

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА**

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ - ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације Биљане Шкорић

На основу Одлуке број 871/2 од 11.04.2024. године Наставно-научно веће Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета, именована је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидаткиње маг. фарм. Биљане Шкорић под називом:

„Извори фармакокинетичке варијабилности и развој популационог модела након примене великих доза метотрексата код педијатријских пацијената са акутном лимфобластном леукемијом и нехочкинским лимфомом”

Ментори:

1. Др сц. Катарина Вучићевић, редовни професор
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет,
Катедра за фармакокинетику и клиничку фармацију

2. Др сц. мед. Милош Кузмановић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Медицински факултет,
Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“

Комисија у саставу:

1. Др сц. Бранислава Миљковић - председник Комисије, редовни професор,
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

2. Др сц. Марија Јовановић, ванредни професор, Универзитет у Београду -
Фармацеутски факултет

3. Др сц. Адријан Сарајлија, доцент, Универзитет у Београду - Медицински
факултет, Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан
Чупић”

Након прегледа приложене докторске дисертације, чланови Комисије подносе Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета следећи извештај.

ИЗВЕШТАЈ

1. Приказ садржаја докторске дисертације

Кандидаткиња маг. фарм. Биљана Шкорић је написала докторску дисертацију под насловом „**Извори фармакокинетичке варијабилности и развој популационог модела након примене великих доза метотрексата код педијатријских пацијената са акутном лимфобластном леукемијом и нехочкинским лимфомом**” на 121 страни, писаних латиничним писмом, фонтом *Times New Roman*, величине 12 и са једноструким проредом. Ова теза је подељена у 8 поглавља: *Уводна разматрања* (17 страна), *Циљеви истраживања* (1 страна), *Материјали и методе* (18 страна), *Резултати* (41 страна), *Дискусија* (15 страна), *Закључак* (2 страна), *Литература* (11 страна) и *Прилози* (16 страна). Садржи укупно 51 слику (3 у *Уводном разматрању*, 2 у поглављу *Материјали и методе* и 46 у поглављу *Резултати*), 21 табелу (2 у *Уводном разматрању*, 2 у поглављу *Материјали и методе* и 17 у поглављу *Резултати*), 160 литературних навода и 4 прилога. У складу са захтевима на почетку се налази Сажетак/*Abstract*, а на крају биографија кандидаткиње и потписане изјаве о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације.

На почетку поглавља *Уводна разматрања* налази се кратки осврт на карактеристике акутне лимфобластне леукемије и нехочкинског лимфома са основама патологије болести, прогностичким факторима и тренутним протоколима за лечење. Затим су описане особине лека метотрексат, кратак историјат, физичко-хемијске карактеристике, механизам деловања као и основни механизми интрацелуларног транспорта. Након тога следи опис фармакокинетичких карактеристика лека, принципа терапијског праћења лека (енг. *therapeutic drug monitoring, TDM*) који су део савремених протокола лечења акутне лимфобластне леукемије и нехочкинског лимфома, осврт на токсичност лека услед примене великих доза и варијабилности у фармакокинезици метотрексата, као и на факторе којима се та варијабилност описује. У оквиру посебног потпоглавља издвојени су најчешће идентификовани фактори којима се објашњава варијабилност у фармакокинетичком профилу, као и детаљна табела са идентификованим популационим фармакокинетичким моделима метотрексата при примени великих доза. Поред основних карактеристика студија (индикација, карактеристике популације, примењена доза) приказане су и идентификоване коваријате којима се објашњавао део варијабилности у фармакокинетичким параметрима.

У оквиру поглавља *Циљеви истраживања* наведени су циљеви који се односе на анализу концентрација лека у зависности од времена узимања узорка биолошког материјала или примењене дозе, затим идентификација и квантификација фактора који доводе до интериндивидуалне варијабилности у концентрацијама лека. Осим тога циљеви укључују и развој популационог фармакокинетичког модела метотрексата применом методе нелинеарног моделовања комбинованих ефеката, идентификација свих типова варијабилности као и идентификација фактора који доприносе варијабилности. Такође, наведени циљеви обухватају и валидацију развијеног популационог фармакокинетичког модела метотрексата, као и разматрање примене модела у циљу прилагођавања режима дозирања метотрексата.

У првом потпоглављу дела *Методологија и методе, План испитивања и укључени подаци*, наведени су укључујући и искључујући фактори према одобреном плану

испитивања, као и детаљан преглед укључених података. Додатно, како поједини подаци из клиничке праксе нису били доступни, пре свега вредности неких лабораторијских параметара у одређеним временским тачкама када су мерене концентрације метотрексата, образложен је поступак за превазилажење тог изазова. Присуство лекова у терапији који могу да повећају концентрацију метотрексата је представљено уз помоћ категоријске варијабле *INCMTX*. Ова варијабла је укључила присуство барем једног од следећих лекова: сулфометоксазол/триметоприм, леветирацетам, ибупрофен, ципрофлоксацин, фуросемид, пиперацилин/газобактам, ацетилсалицилна киселина, клоксацилин. Такође је објашњен поступак за мерење концентрације лека у локалној лабораторији Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“, као и примењена метода за процесуирање концентрација које су биле испод доњег лимита квантификације методе. У наставку истог дела, у потпоглављу *Статистичка анализа података*, описани су поступци за описивање података и поређење између група, али такође и основни принципи мултипле регресионе анализе и процес тумачења резултата исте методе. У последњем подпоглављу, *Популациона фармакокинетичка анализа* су описане основне карактеристике овог приступа применом методе нелинеарног моделовања комбинованих ефеката, поступак развоја и процене адекватности модела, као и методе за валидацију модела. Методе популационе фармакокинетике су описане према захтевима програма *NONMEM*[®].

Резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације су наведени у истоименом поглављу. У овом поглављу део резултата је представљен графичким путем на укупно 46 слика, а део резултата је приказан кроз 17 табела. Поголавље *Резултати* је подељено у 3 дела, *Основне карактеристике пацијената и терапије великим дозама метотрексата*, *Анализа извора варијабилности концентрација метотрексата* и *Развој популационог фармакокинетичког модела метотрексата*. У првом делу поглавља *Резултати* су детаљно описани подаци о пацијентима уз помоћ дескриптивне статистичке анализе. Такође су описани подаци о примени метотрексата, укључујући број циклуса, вредности концентрација и тумачење вредности концентрација у односу на референтне вредности, као и поређење концентрација и нормализованих концентрација у зависности од примењене дозе од 3 или 5 g/m^2 . У следећем делу поглавља су описани извори варијабилности у концентрацијама метотрексата применом мултипле регресионе анализе. У последњем делу поглавља *Резултати* је описан процес развоја популационих модела укључујући развој 4 основна модела, њихово поређење преко објективне вредности функције и Акаикевог информационог критеријума и даље тестирање потенцијалних коваријата за два двопросторна модела скалирана према телесној маси односно према телесној површини. После идентификације коваријата од значаја та два модела су валидирана применом технике умножавања података и техником визуалне предиктивне процене кориговане за предвиђање и варијабилност.

У оквиру поглавља *Дискусија* детаљно су коментарисани и образложени резултати истраживања уз поређење са подацима доступним у литератури. У овом делу је такође размотрена потенцијална примена ових резултата у клиничкој пракси.

У поглављу *Закључци* су таксативно наведени основни закључци у вези са добијеним резултатима у склопу овог испитивања, а који су у сагласности са постављеним циљевима.

Литература обухвата списак референци (160) које су кориштене у оквиру ове докторске дисертације.

Поглавље *Прилози* обухвата 4 дела, *Прилог 1* - Листа скраћеница, *Прилог 2* - Листа и објашњење варијабли које су биле укључене у базу података за популациону анализу, *Прилог 3* - Списак слика и *Прилог 4* - Списак табела.

2. Опис постигнутих резултата

У оквиру ове докторске дисертације је извршена анализа концентрација метотрексата након примене великих доза лека које су добијене током рутинског праћења. Највећи број концентрација изнад референтног опсега идентификован је 48 сати након почетка примене лека, 30,20%. Анализом података о концентрацији лека показано је да статистички значајна разлика у вредности концентрација постоји само 24 часа од почетка примене лека између група пацијената који су примењивали 3 g/m^2 или 5 g/m^2 . Након нормализације концентрације лека примењеном дозом и ова разлика између група се изгубила. Лекови који ступају у интеракције са метотрексатом су идентификовани на основу *LexiComp*[®] базе и креирана је коваријата која је укључивала лекове са потенцијалом да повећавају концентрацију метотрексата. У укупно 8,25% временских тачака у којима је мерена концентрација метотрексата, био је присутан неки од поменутих лекова који ступа у интеракцију са метотрексатом.

У наредном делу су идентификовани фактори који су описивали део варијабилности у концентрацији метотрексата. На природним логаритмом трансформисану концентрацију лека нормализовану примењеном дозом утицали су природним логаритмом трансформисано време од почетка примене лека, природним логаритмом трансформисан клиренс креатинина израчунат преко Шварцове формуле, природним логаритмом трансформисана концентрација хемоглобина и присуство било ког од лекова који могу да повећају концентрацију метотрексата. Овако развијена регресиона једначина је описивала 73,9% варијабилности у природним логаритмом трансформисаној концентрацији лека нормализованој по примењеној дози ($F(4,472)=332,099$, $p<0,001$, коригован $R^2=0,737$). Промена вредности клиренса креатинина од 60 до 120 mL/min према регресионој једначини доводи до смањења концентрације метотрексата за 44%.

Током развоја популационог модела, у првом кораку су развијена четири основна модела, једнопросторни, једнопросторни са варијабилношћу између циклуса, двопросторни модел скалиран према телесној маси и двопросторни модел скалиран према телесној површини. Уз сваки од развијених модела су приказани и основни дијагностички графици (енгл. *goodness of fit*), као и табеларан приказ основних карактеристика модела. Уз помоћ објективне вредности функције и Акаикевог информационог критеријума извршено је поређење модела. На основу ове анализе потврђене су боље карактеристике двопросторних модела у описивању промене концентрације са временом, те су одабрани за даљу анализу утицаја коваријата којима би се могла објаснити варијабилност у фармакокинетичким параметрима.

У следећој фази истраживања су прво графички упоређени однос индивидуално процењених вредности клиренса метотрексата основним моделима и потенцијалних фактора варијабилности. Континуиране коваријате, концентрација серумског

креатинина, број еритроцита, концентрација хемоглобина, вредност аспартат аминотрансферазе, вредност аланин аминотрансферазе, концентрација укупног билирубина су представљене на тачкастом графику уз *loess* криву, док су категоријске коваријате пол, примарна дијагноза и присуство неког од лекова који могу повећати концентрацију метотрексата приказани на бокс плот графицима. Осим графичке процене, утицај коваријата на варијабилност у клиренсу метотрексата код оба модела је испитиван применом приступа степенованог грађења модел. У оквиру ове анализе тестиране континуиране коваријате су посматране као временски зависне варијабле. У двопросторном моделу скалираном према телесној маси, серумски креатинин је довео до смањења објективне вредности функције од 107,905 ($p < 0,001$), док је концентрација хемоглобина довела до укупног смањења објективне вредности функције од 13,051 ($p < 0,01$). Осим ове две варијабле у првом кораку *forward* укључивања одабрана је и концентрација укупног билирубина као коваријата која је довела до смањења вредности објективне функције за 4,015 ($p < 0,05$). Ипак у кораку *backward* елиминације у финалном моделу су задржани само концентрације серумског креатинина и концентрација хемоглобина. Ове две коваријате су укључене у финални двопросторни модел скалиран према телесној маси преко експоненцијалне функције. Процењене вредности фиксних параметара (релативна стандардна грешка) овим моделом су за клиренс метотрексата, 11,00 L/h/70 kg (5,10%), волумен централног простора, 47,10 L/70 kg (6,80%), волумен периферног простора, 18,00 L/70 kg (13,40%), интеркомпарментални клиренс, 0,02 L/h/70 kg (10,10%), параметар утицаја хемоглобина на клиренс, 0,0017 L/h/70 kg (42,6%) и параметар утицаја серумског креатинина на клиренс, -0,0025 L/h/70 kg (16,60%), док је коефицијент варијације у клиренсу метотрексата износио 26,70%. Код двопросторног модела скалираног према телесној површини, коваријате које су се нашле у финалном моделу су биле такође концентрација серумског креатинина и концентрација хемоглобина које су редом довеле до смањења вредности објективне функције од 102,98 ($p < 0,01$) и 10,22 ($p < 0,01$), а као и у претходном случају у првом кораку је била укључена концентрација укупног билирубина која је довела до смањења вредности објективне функције за 5,70 ($p < 0,05$), али након *backward* елиминације није остала у финалном моделу. Концентрација серумског креатинина је уведена преко пропорционалног модела, док је концентрација хемоглобина као и у претходном моделу уведена преко експоненцијалне функције. Процењене вредности фиксних параметара (релативна стандардна грешка) финалним моделом скалираним према телесној површини су износиле за клиренс метотрексата, 5,75 L/h/m² (5,10%), волумен централног простора, 21,30 L/m² (7,60%), волумен периферног простора, 8,20 L/m² (16,70%), интеркомпарментални клиренс, 0,087 L/h/m² (12,60%), утицај хемоглобина на клиренс, 3,37 L/h/m² (38,6%) и утицај серумског креатинина на клиренс, -1,11 L/h/m² (7,70%), док коефицијент варијације у клиренсу метотрексата износи 23,50%, а коефицијент варијације у волумену централног простора износи 15,30%. Финални модели су валидирани применом технике умножавања података и сви параметри су унутар процењеног опсега за 95% интервал поузданости. Додатно, у оквиру интерне валидације извршена је визуелна предиктивна процена коригована за предвиђање и варијабилност (концентрација у функцији времена) ради процене предиктивних карактеристика модела.

3. Упоредна анализа резултата са подацима из литературе

У оквиру ове докторске дисертације, поред анализа концентрација метотрексата добијених током рутинског праћења, развијена је регресиона једначина којом се

предвиђа вредност концентрације метотрексата у популацији педијатријских пацијената са акутном лимфобластном леукемијом и нехочкинским лимфомом узимајући у обзир време од почетка примене лека, концентрацију хемоглобина, вредност клиренса креатинина рачунатог преко Шварцове формуле и присуства неких од лекова који могу да доведу до повећања концентрације метотрексата. Осим тога развијен је популациони фармакокинетички модел у истој популацији пацијената. Кроз обе методе је описана варијабилност, у случају регресионе анализе у концентрацији метотрексата нормализованој примењеном дозом, док у популационој анализи у фармакокинетичким параметрима.

Иако се кроз литературу може идентификовати већи број популационих студија (1, 2), резултати нису униформни, како због различитог дизајна студија, различитих индикација, различитих протокола и старосне групе пацијената. Из тог разлога су резултати ове докторске дисертације (3, 4) изузетно корисни за разумевање фармакокинетичких карактеристика метотрексата након примене великих доза у педијатријској популацији пацијената са акутном лимфобластом леукемијом и нехочкинским лимфомом.

Резултати анализе концентрација метотрексата се могу упоредити са сличним истраживањима доступним у литератури. Наиме, Ксордас и сарадници су, као и у оквиру ове дисертације, идентификовали статистички значајну разлику између пацијената који су примењивали 5 g/m^2 и 2 g/m^2 у 24. часу од почетка примене, што је објашњено различитом дозом лека. Ипак код Ксордас и сарадника ова разлика је идентификована и у 48. часу што није био случај у истраживању у оквиру ове дисертације (5). Са друге стране, одсуство разлике у концентрацијама између две дозне групе у 48. часу од почетка примене инфузије је такође идентификовано у литератури уз објашњење да вредност концентрације метотрексата није искључиво под утицајем примењене дозе лека (6).

Испитивање извора варијабилности у фармакокинезици и концентрацијама метотрексата је спроведено у бројним студијама, али углавном на основу популационог моделовања, односно приступа нелинеарног моделовања комбинованих ефеката. Тако су кроз популационе фармакокинетичке студије претходно идентификовани како концентрација хемоглобина, тако и клиренс креатинина и примена других лекова као фактори којима се објашњава део варијабилности у фармакокинетичким параметрима (1), што је слично са резултатима регресионе анализе спроведене у оквиру ове докторске дисертације. У студији Дупијус и сарадника концентрација хемоглобина је објашњавала део варијабилности у волумену дистрибуције, при чему вредност концентрације хемоглобина већа од $13,45 \text{ g/dL}$ доводи до повећања волумена дистрибуције од 3% (7). У студији Надера и сарадника промена вредности хематокрита од 23 до 50% је довела до смањења клиренса метотрексата од 50%, што се тумачи као клинички значајна промена (8). У оба случаја, утицај параметара еритроцита на вредности фармакокинетичких параметара се објашњава карактеристиком метотрексата да се расподељује у еритроците где подлеже процесу глутамације и има време полупелиминације до чак 79 дана колико је и животни век еритроцита (9). Повећање концентрације метотрексата при смањењу вредности клиренса креатинина објашњава се доминантним путем елиминације лека, где се чак 90% примењене дозе елиминише непромењено преко бубрега (10). Кроз литературу се наводе бројене, пре свега популационе фармакокинетичке студије, у којима је управо клиренс креатинина био фактор који је описивао део варијабилности у фармакокинетичким параметрима (11-

17). Због карактеристика педијатријске популације, које се разликују у односу на карактеристике одраслих пацијената (18), при поређењу и тумачењу резултата неопходно је обратити пажњу на старосне групе. Кроз доступне популационе студије величина утицаја клиренса креатинина се разликује, али у свим студијама где клиренс креатинина има утицај на клиренс метотрексата, тај утицај је био директно пропорционалан (1). Тако у студији Фукухара и сарадника промена клиренса креатинина од 60 до 120 mL/min доводи до повећања клиренса метотрексата за 9% (19), док у студији Дупиус и сарадника, клиренс метотрексата се мења за 10% уколико је вредност клиренса креатинина мања или већа од 89 mL/min (7). Приликом разматрања утицаја бубрежне функције на фармакокинетичке параметре метотрексата, незаобилазно је поменути да и сам метотрексат токсично делује на бубрежну функцију. Ипак, тај утицај је дозно завистан и у највећем броју случајева реверзибилан (20). Код пацијената укључених у ово испитивање вредност клиренса креатинина није била нижа од 60 $mL/min/1,73 m^2$. Као и у регресионој једначини развијеној у оквиру ове докторске дисертације, тако и кроз неколико популационих студија препознати су неки од лекова који утичу на фармакокинетичке параметре метотрексата, и последично на концентрацију (1). Ипак, кроз доступне студије није описан утицај лекова издвојених у оквиру ове дисертације. У студији Панете и сарадника, дексаметазон и ванкомицин су утицали на клиренс метотрексата и волумен централног простора (13), док је у студији Ши и сарадника само дексаметазон утицао на варијабилност у клиренсу метотрексата (11). Студија са пацијентима са лимфоидним малигнитетима је показала да присуство омепразола, есомепразола, лансопризола, пантопризола, амоксицилина или котримсазола доводи до смањења вредности клиренса метотрексата (17).

Приликом развоја популационог модела, као и у оквиру ове дисертације, и друге групе истраживача су испитивале различите структурне моделе (1). Иако су двопросторни модели највише заступљени, кроз литературу се наилази и на једнопросторне моделе, али и на троппросторне моделе (11). У процесу развоја структурног модела Гао и сарадници су добијали све боље карактеристике како се модел усложњавао од једнопросторног до троппросторног модела (21). Студије које су развиле троппросторне моделе су најчешће обухватале велику популацију пацијената са више од 200 пацијената (21-23) уз изузетак код Симон и сарадника који су развиле троппросторни модел у студији са 50 пацијената са неходжинским лимфомом (16).

Основни једнопросторни модели који су развијени у оквиру ове дисертације нису показивали задовољавајуће карактеристике, што је било видљиво и на дијагностичким графицима, али је такође потврђено и проценом вредности објективне функције и Акаикеовог информационог критеријума. Додатно, вредности волумена дистрибуције од 139 $L/70 kg$ код најједноставнијег једнопросторног модела, односно од 85,50 $L/70 kg$ код једнопросторног модела који је разматрао и варијабилност између циклуса терапије су биле више него што би се очекивало на основу претходних модела са једним простором. Приликом развоја једнопросторног модела, Ши и сарадници су се одлучили да се вредност волумена дистрибуције фиксира на 32 L , како би се елиминисала нестабилност модела која је проистицала из немогућности адекватне процене управо тог параметра (11). Основни једнопросторни модел, развијен у склопу ове докторске дисертације, који је разматрао и варијабилност између циклуса је имао нешто боље карактеристике од једноставног једнопросторног модела. Увођењем варијабилности између циклуса коефицијент варијације у клиренсу метотрексата се смањио за 12,40% док се у волумену дистрибуције смањио за 11,70%. Кроз литературу су идентификоване бројне студије које су разматрале варијабилност између циклуса (15, 24), што је у

складу са начином примене великих доза током неколико циклуса терапије (25, 26). Ипак, једнопросторни модел са варијабилношћу између циклуса је имао високу вредност Акаикевог информационог критеријума (1032,08) те није настављено даље развијање модела. Са друге стране, код сложенијих фармакокинетичких модела утицај варијабилности између циклуса није узет у обзир због оскудних података који ограничавају одређивање већег броја параметара модела.

Основни двопросторни модел скалиран према телесној маси и основни двопросторни модел скалиран према телесној површини су имали сличне карактеристике па су изабрани за даље развијање односно за тестирање фактора варијабилности. Када се процењене вредности параметара упореде према просечном пацијенту из ове студије, вредности параметара између ова два модела су врло сличне. Кроз литературу се могу наћи модели у којима су параметри скалирани према телесној маси (8, 27-30) или телесној површини (13, 23, 31), али су најчешће дескриптори величине тела тестирани као потенцијалне коваријате (1). Резултати ове дисертације потврђују да је тешко изабрати суперирорнији метод за скалирање односно за дозирање лекова у педијатријској популацији, јер основни изазов лежи у брзом и нелинсарном процесу сазревања функције органа код деце (32). У популацији педијатријских пацијената, 0-18 година, могу се направити подгрупе које имају различите карактеристике и кроз различито животно доба унутар ове групе различити методи за дозирање се примењују (33). У оквиру ове дисертације модел који је скалиран према телесној маси је имао у клиренсу и интеркомпарменталном клиренсу широко коришћени алометријски фактор 0,75 (34) за који се сматра да није адекватан код деце млађе од 1 годину, али да је прихватљив код деце старије од те доби, што је такође случај и код скалирања према телесној површини (35). Телесна површина, иако има одређене мањкавости као предвиђање за до 10% ниже вредности клиренса код пацијената који имају мање од 20 kg, је перципирана као тачнија метода за прилагођавање дозе у педијатријској популацији пацијената (35). Коначно, треба имати у виду да се у клиничкој пракси уобичајено врши дозирање метотрексата према телесној површини, што упућује на већу примењивост популационог модела који је скалиран по телесној површини.

Као што је већ наведено коваријате које су се показале као значајне за описивање дела варијабилности у клиренсу метотрексата у овом истраживању за оба модела су биле концентрација серумског креатинина и концентрација хемоглобина, што је у складу и са резултатим регресионе анализе. Серумски креатинин као показатељ бубрежне функције је идентификован као коваријата од значаја и код других група истраживача (22, 23, 36-38). Са друге стране резултати ове докторске дисертације су први који указују на утицај концентрације хемоглобина на клиренс метотрексата, док је претходно само хематокрит довођен у везу са клиренсом метотрексата (8), а хемоглобин са волуменом дистрибуције (7).

Вредности параметара процењених у два финална модела су упоредиве са литературним резултатима. Финални модел скалиран према телесној површини даје упоредиве резултате са студијом Панете и сарадника где је у популацији педијатријских пацијената са малигним туморима мозга, процењена вредност клиренса метотрексата била $5,4 \text{ L/h/m}^2$, с том разликом да је код Панете и сарадника клиренс креатинина уз примену дексаметазона и ванкомицина, био коваријата која описује варијабилност у клиренсу метотрексата (13). Такође приближна вредност клиренса метотрексата је виђена у великој мултицентричној студији Тејлора и сарадника, где се фармакокинетика метотрексата описивала тропросторним моделом, али је процењена

вредност клиренса била $6,35 \text{ L/h/m}^2$, а такође је серумски креатинин био коваријата од значаја за описивање варијабилности у клиренсу метотрексата (23). На овај начин су потврђени резултати добијени у склопу ове докторске дисертације за финални модел скалиран према телесној површини.

Процењене вредности параметара према финалном моделу скалираном по телесној маси се такође могу упоредити са вредностима параметара виђених у литератури. У студији са педијатријским пацијентима са остеосаркомом, процењена вредност клиренса је била $10,9 \text{ L/h/70 kg}$ (29), што је врло блиско клиренсу метотрексата процењеном преко финалног модела скалираног по телесној маси, $11,00 \text{ L/h/70 kg}$, развијеном у оквиру ове дисертације.

Освртом на величину утицаја коваријата, примећује се да је утицај серумског креатинина доминантнији од утицаја хемоглобина у финалном моделу скалираном према телесној површини, што је у складу са карактеристикама лека које подразумевају доминантну елиминацију у непромењеном одлику преко бубрега (10). Како је наведено у дискусији тезе, код финалног модела скалираног по телесној површини повећање вредности серумског креатинина од 20% резултира у смањењу клиренса метотрексата од 11,31%, док иста промена у концентрацији хемоглобина доводи до повећања вредности клиренса метотрексата од 7,79%.

Резултати популационе анализе из овог истраживања уз податке о концентрацији метотрексата као интегралног дела терапијског праћења лека, и уз податке о концентрацијама серумског креатинина и хемоглобина применом Бајесове анализе би могли да се примене за индивидуализацију режима дозирања (39, 40). Пре примене резултата овог истраживања у пракси потребно је превазићи недостатке који се пре свега односе на ограничену величину узорка и могућност даљег испитивања извора варијабилности, као што је генетски полиморфизам (1).

Литература:

1. Yang Y, Wang C, Chen Y, Wang X, Jiao Z, Wang Z. External evaluation and systematic review of population pharmacokinetic models for high-dose methotrexate in cancer patients. *Eur J Pharm Sci.* 2023;186:106416.
2. Zhang Y, Sun L, Chen X, Zhao L, Wang X, Zhao Z, et al. A systematic review of population pharmacokinetic models of methotrexate. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2022;47(2):143-64.
3. Skoric B, Kuzmanovic M, Jovanovic M, Miljkovic B, Micic D, Jovic M, et al. Methotrexate concentrations and associated variability factors in high dose therapy of children with acute lymphoblastic leukemia and non- Hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol.* 2023;40(5):446-457.
4. Skoric B, Jovanovic M, Kuzmanovic M, Miljkovic B, Vucicevic K. Understanding hemoglobin contribution to high-dose methotrexate disposition-population pharmacokinetics in pediatric patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Pharmacol.* 2024; 80(5):697-705.

5. Csordas K, Hegyi M, Eipel OT, Muller J, Erdelyi DJ, Kovacs GT. Comparison of pharmacokinetics and toxicity after high-dose methotrexate treatments in children with acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Drugs*. 2013;24(2):189-97.
6. Joannon P, Oviedo I, Campbell M, Tordecilla J. High-dose methotrexate therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of relation between serum methotrexate concentration and creatinine clearance. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;43(1):17-22.
7. Dupuis C, Mercier C, Yang C, Monjanel-Mouterde S, Ciccolini J, Fanciullino R, et al. High-dose methotrexate in adults with osteosarcoma: a population pharmacokinetics study and validation of a new limited sampling strategy. *Anticancer Drugs*. 2008;19(3):267-73.
8. Nader A, Zahran N, Alshammaa A, Altaweel H, Kassem N, Wilby KJ. Population pharmacokinetics of intravenous methotrexate in patients with hematological malignancies: utilization of routine clinical monitoring parameters. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2017;42(2):221-8.
9. Schroder H, Fogh K, Herlin T. In vivo decline of methotrexate and methotrexate polyglutamates in age-fractionated erythrocytes. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1988;21(2):150-5.
10. Levêque D, Becker G, Toussaint E, Fornecker L, Paillard C. Clinical pharmacokinetics of methotrexate in oncology. *IntJ Pharmacokinet*. 2017;2(2):137-47.
11. Shi ZY, Liu YO, Gu HY, Xu XQ, Yan C, Yang XY, et al. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in Chinese pediatric patients with medulloblastoma. *Biopharm Drug Dispos*. 2020;41(3):101-10.
12. Kawakatsu S, Nikanjam M, Lin M, Le S, Saunders I, Kuo DJ, et al. Population pharmacokinetic analysis of high-dose methotrexate in pediatric and adult oncology patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019;84(6):1339-48.
13. Panetta JC, Roberts JK, Huang J, Lin T, Daryani VM, Harstead KE, et al. Pharmacokinetic basis for dosing high-dose methotrexate in infants and young children with malignant brain tumours. *Br J Clin Pharmacol*. 2020;86(2):362-71.
14. Faltaos DW, Hulot JS, Urien S, Morel V, Kaloshi G, Fernandez C, et al. Population pharmacokinetic study of methotrexate in patients with lymphoid malignancy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;58(5):626-33.
15. Hui KH, Chu HM, Fong PS, Cheng WTF, Lam TN. Population pharmacokinetic study and individual dose adjustments of high-dose methotrexate in chinese pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia or osteosarcoma. *J Clin Pharmacol*. 2019;59(4):566-77.
16. Simon N, Marsot A, Villard E, Choquet S, Khe HX, Zahr N, et al. Impact of ABCC2 polymorphisms on high-dose methotrexate pharmacokinetics in patients with lymphoid malignancy. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(6):507-13.

17. Benz-de Bretagne I, Zahr N, Le Gouge A, Hulot JS, Houillier C, Hoang-Xuan K, et al. Urinary coproporphyrin I/(I + III) ratio as a surrogate for MRP2 or other transporter activities involved in methotrexate clearance. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78(2):329-42.
18. Anderson BJ, Holford NH. Understanding dosing: children are small adults, neonates are immature children. *Arch Dis Child*. 2013;98(9):737-44.
19. Fukuhara K, Ikawa K, Morikawa N, Kumagai K. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in Japanese adult patients with malignancies: a concurrent analysis of the serum and urine concentration data. *J Clin Pharm Ther*. 2008;33(6):677 - 84.
20. Hempel L, Misselwitz J, Fleck C, Kentouche K, Leder C, Appenroth D, et al. Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Med Pediatr Oncol*. 2003;40(6):348-54.
21. Gao X, Qian XW, Zhu XH, Yu Y, Miao H, Meng JH, et al. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in chinese pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Front Pharmacol*. 2021;12:701452.
22. Arshad U, Taubert M, Seeger-Nukpezah T, Ullah S, Spindeldreier KC, Jaehde U, et al. Evaluation of body-surface-area adjusted dosing of high-dose methotrexate by population pharmacokinetics in a large cohort of cancer patients. *BMC Cancer*. 2021;21(1):719.
23. Taylor ZL, Mizuno T, Punt NC, Baskaran B, Navarro Sainz A, Shuman W, et al. MTXPK.org: A clinical decision support tool evaluating high-dose methotrexate pharmacokinetics to inform post-infusion care and use of glucarpidase. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;108(3):635-43.
24. Beechinor RJ, Thompson PA, Hwang MF, Vargo RC, Bomgaars LR, Gerhart JG, et al. The population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in infants with acute lymphoblastic leukemia highlight the need for bedside individualized dose adjustment: A report from the Children's Oncology Group. *Clin Pharmacokinet*. 2019;58(7):899-910.
25. Methotrexate 100 mg/ml solution for injection 2023 [updated April 2023. Available from: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/8504/smpc>.
26. Campbell M. ALL IC-BFM 2009 – A randomized trial of the I-BFM-SG for the management of childhood non-B acute lymphoblastic leukemia. 2009:1-178.
27. Faganel Kotnik B, Grabnar I, Bohanec Grabar P, Dolzan 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;67(10):993-1006.
28. Aumente D, Santos Buelga D, Lukas JC, Gomez P, Torres A, Jose ´ Garcia M. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(12):1227-38.

29. Johansson A, Hill N, Perisoglou M, Whelan J, Karlsson M, Standing J. A population pharmacokinetic/pharmacodynamic model of methotrexate and mucositis scores in osteosarcoma. *Ther Drug Monit.* 2011;33(6):711 - 8.
30. Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, et al. Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(2):666-71.
31. Pai MP, Debacker KC, Derstine B, Sullivan J, Su GL, Wang SC. Comparison of body size, morphomics, and kidney function as covariates of high-dose methotrexate clearance in obese adults with primary central nervous system lymphoma. *Pharmacotherapy.* 2020;40(4):308-19.
32. Mahmood I, Staschen CM, Goteti K. Prediction of drug clearance in children: an evaluation of the predictive performance of several models. *AAPS J.* 2014;16(6):1334-43.
33. Batchelor HK, Marriott JF. Paediatric pharmacokinetics: key considerations. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;79(3):395-404.
34. Anderson BJ, Holford NH. Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:303-32.
35. Johnson TN. The problems in scaling adult drug doses to children. *Arch Dis Child.* 2008;93(3):207-11.
36. Colom H, Farre R, Soy D, Peraire C, Cendros J-M, Pardo N, et al. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate after intravenous administration in pediatric patients with osteosarcoma. *Ther Drug Monit.* 2009;31:76-85.
37. Min Y, Qiang F, Peng L, Zhu Z. High dose methotrexate population pharmacokinetics and Bayesian estimation in patients with lymphoid malignancy. *Biopharm Drug Dispos.* 2009;30(8):437-47.
38. Mei S, Li X, Jiang X, Yu K, Lin S, Zhao Z. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in patients with primary central nervous system lymphoma. *J Pharm Sci.* 2018;107(5):1454-60.
39. Fuchs A, Csajka C, Thoma Y, Buclin T, Widmer N. Benchmarking therapeutic drug monitoring software: a review of available computer tools. *Clin Pharmacokinet.* 2013;52(1):9-22.
40. Donagher J, Barras MA. Therapeutic drug monitoring: using Bayesian methods to evaluate hospital practice. *J Pharm Pract Res.* 2018;48(6):522-9.

4. Објављени и саопштени резултати који чине докторску дисертацију

Резултати истраживања садржани у оквиру докторске дисертације маг. фарм. Биљане Шкорић су објављени и саопштени у оквиру следећих часописа и скупова.

Рад у истакнутом међународном часопису (M22)

- **Škorić B**, Jovanović M, Miljković B, Kuzmanović M, Vučićević K. Understanding hemoglobin contribution to high-dose methotrexate disposition-population pharmacokinetics in pediatric patients with hematological malignancies. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2024; 80(5):697-705. doi:10.1007/s00228-024-03642-4; **IF₂₀₂₂ = 2.9 (163/278)**

Рад у међународном часопису (M23)

- **Škorić B**, Kuzmanović M, Jovanović M, Miljković B, Micić D, Jović M, Jovanović A, Vučićević K. Methotrexate concentrations and associated variability factors in high dose therapy of children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Pediatric Hematology and Oncology* 2023; 40(5): 446-457. doi:10.1080/08880018.2023.2168809; **IF₂₀₂₁ = 2.070 (85/130)**

Рад у врхунском часопису националног значаја (M51)

- **Škorić B**, Jovanović M, Miljković B, Kuzmanović M, Vučićević K. Klinička farmakokinetika metotreksata u terapiji akutne limfoblastne leukemije i ne-Hodgkinovog limfoma u pedijatrijskoj populaciji pacijenata. *Arhiv za farmaciju* 2020; 70: 20 - 33; doi: 10.5937/arhfarm70-24905.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

- **Škorić B**, Jovanović M, Miljković B, Kuzmanović M, Micić D, Vučićević K. Ispitivanje varijabilnosti u koncentracijama metotreksata između ciklusa terapije (Investigation of variability in methotrexate concentrations between therapy cycles). VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 10-14.10.2018. Beograd. *Arhiv za farmaciju* 2018; 68:356-357.
- **Škorić B**, Jovanović M, Miljković B, Kuzmanović M, Vučićević K. Ispitivanje koncentracija i normalizovanih koncentracija metotreksata u zavisnosti od primenjene doze u pedijatrijskoj populaciji sa ALL i NHL. VIII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, 12-15.10.2022, Beograd. *Arhiv za farmaciju* 2022; 72: S290-S291.

5. Закључак - образложење научног доприноса докторске дисертације

Терапија великим дозама метотрексата носи ризик од токсичности иако је дуго присутна у клиничкој пракси. Услед велике фармакокинетичке варијабилности, долази до појаве токсичности најчешће услед успорене елиминације лека. Ово је посебно изазовно у педијатријској пракси и према међународно прихваћеним смерницама, захтева се праћење како клиничке слике пацијента тако и концентрације лека (енгл. *therapeutic drug monitoring*).

Према резултатима дисертације вредности концентрација метотрексата нормализованих према дози се не разликују у 24, 48 и 72 сату након примене лека, између пацијената који су примењивали 3 и 5 g/m^2 .

Регресиона једначина за предвиђање концентрације метотрексата нормализоване по примењеној дози, развијена у склопу ове докторске дисертације, доприноси препознавању индивидуалних карактеристика пацијента на које је потребно обратити посебну пажњу како би се идентификовали пацијенти код којих постоји ризик да вредности концентрација лека не буду у циљном опсегу. У питању су клиренс креатинина, концентрација хемоглобина, време од почетка примене лека и присуство лекова који имају карактеристику да повећају концентрацију метотрексата. Укупно је 73,9% варијабилности у концентрацијама метотрексата нормализованих према датој дози лека (3 или 5 g/m^2) описано увођењем претходно наведених варијабли у регресиони модел.

Осим тога, напреднијом методом, нелинеарног моделовања комбинованих ефеката, применом програма *NONMEM*[®], развијен је популациони фармакокинетички модел, који описује фармакокинетичку великих доза метотрексата у овој осетљивој популацији пацијената. Према двоплорном фармакокинетичком моделу метотрексата, код којих је вредност параметара скалирана према телесној површини, вредност клиренса код типичног пацијента износи 5,75 $L/h/m^2$. Овај модел омогућава да се осим популационих предвиди и индивидуалне вредности фармакокинетичких параметара, као и да се уз комбинацију са подацима добијених из терапијског мониторинга индивидуализује режим дозирања, да се у раној фази препознају пацијенти са ризиком од појаве токсичности и да се применом леуковорина предупреди појава компликација. Уз помоћ података из редовног терапијског праћења лека и уз примену развијеног популационог модела може да се индивидуализује режим дозирања у наредном циклусу који пацијент треба да примени.

Резултати ове дисертације доприносе разумевању извора варијабилности у фармакокинетичким параметрима метотрексата где је уз често препознате параметре функције бубрега, идентификована и концентрација хемоглобина као параметар утицаја на клиренс метотрексата. У развијеном популационом фармакокинетичком моделу уз скалирање по телесној површини, са повећањем вредности серумског креатинина од 20% долази до смањења клиренса за 11,31%, док је утицај хемоглобина директно пропорционалан и са порастом концентрације хемоглобина за 20% вредност клиренса метотрексата се повећа за 7,79%. Ови резултати могу бити смернице да се у клиничкој пракси обрати пажња на пацијенте код којих постоји одступање од референтних вредности ових параметара.

6. Мишљење и предлог комисије

Докторска дисертација кандидаткиње маг. фарм. Биљане Шкорић, чија је израда одобрена одлуком број 61206-4416/4-23 од 30. јануара 2024. године на седници Већа научних области медицинских наука на Универзитету у Београду под називом „**Извори фармакокинетичке варијабилности и развој популационог модела након примене великих доза метотрексата код педијатријских пацијената са акутном лимфобластном леукемијом и нехочкинским лимфомом**” испуњава услове адекватно написаног научног рада на основу садржаја и форме, али такође и на основу

свеобухватно написаног уводног дела, јасно постављених истраживачких циљева, детаљно објашњене методологије истраживања, представљених резултата истраживања и последично детаљних образложења у дискусији, као и концизно представљених закључака. Узимајући у обзир резултате испитивања и чињеницу да су исти објављени у међународним часописима (један рад у истакнутом међународном часопису – категорија М22 и један рад у међународном часопису – категорија М23), констатујемо да су успешно реализовани циљеви докторске дисертације.

На основу наведеног, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета - Универзитета у Београду да прихвати позитиван извештај о израђеној докторској дисертацији под насловом „**Извори фармакокинетичке варијабилности и развој популационог модела након примене великих доза метотрексата код педијатријских пацијената са акутном лимфобластном леукемијом и нехочкинским лимфомом**” и да се кандидаткињи маг. фарм. Биљани Шкорић одобри јавна одбрана докторске дисертације након добијања сагласности од стране Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду.

Комисија:

Др сц. Бранислава Миљковић, редовни професор,
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

Др сц. Марија Јовановић, ванредни професор,
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

Др сц. Адријан Сарајлија, доцент,
Универзитет у Београду – Медицински факултет,
Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић”

Београд, 10. мај 2024. године

