М Е Д И Ц И Н С К И У Н И В Е Р С И Т Е Т С О Ф И Я
М Е Д И Ц И Н С К И Ф А К У Л Т Е Т
К А Т Е Д Р А П О Ф А Р М А К О Л О Г И Я И Т О К С И К О Л О Г И Я

Д-р В Е Л К О Т О Д О Р О В М И Н Ч Е В

НИВА НА ДИХИДРОПИРИМИДИН ДЕХИДРОГЕНАЗА И ОКСИДОРЕДУКЦИОНЕН КАПАЦИТЕТ В ПЛАЗМАТА ПРИ ХИМИОТЕРАПИЯ НА ПАЦИЕНТИ С КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование	**7. Здравеопазване и спорт**
Професионално направление	**7. 1. Медицина**
Докторска програма	**ФАРМАКОЛОГИЯ (ВКЛ. ФАРМАКОКИНЕТИКА И ХИМИОТЕРАПИЯ)**

Научен ръководител	Доц. д-р Румен Николов, дм
Научни консултанти	Проф. д-р Славина Сурчева, дм

С О Ф И Я, 2 0 2 1

Дисертантът е магистър по медицина, лекар, началник на Отделение по Медицинска Онкология на УМБАЛ СофияМед. Зачислен е като докторант на самостоятелна подготовка в Катедрата по Фармакология и Токсикология на Медицински Факултет, Медицински Университет София

в Област на висше образование	7. Медицина и спорт
по Професионално направление	7. 1. Медицина
на Докторска програма	Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на разширено *on line* заседание на Катедрата по Фармакология и Токсикология, проведено на 18 Май 2021 г в Медицинския Факултет на МУ София.
Дисертационният труд е написан на 134 страници и съдържа 24 таблици и 36 фигури.
В библиографията са включени 199 публикации на чуждестранни автори и 8 публикации на български автори. Изследванията, представени в дисертационния труд са финансирани от изследователски проект D-98 / 24. 06. 2020 на СМН на МУ София.

Официалната защита на дисертационния труд ще бъде проведена на 14 Септември 2021 г пред Научно Жури в състав

Председател	Проф. д-р Красимира Якимова, дм, дмн
Членове	Чл. кор. проф. д-р М. Власковска, дм, дмн
	Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, дм, дмн
	Проф. д-р Иванка Костадинова, дм
	Доц. д-р Галя Ставрева, дм
Резервни членове	Доц. д-р Павлина Гатева, дм
	Доц. д-р Делян Делев, дм

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Фармакология и Токсикология на Медицинския факултет, ул. Здраве № 2, София, и на страницата на Медицинския Университет София.

Ч Е С Т О И З П О Л З В А Н И С Ъ К Р А Щ Е Н И Я

5-FU	5-Ffluorouracil
5-FUH2	5,6-дихидро-5-флуороурацил
AUC	площ под крива
BC	карином на млечната жлеза
CCB	Capecitabine
CDK	cyclin-dependent kinases
CRC	колоректален карцином
DPD	dihydropyrimidine dehydrogenase
EMA	European Medicine Agency
GSH-P	глутатион пероксидази
INCA	Institut national du Cancer
IRT	Irinotecan
MAPK	митоген - активирана протеин киназа
OPRT	orotate phosphoribosyl transferase
OXP	Oxaliplatin
PET - CT	позитрон-емисионна томография - компютърна томография
PG	простагландини
SOD	супероксид дисмутаза ()
TAS	общ анти-оксидантен статус
TOS	общ окислителен статус
TP	thymidine phosphorylase
TS, TYMS	thymidylate synthase
UTA	Uridine triacetate
VEGF	съдов ендотелен фактор на растежа

АК	амино-киселини
АКТ	серин / треонин протеин киназа
АФК	активни форми на кислород
АХТ	адювантна химиотерапия

КАТ	компютърна томография
КРК	колоректален карцином
МДА	малондиалдехид
НЛР	нежелани лекарствени реакции
ОС	оксидативен стрес
СР	свободни радикали
ТХТ	таргетна химиотерапия
ХНЕ	4-хидроксиноненал
ЯМР	ядрено-магнитен резонанс

В Ъ В Е Д Е Н И Е

Колоректалният карцином в световен план е третия от най-често диагностицираните малигнени заболявания след карцинома на млечната жлеза при жените и на простатната жлеза при мъжете. Свързаният с колоректален карцином леталитет е втория по тежест леталитет от злакачествени заболявания. Причините са многофакторни, но застаряването на населението, обездвижения начин на живот, нерационалното хранене, напрежението и стреса от ежедневието имат съществено значение за рязкото нарастване на заболяемостта. С постоянния напредък в диагностиката на колоректалния карцином честотата на това заболяване в световен мащаб през 2035 година. може да достигне до 2.5 милиона нови случая.

Основните подходи за ограничаване на процеса са профилактика и ранна диагноза, както и навременно хирургично и химиотерапевтично лечение. Независимо от стремителния напредък в създаването на нови антитуморни лекарства, атакуващи специфични таргети, молекулни и генетични механизми, класическата химиотерапия остава най-широко използвания базов терапевтичен подход.

Флуоропимимидините са широко изполдзвани антиметаболити, прилагани самостоятелно и в различни комбинации за химиотерапия, както на колоректален карцином, така и на широка гама от други злокачествени заболявания.

През 2018 години Европейската Агенция по Лекарствата (EMA) инициира арбитраж по въпроса за индивидуализиране на дозировката и намаляване на рисковете от нежелани реакции при прилагане на лекарствени продукти от този група. Препоръчано бе да се търсят методи и подходи за решаване на този проблем, насочени към утвърждаване на методи за бързо и сравнително евтино определяне на нивата на ензима dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD).

В няколко Европейски проучвания с радиоизотопни и генетични методи беше показано, че този ензим има ключова роля за развитието на нежелани реакции при терапията с флуоропимимидини. Изводите на EMA са, че тези методи са сравнително бавни и скъпи, но въвеждането на по-евтини и бързи методи остава основна задача. Това би спомогнало да бъдат рязко намалени разходите за лечение на нежеланите реакции при химиотерапия с

5-Fluorouracil или други флуоропимимидини. Разбира се, качеството на живот на пациентите е водещият хуманен и морален подход при тази инициатива на Европейската Агенция по Лекарствата.

Настоящият дисертационен труд е бърз отклик на общоевропейски (и световен) изисквания за индивидуализирана, ефективно и с минимум нежелани реакции противотуморна терапия. За първи път в България е направено изследване на нивото на ензима dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвната плазма на пациенти с колоректален карцином, които са показани за химиотерапия с 5-Fluorouracil. Използваният в настоящие труд ELISA метод е сравнително евтин, бърз, с добра чувствителност при скрининг-тест, което е в хармония с препоръката на Европейската Агенция по Лекарствата.

Представените резултати показват, че разпределението на DPD нивата на включените в изследването пациенти в България, е много близко до DPD нивата установени при такива пациенти в други Европейски страни. Още повече, проследяване на понижението на броя на гранулоцитите и в по-малка степен на други параклинични показатели, корелира със степента на понижаване на нивото на DPD в кръвната плазма, което съответства на данни от други изследвания при използване на различен метод за определяне на ензима.

Натрупват се все повече данни, че при пациенти с онкологични заболявания настъпват промени

В плазмените и тъкънни нива на специфини маркери на оксидативен стрес, както и на активността на ензимни и не-ензимни антиоксиданти. Освен че промените в редокс-хомеостазата може да отразяват прогресията и тежестта на заболяването, те може да бъдат променени от прилаганата химиотерапия, което да рефлектира в ефикасността на лечението и / или появата на нежелани лекарствени реакции.

В дисертационния труд е представено комплексно проучване на различни по механизъм елементи от промяната на оксидо-редукционния статус на пациенти с колоректален карцином, подложени на химиотерапия с флуоропимимидини. Показано е наличието на зависимост между нивото на DPD в кръвната плазма, левкоцити, гранулоцити и тромбоцити, и на принципни реакции / маркери на оксидо-редукционния статус във представиелна кохорта пациенти с колоректален карцином, подложени на комплексна химиотерапия, включваща прилагане на флуоропимимидинови лекарствени продукти.

В. Ц Е Л И З А Д А Ч И

В.1. Ц е л

1. Да бъде направен качествен и количествен анализ на някои неблагоприятни и благоприятни ефекти на химиотерапията с флуоропиримидинови лекарствени продукти.

2. На тази основа да бъде изследвана корелацията на тези ефекти с плазмените нива на ензима дихидропиримидин дехидрогеназа (DPD) и окислително-редукционния капацитет на пациенти с колоректален карцином, третирани в клинични условия с комплексна химиотерапия, включваща 5-флуороурацил (5-FU).

2. Да бъде разгледана икономическата целесъобразност при препоръчване за прилагане в клиниката на изследване на нивото на дихидропиримидин дехидрогеназа в кръвната плазма преди започване на химиотерапия с флуоропиримидини.

3. В този аспект да бъде обсъден алгоритъм, който би могъл да бъде приложен в онкологичната практика.

В.2. З а д а ч и

1. Да бъде подбран достатъчен брой пациенти с колоректален карцином, които са в стадий на комплексна химиотерапия съдържаща флуорпиримидини и те бъдат рекрутирани в изследванията след дадено информирано съгласие.

2. Да бъде направен пълен демографски и нозологичен анализ на създадената кохорта от рекругирани пациенти.

3. Да бъдат изследвани плазмените нива на DPD в проби от венозна кръв, взети преди започване на съответен цикъл на химиотерапия. Да бъде създадена провизорна работна скала градирана като ниско, средно и високо DPD ниво

4. Да бъде изработен подход за разкриване на евентуална корелация между лимфоцитно / тромбоцитния статус на пациентите и установените при тях плазмени DPD нива.

5. Да бъде определен окислително-редукционния капацитет в плазмата на пациентите (тотален анти-оксидантен капацитет и фери-редукционен потенциал) чрез

(i) спектрофотометричен анализ на ТБА-активни продукти

(ii) хемилуминисцентен анализ на анти-радикални системи, съдържащи АФК

6. Да бъдат верифицирани евентуално съществуващи зависимости между окислително-редукционния статус, нивото на дихидропиримидин дехидрогеназа и някои параклинични показатели при химиотерапия с 5-Fluorouracil на пациенти с колоректален карцином.

С. М Е Т О Д О Л О Г И Я И М А Т Е Р И А Л И

С.1. Включващи критерии

Пациенти от двата пола с клинична диагноза колоректален кацином, хоспитализирани в онкологична клиника (СофияМед) за провеждане на курс персонифицирана комплексна химиотерапия, която включва като принципно анти-туморно лекарство флуоропиримидин (5-FU, ССВ и / или ОХР. Рекрутиране в изследванията е възможно само с подписано информирано съгласие от пациента и може да бъде отказано във всяко време, без от това да има последствия за целия лечебния процес. Участието на пациентите в тези изследвания не затруднява извършването в пълен обем на всички диагностични и терапевтични процедури, необходими за тяхното лечение. От всеки пациент преди и след като е проведена химиотерапия се вземат проби от 5 ml венозна кръв, която се използва по-късно в аналитичните изследвания, представени в настоящия дисертационен труд. В списъка на рекрутираните в изследванията мъже и жени са включени общо 74 пациенти.

С.2 Изключващи критерии

Пациенти, които са диагностицирани с друго синхронно протичащо онкологично заболяване или друга ко-морбидност, която изисква да се приложи друга схема на химиотерапия.

С.3. Аналитични методи

С.3.1. ELISA метод за квантифициране на DPD в плазма

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) е високо чувствителен качествен и количествен метод (≥ pg / mL). Предимство на този метод е възможността за анализ на голям брой проби едновременно. ELISA техниката е удобна за рутинни клинични тестове и е масово практикувана в клиничните лаборатории. За целите на настоящето изследване е използван човешки ELISA кит (Fine Test EH 2958, Wuhan Fine Biological Technology Co. Ltd, Hubei, China) с обхват 0.156 ng / mL - 10 ng / mL и чувствителност ≤ 0,094 ng / mL. Измерванията са направени при стриктно спазване на изискванията на производителя с ELISA Reader при дължина на вълната 450 nm. Квантифицирането на активен DPD ензим

става в линейната част на калибровъчната крива и е формализирано с уравнението $y = 1.0705x + 0.0774$ и R^2. Концентрацията на активния ензим DPD е определяна в кръвна плазма на пациентите взета преди да е проведена химиотерапия.

С.3.2. Спектрофотометричен метод за определяне на оксидативен статус
Оксидативният статус е определян в кръвна плазма взета от пациентите преди и след проведена химиотерапия. Приложените методи позволяват да бъдат определени тотален анти-оксидантен капацитет и продукти на липидната пероксидация в кръвна плазма. Приложена е система на фери-редукционна реакция, която е важна за живите организми и втора система, съдържаща стабилния ABTS радикал, които в живите организми не се открива при нормални условия.

Метод ABTS радикал: Използван е метод на Re, R., et al. (1999). Методът се основава на цветна реакция, в която синьо-зеления разтвор на стабилен ABTS радикал с ивици на поглъщане 420, 734 и 829 mn се обезцветява (екстинкцията се понижава) пропорционално на понижаване на концентрацията на ABTS радикал. При тестиране са използвани пресни основен (сток) и работен разтвори с екстинкция на контролната проба 0.700 ± 0.005 при 734 mn, изготвени съгласно инструкциите за всяко измерване. За всеки отделен пациент се създават по три идентични проби кръвна плазма, приготвени от пробите венозна кръв взети преди и след приключване на химиотерапията. При същите условия в системата е изследван концентрация - зависим ефект на стандартен разтвор на Trolox (водно-разтворим аналог на Vit. E). Тоталният анти-оксидантен капацитет на кръвната плазмата е представен като Trolox Equivalent μmol / μL плазма.

Метод FRAP: Приложен е метод на Benzie, I. F., Szeto, Y. T. (1999) с малки модификации. Методът е основан на степента на редукция на феритрипиридил-триазинов комлекс (Fe^{3+}-TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) до феро-форма Fe^{2+}-TPTZ и синьо оцветяване. Екстинкцията на пробите е измерена при 593 mn след 4 мин инкубация на тъмно. Стандартната калибровъчна крива с $FeSO_4.7H_2O$ е изготвена в концентрационен диапазон от 0 до 1000 mmmol / L. Увеличена екстинкция корелира с по-добри фери-редукционни свойства и показва по-добър тотален анти-оксидантен капацитет.

Метод за определяне на липидна пероксидация в кръвна плазма: Нивото на липидна пероксидация в кръвната плазма е определяно чрез измерване на активните TBA продукти (TBA-RS) по метод на Asakawa, T., Matsushita, S. (1980). Екстинкцията е измервана при дължина на вълната 532 mn и 600 mn. Количеството е квантифицирано l Equvivalent (mmol / mL) по формулата

$$\text{MDA Equvivalent (mmol / mL)} = [(A_{532} - A_{600}) / 155000].10^6,$$

където 155000 е моларният екстинкционен MDA коефициент.

Хемилуминисцентни системи: Хемилуминисцентните изследвания са широко прилагани в биохимичните лаборатории като надеждни, бързи и чувствителни методи (граница на детекция 10^{-19} M) и широк около две декади линеен обхват. За определяне на потенциала на кръвната плазма да понижава количеството на АФК супероксид анион-рдикал и хипохлорит е приложена луминол-зависима хемилуминисценция. Използван е хемилуминометър LKB 1251, свързан с IBM compatible компютер и програмен пакет MultiUse 1.08 (BioOrbit, Turku, Finland). Измерванията са направени при 37^o C в две алтернативни моделни системи. От хемилуминисцентните кинетични криви са определени (i) Хемилуминисцентен отговор (площ под кривата), (ii) Максимална стойност на хемилуминисцентния интензитет, (iii) Време за достигане на кинетичен максимум, (iv) Скавинджер индекс: хемилуминисценция в присъствие на кръвна плазма спрямо хемилуминисценция в контрола (CL - SI %).

Луминол-зависима хемилуминисценция в система на генериране на $O^{2\bullet}$ от KO_2 : Измерването на хемилуминисцентния отговор започва непосредствено след добавяне на 20 µL KO_2 разтворен в DMSO.

Луминол-зависима хемилуминисценция в система на генериране на OCl^- от NaOCl : Измерването на хемилуминисцентния отговор е направено за 1 минута, като стойностите се отчитат на всеки 50 ms.

С.3.3. Статистически методи

Приложени са (i) Вариационен анализ със средна стойност, медиана, мода, минимум, максимум, стандартно отклонение, (ii) Честотен анализ с абсолютни и относителни честоти, (iii) Графичен анализ, (iv) Student’s T-test при ниво на достоверност ≤ 0.05, Статистическата обработка е направена с програмнн пакети Microsoft Excel и Origin.

D. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

D.1. Резултати получени в проведените изследвания на нивото на DPD в кръвна плазма
Подробни анамнестични, клинични, параклинични и терапевтични данни от етапните епикризи на всеки пациент са анонимизирани и енкриптирани от 1 до 74 в Приложение 1.

D.1.1. Анализ по демографски и нозологични критерии на рекрутираните групи пациенти

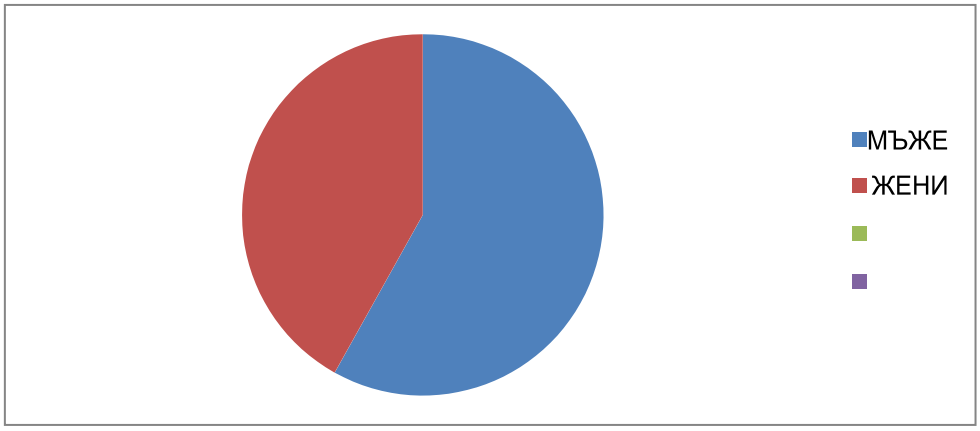
D.1.1.1. Разпределение на рекрутираните пациенти по пол

След подписано информирано съгласие общо 74 пациенти от двата пола, при които са с доказани солидни малигнени тумори в стомашно-чревния тракт (СЧТ) в различни стадии на прогресия на заболяването, са рекрутирани за участие в планираните изследвания. Броят на включените в изследването мъже е 43, докато броят на включените в изследването жени е 31. Данните са обобщени в Табл. D.1.

ОБЩ БРОЙ ПАЦИЕНТИ	74 / 100 %
ОТ ТЯХ ЖЕНИ	31 / 41.9 %
ОТ ТЯХ МЪЖЕ	43 / 58.1 %

Табл. D.1. Разпределение по ПОЛ на пациентите, които са рекрутирани в проведените изследвания

Разпределението по пол показва, че 2/5 от общия брой рекрутирани пациенти са жени и 3/5 от общия брой рекрутирани пациенти са мъже. Обобщени данни за процентното разпределение по пол на рекрутираните пациенти са представени на Фиг. D.1. Данните показват, че от общия брой рекрутирани пациенти 58.1 % са мъже, докато 41.9 % са жени. Това разпределение по пол на включените в изследванията пациенти е в съгласие с общоприетото становище, че по-голяма честота на малигнените тумори в СЧТ се наблюдава при мъжете в сравнение с честотата на тези тумори, която се наблюдава при жените.



Фиг. D.1. Процентно разпределение по ПОЛ на пациентите, които са рекрутирани в проведените изследвания

D.1.1.2. Разпределение на рекрутираните пациенти по възраст

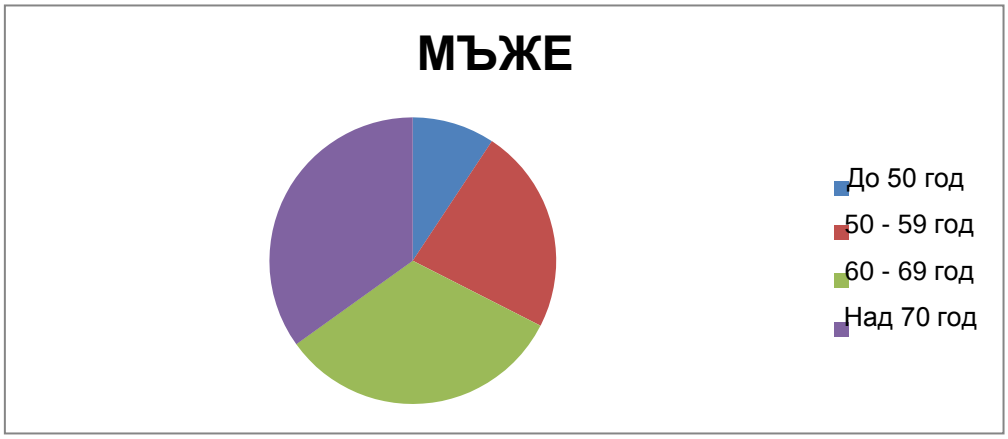
Разпределението на пациентите по възраст е проследено в 4 възрастови диапазони: до 50 годишна възраст, 50 - 59 години, 60 - 69 години и над 70 годишна възраст. Данните показват, че при пациенти с малигнени тумори в СЧТ на възраст над 60 години 29 са мъже и 24 са жени. В по-ниски възрастови диапазони са 14 мъже и 7 жени. Обобщени данни за разпределение по възраст на рекрутираните пациенти са представени на Табл. D.2.

П О Л	**В Ъ З Р А С Т О В О Р А З П Р Е Д Е Л Е Н И Е (БРОЙ / %)**				
	До 50 год	**50-59 год**	**60-69 год**	**над 70 год**	**Общо**
ЖЕНИ	3 / 9.6 %	4 / 13.0 %	12 / 38.7 %	12 / 38.7 %	31 / 100 %
МЪЖЕ	4 / 9.3 %	10 / 23.2 %	14 / 32.6 %	15 / 34.9 %	43 / 100 %
ОБЩО	7 / 9.5 %	14 / 18.9 %	26 /35.1 %	27 / 36.5 %	74 / 100 %

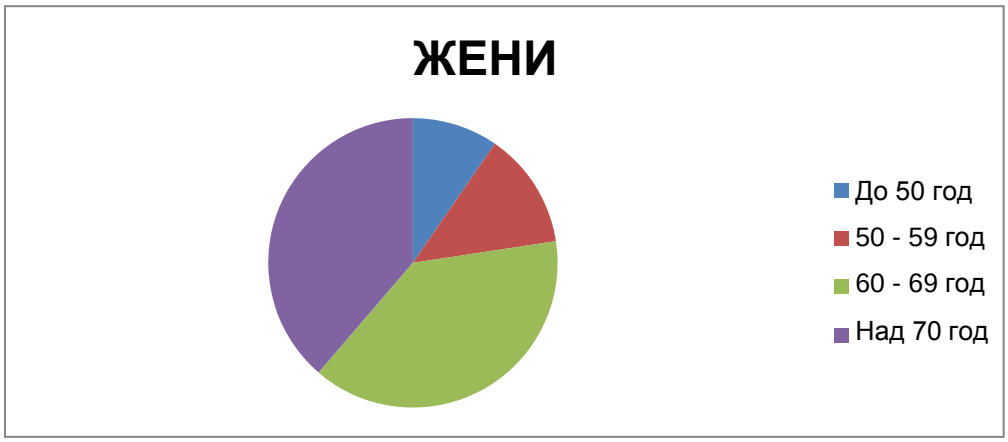
Табл. D.2. Разпределение по ВЪЗРАСТ на пациентите МЪЖЕ и ЖЕНИ, които са рекрутирани в проведените изследвания

Обобщени данни за процентното разпределение в посочените 4 възрастови диапазони на

рекрутираните пациенти мъже и жени са представени на Фиг. D.2. и Фиг. D.3.



Фиг. D.2. Процентно разпределение по ВЪЗРАСТ на пациентите МЪЖЕ, които са рекрутирани в проведените изследвания



Фиг. D.3. Процентно разпределение по ВЪЗРАСТ на пациентите ЖЕНИ, които са рекрутирани в проведените изследвания

Данните от анализа показват, че разпределението по възраст на рекрутираните в

изследванията пациенти е аналогично при мъжете и жените във възрастовите диапазони над 60 години. Прави впечатление отчетливото нарастване (Виж: Табл. D.2.) на честотата на малигнените тумори в СЧТ при мъжете от възрастовия диапазон 50 - 59 години в сравнение с тази честота при жените от същия възрастов диапазон (23.2 % при мъжете vs. 13.0 % при жените). Показана е и обезпокоителната тенденция на „подмладяване“ на малигнените заболявания в СЧТ както при мъжете, така и при жените (Виж: Табл. D.2.), които достигат на брой до 1/10 от всички рекрутирани пациенти.

D.1.1.3. Разпределение съгласно Класификация на малигнените солидни тумори

Както е посочено по-рано фундаментална цел на дисертационния труд е да се изследва активността на DPD при пациенти с нозологично дефинитивни видове коло-ректален карцином в различни стадии на прогресия на заболяването, на които е приложена химиотерапия с 5-FU. Ензимната активност на DPD е главният фактор, който лимитира метаболизма / токсичността, респ. ефективността на 5-флуоропиримидиновите лекарствени продукти. Не ни е известно подобни изследвания да се провеждани у нас по-рано. За да получим данни за по-обхватен анализ към първоначално рекрутираните пациенти с различни топографски локализации на коло-ректален карцином, допълнително бяха рекрутирани и пациенти, на които е приложена химиотерапия с 5-FU по повод на други малигнени тумори като карцином на стомаха, хранопровода или панкреаса. Броят на тези пациенти при мъжете е 7, а при жените е 4, т.е. 16.3 %, респ. 12.9 % от общия брой рекрутирани в изследванията пациенти. В основните групи са включени 36 пациенти мъже и 27 пациенти жени като представят 9 отделни топографски локализации на коло-ректален карцином, дефинирани по Класификация на малигнени солидни тумори. С най-голяма честота са локализациите в сигмоидното и правото черво, което от всички коло-ректални локализации представлява 51.1 % за мъжете и 54.8 % за жените. Детайлни данни за разпределението по 4 възрастови диапазони (до 50 год, 50 - 59 год, 60 - 69 год, над 70 год) на пациентите мъже и жени, рекрутирани в изследванията съгласно Класификация на малигнени солидни тумори, са представени в Табл. D.3. и Табл. D.4.

ВИД	**В Ъ З Р А С Т О В О Р А З П Р Е Д Е Л Е Н И Е (БРОЙ / %)**				
ТУМОР	**До 50 год**	**50-59 год**	**60-69 год**	**над 70 год**	**Общо**
C18.1	-	2	-	1	3 / 7.0 %
C18.2	-	1	1	-	2 / 4.7 %
C18.3	-	-	-	1	1 / 2.3 %
C18.4	-	1	-	2	3 / 7.0 %
C18.5	-	-	1	-	1 / 2.3 %
C18.6	-	-	1	1	2 / 4.7 %
C18.7	-	2	3	3	8 / 18.6 %
C19	1	-	-	1	2 / 4.7 %
C20	2	2	4	6	14 / 32.5 %
C15.1	-	2	-	-	2 / 4.7 %
C16	1	-	4	-	5 / 11.5 %
C25.8	-	-	-	-	- / - %
ОБЩО	4 / 9.6 %	10 / 26 %	14 / 31 %	15 / 33.4 %	43 / 100 %

Табл. D.3. Разпределение по ВЪЗРАСТ на пациентите МЪЖЕ рекрутирани в изследванията съгласно Класификация на малигнените солидни тумори

ВИД	**В Ъ З Р А С Т О В О Р А З П Р Е Д Е Л Е Н И Е (БРОЙ / %)**				
ТУМОР	**До 50 год**	**50-59 год**	**60-69 год**	**над 70 год**	**Общо**
C18.1	-	1	1	2	4 / 12.9 %
C18.2	-	1	-	3	4 / 12.9 %
C18.3	-	-	-	-	- / - %
C18.4	-	-	1	-	1 / 3.2 %
C18.5	-	-	-	-	- / - %
C18.6	-	-	-	-	- / - %
C18.7	3	1	4	1	9 / 29.0 %
C19	-	-	-	1	1 / 3.2 %
C20	-	1	3	4	8 / 25.8 %
C15.1	-	-	-	1	1 / 3.2 %
C16	-	-	2	-	2 / 6.6 %
C25.8	-	-	1	-	1 / 3.2 %
ОБЩО	3 / 9.7 %	4 / 12.9 %	12 / 38.7 %	12 / 38.7 %	31 / 100 %

Табл. D.4. Разпределение по ВЪЗРАСТ на пациентите ЖЕНИ рекрутирани в изследванията съгласно Класификация на малигнените солидни тумори

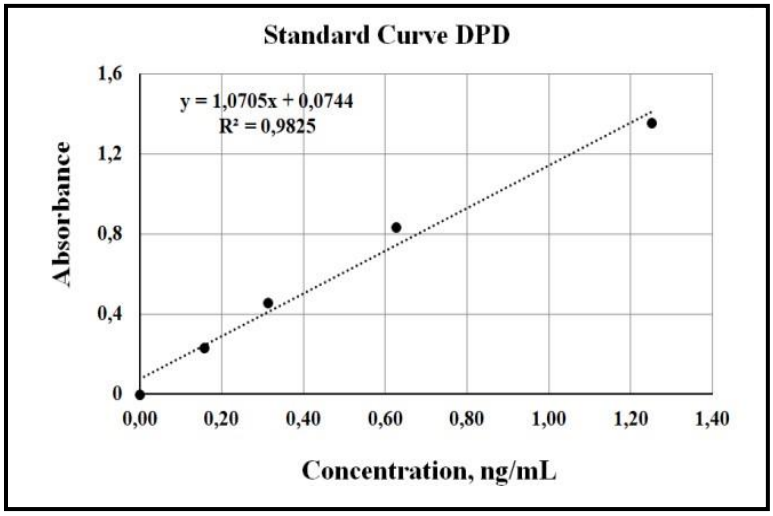
D.1.2. Определяне на количеството DPD в кръвна плазма

Изследвани са кръвни проби (кръвна плазма) взети от 70 пациенти. Демографската характеристика на, разпределение по локализация на първичния тумор, стадий на заболяването и ECOG са сумирани в Табл. D.5.

ПАРАМЕТЪР		**БРОЙ ПАЦИЕНТИ / %**			
ПОЛ	мъже	40 / 57.1	ВЪЗРАСТ	≤ 50	5 / 7.1
	Жени	30 / 42.9		50 - 59	13 / 18.6
				60 - 69	25 / 35.7
ЛОКАЛИЗАЦИЯ				≥ 70	27 / 38.6
	Rectum	21 / 30.0			
	Recto-sygmoid	3 / 4.3			
	Sygma	14 / 20.0			
	Colon descendens	2 / 2.9			
	Colon transvresum	4 / 5.7			
	Colon ascendens	6 / 8.6			
	Flexura coli hepatica	3 / 4.3			
	Coecum	6 / 8.6			
	Oesophagus	4 / 5.7			
	Stomach	6 / 8.6			
	Pancreas	1 / 1.4			
СТАДИЙ	I	0 / 0	ECOG	0	2 / 2.9
	II	15 / 21.4		1	55 / 78.6
	III	20 / 28.6		2	13 / 18.6
	IV	35 / 50.0			

Табл. D.5. Демографска характеристика на, разпределение по локализация на първичния тумор, по стадий на заболяването и по ECOG

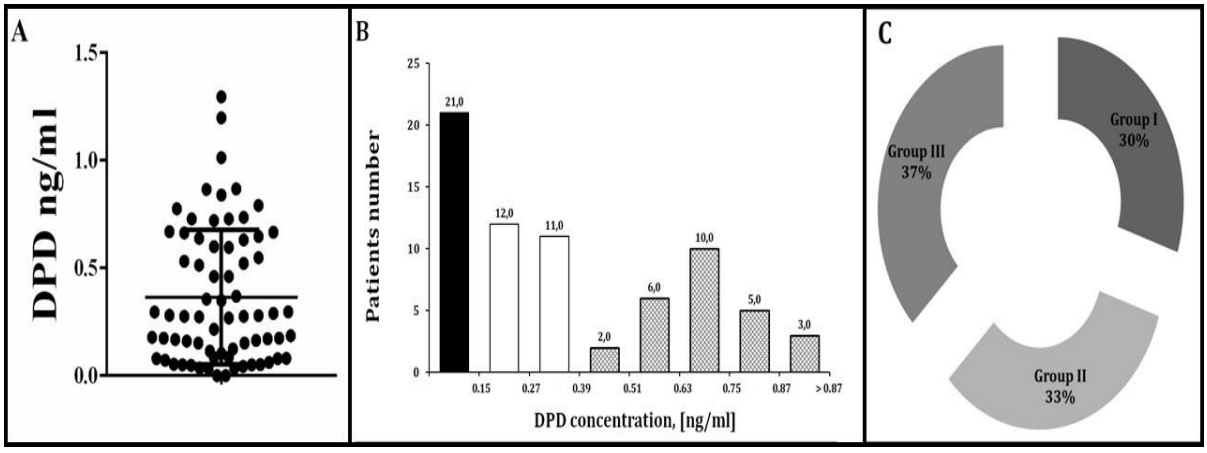
За количествена оценка на DPD ниво в кръвната плазма на рекрутираните пациенти е направено с ELISA кит посредством „сандвич“ метод. На Фиг. D.4 е представена получена със стандартни разтвори калибровъчна крива и аналитичният вид на уравнението на правата, използвано за определяне на концентрацията на ензима.



Фиг. D.4. Калибровъчна крива на зависимостта Екстинкция / DPD концентрация при дължина на вълната 450 nm

Експериментите са проведени в концентрационен диапазон от 0 от до 1.30 ng /L. Калибровъчната крива има ясно изразен линеен характер (R^2 = 0,98). На база измерените стойности на абсорбцията за отделните проби при 450 nm и представените на фигурата данни беше определена DPD концентрацията в кръвната плазма на 70 от рекрутираните в изследванията пациенти. Получените данни от анализа на резултатите са представени на Фиг. D.5. Установено е, че нивото на DPD ензима варира в изследваната популация в широки граници от 0.001 ng / mL до 1.296 ng / mL. Медианата и средната стойност за извадката са съответно 0.2750 ng / mL и 0.3641 ng / mL. Статистическият тест за нормално разпределение на D'Agostino и Pearson показа отклонение от нормалното разпределение и наличие на асиметрия (K^2 = 8,875, P= 0,0118). С цел за по-добро онагледяване на разпределението на пациентите в зависимост от концентрацията на DPD, нивото на ензима беше проследено по концентрационни интервали. Тези данни са представени на Фиг. D.5. Най-ниският концентрационен интервал обхваща стойности от 0 до 0.15 ng / mL,

като горната му граница е определена от прага на детекция на използваният метод. Реално в този интервал са всички пациенти, при които отчетеното по използвания метод DPD ниво е под прага на детекция. Условно тези пациенти са обозначени тук и при всички следващи представяния на резултати, зависимости и разпределения касаещи ефекта на нивото на ензима като Group I.



Фиг. D.5. Ниво на dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвна плазма на пациенти с колоректален карцином

A - ниво на DPD ензима, средна стойност и
стандартно отклонение в изследваната група пациенти

B - разпределение
на пациентите по концентрационни диапазони

C - процентно разпределение на пациентите в трите концентрационно обособени групи

Group I под 0.15 ng / mL, Group II от 0.15 ng / mL до 0.39 ng / mL, Group III над 0.39 ng / mL

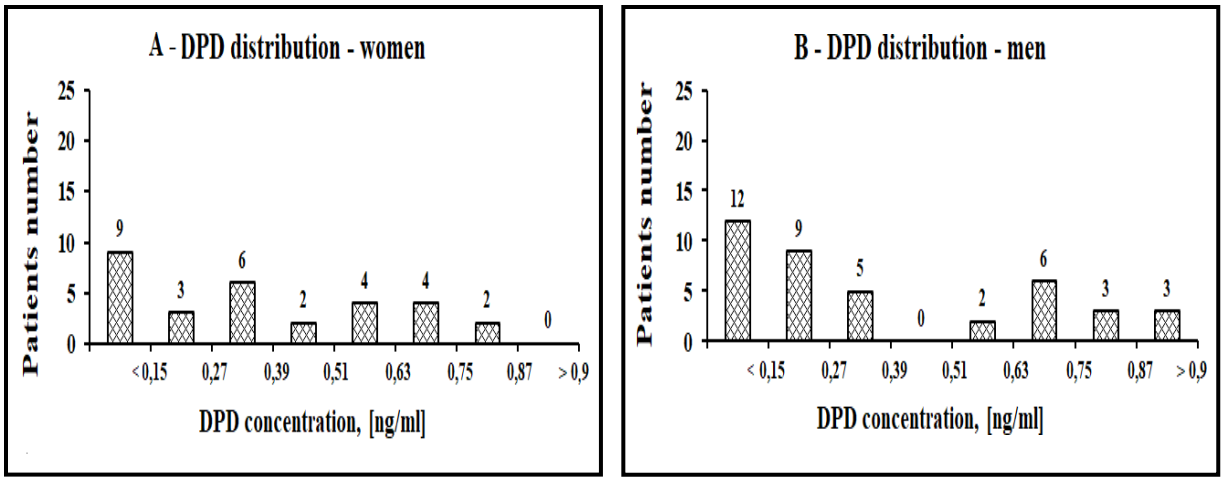
Останалата част от пробите, респ. пациенти, е разделена по концентрационни интервали от 0.12 ng / mL. В тази група концентрационно са обособени две групи пациенти: такива с ниво на ензима под 0.37 ng / mL и такива с ниво над 0.46 ng / mL. Няма пациенти с установено ниво на DPD ензима в интервала от 0.37 ng / mL до 0.46 ng / mL. При използването на избраната концентрационна стъпка, границата между двете групи реално

попада върху 0.39 ng / mL. Условно, подобно на пациентите от Group I, тези групи ще бъдат обозначени като Group II и Group III. Пациентите от Group II са с нива на ензима в концентрационния интервал от 0.15 ng / mL до 0.39 ng / mL, а тези от Group III са с нива на ензима надвишаващи 0.39 ng / mL. Разпределението в трите групи пациенти е статистически проверено с тест на D'Agostino и Pearson за нормално разпределение. Получените от теста данни за формираните статистически съвкупности, че те се различават. При Group I и Group II не е отчетено отклонение от нормалното разпределение Group I (K_2 = 0.004, P= 0.9979) и Group II (K_2 = 4.843; P = 0.0888). При Group III е отчетено асиметрично разпределение (K_2 = 10.66; P = 0.0048). Допълнителна информация относно нивото на DPD в отделните концентрационни групи, базови данни за максимално и минимално DPD ниво, медианата и средната стойност са сумирани в Табл. D.6.

	Group I	**Group II**	**Group III**
Брой пациенти	21	23	26
Минимално ниво	0,001	0,152	0,460
Максималнониво	0,124	0,369	1,296
Медиана	0,053	0,268	0,668
Средна стойност	0,061	0,239	0,719
SD	0,032	0,071	0,205

Табл. D.6. Минимално и максимално DPD ниво, средна стойност и стандартно отклонение (SD) на отделните обособени концентрационни групи от изследваните пациенти

Както се вижда от Фиг. D.5 и Табл. D.4 процентното съотношение между пациентите в отделните групи е близко**.** Аналогично на това е проследено концентрационното разпределение на DPD нивото при пациентите в зависимост от пола. Данните от този анализ са представени на Фиг. D.6 и Табл. D.7.



Фиг. D.6. Ниво на dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвна плазма на пациенти с колоректален карцином в зависимост от пола на пациентите

A - концентрационно разпределение при пациентите от женски пол

B - концентрационно разпределение при пациентите от мъжки пол

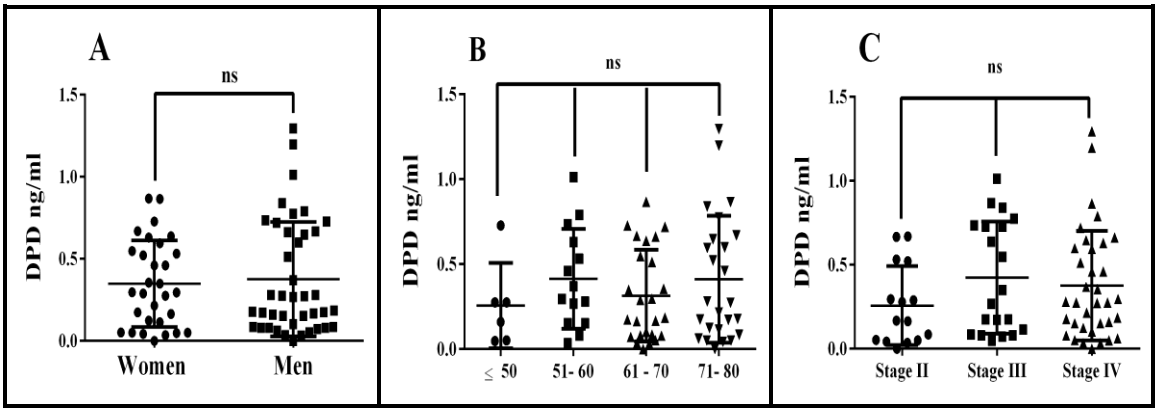
Независимо от по-малкия брой на тези пациенти, прави впечатление, че в този случай и в трите групи както при мъжете така и при жените, се запазва тенденцията за близко процентно разпределение на пациентите в отделните концентрационни групи. Както при мъжете, така при жените е отчетено отклонение от нормалното разпределение.

	Group I	**Group II**	**Group III**
МЪЖЕ			
Брой пациенти	12	14	14
Минимално ниво	0,0010	0,1520	0,5130
Максимално ниво	0,1030	0,3690	1,296
Медиана	0.0755	0,1815	0.7320
Средна стойност	0,06392	0,2204	0,7991
SD	0,02886	0,06808	0,2236

ЖЕНИ			
Брой пациенти	9	9	12
Минимално ниво	0,001	0,164	0,460
Максимално ниво	0,124	0,356	0,868
Медиана	0,050	0,290	0,613
Средна стойност	0,057	0,268	0,626
SD	0,038	0,070	0,138

Табл. D.7. Минимално и максимално DPD ниво, средна стойност и стандартно отклонение (SD) на отделните обособени концентрационни групи от изследваните пациенти в зависимост от пола

Като следваща стъпка беше проследена вероятността за статически значима разлика в нивото на DPD ензима в зависимост от някои базови демографски и нозологични показатели на пациентите като възраст, пол, стадии на заболяването. Получените от този анализ данни са представени на Фиг. D.7.



Фиг. D.7. Ниво на dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвна плазма на пациенти с колоректален карцином в зависимост от демографски и нозологични критерии

A - концентрационно разпределение в зависимост от пола на пациентите

B - концентрационно разпределение в зависимост от възрастта на

пациентите

С - концентрационно разпределение в зависимост от стадия на заболяването

Като цяло не беше отчетена статистически значима разлика между обособените групи при нито един от предварително подбраните критерии ($p > 0.05$). С оглед на възрастовите различия е наблюдавано слабо понижение на средното DPD ниво при групата на пациенти под 50 годишна възраст (0.2565 ± 0.25) спрямо останалите групи, които имат DPD нива над 0.3 ng / mL, като броя на пациентите в първата група е значително по-малък. Средните стойности при мъжете и жените са близки с минимален превес при мъжете. Измерените DPD нива са 0.38 ± 0.35 ng / mL при мъжете и 0.35 ± 0.26 ng / mL при жените. По отношение на стадия на заболяването, при пациенти с КРК втори стадий, които са по-малко на брой в сравнение с другите две групи е установено статистически недостоверно понижение на DPD нивото.

D.1.3. Обобщение и кратък анализ на получените резултати

Данните за разпределението на пациентите в зависимост от индивидуалните DPD нива в кръвната плазма показват сходство в разпределението и при двете изследвани групи. Това е в хармония с данни на други автори, които са използвли алтернативни методи за изследване на този параметър (Van Kuilenburg, A. B. P., al., 2000). Сходство между групата пациенти с колоректален карцином и групата пациенти с малигнени образувания в други отдели на ГИТ е проявено в (i) Установените DPD нива варират в широк концентрационен диапазон, (ii) разделяне на лицата в две ясно обособени групи: група I - пациенти с DPD ниво около и по-ниско от това на средната стойност за конкретната извадка, група II - пациенти с DPD ниво по-високо от това на средната стойност за съответната извадка. Анализът на разпределението на пациентите по демографски и нозологични критерии (пол, възраст и стадий на заболяването) не показа статистически достоверна зависимост на DPD нивото от тези показатели, което е в съгласие с резултати на други автори (Nie, Q., et al., 2017). Данните показват, че приложения ELISA метод има широк концентрационен обхват, к който са установени при всички пациенти измерими DPD нива. Методът е сравнително евтин, бърз и би бил удобен за DPD анализ на голям брой пациенти.

D.2. Онко-фармакологична корелация между плазмените нива на DPD и цитотоксичните ефекти на 5-Fluorouracil

Изследването се базира на клиничните и лабораторни резултати, включени в етапните епикризи на 37 мъже и 34 жени от периода преди и след проведената химиотерапия с 5-FU (Виж: Приложение 1). От резултатите става ясно, че след 5-FU има различен брой пациенти, които са с влошена или облекчена клинична симптоматика и намален или увеличени брой лимфоцити и тромбоцити в кръвта, и тези прояви се срещат при различни DPD нива. Анализът по групи пациенти показва, че при пациентите мъже се наблюдава тенденцията при увеличаване на количеството DPD в плазмата да нараства броят на пациентите, при които тези промени в параклиничните показатели и клиничната симптоматика са благоприятни и да намалява броят на пациентите, при които тези промени са неблагоприятни. Тази тенденция е проявена по-слабо при пациентите жени. Подходящи клинични примери в този аспект за двата пола пациенти са цитирани в приложените таблици. Обобщените данни са представени в Табл. D.8. и Табл. D.9 Тези резултати изискват предпазлива интерпретация и по-интегрален подход за проучване на потенциална връзка между наблюдаваните клинични и параклинични промени след химиотерапията с 5-FU и квантифицираните от нас DPD плазмени нива.

	Lymphocytes			**Thrombocytes**				**Пример**
	↑	↓	=	↑	↓	=	**N**	**(Епикриза No)**
***	6	10	-	2	13	1	16	15, 48, 67, 71
Low	4	5	-	1	8	-	9	2, 40
Medium	1	5	-	3	2	1	6	14, 52
High	6	1	-	3	4	-	7	4, 17, 23

Табл. D.8. Брой пациенти мъже с променен брой лимфоцити и тромбоцити след 5-FU химиотерапия

*** DPD - По-малко от 0.15 ng / mL, Low DPD - от 0.15 ng / mL до 0.30 ng / L, Medium DPD - от 0.30 ng / mL до 0.70 ng / mL, High DPD - над 0.70 ng / mL, ↑- Увеличение, ↓- Намаление, = Без промяна, **N** - Брой пациенти

	Lymphocytes			**Thrombocytes**				**Пример**
	↑	↓	=	↑	↓	=	**N**	**(Епикриза No)**
***	4	3	-	5	2	-	7	29, 46, 55
Low	3	4	1	2	5	1	8	10, 32, 39
Medium	7	6	1	2	11	1	14	11, 16, 58
High	2	3	-	1	4	-	5	3, 21

Табл. D.9. Брой пациенти жени с променен брой лимфоцити и тромбоцити след 5-FU химиотерапия

*** DPD - По-малко от 0.15 ng / mL, Low DPD - от 0.15 ng / mL до 0.30 ng / mL, Medium DPD - от 0.30 ng / mL до 0.70 ng / mL, High DPD - над 0.70 ng / mL, ↑- Увеличение, ↓- Намаление, = Без промяна, **N** - Брой пациенти

D.2.1. Промени на I (Ly) и I (Th) след 5-FU химиотерапия при различни DPD нива
Естествено продължение на проучванията беше да проследим дали и до колко съществува връзка между наблюдаваните клинични и параклинични промени след химиотерапията с 5-FU и квантифицираните от нас DPD плазмени нива. Затова въведохме интегрален емпиричен показател квантифициращ сумарните промени (спадане или увеличаване) на броя на лимфоцитите и тромбоцитите в периферната кръв след химиотерапия с 5-FU на

хомогенни групи пациенти с близки индивидуални DPD нива. В този контекст индивидуалните реакции към химиотерапия с 5-FU степенувани с интензитет (1) ако промените на I (Ly) и I (Th) са до 10 %, с интензитет (2) ако промените са до 20 %, с интензитет (3) ако промените са до 30 % и с интензитет (4) ако промените са над 30 %. Сборът на интензитетите би представлявал интегрален емпиричен показател за връзката между установените нива на DPD в плазмата и цитотоксичността при 5-FU химиотерапия. Резултатите от тази серия показват ясно, че след химиотерапевтичен цикъл с 5-FU увеличаването на броя на пациентите с благоприятни промени в клиничната симптоматика и параклиничните показатели и намаляването на броя на пациентите с неблагоприятни промени в клиничната симптоматика и параклиничните показатели кореспондира с прогресивното нарастване на количеството DPD в плазмата. Тези данни са достатъчно убедителни за DPD субгрупите пациенти мъже. Отново не така убедително тази тенденция е проявена за DPD субгрупите пациенти жени. Обобщените данни от тези изследвания са представени в Табл. D.10. и Табл. D.11. Резултатите от изследванията на пациентите мъже показват, че при подгрупата пациенти мъже с DPD нива под 0.15 ng/ mL отношението увеличен / понижен I (Ly) е 29 % / 71 % и увеличен / понижен I (Th) е 7 % / 93 %. В контраст на това при подгрупата пациенти мъже с DPD нива над 0.70 ng/ mL отношението увеличен / понижен I (Ly) е 71 % / 29 % и увеличен / понижен I (Th) е 45 % / 55 %. За по-лесно възприемане тези зависимости са представени в аналогов вид на Фиг. D.8.A и Фиг. D.8.B. Най-общо с нарастването на DPD нивата в плазмата червените сектори в диаграмите (съответстват на повишаване на целуларните индекси) започват да доминират за сметка на сините сектори (съответстват на понижаване на целуларните индекси).

	Lymphocytes		**Thrombocytes**		
	↑	↓	↑	↓	**N**
***	7	17	5	27	16
Low	5	13	1	15	9

Medium	2	2	3	2	6
High	5	2	4	5	7

Табл. D.10. Интегрални промени на I (Ly) и I (Th) след 5-FU химиотерапия на пациенти мъже при различни плазмени нива на DPD

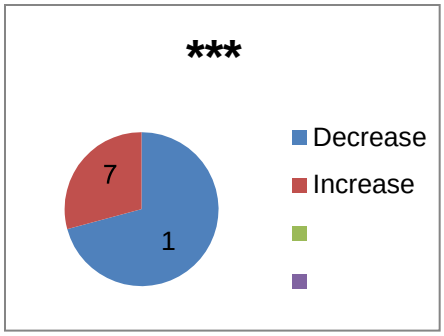
*** DPD - По-малко от 0.15 ng / mL, Low DPD - от 0.15 ng / mL до 0.30 ng / mL, Medium DPD - от 0.30 ng / mL до 0.70 ng / mL, High DPD - над 0.70 ng / mL, ↑- Увеличение, ↓- Намаление, **N** - Брой пациенти

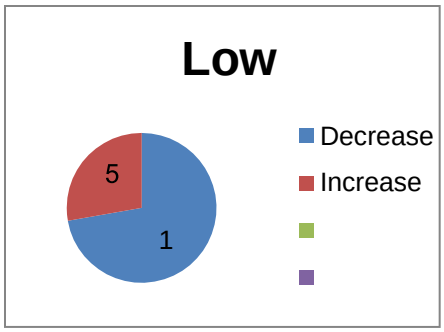
	Lymphocytes		**Thrombocytes**		
	↑	↓	↑	↓	**N**
***	3	18	3	8	7
Low	2	11	2	23	8
Medium	4	8	2	17	14
High	6	4	4	5	5

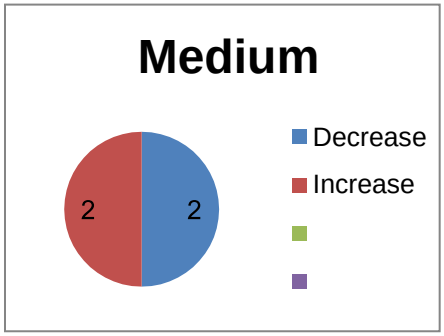
Табл. D.11. Интегрални промени на I (Ly) и I (Th) след 5-FU химиотерапия на пациенти жени при различни плазмени нива на DPD

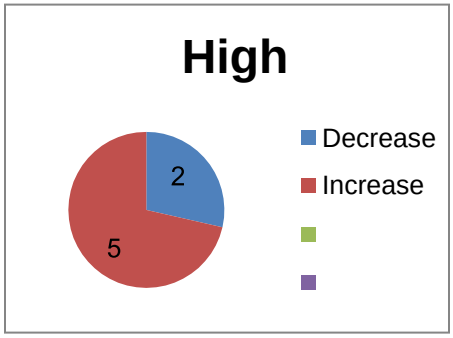
*** DPD - По-малко от 0.15 ng / mL, Low DPD - от 0.15 ng / mL до 0.30 ng / mL, Medium DPD - от 0.30 ng / mL до 0.70 ng / mL, High DPD - над 0.70 ng / mL, ↑- Увеличение, ↓- Намаление, **N** - Брой пациенти

I (Ly) при пациенти мъже

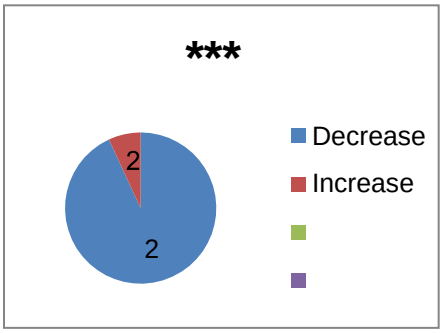


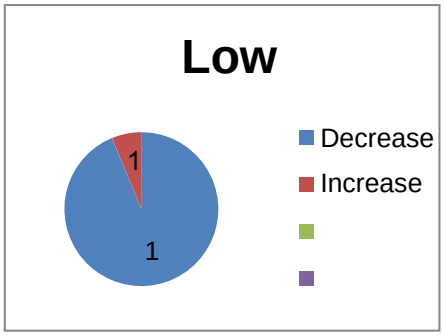


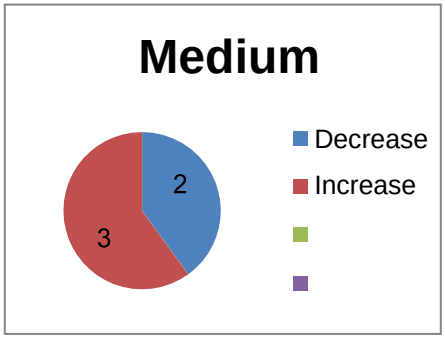


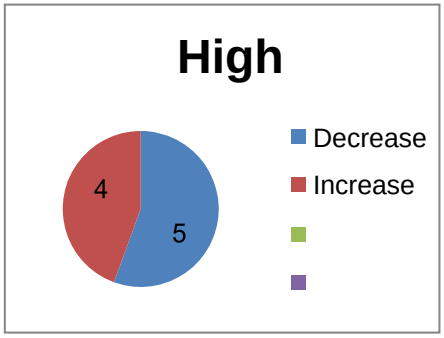


I (Th) при пациенти мъже

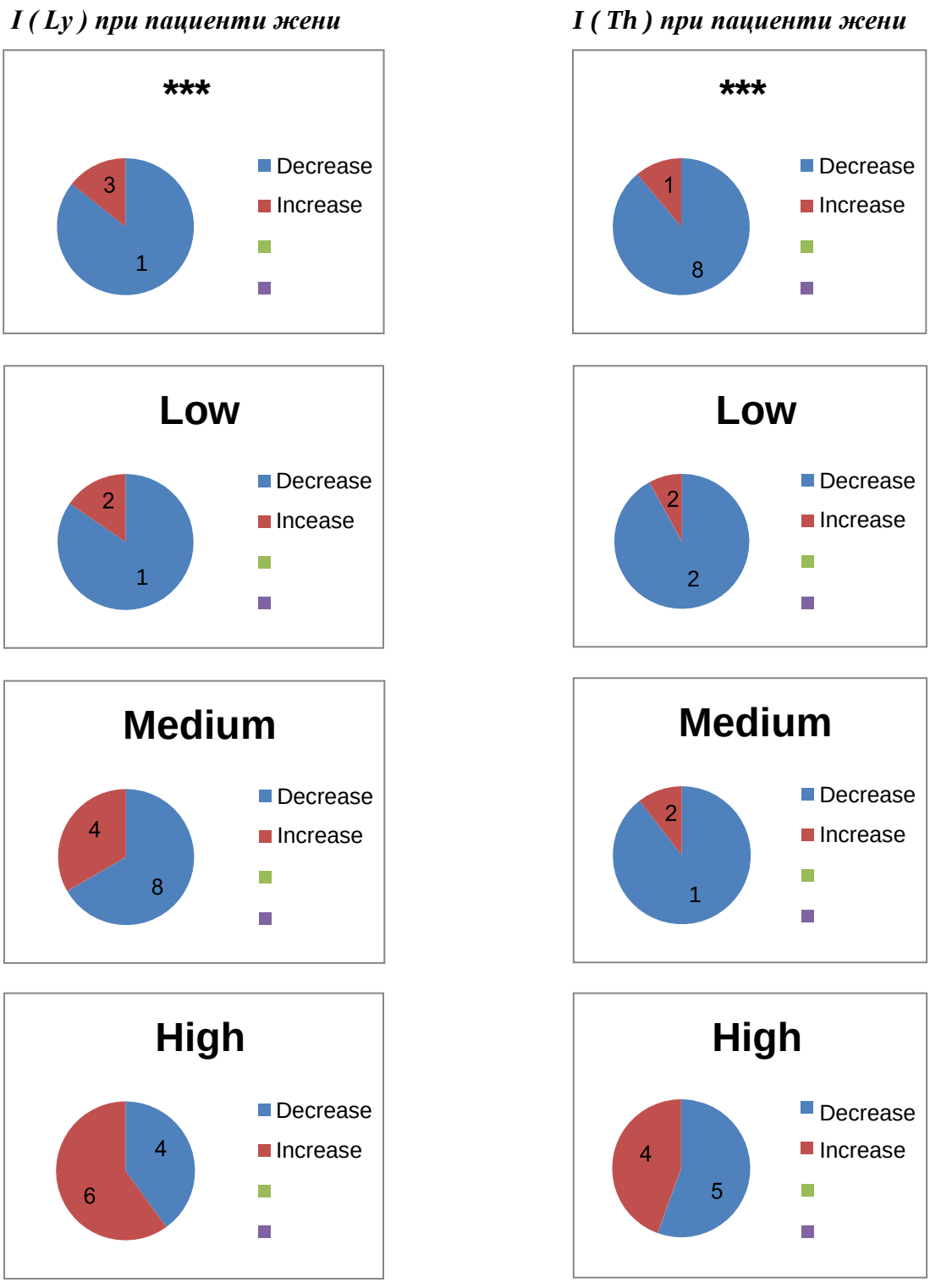








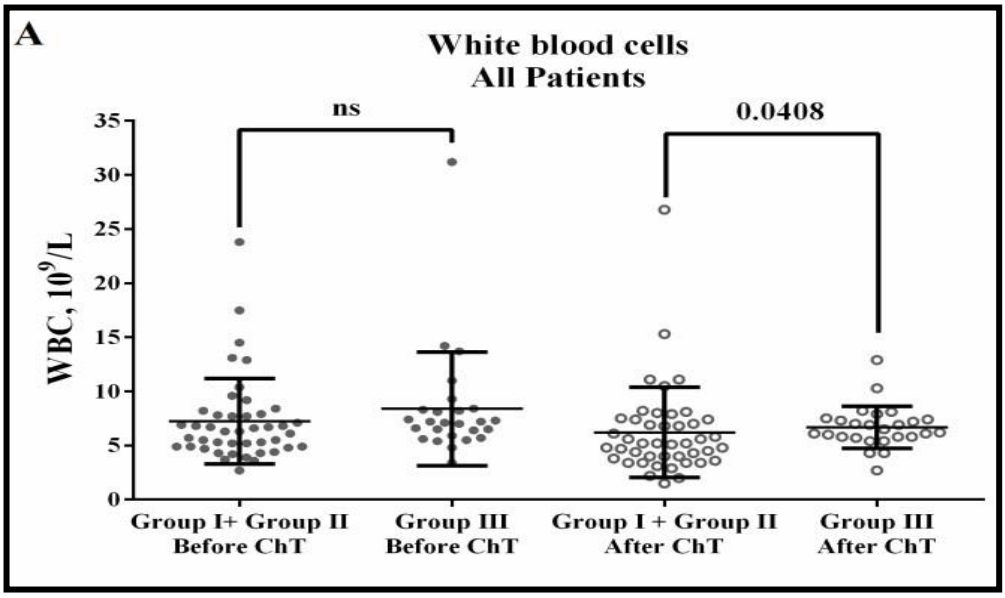
Фиг. D.8.A. Плазмени DPD нива и интегрални I (Ly) и I (Th) промени при 5-FU химиотерапия на пациенти мъже

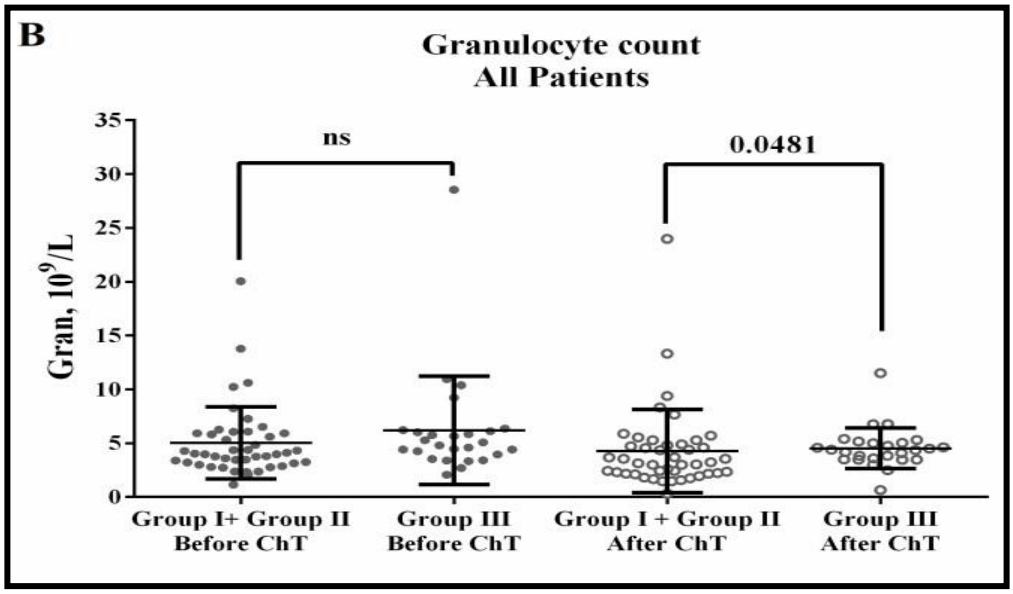


Фиг. D.8.B. Плазмени DPD нива и интегрални I (Ly) и I (Th) промени при 5-FU химиотерапия на пациенти жени

*** DPD - По-малко от 0.15 ng / mL, Low DPD - от 0.15 ng / mL до 0.30 ng / mL, Medium DPD - от 0.30 ng / mL до 0.70 ng / mL, High DPD - над 0.70 ng / mL, Increase - Увеличение, Decrease - Намаление, **N** - Брой пациенти

В онкологичната практика е прието почти аксиоматично, че при химиотерапия с флуоропиримидинови цитостатици най-честа НЛР е увреждане на левкопоезата. DPD-дефицит може да аггравира тази хемотоксичност и да доведе до потенциално опасна левко- / панцитопения. В тази серия са изследвани промени в хемопоезата (нива на левкоцщти, гранулоцити, лимфоцити, еритроцити и тромбоцити) преди и след химиотерапия в зависимост от установените преди това DPD нива при същите пациенти. Резултатите не показаха достоверни изменения в стойностите на хемоглобин, еритроцити и хематокрит, преди и след химиотерапията, които да корелират с рзличните DPD нива. Забелязана е известна тенденция за потискане на тези показатели при по-ниски DPD нива. За разлика от това е установено достоверно понижение в общия брой левкоцити, и броя на гранулоцити 5-FU химиотерапия при пациенти с по-ниско DPD ниво (Group I, II) в сравнение с по-високо DPD ниво (Group III). Данните са представени на Фиг. D.9 A, B. Заслужава да се отбележи, че преди 5-FU химиотерапия няма достоверно разлика в броя левкоцити и гранулоци (първите 2 колони от Фиг. D.9 A, B).





Фиг. D.9. Брой левкоцити и гранулоцити преди и след 5-FU химиотерапия (ChT) и при пациенти с различно DPD ниво в кръвната плазма
А – левкоцити (WBC), В - гранулоцити (Gran)

При равняване на броя левкоцити и гранулоцити при пациентите с по-високи DPD нива и пациенти с по-ниски DPD нива статистически е устновено достоверно понижаване на този брой при по-ниските DPD нива. Стойностите преди и след 5-FU са WBC (Group I и II) $7.227 \pm 3.951.10^9$ / L и $6.2 \pm 4.175.10^9$ / L, (Group III) са $8.381 \pm 5.251.10^9$ / L и $6.681 \pm 1.947.10^9$ / L, за Gran (Group I и II) $5.032 \pm 3.356).10^9$ / L и $4.27 \pm 3.87.10^9$ / L, (Group III) $6.188 \pm 5.037.10^9$ / L и $4.530 \pm 1.89.10^9$ / L.
Тези данни показват убедително, че мониториране на DPD нивото в кръвта може да има съществено и позитивно значение за повишаване на ефективността и намаляване на НЛР при химиотерапията с флуоропиримидини.

D.2.2. Обобщение и кратък анализ на получените резултати

От общо 71 пациенти, които са включени тази част от изследванията, по демографските критерии 83.8 % са мъже и 87 % са жени. Диагнозата *carcinoma recti* е по-честа при мъжете (32.5 %), в сравнение с жените (25.8 %). За разлика от тях диагнозите *carcinoma*

colonis ascendens или *colonis descendens* са по-чести при жените (12.9 % и 29 %) в сравнение с мъжете (4.7 % и 18.7 %).

D.2.3. Анализ на онко-фармакологичната корелация между плазмените DPD нива и цитотоксичните ефекти на 5-FU

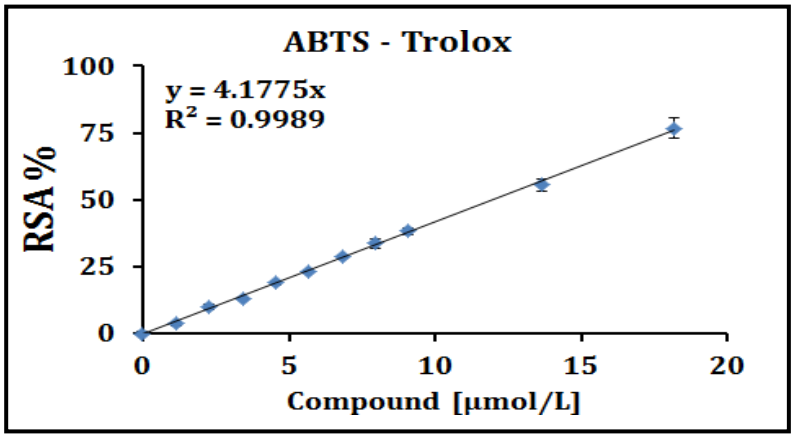
Получените резултати дават възможност за качествена и в известна степен количествена достоверна представа за корелацията между нивата на DPD в плазмата на пациенти, подложени на химиотерапия с 5-FU и интензитета на предизвиканите нежелани лекарствени реакции (НЛР). Анализът на данните за интегралните промени на I (Ly) и I (Th) аргументирано налага извода, че по определените количества DPD в плазмата могат да бъдат достоверно екстраполирани вероятните НЛР при химиотерапията с 5-FU.

Представените резултати недвусмислено показват, че колкото по-високи са плазмените нива на DPD, толкова повече са благоприятните и по-малко са неблагоприятните ефекти от химиотерапията с 5-FU. Настоящото изследване може да бъде квалифицирано като пилотно проучване, в което за първи път се прави опит път за квантифициране на отношението между нивото на DPD в плазмата и интензитета на цитотоксичните ефекти при химиотерапия с 5-FU. Проучването няма претенции да налага допълнителни критерии за добра клинична и / или добра лабораторна практика при химиотерапията с 5- FU.

D. 3. Резултати получени в проведените изследвания на редокс-статуса на кръвна плазма

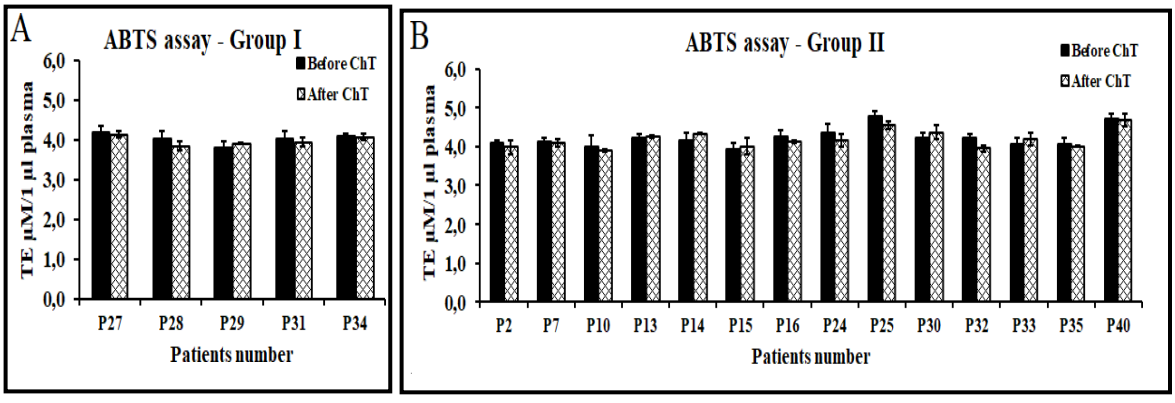
ABTS метод

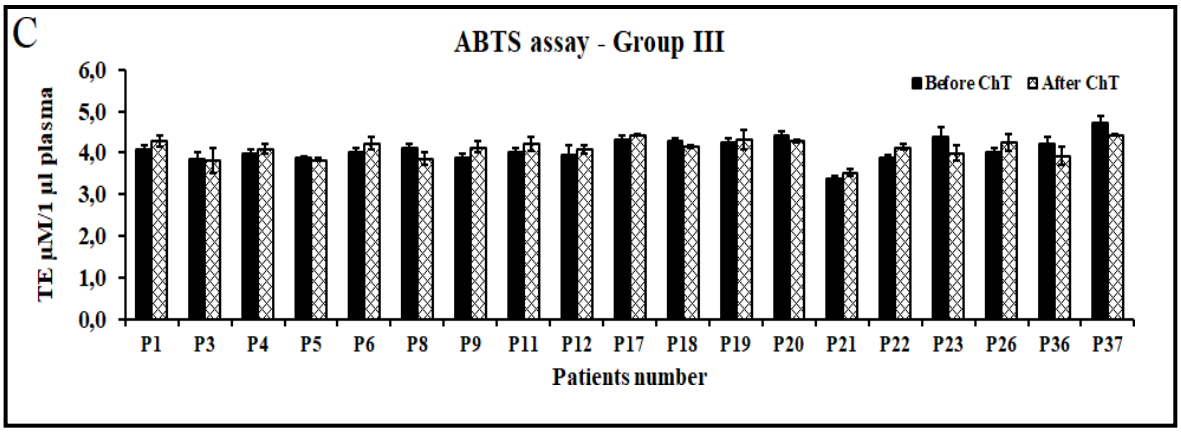
За изследване на антиоксидантният капацитет на кръвната плазма на пациенти с колоректален карцином е приложен ABTS метод. Получените резултати са представени като Тролокс-еквивалент (TE μM/1μL плазма). За целта е построена калибровъчна крива при референт Тролокс и екстинкция 734 nm (Фиг. D.10.).



Фиг. D.10. Стандартна калибровъчна крива Тролокс-еквивалент с аналитичен вид на уравнението y = 4.18 * x, R^2 0.99

На Фиг. D.11. за всеки пациент са представени по две стойности, съответстващи на плазмен Тролокс-еквивалент антиоксидантен капацитет преди и 14 дни след химиотерапия

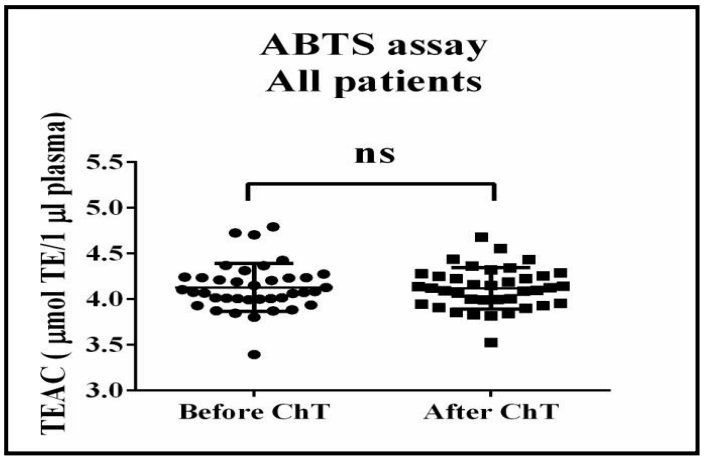




Фиг. D.11. Тотален антиоксидантен капацитет на плазма на пациенти преди и след химиотерапия при различни DPD нива

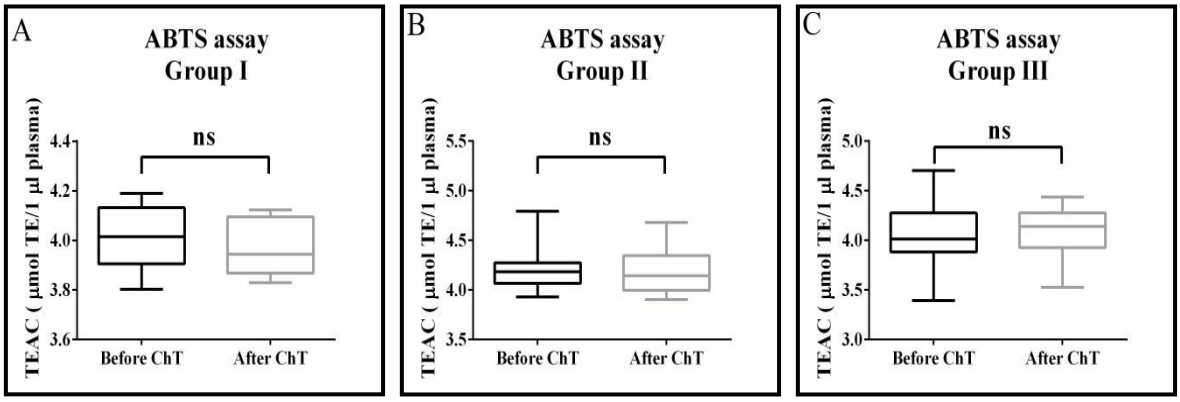
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

Получените резултати показват близки стойности на Тролокс-еквивалент антиоксидантен капацитет между отделните пациенти. Стойностите преди химиотерапия са в диапзона 3.40 - 4.79 TE µM / µL. След химиотерапия минималната и максималната стойност са 3.53 и 4.68 TE TE µM / µL. Сравняването на резултатите преди и след третиране на всеки отделен пациент, при повечето пациенти не показва статистически достоверна разлика. Данните за всеки отделен пациент преди и сред химиотерапия са сумирани на Фиг. D.12. Анализът на данните не показва статистическа разлика между средните стойности ($p > 0.05$). Медианата и средната стойност преди и след 5-FU са 4.10 и 4.13 TE µM / µL, респ. 4.13 и 4.12 TE µM / µL.



Фиг. D.12. Обобщен анти-оксидантен капацитет като TE μM / μL еквивалент преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия

Данните за Тролокс-еквивалент антиоксидантния капацитет по групи преди и след химиотерапия са показани на Фиг. D.13. Средните стойности за пациентите от I, II и III група са 4.02, 4.23, 4.08 μM / μL, респ. При втория анализ стойностите са респ. 3.97, 4.18, 4.11 μM / μL.



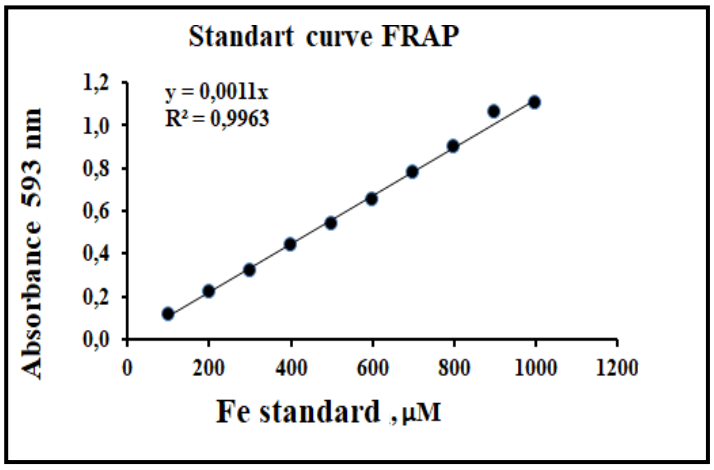
Фиг. D.13. Обобщен анти-оксидантен капацитет като TE μM / μL еквивалент при различни DPD нива преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

Изменението във всяка една от групите е под 2%, като и в трите групи не е установена статистически достоверна разлика между данните преди и след химиотерапи. Като цяло се наблюдава минимален превес на средната стойност на Тролокс-еквивалент антиоксидантния капацитет на пробите взети от пациенти, при които нивата на DPD са в диаазона 0.15 - 0.39 ng / mL.

FRAP метод

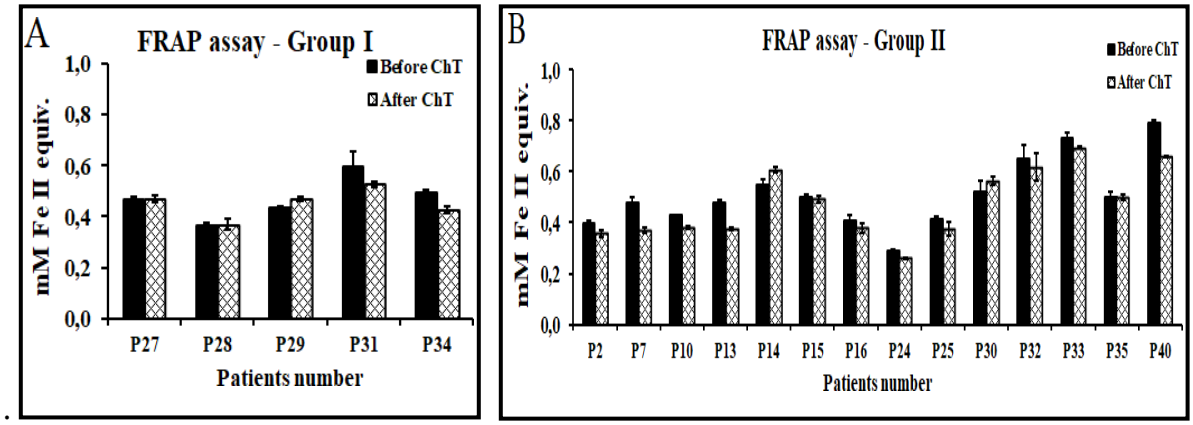
За изследване на фери-редукционната активност на кръвната плазма на пациенти с колоректален карцином е приложен FRAP метод. Получените резултати са представени като mM Fe^{II} еквивалент. За целта е построена калибровъчна крива при референт железен сулфат и екстинкция 593 nm (Фиг. D.14.). Проведените експерименти с референта са в

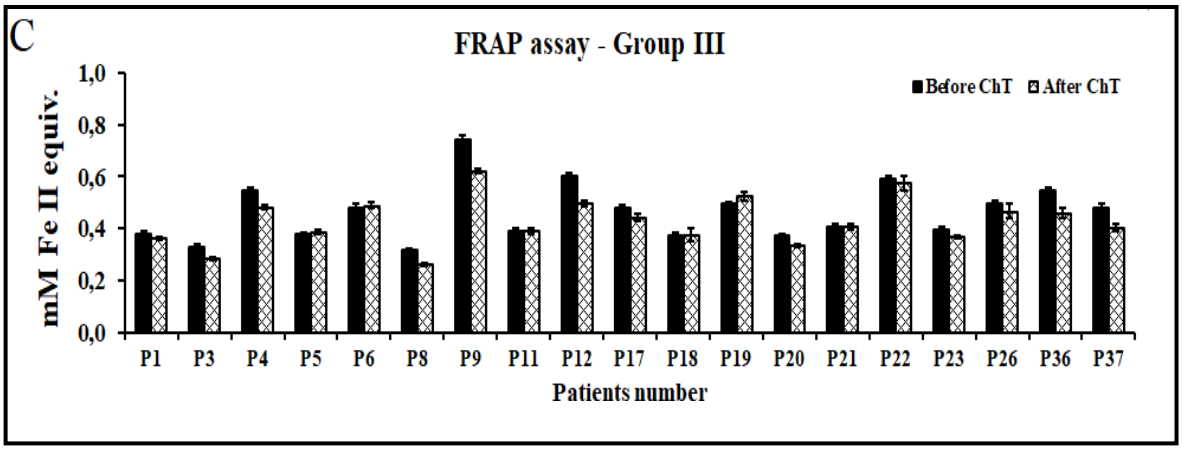
концентрационния диапазан 0 - 1000 µmol / L.



Фиг. D.14. Стандартна калибровъчна крива на референт железен сулфат
аналитичен вид на уравнението y = 0.0011 . x, R^2 0.99

Индивидуалните данни за плазмената фери-редукционна активност при всеки пациент преди и след хмиотерапия, съгласно приетия дизайн на изследванията, са представени на Фиг. D.15.

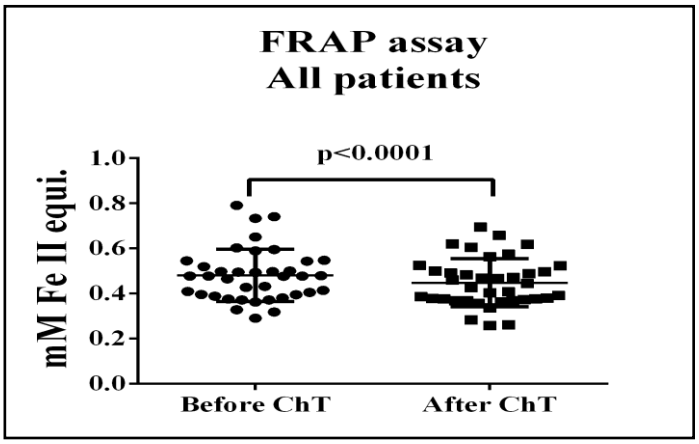




Фиг. D.15. Тотална фери-редукционна активност на плазма от пациенти преди и след химиотерапия при различни DPD нива
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

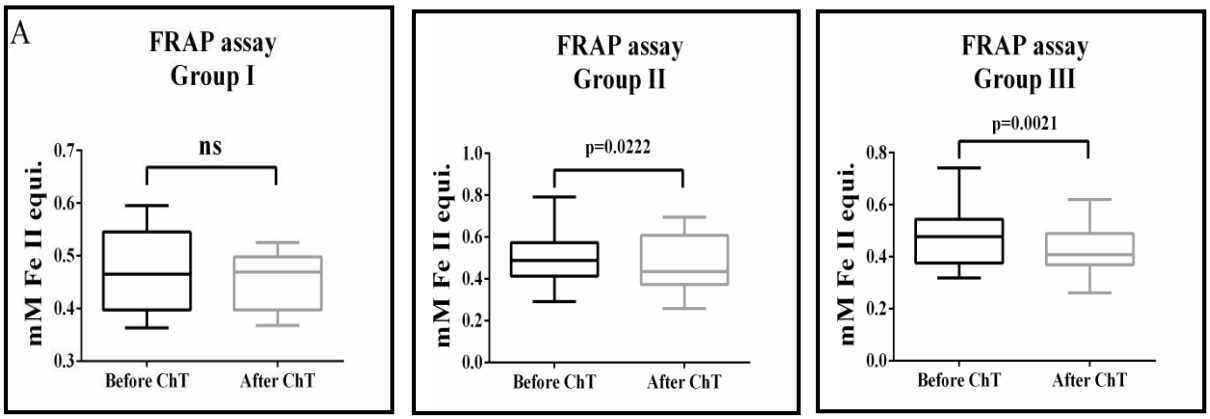
Стойностите на определяния в системата показател преди вливането прогресивно нарастват от 0.291 mM Fe^{II} до 0.791 mM Fe^{II}. След химиотерапия минималната и максималната стойност са от 0.259 mM Fe^{II} до 0.695 mM Fe^{II}. За разлика от получените с *ABTS метод* данни, при които нарастването на максималната и минималната стойност и в двете групи не надвишава 45 %, при определяне на фери-редукционната активност по *FRAP метод* нарастването е над 250 %. За разлика от системата определяща тотален антиоксидантен капацитет на плазма чрез *ABTS тест*, при която липсват отчетливи разлики между стойностите преди и след химиотерапия при повечето пациенти, при определяне на фери-редукционната активност чрез *FRAP метод* при голям брой пациенти вижда фери-редукционната активност е по-висока преди хиимотерапията, което говори за по-висока концентрация на феро-2-комплекса в пробните на тази група пациенти.
За по-добра преценка на ефекта от проведеното лечение данните за всеки конкретен пациент преди и сред химиотерапия са сумирани на Фиг. D.16. Анализът на данните показва, че при тези пациенти има статистически достоверна разлика между средните стойности на фери-редукционна активност ($p > 0.05$). Медианата и средната стойност преди и след 5-FU са 0.478 mM Fe^{II}, 0.482 mM Fe^{II}, респ.0.435 mM Fe^{II}, 0.448 mM Fe^{II}. Това е показано с по-високи стойности на екстинкцията на проби с добавена кръвна плазма взета преди химиотерапия, в сравнение с проби с добавена кръвна плазма взета след

химиотерапия. Това предполага протичане с по-голяма вероятност на преход на желязо от тривалентна фери-форма в двувалентна феро-форма.



Фиг. D.16. Обобщена фери-редукционна активност като mM F II еквивалент
преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия

Данните за определения Fe^{II} еквивалент по групи преди химиотерапия са па показани на Фиг. D.17.

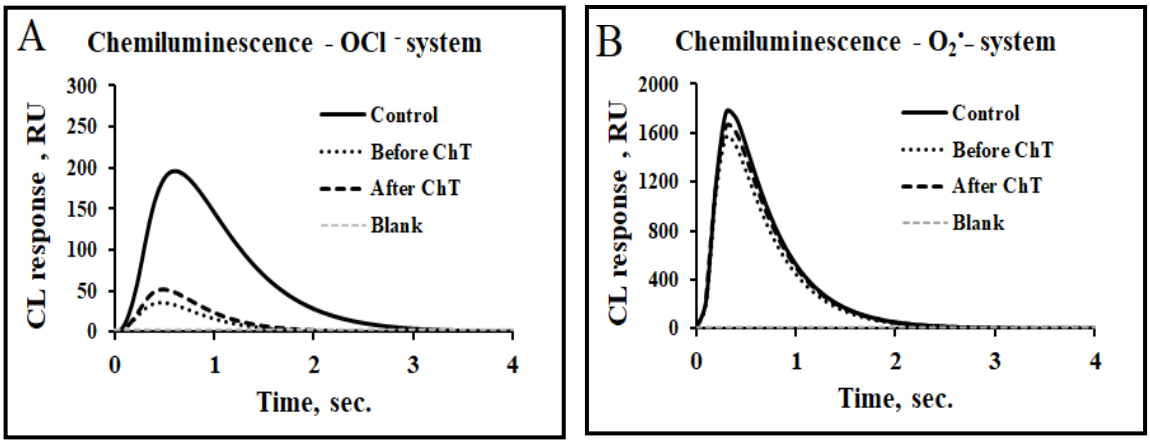


Фиг. D.17. Обобщена фери-редукционна активност като mM Fe^{II} еквивалент.
еквивалент при различни DPD нива
преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

Средните стойности за пациентите от I, II и III група са респ. 0.47, 0.51, 0.462. При втория анализ стойностите са респ. 0.452, 0.473 и 0.428. И в трите групи се наблюдава понижение на средните стойности, като намаляването е най-слабо проявено и недостоверно при Group I ($p>0.05$). За Group II и Group III е намерена статистически достоверна разлика като понижението и в двете групи е над 7 %.

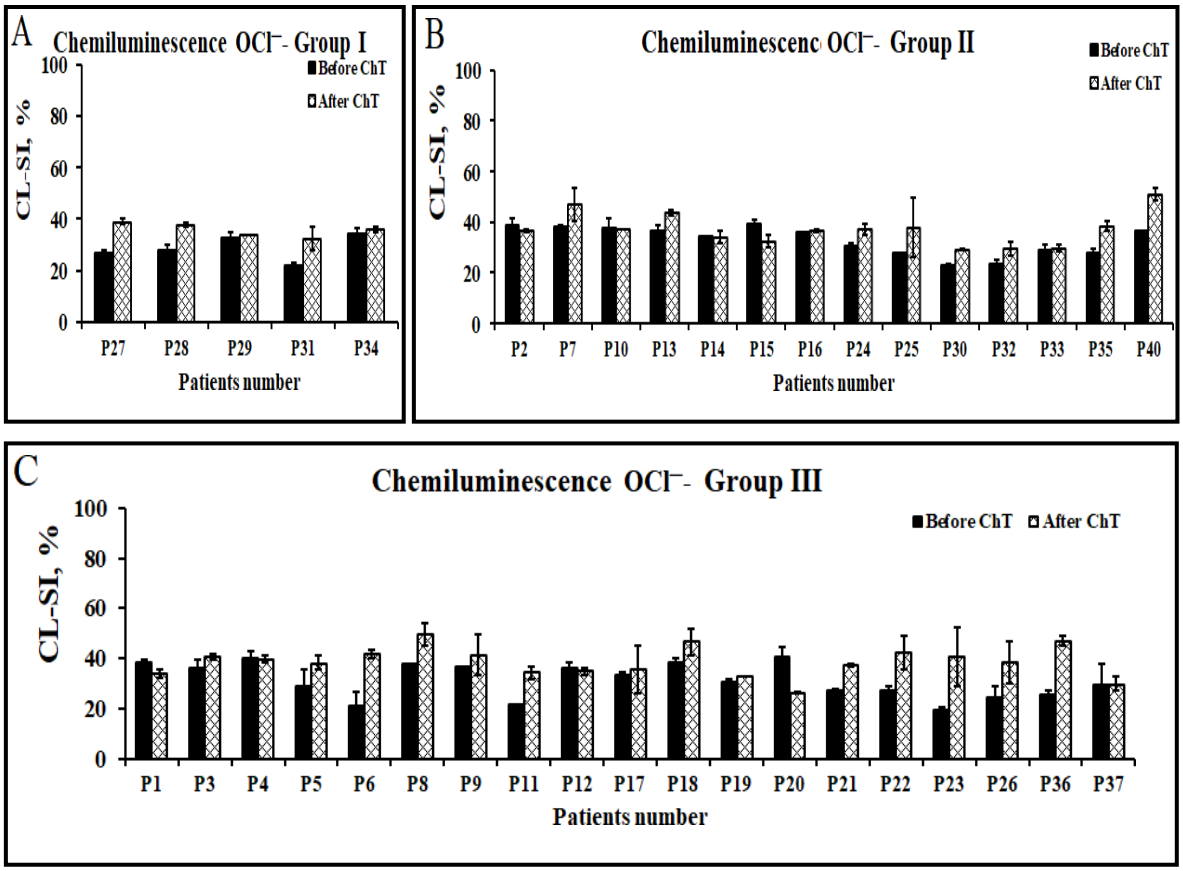
Хемилуминисцентни системи

Използвани са високо-чувствителни луминол-зависими хемилуминесцентни системи, съдържащи супероксиден анион радикал или хипохлорит, които са биологично важни и имат отношение както към неопластичните заболявания, така и към свързаните с прогресията на тази група заболявания възпалителни процеси. Двете АФК се различават значително по реактивоспособността и механизма на индуциране на оксидативна увреда. Анализите са направени с 40 проби кръвна плазма взети от рекрутираните в изследванията пациенти с колоректален карцином. В тази кохорта влизат 23 мъже и 17 жени от възрастовите диапазони 51 - 59, 60 - 69 и над 70 години. На Фиг. D.18. са представени типични хемилуминесцентни криви, отразяващи общата тенденция на изменение на базовите им характеристични параметри (пик и площ) в двете системи като е отчитан хемилуминесцентния отговор на четири групи проби: (i) контрола, в която е генерирана съответната АФК, (ii) проба, съдържаща всички компоненти без луминол, която служи за базисна линия отчитаща собственото светене, (iii) проби съдържащи кръвна плазма взети преди 5-FU химиотерапия, (iv) проби съдържащи кръвна плазма взети след 5-FU химиотерапия. Взаимодействието във всички проби е проследено за времеви интервал от 4 секунди. Фигурата показва, че в двете моделни системи blank-пробите съвпадат по обсцисата на графиката. Това доказва отсъствие на емитирана светлина при липса на луминофор и гарантира, че наблюдавания ефект върху хемилуминесцентния отговор не е резултат от собственото светене. В контролните проби на двете системи има висок максимум на хемилуминесцентния отговор. При това времето от стартиране на отговора до достигане на максимум в кинетиката е под 1 секунда, което е характерно за бързо протичащи свободно-радикални процеси.



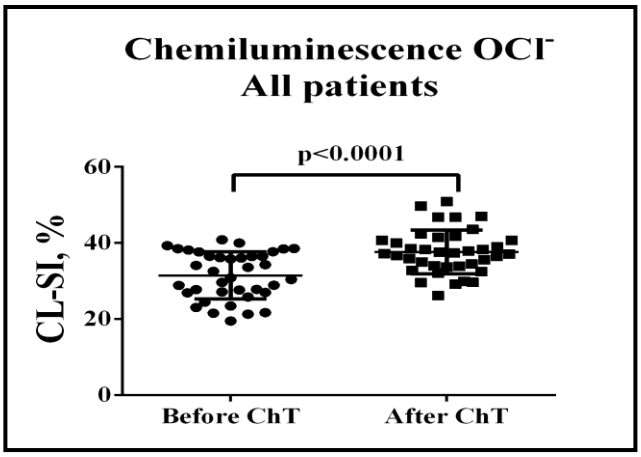
Фиг. D.18. Типични хемилуминесцентни криви, получени чрез луминол-зависима хемилуминесценция преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия А - система на генериране на OCl^- от NaOCl, В - система на генерация на супероксид от KO_2.

При все че диаграмите показват, че в пробите с добавена плазма от пациенти има потискане на CL отговор и респективно намаляване на количеството на регистрираната този метод АФК. Хемилуминесцентните криви на проби с кръвна плазма показват различна степен на повлияване в зависимост от наличния в системата радикал. Резултат на това е намаляване на „площ под“ и максимален интензитет на хемилуминесцентната крива спрямо контролата. Хемилуминесцентният сигнал е с по-слаба интензивност в сравнение с контролно измерване в система съдържаща хипохлорит, което е показателно за по-слабо влияние върху нивото на регистрирания супероксид. На Фиг. D.19. те са представени от моделна система на генериране на хипохлорит от NaOCl. Данните за отделните пациенти позволяват да бъде направена приблизителна преценка на проявения плазмен скевинджър-капацитет, промените от провежданата химиотерапия и индивидуалните особености при отделни пациенти. При по-големия брой пациенти стойностите на хемилуминесцентния скевинджър-индекс преди и след третиране са близки и варират около 35 %. В случаите на достоверни разлики стойностите на индекса са по-високи в пробите взети след химиотерапия.



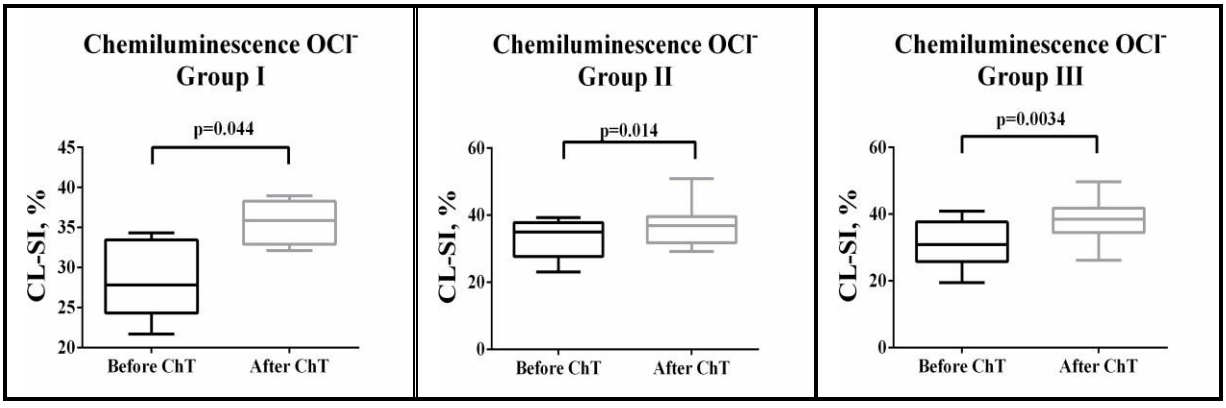
Фиг. D.19. Тотален антиоксидантен скевинджър-капацитет в система на генериране на OCl^- от NaOCl при различни DPD нива преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

Стойностите на CL-индекс преди и след химиотерапия са в диапазона 19.55 % - 40.89 %, респ. 26.20 - 50.87 %, т.е. минималната и максималната стойност са повишени. Това намаляване на количеството регистриран радикал в моделната система, респ. повишен CL-индекс. За по-добра преценка на ефекта от проведеното лечение данните за всеки конкретен пациент преди и сред химиотерапия са сумирани на Фиг. D.20. Анализът на данните показва статистически достоверна разлика между средните стойности на CL индекс. Медианата и средната стойност преди и след 5-FU са 31.73 %, 31.47 %, респ. 37.31 %, 37.66 %. След 5-FU химиотерапия достоверно нараства и средната стойност на CL-индекс ($p < 0.05$).



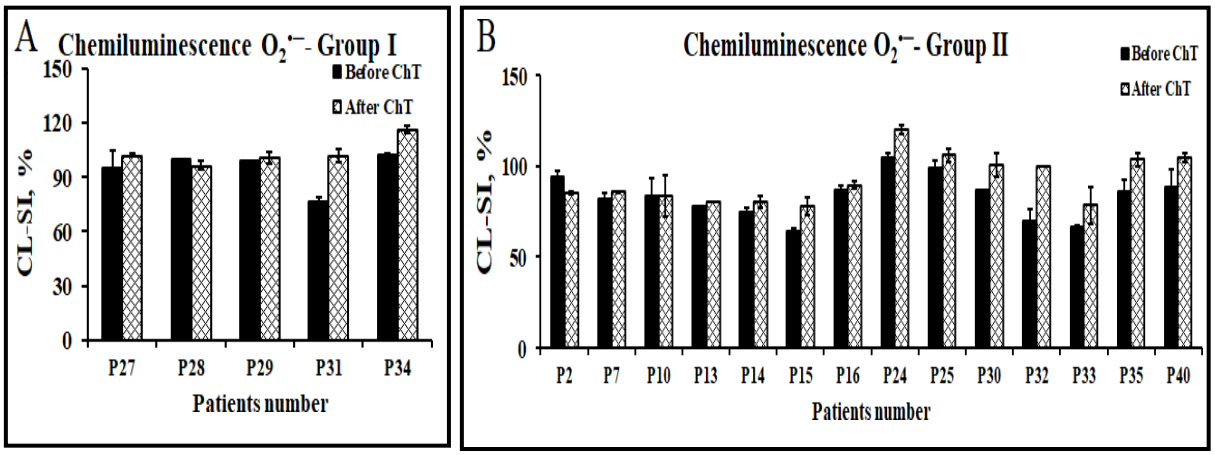
Фиг. D.20. Обобщен антиоксидантен скевинджър-капацитет в система на генериране на OCl- от NaOCl преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия

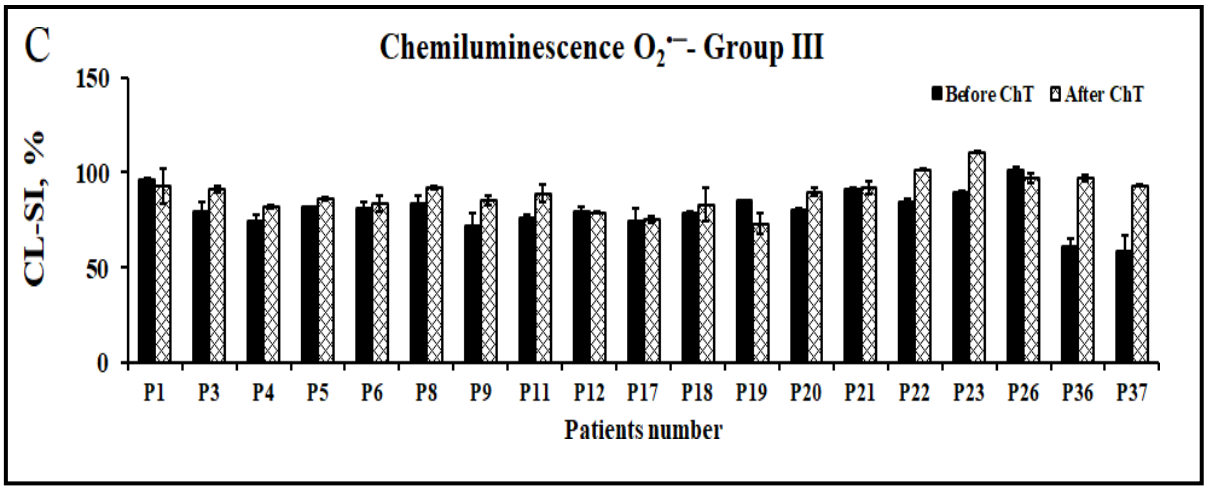
Получените резултати показват, че кръвна плазма взета след химиотерапия с 5-FU има по-слаби скевинджър-капацитет и способност да понижава концентрацията на хипохлорит в сранение с кръвна плазма взета от същите пациенти преди тази химиотерапия. На Фиг. D.21. са представени данни, които показват изменението на плазмения скевинджър-капацитет в система съдържаща хипохлорит при различни DPD нива преди и след химиотерапия. Средните стойности на CL индекс за пациентите от групи I, II и III преди химиотерапия са 28.67 %, 32.71 %, 31.29 %. За пробите взети при следващото проследяване стойностите на CL индекс са респ. 35.65 %, 37.14 %, 38.58 % за същите групи.



Фиг. D.21. Обобщен антиоксидантен скевинджър-капацитет в система на генериране на OCl^- от NaOCl при различни DPD нива
преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

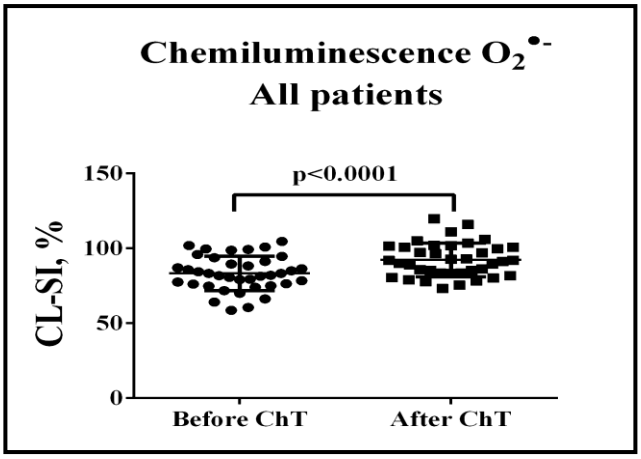
Резултатите потвърждават тенденцията за статистически достоверно нарастване на CL-индекс, респ. понижение на скевинджър-свойствата на кръвната плазма взета след химиотерапия. Разликата в средните стойности преди и след 5-FU химиотерапия корелира с нарастване на нивото на DPD. На Фиг. D. 22. са показани резултатите от изследване на антиоксидантния скевинджър-капацитет на кръвна плазма в система на генериране на супероксиден анион-радикал от калиев супероксид. Фигурата показва, че отношението (%) сигнал в проба с добавена плазма vs сигнал в проба контрол надвишава 70 % при почти всички пациенти, т.е. стойностите на CL индекс в тази система са значително по-високи от стойностите в системата съдържаща хипохлорит (по-висок индекс, по-нисък антиоксидантен капацитет на кръвната плазма. Данните показват по-ефективно елиминиране на хипохлорит отколкото супероксид анион-радикал. С малки изключения преди и след 5-FU химиотерапия се отчитат близки стойности, като тенденция за по-висок CL-индекс има химиотерапия.





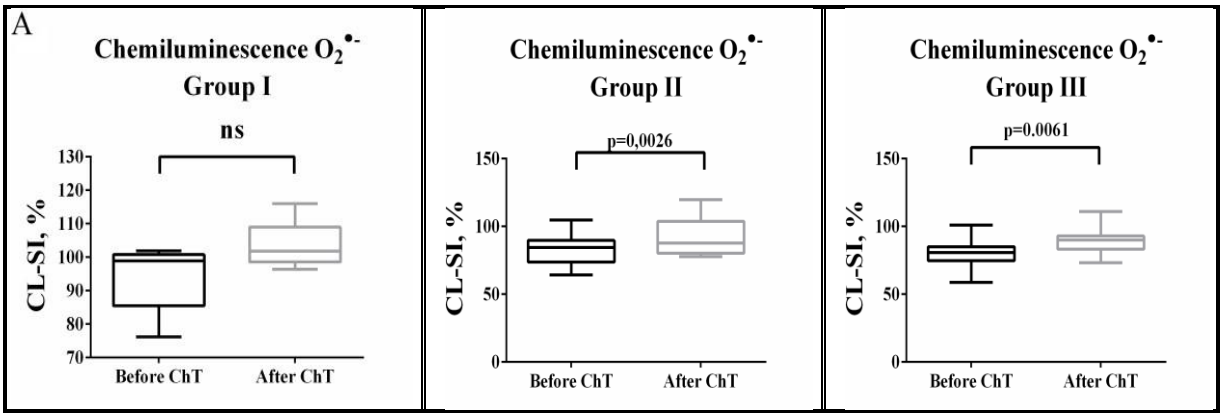
Фиг. D.22. Тотален антиоксидантен скевинджър капацитет в система на генериране на $O_2^{\bullet-}$ от KO_2 при различни DPD нива
преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

Стойностите на CL-индекс преди и след химиотерапия са в диапазона 58.74 % - 104.7 %, респ. 73.16 % - 119.80 %, т.е. минималната и максималната стойност са повишени. При трима пациенти нарастването на CL-индекс след химиотерапия е значително. Това е доказателство за изчерпване на капацитета за елиминиране на съответна АФК при дадената плазмена концентрация. За по-добра преценка на влиянието на лечението върху редокс-статуса на пациентите, данните за всеки конкретен пациент преди и сред химиотерапия са представени на Фиг. D.23.



Фиг. D.23. Обобщен антиоксидантен скевинджър-капацитет в система на генериране на $O_2^{\bullet -}$ от KO_2 преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия

Анализът на данните показва достоверна разлика между средните стойности на CL индекс. Медианата и средната стойност преди и след химиотерапия са 82.69 %, 83.26 %, респ. 91.52 % и 92.28 %. След химиотерапия достоверно нараства и средната стойност на CL-индекс ($p < 0.05$). Стойността на „площ под кривата“ нараства и показва понижен капацитет на кръвната плазма да елиминира съответния радикал. Данните за CL-индекс в системата със супероксид показва различна степен на повлияване в зависимост от нивото на DPD в кръвната плазма (Фиг. D.24.). Средните стойности на CL индекс за пациентите от групи I, II и III преди химиотерапия са 94.28 %, 83.15 %, 80.43 %. За пробите взети при следващото проследяване стойностите на CL индекс са респ. 103.4 %, 92.54 %, 89.16 %.

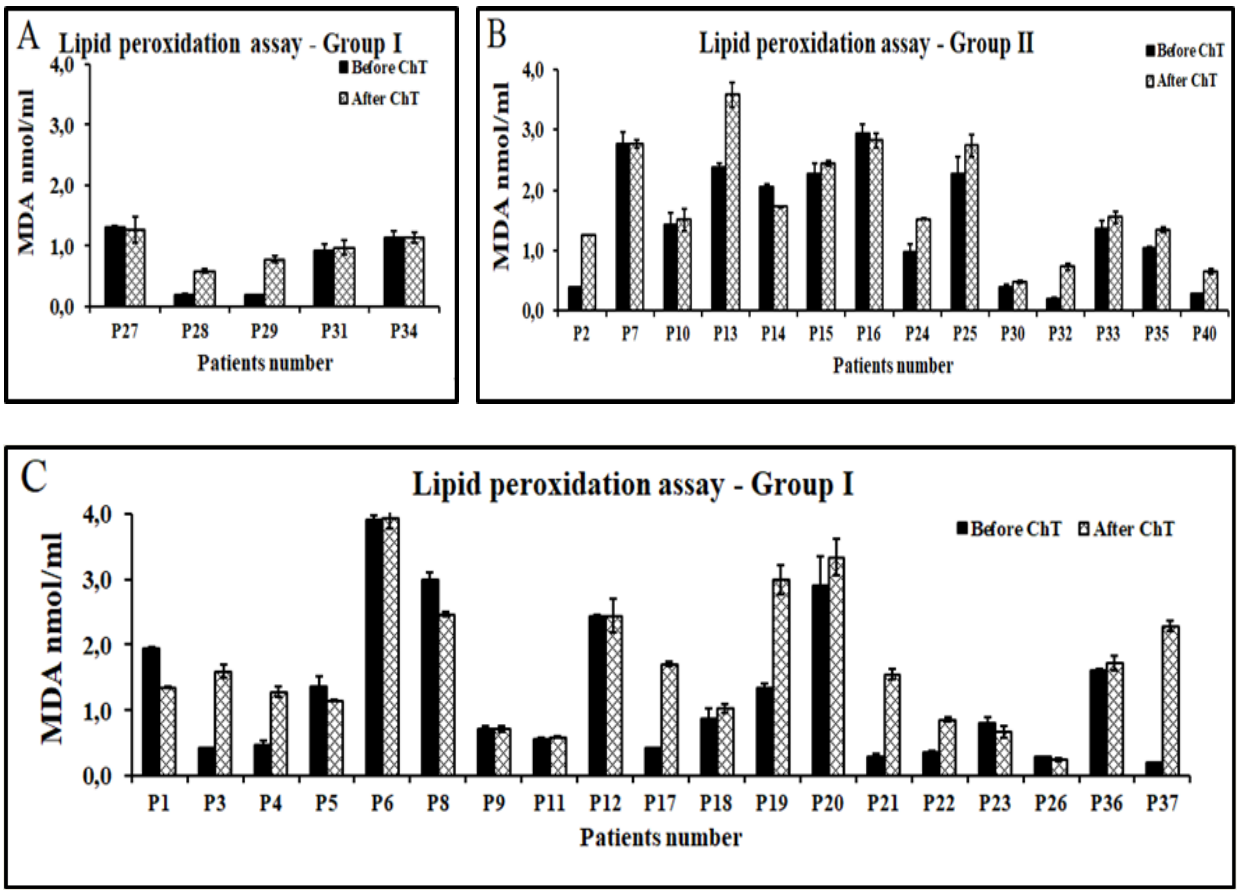


Фиг. D.24. Обобщен антиоксидантен скевинджър капацитет в система на генериране на $O_2^{\bullet -}$ от KO_2 при различни DPD нива преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

Средните стойности на CL индекс като в Group II и Group III разликата е статистически достоверна. Като цяло както преди, така и след химиотерапия с нарастване на нивото на DPD корелира с намаляване на средната стойност на CL-индекса.

TBA - RS метод (МДА квантифициране)

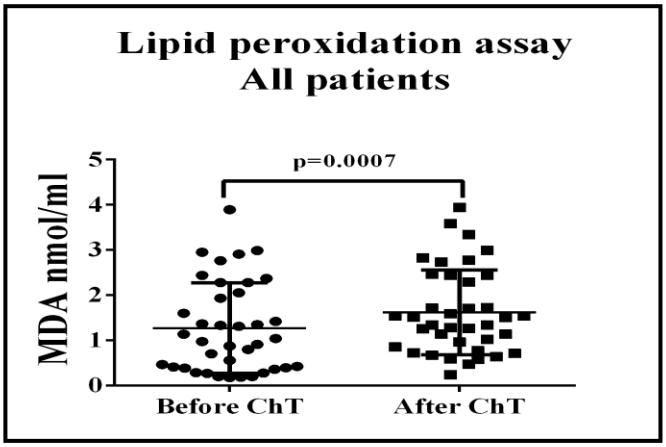
Липидната пероксидация е определена с минимални и максимални стойности на Индекс на липидна пероксидация (ИЛП) и количество образувани МДА продукти (nmol / L). Резултатите показват тенденция за достоверно нарастване на генерираните МДА продукти след 5-FU химиотерапия. На Фиг. D.25. са представени индивидуалните данни на всички пациенти за МДА продукция преди и след химиотерапия при различни DPD ннва в кръвната плазма. Ясно е изразено, че нарастване на нивото на DPD нараства броя на пациентите, при които химиотерапията засилила генерирането на МДА продукти.



Фиг. D.25. Тотално ниво липидна пероксидация като генерирани МДА продукти при различни DPD нива преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия

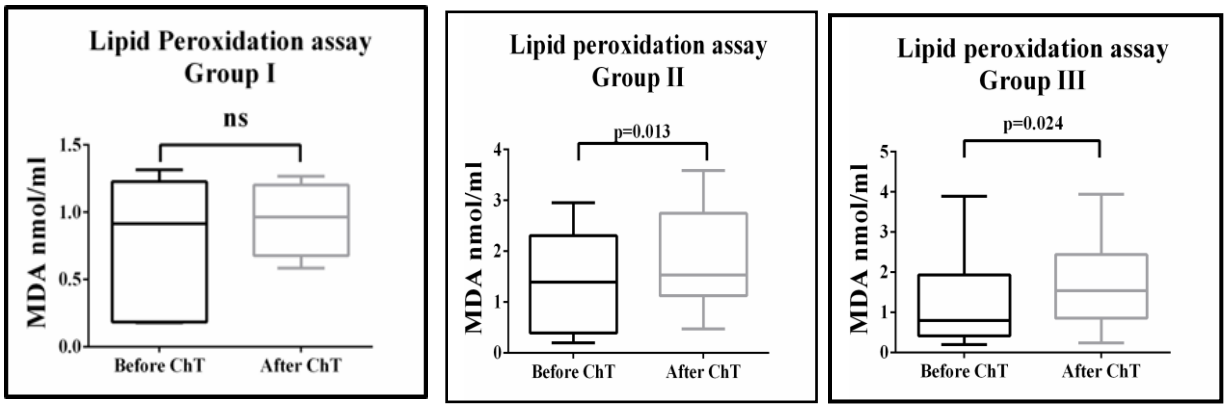
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

Преди съответния цикъл на химиотерапия минималните и максимални стойности на ИЛП са 0.18 nmol / L и 3.89 nmol / L. След химиотерапия стойностите на ИЛП са 0.25 nmol / L и 3.94 nmol / L. Генерираните МДА продукти са 1.27 nmol / L и 1.62 nmol / L.За по-добра преценка на влиянието на лечението върху липидната пероксидация резултатите за всеки конкретен пациент преди и сред химиотерапия са представени на Фиг. D.26.



Фиг. D.26. Тотално ниво на липидна пероксидация преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия

Анализът на резултатите от тези изследвания показва достоверно по-високо ниво на липидна пероксидация при пацентите от групи II и III, т. е. при по-високи нива на DPD химиотерапията може да има по-силен ефект върху редокс-статуса (Фиг. D.27.).



Фиг. D.27. Обобщено ниво на липидна пероксидация при различни DPD нива преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

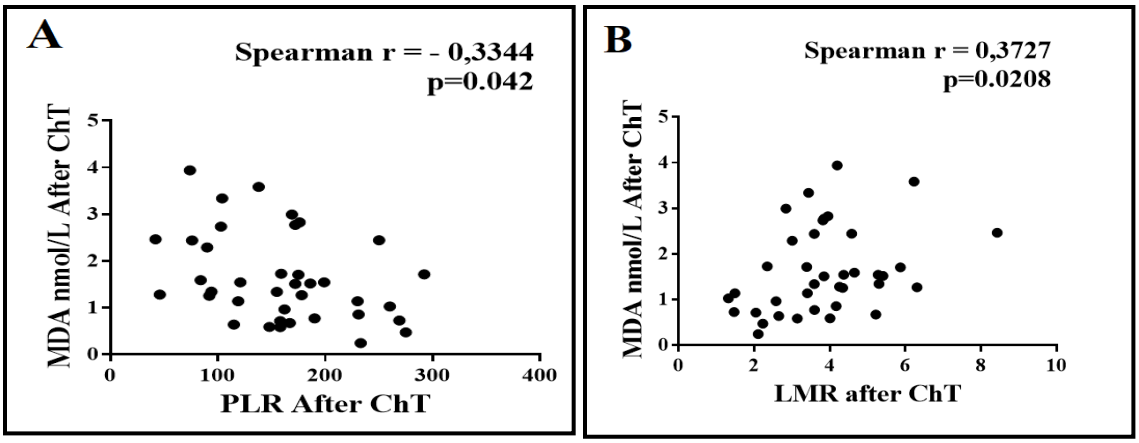
Обобщени данни за липидната пероксидация в система на генериране на МДА продукти чрез TBA - RS метод и МДА квантифициране са представени на Табл. D.13.

DIHYDROPYRIMIDINE ХИМИОТЕРАПИЯ

Група	**Before ChT**	**After ChT**
A	0.75 ± 0.53	0.95 ± 0.28
B	1.48 ± 0.97	1.79 ± 0.94
C	1.26 ± 1.10	1.68 ± 1.00

Табл. D.13. Обобщен индекс на липидна пероксдация при различни DPD нива преди (Before ChT) и след (After ChT) химиотерапия
DPD - A ≤ 0.15 ng / mL, B 0.15 - 0.39 ng / mL, C ≥ 0.39 ng / mL

Корелация между промените в нивото на липидна пероксидация предизвикани от химиотерапия с флуоропиримидини и някои маркери на възпалителния процес, какъвто винаги се открива в / и около тумора, е изследвана чрез отношението тромбоцити / лимфоцити (PLR) и лимфоцити / моноцити (LMR). Приложен е метод на рангова корелация на Spearman. Резултатите от този анализ са представени на Фиг. D.28.



Фиг. D.28. Корелационен анализ между степента на липидна пероксидация (генерирани МДА продукти) и някои маркери на възпалителния процес A- PLR, B - LMR

Е. Дискусия и обобщение на данните получени в проведените изследвания

Настоящият дисертационен труд е изграден върху данни получени в проведените от нас изследвания в две направления: изследвания с предимно химиотерапевтична (клинична) насоченост и изследвания с предимно теоретична (биофизична) насоченост. Привидно може да изглежда, че взаимната обвързаност между тези два аспекта на изследванията е повече индиректна, отколкото директна. В действителност, обаче изследванията относно окси-редукционния капацитет в плазмата на болни с колоректален карцином (CRC) и изследванията относно нивата на DPD в плазмата с цел квантифициране на риска от развитие на нежелани лекарствени реакции (НЛР) при химиотерапията с 5-FU на пациенти с CRC са два аспекта на интегралните проучвания относно някои молекулни механизми на патофизиологията и фармакотерапията на CRC. Независимо от този факт, за по-детайлизиран анализ на данните получени от изследванията проведени в посочените две направления, дискусията по тях е представена в два самостоятелни под-раздела.

Е. 1. Изследвания на нивото на PDP в кръвната плазма

Демографски и нозологични характеристики на рекрутираните групи пациенти

В настоящия раздел се анализират резултатите от изследвания на плазмените PDP нива в проби периферна кръв получени от 74 пациенти от двата пола, които са били подложени на химиотерапия с 5-FU. Броят на рекрутираните в изследванията пациенти позволява да бъдат направени достоверни анализи и някои съществени изводи. От рекрутираните пациенти 58.1 % са мъже и 41.9 % са жени. Това разпределение по пол е в съгласие със приетото становище, че по-голяма честота на малигнените тумори в СЧТ се наблюдава при мъжете в сравнение с честотата на тези тумори, която се наблюдава при жените Понастоящем се вече валидирано, че най-честите малигнени тумори са карцинома на простатната жлеза при мъжете и карцинома на млечната жлеза при жените (Виж: Ред: К. Тимчева, Е. Кръстева, В. Цекова, 2012). В световен план CRC е вторият по честота малигнен тумор и продължава да се увеличава (Bar., et al., 2015). За някои близко-източни нации CRC е станал вече най-честият малигнен тумор сред мъжката популация (Al-Khateeb, M., et al., 2016). Данните от представените изследвания показват, че

разпределението по възраст на рекрутираните в изследванията пациенти е аналогично при мъжете и жените във възрастовите диапазони над 60 години. Освен това резултатите показват обезпокоителната тенденция на „подмладяване“ на малигнените заболявания в СЧТ, както при мъжете така и при жените, като достигат до 10 % от общия брой на всички рекрутирани пациенти. Тази тенденция се проявява убиквитерно във всички индустриални общества (American Family Physician, 2015). В представените тук изследвания с най-голяма честота са локализациите в сигмоидното и правото черво, което от всички коло-ректални локализации представлява 51.1 % за мъжете и 54.8 % за жените.

Онко-фармакологична корелация между плазмените нива на DPD и цитотоксичните ефекти на 5-FU

Аксиоматична истина е, че 5-FU в комбинация с Oxaliplatin, Irinotecan, или самостоятелно е най-често прилаганата “first line” химиотерапия за третиране на пациенти с колоректален карцином (Gustavsson, B., et al., 2015). Представените резултати показват достоверно, че колкото по-високи са плазмените нива на DPD, толкова повече са благоприятните и по-малко неблагоприятните ефекти при химиотерапия с 5-FU. Анализът по групи пациенти показва, че при пациентите мъже се наблюдава тенденция с увеличаване на количеството DPD в плазмата да нараства и броят на пациентите, при които тези промени в параклиничните показатели и клиничната симптоматика са благоприятни и да намалява броят на пациентите, при които тези промени са неблагоприятни. В проведените изследвания тази тенденция се оказа при пациентите жени по-слабо проявена. Тези резултати естествено предизвикаха провеждането на следващия етап на проучването в който целта беше да верифицираме по възможност качествено и количествено дали и в каква степен съществува връзка между наблюдаваните клинични и параклинични промени след химиотерапията с 5-FU и квантифицираните от нас DPD плазмени нива. За решаване на тази задача създадохме оригинален интегрален емпиричен показател, който да квантифицира сумарните промени (спадане или увеличаване) на броя на лимфоцитите и тромбоцитите в периферната кръв след химиотерапия с 5-FU на хомогенни групи от пациенти с близки индивидуални DPD нива. В този контекст индивидуалните реакции към химиотерапията с 5-FU бяха градирани по разработената от нас скала с интензитет (1) ако промените на I (Ly) и I (Th) са до 10 %, с интензитет (2) ако промените са до 20 %, с

интензитет (3) ако промените са до 30 % и с интензитет (4) ако промените са над 30 %. Работната хипотеза допуска, че интегралния интензитет от предварително дефинирани групи от пациенти би представлявал емпиричен квантитативен детерминант на корелация между установените DPD нива в плазмата и цитотоксичността при 5-FU химиотерапията. Резултатите от тази серия показват убедително, че след химиотерапевтичен цикъл с 5-FU увеличаването на броя на пациентите с благоприятни промени в клиничната симптоматика и параклиничните показатели и намаляването на броя на пациентите с неблагоприятни промени в клиничната симптоматика и параклиничните показатели кореспондира с прогресивното нарастване на количеството DPD в плазмата. Тези данни са достатъчно убедителни за DPD субгрупите пациенти мъже. Обобщените данни от изследванията показват, че при пациентите мъже с DPD нива под 0.15 ng / mL отношението на увеличен спрямо понижен I (Ly) е 29 % / 71 % и на увеличен спрямо понижен I (Th) е 7 % / 93 %. В контраст на това при пациентите мъже с DPD нива над 0.70 ng / mL отношението увеличен / понижен I (Ly) е 71 % / 29 % и увеличен / понижен I (Th) е 45 % / 55 %. Анализът на получените данни показва, че тази тенденция е проявена не така категорично при пациентите жени.

Настоящото изследване трябва да бъде възприемано като пилотно проучване, с което се прави за първи път опит количествено да бъде представена зависимостта между нивата на DPD в кръвната плазма и клиничните прояви на цитотоксичност при провеждане на 5-FU химиотерапия. Това проучване обаче, няма претенциите да въвежда допълнителни критерии за добра лабораторна или добра клинична практики при химиотерапията с 5-FU. Анализът на данните за интегралните промени на I (Ly) и I (Th) аргументирано налага извода, че по определените количества DPD в плазмата могат да бъдат достоверно екстраполирани вероятните НЛР при химиотерапията с 5-FU.

Неотдавна в обстойни клинични проучвания е установено, че близо 30 % от пациентите с CRC и химиотерапия с флуоропиримидини развиват цитотоксични усложнения (Kodali, S., et al., 2016) при които леталитета, може да достигне 0.5 % (Van Kuilenburg, A.B.P., 2004, Dhelens, C., et al., 2015). В проведените от нас изследвания концентрацията на DPD в кръвната плазма може да бъде в широк диапазон: при отделните пациенти варира в нива от под 0.15 ng / mL до над 0.70 ng / mL. В предишни изследвания е установено, че може да има 20-кратни разлики в нивата на DPD в плазмата при отделните индивиди (Etienne, M. C., et

al., 1995). В съгласие с това становище са данни на други автори, че експресията на DPD е положителлна в 39 % от пациентите (Fang, L., et al., 2016). Други автори съобщават по-високи нива на експресия (Ezzeldin, H., Diasio, R. 2004, Xiao, J., et al., 2005). Емперично се приема, че по-високи нива на DPD може да корелират с ресистентност към химиотерапията с 5-FU, докато по-ниски нива на DPD може да корелират с добра ефикасност и проявена токсичност на химиотерапията с 5-FU (Kirihara, Y., et al., 1999). В популационни проучвания е установено, че при 5 % от населението не се открива DPD ензимна активност (Mori, K., et al., 2000). В други 3-5 % има парциален дефицит на DPD (Rumiato, E., et al., 2013). Ако при такова състояние се налага химиотерапия с флуоропиримидини има вероятност да се появят застрашаващи живот усложнения. На основата на клинични наблюдения емпирично е прието, че токсичните прояви при химиотерапия с флуоропиримидини са по-тежки при жените, отколкото при мъжете (Chansky, K., et al., 2005). Трябва да се има предвид, че дозиране, респ. индивидуализиране на флуоропиримидините базирано само на фармакокинетичен скрининг може да бъде неточно, защото DPD дефицита не е единствения детерминант на тази токсичност. Чернодробни метастази и стеатоза, предизвикана от системна химиотерапия, могат да забавят лекарствения метаболизъм (Ramadori, G., Cameron, S., 2010), а инфламаторните медиатори могат да предизвикат *down regulation* на ензимната система P450 (Harvey, R. D., Morgan E. T., 2014). Това предполага по-комплексен подход, реализиран с фармакогенетично / фармакокинетично тестиране (Falvella, F. S., et al., 2015).

Понастоящем съществуват достатъчно добре идентифицирани биомаркери на лекарствените продукти за химиотерапия с молекулен таргет (Bokenmeyer, C., et al., 2000). В този смисъл много полезен при химиотерапия на пациенти с CRC се явява техния RAS статус, но за сега няма използваем биомаркер, който би могъл да предскаже реакцията на туморните клетки при третиране с 5-FU (Ochiai, T., et al., 2014). Авторите предлагат да се използва отношението orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) / dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) като параметър за предвиждане на ефекта от терапията с 5-FU. Теза ензими системи са първите въвлечени в OPRT-активиране (Tokunaga, Y., et al., 2007), респ. DPD-инактивиране (Ishikawa, M., et al., 2008) на въведения 5-FU. Според авторите малки стойности на това отношение могат да се дължат на ниска OPRT активност или висока DPD активност и съответстват на значително по-неблагоприятни за пациента обща

преживяемост и продължителност на ремисията. В онкологичната практика е добре известно, че ефекта от третирането с 5-FU варира при всеки конкретен пациент, което прави трудно предвидим резултата от терапията. Неотдавна е бил предложен тест за преценка на ефекта от 5-FU постоперативната химиотерапия на пациенти с CRC (Bai, W., et al., 2015). Теоретично това е обосновано от ключовата роля на ензимите thymidylate synthase (TS), thymidine phosphorylase (TP) и dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) за фармакодинамиката на 5-FU. При този тест върху парафинови проби от туморната тъкан се извършва имунохистохимично и флуоресцентно PCR квантифициране на двата ензими. Авторите намират, че при силна ензимна експресия терапевтичната ефективност на 5-FU е слаба. Този параметър може да бъде използван като индикатор за ефективност на приложената химиотерапия. Общоприето е, че химиотерапия с дихидропиримидинови лекарствени продукти е конвенционалната „първа линия“ терапия на пациентите с колоректален карцином. При тази терапия, обаче настъпват токсични прояви, които в някои случаи могат да са застрашаващи живота на пациентите, и дори да имат летален изход. Ежегодно съобщаваните случаи на 5-FU токсичност с летален край в САЩ са над 1100 (Bamat, M. K., et al., 2011). Такива инциденти на 5-FU токсичност с летален край всяка година са над 200 в Италия, и във Франция (Boisdron-Celle, M., et al., 2007).

Друг подход за предвиждане на висока 5-FU токсичност е биохимичен. С тест *ex vivo* ензимно разградения 5-FU в мононуклеарни клетки от периферна кръв се квантифицира като nmol / mL (Lostia, A. M., et al., 2009). С тази методология изследователи от този екип верифицират т. н. “бързи” и “бавни” тип метаболизатори на 5-FU, като и за двата типа съществува висок риск за развитие на висока 5-FU токсичност (Mazzuca, F., et al., 2016). Според авторите този метод е показал, че в 10 % от цялата популация съществува висок риск за сериозни 5-FU индуцирани нежелани реакции. Този брой е значително по-голям от числото затрашени от 5-FU токсичност, установено с другите рутинни методи (1.3 % от популацията). Други автори прилагат аналогичен подход, като квантифицират uracil и dihydrouracil в кръвната плазма и по отношението dihydrouracil / uracil определят степента на DPD дефицит (Ciccolini, J., et al., 2006). Цитираните по-горе два метода могат да имат известно предимство с това, че позволяват бързо и лесно да се предсказва както евентуален DPD дефицит, така и риск за поява на токсични реакции, преди да е започнала 5-FU терапия. Методът, който приложихме в проведените от нас изследвания може да

има предимства подобни на дискутираните по-горе. При това с такъв метод се определя количеството DPD в кръвната плазма в ng / mL, като за извършване на измерването е необходимо малко време в рамките на един работен ден.

Състояние на ензимен DPD дефицит е хередитарно автозомно рецесивно нарушение, което се среща в ограничен брой хора. Индивидите, които имат копия на два мутирали алели са DPD дефицитни хомозиготи и показват нулева DPD ензимна активност със значителен брой тежки симптоми, проявени от ранно детство като хипертония, припадъци, мантална ретардация (Van Kuilenburg, A. B. P., et al., 1999). Индивидите, които имат копие на един мутирал алел са DPD дефицитни хетерозиготи и показват парциална DPD ензимна инсуфициенция (Mercier, C., Ciccolini, J., 2006).

Понастоящем липсва официална регламентация, която нормативно да осигурява основания за тестиране на ензимната DPD активност при всеки пациент, получаващ 5-FU химиотерапия (Tsutsui, M., et al., 2018). Тази ситуация започва да се преценява във все повече страни с развито здравеопазване като пропуск на здравните осигурителни системи. Важно изискване към всички тестове предложени за скрининг на активност е медицинските характеристики на теста да се съчетават с приемливи икономически показатели за тяхното прилагане. В този контекст определянето на *скорост на DPD разграждане в мононуклеарни клетки от периферна кръв* като тест за предсказване на токсични реакции при 5-FU терапия може да има съществени предимства пред популярните понастоящем фармакогенетични и фармакокинетични методи (Mazzuca, F., et al., 2016). Авторите твърдят, че цената за подобен единичен тест без разходите за труд е ниска (около 10 долара) в сравнение с разходите, които се налага да правят онкологичните клиники (стотици долари) за третиране на пациенти с тежки токсични реакции индуцирани от 5-FU химиотерапия (Delea, T. E., et al., 2002).

Освен от хередитарна DPD ензимна инсуфициенция, токсични 5-FU реакции могат да бъдат предизвикани от разнообразни „технически“ причини, като напр. грешки в терапевтичната схема, вкл. неточно пре-програмирана инфузионна помпа, неточно изчислена доза, неадекватна схема на дозиране, или от стандартна дозировка, но при понижен клирънс (Lexicomp. W. K. Health, 2016). Успешно като 5-FU антидот при тези състояния е бил приложен Uridine triacetate (Vaudo, C. E., et al., 2016). Знае се, че 5-FU е потиска силно thymidylate synthase (TYMS), която е основния инхибиторен таргет при

химиотерапия с 5-FU. Methylene tetrahydrofolate reductase катализира генерирането на редуциран folate-кофактор, който има важно значение за TYMS инхибицията (Schwab, M., et al., 2008). Uridine triacetate (UTA) е *uridine pro-drug*, който е одобрен от FDA през 2015 година като фармакологичен 5-FU антидот (Ma, W., et al., 2016). Лекарственото средство се прилага за спешно лечение на възрастни и педиатрични пациенти при свръх-дозиране на 5-FU и не се препоръчва да бъде използван при не-спешни състояния. Обичайната UTA дозировка е 10 g или 6.2 g / m^2, p.o., през 6 часа (общо 20 дози) за 5 дни, при добра обща поносимост (Ison, G., et al., 2016). Прилагането на UTA на пациенти с DPD ензимна недостатъчност може да бъде ефикасно при условие, че дефицит DPD е верифициран достатъчно рано (Saif, M. W., Diasiio, R. B., 2016). До края на 2019 година този лекарствен продукт не е получил одобрение от EMA (Lampropoulou,D. I., et al., 2019) и за сега е достъпен само за пациенти в САЩ. Приложеният от нас тест за количествено определяне на DPD в кръвна плазма също е с ниска себестойност. Кит съдържащ около 70 теста има цена около 1000 долара и още толкова са работните разходи за извършване на тестовете. Това означава, че цената на подобно единично тестиране може да бъде под 50 лв. Важно условие за ефективното прилагане на метода е логистичната подготовка за всеки етап да бъде подготвена прецизно.

Е. 2. Изследвания на окислително - редукционния капацитет на пациентите

Генерирането на активни форми на кислорода е неизбежен компонент в каскадите на молекулен търновер в жизнените процеси при всички аеробни организми вкл. човешкото тяло (Brieger, К., et al., 2012). Известно е, че патофизиологичния механизъм на малигнените процеси включва нарушения в редокс-хомеостазата в организма [Ghoneum, A., et al., 2020]. Анти-туморното действие на голям брой цитостатици масово използвани в онкологичата химиотерапия, е съпроводено със свободен-радикал-медиирано активиране на програмирана клетъчна смърт (апоптоза). Съпътстващите токсични ефекти от провежданата при редица онкологични заболявания химиотерапия могат също да променят нивото на оксидативен стрес в организма на пациента. В този контекст редокс-хомеостазата и промените в нея при онкологични пациенти са обект на много-факторни въздействия, потенциращи промени в степента на генериране на АФК, и на оксидативно

увреждане от свободни радикали, което резултира в патофизиологична дисфункция предопределена от натрупването на оксидативно увредени молекули (Valko, M., et al., 2006). Измененията се проявяват както локално в туморната тъкан, така и на организмово ниво [Conklin, К. А., 2004]. Множеството детерминанти са наложили необходимостта от приложение на редица методи, с които могат да бъдат изследвани различни параметри използвани като индикатори за настъпилите изменения в окислително - редукционната хомеостаза, генерирането на АФК, последиците от това и способността на организма да толерира оксидативния стрес. Методите са свързани с оценка на ефективността на антиоксидантните защитни системи, с количествена оценка на не-ензимни и ензими анти-оксиданти и проверка за изменения в тяхната активност (общ анти-оксидантен статус (TAS), общ окислителен статус (TOS), индекс на оксидативен стрес (OSI), фериредукционна активност), както и с количествено определяне на нивото на редица маркери на оксидативния стрес (Ladas, I.J., et al., 2004). В научната литература е налична обширна информация относно количествената оценка на вариациите в не-ензимни и ензимни анти-оксиданти и тяхната активност при пациенти с колоректален карцином, както в туморната тъкан, така и в целия органзъм (Zińczuk, J., et al., 2019, Gopcevic, K.R., et al., 2013].

В този контекст, с цел получаването на нова допълваща информация, в настоящото изследване е проследен ефекта на провежданата адювантна химиотерапия по схема FOLFOX-4 на фона на различни индивидуални DPD нива върху редокс - хомеостазата на пациенти с различен стадий на колоректален карцином. Изследването е насочено към преценяване на възможностите на организма да елиминира химични и биологично-релевантни радикали, а също така и измененията в тях. С цел получаване на по-пълна представа за резултата от евентуално настъпилите изменения, е направена количествена оценка на продуктит маркиращи оксидативна увреда на плазмените липиди.

Първата група проведени изследвания включва спектрофотометрични методи за оценка на тотален анти-оксидантен капацитет на кръвна плазма. чрез две алтернативни моделни системи. В едната е изследвана способността на кръвната плазма да намалява концентрацията на стабилния катион радикал на 2,2’-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина (ABTS $^{\bullet+}$), а в другата е оценена фери-редукционна активност на кръвната плазма. Получените резултати показват различен ефект в двете системи в

зависимост от използваният индикатор и най-вероятно е свързано с различните молекулни механизми на протичащите реакции в системите, и с различната способност на отделните плазмени компоненти да взаимодействат с индикаторите. Поради този комплексен характер на показателя се препоръчва едновременна оценка на тотален анти-оксидантен капацитет с повече от една методика с цел коректно интерпретиране на резултатите. По литературни данни способността на плазмата да понижава абсорбцията в ABTS-системата се дължи основно на плазмени анти-оксиданти като албумин (43 % - 53 % от ефекта), пикочна киселина (33 % от ефекта), аскорбинова киселина, α-токоферол и билирубин (Miller, N. J., et al., 1993). Други автори допускат връзка на данните от ABTS-анализа с нивото на глутатион в кръвта (Erel, O., 2003). Като основни представители на механизмите свързани с фери-редукционната активност се приемат пикочната киселина, билирубин, витамин С и тролокс, но ефекта на протеините е слабо изразен (Benzie, I. F., Szeto, Y. T., 1999]. Данните получени чрез ABTS-метода категорично отхвърлят възможността за повлияване на определяния в системата показател от провежданата FOLFOX-4 химиотерапия, както и отсъствието на връзка между отчетените изменения и плазменото DPD ниво. При използването на FRAP-метод е отчетено статистически значимо понижение на фери-редукционната активност, което е индикация за понижен потенциал на изброените основни участващи плазмени анти-оксиданти. Проследяването на влиянието на нивото на DPD върху разликата в средните стойности за извадките преди и след провеждане на химиотерапията, показа липса на статистическа значимост в групата с ниво под 0.15 ng / mL и наличие на изразено статистически значимо повлияване при двете групи с ниво над 0.15 ng / mL. При тях беше отчетена статистически значима разлика и нарастване на достоверността та с нарастване на нивото на ензима. Получените данни за ABTS-системата са в съгласие с предходни изследвания на други авторски колективи. Разлики в определяния по този метод показател, при онкологични пациенти са доказани само при сравняването им със здрави лица, и не е установен ефект на химиотерапията в зависимост от стадия на заболяването (Robev, B., et al., 2021, Wu, R., et al., 2017, Feng, J. F., et al., 2012,Wang, D., et al., 2011). Друга е ситуацията при фери-редукционната, активност. Получените от нас резултати са в съгласия с литературни данни за връзка между показателя и броя направени цикли на химиотерапия с флуоропиримидини, и с въвежданото количество цитостотик (Zińczuk, J., et al., 2019, Singh, G., et al., 2010).

Като следващ етап на изследванията е проследена скевинджър-активност в кръвната плазма на пациентите чрез луминол-зависима хемилуминесценция на някои от биологично значимите АФК като супероксидни радикали и хипохлоритни йони. Тези АФК имат доказана роля в карциногенезата. Те са активно генерирани главно в солидната туморната тъкан, но промените в тези процес могат да бъдат убиквитерни в резултат на циркулиращи туморни клетки, странични ефекти на химиотерапията свързани с миелотоксичност и възпалителни реакции. Всичко това в значителна степен е свързано с промени в капацитета на кръвната плазма да елиминира АФК (Haklar, G., et al., 2001). Проведените изследвания показват, че приложената химиотерапия предизвиква статистически значима разлика в средните стойности на CL-SI индекса на пробите взети преди и след химиотерапевтичен цикъл с 5-FU. И в двата случая наблюдаваният ефект е понижаване на стойностите на индекса CL-SI, т. е. намаляване на капацитета на кръвната плазма да елиминира АФК след химиотерапия с 5-FU. В системата съдържаща хипохлорит е установено, че тенденцията за достоверно нарастване на разликата между стойностите преди и след третиране при отделните групи пациенти корелира с нарастване на DPD нивото в кръвната плазма. В система със супероксид, където действат най-малко два различни механизма на елиминиране (скевинджър-ефект и ензимен път), разликата в средните стойности преди и след третиране е недостоверна при пациенти с DPD нива под 0.15 ng / mL. Данните от проведените изследвания не дават възможност за категоричен доколко промените в концентрацията на супероксидния анион-радикал са резултат само на изменения в скевинджърните свойства на плазмата, и / или на променена активност на ензимите системи отговорни за елиминиране на супероксида. Получените резултати от системите за оценка на тоталната анти-оксидантна активност и скевинджър-ефект на плазмата обосноваха провеждането на изследвания за оценка на оксидативния статус на пациентите преди и след цикъл на химиотерапия с 5-FU чрез определяне на нивото на MDA-подобните продукти в кръвна плазма. Данните за този показател показват, че описаните изменения в другите системи могат да резултират в изменения на нивото на оксидативен стрес в организма на пациентите. Изследванията показват убедително че оксидативните увреждания след химиотерапевтичен цикъл засягат голяма част от биологично-важните молекули. Получените данни показват, че след 5-FU химиотерапия има достоверно корелация между количеството генерирани MDA - продукти и

отношението тромбоцити / лимфоцити и лимфоцити / моноцити. Направеният анализ по групи пациенти показва достоверно, че приложената химиотерапия води до промени в процесите на елиминиране на АФК, което не може да бъде компенсирано от организма. Намаляването на скевинджър-капацитета и понижението на фери-редукционната активност са съществени и предизвикват изместване на окси-редукционния баланс в организма. От една страна това може да бъде свързано с ексцесивна продукция на АФК, предизвикана от *per se* механизмите на действие на конкретния лекарствен продукт и изчерпване на анти-оксидантния потенциал, което допускат други автори при химиотерапия на онкологичните заболявания (Güçlü, H., et al., 2018, Conklin, K. A., et al., 2004). Повишеното ниво на МДА-продуктите показва понижения капацитет на защитните системи да елиминират генерираните в организма радикали и / или частично да възстановяват предизвиканите от тях увреждания.

От друга страна, това може да бъде свързано с неизбежния при КРК системен възпалителен процес, маркерите за който могат да бъдат в известна степен показателни за генетично предразположение към толериране / ефикасен метаболизъм на приложените химиотерапевтични лекарствени продукти.

F. И З В О Д И

В системни клинични проучвания и лабораторни изследвания е установено, че при химиотерапия на пациенти с колоректален карцином нивото на Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) в кръвната плазма е фактор, който може да влияе съществено върху интензитета на нежеланите лекарствени реакции и окислително-редукционнния статус.

Данните от направения демографски и нозологичен анализ на рекрутираната кохорта пациенти показват, че 58.1 % са мъже и 41.9 % са жени. Това разпределение по пол е в съгласие с приетото становище, че при мъжете честотата на малигнените тумори в стомашно-чревния тракт е по-голяма, отколкото при жените.

Диагнозата *carcinoma recti* е по-честа при мъжете (32.5 %), в сравнение с жените (25.8 %). За разлика от тях диагноза *carcinoma colonis ascendens* или *colonis descendens* е по-честа при жените (12.9 % и 29 %) в сравнение с мъжете (4.7 % и 18.7 %).

Установено е, че няма статистически значима разлика в средните стойности на Dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвната плазма на пациентите мъже и жени. Измерените DPD нива са 0.38 ± 0.35 ng / mL при мъжете и 0.35 ± 0.26 ng / mL при жените.

Данните от изследванията показват, че плазмените нива на DPD варират в широк концентрационен диапазон. Съобразно с това пациентите са разделени в група с DPD ниво около и по-ниско от средната стойност и група с DPD ниво по-високо от средната стойност.

Установено е, че след химиотерапевтичен цикъл с 5-Fluorouracil (5-FU) нараства броя на пациентите с благоприятни промени в клиничната симптоматика и параклиничните показатели и намалява броя на пациентите с неблагоприятни промени в клиничната симптоматика и параклиничните показатели, което в пряка корелация с прогресивното нарастване на нивото на Dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвната плазма.

Данните показват, че при пациентите мъже с DPD нива под 0.15 ng / mL отношението увеличен / понижен I (Ly) е 29 % / 71 % и на увеличен / понижен I (Th) е 7 % / 93 %. В контраст на това при пациентите мъже с DPD нива над 0.70 ng / mL отношението увеличен / понижен I (Ly) е 71 % / 29 % и увеличен / понижен I (Th) е 45 % / 55 %. Тази тенденция не е проявена категорично при пациентите жени.

Резултатите от изследване на оокси-редукционния статус показват, че след цикъл на химиотерапия с 5-FU стойностите на CL-SI индекса са понижени, т. е. намалява се капацитета на кръвната плазма да елиминира активните форми на кислорода.

Анализът на получените резултати показва, че след 5-FU химиотерапия съществува достоверна корелация между количеството генерирани MDA - продукти и отношението тромбоцити / лимфоцити и лимфоцити / моноцити.

Резултатите показват, че при химиотерапия с флуоропиримидинови лекарствени продукти генерираните МДА - аналози, радикали $O^{2\bullet}$ *от* KO_2 и CL - SI индекс нарастват. Това е доказателство за намален капаците на защитните системи в кръвната плазма да елиминират образуваните в организма радикали и / или частично да възстановяват предизвиканите от тях увреждания.

G. П Р И Н О С И

Проведено е първото в България изследване на ензима Dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвна плазма на пациенти от двата пола с колоректален карцином след дадено от тях информирано съгласие, които са включени в цикъл на комплексна химиотерапия с флуоропиримидинови лекарствени продукти, като най-често това е 5-Fluorouracil.

За първи път е проведен анализ на окислително-редукционния капацитет в кръвната плазма на пациенти от двата пола с колоректален карцином след дадено от тях информирано съгласие при завършен цикъл на комплексна химиотерапия с флуоропиримидинови лекарствени продукти, като най-често това е 5-Fluorouracil.

Приложен е оригинален модел който дава възможност за квантифицирана оценка на корелацията между нивото на Dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвната плазма и интензитета на нежеланите лекарствени реакции, предизвикани от химиотерапия с флуоропиримидинови лекарствени продукти.

Приложен е ELISA тест за определяне на концентрацията на Dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвна плазма с добри лабораторни и икономически показатели като ниска цена, лесно и бързо изпълнение и приемливи схеми за логистична организация.

Направена е предварителна преценка за икономическа целесъобразност и евентуално регламентирано въвеждане в клиничната практика на мониторинг на плазмените нива на Dihydropyrimidine dehydrogenase за всички пациенти, на които е предвидена химиотерапия с флуоропиримидинови лекарствени продукти.

Установена е обратна корелативна зависимост между интензитета на нежелани ефекти от химиотерапията с флуоропиримидинови лекарствени продукти върху клетките в периферната кръв от левкоцитния и тромбоцитен ред и нивото на ензима Dihydropyrimidine dehydrogenase в кръвната плазма.

Установено е, че химиотерапията с флуоропиримидинови лекарствени продукти може да понижи редокс-капацитета в кръвната плазма. Показано е, че това понижаване е по-слабо изразено при по-високи плазмени нива на Dihydropyrimidine dehydrogenase.

I. П У Б Л И К А Ц И И В Ъ В В Р Ъ З К А С Д И С Е Р Т А Ц И О Н Н И Я Т Р У Д

1. **В. Минчев.** Колоректален карцином. MedInfo 12, 78-82, 2019.

2. **Velko T. Minchev.** Toxic and adverse effects of chemotherapy with 5-Fluoropyrimidine drugs. Could Dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme screening serve as a prerequisite to successful chemotherapy ? J. Biomed. Clin. Res. 13, 87-99, 2020.

3. **В. Минчев,** М. Ангелов, К. Каменова, Н. Христова-Авакумова, В. Хаджимитова, С. Сурчева, Р. Николов. Роля на предварителния скрининг на пациентите за ефикасността и намаляване та нежеланите реакции от лечение на тумори 5-Fluorouracil, Capecitabine, Tegafur и Flucitosine. Наука Фармакология 2, 14-17, 2019.

4. **Velko Minchev,** Kalina Kamenova, Nadya Hristova-Avakumova, Slavina Surcheva, Rumen Nikolov. DPD screening in blood plasma of cancer patients indicated to Fluoropyrimidine chemotherapy by ELISA method. Comp. Rend. Acad. Bulg. Sci. 74, 767-775, 2021.

5. **Velko Minchev,** Nadya Hristova-Avakumova, Kalina Kamenova, Liliya Atanasova, Marin Angelov, Lozan Todorov, Slavina Surcheva, Rumen Nikolov. Does the level of Dihydropyrimifine dehydrogenase (DPD) modulates antioxidant capacity in patients treated with 5-Fluorouracil. Folia Medica (Accepted), 2020.

6. Nadya Hristova-Avakumova, **Velko Minchev,** Kalina Kamenova, Liliya Atanasova, Marin Angelov, Lozan Traikov, Slavina Surcheva, Rumen Nikolov. Dihydropyrimifine dehydrogenase level and the redox status in patients with colorectal cancer are prognostic for adverse effects of fluoropyrimidines. Biol. Biotechnol. Equip. (Submitted), 2021.

J. УЧАСТИЕ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

Изследване активността на ензима Dihydropyrimifine dehydrogenase (DPD) и оксидативния статус в плазма от пациенти с колоректален карцином, лекувани с 5-Флуороурацил, Капецитабин, Оксалиплатин. Значение за терапевтичната ефективност и нежеланите лекарствени реакции. **Проект D-98 / 24. 06. 2020**, **финансиран от СМН на МУ София**.

THE LEVEL OF DIHYDROPYRMIDINE DEHYDROGENASE AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER TREATED WITH FLUOROPYRIMIDINE CHEMOTHERAPY

A total number of 74 male and female patients with colorectal cancer have been enrolled with informed consent in this investigation. In the first stage of this investigation a fraction of the common unwanted and therapeutic effects of fluoropyrimidine chemotherapy was precisely surveyed and qualitatively and quantitatively evaluated in *in extenso* analysis including thorough demography- and nosology-characterization of the whole cohort of recruited patients. In the next stage ELISA method was used to estimate the level of enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in 71 samples of blood plasma collected from the recruited patients before receiving fluoropyrimidine chemotherapy. According to DPD concentrations quantified in the blood plasma four level ranges ware defined and the patients were allotted to four different DPD groups as (i) ≤ 0.15 ng / mL, (ii) 15 - 30 ng / mL, (iii) 30 ng / mL - 70 ng / mL, (iv) ≥ 70 ng /mL. In the third stage of present investigation the presence of correlation was examined between the intensity of the post-chemotherapy effects analyzed and the levels of DPD estimated in patients' blood plasma. Data reviled that the increase of DPD concentration is inversely related to 5-Fluorouracil (5-FU) toxicity on leucocyte, lymphocyte and thrombocyte counts in peripheral blood. The results show that the higher is DPD level the less unwanted and more therapeutic effects are produced by 5-FU chemotherapy. In this series clinical and laboratory data from 70 of the recruited patients are processed. In the last stage of this investigation the plasma redox capacity was studied in blood plasma collected before and after fluoropyrimidine chemotherapy of 38 patients. Complex spectrophotometry was employed to study the total redox capacity (ABTS and FRAP methods) and lipid peroxidation (TBA-RS method). Chemiluminescence methods (generation of $O^{2\bullet}$ and *OCl*$^{-}$) were applied to study the changes of ROS generation induced by 5-FU chemotherapy at various plasma DPD levels. Data revealed that 5-FU treatment decreased plasma redox capacity which is inversely modulated by plasma DPD levels. Present investigation provides first data for quantification of plasma DPD concentration by ELISA assay and evaluation of plasma redox capacity in patients hospitalized for chemotherapy of colorectal cancer. The economic rationale is considered of implementing DPD evaluation as a routine test in patients recommended for fluoropyrimidine chemotherapy.

К. Б Л А Г О Д А Р Н О С Т И

Признателен съм на Ръководството на УМБАЛ СофияМед и специално на д-р Михаил Тиков и д-р Йордан Пелев, че въпреки много трудната за един клиницист ситуация на Ковид-19 пандемия, ме окуражиха да започна тази дисертация.

Благодаря на Доц. д-р Румен Николов и Проф. д-р Славина Сурчева, и чрез тях на Медицинския Факултет и Медицинския Университет София, че приеха да бъда техен докторант и ми предоставиха всичко необходимо да изпълня докторантурата.

Благодаря на главен асистент д-р Надя Христова-Авакумова и главен асистент д-р Калина Каменова за техните търпение, разбиране и помощ. Те ми убедиха, че експерименталната работа е също така отговорна, както и клиничната. Благодаря на г-жа Росица Методиева, за това, че ме спасяваше в трудни технически и административни ситуации.

Думите ми са бедни да изкажа своята благодарност на Член-кор. проф. д-р Мила Власковска. Както казва Проф. д-р Казаков „Тя ще ти извади душата да свършиш работата си, и след това ще ти върне душата още по-богата “. На проф. д-р Власковска искрена признателност и поклон !

Благодаря на семейството си, че с търпение и разбиране понесе моите докторантски увлечения.

Благодаря на моята майка Гюргя Минчева, която ме вкарваше в докторантския график, питайки ме деликатно „Сине, кога ще стане ? “.

ПОСВЕЩАВАМ ТОЗИ ТРУД НА

ВСИЧКИ МОИ ПАЦИЕНТИ