

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
КАТЕДРА ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ

УНИВЕРСИТЕТСКА БОЛНИЦА „СВЕТА МАРИНА“ - ВАРНА
КЛИНИКА МЕДИЦИНСКА ОНКОЛОГИЯ

Д-р Ася Консулова-Кирова

**ЕКСПРЕСИЯ НА НЯКОИ ПЛАЗМЕНИ И ТЪКАННИ БИОМАРКЕРИ
КАТО ПОТЕНЦИАЛНИ ПРЕДИКТОРИ ЗА АНТИАНГИОГЕНЕЗНА
ТЕРАПИЯ С *BEVACIZUMAB* ПРИ МЕТАСТАТИЧЕН
ДЕБЕЛОЧРЕВЕН КАРЦИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И
НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: ОНКОЛОГИЯ

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р ДИМИТЪР КАЛЕВ, ДМ

ВАРНА, 2016

Дисертационният труд е представен в обем 112 страници и съдържа 10 таблици и 19 фигури. Литературната справка включва 263 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден и одобрен за публична официална защита на Катедрен съвет на Катедра „Пропедевтика на вътрешните болести“ на МУ - Варна на 29.02.2016 и съгласно Заповед Р-109-83 / 28.03.2016 год. на Ректора на МУ „Проф. Д-р. Параскев Стоянов“, Варна е избрано научно жури в състав:

Външни членове:

1. Проф. д-р Галина Куртева, д.м. – Началник Клиника Медицинска Онкология, СБАЛО – София
2. Проф. д-р Жанет Грудева-Попова, д.м. – Началник Клиника по Онкология и Хематология и Заместник-директор Диагностично-лечебна дейност, УМБАЛ „Свети Георги“ – Пловдив; Катедра Клинична Онкология, МУ – Пловдив
3. Доц. д-р Жасмина Михайлова, д.м. – доцент по Онкология, Катедра Хематология, онкология, радиационна защита, радиобиология и нуклеарна медицина на ВМА – София, Медицински факултет, МУ – София

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Красимир Димитров Иванов, д.м.н. – Ректор на МУ „Проф. Д-р. Параскев Стоянов“, Варна
2. Доц. д-р Димитър Николаев Калев, д.м. – доцент по Онкология към Катедра Пропедевтика на вътрешните болести, Факултет по медицина, МУ „Проф. Д-р. Параскев Стоянов“, Варна

С благодарности към д-р Наталия Петрова и доц. д-р Петър Генов от Катедра по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология за осъществяването на имунохистохимичните изследвания, както и на д-р Трифон Червенков от Лаборатория по Клинична имунология към Катедра по медицинска генетика за *ELISA* изследването на плазмените проби.

С благодарности към доц. Иван Щерев за статистическата обработка и за времето, творческата мисъл и непрестанната подкрепа, без които анализите и обработката на данните щяха да бъдат „суха“ математика.

С благодарности към научния ръководител, доц. д-р Димитър Калев, за доверието и възможността да реализирам този научен труд.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 09.05.2016 г. (понеделник) от 13.30 часа в аудитория „Проф. Владимир Иванов“, УМБАЛ ”Св.Марина“.

Материалите по защитата са на разположение в Научния отдел на МУ-Варна и на интернет страницата на Медицински университет – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения на кирилица	4
Използвани съкращения на латиница	4
I. УВОД	5
II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	7
III. КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ	8
1 Материална база за реализиране на дисертационния труд	8
2 Пациентска популация	8
3 Рутинни клинични изследвания и биологични маркери	8
4 Медицинска история на пациентите	9
5 Информация за онкологичната болест	9
6 Специфични методи на изследване	9
7 Клинична и патологична стратификация на пациентската популация (подгрупи)	10
7.1 Клинична стратификация и разпределение по групи	10
7.2 Клинико-морфологична характеристика на пациентите, участващи в изследването на тъканните биомаркери	12
7.3 Клинико-морфологична характеристика на пациентите, участващи в изследването на плазмените биомаркери	12
7.4 Разпределение по групи	12
8 Избор и продължителност на системна антитуморна терапия	17
9 Образна оценка на терапевтичен отговор, модели на отговор и определяне на крайни показатели (точки)	18
10 Статистически дизайн и анализ	19
IV. РЕЗУЛТАТИ	21
1 Оценка на терапевтична ефективност на първа линия <i>bevacizumab</i> -съдържаща системна антитуморна терапия	21
2 Корелации между плазмени нива на биомаркери и терапевтичен отговор	22
3 Корелации между тъканни биомаркери и терапевтичен отговор	23
3.1 PFS спрямо нива на тъканна експресия на VEGFR 2 в първичния дебелочревен карцином	23
3.2 PFS спрямо нива на тъканна експресия на NP-1 в първичния дебелочревен карцином	24
4 Корелации между VEGF-биомаркери и други клиникопатологични характеристики	25
4.1 Корелации между VEGF-биомаркери и изходен серумен СЕА	25
4.2 Корелации между VEGF-биомаркери и RAS- статус	25
5 Оценка на странични ефекти и токсичност	27
V. ДИСКУСИЯ	28
VI. ИЗВОДИ	30
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	31
1 Приноси с научно-теоретичен характер	31
2 Приноси с научно-практичен характер	31
VIII. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	
1 Публикации в пълен текст	32
2 Научни съобщения	32

Използвани съкращения на кирилица

ИХХ - имунохистохимия

КТ – компютърна томография

НДКБК – недребноклетъчен белодробен карцином

ПЕТ/КТ - позитронно-емисионна томография с компютърна томография

ТКИ – тирозин-киназни инхибитори

ХТ – химиотерапия

Използвани съкращения на латиница

5-FU – 5-флуороурацил

AJCC - American Joint Committee on Cancer

ASCO – Американското дружество по клинична онкология

LV - левковорин

bFGF - Basic Fibroblast Growth Factor

CEA – карциноембрионален антиген

CECS – циркулиращи ендотелни клетки

CEPS - циркулиращи прогениторни клетки

CR - пълен отговор

DCE-MRI - динамична контрастно-усилена магнитнорезонансна томография

ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group

EGF - епидермален растежен фактор

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

EMA - Европейска Агенция по лекарствата

FDA – Агенция по храни и лекарства

FOLFOX- oxaliplatin, fluorouracil и leucovorin

FOLFIRI – irinotecan, fluorouracil и leucovorin

HIF-1 – Hypoxia inducible factor–1

HGF - хепатоцитен растежен фактор

IL - интерлевкин

IGF-1 - инсулино-подобен растежен фактор-1

KRAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

NP-1 – невропилин 1

PD - прогресия на болестта

PDGF – изолиран от тромбоцити растежен фактор

PDGFR - рецептор на PDGF

PFS – преживяемост без прогресия

PIGF – плацентарен растежен фактор

PR - частичен отговор;

PS - пърформанс статус

RECIST - Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

SD - стабилна болест

VEGF – съдовоендотелен растежен фактор

VEGFR – рецептор на VEGF

XELOX – oxaliplatin, capecitabine

I. УВОД

Ангиогенезата е основен процес във всеки етап от развитието и прогресията на малигнени тумори, допринасяйки за трансформиране на карциномите от „спящи“ *in situ* лезии към животозастрашаваща метастатична болест (неоангиогенеза). Съдовоендотелният растежен фактор А (VEGF А) и неговият рецептор VEGF рецептор 2 (VEGFR 2) играят ключова роля в предаването на проангиогенните сигнали в хода на неоангиогенеза, поради което голяма част от медикаментите с антиангиогенен ефект, включително *bevacizumab*, таргетират именно тях. Понастоящем липсват ясни предиктивни биомаркери за анти-VEGF лечение. Поради това, че общият VEGF и циркулиращите му изоформи VEGF 121 и 165, както и техният рецептор 2 (VEGFR 2) са основни звена в туморната ангиогенеза, а NP-1 (NP-1) действа като ко-рецептор на VEGFR 2, тези субстанции са основните анализирани молекули в настоящия дисертационен труд.

VEGF е един от най-важните регулатори на ангиогенезата във физиологични и патологични условия като ефектите, които медира, са проангиогенни. Съществува в няколко структурно свързани форми, които се обединяват в едно семейство: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарен растежен фактор (PlGF). Главен медиатор на туморната неоангиогенеза е VEGF-A или само VEGF. Семейството на VEGF провежда ангиогенни сигнали чрез тирозинкиназни рецептори (VEGFR 1 и 2) и играе първостепенна роля в регулирането на неоангиогенезата. VEGF сигнализира главно чрез VEGFR 2, който е експресиран най-вече в ендотелните клетки, участващи в ангиогенезата и в циркулиращите костномозъчни прогениторни ендотелни клетки. VEGFR 2 се свързва с VEGF-A и VEGF-C и така играе ролята на първичен рецептор, задвижващ ангиогенезата в нормални условия и при болест.

Биологични функции на VEGFR. VEGF упражнява действието си чрез VEGFR 1 и 2. Афинитетът на VEGF за VEGFR 1 е десетократно по-висок от този за VEGFR 2, но силата на предавания сигнал през VEGFR 1 е изключително слаба. Разработен е модел, при който VEGFR 1 действа като рецептор-примамка и модулира ангиогенезата чрез секвестриране на VEGF и редуциране на предаването на сигнали през VEGFR 2.

Биологични функции на VEGF. VEGF индуцира екстравазация на макромолекули през ендотелноклетъчната бариера и предизвиква вазодилатация чрез индуциране на ендотелноклетъчната азотен оксид синтетаза. Модулира миграцията на ендотелните клетки, а *in vivo* индуцира процеса на ангиогенеза, едновременно с микроваскуларния пермеабилитет.

Биологични функции на циркулиращи изоформи на VEGF. Изоформите на VEGF се свързват VEGFR 2 и за някои от тях се описва връзка с преживяемостта. Биологично най-активни са VEGF 121 и VEGF 165. VEGF 121 се счита за най-проангиогенен и туморогенен от всички изоформи. Клиничното значение на циркулиращите или тъканните нива на VEGF остава с неизяснена роля и се препоръчва провеждане на опити върху потенциална предиктивна стойност на VEGF.

Биологични функции на невропилин. Невропилините участват като ко-рецептори на VEGFR 2 в провеждането на сигналната трансдукция на VEGF. Невропилин (NP) е белтък без собствена тирозинкиназна активност и се свързва с VEGF 165, модулирайки процеса на ангиогенеза. NP-1 изпълнява роля на рецептор на VEGF. От изоформите на VEGF само VEGF 165 се свързва към NP.

Предиктивни биомаркери. Всички, одобрени до момента или подлежащи на скорошно одобрение от FDA или ЕМА антиангиогенезни субстанции, са прицелни молекули, таргетиращи сигналния път на VEGF – те или блокират лиганда на VEGF (*bevacizumab*, *aflibercept*), или инхибират тирозинкиназните рецептори (*sorafenib*, *sunitinib*, *vandetanib*, *razopanib*, *axitinib* и *regorafenib*). Измерването им в кръвта в предклинични модели е използвано за уточняване на оптималната биологична доза на анти-VEGFR 2 таргетни агенти. Наскоро *Van Cutsem* демонстрира как високо плазмено ниво на VEGF и туморен NP-1 са позитивни предиктори за *bevacizumab* при болни с авансирал карцином на стомах. Въпреки данните, че повишените вътретуморни или серумни нива на VEGF се свързват с лоша прогноза, клиничните изпитвания с анти-VEGF моноклоналното анти тяло *bevacizumab* не показаха връзка с нивата на ангиогенния фактор преди лечение и противотуморната ефективност. От друга страна, изходните нива на циркулиращия VEGF се свързват с по-кратко време без прогресия и обща преживяемост, независимо от лечението с *bevacizumab*. Не се регистрира корелация между циркулиращите плазмени нива на VEGF и вътретуморната експресия на VEGF.

Антиангиогенезно лечение при метастатичен дебелочревен карцином. Състои се от добавяне на *bevacizumab/aflibercept* към системното лечение, като полза от *bevacizumab* се регистрира независимо от линията химиотерапия. Други анализи се фокусират върху профила на безопасност, съобщавайки, че добавянето на *bevacizumab* води до увеличаване честотата на свързаните с него усложнения и смъртност – кръвоизливи, неутропения, стомашночревна перфорация и артериална хипертония.

Нерешени проблеми. Въз основа на детайлен литературен обзор се установява, че добавянето на *bevacizumab* към първа линия химиотерапия при авансирал или метастатичен дебелочревен карцином води до подобряване на преживяемостта без прогресия и честотата на туморен отговор. Все още липсва ясна представа за потенциални предиктивни маркери за режими, съдържащи *bevacizumab*, при метастатичен дебелочревен карцином и в клиничната практика няма утвърдени биомаркери, които да селектират пациенти с потенциална полза от такова лечение. Търсене на корелация между нива на общия VEGF, разтворимите му изоформи VEGF 121 и 165 в плазма, както и туморната експресия на NP-1 и VEGFR, би могло да доведе до утвърждаване на лесна и достъпна методика за клинична селекция, а определянето на предиктивната им стойност – до адекватен подбор за подходяща химиотерапия със/без комбинирано приложение на *bevacizumab*.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Въз основа на сегашното състояние на проблема, изложен в литературния обзор и наличието на все още неразрешени научно-клинични аспекти, ние формулираме следната работна хипотеза: Съществуват корелации между изходната туморна експресия на невропилин (NP-1) и VEGFR 2, изходните и проследяваните плазмени нива на общия VEGF и циркулиращите изоформи VEGF 121 и 165 при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином и степента на терапевтичен отговор и преживяемостта без прогресия след системна химиотерапия в комбинация с антиангиогенезно лечение с *bevacizumab*.

Базирайки се на тази хипотеза, настоящото изследване формулира следната цел:

Да се проучат тъканни и плазмени параметри, свързани с VEGF-сигналния път, като предиктивни биомаркери при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином и възможността им за клинична употреба като предиктори за първа линия *bevacizumab*-съдържаща системна антитуморна терапия.

За постигане на поставената цел се формулират следните изследователски задачи:

- 1) Проследяване и сравнителен анализ на два крайни показателя (точки) в подгрупи, третирани със и без *bevacizumab*: (i) преживяемост без прогресия и (ii) честота на общ отговор.
- 2) Определяне на изходни плазмени концентрации на общ VEGF и негови разтворими плазмени изоформи (VEGF 121 и 165) и мониториране на нивата им след 2-4 цикъла антитуморна терапия с антиангиогенезно лечение.
- 3) Определяне на изходни нива на тъканна туморна експресия на NP-1 и VEGFR 2.
- 4) Сравнителна оценка на корелационната зависимост между стойностите на изследваните плазмени и тъканни биомаркери и крайните показатели (преживяемост без прогресия и честота на общ отговор) в подгрупи, третирани със и без *bevacizumab*.
- 5) Проследяване и анализиране на сериозни странични събития от *bevacizumab*-съдържаща системна антитуморна терапия.

III. КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ

1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

- Клиника по Медицинска Онкология, Университетска болница “Света Марина” – Варна
- Катедра по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология – Медицински Университет и Университетска болница “Света Марина” – Варна
- Лаборатория по Клинична имунология към Катедра по медицинска генетика, Медицински Университет и Университетска болница “Света Марина” – Варна

2. Пациентска популация

Проведохме проспективно неинтервенционално едноцентрово клинично изпитване. Включени са пациенти с метастатичен дебелочревен карцином, индициран за първа линия системна химиотерапия; може да са получавали адювантна химиотерапия в миналото, но не са лекувани за метастатична болест и не са получавали антиангиогенезно лечение. Трябва да са в добро общо състояние, което е оценено според скалата на ECOG - пърформанс статус < 2. Всички 54 пациенти, участващи в изпитването, имат хистологично потвърдена онкологична диагноза метастатичен дебелочревен аденокарцином в стадий IV според 7^{мо} издание на AJCC (*American Joint Committee on Cancer*). При всички пациенти е проведено радикално хирургично отстраняване на първичния тумор в дебело черво. Пациентите са били подходящи за провеждане на системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab* като първа линия лечение и са проследявани за период до 2 години – първият пациент е включен на 15 февруари 2013 и проследяването на последния пациент е до 1 август 2015. Преди включване в клиничното изпитване, всички пациенти са подписали информирано съгласие за участие и отделно информирано съгласие за събиране на биологичен материал (плазма, парафинови срези от първичния тумор). Набиране и системно лечение на пациенти е осъществявано единствено в Клиника по медицинска онкология към УМБАЛ „Света Марина“ - Варна и в изпитването са взели участие всички съгласили се и подписали информирано съгласие пациенти за двугодишен период - от 15 февруари 2013 до 15 февруари 2015.

3. Рутинни клинични изследвания и биологични маркери

Параметрите за изследване и проследяване са предварително дефинирани и проспективно събирани в рамките на изпитването. Провеждани са следните процедури:

3.1. Анамнеза и клиничен преглед.

3.2. Кръвни проби за хематологичен и биохимичен рутинен анализ, както и изследване на карциноембрионален антиген.

3.3. Образна диагностика - КТ, ПЕТ/КТ като изходни изследвания и контрола при проследяване в хода на системно лечение.

3.4. Периферна венозна кръв за анализ на плазма и следните предварително дефинирани биомаркери: общ VEGF, циркулиращи форми VEGF 121 и VEGF 165.

3.5. Туморно блокче от първичния тумор за хистологичен анализ и молекулярно-патологичен анализ на RAS, стандартно оцветяване с хематоксилин-еозин и оцветяване за оценка туморна експресия на NP-1 и VEGFR 2.

4. Медицинска история на пациентите

За всеки пациент в изпитването е създадено отделно медицинско досие, включващо следната информация:

Демографски данни

Имена:

ID номер / дата на раждане:

Възраст: под 65 години и над 65 години

Пол: мъж / жена

Медицинска история

Пърформанс статус/ECOG:

Придружаващи болести:

5. Информация за онкологичната болест

Клинична диагноза: локализация на първичния тумор, TNM стадиране, степен на диференциация

Дата на операция:

Обем на хирургия:

Хистологичен резултат: номер, дата

Локализация на първичния тумор:

Локализация на далечни метастази / рецидив и брой засегнати органи: 1 или повече от 1 засегнат от метастатична болест орган

Молекулярно-патологичен анализ на RAS: липсваща/ налична мутация, както и вид RAS мутация

Дата на започване на първа линия химиотерапия:

Вид, продължителност на първа линия химиотерапия:

Изходни и контролни образни изследвания: КТ, ПЕТ/КТ, оценка по RECIST 1.1

Продължителност на първа линия химиотерапия:

Преживяемост без прогресия на болестта:

6. Специфични методи на изследване

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) методика за изследване концентрация на свободни форми на общ VEGF, както и циркулиращи VEGF 121 и 165 в плазмени проби.

6.1. Венепункция на 5 ml кръвна проба за изолиране на плазма е вземана при всички пациенти (n=54) изходно, а при всички пациенти, лекувани с ХТ + *bevacizumab* (n=31), е взета и втора контролна кръвна проба след 3 месеца лечение. Всички проби са обработвани в Имунологична лаборатория на УМБАЛ „Света Марина“, Варна. Измервани са нива на общ VEGF, VEGF 121 и VEGF 165; използван е метод *ELISA* с готови за употреба китове според инструкциите на производителя. Нивата на общ VEGF са изследвани с *ELISA Kit*, каталожен номер *KHG0111 (Invitrogen, САЩ)*, нивата на VEGF 121 са изследвани с човешки VEGF 121 *ELISA* кит, каталожен номер *CSB-E13709h (Cusabio, Китай)* и VEGF 165 с човешки VEGF 165 *ELISA* кит, каталожен номер *CSB-E13100h (Cusabio, Китай)*.

Вземане, съхранение и обработка на тъканни проби за туморни тъканни биомаркери и интерпретация на резултатите.

6.2. Туморните тъканни биомаркери са изследвани в клиника Обща и Клинична патология на УМБАЛ „Света Марина“, Варна. При всички пациенти (n=54) е взета тъкан от първичния тумор и приготвените срези са оцветени по протокол *FLEX* чрез автоматичен оцветител *Dako Autostainer/Autostainer Plus*. Пробите са изследвани имунохистохимично с рекомбинантно моноклонално заешко антитяло *EPR3113* за NP-1 (*Abcam's RabMAb[®] technology*) и с поликлонално заешко антитяло за VEGFR 2 (*Thermo Scientific*). Определени са нива на експресия на VEGFR 2 и Neuropilin-1. Всички срезове са контролно оцветени с Майеров хематоксилин за морфологично потвърждаване.

6.2.1. VEGFR 2 и Neuropilin-1 - нива на експресия и интерпретация на резултатите.

Позитивно оцветяване се отчита при наличие на цитоплазмено оцветяване в кафява оцветка. Измерени са процент (P) и интензивност (I) на оцветяване за VEGFR 2 и NP-1; позитивните туморни клетки се интерпретират чрез полу-количествен анализ. Получените резултати за процент оцветени клетки (P) и интензивност на тяхното оцветяване (I) са сумирани в общ скор, който е дихотомно разделен според медианата на пробите (всички случаи над медианата са отразявани като високи експресионни нива, а тези под медианата – като ниски експресионни нива).

7. Клинична и патологична стратификация на пациентската популация (подгрупи)

Следните клинични данни са събирани: демографски данни (имена, възраст при диагностициране, пол и др.), дата на хирургично лечение, вид хирургично лечение, локализация на първичен тумор и TNM класифициране, локализации на метастатична болест и брой засегнати органи, общо състояние според ECOG.

Следните патологични данни са събирани: характеристика на тумора – хистология, степен на диференциация и патоанатомична TNM класификация, определяне на мутационен статус на *RAS* и вид *RAS*-мутация.

Изходните клинични и патологични характеристики на пациентите са обобщени в Табл. 1.

Таблица 1. Клинични и патологични изходни характеристики на участващите пациенти с метастатичен дебелочревен карцином.

Характеристика	5-FU-базирана ХТ + Bev (n = 31)	5-FU-базирана ХТ (n = 23)
Възраст при диагноза		
Средна	62.5	64.8
Възрастова граница	37-81	59-81
Разпределение по пол, %		
	Жени 45.1 Мъже 54.9	Жени 65.2 Мъже 34.8
Общо състояние ECOG, %		
0	41.9	49.2
1	49.9	44.0
2	8.2	5.8
Локализация на първичен тумор, %		
Възходящо дебело черво	32.26	30.44
Напречно дебело черво	16.13	13.04
Низходящо дебело черво	38.71	34.78
Ректум/сигма	12.9	21.74
Локализации на метастатична болест, %		
Черен дроб	70.9	65.4
Бял дроб	19.4	16.3
Брой засегнати органи от метастатична болест, %		
Метастази в 1 орган (M1a)	41.9	60.9
Изолирано чернодробно засягане	25.8	21.7
Изолирано белодробно засягане	9.7	8.7
Други локализации	6.4	8.7
Метастази в повече от 1 орган (M1b)	58.1	39.1
Мутационен статус на RAS, %		
	RAS WT 35.4 RAS M+ 48.3 Неадекватен материал за генетично изследване 16.3	RAS WT 60.9 RAS M+ 26.1 Неадекватен материал за генетично изследване 13.0
Вид RAS-мутация, %		
Екзон 2 (кодон 12 или 13)	29	17.4
Екзон 3 (кодони 59 или 61)	12.9	8.7
Екзон 4 (кодони 117 или 146)	6.4	-

Използвани съкращения: ХТ – химиотерапия; bev – bevacizumab; WT – мутационен статус див тип; M+ - мутационен статус мутирал тип.

7.1 Клинична стратификация и разпределение по групи

В настоящето проучване са обхванати и анализирани общо 54 пациента с дебелочревен карцином, лекувани с първа линия системна ХТ +/- *bevacizumab*. 31 от пациентите са получили лечение с химиотерапия в комбинация с *bevacizumab* (ХТ + *bevacizumab*) като първа линия системно лечение за метастатична болест. 23 от пациентите съставляват контролната група, в която лечение е само системна ХТ без антиангиогенезно лечение. Включени са всички съгласили се да участват в изпитването пациенти, които отговарят на включващите и изключващите критерии.

Предварително определените биомаркерни анализи включват изследване на три плазмени биомаркера (общ VEGF, VEGF 121 и VEGF 165) и два тъканни туморни биомаркера (NP-1 и VEGFR 2), изследвани от първичните дебелочревни карциноми.

7.2 Клинико-морфологична характеристика на пациентите, участващи в изследването на тъканните биомаркери

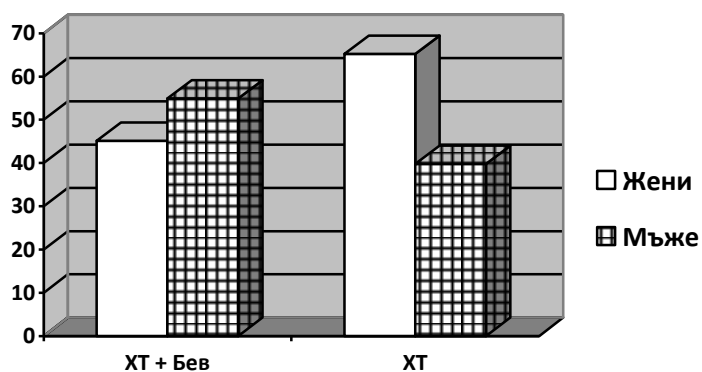
При всички пациенти с метастатичен дебелочревен карцином (n=54) са изследвани нива на експресия на VEGFR 2 и NP-1 от туморна тъкан от първичните тумори.

7.3 Клинико-морфологична характеристика на пациентите, участващи в изследването на плазмените биомаркери

В изследването на биомаркерите в кръвна плазма взеха участие 54 пациента с метастатичен дебелочревен карцином. Изследвани са изходните плазмени концентрации на общ VEGF, циркулиращите му изоформи VEGF 121 и 165. При групата на лечение в комбинация ХТ + *bevacizumab*, плазмените нива на общ VEGF и циркулиращите изоформи VEGF 121 и 165 са измерени и в динамика след 2-4 цикъла лечение (3 месеца).

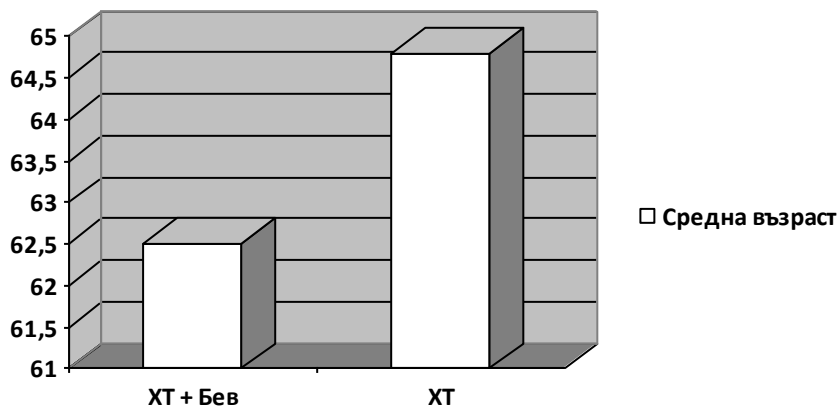
7.4 . Разпределение по групи

Разпределението по пол на лицата е в полза на мъжете (54.9 %) в групата с ХТ + *bevacizumab*, а в групата без антиангиогенезно лечение е в полза на жените (65,2 %) (фигура 1).



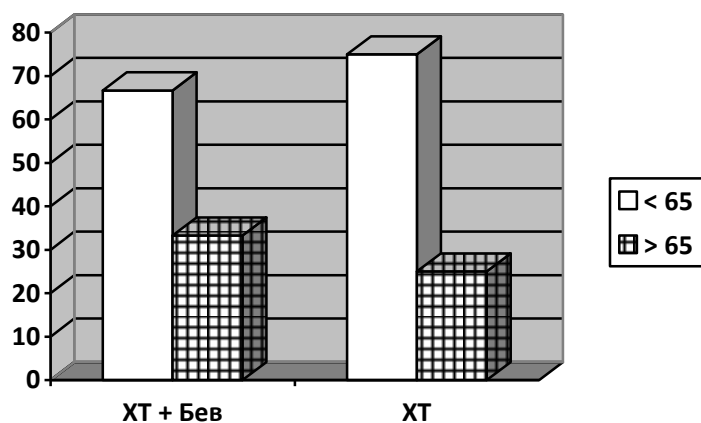
Фигура 1. Разпределение по пол на пациентите, участващи в биомаркерния анализ.

Средната възраст на участниците с комбинирано лечение е 62,5 години с минимална възраст 37 г. и максимална - 81 г. Средната възраст на участниците на лечение само с химиотерапия е 64,8 години с минимална възраст 59 г. и максимална - 81 г. (Таблица 1, фигура 2).



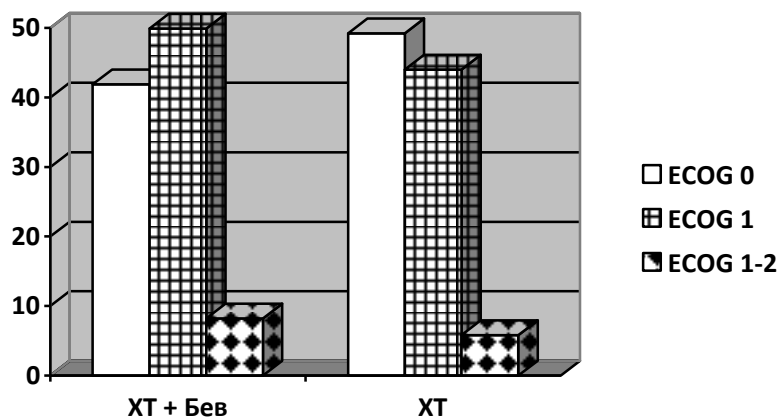
Фигура 2. Разпределение по средна възраст на пациентите, участващи в биомаркерния анализ.

По-голяма част от пациентите, лекувани със системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab*, са на възраст под 65 години (66.7%), докато в групата, лекувана само с химиотерапия, по-младата възрастова група съставлява 75% (фигура 3).



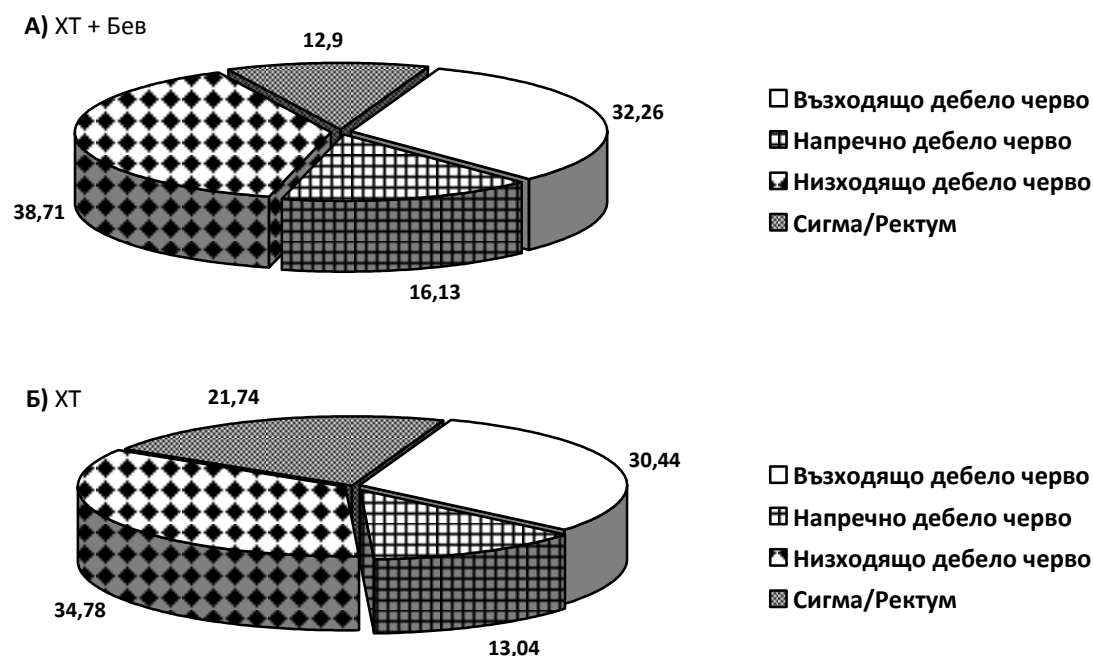
Фигура 3. Разпределение по възраст на пациентите (под 65 години и над 65 години), участващи в биомаркерния анализ.

В изпитването са включени пациенти с общо състояние < 2, оценено по скалата на ECOG. Основната част от пациентите са с ECOG 1 в групата с комбинирано лечение (49.9%), следвани от тези с ECOG 0 (41.9%). В групата на лечение само с химиотерапия доминира броят на пациентите с ECOG 0 (49.2%), следвани от тези с ECOG 1 (44.0%). И в двете групи най-малък е броят на пациентите с гранично за провеждане на системно лечение общо състояние – ECOG 1-2, съответно 8.2% за комбинирано лечение и 5.8 % за групата, лекувана само със системна ХТ (фигура 4).



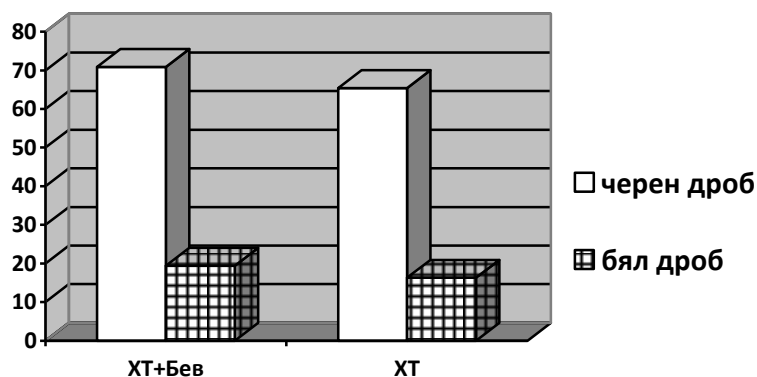
Фигура 4. Разпределение по общо състояние според скалата на ECOG на пациентите, участващи в биомаркерния анализ.

Първичната локализация на колоректалния карцином е с най-чест произход от низходящо дебело черво и в двете групи пациенти - 38.71% за групата с комбинирано лечение ХТ + *bevacizumab* (n=12) и 34.78% (n=8) за групата на лечение само с химиотерапия, следвани от пациентите с първичен карцином във възходящо дебело черво – съответно 32.26% (n=10) и 30.44% (n=7). В групата с комбинирано лечение ХТ + *bevacizumab* най-нисък е процентът на пациенти с първична локализация в ректум/сигма (12.9%) (n=4), следван от тези с първичен карцином в напречното дебело черво (16.13%)(n=5). В групата на лечение само с химиотерапия, най-нисък е процентът на пациенти с първична локализация в напречно дебело черво (13.04%)(n=8), следван от тези с ректо/сигма карцином (21.74%) (n=5) (фигура 5 А и Б).



Фигура 5. Разпределение на пациентите, участващи в биомаркерния анализ, според локализацията на първичния тумор. А) група с комбинирано лечение ХТ + *bevacizumab*; Б) група на лечение само с химиотерапия

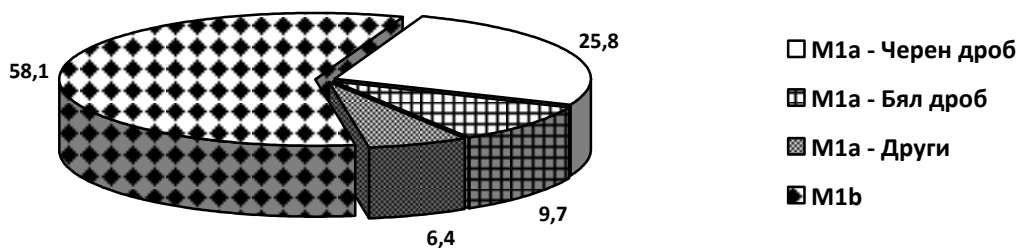
Основна локализация на метастатичната болест и в двете групи е черен дроб (70.9 и 65.4% съответно за комбинирано и моно-ХТ лечение). Като втора по честота метастатична локализация е засегнат бял дроб, съответно в 19.4 и 16.3% от случаите в двете групи (фигура 6).



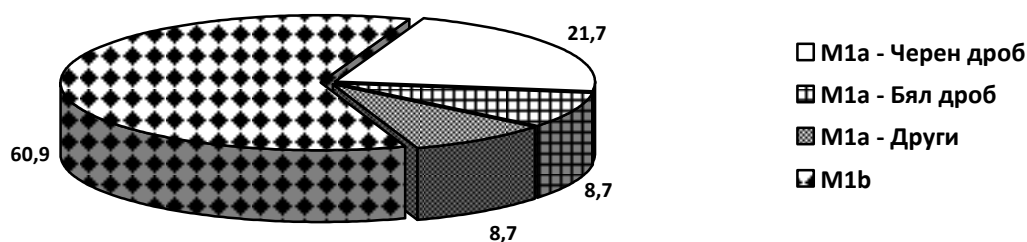
Фигура 6. Разпределение по локализация на метастатичната болест на пациентите, участващи в биомаркерния анализ.

Пациентите в групата на комбинирано лечение с ХТ + *bevacizumab*, при които има засягане само на един орган от метастатичната болест (M1a), са 41.9 %, докато тези, при които метастатичната болест засяга повече от 1 орган (M1b), са 58.1 %. Като основна локализация на метастатичната болест е черен дроб (25.8 %), следван от бял дроб (9.7 %) и други локализации - лимфни възли и перитонеум (6.4 %). Пациентите в групата само с ХТ, при които има засягане от метастатичната болест само на един орган (M1a), са 60.9 %, докато тези, при които метастатичната болест засяга повече от 1 орган (M1b), са 39.1 %. Като основна локализация на метастатичната болест е черен дроб (21.7 %), следван от бял дроб (8.7 %) и други локализации - лимфни възли (8.7 %). (фигура 7).

А) ХТ + Бев

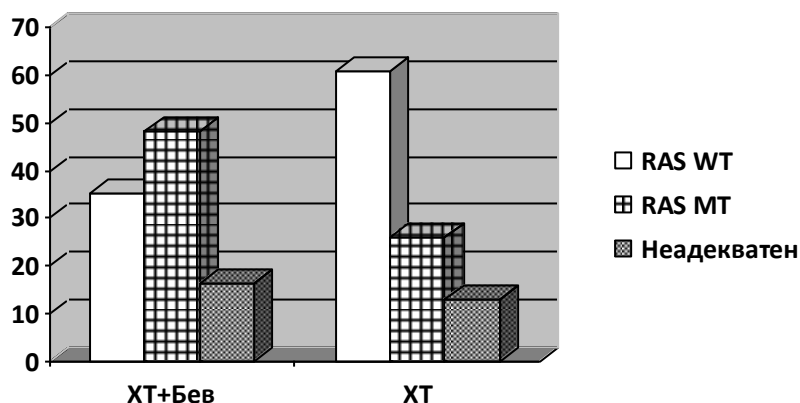


Б) ХТ



Фигура 7. Разпределение по брой засегнати органи от метастатичната болест на пациентите, участващи в биомаркерния анализ. А) група с комбинирано лечение ХТ + *bevacizumab*; Б) група на лечение само с химиотерапия

Логично е и разпределението според молекулярнопатологичния статус на гена *RAS* – в групата на комбинирано ХТ + *bevacizumab* лечение 48.3 % от пациентите са с мутирал статус на *RAS* и 35.4% са без мутация, докато в групата, лекувана само с ХТ, 26.1% са с мутирал статус и 60.9% са без мутация (фигура 8). И в двете групи е значителен броят на пациентите, при които материалът от първичния или метастатичния тумор е бил неадекватен за генетично изследване - съответно 16.3% в групата на комбинирано лечение и 13.0% за групата на лечение само с ХТ.

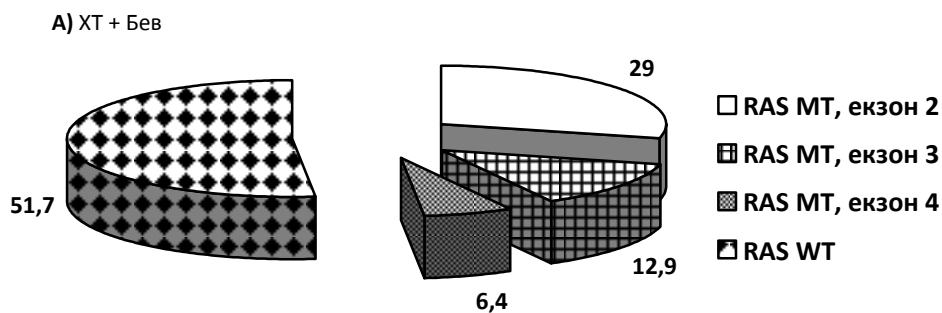


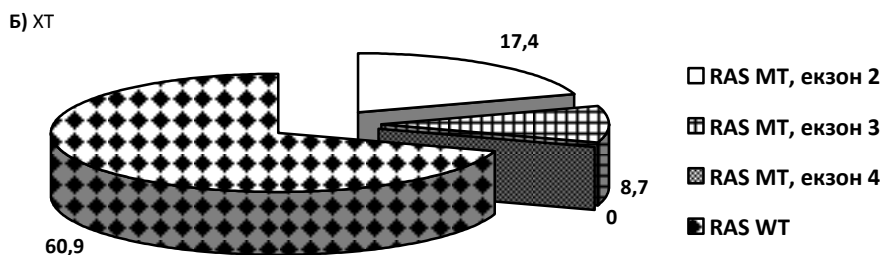
Фигура 8. Разпределение според молекулярнопатологичен анализ на *RAS* на пациентите, участващи в биомаркерния анализ.

Използвани съкращения: *RAS WT*: див тип статус на гена *RAS*; *RAS M+*: мутирал статус на гена *RAS*.

Мутации в *RAS* са открити в екзони 2, 3 и 4, като най-често е открита мутация в *RAS* в екзон 2, кодон 12 или 13 – 29 % от пациентите в групата на комбинирано ХТ+ *bevacizumab* лечение, в екзон 3 (кодони 59 или 61) – 12.9 % и най-рядка е в екзон 4 (кодони 117 или 146) – 6.4 % (таблица 1, фигура 9 А).

Сред пациентите в групата, лекувана само с ХТ, най-честа *RAS* мутация отново е в екзон 2, кодон 12 или 13 – 17.4 % от пациентите, следвана от мутации в екзон 3 (кодони 59 или 61) – 8.7%. Не са открити мутации в екзон 4, кодони 117 или 146 (таблица 1, фигура 9 Б).





Фигура 9. Разпределение според вид мутации в RAS при пациентите, участващи в биомаркерния анализ.
 А) група с комбинирано лечение ХТ + bevacizumab; Б) група на лечение само с химиотерапия

Използвани съкращения: RAS WT: див тип статус на гена RAS; RAS M+: мутирал статус на гена RAS.

8 Избор и продължителност на системна анти туморна терапия

При всички пациенти са проведени минимум 3 месеца системно лечение. Видовете химиотерапевтично лечение и използвани схеми са обобщени в Табл. 2.

Таблица 2. Използвани терапевтични режими за първа линия системна ХТ +/- bevacizumab.

Вид системно лечение	Доза	Начин на приложение	Ритъм на приложение
FOLFOX4 (± Bevacizumab)			
През 14 дни			
Oxaliplatin	85 mg/m ²	IV, 120 минути	Ден 1
Leucovorin	200 mg/m ²	IV, 120 минути	Дни 1 + 2
Fluorouracil	400 mg/m ²	IV bolus, последвани от	
Fluorouracil	600 mg/m ²	IV, 22 часова инфузия	Дни 1 + 2
± Bevacizumab	10 mg/kg	30-90 минути	Ден 1
FOLFIRI (± Bevacizumab)			
През 14 дни			
Irinotecan	180 mg/m ²	IV, 30-90 минути	Ден 1
Leucovorin	200 mg/m ²	IV, 120 минутна инфузия	Дни 1 + 2
Fluorouracil	400 mg/m ²	IV bolus, последвани от	
Fluorouracil	600 mg/m ²	IV, 22 часова инфузия	Дни 1 + 2
± Bevacizumab	10 mg/kg	30-90 минути	Ден 1
XELOX (± Bevacizumab)			
През 21 дни			
Oxaliplatin	85 mg/m ²	IV, 120 минути	Ден 1
Capecitabine	2000-2500 mg/m ²	р.о.	Дни 1 - 14
± Bevacizumab	15 mg/kg	30-90 минути	Ден 1
Capecitabine ± Bevacizumab			
През 21 дни			
Capecitabine	2000-2500 mg/m ²	р.о.	Дни 1 - 14
± Bevacizumab	15 mg/kg	30-90 минутна инфузия	Ден 1

Съкращения: FOLFOX - oxaliplatin, fluorouracil u leucovorin; FOLFIRI – irinotecan, fluorouracil u leucovorin; XELOX – oxaliplatin, capecitabine; IV – интравенозно приложение; p.o. – прием през устата.

9 Образна оценка на терапевтичен отговор, модели на отговор и определяне на крайни показатели (точки)

Образна оценка на болестта е проведена изходно преди първа линия лечение; оценка на терапевтичен отговор е регулярно и ритмично провеждана – на всеки 4-6 цикъла лечение (3 месеца) по време на лечението с химиотерапия/*bevacizumab*, до регистриране на прогресия на болестта според RECIST 1.1 или при поява на клинични симптоми. Като образни методики е провеждана КТ на гръден кош, корем (и други зони при нужда от оценка на други таргетни лезии) или ПЕТ/КТ. Всички пациенти имат мерими лезии според Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1 (RECIST 1.1); оценката е провеждана по тези критерии. В хода на системно лечение са определени следните параметри: преживяемост без прогресия (PFS), ниво на отговор и обща преживяемост, където това може да бъде определено. PFS се дефинира като времето от назначаване на лечение до времето на регистриране на прогресия на болестта чрез образните методики, оценени спрямо критериите на RECIST 1.1.

Отговор към лечение се дефинира като пълен отговор (CR), частичен отговор (PR) или стабилна болест (SD). Пациентите са проследени за период от 2 години след началото на първа линия системно лечение, смърт или 1 Август 2015.

Тези критерии са въведени за дефиниране и уеднаквяване с цел съпоставимост на критериите за отговор от провеждано химиотерапевтично лечение. Всички измервания са отчитани в метрична система в мм/см. Изходното изследване и измерване е извършвано възможно най-близо до началото на лечението и максимум четири седмици преди начало на лечението. Изходно всички туморни лезии са категоризирани по следния начин:

- мерими лезии - лезии, които могат да се измерват точно в най-малко едно измерение (отбелязва се дългият размер) като ≥ 20 mm с конвенционални техники или като ≥ 10 mm със спирална КТ;
- немерими лезии - всички други лезии, включително малки лезии (дълъг размер < 20 мм с конвенционални техники или <10 мм с спирална КТ и наистина неизмерими лезии). За немерими лезии се считат следните: костни лезии, свободни изливи - асцит, плеврален / перикарден излив, белодробен или кожен лимфангит.

Таблица 3. Видове отговор към провежданото лечение спрямо оценката на таргетни/нетаргетни лезии.

Таргетни лезии	Нетаргетни лезии	Нови лезии	Общ отговор
CR	CR	Не	CR
CR	Непълен отговор/SD	Не	PR
PR	Non-PD	Не	PR

SD	Non-PD	Не	SD
PD	Всяка	Да или Не	PD
Any	PD	Да или Не	PD
Any	Всяка	Да	PD

Отговор към лечение = CR + PR + SD

Използвани съкращения: CR = пълен отговор; PR = частичен отговор; SD = стабилна болест; PD = прогресия на болестта.

Възможните типове отговор към провежданото лечение са систематизирани в таблица 3 и се отчитат като:

1. CR или пълен отговор - изчезване на всички таргетни лезии;
2. PR или частичен отговор - най-малко 30% намаляване на общия сбор от най-дългите размери на таргетните лезии спрямо изходното измерване или поредна контрола с най-малкия сбор на тези диаметри;
3. PD или прогресия на болестта - поне 20% увеличение в размера на сбора от най-дългите диаметри на таргетните лезии спрямо най-малката сума спрямо изследването (изходно или контрола в хода на лечение). Като PD се счита и появата на една или повече нови лезии;
4. SD или стабилна болест - нито достатъчно свиване, което да се оцени като частичен отговор, нито достатъчно увеличение, което да се оцени като прогресия на болестта, като за сравнение се взема най-малкият сбор от най-дългите диаметри на фона на провежданото лечение.

10 Статистически дизайн и анализ

Клиникопатологичните характеристики са обобщени чрез честота и проценти. Разпределението на пробите е тествано за нормалност чрез теста на *Kolmogorov-Smirnov* и е използван *unpaired t-test* за сравняване на груповите средни стойности. Последният участвал пациент е включен до 01 Февруари 2015. Дата на последно събиране на данните е 01 Август 2015. Измерени са корелациите между следните биомаркери и клинични параметри: преживяемост без прогресия (PFS), което се дефинира като времето между начало на първа линия лечение и първата документирана прогресия или регистрирана смърт; степен на отговор (SD, PD, PR, CR), която се оценява чрез критериите на RECIST 1.1. Времето до настъпване на събитието и крайните цели са анализирани по методите на Kaplan-Meier и разликите са оценени чрез log-rank тест. Разлика в $P < 0.05$ се счита за статистически значима.

Прогностичната и предиктивната стойност на всеки биомаркер е оценена чрез Cox пропорционален хазарден модел за *time-to-event end points* и логистична регресия за нивата на отговор на меримите лезии. *Cox proportional hazards models* са използвани за определяне HRs и интервал на конфиденциалност 95% CIs по отношение на групите на

лечение, нивата на изследваните биомаркери и оценка на взаимодействието между провежданото лечение и съответния биомаркер. Проведени са ковариационни допълнителни модели, които включват стратифициращи фактори (пол, възраст под и над 65 години, нива на серумен маркер СЕА, първична локализация на тумора, време до прогресия).

За целите на анализа е използвана логаритмична трансформация на плазмените нива на общия VEGF, VEGF 121 и VEGF 165.

Статистическият анализ е осъществен чрез програмния пакет SPSS версия 23 и включва следните методи:

(1) Дескриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност, стандартна грешка на средната, минимални и максимални стойности, медиана.

(2) Непараметрични методи:

Kolmogorov–Smirnov Test: тест за проверка на нулевата хипотеза и определяне на типа на разпределение на стойностите с оглед подбор на параметричен или непараметричен корелационен метод за анализ.

(3) Параметрични методи:

Student t-test: тест за сравняване на средните стойности между две групи от случаи

(4) Статистическо изследване на зависимости чрез корелационен анализ:

чрез определяне коефициент на Spearman (непараметричен метод) и/или

чрез коефициент на Pearson (параметричен метод)

χ^2 -test или Fisher exact test

(5) Kaplan–Meier Test за преживяемост.

(6) Cox регресионен модел за унивариантен анализ с цел подбор на фактор с независимо прогностично значение.

(7) Алтернативен анализ за сравняване на относителни стойности.

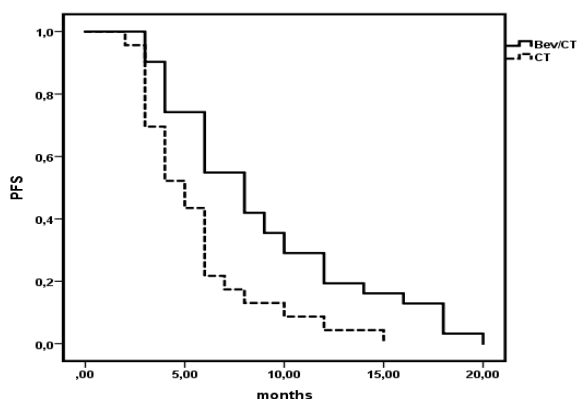
(8) Графично изобразяване на статистическите данни.

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0.05$ при доверителен интервал 95%.

IV. РЕЗУЛТАТИ

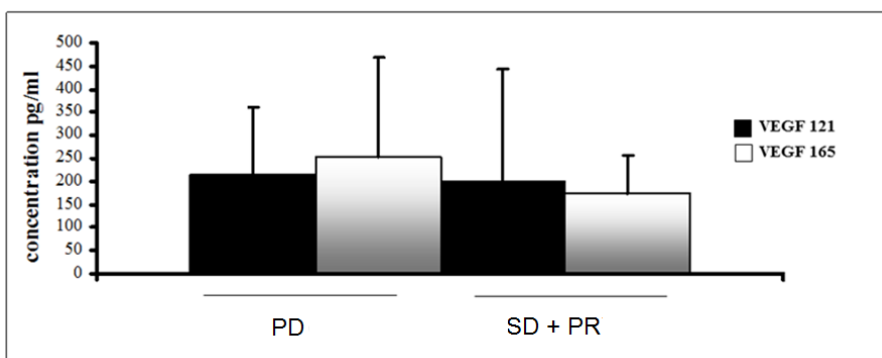
1. Оценка на терапевтична ефективност на първа линия *bevacizumab*-съдържаща системна анти туморна терапия

Нашите резултати показват, че добавянето на *bevacizumab* към първа линия системна химиотерапия достоверно удължава преживяемостта без прогресия (PFS) – 8.8 (5.84-10.15) срещу 5.4 (3.44-6.55) месеца ($p = 0.003$) (Фигура 10).



Фигура 10. Карпан-Меиер разпределение на преживяемостта без прогресия (PFS). Средната PFS за групата, лекувана с химиотерапия и *bevacizumab*, е 8.8 месеца в сравнение с групата пациенти, лекувани само с химиотерапия, където PFS е 5.4 месеца (95% CI, log-rank test $P = .003$).

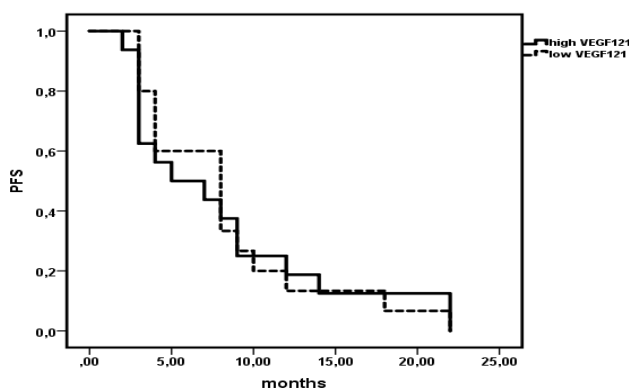
За регистриран отговор към лечение се счита постигане на частичен отговор или стабилна болест (PR+SD) и това се регистрира при 19.3% от пациентите, лекувани с комбинация от ХТ + *bevacizumab* спрямо 10.5% от пациентите, лекувани само с химиотерапия. Липсва статистически значима разлика при проведен алтернативен анализ за достоверност на разлика между което и да е странично действие степен 3 в двете групи пациенти ($t=1.81$, $p > 0.05$). Няма регистрирани случаи на пълен отговор.



Фигура 11. Концентрация на изоформите VEGF 121 и VEGF 165 в плазма, измерени в pg/ml. Измерените концентрации са разпределени спрямо отговор към приложеното лечение. Като отговор са отчетени случаите, при които е регистрирана SD + PR, тъй като не са регистрирани случаи с пълен отговор след противотуморно лечение.

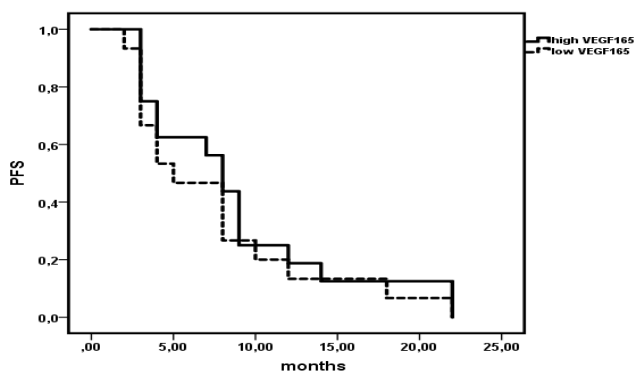
2. Корелации между плазмени нива на биомаркери и терапевтичен отговор

Средното плазмено ниво на VEGF 121 е 201.4 pg/ml (стойности от 34 pg/ml до 1112 pg/ml). Средното плазмено ниво на VEGF 165 е 205 pg/ml (стойности от 51 pg/ml до 731 pg/ml). Не е отчетена достоверна разлика между нивата на VEGF 121 и VEGF 165 в плазма преди започване на лечение при пациентите със стабилна болест и тези, при които е регистрирана прогресия на болестта на фона на лечение (Фигура 11). Не е регистрирана полза от добавяне на *bevacizumab* към системна ХТ в зависимост от плазмените нива на VEGF 121 и VEGF 165, измерени преди започване на първа линия системно лечение. Дори при пациентите, при които са измерени изходни плазмени нива на двата биомаркера над медианата, не е регистрирана сигнификантна полза от добавяне на *bevacizumab* към системна ХТ. Промяна в плазмените нива на общия VEGF, както и циркулиращите форми VEGF 121 и VEGF 165 в хода на лечение, са неинтерпретируеми поради интерференцията с нивата на изследваните биомаркери от провежданото лечение с *bevacizumab*. По тази причина информативна стойност може да бъде очаквана и интерпретирана само от изходните стойности на плазмените биомаркери преди започване на антиангиогенезно лечение с *bevacizumab*.



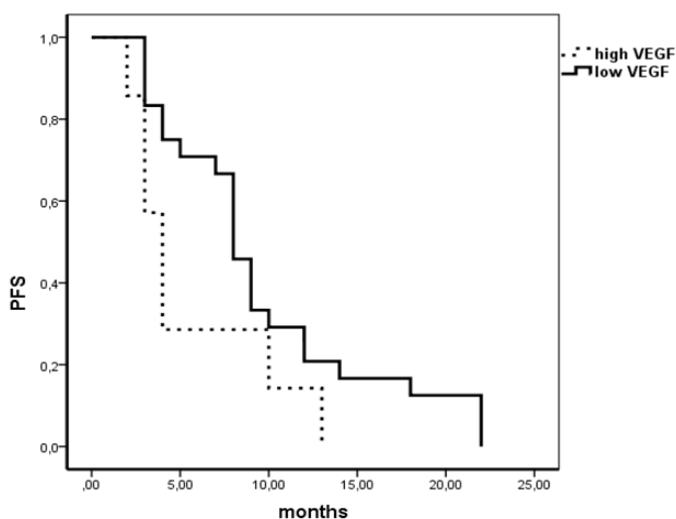
Фигура 12. Различните изходни плазмени нива на VEGF 121 преди системна ХТ (дихотомно разделени по медиана на ниски и високи нива на експресия) са без сигнификантна разлика в PFS.

Липсва сигнификантна разлика в PFS спрямо различните изходни плазмени нива на VEGF 121 преди системна ХТ (дихотомно разделени по медиана на ниски и високи нива на експресия) (Фигура 12).



Фигура 13. Различните изходни плазмени нива на VEGF 165 преди системна ХТ в комбинация с бевацизумаб (дихотомно разделени по медиана на ниски и високи нива на експресия) са без сигнификантна разлика в PFS.

Липсва сигнификантна разлика в PFS спрямо изходните плазмени нива (високи или ниски) на VEGF 165 преди системна ХТ (дихотомно разделени по медиана на ниски и високи нива на експресия) (Фигура 13).



Фигура 14. Различните изходни плазмени нива на общия VEGF преди системна ХТ (дихотомно разделени по медиана на ниски и високи нива на експресия) са без сигнификантна разлика във PFS, но е налице тенденция към по-кратка преживяемост при болните с високи плазмени нива на VEGF (log rank $p=0.09$, CI 95%).

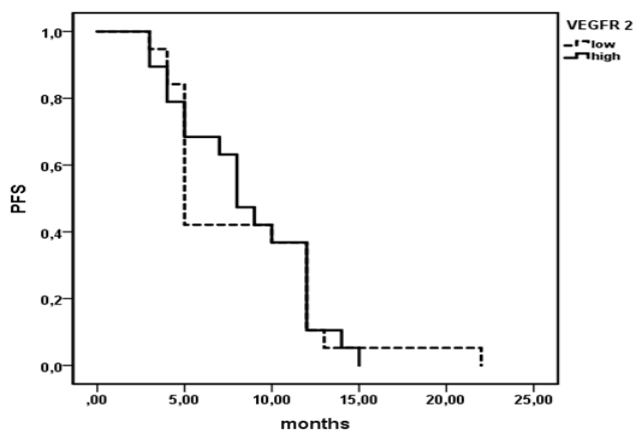
Липсва сигнификантна разлика в PFS спрямо различните изходни плазмени нива на общия VEGF (дихотомно разделени по медиана на ниски и високи нива на експресия) въпреки тенденцията към по-кратка преживяемост при болните с високи плазмени нива на VEGF (Фигура 14).

3. Корелации между тъканни биомаркери и терапевтичен отговор

Тъкан, фиксирана в парафинови блокчета от първичните тумори, е изследвана за експресия на VEGFR 2 или NP-1 при всички изследвани 54 пациента с метастатичен дебелочревен карцином, провели първа линия системна ХТ +/- *bevacizumab*. Клиничните и патологични изходни характеристики на участващите пациенти са обобщени в таблица 1. Направено е дихотомно разделение на две групи според нивата на експресия на всеки отделен биомаркер – високи и ниски нива на тъканна експресия (VEGFR 2 или NP-1). PFS е сравнена между получените две групи пациенти и е разпределена чрез Kaplan-Meier криви.

3.1 PFS спрямо нива на тъканна експресия на VEGFR 2 в първичния дебелочревен карцином

Пациентите с високи нива на експресия на VEGFR 2 в туморна тъкан от първичния тумор не показват статистическа разлика в PFS в сравнение с тези с ниска експресия на VEGFR 2. (Фигура 15).

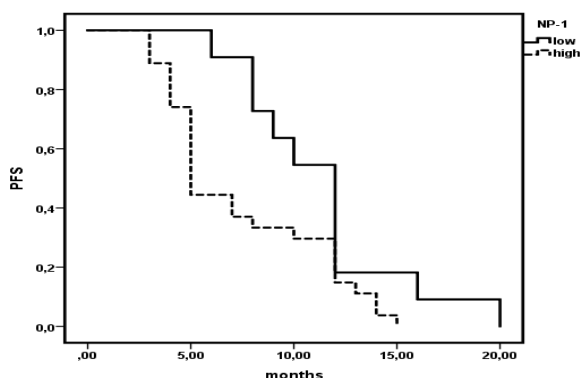


Фигура 15. Карпан-Мејер криви на PFS според изходните нива на тъканна туморна експресия VEGFR 2 в първичния тумор (дихотомно разделени по медиана на ниски и високи нива на експресия). Липсва разлика в медианната PFS между двете групи (с високи и ниски нива на експресия на VEGFR 2). (95% CI, log-rank test P = .968).

3.2 PFS спрямо нива на тъканна експресия на NP-1 в първичния дебелочревен карцином

При пациентите с ниски нива на експресия на NP-1 в първичния тумор, лекувани с ХТ + *bevacizumab*, е налице достоверна разлика в PFS в сравнение с тези с високи нива на експресия (log rank test $p = 0.017$). Пациенти с ниски нива на експресия на NP-1 в тъкан от първичния тумор имат по-голяма полза от комбинирано лечение с ХТ + *bevacizumab* по отношение на PFS (HR 0.333, 95% CI, 0.111 to 0.995) спрямо пациенти с високи нива на експресия на NP-1 (Фигура 16).

Пациентите с ниски нива на експресия на NP-1 в първичния тумор, лекувани с ХТ + *bevacizumab*, имат значима разлика в PFS в сравнение с тези с високи нива на експресия (log rank test $p = 0.017$) (Фигура 16). Сох-регресионният модел показва, че пациенти с ниски нива на експресия на NP-1 в тъкан от първичния тумор имат по-голяма полза от комбинирано лечение с ХТ + *bevacizumab* по отношение на PFS (HR 0.333, 95% CI, 0.111 to 0.995) спрямо пациенти с високи нива на експресия на NP-1.



Фигура 16. Карпан-Мејер криви на PFS спрямо тъканните нива на експресия на NP-1 в първичния тумор при пациенти с дебелочревен карцином (дихотомно разделени по медиана на ниски и високи нива на експресия). Налице е статистическа разлика между медианната PFS в групите с ниски и високи нива на експресия на NP-1 (95% CI, log rank test $p = .017$).

Има статистическа разлика между медианната PFS в групите с ниски и високи нива на експресия на NP-1, лекувани със системна ХТ +/- *bevacizumab* (95% CI, log rank test $p = .017$).

4. Корелации между VEGF-биомаркери и други клиникопатологични характеристики

4.1 Корелации между VEGF-биомаркери и изходен серумен СЕА

Таблица 4. Връзка между серумни нива на СЕА и нива на тъканна експресия на NP-1 от първичен тумор при пациенти с дебелочревен карцином, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab*.

СЕА срещу NP-1					
			NP-1		Общо
			Ниска експресия	Висока експресия	
СЕА	Ниски серумни нива	Брой пациенти	8	10	18
	Високи серумни нива	Брой пациенти	4	9	13
Общо			12	19	31

Липсва връзка между нивата на тъканна експресия на NP-1 и стойностите на серумния туморен маркер СЕА при пациенти, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab* (Fisher's Exact Test, $p = 0.128$).

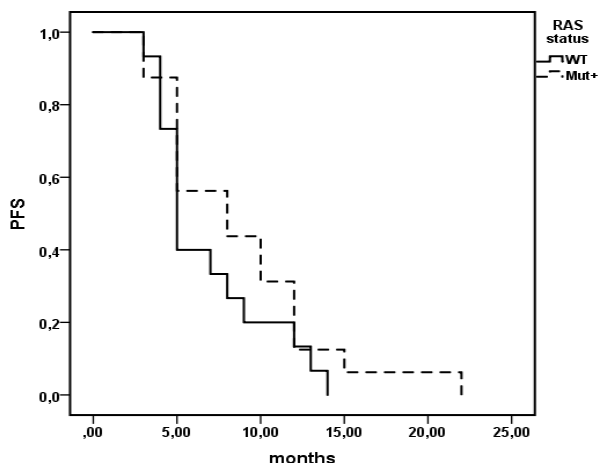
Таблица 5. Връзка между серумни нива на СЕА и нива на тъканна експресия на VEGFR 2 от първичен тумор при пациенти с дебелочревен карцином, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab*.

СЕА срещу VEGFR 2					
			VEGFR 2		Общо
			Ниска експресия	Висока експресия	
СЕА	Ниски серумни нива	Брой пациенти	5	13	18
	Високи серумни нива	Брой пациенти	8	5	13
Общо:			13	18	31

Липсва връзка между нивата на експресия на VEGFR 2 и стойностите на серумния туморен маркер СЕА при пациенти, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab* (Fisher's Exact Test, $p = 0.238$).

4.2. Корелации между VEGF-биомаркери и RAS-статус

Липсва връзка между наличието или липсата на мутация в *RAS* при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином, лекувани с първа линия ХТ + *bevacizumab* и отговор към антиангиогенезно лечение. (Фигура 17). Антиангиогенезно лечение с *bevacizumab* е ефективно при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином, независимо от наличието или липсата на мутация в *RAS*.



Фигура 17. Kaplan-Meier криви на PFS спрямо мутационния статус на RAS в първичния тумор при пациенти с дебелочревен карцином, получили първа линия системна химиотерапия в комбинация с bevacizumab. Липсва статистическа разлика между медианната PFS в групите със или без налична мутация в RAS (95% CI, log rank test $p = .214$).

5. Оценка на странични ефекти и токсичност

Таблица 6. Връзка между възраст и нива на тъканна експресия на NP-1 от първичен тумор при пациенти с дебелочревен карцином, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с bevacizumab.

Възраст срещу NP-1					
			NP-1		Общо
			Ниска експресия	Висока експресия	
Възраст	< 65	Брой пациенти	7	11	18
	> 65	Брой пациенти	5	8	13
Общо			12	19	31

Липсва връзка между нивата на експресия на NP-1 и възрастта при пациенти, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с bevacizumab (Fisher's Exact Test, $p = 0.414$).

Таблица 7. Връзка между възраст и нива на тъканна експресия на VEGFR 2 от първичен тумор при пациенти с дебелочревен карцином, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с bevacizumab.

Възраст срещу VEGFR 2					
			VEGFR 2		Общо
			Ниска експресия	Висока експресия	
Възраст	< 65	Брой пациенти	9	10	19
	> 65	Брой пациенти	4	8	12
Общо			13	18	31

Липсва връзка между нивата на експресия на VEGFR 2 и възрастта при пациенти, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab* (Fisher's Exact Test, $p = 0.637$).

Таблица 8. Връзка между нива на тъканна експресия на VEGFR 2 и на NP-1 от първичния тумор при пациенти с дебелочревен карцином, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab*.

NP-1 срещу VEGFR 2					
			VEGFR 2		Общо
			Ниска експресия	Висока експресия	
NP-1	Ниска експресия	Брой пациенти	3	9	12
	Висока експресия	Брой пациенти	10	9	19
Общо			13	18	31

Липсва връзка между нивата на експресия на VEGFR 2 и тези на NP-1 от при пациенти, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab* (Fisher's Exact Test, $p = 0.172$).

5. Оценка на странични ефекти и токсичност

Всички регистрирани странични ефекти са по-изразени и чести в групата пациенти, лекувани с ХТ + *bevacizumab* в сравнение с групата пациенти, лекувани единствено с химиотерапия. Най-честите странични реакции са гадене и повръщане, обща отпадналост, невропатия, неутропения и тромбоцитопения. Възникването на което и да е странично действие степен 3 е по-често при пациентите, лекувани с ХТ + *bevacizumab* в сравнение с групата, лекувана само с химиотерапия (49 % vs 37 %) като най-често срещани са невропатия, хипертония и повръщане. Има статистически значима разлика при проведен алтернативен анализ за достоверност на разликата между степента на регистриран отговор в двете групи пациенти ($t=2.534$, $p = .02$). Описаните странични ефекти вероятно не се дължат на провежданото антиангиогенезно лечение. Не са регистрирани странични действия от степен 4 в нито една от двете групи пациенти.

IV. ДИСКУСИЯ

Най-изучаваните ангиогенезни кандидат-биомаркери към момента са различни разтворими протеини в кръв или урина. Ангиогенни растежни фактори като VEGF, PDGF, bFGF, PLGF, HGF и IL-8 са примери за кандидат-биомаркери, които могат да бъдат открити в кръвен серум/плазма и биха могли да имат прогностична или предиктивна стойност. VEGF е от жизненоважно значение за растежа на туморните кръвоносни съдове и като такъв се разглежда отдавна като потенциален сурогатен маркер за туморния растеж и за търсене на предиктивност. До момента при лечение с *bevacizumab* изходните нива на циркулиращия VEGF имат по-скоро прогностична стойност, отколкото предиктивна стойност. (Jubb, Hurwitz et al. 2006; Van Cutsem, de Haas et al. 2012; Hegde, Jubb et al. 2013; Jurgensmeier, Schmoll et al. 2013; de Haas, Delmar et al. 2014; Martinetti, Miceli et al. 2014)

Не е ясно дали нивата на експресия на VEGF като самостоятелен фактор са подходящ или достатъчен прогностичен маркер, тъй като той е само един от многото проангиогенни фактори, които участват в развитието на солидните тумори и може да е от по-голямо значение за някои солидни тумори само в някои етапи от туморния им растеж. Необходими са повече изследвания, за да се потвърди стойността на VEGF и други разтворими растежни фактори като биомаркери, особено за да се определят като предиктивни за отговор към терапия.

Към момента няма валидирани сурогатни маркери за биологична активност от лечение с *bevacizumab*. Описаният механизъм на действие на *bevacizumab* и потенциалът за отложена ефективност във времето са довели до заключението, че PFS или общата преживяемост може да са по-адекватни показатели за активност отколкото честотата на общ отговор. В нашето изпитване е направен опит за оценка на ефективността на *bevacizumab* чрез проспективен анализ на няколко плазмени и тъканни биомаркера (общ VEGF, циркулиращите VEGF 121 и VEGFR 165), както и тъканната туморна експресия на биомаркерите VEGFR 2 и NP-1 при пациенти с дебелочревен карцином. Смятаме, че изходните плазмени нива на VEGF и експресията на NP-1 от тумора могат да служат като кандидат-биомаркери за ефективност от лечение при пациенти с метастатичен или локално прогресирал дебелочревен карцином.

В анализираната от нас относително малка група пациенти не се открива връзка между плазмените нива на потенциалните биомаркери – VEGF 121 и VEGF 165 - и лоша PFS. Съобразявайки се с биологичната сложност на туморната ангиогенеза, малкия брой на участващи пациенти и нерандомизирания дизайн на изпитването, нашите резултати трябва да бъдат внимателно обсъждани. Към момента все още няма серумни или плазмени маркери, които да притежават ясна предиктивна стойност, поради което резултатът от лечение с химиотерапия + *bevacizumab* не може да бъде предсказан от изходните плазмени нива на VEGF 121 и VEGF 165.

Антиангиогенезното лечение с *bevacizumab* в комбинация с химиотерапия води до удължаване на преживяемостта без прогресия при пациенти с метастатичен

дебелочревен карцином и този факт е потвърден от множество клинични изпитвания.(Giantonio, Catalano et al. 2007; Petrelli, Borgonovo et al. 2013) Този ефект се наблюдава независимо от типа на използвана химиотерапия. Нашите резултати – PFS, честота на отговор и профил на токсичност на *bevacizumab* са сходни с публикуваните в литературата резултати от други клинични изпитвания.(Kabbinar, Hurwitz et al. 2003; Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004; Chong and Tebbutt 2010) Нашето изпитване потвърждава световните данни за значително подобряване на PFS и честотата на отговор към лечение чрез добавяне на *bevacizumab* към химиотерапия (95% CI, log-rank test P =.003). Този показател остава добър сурогат за общата преживяемост при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином.

Употребата на антиангиогенезно лечение в първа линия системна химиотерапия при метастатичен дебелочревен карцином се определя от много фактори, един от които е мутационният статус на *EGFR* и *RAS*. Известни са различни видове мутации в *RAS*. В нашето изпитване не открихме корелация между молекулярнопатологичния статус на *EGFR* (наличие или не на мутации в *RAS*), както и зависимост между вида *RAS* мутация и отговор към антиангиогенезно лечение с *bevacizumab* - то е ефективно, независимо от наличието или липсата на мутация в *RAS*.

Според *Van Cutsem* в изпитването AVAGAST изходните нива на експресия на NP-1 също са описвани като потенциален кандидат-маркер за предикция на отговор към *bevacizumab*-съдържащо лечение при пациенти със стомашен карцином като ниските нива на NP-1 се свързват с по-лоша обща преживяемост, което предполага, че нивата на експресия на NP-1 може да имат прогностично значение при пациенти с напреднал карцином на стомах. Нашите резултати показват възможна връзка между ниски нива на експресия на NP-1 и високи нива на експресия на VEGF 165 с потенциална полза от лечение със системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab*. Предполагаме, че пациенти с дебелочревен карцином, при които има ниски нива на туморна тъканна експресия на NP-1, имат по-голяма полза от лечение, измерена като по-дълга PFS при лечение с *bevacizumab*-съдържаща химиотерапия в сравнение с пациенти, при които са измерени по-високи нива на експресия на NP-1. Възможно обяснение за тази потенциално предиктивна роля на нивата на NP-1 е, че ниската експресия на NP-1 може да е отражение на по-голямата зависимост от свързването с лиганда VEGF като така не се предоставя алтернативен път за активиране на VEGFR, което прави тумора по-чувствителен към лечение с *bevacizumab*.

В заключение, туморната експресия на NP-1 е кандидат-биомаркер, при който има потенциал за предикция на изхода на болестта при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином, лекувани с първа линия химиотерапия в комбинация с *bevacizumab*. С цел валидиране на нашите резултати е необходимо проспективно събиране и анализиране на данни за плазмените нива на VEGF, VEGF 165 и туморната експресия на NP-1 и трябва да бъде обект на по-обширни проучвания, които да характеризират тези маркери и да изяснят потенциалната им предиктивна стойност при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином, лекувани с *bevacizumab*-съдържаща системна терапия.

VI. ИЗВОДИ

1. Добавянето на антиангиогенезен агент *bevacizumab* към първа линия химиотерапия достоверно удължава преживяемостта без прогресия и повишава честотата на общ отговор при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином.
2. Наличието на ниска тъканна (туморна) експресия на невропилин (NP-1) корелира с достоверно удължаване на преживяемостта без прогресия и би могла да бъде проучвана като потенциален предиктивен маркер за антиангиогенезна терапия при метастатичен дебелочревен карцином.
3. Наличието на високи изходни плазмени нива на общ *VEGF* демонстрира тенденция за негативна корелация с преживяемостта без прогресия и би могло да бъде проучвано като потенциален предиктивен маркер за антиангиогенезна терапия.
4. Липсват корелации между изходните плазмени нива на общ *VEGF* и *VEGF 121* и преживяемостта без прогресия при лечение с химиотерапия и *bevacizumab*.
5. Липсват корелации между тъканната туморна експресия на *VEGFR 2* в първичния тумор и преживяемостта без прогресия при лечение с химиотерапия и *bevacizumab*.
6. Липсват корелации между нивата на двата тъканни туморни маркера (*VEGFR 2* и NP-1).
7. Липсват корелации между нивата на тъканните туморни маркери (NP-1, *VEGFR 2*) и локализацията на първичния тумор (низходящо, възходящо или напречно дебело черво), възрастта и пола.
8. Липсват корелации между нивата на плазмените маркери (*VEGF*, *VEGF 121* и *VEGF 165*) и локализация на първичния тумор (низходящо, възходящо или напречно дебело черво, ректум/сигма), възрастта и пола.
9. Мониторингът на плазмени *VEGF*-маркери (общ *VEGF*, *VEGF 121*, *VEGF 165*) в хода на антиангиогенезно лечение с *bevacizumab* е неинформативно поради интерфериране на резултатите с терапевтичния агент.
10. Липсват корелации между мутационния *RAS*-статус и преживяемостта без прогресия при метастатичен дебелочревен карцином, лекуван с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab*.
11. Липсват корелации между стойностите на серумния туморен маркер СЕА и нивата на тъканните (туморни) (*VEGFR 2*, NP-1) и плазмените маркери (общ *VEGF*, *VEGF 121*, *VEGF 165*).

12. В групата, третирана с комбинация от химиотерапия и *bevacizumab*, се регистрира достоверно по-висока честота на странични лекарствени събития от *степен 3* (невропатия, артериална хипертония и повръщане).

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Приноси с научно-теоретичен характер

1. За първи път в България се изследват нива на няколко плазмени биомаркера, свързани с туморната ангиогенеза при метастатичен дебелочревен карцином и отговор към антиангиогенезна терапия - растежен фактор VEGF, циркулиращите му форми VEGF 121 и VEGF 165, както и тъканни туморни биомаркери - VEGFR и NP-1.
2. За първи път в България се докладват данни за корелации между високи плазмени нива на VEGF 165 и ниски тъканни нива на експресия на NP-1 и връзката им с преживяемостта без прогресия при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином, лекувани с ХТ + *bevacizumab*.
3. За първи път в България е проведен регресионен нелинеен математически модел на зависимостта между стойностите на NP-1 и преживяемостта без прогресия при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином, лекувани с първа линия системна химиотерапия в комбинация с *bevacizumab*.
4. Проведено е целенасочено проучване за установяването на преживяемостта без прогресия при пациенти с метастатичен дебелочревен карцином, лекувани с първа линия системно лечение + *bevacizumab*

2. Приноси с научно-практичен характер

Определяне на тъканната туморна експресия на Neuropilin-1, както и нивата на циркулиращата биологично активна форма VEGF 165 може да бъде обект на допълнителни изследвания с цел потвърждаване на потенциална корелация за отговор към антиангиогенезно лечение с *bevacizumab* като предиктивни биомаркери за отговор към анти-VEGF лечение при метастатичен дебелочревен карцином.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Публикации в пълен текст

1. А. Консулова, И. Донеv, Н. Цонеv, Д. Калев. Първа линия 5-ФУ-базирана химиотерапия със или без *bevacizumab* при метастатичен колоректален карцином: едноцентрово проучване. *Scripta Scientifica Medica*, 2015. (47), pp 20-25.
2. А. Консулова, И. Донеv, Н. Цонеv, Д. Калев. Антиангиогенезно лечение – рационалност, механизми на действие и клинично приложение в медицинската онкология. Списание на българското онкологично дружество, 2015 (2), pp 3-14.
3. А. Konsoulova, I. Donev, E. Dimitrova. Angiogenesis in cancer and inflammation - role, evaluation and clinical significance. 5th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, 2014 Slovenia. ISBN: 978-961-6956-12-3, pp 58-64.

2. Научни съобщения

1. Ангиогенеза при дебелочревен карцином. Доклад на Национална конференция с международно участие Колопроктология, Варна, х-л Адмирал, 03.10.2015
2. Съвременни стратегии в системното лечение на колоректален карцином. Гастрофорум Варна 2015 Новости. Варна, к.к. „Слънчев ден“, х-л „Палас“, 3-5.11.2015
3. Angiogenesis in cancer and inflammation - role, evaluation and clinical significance. A lecture at the 5th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, November 2014, Bled, Slovenia.
4. Case report and clinical discussion over “Management of patients with GIST and colorectal cancer – current knowledge and future strategies”, ESO-ESMO Eastern Europe and Balkan Region Masterclass, Jul 2014, Brdo, Slovenia
5. Management of patients with colon cancer – a plenary lecture at the IVth South-East European Conference in Chemotherapy, Infections and Cancer, November 2013, Istanbul, Turkey.
6. Анти-VEGF терапия при метастатичен дебелочревен карцином - новости. Научен симпозиум на Рош. Варна, х-л Сезони, 02.12.2010