom. Pri tem so ugotovili, da je uporaba PFK modela za zmanjšanje toksičnosti na podlagi dveh plazemskih meritev primerna strategija. Pred uporabo modela so namreč zaznali 70% pacientov, pri katerih so zaznali opazne neželene učinke, po začetku uporabe modela za optimizacijo reševanja s folinsko kislino, pa podobnih neželenih učinkov niso zaznali. Ocenili so, da je njihov pristop možno prilagoditi tudi za druge protokole, ki temeljijo na MTX [31].

1. 6. UMETNE NEVRONSKE MREŽE

Umetne nevronske mreže (UNM) so matematični modeli, ki uporabljajo enak princip, kot ga uporabljajo človeški možgani. Ker je analogija z možgani zelo velika je tudi pri UNM osnovna enota poimenovana nevron. Le-ta pri UNM predstavlja informacijsko procesno enoto, ki je osnova za delovanje nevronske mreže [32].

V nevronu so definirani osnovni elementi (slika 3):

- Množica sinaps oz. povezav od katerih ima vsaka svojo utež (w_{ki}). Signal x_i na vhodu i je pomnožen z w_{ki} . Utež je pozitivna, če je sinapsa vzbujajoča in negativna, če je sinapsa zavirajoča.

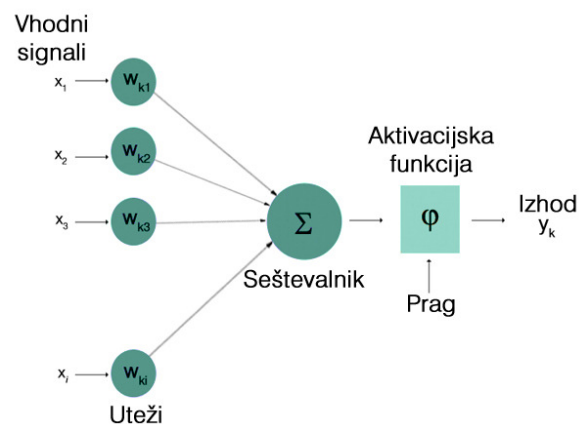
- Seštevalnik, ki služi za seštevanje vhodnih signalov, uteženih s ustreznimi utežmi. Izhod iz seštevalnika imenujemo aktivacija
- Prag, ki predstavlja nivo signala, pri katerem se sproži nevron
- Aktivacijska funkcija, ki služi za omejevanje amplitude izhoda nevrona. Tipično omeji vrednosti izhoda na interval $[0,1]$ ali $[-1,1]$.

Poznamo več vrst aktivacijskih funkcij, med katerimi so najpomembnejše pragovna, sigmoidna, linearna ter njihove izpeljanke [32].

1. 6. a) Lastnosti nevronske mreže

Lastnosti nevronske mreže so:

- Biološka podobnost: Reševanje problemov z UNM skuša oponašati delovanje človeških možganov in hkrati doseči večjo učinkovitost pri reševanju zahtevnih problemov.
- Paralelizem: Visoka stopnja paralelizma v UNM je posledica dejstva, da vsak nevron deluje relativno neodvisno od ostalih. Zato so prav nevronske mreže zmožne prilagajanja zapletenemu okolju v realnem času. Večina današnjih aplikacij je možna na običajnih osebnih računalnikih.
- Večsmerno izvajanje: Pri UNM, kjer je vsak nevron povezan z vsakim, je vsak nevron hkrati voden in izhoden
- Robustnost: Nevronska mreža je robustna glede na okvaro posameznih nevronov in sinaps. Z odstranitvijo ali okvaro enega nevrona ali sinapse ne izgubimo podatka v celoti, ker so podatkovni elementi predstavljeni z množico sinaps in nevronov. Prav tako je UNM robustna glede na pomanjkljive vhodne podatke. Seveda bo aproksimacija tem slabša, čim pomanjkljivejši so podatki.
- Učenje v nevronske mreže poteka s spontanym spreminjanjem uteži na sinapsah. Ena sinapsa predstavlja povezanost med aktivnostma dveh nevronov, ki ju sinapsa povezuje. Ker se utež spreminja glede na spreminjanje vhodnih podatkov, utež predstavlja povezanost glede na vse situacije, v katerih se je mreža do tedaj nahajala oziroma glede na vse do tedaj videne učne

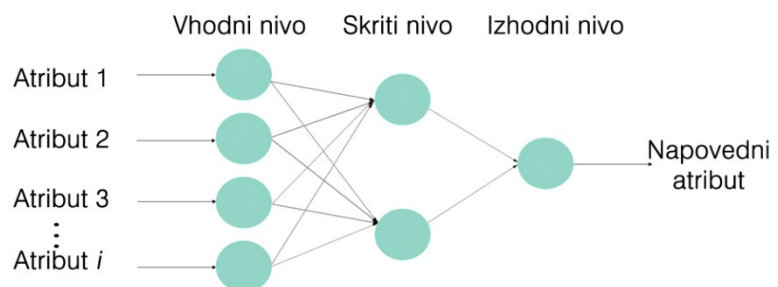


Slika 3: Prikaz umetnega nevrona

primere. Ko je mreža naučena, je vsak nevron sposoben napovedati svoje stanje v odvisnosti od danih stanj z njim povezanih nevronov.

- Relacija med strojno in programsko opremo: V nevronske mreže ni programske opreme v klasičnem pomenu besede. Edini algoritem je algoritem po katerem deluje individualni nevron. Vse ostalo delovanje je spontano.
- Matematična podlaga: Področje UNM ima dobre teoretične temelje v linearni algebri.
- Razlaga odločitev: Največja slabost UNM je, da gre za metodo črne škatle [33].

Posamični nevroni so povezani med seboj v mreže. Pri UNM poznamo več različnih mrežnih arhitektur. V glavnem jih ločimo na enoplastne in večplastne mreže s povezavami naprej,



Slika 4: Večplastna mreža z učenjem naprej

ter na rekurzivne. Tukaj se bomo osredotočili le na večplastne mreže s povezavami naprej (*ang. multilayer feed-forward networks*). Gre za mrežo pri kateri imamo eno plast vhodnih in plast izhodnih nevronov (slika 4). Med njima je ena ali več skritih plasti. Vhodni nevroni so povezani s skritimi nevrone, ti pa dalje z izhodnimi. Takim mrežam pravimo tudi večplastni perceptroni (*ang. multilayer perceptron - MLP*). Če je vsako vozlišče v vsaki plasti povezano z vsakim drugim vozliščem v sosednji plasti v smeri naprej, govorimo o polno povezani, v nasprotnem primeru pa o delno povezani mreži [32]. Osnovni princip UNM je porazdeljeni pomnilnik. Pomnilniške celice so v povezavah med nevrone. Vsak nevron ima dostop do pomnilnika na povezavah z drugimi nevrone [33].

1. 6. b) Učenje nevronske mreže

UNM uporabljajo različna pravila za učenje. Tukaj se bomo osredotočili le na t.i. posplošeno pravilo delta, ki mu pravimo tudi pravilo vzvratnega razširjanja napake (*ang. backpropagation*). Le-to omogoča učenje mreže, sestavljene iz poljubnega števila plasti. To je pomembno, saj so več nivojske mreže sposobne reševati

nelinearne probleme. Osnovni princip splošnega pravila delta temelji na utežeh, ki so na začetku naključne. Na vходу mreža dobi vhodni vzorec in z razširjanjem po nivojih, do izhodnega nivoja izračuna izhod. Zatem izračuna razliko med izračunanim in želenim izходом. Začne se proces minimizacije napake. Najprej se spremenijo uteži med zadnjim in predzadnjim nivojem. Po tem se izračunajo želene vrednosti na predzadnjem nivoju. Izračuna se razlika med želenimi in izračunanimi vrednostmi na predzadnjem nivoju. Po tem postopku se spreminjajo uteži po nivojih vse do vhodnih podatkov. Mreža spreminja uteži tako, da konvergira k čim manjši napaki glede na želeno vrednost. Pravilo vzratnega razširjanja napake, pa ima tudi nekaj problemov, na katere pa lahko delno vplivamo:

- Mreža lahko obtiči v lokalnem minimumu in zato ne konvergira k optimalni rešitvi.
- Problematična je topografija mreže: Empirično je potrebno določiti število nivojev in število nevronov v skritih nivojih.
- Problematično je preveliko prilagajanje učni množici (*ang. over-fit*). Takrat začne napaka na testnem vzorcu naraščati, preden preneha napaka na učnem vzorcu padati. Po navadi je to posledica prevelikega števila nevronov v skriti plasti.

Te probleme se da omiliti z ustreznimi nastavitvami [33]. Nastavitve števila nevronov v skriti plasti, hitrosti učenja in momentnega člana so empirične. Določitev le teh velikokrat meji bolj na umetnost kot znanost, saj so dobre nastavitve pogosto stvar izkušenj [32].

Pri UNM gre torej za matematične modele, ki jih štejemo med orodja za rudarjenje podatkov (*ang. data mining*). Pri tem model išče povezave med vhodnimi in izhodnimi podatki, brez poznavanja znanih relacij ali zakonov med njimi. UNM se uporabljajo na zelo širokem spektru področij. Največji napredek dosegajo na področju prepoznavanja vzorcev npr. prepoznavo podpisov, človeškega govora prav tako pa so pomembne na področju robotike [33].

1. 7. VREDNOTENJE NAPOVEDI MODELOV

Pri vrednotenju napovedi modelov se uporabljajo različni pristopi za oceno napake modelov. Pri našem delu se bomo osredotočili na naslednje:

- Povprečna napaka napovedi s katero ocenjujemo pristranskost (*ang. bias*)

$$Bias = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (model_i - observed_i) \quad \text{Enačba 1.6}$$

Povprečna napaka napovedi je vsota razlik med napovedmi modela in izmerjenimi vrednostmi. Bližje kot je rezultat vrednosti 0, večja je točnost modela.

- Povprečna absolutna napaka – MAE (*ang. Mean Absolute Error*):

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |model_i - observed_i| \quad \text{Enačba 1.7}$$

Pri MAE upoštevamo absolutno vrednost razlik med napovedanimi in dejanskimi vrednostmi spremenljivke.

- Povprečna relativna napaka - MAPE (*ang. Mean Absolute Percentage Error*):

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|model_i - observed_i|}{observed_i} * 100\% \quad \text{Enačba 1.8}$$

Pri MAPE razliko med napovedano in dejansko vrednostjo normaliziramo z dejansko vrednostjo in pomnožimo s 100%. MAE in MAPE sta indikatorja točnosti napovedi.

- Efektivna napaka - RMSE (*ang. Root Mean Square Error*):

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (model_i - observed_i)^2} \quad \text{Enačba 1.9}$$

Pri RMSE upoštevamo kvadrat razlike med napovedanimi in dejanskimi vrednostmi spremenljivke

- Efektivna relativna napaka - RMSPE (*ang. Root Mean Square Percentage Error*)

$$RMSPE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\left(\frac{model_i - observed_i}{observed_i} \right) * 100\% \right)^2} \quad \text{Enačba 1.10}$$

Pri RMSPE, analogno kot pri MAPE, razliko med napovedanimi in dejanskimi vrednostmi spremenljivke delimo z dejansko vrednostjo. RMSE in RMSPE sta bolj občutljivi na izstopajoče vrednosti. Obe sta indikatorja točnosti, hkrati pa nakazujeta mero natančnosti. Indikatorja absolutne napake (MAE in RMSE) sta primerna za primerjavo metod na istem vzorcu, medtem ko za primerjavo vzorcev z vrednostmi različnih razponov nista primerna, saj sta odvisna od velikosti dejanskih vrednosti. Oba indikatorja relativne napake (MAPE in RMSPE) sta primerna za obravnavo med različnimi vzorci. Njuna slabost je, da imata zelo nesimetrično porazdelitev, če so dejanske vrednosti blizu 0. Dodatna slabost je, da nista uporabna pri parametrih z relativno skalo (npr. temperatura v °C) [34].

2. NAMEN DELA

Diplomska naloga je nastala v okviru raziskav na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani, ki so usmerjene v preučevanje populacijske farmakokinetike. Populacijska farmakokinetika namreč predstavlja vedno pogostejši element v klinični farmaciji, kot tudi pri razvoju odmernih strategij za nova zdravila.

Terapija z visokoodmernim metotreksatom (HD-MTX) z reševalnimi odmerki folinske kisline je običajna pri zdravljenju akutne limfoblastne levkemije. Namen našega dela je razviti populacijski model, s katerim bomo s pomočjo vzorcev čim večjega dela relevantne populacije zadovoljivo napovedovali koncentracije metotreksata ter odmerke folinske kisline za posameznika. Povod za našo nalogo je bilo delo *Faganel-Kotnik in sodelavcev*, kjer so se ukvarjali z opisovalnim delom uporabljenega modela, torej določitvijo populacijskih FK parametrov in vplivom genetskih dejavnikov na eliminacijo MTX [35]. Pri naši raziskavi pa se bomo osredotočili predvsem na napovedne lastnosti tega modela.

V prvem delu bomo model, ki temelji na Bayesovi metodi opremili s primernimi farmakokinetičnimi parametri. Preizkusili bomo odvisnost napake od časa v ciklusu. Pri tem bomo preizkusili ali model v kasnejših časovnih točkah bolje napoveduje kot v zgodnejših.

V drugem delu pa bomo razvili alternativni model, ki temelji na neki drugi metodi. Odločili smo se za metodo umetnih nevronske mreže. Ti modeli bodo dveh različnih tipov ter večih variacij. Opravili bomo validacijo napovedne zmogljivosti z vidika napovedne napake ter jih primerjali med modeli. Poleg tega bomo uporabili tudi grafično analizo napovedi in napovednih napak. Na osnovi napovedanih koncentracij bomo določili pripadajoče odmerke folinske kisline, ter ocenili odstotek pravilne klasifikacije.

Na osnovi pridobljenih rezultatov bomo ocenili primernost modelov z BM in UNM za napovedovanje farmakokinetike metotreksata in odmerkov folinske kisline.

3. METODE

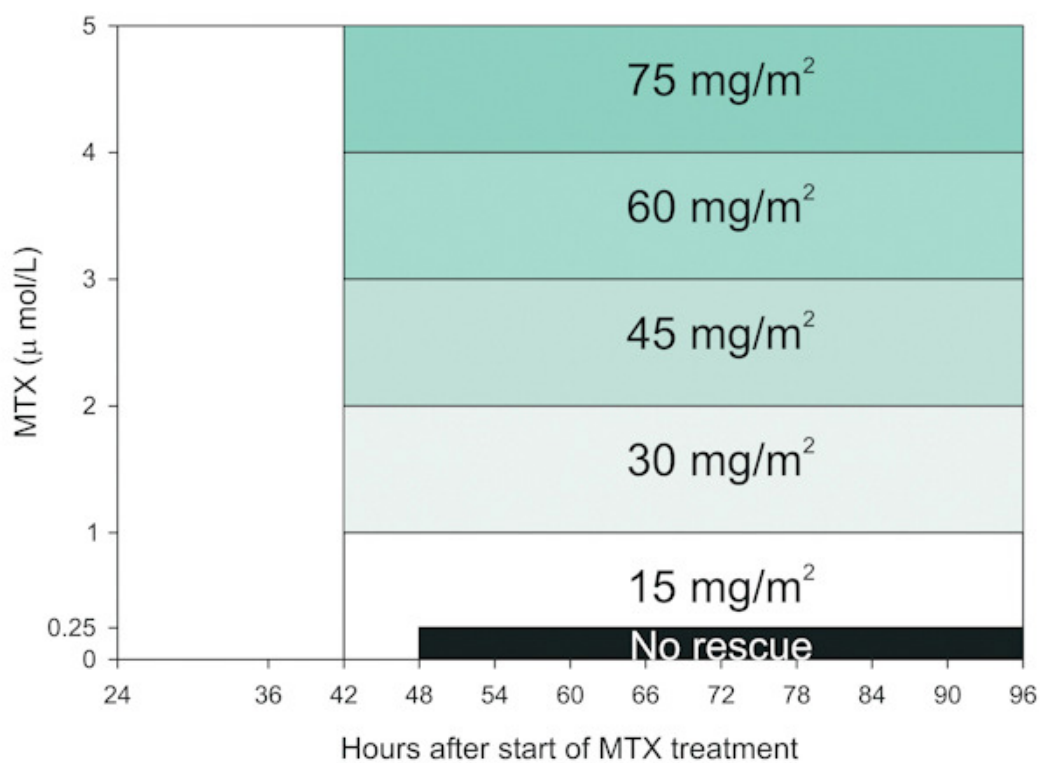
3.1. KLINIČNI DEL RAZISKAVE

V študijo je bil vključen vzorec 64-ih otrok starih od 1,6 do 16,8 let, ki so se zdravili za akutno limfoblastno levkemijo v Pediatrični bolnišnici Kliničnega centra v Ljubljani na oddelku za onkologijo in hematologijo. Podatki so bili zbrani retrospektivno med leti 1990 in 2004. Za vse so bila pridobljena soglasja za uporabo podatkov v študiji. Ta vzorec smo poimenovali »učni«. Pripravili smo tudi modifikacijo tega vzorca »učni – inter« v katerem smo meritve pacienta v različnih ciklikih tretirali, kot da prihajajo od različnih pacientov.

Po protokolu so pacienti prejeli 4 cikle kemoterapije, po vsakem pa je sledilo 2 tedna premora. MTX je bil odmerjen glede na telesno površino pacienta in sicer od 2,0-5,7 g/m² odvisno od protokola kemoterapije in stadija bolezni. MTX je bil apliciran, le če je pH urina presegal 7. Alkalinizacijo so dosegli z dajanjem natrijevega hidrogenkarbonata in 5% glukoze v razponu 15 minut. Hidracijo so dosegli z infuzijo 5% glukoze, 1,4% natrijevega bikarbonata, ter 30 mEq/L kalijevega klorida. Odmerjanje MTX je razdeljeno v 2 infuziji s konstantno hitrostjo odmerjanja. Prva infuzija je trajala 1 uro in pri tem je pacient prejel 10% celotnega odmerka. Druga infuzija, ki je neposredno sledila prvi, pa je trajala 23 ur in je vsebovala preostalih 90% odmerka. Ta infuzija je vzdrževala koncentracijo MTX v stacionarnem stanju. Po 24 urah od začetka je pacient prenehal prejemati citostatik. Po protokolu zdravljenja je potrebno koncentracije MTX nadzirati z odvzemom vzorcev pri 24., 36., 42. in 48. uri. Dodatni vzorci krvi so odvzeti na vsakih 6 ur, če je bila koncentracija pri 48. uri višja od 0,5 µmol/L in dokler le-ta ni padla pod 0,25 µmol/L. Koncentracije MTX so izmerili s fluorescenčno polarizacijsko imuno-kemijsko metodo TDx (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

Vsi pacienti so dobili reševalni odmerek folinske kisline 42 ur po začetku infuzije metotreksata in sicer 15 mg/m². Če so naknadno izmerjene koncentracije MTX presegale 1 µmol/L so reševalni odmerek primerno povečali. Pri 48. uri so glede na vrednosti plazemskih koncentracij pri 42. uri pacienti prejeli odmerek folinske kisline po shemi prikazani na sliki 5. Če je koncentracija pri 48. uri padla pod 0,5 µmol/L so

pacienta odpustili iz bolnišnice. Z odmerjanjem folinske kisline (slika 5) so sicer nadaljevali v šest urnih intervalih dokler niso plazemske koncentracije MTX padle pod $0,25 \mu\text{mol/L}$.



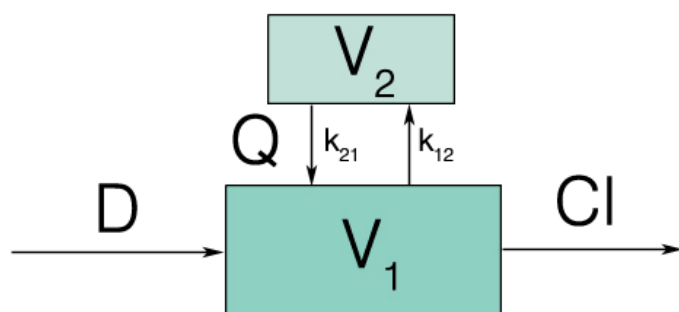
Slika 5: Shema odmerjanja folinske kisline

Naknadno smo pridobili nov vzorec pacientov, ki smo ga poimenovali »testni«. To nam je omogočilo eksterno validacijo. Vzorec »testni« predstavlja skupino 37 otrok starih od 1,6 do 16,8 let, ki so se zdravili za akutno limfoblastno levkemijo v Pediatrični bolnišnici kliničnega centra v Ljubljani. Za vse so bila pridobljena soglasja za uporabo podatkov v študiji. Odmerjanje, potek terapije, alkalinizacija in hidracija so potekali enako kot pri učnem vzorcu. Reševalni odmerki folinske kisline so prav tako potekali po shemi na sliki 5. Tudi pri tem vzorcu smo pripravili varianto »testni – inter«, kjer smo meritve pacienta v različnih ciklih tretirali, kot različne paciente.

Ne glede na to, da bi morali biti pri vseh pacientih vzorci krvi odvzeti pri 24, 36, 42 in 48 urah, pri nekaterih pacientih odvzem krvi za določitev koncentracije MTX ni bil izveden. Vzrok za to je dejstvo, da so bili zbrani rezultati merjenja koncentracije MTX za daljše časovno obdobje, v katerem se je spreminjala doktrina zdravljenja z visokimi odmerki MTX. Predvsem je izstopalo pomanjkanje meritev pri 36. uri.

3. 2. RAZVOJ OSNOVNIH MODELOV

Razvili smo prvi model, ki temelji na Bayesovi metodi. Ta model smo razvili s programskim paketom NONMEM (verzija 6, level 2, Icon Development Solutions, Ellicott City, MD, USA), Perl speaks NONMEM (verzija 2.3, <http://psn.sourceforge.net>) in Xpose (verzija 4, <http://xpose.sourceforge.net>). Kodo v programskem jeziku FORTRAN smo prevajali s prevajalnikom Intel Visual Fortran compiler (verzija 11, Intel, Santa Clara, CA USA). Model smo zasnovali kot model z dvoprostorno strukturo (slika 6) z eliminacijo prvega reda, s proporcionalno in aditivno rezidualno variabilnostjo.



Slika 6: Dvoprostorni model:

D (odmerek), CI (očistek), V_1 (centralni prostor), V_2 (stranski prostor), Q (distribucijski očistek). Zveza med distribucijskim očistkom in hitrostnima konstantama

porazdelitve k_{12} in k_{21} je podana v enačbah 3.1 in 3.2.

$$Q_1 = k_{12} * V_1, \text{Enačba 3.1}; \quad Q_2 = k_{21} * V_2, \text{Enačba 3.2};$$

Za razvoj modela smo uporabili učni vzorec, pri katerem so bili podani sledeči atributi: identifikacijska številka pacienta, spol, starost, telesna teža, telesna površina, genotip šestih genov, ki vplivajo na metabolizem in eliminacijo metotreksata, odmerek metotreksata, ter plazemske koncentracije metotreksata glede na čas odvzema vzorca. Z metodo FOCE in empirično BM smo ocenili vrednosti očistka, volumen centralnega prostora, volumen stranskega prostora in distribucijski očistek ter interindividualno interciklusno in rezidualno variabilnost na osnovi populacijskega FK modela, ki je predstavljen v preglednici II.

Preizkusiti smo želeli odvisnost napake od časa v ciklusu (od števila časovnih podatkov v ciklusu), vendar pa vzorec »testni« za to ni bil primeren. Zato smo se odločili to preizkusiti na vzorcih »učni« in »učni – inter«. Ker gre za testiranje na učnem vzorcu nam je to služilo le kot ocena in ne kot končni rezultat, saj lahko pri testiranju napake na učnem vzorcu govorimo le o navidezni napaki napovedi (*ang. apparent error*) [36]. Preizkusili smo tudi vpliv ciklusa, na napako. Predpostavljali smo, da bo napaka napovedi modela v kasnejših ciklikih manjša, saj ima model v kasnejših ciklikih na voljo več podatkov iz prejšnjih ciklov.

Preglednica II: Parametri populacijskega farmakokinetičnega modela, ki upošteva vpliv genotipa MTHFR na očistek MTX za napovedovanje BM-1.

Cl (očistek)		7,87 L/h/25kg
MTHFR 677 C>T na Cl		
	677CT	0,938
	677TT	0,738
EkspONENT mase na Cl		0,395
V ₁ (centralni prostor)		11.1 L/25kg
EkspONENT mase na V ₁		1
V ₂ (stranski prostor)		2,52 L
Q (distribucijski očistek)		0,213 L/h
Interindiv. var.		
	η_{CL}	29,7%
	η_{V1}	14,2%
	η_{V2}	50,6%
	η_Q	16,5%
Interciklusna var.		
	$\eta_{intc,CL}$	16,6%
Rezidualna var.		
	ϵ_{prop}	67,6%
	ϵ_{adit}	0,0867 $\mu\text{mol/L}$

Preglednica III: Primer atributov učnega vzorca za model BM-2.

ID	TIME	CONC	DOSE	RATE	OCC	SX	WT	BSA	AGE
235	0	?	0,66	0,66	2	0	46,7	1,45	15,5
235	1	?	5,94	0,258	2	0	46,7	1,45	15,5
235	24	37,9	?	?	2	0	46,7	1,45	15,5
235	36	1,43	?	?	2	0	46,7	1,45	15,5
235	42	0,5	?	?	2	0	46,7	1,45	15,5
235	48	0,95	?	?	2	0	46,7	1,45	15,5
235	54	0,6	?	?	2	0	46,7	1,45	15,5
235	60	0,12	?	?	2	0	46,7	1,45	15,5
235	66	?	?	?	2	0	46,7	1,45	15,5

Pacienti v testnem vzorcu niso bili genotipizirani, zaradi česar smo morali modificirati tudi naš model BM-1 tako, da podatkov o genotipu ni upošteval. Morali smo prilagoditi farmakokinetične parametre prikazane v preglednici IV.

Preglednica IV: Parametri populacijskega farmakokinetičnega modela BM-2, ki ne upošteva vpliv genotipa MTHFR na očistek MTX.

Cl (očistek)		6,86 L/h/20kg
EkspONENT mase na Cl		0,383
V ₁ (centralni prostor)		14,6 L/20kg
EkspONENT mase na V ₁		0,486
V ₂ (stranski prostor)		3,62 L
Q (distribucijski očistek)		0,118 L/h
Interindiv. var.		
	η_{CL}	28,9%
	η_{V1}	18,9%
	η_{V2}	64,6%
	η_Q	55,1%
Interciklusna var.		
	$\eta_{intc,CL}$	14,2%
Rezidualna var.		
	ϵ_{prop}	67,8%
	ϵ_{adit}	0,0525 $\mu\text{mol/L}$

Razvili smo tudi model, ki temelji na UNM. Pripravili smo 2 različna modela z UNM. Ta modela smo simulirali s programskim paketom Weka (verzija 3.6.4., University of Waikato, New Zealand). Uporabili smo algoritem z večplastnim perceptronom, z enim skritim nivojem s sigmoidno prenosno funkcijo in linearno prenosno funkcijo na izhodnem nivoju ter nastavitvami parametrov prikazanimi v preglednici V.

Preglednica V: Zagonske nastavitve modelov UNM-1 in 2.

Learning rate	0,3
Momentum	0,2
Learning time	5000
Validation set size	0
Seed	0
Validation threshold	20
Hidden layer neurons	a

Ostale nastavitve so ostale privzete. Pri modeliranju smo uporabili vzorec »učni – inter« s katerim smo modela z UNM naučili. Za oba modela z UNM smo morali preoblikovati vhodne podatke. Pri modelu UNM-1 smo kot vhodne attribute uporabili vse attribute: identifikacijsko številko pacienta, spol, starost, telesna teža, telesna površina, odmerki MTX. Plazemske koncentracije MTX smo morali preoblikovati glede na diskretne časovne točke (od 24., 36., 42., 48., 54., 60. in 66. uro). Slednje je bila nujna prilagoditev, saj omenjeni programski paket ni omogočal uporabe časa kot zvezne spremenljivke. V splošnem to predstavlja precejšnjo omejitev, saj lahko model upošteva le koncentracije v vnaprej določenih časovnih točkah, medtem ko lahko pri modelih z BM dodajamo koncentracije v katerikoli časovni točki. Plazemske

koncentracije smo preoblikovali tudi tako, da smo jih logaritmirali. Za to smo se odločili, ker so modeli z UNM empirični in ne »razumejo« narave podatkov, ki jih obravnavamo. Zaradi tega so koncentracijam blizu nič pripisovali tudi negativne vrednosti koncentracije, kar pa ni realno in to smo preprosto rešili tako, da smo vrednosti logaritmirali (preglednica VI).

Preglednica VI: Primer učnega vzorca za UNM-1.

ID	DOSE	SX	WT	BSA	AGE	LN24	LN36	LN42	LN48	LN54	LN60	LN66
235	6,6	0	46,7	1,45	15,5	3,635	0,358	-0,693	-0,051	-0,511	-2,120	?

Pri modelu UNM-2 smo vhodne podatke še dodatno preoblikovali (preglednica VII), tako da so vsebovali le identifikacijsko številko pacienta, telesno težo in logaritem koncentracije pri 24. in 42. uri. Za uporabo tega nabora vhodnih podatkov smo se odločili na osnovi preliminarne testiranja modela z različnimi nabori spremenljivk.

Preglednica VII: Primer atributov učnega vzorca za UNM-2.

ID	WT	LN24	LN42
235	46,7	3,635	-0,693

Najprimernejši točki za praktično aplikacijo napovednih modelov sta v našem protokolu 42. in 48. ura. Pri 42. uri lahko napovemo ali bo pacient potreboval povečan odmerek folinske kisline ali ne. Še bolj pomembna pa je določitev pri 48. uri, saj lahko preverimo ali je odmerek, ki bazira na meritvi pri 42. uri ustrezen, ali pa bo potrebno povečanje odmerka. Obenem lahko napovemo tudi ali bomo pacienta lahko odpustili iz bolnišnice. Zaradi specifičnih lastnosti vzorcev »testni« in »testni – inter« smo koncentracije določali pri 42. uri. Pri tej uri smo za določitev odmerkov folinske kisline uporabili enake odmerne razrede kot pri 48. uri.

Modela z BM smo učili na vzorcu »učni«, kjer je ohranjena informacija o ciklusu, medtem ko smo oba modela z UNM učili z vzorcem »učni – inter«. Modele smo primerjali z različnimi variantami testnih vzorcev. Primerjali smo jih po posamičnih ciklikih glede na njihovo napovedno napako ter klasifikacijo odmerkov folinske kisline. Iste kriterije smo uporabili tudi za vrednotenje modelov, kjer smo kot testni vzorec uporabili »testni – inter«.

3.3. RAZVOJ MODELOV ZA NAPOVEDOVANJE ODMERKOV FOLINSKE KISLINE

Nato smo raziskavo nekoliko modificirali. Pri modelih z UNM smo uporabili način direktne klasifikacije. O direktni klasifikaciji govorimo zato, ker je model zastavljen tako, da ne napoveduje koncentracije MTX pri 42. uri iz katere na podlagi sheme na sliki 5 določimo odmerek folinske kisline, pač pa UNM določijo odmerek neposredno. Pri tem napovedne meje razredov odmerka niso nujno iste kot v protokolu. V tem načinu smo modela morali ponovno naučiti s preoblikovanim učnim vzorcem. Za UNM-1 je učni vzorec vseboval sledeče podatke: identifikacijska številka pacienta, spol, starost, telesno težo, telesno površino in logaritem koncentracij pri 24., 36. uri, 48., 54., 60. in 66. uri. Podatek o 42. uri smo nadomestili s predvidenim odmerkom folinske kisline. Pri testnem vzorcu so atributi ostali enaki kot pri učnem, vendar pa smo morali vse koncentracije po 42. uri nadomestiti s vprašaji, ki predstavljajo manjkajoče vrednosti. S tem smo želeli simulirati realno situacijo, v kateri želimo napovedati odmerek folinske kisline pri 42. uri. V takšnem primeru koncentracij pri kasnejših časih ne poznamo (preglednici VIII in IX)

Preglednica VIII: Primer učnega vzorca za direktno klasifikacijo pri UNM-1.

ID	DOSE	SX	WT	BSA	AGE	LN24	LN36	LN48	LN54	LN60	LN66	CLASS
235	6,6	0	46,7	1,45	15,5	3,635	0,358	-0,051	-0,51	-2,12	?	LCV15mg/m2

Preglednica IX: Primer testnega vzorca za direktno klasifikacijo pri UNM-1.

ID	DOSE	SX	WT	BSA	AGE	LN24	LN36	LN48	LN54	LN60	LN66	CLASS
144	1,6	1	7,8	0,39	0,5	5,146	1,821	?	?	?	?	LCV30mg/m2

Za UNM-2 je učni vzorec vseboval enake podatke kot v prejšnjih poskusih, le da smo koncentracijo pri 42. uri nadomestili s predvidenim odmerkom folinske kisline (preglednica X).

Preglednica X: Primer učnega vzorca za direktno klasifikacijo pri UNM-2.

ID	WT	LN24	CLASS
235	46,7	3,635	LCV15mg/m2

Zasnovo raziskave smo še dodatno modificirali, tako da smo združili vzorca »učni – inter« in »testni – inter« v »skupni – inter« in uporabili metodo navzkrižne validacije.

Pri tej metodi se skupni vzorec uporablja tako kot učni, kot tudi kot testni. Uporabili smo 10 kratno navzkrižno validacijo. Pri UNM-1 je vzorec »skupni – inter«, zaradi simulacije časa, v formatu prikazanem v preglednici IX, pri UNM-2 pa v formatu preglednice X.

Ker smo želeli ugotoviti, kako pomemben za napovedi je podatek pri 36. uri smo ustvarili vzorec, ki je vseboval le paciente, ki so imeli opravljene vse meritve do vključno 42. ure. S tem se je občutno zmanjšalo število pacientov, saj je le 26% pacientov imelo opravljene meritve pri 36. uri, zaradi česar smo morali pripraviti skupni vzorec, ki smo ga poimenovali »skupni – 36h«, in uporabiti 10 kratno navzkrižno validacijo. Vzoredno smo ta isti vzorec pripravili tako, da smo koncentracije pri 36. uri podali kot manjkajoče vrednosti. Primerjava modelov naučenih na tako pripravljenih vzorednih vzorcih nam je pokazala direkten vpliv koncentracije pri 36. uri. Tudi tukaj smo opravili poskuse še z direktno klasifikacijo. Pri variaciji modela UNM-1 je format skupnega vzorca ustrezal primeru v preglednici IX. Pri variaciji modela UNM-2, pa smo uporabili format prikazan v preglednici XI.

Preglednica XI: Primer učnega vzorca za model s 36. uro pri UNM-2.

ID	WT	LN24	LN36	LN42
235	46,7	3,635	0,358	-0,693

Kot primarni kriterij vrednotenja modelov smo uporabili napovedno napako. Večinoma smo poskušali modele vrednotiti tako z vidika absolutne (indikatorja MAE in RMSE ter povprečna napaka napovedi) kot tudi relativne napake (indikatorja MAPE in RMSPE ter povprečna relativna napaka). Ker omenjeni numerični indikatorji ne izkazujejo popolne slike smo jih dopolnili s pripadajočo grafično analizo. Kot sekundarni kriterij smo uporabili analizo klasifikacije odmerkov folinske kisline. Kot sekundarni pokazatelj smo ga izbrali, ker je slučajna spremenljivka, ki je delno odvisna tudi od napake modela. Pri vrednostih MTX, ki so blizu mejam odmernih intervalov folinske kisline, lahko že zelo majhna odstopanja povzročijo napačno klasifikacijo.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. ODVISNOST OD ČASA (ŠTEVILA ČASOVNIH PODATKOV)

V preglednici XII so prikazane značilnosti vzorca »učni«. Prevladujoči razred odmerkov folinske kisline v tem vzorcu je bil odmerek »15 mg/m²«, ki ga je prejelo 77,27% pacientov v vzorcu.

Preglednici XII: Značilnosti vzorca »učni«.

	Aritmetična sredina	Mediana	Variacijski razpon
Starost (leta)	6,9	5	(1,6; 16,8)
Masa (kg)	26,0	17,2	(10,3; 78,3)
Telesna površina (m²)	0,904	0,71	(0,47; 1,89)
Odmerek MTX (g)	4,53	3,65	(1,10; 9,25)
Odmerek MTX (g/m²)	5,00	5,09	(2,03; 5,71)
Konc. pri 24h (μmol/L)	43,79	28,77	(0,27; 216,8)
Konc. pri 42h (μmol/L)	0,55	0,43	(0,03; 8,30)

V prvem delu naše raziskave smo testirali vpliv časa (oz. števila predhodnih meritev koncentracije MTX) na točnost napovedi BM-1 na vzorcih »učni« ter »učni – inter«.

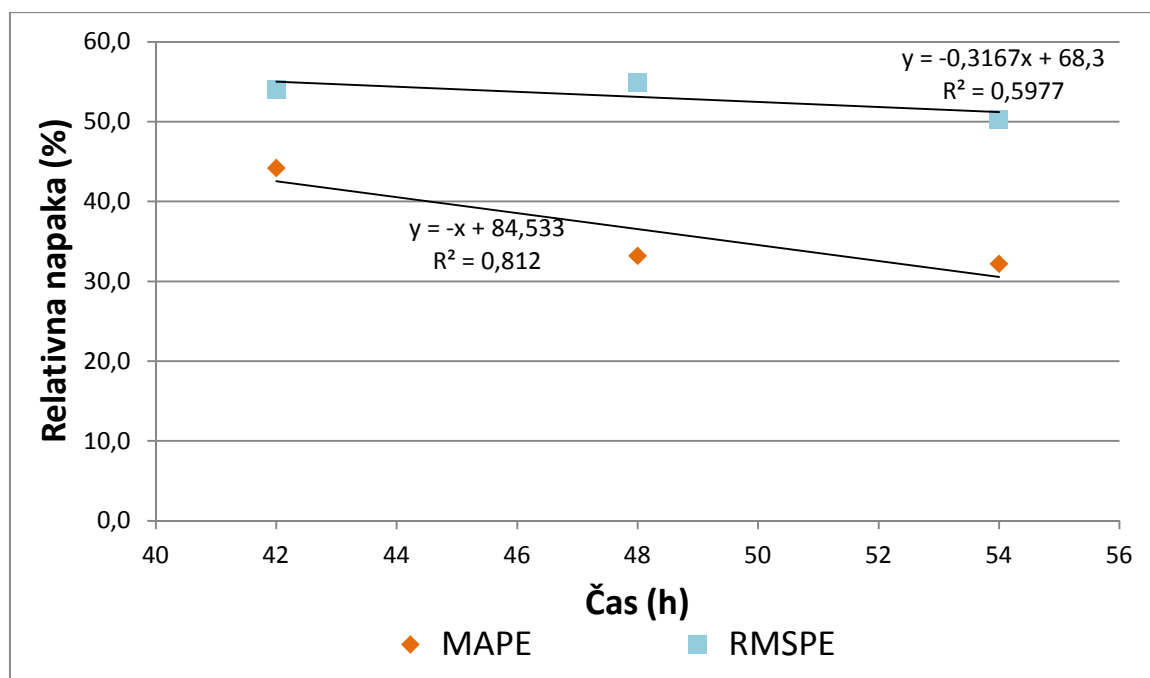
4. 1. a) Model BM-1 na vzorcu »učni«

V preglednici XIII so prikazane vrednosti indikatorjev navidezne napake v odvisnosti od časovne točke v ciklusu zdravljenja.

Preglednica XIII: Prikaz indikatorjev navideznih napak v odvisnosti od časovne točke v ciklusu.

Čas	Absolutna napaka ($\mu\text{mol/L}$)		Relativna napaka (%)	
	MAE	RMSE	MAPE	RMSPE
42h	0,31	0,52	44,2	54,1
48h	0,16	0,27	33,2	54,9
54h	0,11	0,16	32,2	50,3
60h	0,11	0,18	49,1	85,3
66h	0,10	0,11	66,7	82,0

Iz preglednice XIII je razvidno, da absolutna napaka upada z naraščajočim časom. To je pričakovano, saj se tudi vrednosti koncentracije MTX s časom zmanjšujejo. Relativna napaka se do 54. ure malo spreminja, nato pa začne strmo naraščati, ker se vrednosti koncentracije zmanjšujejo hitreje kot pada absolutna napaka. Razloge zakaj napaka po 54. uri narašča gre najverjetneje iskati v količini podatkov ter v vrednostih MTX blizu nič, ki lahko vplivajo na MAPE in RMSPE. Po 54. uri namreč število pacientov, ki so še potrebovali reševanje s folinsko kislino in dodatne meritve plazemske koncentracije MTX, močno upade (pri 60. uri le 9 primerov, pri 66. uri 7, torej le 11% celotnega vzorca). Če smo zanemarili meritve pri 60. in 66. uri lahko na sliki 7 opazimo zelo rahel padec obeh indikatorjev relativne napake (z vidika MAPE $r^2 = 0,812$ in z vidika RMSPE $r^2 = 0,598$). Regresijo smo naredili le iz treh točk, kljub temu pa jasnega padca iz ene časovne točke v drugo nismo opazili.



Slika 7: Indikatorji relativne navidezne napake glede na čas v ciklusu do 54. ure

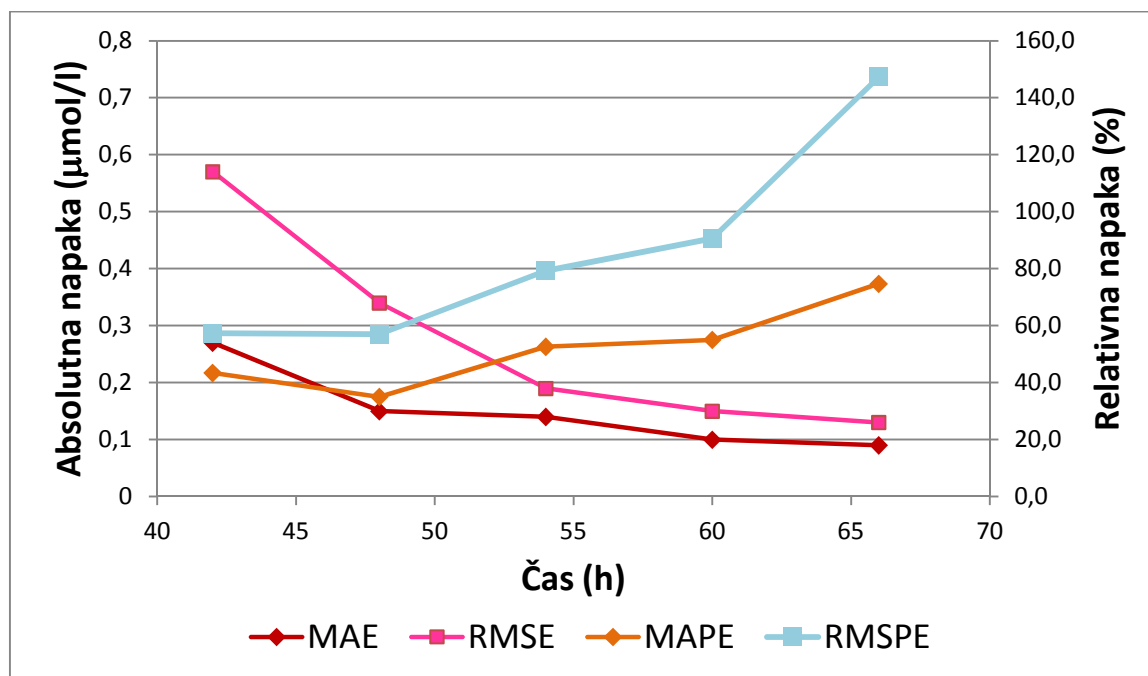
4. 1. b) Model BM-1 na vzorcu »učni – inter«

V preglednici XIV so prikazane vrednosti indikatorjev navidezne napake v odvisnosti od časovne točke v ciklusu zdravljenja. Indikatorje navidezne napake modela smo primerjali na sliki 8.

Preglednica XIV: Prikaz indikatorjev navidezne napake v odvisnosti od časovne točke.

Čas	Absolutna napaka ($\mu\text{mol/L}$)		Relativna napaka (%)	
	MAE	RMSE	MAPE	RMSPE
42h	0,27	0,57	43,4	57,3
48h	0,15	0,34	35,0	57,0
54h	0,14	0,19	52,6	79,3
60h	0,10	0,15	55,0	90,6
66h	0,09	0,13	74,7	147,4

Enako kot pri analizi pri točki 4.1.a) opazimo na sliki 8 padec absolutne napake tako pri MAE kot tudi RMSE. Za razliko od točke 4.1.a) pa tukaj ne opazimo padca relativne napake, tudi če zanemarimo meritvi pri 60. in 66. uri, hkrati pa se večja razlika med MAPE in RMSPE.



Slika 8: Indikatorjev navidezne napake s časom v vzorcu »učni – inter«

Če povzamemo obe točki, lahko pričakovano opazimo padec absolutne napake s časom, ki ga opazimo pri obeh variantah učnega vzorca, in je posledica znižanja koncentracij MTX pri kasnejših časih. Rezultati MAPE in RMSPE v celoti ne sledijo našim pričakovanjem, saj s časom naraščajo. Naša hipoteza, da bo navidezna napaka padala s povečevanjem števila časovnih točk, torej ni bila potrjena.

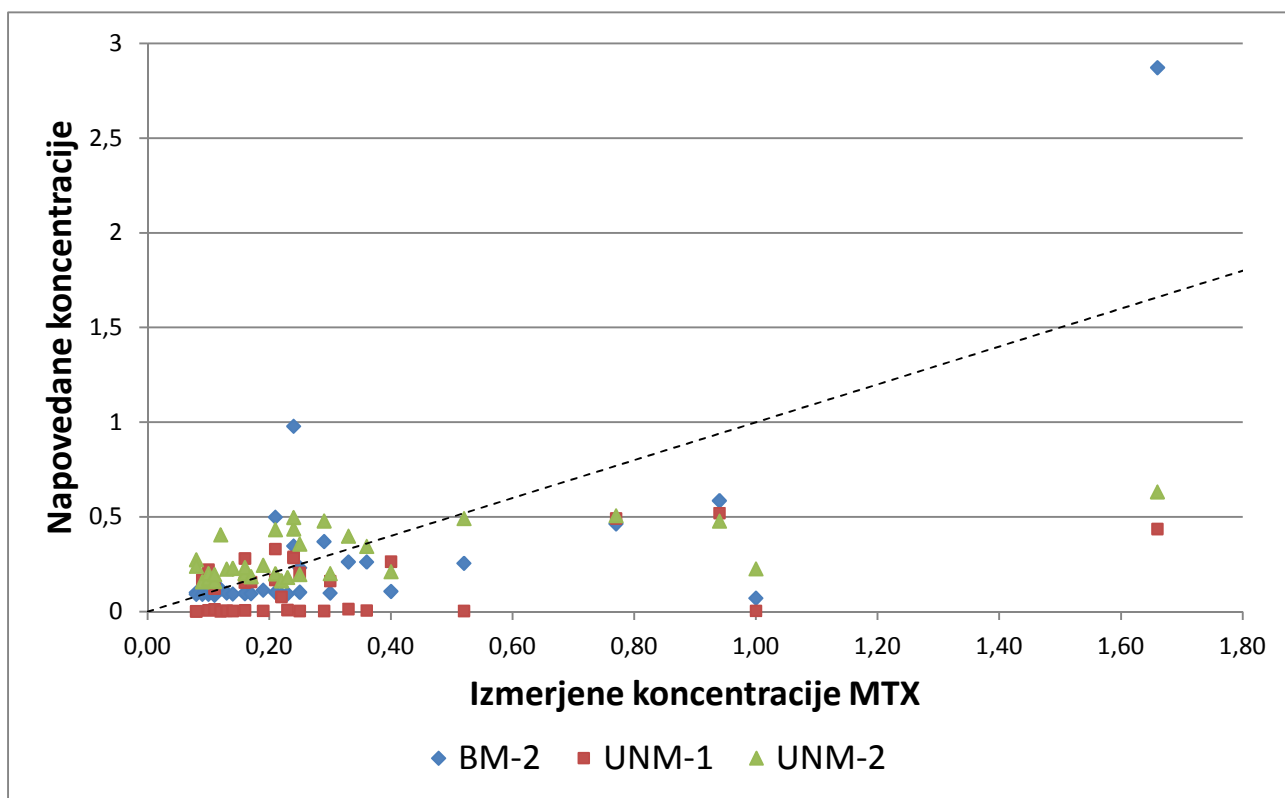
4. 2. PRIMERJAVA OSNOVNIH MODELOV MED CIKLUSI

Preglednica XV prikazuje značilnosti vzorcev »testni« in »testni – inter«. Prevladujoči razred odmerkov folinske kisline je »brez odmerka«, ki predstavlja 68,25% vseh pacientov v vzorcu.

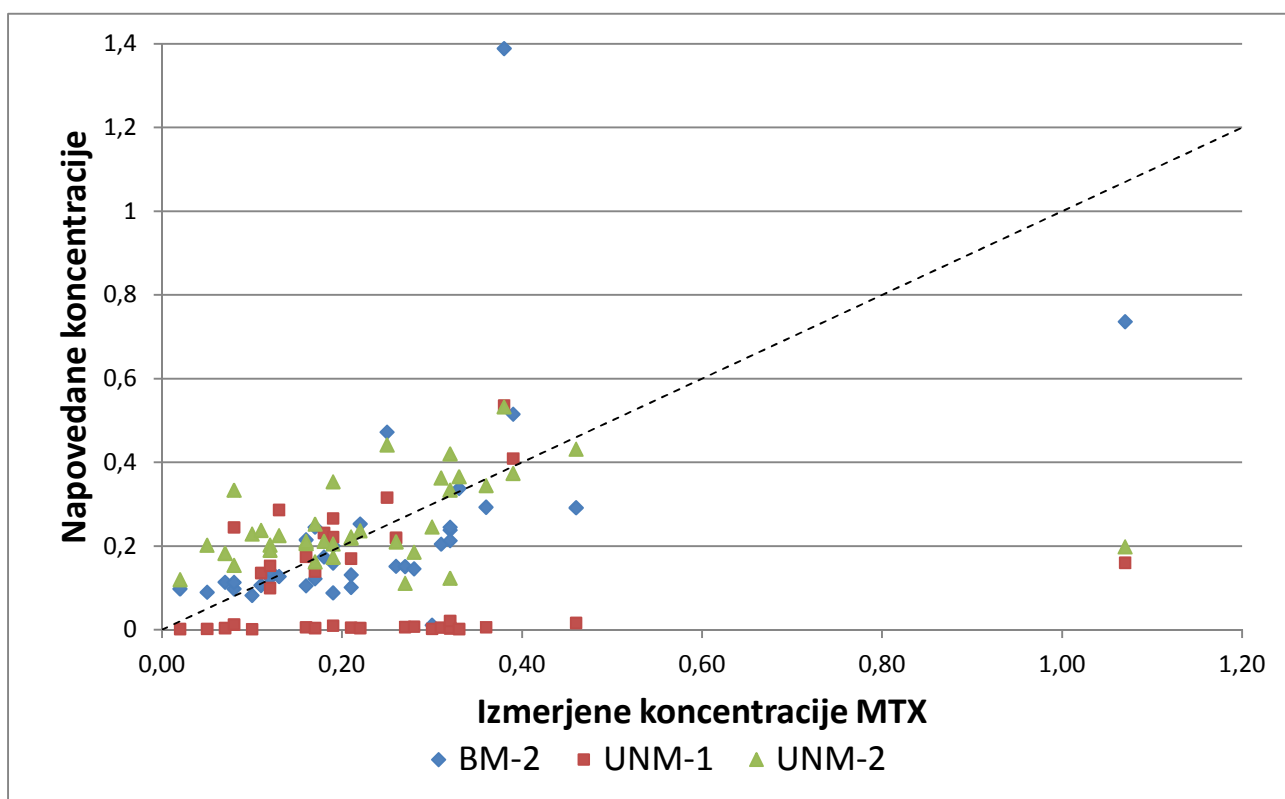
Preglednica XV: Karakteristike vzorca »testni« in »testni – inter«.

	Aritmetična sredina	Mediana	Variacijski razpon
Starost (leta)	6,1	4,5	(0,3; 17,9)
Teža (kg)	27,0	19,1	(7,4; 81)
Telesna površina (m²)	0,917	0,760	(0,36; 2,00)
Odmerek MTX (g)	2,34	1,68	(0,54; 8,44)
Odmerek MTX (g/m²)	2,54	1,99	(1,03; 5,08)
Konc. pri 24h (μmol/L)	19,94	9,10	(0,14; 171,7)
Konc. pri 42h (μmol/L)	0,26	0,2	(0,02; 1,66)

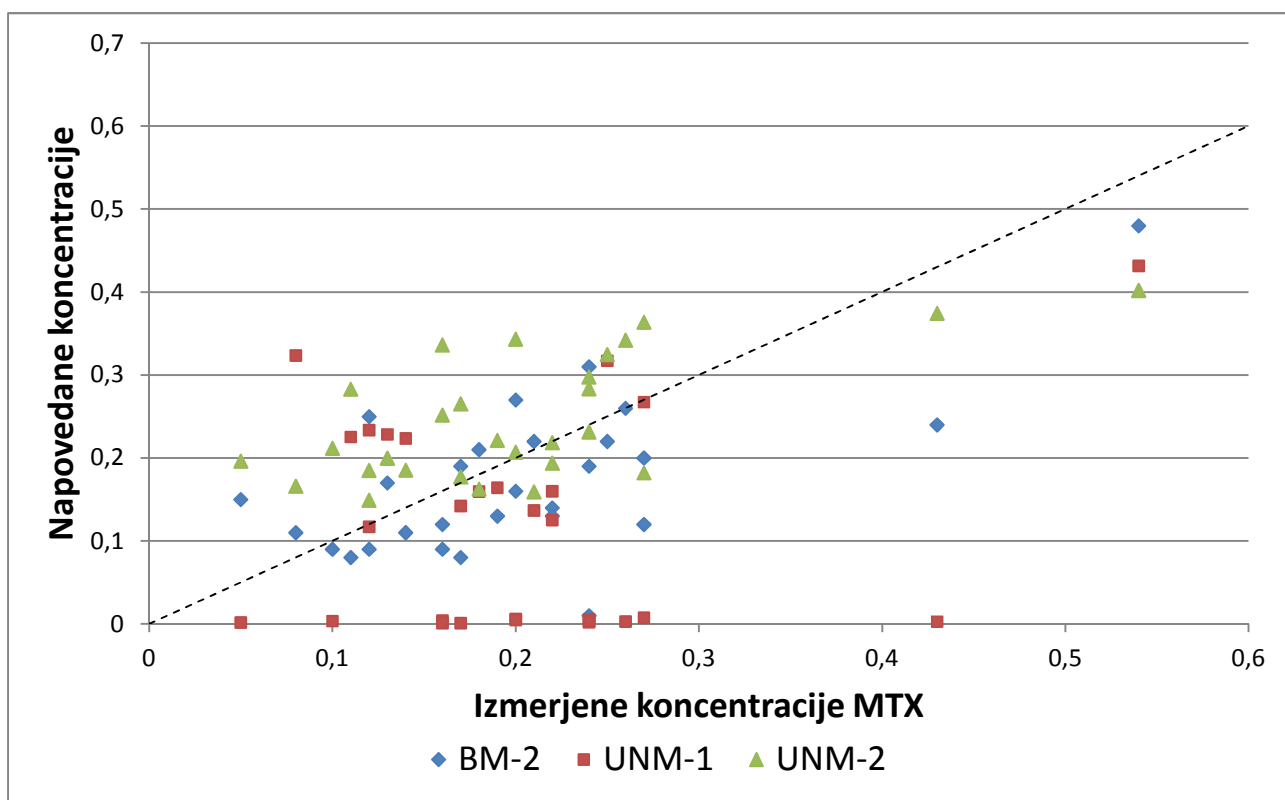
Pri analizi modelov med ciklusi smo uporabljali vzorec »testni«. Napovedi osnovnih modelov (BM-2, UNM-1 in UNM-2) smo testirali za vsak cikel posebej. Na slikah 9-12 so prikazane napovedane koncentracije modelov v odvisnosti od izmerjenih koncentracij MTX po posamičnih ciklih. Diagonalna črta v grafih predstavlja idealno napovedno linijo.



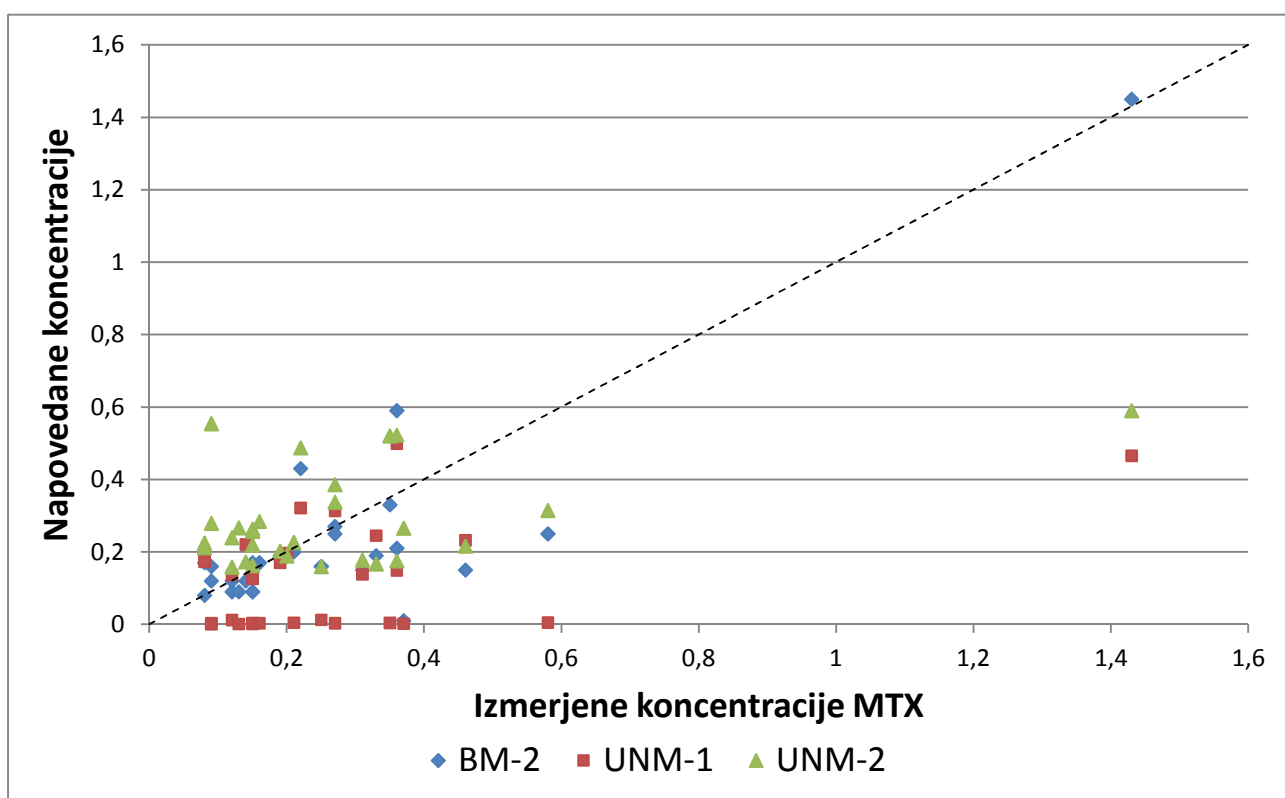
Slika 9: Prikaz napovedi za 1. ciklus zdravljenja



Slika 10: Prikaz napovedi za 2. ciklus zdravljenja



Slika 11: Prikaz napovedi za 3. cikel zdravljenja



Slika 12: Prikaz napovedi za 4. cikel zdravljenja

Preglednica XVI: Rezultati napovedi osnovnih modelov glede na cikel zdravljenja.

		Napovedna napaka				Napoved odmerka folinske kisline			
		Absolutna napaka ($\mu\text{mol/L}$)		Relativna napaka (%)		pravilna (%)	previsoka (%)	prenizka (%)	varna (%)
		MAE	RMSE	MAPE	RMSPE	/	/	/	/
Ciklus 1	BM-2	0,181	0,326	47,6	72,1	78,8	12,1	9,1	90,9
	UNM-1	0,212	0,334	69,5	77,8	66,7	12,1	21,2	78,8
	UNM-2	0,167	0,270	64,6	87,4	69,7	18,2	12,1	87,9
Ciklus 2	BM-2	0,106	0,200	49,5	87,7	66,7	8,3	25,0	75,0
	UNM-1	0,174	0,245	73,0	84,7	58,3	8,3	33,3	66,7
	UNM-2	0,102	0,177	70,4	124,2	72,2	11,1	16,7	83,3
Ciklus 3	BM-2	0,066	0,085	38,3	54,7	82,1	7,1	10,7	89,3
	UNM-1	0,136	0,168	75,4	95,0	82,1	7,1	10,7	89,3
	UNM-2	0,072	0,087	50,5	78,5	67,9	28,6	3,6	96,4
Ciklus 4	BM-2	0,086	0,136	33,7	46,7	72,4	3,4	24,1	75,9
	UNM-1	0,177	0,259	69,4	79,5	65,5	3,4	31,0	69,0
	UNM-2	0,156	0,223	78,5	124,6	58,6	24,1	17,2	82,8

Običajen kriterij za ocenjevanje napak med modeli je relativna napaka, saj kaže na napovedno napako modela ne glede na to, za kakšen red velikosti podatkov v vzorcu gre. Absolutna napaka na drugi strani pa je odvisna od reda velikosti podatkov. Vendar pa imata tudi MAPE in RMSPE nekaj pomanjkljivosti. Uporabljamo jih lahko le na skalah z absolutno ničlo, večji vpliv imajo pozitivna odstopanja kot negativna, ter za nas problematična lastnost, da imata nesimetrično porazdelitev, ko so vrednosti meritev blizu nič [34].

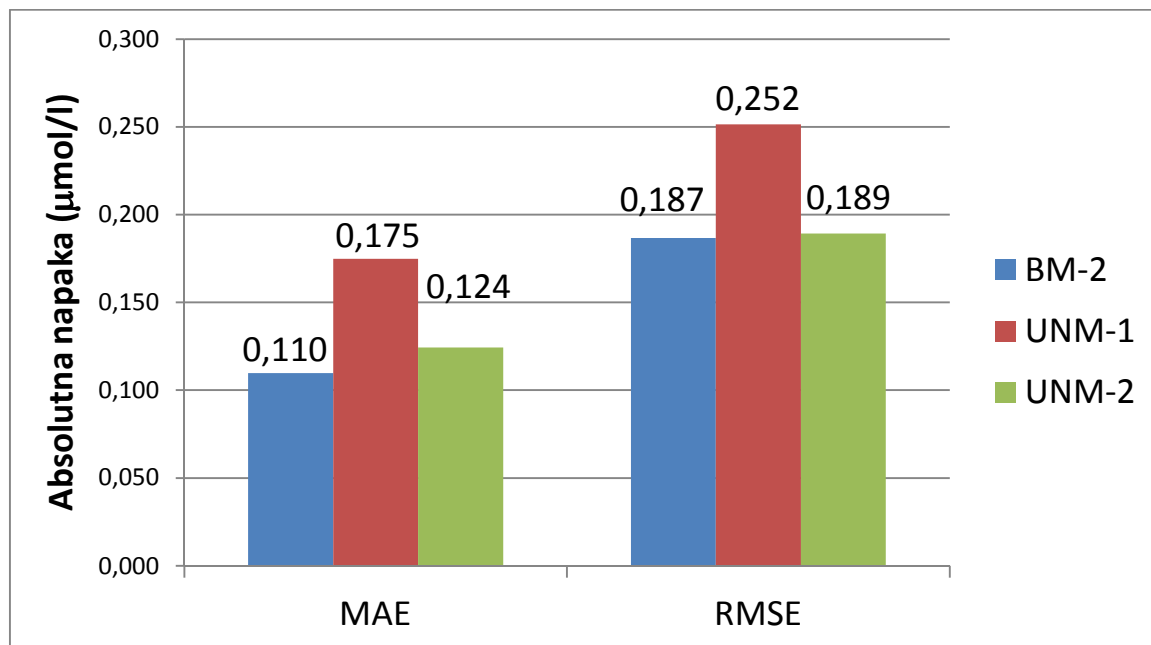
V našem primeru je slednje lahko problematično, saj se vrednosti koncentracij MTX v krvi s časom znižujejo in nekatere koncentracije so že pri 42. uri zelo blizu nič. Zato smo ocenili, da sta zato v tem primeru boljša kriterija za primerjavo med modeli MAE in RMSE. Primerjava teh dveh parametrov med osnovnimi modeli v posameznih ciklikih zdravljenja ni bila problematična, saj smo vse tri testirali na istem testnem vzorcu in je torej red velikosti testnih podatkov enak za vse. V točki 4.2.a), torej pri analizi napak modela BM-2 v različnih ciklikih zdravljenja, je primernejša primerjava relativnih napak, saj se razponi podatkov po posameznih ciklikih razlikujejo.

4. 2. a) Odvisnost napovedne napake od višanja ciklusa

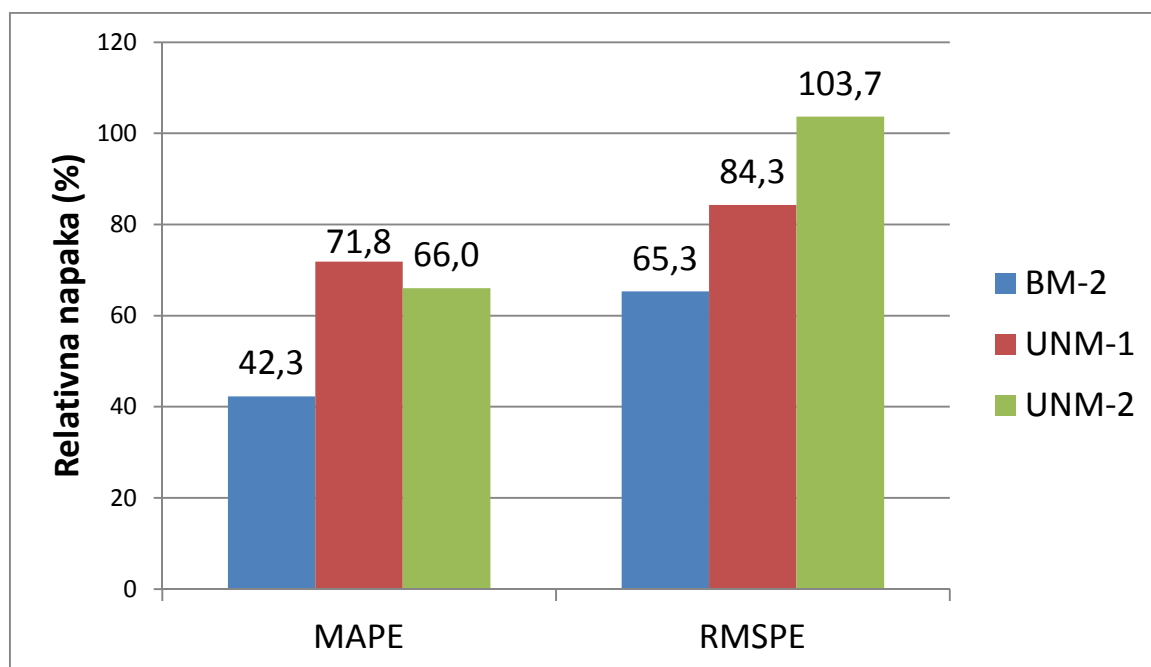
Pri modelu BM-2 so relativne napovedne napake na testnem vzorcu z višanjem ciklusa z ozirom na 42. uro upadale (MAPE: $k = -5,29$, $r^2 = 0,823$; RMSPE: $k = -10,92$, $r^2 = 0,593$), vendar pa jasnega padca napake iz ciklusa v ciklus ni bilo (v drugem ciklusu je napaka narasla). Pri modelih z UNM smo pričakovali, da takšnega trenda ne bo, saj smo s tema modeloma podatke obravnavali za vsak ciklus posebej. Modeloma z UNM namreč nismo mogli vnesti podatkov iz predhodnih ciklusov zdravljenja. Z analizo rezultatov smo naša pričakovanja potrdili, saj pri teh modelih tudi dejansko takšnega trenda nismo zaznali (napaka je v povprečju naraščala).

4. 2. b) Primerjava testnih napak po ciklikih

Na slikah 13 in 14 je prikazana primerjava indikatorjev absolutne in relativne napake med modeli.



Slika 13: Primerjava indikatorjev povprečne testne absolutne napake med modeli



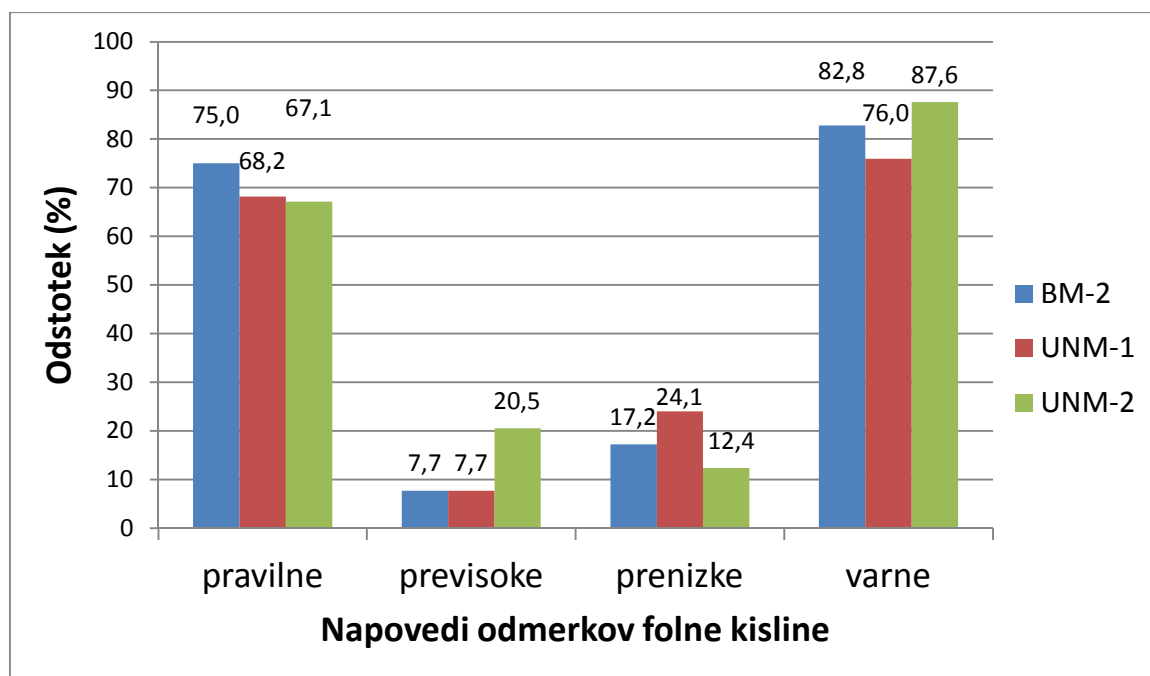
Slika 14: Primerjava indikatorjev povprečne testne relativne napake med modeli

Če povzamemo rezultate vseh štirih ciklusov lahko ugotovimo, da so:

- Absolutne napake modelov BM-2 in UNM-2 bile precej podobne, v povprečju nekoliko nižje pri modelu BM-2. UNM-1 je bil z vidika absolutne napake najslabši.
- Natančnost z vidika absolutne napake (obratno sorazmerna z RMSE) je bila največja pri modelu z BM, sledil je UNM-2. Najmanj natančen je bil UNM-1.
- Relativne napake so bile najmanjše pri modelu BM-2. Nato mu je sledil UNM-2.

4. 2. c) Primerjava klasifikacije odmerkov folinske kisline

Na sliki 15 je prikazana primerjava klasifikacije odmerkov folinske kisline med modeli.



Slika 15: Primerjava klasifikacije odmerkov folinske kisline med modeli po ciklikih

Povzetek analize napovedi odmerkov folinske kisline (slika 15):

- Model BM-2 je v povprečju napovedal največ pravih odmerkov folinske kisline. UNM-1 in 2 sta bila blizu skupaj glede pravih napovedi.
- Standardna deviacija je bila pri modelih BM-2 in UNM-2 podobna, nekoliko nižja pri UNM-2.
- Varne napovedi, ki jih sestavljajo pravilne in previsoke napovedi so bile v povprečju najvišje pri modelu UNM-2.

- Obratno sorazmernega odnosa med napako in številom pravilnih napovedi, ki bi ga lahko pričakovali, ni bilo zaznati, saj je UNM-1 kljub večjim napovednim napakam (MAE in MAPE) klasificiral podobno dobro kot UNM-2.

4. 3. PRIMERJAVA OSNOVNIH MODELOV NA »TESTNI – INTER«

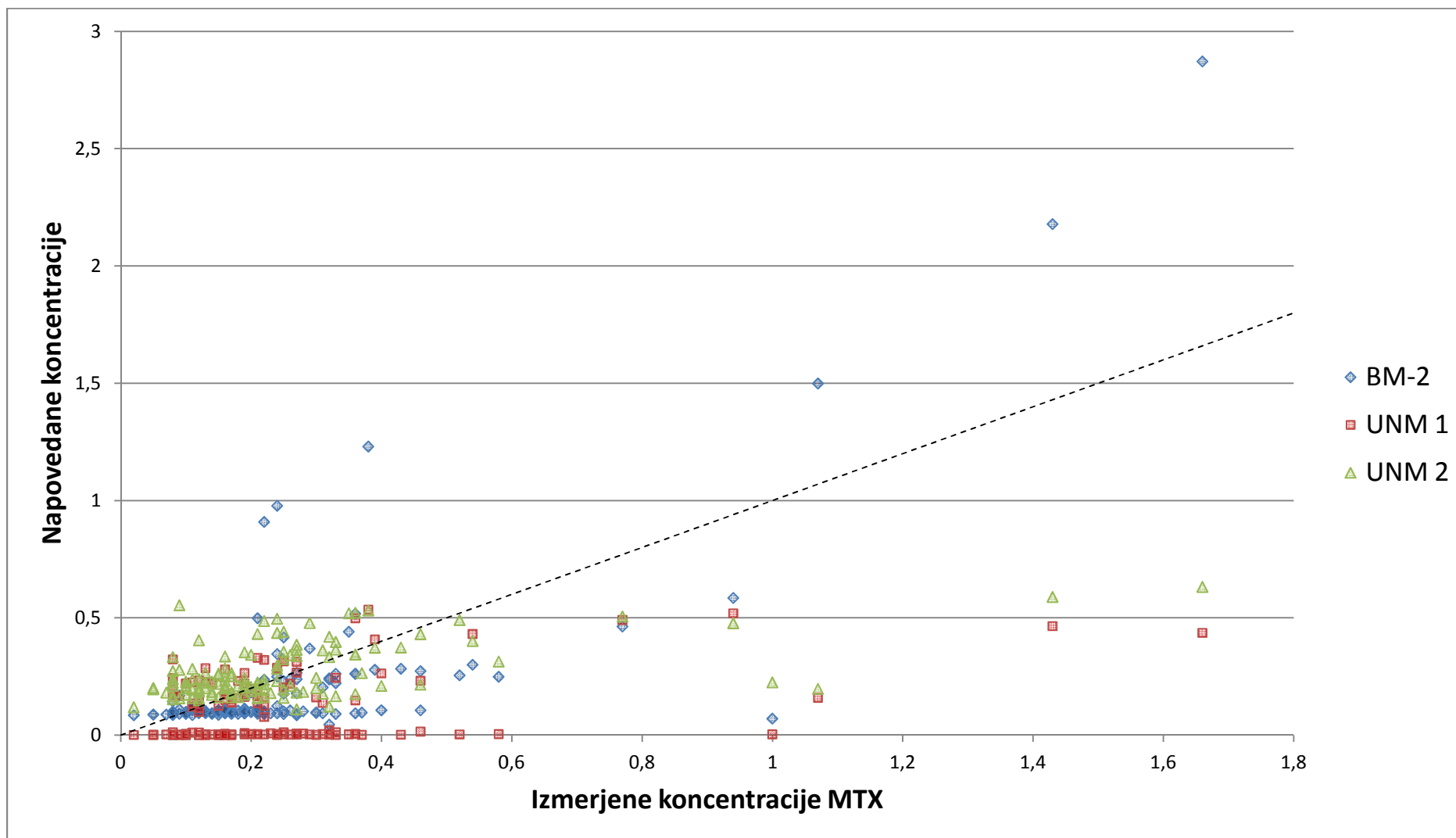
4. 3. a) Primerjava napovedne napake

Primerjali smo osnovne modele BM-2, UNM-1 in UNM-2. V preglednici XVII je predstavljena primerjava primarnih in sekundarnih kriterijev med modeli. Model z UNM-1 je model s polnim naborom atributov. V primerjavi z modelom BM-2 se je odrezal slabše glede na vse indikatorje napovedne napake.

Preglednica XVII: Primerjava modelov z vidika primarnih in sekundarnih kriterijev.

		BM-2	UNM-1	UNM-2
Absolutna napaka ($\mu\text{mol/L}$)	MAE	0,133	0,176	0,125
	RMSE	0,231	0,261	0,203
Relativna napaka (%)	MAPE	47,4	71,8	66,3
	RMSPE	69,5	84,1	106,6
pravilne napovedi (%)	/	75,4	67,5	67,5
previsoke napovedi (%)	/	7,1	7,9	19,8
prenizke napovedi (%)	/	17,5	24,6	12,7
varne napovedi (%)	/	82,5	75,4	87,3

Model UNM-2 pa je z vidika MAE in RMSE napovedoval boljše od modela BM-2, z vidika relativne napake pa slabše. Na sliki 16 so predstavljene napovedi koncentracij MTX glede na model.



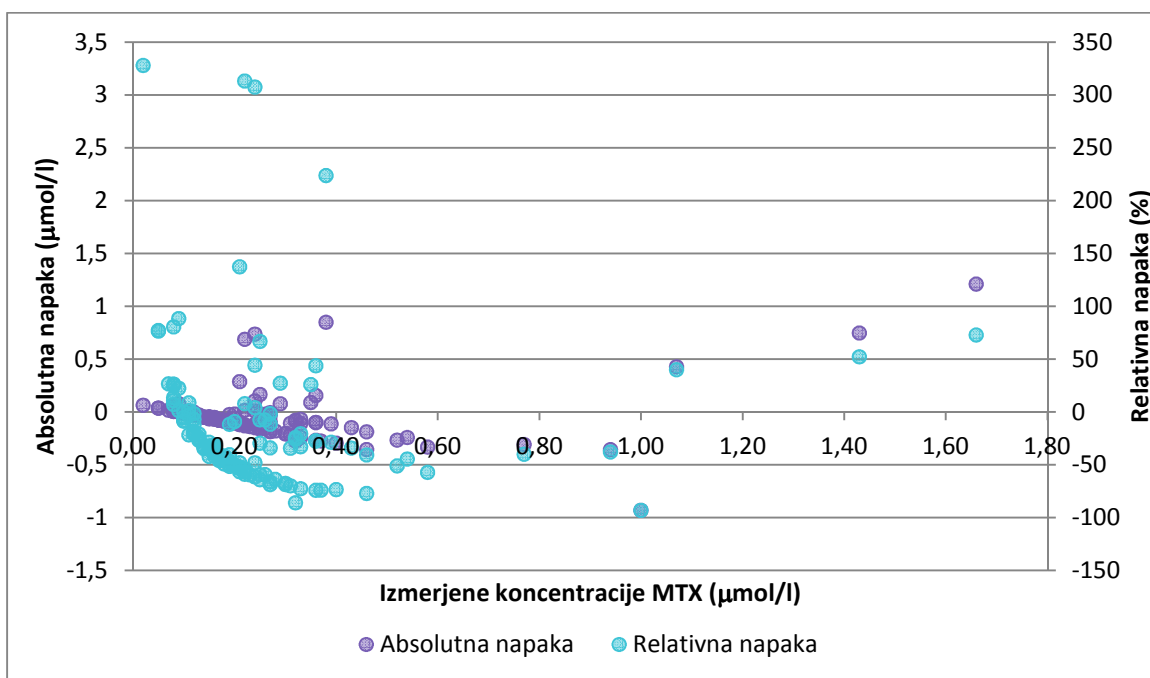
Slika 16: Napovedi koncentracije MTX glede na model v odvisnosti od izmerjenih koncentracij

Če pogledamo razporeditev napovedi na sliki 16 najprej opazimo veliko nizkih in neobičajno porazdeljenih napovedi modela UNM-1. Takšne napovedi so problematične, saj kljub višanju dejanskih koncentracij MTX, napovedi temu ne sledijo. Po drugi strani imata modela BM-2 in UNM-2 veliko bolj enakomerno razporeditev okrog idealne napovedne linije. Pri BM opazimo nekoliko nižje vrednosti pri UNM-2 pa višje. To je razvidno tudi iz povprečne napake napovedi v preglednici XVIII.

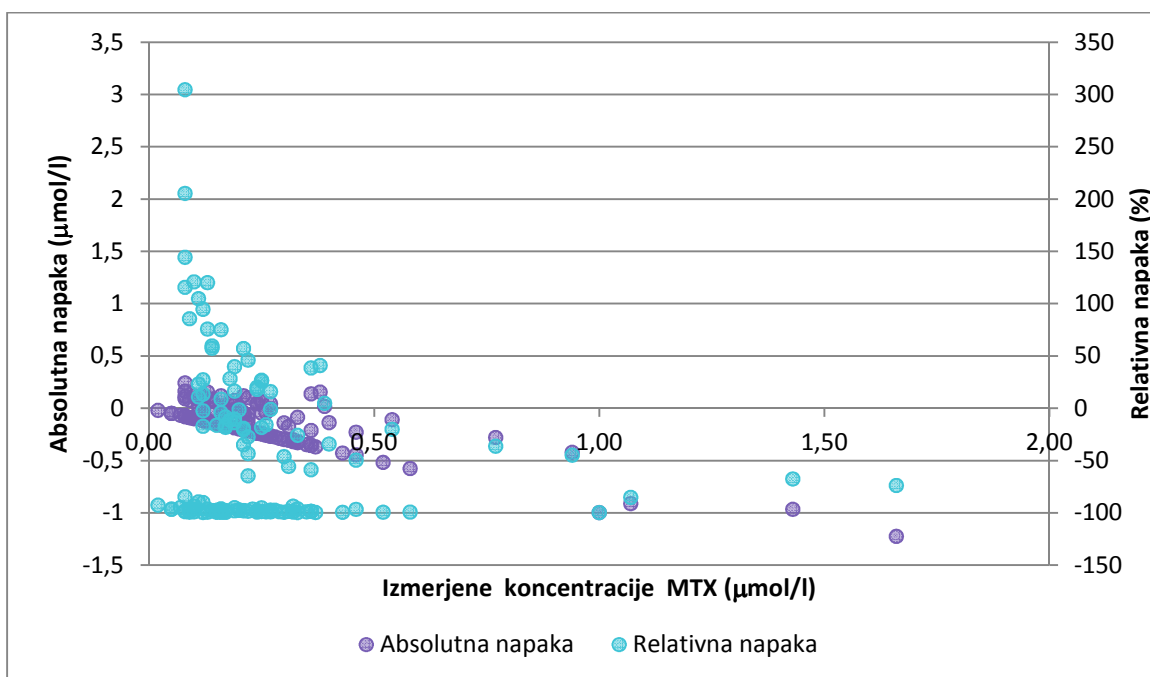
Preglednica XVIII: Primerjava povprečne napake napovedi in povprečne relativne napake med modeli.

	BM-2	UNM-1	UNM-2
Povprečna napaka napovedi ($\mu\text{mol/L}$)	-0,04	-0,14	0,01
Povprečna relativna napaka (%)	-12,6	-40,1	47,3

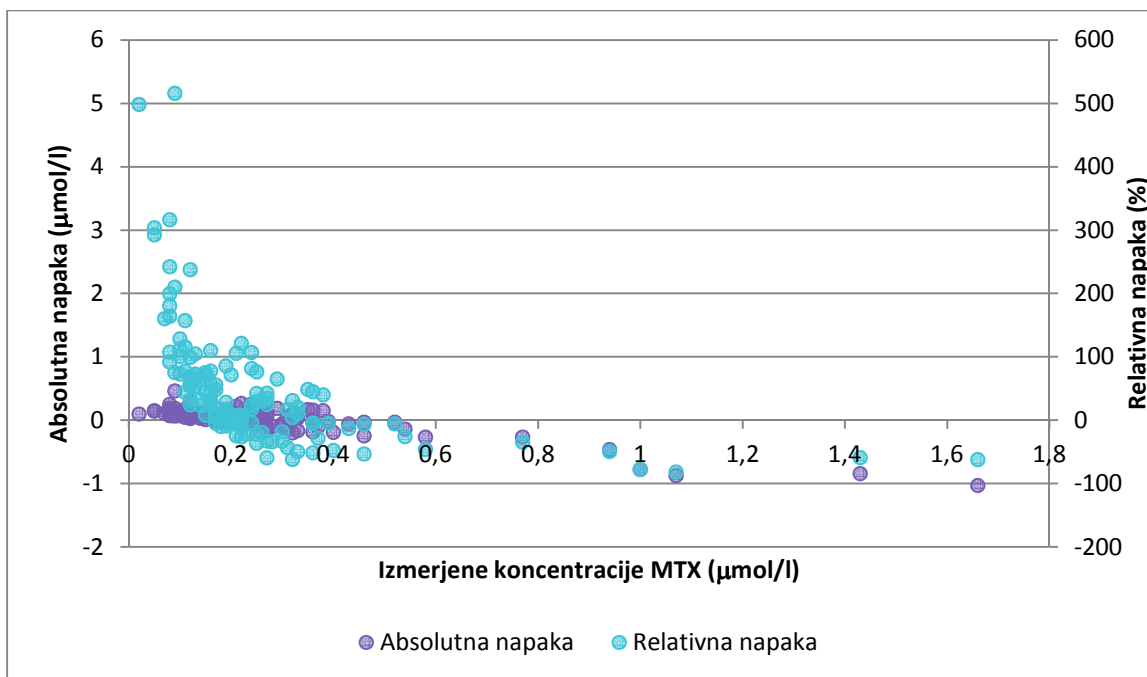
Tudi tukaj najbolj odstopa model UNM-1. Povprečna napaka napovedi odstopa v negativno smer kar potrjuje ugotovitve iz slike 16 o večinsko prenizkih napovedih. Tudi pri višjih vrednostih je model napovedoval precej nižje vrednosti od dejanskih. Hkrati smo primerjali izmerjene in z UNM-1 napovedane koncentracije s parnim t-testom in ugotovili, da se te značilno razlikujejo ($p < 0,001$), kar kaže na sistematično napako napovedi modela. Pri modelu UNM-2 zaznavamo zelo rahlo odstopanje v pozitivno smer, kar je posebej opazno pri nižjih vrednostih MTX. Povprečna napaka napovedi modela UNM-2 se ne razlikuje značilno od nič ($p = 0,435$). To kaže da pri tem modelu sistematična napaka napovedi ni prisotna. Podobno kot pri UNM-1 smo opazili veliko odstopanje pri višjih izmerjenih koncentracijah MTX. Parni t-test med napovedanimi in izmerjenimi koncentracijami je pokazal, da parametra pri tem modelu nista značilno različna ($p = 0,435$). Pri modelu BM opazimo precej boljše porazdelitev napovedi v primerjavi z UNM-1, vrednosti povprečne napake pa nakazujejo, da model napoveduje v povprečju prenizko. Za razliko od modelov z UNM opazimo pri višjih vrednostih manjša odstopanja od idealne napovedne linije, hkrati pa so ta odstopanja pozitivna, kar je z ozirom na neželene učinke MTX, bolj ugodno. Tudi pri tem modelu napovedane in izmerjene koncentracije niso bile značilno različne ($p = 0,071$). Porazdelitve absolutne in relativne napake napovedi smo preverili z razsevnim diagramom in ga uporabili za analizo absolutnih in relativnih napak glede na izmerjene vrednosti MTX v plazmi. Na slikah 17-19 so predstavljene absolutne in relativne napovedne napake v odvisnosti od izmerjenih koncentracij MTX.



Slika 17: Prikaz napovedne napake modela BM-2 v odvisnosti od izmerjenih koncentracij MTX



Slika 18: Prikaz napovedne napake modela UNM-1 v odvisnosti od izmerjenih koncentracij MTX



Slika 19: Prikaz napovedne napake modela UNM-2 v odvisnosti od izmerjenih koncentracij MTX

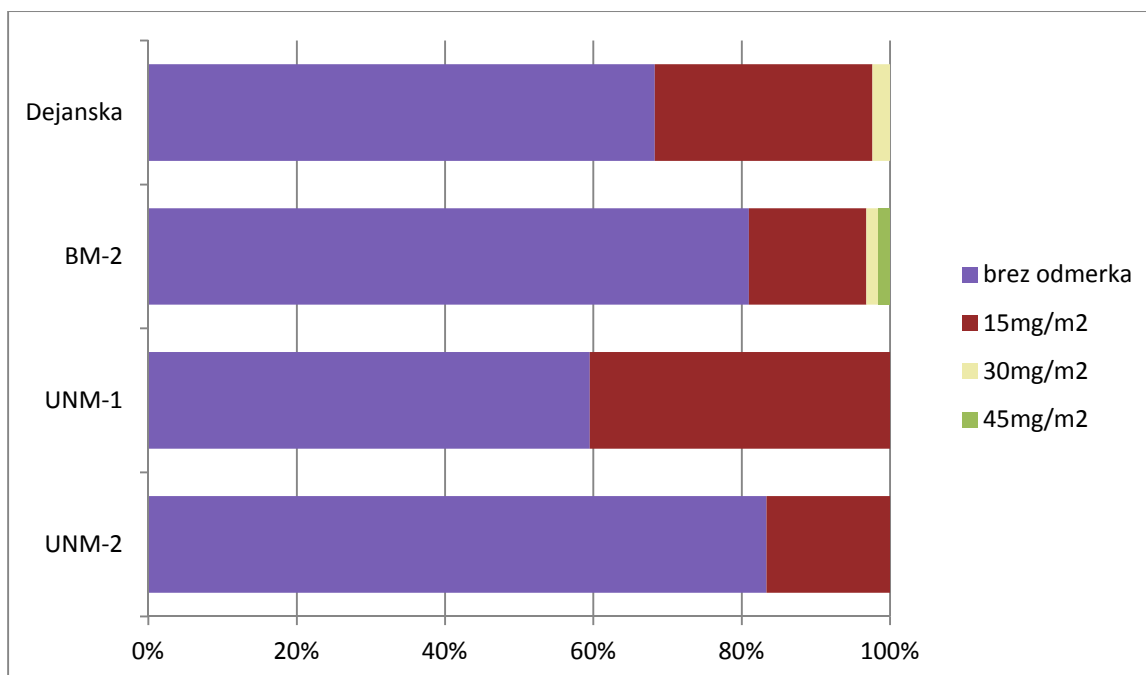
Na sliki 18 izstopa množica prenizkih napovedi zbranih okrog -100% relativne napake. Več kot 100% negativne napake ni bilo možno doseči, saj smo model z logaritmiranjem koncentracij omejili na vrednosti nad nič. Iz slik 16 in 18 opazimo, da pri višjih koncentracijah MTX magnituda negativne napake narašča, kar je problematično, ker ne moremo identificirati pacientov z večjo potencialno izpostavljenostjo neželenim učinkom. Na sliki 19 opazimo, da je model UNM-2 pri nižji vrednostih MTX ($< 0,25$) napovedoval previsoko, medtem ko je pri višjih koncentracijah ($> 0,6$) podobno kot UNM-1 napovedoval nižje od izmerjenih vrednosti. Iz zgornjih grafov lahko identificiramo vzrok za to, da model UNM-2 napoveduje boljše z vidika absolutne napake (boljši MAE in RMSE), medtem ko model BM-2 napoveduje boljše z vidika relativne napake (MAPE in RMSPE). Primerjava napak pri visokih koncentracijah MTX pokaže, da gre za približno enako magnitudo tako absolutne kot relativne napake. Pri zelo nizkih in nizkih koncentracijah je model UNM-2 napovedoval z nekoliko višjo absolutno napako, pri čemer je prispevek k MAE in RMSE zanemarljiv, ker pa so vrednosti blizu nič, je vpliv na MAPE in RMSPE ogromen, kar je jasno razvidno iz primerjave relativne napake na slikah 17 in 19 (zelo izstopajoče točke pri koncentracijah $< 0,1$ na sliki 19). Ta pojav je opazen tudi v preglednici XVIII, kjer je pri modelu UNM-2 pri zelo nizki povprečni napaki napovedi

prisotna visoka povprečna relativna napaka. Le-ta je celo večje magnitude kot napaka pri UNM-1, vendar pa je pri tem potrebno poudariti, da je negativna napaka omejena na 100%, medtem ko navzgor omejitve ni.

4. 3. b) Primerjava klasifikacije

Primerjavo klasifikacije pravičnih napovedi smo uporabili kot sekundarni pokazatelj kvalitete napovedi modela. Pri vrednostih MTX, ki so blizu mejam odmernih intervalov folinske kisline, lahko namreč že zelo majhna odstopanja povzročijo napačno klasifikacijo.

Iz preglednice XVII je razvidno, da je imel največ pravilno klasificiranih odmerkov folinske kisline model BM-2. UNM-1 in UNM-2 sta imela, kljub precejšnji razliki v absolutni napaki, enako število pravilno napovedanih odmerkov. Razlika je opazna pri varnih napovedih. Kot že omenjeno varne napovedi sestavljajo pravilne in previsoke napovedi, saj je namen reševanja s folinsko kislino zmanjševanje neželenih učinkov MTX, medtem ko so neželeni učinki sicer teoretično možnega prevelikega odmerka folinske kisline zanemarljivi. Če je torej napoved modela previsoka (vendar ne več kot za en razred) lahko govorimo o varni napovedi. S tega vidika je bil najuspešnejši model UNM-2 pred BM, UNM-1 je bil najslabši.



Slika 20: Prikaz dejanske stratifikacije vzorca ter primerjave s klasifikacijo modelov

Iz slike 20 je razvidno, da je model BM-2 edini pravilno zaznal paciente, ki so potrebovali 30 mg/m² folinske kisline, ter jih pravilno ali pa previsoko ocenil. To je z vidika uporabnosti modela zelo pomembno, saj je cilj nadzora nad terapijo z MTX ravno zaznavanje pacientov s počasno eliminacijo, ki imajo visoke plazemske koncentracije MTX in posledično večjo verjetnost za nastop resnih neželenih učinkov. Model BM-2 je le-tem pripisal varne odmerke folinske kisline. Modela z UNM pa po drugi strani, zaradi nižjih napovedi pri višjih izmerjenih koncentracijah MTX pacientov, ki so najbolj izpostavljeni neželenim učinkom nista zaznala in sta jih klasificirala prenizko.

4. 3. c) Direktna klasifikacija

Pri variaciji z direktno klasifikacijo smo kot kriterij uporabili pravilnost klasifikacije. Ker model direktno klasificira in ne napoveduje koncentracij MTX, tudi napake pri napovedi le-teh nismo mogli izračunati. V preglednici XIX smo primerjali klasifikacijo Bayesove metode, ki ni zmožen direktne klasifikacije in predstavlja referenco, ter obema modeloma z UNM.

Preglednica XIX: Primerjava modela BM-2 z modeloma z direktno klasifikacijo.

	BM-2	UNM-1_{DK}	UNM-2_{DK}
pravilne napovedi (%)	75,4	28,6	69,8
previsoke napovedi (%)	7,1	69,0	17,5
prenizke napovedi (%)	17,5	2,4	12,7
varne napovedi (%)	82,5	97,6	87,3

Model UNM-1_{DK} je napovedoval zelo slabo, saj je pravilno napovedal manj kot tretjino pravih napovedi. To nakazuje, da model najverjetneje ni dobro prepoznal povezav med atributi, zaradi česar je tudi izjemno visok odstotek varnih napovedi nezanesljiv. Pri modelih z UNM je pomembno razmerje med številom povezav med nevroni, katerih število je odvisno od števila atributov in števila izhodnih razredov, ter številom podatkovnih nizov. V premajhnem razmerju gre najverjetneje tudi iskati vzrok za izjemno slabe napovedi modela UNM-1_{DK}. UNM-2_{DK} je napovedoval veliko bolje, vendar še vedno nekoliko slabše v primerjavi z modelom BM-2. V primerjavi z UNM-2 vidnega izboljšanja

ni bilo zaznati. UNM-2_{DK} je napovedal za odtenek več pravih napovedi, odstotek varnih pa je ostal enak.

4. 3. d) Direktna klasifikacija z navzkrižno validacijo

Pri tej modifikaciji smo vzorca »učni – inter« in »testni – inter« združili v »skupni – inter«. S tem smo povečali število pacientov (podatkovnih nizov). Vendar pa nam je to služilo le kot primerjava med variacijami modelov z UNM. Ker smo uporabili vzorec »skupni – inter«, namreč neposredna primerjava BM-2 ni mogoča. V preglednici XX so predstavljene karakteristike vzorca »skupni – inter«. Prevladujoči razred odmerkov folinske kisline je »15 mg/m²«, ki predstavlja 60,87% vseh pacientov v vzorcu.

Preglednica XX: Karakteristike vzorca »skupni - inter«.

	Aritmetična sredina	Mediana	Variacijski razpon
Starost (leta)	6,7	4,8	(0,3; 17,9)
Teža (kg)	26,2	18,4	(7,4; 81)
Telesna površina (m ²)	0,91	0,75	(0,36; 2,00)
Odmerek MTX (g)	3,80	3,24	(0,54; 9,25)
Odmerek MTX (g/m ²)	4,19	5,00	(1,03; 5,71)
Konc. pri 24h (μmol/L)	35,45	23,5	(0,14; 216,8)
Konc. pri 42h (μmol/L)	0,43	0,33	(0,02; 8,3)

Uporabili smo proces navzkrižne validacije. Pri izbiri variante tega procesa ni univerzalno sprejetih pravil, zato smo se odločili in izbrali eno najpogostejše uporabljanih in sicer 10 kratno navzkrižno validacijo. To pomeni, da smo 9/10 naključno izbranih podatkovnih nizov uporabili za učenje in 1/10 za testiranje. To je doprineslo k povečanju učnega vzorca, kar se je pokazalo tudi pri rezultatih modela UNM-1_{DK,NV}, razvidnih v preglednici XXI. Le-ta je namreč napovedal občutno več pravih napovedi kot UNM-1_{DK}. Sklepali smo, da so napovedi v primerjavi z UNM-1_{DK} veliko bolj zanesljive, vzrok pa gre verjetno iskati v povečanju učnega vzorca. UNM-2_{DK,NV}, je odstotek pravih napovedi povečal v primerjavi z UNM-2_{DK}, vendar pa je tudi ta primerjava zaradi različnih testnih vzorcev zgolj orientacijska.

Preglednica XXI: Primerjava klasifikacije modelov z direktno klasifikacijo in 10-kratno navzkrižno validacijo.

	UNM-1 _{DK,NV}	UNM-1 _{DK}	UNM-2 _{DK,NV}	UNM-2 _{DK}
pravilne napovedi (%)	80,4	28,6	76,1	69,8
previsoke napovedi (%)	7,9	69,0	9,8	17,5
prenizke napovedi (%)	11,7	2,4	14,1	12,7
varne napovedi (%)	88,3	97,6	85,9	87,3

4. 4. MODELI S 36. URO

V preglednici XXII so predstavljene karakteristike vzorca »skupni – 36h«. Prevladujoči razred odmerkov folinske kisline je »15 mg/m²«, ki predstavlja 68,18% vseh pacientov v vzorcu.

Preglednica XXII: Karakteristike vzorca »skupni – 36h«.

	Aritmetična sredina	Mediana	Variacijski razpon
Starost (leta)	6,1	3,6	(0,5; 15,7)
Teža (kg)	22,1	15,8	(7,8; 54,4)
Telesna površina (m²)	0,82	0,65	(0,39; 1,64)
Odmerek MTX (g)	4,11	3,25	(1,6; 8)
Odmerek MTX (g/m²)	5,00	5,00	(4,10; 5,53)
Konc. pri 24h (μmol/L)	57,47	32,22	(0,27; 216,8)
Konc. pri 42h (μmol/L)	0,60	0,47	(0,03; 1,66)

4. 4. a) Primerjava napovednih napak

Pri tej variaciji smo iz vzorca »skupni – inter« pripravili vzorec »skupni – 36h« v katerega smo izbrali le primere, ki so imeli pridobljene koncentracije tudi pri 36. uri. V to smo bili prisiljeni, saj nam vzorec »testni – inter« ni omogočal takšne analize. To je povzročilo velik upad števila podatkovnih nizov, zato smo se odločili, da smo pri vseh modelih s 36. uro uporabili navzkrižno validacijo. Hkrati nam je to onemogočilo direktno primerjavo z modelom BM-2. Vzoredno smo ta nabor pacientov uporabili za učenje modela s 36. uro in hkrati istega modela, kjer smo koncentracije pri 36. uri podali kot manjkajoče vrednosti.

S tem smo želeli zaznati vpliv prisotnosti koncentracije pri 36. uri na napovedi modelov z UNM. V preglednicah XXIII in XXIV je predstavljena primerjava primarnih in sekundarnih kriterijev med modeli z in brez koncentracije pri 36. uri.

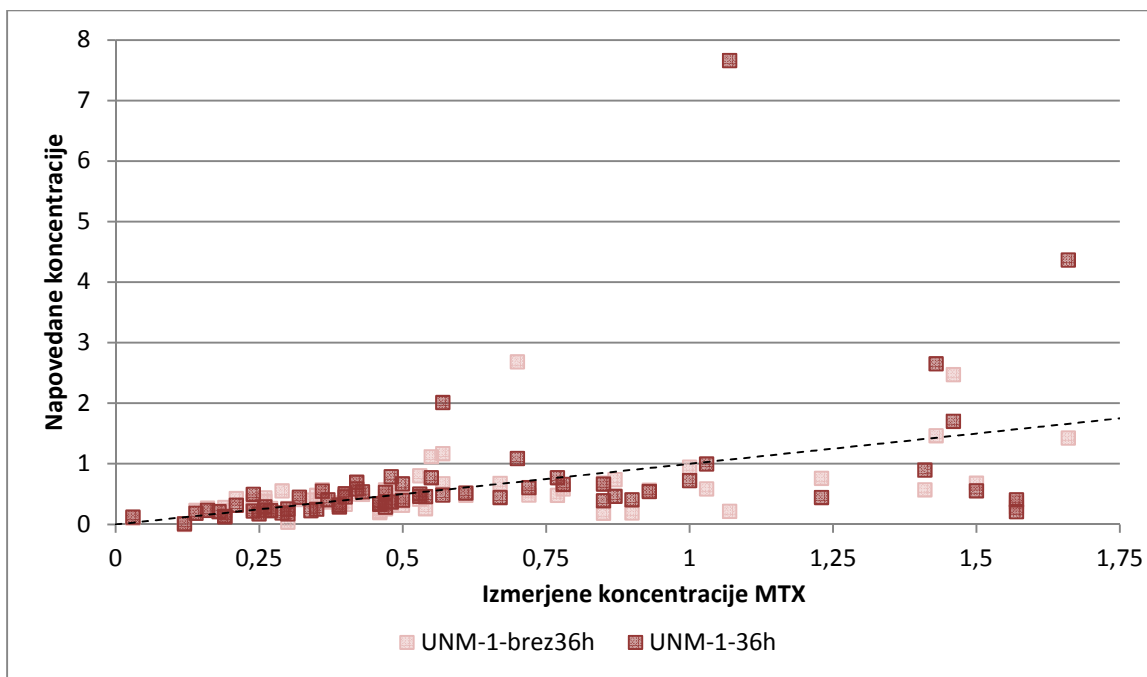
Preglednica XXIII: Primerjava primarnih in sekundarnih kriterijev med variacijama UNM-1.

		UNM 1 _{36h}	UNM 1 _{brez 36h}
Absolutna napaka ($\mu\text{mol/L}$)	MAE	0,374	0,279
	RMSE	0,963	0,453
Relativna napaka (%)	MAPE	52,4	47,9
	RMSPE	100,6	67,9
pravilne napovedi (%)	/	72,7	68,2
previsoke napovedi (%)	/	10,6	13,6
prenizke napovedi (%)	/	16,7	18,2
varne napovedi (%)	/	83,3	81,8

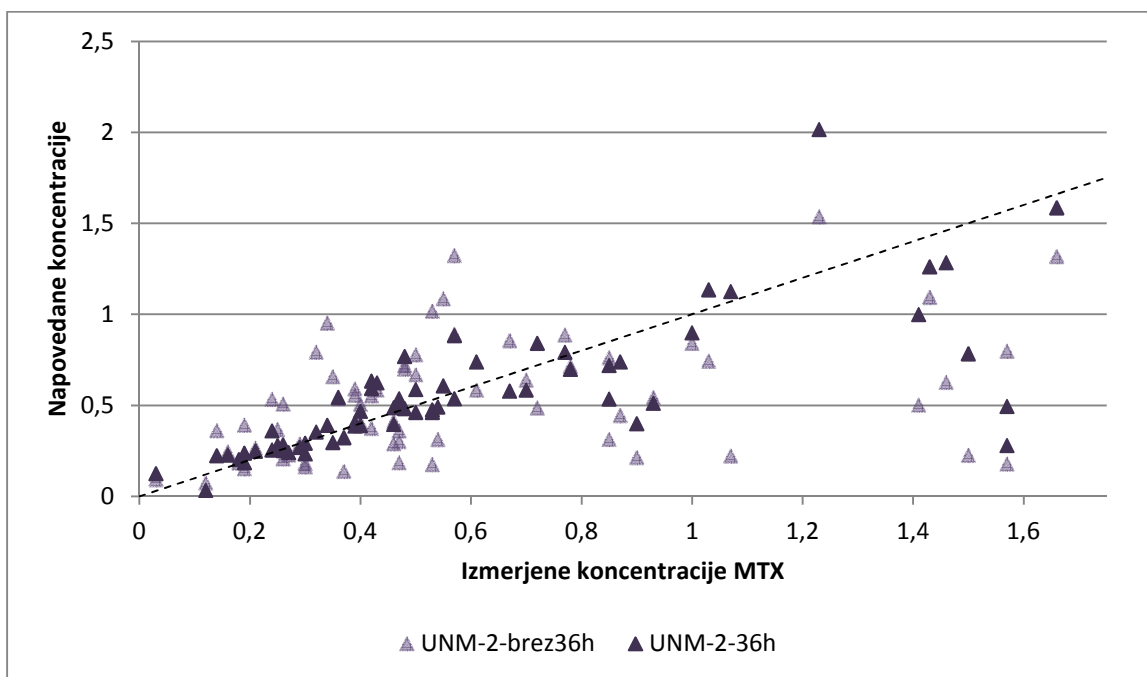
Preglednica XXIV: Primerjava primarnih in sekundarnih kriterijev med variacijama UNM-2.

		UNM 2 _{36h}	UNM 2 _{brez 36h}
Absolutna napaka ($\mu\text{mol/L}$)	MAE	0,153	0,288
	RMSE	0,283	0,408
Relativna napaka (%)	MAPE	26,9	52,2
	RMSPE	49,3	67,6
pravilne napovedi (%)	/	84,8	63,6
previsoke napovedi (%)	/	6,1	13,6
prenizke napovedi (%)	/	9,1	22,7
varne napovedi (%)	/	90,9	77,3

UNM-1_{36h} je v primerjavi z UNM-2_{36h} napovedoval precej slabše tako z vidika indikatorjev absolutne kot relativne napake. Tudi grafična analiza slik 21 in 22 pokaže, da je UNM-2_{36h} napovedoval bolj strnjeno okrog idealne napovedne linije.



Slika 21: Prikaz napovedi modelov UNM-1_{36h} in UNM-1_{brez36h} v odvisnosti od koncentracij MTX

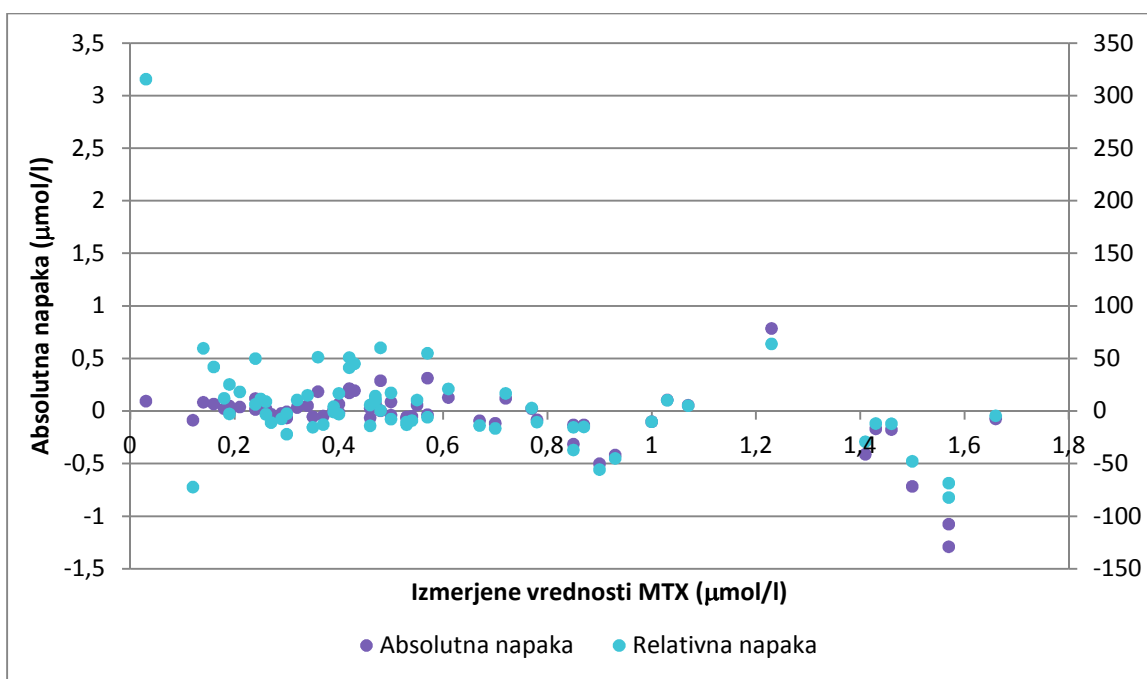


Slika 22: Prikaz napovedi modelov UNM-2_{36h} in UNM-2_{brez36h} v odvisnosti od koncentracij MTX

Pri modelu UNM-1_{36h} je bil vpliv prisotnosti koncentracije pri 36. uri na napovedne napake slab in je povečal indikatorje absolutne napake in relativne napake. Iz analize slike 21 je

opaziti posamične primere (opazili smo 2 zelo očitna) z zelo velikim odstopanjem t.i. outlierje. To se je močno odražalo v indikatorjih napake, še posebej RMSE in RMSPE, kar kaže na manjšo natančnost modela.

UNM-2_{36h} pa je na drugi strani povzročil precejšnje izboljšanje napovednih napak in je napovedoval boljše z vidika vseh indikatorjev. Pri grafični analizi slike 22 lahko ugotovimo, da so bile napovedi bolj strnjene okrog idealne napovedne linije, hkrati pa iz slike 23 ne zasledimo, da bi magnituda napovedne napake naraščala z večanjem koncentracij MTX, kot smo to opazili pri modelu UNM-2. Nekaj izstopajočih vrednosti je sicer še vedno prisotnih, kljub temu pa gre za občutno izboljšanje vseh napovednih kriterijev.



Slika 23: Prikaz napovedne napake modela UNM-2_{36h} v odvisnosti od izmerjenih koncentracij MTX

4. 4. b) Primerjava klasifikacije

Pri modelu UNM-1_{36h} (preglednica XXIII) smo z vidika klasifikacije, kljub večji napovedni napaki, opazili povečanje pravilno napovedanih odmerkov, zmanjšanje prenizkih in posledično povečanje varnih napovedi. Pri tem je potrebno poudariti, da je v treh primerih UNM-1_{36h} napovedal odmerek folinske kisline previsoko za več kot en razred, v enem primeru pa je bila napoved za več kot en razred prenizka. Pri modelu

UNM-2_{36h} (preglednica XXIV) je bilo izboljšanje zaradi prisotnosti koncentracije pri 36. uri še izrazitejše. Odstotek pravilnih napovedi se je povečal na zavidljivo raven, prav tako pa tudi odstotek varnih napovedi. Hkrati model UNM-2_{36h} nikoli ni zgrešil napovedi za več kot en razred.

4. 4. c) Direktna klasifikacija

Pri variaciji z direktno klasifikacijo (preglednici XXV in XXVI) je model UNM-1_{36h,DK} napovedal večji odstotek pravilnih napovedi v primerjavi z modelom UNM-1_{brez36h,DK}, prav tako pa tudi manjši odstotek prenizkih in posledično več varnih napovedi. Tudi model UNM-2_{36h,DK} je napovedoval bolje od svojega vzporednega modela. Večji odstotek je napovedal tako pri pravilnih, kot tudi varnih napovedih.

Preglednica XXV: Primerjava klasifikacije modelov serije UNM-1.

	UNM-1 _{36h,DK}	UNM-1 _{brez 36,DK}	UNM-1 _{36h}
pravilne napovedi (%)	81,8	71,2	72,7
previsoke napovedi (%)	4,5	9,1	10,6
prenizke napovedi (%)	15,2	19,7	16,7
varne napovedi (%)	86,3	80,3	83,3

Preglednica XXVI: Primerjava klasifikacije modelov serije UNM-2.

	UNM-2 _{36h,DK}	UNM-2 _{brez 36,DK}	UNM-2 _{36h}
pravilne napovedi (%)	81,4	74,2	84,8
previsoke napovedi (%)	7,6	10,6	6,1
prenizke napovedi (%)	10,6	15,2	9,1
varne napovedi (%)	89,4	84,8	90,9

4. 5. VPLIV VARIACIJ PRI MODELIH Z UNM

Cilj našega dela je bil preveriti kako so različne variacije modelov z UNM vplivale na napovedi le-teh. Direktna klasifikacija ni kazala jasnega vpliva na uspešnost klasifikacije. Če izvezemo UNM-1_{DK}, ki ni prepoznal povezav med atributi in se torej na njegove rezultate ne moremo zanesti, lahko ponekod zaznamo pozitiven vpliv na klasifikacijo. Opazen je bil porast pri direktni klasifikaciji vzporednih modelov (UNM-1_{brez36h,DK} in

UNM-2_{brez36h,DK}), vendar pa to niso bili naši primarni modeli, ampak so služili le kot kontrolna skupina. Pri modelih s 36. uro smo pri UNM-1_{36h,DK} opazili izboljšanje klasifikacije in v splošnem precej dobre odstotke pravilne klasifikacije. Pri modelu UNM-2_{36h,DK} se klasifikacija v primerjavi z UNM-2_{36h} ni bistveno spremenila, nekoliko je celo upadel odstotek pravilnih napovedi. Kljub temu direktna klasifikacija v splošnem nakazuje na izboljšanje klasifikacije naših modelov. Ima pa nekaj pomembnih omejitev. Prva omejitev je, da nima jasno zastavljenih kriterijev za razrede odmerkov folinske kisline in torej ne vemo, po kakšnih kriterijih (glede na koncentracije MTX) je pacient uvrščen v določen razred. Druga omejitev pa je nezmožnost ekstrapolacije na primerke izven učne množice. To pomeni, da bo model z UNM koncentracije v testni množici, ki so izven razpona učne množice in bi jih morali uvrstiti v višji razred, kot je najvišji razred v učni množici, uvrstil v enega izmed razredov učne množice.

Vpliv uporabe atributa koncentracije pri 36. uri smo jasno zaznali pri modelu UNM-2_{36h}. V primerjavi z vzporednim modelom UNM-2_{brez36h} je pokazal jasno izboljšanje vseh, tako primarnih kot sekundarnih kriterijev. Pri UNM-1_{36h} je z vidika napovedne napake prišlo do poslabšanja. Z vidika klasifikacije odmerka je prisotnost koncentracije pri 36. uri pozitivno vplivala na rezultate. Prav tako je prisotnost koncentracije pri 36. uri vplivala na izboljšanje napovedi obeh modelov z direktno klasifikacijo. Tudi grafična analiza je bila ugodnejša pri modelih s 36. uro. V splošnem ocenjujemo, da je prisotnost atributa koncentracije pri 36. uri izboljšala napovedno zmogljivost naših modelov.

Vpliv navzkrižne validacije je bilo zelo težko oceniti, saj se je uporaba navzkrižne validacije prekrivala z ostalimi variacijami. Če primerjamo modela UNM-2 in UNM-2_{brez36h} (pri slednjem smo uporabili navzkrižno validacijo, vendar brez vpliva koncentracije pri 36. uri) ugotovimo, da je relativna napaka upadla. Do istega pojava je prišlo tudi med UNM-1 in UNM-1_{brez36h}. Pri primerjavi modelov UNM-2_{DK,NV} in UNM-2_{DK} smo zaznali izboljšanje pravilno klasificiranih odmerkov folinske kisline. Ocenjujemo, da v naših poskusih navzkrižna validacija ugodno vplivala na rezultate, predvsem zaradi povečanja učnega vzorca v primerjavi z eksterno validacijo.

4. 6. OCENA UPORABNOSTI MODELOV

Cilj naše naloge je bil tudi skozi prizmo naših rezultatov primerjati razvite modele in oceniti njihovo uporabnost ter pomanjkljivosti. Model BM-2, ki predstavlja varianto mehanističnega modela, temelji na teoretičnem modelu, ki ga razvijemo glede na poznavanje procesov, ki urejajo določene pojave v telesu [26]. V našem primeru je šlo za modeliranje farmakokinetike metotreksata v telesu. Modeli z UNM so po drugi strani empirični modeli, ki se poskušajo po matematični poti, s prilagajanjem uteži atributom, čim bolje prilagajati odnosom med vhodnimi in izhodnimi podatki. Govorimo tudi o t.i. black-box modelih, saj takšni modeli ne znajo pojasniti svojih napovedi. Poznavanje teoretičnega ozadja zato predstavlja veliko prednost, obenem pa nam omogoča analizo variabilnosti v populaciji. Pri tem je treba dodati, da moramo pri izdelavi mehanističnih modelov procese, ki jih opisujemo idealizirati in poenostaviti. S tem vnašamo v model variabilnost, ki je v samih podatkih ni, kar predstavlja slabost teh modelov [26].

Velika prednost v korist modela BM-2 je obravnavanje časa kot zvezne spremenljivke. Ker poznamo teoretično ozadje, bi lahko pri modelu BM-2 napovedovali koncentracijo MTX v katerikoli časovni točki. To je pomembno, saj ima MTX relativno kratek biološki razpolovni čas in bi lahko, kadar vzorci niso odvzeti ob točno določeni uri, to kompenzirali z dokumentiranjem natančnega časa odvzema vzorca, kar bi po naših ocenah doprineslo k zmanjšanju rezidualne variabilnosti v vzorcu. Pri modelih z UNM smo morali čas diskretizirati, kar vnaša v sistem omejitve, saj smo lahko uporabljali le v naprej določene časovne točke in zato odstopanja od točnih časov odvzema krvi v podatke vnašajo večjo variabilnost. *Odoul in sodelavci* so na mehanističnem modelu kot kriterij napovedne zmogljivosti uporabili čas pri katerem je koncentracija MTX padla pod kritično mejo (v njihovi raziskavi $0,2 \mu\text{mol/L}$) [38]. Tak način testiranja napovedne zmogljivosti pri naših modelih z UNM, zaradi diskretizacije časa, ni možen. Mi smo se zato odločili za napovedovanje v eni časovni točki. Pri našem delu se je 48. ura izkazala za najprimernejšo, saj lahko na tej točki ocenimo ali je potrebno podaljšanje zdravljenja ali pa lahko pacienta odpustimo iz bolnišnice. Vendar pa testiranje pri 48. uri ni bilo izvedljivo, saj smo ob analizi testnega vzorca ugotovili, da so podatki pri 48. uri premalo razpršeni (preglednica XXVII), zato smo se odločili, da bomo napovedovanje premaknili na 42. uro, z enakimi

odmernimi razredi folinske kisline, kot pri 48. uri. Pri 42. uri so imeli podatki večji razpon, kar je bilo za naše cilje ugodneje.

Preglednica XXVII:

	Razpon od	do	Št. konc. >0,5 $\mu\text{mol/L}$	Št. konc. >1 $\mu\text{mol/L}$
»učni«	0,05	2,2	38	9
»testni«	0,02	0,95	4	0
»testni« pri 42h	0,02	1,66	7	3
Literatura [37]	0,01	1,64	/	/

Odoul in sodelavci so ugotovili, da je bilo napovedovanje njihovega mehanističnega modela boljše, če so za ocenjevanje uporabili 2 predhodni koncentraciji [38]. Mi tega za model BM-2 nismo mogli potrditi, zaradi pomanjkljivosti vzorcev »testni« in »testni – inter«. Pri modelu serije UNM-2 smo to potrdili, saj so modeli, ki so za napovedovanje uporabljali 24. in 36. uro napovedovali bolje od modelov, ki so uporabljali le napovedi pri 24. uri. Predpostavljamo tudi, da bi ob pridobitvi primernejšega testnega vzorca, lahko napovedovali koncentracije pri 48. uri na podlagi koncentracij pri 24. in 42. uri (ki sta bili zbrani praktično pri vseh pacientih), s podobno dobrimi rezultati kot pri modelih s 36. uro.

Opozoriti je potrebno na pomanjkanje podatka o serumskem kreatininu. Tako v učni kot testni populaciji namreč nismo imeli dovolj meritev serumskega kreatinina, da bi te podatke lahko uporabili pri razvoju modela. To je pri MTX, ki se v 90% izloča skozi ledvice zelo problematično, saj glomerulna filtracija v veliki meri (poleg aktivne tubulne sekrecije) vpliva na eliminacijo. Podatek o serumskem kreatininu bi lahko pomembno vplival na napovedno uspešnost tako modela BM-2, kot tudi modelov z UNM. Pri pregledu literature so le *Faltaos in sodelavci* izmed petih podobnih študij, ki so s pomočjo PFK raziskovale farmakokinetiko MTX, opazili in kvantificirali vpliv serumskega kreatinina na očistek MTX [4]. Kljub temu menimo, da bi veljalo v prihodnje proučiti vpliv serumskega kreatinina na napovedi naših modelov.

Modeli iz serije UNM-1 so se v naših poskusih izkazali za precej nezanesljive. Precejšnja nihanja napovedne napake ter neobičajne napovedi blizu nič kažejo na slabo napovedno zmogljivost. Tako model BM-2 kot UNM-2 sta napovedovala značilno bolje od modela UNM-1 ($p < 0,001$). Napovedna napaka je bila značilno različna od 0, model pa je dajal v povprečju prenizke napovedi. Tudi klasifikacija odmerkov folinske kisline je bila slabša

kot pri modelu BM-2. Zato smo ocenili, da modeli serije UNM-1 niso primerni za napovedovanje koncentracij MTX.

Pri modelih serije UNM-2 smo ugotovili, da je z vidika napovedne napake primerljiv z modelom BM-2 in se v tem oziru nista značilno razlikovala. Napovedna napaka ni bila značilno različna od 0. Čeprav se napovedi modela niso značilno razlikovale od izmerjenih koncentracij, pa smo zaznali precej slabo korelacijo, ter odstopanje trenda napovedi od idealne napovedne linije (naklon premice $k = 0,243$; $r = 0,507$). Posledica tega je trend večanja negativne napake s povečevanjem izmerjenih koncentracij MTX. To je še posebej problematično, ker so napovedi prenizke pri najbolj ogroženih pacientih, zato smo ocenili, da model UNM-2 ni primeren za napovedi koncentracij MTX. Variacije z direktno klasifikacijo so sicer prinesle povečanje odstotka pravilno klasificiranih odmerkov, vendar ocenjujemo, da je naš učni vzorec preozek in premalo reprezentativen, da bi lahko te variacije modelov uporabili za napovedovanje reševalnih odmerkov folinske kisline v klinični praksi.

Pri modelu BM-2 se napovedna napaka ni statistično značilno razlikovala od 0. Napovedi se niso značilno razlikovale od izmerjenih koncentracij, trend napovedi pa je bil veliko bližje idealni napovedni liniji ($k = 1,213$; $r = 0,788$), ter izkazoval boljšo korelacijo, kot pri modelih z UNM. Razsevni diagram je nakazoval boljšo razporeditev napovedne napake okrog 0. Pri pacientih z višjimi koncentracijami so bile napovedi v povprečju nekoliko previsoke, kar je z vidika neželenih učinkov ugodno, saj gre za paciente z največjo verjetnostjo za pojav neželenih učinkov. Tudi klasifikacija odmerkov folinske kisline je bila pri modelu BM-2 najboljša v primerjavi z modeloma z UNM. Na podlagi teh ugotovitev ter primerjave s podobnimi modeli iz literature [38, 2, 31, 4] smo zaključili, da je model BM-2 primeren pripomoček za nadzor plazemskih koncentracij MTX in prilagoditve reševalnih odmerkov folinske kisline. Pri tem dodajmo, da smo morali že v začetku model z BM prilagoditi (razvili smo BM-2), da smo lahko model testirali na vzorcu »testni« ter da smo lahko modele primerjali med seboj.

Pri modelih s 36. uro smo zaznali precejšnje izboljšanje v primerjavi z vzporednimi modeli. Ker je model UNM-1_{36h} napovedoval slabše glede na vse kriterije od modela UNM-2_{36h}, se osredotočimo le na slednjega. Napovedi modela UNM-2_{36h} se niso značilno

razlikovale od izmerjenih koncentracij. Trend napovedi je bil nekoliko slabši v primerjavi z modelom BM-2, vendar še vedno primerljiv ($k = 0,632$; $r = 0,733$) napovedne napake pa niso bile značilno različne od 0. Model je ustrezno zaznal tudi paciente z višjimi koncentracijami MTX. Z vidika MAPE in RMSPE, ki sta zaradi različnosti vzorcev edina primerna kriterija, je model UNM-2_{36h} napovedoval bolje od modela BM-2. Prav tako smo zaznali največji odstotek pravilno klasificiranih odmerkov folinske kisline, vendar pa ta kriterij ni primerljiv med različnimi vzorci, zato ju z modelom BM-2 ne moremo direktno primerjati. Na podlagi primerjave z modelom BM-2 smo ocenili, da model UNM-2_{36h} zaradi svojih napovednih zmogljivosti nakazuje potencial za uporabo kot pripomoček nadzora koncentracij MTX ter klasifikacije odmerkov folinske kisline, vendar pa bi ga bilo potrebno preizkusiti na dodatnih naborih testnih vzorcev. Ker diskretizacija časa prinaša rigidnejše zastavljene raziskave, ter zaradi večje možnosti diverzifikacije modela in raziskave pri modelu BM-2, ocenjujemo, da je primarni izbor model BM-2. To utemeljujemo tudi s podobnimi uporabljenimi modeli v literaturi [4, 38, 31, 2, 3].

4. 7. NASVETI IN IDEJE ZA PRIHODNJE RAZISKAVE

Pri našem delu smo naleteli na nekatere ovire ali pomanjkljivosti, ki jih v okviru našega dela nismo mogli odpraviti, lahko pa bi jih s primerno zasnovo v prihodnjih raziskavah. V sklopu našega dela so se porodile tudi nekatere ideje, s katerimi bi se lahko ukvarjala katera izmed prihodnjih raziskav. Najpomembnejša ovira pri našem delu je bil slab testni vzorec. Priporočamo pridobitev primernejšega testnega vzorca, ki bo omogočal validacijo napovedne zmogljivosti vsaj pri 48. uri. Pri pridobivanju vzorcev krvi priporočamo dokumentacijo natančnega časa odvzema vzorca, saj menimo, da bi to lahko pripomoglo k zmanjšanju variabilnosti farmakokinetičnih parametrov pri modelih z BM. Obenem bi lahko pridobili tudi koncentracije serumskega kreatinina in preizkusili vpliv le-tega na farmakokinetiko MTX. Menimo, da bi veljalo raziskati ali imajo odmerki folinske kisline vpliv poleg farmakodinamike tudi na farmakokinetiko MTX. Menimo tudi, da možnosti uporabe UNM, v sklopu PFK raziskav, niso dovolj raziskane ter da bi veljalo to področje bolje raziskati.

5. SKLEPI

- Model BM-1 v bolj oddaljenih časovnih točkah v ciklusu ni napovedoval bolje kot v manj oddaljenih, kar je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji.
- Trend napovedne napake modela BM-2 je s številom ciklusa upadal, vendar pa ni bilo jasnega padca iz ciklusa v cikel.
- Izmed osnovnih modelov je najbolje napovedoval model BM-2 in sicer tako z vidika indikatorjev napak, grafične analize, kot tudi z vidika pravilne klasifikacije.
- Prisotnost meritev pri 36. uri najugodnejše vplivala na napovedno zmogljivost modelov z UNM. Na napovedi naših modelov je pozitivno vplivala tudi direktna klasifikacija, ki pa ima pomembne omejitve. Tudi navzkrižna validacija, je doprinesla k boljšim rezultatom, najverjetneje na osnovi povečanja učnega vzorca.
- Ocenili smo, da model UNM-2_{36h} nakazuje potencial za uporabo kot pripomoček pri nadzoru farmakokinetike MTX in odmerjanju folinske kisline in bi lahko predstavljal možno alternativo modelu BM-2. Kljub obetajočim indikatorjem napovedne napake, pa bi bilo potrebno ta model še natančneje raziskati.
- Ocenili smo, da je model BM-2 primeren za uporabo ter smo ga izbrali za primarni model pri nadzoru farmakokinetike MTX in odmerjanju folinske kisline.

6. LITERATURA

- [1] Dennis L. Kasper et al.: Harrison's principles of internal medicine. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, 2005: poglavje 97.
- [2] Aumente D., Buelga D.S., Lukas J.C., Gomez P., Torres A., Garcia M.J.: Population Pharmacokinetics of High-Dose Methotrexate in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. Clin Pharmacokinet. 2006; 45(12): 1227-38.
- [3] Piard C., Bressolle F., Fakhoury M., Zhang D., Yacouben K., Rieutord A., Jacqz-Aigrain E.: A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukaemia. Cancer Chemoter Pharmacol. 2007 Sep; 60(4):609-20.
- [4] Faltaos D.W., Hulot J.S., Urien S., Morel V., Kaloshi G., Fernandez C., Xuan H., Leblond V., Lechat P.: Population pharmacokinetic study of methotrexate in patients with lymphoid malignancy. Cancer Chemother Pharmacol. 2006 Nov; 58(5): 626-33.
- [5] ICH Harmonised tripartite guideline: Clinical investigation of medicinal products in the pediatric population, E11, Step 4, July 2000.
- [6] <http://www.conet-gmbh.de/pediatric-clinical-trials.html> Datum: 20.1.2012
- [7] Novaković S., Hočevár M., Jezeršek Novaković B., Strojan P., Žgajnar J.: Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. 1. izdaja, Ljubljana: Mladinska knjiga, 2009: 382-89.
- [8] Porter R., Kaplan J.: The Merck manual of diagnosis and therapy. 19th edition, Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, 2011: 1004-1010.
- [9] Rubin P.: Clinical oncology: a multidisciplinary approach for physicians and students. 8th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001: 586-96.
- [10] Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., Flandrin G. Muller-Hermelink H.K., Vardiman J., Lister T.A., Bloomfield C.D.: The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997, Mod Pathol. 2000 Feb; 13(2): 193-207.
- [11] <http://pathologyoutlines.com/leukemia.html> Datum: 25.1.2012
- [12] Hardman J.G., Limbird L.E., Goodman Gilman A.: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, 2001: 1399-1404, 1503-13.

- [13] Hilton J.G., Cooper B.A., Rosenblatt D.S.: Folate Polyglutamate Synthesis and Turnover in Cultured Human Fibroblasts. *J Biol Chem.* 1979 Sep 10; 254(17): 8398-403.
- [14] Tavčar P.: Problematika visokih odmerkov metotreksata pri onkoloških bolnikih. Specialistično delo, Ljubljana, 2008.
- [15] Westerhof G. R., Rijnboutt S., Schornagel J.H., Pinedo H.M., Peters G.J., Jansen G.: Functional Activity of the Reduced Folate Carrier in KB, MA104, and IGROV-I Cells Expressing Folate-binding Protein. *Cancer Res.* 1995 Sep 1; 55(17):3795-802.
- [16] Zhao R., Goldman I.D.: Resistance to antifolates. *Oncogene.* 2003 Oct 20; 22(47):7431-57.
- [17] Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E.: *Holland-Frei Cancer Medicine.* 6th edition, Hamilton (ON): BC Decker; 2003: poglavje 49.
- [18] <http://www.drugs.com/pro/methotrexate.html> Datum: 30.1.2012
- [19] Fotoohi A.K., Assaraf Y.G., Moshfegh A., Hashemi J., Jansen G., Peters G.J., Larsson C., Albertioni F.: Gene expression profiling of leukemia T-cells resistant to methotrexate and 7-hydroxymethotrexate reveals alterations that preserve intracellular levels of folate and nucleotide biosynthesis. *Biochem Pharmacol.* 2009 Apr 15; 77(8):1410-17.
- [20] Cooper G.M., Hausman R.E.: *The Cell: a molecular approach.* 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000: poglavje 14.
- [21] Minev B.R.: *Cancer management in man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures.* 1st edition, Springer; 2011: 125-43.
- [22] <http://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-new-application-levoleucovorin-spectrum-s-first-proprietary-oncology-888.html> Datum: 14.2.2012
- [23] Borsi J.D., Sagen E., Romslo I., Moe P.J.: Rescue after intermediate and high-dose methotrexate: background, rationale, and current practice. *Pediatr Hematol Oncol.* 1990; 7(4):347-63.
- [24] Matherly L.H., Anderson L.A., Goldman I.D.: Role of the Cellular Oxidation-Reduction State in Methotrexate Binding to Dihydrofolate Reductase and Dissociation Induced by Reduced Folates. *Cancer Res.* 1984 Jun; 44(6):2325-30.
- [25] Ette E.I., Williams P.J.: Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother.* 2004 Oct; 38(10):1702-6.
- [26] Bonate P.L.: *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation,* Springer Science+Buisness Media, New York, 2006: 1-56, 205-307.

- [27] Ette E.I., Williams P.J.: Population pharmacokinetics III: design, analysis, and application of population pharmacokinetic Studies. *Ann Pharmacother.* 2004 Dec; 38(12):2136-44.
- [28] Rousseau A., Marquet P.: Application of pharmacokinetic modelling to the routine therapeutic drug monitoring of anticancer drugs. *Fundam Clin Pharmacol.* 2002 Aug; 16(4):253-62.
- [29] Ette E.I., Williams P.J.: Population pharmacokinetics II: estimation methods. *Ann Pharmacother.* 2004 Nov; 38(11):1907-15.
- [30] Beal S.L., Sheiner L.B.: NONMEM Users Guide - Part VII Conditional Estimation Methods; University of California at San Francisco, San Francisco 1998 (<ftp://nonmem.iconplc.com/Public/nonmem720/guides/vii.pdf>)
- [31] Monjanel-Mouterde S., Lejeune C., Ciccolini J., Merite N., Hadjaj D., Bonnier P., Piana P., Durand A.: Bayesian population model of methotrexate to guide dosage adjustments for folate rescue in patients with breast cancer. *J Clin Pharm Ther.* 2002 Jun; 27(3):189-95.
- [32] Guid N., Strnad D.: Umetna inteligenca, Maribor, Fakulteta za elektrotehniko, računalništvo in informatiko, 2009: 211-70.
- [33] Kononenko I.: Strojno učenje, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Ljubljana, 1997: 183-207, 224-34.
- [34] Hyndman R.J., Koehler A.B.: Another look at measures of forecast accuracy. *Int J Forecast*, 2006: 22(4):679-88.
- [35] Faganel Kotnik B., Grabnar I., Bohanec Grabar P., Dolžan V., Jazbec J.: Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011 Oct; 67(10):993-1006.
- [36] Kartam N., Flood I., Garrett J.H.: Artificial Neural Networks for Civil Engineers: Fundamentals and Applications, New York, American Society of Civil Engineers, 1997: poglavje 4.
- [37] Lin X.B., Zhou N.N., Li S., Cai Q.Q., Xia Z.J., Liao H., Gao Y., Huang H.Q.: Effects of infusion duration of high-dose methotrexate on cerebrospinal fluid drug levels in lymphoma patients (English version). *Ai Zheng.* 2008 Oct; 27(10):1100-5.
- [38] Odoul F., Le Guellec C., Lamagnère J.P., Breilh D., Saux M.C., Paintaud G., Autret-Leca E.: Prediction of methotrexate elimination after high dose infusion in children with

acute lymphoblastic leukaemia using a population pharmacokinetic approach. *Fundam Clin Pharmacol.* 1999; 13(5):595-604.