

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Mikačić

**Sistemska izloženost i nuspojave, te mjere
smanjenja rizika nakon bevacizumaba
primijenjenoga intravitrealno u liječenju
senilne makularne degeneracije**

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Mikačić

**Sistemska izloženost i nuspojave, te
mjere smanjenja rizika nakon
bevacizumaba primijenjenoga
intravitrealno u liječenju senilne
makularne degeneracije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena na Odjelu kliničke farmakologije s toksikologijom Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u Zagrebu

Voditelj rada: doc. dr. sc. Damir Bosnar

Zahvala osoblju Klinike za očne bolesti Kliničke bolnice „Sveti Duh“ i Laboratorija za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu

Posvećeno mom ocu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Senilna makularna degeneracija	1
1.2. VEGF I VEGF-R	4
1.3. Dostupna liječenja	5
1.4. Intravitrealni bevacizumab (Avastin®)	7
1.5. Dosadašnje spoznaje	8
1.6. Koncept istraživanja	11
2. HIPOTEZA	12
3. CILJEVI RADA	12
4. MATERIJALI I METODE	13
4.1. Sustavni pregled i meta-analiza kardio- i cerebrovaskularnog rizika združenog s IVT bevacizumabom u bolesnika s AMD	13
4.1.1. Pretraživanje literature i odabir studija za kvalitativnu analizu	14
4.1.2. Ocjena kvalitete izvještaja i odabir studija za kvantitativnu analizu	15
4.1.3. Mjere ishoda, ekstrakcija podataka i kvantitativna analiza	16
4.2. Prospektivno nekontrolirano opservacijsko ispitivanje sigurnosti intravitrealne primjene bevacizumaba	18
4.2.1. Oblikovanje ispitivanja	18
4.2.2. Klinička i laboratorijska evaluacija bolesnika u kohorti	18
4.2.3. Određivanje sistemskih koncentracija bevacizumaba i VEGF-a	19
4.2.4. Statistička analiza	20
5. REZULTATI	22
5.1. Sustavni pregled literature i meta-analiza	22
5.1.1. Izbor studija za analizu	22
5.1.2. Ocjena kvalitete i temeljna svojstva studija	22
5.1.2.1. Randomizirane kontrolirane studije	25
5.1.2.2. Populacijske stratificirane kohortne studije i nerandomizirane kliničke studije	25
5.1.2.3. Nekontrolirane kliničke studije	25
5.1.3. Rizik kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja s AMD liječenih IVT bevacizumabom	28
5.1.3.1. Randomizirane kontrolirane studije	28
5.1.3.1.1. IVT bevacizumab naspram liječenja koje se ne temelji na anti-VEGF načelu	28
5.1.3.1.2. Različiti režimi IVT bevacizumaba – češće u odnosu na rjeđe doziranje	28
5.1.3.1.3. IVT bevacizumab naspram drugih anti-VEGF tretmana	29
5.1.3.2. Opservacijske studije	34

5.1.4. Mortalitet i incidencija kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja u bolesnika liječenih IVT bevacizumabom u kliničkim studijama	36
5.1.5. Zaključak o rezultatima sustavnog pregleda literature i meta-analize	39
5.2. Prospektivno kohortno istraživanje u KB „Sveti Duh“	39
5.2.1. Učestalost sistemskih ozbiljnih štetnih događaja	41
5.2.2. Odnos sustavno praćenih laboratorijskih pokazatelja i pojave ozbiljnih sistemskih štetnih događaja	48
5.2.3. Sistemska izloženost bevacizumabu nakon intravitrealne primjene	59
5.2.4. Zaključni osvrt na prikazane rezultate	64
6. RASPRAVA	66
6.1. Sustavni pregled i meta-analiza	67
6.1.1. Glavni rezultati	69
6.1.2. Zaključak sustavnog pregleda i meta-analize	71
6.2. Prospektivno opservacijsko istraživanje u kohorti bolesnika u KB „Sveti Duh“ .	71
6.3. Kratak osvrt na mehanizme odnosa VEGF-a i kardiovaskularnog i cerebrovaskularnog rizika	79
7. ZAKLJUČAK	83
8. KRATKI SADRŽAJ	87
9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU	87
10. POPIS LITERATURE	89
11. KRATKA BIOGRAFIJA	96
12. PRILOZI	97

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABCA1 (engl. *ATP-binding cassette transporter 1*) – glavni regulator stanične homeostaze kolesterola i fosfolipida

AFLIB – aflibercept

AMD (engl. *age-related macular degeneration*) – senilna makularna degeneracija

AP – angina pektoris

APOE – apolipoprotein E

ARMS2/HTRA1 (engl. *age-related maculopathy susceptibility 2/ (high-temperature requirement factor A 1)*) - lokusi na kromosomu 10q26 važni u patogenezi neovaskularne senilne makularne degeneracije

ATE – aterotrombotski događaji

C2 – komponenta komplementa 2

C3 – komponenta komplementa 3

CETP (engl. *cholesteryl ester transfer protein*) – transferni protein kolesterilskih estera

CFB – faktor komplementa B

CFH (engl. *complement factor H*) - faktor komplementa H

CFI – faktor komplementa I

COL10A1 i COL8A1 (engl. *collagen type X alpha 1 I collagen type VIII alpha 1*) – protein-kodirajući geni za kolagen

CV – kardiovaskularni

CVI – moždani udar

DM – diabetes mellitus

FcRn (engl. *neonatal Fc receptor*) – receptor koji olakšava recikliranje molekula s Fc (kristalizirajući fragment) dijelom

FGF (engl. *fibroblast growth factor*) – fibroblastni faktor rasta

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

HDL (engl. *high -density lipoprotein*) – lipoprotein visoke gustoće

HZZO – Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje

IVT – intravitrealno

k – broj studija

KBSD – Klinička bolnica „Sveti Duh“

KV/CV – kardiovaskularni/cerebrovaskularni događaj

LDL (engl. *low-density lipoprotein*) – lipoprotein niske gustoće

LIPC (engl. *lipase, hepatic*) – jetrena lipaza

LPL (engl. *lipoprotein lipase*) – lipoprotein-lipaza

MH – Mantel-Haenszel

MI – infarkt miokarda

µm – mikrometar

n – broj bolesnika

NOS (engl. NOS – *nitric oxide synthase*) – sintetaza dušičnog oksida

OCT – optička koherentna tomografija

OR (engl. *odds ratio*) – omjer šansi

PBO – placebo

PDT – fotodinamska terapija

PEA (engl. *proximity extension assay*) – analiza koja koristi par DNA oligonukleotida vezanih na par monoklonskih ili poliklonskih protutijela, koja se pak vezuju na ciljni protein u uzorku. Nakon vezivanja dvije probe, stvara se slaba DNA uzvojnica, koji se pomoću DNA polimeraze umnožava stvarajući tako pojačani signal koji se očitava *real-time PCR* metodom

PEDF (engl. *pigment epithelial-derived factor*) – faktor iz pigmentnog epitela

PL – Povjerenstvo za lijekove

PLCγ-PKC-MAPK (engl. *phospholipase Cγ - protein kinase C - mitogen-activated protein kinase*) – signalni put koji uključuje fosfolipazu Cγ, protein-kinazu C i mitogenom aktiviranu protein kinazu

PIGF (od engl. *placental growth factor*) – placentarni faktor rasta

RA – reumatoidni artritis

RAN – ranibizumab

RCT – randomizirano kontrolirano ispitivanje

RR – omjer rizika

RVO – okluzija retinalne arterije

SSAE – sistemski ozbiljni neželjeni događaj

TIA – tranzitorna ishemična ataka

TIMP3 (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases 3*) – tkivni inhibitor metaloproteinaza 3

VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) – vaskularni endotelni faktor rasta

VEGF-R (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta

VTE – venski tromboembolizam

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Senilna makularna degeneracija

Senilna makularna degeneracija (AMD od engl. *age-related macular degeneration*) je progresivna kronična bolest centralne retine i vodeći uzrok gubitka vida u svijetu. Gubitak vida pojavljuje se u kasnijim stadijima bolesti zbog jednog od dva procesa: neovaskularna („vlažna“) senilna makularna degeneracija i geografska atrofija (kasna „suha“). U neovaskularnom obliku, koroidalna neovaskularizacija prodire kroz neuralnu retinu, propuštajući tekućinu, lipide i krv i dovodeći do stvaranja fibroznih ožiljaka. U geografskoj atrofiji pojavljuje se progresivna atrofija retinalnog pigmentnog epitela, koriokapilarisa i fotoreceptora. Najteži gubitak vida u senilnoj makularnoj degeneraciji je uzrokovan ovim oblicima uznapredovale bolesti (1).

Tradicionalno, bolest se klasificira u rani i kasni stadij. Rani stadiji bolesti čine promjene boje makularnog pigmentnog epitela, hipo- i hiperpigmentacije i prisutnost druzna većih od 125 μm u promjeru. Rana faza se opisuje i kao atrofična, neeksudativna, preangiogena ili suha AMD. Eksudativna ili neovaskularna AMD je tipični fenomen koji se pojavljuje kasnije, u očima bolesnika s visoko rizičnim karakteristikama, uključujući prisutnost opsežnih mekanih druzna, zadebljanjem Bruchove membrane i fokalnom hiperpigmentacijom. Ova faza je tipično praćena brzim gubitkom tijekom 6-12 mjeseci i razvojem ventralnih disciformnih fibrotičnih ožiljaka. Bez intervencija, vidna oštrina općenito pada na 20/200 ili i izraženije tijekom 12 mjeseci (2).

Epidemiološki podaci. U posljednjih 30 godina publicirano je puno epidemioloških ispitivanja o AMD. U meta analizi (3) studija populacije bijele rase od 40 godina i starijih, procijenjena prevalencija rane AMD je bila 6,8% a kasne 1,5%. Rezultati *Baltimore Eye Study* (4) pokazuju da kasna AMD ima 9-10 puta veću prevalenciju u pripadnika bijele rase u odnosu na crnu. Meta analiza azijske populacije (5) pokazuje da je prevalencija kasne AMD u azijskoj populaciji slična onoj u bijele rase (6). Nekoliko je ispitivanja incidencije AMD. U Sjedinjenim Američkim Državama *Beaver Dam Study* ukazuje na 15-godišnju kumulativnu incidenciju od 14,3% za ranu AMD i 3,1% za kasnu AMD u odraslih osoba u dobi od 43 do 86 godina (7). Slična incidencija zabilježena je i u Australiji u odraslih osoba starijih od 49 godina (8).

Patogeneza. Mehanizmi koji dovode do gubitka vida u AMD razlikuju se ovisno o stadiju bolesti. Patogeneza suhe AMD nije jasna (9). Postoje neki dokazi da poremećaji komponenti Bruchove membrane mogu biti važni. Upala i kronična infekcija također mogu imati ulogu

(10-12) . Što se tiče vlažne AMD, važno je naglasiti da se barem dva odvojena i različita mehanizma gubitka vida pojavljuju u ovom obliku: 1) proliferacija novih krvnih žila – angiogeneza, praćena sekundarnom fibrozom i dezorganizacijom pigmentnog epitela i vanjskog sloja retine, koji su stupnjeviti procesi; 2) sekundarne promjene permeabilnosti retinalnih krvnih žila i žila koroideje praćeno disfunkcijom retinalnog pigmentnog epitela što dovodi do nakupljanja serozne i serosangvinozne tekućine ispod retinalnog pigmentnog epitela, neurosenzorne retine ili unutar same retine, što više dovodi do akutne disfunkcije vida (2). Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz postojećih, što treba razlikovati od procesa vaskulogeneze koja se tipično javlja *in utero* u kojem se nove krvne žile stvaraju *de novo*. Kaskada angiogeneze karakterizirana je višestrukim uzastopnim koracima i bez obzira koji je inicijalni stimulirajući faktor uključen u razvoj patološke neovaskularizacije, danas je poznato da vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor* – VEGF) igra glavnu ulogu (2). I drugi citokini imaju vjerojatno važne uloge, uključujući fibroblastni faktor rasta (engl. *fibroblast growth factor* – FGF), faktor iz pigmentnog epitela (engl. *pigment epithelial-derived factor* – PEDF), integrini, angiopoetini i inhibitori matriksnih metaloproteinaza (13-18).

Rizični faktori. Starija dob je glavni rizični faktor za AMD. Više od 10% populacije starije od 80 godina ima AMD. Ženski spol je nekonzistentno rizični faktor (3). Od očnih rizičnih faktora tu su tamnija pigmentacija šarenice, operacija katarakte u anamnezi i hiperopična refrakcija. Sistemski faktori rizika uključuju pušenje cigareta, pretilost, izlaganje suncu i kardiovaskularne bolesti. Pušenje cigareta je posebno snažan i konzistentan rizični faktor za AMD. Kardiovaskularni faktori rizika (npr. hipertenzija) su povezani s ovom bolešću. Ljudi oboljeli od AMD imaju također povećani rizik kardiovaskularnih oboljenja i moždanog udara (1). U posljednjih nekoliko godina postoje snažni dokazi za genetski utjecaj na razvoj bolesti. Od 2005. god., nekoliko lokusa je povezano s AMD, uključujući dva glavna lokusa gena faktora komplementa H (CFH) na 1q32 i u ARMS2/HTRA1 lokusu genskog klastera 10q26. Ostali potvrđeni geni puta komplementa uključuju C2, CFB, C3 i CFI (19-21). Temeljem velikih genomskih ispitivanja (*genome-wide association studies*), HDL geni u kolesterolskom putu imaju također utjecaja, uključujući LIPC i CETP, a moguće i ABCA1 i LPL (22-24). APOE u LDL putu također je povezan s AMD (25). Geni kolagenog matriksa COL10A1 i COL8A1 i geni ekstracelularnog matriksa TIMP3 su povezani s bolešću (23, 24, 26). I konačno, geni koji sudjeluju u angiogenezi (VEGF-A) su isto povezani s nastankom AMD što je pokazala meta analiza dva ispitivanja povezanosti genoma u AMD (26). Dakle, geni koji utječu na nekoliko bioloških putova su povezani s AMD. Sustav komplementa i imuni

procesu, HDL kolesterol i mehanizmi koji uključuju kolagen, ekstracelularni matriks i angiogenezu povezuju se s početkom, progresijom i obostranim zahvaćanjem rane, srednje i uznapredovale faze AMD. Genska podložnost može se modificirati okolišnim faktorima i zajedno svi ti faktori su visoko prediktivni za početak i progresiju bolesti. Genske varijacije mogu utjecati na različite odgovore na liječenje AMD (1).

Klinička slika. Bolesnici u ranom stadiju AMD obično su asimptomatski, s klinički vidljivim žučkastim druzama ispod retinalnog pigmentnog epitela i s područjima išaranim hipo- i hiperpigmentacijama retinalnog pigmentnog epitela. Bolesnici obično razvijaju brzi gubitak vida kada se pojavi neovaskularni oblik AMD. Tipično, opisuju naglo pogoršanje centralnog vida s iskrivljenjem ravnih linija (metamorfopsija) ili crnim mrljama u centralnom vidu (skotomi) ili oboje. U geografskoj atrofiji, gubitak vida napreduje sporije, tijekom nekoliko godina. Klinički se nalaze oštro ograničena područja depigmentacije koja ukazuju na atrofiju retinalnog pigmentnog epitela. Neovaskularna AMD je karakterizirana subretinalnom i intraretinalnom tekućinom i krvarenjima, ponekad se vidi i kompleks koroidalne neovaskularizacije (1).

Razvijene su različite klasifikacije AMD (27, 28). Neke od njih su se pokazale korisnima u istraživanjima i kliničkoj praksi (28). Studija bolesti povezanih sa starenjem (AREDS – *Age-Related Eye Disease Study*) (29) klasificira znakove AMD u 4 kategorije: 1. nema ili nekoliko manjih druzi (<63 µm u promjeru); 2. više malih druzi, malo srednje velikih druzi (63-124 µm u promjeru) ili patološke promjene retinalnog pigmentnog epitela; 3. više srednje velikih druzi i barem jedna velika (>125 µm u promjeru, u grubo jednake promjeru retinalne vene kod ruba optičkog diska) i geografska atrofija koja ne zahvaća foveu; 4. geografska atrofija koja zahvaća foveu ili bilo koji znak neovaskularne makularne degeneracije i gubitak vida povezan s bolešću.

5-godišnji rizik razvoja uznapredovale AMD u jednom oku bio je 1,3% u kategoriji 2, 18,3% u kategoriji 3 i 43,9% u kategoriji 4 (29). Polipoidnu koroidalnu vaskulopatiju teško je klinički razlikovati od koroidalne neovaskularizacije (6). Ponekad se mogu vidjeti narančaste, izbočene dilatacije ispod retine. Ipak, polipoidna koroidalna vaskulopatija češće se prezentira povratnim ozbiljnim i krvarećim odvajanjima retinalnog pigmentnog epitela. Retinalna angiomatozna proliferacija karakterizirana je kliničkim znacima krvarenja, edema i eksudata unutar slojeva retine uz druge tipične znakove koroidalne neovaskularizacije. U nekim slučajevima mogu se vidjeti anastomoze retinalnih i subretinalnih novih krvnih žila (1).

Dijagnoza. Tradicionalno se u dijagnostici AMD koristi floresceinska angiografija fundusa. To je invazivna pretraga u kojoj se žuta boja (florescein) intravenozno inicira te se

sekvencijski fotografira kako bi se ocijenio koroidalni i retinalni krvni protok. U neovaskularnoj AMD vidi se curenje boje (hiperflorescencija) u retinalno tkivo (30). Ovo curenje klasificira se prema lokalizaciji (subfovealno, jukstafovealno ili estrafovealno) i prema tipu (klasično, okultno ili miješano). Klasična koroidalna neovaskularizacija predstavlja leziju koja prolazi kroz retinalni pigmentni epitel i zato se nalazi ispred retinalnog pigmentnog epitela dok se okultna koroidalna neovaskularizacija proteže ispod retinalnog pigmentnog epitela (1). Angiografija indocijaninskim zelenilom koristi boju različitih karakteristika od floresceina (manje apsorpcije melanina). Poboljšava identifikaciju i karakterizaciju neovaskularnih oblika AMD kao što je polipoidna koroidalna vaskulopatija (31). Optička koherentna tomografija (OCT) je novija neinvazivna slikovna metoda koja se koristi blizu-infracrvenim svjetlom i interferometrijskom analizom. Omogućuje *in vivo* vizualizaciju retinalne mikroarhitekture u poprečnim presjecima ili volumetrijskom tomografijom. OCT omogućuje poprečni presjek obrisa kompleksa koroidalne neovaskularizacije ali ne može njegovu unutrašnju strukturu prepoznati i razlikovati od fibroznih komponenti, krvarenja, fibroznih ili gustih infiltrata (32). U ranim stadijima AMD, novija spektralna OCT može prikazati različite morfološke osobine druza koja omogućuje detaljnije fenotipiziranje bolesti (33). OCT je također korisna u razlikovanju dijagnoze retinalne angiomatozne proliferacije pokazivanjem intraretinalnih eksudata (1). Autoflorescencija fundusa je druga nova neinvazivna metoda mapiranja prirodnih ili patoloških florofora (uglavnom lipofuscina) u retini. Lipofuscinsko nakupljanje je obilježje starenja koje nastaje fagocitozom vanjskih segmenata fotoreceptora. Danas se sve više koristi za kliničko karakteriziranje geografske atrofije, koja je obilježena područjima smanjenog intenziteta signala autoflorescencije (34). Važno je naglasiti da se ove promjene mogu analizirati sekvencijski (1).

1.2. VEGF i VEGF-R

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i receptori (VEGFR) reguliraju vaskulogenezu, nastanak krvnih žila iz prekursorskih stanica tijekom rane embriogeneze i angiogenezu, stvaranje krvnih žila iz ranije nastalih krvnih žila kasnije u životu. VEGF obitelj gena ima najmanje sedam članova (A, B, C, D, PlGF (od engl. *placental growth factor*) i dva člana koja se ne nalaze u stanicama sisavaca, uključujući i ljude), dok VEGFR obitelj gena ima tri do četiri člana, ovisno o vrsti. VEGF-A i njegovi receptori VEGFR-1 i VEGFR-2 imaju glavnu ulogu u fiziološkoj i patološkoj angiogenezi. VEGF-C/D i njihovi receptori VEGFR-3 reguliraju angiogenezu samo u ranoj embriogenezi ali uglavnom djeluju kao ključni regulatori

limfangiogeneze. PlGF i VEGF-B vežu se i aktiviraju samo VEGFR-1. VEGF-A ima različite funkcije uključujući aktivnost u pro-angiogenezi, vaskularnoj permeabilnosti i stimulaciju migracije makrofaga i endotelnih stanica. Nadalje, VEGF-i u fiziološkim koncentracijama imaju pro-angiogeni potencijal za održavanje različitih tkiva i za stvaranje novih krvnih žila kako bi se prebrodila ishemijska bolest, a autokrini petlja VEGF-A i receptora postoji unutar vaskularnih endotelnih stanica, sudjelujući u endotelnim funkcijama (35).

VEGFR su receptori s tirozin-kinaznom aktivnošću, koji imaju izvanstaničnu domenu za vezanje liganda, transmembransku domenu i citoplazmatsku domenu koje uključuje i onu s tirozin-kinaznom aktivnosti. VEGFR-1 ima visoki afinitet za VEGF-A za red veličine veći od afiniteta VEGFR-2, dok je tirozin-kinazna aktivnost oko 10 puta manja od tirozin-kinazne aktivnosti VEGFR-2. Glavni angiogeni signal nastaje aktivacijom VEGFR-2 ligandom. Glavni signal endotelne proliferacije dolazi aktivacijom PLC γ -PKC-MAPK signalnog puta (35).

VEGF ima dvije važne uloge u patogenezi neovaskularne forme AMD: 1) indukcija angiogeneze putem proliferacije endotela, migracije i stvaranje novih kapilara i 2) pojačanje vaskularne permeabilnosti. VEGF stvara važan porast hidrauličnog provođenja izoliranih mikrožila što je posredovano povećanjem utoka kalcija i vjerojatno promjena razina dušičnog oksida uzrokovanog indukcijom sintetaze dušičnog oksida (NOS – *nitric oxide synthase*). VEGF-A je heparin-vezujući homodimerni glikoprotein od 45 kDa značajne homologije s PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*). Ljudski VEGF gen je organiziran u 8 egzona odijeljenih sa 7 introna i smještenih na kromosomu 6p21.3. Iako je samo jedan gen za VEGF-A, različito posttranslacijsko izrezivanje egzona dovodi do nastanka između 4 i 6 različitih izoformi s 121, 145, 165, 183, 189 i 206 aminokiselina nakon cijepanja signalne sekvence (*signal sequence cleavage*). VEGF 165 postoji u slobodnom i vezanom obliku i predominantno je odgovoran za patološku neovaskularizaciju (2).

1.3. Dostupna liječenja

U 80-tim godinama prošlog stoljeća laserska fotokoagulacija u određenih bolesnika bila je učinkovita u smanjivanju gubitka vida, ali limitirana nemogućnošću da poboljša vid a imala je i visoku stopu povrata (50%) i rizik od umjerenog gubitka vida (41%). Danas se liječenje laserom mnogo manje koristi, osim u slučajevima s malim ektrafovealnim koroidalnim neovaskularnim lezijama daleko od foveje ili za ektrafovealnu polipoidnu koroidnu vaskulopatiju.

Fotodinamska terapija verteoporfinom je uvedena kasnih 1990-tih godina i danas se rijetko primjenjuje u AMD. Sastoji se od dva stadija koja uključuju intravensku infuziju verteoporfina, zelene fotosenzitivne boje koja se nakuplja u neovaskularnim membranama, nakon čega slijedi aktivacija boje infracrvenim svjetlom. Ovaj proces stvara slobodne radikale koji oštećuju endotel i potiču zatvaranje novo stvorenih krvnih žila. No i dalje je liječenje limitirano stabilizacijom vida bez pogoršanja ali i poboljšanja, te nuspojavama među kojima je i fotosenzitivnost, glavobolja, bolovi u leđima i akutni teški gubitak vida u 4% slučajeva. Koriorretinalna atrofiya se također može javiti, koja dovodi do postupnog pogoršanja vida.

Prepoznavanjem ključne uloge koju VEGF ima u patogenezi koroidalne neovaskularizacije dovelo je do razvoja VEGF inhibitora, skupine lijekova koji su se brzo nametnuli kao standard liječenja. Oni se tipično daju intravitrealno (1).

Pegaptanib (Macugen[®]) je pegilirani modificirani oligonukleotid koji se visokom specifičnošću i afinitetom veže za ekstracelularni VEGF (VEGF₁₆₅) inhibirajući njegovu aktivnost (36).

Ranibizumab (Lucentis[®]) je fragment humaniziranog monoklonskog protutijela proizveden rekombinantnom DNA tehnologijom u stanicama *E.coli* i usmjeren je protiv humanog VEGF-A. Veže se visokim afinitetom za VEGF-A izoforme koje nastaju alternativnim mRNA izrezivanjem kao što su VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ i njihov biološki aktivni proteolitički produkt VEGF₁₁₀. Vezivanjem ranibizumaba za VEGF-A onemogućena je interakcija VEGF-A i receptora VEGFR-1 i VEGFR-2 na površini endotelnih stanica. Vezivanje VEGF-A za receptore dovodi do proliferacije endotela krvnih žila i neovaskularizacije, kao i do povećane propusnosti vaskulature, svih procesa koji značajno doprinose progresiji neovaskularne (vlažne) forme AMD, vodećeg uzroka sljepoće (37).

Aflibercept (Eylea[®]) je fuzijski protein koji se sastoji od rekombinantnih vanstaničnih dijelova VEGFR1 i VEGFR2 spojenih na Fc fragment imunoglobulina klase G1. Potentni je i specifični inhibitor VEGF-a koji interferira s biološkim djelovanjem VEGF-A, vezivanjem za VEGF-A, sprečavajući tako interakciju sa njegovim receptorima. Također veže druge VEGFR1 ligande, posebice PlGF. Aflibercept pokazuje neke razlike u odnosu na druge blokatore VEGF - veći afinitet za VEGF 165 i VEGF 121, duže poluvrijeme života, vezanje PlGF1 i PlGF 2, što može biti prednost u nekim situacijama uključujući retinalnu neovaskularizaciju (38).

1.4. Intravitrealni bevacizumab (Avastin®)

Bevacizumab je humanizirano monoklonsko protutijelo (IgG1) protiv humanog VEGF-A koji selektivno inhibira sve izoforme i bioaktivne proteolitičke produkte raspada VEGF-A. Vežanjem na VEGF blokira vežanje VEGF-a i receptora (39). Bevacizumab je molekula imunoglobulina G koja se sastoji od sekvenca aminokiselina koje su oko 93% humane i 7% mišje. Pretklinička ispitivanja u animalnim modelima različitih tumorskih staničnih linija kao i različitih formi okularnih neovaskularizacija pokazala su da je ovo protutijelo djelotvorno protiv permeabilnih i proliferativnih učinaka VEGF izoformi (2). Odobren je 2004. godine za liječenje metastatskog kolorektalnog karcinoma i karcinoma pluća, bubrega, jajnika i mozga. Regulatorno odobrenje za primjenu u liječenju AMD bevacizumab nema (niti je traženo). No ipak, ovo je najčešće primjenjivano liječenje AMD u svijetu (40). Razlog je značajno niža cijena u usporedbi s drugim, regulatorno odobrenim, VEGF tretmanima.

Iste, 2004. godine, učinjeno je ispitivanje sistemski primijenjenog bevacizumaba u bolesnika s eksudativnom AMD (*Systemic Avastin for Neovascular AMD - SANA*) (41). Ispitivanje je prva naznaka dokaza da je bevacizumab učinkovit u ovoj bolesti. To je bila otvorena nekontrolirana studija 18 bolesnika koji su dobili dvije do tri intravenske infuzije bevacizumaba tijekom 6 mjeseci (2).

Primjena bevacizumaba u indikaciji AMD nema regulatorno odobrenje (*off label*). *Off label* propisivanje - drugačije u odnosu na propisivanje lijekova sukladno odobrenjima regulatornih agencija - je legalno i učestalo, a često i bez adekvatnih dokaza koji potkrepljuju takvu primjenu. *Off label* primjena nije formalno evaluirana a dokazi dostavljeni za jednu kliničku situaciju ne moraju biti primjenjivi u drugim situacijama. Zato *off label* primjena umanjuje očekivanja da je sigurnost i djelotvornost primjene lijeka potpuno ocijenjena (42).

Sistemska primjena bevacizumaba povezana je ozbiljnim nuspojavama kardiovaskularnog sustava poput hipertenzije, arterijskih trombotskih događaja, krvarenja i smrti (43). Kao što su pokazali podaci u životinja i ograničeni podaci o sistemskej ekspoziciji u ljudi, intravitrealni bevacizumab utječe na razine VEGF u sistemskej cirkulaciji i uzrokuje sistemske nuspojave (44, 45). Obzirom da se koristi *off label*, nije obuhvaćen periodičkim izvješćima o neškodljivosti lijeka, mjerama minimizacije rizika i drugim alatima farmakovigilancije. Posljedično tome, publicirani podaci su glavni izvor informacija.

1.5. Dosadašnje spoznaje

Ova tema privukla je mnogo pažnje u zadnjih nekoliko godina. Samo u periodu od 2014. godine do lipnja 2015. godine objavljeno je 8 sustavnih pregleda i/ili meta-analiza randomiziranih kontroliranih ispitivanja (RCT) s primjenom IVT bevacizumaba u AMD (tablica 1.). No, ove publikacije značajno se razlikuju po usporednim tretmanima uključenim u evaluaciju i po ciljnim ishodima koji su praćeni. Ovdje se, kada govorimo o sistemskim ozbiljnim štetnim događajima u kardiovaskularnom sustavu, radi o rijetkim događajima. Rijetki događaji su definirani njihovim brojem u specifičnoj grupi koji je često vrlo malen ili čak nula. Izvještavanje o neželjenim događajima tijekom randomiziranih kontroliranih ispitivanja ima nekoliko ograničenja od kojih su jedni od važnijih uključni odnosno isključni kriteriji kojima se potencijalno najrizičniji bolesnici mogu isključiti iz ispitivane populacije. No, čak i da je izvještavanje sasvim ispravno, većini ispitivanja nedostaje snaga detekcije neželjenih događaja koji imaju incidenciju manju od 1/1000. I meta-analizom nekoliko RCT-ova snaga detekcije ne mora biti dostatna za identifikaciju rijetkih (a potencijalno važnih) neželjenih događaja. Nadalje, ispitivanja mogu biti nedostatna po pitanju adekvatno dugog vremena praćenja koje je potrebno da bi se otkrili rijetki događaji (koji se pojavljuju s vremenskim odmakom od inicijalne primjene ili odgođene posljedice povezane s dugotrajnom primjenom lijeka). Zbog navedenih ograničenja RCT-ova, druga nerandomizirana ispitivanja mogla bi biti izvorom vrijednih informacija (46). Najveći RCT primjene bevacizumaba i ranibizumaba u bolesnika s AMD uključuje oko 600 bolesnika po kraku. Kao takav, ima oko 20% snage za detekciju apsolutne razlike u incidenciji npr. infarkta miokarda od 1%, odnosno razlike 3% u odnosu na 2% (u godini dana), što je relativni rizik od 1,5 i praktično važan apsolutni efekt od 10 bolesnika više s infarktomiokarda na 1000 liječenih. Slično tome, najveći broj s uključenih devet RCT-ova u jednoj meta-analizi ima ukupno 3600 ispitanika. Čak i da su ispitivanja/krakovi vrlo slični dizajnom i da je heterogenost blaga do umjerena (I^2 do 50%), takva analiza ima 40-60% snage za detekciju praktično važnih razlika.

Tablica 1. Sumarni prikaz meta-analiza randomiziranih kontroliranih ispitivanja (RCT-ova) intravitrealne primjene bevacizumaba za AMD objavljene tijekom 2014. do lipnja 2015. god.

Reference	Svrha rada, period praćenja	Bevacizumab RCT-ovi	pregled / metoda	Zaključci o sigurnosti CV sustava
Solomon 2014 (47)	Svi anti-VEGF u AMD Djelotvornost i sigurnost, 1 ili 2 god.	<u>BEV vs. PDT</u> k=2, n=95 <u>BEV vs. PBO</u> k=1, n=77 <u>BEV vs. RAN</u> k=6, n=2806	Cochran pregled Izravne parne usporedbe <i>Random-effects</i> MH RR	Smrtni ishod, MI, CVI/TIA, kardijalni poremećaji: nema razlike BEV vs. RAN VTE: trend BEV lošiji ≥1 SSAE: BEV lošiji Podaci slični o obje vremenske točke
Moja 2014 (48)	BEV vs. RAN in ARMD Sistemska sigurnost, 1 ili 2 god.	k=9 (3 neobjavljena) n=3645	Cochran pregled Izravne parne usporedbe <i>Random-effects</i> MH RR	Smrtni ishod, ATE, MI, CVI, ≥1 SSAE: nema razlike BEV vs. RAN Podaci slični o obje vremenske točke
Kodjikian 2014 (49)	BEV vs. RAN u AMD Djelotvornost i sigurnost, 1 ili 2 god.	k=5, n=2686	Sustavni pregled Izravne parne usporedbe <i>Random-effects</i> OR	Smrtni ishod, MI, CVI, ATE, kardijalni, ne-očna krvarenja: nema razlike BEV vs. RAN VTE: trend BEV lošiji ≥1 SSAE: BEV lošiji Podaci slični o obje vremenske točke
Thulliez 2014 (43)	Anti-VEGF vs. ne-anti-VEGF u AMD, RVO ili DM retinopatiji, djelotvornost i sigurnost, 1 god.	<u>BEV vs. PDT/PBO (AMD)</u> k=1, n=93 (ukupno k=21, 12 u AMD)	Sustavni pregled Izravne parne usporedbe Peto OR	Veliki CV događaji, ne-očna krvarenja: anti-VEGF (BEV ili RAN) nisu različiti vs. ne-anti-VEGF
Chen 2015 (50)	BEV vs. RAN u AMD Djelotvornost i sigurnost, 1 ili 2 god.	k=6, n=2612	Sustavni pregled Izravne parne usporedbe <i>Fixed-effect</i> MH RR	Smrtni ishod i ATE: nema razlike BEV vs. RAN VTE: trend BEV lošiji ≥1 SSAE: BEV lošiji Podaci slični o obje vremenske točke
Schmid 2015 (51)	AFLIB, BEV, RAN vs. PBO i međusobno u AMD, djelotvornost i sigurnost, 1 god.	<u>BEV vs. RAN</u> k=2, n=1795 (ukupno k=11, 2 vs. PBO [RAN])	Sustavni pregled Mrežna meta-analiza	Trombotski događaji: BEV lošiji od PBO (isključivo indirektna usporedba)
Wang 2015 (52)	BEV vs. RAN u AMD	k=5, n=2619	Sustavni pregled	Smrtni ishod, ATE: nema razlike BEV vs. RAN

	djelotvornost i sigurnost, 1 ili 2 god.		Izravne parne usporedbe <i>Fixed-effect</i> MH OR	VTE: trend BEV lošiji ≥1 SSAE: BEV lošiji Podaci slični o obje vremenske točke
Scott 2015 (53)	Sustavna sigurnost IVT anti-VEGF lijekova, 1 ili 2 god.	<u>BEV vs. RAN (AMD)</u> k=6, n=2744 <u>BEV vs. PDT/PBO (AMD)</u> k=1, n=93	Ne-sustavni pregled Izravne parne usporedbe <i>Fixed-effect</i> OR	Smrtni ishod u 1 god, ATE u 2 god: nema razlike BEV vs. RAN ≥1 SSAE u 1 god: BEV lošiji

AFLIB – aflibercept; ATE – aterotrombotski događaji; CV –kardiovaskularni; CVI – moždani udar; DM – diabetes mellitus; k – broj studija; MH – Mantel-Haenszel; MI – infarkt miokarda; n – broj bolesnika; OR – omjer šansi; PBO – placebo; PDT – fotodinamska terapija; RAN – ranibizumab; RR – omjer rizika; RVO – okluzija retinalne arterije; SSAE – sistemski ozbiljni neželjeni događaj; TIA – tranzitorna ishemična ataka; VTE – venski tromboembolizam

1.6. Koncept istraživanja

Ovo istraživanje usmjereno je na sistemske nuspojave intravitrealne primjene bevacizumaba. Sastoji se od 2 cjeline. Prva cjelina je sustavni pregled i meta-analize randomiziranih kontroliranih i opservacijskih ispitivanja koji su publicirani i izvještavali su o kardiovaskularnim rizicima intravitrealne primjene bevacizumaba. Drugu cjelinu čini praćenje kohorte bolesnika Klinike za očne bolesti Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u prospektivnom nekontroliranom opservacijskom ispitivanju od 06/2012. god. kada je počela primjena ove *off label* terapije u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“. U tom praćenju primijenjen je sustav probira kojim su se selekcionirani najrizičniji bolesnici i isključeni iz terapije. Dio bolesnika iz kohorte liječenih bevacizumabom intravitrealno koji je pristao na dodatno vađenje krvi uključen je u farmakokinetičko ispitivanje sustavne izloženosti bevacizumabu i istodobnom praćenju VEGF iz krvi bolesnika. Na kraju, evaluiran je sustav probira u odnosu na sve rezultate i predložen je modificirani sustav probira bolesnika liječenih bevacizumabom intravitrealno.

2. HIPOTEZA

Sustavom probira bolesnika sa senilnom makularnom degeneracijom smanjuje se rizik sistemskih nuspojava intravitrealno primijenjenoga bevacizumaba.

3. CILJEVI RADA

Opći cilj je procjena smanjenja rizika neželjenih događaja bevacizumaba primijenjenoga intravitrealno u bolesnika sa senilnom makularnom degeneracijom sustavom probira koji se primjenjuje u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“.

Istraživanje je imalo slijedeće specifične ciljeve:

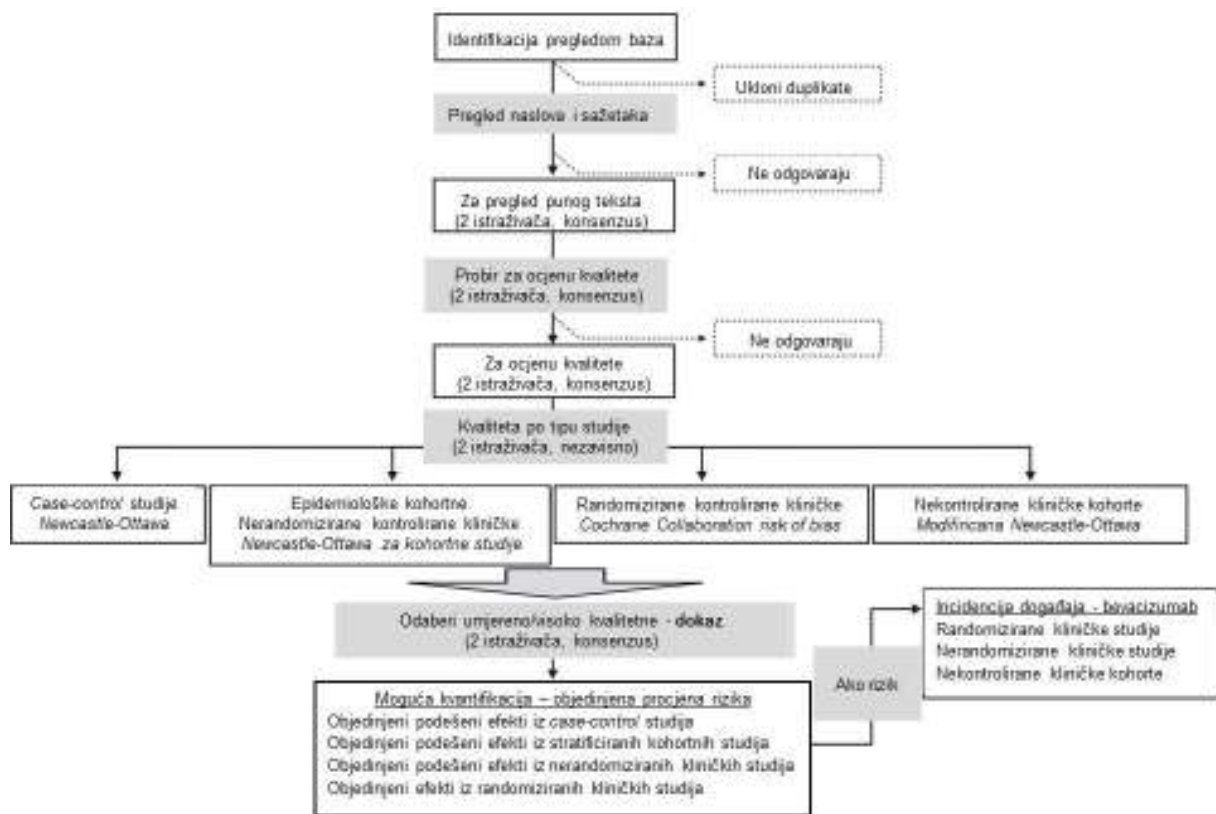
- a) *Procjena relevantnosti primjene opisanog probira za kontrolu kardiovaskularnog /cerebrovaskularnog rizika u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom.* Budući da sustav liječenje bolesnika s AMD IVT bevacizumabom u KB „Sveti Duh“ ne omogućuje liječenje **bez** probira na temelju postupnika, ova procjena temelji se na opaženoj incidenciji događaja u promatranoj kohorti u odnosu na literaturne podatke;
- b) *Sustavni pregled literature i meta-analiza literaturnih podataka o neželjenim događajima tijekom liječenja AMD IVT bevacizumabom;*
- c) *Procjena relevantnosti pojedinih kliničkih i laboratorijskih pokazatelja koji se u probiru određuju i prate, kao pokazatelja kardiovaskularnog/cerebrovaskularnog rizika (u kohorti).* Tijekom probira i praćenja bolesnika određuje se niz kliničkih i laboratorijskih pokazatelja, te je na ovaj način pokušano identificirati one od praktičnog značenja;
- d) *Procjena sistemske izloženosti bevacizumabu nakon IVT primjene, odnos izloženosti bevacizumabu i cirkulirajućih koncentracija VEGF, te procjena odnosa sistemskih koncentracija bevacizumaba i/ili VEGF-a i laboratorijskih pokazatelja.* Podskupini bolesnika iz praćene kohorte, a koji su potpisali informirani pristanak, uzeti su uzorci periferne venske krvi 24 sata prije primjene IVT bevacizumaba, 24 sata nakon primjene i 7 dana nakon primjene, u svrhu određivanja razine cirkulirajućeg bevacizumaba i VEGF-a.

4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje provedeno u sklopu izrade ovog doktorskog rada sastoji se od dva dijela. Prvi dio (a) čini sustavni pregleda i meta-analize literaturnih podataka koji se odnose na problem kardio-/cerebrovaskularnog rizika združenog s intravitrealnom primjenom (IVT) bevacizumaba u bolesnika sa senilnom makularnom degeneracijom (AMD, *age related macular degeneration*) i obuhvatio je randomizirane kontrolirane kliničke studije (RCT, *randomized controlled trials*), nerandomizirane kontrolirane kliničke studije, nekontrolirane kohortne kliničke studije (radi se, zapravo, o serijama bolesnika), te (farmako)epidemiološke studije, odnosno opservacijske studije; b) prospektivno nekontrolirano opservacijsko ispitivanje sigurnosti intravitrealne primjene bevacizumaba u kohorti bolesnika liječenih u KB Sveti Duh, a uključilo je i procjenu koncentracija bevacizumaba i VEGF-a u sistemskoj cirkulaciji nakon IVT primjene bevacizumaba. U ovom su poglavlju prvo izložena metodološka svojstva sustavnog pregleda i meta-analize a zatim svojstva ispitanika i metode rabljene u prospektivnom opservacijskom istraživanju.

4.1. Sustavni pregled i meta-analiza kardio- i cerebrovaskularnog rizika združenog s IVT bevacizumabom u bolesnika s AMD

Slika 1 prikazuje plan cjelokupnog istraživanja. Istraživanje uključuje identifikaciju publikacija pregledom elektronskih baza, uklanjanje dupliciranih publikacije, prvi probir (sukladnost s ključnim/isključnim kriterijima) na temelju naslova i sažetaka u svrhu identifikacije onih koje treba procijeniti na temelju cjelokupnog teksta, odabir publikacija sukladnih glavnim ključnim/isključnim kriterijima koji ulaze u ocjenu kvalitete, te odabir studija barem umjerene a prvenstveno visoke kvalitete za potencijalnu kvantitativnu sintezu (meta-analiza). Kvantitativna sinteza provodi se metodama koje odgovaraju tipu studije i predviđa dvije vrste meta-analize: a) meta-analizu rizika združenog s primjenom IVT bevacizumaba (u odnosu na neku kontrolu, primjerice drugi tretman ili stanje bez tretmana) na temelju *case-control* ili kohortnih (stratificiranih) studija, nerandomiziranih kontroliranih kliničkih studija ili pak randomiziranih kontroliranih kliničkih studija (RCT, *randomized controlled trial*); b) i meta-analizu incidencije događaja koja se temelji samo na proporcijama bolesnika s događajem u krakovima kliničkih studija (kontroliranih – randomiziranih ili ne; i nekontroliranih, tj. „serija bolesnika“) u kojima su bolesnici primali IVT bevacizumab.



Slika 1. Shema sustavnog pregleda literature i meta-analiza rezultata kliničkih i epidemioloških studija koje su se bavile procjenom kardio- i cerebrovaskularnog rizika združenog s IVT primjenom bevacizumaba u bolesnika s AMD.

Newcastle-Ottawa je validirani instrument – ocjenska ljestvica – za procjenu kvalitete opservacijskih studija, *case-control* i kohornih; *Cochrane Collaboration risk of bias* je validirani instrument – ocjenska ljestvica – za procjenu kvalitete randomiziranih kliničkih studija. Metodološki detalji objašnjeni su u tekstu.

4.1.1. Pretraživanje literature i odabir studija za kvalitativnu ocjenu

Elektronske baze podataka (PubMed, MEDLINE, Ovid, Cochrane Library, EBSCO) sustavno su i ponavljano pretraživane između 1. lipnja 2014. i 15. lipnja 2015.g. Strategija pretraživanja osmišljena je kao osjetljiva i nespecifična uključujući pojmove “age related macular degeneration“ ili „AMD“ ili „ARMD“ ili sinonime – „neovascular“ ili „wet“ ili „exudative“ kombinirane s „macular degeneration“ ili „choroidal neovascularization“; za identifikaciju bolesti; te, “bevacizumab”, “Avastin” zajedno s “intravitreal” ili “intra-ocular“ za identifikaciju tretmana. Pretraživanje je ograničeno na članke na engleskom i njemačkom jeziku. Pregledane su i liste referenci pretraživanih članaka. Uključni kriteriji bili su: 1) studije IVT bevacizumaba u bolesnika s AMD; 2) RCT, studije slučajeva i kontrola (*case-control*), stratificirane kohortne studije i kliničke nerandomizirane kontrolirane ili

nekontrolirane studije (prospektivne ili retrospektivne); 3) studije koje eksplicitno izvještavaju o barem jednom od slijedećih ishoda: (a) ukupna smrtnost; (b) smrtnost od vaskularnih uzroka; (c) smrtnost nepoznatog uzroka; (d) hipertenzija; (e) arterijski trombotski događaji (moždani udar ili tranzitorna ishemična ataka; infarkt miokarda ili angina; periferna arterijska okluzija); (f) venski tromboembolizam; (g) ne-ofthalmološko krvarenje; ili su alternativno spomenuti “sistemski neželjeni događaji”. Isključni kriteriji bili su: 1) kongresna priopćenja; 2) studije s ≤ 20 ispitanika izloženih bevacizumabu; 3) bevacizumab primjenjivan u kombiniranom liječenju (npr. bevacizumab s fotodinamskom terapijom); 4) period praćenja manji od 6 mjeseci i/ili manje od 3 ponavljana davanja IVT bevacizumaba. Kada je studija objavljena u više od jednog članka, onaj s najpotpunijim podacima je uključen u pregled. Iznimka su bile separatne publikacije produžetka iste studije koje su razmatrane zasebno u različitim vremenskim točkama. Podaci iz različitih vremenski točaka nisu sumirani, stoga nije bilo dvostrukog brojanja događaja. Nakon selekcije temeljem naslova i sažetaka, sve različitosti u uključenju i/ili isključenju dogovorno su razriješene između doktoranda i mentora.

4.1.2. Ocjena kvalitete izvještaja i odabir studija za kvantitativnu sintezu

Ocjena kvalitete temeljena je primarno na definiciji, ustanovljenju i izvještaju štetnih događaja od interesa i ključnim odnosno isključnim kriterijima. Za ocjenu RCT-ova korišten je Cochrane Collaboration instrument ocjene rizika od sustavne greške (pristranosti) (54), prilagođen specifičnom fokusu na štetne događaje. Za ocjenu stratificiranih kohortnih i studija slučajeva i kontrola korištena je Newcastle-Ottawa ocjenska ljestvica (55). Nerandomizirana kontrolirana klinička ispitivanja ocjenjivana su kao stratificirane kohortne studije. Za nekontrolirane kohorte (velike serije slučajeva) korišteni su elementi Newcastle-Ottawa ljestvice koji se odnose na selekciju bolesnika, ekspoziciju i dijelove koji se odnose na ishode. Da bi se izbjegle pristrane procjene, samo studije ocijenjene kao visoko kvalitetne uključene su u kvantitativnu sintezu. Svaki RCT je ocijenjen kao visoko kvalitetan ako su: (1) rizik pristranosti uslijed nepotpunog izvještavanja i rizik pristranosti zbog „ispadanja“ bolesnika iz studije ocijenjeni kao “niski”. Ovi elementi ocjene rizika pristranosti modificirani su sukladno činjenici da je sustavni pregled fokusiran na nuspojave, te je ocjena ovisila o tome je li neželjeni događaj jasno definiran, jesu li opisane metode praćenja, i jesu li navedeni brojevi slučajeva, uključivo s eksplicitnim navođenjem “nula događaja”; (2) najviše jedan od drugih rizika pristranosti (selekcije, izvođenja i detekcije) označen je kao “nejasan” i (3) niti jedan

rizik pristranosti nije označen kao “visok”. Stratificirane kohortne studije (i nerandomizirane kontrolirane studije) smatrane su visoko kvalitetnima kada je barem jedna zvjezdica dodijeljena svakom od osam elemenata Newcastle-Ottawa ljestvice [selekcija kohorti - reprezentativnost kohorte, selekcija kontrolne (neizložene) kohorte, dosljednost ekspozicije, dokaz da ishoda od interesa nije bilo na početku studije, usporedivost kohorti - dizajnom i analizom (moguće dvije zvjezdice) i ishod - metoda ocjene, dužina praćenja dovoljna da se ishod pojavi i adekvatnost praćenja (proporcije praćenih i uračunavanje bolesnika koji su „ispali“ iz praćenja)]. Studija slučajeva i kontrola smatrana je visoko kvalitetnom kada je dodijeljeno barem sedam od osam mogućih zvjezdica (primjenjivi dijelovi ljestvice): definicija slučajeva i njihova reprezentativnost, definicija kontrola, usporedivost slučajeva i kontrola (dvije zvjezdice moguće), dosljednost ekspozicije i ista metoda za slučajeve i kontrole i broj ispitanika (slučajeva i kontrola) koji su odbili sudjelovati u studiji. Kontrolni ispitanici nisu nužno morali biti iz opće populacije, već su mogli biti regrutirani i u zdravstvenim ustanovama. I konačno, nekontrolirane kohorte (velike serije slučajeva) smatrane su prihvatljive kvalitete za uključenje u kvantitativnu sintezu kada je zvjezdica dodijeljena u slijedećim elementima: reprezentativnost izložene kohorte, dosljednost ekspozicije, ocjena ishoda i dovoljno dugo praćenje (s uračunavanjem izgubljenih slučajeva tijekom praćenja). Također su smatrane prihvatljivim ako su uključivale bolesnike s postojećim kardiovaskularnim ili cerebrovaskularnim bolestima (npr. hipertenzijom ili koronarnom bolešću) ali su izvijestile o pogoršanju stanja.

4.1.3. Mjere ishoda, ekstrakcija podataka i kvantitativna sinteza

Podatke su neovisno ekstrahirali doktorand i mentor, koristeći standardizirane obrasce prema metodologiji Cochranove skupine (Cochrane Collaboration) (56). Sve nepodudarnosti riješene su konsenzusom. Kardiovaskularni/cerebrovaskularni događaji ekstrahirani su prema definiciji (npr. posebno infarkt miokarda i moždani udar); a združeni ishodi nastali kombinacijom različitih tipova događaja, npr. “kardiovaskularni događaj” nisu sumirani. Tako je izbjegnuto dupliciranje koje se navodilo i u primarnim studijama.

U RCT-ovima, binarni podaci su ekstrahirani za kumulativnu incidenciju određenog neželjenog događaja kao broj bolesnika s događajem/ukupni broj bolesnika (kao nazivnik, korišteni su bolesnici deklarirani kao „populacija za procjenu sigurnosti“ ili deklarirani kao „populacija koju se namjerava liječiti“). Za studije slučajeva i kontrola, kohortne i

nerandomizirane kontrolirane kliničke studije kao mjera učinka bevacizumaba (u odnosu na neki drugi tretman ili stanje bez tretmana), ekstrahirani su prilagođeni omjeri (rizika, šanse, stope, hazarda). Za procjenu incidencije u bolesnika izloženih bevacizumabu, ekstrahirani su n/N podaci. Kada su dva kraka/studije izvijestila o istom ishodu i bila klinički usporediva (npr. isti dizajn studije, slično razdoblje praćenja, bolesnici su imali slično kardiovaskularno/cerebrovaskularno opterećenje u anamnezi), podaci su objedinjeni kvantitativno. Za kvantitativnu sintezu podataka iz RCT-ove korišten je Peto omjer šansi (OR) za ishode s incidencijom oko ili ispod 1%, a za ishode s incidencijom >1% korišten je Mantel-Haenszel (*random effects* M-H) OR. U oba slučaja, određen je i uvjetni egzaktni M-H OR s mid-P intervalima pouzdanosti, jer metoda ne uključuje korekciju za incidenciju „0“ u pojedinom kraku studije i ne isključuje studije u kojima uopće nije bilo događaja. Za kvantitativnu sintezu rezultata opservacijskih studija (podešeni omjeri) korištena je metoda inverzne varijance (*random-effects inverse-variance method*). Za meta-analizu proporcija (incidencije), primijenjena je metoda transformacije po Freeman-Tukey-u (*random-effects Freeman-Tukey double arcsine transformation method*). Za procjenu učinka trajanja studije i prosječnog broja isporučenih doza bevacizumaba na incidenciju događaja, korištena je meta-regresija transformiranih proporcija. Za ocjenu varijabilnosti (heterogenosti) efekata bevacizumaba od studije do studije (RCT), korišten je formalni test statističke značajnosti heterogenosti efekata (Q-test), određena je varijanca stvarnih efekata kao izravna mjera varijabilnosti (τ^2), indeks nekonzistentnosti (I^2 koji govori o udjelu stvarne varijabilnosti efekata u ukupnoj varijabilnosti [ukupna varijabilnost= stvarna varijabilnost + slučajna varijabilnost]), te interval predikcije (PI) kao ilustracija rasapa (varijabilnosti) opaženih efekata uslijed stvarne varijabilnosti efekata i slučajne varijabilnosti (57).

Usporedbe između tretmana odnose se na usporedbu bevacizumaba u odnosu na ne anti-VEGF tretmane i u odnosu na druge VEGF tretmane. Obzirom na vrlo detaljan pregled literature, pristranost publiciranja (*publication bias*) nije posebno evaluirana. Iako bi, u statističkom smislu, bilo ispravno uvesti korekciju razine greške tipa I (alfa) za broj usporedbi (usporedbe između tretmana za veliki broj ishoda), smatrali smo da bi takav postupak bio suviše konzervativan i rezultirao mogućim previđanjem potencijalno važnih sigurnosnih signala. Za sve izračune korišten je STATA 13 računalni program (StatCorp, College Station, TX, USA).

4.2. Prospektivno nekontrolirano opservacijsko ispitivanje sigurnosti intravitrealne primjene bevacizumaba

4.2.1. Oblikovanje ispitivanja

Na Klinici za očne bolesti KB „Sveti Duh“ od lipnja 2012.g. IVT bevacizumab primijenjuje se *off-label* u liječenju bolesnika s koroidalnom neovaskularizacijom. Sukladno nalogu direktorice Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje (HZZO-a) o *off label* primjeni lijekova u bolnicama, za odobrenje primjene potrebna je suglasnost bolničkog povjerenstva za lijekove (PL). S obzirom na moguće rizike intravitrealne (IVT) primjene bevacizumaba, a na inicijativu kliničkog farmakologa, člana PL (doktorand), smatrali smo etički neprihvatljivim primjenjivati lijek u liječenju AMD bez prethodne detaljne procjene rizika sistemskih nuspojava i adekvatnog kontinuiranog nadzora nad bolesnicima. Stoga je u suradnji s Klinikom za očne bolesti a u svrhu minimalizacije rizika za bolesnike, razrađen sustav probira kandidata za ovaj terapijski postupak. Sustav se sastoji od postupnika s 3 dijela: evaluacija anamneze bolesnika i dosadašnjih bolesti, sadašnjeg stanja, statusa i laboratorijskih nalaza, te postproceduralne evaluacije (Prilog 1.). Stanja poput teške neregulirane hipertenzije, značajne proteinurije, operativnog zahvata unutar mjesec dana ili da se ista planira u tijeku terapije, aktivno krvarenje, akutna bolest i sustavna primjena bevacizumaba isključni su kriteriji kojima se bolesniku privremeno (do regulacije bolesti) ili trajno ukida ova terapija. Sustavnim praćenjem od srpnja do rujna 2012.g. ustanovljeno je da je postupnik, koji zahtijeva multidisciplinarnu suradnju (timski rad oftalmologa, kliničkog farmakologa, internista i po potrebi drugih specijalista), potpuno primjenjiv u svakodnevnoj praksi.

Predmet ove disertacije je prospektivno opservacijsko istraživanje koje je uključilo bolesnike s dijagnozom AMD liječene u Klinici za očne bolesti KB „Sveti Duh“ IVT bevacizumabom od rujna 2012.g. do kolovoza 2015.g., kada je pristupljeno obradi podataka. Svi su uključeni u terapijski postupak na temelju kriterija opisanog postupnika.

4.2.2. Klinička i laboratorijska evaluacija bolesnika u kohorti

Bolesnici uključeni u kohortu (prema opisanim kriterijima) sustavno su praćeni tijekom trajanja liječenja (a najduže do kraja kolovoza 2015.g.) te su zabilježeni: svi neželjeni događaji, kardiovaskularni/cerebrovaskularni događaji, ostali komorbiditet, broj primijenjenih injekcija, vremenski razmaci između pojedinih injekcija te ukupno trajanje liječenja, a 24 sata prije i 24 sata nakon svake primjene bevacizumaba određeni su broj leukocita, hemoglobin,

D-dimer, troponin, urea, kreatinin, C-reaktivni protein, te proteini u urinu određivani test trakom.

4.2.3. Određivanje sistemskih koncentracija bevacizumaba i VEGF-a

U bolesnika koji su potpusali informirani pristanak, krv je vađena kubitalnom venepunkcijom u epruvetu (cca 5ml) bez antikoagulansa (crveni čep) označena posebno pripremljenom naljepnicom radi lakšeg prepoznavanja. Krv je odmah transportirana do laboratorija KBSD gdje su uzorci centrifugirani na 4000 rpm kroz 10 minuta. Odvojena je plazma u dva alikvota (duplikati) i pohranjena u hladnjak na -20°C unutar 2 sata od vađenja. Uzorci su, na suhom ledu, transportirani u Laboratorij za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković gdje je za određivanje koncentracija bevacizumaba i VEGF-a korištena metoda *proximity extension assay* (PEA) koju je razvila tvrtka Olink Bioscience (Uppsala, Švedska). Metoda se najviše koristi u animalnim modelima jer omogućuje da se u vrlo malim volumenima bioloških uzoraka detektiraju male količine ciljnih molekula. Metoda je izabrana na temelju pretpostavljene visoke specifičnosti i senzitivnosti u detekciji niskih koncentracija (bevacizumaba odnosno VEGF-a), zbog principa na kojima se temelji (58). Naime, metodu (kao i sastavnice PEA kita proizvođača Olink Bioscience) sačinjava vezivanje poliklonskih ili monoklonskih protutijela, u kombinaciji sa sastavnicama kita, na ciljnu molekulu, te detekcija metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*real-time polymerase chain reaction, real-time PCR*). PEA tehnologija koristi par DNA oligonukleotida vezanih na par monoklonskih ili poliklonskih protutijela, koja se pak vezuju na ciljni protein u uzorku. Nakon vezivanja dvije probe, stvara se slaba DNA uzvojnica, koji se pomoću DNA polimeraze umnožava stvarajući tako pojačani signal koji se očitava *real-time PCR* metodom. Ovime se, bez dodatnih koraka ispiranja, transformira detekcija ciljnog proteina u DNA očitavanje. Za određivanje koncentracije bevacizumaba konjugirana su (s DNA probama) dva para monoklonskih protutijela (fab fragmenta HCA182, Bio-Rad Laboratories Inc. + monoklonskog protutijela HCA184, Bio-Rad Laboratories Inc.) testirana na poznatim koncentracijama (uz zadovoljavajuće krivulje detekcije poznatih koncentracija), dok je za određivanje VEGF-a korišteno pročišćeno poliklonalno protutijelo prema preporuci proizvođača PEA kita, na temelju potvrđenih dobrih svojstava (kat. broj AF-293-NA, R&D Systems, Inc.) podijeljeno u dvije frakcije vezivanjem PEA proba A i B. PEA probe se potom inkubiraju s uzorcima i standardima antigena (bevacizumaba, odnosno VEGF-a). Koncentracije ciljnih molekula u uzorcima određuju se na temelju standardnih krivulja,

pretvorbom očitanih RT-PCR vrijednosti (Ct) u koncentracije. Sve analize rađene su u triplikatu i u kratkom vremenskom periodu, svodeći tako mogućnosti varijacija aparata i uvjeta analize na minimum.

4.2.4. Statistička analiza

Svi klinički, laboratorijski i farmakokinetički podaci sažeti su odgovarajućim metodama deskriptivne statistike.

Usporedba učestalosti kardiovaskularnih/cerebrovaskularnih događaja u praćenoj kohorti s literaturnim podacima. Kao mjera učestalosti događaja određene su incidencija (broj bolesnika s barem jednim događajem/ukupan broj bolesnika) i stopa događaja (broj događaja/broj mjeseci ekspozicije). Budući da u studiji nije, kako je objašnjeno, postojala „kontrolna skupina“ (tj. „ne-probrani“ bolesnici), ti su podaci, bez formalnog statističkog testa, tablično prikazani usporedno s podacima iz literature za bolesnike (studije) u kojima ispitanici nisu isključivani na temelju sustavno procijenjenog kardio-/cerebrovaskularnog rizika.

Daljnja analiza podataka slijedila je logički niz sukcesivnih pitanja na koja se željelo odgovoriti:

Postoji li povezanost pojedinih laboratorijskih pokazatelja (tijekom vremena) i pojave kardiovaskularnih ili cerebrovaskularnih događaja? Individualni praćeni laboratorijski pokazatelji (kao nezavisne varijable promjenjive u vremenu) testirani su u univarijatnim ili multivarijatnim modelima za detekciju povezanosti s pojavom kardiovaskularnih ili cerebrovaskularnih neželjenih događaja (zavisna binarna varijabla s ponovljenim mjerenjima, odnosno, longitudinalne proporcije). U tu svrhu korištena je metoda logističke regresije za ponovljena mjerenje primjenom generaliziranih linearnih mješovitih modela.

Postoji li povezanost IVT primjene bevacizumaba i promjena (tijekom vremena) laboratorijskih pokazatelja za koje je pak nađena povezanost s pojavom kardiovaskularnih/cerebrovaskularnih događaja? Budući da u studiji nije postojala „kontrolna“ skupina ispitanika koji nisu liječeni bevacizumabom, na ovo pitanje nije moguće izravno odgovoriti. Stoga je provedena sukcesivna analiza u svrhu detekcije (ili odbacivanja) posrednog dokaza. U prvom koraku, identificirani relevantni laboratorijski pokazatelji tretirani su kao zavisne varijable (s ponovljenim mjerenjima, tj. longitudinalni podaci), a kao relevantne nezavisne varijable u univarijatnim i multivarijatnim modelima testirani su broj

primijenjenih injekcija (kao mjera „intenziteta ekspozicije“), te moguće razlike vrijednosti nakon primjene bevacizumaba (24 sata) i prije primjene bevacizumaba (24 sata). Moguća povezanost trajanja terapije/broja injekcija (intenzitet ekspozicije), odnosno moguće promjene vrijednosti neposredno nakon primjene (u odnosu na stanje prije primjene), smatrane su neizravnim pokazateljem utjecaja primjene lijeka na zavisnu varijablu. U tu su svrhu korišteni generalni linearni mješoviti modeli. U drugom koraku, u podskupini bolesnika u kojih su izmjerene sistemske koncentracije bevacizumaba i VEGF-a (i) ispitan je odnos koncentracija bevacizumaba (nezavisna varijabla) i koncentracija VEGF-a (zavisna varijabla) u svakoj od vremenskih točaka u kojima su određeni; (ii) ispitan je odnos koncentracije bevacizumaba, ili VEGF-a ili oboje (nezavisne varijable) i vrijednosti laboratorijskih pokazatelja od interesa (zavisna varijabla) u univarijatnim i multivarijatnim modelima. U tu svrhu su korišteni generalni linearni modeli i generalni linearni mješoviti modeli. Nalaz povezanosti ekspozicije bevacizumabu i/ili koncentracije VEGF-a (u slučaju povezanosti koncentracija tih dviju molekula) s vrijednostima laboratorijskih pokazatelja od interesa, smatran je dokazom povezanosti IVT primjene bevacizumaba i opaženih promjena laboratorijskih pokazatelja. Uzevši skupno (moguća povezanost „intenziteta ekspozicije“ i laboratorijskih pokazatelja od interesa; moguća povezanost razine sistemske ekspozicije i laboratorijskih pokazatelja od interesa), ova analiza pruža razumnu razinu dokaza koja potvrđuje ili odbacuje logički slijed: IVT bevacizumab – sistemska ekspozicija s ili bez promjena VEGF-a – promjene laboratorijskih pokazatelja – neželjeni kardiovaskularni ili cerebrovaskularni događaji. Na taj način potvrđuje se ili odbacuje praktična relevantnost pojedinih laboratorijskih testova u programu praćenja bolesnika a u svrhu smanjenja rizika neželjenih događaja.

Za sve izračune korišten je STATA 13 računalni program (StatCorp, College Station, TX, USA).

5. REZULTATI

5.1. Sustavni pregled literature i meta-analiza

5.1.1. Izbor studija za analizu

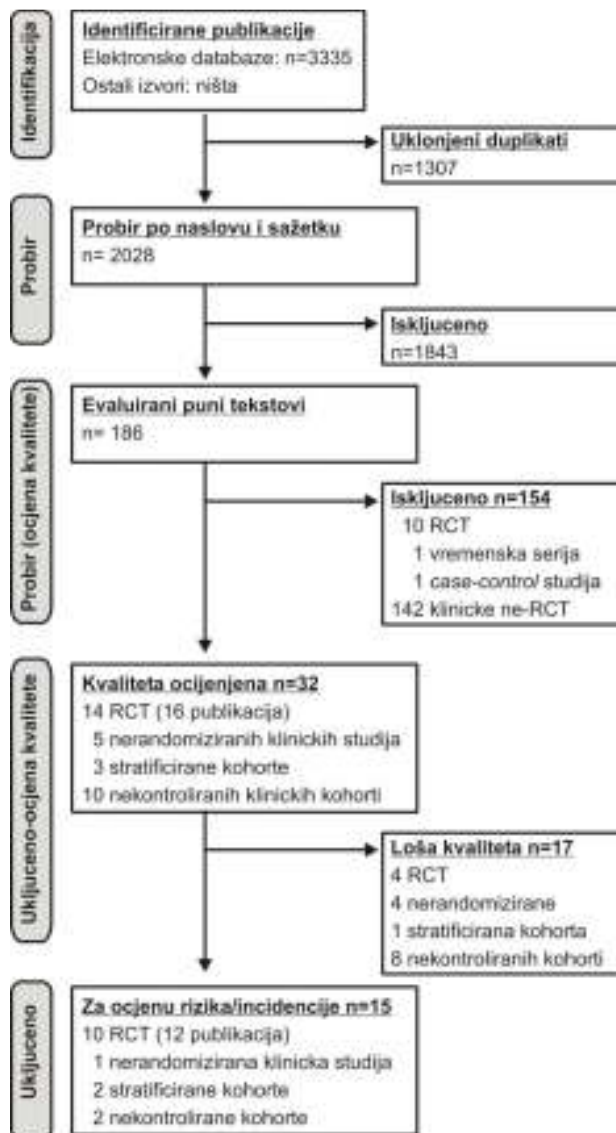
Slika 2. prikazuje PRISMA shemu procesa identifikacije, probira i ocjene studija. Od identificiranih 2028 publikacija (bez duplikata), za 1843 je zaključeno da nisu u skladu s uključnim/isključnim kriterijima na temelju naslova i sažetaka, a 186 ih je pregledano u punom tekstu. Od njih, za 154 je zaključeno da ne odgovaraju kriterijima: 10 RCT-ova [5 s <20 bolesnika liječenih bevacizumabom (59-63), u 2 je vrijeme praćenja bilo <6 mjeseci (64, 65), a u 3 nisu se spominjali sistemski štetni događaji (66-68)]; 1 populacijska analiza vremenskih serija koja je upućivala da nije bilo promjena u stopi hospitalizacija zbog moždanog udara koincidentno s porastom primjene IVT bevacizumaba i ranibizumaba, uključila je više tretiranih bolesti, a AMD se nije mogla jasno izdvojiti iz podataka (69); jedna populacijska „ugnježđena“ studija slučajeva i kontrola koja je upućivala da ne postoji povezanost ekspozicije bevacizumabu ili ranibizumabu unutar šest mjeseci i pojavnosti ishemijskog moždanog udara, infarkta miokarda, venske tromboembolije ili kroničnog zatajenja srca, uključivala je različite bolesti (ne samo AMD) (70); u 142 ostale studije (većinom serije slučajeva i nerandomizirane kontrolirane studije – tipično, retrospektivni pregledi medicinske dokumentacije) vrijeme praćenja bilo je prekratko i/ili se sistemski štetni događaji uopće nisu spominjali. Tim postupkom nađene su 32 studije koje su ušle u ocjenu kvalitete. Kako je prikazano na slici 2., ukupno 15 studija (10 RCT-ova prikazanih u 12 publikacija, 1 nerandomizirana kontrolirana studija, 2 populacijske stratificirane kohortne studije i 2 nekontrolirane kliničke kohorte tj. serije slučajeva) zadovoljilo je kriterije kakvoće za procjene rizika i incidencije kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom.

5.1.2. Ocjena kvalitete i temeljna svojstva studija

5.1.2.1. Randomizirane kontrolirane studije

U ocjenu kvalitete uključeno je 14 RCT-ova prikazanih u 16 publikacija (tablica 2.): 10 (prikazanih u 12 publikacija) ih je ocijenjeno visokokvalitetnima. Njihova klinička heterogenost očitovala se u nekoliko aspekata (tablica 2.): 1) usporedni tretmani – pet studija usporedilo je bevacizumab s ranibizumabom (12 ili 24 mjeseca praćenja), jedna je usporedila bevacizumab sa „standardnom terapijom“, a četiri su usporedile različite sheme primjene

bevacizumaba; 2) probir bolesnika ovisno o komorbiditetu – šest studija isključilo je bolesnike s anamnezom ili trenutnim ozbiljnim kardiovaskularnim komorbiditetom (71-77) a četiri nije (78-82); i 3) prethodno kardiovaskularno „opterećenje“ bolesnika – u pet studija eksplicitno je naveden udio bolesnika s nekim kardio-/cerebrovaskularnim događajem u anamnezi (72, 73, 77, 78, 80-82), a u pet anamnestički podatci nisu navedeni (71, 74-76, 79).



Slika 2. PRISMA prikaz procesa identifikacije, probira i ocjene studija.

Tablica 2. Glavna svojstva i kvaliteta u odnosu na sistemske štetne događaje u 14 randomiziranih kontroliranih studija (prikazanih u 16 publikacija) intravitrealnog bevacizumaba (BEV) u bolesnika sa senilnom makularnom degeneracijom koje su uključene u ocjenu. Rizik pristranosti (54) procijenjene specifično u odnosu na definiciju, praćenje i izvještavanje o sistemskim štetnim događajima. Zasjenjenjem su naznačene studije visoke kvalitete.

Osnovni podatci o studijama		Rizik pristranosti					
Ime autora/studije, godina (ref)	Glavna svojstva studije (usporedba, broj bolesnika, trajanje u mjesecima)	Generiranje random. liste (selekcija)	Skrivena randomizacija (selekcija)	„Slijepi“ bolesnici (izvedba)	„Slijepi“ istraživači (detekcija)	Nepotpuni rezultati („ispadanje“)	Selektivno izvještavanje (izvještavanje)
Tufail 2010 (71)	BEV (n=65) vs. standard ¹ (n=66), 12 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK
CATT 2011 (72)	BEV (n=586) vs. RAN (n=599), 12 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NEJASNO	NIZAK	NIZAK
CATT 2012 (73)	BEV (n=586) vs. RAN (n=599), 24 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NEJASNO	NIZAK	NIZAK
Li 2012 (78)	BEV dva terapijska režima (N=185), 12 mj	NEJASNO	NEJASNO	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK
IVAN 2012 (82)	BEV (n=314) vs. RAN (n=296), 12 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NEJASNO	NIZAK	NIZAK
IVAN 2013 (81)	BEV (n=314) vs. RAN (n=296), 24 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NEJASNO	NIZAK	NIZAK
GEFAL 2013 (77)	BEV (n=246) vs. RAN (n=239), 12 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK
Krebs 2013 (74)	BEV (n=154) vs. RAN (n=163), 12 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK
Lushchik 2013 (75)	BEV tri terapijska režima (N=193), 12 mj	NEJASNO	NEJASNO	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK
Menon 2013 (79)	BEV dva terapijska režima (N=100), 12 mj	NEJASNO	NEJASNO	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK
Berg 2015 (80)	BEV (n=220) vs. RAN (n=221), 12 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK
GMAN 2015 (76)	BEV dva terapijska režima (N=331), 23 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NEJASNO	NIZAK	NIZAK
Lai 2009 (83)	BEV dva terapijska režima (N=50), 6 mj	NIZAK	NEJASNO	NIZAK	NEJASNO	NEJASNO	NEJASNO
El-Mollayess 2012 (84)	BEV dva terapijska režima (N=50), 12 mj	NIZAK	NIZAK	NIZAK	NIZAK	VISOK	VISOK
Parodi 2013 (85)	BEV (n=26) vs. RAN (n=24), 12 mj	NIZAK	NIZAK	NEJASNO	NEJASNO	VISOK	NEJASNO
Barikian 2015 (86)	BEV tri terapijska režima (N=90), 12 mj	NEJASNO	NEJASNO	NIZAK	NEJASNO	VISOK	VISOK

RAN – ranibizumab

¹U ovoj studiji 66 bolesnika primilo je u to vrijeme standardni tretman – pegaptanib (n=38) ili fotodinamsku terapiju (16) ili lažni tretman (n=12)

5.1.2.2. Populacijske stratificirane kohortne studije i nerandomizirane kontrolirane kliničke studije

Kako je sažeto u tablici 3., sve tri populacijske stratificirane kohortne studije koje su zadovoljile kriterije za uključenje bile su usmjerene na kardio-/cerebrovaskularnu sigurnost IVT bevacizumaba (ali i ranibizumaba i pegaptaniba), te su procijenile rizik smrti (svih uzroka), infarkta miokarda, moždanog udara i krvarenja. Dvije (87, 88) su ocijenjene visokokvalitetnima, dok jedna nije (89) –izvještaj se temeljio na dobno standardiziranoj incidenciji u kohorti od oko 1200 bolesnika s AMD uglavnom liječenih IVT bevacizumabom, a zaključeno je da nema razlike u odnosu na dobno standardiziranu incidenciju događaja u općoj populaciji. Dakle, ova studija nije zadovoljila kvalitetom u pogledu usporedivosti kohorti bilo karakteristikama, bilo analizom. Nadalje, u studiji nije definirano vrijeme između zadnje injekcije i pojave događaja, pa je upitna i adekvatnost praćenja.

Od pet nerandomiziranih kontroliranih kliničkih studija (sve retrospektivni pregledi medicinske dokumentacije; tablica 3.), jedna je usporedila IVT bevacizumab s IVT ranibizumabom u pogledu smrtnosti (bilo kojeg uzroka) i pojave aterotrombotskih događaja, te je ocijenjena visokokvalitetnom (90). Preostale četiri studije (91-94) evaluirale su prvenstveno djelotvornost IVT bevacizumaba u odnosu na ranibizumab, no u pogledu evaluacije sigurnosti primjene nisu zadovoljile kriterije usporedivosti i/ili reprezentativnosti kohorti (bolesnici su uključivani samo ako su imale kompletne podatke u medicinskoj dokumentaciji), kriterije primjerenog ishoda ili primjerenog razdoblja praćenja.

5.1.2.3. Nekontrolirane kliničke kohorte

U ocjenu kvalitete specifično u odnosu na sistemske štetne događaje uključeno je ukupno 10 nekontroliranih kohorti, tj. serija bolesnika. Reprezentativnost kohorte zaključena je kada su svojstva bolesnika bila dokumentirana i odgovarala su „tipičnima“ za bolesnike s AMD i indikacijom za anti-VEGF liječenje, bez pristranosti u izboru bolesnika. Dvije su takve studije ocijenjene kao dostatno kvalitetne (95, 96), dok je preostalih 8 studija (97-104) bilo uglavnom fokusirano na djelotvornost, te nisu zadovoljile kriterije kvalitete po jednoj ili više od slijedećih stavki: reprezentativnost kohorte, adekvatno vrijeme praćenja, odnosno (ne)adekvatan način praćenja s obzirom na sistemske štetne događaje (primjerice: nepoznati ishodi u bolesnika povučениh iz studije, nedefinirano vrijeme praćenja) (tablica 4.).

Tablica 3. Glavna svojstva i kvaliteta u odnosu na sistemske štetne događaje (55) populacijskih stratificiranih kohortnih studija (n=3, iznad crte) i nerandomiziranih kontroliranih kliničkih studija (retrospektivnih pregleda medicinske dokumentacije, n=5, ispod crte) intravitrealnog bevacizumaba (BEV) za liječenje senilne makularne degeneracije uključenih u ocjenu. Zasjenjenjem su označene studije visoke kvalitete.

Autor, godina (ref)	Glavna svojstva studija		Izbor i usporedivost kohorti					Ishod		
	Opći dizajn, trajanje praćenja, ciljevi - ishodi	Kohorte	BEV	Kont.	Ekspozicija potvrđena	Bez događaja u početku	Kohorte slične	Ishod ocijenjen	Duljina praćenja	Duljina adekvatna
Curtis 2010 (87)	Populacijska (SAD), administrativne baze, 1 godina. Ishod: ukupna smrtnost, MI, moždani udar, krvarenje	BEV n=38718 RAN n=19926 PEG n=36942 PDT n=52256	*	*	*	*	**	*	*	*
Kemp 2013 (88)	Populacijska (Australija), administrativne baze, 1 godina. Ishod: MI, moždani udar, krvarenje	BEV n=792 RAN n=475 PDT n=399	*	*	*	*	*	*	*	*
Wei Yan 2015 (89)	Populacijska (Singapur), administrativne baze, 2 godine. Ishod: ukupna smrtnost, MI, moždani udar	BEV n=1011 RAN n=98 Miks. n=73 Opća popul.	*	*	*	*	---	*	*	---
Carneiro 2011 (90)	Medicinska dokumentacija , >6 mj Ishod: smrt, AT događaji	BEV n=97 RAN n=219	*	*	*	*	*	*	*	*
Landa 2009 (92)	Medicinska dokumentacija , >6 mj Cilj: <u>djelotvornost</u> , sigurnost	BEV n=37 RAN n=31	---	---	*	*	---	*	*	---
Feng 2011 (91)	Medicinska dokumentacija , 6-26 mj Cilj: <u>djelotvornost</u> , sigurnost	BEV n=278 RAN n=93	*	*	*	*	---	---	*	*
Li 2013 (93)	Medicinska dokumentacija , 6 mj Cilj: <u>djelotvornost</u> , sigurnost	BEV n=28 RAN n=32	*	*	*	*	---	---	*	*
Ozkaya 2013 (94)	Medicinska dokumentacija , >12 mj Cilj: <u>djelotvornost</u> , sigurnost	BEV n=79 RAN n=74	*	*	*	*	---	---	*	*

AT – aterotrombotski događaj; Kont – kontrola; MI – infarkt miokarda; PDT – fotodinamska terapija; PEG – pegaptanib; RAN – ranibizumab
Zvjezdica (★)= u odnosu na specifičnu stavku, studija ima potrebnu kvalitetu; bez zvjezdice (---)= kvaliteta nije adekvatna

Tablica 4. Glavna svojstva i kvaliteta u odnosu na sistemske štetne događaje (55) izvještaja o primjeni intravitrealnog bevacizumaba u nekontroliranim kliničkim kohortama (serijama bolesnika) za liječenje senilne makularne degeneracije uključenih u ocjenu. Zasjenjenjem su označene studije visoke kvalitete.

Autor, godina (ref)	Glavna svojstva studija Opći dizajn, doziranje, bolesnici, isključeni bolesnici s KV opterećenjem?, praćenje, ciljevi, ishodi	Kohorta			Ishod		
		Kohorta re-prezentativna	Ekspozicija potvrđena	Bez događaja u početku	Ishod ocijenjen	Duljina praćenja	Duljina adekvatna
Wu 2008 (96)	Retrospektivna, 1,25/2,5 mg q8w, N=345, KV nije isključen; 12-15 mj; sigurnost; smrt, HTN, MI, CVI, vaskularni događaj	*	*	---	*	*	*
Wong 2008 (95)	Retrospektivna, 1,25 mg prn, N=153, HTN uključena; 6 mj; sigurnost; smrt, HTN, tromboembolijski događaj	*	*	---	*	*	*
Bashshur 2008 (98)	Prospektivna, 1x1,25 mg→prn q4w; N=60, KV isključen; 12 mj; djelotvornost i sigurnost (i sistemska)	*	*	*	---	*	---
Algvere 2008 (97)	Prospektivna, 3x1,25 mg q4-6w→prn; N=36, KV nije spomenut; 6 mj; fokus na djelotvornost	*	*	---	---	*	---
Fong 2008 (103)	Retrospektivna, 3x1,25 mg q4w→prn, N=109, KV nije isključen; 6-12 mj; fokus na djelotvornost, navedena smrt	*	*	---	---	*	---
Costagliola 2009 (100)	Retrospektivna, 1x1,25 mg→q4w prn, N=68, KV isključen; 12 mj; fokus na djelotvornost	*	*	*	---	*	---
Carneiro 2010 (99)	Prospektivna, 1x1,25 mg→prn q4w; N=102, individualno o MI i CVI; 12 mj; djelotvornost/sigurnost (i sistemska)	---	*	*	*	*	---
Mekjavic 2011 (104)	Retrospektivna, 3x1,25 mg q4-6w→prn q4w, N=147, KV nije spomenut; 12 mj; fokus na djelotvornost	*	*	---	---	*	---
Dunavoelgy 2012 (101)	Prospektivna, 1 mg q6w or 2.5 mg q12w; N=160, KV nije isključen; 36 mj; djelotvornost/sigurnost (i sistemska)	---	*	---	*	*	---
El-Mollayess 2013 (102)	Prospektivna, 1x1,25 mg→prn q6w; N=90, KV isključen; 12 mj; djelotvornost/sigurnost (i sistemska)	*	*	*	---	*	*

CVI – moždani udar; HTN – hipertenzija; KV – kardiovaskularno (opterećenje); MI – infarkt miokarda; prn – po potrebi (*pro re nata*), svakih (*quaque*) 4, 6, 8, 12 tjedana (w)

Zvjezdica (*)= u odnosu na specifičnu stavku, studija ima potrebnu kvalitetu; bez zvjezdice (---)= kvaliteta nije adekvatna.

5.1.3. Rizik kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom

5.1.3.1. Randomizirane kontrolirane studije

5.1.3.1.1. IVT bevacizumab naspram liječenja koje se ne temelji na anti-VEGF načelu

U jednom 12-mjesečnom RCT-u (71) IVT bevacizumab (n=65) uspoređen je s fotodinamskom terapijom (n=16) ili placebo injekcijom (n=12). Eksplicitno je navedeno da nije bilo pojava nove hipertenzije, ne-okularnog krvarenja, moždanog udara, intrakranijalnog krvarenja. Naveden je jedan slučaj infarkta miokarda i jedna smrt vaskularnog uzroka (isti bolesnik) uz bevacizumab (spram niti jedan u kontrolnoj skupini). Na temelju postojećih RCT-ova, dakle, nemoguće je procijeniti razlikuje li se kardio-/cerebrovaskularni rizik u bolesnika liječenih IVT bevacizumabom od onoga u bolesnika liječenih ne anti-VEGF terapijom.

5.1.3.1.2. Različiti režimi IVT bevacizumaba – češće u odnosu na rjeđe doziranje

Četiri RCT-a koja su uspoređivala različite režime doziranja (tijekom 12 (75, 79, 93) ili 23 (76) mjeseca) IVT bevacizumaba zapravo su uspoređivala režime karakterizirane različitom učestalošću primjene („češće“ naspram „rjeđih“). Tip eksplicitno navedenih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja i njihove definicije izrazito su se razlikovale po studijama. Stoga je, kako je sažeto u tablici 5., po određenom štetnom događaju nađena samo po jedna studija određenog trajanja i niti u jednoj nije uočena razlika između režima, osim što je u jednoj studiji učestalost „vaskularnih događaja“ bila niža uz češće doziranje (0,6%) u odnosu na rjeđe doziranje (1,8%) (apsolutna razlika rizika -1,2%; p=0,032). Tri studije u trajanju od 12 mjeseci izvijestile su o incidenciji „kardiovaskularnih ili cerebrovaskularnih“ događaja (skupno) – objedinjeni efekt (omjer šansi) nije ukazao na razlike između režima (tablica 5., zadnji red). Valja uočiti da je u svakoj od studija, a i sveukupno, broj ispitanika malen, da su štetni događaji rijetki (u nekim studijama nije zabilježen niti jedan događaj), pa su i sve pojedinačne objedinjene procjene rizika neprecizne i „krhke“ (po jedan događaj više ili manje u nekom od krakova studija bitno bi promijenio procjenu rizika). Stoga je nemoguće pouzdano procijeniti razlikuje li se rizik štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja u bolesnika koji primaju češće injekcije bevacizumaba od onoga u bolesnika u kojih se bevacizumab primjenjuje s duljim vremenskim intervalom između injekcija.

Tablica 5. Meta-analiza RCT-ova koji su usporedili češće i rjeđe doziranje IVT bevacizumaba u bolesnika s AMD prema štetnom kardio-/cerebrovaskularnom događaju. Prikazan je broj studija (k) određenog trajanja, grube incidencije (n/N) i njihova razlika s 95% granicama pouzdanosti (CI).

Ishod	Trajanje	k	Češće	Rjeđe	Razlika (95% CI) ¹ ;	Heterogenost / inkonzistentnost ²
			n/N (%)	n/N (%)	p-vrijednost	
Smrt bilo kojeg uzroka	12 mj (78) 23 mj (80)	1	0/91	0/94	0 (-3,9 do 4,1)	---
Vaskularna smrt	12 mj (75) 23 mj (80)	1	10/165 (6,1)	12/166 (7,2)	-1,2 (-6,9 do 4,5); 0,670	---
Arterijska tromboza	12 mj 23 mj (80)	1	3/127 (2,4)	0/66	2,4 (-3,2 do 6,7); 0,208	---
Popuštanje srca	23 mj (80)	1	1/165 (0,6)	4/166 (2,4)	-1,8 (-5,5 do 1,2); 0,179	---
Vask. događaj ³	23 mj (80)	1	1/165 (0,6)	7/166 (4,2)	-3,6 (-7,9 do -0,4); 0,032	---
KV/CV događaj	12 mj (75, 78, 79)	3	3/268 (1,1)	3/210 (1,4)	0,57 (0,10-3,43); 0,523	p=0,152;τ ² =0,00, I ² 51%

¹ Gdje se radi samo o jednoj studiji, razlika je apsolutna razlika rizika (proporcija) izražena kao razlika postotaka; gdje se radi o više od jedne studija, prikazana je objedinjena razlika kao egzaktni uvjetni (Mantel-Haenszel) omjer šanse (OR, odds ratio)

² Prikazana je p-vrijednost iz Q-testa, iznos varijance razlika (τ^2) i indeks inkonzistentnosti (I²)

³ U ovoj studiji javljena je učestalost „vaskularnih događaja“ prema MedDRA kodiranju - MedDRA – naziv (kodiranje) štetnih događaja prema *Medical Directory of Regulatory Affairs* standardima KV/CV – kardiovaskularni/cerebrovaskularni događaj

5.1.3.1.3. IVT bevacizumab naspram drugih anti-VEGF tretmana

Tablica 6. sažima rezultate sustavnog pregleda i meta-analize RCT-ova koji su usporedili bevacizumab i druge anti-VEGF tretmane. Kako je prikazano, samo je jedna 12-mjesečna studija (71) usporedila bevacizumab (n=65) i **pegaptanib** (n=38): u kraku studije na bevacizumabu jedan je bolesnik doživio infarkt miokarda i umro, pa su *stoga smrt bilo kojeg uzroka, smrt vaskularnog uzroka i infarkt miokarda* zabilježeni u 1/65 i 0/38 bolesnika. Eksplicitno je navedeno da u studiji nije bilo slučajeva *moždanih udara i nove/pogoršane hipertenzije* (tablica 6.). S obzirom na samo jednu studiju, mali broj ispitanika i sporadične događaje, ova studija ne omogućuje valjan zaključak o riziku kardio-/cerebrovaskularnih događaja uz bevacizumab naspram pegaptaniba.

Sve ostale studije odnosile su se na usporedbu bevacizumaba i *ranibizumaba* – 5 studija izvijestilo je o ishodima nakon 12 mjeseci (72, 74, 77, 80, 82), a 2 i nakon 24 mjeseca (73, 81) (tablica 6.). Rezultati prema ishodima su:

Smrt bilo kojeg uzroka (tablica 6.)

12 mjeseci. Na temelju 5 studija (72, 74, 77, 80, 82) (3038 bolesnika), nema razlike između dva tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan – granice pouzdanosti protežu se od 36% manjeg do 90% većeg rizika uz bevacizumab. Interval predikcije ilustrira *rasap stvarnih efekata* od studije do studije naznačujući da s 95% sigurnosti u idućoj studiji treba očekivati efekt u rasponu od oko upola manjeg do 2,67 puta većeg rizika uz bevacizumab. Granice pouzdanosti indeksa inkonzistentnosti (I^2) naznačuju da je varijabilnost stvarnih razlika i do 100% ukupne varijabilnosti.

24 mjeseca. Na temelju 2 studije (73, 81) (1795 bolesnika), nema razlike između dva tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan (granice pouzdanosti od 25% manjeg do 70% većeg rizika uz bevacizumab).

Ukupno, procjene odnosa bevacizumaba i ranibizumaba su neprecizne i varijabilne i ostavljaju visoku razinu nesigurnosti pa stoga ne omogućuju pouzdan zaključak.

Smrt vaskularnog uzroka (tablica 6.)

12 mjeseci. Na temelju 3 studije (72, 73, 80) (2236 bolesnika), nema razlike između dva tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan – granice pouzdanosti protežu se od 54% manjeg do 4,23 puta većeg rizika uz bevacizumab. Interval predikcije naznačuje izrazit rasap stvarnih efekata od studije do studije (od 24 puta manji do 40 puta viši rizik uz bevacizumab). Granice pouzdanosti I^2 naznačuju da je varijabilnost stvarnih razlika i do 95% ukupne varijabilnosti.

24 mjeseca. Na temelju dvije studije (73, 81) (1795 bolesnika), nema razlika između tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan (od 38% manjeg do 2,47 puta većeg rizika uz bevacizumab).

Tablica 6. Sažetak meta-analize RCT-ova koji su usporedili IVT bevacizumab i druge anti-VEGF tretmane u liječenju AMD prema štetnom kardio-/cerebrovaskularnom događaju. Naznačeno je trajanje i broj studija (k), ukupni broj događaja za bevacizumab (BEV) i kontrolni tretman (KON), omjer šanse (OR) s 95% granicama pouzdanosti (CI) i p-vrijednost, te p-vrijednost iz Q-testa heterogenosti, stvarna varijanca između studija (τ^2), indeks inkonzistentnosti (I^2) s 95% CI i interval predikcije (gdje je ≥ 3 studije).

Ishod	Kontrola	Trajanje	k	BEV n/N	KON n/N	OR (95% CI); p ¹	Q-test	τ^2	I^2 (95%CI)	Interval predikcije
Smrt bilo kojeg uzroka	PEG	12 mj	1	1/65	0/38	1,79 (0,07-45,1); 0,723	---	---	---	---
	RAN	12 mj	5	29/1509	27/1536	1,10 (0,64-1,90); 0,723	0,585	0,000	0-100%	0,46-2,67
	RAN	24 mj	2	51/882	47/913	1,13 (0,75-1,70); 0,559	0,848	0,000	0%	---
	PEG	12 mj	1	1/65	0/38	1,79 (0,07-45,1); 0,723	---	---	---	---
Smrt vaskularnog uzroka	RAN	12 mj	3	8/1102	6/1134	1,37 (0,46-4,23); 0,578	0,630	0,000	0-95,5%	0,05-40,4
	RAN	24 mj	2	18/882	15/913	1,24 (0,62-2,47); 0,539	0,844	0,000	0%	---
MI ili angina	PEG	12 mj	1	1/65	0/38	1,79 (0,07-45,1); 0,723	---	---	---	---
	RAN	12 mj	5	10/1502	19/1536	0,55 (0,27-1,15); 0,111	0,329	0,111	13,3% (0-69)	0,11-2,71
	RAN	24 mj	2	14/882	20/913	0,73 (0,37-1,44); 0,358	0,811	0,000	0%	---
Moždani udar	PEG	12 mj	1	0/65	0/38	---	---	---	---	---
	RAN	12 mj	5	7/1502	11/1536	0,65 (0,24-1,70); 0,388	0,522	0,000	0-83%	0,09-5,03
	RAN	24 mj	2	11/882	14/913	0,81 (0,37-1,79); 0,606	0,447	0,000	0%	---
TIA	RAN	12 mj	4	6/1438	4/1373	1,54 (0,42-6,21); 0,521	0,457	0,000	0-96%	0,03-83,7
ATE događaj	RAN	12 mj	2	15/882	19/913	0,57 (0,10-3,32); 0,535	0,104	1,090	62,2%	---
	RAN	24 mj	2	39/882	40/913	1,01 (0,64-1,58); 0,974	0,715	0,000	0%	---
Hipertenzija	PEG	12 mj	1	0/65	0/38	---	---	---	---	---
	RAN	12 mj	2	4/806	0/820	7,51 (1,06-53,4); 0,044	0,994	0,000	0%	---
Popuštanje srca	RAN	12 mj	1	2/296	3/314	0,71 (0,08-4,78); 0,733	---	---	---	---
	RAN	24 mj	1	2/296	7/314	0,30 (0,04-1,35); 0,127	---	---	---	---
VTE događaj	RAN	12 mj	4	10/1348	4/1373	2,05 (0,62-7,81); 0,203	0,170	1,135	40,3% (0-80)	0,04-100
	RAN	24 mj	2	14/882	6/913	2,33 (0,96-5,61); 0,061	0,419	0,000	0%	---

¹ Za jednu studiju OR je Mantel-Haenszel OR; za više studija, OR je Peto OR (incidencija $\leq 1\%$, bez studija bez događaja), egzaktni uvjetni MH OR (ako ima studija bez događaja) ili *random-effects* MH OR (incidencija $> 1\%$ i nema studija bez događaja)

ATE – arterijski tromboembolijski događaj; MI – infarkt miokarda; PEG – pegaptanib; RAN – ranibizumab; TIA – tranzitorna ishemična ataka; VTE – venski tromboembolijski događaj

Ukupno, procjene odnosa bevacizumaba i ranibizumaba su neprecizne i varijabilne i ostavljaju visoku razinu nesigurnosti pa stoga ne omogućuju pouzdan zaključak.

Infarkt miokarda ili angina (tablica 6.)

12 mjeseci. Na temelju 5 studija (72, 74, 77, 80, 82) (3038 bolesnika), nema razlika između dva tretmana. Objedinjeni OR ukazuje na 45% manji rizik uz bevacizumab i u jednoj studiji (80) rizik je bio statistički značajno niži uz bevacizumab: 0/220 vs. 6/221 (OR=0,133 p=0,014). Međutim, objedinjeni OR je neprecizan (od 73% niži do 15% viši rizik uz bevacizumab), a interval predikcije ukazuje na znatan rasap stvarnih efekata – od 10 puta niži do 2,71 puta viši rizik uz bevacizumab. Inkonzistentnost je umjerena.

24 mjeseca. Na temelju 2 studije (73, 81) (1795 bolesnika), nema razlika između tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan (od 63% niži do 44% viši rizik uz bevacizumab).

Ukupno, procjene odnosa bevacizumaba i ranibizumaba upućuju na mogući manji rizik infarkta/angine uz bevacizumab, no neprecizne su i varijabilne i ostavljaju visoku razinu nesigurnosti pa stoga ne omogućuju pouzdan zaključak.

Moždani udar (tablica 6.)

12 mjeseci. Na temelju 5 studija (72, 74, 77, 80, 82) (3038 bolesnika), nema razlika između tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan – granice pouzdanosti protežu se od 76% nižeg do 70% višeg rizika uz bevacizumab, a interval predikcije ukazuje na izrazit rasap efekata (od 10 puta nižeg do 5 puta višeg rizika uz bevacizumab). Granice pouzdanosti I^2 ukazuju da i do 83% ukupne varijabilnosti otpada na stvarnu varijabilnost efekata.

24 mjeseca. Na temelju 2 studije (73, 81) (1795 bolesnika), nema razlika između tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan (od 63% nižeg do 79% višeg rizika uz bevacizumab).

Ukupno, procjene odnosa bevacizumaba i ranibizumaba su neprecizne i varijabilne i ostavljaju visoku razinu nesigurnosti pa stoga ne omogućuju pouzdan zaključak.

Tranzitorna ishemijska ataka (tablica 6.)

12 mjeseci. Na temelju 4 studije (72, 77, 80, 82) (2811 bolesnika), nema razlike između tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan (od 58% nižeg do 6,2 puta višeg rizika uz bevacizumab), interval predikcije naznačuje ekstremni rasap efekata (od 30 puta nižeg do 84 puta višeg rizika uz

bevacizumab), a I^2 naznačuje da i do 96% ukupne varijabilnosti otpada na stvarnu varijabilnost efekata.

Ukupno, procjene odnosa bevacizumaba i ranibizumaba temelje se samo na 12-mjesečnim opažanjima, neprecizne su i varijabilne i ostavljaju visoku razinu nesigurnosti pa stoga ne omogućuju pouzdan zaključak.

Aterotrombotski događaji (tablica 6.)

12 mjeseci. Na temelju dvije studije (1795 bolesnika), nema razlike između tretmana, no objedinjeni OR je neprecizan (od 10 puta nižeg do 3,3 puta višeg rizika uz bevacizumab). U jednoj studiji (72), rizik je praktično identičan za dva tretmana (OR=1,1) a u drugoj (82) je nešto više od 5 puta niži uz bevacizumab (OR=0,17).

24 mjeseca. Iste dvije studije izvijestile su o ovom ishodu i nakon 24 mjeseca – objedinjeni OR ukazuje da nema razlike, no neprecizan je (od 36% niži do 58% viši rizik uz bevacizumab).

Ukupno, procjene odnosa bevacizumaba i ranibizumaba su neprecizne i varijabilne i ostavljaju visoku razinu nesigurnosti pa stoga ne omogućuju pouzdan zaključak.

Hipertenzija (tablica 6.)

12 mjeseci. Na temelju 2 studije (1626 bolesnika), rizik hipertenzije viši je uz bevacizumab – objedinjeni OR ukazuje na 7,5 puta viši rizik, ali je neprecizan (od 6% do 53,4 puta viši rizik). U obje studije (72, 80) rezultat je praktično identičan (OR 7,57 i OR 7,46), međutim sveukupno je u obje studije bilo svega 4 događaja (sva četiri uz bevacizumab vs. 0 uz ranibizumab).

Procjene odnosa bevacizumaba i ranibizumaba su neprecizne i temelje se na malom broju bolesnika i događaja. Stoga ostavljaju visoku razinu nesigurnosti i ne omogućuju pouzdan zaključak.

Popuštanje srca (tablica 6.)

Samo jedna studija (82) izvijestila je o ovom ishodu, i to nakon 12 i 24 mjeseca. Uz svega 5 događaja/610 bolesnika nakon 12 mjeseci i 9 događaja/610 bolesnika nakon 24 mjeseca, obje procjene su neprecizne i ne omogućuju pouzdan zaključak o odnosu bevacizumaba i ranibizumaba.

Venski tromboembolijski događaji (tablica 6.)

12 mjeseci. Na temelju 4 studije (72, 77, 80, 82) (2721 bolesnik), nema razlike između tretmana. Objedinjeni OR ukazuje na oko 2 puta viši rizik uz bevacizumab, ali je neprecizan (od 38% niži do 7,8 puta viši rizik uz bevacizumab), interval predikcije ukazuje na ekstreman rasap efekata (od 25 puta niži do 100 puta viši rizik uz bevacizumab), a granice pouzdanosti I^2 naznačuju da i do 80% ukupne varijabilnosti otpada na stvarnu varijabilnost efekata.

24 mjeseca. Na temelju 2 studije (73, 81) (1795 bolesnika), nema razlike između tretmana. Objedinjeni OR ukazuje na 2,33 puta viši rizik uz bevacizumab ($p=0,061$), i u jednoj od dvije studije (73) on i jest viši (OR=3,04, $p=0,046$), no procjena objedinjenog OR je neprecizna (od 4% niži do 5,6 puta viši rizik uz bevacizumab).

Ukupno, procjene odnosa bevacizumaba i ranibizumaba temelje se na malom broju ispitanika i događaja, neprecizne su i varijabilne i stoga ne omogućuju pouzdan zaključak.

Zaključno – praktično ne postoje RCT-ovi koji bi omogućili procjenu kardio-/cerebrovaskularnog rizika združenog s IVT bevacizumabom u odnosu na ne anti-VEGF tretmane ili u odnosu na pegaptanib. Usporedbe s ranibizumabom temelje se na ukupno malom broju ispitanika i događaja, pa su sve procjene „krhke“ (poneki događaj više ili manje u nekom od krakova studija bitno bi promijenio procjene razlika), neprecizne i varijabilne, te stoga ne omogućuju pouzdane zaključke.

5.1.3.2. Opservacijske studije

U tablici 7. sažeti su rezultati iz opservacijskih studija – dvije populacijske stratificirane kohortne studije i jedne nerandomizirane kontrolirane retrospektivne kliničke studije. Obzirom na način na koji su analizirane te način na koji su definirale „događaje“, rezultati tih studija ne mogu se objediniti, već se moraju promatrati pojedinačno. Prema tipu događaja, rezultati su kako slijedi:

Smrt bilo kojeg uzroka. Bilježena je u jednoj kohortnoj studiji (87), bez naznaka razlike bevacizumaba prema fotodinamskoj terapiji (PDT), pegaptanibu i ranibizumabu (tablica 7.).

Infarkt miokarda. U jednoj kohortnoj studiji (87) nije bilo naznaka razlika bevacizumaba prema ne anti-VEGF i drugim anti-VEGF tretmanima, dok je u drugoj (88) naznačen oko 2,2 puta veći rizik u odnosu na PDT, ali je procjena izrazito neprecizna (od 40% niži do 12,1 puta viši rizik uz

bevacizumab) (tablica 7). Također, naznačeno je da nema razlike prema ranibizumabu, ali je procjena iznimno neprecizna – od 3 puta manji do 2 puta veći rizik uz bevacizumab (tablica 7.).

Moždani udar. U jednoj kohortnoj studiji (87) nije bilo naznaka razlika bevacizumaba prema PDT ili pegaptanibu, ali je naznačen statistički značajno viši rizik (za 23%) u odnosu na ranibizumab, koji, međutim, uz podešenje za socioekonomski status više nije bio značajan (HR=1,15; 0,81-1,64). U drugoj kohortnoj studiji (88), naznačen je oko 3 puta niži rizik uz bevacizumab u odnosu na PDT ali je procjena izrazito neprecizna (od oko 30 puta niži do 2,9 puta viši rizik), te oko 40% niži rizik uz bevacizumab u odnosu na ranibizumab, ali je procjena ponovno izrazito neprecizna (od 25 puta niži do 8,3 puta viši rizik) (tablica 7.).

Smrt ili arterijski tromboembolijski događaj. U nerandomiziranoj retrospektivnoj kliničkoj studiji (90), incidencija ovog kompozitnog ishoda u bolesnika liječenih bevacizumabom bila je 12,4% naspram 3,1% uz ranibizumab te je naznačen 6,1 puta veći rizik uz bevacizumab, no procjena je izrazito neprecizna (od 60% viši do 23,2 puta viši rizik) (tablica 7.).

Ukupno, rezultate opservacijskih studija karakterizira slijedeće: a) usporedbe s PDT su neizravne, budući da u vrijeme kada je započela uporaba bevacizumaba, PDT se praktično više nije rabio; b) usporedbe s pegaptanibom su također uvelike neizravne, jer u vrijeme kada se počeo rabiti bevacizumab, pegaptanibom je liječeno progresivno sve manje bolesnika; c) rezultati studija naznačuju oprečne trendove u odnosu bevacizumab-PDT i bevacizumab-ranibizumab u pogledu infarkta miokarda ili moždanog udara; d) procjene su pretežito vrlo neprecizne.

Imajući na umu inherentno ograničenu pouzdanost opservacijskih studija i svojstva prikazanih rezultata, studije obuhvaćene ovim sustavnim pregledom ostavljaju visoku razinu nesigurnosti i ne omogućuju pouzdan zaključak o riziku kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja združenih s primjenom bevacizumaba u odnosu na druge tretmane u bolesnika s AMD.

Tablica 7. Rizik kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom (BEV) u usporedbi s fotodinamskom terapijom (PDT), pegaptanibom (PEG) ili ranibizumabom (RAN) u opservacijskim studijama – populacijskim stratificiranim kohortnim studijama ili nerandomiziranim kontroliranim kliničkim studijama (zasjenjeno). Efekti su

prikazani kao omjer hazarda (HR) ili omjer šansi (OR) s pripadajućim granicama pouzdanosti (CI). Naznačeni su efekti (otisnuti podebljano) koji su dostigli statističku značajnost.

Autor, godina, (ref), praćenje	Kohorte	Zabilježene stope događaja ¹ (%)				Usporedbe prema ishodima
		Smrt	MI	CVI	Smrt/ATE ²	
Curtis 2010 (87) 1 godina	BEV n=38718	4,4	1,2	2,1	---	<i>Smrt bilo kojeg uzroka (HR, 99% CI)³</i>
	RAN n=19926	4,1	1,1	1,5		PDT 0,94 (0,86-1,04)
	PEG n=36942	4,8	1,3	2,0		PEG 0,93 (0,84-1,04)
	PDT n=52256	4,1	1,3	2,0		RAN 1,11 (0,98-1,26) /0,91 (0,71-1,18)
						<i>MI (HR, 99% CI)³</i>
						PDT 0,88 (0,74-1,04)
						PEG 0,95 (0,78-1,16)
						RAN 1,19 (0,94-1,52) /1,15 (0,71-1,89)
						<i>CVI (HR, 99% CI)³</i>
						PDT 1,02 (0,89-1,17)
						PEG 1,07 (0,91-1,25)
						RAN 1,23 (1,02-1,47) /1,15 (0,81-1,64)
Kemp 2013 (88) 1 godina	BEV n=792	---	1,6	0,4	---	<i>MI (OR, 95% CI)⁴</i>
	RAN n=475	---	2,1	0,4		PDT 2,20 (0,60-12,1)
	PDT n=399	---	2,1	0,8		RAN 0,77 (0,31-1,99)
						<i>CVI (OR, 95% CI)⁴</i>
						PDT 0,33 (0,03-2,93)
						RAN 0,60 (0,04-8,29)
Carneiro 2011 (90) 3 godine	BEV n=97	---	---	---	12,4	<i>ATE (OR, 95% CI)⁵</i>
	RAN n=219	---	---	---	1,4	RAN 6,1 (1,6-23,2)

¹ Za Curtis 2010 (87), radi se o kumulativnoj incidenciji procijenjenoj metodom „kompetitivnog rizika“ (u regresiji proporcionalnog hazarda), za ostale radi se o jednostavnim postotcima

² Kao arterijski tromboembolijski događaji (ATE) brojani su: moždani udar/transizorna ishemijska ataka, infarkt miokarda/angina, nagla smrt i periferni aterotrombotski događaj.

³ U studiji su za usporedbu bevacizumaba s fotodinamskom terapijom ili pegaptanibom prikazani efekti podešeni za kalendarsku godinu, dob, spol, rasu, 12 komorbidnih stanja i broj usporedbi, a za usporedbu s ranibizumabom i efekt dodatno podešen za socioekonomski status

⁴ Nepodešeni efekti

⁵ Efekt podešeni za dijabetes, hipertenziju, postojeću kardiovaskularnu bolest, plućnu bolest i anamnezu arterijskih tromboembolijskih događaja

CVI – moždani udar (cerebrovaskularni inzult); MI – infarkt miokarda

5.1.4. Mortalitet i incidencija kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom u kliničkim studijama

Tablica 8. sažima rezultate meta-analize mortaliteta/incidencije događaja zabilježenih u kliničkim studijama – prema tipu događaja, tipu studije, trajanju studije i uključivanju ili neuključivanju bolesnika s kardiovaskularnim „opterećenjem“.

Tablica 8. Sažetak meta-analize smrtnosti i incidencije štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom iz kliničkih studija. Rezultati su prikazani kao stopa incidencije (IR) s intervalom pouzdanosti (CI) i indeksom inkonzistentnosti (I^2).

Ishod	Tip studije	Trajanje (mj)	KV isključen	Broj studija	Broj krakova	Ukupno n/N	IR (%) (95% CI)	I^2 (%)
Smrt bilo kojega uzroka	RCT	12	DA	4	4	21/1051	2,1 (1,3–3,1)	0,0
	RCT	12	NE	3	4	9/701	1,2 (0,4–2,4)	28,6
	RCT	24	DA	2	3	58/917	6,5 (5,0–8,1)	0,0
	RCT	24	NE	1	1	15/296	5,1 (2,9–8,2)	---
	Serija	6	NE	1	1	0/158	0,0 (0,0–2,3)	---
	Serija	13,2	NE	1	1	2/345	0,6 (0,0–2,1)	---
	Nerandom.	30	Nejasno	1	1	3/97	3,1 (0,6–8,8)	---
Smrt vaskularnog uzroka	RCT	12	DA	3	5	11/844	1,5 (0,8–2,4)	0,0
	RCT	12	NE	2	2	1/516	0,3 (0,0–1,1)	27,6
	RCT	24	DA	2	3	19/917	2,1 (1,2–3,3)	14,9
	RCT	24	NE	1	1	4/296	1,4 (0,4–3,4)	---
Infarkt miokarda	RCT	12	DA	4	4	8/1051	0,9 (0,4–1,7)	19,2
	RCT	12	NE	3	4	2/616	0,4 (0,9–1,1)	4,0
	RCT	24	DA	2	3	8/917	0,8 (0,2–1,8)	30,6
	RCT	24	NE	1	1	4/296	1,4 (0,4–3,4)	---
	Serija	13,2	NE	1	1	1/345	0,3 (0,0–1,6)	---
	Nerandom.	30	Nejasno	1	1	2/97	2,1 (0,3–7,3)	---
Moždani udar	RCT	12	DA	5	7	8/1244	0,7 (0,3–1,3)	4,9
	RCT	12	NE	2	2	2/516	0,4 (0,0–2,0)	66,7
	RCT	24	DA	2	3	9/917	0,9 (0,2–1,9)	42,7
	RCT	24	NE	1	1	3/296	1,0 (0,2–3,9)	---
	Serija	13,2	NE	1	1	1/345	0,3 (0,0–1,6)	---
	Nerandom.	30	Nejasno	1	1	6/97	6,2 (2,3–13,0)	---
Arterijski tromboembolijski događaj	RCT	12	DA	2	4	18/779	2,5 (1,5–3,7)	0,0
	RCT	12	NE	1	1	1/296	0,3 (0,0–1,5)	---
	RCT	24	DA	2	3	36/917	3,3 (1,5–5,9)	65,5
	RCT	24	NE	1	1	10/296	3,4 (1,6–6,1)	---
	Nerandom.	30	Nejasno	1	1	12/97	12,4 (6,6–20,6)	---
Venski tromboembolijski događaj	RCT	12	DA	2	2	6/832	0,8 (0,3–1,6)	0,0
	RCT	12	NE	2	2	2/516	0,4 (0,0–1,5)	40,7
	RCT	24	DA	2	3	12/917	1,4 (0,8–2,3)	0,0
	RCT	24	NE	1	1	4/296	1,4 (0,4–3,4)	---
	Serija	6	NE	1	1	0/158	0,0 (0,0–2,3)	---
Hipertenzija	RCT	12	DA	1	1	2/586	0,3 (0,0–1,2)	---
	RCT	12	NE	1	1	2/220	0,9 (0,1–3,2)	---
	RCT	24	DA	1	1	4/586	0,7 (0,2–1,7)	---
	Serija	6	NE	1	1	2/158	1,3 (0,2–4,5)	---
	Serija	13,2	NE	1	1	5/345	1,4 (0,5–3,3)	---
Popuštanje srca	RCT	12	NE	1	1	2/296	0,7 (0,0–2,4)	---
	RCT	24	DA	1	2	5/331	1,7 (0,4–3,9)	39,9
	RCT	24	NE	1	1	2/296	0,7 (0,0–2,4)	---

Smrt bilo kojeg uzroka. Incidencija je bila u rasponu od 0% u jednoj 6-mjesečnoj seriji bolesnika (105), do 6,5% objedinjeno za 3 kraka iz 24-mjesečnih RCT-ova (73, 76, 81) (tablica 8.). U meta-regresiji (12 krakova), dulje trajanje studije ($p=0,003$) i veći broj isporučenih doza ($p=0,071$) bili su nezavisno združeni s višom smrtnošću (obje nezavisne varijable u modelu).

Smrt vaskularnog uzroka. Incidencija je bila u rasponu od 0,3% (objedinjeno za 2 kraka 12-mjesečnih RCT-ova) (80, 82) do 2,1% (objedinjeno za 3 kraka iz 24-mjesečnih RCT-ova) (73, 76, 81) (tablica 8). Meta-regresija (8 krakova) nije ukazala na združenost duljine studije ili broja isporučenih doza i ovog ishoda.

Infarkt miokarda. Incidencija je bila u rasponu od 0,3% (jedna 13-mjesečna serija) (96) do 2,1% (jedan 30-mjesečni krak nerandomizirane studije) (90) (tablica 8). Meta-regresija (9 krakova) nije našla združenost dulje studije ili broja doza i ovog ishoda.

Kada su identificirana ≥ 2 kraka iz studija istog tipa, trajanja i isključivanja bolesnika s kardiovaskularnim (KV) opterećenjem – prikazane su objedinjene procjene IR; za pojedinačne krakove, procjena je proporcija s egzaktnim Clopper-Pearson intervalom pouzdanosti.

Moždani udar. Incidencija je bila u rasponu od 0,3% (jedna 13-mjesečna serija) (96) do 6,2% (jedan 30-mjesečni krak nerandomizirane studije) (90) (tablica 8). Meta-regresija (13 krakova) nije našla združenost dulje studije ili broja doza i ovog ishoda.

Arterijski tromboembolijski događaji. Incidencija je bila u rasponu od 0,3% u jednom kraku 12-mjesečnog RCT-a (82) do 12,4% u jednom kraku 30-mjesečne nerandomizirane studije (90) (tablica 8.). U meta-regresiji (8 krakova), dulje trajanje studije ($p=0,072$) ali ne i broj isporučenih doza ($p=0,851$) združeno je s višom incidencijom.

Venski tromboembolijski događaji. Incidencija je bila u rasponu od 0% u jednoj 6-mjesečnoj seriji (105) do 1,4% objedinjeno za 3 kraka 24-mjesečnih RCT-ova s isključivanjem bolesnika opterećenih kardiovaskularnom anamnezom (73, 76, 81) (tablica 8.). U meta-regresiji (7 krakova), dulje trajanje studije ($p=0,054$) i veći broj isporučenih doza ($p=0,034$) bili su združeni s višom incidencijom, ali ne kada su obje varijable bile u modelu.

Hipertenzija. Incidencija je bila u rasponu od 0,3% u jednom kraku 12-mjesečnog RCT-a (72) do 1,4% u jednoj 13-mjesečnoj seriji (96) (tablica 8.).

Popuštanje srca. Incidencija je bila u rasponu od 0,7% u jednom kraku 12-mjesečnog RCT-a (82) do 1,7% objedinjeno za dva kraka 24-mjesečnih RCT-ova (76, 81) (tablica 8.).

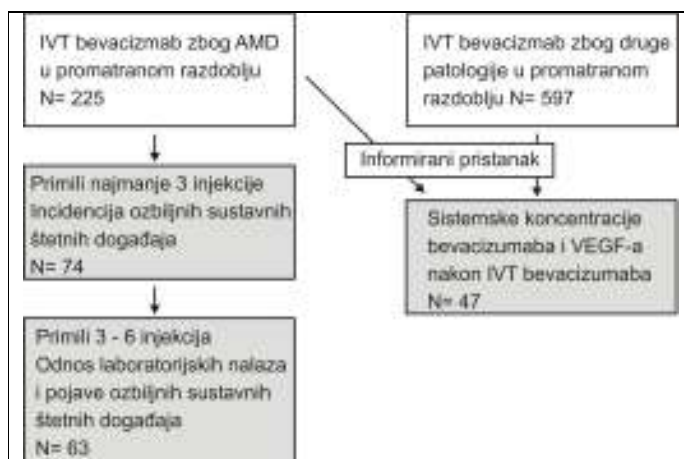
Ukupno, u objavljenim kliničkim studijama, a koje su primjenom odgovarajućih instrumenata ocijenjene visokokvalitetnima (sukladno dizajnu) specifično u odnosu na praćenje i izvještavanje o štetnim kardio-/cerebrovaskularnim događajima, učestalost tih događaja bila je izrazito varijabilna i ne omogućuje jedinstvenu procjenu. Činjenica da je meta-regresija *smrti bilo kojeg uzroka* ukazala na nezavisnu (istodobnu) združenost veće stope događaja s duljim trajanjem liječenja i većim brojem isporučenih doza ukazuje na moguću povezanost smrtnosti i primjene IVT bevacizumaba.

5.1.5. Zaključak o rezultatima sustavnog pregleda literature i meta-analize

Na temelju objavljenih visokokvalitetnih RCT-ova i opservacijskih studija nije moguće jednoznačno zaključiti da li liječenje AMD IVT bevacizumabom utječe na rizik štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja i u kojem „smjeru“. Razlog su tome nekonzistentnost i nepreciznost procjena uslijed, primarno, razmjerno malog broja ispitanika u primarnim studijama i malog broja događaja, što procjene čini i „krhkima“ (poneki događaj više ili manje u pojedinom kraku neke studije bitno bi promijenio procjenu rizika).

5.2. Prospektivno kohortno istraživanje u KB „Sveti Duh“

Istraživanje je provedeno uz dozvolu Etičkog povjerenstva KB „Sveti Duh“ i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U razdoblju od rujna 2012.g. do kolovoza 2015.g., ukupno je IVT bevacizumabom liječeno 225 bolesnika s potvrđenom dijagnozom senilne makularne degeneracije (AMD), te 597 bolesnika s drugim oftalmološkim bolestima u kojima se IVT bevacizumab rabi *off-label* (najčešće dijabetička retinopatija i okluzija *v. centralis retinae*) (slika 3.).



Slika 3. Opća shema provedenog prospektivnog kohortnog istraživanja.

Svi su u liječenje uključeni po kriterijima probira na temelju opisanog postupnika (vidi: Ispitanici i metode): u liječenje *nisu* uključeni bolesnici s teškom nereguliranom hipertenzijom, značajnom proteinurijom, bolesnici koji su podvrgnuti operativnim zahvatima unutar mjesec dana prije početka liječenja ili je operativni zahvat planiran u razdoblju u kojem se provodi liječenje, bolesnici s aktivnim krvarenjem, akutnom bolešću, ili oni koji se liječe sustavnom primjenom bevacizumaba; svi su bolesnici kontinuirano praćeni u smislu kliničke i laboratorijske evaluacije koja je uključila određivanje broja leukocita i trombocita, koncentracije hemoglobina, D-dimera, troponina, ureje, kreatinina, C-reaktivnog proteina, te proteine u urinu test trakom, 24 sata prije i 24 sata nakon svake injekcije.

Kako bi podaci iz ovog istraživanja koji se odnose na pojavu ozbiljnih sistemskih štetnih događaja bili usporedivi podacima iz literature (5.1. Sustavni pregled literature i meta-analiza), u analizu pojavnosti štetnih događaja uključeni samo bolesnici s AMD koji su primili najmanje 3 doze IVT bevacizumaba (slika 3). Kako je onih koji su primili više od 6 injekcija bilo malo (n=11), u analizu odnosa laboratorijskih pokazatelja koji su sustavno praćeni sukladno postupniku i pojave neželjenih događaja uključeni su samo oni koji su primili 3-6 injekcija (slika 3). U procjenu koncentracija bevacizumaba i VEGF-a u sistemske cirkulaciji nakon IVT primjene bevacizumaba, uključeni su bolesnici s AMD ili s drugom patologijom koji su dali informirani pristanak za uzimanje dodatnih uzoraka krvi 24 sata prije, 24 sata nakon i 7 dana nakon injekcije IVT bevacizumaba (slika 3.).

5.2.1. Učestalost sistemskih ozbiljnih štetnih događaja

Svojstva ispitanika i vrijeme praćenja

U analizu je uključeno 74 bolesnika s najmanje 3 primljene injekcije. Neki su bolesnici injekcije primili i prije uključanja u liječenje u KB Sveti Duh. Stoga je medijan primljenih injekcija iznosio 6 (raspon 3-23), a medijan broja injekcija primljenih u KB Sveti Duh iznosio je 3 (raspon 1-14) (tablica 9). Ispitanici su bili u dobi od 45-89 godina s nešto većom zastupljenošću žena i praktično svi su imali i neki komorbiditet, najčešće hipertenziju, a većina istodobno i više bolesti – svojstva ispitanika sažeta su u tablici 9.

Tablica 9. Svojstva bolesnika uključenih u analizu učestalosti ozbiljnih sistemskih štetnih događaja u kohorti bolesnika liječenih IVT bevacizumabom u KB Sveti Duh. Brojevi su apsolutni brojevi (postotci, %) i medijani (raspon).

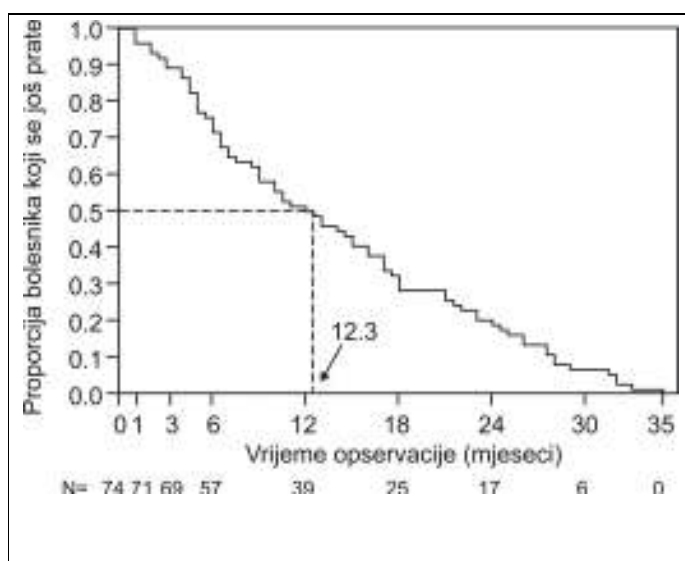
N	74
Dob (godine)	77 (45-89)
Spol, muški/žene	32 (43,2) / 42 (56,8)
Ukupan broj primljenih injekcija	6 (3-23)
Broj injekcija primljenih u KB Sveti Duh	3 (1-14)
Komorbiditet ukupno*	69 (93,2)
Hipertenzija	49 (66,2)
Kardiovaskularna bolest**	22 (29,3)
Maligna bolest	14 (18,7)
Kronično zatajenje bubrega	2 (2,7)
Broj leukocita (x 10 ⁹ /L)	6,74 (4,33-13,29)
Hemoglobin (g/L)	139 (93-175)
Broj trombocita (x 10 ⁹ /L)	237 (127-377)
D-dimer (μg/L)	553 (185-5916)
Kreatinin ((μmol/L)	93,5 (58-416)
Troponin ((μg/L)	0,01 (0-0,27)
C-reaktivni protein (mg/L)	1,9 (0,3-57,5)

*Većina bolesnika istodobno je patila od više bolesti

**Popuštanje srca, preboljeli infarkt miokarda, moždani udar, tranzitorna ishemična ataka, stabilna koronarna bolest

Razdoblje praćenja u sustavu liječenja u KB Sveti Duh bilo je u rasponu od 1 do 35 mjeseci, a medijan je iznosio 12,3 mjeseca (slika 4). „Središnjih“ 50% ispitanika (donja – gornja kvartila)

praćeno je između 6 i 21.5 mjeseci. Ukupno, radi se o 1033 mjeseca opservacije tijekom liječenja IVT bevacizumabom. Tijekom tog razdoblja, u 6 je bolesnika (10,5%) primjena terapije odgođena zbog ocjene da postoji povišen rizik kardio-/cerebrovaskularnih događaja obzirom na kliničku sliku i laboratorijske nalaze. Razlozi su bili: visoki CRP i upalno zbivanje (3 bolesnika), pojava makrohaturije i pad hemoglobina (1 bolesnik), porast kreatinina (1 bolesnik) i pojava proteinurije (1 bolesnik).



Slika 4. Kaplan-Meier krivulja vremena praćenja bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom u kohorti u KB Sveti Duh. Strelicom je naznačen medijan vremena praćenja (12,3 mjeseca). Najkraće vrijeme praćenja iznosilo je 1 mjesec (tri bolesnika), a najdulje 35 mjeseci (jedan bolesnik). Barem 3 mjeseca praćeno je 69 bolesnika, a 57 ih je praćeno barem 6 mjeseci.

Sistemska neželjeni (štetni) događaji

Tijekom promatranog razdoblja, ukupno je 12/74 (16,2%) bolesnika doživjelo neki sistemski neželjeni događaj (0,139 događaja/12 bolesničkih mjeseci). Ti događaji i svojstva bolesnika sažeti su u tablici i. Ukupno 6/74 (8,1%) bolesnika doživjelo je *srčane poremećaje* (4/74; 5,4%) ili *krvožilne poremećaje* (2/74; 2,7%), a 6/74 (8,1%) bolesnika doživjelo je poremećaje *krvi i limfe* (tablica 10). Budući da se radi o opservacijskom istraživanju (bez kontrolne skupine), nemoguće je pojavu opisanih štetnih događaja pripisati liječenju IVT bevacizumabom.

U postupku evaluacije praktične relevantnosti postupnika primijenjenog u probiru i praćenju bolesnika liječenih IVT bevacizumabom stoga smo se ograničili na: a) štetne događaje koji su zahtijevali hospitalizaciju (takvi štetni događaji smatraju se **ozbiljnim štetnim događajima**); b) štetne događaje koji nisu pogoršanje postojećeg stanja; isključili smo štetne događaje za koje je nemoguće procijeniti u kojoj mjeri odražavaju „prirodan tijek“ bolesti, a u kojoj bi mjeri mogli

biti pripisivi IVT bevacizumabu; c) štetne događaje za koje postoji racionalna patofiziološka povezanost s bevacizumabom/VEGF-om.

Tablica 10. Ozbiljni štetni događaji, svojstva bolesnika i ishod u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom u kohorti u KB Sveti Duh.

Dob (g) spol	Događaj	Komorbiditet	Redni broj injekcije i vrijeme proteklo od prve	Ishod
Srčani poremećaji				
81, Ž	Akutno srčano popuštanje	Hipertenzija, dijabetes	Između 5. i 6. injekcije 26 mjeseci	Hospitalizacija
80, Ž	Akutno srčano popuštanje	Hipertenzija, aritmija, hiperlipidemija, i srčano popuštanje	Između 2. i 3. injekcije 11 mjeseci	Hospitalizacija
82, M	Recidivne sinkope	Hipertenzija, neoplazma pluća	Između 7. i 8. injekcije 21 mjesec	Hospitalizacija
73, M	Akutni koronarni sindrom	Hipertenzija, AP, RA, kronično zatajenje bubrega (dijaliza)	Između 1. i 2. injekcije 4 mjeseca	Hospitalizacija
Krvožilni poremećaji				
83, Ž	Pogoršanje hipertenzije	Hipertenzija, hiperlipidemija	Između 5. i 6. injekcije 25 mjeseci	Pregled u hitnoj službi
76, M	Tromboza jugularne vene	Hipertenzija, stanje nakon TIA, hiperlipidemija, aneurizma abd. aorte	Između 4. i 5. injekcije 40 mjeseci	Hospitalizacija
Poremećaji krvi i limfe				
88, Ž	Krvarenje nakon implantacije elektrostimulatora	Hipertenzija, AP, stanje nakon totalne tireoidektomije	Između 2. i 3. injekcije 6 mjeseci	Hospitalizacija
73, M	Hemoptiza	Hipertenzija, AP, RA, kronično zatajenje bubrega (dijaliza)	Između 3. i 4. injekcije 12 mjeseci	Hospitalizacija
82, M	Krvarenje iz hemeroida	Hipertenzija, neoplazma pluća	Između 7. i 8. injekcije 68 mjeseci	Hospitalizacija
80, Ž	Hematom	Hipertenzija, aritmija, srčano popuštanje, hiperlipidemija	Između 3. i 4. injekcije 15 mjeseci	Pregled u hitnoj službi
74, M	Makrohematurija	Hipertenzija, stanje nakon infarkta miokarda, hiperlipidemija	Nakon 12. injekcije 46 mjeseci	Hospitalizacija
86, M	Krvarenje iz ulkusa	Hipertenzija, GERB	Nakon 2. injekcije 2 mjeseca	Hospitalizacija

AP – *angina pectoris*; GERB – gastroezofagealna refluksna bolest; RA – reumatoidni artritis; TIA – tranzitorna ishemična ataka

Štetni događaji koji su rezultirali hospitalizacijom zabilježeni su ukupno u 10/74 (13,5%) bolesnika (0,116 događaja/12 bolesničkih mjeseci). Od toga, u 5 bolesnika radilo se o srčanim ili krvožilnim događajima a u 5 o krvarenjima (tablica 10.).

Srčani i krvožilni poremećaji

Inherentno mehanizmu djelovanja, sistemska primjena bevacizumaba (liječenje tumora) združena je s povećanim rizikom hipertenzije što se, međutim, ne smatra posebnim problemom jer se može kontrolirati (39). No, sistemska primjena bevacizumaba združena je i s povišenim rizikom arterijskih i venskih tromboembolijskih događaja (39). Nije sasvim jasno da li IVT primjena bevacizumaba ili IVT primjena bilo kojeg drugog anti-VEGF tretmana utječe na kardio-/cerebrovaskularni rizik. Jedna mrežna meta-analiza (Uvod, tablica 1.) obuhvatila je 11 RCT-a anti-VEGF tretmana u liječenju AMD (ukupno 8341 bolesnik): 2 studije ranibizumaba vs. placebo (ukupno 294 bolesnika na placebo); 2 studije ranibizumaba vs. bevacizumab; 2 studije ranibizumaba vs. aflibercept; 2 studije ranibizumaba vs. ranibizumab+fotodinamska terapija; i 3 studije koje su usporedile različite doze ranibizumaba. Zaključeno je da je incidencija **sistemskih trombotskih događaja** nekoliko postotaka (od 4% do 6%) i statistički značajno **viša** za sve anti-VEGF tretmane u odnosu na placebo (51). Pri tome valja uzeti u obzir da, osim ranibizumaba, niti jedan anti-VEGF tretman nije izravno uspoređen s placebom ili nekim ne-anti-VEGF tretmanom, te su za njih usporedbe isključivo neizravne.

Još dva objavljena sustavna pregleda literature/meta-analize (Uvod, tablica 1.) fokusirali su se upravo na kardio-/cerebrovaskularne događaje u bolesnika liječenih IVT ranibizumabom i bevacizumabom (43, 48). Podaci za ranibizumab su važni jer su praktično svi RCT-ovi bevacizumaba zapravo usporedbe s ranibizumabom. Glavna svojstva i rezultati ove dvije meta-analize sažeti su u tablici 11. i ukazuju da ranibizumab u odnosu na ne anti-VEGF tretmane ne povećava rizik bilo kojeg kardio-/cerebrovaskularnog događaja, a zatim da se IVT bevacizumab ne razlikuje od ranibizumaba. Samo jedna mala kontrolirana studija bez ijednog događaja usporedila je IVT bevacizumab s ne anti-VEGF tretmanom (spomenuta i u 5.1.).

Tablica 11. Glavna svojstva i rezultati dva objavljenja sustavna pregleda i meta-analize kardio-/cerebrovaskularne sigurnosti IVT bevacizumaba i ranibizumaba.

	Thuillez i sur. 2014 (43)	Moja i sur. 2014 (48)
Tip uključenih studija	RCT (6-24 mjeseca trajanje)	RCT (6-24 mjeseca trajanje)
Indikacija za IVT liječenje	AMD, dijab. retinopatija, okluzija ACR	AMD
Usporedbe	RAN ili BEV vs. ne anti-VEGF kontrola	BEV vs. RAN
Studije izabrane po kvaliteti?	NE, uključene sve	NE, uključene sve (9 RCT, N=3665)
Glavni ishod	Kompozit: infarkt, moždani udar, vaskularna smrt ili smrt bilo kojeg uzroka	Kompozit: arterijska tromboembolija (infarkt, moždani udar, periferni događaji)
Usporedbe za glavni ishod	<u>RAN vs. KONT (11 RCT, N=4069)</u> RAN 3,3% / KONT 2,9% OR= 1,16 (0,80-1,68) <u>BEV vs. KONT (1 RCT, N=93)</u> BEV 0/65 vs. KONT 0/28	BEV 3,0% / RAN 3,5% RR=0,92 (0,62-1,37)
Infarkt miokarda	<u>RAN vs. KONT</u> : OR=0,92 (0,54-1,59)	RR=0,84 (0,42-1,66)
Moždani udar (bilo koji)	<u>RAN vs. KONT</u> : OR=1,61 (0,85-3,05)	RR=0,83 (0,42-1,66)
Smrt bilo kojeg uzroka	<u>RAN vs. KONT</u> : OR=1,53 (0,92-2,56)	RR=1,10 (0,78-1,57)
Smrt vaskularnog uzroka	<u>RAN vs. KONT</u> : OR=0,97 (0,71-1,32)	---
Venski tromboembolizam	<u>RAN vs. KONT</u> : OR=1,39 (0,17-11,4)	---
Vaskularni događaji združeni s primjenom anti-VEGF lijekova	---	RR=1,03 (0,52-2,05)
Srčani poremećaji (MedDRA)	---	RR=1,20 (0,89-1,61)

ACR – *a. centralis retinae*; AMD – senilna makularna degeneracija (*age-related macular degeneration*); BEV – bevacizumab; MedDRA – naziv (kodiranje) štetnih događaja prema **Medical Directory of Regulatory Affairs** standardima; OR – omjer šanse; RAN – ranibizumab; RCT – randomizirani kontrolirani klinički pokus (*randomized controlled trial*); RR – relativni rizik; VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (*vascular endothelial growth factor*)

Sustavni pregled i meta-analiza provedeni kao dio ove dizertacije (vidi 5.1.) razlikuju se od sustavnih pregleda i meta-analiza prikazanih u tablici j (a i ostalih sažetih u tablici 1. u Uvodu) po tome što su uključile i RCT i opservacijske studije i po tome što su uključile samo visokokvalitetne studije (specifično u odnosu na systemske štetne događaje). Kao i sustavni pregledi i meta-analize u tablici j, prikazana analiza (vidi 5.1.) ne ukazuje na neki jasan signal da bevacizumab (kroz usporedbu s ranibizumabom ili stanja bez tretmana u opservacijskim studijama) povećava kardio-/cerebrovaskularni rizik. Međutim, glavni nalaz jest činjenica da su sve procjene izrazito neprecizne (široki intervali pouzdanosti, baš kao i u tablici 11), i. utemeljene

na malom broju događaja, s puno studija bez događaja, te bi svega nekoliko događaja više ili manje moglo znatno promijeniti zaključke. Osim toga, heterogenost rezultata od studije do studije („slučajna“ i stvarna, tj. inkonzistentnost) znatne su za sve ishode i ostavljaju visoku razinu nesigurnosti oko toga da li IVT bevacizumab (primarno u odnosu na druge tretmane za AMD) povećava kardio-/cerebrovaskularni rizik, te treba li na taj rizik obratiti pozornost u liječenju AMD IVT bevacizumabom.

Od 5 ozbiljnih štetnih *srčanih ili krvožilnih događaja* prikazanih u tablici 10., u jednom slučaju radilo se o pogoršanju postojećeg popuštanja srca te smo smatrali da taj događaj ne treba uključiti u proces evaluacije postupnika. Također, u jednog bolesnika radilo se o recidivnim sinkopama i zaključeno je da se ta pojava u bolesnika bez incidentne srčane ishemije/popuštanja u patofiziološkom smislu „ne uklapa“ u mehanizam djelovanja bevacizumaba. Preostala 3 ozbiljna štetna događaja udovoljavaju kriterijima da su novonastala, te da su sukladna patofiziološkim mehanizmima povezanim s bevacizumabom/VEGF-om (tablica 10.): jedan slučaj *de novo* akutnog popuštanja srca, jedna tromboza jugularne vene i jedan slučaj akutnog koronarnog sindroma.

Od svih studija identificiranih u sustavnom pregledu literature (vidi 5.1.) prikazanoj kohorti – po tipu registriranih štetnih događaja, svojstvima i broju bolesnika, te duljini opservacije – najsličniji je izvještaj o opservacijskoj studiji u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom u Portugalu (90). Tablica 12. usporedno sažima svojstva literaturne kohorte i prikazane kohorte liječene u KB Sveti Duh: u literaturnoj kohorti bez strukturiranog probira i praćenja u svrhu procjene rizika, incidencija srčanih/krvožilnih događaja bila je 12,4% a u kohorti Sveti Duh 4,1%. Razlika te dvije proporcije iznosi -8,3% (95% CI -17,0 do 0,00; $p=0,057$) i podupire hipotezu da se primjenom probira i kontinuirane procjene rizika u bolesnika s AMD koji se liječe IVT bevacizumabom može smanjiti rizik ozbiljnih štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja.

Tablica 12. Usporedba literaturne kohorte bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom i kohorte liječene u KB Sveti Duh prema temeljnim svojstvima ispitanika i incidenciji ozbiljnih srčanih/krvožilnih štetnih događaja.

Svojstvo	Literatura (Carneiro et al.(90))	Kohorta Sveti Duh
N	97	74
Duljina praćenja	Do 3 godine	Do 3 godine
Dob (godine)	77,8 (aritmetička sredina)	77 (medijan)
Broj isporučenih injekcija	7,8 (aritmetička sredina)	6 (medijan)
Kardiovaskularni komorbiditet	Hipertenzija (56%), povijest kardiovaskularnih bolesti (12,4%)	Hipertenzija (66,2%), povijest kardiovaskularnih bolesti (29,3%)
Probir pri uključivanju u liječenje	Isključeni oni s infarktom miokarda ili moždanim udarom unazad 6 mjeseci	Kako je opisano u postupniku
Praćenje rizika tijekom liječenja	Ne sustavno – odluka o primjeni redovite injekcije „...individualna odluka nadležnog liječnika“. Moguće odgode/prekid liječenja nisu navedene.	Sustavno, prema postupniku. U 6/74 bolesnika zakazana injekcija je barem jednom odgođena zbog nepovoljne procjene rizika.
Kardiovaskularni događaj	12 (12,4%)	3 (4,1%)
Smrt	3 (3,1%)	0
Moždani udar/TIA	5 (5,2%)	0
Akutni koronarni sindrom	3 (3,1%)	1 (1,4%)
Periferni ATE/VTE	1 (1,0%)	1 (1,4%)
Akutno popuštanje srca	nepoznato	1 (1,4%)

ATE – arterijski tromboembolizam, TIA – tranzitorna ishemična ataka; VTE – venski tromboembolizam

Poremećaji krvi i limfe – ne-okularna krvarenja

Sustavno liječenje bevacizumabom (tumori) povezano je s povećanim rizikom krvarenja u odnosu na neke druge tretmane, no radi se prvenstveno o krvarenjima vezanim za tumore. Površinska krvarenja, poput epistakse, hematoma mekih tkiva, krvarenja iz probavnog trakta i slično, rijetka su (39). Već spomenuta meta-analiza anti-VEGF tretmana spram ne anti-VEGF tretmana [Thuilliez i sur. (43)] identificirala je ukupno 10 RCT-a (trajanje 6 mjeseci do 2 godine) IVT ranibizumaba vs. ne anti-VEGF tretman u AMD, dijabetičkoj retinopatiji i okluziji retinalne vene. Gruba stopa ne-okularnih krvarenja uz ranibizumab iznosila je 90/2716 (3,5%) nasuprot

29/1167 (2,9%) u kontrola (Peto OR=1,42; 0,95-2,13; p=0,09). Identificirana su također dva RCT-a bevacizumaba (razne indikacije) vs. ne-anti-VEGF tretmani a gruba ukupna stopa događaja iznosila je 0/107 za bevacizumab i 0/66 za ne-anti-VEGF tretmane. Cochrane sustavni pregled RCT-a koji su uspoređivali bevacizumab i ranibizumab u bolesnika s AMD Moje i sur. (48) identificirao je 3 studije (trajanje 1 do 2 godine) koje su izvjestile o ne-okularnim krvarenjima – gruba stopa za bevacizumab iznosila je 2/649 (0,31%) nasuprot 6/607 (0,99%) uz ranibizumab (RR=0,34; 95% CI 0,08-1,37, P=0,129). Problem procjene rizika ne-okularnih krvarenja pri primjeni anti-VEGF tretmana (uključujući i bevacizumab) još je izraženiji nego u slučaju kardio-/cerebrovaskularnih događaja – ovi su događaji rjeđi i izrijeckom se u izvještajima studija tek sporadično spominju. Obje procjene iz spomenutih meta-analiza su neprecizne i temeljene na sveukupno malom broju događaja što ostavlja znatnu nesigurnost oko toga povećava li anti-VEGF IVT liječenje rizik krvarenja i treba li na njega obratiti pozornost. U kohorti bolesnika praćenih u KB Sveti Duh zabilježeno je 5 takvih događaja što je bilo neočekivano – i postupnik probira i praćenja kao i provedeni sustavni pregled literature bili su usmjereni prvenstveno na praćenje/kontrolu kardio-/cerebrovaskularnog rizika. U analiziranoj literaturi nismo našli niti jednu publikaciju koja bi po strukturi i svojstvima odgovarala prikazanoj kohorti, pa nema temelja ni za kakve usporedbe opaženoga s literaturnim podatcima.

5.2.2. Odnos sustavno praćenih laboratorijskih pokazatelja i pojave ozbiljnih sistemskih štetnih događaja

Svojstva ispitanika i vrijeme praćenja

U ovu je analizu uključeno ukupno 63 bolesnika s najmanje 3 a najviše 6 primljenih injekcija. Razlog je tome činjenica da su bolesnici s >6 primljenih injekcija bili rijetki (n=11), s vrlo varijabilnim brojem injekcija i modeli koji su rabljeni za analizu nisu mogli konvergirati. Neki su od ispitanika primili određeni broj injekcija i prije uključivanja u proces liječenja u KB Sveti Duh, a medijan broja injekcija primljenih u bolnici KB Sveti Duh iznosio je 2 (raspon 1-6) (tablica 13.). Po svim ostalim svojstvima, ova je podskupina posve slična cjelokupnoj kohorti (tablica 8.) koja je analizirana za učestalost ozbiljnih sistemskih štetnih događaja. Također, u ovoj podskupini su i svih troje bolesnika s ozbiljnim kardio-/cerebrovaskularnim štetnim događajima

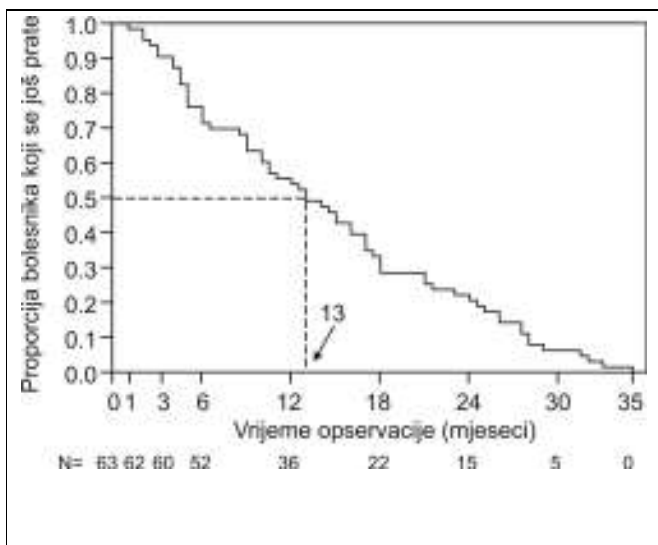
(akutni koronarni sindrom, tromboza jugularne vene, novo akutno popuštanje srca) (3/63 ili 4,8%) te troje bolesnika u kojih su ozbiljni štetni događaji bili krvarenja (4,8%) (tablica 13.).

Razdoblje praćenja u sustavu liječenja u KB Sveti Duh bilo je u rasponu od 1 do 35 mjeseci, a medijan je iznosio 13 mjeseca (slika 5.). „Središnjih“ 50% ispitanika (donja – gornja kvartila) praćeno je između 6 i 21,5 mjeseci. Sve su te vrijednosti praktično identične vrijednostima za cijelu kohortu (slika 6.).

Tablica 13. Svojstva bolesnika s AMD uključenih u analizu odnosa laboratorijskih pokazatelja praćenih tijekom liječenja IVT bevacizumabom i pojave ozbiljnih sistemskih štetnih događaja u KB Sveti Duh. Brojevi su apsolutni brojevi (postotci, %) i medijani (raspon).

N	63
Dob (godine)	77 (45-89)
Spol, muški/žene	28 (43,8) / 35 (56,3)
Ukupan broj primljenih injekcija	4 (3-6)
Broj injekcija primljenih u KB Sveti Duh	2 (1-6)
Kardio-/cerebrovaskularni komorbiditet ¹	55 (87,3)
Kronično zatajenje bubrega	1 (1,6)
Broj leukocita (x 10 ⁹ /L)	6,59 (4,33-13,29)
Hemoglobin (g/L)	139 (93-175)
Broj trombocita (x 10 ⁹ /L)	237 (127-344)
D-dimer (μg/L)	550 (215-2130)
Kreatinin ((μmol/L)	93,5 (58-416)
Troponin ((μg/L)	0,01 (0-0,27)
C-reaktivni protein (mg/L)	2,1 (0,3-12,1)
Kardio-/cerebrovaskularni ozbiljni štetni događaji	3 (4,8)
Ozbiljni štetni događaji - krvarenja	3 (4,8)

¹Hipertenzija, popuštanje srca, preboljeli infarkt miokarda, moždani udar ili tranzitorna ishemična ataka, stabilna koronarna bolest.



Slika 6. Kaplan-Meier krivulja vremena praćenja bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom u kohorti u KB Sveti Duh u kojih je analiziran odnos praćenih laboratorijskih pokazatelja i pojave ozbiljnih štetnih događaja. Strelicom je naznačen medijan vremena praćenja. Najkraće vrijeme praćenja iznosilo je 1 mjesec (1 bolesnik). Barem 3 mjeseca praćeno je 62 bolesnika, a 52 ih je praćeno barem 6 mjeseci.

Vrijednosti laboratorijskih pokazatelja tijekom praćenja

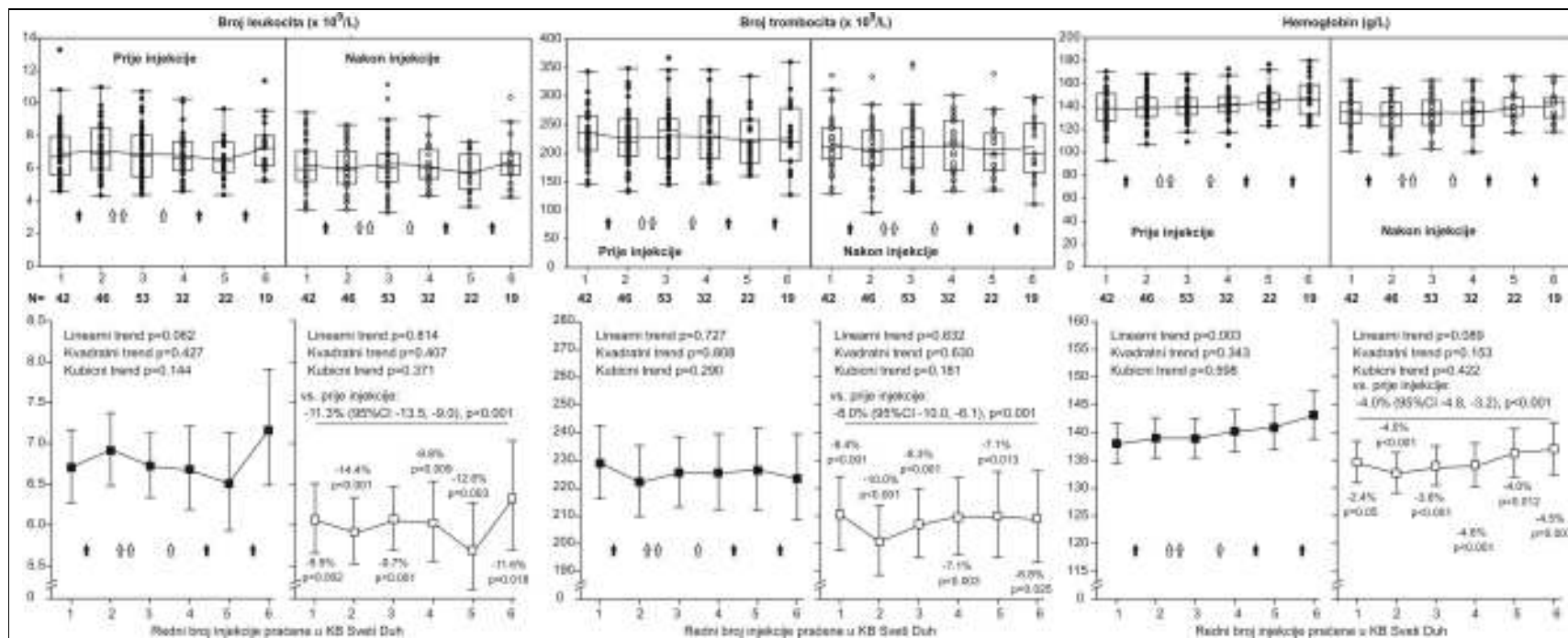
Slika 7. prikazuje razvoj broja leukocita, trombocita i razine hemoglobina izmjerenih 24 sata prije i 24 sata nakon IVT injekcija bevacizumaba tijekom praćenja u KB Sveti Duh u odnosu na redni broj injekcije (neki su u sustavu praćenja od prve injekcije, a neki uključeni u praćenje već su primili prethodne injekcije, pa se opažanja odnose na kasnije injekcije, do uključno 6) i naznačuje „lokaciju“, u odnosu na injekcije, ozbiljnih štetnih događaja – kardio-/cerebrovaskularnih i krvarenja. Vrijednosti leukocita i trombocita nisu tijekom liječenja pokazale nikakav jasan trend promjena, dok su vrijednosti hemoglobina pokazale trend linearnog porasta s povećanjem broja injekcija (prije injekcija $p=0,003$, nakon injekcija $p=0,089$) (slika 7, donji red). No, vrijednosti sva tri pokazatelja konzistentno su, uz svaku injekciju, bile značajno niže 24 sata nakon nego 24 sata prije injekcije: leukociti sveukupno za 11,3% niži ($p<0,001$) (od 9,5% do 14,4% niži po injekciji), trombociti sveukupno za 8,0% niži ($p<0,001$) (od 6% do 10% niži, po injekciji) i hemoglobin sveukupno za 4,0% niži (od 2,4% do 4,6% niži, po injekciji) (slika 7).

Slika 8. prikazuje kretanje vrijednosti D-dimera, kreatinina i C-reaktivnog proteina izmjerenih 24 sata prije i 24 sata nakon IVT injekcija bevacizumaba tijekom praćenja u KB Sveti Duh u odnosu

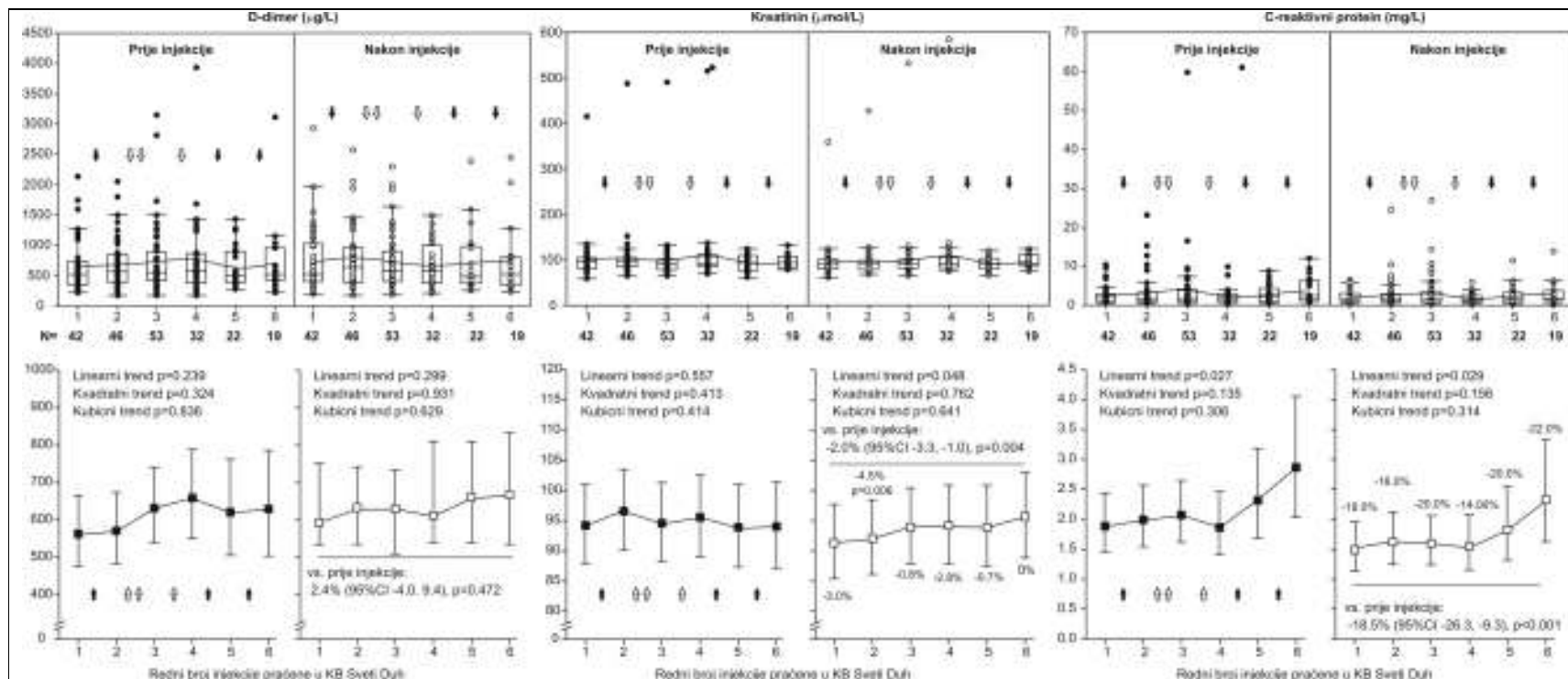
na redni broj injekcije i naznačuje „lokaciju“, u odnosu na injekcije, ozbiljnih štetnih događaja. Vrijednosti D-dimera nisu pokazale nikakav jasan trend tijekom vremena, vrijednosti kreatinina mjerene nakon injekcija pokazale su linearan trend rasta, baš kao i vrijednosti C-reaktivnog proteina (i prije i nakon injekcije) (slika 8, donji red). Sveukupno, vrijednosti kreatinina mjerene 24 sata nakon injekcije bile su statistički značajno ($p=0,004$) (slika 8, donji red) niže od onih mjerenih 24 sata prije injekcije, no po iznosu (sveukupno 2,0% niže; 4,5% nakon druge injekcije) to su praktično beznačajne razlike. Vrijednosti C-reaktivnog proteina bile su sveukupno (za 18,5%; $p<0,001$) niže nakon injekcija nego prije injekcija, a bile su niže i nakon svake pojedine injekcije (za 14% do 22%) iako razlike nisu bile statistički značajne (slika 8., donji red).

Od ukupno 211 vrijednosti troponina izmjerenih prije injekcije, 97 (46%) je iznosilo 0; 70 (33,2%) je iznosilo 0,01 $\mu\text{g/L}$; 30 (14,2%) ih je iznosilo 0,02 $\mu\text{g/L}$; 9 (4,3%) ih je iznosilo 0,03 $\mu\text{g/L}$, te su izmjerene po jedna vrijednost (0,5%) od 0,04, 0,05, 0,27 i 0,39 $\mu\text{g/L}$ bez naznaka bilo kakvog trenda. Gotovo identične vrijednosti, bez trenda i bez razlike na stanje prije injekcije, izmjerene su 24 sata nakon injekcije (nije prikazano).

Od ukupno 209 urina analiziranih na prisutnost proteina test trakom prije injekcije, u 176 (84,2%) nalaz je bio negativan i nije opažen nikakav trend u odnosu na injekcije bevacizumaba. Što se tiče mjerenja 24 sata nakon injekcije, 194/210 (92,4%) vrijednosti bilo je negativno, bez trenda (nije prikazano).



Slika 7. Leukociti, trombociti i hemoglobin 24 sata prije i 24 sata nakon IVT injekcije bevacizumaba u bolesnika s AMD praćenih u sustavu KB Sveti Duh, u odnosu na redni broj injekcije (neki od prve injekcije u sustavu, neki od kasnijih). Gornji red: individualne vrijednosti (krugovi), medijani (poprečne crte), gornja i donja kvartila (kvadrati), polinomni spline (valovita linija) i unutarnje ograde [medijan \pm (1,5 x interkvartilni raspon)]. Vrijednosti izvan ograda su odstojeće (*outlier*). Crne strelice: „lokacija“ ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja (3 bolesnika) u odnosu na redni broj injekcije; bijele strelice: „lokacija“ ozbiljnih krvarenja (3 bolesnika). N= broj bolesnika prema rednom broju injekcije uključene u praćenje. Donji red: geometrijske srednje vrijednosti i 95% granice pouzdanosti (generalni linearni mješoviti model ln-transformiranih vrijednosti s jednom nezavisnom varijablom – redni broj injekcije). Uz vrijednosti 24 sata nakon injekcije naznačene su razlike u odnosu na prije injekcije, sveukupno i po rednom broju injekcije. Ln-transformirane vrijednosti analizirane su u generalnim linearnim mješovitim modelima s nezavisnim varijablama: mjerenje (prije ili nakon), redni broj injekcije i mjerenje*redni broj injekcije. Postotne razlike izvedene su iz omjera geometrijskih srednjih vrijednosti [razlika (%) = (1 - GMR)*100].



Slika 8. D-dimeri, kreatinin i C-reaktivni protein 24 sata prije i 24 sata nakon IVT injekcije bevacizumaba u bolesnika s AMD praćenih u sustavu KB Sveti Duh, u odnosu na redni broj injekcije. Gornji red: individualne vrijednosti (krugovi), medijani (poprečne crte), gornja i donja kvartila (kvadrati), polinomni spline (valovita linija) i unutarnje ograde [medijan ± (1,5 x interkvartilni raspon)]. Vrijednosti izvan ograda su odstojeće (*outlier*). Crne strelice: „lokacija“ ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja (3 bolesnika) u odnosu na redni broj injekcije; bijele strelice: „lokacija“ ozbiljnih krvarenja (3 bolesnika). N= broj bolesnika prema rednom broju injekcije uključene u praćenje. Donji red: geometrijske srednje vrijednosti i 95% granice pouzdanosti a uz vrijednosti 24 sata nakon injekcije naznačene su razlike u odnosu na prije injekcije, sveukupno i po rednom broju injekcije. Podatci su analizirani na isti način kao i za sliku e. Postotne razlike izvedene su iz omjera geometrijskih srednjih vrijednosti [razlika (%) = (1- GMR)*100].

Praćeni laboratorijski pokazatelji kao prediktori ozbiljnih štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja

U nizu generaliziranih linearnih mješovitih modela, demografska i komorbiditetna svojstva ispitanika (fiksne nezavisne varijable), te vrijednosti praćenih laboratorijskih pokazatelja (longitudinalne nezavisne varijable) analizirani su kao mogući prediktori pojave štetnih događaja (binarna longitudinalna zavisna varijabla). Svaka od nezavisnih varijabli prvo je analizirana kao jedina nezavisna varijabla u modelu (univarijantni testovi), a one koje su pokazale makar trend združenosti sa zavisnom varijablom (definirano kao $p < 0,250$), uključene su u konačni model. Uz njih, dob je uvijek uključena u model (bez obzira na p-vrijednost), budući da je dob poznati čimbenik rizika za kardio-/cerebrovaskularne događaje. Samo su vrijednosti kreatinina izmjerene prije ili nakon injekcije, te vrijeme proteklo od početka liječenja IVT bevacizumabom pokazale združenost s rizikom kardio-/cerebrovaskularnih događaja i uključene su u završne modele.

Tablica 14. sažima 4 završna multivarijantna modela. Model 1 pokazuje da su, uz podešenje za dob, i vrijednosti kreatinina izmjenjenog prije injekcije i vrijeme proteklo od prve injekcije (tj. početka liječenja) nezavisno združeni s rizikom pojave ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja. Budući da vrijednosti Chi^2/df iznosi 0,74 i razmjerno je blizu vrijednosti 1,0, model dobro modelira varijabilnost zavisne varijable. U slijedećem koraku sve ostale potencijalne nezavisne varijable (jedna po jedna) uvedene su u model neovisno o statističkoj značajnosti, te je promatran njihov utjecaj na „fit“ modela (tj. na vrijednost Chi^2/df). Na kraju (Model 1A, tablica 14.), ustanovljeno je da uvođenje nezavisne varijable „D-dimer prije injekcije“ popravlja fit modela. Model 1A ukazuje da je porast kreatinina za 10 $\mu\text{mol/L}$ nezavisno združen s 14,5% većim rizikom ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja a duljina trajanja liječenja s oko 13,4% većim rizikom (za svaki mjesec trajanje liječenja više). Činjenica da je „efekt“ višeg kreatinina vidljiv i uz podešenje za dob i za trajanje liječenja ukazuje da je „efekt“ kreatinina neovisan od dobi (iako, vrijednosti kreatinina tendiraju biti više u starijih ljudi) i od protoka vremena. Slično, Model 2 u tablici ukazuje i na nezavisnu združenost vrijednosti kreatinina izmjenjenu 24 sata nakon injekcije i rizika ozbiljnih štetnih događaja, međutim „fit“ modela je lošiji od „fita“ Modela 1A i ne popravlja se bitno kada se uvede varijabla „D-dimer prije injekcije“ (Model 2A, tablica 14.).

Tablica 14. Sažetak multivarijatne analize rizika za pojavu ozbiljnih štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja u kohorti bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom u KB Sveti Duh. Rezultati su prikazani kao omjeri šansi (OR) s 95% granicama pouzdanosti (CI). Zasjenjen je model s najboljim „fitom“¹.

Nezavisna varijabla	OR (95% CI)	P
Model 1; Chi²/df= 0,74		
Kreatinin prije injekcije (za 10 μmol/L)	1,153 (1,023-1,298)	0,019
Vrijeme proteklo od prve injekcije (za 1 mjesec)	1,138 (1,010-1,285)	0,037
Dob (za jednu godinu)	1,173 (0,832-1,657)	0,363
Model 1A; Chi²/df= 1,06		
Kreatinin prije injekcije (za 10 μmol/L)	1,145 (1,020-1,286)	0,023
Vrijeme proteklo od prve injekcije (za 1 mjesec)	1,134 (1,010-1,276)	0,035
Dob (za jednu godinu)	1,162 (0,827-1,631)	0,385
D-dimer prije injekcije (za 100 μg/L)	1,083 (0,878-1,323)	0,473
Model 2; Chi²/df= 0,29		
Kreatinin nakon injekcije (za 10 μmol/L)	1,142 (1,018-1,280)	0,023
Vrijeme proteklo od prve injekcije (za 1 mjesec)	1,132 (1,001-1,279)	0,048
Dob (za jednu godinu)	1,170 (0,813-1,681)	0,395
Model 2A; Chi²/df= 0,34		
Kreatinin nakon injekcije (za 10 μmol/L)	1,131 (1,004-1,275)	0,042
Vrijeme proteklo od prve injekcije (za 1 mjesec)	1,125 (1,000-1,270)	0,051
Dob (za jednu godinu)	1,144 (0,782-1,677)	0,485
D-dimer prije injekcije (za 100 μg/L)	1,083 (0,867-1,376)	0,549

Omjer generalizirane Chi² vrijednosti i broja stupnjeva slobode (df) ilustrira „valjanost modela“ („fit“) – što je vrijednost bliža 1,0, to model bolje modelira varijabilnost zavisne varijable. Zasjenjen je model s najboljom vrijednosti Chi²/df, te su procjene omjera šansi iz tog modela najpouzdanije.

Praćeni laboratorijski pokazatelji kao prediktori ozbiljnih štetnih događaja - krvarenja

Iako, kako je rečeno, neočekivano, u ovoj su kohorti zabilježeni ozbiljni štetni događaji - krvarenja. Kako je prikazano u tablici 13., ukupno 3/63 bolesnika koja su primili između 3 i 6 injekcija IVT bevacizumaba doživjeli su te događaje. Stoga su praćeni laboratorijski pokazatelji analizirani kao mogući prediktori ovakvih događaja slijedeći istu logiku i postupke kao i u slučaju ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja. Kako je prikazano u tablici 15., samo su vrijednosti kreatinina izmjerene prije i D-dimera izmjerene nakon injekcije nezavisno združene s pojavom ozbiljnih krvarenja. U ovom modelu, dodavanje drugih nezavisnih varijabli (od kojih niti jedna nije pokazala nezavisnu združenost

s ishodom) nije popravilo „fit“ modela niti su veličine efekata koncentracija kreatinina ili D-dimera izmijenjene. Rezultati u tablici n ukazuju da se rizik za ozbiljna krvarenja povećava za 10,3% za svaki porast kreatinina od 10 $\mu\text{mol/L}$, odnosno za oko 20,9% za porast D-dimera za 100 $\mu\text{mol/L}$.

Tablica 15. Sažetak multivarijatne analize rizika za pojavu ozbiljnih krvarenja u kohorti bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom u KB Sveti Duh. Rezultati su prikazani kao omjeri šansi (OR) s 95% granicama pouzdanosti (CI).

Nezavisna varijabla	OR (95% CI)	P
Kreatinin prije injekcije (za 10 $\mu\text{mol/L}$)	1,103 (1,010-1,209)	0,035
D-dimer nakon injekcije (za 100 $\mu\text{g/L}$)	1,209 (1,010-1,447)	0,043

Odnos trajanja liječenja IVT bevacizumabom i vrijednosti kreatinina i d-dimera

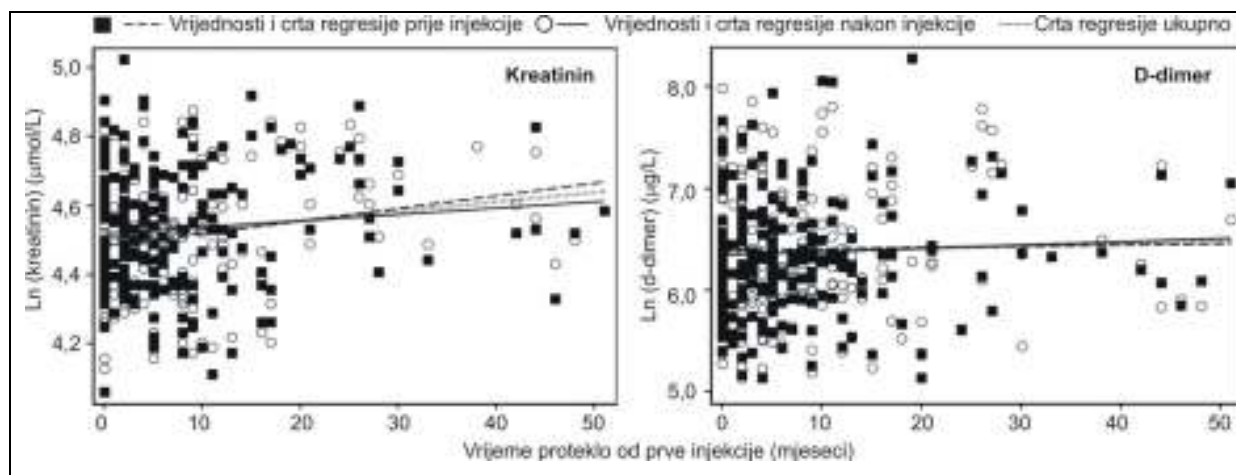
Budući da je uočena nezavisna povezanost između praćenih vrijednosti kreatinina i D-dimera i rizika ozbiljnih štetnih događaja, postavlja se pitanje jesu li razine kreatinina i D-dimera posljedica primjene IVT bevacizumaba. Kako nema kontrolne skupine (bolesnici bez IVT bevacizumaba), to nije moguće izravno procijeniti. Međutim, sugestivni mogu biti podaci koji u odnos stavljaju neku mjeru „intenziteta“ izloženosti bevacizumabu i vrijednosti kreatinina i D-dimera.

Slika 8. pokazuje razvoj vrijednosti kreatinina i D-dimera s obzirom na redni broj injekcije IVT bevacizumaba primljene u sustavu praćenja u KB Sveti Duh. Vrijednosti D-dimera ne pokazuju neki poseban trend, dok vrijednosti kreatinina mjerene nakon injekcije pokazuju linearan rastući trend s većim rednim brojem injekcije. Međutim, vremenski razmak između injekcija određenog rednog broja bio je vrlo različit od bolesnika do bolesnika, tj., vrijeme proteklo od prve injekcije kao indikator „trajanja (povremene) ekspozicije“ IVT bevacizumabu bilo je različito. To vrijeme nađeno je nezavisno povezano s rizikom ozbiljnih štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja (tablica 14.). Stoga su ponovljene analize (generalni linearni mješoviti modeli) u kojima su zavisne longitudinalne varijable ili koncentracije kreatinina ili koncentracije D-dimera, a nezavisne varijable su: dob (može utjecati na razine oba laboratorijska parametra), spol (muškarci obični imaju više razine kreatinina), vrijeme proteklo od prve injekcije (longitudinalna nezavisna varijabla), mjerenje

(prije ili nakon injekcije; binarna longitudinalna nezavisna varijabla) i mjerenje*vrijeme od prve injekcije interakcija. Tablica 15. sažima rezultate multivarijatne analize a slika 9. prikazuje nezavisni odnos vremena proteklog od prve injekcije i vrijednosti kreatinina odnosno D-dimera. Uzevši u obzir i mjerenja prije i nakon injekcije, dulje vrijeme proteklo od prve injekcije pokazuje tendenciju nezavisne združenosti s višim razinama kreatinina (za 0,3% / 3 mjeseca, p=0,091) (tablica 16., Model 1), no združenost ne postoji za vrijednosti mjerene prije injekcije, dok je za vrijednosti mjerene 24 sata nakon injekcije ta združenost jasna (porast od oko 0,6% / 3 mjeseca, p=0,007). Za D-dimer jasna je nezavisna združenost duljeg vremena proteklog od prve injekcije i viših vrijednosti (tablica 16., Model 2) – sveukupno za 2,3% / 3 mjeseca (p=0,023); za mjerenja prije injekcije za 2,6% / 3 mjeseca (p=0,009); i za mjerenja nakon injekcije za 2,0% / 3 mjeseca (p=0,047).

Tablica 16. Nezavisna združenost vremena proteklog od prve injekcije IVT bevacizumaba (indikator trajanja izloženosti bevacizumabu) i vrijednosti kreatinina (Model 1) i D-dimera (Model 2) u kohorti bolesnika s AMD praćenih u KB Sveti Duh. Analizirane su In-transformirane vrijednosti pa su rezultati prikazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95% granicama pouzdanosti (CI).

Nezavisna varijabla	GMR (95% CI)	P
Model 1 – ishod od interesa kreatinin		
Vrijeme proteklo od prve injekcije - sveukupno (za 3 mjeseca)	1,003 (0,997-1,007)	0,091
Vrijeme proteklo od prve injekcije – mjerenje prije injekcije	1,001 (0,996-1,046)	0,807
Vrijeme proteklo od prve injekcije – mjerenje nakon injekcije	1,006 (1,002-1,010)	0,007
Mjerenje nakon injekcije (vs. prije)	0,977 (0,966-0,989)	<0,001
Muški spol (vs. ženski)	1,133 (1,049-1,222)	0,001
Dob (za jednu godinu)	1,003 (0,998-1,007)	0,193
Model 2 – ishod od interesa D-dimer		
Vrijeme proteklo od prve injekcije - sveukupno (za 3 mjeseca)	1,023 (1,006-1,286)	0,023
Vrijeme proteklo od prve injekcije – mjerenje prije injekcije	1,026 (1,006-1,045)	0,009
Vrijeme proteklo od prve injekcije – mjerenje nakon injekcije	1,020 (1,000-1,040)	0,047
Mjerenje nakon injekcije (vs. prije)	1,028 (0,967-1,092)	0,380
Muški spol (vs. ženski)	0,986 (0,771-1,261)	0,912
Dob (za jednu godinu)	1,029 (1,015-1,044)	<0,001



Slika 9. Nezavisna združenost vremena proteklog od prve injekcije (indikator trajanja liječenja IVT bevacizumabom) i vrijednosti kreatinina i D-dimera u kohorti bolesnika s AMD praćenih u KB Sveti Duh - crte regresije su iz modela u tablici 16.

Sveukupno, prikazani podatci ukazuju:

- Više vrijednosti kreatinina, koje se prema postupniku probira/nadzora nad bolesnicima koji se liječe IVT bevacizumabom u KB Sveti Duh u takvih bolesnika kontinuirano prate, kao i dulje trajanje liječenja IVT bevacizumabom, nezavisno su združene s većim rizikom ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja;
- Više vrijednosti kreatinina i više vrijednosti D-dimera, koji se prema istom protokolu sustavno prate, nezavisno su združene s većim rizikom ozbiljnih štetnih događaja – krvarenja;
- Dulje vrijeme trajanja (povremene) izloženosti IVT bevacizumabu nezavisno je združeno s višim razinama kreatinina i D-dimera tijekom vremena;
- U usporedbi s literaturnim podacima, primjena tog postupnika i kontinuirana procjena rizika (s mogućnošću odgađanja terapije), čini se smanjuje rizik ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja u bolesnika s AMD koji se liječe IVT bevacizumabom.

Podatci podupiru ovaj logički slijed: IVT bevacizumab \rightarrow kreatinin \uparrow , D-dimer \uparrow \rightarrow rizik kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja \uparrow , rizik krvarenja \uparrow .

5.2.3. Sistemska izloženost bevacizumabu nakon intravitrealne primjene

Svojstva ispitanika, tretmana bevacizumabom i uzimanja uzoraka

U ovaj dio studije uključeno je 47 ispitanika (dali informirani pristanak za dodatne uzroke krvi) a njihova su svojstva sažeta u tablici 17. Većinom se radilo o bolesnicima s AMD, uz znatnu zastupljenost (27,7%) bolesnika s dijabetičkom retinopatijom te uz podjednaku zastupljenost muškaraca i žena (tablica 17.). U 19/47 bolesnika krv za ovu analizu uzeta je uz prvu injekciju IVT bevacizumaba, dok se u ostalih radilo o kasnijim injekcijama (od 2. do 12.) pri čemu je vrijeme proteklo od prethodne injekcije bilo u rasponu od 0,7 do 18 mjeseci (medijan 3,3 mjeseca) (tablica 17.).

Tablica 17. Svojstva bolesnika u kojih su uzeti uzroci krvi za određivanje koncentracija bevacizumaba i VEGF-a 24 sata prije, 24 sata nakon i 7 dana nakon intravitrealne primjene bevacizumaba. Brojevi su apsolutni brojevi (postotci, %) i medijani (raspon).

N	47
Dob (godine)	74 (36-89)
Spol, muški/žene	25 (53,8) / 22 (46,8)
Dijagnoza zbog koje je primijenjen bevacizumab	
Senilna makularna degeneracija	31 (66,0)
Dijabetička retinopatija	13 (27,7)
Gluakom	1 (2,1)
Okkluzija v. <i>centralis retinae</i>	1 (2,1)
Ostalo	1 (2,1)
Broj primljenih injekcija	3 (1-12)
Bolesnici kojima je krv za analizu uzeta uz prvu injekciju	19 (40,4)
Mjeseci proteklo od prethodne injekcije (n=28)	3,3 (0,7-18,0)

Sigurnosni laboratorijski pokazatelji prije i nakon injekcije IVT bevacizumaba

Sukladno postupniku, i u ovih su bolesnika rutinski 24 sata prije i 24 sata nakon injekcije određeni laboratorijski pokazatelji. Kako je sažeto u tablici 18., iako su neke razlike „poslije - prije“ dostigle statističku značajnost (broj leukocita, broj trombocita), radi se o praktično beznačajnim razlikama.

Tablica 18. Laboratorijski pokazatelji 24 prije i 24 sata nakon IVT injekcije bevacizumaba u 47 bolesnika u kojih su analizirane sistemske koncentracije bevacizumaba i VEGF-a. Izmjerene vrijednosti sažete su kao medijani (raspon) te je istaknuta i razlika „poslije – prije“ s 95% granicama pouzdanosti (CI).

	24 h prije	24 h poslije	Poslije-prije (95%CI);p ¹
Leukociti (x 10 ⁹ /L)	7,6 (4,6-83,9)	7,0 (3,0-76,1)	-0,45 (-0,80 do -0,05); 0,025
Hemoglobin (g/L)	139 (107-175)	138 (110-166)	-1,0 (-2,5 do 1,0); 0,354
Trombocita (x 10 ⁹ /L)	231 (58-465)	227 (55-458)	-11 (-16 do -5); <0,001
D-dimer (μg/L)	453 (169-1297)	434 (169-3092)	3,0 (-20,5 do 27,5); 0,851
Kreatinin ((μmol/L)	95 (68-488)	100 (69-427)	2 (0 do 4); 0,044
Troponin (μg/L)	0,01 (0-0,09)	0,01 (0-0,09)	0 (0 do 0,005); 0,341

¹Medijan razlika i p-vrijednosti iz Wilcoxon testa

Sistemske koncentracije bevacizumaba i VEGF-a nakon IVT primjene bevacizumaba

Uzorci krvi za određivanje sistemskih koncentracija bevacizumaba i VEGF-a uzeti su 24 sata prije, 24 sata nakon i 7 dana nakon primjene IVT bevacizumaba. Iz tehničkih razloga, nisu uzeti svi planirani uzorci (tablica 19.). Kako je sažeto u tablici 19., u odnosu na stanje prije injekcije, sistemske koncentracije bevacizumaba su u vremenima nakon injekcije imale tendenciju porasta, a istodobno su koncentracije VEGF-a pokazale tendenciju opadanja.

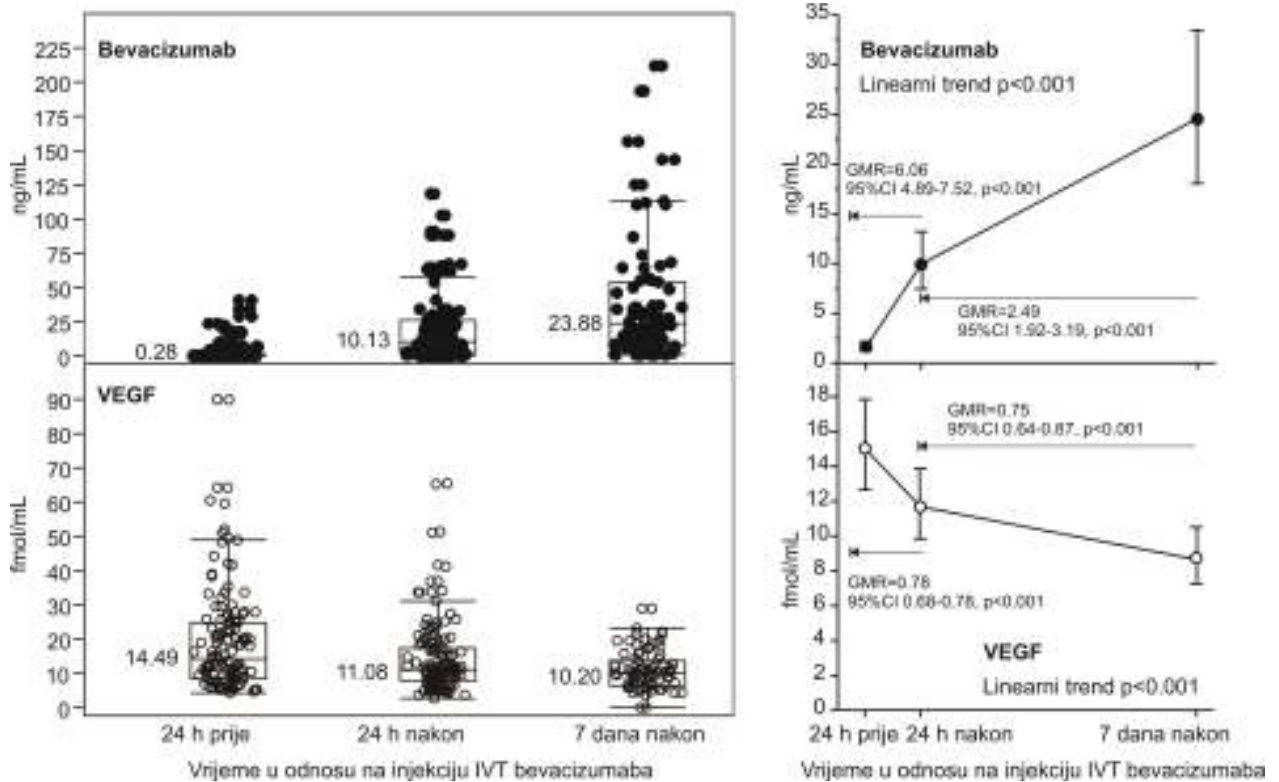
Tablica 19. Sistemske koncentracije bevacizumaba i VEGF-a, 24 sata prije, 24 sata nakon i 7 dana nakon IVT primjene bevacizumaba. Vrijednosti su sažete kao medijani (raspon).

	N	Bevacizumab (ng/mL) ¹	VEGF (fmol/mL) ¹
24 sata prije injekcije	40	0,33 (0 -35,18)	14,84 (5,41 – 61,2)
24 sata nakon injekcije	41	8,52 (0,22 – 85,6)	11,39 (4,14 – 43,2)
7 dana nakon injekcije	27	31,1 (1,17 – 172,1)	10,45 (3,75 – 22,25)

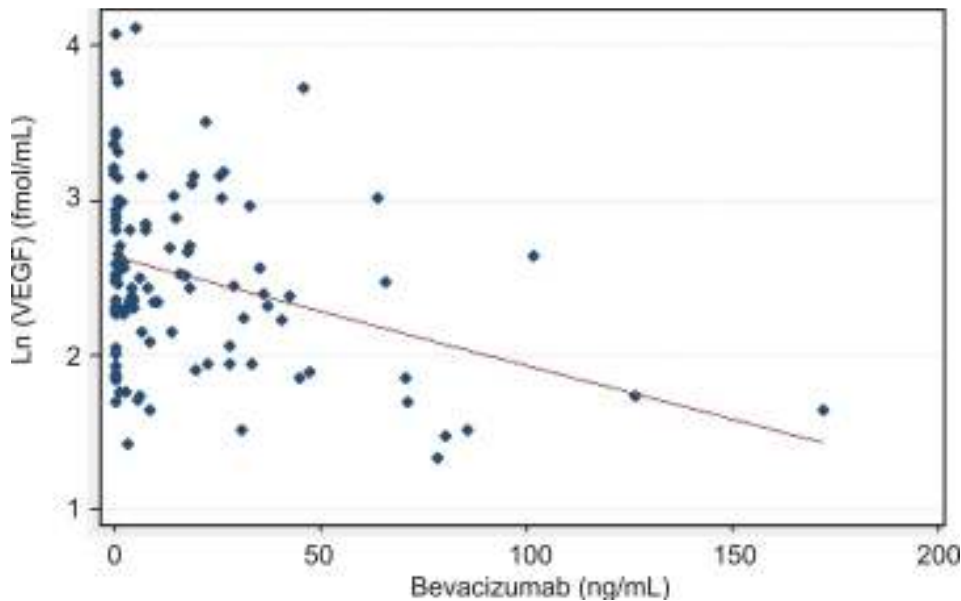
*Sva su mjerenja rađena u triplicatu („tehnički triplicati“) te su korištene prosječne vrijednosti

Ti su trendovi još jasnije vidljivi na slici 10. gdje su prikazani sve izmjerene vrijednosti (svi tehnički multiplikati) – u odnosu na stanje prije injekcije, 24 sata nakon injekcije koncentracije bevacizumaba su oko 6 puta više, a 7 dana nakon injekcije još 2,5 puta više (u odnosu na 24 sata nakon injekcije) (slika 10., desno); istodobno, koncentracije VEGF-a su 24 sata nakon injekcije oko 22% niže nego prije injekcije, te se još dodatno snize za 25% 7 dana nakon injekcije (slika 10., desno). Sve su te razlike izrazito statistički značajne. Slika 11.

prikazuje regresiju logaritmiranih koncentracija VEGF-a (baza e) na koncentracije bevacizumaba ilustrirajući linearan odnos: za porast koncentracije bevacizumaba od 20 ng/mL, koncentracija VEGF-a opada za 13,2%.



Slika 10. Sistemske koncentracije bevacizumaba i VEGF-a 24 sata prije, 24 sata nakon i 7 dana nakon intravitrealne primjene bevacizumaba. **Lijevo** su prikazane sve izmjerene vrijednosti po vremenskoj točki („tehnički multiplikati“), te su naznačene vrijednosti medijana (horizontalne crte, brojčana vrijednost), gornja i donja kvartila („box“) i unutarnje ograde [medijan ± (1.5 x interkvartilni raspon)]. Vrijednosti izvan ograda su odstojeće vrijednosti (*outlier*). **Desno** su prikazane geometrijske srednje vrijednosti po vremenskoj točki s 95% granicama pouzdanosti: In-transformirane vrijednosti bevacizumaba i VEGF-a analizirane su svaka u zasebnom generalnom linearnom mješovitom modelu te su razlike između vremenskih točaka prikazane kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR). Granice pouzdanosti i p-vrijednosti podešene su za ponovljene usporedbe simulacijskom metodom.



Slika 11. Linearan odnos ln koncentracija VEGF-a i koncentracija bevacizumaba. Ln-transformirane koncentracije VEGF-a analizirane su u generalnom linearnom modelu s jednom nezavisnom varijablom: koncentracija bevacizumaba. Regresijski koeficijent naznačuje da za porast koncentracije bevacizumaba od 20 ng/mL, koncentracija VEGF-a opada za 13,2% (95% CI 4,2-19,6; $p < 0,001$). Koeficijent korelacije iznosi -0,331 (95% CI -0,490 do -0,152; $p < 0,001$).

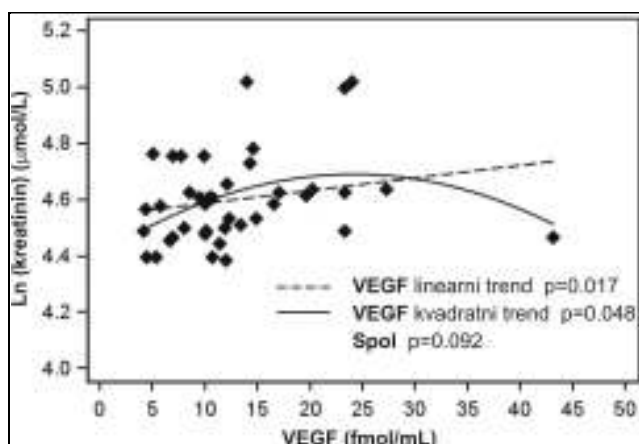
Opaženi odnos između sistemskih koncentracija bevacizumaba i VEGF-a razumljiv je sa stanovišta mehanizma djelovanja bevacizumaba, no valja uočiti da je opažen nakon IVT primjene svega 1,25 mg bevacizumaba.

Odnos sistemskih koncentracija VEGF-a i laboratorijskih pokazatelja koji se rutinski prate u bolesnika liječenih IVT bevacizumabom zbog AMD u KB Sveti Duh

Iako su sistemske koncentracije VEGF-a izmjerene samo „oko“ jedne IVT injekcije bevacizumaba, pokušali smo ispitati postoji li odnos između koncentracija VEGF-a (njihovo sniženje osnovni je mehanizam djelovanja bevacizumaba) i nekog od laboratorijskih pokazatelja koji se u sustavu liječenja AMD IVT bevacizumabom u KB Sveti Duh rutinski prate. Od primarnog su interesa bile vrijednosti kreatinina i D-dimera, jer je u prethodnim analizama pokazano da su njihove vrijednosti nezavisno združene s duljinom liječenja, te da su nezavisno združene i s rizikom pojave ozbiljnih srčanih/krvožilnih štetnih događaja i krvarenja. Odnosi su ispitani u vremenu 24 sata nakon injekcije zato: a) jer su vrijednosti kreatinina i D-dimera u tom vremenu određene za sve ispitanike ove skupine (tablica 18.), a vrijednosti VEGF-a u 41/47 ispitanika (tablica 19.); b) jer se u tom vremenu vidi jasna

dinamika VEGF-a u odnosu na stanje prije injekcije – pad od oko 22% istodoban s oko šesterostrukim povišenjem koncentracija bevacizumaba (slika 10.).

Od svih laboratorijski pokazatelja istaknutih u tablici 19., jedino je za koncentracije kreatinina identificiran odnos spram koncentracija VEGF-a. Kako je naznačeno na slici 12., uz podešenje za spol, odnos serumskog kreatinina i koncentracije VEGF-a je složen: postoji značajan linearni trend porasta kreatinina uz više vrijednosti VEGF-a, ali istodobno postoji i značajan kvadratni trend – uz porast vrijednosti VEGF-a, vrijednosti kreatinina prvo rastu a zatim opadaju (slika 12.).



Slika 12. Odnos logaritma (baza e) kreatinina (zavisna varijabla) i koncentracija VEGF-a (nezavisna varijabla) uz podešenje za spol, 24 sata nakon IVT primjene bevacizumaba (N=41). U generalni linearni model uključene su nezavisne varijable koje su pokazale makar i trend univarijatne združenosti s kreatininom ($p < 0.150$).

Tablica 20. sažima rezultate multivarijatne analize: značajan linearni trend pokazuje združenost viših vrijednosti VEGF-a s višim vrijednostima kreatinina – porast koncentracije VEGF-a za 10 fmol/mL združen je s 11,4% porastom koncentracije kreatinina; značajan kvadratni trend kazuje da nakon linearnog rasta vrijednosti kreatinina (uz porast VEGF-a) do razine vršnih vrijednosti kreatinina u uzorku (negdje između koncentracija VEGF-a od 15 i 25 fmol/mL), slijedi pad koncentracija kreatinina uz porast koncentracije VEGF-a – porast VEGF-a za 10 fmol/mL združen je s 1,0% sniženjem koncentracije kreatinina. Muškarci imaju oko 8,6% više vrijednosti kreatinina od žena (podešeno za VEGF) (tablica 20.).

Tablica 20. Odnos koncentracija VEGF-a (nezavisna varijabla) i kreatinina (zavisna varijabla) u bolesnika s AMD 24 sata nakon IVT primjene bevacizumaba (N=41) - sažetak multivarijatne analize logaritmiranih koncentracija kreatinina (baza e).

	% (95%CI)	p
Porast kreatinina uz porast VEGF za 10 fmol/mL (linearni trend)	+11,4 (+2,5 do +21,0)	0,014
Pad kreatinina uz porast VEGF za 10 fmol/mL (kvadratni trend)	-1,0 (-1,8 do -0,1)	0,048
Razlika muškaraca spram žena	+8,6 (-1,5 do +19,7)	0,092

Zavisna varijabla (koncentracija kreatinina) logaritmirana je (baza e) da bi se zadovoljili uvjeti generalnog linearnog modela. Nezavisne varijable uključene su u model po kriteriju trenda univarijatne združenosti sa zavisnom varijablom (testirani: demografska svojstva, dijagnoza, komorbiditet, vrijednosti laboratorijskih pokazatelja određenih 24 sata nakon IVT bevacizumaba). Model je uključio nezavisne varijable spol, VEGF koncentraciju i VEGF*VEGF (kvadratni efekt). Budući da između linearnog (VEGF) i kvadratnog (VEGF*VEGF) efekta uvijek postoji kolinearnost, vrijednosti VEGF su centrirane (od svake pojedinačne koncentracije oduzeta je aritmetička srednja vrijednost) (između centriranih linearnih i kvadratnih efekata nema kolinearnosti). Analiza je ponovljena s centriranim vrijednostima VEGF (cVEGF) u modelu: spol, cVEGF, cVEGF*cVEGF. U takvom modelu, linearni efekt (cVEGF) daje iznos promjene zavisne varijable za definirani iznos promjene nezavisne varijable (u ovom slučaju porast kreatinina uz porast VEGF), a kvadratni efekt (cVEGF*cVEGF) daje iznos promjene u suprotnom smjeru (u ovom slučaju pad kreatinina uz porast VEGF, nakon što je kreatinin dosegao vršne vrijednosti). Budući da su vrijednosti kreatinina logaritmirane, iznos promjene izražen je u postocima: postotna promjena= $\{[\exp(\text{koeficijent})-1] \times 100$.

5.2.4. Zaključni osvrt na prikazane rezultate

Rezultati prikazanog istraživanja koje je obuhvatilo kohortu bolesnika s AMD koji se liječe IVT bevacizumabom u KB Sveti Duh i u kojih se pri odabiru za liječenje i tijekom liječenja sustavno primjenjuje postupnik za identifikaciju/kontrolu rizika sistemskih štetnih događaja, prvenstveno kardio-/cerebrovaskularnih, ukazuju:

- Usporedba prikazanih rezultata s odgovarajućim literaturnim podacima ukazuje da se sustavnim probirom i trajnim nadzorom može smanjiti rizik štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja;

- Neočekivano, u kohorti je uočen i relativno velik broj ozbiljnih štetnih događaja – neokularnih krvarenja;
- Dulje trajanje liječenja nezavisno je združeno s većim rizikom ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja što neizravno ukazuje na moguću uzročno-posljedičnu vezu;
- Više razine kreatinina tijekom vremena nezavisno su združene s većim rizikom ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja: za oko 14,5% viši rizik uz porast kreatinina od 10 $\mu\text{mol/L}$. To ukazuje da bi, tijekom praćenja bolesnika, u procjeni rizika posebno trebalo obratiti pozornost na dinamiku kreatinina;
- Više razine kreatinina i D-dimera tijekom vremena nezavisno su združene s većim rizikom ozbiljnih štetnih događaja – krvarenja: za oko 10,3% veći rizik uz porast kreatinina od 10 $\mu\text{mol/L}$; za oko 20,9% veći rizika uz porast d-dimera za 100 $\mu\text{g/L}$. To ukazuje da bi, tijekom praćenja bolesnika, u procjeni rizika posebno trebalo obratiti pozornost na dinamiku kreatinina i D-dimera;
- Dulje trajanje liječenja nezavisno je združeno s porastom vrijednosti kreatinina (za oko 0,6%/3 mjeseca) i D-dimera (za oko 2,3%/3 mjeseca) tijekom vremena, što neizravno ukazuje na moguću uzročno-posljedičnu vezu;
- 24 sata nakon IVT injekcije bevacizumaba vidi se šesterostruki porast sistemskih koncentracija bevacizumaba s daljnjim porastom oko 2,5 put do 7. dana nakon injekcije. Istodobno, sistemske koncentracije VEGF-a snižavaju se za oko 22% i zatim za daljnjih 25%;
- Između sistemskih koncentracija VEGF-a i kreatinina čini se postoji kompleksan odnos – rast koncentracija VEGF-a praćen je u početku porastom koncentracija kreatinina a zatim njihovim padom.

6. RASPRAVA

Iako se u toj indikaciji lijek rabi *off label*, intravitrealne (IVT) injekcije pripravka bevacizumaba za parenteralnu primjenu raširena su i dobro etablirana terapija senilne makularne degeneracije (AMD). Djelotvornost i lokalna (okularna) sigurnost/podnošljivost usporedive su onima ranibizumaba (47) koji je regulatorno odobren u toj indikaciji, a cijena je lijeka značajno niža. Međutim, dok za lijekove s regulatornim odobrenjem u određenoj indikaciji nositelj odobrenja podliježe strukturiranom regulatornom nadzoru sigurnosti primjene lijeka (farmakovigilancija), podatci o sigurnosti *off label* primjene lijekova temelje se na znanstvenim/stručnim publikacijama.

Inherentno temeljnom mehanizmu djelovanja, sistemska primjena bevacizumaba združena je s rizikom kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih štetnih događaja, te povećanim rizikom nekih oblika krvarenja. Već rane studije u životinja, a zatim i u ljudi naznačile su da nakon IVT primjene bevacizumab dopijeva u sistemska cirkulaciju što prate promjene razina VEGF-a, baš kao i nakon sistemske primjene (44, 45). Tako je, inicijalno, naznačena mogućnost i sistemskih štetnih događaja i time definirano i praktično pitanje: izvjesno je da terapijski učinak IVT bevacizumaba uvelike doprinosi kvaliteti života oboljelih, no postoji li i koliki je rizik ozbiljnih štetnih događaja čije posljedice mogu biti teže i izraženije od moguće koristi? Treba li na rizik kardiovaskularnih/cerebrovaskularnih štetnih događaja obratiti pozornost i pokušati ga, na individualnoj razini, kontrolirati?

U vrijeme kad je u KB Sveti Duh započela intenzivnija primjena IVT bevacizumaba za liječenje AMD (ali i drugih stanja) (2012.g.), smatrali smo da je u situaciji opterećenoj velikim brojem nepoznanica nužno definirati kriterije kojima bi se za svakog pojedinog bolesnika koji ima indikaciju za liječenje IVT bevacizumabom odlučivalo o riziku štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja i u trenutku odluke o početku liječenja (probir), te kontinuirano tijekom liječenja (praćenje). Razvijen je strukturirani sustav - postupnik - koji uključuje kontinuiranu evaluaciju anamneze i aktualnog kliničkog stanja na temelju fizikalnog nalaza i laboratorijskih pokazatelja i predviđa, ako je to potrebno, neključivanje i/ili isključivanje/odgodu liječenja (Prilog 1.). Postupnik se primjenjuje u suradnji specijalista oftalmologa i internista/kliničkog farmakologa (doktorand) i tijekom prvih nekoliko mjeseci uporabe pokazao se praktičan i primjenjiv. Svrha ovog doktorskog rada bila je da se na temelju prospektivnog opservacijskog istraživanja procijeni da li primjena postupnika u praksi doista doprinosi smanjenju rizika štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja. Budući da istraživanje nije moglo biti kontrolirano, tj. nije moglo, sukladno strategiji liječenja koja se u

KB Sveti Duh primjenjuje, uključiti skupinu bolesnika koji bi se liječili IVT bevacizumabom bez primjene postupnika, cilj je bio da se u svrhu evaluacije postupnika rezultati istraživanja usporede s najboljom procjenom rizika na temelju literaturnih podataka. U svrhu definiranja „najbolje procjene rizika“, osim samog istraživanja, proveden je i sustavni pregled i meta-analiza publiciranih studija koje su izvijestile o štetnim kardio-/cerebrovaskularnim događajima u bolesnika s AMD koji se liječe IVT bevacizumabom.

6.1. Sustavni pregled i meta-analiza

Pregledom elektronskih baza podataka u svrhu sustavnog pregleda literature, identificirali smo veći broj objavljenih sustavnih pregleda i meta-analiza koje su se bavile djelotvornošću/sigurnošću bevacizumaba i/ili drugih IVT tretmana za AMD ali i druga stanja (prvenstveno dijabetička retinopatija i okluzija v. *centralis retinae*) (sažeto u Tablici 1.). Neke od njih bile su specifično usmjerene na sistemsku sigurnost. Jedna je mrežna meta-analiza (51) randomiziranih kontroliranih kliničkih studija (RCT) raznih anti-VEGF tretmana (uključeni RCT-ovi koji su uspoređivali: ranibizumab i placebo ili ne anti-VEGF liječenje; ranibizumab i bevacizumab; i aflibercept i ranibizumab) zaključila da svi anti-VEGF IVT tretmani (bevacizumab, ranibizumab i aflibercept) povećavaju rizik sistemskih tromboembolijskih događaja (za oko 4-6%) u odnosu na placebo/ne anti-VEGF liječenje. Druga meta-analiza (43) RCT-ova s izravnim usporedbama ranibizumaba i placeba/ne anti-VEGF liječenja zaključila je da IVT ranibizumab ne utječe na rizik kardio- ili cerebrovaskularnih štetnih događaja i krvarenja; dok je treća (48) meta-analiza RCT-ova bevacizumaba u usporedbi s ranibizumabom zaključila da između dva lijeka nema razlika u pogledu rizika sistemskih štetnih događaja, kardio-/cerebrovaskularnih ili krvarenja. Međutim, ti sustavni pregledi/meta-analize imaju određena ograničenja:

1. Mrežna meta-analiza (51) obuhvatila je samo neke a ne sve studije IVT anti-VEGF lijekova (recimo, samo 2 od 5 RCT-ova koji uspoređuju bevacizumab i ranibizumab). Nadalje, budući da je samo ranibizumab uspoređen s placebom/ne anti-VEGF liječenjem u relevantnom broju RCT-ova, usporedba aflibercepta i bevacizumaba s placebom/ne anti-VEGF liječenjem isključivo je neizravna (indirektna) i kao takva pruža nisku razinu dokaza, odnosno visoku razinu nesigurnosti o pouzdanosti procjene (106);

2. Sve tri spomenute meta-analize (43, 48, 51) uključile su kvantitativnu sintezu sve identificirane studije bez obzira na njihovu kvalitetu. Primarne studije nedostatne kvalitete tj. nedostatne zaštite od rizika pristranosti (*bias*) u pravilu daju nerealne tj. „lažne“ procjene populacijskog stanja i, u svrhu pouzdanih procjena, zapravo bi ih trebalo izostaviti (107);
3. Sve tri spomenute meta-analize (43, 48, 51) evaluirale su kvalitetu primarnih studija, ali **ne** specifično u odnosu na definiciju, praćenje i izvještavanje o štetnim događajima. Valja imati na umu da jedan RCT „visoke kvalitete“ (niskog rizika pristranosti) što se tiče procjene djelotvornosti nekog tretmana, u pogledu štetnih događaja može biti vrlo „niske kvalitete“ (tj. visokog rizika pristranosti) (108);
4. Konačno, kako je istaknuto i u Uvodu, najveća od spomenutih meta-analiza (48) imala je nedostatnu snagu (obzirom na broj studija, ispitanika i događaja) za detekciju potencijalno klinički značajnih razlika bevacizumaba i ranibizumaba.

Stoga je u svrhu ovog doktorskog rada proveden sustavni pregled i meta-analiza slijedećih specifičnosti:

- a) Uključeni su RCT-ove koji su usporedili IVT bevacizumab s bilo kojim drugim tretmanom za AMD, ali i RCT-ovi koji su usporedili razne režime primjene bevacizumaba jer i oni mogu (npr. kao razlike doze ili učestalosti primjene) naznačiti mogući rizik združen s bevacizumabom;
- b) Uključene su epidemiološke studije (opservacijske), jer se tipično temelje na velikom broju opažanja i, mada se u smislu evaluacije terapijskih intervencije takve studije smatraju manje pouzdanima inherentno dizajnu, mogu doprinijeti identifikaciji signala;
- c) Uključene su i velike kliničke serije bolesnika, jer one mogu pomoći u procjeni incidencije pojedinih događaja;
- d) U kvantitativnu sintezu uključene su, sukladno tipu i dizajnu, samo studije visoke kvalitete ocijenjene primjenom specifičnih etabliranih instrumenata (Cochrane Collaboration instrument za ocjenu rizika pristranosti (54) specifično prilagođen evaluaciji štetnih događaja; Newcastle-Ottawa ocjenska ljestvica (55) za opservacijske studije);
- e) Kvantitativna sinteza obuhvatila je i procjenu relativnog rizika, tj. usporedbe bevacizumaba s drugim tretmanima i procjenu incidencije događaja za sam bevacizumab;

- f) Specifično je definirano 9 štetnih događaja sukladno načinu na koji su definirani u primarnim studijama, tj. nisu stvarani „kompozitni“ ishodi kako bi se izbjeglo dvostruko brojanje događaja [smrt bilo kojeg uzroka, smrt vaskularnog uzroka, infarkt miokarda/angina, moždani udar, tranzitorna ishemijska ataka (TIA), hipertenzija, popuštanje srca, arterijski tromboembolijski događaji i venski tromboembolijski događaji];
- g) Kvantitativna sinteza provedena je uvažavajući ne samo „statističku“ (in)homogenost rezultata primarnih studija, već i njihovu kliničku sličnost.

Sukladno navedenome, prikazani sustavni pregled i meta-analiza najobuhvatnija su evaluacija kardio-/cerebrovaskularnog rizika združenog s IVT bevacizumabom u bolesnika s AMD do sada.

6.1.1. Glavni rezultati

Ukupno je identificirano 6 RCT-ova koji su usporedili IVT bevacizumab s drugim tretmanima, 4 RCT-a koja su usporedila različite režime liječenja bevacizumabom; 3 opservacijske studije koje su usporedile bevacizumab sa svim ili nekim od slijedećih tretmana: ranibizumab, pegaptanib, fotodinamska terapija (PDT); i dvije velike serije bolesnika liječene IVT bevacizumabom za koje je, sukladno osnovnom dizajnu, ocijenjeno da su visoke kvalitete.

Sa stajališta ocjene terapijske intervencije, u ovom slučaju rizika združenog s IVT bevacizumabom, inherentno dizajnu, dokazi najviše kvalitete dolaze iz RCT-ova koji uspoređuju bevacizumab s drugim tretmanima; nižu razinu dokaza pružaju RCT-ovi koji uspoređuju različite režime primjene bevacizumaba; a najniža razina dokaza dolazi iz opservacijskih studija. Serije bolesnika služile su samo za procjenu incidencije.

RCT – usporedbe s drugim tretmanima

Strogo uzevši, jedini **izravan** način procjene kardio-/cerebrovaskularnog rizika združenog s primjenom IVT bevacizumaba u bolesnika s AMD jest usporedba s placebo ili nekim tretmanom koji se ne temelji na inhibiciji VEGF-a. Samo je jedan 12-mjesečni RCT (71) usporedio bevacizumab (65 bolesnika) s PDT (16 bolesnika) ili placebo (12 bolesnika), a uključio je i krak bolesnika liječenih pegaptanibom (38 bolesnika). Ta studija, sa samo jednim događajem, ne omogućuje nikakav relevantan zaključak o riziku združenom s bevacizumabom – niti u odnosu na ne anti-VEGF liječenje, niti u odnosu na pegaptanib.

Ukupno 5 RCT-a usporedilo je bevacizumab s ranibizumabom tijekom 12 mjeseci, a dvije od tih studija i tijekom 24 mjeseca. Ukupno, niti nakon 12 niti nakon 24 mjeseca niti jedna objedinjena procjena nije bila „statistički značajna“ u pogledu *smrti bilo kojeg uzroka, smrti vaskularnog uzroka, infarkta miokarda, moždanog udara, TIA, arterijskog tromboembolijskog događaja* ili *popuštanja srca* sugerirajući da između tretmana nema razlike. Međutim, pojedine procjene (omjeri šansi) bile su u rangu „relevantne štete ili relevantne prednosti“, primjerice: 37% veći rizik smrti vaskularnog uzroka ili 54% veći rizik TIA nakon 12 mjeseci uz bevacizumab; ili pak 45% manji rizik infarkta miokarda, 35% manji rizik moždanog udara ili 43% manji rizik arterijskih događaja nakon 12 mjeseci, te 3 puta manji rizik popuštanja srca nakon 24 mjeseca. Također, doslovno sve procjene bile su izrazito neprecizne jer su se 95% granice pouzdanosti protezale od višestruko nižeg do višestruko višeg rizika. Osim toga, rasap rezultata individualnih studija bio je izrazit što najbolje ilustriraju intervali predikcije, gdje ih je bilo moguće odrediti (najmanje 3 studije). Za *hipertenziju*, objedinjena procjena dva RCT-a nakon 12 mjeseci ukazuje na 7,5 puta veći rizik s bevacizumabom i statistički je značajna ($p=0,044$), međutim radi se o procjeni temeljenoj na samo 4 događaja u ukupno 1626 bolesnika. Slično, za *venske tromboembolijske događaje*, objedinjena procjena 4 RCT-a nakon 12 mjeseci ukazuje na 2 puta veći rizik uz bevacizumab (s gornjom granicom pouzdanosti 7,8) – no temelji se na svega 14 događaja u 1721 bolesnika uz znatan rasap rezultata u 4 studije. Nakon 24 mjeseca i na temelju dva RCT-a, procjena za ovaj ishod je 2,3 puta veći rizik uz bevacizumab i na granici je statističke značajnosti ($p=0,061$), no temelji se na svega 20 događaja u 1795 ispitanika.

Sveukupno, usporedbe bevacizumaba i ranibizumaba karakterizira: mali broj studija, mali broj ispitanika, mali broj događaja, razlike rezultata između studija, neprecizne (široki intervali pouzdanosti) i „krhke“ procjene (poneki događaj više ili manje uz pojedini tretman bitno bi promijenio procjenu). Stoga postojeći RCT-ovi ne omogućuju pouzdan zaključak o tome utječe li bevacizumab (u usporedbi s ranibizumabom) na rizik štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja i u kojem smjeru.

RCT – usporedbe različitih režima IVT bevacizumaba

Kao i usporedbe s ranibizumabom, i ovi RCT-ovi (3 u trajanju 12 mjeseci, jedan u trajanju 23 mjeseca) ograničenog su značenja zbog malog broja ispitanika i malog broja događaja i, posljedično, nepreciznih, „krhkih“ procjena. Jedna je studija (80) naznačila manji rizik „vaskularnih događaja“ među 165 bolesnika s učestalijim doziranjem u odnosu na 166

bolesnika s manje učestalim doziranjem IVT bevacizumaba, međutim, sveukupno, ove studije ne omogućuju pouzdan zaključak o „učinku“ IVT bevacizumaba na kardio-/cerebrovaskularni rizik.

Opservacijske studije

Nedoumice preostale nakon analize RCT-ova nažalost nisu razriješene niti na temelju opservacijskih studija – zbog nesuglasnih rezultata (primjerice, razlike bevacizumaba i PDT ili razlike bevacizumaba i ranibizumaba u suprotnom smjeru), nepreciznih procjena (široke granice pouzdanosti) i neizravnosti usporedbe (npr. bevacizumab naspram PDT) ostaje znatna razina nesigurnosti o mogućem riziku združenom s IVT bevacizumabom.

6.1.2. Zaključak sustavnog pregleda i meta-analize

Sveukupni zaključak provedenog sustavnog pregleda i meta-analize jest da postojeće publicirane visokokvalitetne studije ne omogućuju jednoznačan zaključak o tome ima li IVT bevacizumab u bolesnika s AMD utjecaja na rizik štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja i u kojem „smjeru“ (posebno, u odnosu na druge anti-VEGF tretmane). Također, na temelju publiciranih studija nije moguće pouzdano procijeniti s kojom učestalošću treba očekivati takve događaje u bolesnika liječenih IVT bevacizumabom.

U svjetlu saznanja o sistemskoj izloženosti bevacizumabu nakon IVT primjene, već ta razina nesigurnosti sugerira da bi se riziku štetnih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja u bolesnika koji se liječe IVT bevacizumabom trebala posvetiti pozornost.

6.2. Prospektivno opservacijsko istraživanje u kohorti bolesnika u KB Sveti Duh

U odnosu na glavni postavljeni cilj – procijeniti da li primjena postupnika probira i praćenja bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom doista smanjuje rizik štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja – prikazano istraživanje ima nekoliko ograničenja. Najznačajnije od njih jest činjenica da nema kontrolne skupine, tj. skupine bolesnika u koje postupnik nije primijenjen. No, kako je objašnjeno, s obzirom na neizvjesnost oko rizika koje IVT bevacizumab potencijano nosi, smatrali smo da etički nije opravdano za potrebe ovog istraživanja uključiti i kontrolnu skupinu bolesnika. Stoga je procjena „učinka“ primjene postupnika u odnosu na literaturne podatke samo približna. Daljnje ograničenje proizlazi iz

činjenice da je od ukupno 225 bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom tijekom promatranog razdoblja i u kojih je postupnik primijenjen, u ovo istraživanje uključeno njih 74 koji su primili najmanje 3 injekcije bevacizumaba. S jedne strane, to je relativno mali uzorak (što procjene čini nepreciznima), a s druge strane ta činjenica mogla je, barem teorijski, unijeti određenu „pristranost u selekciji“ (*selection bias*). Naime, moguće je pretpostaviti da su u skupinu onih s najmanje 3 primljene injekcije ušli oni koji su, primjerice, bolje motivirani, „kardiovaskularno zdraviji“ ili pokazuju bolji terapijski odgovor. S tim u vezi treba uočiti: a) ograničenje na najmanje 3 primljene injekcije uvedeno je da bi podatci prikupljeni u promatranoj kohorti bili usporedivi literaturnim podacima obuhvaćenim u sustavnom pregledu u koji su uključene samo studije u kojima su ispitanici primili najmanje 3 injekcije. Razlog tom kriteriju jest patofiziološki – da bi bevacizumab imao neki učinak (u ovom slučaju kardiovaskularni), potrebno je da je neko vrijeme „prisutan u sustavu i djeluje“. Drugim riječima, na taj način osiguran je uvjet da su izloženost i praćenje dovoljno dugi da bi se odvio slijed bioloških događaja koji rezultira eventualnim kliničkim događajem; b) u smislu kardio-/cerebrovaskularnog rizika, svih 225 bolesnika evaluirani su na isti način. Shodno tome, nije vjerojatno da je činjenica ograničenja analizirane kohorte na 1/3 sveukupnog broja unijela „kardio-/cerebrovaskularnu pristranost“. Ostaje, naravno, mogućnost da su analiziranu kohortu činili bolesnici motiviraniji da nastave liječenje ili pak „bolji terapijski reaktori“. Iako se to ne može u potpunosti isključiti, racionalno je pretpostaviti da ti elementi ipak nisu imali bitan utjecaj na njihov kardiovaskularni rizik.

S druge strane, u odnosu na glavnu svrhu, istraživanje je imalo nekoliko metodološki dobrih svojstava: sustavnost i uniformnost kliničke i laboratorijske evaluacije; kompletnost podataka; jasnu i uniformnu definiciju štetnih događaja – ograničenje na „ozbiljne događaje“ (definirane činjenicom potrebne hospitalizacije) koji po svojoj prirodi odgovaraju patofiziološkim mehanizmima sukladnim inhibiciji VEGF-a. Razumno je, također, smatrati da je činjenica ne-eksperimentalnog, nekontroliranog dizajna (što je bilo zadano), u velikoj mjeri „kompenzirana“ provedenim analizama: a) odnosa pojedinih praćenih pokazatelja i rizika štetnih događaja; b) odnosa intenziteta izloženosti liječenju, tj. vremena tijekom kojeg su bolesnici povremeno izlagani bevacizumabu i pojedinih laboratorijskih pokazatelja; i c) odnosa sistemske izloženosti bevacizumabu/koncentracija VEGF-a i pojedinih praćenih pokazatelja.

U cjelini, rezultati prikazanog istraživanja podupiru zaključak da se strukturiranom evaluacijom bolesnika s AMD koji imaju indikaciju za primjenu IVT bevacizumaba u trenutku početka liječenja (probir) i dalje tijekom liječenja (praćenje) može smanjiti rizik štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja. Rezultati također ukazuju da bi tijekom liječenja trebalo posvetiti pozornost i štetnim događajima – krvarenjima, te bolesnike evaluirati i u tom pogledu. Ti se zaključci temelje na opažanjima na nekoliko razina.

Usporedba učestalosti ozbiljnih štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja u kohorti bolesnika liječenih u KB Sveti Duh s literaturnim podacima ukazuje da primjena postupnika smanjuje rizik takvih događaja

Iako sustavni pregled literature nije rezultirao konzistentnim i jednoznačnim procjenama incidencije takvih štetnih događaja, postupkom sustavnog pregleda identificirana je klinička studija (90) koja je po svojim svojstvima posve usporediva promatranoj kohorti (svi bolesnici s AMD, prevalencija hipertenzije i povijesti kardiovaskularnih bolesti, dob, duljina praćena, broj isporučenih doza), osim činjenice da nije, kao kohorta u KB Sveti Duh, sustavno i uniformno evaluirala bolesnike u pogledu rizika kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja (u kohorti u KB Sveti Duh, u 6/74 bolesnika primjena bevacizumaba je barem jednom odgođena zbog procjene previsokog rizika). Usporedba incidencije ozbiljnih štetnih događaja u promatranoj i publiciranoj kohorti, iako neizravno, snažno naznačuje da strukturirani kontinuirani nadzor može sniziti rizik štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja u bolesnika s AMD liječenih IVT bevacizumabom.

Sam postupnik je, kako je naglašeno, definiran u smislu kontrole kardio- i cerebrovaskularnog rizika. U promatranoj kohorti, pomalo neočekivano, uočeni su i ozbiljni štetni događaji – krvarenja. Naime, usporedbe ranibizumaba s placebo/ne anti-VEGF tretmanima (43) (najbrojnije usporedbe nekog anti-VEGF i ne anti-VEGF tretmana) nisu ukazale da IVT anti-VEGF liječenje povećava rizik krvarenja, niti su usporedbe bevacizumaba s ranibizumabom (iako oskudne u pogledu rizika krvarenja) (48) ukazale da se dva lijeka u tom smislu razlikuju. Smatrana su „ozbiljnim štetnim događajima“ jer su rezultirala hospitalizacijom, i po tom svojstvu odgovaraju definiciji „ne-velikih, klinički relevantnih krvarenja“ prema klasifikaciji Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (ISTH, *International Society for Thrombosis and Hemostasis*) (109). Stoga su i ti događaji uzeti u obzir u daljnjoj analizi.

Na temelju sustavnog mjerenja tijekom praćenja bolesnika, više vrijednosti kreatinina nezavisno su združene s rizikom ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja, a više vrijednost kreatinina i D-dimera s rizikom ozbiljnih štetnih događaja – krvarenja. Istodobno, dulje trajanje liječenja IVT bevacizumabom, nezavisno je združeno s višim razinama kreatinina i D-dimera.

Ovi su odnosi detektirani u nizu sukcesivnih multivarijatnih analiza na daljnjoj podskupini od 63 bolesnika (od ukupno 74) koji su primili najmanje 3 a najviše 6 injekcija IVT bevacizumaba. To zahtijeva da se prokomentiraju moguće primjedbe. Prvo, daljnje smanjenje uzorka po kriteriju broja primljenih injekcija moglo je uzrokovati „pristranu selekciju ispitanika“. S tim u vezi valja naglasiti da je po svim svojstvima (demografska i [ko]morbidityetna svojstva, duljina praćenja) ova podskupina bolesnika bila posve slična cjelokupnoj kohorti. Odluka o restrikciji na broj primljenih injekcija od 3 (najmanji broj uopće uzet u razmatranje) do 6 temeljio se na praktičnom tehničkom načelu (bez uvida u svojstva bolesnika) koji je omogućio adekvatno modeliranje podataka: 3, 4, 5 ili 6 injekcija primilo je 23, 12, 10 i 19 bolesnika, odnosno određeni broj primljenih injekcija bio je „zastupljen“ razumnim brojem bolesnika. Broj injekcija veći od 6 bio je u rasponu od 7 do najviše 24 tijekom nekoliko godina, a pojedini brojevi injekcija bili su zastupljeni s po jednim ili dva bolesnika. U situaciji gdje su „broj injekcija“ ili „duljina liječenja“ (kao „vrijeme proteklo od prve injekcije“ do događaja ili prestanka praćenja) mogući pokazatelji „intenziteta“ izloženosti bevacizumabu, a po prirodi su potencijalne „nezavisne longitudinalne varijable“ odnosno potencijalni prediktori mjereni ponovljeno tijekom vremena, analize u generalnim ili generaliziranim linearnim modelima temelje se na pretpostavci da su ti „nasumični“ (*random*) efekti normalno distribuirani. Skupina ispitanika s >6 injekcija predstavlja skupinu ispitanika s odstojećim vrijednostima (*outlier cluster* ili *b-outliers* budući da se odnose na *random* efekte) koja može bitno iskriviti procjene modela. Modeli u koje su ti ispitanici bili uključeni nisu mogli konvergirati, pa su stoga isključeni (110). Drugo, uzorak od 63 bolesnika doista nije veličine koja bi omogućila multivarijatnu analizu s velikim brojem nezavisnih varijabli u modelu. Međutim, svrha cjelokupne analize nije bila identificirati potpuni niz nezavisnih varijabli koje najbolje objašnjavaju varijabilnost zavisnih varijabli (štetnih događaja; praćenih laboratorijskih pokazatelja), već identificirati one nezavisne varijable (ako takve postoje) koje pokazuju univarijatnu i nezavisnu („podešenu“ ili „kontroliranu“ za neke standardne prediktore ishoda) združenost sa zavisnim varijablama, a za koje istodobno postoji i razumljiv ili poznat patofiziološki odnos sa zavisnom varijablom.

Stoga je i cijeli proces građenja modela slijedio jasnu logiku: a) identificirati pojedinačne nezavisne varijable (demografska, [ko]morbiditetna svojstva bolesnika, intenzitet izloženosti bevacizumabu ili praćene laboratorijske parametre) koje pokazuju makar i trend univarijatne združenosti sa zavisnom varijablom; b) u multivarijatni model uključiti takve nezavisne varijable i one (neovisno o statističkoj značajnosti u modelu) za koje je poznato da mogu biti povezane sa zavisnom varijablom („obavezne“ nezavisne varijable); c) konačni model svesti na jednostavan, *parsimonični* model (koji sadrži samo „obavezne“ i „statistički značajne varijable“); d) te uključiti, ako takve postoje, i druge nezavisne varijable koje ne moraju nužno pokazati združenost sa zavisnom varijablom, ali njihovo prisustvo u modelu može povećati sukladnost modela podacima („fit“ modela) kako bi procjene efekata od interesa bile pouzdanije. Treće, u analizama je kao mjera „intenziteta“ ili „izloženosti“ bevacizumabu korišteno „vrijeme proteklo od prve injekcije“ (do događaja ili kraja praćenja), a zapravo vrijeme tijekom kojega su ispitanici (povremeno) izlagani bevacizumabu, a ne „redni broj injekcije“. Razlog je tome činjenica da je varijabla „redni broj injekcije“ sužena na uzak raspon vrijednosti (od 3 do 6), a stvarne razlike između bolesnika zapravo su bile one u duljini trajanja liječenja (izraženo kao „vrijeme proteklo od prve injekcije“) budući da je IVT bevacizumab primjenjivan prema potrebi (prema oftalmološkom nalazu) (*pro re nata*), pa su intervali između injekcija u pojedinaca (ili između dvije injekcije u istog bolesnika) izrazito varirali – od 1-2 mjeseca pa i do godine dana. U patofiziološkom smislu, taj pokazatelj izloženosti je i prikladniji od „rednog broja injekcije“ jer ilustrira vrijeme tijekom kojeg su (povremene) injekcije bevacizumaba inducirale određeni slijed bioloških događaja koji su, u konačnici, rezultirali eventualnim štetnim događajima.

Pod tim okolnostima, rezultati istraživanja pokazali su:

U prvom koraku – a) da su više razine kreatinina (tijekom vremena) nezavisno združene s rizikom ozbiljnih štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja; b) da su više razine kreatinina i D-dimera (tijekom vremena) nezavisno združene s rizikom ozbiljnih krvarenja. Ti nalazi jasno ukazuju da su razine kreatinina i D-dimera i njihova dinamika tijekom vremena pokazatelji koji mogu predvidjeti rizik ozbiljnih štetnih događaja te da ih je opravdano kontinuirano pratiti u bolesnika s AMD koji se liječe IVT bevacizumabom. To je ujedno i prva indikacija laboratorijskih markera rizika združenih s IVT primjenom bevacizumaba.

U drugom koraku – da je duljina liječenja IVT bevacizumabom nezavisno združena s višim razinama kreatinina i višim razinama D-dimera (tijekom vremena liječenja IVT bevacizumabom). Iako posredno, ovi nalazi po prvi puta snažno ukazuju na uzročno-

posljedičnu vezu između duljine/intenziteta ekspozicije IVT bevacizumabu i promjena kreatinina i D-dimera tijekom vremena, a time, u „daljnjem koraku“ i sukladno opažanjima u prethodnoj analizi, na uzročno-posljedičnu vezu između duljine/intenziteta ekspozicije IVT bevacizumabu i rizika kardio-/cerebrovaskularnih događaja i krvarenja.

Nakon IVT primjene, bevacizumab dospijeva u sistemsku cirkulaciju, a to je praćeno sniženjem koncentracija VEGF-a. Između koncentracija VEGF-a i koncentracija kreatinina postoji nezavisna združenost.

Rezultate ovog dijela istraživanja treba sagledati uz određeni oprez, s obzirom na nekoliko ograničenja. Zbog financijskih razloga sistemske koncentracije bevacizumaba i VEGF-a izmjerene su samo „oko“ jedne injekcije i u samo tri vremenske točke – 24 sata prije, 24 sata nakon i 7 dana nakon injekcije. To je spriječilo detaljniju evaluaciju odnosa koncentracija bevacizumaba i VEGF-a, odnosno relacija njihovih koncentracija i vrijednosti pojedinih laboratorijskih pokazatelja. Također, zbog tehničkih razloga/nevoljkosti bolesnika s AMD da pristanu na uzimanje dodatnih uzoraka krvi nisu svi uključeni bolesnici (njih 16/47 ili 34,0%) bolovali isključivo od AMD i uzorci krvi nisu uzeti od svih u sve tri vremenske točke. Međutim, većina bolesnika (66%) bolovala je od AMD te nema razloga smatrati da je udio bolesnika s drugim dijagnozama na bilo koji relevantan način utjecao na odnos sistemskih koncentracija bevacizumaba i VEGF-a, ili njihov odnos s pojedinim laboratorijskim pokazateljima koji su bili sastavni dio standardnog praćenja bolesnika. Također, nije vjerojatno da je činjenica „nekompletnosti podataka“ o koncentracijama bevacizumaba/VEGF-a utjecala na „pristranost selekcije“ – u pojedinim vremenskim točkama uzorkovanja, bolesnici nisu „otpali“ zbog nekih komorbiditetnih ili sigurnosnih razloga, već iz sasvim tehničkih razloga ili osobne nesuradljivosti. Stoga se može smatrati da podatci koji nedostaju, nedostaju po sasvim slučajnom (*at random*) načelu. Opaženi rezultati u skladu su s očekivanjima (111) – nakon IVT primjene, bevacizumab dolazi u sistemsku cirkulaciju, te su koncentracije 24 sata nakon primjene višestruko više nego prije primjene, i dalje višestruko rastu 7. dana nakon primjene, a to prati značajan pad koncentracija VEGF-a. U onkoloških bolesnika koji se liječe bevacizumabom, sistemske koncentracije VEGF surogatni su marker farmakodinamskog učinka (inhibicija angiogeneze) i relevantnim se smatra razlika koncentracija prije i nakon primjene lijeka a ne apsolutne vrijednosti (37). Upravo je to, promjena koncentracije VEGF nakon primjene, dokazano za IVT bevcizumab i u ovom istraživanju.

Ovaj dio istraživanja značajan je i po tome što je, prema našem najboljem znanju, u njemu prvi puta za farmakokinetičku evaluaciju jednog lijeka/proteina u ljudi rabljen *proximity extension assay* (PEA) metoda, a sasvim sigurno je to prvi slučaj detekcije bevacizumaba u sistemskoj cirkulaciji u ljudi ovom tehnikom. Metoda je izabrana zbog visoke specifičnosti i senzitivnosti što joj omogućuje da detektira vrlo male količine proteina – temelji se na detekciji ciljne molekule parom specifičnih protutijela označenih parom DNA nukleotida koje nakon vezivanja na ciljnu molekulu započinju proces stvaranja DNA uzvojnice, a taj se signal zatim pojača djelovanjem DNA polimeraze i očita metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. Metoda se rašireno koristi u nekliničkim istraživanjima za detekciju proteina u uzorcima tkiva ili tjelesnih tekućina malog volumena (58). U ovom istraživanju, metoda nije validirana u usporedbi s ELISA metodom koja se klasično rabi u sličnim istraživanjima (111), a razlozi su isključivo financijske prirode. Međutim, u postupku su rabljena anti-VEGF protutijela po preporuci proizvođača PEA sustava temeljena na opsežnom iskustvu u nekliničkim istraživanjima, dok su za detekciju bevacizumaba probрана protutijela (testirana dva monoklonska protutijela i jedna Fab fragment) s najjasnijim signalom. Mjerenja su provedena u kratkom vremenskom razdoblju svodeći varijabilnost aparata i uvjeta analize na minimum. Svi uzorci mjereni su u triplikatu („tehnički triplikati“), a sporadične ekstremne vrijednosti pojedinačnih mjerenja (odstupaju ≥ 2 puta od preostala dva mjerenja) isključivane su iz analize. S obzirom na navedeno, rezultate je opravdano smatrati pouzdanima. Eksterna validacija opaženih rezultata dolazi iz usporedbe s nedavno objavljenom analizom sistemskih koncentracija bevacizumaba i VEGF-a nakon intravitrealne primjene bevacizumaba temeljena na mjerenjima ELISA metodom (111): a) nakon jednokratne (prve) doze od 1,25 mg bevacizumaba IVT (kao i u ovom istraživanju) u 15 bolesnika s AMD, koncentracije bevacizumaba rasle su tijekom prvih nekoliko dana (mjereno 24 i 72 sata nakon injekcije) i dostigle su vršnu razinu 7. dana nakon injekcije (kao i u ovom istraživanju); b) istodobno, koncentracije VEGF-a su opadale i najnižu razinu (oko 50% početne, baš kao i u ovom istraživanju) dostigle su 7. dana nakon injekcije (kao i u ovom istraživanju); c) sistemske koncentracije VEGF-a pokazale su, baš kao i u ovom istraživanju, izrazitu inter-individualnu varijabilnost.

Treba prokomentirati i činjenicu da su u vremenu 24 sata prije injekcije u pojedinim bolesnika detektirane mjerljive razine bevacizumaba. To ne čudi jer je 27 bolesnika prije injekcije „oko“ koje je bevacizumab mjeren prethodno već primilo barem jednu injekciju. Medijan vremena proteklog od prethodne injekcije iznosio je 3,3 mjeseca a raspon 0,7 do 18 mjeseci. Već

spomenuta analiza sistemskih koncentracija bevacizumaba nakon prve IVT primjene 1,25 mg u bolesnika s AMD (111) pokazala je da se 30 dana nakon primjene u sistemskoj cirkulaciji detektiraju koncentracije na razini od oko 60% vršne vrijednosti (izmjerene 7. dan nakon injekcije). Istodobno, razine VEGF-a su i 30 dana nakon injekcije na razini od oko 50-60% od onih prije injekcije (baš kao i 7. dana). U toj su studiji (111) ispitanici dobili tri uzastopne IVT aplikacije bevacizumaba u razmaku od 30 dana. Nakon 3. injekcije, zabilježena je akumulacija bevacizumaba – vršna koncentracija (7. dana) i najniža koncentracija (30. dana) bile su 80-90% više od odgovarajućih koncentracija nakon prve injekcije. Istodobno, razine VEGF-a su tijekom svih 30 dana bile podjednako niske, na približno istoj razini kao 7. dana nakon prve injekcije (111). Ti podaci ukazuju da se relevantne koncentracije bevacizumaba i sniženje razina VEGF-a inducirano IVT bevacizumabom održavaju vjerojatno i dulje od 30 dana. Neizravno, oni podupiru naš izbor da se u analizi odnosa prema štetnim događajima i praćenim laboratorijskim pokazateljima intenzitet ekspozicije bevacizumabu kvantificira kao „vrijeme proteklo od prve injekcije“, tj. kao vrijeme trajanja liječenja, odnosno kao razdoblje tijekom kojega su povremene IVT doze bevacizumaba, kako se čini, inducirale dugotrajne(ije) sniženje razina VEGF-a.

Evaluaciju odnosa sistemskih koncentracija VEGF-a i praćenih laboratorijskih pokazatelja bila je ograničena na odnos prema razinama kreatinina i D-dimera, jer je za njih prethodno pokazana nezavisna povezanost sa, s jedne strane, trajanjem liječenja bevcizumabom („intenzitetom ekspozicije“), a s druge strane s rizikom ozbiljnih štetnih događaja. Kako je objašnjeno u poglavlju Rezultati, taj je odnos testiran u vremenu 24 sata nakon injekcije, i zbog pragmatičnog i zbog biološkog razloga: u toj vremenskoj točki bio je najveći broj ispitanika s izmjerenim vrijednostima VEGF-a (41, a svi su imali i sve podatke o laboratorijskim mjerenjima), i u tom vremenu već je bilo očita dinamika VEGF-potaknuta injekcijom bevacizumaba. Iako je uzorak relativno malen (41 bolesnik), primjenom iste strategije kao i u već opisanim multivarijantnim modelima, detektirana je nezavisna združenost između koncentracije VEGF-a i razine kreatinina: odnos se čini kompleksnim, budući da je detektiran i linearan i kvadratičan trend promjena kreatinina uz porast VEGF-a – početno, porast koncentracije VEGF-a prati porast razine kreatinina (linearan odnos), a nakon određen razine, daljnji porast koncentracija VEGF-a prati blagi pad koncentracija kreatinina (kvadratičan odnos). No, bez obzira je li odnos dviju varijabli linearan ili kvadratičan (što je teško sa sigurnošću tvrditi, jer je uzorak razmjerno malen), rezultati ipak jasno ukazuju da između dva pokazatelja postoji nezavisna združenost. Na taj način podupiru zaključak da se

bevacizumabom potaknute promjene sistemskih koncentracija VEGF-a odražavaju na razine kreatinina, a one su pak združene s rizikom ozbiljnih štetnih događaja.

Temeljem navedenog, smatramo da smo prikazanim istraživanjem dokazali da je primjena opisanog postupnika (tj. strukturiranog probira na temelju kardio-/cerebrovaskularnog rizika i strukturiranog praćenja tog rizika) u bolesnika s AMD koji se liječe IVT bevacizumabom biološki/patofiziološki opravdana i praktično važna. Na temelju rezultata istraživanja, Klinici za očne bolesti bit će predložena modificirana verzija protokola probira i praćenja bolesnika. Novi protokol nalazi se u prilogu 2. ovog doktorskog rada.

6.3. Kratak osvrt na mehanizme odnosa VEGF-a i kardio-/cerebrovaskularnog rizika

Unatoč sličnoj djelotvornosti u izravnim usporednim RCT-ovima ranibizumaba, bevacizumaba i aflibercepta u neovaskularnoj AMD, postoje značajne razlike u molekularnim strukturama ovih lijekova, što rezultira različitim farmakokinetičkim profilima kao što je sustavna ekspozicija nakon intravitrealne injekcije. U krvotoku, molekule koje imaju Fc dio recikliraju se vezivanjem Fc dijela (kristalizirajući fragment) na FcRn receptore čime su zaštićene od degradacije unutar endosoma (112). Aflibercept i bevacizumab sadrže Fc dio, dok ranibizumab nema tu domenu. Zato je klirens ranibizumaba brži a sustavna ekspozicija najmanja. Bevacizumab se sporije eliminira i nakuplja se s ponavljanim doziranjem. Aflibercept se manje akumulira od bevacizumaba, ali mu je razina sustavne ekspozicije veća od razine sustavne ekspozicije bevacizumabu. Ranibizumab ima malo učinaka na slobodne koncentracije VEGF u plazmi, dok bevacizumab značajno smanjuje slobodni plazmatski VEGF (111). U studiji usporedbe bevacizumaba i ranibizumaba, u kojoj je mjereno slobodni VEGF, također je nađena značajna redukcija slobodnog VEGF-a nakon bevacizumaba u odnosu na mjerene vrijednosti slobodnog VEGF-a nakon ranibizumaba (81, 82). Aflibercept pak pokazuje najveću redukciju slobodnog VEGF-a u plazmi, najvjerojatnije zbog najjačeg afiniteta za plazmatski VEGF (113). Registracijska i komparativna ispitivanja ranibizumaba i aflibercepta ne ukazuju na statistički značajno povišeni rizik ATE, no postoje naznake da bi se štetni događaji uočili većim brojem uključenih ispitanika i dužim praćenjem. U drugoj godini praćenja ispitivanja ranibizumaba u dijabetičkom makularnom edemu, uočena je neravnoteža smrtnih ishoda i KV događaja kod viših doza, što je rezultiralo odobrenjem niže

doze od 0,3 mg od strane FDA (111). U drugoj godini praćenja ispitivanja aflibercepta u liječenju dijabetičkog makularnog edema, uočena je slično viša incidencija smrtnih ishoda kod kumulativno viših doza (111). Ti štetni događaji možebitno su povezani sa smanjenjem razina VEGF-a u cirkulaciji.

Podaci o cirkulirajućim razinama VEGF-a i rizika od kardiovaskularne bolesti su oprečna, kako u animalnim modelima tako i u ljudi.

Animalnim modelima je pokazano da inhibicija angiogeneze smanjuje progresiju plaka i puno je studija koje potvrđuju proaterogenu ulogu VEGF-a (114). Suprotno tome, u jednoj studiji (115) transfer gena koji kodira VEGF nije imao utjecaja na progresiju ateroskleroze. Winnik et al. su pokazali da se sistemskom inhibicijom VEGF-a ubrzava proces ateroskleroze, dok je u drugom eksperimentalnom modelu pokazano da VEGF štiti vaskulaturu od aterosklerotskih promjena u ranom stadiju te bolesti (116).

U zdravih pojedinaca, niske razine fiziološki cirkulirajućeg VEGF moduliraju tonus vaskulature i krvni tlak putem stimulacije stvaranja dušičnog oksida. Hipoksija stimulira VEGF ekspresiju; tako se povišene razine VEGF-a u cirkulaciji mogu očekivati kao posljedica ishemije povezane s aterosklerozom (117). S druge strane, više razine VEGF-a kompenzatorno potiču neovaskularizaciju ciljnih organa kao odgovor na ishemiju, štiteći tako ciljne organe od kliničke pojave kardiovaskularne bolesti. Ove promjene mogu se shvatiti i kao reparatorni proces i odgovor na oštećenje vaskulature ili endotelijalnu disfunkciju (118). Tako transfer VEGF gena inhibira zadebljanje medije i potiče vaskularnu remodelaciju. Visoke razine cirkulirajućeg VEGF povezuju se s boljom sistoličkom funkcijom i remodelacijom miokarda u dijabetičara s povišenim krvnim tlakom. Paradoksalno pak, VEGF potiče progresiju ateroskleroze putem pojačavanja proupalne infiltracije plaka i neovaskularizacije plaka. Da li je VEGF odgovor protektivan ili patološki vjerojatno ovisi o pokretanju regulacijskih mehanizama VEGF-a u određeno vrijeme i u određenim okolnostima (117).

VEGF se već duže vremena u literaturi povezuje s kardiovaskularnim bolestima. U koronarnoj bolesti je primijećeno otpuštanje VEGF-a iz trombocita tijekom procesa nastanka ugruška, kao i detekcija povećane mRNA ekspresije u uzorcima infarkta miokarda, ali ne i u normalnom tkivu. To povećanje nije nedvojbeno pokazano za razine VEGF-a u krvi, niti je postignut konsenzus oko promjene razina VEGF-a u različitim kliničkim stanjima (119). Mjerenjem razina VEGF-a u bolesnika s koronarnom bolešću i u kontrolnoj skupini uočeno je da su početne razine VEGF-a niže u bolesnih u odnosu na zdrave kontrole. Nakon perkutane koronarne revaskularizacije došlo je do porasta razina VEGF-a. Autori zaključuju o pozitivnoj

ulozi VEGF-a u uspješnoj revaskularizaciji, kao i o ulozi prediktora u prognozama ishoda koronarne bolesti (119). U ispitivanju VEGF-a u perifernoj vaskularnoj bolesti (120) u usporedbi sa zdravim kontrolama, povišene razine VEGF-a bile su prediktor lošije prognoze i težeg oblika bolesti.

Objavljena je i velika epidemiološka studija povezanosti cirkulirajućih razina VEGF u krvi s kardiovaskularnim događajima u kohorti iz Framingham Heart Study (114) (n=3041). Autori objavljuju da je povezanost nelinearnog, obrnutog U-oblika, kakva se relativno rijetko viđa u znanstvenoj literaturi iz područja biologije. Taj oblik vrlo vjerojatno održava kompleksnost molekularnih i bioloških učinaka molekule VEGF-a i aktivacije/inaktivacije njezinih receptora.

Stoga su potrebna daljnja istraživanja koja će rasvijetliti tu kompleksnost signalizacije i promjena koncentracija te pronaći modele koji će reflektirati procese u tkivima i detektirati i druge potencijalne biomarkere kao prediktore kardiovaskularnih štetnih događaja odnosno rizične faktore kojima bi se selekcionirali bolesnici prije kliničke manifestacije te tako održali omjer koristi i rizika pozitivnim.

7. ZAKLJUČAK

Senilna makularna degeneracija je progresivna kronična bolest retine, a neovaskularni oblik koji je karakteriziran pojavom procesa angiogeneze, brzo dovodi do gubitka vida. Prepoznavanje ključne uloge VEGF-a u patogenezi neovaskularizacije dovelo je do razvoja VEGF inhibitora, potentne intravitrealne terapije. Iako najčešće primjenjivan u svijetu, IVT bevacizumab nema regulatorno odobrenje u ovoj indikaciji (off-label). Sistemske nuspojave IVT bevacizumaba dosada su evaluirane sustavnim pregledima i/ili meta-analizama RCT-ova. Zbog ograničenja (broj ispitanika, dužina praćenja, heterogenost uključenih/isključenih kriterija) publiciranih ispitivanja, nerandomizirane, kontrolirane/nekontrolirane, kohortne i opservacijske studije potencijalni su dodatan izvor informacija o KV/CV rizicima primjene ove terapije.

Istraživanje provedeno u sklopu izrade ovog doktorskog rada sastoji se od dva dijela. Prvi dio čini sustavni pregled i meta-analize literaturnih podataka koji se odnose na problem kardio-/cerebrovaskularnog rizika združenog s intravitrealnom primjenom (IVT) bevacizumaba u bolesnika s AMD i obuhvatio je randomizirane kontrolirane kliničke studije, nerandomizirane kontrolirane kliničke studije, nekontrolirane kohortne kliničke studije te (farmako)epidemiološke studije, odnosno opservacijske studije. Drugi dio je prospektivno nekontrolirano opservacijsko ispitivanje sigurnosti intravitrealne primjene bevacizumaba u kohorti bolesnika liječenih u periodu od 3 godine u KB Sveti Duh. Uz primjenu postupka (prilog 1.) probira praćenje je obuhvatilo slijedeće ishode/karakteristike: svi neželjeni događaji, kardiovaskularni/cerebrovaskularni događaji, ostali komorbiditet, broj primijenjenih injekcija, vremenski razmaci između pojedinih injekcija te ukupno trajanje liječenja, a 24 sata prije i 24 sata nakon svake primjene bevacizumaba - broj leukocita, hemoglobin, D-dimer, troponin, urea, kreatinin, C-reaktivni protein, te proteini u urinu određivani test trakom. U bolesnika koji su pristali na dodatno vađenje krvi, ispitivanje je uključilo i procjenu koncentracija bevacizumaba i VEGF-a u sistemske cirkulaciji nakon IVT primjene bevacizumaba.

U prvom dijelu, u konačnu ocjenu rizika sustavnim pregledom literature uključeno je 10 RCT-ova, 1 nerandomizirana klinička studija, 2 stratificirane kohorte i 2 nekontrolirane kohorte primjenom ocjenskih ljestvica, inače namijenjenih ocjeni djelotvornosti, a ovdje modificiranih za evaluaciju izvještaja o sigurnosti primjene terapije. Zaključno, ne postoje RCT-ovi koji bi omogućili procjenu kardio-/cerebrovaskularnog rizika združenog s IVT bevacizumabom u odnosu na ne anti-VEGF tretmane ili u odnosu na pegaptanib. Usporedbe s

ranibizumabom temelje se na ukupno malom broju ispitanika i događaja, pa su sve procjene neprecizne i varijabilne, te stoga ne omogućuju pouzdane zaključke. Imajući na umu inherentno ograničenu pouzdanost opservacijskih studija i svojstva prikazanih rezultata, studije obuhvaćene ovim sustavnim pregledom ostavljaju visoku razinu nesigurnosti i ne omogućuju pouzdan zaključak o riziku kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja združenih s primjenom bevacizumaba u odnosu na druge tretmane u bolesnika s AMD

Ukupno, u objavljenim kliničkim studijama, učestalost štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja bila je izrazito varijabilna i ne omogućuje jedinstvenu procjenu (od 0% do najviše 12,4% za ATE sa širokim intervalima pouzdanosti). Činjenica da je meta-regresija *smrti bilo kojeg uzroka* ukazala na nezavisnu (istodobnu) združenost veće stope događaja s duljim trajanjem liječenja i većim brojem isporučenih doza ukazuje na moguću povezanost smrtnosti i primjene IVT bevacizumaba.

U drugom dijelu ispitivanja, od ukupno 597 bolesnika liječenih IVT bevacizumabom u periodu praćenja, njih 74 uključeno je u konačnu analizu zbog uključnih/isključnih kriterija. Sustavom probira nisu uključeni bolesnici s teškom nereguliranom hipertenzijom, značajnom proteinurijom, bolesnici koji su podvrgnuti operativnim zahvatima unutar mjesec dana prije početka liječenja ili je operativni zahvat planiran u razdoblju u kojem se provodi liječenje, bolesnici s aktivnim krvarenjem, akutnom bolešću, ili oni koji se liječe sustavnom primjenom bevacizumaba. Svi su bolesnici kontinuirano praćeni u smislu kliničke i laboratorijske evaluacije. Uspoređena je kohorta u KB Sveti Duh s literaturnim podacima: u literaturnoj kohorti bez strukturiranog probira i praćenja u svrhu procjene rizika, incidencija srčanih/krvožilnih događaja bila je 12,4% a u kohorti Sveti Duh 4,1%. Razlika te dvije proporcije iznosi -8,3% (95% CI -17,0 do 0,00; $p=0,057$) i podupire hipotezu da se primjenom probira i kontinuirane procjene rizika u bolesnika s AMD koji se liječe IVT bevacizumabom može smanjiti rizik ozbiljnih štetnih kardio-/cerebrovaskularnih događaja. Osim toga, zabilježeno je i 5 ozbiljnih događaja tipa ne-okularnih krvarenja što je bilo neočekivano – i postupnik probira i praćenja kao i provedeni sustavni pregled literature bili su usmjereni prvenstveno na praćenje/kontrolu kardio-/cerebrovaskularnog rizika. U analiziranoj literaturi nije nađena niti jedna publikacija koja bi po strukturi i svojstvima odgovarala prikazanoj kohorti, pa nije bilo usporedbe s literaturnim podacima.

U nizu generaliziranih linearnih mješovitih modela analizirani su mogući prediktori pojave štetnih događaja. Više vrijednosti kreatinina, koje se prema postupniku probira/nadzora nad bolesnicima koji se liječe IVT bevacizumabom u KB Sveti Duh kontinuirano prate, kao i dulje

trajanje liječenja IVT bevacizumabom, nezavisno su združene s većim rizikom ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja. Više vrijednosti kreatinina i više vrijednosti D-dimera, koji se prema istom protokolu sustavno prate, nezavisno su združene s većim rizikom krvarenja. Dulje vrijeme trajanja (povremene) izloženosti IVT bevacizumabu nezavisno je združeno s višim razinama kreatinina i D-dimera tijekom vremena. U ovaj dio studije uključeno je 47 ispitanika koji su dali informirani pristanak za dodatne uzroke krvi, većinom bolesnici s AMD, uz znatnu zastupljenost (27,7%) bolesnika s dijabetičkom retinopatijom. Određivani su koncentracija VEGF-a i bevacizumaba u sistemskoj cirkulaciji metodom PEA koja je rašireno korištena u pretkliničkim istraživanjima i prema našem najboljem znanju, prvi puta ovdje primijenjena za farmakokinetičku evaluaciju jednog lijeka u ljudi, a sasvim sigurno je ovo prvi slučaj detekcije bevacizumaba i VEGF-a u sistemskoj cirkulaciji u ljudi ovom tehnikom. Metoda je izabrana zbog visoke specifičnosti i senzitivnosti što joj omogućuje da detektira vrlo male količine proteina – temelji se na detekciji ciljne molekule parom specifičnih protutijela označenih parom DNA nukleotida koje nakon vezivanja na ciljnu molekulu započinju proces stvaranja DNA uzvojnice, a taj se signal zatim pojača djelovanjem DNA polimeraze i očita metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

Zapažen je linearan odnos pada koncentracije VEGF-a s porastom koncentracije bevacizumaba - za porast koncentracije bevacizumaba od 20 ng/mL, koncentracija VEGF-a opada za 13,2%. Opaženi odnos između sistemskih koncentracija bevacizumaba i VEGF-a razumljiv je sa stanovišta mehanizma djelovanja bevacizumaba, no valja uočiti da je opažen nakon IVT primjene svega 1,25 mg bevacizumaba.

Od svih praćenih laboratorijskih parametara, jedino je za koncentracije kreatinina identificiran odnos spram koncentracija VEGF-a. Uz podešenje za spol, odnos serumskog kreatinina i koncentracije VEGF-a je složen: postoji značajan linearni trend porasta kreatinina uz više vrijednosti VEGF-a, ali istodobno postoji i značajan kvadratni trend – uz porast vrijednosti VEGF-a, vrijednosti kreatinina prvo rastu a zatim opadaju.

Kompleksan odnos je uočen i u publikaciji kohorte iz Framingam Heart Study (114) povezanosti cirkulirajućih razina VEGF i rizika kardiovaskularnih štetnih događaja koji je nelinearnog, obrnutog U-oblika, kakva se relativno rijetko viđa (zbog dizajna eksperimenata i statističke analize koja je uglavnom fokusirana na linearne združenosti). Taj oblik vrlo vjerojatno održava kompleksnost molekularnih i bioloških učinaka molekule VEGF-a i aktivacije/inaktivacije njezinih receptora.

Pouzdana procjena trebalo bi tražiti u randomiziranim kontroliranim ispitivanjima dugog praćenja velikog broja ispitanika liječenih IVT bevacizumabom, koje nije realno očekivati u situaciji kada na tržištu postoji više terapijskih opcija, dok se intenzivno proučavaju i pametne molekule i ciljana terapija usmjerena i specifičnija za bolest od anti-VEGF principa, a događaji od interesa su rijetki. Financijsko opterećenje bilo bi nesagledivo, dobit zanemariva, stoga nije za očekivati da će farmaceutske kompanije, koje su i dalje vodeći izvor financiranja ovakvih studija, investirati u tom smjeru. IVT bevacizumab kao terapijska opcija će sigurno još neko vrijeme najprimjenjivija u liječenju AMD, barem u zemljama u kojima *off-label* terapijski pristup, ako u istoj indikaciji ima odobren lijek, nije zakonom zabranjen. Stoga je predloženi postupnik probira razuman način pomnog praćenja bolesnika i odabir onih koji će imati najviše koristi od liječenja svodeći štetne događaje tijekom terapije na prihvatljivi minimum i održavajući omjer koristi i rizika pozitivnim.

8. KRATKI SADRŽAJ

Tema ove doktorske disertacije je minimizacija rizika primjene IVT bevacizumaba od sustavnih neželjenih događaja u liječenju AMD. Učinjen je sustavni pregled svih publiciranih kliničkih studija kojim se ne može utvrditi da li postoji i koliki je rizik KV/CV događaja. Evaluirana je kohorta bolesnika liječenih u KBSD s primjenom postupnika u kojoj je nađeno 4,1% KV/CV događaja (vs. 12,4% u sličnoj kohorti bez probira u literaturnoj kontroli) i 4,1% ne-okularnih krvarenja. Više vrijednosti kreatinina i dulje trajanje liječenja IVT bevacizumabom nezavisno su združeni s većim rizikom ozbiljnih kardio-/cerebrovaskularnih štetnih događaja. Više vrijednosti kreatinina i više vrijednosti D-dimera nezavisno su združene s većim rizikom krvarenja. Dulje vrijeme trajanja (povremene) izloženosti IVT bevacizumabu nezavisno je združeno s višim razinama kreatinina i D-dimera tijekom vremena. Koncentracije VEGF-a i bevacizumaba određivanih PEA metodom povezane su linearno - porast koncentracije bevacizumaba dovodi do pada koncentracije VEGF-a. Opaženi odnos između sistemskih koncentracija bevacizumaba i VEGF-a očekivan je, no valja uočiti da je opažen nakon IVT primjene svega 1,25 mg bevacizumaba. VEGF pokazuje kompleksan odnos koji odražava kompleksnu molekularnu biologiju molekule i brojne (pato)fiziološke učinke koji se još moraju detaljnije istraživati. Predloženi postupnik mjera je minimizacije rizika sustavnih štetnih događaja intravitrealno primijenjenoga bevacizumaba i služi odabiru bolesnika u kojih će omjer koristi i rizika terapije biti povoljan.

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU

Systemic exposure, systemic adverse reactions and risk minimization measures of bevacizumab applied intravitreally in senile macular degeneration treatment

Ivana Mikačić

The main objective of this doctoral dissertation is risk minimisation measures of systemic adverse events of IVT bevacizumab in AMD treatment. We did a systematic review of all published clinical studies and, based on the results, we cannot determine whether IVT bevacizumab affects cardio-/cerebrovascular risk and in which direction. Treated patients were evaluated through a 3-year period at University Hospital Sveti Duh with selection protocol applied. Adverse cardio-/cerebrovascular events and non-ocular bleeding events occurred each in 4.1% patients (vs. 12.4% patients in bibliographic control). Higher serum creatinine levels and longer IVT bevacizumab treatment were independently associated with

higher cardio-/cerebrovascular adverse event risk. Higher serum creatinine and D-dimer levels were independently associated with higher bleeding risk. Longer treatment exposure was independently associated with higher serum creatinine and D-dimer levels in time. VEGF and bevacizumab plasma concentrations, measured by PEA, were associated in linear relationship – increase in bevacizumab concentration decreased VEGF concentration. This is in accordance with the known mechanism of action, but achieved after intravitreal application of only 1.25 mg bevacizumab. VEGF had shown complex relationship with measured laboratory parameters, which mirrors complex (patho)-physiological and molecular biology, yet to be elucidated. The recommended selection protocol is the risk minimisation measure for IVT bevacizumab and could be a useful tool for patients with positive benefit/risk ratio in off-label setting.

10. POPIS LITERATURE

1. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012;379(9827):1728-38.
2. Blumenkranz MS. Pharmacotherapy of Age-Related Macular Degeneration. 2013. U: *Retina*. Saunders. 5. izd:1213-55.
3. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*. 2001;108(4):697-704.
4. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology*. 1999;106(6):1049-55.
5. Kawasaki R, Yasuda M, Song SJ, Chen SJ, Jonas JB, Wang JJ, et al. The prevalence of age-related macular degeneration in Asians: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2010;117(5):921-7.
6. Laude A, Cackett PD, Vithana EN, Yeo IY, Wong D, Koh AH, et al. Polypoidal choroidal vasculopathy and neovascular age-related macular degeneration: same or different disease? *Progress in retinal and eye research*. 2010;29(1):19-29.
7. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2007;114(2):253-62.
8. Wang JJ, Rochtchina E, Lee AJ, Chia EM, Smith W, Cumming RG, et al. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 2007;114(1):92-8.
9. Johnson LV, Anderson DH. Age-related macular degeneration and the extracellular matrix. *The New England Journal of Medicine*. 2004;351(4):320-2.
10. Seddon JM, Reynolds R, Yu Y, Daly MJ, Rosner B. Risk models for progression to advanced age-related macular degeneration using demographic, environmental, genetic, and ocular factors. *Ophthalmology*. 2011;118(11):2203-11.
11. Vine AK, Stader J, Branham K, Musch DC, Swaroop A. Biomarkers of cardiovascular disease as risk factors for age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2005;112(12):2076-80.
12. Kalayoglu MV, Bula D, Arroyo J, Gragoudas ES, D'Amico D, Miller JW. Identification of *Chlamydia pneumoniae* within human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 2005;243(11):1080-90.
13. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of ophthalmology*. 2003;48(3):257-93.
14. Fariss RN, Apte SS, Olsen BR, Iwata K, Milam AH. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is a component of Bruch's membrane of the eye. *The American Journal of Pathology*. 1997;150(1):323-8.
15. Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, et al. Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9764-9.
16. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheres DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*. 1995;270(5241):1500-2.
17. Miller JW. Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *The American Journal of Pathology*. 1997;151(1):13-23.
18. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 5):853-65.
19. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385-9.
20. Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, Neale BM, Daly MJ, Seddon JM. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nature genetics*. 2007;39(10):1200-1.

21. Fagerness JA, Maller JB, Neale BM, Reynolds RC, Daly MJ, Seddon JM. Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. *European journal of human genetics* : EJHG. 2009;17(1):100-4.
22. Reynolds R, Rosner B, Seddon JM. Serum lipid biomarkers and hepatic lipase gene associations with age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2010;117(10):1989-95.
23. Chen W, Stambolian D, Edwards AO, Branham KE, Othman M, Jakobsdottir J, et al. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(16):7401-6.
24. Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, Sobrin L, Parker M, Raychaudhuri S, et al. Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(16):7395-400.
25. McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, Dasari S, Klaver CC, Vingerling JR, et al. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Human mutation*. 2011;32(12):1407-16.
26. Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, Ripke S, Thorleifsson G, Tan PL, et al. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. *Human molecular genetics*. 2011;20(18):3699-709.
27. Klein R, Davis MD, Magli YL, Segal P, Klein BE, Hubbard L. The Wisconsin age-related maculopathy grading system. *Ophthalmology*. 1991;98(7):1128-34.
28. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*. 2006;113(2):260-6.
29. Age-Related Eye Disease Study Research G. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9. *Archives of ophthalmology*. 2001;119(10):1439-52.
30. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology*. 1986;104(5):694-701.
31. Yannuzzi LA. Indocyanine green angiography: a perspective on use in the clinical setting. *American journal of ophthalmology*. 2011;151(5):745-51 e1.
32. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991;254(5035):1178-81.
33. Schmitz-Valckenberg S, Steinberg JS, Fleckenstein M, Visvalingam S, Brinkmann CK, Holz FG. Combined confocal scanning laser ophthalmoscopy and spectral-domain optical coherence tomography imaging of reticular drusen associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1169-76.
34. Jorzik JJ, Bindewald A, Dithmar S, Holz FG. Digital simultaneous fluorescein and indocyanine green angiography, autofluorescence, and red-free imaging with a solid-state laser-based confocal scanning laser ophthalmoscope. *Retina*. 2005;25(4):405-16.
35. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer*. 2011;2(12):1097-105.
36. Macugen - *European public assessment report (EPAR)*. *European Medicines Agency*. EMEA/H/C/000620. 2006. [pristupljeno: 02.10.2015.] Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000620/WC500026218.pdf.
37. Lucentis - *European public assessment report (EPAR)* *European Medicines Agency*. EMEA/H/C/000715. 2007.[pristupljeno: 12.10.2015.] Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000715/WC500043550.pdf.
38. Eylea - *European public assessment report (EPAR)*: *European Medicines Agency*; . [pristupljeno: 02.10.2016.] Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002392/WC500135744.pdf.

39. Avastin *European public assessment report (EPAR)*. European Medicines Agency. EMEA/H/C/000582. 2006. [pristupljeno: 02.10.2015.] Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000582/WC500029262.pdf.
40. International Council of Ophthalmology. Section 21 Ophthalmological Preparations Bevacizumab - Addition. Rep. World Health Organization 2013.
41. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology*. 2005;112(6):1035-47.
42. Stafford RS. Regulating off-label drug use--rethinking the role of the FDA. *The New England Journal of Medicine*. 2008;358(14):1427-9.
43. Thulliez M, Angoulvant D, Le Lez ML, Jonville-Bera AP, Pisella PJ, Gueyffier F, et al. Cardiovascular events and bleeding risk associated with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibodies: systematic review and meta-analysis. *JAMA ophthalmology*. 2014;132(11):1317-26.
44. Qian J, Lu Q, Tao Y, Jiang YR. Vitreous and plasma concentrations of apelin and vascular endothelial growth factor after intravitreal bevacizumab in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Retina*. 2011;31(1):161-8.
45. Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, Wada M, Takahashi K, Nishimura T. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab. *The British journal of ophthalmology*. 2010;94(9):1215-8.
46. Sutton AJ, Cooper NJ, Lambert PC, Jones DR, Abrams KR, Sweeting MJ. Meta-analysis of rare and adverse event data. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*. 2002;2(4):367-79.
47. Solomon SD, Lindsley K, Vedula SS, Krzystolik MG, Hawkins BS. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;8:CD005139.
48. Moja L, Lucenteforte E, Kwag KH, Bertele V, Campomori A, Chakravarthy U, et al. Systemic safety of bevacizumab versus ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;9:CD011230.
49. Kodjikian L, Decullier E, Souied EH, Girmens JF, Durand EE, Chapuis FR, et al. Bevacizumab and ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: an updated meta-analysis of randomised clinical trials. *Graefes' archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2014;252(10):1529-37.
50. Chen G, Li W, Tzekov R, Jiang F, Mao S, Tong Y. Bevacizumab versus ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Retina*. 2015;35(2):187-93.
51. Schmid MK, Bachmann LM, Fas L, Kessels AG, Job OM, Thiel MA. Efficacy and adverse events of aflibercept, ranibizumab and bevacizumab in age-related macular degeneration: a trade-off analysis. *The British journal of ophthalmology*. 2015;99(2):141-6.
52. Wang WJ, Chen J, Zhang XL, Yao M, Liu XY, Zhou Q, et al. Bevacizumab versus ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: a Meta-analysis. *International journal of ophthalmology*. 2015;8(1):138-47.
53. Scott LJ, Chakravarthy U, Reeves BC, Rogers CA. Systemic safety of anti-VEGF drugs: a commentary. *Expert opinion on drug safety*. 2015;14(3):379-88.
54. Higgins JPT, Altman DG, Sterne JAC (editors). Chapter 8: Assessing risk of bias in included studies. In: Higgins JPT, Green S (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 (updated March 2011). The Cochrane Collaboration, 2011. Available from www.cochrane-handbook.org.
55. Wells G, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses [cited 2015 Feb 01]. Available from: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp.
56. Higgins JPT, Deeks JJ (editors). Chapter 7: Selecting studies and collecting data. In: Higgins JPT, Green S (editors), *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0

(updated March 2011). The Cochrane Collaboration, 2011. Available from www.cochrane-handbook.org.

57. Borenstein M HL, Higgins JPT, Rothstein HR. Introduction to meta-analysis: Wiley, Chichester; 2009.
58. Lundberg M, Eriksson A, Tran B, Assarsson E, Fredriksson S. Homogeneous antibody-based proximity extension assays provide sensitive and specific detection of low-abundant proteins in human blood. *Nucleic acids research*. 2011;39(15):e102.
59. Potter MJ, Claudio CC, Szabo SM. A randomised trial of bevacizumab and reduced light dose photodynamic therapy in age-related macular degeneration: the VIA study. *The British journal of ophthalmology*. 2010;94(2):174-9.
60. Sacu S, Michels S, Prager F, Weigert G, Dunavoelgyi R, Geitzenauer W, et al. Randomised clinical trial of intravitreal Avastin vs photodynamic therapy and intravitreal triamcinolone: long-term results. *Eye (London, England)*. 2009;23(12):2223-7.
61. Subramanian ML, Abedi G, Ness S, Ahmed E, Fenberg M, Daly MK, et al. Bevacizumab vs ranibizumab for age-related macular degeneration: 1-year outcomes of a prospective, double-masked randomised clinical trial. *Eye (London, England)*. 2010;24(11):1708-15.
62. Weigert G, Michels S, Sacu S, Varga A, Prager F, Geitzenauer W, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy versus photodynamic therapy plus intravitreal triamcinolone for neovascular age-related macular degeneration: 6-month results of a prospective, randomised, controlled clinical study. *British Journal of Ophthalmology*. 92(3):356-60.
63. Schmid-Kubista KE, Krebs I, Gruenberger B, Zeiler F, Schueller J, Binder S. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for exudative neovascular age-related macular degeneration. The BEAT-AMD-Study. *The British journal of ophthalmology*. 2009;93(7):914-9.
64. Modarreszadeh M, Naseripour M, Ghasemi-Falavarjani K, Nikeghbali A, Hashemi M, Parvaresh MM. Two Different Doses of Intravitreal Bevacizumab for Treatment of Choroidal Neovascularization Associated with Age-related Macular Degeneration. *Journal of ophthalmic & vision research*. 2008;3(2):102-7.
65. Riazi-Esfahani M, Ahmadi H, Faghihi H, Piri N, Taei R, Karkhaneh R, et al. Intravitreal Bevacizumab versus Combined Bevacizumab and Triamcinolone Acetonide for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Journal of ophthalmic & vision research*. 2008;3(2):95-101.
66. Datskeris I, Kontadakis GA, Diamanti R, Datskeris I, Pallikaris IG, Theodossiadi P, et al. Prospective Comparison of Low-Fluence Photodynamic Therapy Combined with Intravitreal Bevacizumab versus Bevacizumab Monotherapy for Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration. *Seminars in ophthalmology*. 2013.
67. Ahmadi H, Taei R, Riazi-Esfahani M, Piri N, Homayouni M, Daftarian N, et al. Intravitreal bevacizumab versus combined intravitreal bevacizumab and triamcinolone for neovascular age-related macular degeneration: six-month results of a randomized clinical trial. *Retina*. 2011;31(9):1819-26.
68. Biswas P, Sengupta S, Choudhary R, Home S, Paul A, Sinha S. Comparative role of intravitreal ranibizumab versus bevacizumab in choroidal neovascular membrane in age-related macular degeneration. *Indian journal of ophthalmology*. 2011;59(3):191-6.
69. Campbell RJ, Bell CM, Paterson JM, Bronskill SE, Moineddin R, Whitehead M, et al. Stroke rates after introduction of vascular endothelial growth factor inhibitors for macular degeneration: a time series analysis. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1604-8.
70. Campbell RJ, Gill SS, Bronskill SE, Paterson JM, Whitehead M, Bell CM. Adverse events with intravitreal injection of vascular endothelial growth factor inhibitors: nested case-control study. *Bmj*. 2012;345:e4203.
71. Tufail A, Patel PJ, Egan C, Hykin P, da Cruz L, Gregor Z, et al. Bevacizumab for neovascular age related macular degeneration (ABC Trial): multicentre randomised double masked study. *Bmj*. 2010;340:c2459.
72. Group CR, Martin DF, Maguire MG, Ying GS, Grunwald JE, Fine SL, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2011;364(20):1897-908.
73. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research G, Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of

- neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology*. 2012;119(7):1388-98.
74. Krebs I, Schmetterer L, Boltz A, Told R, Vecsei-Marlovits V, Egger S, et al. A randomised double-masked trial comparing the visual outcome after treatment with ranibizumab or bevacizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology*. 2013;97(3):266-71.
75. Lushchik T, Amarakoon S, Martinez-Ciriano JP, van den Born LI, Baarsma GS, Missotten T. Bevacizumab in age-related macular degeneration: a randomized controlled trial on the effect of injections every 4 weeks, 6 weeks and 8 weeks. *Acta ophthalmologica*. 2013;91(6):e456-61.
76. Mahmood S, Roberts SA, Aslam TM, Parkes J, Barugh K, Bishop PN. Routine versus As-Needed Bevacizumab with 12-Weekly Assessment Intervals for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: 92-Week Results of the GMAN Trial. *Ophthalmology*. 2015.
77. Kodjikian L, Souied EH, Mimoun G, Mauget-Faÿsse M, Behar-Cohen F, Decullier E, et al. Ranibizumab versus Bevacizumab for Neovascular Age-related Macular Degeneration: Results from the GEFAL Noninferiority Randomized Trial. *Ophthalmology*. 2013;120(11):2300-9.
78. Li X, Hu Y, Sun X, Zhang J, Zhang M. Neovascular Age-Related Macular Degeneration Treatment Trial Using B. Bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration in China. *Ophthalmology*. 2012;119(10):2087-93.
79. Menon G, Chandran M, Sivaprasad S, Chavan R, Narendran N, Yang Y. Is it necessary to use three mandatory loading doses when commencing therapy for neovascular age-related macular degeneration using bevacizumab? (BeMOc Trial). *Eye (London, England)*. 2013;27(8):959-63.
80. Berg K, Pedersen TR, Sandvik L, Bragadottir R. Comparison of Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration According to LUCAS Treat-and-Extend Protocol. *Ophthalmology*. 2015;122(1):146-52.
81. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, Culliford LA, et al. Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. *Lancet*. 2013;382(9900):1258-67.
82. Investigators IS, Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology*. 2012;119(7):1399-411.
83. Lai TY, Liu DT, Chan KP, Luk FO, Pang CP, Lam DS. Visual outcomes and growth factor changes of two dosages of intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration: a randomized, controlled trial. *Retina*. 2009;29(9):1218-26.
84. El-Mollayess GM, Mahfoud Z, Schakal AR, Salti HI, Jaafar D, Bashshur ZF. Fixed-interval versus OCT-guided variable dosing of intravitreal bevacizumab in the management of neovascular age-related macular degeneration: a 12-month randomized prospective study. *American journal of ophthalmology*. 2012;153(3):481-9 e1.
85. Parodi MB, Iacono P, Menchini F, Sheth S, Polini G, Pittino R, et al. Intravitreal bevacizumab versus ranibizumab for the treatment of retinal angiomatous proliferation. *Acta ophthalmologica*. 2013;91(3):267-73.
86. Barikian A, Mahfoud Z, Abdulaal M, Safar A, Bashshur ZF. Induction with intravitreal bevacizumab every two weeks in the management of neovascular age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*. 2015;159(1):131-7.
87. Curtis LH, Hammill BG, Schulman KA, Cousins SW. Risks of mortality, myocardial infarction, bleeding, and stroke associated with therapies for age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*. 2010;128(10):1273-9.
88. Kemp A, Preen DB, Morlet N, Clark A, McAllister IL, Briffa T, et al. Myocardial infarction after intravitreal vascular endothelial growth factor inhibitors: a whole population study. *Retina*. 2013;33(5):920-7.
89. Ng WY, Tan GS, Ong PG, Cheng CY, Cheung CY, Wong DW, et al. Incidence of myocardial infarction, stroke, and death in patients with age-related macular degeneration treated with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy. *American journal of ophthalmology*. 2015;159(3):557-64 e1.
90. Carneiro AM, Barthelmes D, Falcao MS, Mendonca LS, Fonseca SL, Goncalves RM, et al. Arterial thromboembolic events in patients with exudative age-related macular degeneration treated

- with intravitreal bevacizumab or ranibizumab. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 2011;225(4):211-21.
91. Feng XF, Constable IJ, McAllister IL, Isaacs T. Comparison of visual acuity outcomes between ranibizumab and bevacizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration. *International journal of ophthalmology*. 2011;4(1):85-8.
 92. Landa G, Amde W, Doshi V, Ali A, McGevna L, Gentile RC, et al. Comparative study of intravitreal bevacizumab (Avastin) versus ranibizumab (Lucentis) in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 2009;223(6):370-5.
 93. Li J, Zhang H, Sun P, Gu F, Liu Z-L. Bevacizumab vs ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration in Chinese patients. *International journal of ophthalmology*. 2013;6(2):169-73.
 94. Ozkaya A, Alkin Z. Bevacizumab versus Ranibizumab on As-Needed Treatment Regimen for Neovascular Age-Related Macular Degeneration in Turkish Patients. 2013;2013:151027.
 95. Wong TY, Tikellis G, Sun C, Klein R, Couper DJ, Sharrett AR. Age-related macular degeneration and risk of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Ophthalmology*. 2007;114(1):86-91.
 96. Wu L, Martinez-Castellanos MA, Quiroz-Mercado H, Arevalo JF, Berrocal MH, Farah ME, et al. Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin): results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES). *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology*. 2008;246(1):81-7.
 97. Algrever PV, Steen B, Seregard S, Kvanta A. A prospective study on intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration of different durations. *Acta ophthalmologica*. 2008;86(5):482-9.
 98. Bashshur ZF, Haddad ZA, Schakal A, Jaafar RF, Saab M, Nouredin BN. Intravitreal bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a one-year prospective study. *American journal of ophthalmology*. 2008;145(2):249-56.
 99. Carneiro AM, Falcao MS, Brandao EM, Falcao-Reis FM. Intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration with or without prior treatment with photodynamic therapy: one-year results. *Retina*. 30(1):85-92.
 100. Costagliola C, Romano M, Corte MD, Perrotta R, Menzione M, Rinaldi M, et al. Intravitreal bevacizumab for treatment-naive patients with subfoveal occult choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: a 12-month follow-up study. *Retina*. 2009;29(9):1227-34.
 101. Dunavoelgyi R, Sacu S, Eibenberger K, Palkovits S, Leydolt C, Prunte C, et al. Retreatment with anti-vascular endothelial growth factor therapy based on changes in visual acuity after initial stabilization of neovascular age-related macular degeneration: 3-year follow-up results. *Retina*. 32(8):1471-9.
 102. El-Mollayess GM, Mahfoud Z, Schakal AR, Salti HI, Jaafar D, Bashshur ZF. Intravitreal bevacizumab in the management of neovascular age-related macular degeneration: effect of baseline visual acuity. *Retina*. 33(9):1828-35.
 103. Fong DS, Custis P, Howes J, Hsu J-W. Intravitreal bevacizumab and ranibizumab for age-related macular degeneration a multicenter, retrospective study. *Ophthalmology*. 2010;117(2):298-302.
 104. Mekjavic PJ, Kraut A, Urbancic M, Lenassi E, Hawlina M. Efficacy of 12-month treatment of neovascular age-related macular degeneration with intravitreal bevacizumab based on individually determined injection strategies after three consecutive monthly injections. *Acta ophthalmologica*. 2011;89(7):647-53.
 105. Wong LJ, Desai RU, Jain A, Feliciano D, Moshfeghi DM, Sanislo SR, et al. Surveillance for potential adverse events associated with the use of intravitreal bevacizumab for retinal and choroidal vascular disease. *Retina*. 2008;28(8):1151-8.
 106. Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R, Woodcock J, Brozek J, Helfand M, et al. GRADE guidelines: 8. Rating the quality of evidence--indirectness. *Journal of clinical epidemiology*. 2011;64(12):1303-10.

107. Ioannidis JP. Why most published research findings are false. *PLoS medicine*. 2005;2(8):e124.
108. Loke YK PD, Herxheimer A. Chapter 14: Adverse effects. In: Higgins JPT, Green S (editors), *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 (updated March 2011)*. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from www.cochrane-handbook.org.
109. Schulman S, Kearon C. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *J Thromb Haemost* 2005;3:692–694.
110. Wu L. *Mixed effects models for complex data*. Chapman&Hall CRC 2010: 294-331.
111. Avery RL, Castellarin AA, Steinle NC, Dhoot DS, Pieramici DJ, See R, et al. Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *The British journal of ophthalmology*. 2014;98(12):1636-41.
112. Ternant D, Paintaud G. Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert opinion on biological therapy*. 2005;5 Suppl 1:S37-47.
113. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012;15(2):171-85.
114. Kaess BM, Preis SR, Beiser A, Sawyer DB, Chen TC, Seshadri S, et al. Circulating vascular endothelial growth factor and the risk of cardiovascular events. *Heart*. 2016.
115. Leppanen P, Koota S, Kholova I, Koponen J, Fieber C, Eriksson U, et al. Gene transfers of vascular endothelial growth factor-A, vascular endothelial growth factor-B, vascular endothelial growth factor-C, and vascular endothelial growth factor-D have no effects on atherosclerosis in hypercholesterolemic low-density lipoprotein-receptor/apolipoprotein B48-deficient mice. *Circulation*. 2005;112(9):1347-52.
116. Khurana R, Shafi S, Martin J, Zachary I. Vascular endothelial growth factor gene transfer inhibits neointimal macrophage accumulation in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(6):1074-80.
117. Boonkitticharoen V, Kulapaditharom B, Leopairut J, Kraiphikul P, Larbcharoensub N, Cheewaruangroj W, et al. Vascular endothelial growth factor a and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2008;134(12):1305-11.
118. Felmeden DC, Blann AD, Lip GY. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *European heart journal*. 2003;24(7):586-603.
119. Ramos C, Napoleao P, Selas M, Freixo C, Viegas Crespo AM, Mota Carmo M, et al. Prognostic value of VEGF in patients submitted to percutaneous coronary intervention. *Disease markers*. 2014;2014:135357.
120. Stehr A, Topel I, Muller S, Unverdorben K, Geissler EK, Kasprzak PM, et al. VEGF: a surrogate marker for peripheral vascular disease. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2010;39(3):330-2.

11. KRATKA BIOGRAFIJA

Ivana Mikačić, rođena 1978. godine, nakon završetka gimnazije Lucijana Vranjanina u Zagrebu, upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1996. godine. Diplomirala je 2002. godine. Stažirala je do 2003. godine. Od 2004. do 2008. godine specijalizirala je internu medicinu u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“, a od 2008. godine do 2010. godine specijalizirala je kliničku farmakologiju s toksikologijom. Tijekom specijalizacije upisala je doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Radila je kao odjelni liječnik specijalist na Odjelu kliničke farmakologije s toksikologijom Kliničke bolnice „Sveti Duh“ do 2012. godine kada prelazi na 80% radnog vremena u Agenciju za lijekove i medicinske proizvode u Odjel za odobravanje lijekova. Od 2013. godine hrvatski je predstavnik u Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Europske agencije za lijekove. U tom periodu mijenja udio radnog vremena u Bolnici na 80% i pomoćnica je ravnatelja za kontrolu kvalitete zdravstvene zaštite. Započinje subspecijalizaciju iz nefrologije 2015. godine. Potpuno prelazi na rad u Bolnici u 05/2015. godine, a od 2016. godine vršiteljica je dužnosti zamjenika ravnatelja sve do danas.

12. PRILOZI

PRILOG 1

PODATCI O BOLESNIKU

IME I PREZIME _____ DATUM _____

DOB _____ SPOL M / Ž DATUM POČETKA LIJEČENJA __/__/__

DIJAGNOZA _____

HOSPITALIZACIJA od _____ do _____

DOSADAŠNJE BOLESTI

_____ šećerna bolest

_____ hipertenzija

_____ neurološke bolesti

_____ ostale kardiovaskularne bolesti i bolesti metabolizma

_____ operativni zahvati u posljednjih godinu dana

_____ ostalo (nadopuniti relevantnim anamnestičkim podacima):

NEREGULIRANA TEŠKA HIPERTENZIJA	DA	NE
PROTEINURIJA	DA	NE
OPERATIVNI ZAHVAT, NEDAVNI ILI SE PLANIRA		
U TIJEKU PRIMJENE TERAPIJE	DA	NE
KRVARENJE	DA	NE
AKUTNA BOLEST	DA	NE

u slučaju postojanja bilo kojeg od navedenih stanja terapija se NE SMIJE PRIMIJENITI!

STATUS:

TEMP(ax): _____ RR ___/___ c/p ___/min resp ___/min

neurološki (prisutnost glavobolje, kvantitativnog ili kvalitativnog poremećaja mentalnog statusa orijentacijski): _____

OFTALMOLOŠKI:

LABORATORIJSKI NALAZI:

laboratorijski nalaz i EKG	prije injekcije	nakon injekcije
KKS: L (neu%) E Hb MCV T		
CRP		
D-dimer		
troponin		
K		
Na		
ureja		
kreatinin		
urin obični (proteini 0/+/+/+++)		
ostalo (samo patološki)		
priložiti EKG	DA NE	DA NE

Injekcijske reakcije (opisati ako postoje)

STANJE KOD OTPUSTA:

TEMP(ax):_____ RR___/___ c/p___/min resp_____/min

NEUROLOŠKI I OFTALMOLOŠKI STATUS :

POTPIS ODJELNOG LIJEČNIKA:

POTPIS PREDSTOJNIKA KLINIKE:

PRILOG 2

PODATCI O BOLESNIKU

IME I PREZIME _____ DATUM _____

DOB _____ SPOL M / Ž DATUM POČETKA LIJEČENJA __ / __ / ____

DIJAGNOZA _____

HOSPITALIZACIJA od _____ do _____

DOSADAŠNJE BOLESTI

_____ šećerna bolest

_____ hipertenzija

_____ neurološke bolesti

_____ ostale kardiovaskularne bolesti i bolesti metabolizma

_____ operativni zahvati u posljednjih godinu dana

_____ ostalo (nadopuniti relevantnim anamnestičkim podacima):

NEREGULIRANA TEŠKA HIPERTENZIJA	DA	NE
PROTEINURIJA	DA	NE
OPERATIVNI ZAHVAT, NEDAVNI ILI SE PLANIRA		
U TIJEKU PRIMJENE TERAPIJE	DA	NE
KRVARENJE	DA	NE
AKUTNA BOLEST	DA	NE

u slučaju postojanja bilo kojeg od navedenih stanja terapija se NE SMIJE PRIMIJENITI!

STATUS:

TEMP(ax): _____ RR ___/___ c/p___/min resp_____/min

neurološki (prisutnost glavobolje, kvantitativnog ili kvalitativnog poremećaja mentalnog statusa orijentacijski): _____

OFTALMOLOŠKI:

LABORATORIJSKI NALAZI:

laboratorijski nalaz i EKG	prije injekcije	nakon injekcije
KKS: L (neu%) E Hb MCV T		
D-dimer		
kreatinin		
ostalo		

Injekcijske reakcije (opisati ako postoje)

STANJE KOD OTPUSTA:

TEMP(ax): _____ RR ___/___ c/p___/min resp_____/min

OFTALMOLOŠKI STATUS :

POTPIS ODJELNOG LIJEČNIKA:

POTPIS PREDSTOJNIKA KLINIKE:
