

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Małgorzaty Szurgot

Promotor: prof. dr hab. Walentyna Balwierz

Temat pracy doktorskiej: „Analiza czynników rokowniczych u dzieci ze zwojakiem zarodkowym współczulnym” - monografia

Neuroblastoma (NB) jest nowotworem złośliwym, rozwijającym się z komórek zarodkowych współczulnego układu nerwowego. Jest najczęstszym nowotworem złośliwym u niemowląt i najczęstszym zewnątrzczaszkowym guzem litym u dzieci w ogóle. Etiologia nowotworu pozostaje nieznana. Guz najczęściej zlokalizowany jest w jamie brzusznej, w nadnerczach lub zwojach przykręgosłupowych. Choroba rozpoznawana jest zazwyczaj w 4. stopniu zaawansowania, kiedy obecne są przerzuty odległe. Do znanych, niekorzystnych czynników rokowniczych należą: wiek pacjenta w chwili diagnozy ≥ 1 r., wysoki stopień zaawansowania choroby oraz obecność amplifikacji onkogenu NMYC (amp NMYC). Znaczenie ma także rodzaj budowy histologicznej guza. Dzieci z postacią zlokalizowaną choroby i korzystnymi cechami genetycznymi mają duże szanse na pełne wyleczenie. Obecnie u około 60% wszystkich dzieci z NB można uzyskać remisję choroby. U części niemowląt obserwuje się samoistną regresję guza. Niemniej jednak większość dzieci z NB ma klinicznie agresywną postać choroby ze współczynnikiem przeżycia całkowitego (OS) około 30%. Ponadto pacjenci, którzy przeżyją są narażeni na ryzyko późnych toksyczności związanych z zastosowanym leczeniem.

Guzy neuroblastyczne charakteryzują się dużą niejednorodnością kliniczną, histologiczną i genetyczną, która jest główną przyczyną błędnej diagnozy i kwalifikacji do grupy ryzyka niskiego, pośredniego lub wysokiego oraz słabej odpowiedzi na standardową terapię multimodalną. Heterogenność obrazu klinicznego utrudnia rozpoznanie. Natomiast heterogenność histologiczna i genetyczna guza może być przyczyną nieodpowiednio dostosowanej terapii – zarówno zbyt mało intensywnej, jak i zbyt mocnej.

Pomimo wprowadzenia nowych metod leczenia, w tym chemioterapii w dużych dawkach z autologicznym przeszczepieniem komórek macierzystych szpiku kostnego i specyficznej dla guza immunoterapii, długoterminowe przeżycie pacjentów w grupie wysokiego ryzyka pozostaje wciąż niskie. Wznowa i progresja choroby występują nawet po tak intensywnej i różnorodnej terapii. Leczenie dzieci z NB pozostaje wciąż wyzwaniem dla lekarzy klinicyстів z całego świata. Nadal poszukiwane są nowe, bardziej skuteczne sposoby leczenia ze szczególnym uwzględnieniem biologii molekularnej guza. Wczesne rozpoznanie choroby zwiększa szanse na pełne wyzdrowienie. U pacjentów z grupy wysokiego ryzyka rozwój skutecznych adjuwantowych metod terapeutycznych wydaje się być jedynym realnym sposobem dalszej poprawy wyników leczenia. Szansę dla pacjentów stanowi także terapia spersonalizowana.

NB należy do najbardziej intensywnie badanych nowotworów wieku dziecięcego i pozostaje jednym z najtrudniejszych zadań w onkologii dziecięcej. Chociaż znanych jest już wiele czynników prognostycznych, precyzyjne określenie rokowania w tej chorobie nadal nie jest możliwe. Wysiłki badaczy koncentrują się na jak najlepszym poznaniu biologii guza i zidentyfikowaniu molekularnych punktów uchwytu dla nowych leków działających wybiórczo. Oprócz dokładniejszego zrozumienia biologii NB, konieczna jest również weryfikacja znanych i poszukiwanie nowych czynników prognostycznych wpływających na wyniki leczenia. Potrzebne są bowiem nowe skuteczne terapie dla dzieci z grupy wysokiego ryzyka i ze wznową NB.

Retrospektywna analiza ocenianych w pracy wielu różnych parametrów oraz metod terapii u dzieci z NB może przyczynić się do wyłonienia nowych czynników rokowniczych, istotnie wpływających na przebieg choroby. Pozwoli to na bardziej precyzyjne określenie rokowania u dzieci z NB i poprawi stratyfikację pacjentów do odpowiednich grup terapeutycznych, różniących się intensywnością i sposobem zastosowanego leczenia. Optymalizacja metod diagnozowania i leczenia może spowodować dalszą poprawę wyleczalności i zmniejszenie ryzyka wystąpienia zagrażających życiu powikłań.

Celem pracy była ocena znanych i poszukiwanie nowych czynników prognostycznych u dzieci z NB, co w przyszłości będzie mogło zostać wykorzystane do opracowania bardziej optymalnych sposobów kwalifikacji pacjentów do grup ryzyka i związanych z nimi odpowiednich metod terapeutycznych.

W przedstawionej pracy na podstawie zgromadzonych danych dokonano oceny istotności statystycznej powiązania różnych klinicznych, biochemicznych, histologicznych i biologicznych czynników z przeżyciem pacjentów z NB.

W badanej grupie 180 dzieci stwierdzono przewagę pacjentów o niekorzystnych markerach prognozy. Większość objętych badaniem dzieci była w wieku powyżej 1 r. (64%). Średni wiek pacjentów w chwili diagnozy wynosił 2,9 roku. W chwili rozpoznania 81 (45%) dzieci miało chorobę rozszianą w 4. stopniu zaawansowania. 132 pacjentów (73%) prezentowało zaawansowane stadium choroby (3. lub 4 stopień). Guz pierwotny najczęściej zlokalizowany był w okolicy zaotrzewnowej jamy brzusznej (79%). Częstość lokalizacji guza w prawym i lewym nadnerczu była podobna (34% vs 32%). U 5 pacjentów (3%) nie udało się znaleźć ogniska pierwotnego choroby. W badaniu histopatologicznym guza u 108 (86%) pacjentów rozpoznano NB, u 12 (9%) ganglioneuroblastoma, u 6 (5%) ganglioneuroma. U 95 dzieci (53%) stwierdzono obecność przerzutów odległych w momencie diagnozy. Amplifikację genu MYCN stwierdzono w 25 spośród 154 ocenionych guzów (16%), najczęściej (n = 19; 76%) u dzieci w 4. stopniu zaawansowania choroby. U żadnego pacjenta z 1. lub 4S stopniem zaawansowania choroby nie wykryto dodatkowo amp NMYC. Ponadto u 132 pacjentów (73%) określono budowę guza zgodnie z klasyfikacją INPC. Stwierdzono 51 (39%) guzów o korzystnej i 81 (61%) guzów o niekorzystnej rokowniczo morfologii. W badanej grupie zmarło 58 pacjentów (32%), wznova choroby wystąpiła u 42 (24%). 5-letnie OS wyniosło 69%, a 3-letnie OS 76%. Z kolei 5- i 3-letnie EFS wynosiły odpowiednio 59% i 61%. Obserwacja pacjentów została zakończona w dn. 30.06.2015 r. Średni czas obserwacji pacjentów od chwili rozpoznania NB wynosił 77,7 miesiąca.

Zbadana grupa pacjentów zróżnicowana była pod względem czynników klinicznych, histologicznych i biologicznych. Sposoby terapii dostosowane były do grup ryzyka wyznaczonych przez znane czynniki prognostyczne. Częstość występowania znanych niekorzystnych czynników rokowniczych w badanej grupie dzieci była porównywalna z danymi z piśmiennictwa.

W oparciu o analizy statystyczne czasów przeżycia wskazano nowe, potencjalnie niekorzystne czynniki rokownicze w badanej populacji dzieci z NB.

Stwierdzono, że grupa krwi pacjentów z NB ma znaczenie rokownicze. Grupa krwi A Rh (-) ujemny jest związana z dobrym rokowaniem. Grupa krwi AB Rh (-) ujemny stanowi niekorzystny czynnik rokowniczy. Duża zmienność układów grupowych krwi u człowieka może mieć potencjalny wpływ na stan zdrowia i choroby organizmu oraz uzyskaną odpowiedź na leczenie w różnych chorobach, nie tylko u pacjentów z NB. Zaobserwowano także, że niedokrwistość w morfologii krwi obwodowej u pacjentów z NB w chwili diagnozy stanowi niekorzystny czynnik rokowniczy.

Ponadto w badanej populacji chorych zauważono, że ucisk dużych naczyń przez guz pierwotny, modelowanie wątroby lub przyleganie guza do wątroby, przemieszczanie jednej lub obu nerek przez guz oraz naciekanie mięśni okolicy lędźwiowej w badaniach obrazowych w chwili diagnozy należą do niekorzystnych czynników radiologicznych (IDRF).

Obecność guza pierwotnego wychwytyjącego lub niewychwytyjącego 131I-MIBG w badaniu scyntygraficznym całego ciała w chwili diagnozy nie miała wpływu na przeżycie chorych z NB. Jednak zwiększone gromadzenie znacznika w kościach w scyntygrafii całego ciała 131I-MIBG w chwili diagnozy było związane z większym ryzykiem zgonu w porównaniu do pacjentów bez zwiększonego gromadzenia znacznika w kościach. Zwiększone gromadzenie znacznika w kościach w scyntygrafii całego ciała 131I-MIBG u pacjentów z NB w chwili diagnozy powinno być uwzględniane w stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka nawet jeśli wyniki punkcji szpiku i trepanobiopsji nie wskazują na obecność przerzutów do szpiku kostnego.

Co więcej, u wybranych pacjentów z NB pozostawienie węzłów chłonnych w okolicy guza pierwotnego, jako ośrodków namnażania i aktywacji komórek prezentujących antygen i zdolnych do walki z nowotworem, potencjalnie może być korzystne. Obserwacja ta wymaga jednak potwierdzenia w dalszych badaniach.

Stwierdzono również, że występowanie powikłań w trakcie i/lub po zakończeniu leczenia z powodu NB było niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. W badanej grupie pacjentów najczęstszym

powikłaniem leczenia była pancytopenia po chemioterapii. Pacjenci, u których obserwowano pancytopenie po cyklach chemioterapii, mieli istotnie mniejsze prawdopodobieństwo przeżycia w porównaniu do pacjentów bez pancytopenii. Wykazano, że obniżenie liczby leukocytów $< 2000/\mu\text{l}$ po chemioterapii było czynnikiem złej prognozy. Niedokrwistość $< 80 \text{ g/l}$ po chemioterapii była związana ze złym rokowaniem. Również małopłytkowość $< 50\ 000/\mu\text{l}$ po chemioterapii istotnie zmniejszała szanse na przeżycie pacjentów.

Wznowa lub progresja NB w płucach lub ośrodkowym układzie nerwowym była związana z bardzo złym rokowaniem (5-letnie OS odpowiednio 8 i 27%).

W analizie proporcjonalnego hazardu Coxa stwierdzono, że wiek pacjentów ≥ 1 . rż. w chwili diagnozy, zaawansowane stadium choroby (stopień 3., 4. wg INSS), obecność przerzutów odległych oraz brak remisji całkowitej były istotnie statystycznie powiązane ze zwiększonym ryzykiem zgonu. Ponadto stężenie dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) lub ferrytyny (F) w surowicy krwi ≥ 3 razy norma było związane z większą śmiertelnością. Zdecydowanie większe ryzyko zgonu mieli także pacjenci z podwyższonym stężeniem kwasu wanilinomigdałowego (VMA) i 3-metoksytyraminy (3-MT) w dobowej zbiorce moczu.

Podsumowując, należy podkreślić, że uzyskane wyniki potwierdzają związek grupy krwi pacjentów z NB z ryzykiem zgonu. Dzieci z NB z grupą krwi A Rh (-) ujemny mają korzystne rokowanie, podczas gdy dzieci z NB z grupą krwi AB Rh (-) ujemny cechują się istotnie wyższym ryzykiem zgonu w porównaniu do pacjentów z innymi grupami krwi. Co więcej, dzieci z wywiadem NB z niedokrwistością w morfologii krwi w chwili diagnozy, z przemieszczaniem jednej lub obu nerek przez guz pierwotny w badaniach obrazowych, z nawracającymi pancytopeniami po cyklach chemioterapii, a także w wieku ≥ 1 rż. cechują się największym ryzykiem wystąpienia niepowodzenia leczenia. Niemniej jednak potrzebne są dalsze badania, aby zweryfikować prawdziwość i zasadność tych doniesień.

Wnikliwa analiza cech klinicznych, histologicznych i biologicznych u 180 dzieci z NB leczonych w ośrodku krakowskim pozwoliła na wskazanie nowych, potencjalnie istotnych czynników prognostycznych, które w znaczący sposób mogą wpłynąć na zmianę kwalifikacji pacjentów do grup ryzyka i wybór bardziej zindywidualizowanego leczenia. Dokładniejsza ocena znaczenia klinicznego wskazanych czynników prognostycznych w badaniach wieloośrodkowych może stać się podstawą do określenia nowych kryteriów kwalifikacji pacjentów do grup terapeutycznych.

Dalsze analizy uzyskanych danych umożliwią ocenę wpływu badanych parametrów na przebieg kliniczny choroby. Ponadto, w celu poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów progresji NB i znalezienia innowacyjnych terapii przeciwnowotworowych, jest konieczna równoczesna identyfikacja nowych i wybiórczych biomarkerów molekularnych. Wczesna diagnoza, właściwa kwalifikacja pacjentów do grup ryzyka oraz odpowiednio prowadzona terapia mogą przyczynić się do zwiększenia wyleczalności, zmniejszenia powikłań leczenia oraz poprawy jakości życia dzieci z NB.

Summary

Neuroblastoma (NB) is a malignant tumor that develops from the germ cells of the sympathetic nervous system. It is the most common malignant tumor in infants and the most common extracranial solid tumor in children in general. The etiology of cancer remains unknown. The tumor is usually located in the abdomen, adrenals or paraspinal ganglia. The disease is usually diagnosed in stage 4 when distant metastases are present. Known adverse prognostic factors include: age of the patient at the time of diagnosis ≥ 1 year, high stage of the disease and presence of NMYC oncogene amplification (NMYC amp). The type of histological structure of the tumor is also important. Children with localized disease and favorable genetic features have a good chance of full recovery. Currently, about 60% of all children with NB can get remission of the disease. In some infants, spontaneous tumor regression is observed. Nevertheless, the majority of children with NB have a clinically aggressive form of the disease with a survival rate of about 30%. In addition, patients who survive are at risk of late toxicity associated with the treatment being used.

Neuroblastic tumors are characterized by high clinical, histological and genetic heterogeneity, which is the main cause of incorrect diagnosis and qualification for low, intermediate or high risk group and poor response to standard multimodal therapy. Heterogeneity of the clinical picture makes diagnosis difficult. On the other hand, histological and genetic heterogeneity of the tumor may cause inadequately adjusted therapy - both too low and too strong.

Despite the introduction of new therapies, including high-dose chemotherapy with autologous bone marrow stem cell transplantation and tumor-specific immunotherapy, long-term survival of patients in the high-risk group remains low. Recurrence and progression of the disease occur even after such intensive and varied therapy. Treating children with NB remains a challenge for clinicians around the world. New, more effective methods of treatment are still sought, with particular emphasis on tumor molecular biology. Early diagnosis of the disease increases the chances of full recovery. In high-risk patients, the development of effective adjuvant therapies seems to be the only real way to further improve treatment outcomes. Also personalized therapy is a chance for patients.

NB belongs to the most intensively studied childhood cancers and remains one of the most difficult tasks in pediatric oncology. Although many prognostic factors are already known, precise prognosis in this disease is still not possible. The researchers' efforts are focused on getting to know the tumor biology and identifying the molecular points of the grip for new selective agents. In addition to a more accurate understanding of NB biology, it is also necessary to verify the known and search for new prognostic factors affecting the results of treatment. New effective therapies are needed for high-risk children and the recurrent NB.

Retrospective analysis of many different parameters and methods of treatment in children with NB may contribute to the emergence of new prognostic factors that significantly affect the course of the disease. This will allow a more precise prognosis in children with NB and improve the stratification of patients to appropriate therapeutic groups, differing in intensity and method of treatment. Optimizing the methods of diagnosis and treatment may result in a further improvement of the cure rate and a reduction in the risk of life-threatening complications.

The aim of the study was to assess the known and search for new prognostic factors in children with NB, which in the future could be used to develop more optimal ways of qualifying patients to risk groups and related appropriate therapeutic methods.

In the presented study, on the basis of the collected data, the statistical significance of the association of various clinical, biochemical, histological and biological factors with the survival of patients with NB was made.

In the examined group of 180 children, the prevalence of patients with unfavorable prognostic markers was found. The majority of children covered by the study were over 1 year of age (64%). The average age of patients at the time of diagnosis was 2.9 years. At the time of diagnosis, 81 (45%) children had a disease spread in the 4th stage. 132 patients (73%) presented advanced stages of the disease (grade 3 or 4). The primary tumor was most often located in the retroperitoneal area of the abdominal cavity

(79%). The rate of tumor localization in right and left adrenal glands was similar (34% vs 32%). In 5 patients (3%), no primary outbreak was found. Histopathological examination of the tumor in 108 (86%) patients was diagnosed with NB, in 12 (9%) ganglioneuroblastoma, in 6 (5%) ganglioneuroma. In 95 children (53%) metastases distant at the time of diagnosis were found. The amplification of the MYCN gene was found in 25 out of 154 evaluated tumors (16%), most often (n = 19, 76%) in children at the 4th stage of the disease. No positive NMYC amp was detected in any 1 or 4 stage patient. In addition, 132 patients (73%) determined the tumor structure according to the INPC classification. There were 51 (39%) tumors with favorable and 81 (61%) tumors with unfavorable prognostic morphology. 58 patients died in the study group (32%), 42 relapsed (24%). 5-year OS was 69%, and 3-year OS 76%. In turn, 5- and 3-year EFS were 59% and 61% respectively. The patients' observation was completed on 30/06/2015. The average time of observation of patients since the diagnosis of NB was 77.7 months.

The examined group of patients varied in terms of clinical, histological and biological factors. The methods of therapy were adjusted to the risk groups determined by known prognostic factors. The incidence of known adverse prognostic factors in the studied group of children was comparable to literature data.

Based on statistical analyzes of survival times, new, potentially unfavorable prognostic factors in the studied population of children with NB were indicated.

It was found that the blood group of NB patients is prognostic. Blood group A Rh (-) negative is associated with a good prognosis. The blood group AB Rh (-) negative is an unfavorable prognostic factor. High variability of human blood group systems can have a potential effect on the health and diseases of the body and the response to treatment in various diseases, not only in patients with NB. It was also observed that anemia in peripheral blood morphology in NB patients at the time of diagnosis is an unfavorable prognostic factor.

Moreover, in the studied population of patients, it was noticed that the pressure of large vessels through the primary tumor, liver modeling or tumor adherence to the liver, movement of one or both kidneys by the tumor and lumbar muscle infiltration in imaging at the time of diagnosis belong to unfavorable radiological factors (IDRF).

The presence of the primary tumor capturing or not capturing ¹³¹I-MIBG in the whole body scintigraphy at the time of diagnosis had no effect on the survival of patients with NB. However, increased bone staining in whole body scintigraphy ¹³¹I-MIBG at the time of diagnosis was associated with a higher risk of death compared to patients without increased bone mark collection. Increased collection of bone markers in whole body scintigraphy ¹³¹I-MIBG in patients with NB at the time of diagnosis should be considered in the stratification of patients to risk groups even if the results of bone marrow puncture and trepanobiopsy do not indicate the presence of bone marrow metastases.

Moreover, in selected NB patients, leaving lymph nodes around the primary tumor, as centers of multiplication and activation of antigen-presenting cells and able to fight cancer, can potentially be beneficial. This observation, however, requires confirmation in further research.

It was also found that the occurrence of complications during and/or after treatment due to NB was an unfavorable prognostic factor. In the examined group of patients, the most common complication of treatment was pancytopenia after chemotherapy. Patients who were observed pancytopenia after chemotherapy cycles had significantly less likelihood of survival compared to patients without pancytopenia. It has been shown that a reduction in the number of leukocytes < 2000/μl after chemotherapy was a factor of poor prognosis. Anemia < 80 g/l after chemotherapy was associated with poor prognosis. Also, thrombocytopenia < 50 000/μl after chemotherapy significantly reduced the chances of survival of patients.

Recurrence or progression of NB in the lungs or central nervous system was associated with a very poor prognosis (5-year OS, respectively 8 and 27%).

Cox proportional hazard analysis found that the age of patients ≥ 1 year of age at the time of diagnosis, advanced stage of the disease (grade 3, 4 according to INSS), the presence of distant metastases and the lack of complete remission were statistically significantly associated with an increased risk of death. In addition, the concentration of lactic acid dehydrogenase (LDH) or ferritin (F) ≥ 3 times the norm was associated with higher mortality. Patients with elevated levels of vanillylmandelic acid (VMA) and 3-methoxytyramine (3-MT) in a 24-hour collection of urine also had a significantly higher risk of death.

In conclusion, it should be emphasized that the results obtained confirm the association of blood group of patients with NB with the risk of death. Children with NB with the blood group A Rh (-) negative have a favorable prognosis, while children with NB with the blood group AB Rh (-) negative are characterized by a significantly higher risk of death compared to patients with other blood groups. What's more, children with a history of anemia with blood counts at the moment of diagnosis, with the movement of one or both kidneys by the primary tumor in imaging studies, with recurrent pancytopenia after chemotherapy cycles, as well as those ≥ 1 year of age are characterized by the highest risk of failure treatment. Nevertheless, further research is needed to verify the accuracy and validity of these reports.

A thorough analysis of clinical, histological and biological features in 180 children with NB treated in the Krakow center allowed to identify new, potentially significant prognostic factors that could significantly change patients' qualification to risk groups and select a more individualized treatment. A more accurate assessment of the clinical significance of the indicated prognostic factors in multicenter studies may become the basis for determining new criteria for qualifying patients for treatment groups.

Further analyzes of the obtained data will enable assessment of the impact of the examined parameters on the clinical course of the disease. In addition, in order to broaden the knowledge on the mechanisms of NB progression and to find innovative anticancer therapies, it is necessary to simultaneously identify new and selective molecular biomarkers. Early diagnosis, appropriate qualification of patients to risk groups and properly conducted therapy can contribute to increasing the cure rate, reducing complications of treatment and improving the quality of life of children with NB.