

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Odlukom Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta od 19.07.2016. godine imenovana je komisija u sastavu:

1. Prof dr Nenad Ugrešić, redovni profesor, mentor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Prof dr Dino Tarabar, vanredni profesor, mentor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu
3. Prof dr Miroslav Savić, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
4. Prof dr Zoran Šegrt, vanredni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu
5. Prof dr Slobodan Obradović, vanredni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata Kristine Denić, dipl. farmaceuta, zaposlene kao analitičar u Odeljenju za toksikološku hemiju Nacionalnog centra za kontrolu trovanja, Vojnomedicinske akademije u Beogradu:

Hepatotoksičnost citotoksične kombinovane hemioterapije sa biološkom terapijom ili bez nje kod bolesnika sa metastatskim kolorektalnim karcinomom

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorska disertacija Kristine Denić, pod nazivom: "Hepatotoksičnost citotoksične kombinovane hemioterapije sa biološkom terapijom ili bez nje kod bolesnika sa metastatskim kolorektalnim karcinomom", napisana je na 104 strana kroz sedam celina koje obuhvataju (1) Uvod, (2) Ciljeve istraživanja, (3) Metodologiju ispitivanja, (4) Rezultate (5) Diskusiju, (6) Zaključke i (7) Literaturu. Tekst je napisan jasnim i preglednim stilom i obuhvata 29 tabela, 15 grafičkih prikaza, kao i 134 literaturnih navoda.

U **Uvodu** je dat pregled epidemioloških podataka vezanih za incidenciju razvoja malignih oboljenja sa posebnim osvrtom na globalne i evropske epidemiološke podatke za kolorektalni karcinom (CRC). Takođe, prikazani su podaci o učestalosti oboljevanja od CRC u Srbiji i poziciji naše zemlje u odnosu na evropske. Prikazani su faktori rizika za razvoj CRC, dijagnostičke *skrining* procedure za otkrivanje bolesti, klinička slika obolelih, *staging* sistem kategorizacije bolesti, klasifikacija kao i molekularni mehanizmi razvoja ovog oboljenja. Navedeni su preporučeni terapijski protokoli lečenja za svaki stadijum bolesti ponaosob sa posebnim akcentom na hemioterapijske protokole lečenja CRC. Dat je detaljan prikaz razvoja i kreiranja konvencionalnih citostatskih hemioterapijskih protokola sa jedne i biološke, ciljane terapije sa druge strane. Istaknut je terapijski značaj upotrebe biološkog leka, bevacizumaba kao sastavnog dela hemioterapijskih protokola primenjenih za lečenje CRC. Opisan je hepatotoksični potencijal konvencionalnih citostatika primenjenih za lečenje CRC koji se osim u vidu histoloških promena tkiva jetre može manifestovati i kao poremećaj vrednosti biohemijskih parametra jetre. Osim konvencionalnih citostatika, navedeni su i drugi mogući uzroci poremećaja vrednosti biohemijskih parametra jetre, a koji mogu ili ne moraju biti vezani za samu malignu bolest. Opisani su parametri funkcionalnog statusa jetre za praćenje hepatotoksičnog efekta citostatika. Razmotreni su hepatotoksični potencijali konvencionalnih citostatskih hemioterapijskih protokola sa bevacizumabom i bez njega i ukazano je na manji stepen oštećenja tkiva jetre kod bolesnika dodatno lečenih bevacizumabom.

U okviru **Ciljeva istraživanja** navedeni su ciljevi, koji se odnose na komparativnu analizu vrednosti biohemijskih parametara funkcije jetre bolesnika lečenih konvencionalnim citostaticima sa vrednostima parametara bolesnika dodatno tretiranih bevacizumabom kao i utvrđivanje odnosa kliničkih ishoda bolesnika sa vrednostima biohemijskih parametara jetre.

U delu **Metodologija ispitivanja** prikazani su dizajn ispitivanja, pacijenti i protokol studije (kriterijumi za njihovo uključivanje/isključivanje u/iz studije), zatim je naveden protokol uzimanja biološkog materijala kao i metode koje su korišćene za određivanje vrednosti biohemijskih parametara funkcionalnog statusa jetre. Takođe, prikazane su i metode za statističku analizu podataka.

Za potrebe studije su korišćeni demografski i kliničko-epidemiološki podaci dobijeni pregledom medicinske dokumentacije bolesnika sa metastatskim kolorektalnim karcinomom lečenih u periodu od januara 2009. do decembra 2014. godine u Institutu za onkologiju i radiologiju u Beogradu, za šta je Etički odbor Instituta za onkologiju i radiologiju dao saglasnost (broj 676-01). Ispitivanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom i njenim amandmanima i prema načelima Dobre kliničke prakse (*Good Clinical Practice, GCP*).

Procena potrebnog broja ispitanika je izvršena primenom t-testa uz pomoć komercijalno dostupnog programa GPower 3.1. Dobijeni rezultati su analizirani po *intention to treat* (ITT) modelu. Za statističku obradu dobijenih rezultata korišćen je komercijalni statistički softver za PC računare - SPSS Statistics 17.0, 2008. Poređenje rezultata u grupi i između grupa je izvedeno, primenom Studentovog t-testa ili Wilcoxon odnosno Mann-Whitney testa. Rezultati izraženi u vidu distribucija frekvencija poređeni su primenom χ^2 testa ili Kolmogorov-Smirnov testa.

Međusobna povezanost klinički važnih parametara utvrđena je pomoću Pearsonove i Spearmanove korelacione analize.

Rezultati sprovedenog ispitivanja su podeljeni na tri dela i odnose se na: (1) biohemijske parametre i tumor markere kod bolesnika lečenih konvencionalnim citostatskim protokolom (FOLFOX4) sa bevacizumabom ili bez njega; (2) biohemijske parametre i tumor markere u odnosu na klinički ishod i na (3) klinički ishod ispitivanih bolesnika u odnosu na broj primenjenih hemioterapija.

U prvom delu su opisani rezultati biohemijskih parametara i tumor markera kod bolesnika lečenih FOLFOX4 protokolom sa bevacizumabom ili bez njega. Dobijeni rezultati su prikazani kao parametri funkcije hepatocita i žučnih kanalića i poređeni kako u grupi tako i između dve grupe

bolesnika. Takođe, prikazan je broj bolesnika koji su na početku i kraju lečenja imali isti, nepromenjeni biohemijski status (vrednosti analiziranih biohemijskih parametara su bile u/iznad referentnog opsega vrednosti i na početku i na kraju lečenja) kao i onih sa promenjenim biohemijskim statusom (vrednosti analiziranih biohemijskih parametara nisu bile u istom opsegu na početku i kraju lečenja). Vrednosti parametara funkcije jetre i žučnih kanalića, a u odnosu na biohemijski status date su za obe grupe bolesnika. Dobijeni rezultati su poređeni kako unutar tako i između grupa bolesnika. Prikazani su rezultati analiziranih biohemijskih parametara funkcije hepatocita i žučnih kanalića kod bolesnika bez progresije bolesti na kraju lečenja. Time je eliminisan uticaj metastatske bolesti na vrednosti parametara funkcionalnog statusa jetre. Dobijeni rezultati praćenih parametara su takođe poređeni u grupu i između grupa bolesnika.

U drugom delu su prikazani rezultati praćenih parametara funkcije hepatocita i žučnih kanalića u odnosu na klinički ishod, radi utvrđivanja postojanja korelacije između postignutog kliničkog efekta i biohemijskog statusa jetre.

U trećem delu je prikazan klinički ishod bolesnika u odnosu na broj primenjenih hemioterapijskih protokola sa ciljem dobijanja podataka o optimalnom trajanju terapijskog protokola koji će dati najpovoljniji terapijski i minimalni hepatotoksični efekat.

Diskusija je podeljena na četiri dela: (1) Klinička efikasnost udružene primene bevacizumaba i konvencionalnog citostatskog protokola u poređenju sa konvencionalnom citostatskom terapijom; (2) Biohemijski parametri funkcije jetre u odnosu na klinički ishod; (3) Prognostički i prediktivni značaj tumor markera kod metastatskog CRC; (4) Biohemijski parametri jetre kod lečenih bolesnika.

U prvom delu su detaljno analizirani dobijeni rezultati ostvarenog terapijskog odgovora i upoređeni sa dosadašnjim odgovarajućim rezultatima drugih autora. U drugom delu je izvršena analiza dobijenih vrednosti biohemijskih parametara funkcije hepatocita i žučnih kanalića u odnosu na klinički ishod bolesnika. Opisani su svi razmatrani i ispitivani faktori i stavljen je akcenat na naučni doprinos rezultata. Zatim je u trećem delu diskutovan prognostički i prediktivni značaj određivanja tumor markera (CEA i CA 19-9) kod obolelih od metastatskog CRC. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima drugih istraživača i istaknut je naučni doprinos. U četvrtom delu su detaljno analizirani dobijeni rezultati analiziranih biohemijskih parametara kao i faktori koji utiču na njihove vrednosti. Istaknut je naučni i klinički značaj dobijenih rezultata.

Na kraju disertacije, dati su **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize. U **Literaturi** je naveden spisak referenci koje su korišćene u okviru doktorske disertacije.

B. Opis postignutih rezultata

U okviru ove doktorske disertacije su ispitivane dve grupe bolesnika sa metastatskim CRC na jetri. Prva grupa je lečena primenom kombinovanog citostatskog protokola (FOLFOX4), a druga dodatnom primenom bevacizumaba. Praćenjem kliničkog odgovora i biohemijskih parametara kao pokazatelja funkcionalnog statusa jetre, ustanovljeno je da bevacizumab dovodi do značajnog poboljšanja kliničkog odgovora uz smanjenje trajanja lečenja, a da pri tom ne utiče značajno na analizirane biohemijske parametre.

Stepen težine kliničke slike bolesti na početku lečenja je bio približno jednak u obe grupe bolesnika. Dobijeni rezultati pokazuju da je klinički odgovor kod bolesnika dodatno lečenih bevacizumabom bolji u odnosu na one lečene konvencionalnom hemioterapijom. To se ogledalo u većem broju bolesnika sa kompletnom i parcijalnom regresijom bolesti u grupi sa bevacizumabom u odnosu na grupu bez bevacizumaba, kao i u manjem broju bolesnika sa progresijom bolesti. Pored toga, navedeni klinički odgovori u grupi bolesnika dodatno lečenih bevacizumabom su postignuti primenom značajno manjeg broja ciklusa hemioterapije. S obzirom na to, veća efikasnost udružene upotrebe bevacizumaba i citostatske terapije u odnosu na konvencionalnu hemioterapiju ogledala se i u manjem broju primenjenih ciklusa hemioterapije.

U drugom delu istraživanja analizirani su rezultati biohemijskih parametara funkcije jetre. Praćeni parametri su podeljeni u dve grupe. U prvu grupu spadaju oni koji su indikatori funkcije hepatocita, a u drugu parametri koji su pokazatelji funkcije žučnih kanalića, a time i ekskretorne funkciju jetre. Od parametara za praćenje funkcionalnog stanja hepatocita određivani su AST i ALT, dok je procena funkcije žučnih kanalića vršena određivanjem vrednosti ALP, GGT, LDH i bilirubina. Nakon korelacije kliničkog odgovora sa vrednostima biohemijskih parametara funkcije jetre, pokazano je da je u grupi bolesnika sa regresijom bolesti, nivo AST, ALT i bilirubina na kraju lečenja bio statistički značajno povišen. Suprotno tome, vrednosti GGT i proteina su nakon sprovedenog lečenja bile statistički značajno niže u odnosu na inicijalne vrednosti. Kod bolesnika sa stabilizacijom bolesti takođe je nađeno da je nivo proteina značajno niži na kraju lečenja u odnosu na inicijalne vrednosti. Kod bolesnika sa progresijom bolesti

vrednosti AST i bilirubina su bile značajno povišene nakon sprovedenog lečenja. Rezultat koji se izdvaja nakon sprovedene analize dobijenih nalaza je smanjenje vrednosti GGT po završetku terapije koje korelira sa povoljnim kliničkim odgovorom. To bi moglo da izdvoji GGT kao potencijalno prognostički parametar za praćenje hepatotoksičnosti primenjene terapije.

Kod ispitivanih bolesnika su od tumor markera određivani nivoi CEA i CA 19-9. Pre početka lečenja je kod 78,13% bolesnika nivo CEA bio iznad gornje granice referentnog opsega, dok se nakon završenog lečenja broj bolesnika sa vrednostima CEA iznad referentnog opsega smanjuje i iznosi 63,54%. Navedeni rezultati pokazuju da je kod više od polovine ispitivanih bolesnika vrednost CEA pre početka terapije bila znatno povišena i kao takva bila u skladu sa kliničkim nalazom obolelih. Međutim, s obzirom na to da su vrednosti CEA po završetku terapije bile niže u odnosu na početne moglo bi se reći da nivo CEA može biti jedan od biomarkera za praćenje terapijskog efekta primenjenog protokola lečenja. Za potvrđivanje korelacije između nivoa CEA i postignutog terapijskog efekta, određivane su početne i post terapijske vrednosti ovog tumor markera kod bolesnika kod kojih nije registrovana progresija bolesti. Prikazani rezultati pokazuju da su i kod bolesnika lečenih bevacizumabom kao i kod onih koji nisu dobijali ovaj biološki lek krajnje vrednosti za CEA niže u odnosu na početne i time u skladu sa postignutom regresijom ili stabilizacijom bolesti. Takođe, iz prikazanih rezultata se može uočiti da su bez obzira na to što nije postignuta statistička značajnost, krajnje vrednosti ovog tumor markera u grupi bolesnika sa bevacizumabom niže u odnosu na grupu koja nije primala ovaj lek. Takvi nalazi su u skladu sa boljom kliničkom efikasnošću terapijskog protokola koji uključuje primenu bevacizumaba što dodatno potvrđuje i opravdava primenu CEA kao biomarkera za praćenje terapijske efikasnosti primenjenog protokola lečenja. Pored CEA, kod lečenih bolesnika je praćen nivo CA 19-9 kako pre tako i po završenom lečenju. Od ukupnog broja bolesnika je kod 51,40% obolelih nivo CA 19-9 pre terapije bio u referentnom opsegu. Prema tome, ne bi se moglo reći da nivo CA 19-9 pre terapije korelira sa početnim stadijumom bolesti praćenih bolesnika, te se CA 19-9 ne bi mogao koristiti kao pouzdan dijagnostički biomarker. Analiziranjem nivoa CA 19-9 po završenoj terapiji uočava se da je kod 63,54% bolesnika on u referentnom opsegu, kao i da se broj bolesnika sa ovakvim vrednostima CA 19-9 ne razlikuje značajno između grupe bolesnika koja je primala bevacizumab i one koja to nije (61,54%:56,82%). Međutim, kada se između dve grupe bolesnika porede vrednosti za CA 19-9 nakon završenog protokola lečenja uočava se značajna razlika ($p=0,044$) pri čemu su vrednosti praćenog tumor markera niže u grupi koja je primala bevacizumab. Ovaj nalaz dodatno potvrđuje veću kliničku efikasnost konvencionalnog

citostatskog protokola sa bevacizumabom u odnosu na protokol bez njega. Međutim, bez obzira na to ne bi se moglo zaključiti da je CA 19-9 pouzdan biomarker za praćenje postignutog terapijskog odgovora.

Rezultati analiziranih biohemijskih parametara pokazuju da su početne vrednosti nekih od parametara bile iznad referentnih vrednosti. Poremećaj vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika koji su tretirani konvencionalnim citostaticima, posledica je ne samo metastatskih promena već i toksičnog efekta hemioterapije. Na početku lečenja je između grupe bolesnika na citostatskoj terapiji i one koja je dodatno primala bevacizumab ustanovljena granično značajna razlika vrednosti za AST i ALT kao biomarkera funkcije hepatocita. Pri tome je varijabilnost vrednosti navedenih parametara bila izraženija u grupi bolesnika bez bevacizumaba. Na kraju lečenja, vrednosti AST se nisu razlikovale među grupama, dok je nivo ALT i dalje ostao granično statistički različit. Praćenjem biohemijskih parametara ekskretorne funkcije jetre ustanovljeno je da je nivo bilirubina bio u granicama referentnih vrednosti i bez značajne razlike između ispitivanih grupa i na početku i na kraju lečenja. Vrednosti ostalih parametara (ALP, LDH i GGT) nakon završenog lečenja se nisu značajno razlikovale između ispitivanih grupa bolesnika. Pri tome je varijabilnost vrednosti ispitivanih parametara, koje su se ponekad kretale iznad normalnih vrednosti, bila izraženija u grupi koja nije dobijala bevacizumab.

Iako se vrednosti ALP, GGT i LDH nakon završenog lečenja nisu značajno razlikovale između ispitivanih grupa bolesnika, veća varijabilnost vrednosti navedenih parametara u grupi bez bevacizumaba može biti pokazatelj izraženijeg oštećenje žučnih kanalića kod ovih bolesnika. Međutim, za potvrđivanje ovakve hipoteze neophodno je sprovesti ispitivanje na većem broju bolesnika i korelisati dobijene rezultate sa patohistološkim nalazima tkiva jetre.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

Klinička efikasnost konvencionalnih hemioterapijskih protokola za lečenje mCRC sa bevacizumabom ili bez njega bila je predmet ispitivanja mnogih istraživačkih grupa.

U radu Klinger i sar. (2009) rezultati istraživanja ukazuju na veći broj bolesnika sa postignutom kompletnom regresijom (CR) u grupi koja je lečena udruženom upotrebom bevacizumaba i FOLFOX4 protokola u odnosu na one tretirane konvencionalnim FOLFOX4 protokolom (CR=8,9%:4%). Takođe, u grupi sa bevacizumabom registrovan je manji broj bolesnika sa progresijom bolesti (PB) u odnosu na grupu bez bevacizumaba (PB=5,4%:8%). Međutim, broj

bolesnika sa postignutom parcijalnom regresijom (PR) i stabilizacijom bolesti (SB) je bio približno isti u obe grupe bolesnika. Iako nije pokazana statistički značajna razlika nakon poređenja tretmana u odnosu na postignuti klinički odgovor, zaključak autora je da se uočava trend kompletne regresije bolesti u grupi sa bevacizumabom, a u grupi bez bevacizumaba sasvim obrnuto (progresija bolesti).

Osim kliničke efikasnosti, u radu su prikazani rezultati koji ukazuju na manji stepen histološkog oštećenja tkiva (smanjenje razvoja SOS) jetre u grupi bolesnika koja je primala bevacizumab u odnosu na one lečene konvencionalnom terapijom. Shodno navedenom, moglo bi se reći da je dodatak bevacizumaba konvencionalnoj citostatskoj terapiji, kao adjuvansa doveo do značajnog poboljšanja kliničkog odgovora, ali i do smanjenja hepatotoksičnog efekta konvencionalnih citostatika.

Rezultati istraživanja koje su sprovedeli Saltz i saradnici (2008) ukazuju na manji broj bolesnika sa PB u grupi koja je primala bevacizumab u odnosu na grupu bez bevacizumaba (29%:47%), kao i veći broj bolesnika koji je resektovan (što je cilj primenjene terapije) nakon hemioterapije u grupi sa bevacizumabom (8,4%:6,1%). Iako navedene razlike nisu dostigle statističku značajnost moglo bi se reći da one ukazuju na bolji terapijski odgovor u grupi bolesnika koja je bila tretirana udruženom upotrebom bevacizumaba i citostatika u odnosu na one koji su lečeni konvencionalnim citostatskim protokolom.

Veća klinička efikasnost konvencionalnih hemioterapijskih protokola po dodatku bevacizumaba potvrđena je i rezultatima studije koju su sprovedeli Popov i saradnici (2007) koji ukazuju da je željeni klinički efekat u smislu ostvarenja kompletne ili parcijane regresije kao i stabilizacije bolesti postignuta kod 75% bolesnika koji su primali bevacizumab kao terapiju prve linije.

Rezultati sprovedenog istraživanja su u pogledu kliničke efikasnosti u skladu sa literaturnim podacima (Hurwitz i sar., 2004; Hurwitz i sar., 2005; Kabbinavir i sar., 2005; Grothey i sar., 2008; Saltz i sar., 2008) koji takođe ukazuju na bolji klinički odgovor bolesnika lečenih udruženom upotrebom bevacizumaba i konvencionalnog citostatskog protokola u odnosu na monoterapiju konvencionalnim citostaticima. Poređenjem dobijenih rezultata sa podacima iz literature, može se reći da je bevacizumab efikasan i bezbedan lek koji povećava kliničku efikasnost citostatske terapije, skraćuje vreme trajanja lečenja i značajno smanjuje hepatotoksičnost citostatika. Sve su to razlozi da se on danas udruženo sa konvencionalnim citostaticima koristi kao terapijski protokol prve linije za lečenje mCRC.

U dostupnoj literaturi nije bilo podataka o stepenu korelacije biohemijskih parametara jetre kao mere hepatotoksičnog efekta terapijskih protokola primenjenih za lečenje mCRC sa postignutim kliničkim efektom na kraju lečenja. Shodno tome nije bilo moguće porediti dobijene nalaze biohemijskih parametara jetre, a u odnosu na klinički ishod sa literaturnim podacima. Međutim, u jednom zbirnom radu (Tužba i sar., 2011) su kod bolesnika sa CRC prikazali vrednosti parametara funkcije jetre (AST, ALT, ALP, LDH i albumin) pre početka i po završetku hemioterapijskog protokola. Iz zbirnih podataka navedene studije proizilazi da su početne vrednosti za ALP kod obolelih bile statistički značajno više od kontrolnih vrednosti, dok je nivo albumina bio značajno niži u odnosu na nivo kod zdravih osoba. Na kraju terapije, došlo je do povećanja vrednosti ALP i AST u odnosu na njihove početne vrednosti, što može delom biti posledica hepatotoksičnog efekta primenjenih terapijskih protokola.

Literaturni podaci ukazuju na jasnu povezanost između određenog citostatika i histološkog oštećenja tkiva jetre do kojeg dovode (Field i sar; 2008; Field i Michael, 2008; Abrams i sar., 2014). Takođe, rezultati sprovedenih studija pokazuju da upotreba bevacizumaba umanjuje hepatotoksičnost konvencionalnih citostatika korišćenih za lečenje mCRC što se ogleda u boljem histopatološkom nalazu tkiva jetre kod tako lečenih bolesnika (Hedrick 2006; Klinger i sar., 2009). Bez obzira na to što nije postignuta statistički značajna razlika, rezultati našeg ispitivanja ukazuju da su vrednosti analiziranih parametara bile niže u grupi bolesnika sa bevacizumabom. Shodno tome, nameće se pitanje da li bi vrednosti u grupi bolesnika sa bevacizumabom bile podjednako visoke kao u grupi bez bevacizumaba da nije primenjivan biološki lek.

Pregledom literature nađeni su radovi u kojima su opisane preporuke onkoloških vodiča za određivanje nivoa serumskih tumor markera kao prognostičkih i prediktivnih biomarkera kod obolelih od CRC (Sturgeon i sar., 2008; Selcukbiricik i sar., 2013; De Devitis i sar., 2014).

U zbirnom radu Sturgeon i saradnika (2008) se, prema preporukama Nacionalne akademije za kliničku laboratorijsku medicinu i drugih onoloških vodiča, ukazuje na značaj određivanja CEA i drugih serumskih tumor markera kod obolelih od CRC. Shodno pomenutim smernicama CEA se ne može koristiti kao pouzdani dijagnostički biomarker za detekciju početnog stadijuma CRC kod uslovno rečeno zdrave populacije. Razlog tome može biti nedostatak specifičnosti ovog tumor markera, zbog čega njegove vrednosti kod asimptomatskih bolesnika u početnim stadijumima bolesti mogu biti u okviru referentnog opsega. Suprotno tome, autori ističu da početne vrednosti CEA koje su iznad gornje granice referentnog opsega imaju prognostički značaj i kao takve mogu ukazivati na postojanje metastatskih promena. Zbog toga je CEA u

vodičima američkog onkološkog društva iz 2006. godine označen kao tumor marker izbora za detekciju udaljenih metastaza kod obolelih od CRC. Takođe, u radu se navodi da je određivanje nivoa CEA, kod bolesnika sa mCRC koji su na određenom protokolu lečenja, značajno za praćenje kliničke efikasnosti primenjene terapije. Za procenu terapijske efikasnosti neophodno je vršiti monitoring vrednosti markera tokom lečenja i poređenje dobijenih rezultata sa početnim vrednostima.

U radu De Devitis i saradnika (2014) se sasvim suprotno stavovima istraživača iz prethodne studije navodi da uloga CEA kao prognostičkog faktora kod bolesnika sa mCRC nije dovoljno razjašnjena i da se o prognostičkom značaju ovog tumor markera može govoriti u adjuvantnom segmentu praćenja bolesnika kada bi svako povišenje vrednosti ukazivalo na recidiv bolesti.

Pregledom literature se može zaključiti da se vrednosti CEA mogu uz druge klinički relevantne nalaze koristiti kao parametri za dijagnostikovanje metastatske bolesti sa jedne i procene terapijske efikasnosti lečenja sa druge strane (Duffy, 2013). Takvi stavovi su u skladu sa rezultatima sprovedene studije koji ukazuju da je kod najvećeg broja ispitivanih bolesnika sa potvrđenom metastatskom bolešću početni nivo CEA bio znatno iznad gornje granice referentnog opsega. Takođe, dobijeni rezultati su potvrdili da je povoljan klinički efekat u smislu regresije ili stabilizacije bolesti praćen i smanjenjem vrednosti CEA.

U radu Sturgeon i sar. (2008) je navedeno da se pored CEA kod obolelih od CRC mogu određivati i drugi tumor markeri kao što su CA 19-9 i CA 242. Prema navedenim rezultatima početne koncentracije CA 19-9 imaju dijagnostički značaj kod CRC bolesnika, ali se zbog manje senzitivnosti u odnosu na CEA ne preporučuje njihova rutinska analiza kod CRC bolesnika i interpretacija dobijenih rezultata kao samostalnih dijagnostičkih i prediktivnih parametara. Pouzdanost CA 19-9 kao dijagnostičkog parametra metastatske bolesti nije pokazana u našem ispitivanju te su takvi nalazi u skladu sa literaturnim rezultatima.

Primena hemioterapijskih protokola za lečenje mCRC nosi sa sobom rizik od oštećenja jetre. Pregledom literature mogu se naći podaci o hepatotoksičnom efektu hemioterapijskih protokola primenjenih ne samo za lečenje mCRC već i drugih malignih oboljenja (King i Perry, 2001; Kandutsch i sar., 2008; Tamandl i sar., 2011).

U zbirnom radu Ramodri i saradnika (2010) pokazano je da konvencionalni citostatici najčešće dovode do holestatskih promena koje se na biohemijskom nivou manifestuju u vidu povećanja vrednosti ALP, GGT i bilirubina, dok vrednosti transferaza mogu i ne moraju biti povišene. Autori ističu da oštećenje jetre tokom hemioterapije zavisi i od hepatotoksičnog potencijala

primenjenog citostatika. Pokazano je da 5-FU i oksaliplatin, kao najčešće primenjivani neoadjuvantni protokoli prve linije za lečenje mCRC dovode do oštećenja tkiva jetre koje se manifestuje u vidu steatoze odnosno sinusoidalnog opstrukcionog sindroma (SOS). Pri tome je hepatotoksični potencijal oksaliplatina izraženiji u odnosu na 5-FU. To je i potvrđeno rezultatima brojnih studija koji ukazuju na učestaliju pojavu SOS uzrokovanu oksaliplatinom u odnosu na steatozu do koje dovodi 5-FU (Browning i Horton, 2004; Ribero i sar., 2007; Chun i sar., 2009; Klinger i sar. 2009; Tamandl i sar., 2011; Abrams i sar., 2014). Hepatotoksičnom potencijalu primenjenih citostatika mogu da doprinesu i drugi faktori kao što su starosna dob, pol, genetski faktori bolesnika koji utiču na metabolizam citostatika kao i upotreba suportivne terapije koja može intereagovati sa citostaticima i pospešiti njihovu toksičnost. Za pravilnu interpretaciju biohemijskih nalaza jetre dobijenih tokom hemioterapije neophodno je osim uticaja citostatika uzeti u obzir i hepatotoksični potencijal samog tumora u smislu metastatskih promena na jetri, paraneoplastičkih efekata kao i portalne venske tromboze do koje može dovesti. Rezultati prikazani u radu Klinger i sar. (2009) takođe pokazuju da bevacizumab ne dovodi do oštećenja tkiva jetre i da umanjuje mogućnost razvoja SOS usled primene oksaliplatina. Međutim, podaci jedne studije (Brown-Glaberman i sar., 2008) pokazuju da iako retko, bevacizumab može dovesti do portalne hipertenzije koja je praćena povišenjem vrednosti transaminaza i bilirubina. Imajući sve navedeno u vidu, jasno je da postoji veliki broj interferirajućih faktora koji utiču na nivo standardnih biohemijskih parametara funkcije jetre zbog čega se oni ne mogu koristiti kao pouzdani dijagnostički parametri hepatotoksičnog efekta hemioterapije. U dostupnoj literaturi je opisivani uticaj konvencionalnih citostatika i bevacizumaba na tkivo jetre kao i uticaj standardne hemiotrapije na vrednosti biohemijskih parametara jetre. Međutim, nema podataka o uticaju bevacizumaba na biohemijske parametre kod bolesnika koji su lečeni udruženom upotrebom ovog biološkog leka i citostatika. Shodno tome, nije moguće porediti dobijene rezultate u odnosu na postojeće literaturne. Generalno, dobijeni rezultati pokazuju da je bevacizumab značajno povećao terapijski efekat konvencionalnih citostatika, ali da nije imao značajnog efekta na poboljšanje analiziranih biohemijskih parametara jetre. Kod metastatskog CRC, slično drugim malignim oboljenjima, jetra trpi dve vrste oštećenja uzrokovanih metsatazama na jetri sa jedne i primenjenih hemioterapijskih protokola sa druge strane. Boreći se sa ova dva faktora istovremeno, tkivo jetre prema navodima iz literature (Chun i sar., 2009; Abrams i sar., 2014) kao i prema rezultatima sprovedenog ispitivanja ipak uspeva da kompenzuje oba navedena faktora i da uprkos oštećenjima na histološkom nivou očuva homeostazu biohemijskih

parametara. S obzirom na to, standardni set biohemijskih parametara funkcije jetre nije dovoljno pouzdano oruđe kojim će moći da se prati hemioterapijom uzrokovano oštećenje jetre. Zbog toga bi dalji tok istraživanja trebao da ide u pravcu pronalaženja specifičnijeg i osetljivijeg parametra kao biomarkera hepatotoksičnosti citostatika.

LITERATURA

Abrams TA, Meyer G, Schrag D, Meyerhardt JA, Moloney J, Fuchs CS. Chemotherapy usage patterns in a US-wide cohort of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(2): djt371.

Brown-Glaberman U, Swart R, Dragovich T, Bracamonte E, Kurtin S, Stopeck A. Hepatic injury associated with bevacizumab use in metastatic breast and colon cancers: A review of two cases. *Community Oncology* 2008; 5(10): 539-42.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147–52.

Chun S Yun, Laurent A, Maru D, Vauthey JN. Management of chemotherapy-associated hepatotoxicity in colorectal liver metastases. *Lancet Oncol* 2009; 10: 278-86.

De Devitiis C, Nasti G, Montano M, Fisichella R, Iaffiaoli RV, Beretta M. Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: Between hope and reality. *World J Gastroenterol* 2014; 20(41): 15049-59.

Duffy M. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. *Med Princ Pract* 2013; 22: 4-11.

Field MK, Dow C, Michael M. Part I: Liver function in oncology: biochemistry and beyond. *Lancet Oncol* 2008; 9: 1092-101.

Field MK, Michael M. Part II: Liver function in oncology: towards safer chemotherapy use. *Lancet Oncol* 2008; 9: 1181-90.

Grothey A, Sugrue M, Purdie D, Dong W, Sargent D, Hedric E, et al. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: Results from a large observational cohort study (BRiTe). *J Clin Oncol* 2008; 26: 5326-34.

Hedrick E, Kozloff M, Hainsworth J, Badarinath S, Cohn A, Flynn P, et al. Safety of bevacizumab plus chemotherapy as first line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: Updated results from a large observational registry in the United States (BriTE). *J Clin Oncol* 2006; 24: 155s, (abstr 3536).

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-42.

Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3502-8.

Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, Sarkar S. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal. *J Clin Oncol* 2005; 23(16): 3706-12.

Kandutsch S, Klinger M, Hacker S, Wrba F, Gruenberger B, Gruenberger T. Patterns of hepatotoxicity after chemotherapy for colorectal cancer liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34(11): 1231-6.

King DP, Perry CM. Hepatotoxicity of chemotherapy. *The Oncologist* 2001; 6: 162-76.

Klinger M, Eipeldauer S, Hacker S, Herberger B, Tamandl D, Dorfmeister M, et al. Bevacizumab protects against sinusoidal obstruction syndrome and does not increase response rate in neoadjuvant XELOX/FOLFOX therapy of colorectal cancer liver metastases. *Eur J Surg Onc* 2009; 35(5): 515-20.

Popov I, Tarabar D, Jovanović D, Kovčín V, Micev M, Petrović Z, et al. Efficacy and safety of bevacizumab in combination with oxaliplatin, irinotecan and fluoropyrimidine-based therapy in advanced colorectal cancer. *Arch Oncol* 2007; 15(1-2): 10-4.

Ramodri G, Cameron S. Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Annals of Hepatology* 2010; 9(2): 133-43.

Ribero D, Wang H, Donadon M, Zorzi D, Thomas M, Eng C, et al. Bevacizumab improves pathologic response and protects against hepatic injury in patients treated with Oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases. *Cancer* 2007; 110: 2761-7.

Saltz BL, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2013-9.

Selcukbiricik F, Bilici A, Tural D, Erdamar S, Soyluk O, Buyukunal E, et al. Are high initial CEA and CA 19-9 levels associated with the presence of K-ras mutation in patients with metastatic colorectal cancer? *Tumour Biol* 2013; 34: 2233-9.

Sturgeon C, Duffy M, Stenman U, Lilja H, Brünner N, Chan D, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. *Clin Chem* 2008; 54(12): e11-79.

Tamandl D, Klinger M, Eipeldauer S, Herberg B, Kaczirek K, Grunberger B, et al. Sinusoidal obstruction syndrome impairs long-term outcome of colorectal liver metastases treated with resection after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Onc* 2011; 18: 421-30.

Tuğba G, Halit D, Çetin KM. Tumor markers and biochemical parameters in colon cancer patients before and after chemotherapy. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2011; 12: 3147-50.

D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Radovi u časopisima međunarodnog značaja:

1. Denić K, Tarabar D, Obradović S, Stanić N, Spasić J, Ugrešić N. Biochemical liver function tests do not indicate any difference in the degree of hepatotoxicity in patients with metastatic colorectal carcinoma treated with conventional anticancer drugs with or without bevacizumab. *Vojnosanit Pregl* 2017; 74(8) (u štampi) [DOI: 10.2298/VSP150807221D]
Kategorija M23
2. Denić K, Tarabar D, Obradović S, Ristić M, Spasić J, Radosavljević D, Ugrešić N. Biochemical Liver Function Tests Parameters Level in Relation to Treatment Response in Liver Metastatic Colorectal Patients Treated with FOLFOX4 with or without Bevacizumab. *Srp Arh Celok Lek* 2017 (u štampi).
Kategorija M23

E. Zaključak - obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Na osnovu detaljne analize dostavljene doktorske disertacije diplomiranog farmaceuta Kristine Denić, članovi Komisije smatraju da prikazani rezultati, diskusija i zaključci predstavljaju značajan doprinos u oblasti farmakoterapije malignih oboljenja gastrointestinalnog trakta. Ispitivanje hepatotoksičnog efekta citotoksične kombinovane hemioterapije sa bevacizumabom ili bez njega, pokazalo je da rutinsko određivanje biohemijskih parametara funkcionalnog statusa jetre nema klinički značaj u smislu praćenja hepatotoksičnog efekta primenjenog protokola lečenja. Izuzetak predstavlja GGT, čije post-terapijske vrednosti koreliraju sa povoljnim kliničkim ishodom. Shodno tome bi se GGT mogao izdvojiti kao potencijalno prognostički parametar za praćenje hepatotoksičnog efekta primenjene hemioterapije. Kandidatkinja je uspešno ostvarila postavljene ciljeve i deo rezultata objavila u dva naučna rada u časopisima međunarodnog značaja.

Na osnovu svega iznetog, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, zbog dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom **„Hepatotoksičnost citotoksične kombinovane hemioterapije sa biološkom terapijom ili bez nje kod bolesnika sa metastatskim kolorektalnim karcinomom“**, kandidata, diplomiranog farmaceuta Kristine Denić.

Beograd, 05.04.2016.

Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Dino Tarabar, vanredni profesor,
Univerzitet odbrane u Beogradu,
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Dr Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Zoran Šegrt, vanredni profesor
Univerzitet odbrane u Beogradu,
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Dr Slobodan Obradović, vanredni profesor
Univerzitet odbrane u Beogradu,
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije