

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Cauze de eșec terapeutic în hemopatiile maligne ale
copilului**

Doctorand: CRISTINA LUCIA BLAG

Conducător științific: PROF. DR. NICOLAE MIU

2011

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	2
I.1. Dinamica supraviețuirii în hemopatiile maligne la copil	3
I.2. Eșecul terapeutic	8
I.3. Direcții noi în terapia bolilor maligne	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	49
II.1. Ipoteza de lucru	50
II.2. Design-ul studiului	52
II.3. Material și metodă	54
II.4. Caracterizarea lotului	70
II.5. Studiul 1 - Analiza mortalității	88
II.6. Studiul 2 - Analiza recidivelor	125
II.7. Studiul 3 - Analiza infecțiilor	152
II.8. Studiul 4 - Analiza toxicităților de organ	166
II.9. Concluzii generale	185
III. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	188
IV. Bibliografie	189

Cuvinte cheie: hemopatii maligne, eșec terapeutic, supraviețuire globală, supraviețuire fără eveniment, mortalitate, infecții, toxicități de organ

Introducere. Incidența cancerului la copii este relativ mică dar cu o creștere constantă în fiecare an. Tratatamentul cancerului la copii reprezintă una dintre cele mai de succes istorii ale medicinei moderne, ajungându-se la o curabilitate de 80% pentru marea majoritate a malignităților în ultimii ani. Acest salt extraordinar se datorează creșterii calității și acurateții diagnosticului, prin tehnici moleculare și imagistice de mare finețe, introducerii și îmbunătățirii constante a strategiilor de tratament multimodal, colaborării naționale și internaționale a specialiștilor în oncologia pediatrică. Atenția specialiștilor se îndreaptă în ultimii ani spre ameliorarea calității vieții, minimalizarea toxicităților secundare terapiei și optimizarea suportului psihosocial pentru pacienții cu boală malignă. Protocoalele anterioare de chimioterapie agresivă vor fi cu siguranță înlocuite sau cel puțin completate de terapii țintite împotriva markerilor moleculari și imunologici specifici fiecărui tip de celulă malignă și adaptate ca doză genotipului fiecărui pacient. Lucrarea mea și-a propus o analiză a cauzelor de eșec terapeutic în hemopatiile maligne ale copilului și prin aceasta să aducă o contribuție la îmbunătățirea ratei de supraviețuire și ameliorarea calității vieții pacienților diagnosticați și tratați în țara noastră.

Partea I. Stadiul actual al cunoașterii

Capitolul I.1. Dinamica supraviețuirii în hemopatiile maligne la copii. Impactul deosebit asupra societății pe care îl are cancerul la copil și adolescent a impus inițierea unor studii ample care să conducă la o imagine corectă privind epidemiologia acestuia, așa cum sunt EURO CARE pentru Europa și SEER pentru SUA care prezintă ratele de

supraviețuire globală la 5 ani pentru copiii între 0-14 ani. Datele epidemiologice din Europa relevă că, deși cu o incidență mică, de 140 de cazuri la 1 milion, cancerul la copil înregistrează o tendință de creștere mediană constantă de 1% în fiecare an. Chiar dacă, în țările dezvoltate, rata de supraviețuire a ajuns la aproximativ 80%, cancerul rămâne a doua cauză de mortalitate la copii. Conform datelor publicate de studiile EURO CARE rata de supraviețuire a fost de 65% pentru toate cancerurile la un loc în cazul copiilor diagnosticați în perioada 1983-1985 și ea a crescut la 81% în perioada 2000-2002. Rezultate similare se înregistrează în SUA unde OS la 5 ani a crescut de la 67% în perioada 1981-1983 la 82% în perioada 1999-2006. Cele mai importante progrese s-au înregistrat în hemopatiile maligne, în cazul leucemiei acute limfoblastice, cea mai frecventă malignitate a copilului, înregistrându-se OS de 85% în perioada 2000-2002 în Europa (cu diferențe însă între Europa de Est și restul țărilor europene) și de 89% în SUA.

Capitolul I.2. Eșecul terapeutic. În ciuda progreselor remarcabile în ceea ce privește rata de supraviețuire în hemopatiile maligne la copil, cauzele de eșec terapeutic sunt încă numeroase și găsirea de soluții eficiente pentru rezolvare lor rămâne o prioritate. Boala progresivă și recidiva rămân una dintre principalele cauze de eșec terapeutic la copiii cu hemopatii maligne. Rezistența la chimioterapie este, din ce în ce mai frecvent, luată în discuție ca mecanism de apariție a recidivei și a bolii progresive maligne. Fenomenul a fost descris atât în cazul utilizării chimioterapiei standard cât și a terapiilor țintite. Apariția rezistenței la chimioterapie este determinată de două categorii principale de factori. Primul grup este reprezentat de factori farmacologici și fiziologici cum sunt metabolizarea și excreția medicamentelor, accesul inadecvat al medicamentelor la tumoră, rata inadecvată de administrare și calea inadecvată de administrare a acestora. Al doilea grup este reprezentat de factori specifici celulari sau tisulari: supra-expresia la nivel tumoral a enzimelor citocromului P450, modificarea căilor de activare metabolică a unor citostatice, activarea sistemelor de reparare a ADN, evitarea apoptozei, necrozei sau senescenței celulare, expresia diferențiată a unor proteine membranare (cărăuși solubili, canale și transportori), etc. O altă cauză importantă de eșec terapeutic este mortalitatea corelată cu tratamentul, frecvența acesteia fiind de 2-4% în cazul copiilor cu hemopatii maligne, în ciuda ameliorării semnificative a terapiei de susținere. Decesele legate de tratament reprezintă ”vârful icebergului” toxicităților corelate cu terapiile moderne ale hemopatiilor maligne și ele sunt reprezentate de infecții, hemoragii sau tromboze, complicații legate de masa tumorală și toxicități de organ. Refuzul și abandonul terapeutic reprezintă principala cauză a eșecului terapeutic în cancerul la copil din țările cu resurse financiare limitate, la baza acestora fiind o complexă asociere de factori biologici, socio-economici și factori legați de tratament.

Capitolul I.3. Direcții noi în terapia bolilor maligne. Ultimul deceniu a marcat începutul unei ere de tranziție în terapia oncologică de la medicamente a căror mecanisme de acțiune se bazau pe manipularea ADN-ului și mitozei (chimioterapia convențională) la strategii care manipulează căile moleculare anormale ce caracterizează fenotipul malign (terapiile țintite). Datorită mecanismelor complexe ale cancerului, terapiile țintite afectează, de obicei, aspecte biologice multiple în mod simultan. La ora actuală există 3 categorii principale de abordări utilizate în design-ul acestor terapii țintite: imunologică, a acizilor nucleici și a moleculelor mici. Abordarea imunologică este dominată de anticorpii monoclonali care acționează, de obicei, prin ruperea

interacțiunilor ligand-receptor, ținta lor fiind antigenele de suprafață exprimate de celule tumorale. Abordarea pe calea acizilor nucleici a condus la apariția oligonucleotidelor antisens în terapia oncologică, molecule ADN-like monocatenare, modificate chimic, care inhibă selectiv expresia genei post-transcripționale prin hibridizarea complementară a acizilor nucleici și determină, în final, degradarea mRNA care reprezintă ținta lor. Abordarea pe calea moleculelor mici a înregistrat în oncologie un succes asemănător cu cel al anticorpilor monoclonali, ele putând fi îndreptate împotriva unor ținte atât intracelulare cât și extracelulare, pe care le pot altera atât cantitativ cât și calitativ. Imatinib mesylate, medicament ce a revoluționat tratamentul leucemiei mieloide cronice, este prototipul moleculelor mici, el fiind un inhibitor al domeniilor tirozin-kinazei. Un interes deosebit este acordat, în ultimii ani, farmacogeneticii și farmagenomicii. Farmacogenetica se ocupă de variațiile genetice ale enzimelor răspunzătoare de metabolismul medicamentelor, ale țintelor și transportorilor și de modul cum aceste variații genetice interacționează pentru a determina un anumit fenotip specific relaționat cu medicația. Aceste variații genetice pot servi la o sub-clasificare a pacienților cu o anumită boală, influențând natura și intensitatea unui anumit tratament. În mod asemănător, pot indica noi ținte ale medicamentelor cu repercursiuni asupra efectelor pozitive și a celor adverse, cum ar fi învingerea rezistenței la medicamente sau încorporarea celulară crescută a acestora. În final, farmacogenetica intenționează să creeze modele poligenice care să prezică cu acuratețe răspunsul și toxicitatea la un anumit medicament pentru fiecare pacient în parte și să utilizeze aceste modele pentru a crea regimuri terapeutice personalizate în scopul creșterii eficienței și siguranței administrării medicamentelor. Farmacogenomica se circumscrie aplicațiilor tehnologiilor genomice la crearea noilor medicamente sau la caracterizarea celor aflate deja în folosința clinică.

Partea a II a. Cercetări personale

Capitolul II.1. Ipoteza de lucru. Studiul nostru este justificat de faptul că, în pofida progreselor remarcabile, cancerul rămâne a doua cauză de mortalitate la copii iar rezultatele terapeutice în hemopatiile maligne sunt inferioare în țara noastră celor din țările occidentale. Am definit eșecul terapeutic în hemopatiile maligne ca boală progresivă, recidivă, deces (prin boală sau corelat cu tratamentul) și abandon terapeutic și ne-am propus o analiză a cauzelor de eșec terapeutic în hemopatiile maligne ale copiilor diagnosticați și tratați în Compartimentul de Oncopediatrie al Clinicii Pediatrie II Cluj-Napoca, evaluarea standardelor de diagnostic și tratament, analiza ratelor de supraviețuire, a bolii progresive, recidivelor și mortalității în hemopatiile maligne.

Capitolul II.2. Design-ul studiului și capitolul II.3. Material și metodă. Studiul nostru este unicentric, retrospectiv, non-randomizat, pe o populație țintă reprezentată de copii diagnosticați cu hemopatii maligne în Compartimentul de Oncopediatrie al Clinicii Pediatrie II, Cluj-Napoca. El este un studiu observațional, longitudinal, perioada luată în studiu fiind de 20 de ani, între ianuarie 1991 și decembrie 2010. Obiectivul studiului este analiza cauzelor de eșec terapeutic la copii cu hemopatii maligne și pentru aceasta ne-am propus următoarele: evaluarea standardelor de diagnostic și tratament aplicate în hemopatiile maligne, analiza ratelor de supraviețuire globală și de supraviețuire fără eveniment în hemopatiile maligne, analiza cauzelor de deces, analiza toxicităților

secundare chimioterapiei/radioterapiei și impactul acestora asupra respectării disciplinei protocolare și a supraviețuirii pacienților cu hemopatii maligne, evaluarea complianței la tratament, respectiv a refuzului și abandonului terapeutic.

Am luat în studiu 190 de pacienți cu hemopatii maligne diagnosticați și tratați în Compartimentul de Oncopediatrie al Clinicii Pediatrie II, Cluj-Napoca în perioada ianuarie 1991-decembrie 2010. Pacienții au fost împărțiți în 4 loturi, în funcție de tipul de hemopatie malignă, după cum urmează:

- Lotul I: 119 pacienți cu leucemie acută limfoblastică (LAL); acest lot a fost subîmpărțit în 2 loturi pe criterii diagnostice și terapeutice:
 - lotul IA: 36 de copii cu LAL diagnosticați în perioada ianuarie 1991-decembrie 2000 (fără imunofenotipare și tratați cu protocoale terapeutice modificate);
 - lotul IB: 83 de copii cu LAL diagnosticați în perioada ianuarie 2001-decembrie 2010 (cu imunofenotipare și tratați cu protocoale integrale);
- Lotul II: 19 pacienți cu leucemie acută mieloblastică (LAM);
- Lotul III: 19 copii cu limfom nonHodgkin (LNH);
- Lotul IV: 33 de pacienți cu limfom Hodgkin (LH).

În perioada ianuarie 1991-decembrie 2000 diagnosticul de hemopatie malignă s-a bazat exclusiv pe examinări hematologice periferice și examinări morfologice și enzimatice ale aspiratului osteomedular. Din anul 2001 acuratețea diagnosticului hemopatiilor maligne a crescut mult prin introducerea, pe lângă examenul morfologic sau histologic, imunofenotipării (pentru LAL și LAM) și a imunohistochimiei (pentru LH și LNH). Din anul 2007 pacienții au beneficiat și de efectuarea testelor de biologie moleculară, pentru translocății specifice fiecărui tip de hemopatie maligne. Pentru diagnostic și evaluarea complicațiilor au mai fost utilizate diferite investigații imagistice ca și variate analize de laborator biochimice și bacteriologice. Încadrarea în grupe de risc, stadializarea și terapia citostică a fost efectuată conform protocoalelor terapeutice internaționale utilizate pentru fiecare hemopatie malignă în diferite perioade de timp, cel mai frecvent utilizate fiind protocoalele germane ale grupului de studiu BFM.

Evaluarea statistică a datelor s-a efectuat prin reprezentarea grafică a rezultatelor în grafice de tip pie, bar, box plots. S-au calculat parametrii medie sau mediană și au fost utilizate tabele de frecvență. Au fost calculate supraviețuirea globală (OS) și cea fără eveniment (EFS). Datele de supraviețuire au fost estimate prin metoda produs limitată Kaplan Meier cu calcularea supraviețuirilor la 5 sau 3 ani. Diferențele în supraviețuire au fost comparate prin utilizarea testului log rank. Pentru studiul semnificației corelației dintre variabile am utilizat în funcție de natura lor, următoarele metode: metoda hi-patrat, coeficientul de contingență, coeficientul Phi, coeficientului de corelație liniară r. Rezultatelor diferitelor analize au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic când s-a obținut o valoare a probabilităților de eroare sunt 0,05 ($p < 0,05$).

Capitolul II.4. Caracterizarea lotului. Lotul nostru de pacienți a fost reprezentat în marea majoritate (62,63%) din copii cu LAL (lot I), celelalte hemopatii maligne având o reprezentare mult mai mică, respectiv LAM (lotul II) și LNH (lotul III) au constituit câte 10,00% din întregul lot, iar LH a reprezentat 17,37% dintre cazuri. Durata mediană de urmărire la nivelul întregului lot a fost de 30,5 luni, cu variație mare în funcție de tipul

de hemopatie malignă, LH și LAL având o mediană a urmării de 58 și, respectiv, 31 luni, la polul opus aflându-se LAM și LNH cu 10 și, respectiv, 8 luni, oglindire a diferențelor în ratele de supraviețuire în hemopatiile maligne la nivelul lotului nostru. Vârsta mediană a pacienților, la nivelul întregului lot, a fost de 7 ani. Pacienții cu LAL au avut o mediană a vârstei de 5 ani, în cazul LAM am înregistrat o mediană de 10 ani, iar pacienții cu LNH și LH au avut o mediană a vârstei la debutul bolii de 12 ani. LH a fost mai frecvent la adolescenți, 60,61% dintre cazuri încadrându-se la categoria de vârstă 10-16 ani. La nivelul lotului I am constatat o distribuție sensibil egală a celor două subtipuri morfologice FAB, L1 și L2. Imunofenotipul preB a fost regăsit la 79,73% dintre copiii cu LAL imunofenotipați (89,15%). Deși în lotul nostru am avut un număr relativ mic de pacienți (51,80% dintre pacienții lotului IB) la care s-au efectuat testele de biologie moleculară, am găsit o incidență de 4,65% a BCR/ABL și de 2,32% a MLL/AF-4. În cazul LAL se remarcă o diferență între procentul de copii încadrați în SRG și MRG la nivelul loturilor IA și IB, cu un procent mai mare de copii în MRG la nivelul lotului IB, reflectare a creșterii acurateții stratificării pacienților în grupele de risc în timp dar și, posibil, a precocității adresării pacienților la specialistul oncolog în ultimii 10 ani. Analiza LAM (lotul II) a pus în evidență faptul că aproape toate tipurile morfologice FAB au fost prezente la nivelul lotului nostru, cu o predominanță a LAM M2 care a reprezentat o treime dintre cazuri. 52,63% dintre copiii cu LAM au fost imunofenotipați, iar 26,32% au avut efectuate testele de biologie moleculară, confirmându-se prezența translocației AML1-ETO la un pacient cu LAM M1/M2, a inv16 la un copil cu LAM M4-Eo și a translocației PML-RARa la un caz de LAP. În cazul LNH (lot III) am înregistrat o frecvență mai mare a LNH difuz cu celule mari B și a limfomului Burkitt. 94,74% dintre pacienții cu LNH din lotul nostru s-au prezentat cu stadii avansate de boală, 42,11% fiind în stadiul III și 52,63% în stadiul IV în momentul diagnosticului. Analiza lotului IV (LH) a relevat prezența tuturor subtipurilor morfologice, cu o predominanță a formei cu scleroză nodulară, întâlnită la 51,52% dintre cazurile noastre. Un rezultat îmbucurător pentru noi, a fost faptul că în cazul copiilor cu LH diagnosticul a fost stabilit pentru 63,64% dintre ei în stadii inițiale de boală, 6,06% în stadiul I și 57,58% în stadiul II.

Capitolul II.5. Analiza mortalității. Supraviețuirea globală la 5 ani a pacienților cu LAL a fost de 59,27%, înregistrând o creștere a OS de la 52,58% în cazul lotului IA la 66,98% în cazul lotului IB, diferență care, chiar fără semnificație statistică, confirmă faptul că ameliorarea calității diagnosticului și a terapiei, prin introducerea imunofenotipării și a testelor de biologie moleculară ca și administrarea dozelor mari de metotrexat, au condus la îmbunătățirea supraviețuirii pacienților cu LAL. Un alt lucru încurajator este ameliorarea rezultatelor pentru SRG și MRG între loturile IA și IB, de la 50% la 79,31% și, respectiv, de la 55,80% la 67,57%. Diferența între OS în funcție de imunofenotip a fost mică și fără semnificație statistică, de 77,42% pentru preB și 65,95% pentru T, dovadă că o corectă încadrare a imunofenotipului și adaptare a intensității tratamentului conduce la rezultate similare în LAL. OS la 5 ani în LAM (lot II) a fost de 45,61%. La nivelul lotului nostru nu au existat diferențe în OS în funcție de grupa de risc a pacienților cu LAM. În cazul LNH OS la 5 ani a fost de 33,26%, acest rezultat trebuind a fi analizat în contextul unui lot mic de pacienți dintre care 94,74% s-au prezentat în stadii avansate de boală (stadiul III și IV). OS pacienților cu LH în studiul nostru a fost de 78,48%. La încheierea studiului nostru, la nivelul lotului I, al copiilor cu LAL, 36,13%

dintre pacienți decedaseră. Rezultatele comparative ale loturilor IA și IB arată o diferență importantă în ceea ce privește mortalitatea care a fost de 55,56% și, respectiv, 27,71%, fapt ce confirmă îmbunătățirea calității actului diagnostic și a terapiei. La nivelul lotului I am înregistrat un procent relativ egal între decesul prin boală progresivă (44,19%) și cel toxic (46,51%), cel mai mic procent fiind înregistrat de decesul combinat (9,30%). Dacă analizăm ponderea decesului prin boală progresivă și a decesului toxic la nivelul deceselor din cadrul lotului IA și lotului IB vom avea o situație total diferită, în cazul lotului IA predominând decesul prin boală progresivă (65,00%), iar în cazul lotului IB predominând decesul toxic (60,87%). Comparând între cele două loturi ponderea cauzelor de deces la nivelul întregului lot și nu doar a deceselor, remarcăm că decesul de cauză toxică a înregistrat practic același procent, 16,67% în lotul IA și 16,87% în lotul IB, și faptul că o diferență remarcabilă apare pentru decesul prin boală progresivă care a scăzut de la 36,11% în cadrul lotului IA la 7,23% în cadrul lotului IB. În cazul lotului II și a lotului III rezultatele nu sunt la fel ca încurajatoare, la sfârșitul studiului nostru 63,16% și, respectiv, 68,42% dintre pacienți fiind decedați. Decesul toxic a reprezentat principala cauză de mortalitate atât pentru copii cu LAM (66,66%) cât și pentru cei cu LNH (53,85%), rezultate ce oglindesc frecvența mare a complicațiilor severe apărute la pacienții noștri. Pacienții cu LH au avut ca cea mai frecventă cauză de deces boala progresivă (66,67% dintre decese), 3 dintre cele 4 cazuri fiind recidive cu lipsă de răspuns la terapie. Analiza eșecului inducției, cu mențiunea că în această categorie am analizat atât pacienții la care nu s-a reușit obținerea remisiei complete la sfârșitul protocolului de inducție cât și pacienții cu deces precoce în prima lună de terapie (în inducție), a relevat următoarele rezultate: 14,28% pentru LAL, 57,89% pentru LAM, 36,84% pentru LNH și 3,03% pentru LH. Ceea ce considerăm un succes în cazul lotului nostru de pacienți este rata mică de refuz al inițierii tratamentului, unde nu am înregistrat nici un caz, și de abandon terapeutic care a fost de 1,05%.

Capitolul II.7. Analiza recidivelor. În cazul LAL am înregistrat un procent de recidive de 22,69%, cu o scădere impresionată a ratei acestora de la 47,22% pentru lotul IA la 12,04% pentru lotul IB, rezultat ce se reflectă și în EFS la 5 ani, aceasta fiind de 33,33% pentru lotul IA și 60,01% pentru lotul IB (p 0,007). Rezultatele asemănătoare obținute pentru EFS la 3 ani pentru LAL preB și LAL T, de 69,4% și respectiv 65,93%, relevă, așa cum aminteam și la analiza OS, că o corectă încadrare diagnostică și o adaptare corespunzătoare a terapiei citostatice conduce la rezultate similare pentru cele două imunofenotipuri. Cel mai frecvent sediu al recidivelor LAL a fost cel medular, urmat de SNC, recidiva combinată și cea testiculară. La încheierea studiului nostru 29,63% dintre pacienții cu LAL cu recidive se aflau în a doua remisie completă, 44,44% decedaseră în prima recidivă, iar 29,63% dintre ei, la care inițial s-a obținut a doua remisie completă (RC2), au decedat cu a doua recidivă sau cu recidive multiple. Pacienții cu LAM din studiul nostru au avut o rată a recidivelor de 26,32% cu o EFS de 26,60%, sediul cel mai frecvent fiind cel medular urmat de cel combinat (medular și extramedular). Evoluția recidivelor LAM a fost proastă, toți pacienții fiind decedați la încheierea studiului nostru, 3 în prima recidivă iar ceilalți 2 cu a doua recidivă sau cu recidive multiple. Pentru pacienții cu LNH rata recidivelor a fost de 26,32%, la nivelul acestui lot înregistrând o EFS de 21,38%, fără a exista o predominanță a unuia dintre subtipuri dar cu o predominanță a stadiilor avansate, așa cum era de așteptat având în vedere și structura lotului nostru. Doar unul dintre copiii cu recidiva LNH se afla în RC2

la încheierea studiului, ceilalți patru fiind decedați cu boală progresivă. Rată cea mai mică a recidivelor, 9,09%, cu cea mai bună EFS, 78,10% a fost obținută în cadrul studiului nostru la pacienții cu LH. Faptul că dintre subtipurile LH toate cele 4 recidive au apărut în cazul pacienților cu forma de scleroză nodulară o atribuim faptului că în structura acestui lot 51,52% dintre cazuri au avut această formă histologică. Trei dintre pacienții cu recidive LH au decedat prin boală progresivă, doi dintre ei în prima recidivă fără răspuns la tratament, iar cel de-al treilea, care a beneficiat și de transplant autolog de celule stem hematopoetice, cu a treia recidivă rezistentă la terapie.

Capitolul II.7. Analiza infecțiilor. În cadrul lotului integral de 190 copii cu hemopatii maligne am înregistrat un număr total de 368 episoade infecțioase, ceea ce a reprezentat o medie de 1,94 episoade infecțioase/pacient. 268 dintre episoadele infecțioase (72,83%) au apărut la pacienți care se aflau sub chimioterapie intensivă, infecțiile bacteriene fiind cele mai frecvente, 192 episoade (71,64%), urmate de cele virale, 48 episoade (17,91%) și fungice invazive, 28 episoade (10,44%). Cele mai frecvente infecții bacteriene au fost cele ale tractului respirator și cele sistemice, pneumoniile și sepsisul reprezentând 60% din totalul acestora. Etiologia a putut fi precizată în 65 dintre episoadele infecțioase bacteriene (25,19%), predominând infecțiile cu gram negativi: *E.coli* patogen, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp și *Pseudomonas aeruginosa*. Infecțiile bacteriene s-au corelat semnificativ statistic cu neutropenia grad 2, 3 și 4, iar cele sistemice au avut ca și factori predictivi cu semnificație statistică neutropenia grad 4, sub $500/\text{mm}^3$, și formele severe de hemopatie malignă. Infecțiile fungice invazive (IFI) s-au corelat cu chimioterapia intensivă, neutropenia severă și de lungă durată și antibioterapia cu spectru larg ($p < 0,000$). Am reușit să precizăm etiologia în 42,68% dintre episoade, 32,14% fiind încadrate ca IFI dovedite și 10,72% ca probabile, infecțiile cele mai frecvente fiind cu *Aspergillus* spp și *Candida* spp, dar au fost izolați și *Rhizopus* spp, *Penicillium marneffeii* și *Blastomyces dermatitidis*. Localizarea cea mai frecventă a IFI la pacienții noștri a fost cea pulmonară. Infecțiile virale nu s-au corelat cu chimioterapia intensivă și ele au fost reprezentate de infecții cutanate cu virus herpes simplex și varicelo-zosterian, rujeola, rubeola și parotidita epidemică, iar cele mai frecvente izolate au fost Rotavirus, Adenovirus sau Norovirus. Dintre etiologiile virale din ce în ce mai implicate în infecțiile severe ale pacienților oncologici, unul dintre pacienții noștri cu LAL a fost diagnosticat cu infecție cu virus BK post-transplant de celule stem hematopoetice iar un alt caz cu LAL a prezentat leucoencefalopatie multifocală însoțită de demență a cărei etiologie suspectată a fost virusul JC. Mortalitatea generală prin infecții a fost de 13,16% la nivelul lotului nostru. Așa cum era de așteptat cea mai frecventă etiologie care a condus la deces a fost cea bacteriană, 10% din totalul lotului, diagnosticul fiind în toate cazurile de sepsis sever. IFI a determinat o mortalitate de 2,11%, iar infecțiile virale o mortalitate de 1,05%.

Capitolul II.8. Analiza toxicităților de organ. Toxicitățile de organ, numeroase și diverse în studiul nostru, au determinat o rată de mortalitate de 10,53% la nivelul întregului lot de pacienți, reprezentând 27,02% din totalul deceselor înregistrate. Cea mai frecventă toxicitate întâlnită în studiul nostru a fost cea hematologică reprezentată de pancitopenia periferică înregistrată cu o rată de 2,58 episoade/pacient. Majoritatea episoadelor de toxicitate hematologică au fost de severitate mare, 381/492 episoade fiind de grad 3 și 4, și această severitate s-a corelat semnificativ statistic cu chimioterapia intensivă. Neutropenia severă, sub $500/\text{mm}^3$, a avut corelație statistică cu infecțiile

severe, respectiv cu cele bacteriene sistemice și cu cele fungice invazive. Tiflita neutropenică a avut o frecvență de 2,10% în cadrul lotului nostru și ea a determinat o mortalitate de 0,53%. Anemia nu a determinat complicații la nivelul lotului nostru de pacienți, ea fiind controlată sub terapie transfuzională. Trombocitopenia grad 4 a fost, însă, una dintre complicațiile redutabile, ea determinând o mortalitate prin hemoragii masive și necontrolate de terapia transfuzională de 4,74%, cea mai mare din totalul mortalității corelate cu toxicitățile de organ. Toxicitatea digestivă a avut expresie clinică variată, cea mai frecventă manifestare mucozita cu o rată de 0,75 episoade/pacient. Constipația și diareea de cauză neinfecțioasă au fost complicații rar întâlnite în lotul nostru, constipația corelându-se cu terapia cu Vincristină. Vărsăturile au fost, și ele, rar înregistrate și au fost de severitate redusă la pacienții noștri aflați sub chimioterapie intensivă. Anomaliile tranzitorii ale probelor hepatice, cel mai frecvent sub forma sindromului de hepatocitoliză, au fost des întâlnite la pacienții din lotul nostru, hepatotoxicitatea fiind, după cea hematologică, cea mai frecvent diagnosticată toxicitate de organ secundară chimioterapiei. Sindromul de obstrucție sinusoidală a fost diagnosticat la 2 dintre pacienții noștri. Ambii au dezvoltat această complicație după chimioterapie agresivă, respectiv după doză mare de citozin-arabinozidă și după protocol de condiționare a transplantului de celule stem hematopoetice. Hepatotoxicitatea severă cu insuficiență hepatică acută și, respectiv, sindrom hepato-renal, a fost a doua cauză ca frecvență de deces prin toxicitate de organ, determinând o mortalitate de 2,63%. Insuficiență renală acută înregistrată în cazul pacienților noștri, majoritatea de grad 1 sau 2, s-a corelat cel mai frecvent cu malignitatea, fiind determinată de infiltrația blastică sau masele tumorale masive cu obstrucție extrarenală și de sindromul de liză tumorală. Am avut 3 cazuri de cistită hemoragică în cazul lotului nostru, unul dintre ele fiind sever și necesitând intervenție chirurgicală de reconstrucție a vezicii urinare. Trei dintre pacienții noștri au decedat cu simptomatologia clinico-biologică a insuficienței multiple de organ, secundară chimioterapiei agresive și în absența sepsisului, ceea ce a reprezentat o mortalitate de 1,58%. Deși rar întâlnită în lotul nostru, cardiotoxicitatea a fost severă, determinând o mortalitate de 2,11%, ea fiind corelată la toți pacienții cu administrarea de antracicline. Neurotoxicitatea a avut o rată de 0,35 episoade/pacient la nivelul lotului nostru și ea s-a manifestat în principal prin neurotoxicitate periferică corelată cu Vincristina. Neurotoxicitatea centrală a fost rar întâlnită în studiul nostru și s-a corelat cu prezența în schemele de tratament a Metotrexatului intratecal și/sau a radioterapiei. Sindromul de liză tumorală a fost întâlnit atât spontan, prezent în momentul diagnosticului de hemopatie malignă, cât și după inițierea chimioterapiei, majoritatea cazurilor fiind de grad 1 sau 2. Incidența hiperglicemiilor tranzitorii în lotul nostru de pacienți a fost de 4,95%. Reacțiile de hipersensibilitate la preparatul E.coli Asparaginază, utilizat la toți pacienții care aveau prevăzut în protocol acest citostatic, au avut o frecvență mare în lotul nostru de pacienți, de 12,5% și ele au variat ca manifestare clinică de la simpla erupție cutanată alergică la reacții de tip anafilactoid. Nu au existat decese prin toxicități digestive, renale, neurologice, metabolice sau alergice.

Capitolul II.9. Concluzii generale.

1. OS a copiilor cu LAL a fost de 59,27%, cu ameliorarea rezultatelor odată cu creșterea calității diagnosticului și terapiei, de la 52,58% la 66,98%. Diferențele între OS ale celor 3 grupe de risc au fost semnificative statistic și cea mai importantă ameliorare a supraviețuirii am înregistrat-o la nivelul SRG, de la 50% la 79,31%;

2. OS a pacienților cu LAM a fost de 45,61% și nu variat în funcție de grupele de risc;
3. OS a pacienților cu LNH a fost de 33,26%, rezultat care reflectă stadiile avansate de boală în care s-au prezentat pacienții noștri și rata mare de decese precoce toxice;
4. OS a pacienților cu LH a fost de 78,48%, rezultat ce relevă necesitatea ameliorării în continuare a terapiei acestei hemopatii maligne;
5. Decesul toxic, și cel mai frecvent prin infecții severe, a reprezentat principala cauză de deces, atât la nivelul mortalității generale cât și a mortalității precoce, pentru majoritatea pacienților (lot IB, LAM și LNH)
6. Abandonul terapeutic a fost prezent într-un procent foarte mic, de 1,05%, la nivelul lotului nostru de pacienți, oglindire a comunicării eficiente medic-pacient și familie ca și a condițiilor bune de spitalizare și îngrijire medicală.
7. EFS a copiilor cu LAL a fost de 50,83%, cu ameliorarea rezultatelor semnificativ statistic odată cu creșterea calității diagnosticului și terapiei, de la 33,33% la 60,01%;
8. Pacienții cu LAM au avut o rată a recidivelor de 26,32% cu o EFS de 26,60% și la sfârșitul studiului toți pacienții decedaseră, rezultate ce relevă nu numai riscul crescut pentru recidivă al LAM dar și gravitatea deosebită a acesteia;
9. Riscul de apariție a recidivei în cazul LNH a fost mare, rata recidivelor fiind în studiul nostru de 26,32% cu o EFS de 21,38%, iar severitatea deosebită a acestora a fost reflectată de supraviețuirea de doar 20%;
10. Pacienții cu LH au avut cea mai mică rată a recidivelor de 12,12%, cu cea mai bună EFS de la nivelul întregului lot, de 78,48%, dar și în cazul acestui lot evoluția recidivelor a fost nefavorabilă cu o supraviețuire de doar 25% la încheierea studiului.
11. Rata infecțiilor în cadrul studiului nostru a fost mare, de 1,94 episoade/pacient;
12. Cele mai frecvente infecții au fost cele bacteriene, reprezentând 71,64% din episoadele infecțioase apărute în timpul chimioterapiei intensive, iar etiologia care a predominat a fost cea cu germeni gram negativi;
13. Infecțiile bacteriene s-au corelat semnificativ statistic cu chimioterapia intensivă și neutropenia sub $1.500/\text{mm}^3$, iar cele bacteriene sistemice s-au corelat cu neutropenia severă sub $500/\text{mm}^3$ și formele severe de boală (grupe de risc înalte și stadii avansate);
14. Infecțiile fungice invazive la pacienții aflați sub chimioterapie intensivă au avut o incidență de 10,44%, cea mai frecventă etiologie dovedită fiind *Candida spp* și *Aspergillus spp*;
15. Infecțiile fungice invazive s-au corelat semnificativ statistic cu chimioterapia intensivă, neutropenia severă și administrarea anterioară de antibiotice;
16. Infecțiile virale au reprezentat 17,91% dintre episoadele infecțioase apărute în timpul chimioterapiei intensive, fără însă să existe corelație statistică între acestea și neutropenie;
17. Mortalitatea prin infecție a fost mare în lotul nostru, 13,16%, și aici predominând infecțiile bacteriene;
18. În studiul nostru toxicitățile de organ au fost frecvente și foarte variate ca expresie clinică, cele mai des întâlnite fiind cele hematologice urmate de cele hepatice, digestive și neurologice;

19. Mortalitatea prin toxicități de organ de 10,53% înregistrată pentru lotului nostru relevă faptul că, în ciuda ameliorării continue a terapiei de susținere, acestea rămân o cauză importantă de deces a pacienților cu hemopatii maligne;
20. În ordinea frecvenței cauzelor, mortalitatea prin toxicități de organ a fost determinată de hemoragiile masive și necontrolate, toxicitatea hepatică severă cu insuficiență hepatică acută și sindromul hepato-renal, insuficiența multiplă de organ, aritmiile ventriculare cu șoc cardiogen și tiflita neutropenică;
21. Toxicitățile de organ au ridicat numeroase probleme de terapie de susținere și au condus la diverse alterări ale protocoalelor de chimioterapie, iar diversitatea și complexitatea lor au atras atenția asupra necesității existenței unei echipe medicale la fel de complexe (oncopediatru, specialiști în terapie intensivă, cardiologie, hepatologie, nefrologie, neurologie, etc);
22. Studiul nostru reușește să arate că, deși curabilitatea hemopatiilor maligne a crescut în ultimii ani, există încă numeroase cauze de eșec terapeutic care pot determina scăderea șanselor de supraviețuire a acestor pacienți;
23. Ameliorarea supraviețuirii copiilor cu hemopatii maligne necesită atât creșterea calității diagnosticului și a eficienței protocoalelor de chimioterapie cât și îmbunătățirea terapiei de susținere a acestor pacienți, având în vedere numeroasele toxicități severe cu potențial fatal determinate de terapia citostică agresivă.

Curriculum vitae

Date personale

Nume: Cristina Lucia Blag

Data nașterii: 21.03.1968

Adresa: Str.Rășinari nr.2, scara 2, ap.59, Cluj-Napoca, jud.Cluj

Telefon: Acasă: 0264-543818, Mobil: 0740-066919

E-mail: cristinablag@yahoo.com

Studii preuniversitare:

- 1982-1984: Liceul Matematică-Fizică "Vasile Alecsandri" Galați
- 1984-1986: Liceul Industrial nr.1 Galați; absolvit cu media generală 9,10 la examenul de bacalaureat

Studii universitare:

- 1987-1993: Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, specializarea Medicină Generală; absolvită cu nota 10 la examenul de diplomă

Studii postuniversitare:

- 1999: curs de Endoscopie digestivă la copil, Cl.Pediatrie II, absolvit cu nota 10
- 2002: curs de Hematologie și Oncologie Pediatrică, Cl.Pediatrie II, absolvit cu nota 10
- 2002: SIOP-ESO-ASPO Course, Porto, Portugalia
- 2004: curs de Hematologie și Oncologie Pediatrică, Cl.Pediatrie II, absolvit cu nota 10

- 2005: curs de Electrocardiografie Pediatrică, Cl.Pediatrie II, absolvit cu nota 10
- Din 2005: Doctorand al UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, lucrare de doctorat cu titlul: "Cauze de eșec terapeutic în hemopatiile maligne ale copilului"

Activitate profesională

- 1994-1995: medic stagiar Spitalul de Copii Cluj-Napoca și Spitalul Județean Cluj-Napoca
- 1995-2000: medic rezident pediatru Cl.Pediatrie II Cluj-Napoca
- 2000-2010: medic specialist pediatru, confirmată prin Ordinul MS nr.1011/01.12.2000, pe baza examenului susținut în sesiunea octombrie 2000, cu nota 9,17
- 2001-2010: medic specialist pediatru, Compartiment Onco-Hematologie Pediatrică, Cl.Pediatrie II, Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca
- Din 2010: medic primar pediatru, confirmată prin Ordinul MS nr.1276 din 30.09.2010, pe baza examenului susținut în sesiunea 15 iunie 2010, cu media 9,00
- Din 2010: medic primar pediatru, Secția ATI, Compartiment Terapie Intensivă Intermediară Pediatrică, Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca
- din 2001: asistent universitar la Catedra Pediatrie II, UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, validată prin hotărârea Senatului din ședința din 10.05.2001

Experiență profesională în domeniul învățământului

- stagii de pediatrie efectuate cu studenții anului V Facultatea de Medicină Generală, stagii de pediatrie efectuate cu studenții anului V Facultatea de Stomatologie
- seminarii de Științele Comportamentului efectuate cu studenții anului I Facultatea de Medicină Generală
- susținerea de cursuri post-universitare cu teme din domeniul oncologiei și hematologiei pediatrice pentru medicii rezidenți și specialiști
- îndrumarea a 7 lucrări de diplomă ale absolvenților

Participări la Congrese și Conferințe:

- 30 de participări la congrese și conferințe naționale și internaționale

Lucrări științifice publicate în țară, în străinătate, în volume de rezumate

- 10 lucrări

Lucrări științifice publicate în țară și străinătate in extenso

- Popa Gh, **Blag C**. Boala veno-ocluzivă a ficatului indusă de chimioterapia pentru leucemia acută mieloblastică, Oncohematologia Pediatrică. 2002, 3:170-174
- Popa G, **Blag C**, Porojan M, Miu N. Evaluarea calității vieții la supraviețuitorii cancerului copilăriei. Studiu preliminar. Oncohematologia Pediatrică 2003; 2: 135-138
- Popa G, Miu N, **Blag C**, Figan I, Marian M. Rezultatele tratamentului imunosupresor cu imunoglobulină antitimocitară în anemia aplastică dobândită la copil. Jurnalul Român de Pediatrie 2004; 3 (2): 43-47.

- Popa G, **Blag C**, Miu N, Maternik C. Caracteristici clinico-biologice și evolutive ale recidivelor leucemiei acute limfoblastice la copii. Jurnalul Român de Pediatrie 2004; 3 (4): 58-60
- Popa G, **Blag C**, Marian M, Bene L. Autocontrolul calității diagnosticului și disciplinei protocolare la copiii cu leucemie acută limfoblastică tratați în Clinica Pediatrie II Cluj-Napoca. Oncohematologia Pediatrică 2004; 3-4: 197-201
- Pârvan A, Miu N, Popa G, **Blag C**. Mallory-Weiss Tear in an 11 Years Old Patient. Jurnalul Pediatrului 2004; 7 (27-28): 20-22
- Popa G, **Blag C**, Miu N, Cernea D, Florescu P. Experiența Clinicii Pediatrie II Cluj-Napoca în diagnosticul și tratamentul limfomului Hodgkin. Oncohematologia Pediatrică 2004; 3-4: 209-211
- Popa G, **Blag C**, Miu N, Maternik C, Porojan Iuga M. Toxicitatea hepatică la copiii cu leucemie acută limfoblastică tratați cu doze mari de metotrexat. Oncohematologia Pediatrică 2005; 2: 19-25
- Popa G, **Blag C**, Miu N, Florescu P. Histiocitoza cu celule Langerhans. Experiența Clinicii Pediatrie II Cluj-Napoca. Oncohematologia Pediatrică 2006; 2-3: 20-22
- Popa G, Spîrchez M, **Blag C**, Miu N, Marian M. Florescu P. Limfohistiocitoza hemofagocitară asociată malignității. Presentare de caz. Oncohematologia Pediatrică 2006; 2-3: 23-25
- **Blag C**, Popa G, Miu N, Marian M, Florescu P. Limfohistiocitoza hemofagocitară asociată infecției cu EBV. Oncohematologia Pediatrică 2006; 2-3: 26-30
- **Blag C**, Popa G, Bolba C, Andreica M. Diabetul zaharat, complicație a terapiei leucemiei acute limfoblastice la copii. Clujul Medical 2011;84:258-261
- **Blag C**, Popa G. Infecții fungice invaze: factori de risc și evoluție la pacienții cu hemopatii maligne. Acta Medica Transilvanica 2011;1:71-74

Co-autor la cărți și tratate:

- Miu N, Milea J, Marți L, **Blag C**. Gastritele și boala peptică ulceroasă în Tratat de Medicină a Adolescentului sub redacția N.Miu, Ed.Casa Cărții de Știință, Cluj, 1999, 311-321
- Dragoș MC, **Blag C**. Surse și factori de stres psihosocial în Magneziul în Biologia și Patologia Umană sub redacția Nicolae Miu și Gheorghe Drăgătoiu, Ed.Casa Cărții de Știință, Cluj, 2000, 239-242
- Miu N, **Blag C**. Rolul magneziului în procesele de nutriție în Magneziul în Biologia și Patologia Umană sub redacția Nicolae Miu și Gheorghe Drăgătoiu, Ed.Casa Cărții de Știință, Cluj, 2000, 265-273
- Miu N, **Blag C**. Moartea subită la sugari în Particularități în Anestezia și Terapia Intensivă Pediatrică sub redacția Călin Mitre, Ed.Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, 2003, 477-486
- Popa G, Miu N, **Blag C**. Manual de Oncohematologie Pediatrică.Ed. Casa Cărții de Știință Cluj-Napoca 2007: 113-117
- Popa G, **Blag C**. Boli hematologice în Pediatrie, curs pentru studenți sub redacția Mariana Andreica, Nicolae Miu, Ed.Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, 2010, 305-326

Alte activități

- Membru fondator al Societății Naționale de Gastroenterologie și Hepatologie Pediatrică
- Membru în Societatea Română de Oncohematologie Pediatrică

**“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY**

PhD Thesis

**“CAUSES OF FAILURE IN THE TREATMENT OF
MALIGNANT HEMOPATHIES IN CHILDREN”**

Ph.D. Candidate: CRISTINA LUCIA BLAG

Scientific Coordinator: PROF. DR. NICOLAE MIU

2011

CONTENTS

INTRODUCTION	1
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	2
I.1. Survival Dynamics in Malignant Hemopathies Affecting Children	3
I.2. Treatment Failure	8
I.3 New Directions in the Treatment of Malignant Diseases	43
PERSONAL CONTRIBUTION	49
II.1 Working Hypothesis	50
II.2 Study Design	52
II.3 Material and Method	54
II.4 Description of the Group	70
II.5 Study n°1 – Assessment of Mortality Rates	88
II.6 Study n°2 –Assessment of Relapse Rates	125
II.7 Study n°3 –Assessment of Infections	152
II.8 Study n°4 – Assessment of Organ Toxicities	166
II.9 General Conclusions	185
III. Originality and Innovative Contributions of this Ph.D Thesis	188
IV. Bibliography	189

Key words: malignant hemopathies, treatment failure, overall survival, event-free survival, mortality, infections, organ toxicities

Introduction The incidence of childhood cancer is relatively low; however, it constantly increases every year. Curing childhood cancer represents one of the most important achievements of modern medicine. In the last few years, cure rates have reached 80% for most malignancies. This extraordinary progress is due to an improvement in the quality and accuracy of diagnosis – through the use of high-precision molecular and imaging techniques-, to the use and constant betterment of multimodal treatment strategies and to national and international collaboration among pediatric oncologists. During the last few years, specialists have focused on improving the quality of life of patients, on minimizing treatment-induced toxicity and on optimizing psychosocial support for patients suffering from malignant diseases. Therapies targeting molecular and immune markers specific to each type of malignant cell, adapted in terms of dosage to the genotype of each patient, will undoubtedly replace previous protocols of aggressive chemotherapy or at least be added to these protocols.

The purpose of this Ph.D. thesis is to address the causes of treatment failure in malignant hemopathies affecting children and to contribute to improving the survival rate and quality of life of patients diagnosed and treated in our country.

Part I. Current Stage of Knowledge

Chapter I.1 Survival Dynamics in Malignant Hemopathies Affecting Children The huge social impact of childhood and adolescent cancers called for extensive studies intended to identify their exact epidemiology, studies such as EUROCARE, in Europe, and SEER in the US; these studies release 5-year overall survival rates for children aged 0 to 14 years. European epidemiologic data reveal that, in

spite of its low incidence (140 cases for 1 million children), childhood cancer shows a constant median increase of 1% a year. Even though survival rates reached approximately 80% in developed countries, cancer remains the second most common cause of infant mortality. According to EUROCARE data, the survival rate for all types of childhood cancer was, between 1983 and 1985, of 65%, reaching 81% between 2000 and 2002. Similar results were obtained for the United States, where the 5-year overall survival rate increased from 67% between 1981 and 1983 to 82% between 1999 and 2006. The most important progress was made in the field of malignant hemopathies. For acute lymphoblastic leukemia, the most frequent malignancy affecting children, the overall survival rate reached 85% between 2000 and 2002 in Europe (with some differences between Eastern Europe and the rest of the European countries) and 89% in the USA.

Chapter I.2. In spite of the significant progress in the improvement of cure rates for childhood hematologic malignancies, treatment failure causes are still numerous and finding viable solutions for this problem represent a priority. Progressive disease and relapse are two of the most important causes for treatment failure in children with hematologic malignancies. Resistance to chemotherapy is more often associated with relapsed and progressive malignant disease. This phenomena was described in association both with conventional chemotherapy and targeted therapy. Two main groups of factors contribute to the development of drug resistance. The first group includes pharmacological and physiological factors such as drug metabolism and excretion, inadequate access of the drug to the tumour, inadequate infusion rate and inadequate route of delivery. The second group includes cell- or tissue-specific factors: overexpression in tumor cells of cytochrome P450 enzymes, modification of the activation pathways of some citostatics, activation of the DNA repair systems, regulation of cell death by evasion of apoptosis, necrosis, or evasion of senescence, the differential expression of membrane proteins (solute carriers, channels and transporters). Another important cause of therapy failure is treatment-related mortality, responsible for 2-4% of death in children with malignant hemopathies, in spite of significant improvement of supportive therapy. Treatment-related mortality is just the "iceberg peak" of the toxicities correlated with modern therapies of hematologic malignancies represented by infections, bleedings or thrombosis, tumor burden complications and organ toxicities. Refusal and abandonment of therapy is one of the most common causes of treatment failure among children with cancer in low-income countries, a complex interplay of biological, socio-economic and treatment-related factors underling this problem.

Chapter I.3. New directions in malignant diseases therapy. The past decade marked the beginning of a transitional era in cancer therapy from DNA/mitosis-based mechanisms (conventional chemotherapy) to strategies manipulating the dysregulated molecular pathways that characterize the malignant phenotype (targeted therapies). Because complex mechanisms of cancer targeted agents commonly affect multiple aspects of cancer biology simultaneously. Currently there are three broad categories of technologies used in the rational design of these targeted therapies: immunologic, nucleic acids, and small molecules. The immunologic approach currently is dominated by the use of monoclonal antibodies (MoAbs), typically to disrupt ligand-receptor interactions, their targeted being the surface-expressed tumor-associated antigens. Antisense oligonucleotides (ASO) constitute the major technologies in cancer therapeutics that use the nucleic acid approach. ASO are single-stranded, chemically modified, DNA-like molecule that can

selectively inhibit posttranscriptional gene expression through complementary nucleic acid hybridization, and finally cleave the target mRNA. The clinical success of small molecule inhibitors parallels that of MoAbs in cancer therapy, these versatile molecules being well suited to alter target intracellular or extracellular proteins either qualitatively or quantitatively. Imatinib mesylate, drug which has revolutionised chronic myeloid leukemia, is the prototype small molecule inhibitor of the tyrosine kinase (TK) domains. In the last years a special interest was given for pharmacogenetics and pharmacogenomics. Specifically, pharmacogenetics focuses on genetic variation of drug metabolizing enzymes, targets and transporters and how these genetic variations interact to produce specific drug related phenotypes. Furthermore, potential genetic markers may serve to functionally sub-classify patients for their disease and therefore influence the nature and intensity treatment. These genetic markers may indicate novel drug targets or modifiers that may positively influence drug effects and toxicity, such as reverse drug resistance and increased cellular uptake. Ultimately, the intent of pharmacogenetics is to develop polygenic models that accurately predict drug response and toxicity for individual patients, and to use these models to prospectively personalize treatment regimens with the goal of enhancing efficacy and safety through better understanding of the patient's pharmacogenetic characteristics. Pharmacogenomics is used in the context of polygenic models that describe specific drug response phenotypes.

Part II. Personal Research

Chapter II.1 Working Hypothesis. Our study is justified by the fact that, in spite of remarkable progress, cancer remains the second most common cause of infant mortality. Moreover, the results obtained in the treatment of malignant hemopathies are not as good as those attained in developed countries. We defined treatment failure in malignant hemopathies by taking into account: progressive disease, relapse, death (disease or treatment-induced) and abandonment of treatment. We intend to address the causes of treatment failure in malignant hemopathies affecting children diagnosed and treated in the Department of Pediatric Oncology at the Pediatric Clinic II of Cluj-Napoca and to analyze diagnosis and treatment guidelines, survival rates, progressive disease rates and relapse and mortality rates in malignant hemopathies.

Chapter II.2 Study Design and Chapter II.3 Material and Method This is a unicentric, retrospective, non-randomized study targeting a population of children diagnosed with malignant hemopathies by the Department of Pediatric Oncology at the Pediatric Clinic II of Cluj-Napoca. It is an observational, longitudinal study. The study extends over a period of 20 years, between January 1991 and December 2010. The purpose of the study is to address the causes of treatment failure in malignant hemopathies affecting children. In order to do so, we analyzed the diagnosis and treatment guidelines applied in malignant hemopathies, the overall survival and event-free survival rates in malignant homeopathies, the causes of death, the chemotherapy and radiotherapy-induced toxicities and their impact on protocol compliance and on survival rates for patients suffering from malignant hemopathies and the compliance, refusal and abandonment of treatment.

The study took into account 190 patients suffering from malignant hemopathies, diagnosed and treated in the Department of Pediatric Oncology at the Pediatric Clinic II

of Cluj-Napoca between January 1991 and December 2010. The patients were divided into 4 groups, contingent on the type of malignant hemopathy, as follows:

Group I: 119 patients suffering from acute lymphoblastic leukemia (ALL); this group was subdivided into two groups according to diagnosis and treatment-related criteria:

- group IA: 36 children suffering from ALL, diagnosed between January 1991 and December 2000 (no immunophenotyping was performed in their case; they were treated using modified treatment protocols);
 - group IB: 83 children suffering from ALL, diagnosed between January 2001 and December 2010 (immunophenotyping was performed in their case; they were treated in full compliance with the protocols).
- Group II: 19 patients suffering from acute myeloblastic leukemia (AML);
 - Group III: 19 children suffering from non-Hodgkin lymphoma (NHL);
 - Group IV: 33 patients suffering from Hodgkin lymphoma (HL).

Between January 1991 and December 2000, malignant hemopathies were exclusively diagnosed through peripheral blood tests and morphologic and enzymatic tests performed on bone marrow aspirates. Since 2001, the diagnosis of malignant hemopathies has become more accurate due to the introduction of immunophenotyping (for ALL and AML) and immunohistochemistry tests (for HL and NHL) in addition to morphological and histological tests. Since 2007, biomolecular tests have also started to be used for translocations specific to each type of malignant hemopathy. Several other imaging investigation techniques and various biochemical and bacteriological lab tests were used in order to make a diagnosis and assess complications. Risk group classification, staging and cytostatic treatment were performed in compliance with the international treatment protocols used for each type of malignant hemopathy at different stages, the protocols most frequently used being the German protocols of the BFM study group.

The analysis of statistical data was carried out using graphic representations of the results, such as pies, bars and box plots. The mean and median values of the parameters were calculated. Frequency tables were used. The overall survival (OS) rate and the event-free survival (EFS) rate were calculated. The Kaplan Meier product-limit method was used to estimate five or three-year survival rates. Differences in survival rates were compared using the log rank test. The significance of the correlation between variables was assessed, contingent on their nature, in accordance with one of the following methods: chi-square test, contingency coefficient, phi coefficient, linear correlation coefficient r . The results of the various analyses were considered statistically significant when the probability of error was lower than 0.05 ($p < 0.05$)

Chapter II.4 Description of the Group The group of patients under study was mainly (62.63%) formed of children suffering from ALL (group I), the other malignant homeopathies taken into account accounting for a lot less, i.e.: AML (group II) and NHL (group III) accounted each for 10.00% of the entire group, whereas HL accounted for 17.37% of all cases. The median follow-up period was of 30.5 months for the entire group, significant variations appearing contingent on the type of malignant hemopathy. For HL and ALL, the median follow-up period was of 58 and 31 months, while for AML and NHL the monitoring period was of 10 and 8 months respectively, thus reflecting the differences in survival rates recorded for our group of patients. The median age of the patients, for the entire group, was 7 years. Patients suffering from ALL had a median age

of 5 years; in the case of AML, it was 10 years; for NHL and HL, the median age of the patients was 12 years. HL was more frequently diagnosed in teenagers, 60.61% of the patients being aged between 10 and 16 years. L1 and L2, the two morphological FAB [French-American-British] subtypes, were evenly distributed in group I. The preB immunophenotype was identified in 79.73% of the children suffering from ALL who underwent immunophenotyping (89.15%). Only a relatively small number of patients were submitted to biomolecular tests (51.80% of the patients of group IB). Nevertheless, a 4.65% BCR/ABL incidence and a 2.32% MLL/AF-4 incidence were noted. For ALL, the percentage of children placed in SRG [standard risk group] and the percentage of children placed in MRG [medium risk group] were different for groups IA and IB. The number of children placed in MRG in group IB was larger, thus reflecting an increase in risk group classification accuracy over time, but also the patients' tendency in the last 10 years to get diagnosed by an oncologist at earlier stages. The AML analysis (group II) revealed that almost all morphological FAB types were represented in our group, the AML M2 being predominant (one third of the cases). 52.63% of the children suffering from AML underwent immunophenotyping and 26.32% underwent biomolecular tests. The tests confirmed the AML1-ETO translocation in one patient diagnosed with AML M1/M2, the inv16 translocation in a child suffering from AML M4-Eo and the PML-RARa translocation translocation in one case of APL [acute promyelocytic leukemia]. As far as NHL is concerned, the most common forms encountered were diffuse NHL and Burkitt lymphoma. 94.74% of the patients suffering from NHL presented to the oncologist in advanced stages: when they were diagnosed, 42.11% of the patients had stage III and 52.63% stage IV NHL. The analysis of group IV (HL) revealed the presence of all morphological subtypes, with a predominance of nodular sclerosis, diagnosed in 51.52% of the cases. In the case of children suffering from HL, 63.64% of the cases were diagnosed at an early stage, 6.06% in stage I and 57.58% in stage II, an encouraging result.

Chapter II.5 Assessment of Mortality Rates The five-year overall survival rate for patients suffering from ALL was of 59.27%. The overall survival rate increased from 52.58% in the case of group IA to 66.98% for group IB. Even though this difference is not statistically significant, it confirms that the improvement of diagnosis and treatment quality through the introduction of immunophenotyping and biomolecular tests and the administration of high doses of methotrexate increased the survival rate of the patients suffering from ALL. Another positive aspect is related to the improvement of SRG and MRG results for groups IA and IB, from 50% to 79.31% and from 55.80% to 67.57% respectively. The difference in overall survival rates contingent on the immunophenotype was small and insignificant from a statistical point of view: 77.42% for preB and of 65.95% for T, thus proving that proper immunophenotype classification and the adjustment of treatment intensity lead to the achievement of similar results for ALL. The five-year overall survival rate for patients suffering from AML (group II) was of 45.61%. In our group, risk group classification did not impact on the overall survival rate of patients suffering from AML. For NHL, the five-year overall survival rate was of 33.26%. This result had to be analyzed on a smaller group, in which 94.74% of the patients were diagnosed in advanced stages (stages III and IV). For patients suffering from HL, our study revealed an overall survival rate of 78.48%. Upon termination of the study, 36.13% of the children with ALL included in group I had died. The comparison

between the results obtained for group IA and those obtained for group IB show a significant difference in terms of mortality rates, which were of 55.56% and 27.71% respectively. These results confirm the improvement of diagnosis and treatment quality. We noticed that, in group I, the percentage of disease-related deaths (44.19%) nearly coincided with the percentage of toxicity-related deaths (46.51%). By comparing the rate of disease-related mortality and the rate of toxicity-related mortality to the overall number of deaths recorded for group IA and group IB a completely different result is obtained: in group IA, the main cause of death is disease-related (65.00%) whereas in group IB, toxicity-related deaths are predominant (60.87%). By comparing the weight of the two causes of mortality for the two subgroups of group I, we note that very similar results are recorded in terms of toxicity-related mortality: 16.67% for group IA and 16.87% in group IB. A significant difference can be observed for disease-related mortality, which decreased from 36.11% in group IA to 7.23% in group IB. For group II and group III the results obtained are not as encouraging: at the end of our study, 63.16% and 68.42% of the patients had died. Toxicity-related death represented the main cause of mortality both in children suffering from AML (66.66%) and in children suffering from NHL (53.85%). The results reflect the high occurrence of severe complications. For patients with HL, the most frequent cause of death was disease-related (66.67%), 3 out of the 4 deaths being caused by relapse unresponsive to treatment. The analysis of induction therapy failure –we included, in this category, both patients for whom complete remission failed to be achieved at the end of the induction protocol and patients with early death, during the first month of induction therapy – revealed the following results: 14.28% for ALL, 57.89% for AML, 36.84% for NHL and 3.03% for HL. In our group, no patient refused the initiation of treatment and the rate of treatment abandonment was low, of 1.05%.

Chapter II.6 Assessment of Relapse Rates For ALL, the relapse rate was of 22.69%. A significant decrease was noted, from 47.22% for group IA, to 12.04% for group IB, result which impacted on the 5-year EFS rate, which was of 33.33% for group IA and 60.01% for group IB (p 0.007). Similar results, obtained for 3-year EFS rates for patients diagnosed with preB ALL and T-ALL (69.4% and 65.93% respectively) prove that correct diagnosis and proper adjustment of the cytostatic treatment lead to similar results for the two immunophenotypes (as mentioned for the OS analysis). The bone marrow is the most common site of relapse for ALL, followed by the CNS and by combined and testicular relapses. Upon termination of the study, 29.63% of the patients suffering from ALL relapse reached their second complete remission, 44.44% had died during the first relapse and 29.63%, for which the second complete remission (CR2) had been initially achieved, died during a second relapse or after multiple relapses. For patients suffering from AML, the relapse rate revealed by the study was of 26.32%, with an EFS rate of 26.60%. The most common site of AML was the bone marrow, followed by combined relapse (bone marrow and extramedullary sites). The evolution of AML relapses was dissatisfactory, all patients having died before the conclusion of the study, 3 during the first relapse and the other 2 during the second relapse or after multiple relapses. For patients suffering from NHL, the relapse rate was of 26.32% and the EFS rate was of 21.38%. None of the subtypes was predominant. However, this group was mainly formed of patients with late stage NHL – unsurprising, given the structure of the group. Only one of the children with NHL relapse was in CR2 at the end of the study.

The other 4 had died of progressive disease. The HL category obtained the lowest relapse rate, 9.09%, and the best EFS rate, 78.10%. All 4 relapses were detected in patients having suffered from nodular sclerosis. This could be explained by the fact that 51.52% of the cases included in this group suffered from this type of HL. Three of the patients with HL relapses died of progressive disease, two during the first relapse, unresponsive to treatment, and the third, who benefited from autologous hematopoietic stem cell transplantation, died during the third relapse, unresponsive to treatment.

Chapter II.7 Assessment of Infections 368 infectious episodes were identified for the 190 children with malignant hemopathies forming the group, i.e. an average of 1.94 infectious episodes/patient. 268 of the infectious episodes (72.83%) were detected in patients undergoing intensive chemotherapy. Bacterial infections were the most common – 192 episodes (71.64%) – followed by viral infections – 48 episodes (17.91%) and invasive fungal infections – 28 episodes (10.44%) The respiratory and systemic infections were the most common bacterial infections, pneumonia and sepsis accounting for 60% of all bacterial infections. The etiology of 65 of all bacterial infection episodes (25.19%) was identified, infections caused by gram-negative bacteria being predominant: pathogenic *E.coli*, *Kebsiella* spp, *Salmonella* spp and *Pseudomonas aeruginosa*. There was a significant statistical correlation between bacterial infections and grade 2,3 and 4 neutropenia (p 0,000). The statistically significant predictive factors of systemic infections were grade 4 neutropenia, below 500/mm³, and severe forms of malignant hemopathy. Invasive fungal infections (IFI) were correlated with intensive chemotherapy, severe, long-term neutropenia and treatment with broad-spectrum antibiotics (p 0.000). We managed to identify the etiology in 42.68% of the episodes, 32.14% being classified as proven IFIs and 10.72% as probable IFIs. The most common infections were those with *Aspergillus* spp and *Candida* spp, but *Rhyzopus* spp, *Penicillium marneffeii* and *Blastomyces dermatitidis* were isolated as well. In the case of IFI, the most common site of infection was the lung. Viral infections were not linked to intensive chemotherapy; they included infections with herpes simplex and the varicella-zoster viruses, measles, rubella and epidemic parotitis. The most frequently serological identified viruses were Rotavirus, Adenovirus or Norovirus. One of our ALL patients was diagnosed with BK infection after a hematopoietic stem-cell transplant while another patient suffering from ALL developed multifocal leukoencephalopathy coupled with dementia, which was believed to have been caused by the JC virus. The BK and JC viruses are two of the viruses causing more and more severe infections in oncologic patients. The overall infection-induced mortality rate was of 13.16% for the entire group. As expected, bacterial infections were the most common cause of death, accounting for 10% (all patients with severe sepsis) at the level of the entire group. IFIs accounted for 2.11% of the deaths and viral infections for 1.05%.

Chapter II.8 Assessment of Organ Toxicities The numerous and various organ toxicities identified by our study caused a mortality rate of the entire group of 10.53%, accounting for 27.02% of the total number of deaths. The most common toxicity encountered in the study was hematologic toxicity, represented by peripheral pancytopenia (2,58 episodes/patient). Most episodes of hematologic toxicity were severe, 381 out of the 492 episodes being grade 3 and 4. From a statistical point of view, there was a significant correlation between the seriousness of these episodes and intensive chemotherapy. Severe neutropenia, below 500/mm³ was statistically correlated with

severe infections, more precisely with bacterial systemic infections and invasive fungal infections (p 0,000). Neutropenic enterocolitis (typhlitis) had an incidence rate of 2.10% within our group, triggering a mortality rate of 0.53%. Anemia did not cause any complications for the group of patients under study, being kept under control by transfusion therapy. By contrast, grade 4 thrombocytopenia was one of the most feared complications, causing death by massive bleeding, uncontrollable by transfusion therapy. It triggered a mortality rate of 4.74%, the highest among organ toxicity-induced mortality rates. Digestive toxicity took several forms, the most frequent being mucositis (0,75 episodes/patient). Constipation and non-infectious diarrhea were complications rarely identified in our group. Constipation was correlated with the administration of Vincristine. Intensive chemotherapy rarely induced vomiting episodes, which were not severe. Transient abnormalities, mostly the hepatocytolysis syndrome, were observed in liver function tests. Hepatotoxicity was the second most common chemotherapy-related organ toxicity after hematologic toxicity. The sinusoidal obstruction syndrome was diagnosed in 2 of our patients, who both developed this complication after undergoing aggressive chemotherapy, i.e. after the administration of a strong dose of citozin-arabinozid and after a conditioning protocol for hematopoietic stem-cell transplant. Severe hepatotoxicity, taking the form of acute liver failure and hepatorenal syndrome was the second most common cause of organ toxicity-induced death, causing a mortality rate of 2.63%. The cases of acute renal failure identified in our group, mostly grade 1 or 2, were most frequently correlated with the malignancy, being caused by blastic infiltration or large tumors coupled with extrarenal obstruction or by the tumor lysis syndrome. Three cases of hemorrhagic cystitis were identified in the group under study, one of which was severe and required bladder reconstruction surgery. Three of our patients died of what appeared to be multiple organ failure induced by aggressive chemotherapy, in the absence of sepsis, leading to a mortality rate of 1.58%. Although rarely encountered in our group, cardiotoxicity was severe, leading to a mortality rate of 2.11%. It was correlated, in all cases, with the administration of antraciclina. In the group under study, neurotoxicity occurred at a rate of 0.35 episodes/patient, mainly taking the form of vincristine-induced peripheral neurotoxicity. Central neurotoxicity, rarely observed in our study, was correlated with the presence of intrarectal Methotrexate and/or radiotherapy on treatment schemes. The tumor lysis syndrome occurred both spontaneously, upon diagnosis of the malignant hemopathy, and after the initiation of chemotherapy, most cases being grade grade 1 and 2. The incidence of transient hyperglycemia was of 4.95%. Hypersensitiveness to E.coli Asparaginase, administered to all patients who had this cytostatic drug in their treatment protocol, was highly frequent in the group under study (12.5%). Clinical manifestations varied from simple allergic skin rashes to anaphylactoid reactions. Digestive, renal, neurologic, metabolic or allergic toxicities did not cause death in the group under study.

Chapter II.9 General Conclusions

1. The overall survival rate for patients suffering from ALL was of 59.27%. Results bettered with the improvement of diagnosis and treatment quality, from 52.58% to 66.98%. The differences measured among the survival rates of the 3 risk groups were statistically significant. The most significant increase in survival rates was observed for SRG, from 50% to 79.31%;

2. The overall survival rate for patients suffering from AML was of 45.61%. It did not vary with the risk group;
3. The overall survival rate for patients suffering from NHL was of 33.26%. The result reflects the diagnosis of patients in advanced stages and the high rate of premature, toxically-induced deaths;
4. The overall survival rate for patients suffering from HL was of 74.48%. This result stresses the necessity to continue to improve treatment for this malignant hemopathy;
5. Toxic death and severe infections represented, for most of the patients (group IB, AML and NHL), the main cause of death, both in terms of overall mortality and in terms of early death;
6. The treatment abandonment rate was low, of only 1.05%, reflecting the effective doctor-patient and family communication and the good medical facilities and medical care;
7. The event-free survival rate for children suffering of ALL was of 50.83%. Results significantly improved with the increase in diagnosis and treatment quality, from 33.33% to 60.01%;
8. Patients suffering from AML had a relapse rate of 26.32% and an EFS rate of 26.60%. Upon termination of the study, all relapsed patients had died. These results reflect not only the high risk of AML relapse, but also its severity.
9. The risk of NHL relapse was high, the relapse rate reaching, in our study, 26.32%, with an EFS rate of 21.38%. Furthermore, the extreme seriousness of these figures is underlined by the survival rate of merely 20%;
10. Patients suffering from HL had the lowest relapse rate (12.12%) and the best EFS of the entire group (78.48%). Nevertheless, this group showed an unfavorable evolution in relapse cases, the survival rate being of only 25% upon termination of the study;
11. The infection rate was high for the group under study (1.94 episodes/patient);
12. Bacterial infections were the most frequently identified, accounting for 71.64% of the infectious episodes induced by intensive chemotherapy. These infections were mainly caused by gram-negative germs;
13. A significant correlation was statistically established between bacterial infections and intensive chemotherapy and neutropenia below $1.500/\text{mm}^3$; systemic bacterial infections were correlated with severe neutropenia below $500/\text{mm}^3$ and severe forms of the disease in question (high risk groups and advanced stages);
14. The incidence of invasive fungal infections in patients undergoing intensive chemotherapy was of 10.44%, the most common proven causes being *Candida* spp and *Aspergillus* spp;
15. The correlation between invasive fungal infections and intensive chemotherapy, severe neutropenia and prior administration of antibiotics proved to be statistically significant;
16. Viral infections accounted for 17.91% of the infectious episodes occurred during intensive chemotherapy. However, there is no statistical correlation between these episodes and neutropenia;
17. Infection-induced mortality was high in the group under study (13.16%), bacterial infections prevailing in this case as well;
18. In our study, organ toxicities were frequent and took various clinical forms, the most common being hematologic, followed by hepatic, digestive and neurologic toxicities;

19. The organ toxicity-related mortality rate of 10.53%, recorded for the group under study, reveals the fact that, despite continuous improvement of the support therapy, organ toxicity remains an important cause of death for patients with malignant hemopathies;
20. Organ toxicity-related death was caused, in order of frequency, by massive, uncontrollable hemorrhages, severe hepatotoxicity coupled with acute renal failure and hepatorenal syndrome, multiple organ failure, ventricular arrhythmias coupled with cardiogenic shock and neutropenic enterocolitis (typhlitis);
21. Organ toxicities raised numerous problems in terms of support therapy and led to various adjustments of chemotherapy protocols. Their diversity and complexity outlined the necessity of a complex medical team formed of the pediatric oncologist and specialists in intensive care, cardiology, hepatology, nephrology, neurology etc;
22. Our study manages to show that, in spite of the increase in cure rates for malignant hemopathies in the last few years, there still are numerous causes of treatment failure that can lower the survival chances of these patients;
23. The increase in survival rates for patients suffering from malignant hemopathies requires, on the one hand, the improvement of diagnosis quality and of the effectiveness of chemotherapy protocols and, on the other hand, the amelioration of support therapy for these patients, given the numerous cases of severe, potentially fatal toxicities induced by aggressive cytostatic treatment

Curriculum vitae

Personal Information

Name: Cristina Lucia Blag

Date of birth: 21.03.1968

Address: Str.Rășinari nr.2, scara 2, ap.59, Cluj-Napoca, jud.Cluj

Telephone: Home: 0264-543818, Mobile: 0740-066919

E-mail: cristinablag@yahoo.com

Education

High School:

- 1982-1984: Mathematics-Physics High School “Vasile Alecsandri”, Galați
- 1984-1986: Industrial High School no.1 Galați; graduation exam result 9,10/10

Undergraduate Studies:

- 1987-1993: “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, major in General Medicine; graduated with 10/10

Post-graduate Studies:

- 1999: Course in Digestive Endoscopy in children, Pediatric Clinic no. 2, graduated with 10/10
- 2002: Course in Paediatric Hematology and Oncology, Pediatric Clinic no. 2, graduated with 10/10
- 2002: SIOP-ESO-ASPO Course, Porto, Portugal

- 2004: Course in Paediatric Hematology and Oncology, Pediatric Clinic no. 2, graduated with 10/10
- 2005: Course in Paediatric Electrocardiography, Pediatric Clinic no. 2, graduated with 10/10
- Since 2006: PhD candidate at "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy of Cluj-Napoca, title of PhD dissertation: "Therapy Failure Causes in Malignant Hemopathies in Children"

Professional Experience

- 1994-1995: intern at the Children's Hospital in Cluj-Napoca and the County Hospital of Cluj-Napoca
- 1995-2000: resident physician at the Pediatric Clinic no. 2, Cluj-Napoca
- 2000: paediatric physician, confirmed by Health Ministry Order no. 10111/01.12.2000 upon the exam held in October 2000, result: 9.17/10
- 2000-2010: paediatric physician, Pediatric Hemato-Oncology Department, the Emergency Clinical Hospital of Cluj-Napoca
- since 2010: primary physician confirmed through Health Ministry Order 1276 of 30.09.2010 upon the exam held in 15 June 2010, result: 9/10
- since 2010: primary pediatric physician, ATI Department, Intensive Paediatric Intermediary Care, the Emergency Clinical Hospital of Cluj-Napoca
- since 2001: teaching Assistant at the Department of Pediatrics II, "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, validated by Decision of the Senate of 10.05.2001

Professional Experience in Academic Teaching

- internships in Pediatrics with 5th year students of the Faculty of General Medicine
- internships in Pediatrics with 5th year students of the Faculty of Dental Medicine
- Behavioral Science seminars with 1st year students of the Faculty of General Medicine
- post-graduate courses in the fields of Pediatric Oncology and Hematology for residents and specialized physicians
- coordination of 7 graduation theses

Congresses and Conferences Attended:

- over 30 national and international congresses and conferences attended

Scientific papers published nationally and abroad in summary reviews

- 10 papers

Scientific papers and presentations

- Popa Gh, **Blag C.** Hepatic Veno-Occlusive Disease Induced by Chemotherapy for Acute Myeloblastic Leukimia, *Oncohematologia Paediatrică*. 2002, 3:170-174

- Popa G, **Blag C**, Porojan M, Miu N. Assessment of Life Quality in Pediatric Cancer Survivors. Preliminary Study. *Oncohematologia Paediatrică* 2003; 2: 135-138
- Popa G, Miu N, **Blag C**, Figan I, Marian M. Results of Immunoglobulin Immunosuppressive Treatment in Infancy Acquired Aplastic Anemia. *Jurnalul Român de Pediatrie* 2004; 3 (2): 43-47.
- Popa G, **Blag C**, Miu N, Maternik C. Clinical-Biological and Evolution Features of Acute Relapses of Lymphoblastic Leukemia în Infants. *Jurnalul Român de Pediatrie* 2004; 3 (4): 58-60
- Popa G, **Blag C**, Marian M, Bene L. Diagnosis and Protocolary Discipline Quality Self-control in Infants with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated in Pediatric Clinic no. 2 of Cluj-Napoca. *Oncohematologia Paediatrică* 2004; 3-4: 197-201
- Pârvan A, Miu N, Popa G, **Blag C**. Mallory-Weiss Tear in an 11 Years Old Patient. *Jurnalul Pediatrului* 2004; 7 (27-28): 20-22
- Popa G, **Blag C**, Miu N, Cernea D, Florescu P. The Experience of the Pediatric Clinic no.2 of Cluj-Napoca in the Diagnosis and Treatment of Hodgkin Lymphoma. *Oncohematologia Paediatrică* 2004; 3-4: 209-211
- Popa G, **Blag C**, Miu N, Maternik C, Porojan Iuga M. Hepatic Toxicity in Infants with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with High Doses of Metotrexat. *Oncohematologia Paediatrică* 2005; 2: 19-25
- Popa G, **Blag C**, Miu N, Florescu P. Histiocytosis with Langerhans Cells. The Experience of the Pediatric Clinic no. 2 of Cluj-Napoca. *Oncohematologia Paediatrică* 2006; 2-3: 20-22
- Popa G, Spîrchez M, **Blag C**, Miu N, Marian M. Florescu P. Hemophagocytic lymphohistiocytosis Associated with Malignancy. Case Study. *Oncohematologia Paediatrică* 2006; 2-3: 23-25
- **Blag C**, Popa G, Miu N, Marian M, Florescu P. Hemophagocytic lymphohistiocytosis Associated with Epstein-Barr Virus Infection. *Oncohematologia Paediatrică* 2006; 2-3: 26-30
- **Blag C**, Popa G, Bolba C, Andreica M. Diabetes Mellitus, Complication of the Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia in Infants. *Clujul Medical* 2011;84:258-261
- **Blag C**, Popa G. Invasive Fungal Infections: Risk Factors and Evolution in Patients with Malignant Hemopathies. *Acta Medica Transilvanica* 2011;1:71-74

Co-author of Books and Treatises

- Miu N, Milea J, Marți L, **Blag C**. Gastritis and Peptic Ulcer in *Tratat de Medicină a Adolescentului* edited by N.Miu, Ed.Casa Cărții de Știință, Cluj, 1999, 311-321
- Dragoș MC, **Blag C**. Psycho-Social Stress Sources and Factors in Magneziul in *Biologia și Patologia Umană* edited by Nicolae Miu and Gheorghe Drăgătoiu, Ed.Casa Cărții de Știință, Cluj, 2000, 239-242

- Miu N, **Blag C.** The Role of Magnesium in Nutrition Processes in Magneziul in Biologia și Patologia Umană edited by Nicolae Miu and Gheorghe Drăgătoiu, Ed.Casa Cărții de Știință, Cluj, 2000, 265-273
- Miu N, **Blag C.** Sudden Death in New-Born Children in Specifics of Paediatric Anaesthesiology and Intensive edited by Călin Mitre, Ed.Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, 2003, 477-486
- Popa G, Miu N, **Blag C.** Handbook of Paediatric Oncohematology. Ed.Casa Cărții de Știință Cluj-Napoca 2007: 113-117
- Popa G, **Blag C.** Hematologic diseases in Pediatrics edited by Mariana Andreica, Nicolae Miu, Ed.Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, 2010, 305-326

Other activities:

- Co-founder of the National Society of Gastroenterology and Paediatric Hepatology
- Member of the Romanian Society of Paediatric Oncohematoly