

**lek. Dorota Kaczmarzka-Turek**

**Markery prognozujące skuteczność leczenia analogami  
somatostatyny u chorych z rozsiałym procesem nowotworowym  
wysokozróżnicowanych guzów neuroendokrynnych przewodu  
pokarmowego (GEP-NET)**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Tomasz Bednarczuk

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii  
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024

## **STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM**

**Markery prognozujące skuteczność leczenia analogami somatostatyny u chorych z rozsiałym procesem nowotworowym wysokozróżnicowanych guzów neuroendokrynnych przewodu pokarmowego (GEP-NET)**

### **Wstęp**

Długodziałające analogi somatostatyny (SSA) są zalecane jako leczenie z wyboru u chorych z wysokozróżnicowanymi guzami neuroendokrynnymi przewodu pokarmowego (GEP-NET). Jako leki biologiczne są stosowane z dwóch głównych wskazań: mają działanie antyproliferacyjne oraz redukują objawy czynności hormonalnej nowotworu neuroendokrynnego. Zgodnie z praktyką kliniczną, kolejne etapy leczenia systemowego są ustalane indywidualnie, w oparciu m.in. o typ nowotworu, grading, stopień zaawansowania, ocenę wychwytu radioznacznika w badaniach receptorowych, cechy kliniczne pacjenta (tj. wiek, stan sprawności, choroby współistniejące, obecność objawów czynności hormonalnej) i jego preferencje. Aktualnie prowadzone badania porównawcze dostępnych strategii leczenia wysokozróżnicowanych nowotworów neuroendokrynnych (NEN) mają przyczynić się do ustalenia algorytmów optymalnej kolejności terapii. Pomimo rosnących danych klinicznych i badań z zakresu biologii molekularnej, istnieje niezaspokojona potrzeba personalizacji leczenia w zaawansowanych wysokozróżnicowanych NEN.

Wyselekcjonowanie z grupy zaawansowanych GEP NEN chorych o profilu szybkiej progresji w ciągu pierwszego roku leczenia I rzutu, wydaje się istotne do optymalizacji decyzji terapeutycznych m.in. ustalenia schematów wielolekowych, momentu kwalifikacji do terapii izotopowej. Dostępne dane literaturowe, gdzie podejmuje się poszukiwania czynników związanych z progresją GEP NEN, oparte są na heterogennych grupach pacjentów z różnymi stadiami zaawansowania choroby. Czynniki, mogące przemawiać za progresją podczas leczenia długodziałającymi analogami somatostatyny w populacji chorych z GEP NEN w IV stadium zaawansowania, nie są do końca ustalone.

### **Cele pracy**

Celem pracy jest (1) ocena częstości występowania progresji oraz (2) identyfikacja czynników mogących prognozować jej wystąpienie podczas 12-miesięcznego leczenia

długodziałającymi analogami somatostatyny w grupie chorych z GEP NEN w IV stadium zaawansowania.

## **Metody**

Do badania prospektywnego obserwacyjnego zostało włączonych 30 pacjentów z wysokozróżnicowanym nowotworem neuroendokrynnym przewodu pokarmowego G1 lub G2, czynnym lub nieczynnym hormonalnie, zakwalifikowanych do leczenia długodziałającym analogiem somatostatyny (oktreotyd LAR lub lanreotyd Autogel) w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii WUM. Włączenie leku pierwszego wyboru było zgodne z rejestracją leku i obowiązującymi zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Guzów Neuroendokrynnych (ENETS, *European Neuroendocrine Tumor Society*). Okres rekrutacji wynosił 25,5 miesiąca. Okres obserwacji trwał do wystąpienia progresji choroby lub do 12 miesięcy od włączenia leczenia długodziałającym analogiem somatostatyny. Kryteria włączenia do badania obejmowały: (1) wiek  $\geq 18$  roku życia, (2) sprawność wg skali Karnofsky'ego  $>60\%$  i (3) wg ECOG/WHO  $\leq 2$ , (4) rozpoznanie histopatologiczne zaawansowanego (z przerzutami odległymi / nieresekcyjnego) wysokozróżnicowanego GEP NEN ze stopniem dojrzałości G1 i G2 (Ki67 $<20\%$ ) wg klasyfikacji histopatologicznej WHO, (5) obecność receptorów somatostatynowych w badaniu receptorowym  $^{68}\text{Ga}$ -PET/TK oraz (6) świadomą zgodę na udział w badaniu. Kryteria wyłączenia z badania to (1) leczenie: inhibitorami mTOR lub inhibitorami kinaz tyrozynowych, interferonem alfa, długodziałającymi analogami somatostatyny, chemioterapią, terapią izotopową, chemoembolizacją, termoablacją w okresie ostatnich 6 miesięcy, (2) cukrzyca źle kontrolowana z HbA1c  $>8\%$ , (3) objawowa kamica żółciowa, (4) przewlekła choroba nerek  $>G3$  wg KDIGO, (4) zespół złego wchłaniania, zespół krótkiego jelita, (5) przewlekła sterydoterapia, (6) HIV oraz (7) ciąża lub okres laktacji. Grupę kontrolną stanowiło 28 zdrowych ochotników, bez rozpoznanych chorób internistycznych i rozpoznanego nowotworu neuroendokrynnego.

Protokół badania obejmował wizyty kontrolne w punktach czasowych: 0 – 3 m-ce – 6 m-cy – 12 m-cy oraz comiesięczne wizyty celem podania długodziałającego analogu somatostatyny. Progresja choroby była oceniana na podstawie tomografii komputerowej wg kryteriów RECIST v.1.1. W przypadku stwierdzenia progresji choroby pacjent był poddawany kwalifikacji do kolejnej linii leczenia GEP NEN. W przypadku stwierdzenia stabilizacji, remisji częściowej lub całkowitej pacjent kontynuował leczenie długodziałającym analogiem somatostatyny w niezmiennym schemacie. Na podstawie przebiegu klinicznego

w okresie 12-miesięcznej obserwacji chorzy z GEP NEN zostali podzieleni na dwie grupy – z progresją i bez progresji w trakcie leczenia długodziałającym analogiem somatostatyny.

Materiał do analizy histopatologicznej stanowiły bloczki pobrane podczas procedur, jak biopsja czy operacja, zgodnie z zaleceniami Polskiej Sieci Guzów Neuroendokrynych. Raport histopatologiczny GEP NEN obejmował: lokalizację ogniska pierwotnego (jeśli było znane) i/lub ogniska przerzutowego, największy wymiar guza, przerzuty do węzłów chłonnych, angioinwazję, neuronoinwazję, obecność martwicy, pTNM, Ki67 oraz chromograninę A, synaptofizynę i beta-kateninę.

Oznaczenia stężeń wybranych markerów w surowicy podczas leczenia długodziałającym analogiem somatostatyny tj. chromograniny A (CgA), polipeptydu trzustkowego (PP), neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF), tenascyny C (TNC) i chemokiny 21 (CCL21), zostały wykonane testami ELISA według procedury dla danego testu. Stężenia BDNF, TNC i CCL21 nie były dotychczas oceniane w wysokozróżnicowanych GEP NEN. Pomiary stężeń angiopoetyny 2 (ANG 2) i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF A) zostały wykonane nowatorskim jednoczasowym testem wieloparametrowym Milliplex Map (Merck Millipore) opartym na technologii mikrokulek magnetycznych Luminex xMAP i poddane analizie na aparacie BioRad (Merck Millipore).

## Wyniki

Analizą objęto grupę 30 chorych (F:M 17:13) z medianą wieku  $57 \pm 11,75$  lat i BMI  $25,6 \pm 5,53$  kg/m<sup>2</sup>. Grupę kontrolną stanowiło 28 zdrowych ochotników (F:M 21:7) z medianą wieku  $62,5 \pm 19,12$  lat i BMI  $28,1 \pm 5,01$  kg/m<sup>2</sup>. Zarówno w grupie badanej jak i w grupie kontrolnej stopień sprawności oceniony wg skali Karnofsky'ego wynosił >80%, wg ECOG/WHO  $\geq 1$ . Między grupą badaną a grupą kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic w płci, wieku i BMI.

W grupie badanej ognisko pierwotne GEP NEN było znane u 26 chorych (86,7%): midgut u 19 chorych (63,3%), trzustka u 7 chorych (23,3%). W materiale z resekcji ogniska pierwotnego u 14 pacjentów stwierdzono stopień dojrzałości G1, u 12 chorych G2. W materiale histopatologicznym z przerzutu w wątrobie u 13 chorych stwierdzono G1, u 14 chorych G2. Indeks proliferacyjny w ognisku pierwotnym i/lub metastatycznym u chorych z G2 był niższy niż 10%. Do dalszej analizy wybrano dla każdego chorego wyższy Ki67 uzyskany z dostępnych materiałów histopatologicznych (ogniska pierwotnego i/lub przerzutu w wątrobie) uzyskując u 11 chorych NET G1, u 19 chorych NET G2.

W momencie kwalifikacji do badania 53,3% chorych prezentowało czynność hormonalną pod postacią zespołu rakowiaka – w tej podgrupie chorobę rakowiakową serca stwierdzono u 43,75%.

Wszyscy chorzy mieli zmiany metastatyczne w wątrobie, 86,7% w węzłach chłonnych jamy brzusznej, 13,3% w układzie kostnym, a u 43,3% stwierdzono zmiany przerzutowe poza jamą brzuszną i układem kostnym. U wszystkich chorych w badaniu receptorowym z <sup>68</sup>Ga-PET/TK potwierdzono obecność receptorów somatostatynowych w ognisku pierwotnym i/lub w zmianach metastatycznych. Pacjenci zostali zakwalifikowani do leczenia długodziałającym analogiem somatostatyny – u 19 chorych zastosowano oktreotyd LAR, u 11 lanreotyd Autogel.

60% grupy badanej prezentowało progresję choroby w okresie 3 miesięcy przed podaniem 1. dawki długodziałającego analogu somatostatyny. Podczas leczenia SSA progresja choroby wystąpiła u 56,7% w ciągu pierwszych 12 miesięcy, a u pozostałych choroba pozostawała stabilna. Mediana czasu do wystąpienia progresji wyniosła 6 miesięcy. W obu grupach nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności od rodzaju stosowanego analogu somatostatyny.

Grupy z GEP NEN z progresją i bez progresji nie różniły się w zakresie: płci, wieku, BMI, stopnia sprawności, aktywności hormonalnej, lokalizacji ogniska pierwotnego, resekcji ogniska pierwotnego, obecności przerzutów w węzłach chłonnych jamy brzusznej oraz obecności przerzutów w układzie kostnym w momencie włączenia leczenia. Zaobserwowano istotną zależność wystąpienia progresji podczas leczenia od obecności przerzutów poza jamą brzuszną i układem kostnym w momencie kwalifikacji do SSA.

W grupie GEP NEN z progresją istotnie częściej stwierdzano G2 ( $p$  0.012) oraz wyższe Ki67 ( $p$  0.037) w ognisku przerzutowym w wątrobie, niż w grupie bez progresji. Poza tym w badaniu histopatologicznym obie grupy nie różniły się w zakresie angioinwazji, neuronoinwazji, ognisk martwicy oraz stopnia wybarwienia CgA, synaptofizyny i beta-kateniny w ognisku pierwotnym i/lub metastatycznym.

Porównano wyjściowe stężenia markerów między grupą chorych z GEP NEN i grupą kontrolną stwierdzając istotnie wyższe stężenia CgA ( $p$  <0.001), PP ( $p$  0.047), TNC ( $p$  <0.001) i ANG 2 ( $p$  <0.001), natomiast stężenie BDNF przed leczeniem w grupie GEP NEN było istotnie niższe, niż w grupie kontrolnej ( $p$  0.007). Wyjściowe stężenia VEGF A oraz CCL21 nie różniły się w grupie badanej i grupie kontrolnej.

W kolejnym etapie analizy porównano wyjściowe stężenia markerów w dwóch podgrupach chorych z GEP NEN: z progresją i bez progresji. Stężenia CgA przed leczeniem

różniło się istotnie między grupą z progresją i bez progresji ( $p$  0.021) oraz między grupą z progresją a grupą kontrolną ( $p$  <0.001). Na podstawie krzywej ROC, stwierdzono, że wyjściowe stężenie chromograniny A prezentuje się jako stymulanta dla wystąpienia progresji z punktem odcięcia 221,11 ng/ml (AUC 0.755 [95%CI: 0.563-0.947], czułość 76,47%, swoistość 83,33%,  $p$  0.021). W dalszej analizie zaobserwowano, że wyjściowe stężenia TNC i ANG 2 były istotnie wyższe w grupie z progresją (odpowiednio  $p$  0.002 i  $p$  0.009) oraz w grupie bez progresji (odpowiednio  $p$  0.008 i  $p$  0.042), niż w grupie kontrolnej. W grupie chorych z progresją stężenie BDNF przed leczeniem ( $p$  0.022) było istotnie niższe, niż w grupie kontrolnej.

W kolejnym etapie przeanalizowano stężenia markerów podczas leczenia długodziałającym analogiem somatostatyny. W grupie GEP NEN z progresją stężenia CgA, polipeptydu P i CCL21 nie zmieniały się istotnie w okresie 6-ciu i 3-ch miesięcy przed progresją, a w grupie bez progresji podczas 12 miesięcznego leczenia ( $p$  ns).

W grupie GEP NEN z progresją stwierdzono istotną różnicę stężeń TNC między progresją a 3 m-cami ( $p$  0.043) i 6 m-cami przed jej wystąpieniem ( $p$  0.01). Na podstawie analizy krzywej ROC, punkt odcięcia (indeks Youdena) dla stężenia tenascyny C w momencie progresji ustalono na 4,93% (AUC 0.76 [95%CI: 0.529-1] z czułością 70% i swoistością 80%  $p$  0.049). W analizie stwierdzono istotny ( $p$  0.045) wzrost stężenia ANG 2 między 6 a 3 miesiącem przed wystąpieniem progresji. Na podstawie analizy krzywej ROC, punkt odcięcia dla zmiany stężenia ANG 2 między 6 a 3 miesiącem przed wystąpieniem progresji ustalono na 12.7% (AUC 0.786 [95%CI: 0.524-1] z czułością 71.43% i swoistością 85.71%  $p$  0.037). W grupie GEP NEN z progresją stwierdzono istotny ( $p$  0.048) wzrost stężenia VEGF A między 6. a 3. miesiącem przed progresją. Na podstawie analizy krzywej ROC, punkt odcięcia dla zmiany stężenia VEGF A między 6 a 3 m-cem przed wystąpieniem progresji ustalono na 10,3% (AUC 0.821 [95%CL: 0.566-1], z czułością 76.92% i swoistością 83.33%,  $p$  0.028). W grupie GEP NEN z progresją obserwowano istotną statystycznie różnicę w stężeniu BDNF między progresją a 3 m-cami ( $p$  0.022) i 6 m-cami ( $p$  0.028) przed jej wystąpieniem. W grupie bez progresji nie odnotowano istotnych różnic w stężeniach TNC, ANG 2, VEGF A, BDNF pomiędzy punktami czasowymi przez cały okres obserwacji ( $p$  ns).

W analizie czynników prognozujących wystąpienie progresji w grupie pacjentów z GEP NEN w IV stadium zaawansowania stwierdzono, że niezależnymi czynnikami związanymi z progresją były: (1) progresja w ciągu 3 miesięcy przed rozpoczęciem leczenia analogami somatostatyny ( $p$  <0.001), (2) grading G2 w ognisku przerzutowym ( $p$  0.003), (3) indeks proliferacji Ki67 w ognisku metastatycznym w wątrobie ( $p$  0.003), (4) obecność

przerzutów poza jamą brzuszną i układem kostnym w momencie kwalifikacji do leczenia ( $p < 0.001$ ), (5) stężenie chromograniny A przed leczeniem 2,35x górna granica normy ( $p 0.014$ ), (6) wzrost stężenia BDNF w okresie 6 m-cy przed progresją ( $p 0.003$ ) oraz (7) wzrost stężenia ANG 2 między 6 m-cem a 3 m-cem przed progresją ( $p 0.023$ ).

## Wnioski

W niniejszej pracy kryteria kwalifikacji chorych do badania miały za zadanie wyselekcjonować optymalnie jednorodną grupę pacjentów. U chorych z wysokozróżnicowanymi GEP NEN w IV stadium zaawansowania, z przerzutami do wątroby, z ogniskiem pierwotnym w jelicie cienkim, trzustce lub nieznanym podczas 12 miesięcy leczenia długodziałającym analogiem somatostatyny, progresja występuje u ponad 50% chorych z medianą czasu do wystąpienia progresji wynoszącą 6 miesięcy. Grading G2 w ognisku przerzutowym, Ki67 w ognisku metastatycznym w wątrobie, wyjściowe stężenie CgA powyżej górnej granicy normy są zmiennymi często podejmowanymi w literaturze. Do czynników wystąpienia progresji podczas leczenia SSA u chorych w wysokozróżnicowanymi GEP NEN w IV stadium zaawansowania można dołączyć progresję w okresie 3 miesięcy przed rozpoczęciem leczenia analogami somatostatyny oraz obecność przerzutów poza jamą brzuszną i układem kostnym w momencie kwalifikacji do leczenia.

Użyteczność kliniczna przedstawionych biomarkerów: wyjściowej chromograniny A, zmiany stężeń ANG 2 i BDNF wymaga dalszych badań na innej populacji chorych z wysokozróżnicowanym GEP NEN w IV stadium zaawansowania celem dostarczenia dowodów, że proponowane czynniki związane z progresją możliwe są do przeniesienia lub uogólnienia na inne populacje NEN. Oznaczenia stężeń proponowanych markerów wykonano za pomocą testów wybranych na podstawie danych literaturowych, niemniej jednak z uwagi na możliwe interferencje oraz zmienności między testami immunoenzymatycznymi ocena inną metodą wydaje się zasadna. Wskazane czynniki związane z progresją mogą być pomocne w wyjściowej identyfikacji grupy chorych z możliwością progresji w ciągu 1 roku leczenia wśród pacjentów z GEP NEN w IV stadium zaawansowania.

*Tomasz Bednarski*

*Dorota Kaczmarska-Turek*  
specjalista chorób wewnętrznych  
264603

