

Sesje plenarne

Sesja 2.

Nowe technologie w diagnostyce i leczeniu nowotworów

[1]

MikroRNA jako cel i narzędzie w terapii nowotworów

**Edyta Kosciańska, Julia Starega-Rostań,
Marta Olejniczak, Piotr Kozłowski, Paulina Gałka,
Włodzimierz J. Krzyżosiak**

Pracownia Genetyki Nowotworów IChB PAN, Poznań

MikroRNA (miRNA) należą do rodziny matych, niekodujących RNA, które regulują wiele procesów biologicznych u różnych organizmów, począwszy od prostych *Eucariota* po człowieka. Genom człowieka koduje ponad 700 miRNA, które kontrolują ekspresję większości genów kodujących białka i regulują takie procesy, jak rozwój, proliferacja i różnicowanie komórek oraz apoptoza. W komórkach ludzkich dojrzałe cząsteczki miRNA, wielkości około 20nt, powstają z prekursorów pri-miRNA oraz pre-miRNA w wyniku działania rybonukleaz Drosha i Dicer. Potraskrypcyjna regulacja ekspresji genów za pośrednictwem miRNA jest inicjowana przyłączeniem kompleksu miRISC do częściowo komplementarnej sekwencji w regionie 3'UTR regulowanego mRNA. Takie oddziaływanie miRNA z mRNA prowadzi w konsekwencji do inibicji translacji mRNA lub jego deadenylacji lub degradacji. W wielu badaniach wykazano, że deregulacja funkcji miRNA poprzez nadekspresję lub inibicję prowadzi do wielu chorób, w tym również nowotworowych. Dlatego też przywrócenie prawidłowej ekspresji miRNA w zmienionej chorobowo tkance może być jedną ze strategii terapii antynowotworowej.

Technologia miRNA jest skierowana na obniżanie lub podwyższanie poziomu ekspresji miRNA, zarówno w podejściu badawczym, jak i w zastosowaniach terapeutycznych. W celu obniżenia poziomu miRNA stosuje się oligonukleotydy antysensowe zwane anty- lub antagonizantami lub podejścia z użyciem „gąbek molekularnych” (ang. *sponges*, *decoys*) wchłaniających nadmierne ilości miRNA. W celu podniesienia poziomu miRNA są one wprowadzone do komórek w formie syntetycznego mimetyku, który może zastąpić brakujący miRNA. Alternatywne podejście zakłada wprowadzenie miRNA kodowanych przez wektory typu shRNA lub sh-miR. Nasze prace badawcze koncentrują się na podejściu opartym o wektory. Badamy strukturalne podstawy biogenezy ludzkich miRNA, aby „podpatrując naturę”, móc projektować bardziej skuteczne kasety ekspresyjne, z których w pełnym szlaku biogenezy mikroRNA zachodziłaby wydajna ekspresja reagenta siRNA i miRNA. Implikacje naszych wyników dotyczących aktywności i specyficzności działania Drosha i Dicer dla badań i terapii nowotworów zostaną zaprezentowane w referacie.

MicroRNA as target and tool for cancer therapy

MicroRNAs (miRNAs) are a family of small non-coding RNAs that regulate multiple biological processes in various organisms ranging from simple eukaryotes to humans. The human genome harbours more than 700 miRNA genes which keep under control most of the protein coding genes, and regulate such processes as development, cell proliferation, differentiation and apoptosis. The ~20nt mature miRNAs are generated in human cells from primary precursors named pri-miRNAs and secondary precursors pre-miRNAs in two RNA cleavage steps executed by ribonucleases Drosha and Dicer. The post-transcriptional regulation of gene expression by miRNA is initiated by the binding of the effector complex miRISC to partially complementary sequences in the 3'-UTR of mRNAs. Binding typically results in mRNA repression by the inhibition of its translation or deadenylation and degradation. Numerous studies have shown that deregulation of miRNA function by their overexpression, partial inhibition or complete loss contributes to many human diseases including cancer (oncomiRs). Thus, the restoration of normal miRNA expression in affected tissue is considered one of the strategies to cope with cancer.

The miRNA technology is aimed at either blocking or overexpressing cellular miRNAs for research or therapeutic purposes. To downregulate the overexpressed miRNAs the antisense oligonucleotides known as antimirs or antagomirs are used. Another approach to inhibit the overexpressed miRNAs is to use miRNA sponges or decoys designed to sequester the overproduced miRNAs. On the other hand, in cases of miRNA underexpression such miRNA may be transfected to cells as an antisense strand of siRNA-like duplex known as miRNA mimetic. Alternatively, specific miRNAs may be expressed in cells from suitable vectors in the way siRNAs are expressed from short hairpin RNAs (shRNAs) or sh-miRs. Our recent research is focused on the issues related to vector based strategies used by miRNA and RNAi technologies. We study structural aspects of human miRNA biogenesis to take lessons from nature on how to create miRNA precursor based expression cassettes to release specific miRNAs and siRNAs in cells. Implications of our studies on Drosha and Dicer activities and specificities to cancer research and therapy will be discussed.

[2]

Micro-RNA w diagnostyce i terapii raka niedrobnokomórkowego płuc

Marcin Skrzypski

[3]

Perspektywy TPMCC (*Therapeutic Personalized Multimodality Cancer Care*) w leczeniu chorych na raka regionu głowy i szyi

Rafał Suwiński

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Dzięki postępom w metodach obrazowania nowotworów, komputerowemu planowaniu leczenia i nowym technikom terapeutycznym możliwa jest obecnie precyzyjna konformacja (dopasowanie) przestrzennego rozkładu fizycznej dawki promieniowania do obrysów guza nowotworowego i otaczających go narządów krytycznych. Osiągnięcie w pełni konformalnego rozkładu dawki fizycznej nie oznacza jednak konformalności w zakresie dawki biologicznej. Dalszy postęp w leczeniu skojarzonym nowotworów regionu głowy i szyi będzie możliwy dzięki poznaniu kluczowych relacji pomiędzy ekspresją markerów molekularnych a klinicznym efektem leczenia. Perspektywa ta stoi u podstaw TPMCC (*Therapeutic Personalized Multimodality Cancer Care*), tj. leczenia skojarzonego, w którym nie tylko przestrzenny rozkład fizycznej dawki promieniowania, lecz również schemat frakcjonowania, sekwencja stosowanych metod leczenia i wybór leczenia systemowego będzie optymalizowany w zależności od indywidualnej charakterystyki biologicznej guza nowotworowego. W prezentacji zostaną przedstawione możliwości zastosowań TPMCC w leczeniu chorych na raka regionu głowy i szyi na przykładzie wyników badań własnych i wybranych doniesień z piśmiennictwa.

[4]

Genetyczne uwarunkowania wyboru leczenia w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego

Andrzej Lange

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk
Dolnośląskie Centrum Transplantacji Komórkowych z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku

Poczynione ostatnio postępy dotyczące zrozumienia genetycznych podstaw nowotworów szpiku skłoniły WHO do opracowania wraz z Amerykańskim i Europejskim Towarzystwem Hematologicznym nowych wytycznych odnośnie użycia uaktualnionej klasyfikacji hematologicznych nowotworów złośliwych. Uaktualniona wersja podkreśla rolę badań genetycznych w ustaleniu pierwotnego rozpoznania. Badania te obejmują pełną analizę cytogenetyczną komórek szpiku kostnego w momencie rozpoznania oraz później, aby umożliwić śledzenie odpowiedzi na terapię i wykrycie pojawienia się nowych nieprawidłowości

genetycznych. Zagadnienie to ma nie tylko ogromne znaczenia dla procesu diagnostycznego, ale również przewidywania odpowiedzi na leczenie.

1. Anemia aplastyczna (AA) i anemia oporna na leczenie (RA) zdefiniowane przez kryteria morfologiczne charakteryzują się różnymi nieprawidłowościami chromosomalnymi, których obserwacja wskazuje na domniemany patomechanizm oraz przewidywaną odpowiedź na leczenie. Obecność delecji w chromosomie 13 (del(13q)), dodatkowy chromosom 8 (+8), delecja w chromosomie 20 (del(20q)) lub utrata chromosomu Y (-Y) wskazuje na zmiany chorobowe w szpiku kostnym, które związane są z dobrą odpowiedzią na terapię immunosupresyjną. Natomiast utrata chromosomu 7 (-7) oraz delecja w chromosomie 5 (del(5q)) stanowią o złym rokowaniu, które jest związane z nieimmunologiczną patofizjologią schorzenia.
2. Pacjentów z AML bez zmian cytogenetycznych, którzy mają mutacje w genach *NPM1* i *CEBPA*, cechuje dwukrotnie częstsze czteroletnie przeżycie w porównaniu z pacjentami z mutacją w genie *FLT3*.
3. W zespołach mieloproliferacyjnych przełomowe wykazanie związku między obecnością genu fuzyjnego *BCR/ABL* a odpowiedzią ma inhibitory kinazy tyrozynowej w CML umożliwia użycie leczenia celowanego, które może być później adaptowane zgodnie z pojawieniem się nowych nieprawidłowości genetycznych w klonach nowotworowych. W innej podgrupie pacjentów wykrycie mutacji genu *JAK2* przyczynia się w znaczący sposób do rozpoznania czerwienicy prawdziwej (PV) i wyznacza podgrupy pacjentów z nadpłytkowością samoistną (ET) i mielofibrozą (MF), które mogą odpowiadać na terapię celowaną na zablokowanie następstw mutacji.

Odpowiednio dostosowane leczenie zależy nie tylko od genetycznych podstaw choroby, ale również od czynników genetycznych, które wiążą się z przewidywaniem odpowiedzi na chemioterapię oraz możliwymi niepożądanymi działaniami leczenia. Polimorfizm genów kodujących enzymy odpowiedzialne za metabolizm ksenobiotyków może służyć do przewidywania toksyczności. Podobnie, polimorfizm genów kodujących cytokiny, chemokiny i ich receptory ma duże znaczenie w przewidywaniu i) toksycznych efektów chemioterapii (gen *TNF α*), ii) podatności na niektóre patogenne drobnoustroje (gen *NOD2*), iii) skłonności do wystąpienia ostrej reakcji przeszczep przeciw gospodarzowi (gen *CCR5*), iv) podatności na reaktywację wirusów z rodzaju *Herpes* (gen *INF γ*).

Podsumowując, wszyscy pacjenci cierpiący na nowotwory szpiku muszą mieć wykonane badanie kariotypu oraz rozszerzone badania genetyczne. Umożliwi to i) właściwe rozpoznanie i ii) wczesne zidentyfikowanie pacjentów z korzystnymi (np. *PML/RAR α*) i źle rokującymi cechami genetycznymi. Wdrożone leczenie, które jest zaadaptowane odpowiednio do przewidywanego przebiegu choroby, umożliwi poprawę przeżywalności, podobnie jak zastosowanie leczenia skierowanego bezpośrednio na opisane mutacje promujące wzrost nowotworu. Opis pacjenta w zakresie jego systemu immunologicznego pomaga w podjęciu decyzji dotyczącej profilaktyki lub leczenia wyprzedzającego odnośnie komplikacji infekcji mogących zagrażać życiu.

Genetic characteristics of haematological patients: role in diagnosis and prediction of response to treatment

Recent advances in understanding the genetic background to myeloid neoplasms prompted the WHO to elaborate with the American and European Societies of Hematology new guidelines for using the revised version of classification of haematological malignancies. The revised version strengthens the role of genetic work essential for primary diagnosis. This work includes a complete cytogenetic analysis of bone marrow cells at the diagnosis and thereafter for following the response to the therapy and detection of genetic evolution. This approach proved to have a high power not only in supporting the diagnosis but also in prediction of treatment response.

1. AA and RA/MDS defined by morphological criteria present various chromosomal abnormalities supporting the diagnosis and pointing out a putative pathomechanism and predicting the response to treatment. The presence of del(13q), +8, del(20q) or -Y may represent bone marrow failure associated with a good response to immunosuppressive therapy, while the presence of -7 and del(5q) is of a bad prognosis considered to be related to a non-immune pathophysiology.
2. In cytogenetically normal AML the most frequent mutations involve *FLT3*, *NPM1*, and *CEBPA*. They have different prognostic significance; *NPM1* and *CEBPA* positive cases have a survival probability of 4 yrs, twice as good as that seen in AML cases with *FLT3* mutation.
3. In myeloproliferative syndromes the revolutionary recognition of an association between the presence of *BCR/ABL* hybrid gene and response to inhibitors of tyrosine kinase in CML enables the use of a targeted treatment which may be further adapted according to the genetic evolution of neoplastic clones. In another subset of patients *JAK2* mutation adds greatly to the diagnosis of PV and marks a subset of patients with ET and MF which may respond to treatment aimed at blocking the mutation effect.

Tailoring the treatment relies not only on the genetic background to the disease but also on some genetic features predicting the response and possible adverse effect of chemotherapy. Polymorphism of genes encoding enzymes responsible for the metabolism of xenobiotics may predict toxicity. Similarly, that of genes encoding cytokines, chemokines and their receptors has a strong power of prediction of (i) the toxic effect of chemotherapy (*TNFalpha*), (ii) vulnerability caused by some microbial pathogens (*NOD2*), (iii) susceptibility to aGvHD (*CCR5*), (iv) susceptibility to Herpes viruses reactivation (*INFgamma*).

In conclusion, all patients suffering from myeloid malignancies must be karyotyped and extended genetic work must be performed to make possible (i) proper diagnosis and (ii) early recognition of patients with favourable (e.g. *PML/RARalpha*) and more difficult genetic prediction pattern. The implemented treatment adapted to the predicted severity of the course of the disease result with higher survival rate. The same is true for using treatment which

targets an exactly described mutation which promotes cancer growth. Description of patients with respect to their immune system potential assists in making the decision of prophylactic or pre-emptive treatment of life-threatening infectious complications.

[5]

Czy możliwa jest personalizacja przeszczepienia szpiku?

Wiesław Wiktor Jędrzejczak

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Przeszczepianie szpiku – obecnie rozumiane szerzej jako przeszczepianie komórek krwiotwórczych – było jedną z pierwszych bardzo wystandaryzowanych metod leczniczych, którą niemal w identyczny sposób wykorzystywano u wszystkich kwalifikowanych do niej chorych. Wynikało to stąd, że metoda kliniczna wyjściowo była prostą adaptacją metod wcześniej opracowanych i wykorzystywanych u psów i myszy. W klinice metoda zderzyła się z ogromną różnorodnością stanu zdrowotnego chorych, co ograniczyło pierwotnie jej zastosowanie tylko do młodych chorych bez schorzeń dodatkowych, w stosunku do tego, które było wskazaniem do wykonania zabiegu. Z drugiej strony okazało się, że efekt leczniczy zabiegu można zwiększyć, dostosowując rodzaj megachemioterapii i radioterapii do rodzaju schorzenia. Wreszcie, okazało się, że chorzy niezależnie od tych czynników są różnicowani pod względem dostępności dawcy komórek krwiotwórczych i tylko w odniesieniu do niektórych z nich istnieje możliwość wyboru rodzaju dawcy. Próby rozwiązania tych problemów doprowadziły do opracowania bardzo wielu odmian metodycznych przeszczepiania komórek krwiotwórczych, obejmujących różne rodzaje i różne natężenie leczenia przedprzeszczepowego, różne rodzaje komórek wykorzystywanych do przeszczepiania i różne sposoby prowadzenia chorych po przeszczepieniu. Tym samym doszło do pewnej personalizacji wyboru rodzaju zabiegu przeszczepienia oraz sposobu wykonania tego zabiegu. Inaczej mówiąc, chory na ostrą białaczkę wysokiego ryzyka, który nie ma ani dawcy rodzinnego, ani dorosłego dawcy niespokrewnionego, musi otrzymać przeszczep krwi pępowinowej albo zostać zdyskwalifikowany od leczenia przeszczepieniem. Kolejnym czynnikiem warunkującym decyzję leczniczą dotyczącą konkretnego chorego stał się rozwój metod alternatywnych w stosunku do przeszczepiania szpiku. Opracowano specjalne skale ryzyka zabiegu przeszczepiania mające w założeniu zracjonalizować wybór pomiędzy przeszczepieniem a leczeniem bezprzeszczepowym. Dalsza personalizacja wyboru rodzaju metody i sposobu jej wykorzystania oprócz zalety dostosowywania leczenia do indywidualnej sytuacji chorego ma też zasadniczą wadę polegającą na tym, że będzie bardzo trudno porównawczo oceniać tak różnorodnie stosowane leczenie i ulepszać je na podstawie wyników tego porównania.

Is it possible to personalize bone marrow transplantation?

Bone marrow transplantation, now considered more widely as transplantation of haematopoietic cells, was one of the first well standardized therapeutic methods, performed in an almost identical way in all qualifying patients. This was due to the fact that the original clinical method was a simple adaptation of the method originally elaborated on dogs and mice. In clinical practice this method was confronted with high diversity of the patients' health status, which originally limited its use to young patients without underlying disorders additional to the disease that was an indication for transplantation. On the other hand, it was found that therapeutic efficacy of the procedure could be increased if the type of megachemotherapy and radiotherapy used was adjusted to the type of disorder. Finally, it was found that independently of these factors patients differ with respect to the availability of a suitable donor of haematopoietic cells and that only for some of them is there a possibility to choose the donor. Attempts to solve these problems led to the development of many methodological variants of transplantation of haematopoietic cells including various types and various intensity of conditioning prior to transplantation, various types of sources of cells used for transplantation and variations in post-transplant care. This way a certain stage of personalization of the choice of a particular type of transplantation and of its specific performance was achieved. In other words, a high-risk acute leukaemia patient lacking both an identical sibling and an unrelated adult marrow donor has to either receive a cord blood transplant or be disqualified from transplantation. An additional factor influencing the decision concerning a particular patient is the development of methods alternative to bone marrow transplantation. In order to rationalize the individual decisions for either transplantation or not, special risk assessment scales have been developed. Further widespread personalization of the selection of therapeutic method and mode of its use, besides the advantage of adjusting treatment to individual patient needs, also has a drawback as it may lead to difficulties in recruitment of a sufficient number of patients to trials comparing various treatment approaches and may disturb further improvement of treatment approaches based on the results of such trials.

Sesja 3.

Nowe narzędzia w diagnostyce i terapii nowotworów

[6]

Zautomatyzowana diagnostyka zmian genetycznych

Bohdan Górski

Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

[7]

Lung cancer biobanking

Jacek Nikliński^{1,2}, Mirosław Kozłowski², Lech Chyczewski³, Wojciech Laudański²

¹Department of Clinical Molecular Biology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

²Department of Thoracic Surgery, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

³Department of Pathology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

The establishment of biorepositories of DNA, RNA, serum and plasma, linked to clinical and epidemiologic data, is central to the goals of cancer research, including the investigation of biomarkers for early detection, prediction of response, prognosis and individualized cancer therapy.

To optimise the standardization, preservation and use of the clinical specimens, the Lung Cancer Tissue Bank (LCTB) was set up at the Medical University of Białystok.

We present herein our experience in establishing a repository for lung cancer research, with discussion of elements to be considered when establishing such a resource, from the quality assurance of samples to the organized collection and storage of associated clinical data. The LCTB developed standard operating procedures to ensure uniformity in the collection and labelling of specimens. Specimens were collected from both the lesion and the surrounding normal lung tissue. All specimen details were recorded in a separate database.

The biobank facility is divided into four sections: (i) storage of frozen tissue samples, (ii) storage of blood and blood components, (iii) storage of tissue designated for DNA/RNA/microRNA extraction, (iv) extracted DNA, RNA and microRNA.

Methods for biomolecule extraction were tested by examining both the quality and the quantity of a recovered sample.

[8]

Zahamowanie rozwoju nowotworu mózgu u ludzi za pomocą RNA

Jan Barciszewski¹, Stanisław Nowak², Eliza Wyszko¹, Katarzyna Rolle¹, Monika Piwecka¹, Ryszard Zukiel², Mirosława Barciszewska¹

¹Institut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

²Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Złośliwe nowotwory mózgu (glejaki) są niezwykle agresywne, genetycznie niestabilne i wyjątkowo odporne na apoptozę. Wykazują dużą atypię i szybką proliferację komórek, co odzwierciedla ich małą podatność na dotychczas znane chemoterapeutyki i radioterapię, niezależnie od zakresu resekcji guza. Brak skuteczności w leczeniu złośliwych guzów mózgu wymusza poszukiwanie nowych metod terapii.

Przez trzy ostatnie dekady badane są możliwości wykorzystania cząsteczek DNA i RNA w terapii nowotworów. Z małymi sukcesami próbowano zastosować oligonukleotydy antysensowe, katalityczne kwasy nukleinowe oraz aptamery do sekwencyjnie specyficznej inhibicji ekspresji wybranych białek. Interferencja RNA (RNAi) jest najnowszą i najbardziej obiecującą techniką na długiej liście technologii bazujących na kwasach nukleinowych.

Kluczowym problemem w medycynie molekularnej jest wybór celu terapeutycznego. W trakcie rozwoju glejaka wielopostaciowego nadekspresji ulegają geny różnych białek komórkowych, również tych w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej. Związane są one z nadmierną proliferacją i mogą stanowić potencjalne markery nowotworowe, a także cele terapeutyczne. Jednym z nich jest tenascyna C (TN-C), glikoproteina, która bierze udział w adhezji, inwazji oraz migracji komórek nowotworowych. Ekspresja TN-C jest proporcjonalna do złośliwości guza.

Pacjentom cierpiącym na nowotwory mózgu po resekcji guza podawano dsRNA o sekwencji komplementarnej do struktury mRNA tenascyny C (ATN-RNA). Metodami rezonansu magnetycznego (MRI) oraz tomografii komputerowej (CT) wykazano zahamowanie rozrostu guza oraz symptomów wznowy w wyniku inhibicji syntezy TN-C. Obserwowano znaczącą poprawę przeżywalności pacjentów bez jednoczesnego pogorszenia jakości życia. Leczenie oparte na interferencji RNA ma ogromny potencjał terapeutyczny. Zgodnie z wiedzą autorów interwencja RNAi (iRNAi) jest pierwszym przykładem zastosowania RNAi w leczeniu chorób u człowieka.

Inhibition of human brain tumour invasion with RNA

Malignant gliomas are the deadliest brain tumours, characterized by highly invasive growth, a rampant genetic instability and intense resistance to apoptosis. Such aggressive behaviour of these tumours is reflected in the

resistance to chemo- and radiotherapies and a poor prognosis in spite of cytoreduction through surgery. Gliomas preferentially express a number of surface markers that may be exploited as therapeutic targets, such as tenascin-C. This is an extracellular matrix glycoprotein that contributes to tumour cell adhesion, invasion, migration and proliferation. Disappointing results in the treatment of gliomas with surgery, radiation and chemotherapy have fuelled a search for new treatment modalities.

For almost three decades, the possibility of application of DNA and RNA molecules as anticancer therapeutics has been researched. A variety of antisense oligonucleotides, ribozymes, DNAzymes, and aptamers can be designed to trigger the sequence-specific inhibition of a particular mRNA of interest. RNA interference (RNAi) is the latest and the most promising technique in a long line of nucleic acid-based therapeutic technologies.

Patients suffering from brain tumours were resected and treated with dsRNA (ATN-RNA) complementary to the sequence of tenascin-C mRNA. MRI and CT follow-up studies showed tumour growth delay or lack of symptoms of its recurrence, due to inhibition of TN-C synthesis. A significant improvement in overall survival (OS) was observed without loss of the quality of life (QOL) of patients. This novel therapy based on RNA interference shows great therapeutic potential. To our knowledge intervention with RNAi (iRNAi) is the first protocol of application of RNAi in human disease treatment.

in this subgroup of patients operated on due to bilateral lung metastases using a 1318 nm ND:YAG laser.

Between 2004 and 2009, 88 patients, 27 females and 61 males, of mean age 51.5 yrs (range 20-76 yrs), underwent bilateral resection of multiple lung metastases. All procedures were performed by subsequent thoracotomy and lung parenchyma sparing metastasectomy. Use of the 1318 nm ND:YAG laser allowed selective resection even in cases of centrally located tumours in the lung parenchyma. The interval between the two procedures was usually 4-6 weeks.

The number of resected metastases in one lung ranged from 1 to 31 (mean 4.8) and the size of the nodules ranged from 0.8 cm to 6 cm, mean 2.4 cm. The primary malignancies were as follows: colorectal cancer in 35 patients, renal in 18 pts, sarcoma in 20 pts, neoplasm of testis in 10 pts, and other types of malignancies in 5 cases. There was no in-hospital death. Four patients were re-operated on due to prolonged air leak (3) and bleeding (1). The mean time of the chest tube drainage was 4.8 days, ranging from 2 to 21 days, and did not differ between the first and second procedure. Prolonged air leak above 7 days was observed in 10 pts. Mean length of hospital stay was related to the number of resected nodules and was significantly longer after the second procedure, 12.5 days (6-43) vs. 8.5 days (6-24) respectively.

Conclusion: 1318 nm ND:YAG laser is a useful tool for the safe and sparing resection of lung parenchyma even in patients with multiple lung metastases. If required, the second procedure is feasible and is not related to higher risk of complications.

[9]

Perspektywy modulowanego i dynamicznego obrazowania PET/TK/NMR biologicznego stageringu wybranych nowotworów

Barbara Jarzqb, Zbigniew Wygoda

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie,
Oddział w Gliwicach

[10]

Bilateral ND:YAG laser resection in the treatment of multiple lung metastases

Wojciech Dyszkiewicz

Thoracic Surgery Clinic of Medical University
of Medical Sciences in Poznań, Poland
WCPiT

Metastasectomy can be a curative option for some patients with bilateral pulmonary malignancies if complete resection of pulmonary metastases with minimal parenchymal loss is accomplished. However, there is an increased risk of complications when a two-stage thoracotomy is required and both procedures are carried out consecutively. We present the results of treatment

Sesja 5.

Wprowadzenie do onkologii spersonalizowanej

[11]

Co powinniśmy znać, aby planować terapie celowane – fenotyp guza czy genotyp pacjenta?

Sergiusz Nawrocki

Spersonalizowana onkologia wymaga zrozumienia biologii pacjenta i choroby nowotworowej. Genotyp komórek nowotworowych różni się od genotypu zdrowych komórek pacjenta. Fenotyp z kolei może być rozumiany jako zestaw cech warunkujących wrażliwość na leczenie i skutki uboczne terapii. Jest on wynikiem złożonych mechanizmów regulacji ekspresji genów. Guz nowotworowy w trakcie progresji ulega swoistej mikroewolucji pod presją czynników „środowiskowych”, takich jak presja układu immunologicznego (immunoedycja), presja selekcyjna leków przeciwnowotworowych, jak też skutek zdarzeń losowych, takich jak mutacje somatyczne. Zarówno genotyp, jak i fenotyp chorego oraz guza może wyznaczać wrażliwość na leczenie standardowe oraz terapie celowane. Dla przykładu tamoksyfen jest przekształcany w aktywne metabolity przez polimorficzny układ enzymatyczny (P450 2D6). Osoby o wolnym metabolizmie tamoksyfenu, mające niski poziom aktywnych metabolitów we krwi, gorzej reagują na leczenie i mają krótsze przeżycie wolne od wznowy choroby. Z kolei skutki uboczne chemioterapii (ryzyko ciężkiej neutropenii) irinotekaniem są zależne od polimorfizmu genu UGT1A1. Fenotyp guza jest głównym czynnikiem warunkującym skuteczność leczenia przeciwciałami anti-HER2. Z kolei w przebiegu leczenia przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko EGFR obserwujemy się wysypkę trądzikopodobną, która nie zależy od rodzaju nowotworu (genotypu lub fenotypu guza), a której nasilenie koreluje ze skutecznością leczenia, co może wskazywać na kluczowe znaczenie genotypu oraz fenotypu pacjenta, a nie tylko fenotypu guza (ekspresja EGFR i status genu *kras*) w kontekście skuteczności terapii. Odpowiedź na leczenie tym samym lekiem może być warunkowana różnymi cechami fenotypowymi w zależności od rodzaju guza, np. status metylacji promotora genu *MGMT* ma duże znaczenie predykcyjne w przypadku leczenia głąjaka wielopostaciowego temozolomidem, natomiast takiej korelacji nie wykazano w głąjakach o niższych stopniach złośliwości. Nie ulega wątpliwości, że obecnie znajdujemy się na początku długiej i krętej drogi prowadzącej do zidentyfikowania istotnych cech genetycznych i fenotypowych warunkujących powodzenie bądź fiasko stosowanych terapii.

Personalized oncology requires understanding of patient as well as tumour biology. The tumour's genotype differs from the patient's genotype. Phenotype, which is

a result of sophisticated mechanisms regulating gene expression, may be considered as an array of features determining treatment outcome and side effects. A tumour during its natural history is under constant environmental pressure such as immune surveillance, immune editing, and selective pressure of cytotoxic drugs, but tumour microevolution is also affected by random somatic mutations. Both genotype and phenotype of the patient and the tumour may determine the sensitivity to treatment with old cytotoxic drugs and new biologicals. For example tamoxifen is converted to its active metabolites by polymorphic enzyme (P450 2D6). Poor metabolizers with low blood level of active metabolites of tamoxifen are poor responders and have shorter time to treatment failure. Side effects of irinotecan chemotherapy (risk of severe neutropenia) are dependent on UGT1A1 gene polymorphism. On the other hand, tumour phenotype (positive HER2 status) is predictive for anti-HER2 therapy in breast cancer patients. But in the case of anti-EGFR therapy with monoclonal antibodies, acne-like rash is associated with good response to treatment irrespectively of tumour type. This observation suggests that not only tumour phenotype (EGFR expression and *kras* gene status) but also patient genotype/phenotype is important. Response to temozolomide in glioblastoma is associated with methylation of the *MGMT* promoter, but there is no such relationship in low grade gliomas. There is no doubt that we are just starting to explore and understand mechanisms of individual sensitivity to old and new therapies in oncology.

[12]

Transkryptomyczne sygnatury predykcyjne w doborze chemioterapii neoadiuwantowej u chorych na raka piersi

Michał Jarzab

Klinika Onkologii Klinicznej i Doświadczalnej, Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Wstęp: Mnogość wielogenowych sygnatur ekspresyjnych o prognostycznym znaczeniu w raku piersi zwróciła uwagę na możliwość zastosowania tego narzędzia w podejmowaniu decyzji terapeutycznych. Obiecująca wydaje się próba zastosowania technik genomicznych do poszukiwania markerów o charakterze predykcyjnym, przydatnych w doborze optymalnego leczenia.

Cel pracy: Dokonanie bioinformatycznej analizy zbiorów danych mikromacierzowych dla chorych leczonych przedoperacyjną chemioterapią, w kontekście przewidywania odpowiedzi na to leczenie, wybór optymalnych sygnatur i podjęcie wstępnej walidacji na materiale od chorych prospektywnie obserwowanych.

Materiał i metody: Analizę bioinformatyczną dostępnych zbiorów danych prowadzono za pomocą algorytmów nadzorowanej selekcji genów z użyciem różnych technik predykcji klas, w tym maszyn wektorów podpierających.

Wykorzystano dane z różnych generacji mikromacierzy, analizy prowadzono w systemie BRB Array Tools. Dane do walidacji uzyskano dzięki analizie profilu ekspresji próbek pobranych od 15 chorych poddanych przedoperacyjnej chemioterapii w Centrum Onkologii – Instytucie w Gliwicach, od każdej chorej podczas biopsji przed rozpoczęciem chemioterapii pobierano trzy niezależne wycinki tkankowe.

Wyniki: W pierwszym etapie podjęto analizę stabilności profilu ekspresji w biopsji gruboigłowej, porównując trzy niezależne próbki pobrane podczas jednego zabiegu. Globalny profil ekspresji próbek wykazuje stosunkowo dobrą zgodność, ale u niektórych chorych obserwowano istotną heterogenność. Geny zidentyfikowanych już sygnatur predykcyjnych mają wyraźną zmienność, kiedy analizuje się je w różnych próbkach pobieranych od tego samego chorego. Celem dalszych analiz będzie wybór zbioru genów o potencjale predykcyjnym, ale względnie stabilnego w guzie i jego podścielisku.

Predictive transcriptomic signatures in selection of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients

Background: Multiple multi-gene signatures identified in breast cancer showed prognostic significance. Thus, they focused the attention on the potential use of this tool in the clinic. At the moment the most important aspect is to apply this technique to search for predictive markers, able to guide therapeutic decisions.

Aim of the study is to carry on the bioinformatic analysis of available microarray datasets for patients treated with pre-operative chemotherapy, in the context of prediction of chemotherapy response, to choose the optimal signature and perform the preliminary validation in the group of prospectively recruited patients.

Material and methods: The bioinformatic analysis of publicly available datasets was carried out by supervised gene selection algorithms, by different class prediction methods, including support vector machines technique. Different microarray generations were used, analysis was carried out by BRB Array Tools software. Validation data were obtained by microarray analysis of samples obtained from 15 patients, who were treated by preoperative chemotherapy in MSC Memorial Cancer Center in Gliwice. From every patient three independent tissue samples (cores) were obtained.

Results: In the first step, the stability of gene expression in the core needle-biopsy specimens was assessed, by comparison of three samples from every patient. Global gene expression profile analyzed by unsupervised methods show relatively good concordance, but in minority of patients demonstrated significant heterogeneity. Some of the genes of previously identified predictive signatures show clear intra-patient heterogeneity. The aim of further analysis will be to select the optimal predictive genes, stable in the tumour and its microenvironment.

[13]

Cytochromy P450 jako czynniki wpływające na podatność oraz terapię nowotworów

Przemysław M. Mrozikiewicz

Pracownia Farmakogenetyki Doświadczalnej,
Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Cytochromy P450 (CYP) są dużą grupą enzymów uczestniczących w utlenianiu szeregu ksenobiotyków, w tym leków onkologicznych i prokancerogenów. Genetyczne różnice w aktywności CYP mogą być istotnym czynnikiem zwiększającym podatność na wystąpienie choroby nowotworowej, zwłaszcza w przypadku takich cytochromów, jak CYP1A1, CYP2A1, CYP2D6 i CYP3A4, które odgrywają kluczową rolę w metabolizmie prokancerogenów. Ponadto, polimorfizm enzymów CYP może mieć potencjalny wpływ na skuteczność i bezpieczeństwo współczesnej chemioterapii onkologicznej (CYP2D6 i CYP3A4). Z drugiej strony aktywność enzymów CYP może być również modulowana poprzez szereg ksenobiotyków, w tym substancji leczniczych, substancji pochodzenia naturalnego czy samych substancji kancerogennych, które mogą być przyczyną niepowodzeń terapeutycznych lub nieoczekiwanych interakcji.

Szereg badań, w tym badania własne, w pełni potwierdziło rolę polimorficznych wariantów CYP na modulację ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej. Natomiast kwestia wpływu substancji naturalnych, często obecnych w codziennej diecie, na aktywność CYP nie jest w pełni wyjaśniona. W naszych badaniach oceniliśmy wpływ substancji naturalnych na aktywność szczerzych CYP i wykazaliśmy znamienny spadek poziomu ekspresji CYP3A1 (homolog ludzkiego CYP3A4) po stosowaniu ekstraktów z *Echinacea purpurea*, *Hypericum perforatum*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Allium sativum*, *Valeriana officinalis* oraz *Panax ginseng*. W przypadku CYP2D2 (homolog CYP2D6) aktywność tego genu była hamowana przez *Panax ginseng*, natomiast wzrost poziomu ekspresji mRNA dla CYP1A2 obserwowano po podaniu *Hypericum perforatum* i *Panax ginseng*. Uzyskane wyniki wskazują, że preparaty roślinne mogą istotnie zmieniać poziom ekspresji enzymów CYP.

Pełne określenie polimorfizmu i aktywności CYP może być pomocne w określeniu ryzyka rozwoju kancerogenezy i indywidualizacji profilaktyki przeciwnowotworowej oraz być elementem optymalizacji terapii onkologicznej.

Cytochromes P450 as factors influencing cancer susceptibility and therapy

Cytochromes P450 (CYP) are a large group of enzymes involved in the oxidation of various xenobiotics including antineoplastic drugs and procarcinogens. Genetic differences in CYP activity can be crucial factors in defining cancer disease susceptibility, especially in the case of cytochromes, such as CYP1A1, CYP2A1, CYP2D6 and CYP3A4, that play an important role in the metabolism of

procarcinogens. Moreover, polymorphism of CYP enzymes can lead to inter-individual differences in metabolic activity and can have a potential influence on the efficacy and safety of modern chemotherapy (CYP2D6 and CYP3A4). On the other hand, the activities of CYP enzymes can also be modulated by a large number of xenobiotics including herbal drugs, natural substances or carcinogenic substances that may be a cause of therapeutic inefficacy and unexpected interactions.

Several studies including our own have confirmed the role of CYP polymorphic variants in modulation of the risk of cancer disease occurring. However, the issue regarding the influence of natural substances that are often present in every diet is still unexplained. In our study we determined the potential influence of natural substances on CYP activity in rat liver and noted a statistically significant decrease of CYP3A1 (homologue to human CYP3A4) expression level after application of *Echinacea purpurea*, *Hypericum perforatum*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Allium sativum*, *Valeriana officinalis* and *Panax ginseng*. In the case of CYP2D2 (human CYP2D6), the activity of this gene was inhibited by extract of *Panax ginseng*. Increased expression of CYP1A2 mRNA after application of *Hypericum perforatum* and *Panax ginseng* was also observed. These results indicate that herbal preparations may change the expression level of CYP enzymes.

A complete determination of CYP polymorphism and activity could be helpful in determining the risk of the development of carcinogenesis and individualization of cancer prevention as well as for optimization of anticancer therapy.

[14]

Selenium supplementation and the risk of cancer in BRCA1 carriers

J. Lubinski¹, T. Huzarski¹, T. Byrski¹, C. Cybulski¹, M. Stawicka², A. Jakubowska¹, J. Gronwald¹, B. Górski¹, T. Debniak¹, W. Wasowicz³, E. Kilar⁴, M. Szwiec⁵, D. Surdyka⁶, E. Marczyk⁷, P. Serrano Fernandez¹, P. Sun⁸, S.A. Narod⁸

¹Department of Genetics and Pathology, International Hereditary Cancer Center, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

²Prophylactic and Epidemiology Center, Poznan, Poland

³Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland

⁴Regional Oncology Hospital, Swidnica, Poland

⁵Regional Oncology Hospital, Opole, Poland

⁶Center of Oncology of Lublin Region, Lublin, Poland

⁷Regional Oncology Center, Krakow, Poland

⁸Womens College Research Institute and Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto, Canada

Part I

Women with a BRCA1 mutation face a lifetime risk of breast cancer of approximately 70% and a lifetime risk of ovarian cancer of approximately 20%. It has not been established whether dietary factors or nutritional supplements impact on the incidence of cancer in high-risk

women. We randomised 1135 women with a BRCA1 mutation to 250 micrograms daily of elemental selenium as sodium selenite, or to placebo, in a double-blind trial. After a median follow-up period of 35 months (range 6 to 62 months), there were 60 incident cases of cancer diagnosed in the selenium-supplemented group, versus 45 cases in the placebo group (hazard ratio 1.4; 95% CI: 0.9 to 2.0). Selenium supplementation was not associated with a reduction in the risk of primary breast cancer (hazard ratio 1.3; 95% CI: 0.7 to 2.5), of contralateral breast cancer (hazard ratio 1.5; 95% CI: 0.7 to 3.2) or of ovarian cancer (hazard ratio 1.3; 95% CI: 0.6 to 2.7).

Part II

In this part of the studies we asked whether serum selenium levels were different in women with a BRCA1 mutation who developed breast or ovarian cancer, compared to matched mutation-positive controls who did not develop cancer. We conducted a nested case-control study of 60 women with breast cancer and 11 women with ovarian cancer (and 142 controls matched 1 : 2) who were diagnosed among a cohort of 747 women in a selenium supplementation trial and for whom a blood sample had been taken for serum selenium measurement. Cases and controls were matched for age at enrolment, past history of breast cancer, oophorectomy and whether they received selenium supplement or placebo during the cancer chemoprevention trial. Selenium measurements for this study were performed one year after the above trial. The mean serum selenium level was 77.7 µg/l for the 71 cases vs. 76.4 µg/l for controls.

Selenium level was an independent risk factor for breast/ovarian cancer risk among BRCA1 carriers. The optimal concentration of selenium in the blood was > 70 – < 85 µg/l. This sub-group had ~2-fold lower risk of cancer as compared with lower or higher selenium blood level (OR = 0.52; *p* = 0.03; CI = 0.28-0.92).

[15]

Neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients

T. Byrski¹, J. Gronwald¹, T. Huzarski¹, R.A. Dent², D. Zuziak³, R. Wiśniowski⁴, E. Marczyk⁴, P. Blecharz⁴, O. Oszurek¹, C. Cybulski¹, T. Dębniak¹, B. Górski¹, J. Lubiński¹, S. Narod⁵

¹International Hereditary Cancer Center, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

²Sunnybrook Odette Cancer Centre, Toronto, ON, Canada

³Regional Oncology Center, Bielsko-Biala, Poland

⁴Centre of Oncology Maria Skłodowska-Curie, Memorial Institute Krakow Branch, Poland

⁵Women's College Research Institute, University of Toronto and Women's College Hospital, Toronto, Canada

Background: Neoadjuvant chemotherapy is administered to control disease, make surgical resection possible and increase the possibility of breast tissue conservation.

A further advantage of neoadjuvant therapy is that it helps to assess chemo-sensitivity to a particular agent. Induction of a pathological complete response (pCR) is one of the primary goals of neoadjuvant therapy in order to achieve a better disease-free and overall survival. Experimental data suggest that BRCA1-related breast cancer may have increased sensitivity to platinum-based chemotherapy, but clinical data are limited.

Aim of the study was to evaluate the frequency of complete pathological response after neo-adjuvant treatment with cisplatin chemotherapy in women with breast cancer and a BRCA1 mutation.

Methods: Twenty-five women with breast cancer and a BRCA1 mutation with stage I, II, and III breast cancer between December 2006 and July 2009 were entered into this study. Patients were treated with cisplatin 75 mg/m² intravenously every 3 weeks for 4 cycles. After chemotherapy, patients underwent surgery and were assessed for pathological response in both the breast and axillary lymph nodes. Complete pathological response was defined as no residual invasive disease in both the breast and axilla; however, ductal carcinoma in situ was allowed.

Results: Thirty-eight patients were enrolled in the study. Twenty-three patients had tumours of greater than 2 cm (60%) and 11 patients had positive lymph nodes at diagnosis (29%). Thirty-five patients completed 4 cycles of cisplatin (92%) and 3 patients completed 2 cycles (8%). Clinical complete response was observed in 28 patients (74%). Pathological complete response was observed in 23 (60.5%).

Conclusions: Platinum-based chemotherapy is effective in a high proportion of patients with BRCA1-associated breast cancers. Clinical trials are warranted to determine the optimum treatment for this subgroup of breast cancer patients.

Sesja 6.

Postępy w onkologii

[16]

Operacje częściowe w leczeniu raka krtani

Wojciech Golusiński^{1,2}, Piotr Pieńkowski¹

¹Oddział Chirurgii Głowy i Szyi i Onkologii Laryngologicznej, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

²Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: W ostatniej dekadzie znaczenie operacji z dostępu zewnętrznego u chorych na raka krtani zostało mocno ograniczone. Rozwój endoskopowej chirurgii laserowej, a przede wszystkim nowoczesnej radiochemioterapii, ograniczył rolę operacji częściowych. Możliwość radykalnego usunięcia guza zlokalizowanego w okolicy spoidła przedniego laserem nadal jednak pozostaje kontrowersyjna, a radiochemioterapia wiąże się z późnymi poważnymi objawami niepożądanymi.

Cel pracy: Znaczenie operacji częściowych w chirurgicznym programie zachowania krtani.

Materiał: Dwudziestu sześciu chorych z rozpoznaniem rakiem krtani operowanych na Oddziale Chirurgii Głowy i Szyi Wielkopolskiego Centrum Onkologii w latach 2007–2008. Dwudziestu pięciu chorych T2N0M0 i jeden chory T3N1M0. Dwudziestu pięciu chorych było leczonych wyłącznie operacyjnie. U 14 chorych wykonano laryngectomię czołowo-boczną, u 3 laryngectomię nadpierzścienną z CHEP, a u 9 laryngectomię poziomą według Calero. Jeden chory otrzymał uzupełniającą radioterapię z powodu objęcia naciekiem nowotworowym chrząstek krtani stwierdzonym w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym. Wszyscy chorzy znajdują się pod stałą kontrolą w Wielkopolskim Centrum Onkologii. Są wolni od nawrotu choroby i nie podają zaburzeń oddychania i potykania.

Wnioski: Laryngektomia częściowa winna być postępowaniem z wyboru w stadium zaawansowania narządowego T1 i T2. Jest leczeniem radykalnym onkologicznie, pozwala na zachowanie narządu i jego funkcji.

ment of Head and Neck Surgery of the Greater Poland Cancer Centre from 2007 to 2008. Twenty-five T2N0M0 cases and one T3N1M0 case. Surgery was the only treatment for 25 patients. Fourteen patients had frontolateral partial laryngectomy, 3 patients had supracricoid partial laryngectomy with CHEP, 9 patients had horizontal laryngectomy according to Calero. One patient had adjuvant radiotherapy because of cartilage infiltration in the post-operative report of the pathologist. All patients are recurrence free, breathe freely and have no swallowing disorders.

Conclusion: Open partial laryngectomy is the best choice for selected patients and open partial resection is an important part of organ preservation surgery. Every head and neck surgeon should know this procedure in detail.

Partial open resection in laryngeal cancer

Introduction: The role of open partial surgery for laryngeal cancer has been significantly limited during the first decade of the 21st century. Expansion of the endoscopic laser approach and especially concomitant chemoradiotherapy has reduced the importance of open partial resection of laryngeal tumours. Nevertheless, radical endoscopic excision of the tumour with anterior commissure involvement is still controversial and concomitant chemoradiotherapy is responsible for severe late toxicity.

Purpose: This paper emphasizes the value of partial open resection in organ preservation surgery.

Materials: Twenty-six patients with laryngeal cancer who underwent partial open laryngectomy in the Depart-

Sesja doniesień ustnych

[17]

Wyniki diagnostyki molekularnej w zaawansowanych rakach jelita grubego kwalifikowanych do leczenia terapią celowaną anty-EGFR

Piotr Wójcik¹, Agnieszka Klimkowska¹, Jacek Czopek¹, Piotr Zaporowski², Joanna Biaty³, Dariusz Adamek¹

¹Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

²Merck Sp. z o.o.

³Amgen Sp. z o.o.

Wstęp: Przeciwciała monoklonalne anty-EGFR – cetuksymab i panitumumab – znajdują obecnie zastosowanie w terapii zaawansowanego raka grubego. Onkogen KRAS związany jest z brakiem klinicznych korzyści z tego typu terapii. Analiza mutacji stała się niezbędna w celu określenia odpowiedzi na leczenie. Obecnymi wskazaniami do leczenia są ekspresja EGFR i prawidłowa sekwencja protoonkogenu KRAS w nowotworze.

Cel pracy: Ocena liczby pacjentów spełniających molekularne kryteria włączenia do terapii celowanej anty-EGFR z uwagi na status EGFR i KRAS.

Materiał i metody: Analiza objęta 463 przypadki raka jelita grubego. Do badań użyto wycinki nowotworów, standardowo utrwalone i przeprowadzone do kostek parafinowych. W celu określenia ekspresji EGFR wykonano badanie immunohistochemiczne z przeciwciałem monoklonalnym anty-EGFR (EGFR.113; Novocastra). DNA izolowano z odparafinowanych próbek. Pierwszy kodujący ekson genu KRAS był amplifikowany metodą PCR i analizowany metodą SSCP.

Wyniki: Badanie immunohistochemiczne wykonano w 444 przypadkach. Pozytywny odczyn błonowy wykryto w 404 (91%) przypadkach w co najmniej 1% komórek. Mutacje KRAS wykryto w 40,5% analizowanych nowotworów (174/430). Jednoczesna pozytywna ekspresja EGFR i prawidłowa sekwencja genu KRAS charakteryzowała 53,8% badanych raków (249/463).

Wnioski: Kryteria włączenia do terapii anty-EGFR spełniało 53,8% badanych nowotworów.

Results of molecular diagnostics in advanced colorectal carcinoma tested for eligibility for EGFR-targeted therapy

Background: Cetuximab and panitumumab are anti-EGFR monoclonal antibodies employed in clinical practice in advanced colorectal cancer. The KRAS oncogene is associated with lack of clinical benefits of EGFR-targeted therapy. Mutation detection has become indispensable to predict therapy outcome. Only tumours with wild-type KRAS and positive EGFR staining meet the current eligibility criteria.

Aim of the study: To assess the eligibility of patients with advanced colorectal cancer for anti-EGFR therapy with regards to EGFR and KRAS status.

Material and methods: 463 cases of colorectal carcinoma were investigated. Tumour samples routinely fixed and embedded in paraffin blocks were used. Expression of EGFR was studied immunohistochemically with anti-EGFR monoclonal antibody (EGFR.113; Novocastra). For KRAS mutation detection, DNA was extracted from deparaffinized tissues. The first coding exon of the KRAS gene was amplified by PCR and analysed using the SSCP method.

Results: Immunohistochemistry was performed on 444 samples. Positive membranous staining was detected in 404 (91%) tumours in at least 1% of neoplastic cells. KRAS mutations were detected in 40.5% of analysed tumours (174/430). 53.8% of analysed tumours (249/463) were characterized by concomitant positive EGFR expression and wild-type KRAS.

Conclusions: 53.8% of analysed tumours were eligible for EGFR-targeted therapy.

[18]

Personalizacja terapii PBL – przydatność techniki różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) w wyborze optymalnego sposobu leczenia

Małgorzata Rogalińska¹, Paweł Góralski², Jerzy Z. Błoński³, Arleta Kaźmierczuk³, Oxana Komina⁴, Jolanta D. Żołnierczyk¹, Henryk Piekarski², Tadeusz Robak³, Józefa Węsierska-Gądek⁴, Zofia M. Kiliańska¹

¹Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

²Katedra Chemii Fizycznej, Uniwersytet Łódzki

³Katedra Hematologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

⁴Katedra Medycyny 1, Uniwersytet Medyczny w Wiedniu, Austria

Wstęp: Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęstszym typem białaczki ludzi dorosłych w krajach zachodnich. Etiologia tego nowotworu nie została w pełni poznana. Przyjmuje się, że jest to bardzo niejednorodna choroba, która charakteryzuje się nagromadzeniem we krwi spoczynkowych limfocytów B, z powodu zaburzeń ich usuwania na drodze apoptozy. Duże zróżnicowanie wśród pacjentów pod względem dynamiki rozwoju choroby, odpowiedzi oraz końcowego wyniku leczenia stanowi nadal duży problem w terapii tej białaczki. Dlatego też ważny jest dobór leczenia w przypadku każdego chorego, który umożliwiłby jego efektywniejszą terapię oraz wydłużenie remisji choroby i opracowanie sposobu oceny jej efektywności. W tym kontekście różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) stanowi technikę umożliwiającą ocenę efektywności terapii antynowotworowej.

Materiał i metody: W badaniach wykorzystano: DSC, cytometrię przepływową oraz Western blot. Komórki PBL wydzielone z krwi nieleczonych chorych inkubowano *ex vivo* z analogami puryn w kombinacji z mafosfamidem, tj. CM (kladrybina + mafosfamid) lub FM (fludarabina +

mafosfamid), a także z inhibitorem kinaz cyklozależnych – *R*-roskowitzyną.

Wyniki: W profilach termicznych frakcji jądrowej wydzielonej z komórek PBL inkubowanych ze związkami antynowotworowymi, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, obserwowano znaczne obniżenie lub nawet zanik przejścia fazowego w temperaturze $95 \pm 3^\circ\text{C}$. Natomiast, tylko niewielką zmianę profilu lub brak różnic w przebiegu termogramu otrzymywano w przypadku komórek PBL opornych na stosowane związki. Należy podkreślić, że zmianom w profilach termicznych towarzyszył także znaczący spadek przeżywalności komórek PBL, fragmentacja DNA oraz zmiany w poziomie ekspresji/proteolizy białek związanych z procesem apoptozy (kaspaza 9, kaspaza 3, PARP-1, Mcl-1 i Bcl-2).

Wnioski: Różnicowa kalorymetria skaningowa wydaje się stanowić technikę przydatną w wyborze najbardziej efektywnego sposobu leczenia pacjentów z PBL. Technika ta, uzupełniona innymi metodami, potwierdza wysoką efektywność *R*-roskowitzyny w leczeniu PBL.

Personalized therapy of CLL – usefulness of differential scanning calorimetry (DSC) in the choice of optimal treatment

Background: Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is the most frequent type of adult leukaemia in the Western world. The aetiology of this leukaemia is still not known. This heterogeneous disease is described as an accumulation of mainly resting B lymphocytes in peripheral blood, because of a defect in programmed cell death. The strong diversity between patients in the time of progression, response to anticancer therapy, and outcome is a big problem in treatment of this type of leukaemia. Therefore, it is important to develop the optimal type of therapy for individual patients to achieve long-term complete remission of the disease and to evaluate the method of assessment of treatment efficacy. In this context, differential scanning calorimetry (DSC) seems to be a technique capable of distinguishing the potency of anticancer agents.

Material and methods: In this study we employed a few techniques – DSC, flow cytometry and Western blot – to evaluate induction and the course of apoptosis in CLL cells treated for 48 hrs with anticancer agents. Leukaemia cell samples were exposed to purine analogues combined with mafosfamide, i.e. CM (cladribine + mafosfamide), FM (fludarabine + mafosfamide), and the cell cycle inhibitor *R*-roscovitine.

Results: We observed a significant decrease or even loss of transition at $95 \pm 3^\circ\text{C}$ in thermal scans of nuclear fraction preparations obtained from drug-treated cells. Interestingly, a deficiency or only slight differences were seen in thermal profiles of nuclei originating from CLL cells resistant to treatment. These changes in scans were accompanied by a marked decrease of cell viability, DNA fragmentation, as well as changes in expression/proteolysis of apoptosis-related proteins (caspase-9, caspase-3, PARP-1, Mcl-1 and Bcl-2).

Conclusions: DSC seems to be a useful technique in selection of the most effective drug treatment for CLL patients. DSC supplemented by other methods confirms high efficacy of *R*-roscovitine against CLL cells.

[19]

Osteopontyna – potencjalny nowy marker w monitorowaniu skuteczności chemioterapii I rzutu u chorych na raka jajnika

Jolanta Mrochem-Kwarciak¹, Izolda Mrochen-Domin², Elżbieta Nowara², Regina Deja¹, Aleksandra Chmura¹, Beata Kaleta², Andrzej Wojcieszek³, Zofia Kotosza⁴, Barbara Mastyk¹

¹Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

²Klinika Onkologii Klinicznej i Doświadczalnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

³Przychodnia Przykliniczna, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

⁴Zakład Epidemiologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Wstęp: W ocenie skuteczności leczenia chorych na raka jajnika powszechnie wykorzystuje się marker CA 125. Nie spełnia on jednak oczekiwań klinicystów, ponieważ u wielu chorych stężenie markera pozostaje w zakresie wartości referencyjnych pomimo progresji choroby. Nadziejemy na poprawę monitorowania leczenia stwarzając oznaczenia osteopontyny.

Cel pracy: Ocena przydatności oznaczeń osteopontyny do przewidywania wznowy u chorych na raka jajnika.

Materiał i metody: Osteopontynę oznaczono metodą EIA w osoczu 54 chorych operowanych z powodu raka jajnika (IC-IV), u których stosowano standardową chemioterapię. Oznaczenia wykonano przed każdym kolejnym cyklem leczenia systemowego. Porównano czas przeżycia bezobjawowego chorych z wyjściowo dużym vs małym stężeniem osteopontyny (metoda Kaplan-Meiera), przyjmując wartość odcięcia jako 71 ng/ml.

Wyniki: Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy czasu bezobjawowego przeżycia chorych w obydwu grupach = 0,592), jednakże w grupie chorych ze stwierdzoną klinicznie progresją choroby (22/54) zaobserwowano trend zwiększenia stężenia osteopontyny:

- u 9 chorych stężenie osteopontyny utrzymywało się na wysokim poziomie podczas całego procesu leczenia; w tej grupie stwierdzono zgon 5 chorych,
- u 9 chorych zwiększenie stężenia osteopontyny wyprzedzało nawrót choroby,
- u 2 chorych zwiększenie stężenia osteopontyny zaobserwowano później niż progresję kliniczną.

Jedynie u 2 chorych pomimo postępu choroby nie odnotowano zwiększenia stężenia osteopontyny.

Wnioski: Nie stwierdzono zależności pomiędzy dużym stężeniem osteopontyny przed leczeniem I rzutu a krótszym czasem przeżycia bezobjawowego chorych na raka jajnika.

W większości przypadków zwiększenie stężenia osteopontyny wyprzedzało jednak progresję choroby, a duże stężenia osteopontyny podczas chemioterapii łączyły się z gorszym rokowaniem. Być może dłuższa obserwacja chorych wykaże korelację pomiędzy stężeniem osteopontyny a czasem przeżycia bezobjawowego, co jest przedmiotem aktualnych badań.

Osteopontin – a new potential marker in monitoring the effectiveness of first-line chemotherapy in patients with ovarian carcinoma

Background: CA 125 is commonly used in the evaluation of treatment effectiveness in patients with ovarian carcinoma. However, it falls short of clinicians' expectations since in many cases the level of that marker stays within the reference values despite progression of the disease. However, a hope for improvement of treatment monitoring lies in osteopontin determination.

Aim of the study: To evaluate the usefulness of osteopontin determination in the prognosis of ovarian carcinoma recurrence.

Material and methods: Osteopontin was determined in 54 patients operated on because of ovarian carcinoma (IC-IV) and treated with standard chemotherapy. The measurements were performed prior to each cycle of system treatment. The time of asymptomatic survival of patients with high vs. low pre-treatment concentration of osteopontin was compared (the Kaplan–Meier method). The assumed cut-off value was 71 ng/ml.

Results: A statistically significant difference between the time of asymptomatic survival of each group was not observed ($p = 0.592$). However, in patients with clinically confirmed progression of the disease (22/54), a trend for osteopontin level to increase was observed:

- 9 patients had a high level of osteopontin concentration during the entire treatment process; 5 patients from this group died,
- in 9 patients the increase of osteopontin concentration preceded the relapse of the disease,
- in 2 patients the increase of osteopontin concentration was observed later than clinical progression.

Only in 2 patients was an increase of osteopontin concentration not observed regardless of the progression of the disease.

Conclusions: A relation between a high concentration of osteopontin before treatment and shorter time of asymptomatic survival of patients with ovarian carcinoma was not observed. In most cases, the increase of osteopontin concentration preceded the progression of the disease and high concentrations of osteopontin during chemotherapy coincided with a worse prognosis.

[20]

Wartość diagnostyczna zmian genetycznych typu LOH/MSI w nowotworach tarczycy

Monika Migdalska-Sęk¹, Karolina Czarnecka¹,
Dorota Pastuszek-Lewandoska¹, Ewa Nawrot¹,
Jan Brzeziński², Marek Dedecjus², Ewa Brzezińska¹

¹Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Klinika Chirurgii Ogólnej, Onkologicznej
i Gruzołów Dokrewnych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wstęp: W kancerogenezie tarczycy istotnym czynnikiem jest niestabilność genetyczna: utrata heterozygotyczności (LOH) i niestabilność mikrosatelitarna (MSI). LOH/MSI wykorzystuje się do molekularnej diagnostyki i prognozowania rozwoju nowotworów u ludzi (m.in. raka jelita grubego i żołądka). W nowotworach gruczołu tarczowego niestabilność genetyczną obserwuje się szczególnie w raku pęcherzykowym tarczycy.

Cel pracy: Próba odpowiedzi na pytanie, czy obecność zmian typu LOH/MSI w nowotworach tarczycy (FA, PTC, UTC) jest istotnym narzędziem diagnostycznym prognozującym rozwój guza.

Materiał: Fragmenty tkanek tarczycy ($n = 39$) pobrane od pacjentów z łagodnymi (FA) i złośliwymi nowotworami (PTC, UTC) oraz z wolem guzkowym tarczycy (NG).

Metody: Reakcje PCR z użyciem 27 markerów mikrosatelitarnych sprzężonych z regionami: 1p31.2, 3p21.3-25.3, 7q32.2, 9p21.3, 11p15.5, 12q23.2 i 16q22.1. Analiza LOH/MSI metodami: allelotypowania i dHPLC. Częstość występowania niestabilności genetycznej oceniano na podstawie procentowego udziału LOH/MSI oraz indeksem FAL (*fractional allelic loss*).

Wyniki: Najwyższą częstość niestabilności genetycznej wykazano w PTC w regionach: 9p i 16q, niższą dla regionów 1p, 3p, 7q i 12q. Indeks FAL w PTC wynosił 0,33. LOH/MSI w przypadku UTC stwierdzono w 3p, 9p i 16q, gdzie otrzymano najwyższą wartość FAL (0,46). W FA wysoką częstość niestabilności genetycznej obserwowano w 16q, niższą w 1p, 3p, 11p i 12q. Nie stwierdzono LOH/MSI w NG.

Wnioski: Zmiany genetyczne typu LOH/MSI występują w gruczole tarczowym na wczesnym etapie procesu nowotworowego i korelują z progresją guza. LOH/MSI występuje częściej w *loci* genów ważnych dla regulacji cyklu komórkowego, proliferacji i adhezji komórkowej (*p16INK4A*, *CDH1*, *RASSF1A*). Wydaje się, że obecność zmian LOH/MSI w regionach występowania genów supresorowych ma istotne znaczenie prognostyczne. Zwiększenie częstości występowania LOH/MSI wiąże się z odróżnieniem się komórek raka tarczycy. Ustalenie uniwersalnego panelu markerów analizy LOH/MSI i potwierdzenie wstępnych wyników wymaga jednak dalszych badań.

Diagnostic value of genetic alterations of LOH/MSI type in thyroid neoplasms

Background: Genetic instabilities, i.e., loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI), play an important role in thyroid carcinogenesis. LOH/MSI analysis is used for molecular cancer diagnostics and prognosis (e.g., in colon and stomach cancers). In thyroid neoplasms genetic instability is observed especially in follicular thyroid carcinoma.

Aim of the study: An attempt to answer the question of whether the presence of LOH/MSI in thyroid carcinomas (FA, PTC, UTC) can be regarded as a significant diagnostic tool predicting tumour development.

Material: Thyroid tissue samples ($n = 39$) obtained from patients with benign (FA) and malignant thyroid lesions (PTC, UTC) and nodular goitres (NG).

Methods: PCR reactions using 27 microsatellite markers linked to the following chromosomal regions: 1p31.2, 3p21.3-25.3, 7q32.2, 9p21.3, 11p15.5, 12q23.2 and 16q22.1. LOH/MSI analysis was conducted using allelotyping and dHPLC methods. Genetic instability Frequency Was assessed as LOH/MSI percentage and FAL (*fractional allelic loss*) Index.

Results: The highest genetic instability frequency in PTC was found in the regions 9p and 16q, lower in 1p, 3p, 7q and 12q. FAL Index in PTC was 0.33. In the case of UTC, LOH/MSI was observed in 3p, 9p and 16q, and the highest FAL value was found in UTC (0.46). In FA high genetic instability frequency was observed in 16q, and lower in 1p, 3p, 11p and 12q. No LOH/MSI was found in NG.

Conclusions: In thyroid, genetic alterations of LOH/MSI type occur at an early stage of carcinogenesis and correlate with tumour progression. LOH/MSI is found more frequently *in loci* of genes important for cell cycle regulation, proliferation and adhesion (*p16INK4A*, *CDH1*, *RASSF1A*). It seems that LOH/MSI analysis in regions containing tumour suppressor genes is significant in terms of prognosis. The increase of LOH/MSI frequency is associated with dedifferentiation of thyroid cancer cells. The establishment of a universal marker panel for LOH/MSI analysis needs further studies, as well as confirmation of the obtained preliminary results.

[21]

Ocena stężenia cząstek adhezyjnych sVCAM-1 i sICAM-1 u kobiet chorych na raka piersi

Anna Thielemann, Zygmunt Kopczyński, Adrianna Nowak, Aleksandra Baszczuk, Sylwia Grodecka-Gazdecka

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: Śródbłonek naczyniowy odgrywa ważną rolę w fizjologii i patologii wielu chorób. Jego uszkodzenie jest przyczyną powstawania zakrzepów, miażdżycy oraz zmian naczyniowych w przebiegu nadciśnienia. Przypuszcza się, że zmiany ilościowe rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych mogą także wiązać się z zaburzoną funkcją śródbłonna naczyniowego u chorych na raka.

Cel pracy: Ocena stężenia rozpuszczalnych form cząsteczek adhezji komórkowej naczyń 1 (sVCAM-1) i międzykomórkowych cząsteczek adhezyjnych 1 (sICAM-1) w surowicy kobiet chorych na pierwotnego raka piersi z uwzględnieniem uznanych czynników prognostycznych, takich jak: zaawansowanie kliniczne choroby, stopień złośliwości histologicznej guza, stan okolicznych węzłów chłonnych pachowych oraz wielkość guza pierwotnego.

Materiał i metody: Oznaczanie stężenia sVCAM-1 i sICAM-1 wykonano w surowicy 103 kobiet chorych na raka piersi w wieku 29–89 lat (średnia wieku 56 lat) przed zabiegiem chirurgicznym, leczonych w Katedrze i Klinice Onkologii UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Grupę kontrolną stanowiły surowice 40 kobiet zdrowych w wieku 24–75 lat (średnia wieku 47 lat). Stężenie rozpuszczalnych form cząsteczek sVCAM-1 i sICAM-1 oznaczano w surowicy metodą immunoenzymatyczną ELISA w oparciu o testy firmy R&D Systems Abingdon, UK.

Wyniki: Badania wykazały istotnie większe stężenia sICAM-1 i sVCAM-1 w surowicy kobiet chorych na pierwotnego raka piersi w porównaniu z wartościami u kobiet zdrowych. Im wyższy był stopień zaawansowania klinicznego choroby, tym obserwowano istotnie wyższy poziom badanych cząstek. Podobną zależność stwierdzono, analizując stopień złośliwości histologicznej nowotworu i wielkość guza pierwotnego. Różnice istotnie statystycznie użytkowano także, kiedy oznaczano stężenia sICAM-1 i sVCAM-1 w grupie kobiet z przerzutami i bez przerzutów do węzłów chłonnych.

Wnioski: Zaobserwowane zmiany stężeń rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych (sVCAM-1 i sICAM-1) mogą wiązać się z zaburzoną funkcją śródbłonna naczyniowego u kobiet chorych na raka piersi.

Determination of concentration of sVCAM-1 and sICAM-1 in women with primary breast cancer

Anna Thielemann, Zygmunt Kopczyński, Adrianna Nowak, Aleksandra Baszczuk, Sylwia Grodecka-Gazdecka

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Background: The endothelium plays an important role in physiology and pathology of many diseases. Dysfunction of the endothelium is a cause of thrombus, sclerosis and changes of blood vessels in hypertension. It has been assumed that changes of quantitative forms of soluble adhesion molecules may be connected with dysfunction of the endothelium in the tumour process.

Aim of the study: The aim of the study was to ascertain the value of assessment of the vascular endothelial adhesion molecule sVCAM-1 and soluble form of intercellular adhesion molecule sICAM-1 levels in serum of women with primary breast cancer and its correlations with age, clinical status of the disease, histological malignancy, status of axillary lymph nodes, size of the primary tumour and histological type of cancer.

Material and methods: A group of 103 patients with primary breast cancer who did not undergo surgery was selected. Patients' age ranged from 29 to 89 years (mean 56). All patients were treated at the Department of Oncology, University of Medical Sciences in Poznań. Forty healthy women aged from 24 to 75 years (mean 47) formed a control group. The assessment of concentration of sVCAM-1 and sICAM-1 was performed in serum by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Quantikine test of R&D Systems, Abingdon, UK).

Results: The results of the study suggested that the level of sICAM-1 and sVCAM-1 in serum of women with breast cancer was significantly higher than in serum of healthy women. A relation between the levels of sICAM-1 and sVCAM-1 and the stage of clinical disease advancement was discovered. There was a correlation between increasing values of sICAM-1 and sVCAM-1 levels and the aggressiveness of the disease. A similar correlation was found between sICAM-1 and sVCAM-1 levels and the size of the primary tumour. Significant differences were also found between the group of women with metastases to the axillary lymph nodes and women with no metastases.

Conclusions: The changes observed in the concentration of soluble form of the vascular endothelial growth factors sICAM-1 and sVCAM-1 may be involved in the disturbance of endothelial function in women with breast cancer.

[22]

Korelacja ekspresji EGFR oraz poziomu cytokin wydzielanych przez limfocyty T krwi obwodowej w raku płaskonabłonkowym krtani*

Katarzyna Starska¹, Olga Stasikowska², Iwona Lewy-Trenda², Ewa Glowacka³

¹Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

³Zakład Immunologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Wstęp: W odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym istotną rolę pełnią mechanizmy związane z aktywnością limfocytów T oraz wydzielaniem cytokin prozapalnych i immunoregulatorowych. Udział receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), kluczowego mediatora w procesie kancerogenezy, związany jest z aktywacją szlaku wewnątrzkomórkowych białek należących do przekaźników sygnału i aktywatorów transkrypcji (STATs), które również mogą być aktywowane po pobudzeniu receptorów dla cytokin.

Cel pracy: Oznaczenie poziomu prozapalnych i immunoregulatorowych cytokin wydzielanych przez limfocyty T krwi obwodowej oraz określenie korelacji z immunoekspresją EGFR w utkaniu nowotworowym.

Materiał i metody: W przeprowadzonych badaniach oznaczono stężenie wybranych cytokin (IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IFN- γ) we krwi obwodowej oraz określono poziom immunoekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) w utkaniu nowotworowym u 45 chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani. Ekspresję antygenów EGFR (uwzględniając odczyn błonowy i cytoplazmatyczny) wykonano z zastosowaniem metody immunohistochemicznej IHC. Poziom wydzielanych cytokin oznaczono metodą ELISA.

Wyniki: W wykonanej analizie potwierdzono korelację odczynów IHC EGFR-m oraz EGFR-c w raku płaskonabłonkowym krtani z poziomem wydzielanych cytokin IL-8 oraz IFN- γ , oznaczonych we krwi obwodowej.

Wnioski: Poziom prozapalnych i proangiogennych cytokin wydzielanych przez limfocyty T krwi obwodowej oraz immunoekspresji odczynów błonowych i cytoplazmatycznych EGFR może być użytecznym biomarkerem u chorych na raka płaskonabłonkowego krtani.

*Praca finansowana z funduszy projektu naukowo-badawczego KBN/ MNiSW nr N403 04332/2326

Expression of EGFR and production of cytokines by peripheral blood T lymphocytes in squamous cell carcinoma of the larynx*

Background: In the antitumour response the most important mechanism of host humoral immunity is T lymphocyte activity and production of immunoregulatory and proinflammatory cytokines. The involvement of epidermal growth factor receptor (EGFR), a mediator critical for tumour aggressiveness, is connected with activation of the signal transducer and activator of transcription pathway family (STATs), which can be activated by cytokine receptors.

Aim of the study: The aims of this study were to estimate whole blood cytokine concentrations and to analyse the directed influence of cytokines on the EGFR profile.

Material and methods: In the study the whole blood cytokine concentrations and EGFR (cytoplasmic and membranous) antigens expression in 45 patients treated surgically due to advanced squamous cell laryngeal carcinoma were determined. The concentration of secreted IL-6, IL-8, IL-10, TNF, and IFN- γ was estimated by ELISA. The EGFR-c and EGFR-m stainings in tumour tissues were assessed by immunohistochemistry.

Results: The authors reported that EGFR IHC staining analysed in laryngeal squamous carcinoma cells is connected with whole blood cells' activity. The whole blood concentrations of cytokines IL-8 and IFN- γ were found to be correlated with EGFR-m and EGFR-c immunostaining in primary tumour tissues, respectively.

Conclusions: We conclude that pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines produced by whole blood cells and expression of EGFR may be useful as biomarkers in patients with advanced-stage laryngeal cancer.

*This work was supported by grants from the National Science Council (KBN N403 04332/2326)

[23]

Hipermetylacja promotora genu E-kadheryny w rodzinnych i sporadycznych rakach żołądka w polskiej populacji

Monika Zazula, Magdalena Białas, Agnieszka Klimkowska, Piotr Wójcik, Dariusz Adamek

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

CDH1 jest genem supresorowym, który koduje E-kadherynę – białko odgrywające kluczową rolę w różnicowaniu i adhezji komórek nabłonkowych. Hipermetylacja promotora *CDH1* może być spowodowana m.in. wiekiem, zakażeniem EBV czy *Helicobacter pylori* i jest najczęstszym mechanizmem epigenetycznym wyciszenia ekspresji E-kadheryny w komórkach raka żołądka. Gen ten jest dobrym markerem globalnej hipermetylacji genów w nabłonku żołądka.

W ramach badania autorów hipermetylacja *CDH1* została zaobserwowana w 53% (82/152) analizowanych sporadycznych raków żołądka w polskiej populacji. Ten wynik jest szczególnie interesujący w kontekście supresji hipermetylacji genów w nabłonku żołądka przez niesteroidowe leki przeciwzapalne (w tym kwas acetylosalicylowy).

Hipermetylację promotora genu *CDH1* wykryto u 100% (6/6) analizowanych rodzin (u 18/18 badanych członków) z rodzinnym rakiem żołądka. Dodatkowo, wszystkie przypadki (20/20) wykazujące fenotyp MSI-high pod względem niestabilności mikrosatelitarnego DNA charakteryzowały się zmetylowanym regionem promotora E-kadheryny. W przypadku raków z fenotypem niskiej niestabilności oraz raków mikrosatelitarnie stabilnych odsetek ten był niższy i wynosił odpowiednio 71 i 41%.

Zaobserwowano również trend, że „zmetylowane” guzy żołądka były nieco większe niż „niezmetylowane”, a grupa pacjentów niewykazujących hipermetylacji *CDH1* w guzach charakteryzowała się wyższym prawdopodobieństwem dłuższego przeżycia. Wyniki te mogą sugerować, że obniżenie ekspresji E-kadheryny spowodowane metylacją jej promotora może być związane z gorszą prognozą i specyficznym fenotypem guza.

Ze względu na to, że hipermetylacja promotora *CDH1* może mieć związek z inaktywacją drugiego allelu w czasie kancerogenezy w nabłonku żołądka, badania tego typu są szczególnie ważne w kontekście pojawiających się nowych możliwości epigenetycznych terapii celowanych.

E-cadherin gene promoter hypermethylation in familial and sporadic gastric cancers in the Polish population

CDH1 is a tumour suppressor gene and it encodes E-cadherin – a protein which plays a crucial role in epithelial cells' adhesion and differentiation. Hypermethylation of the *CDH1* promoter region may be caused among other things by age, viruses or *Helicobacter pylori* and seems to be the most common epigenetic mechanism in this gene silencing in gastric cancer. The studied gene is a logical model of gastric cancer epigenetic changes as *CDH1* is a marker of global hypermethylation in gastric epithelial cells.

In this study, *CDH1* promoter hypermethylation was observed in 53% (82/152) of the analysed sporadic gastric carcinomas from the Polish population. This result is especially interesting as non-steroidal anti-inflammatory drugs including acetylsalicylic acid are potent suppressors of global hypermethylation in gastric epithelial cells.

We also report *CDH1* promoter hypermethylation in 100% (6 of 6) of families (18/18 family members) with familial gastric cancer. Additionally, all cases (20/20) with the MSI-high phenotype revealed *CDH1* promoter hypermethylation. In MSI-low and MSS gastric cancers, this percentage was lower, 71% and 41%, respectively.

We observed that “methylated” tumours were slightly larger than “nonmethylated”, whereas the second group revealed a higher probability of longer patient survival, though these relationships were not statistically signifi-

cant. These results suggest that downregulation of E-cadherin, caused by promoter hypermethylation, in sporadic gastric carcinomas may be associated with a worse prognosis and specific tumour phenotype.

As *CDH1* promoter hypermethylation may be linked with second allele inactivation during carcinogenesis of gastric cancer cells – such a study is of special interest as hypermethylated cancers may be targets for new epigenetic treatment strategies.

[24]

Wstępny raport oceny częstości metylacji promotora genu MGMT w złośliwych glejakach operowanych w Klinice Neurochirurgii CM UJ w roku 2009 i diagnozowanych neuropatologicznie w Zakładzie Neuropatologii CM UJ w Krakowie

Dariusz Adamek¹, Monika Zazula¹, Edyta Radwańska¹, Ewelina Grzywna², Marek Moskata²

¹Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

²Klinika Neurochirurgii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

Wstęp: Metylacja promotora MGMT (O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase) w komórkach gąbczaka wielopostaciowego (*glioblastoma multiforme*) jest uważana za wskaźnik podatności nowotworu na leczenie lekami alkilującymi (temozolomidem), jakkolwiek zdaniem niektórych autorów konieczne są dalsze badania nad walidacją i standaryzacją protokołów badawczych.

Cel pracy: Ocena częstości występowania metylacji promotora MGMT w złośliwych glejakach u pacjentów diagnozowanych i operowanych w ośrodku krakowskim.

Materiał i metody: Dwadzieścia trzy kolejne przypadki *glioblastoma multiforme* (K – 11, M – 12, średnia wieku 56 lat). Metylację promotora MGMT określono za pomocą MS-PCR (*methylation-specific PCR*). Przed MS-PCR DNA zostało poddane działaniu wodorosiarczynu sodu, oczyszczone, zdenaturowane, sprecypitowane i odzyskane za pomocą elucji. Reakcja MS-PCR została wykonana dla dwóch par starterów – amplifikujących zmetylowane DNA oraz primerów specyficznych dla niezmetrylowanej matrycy.

Wyniki: Wśród zbadanych 23 przypadków glejaków metylację promotora MGMT stwierdzono w 10 (7 u kobiet, 3 u mężczyzn), co stanowi 43,5% badanego zbioru. Przypadki z metylacją MGMT nie różniły się od tych bez metylacji pod względem ekspresji Ki67 i GFAP, natomiast wśród guzów bez metylacji stwierdzono znacznie rozleglejsze obszary martwic.

Wnioski: Wstępne wyniki badania metylacji promotora MGMT wskazują na relatywnie znaczny odsetek (blisko połowa) nowotworów wykazujących tę cechę w materiale autorów i co za tym idzie mających szansę na pozytywną odpowiedź na leczenie temozolomidem. Badanie

to według oceny autorów może być wstępem do „spersonalizowanego” (zindywidualizowanego) leczenia chorych z glioblastoma w oparciu o racjonalne przesłanki.

Praca sfinansowana z programu K/ZDS/001044, Uniwersytet Jagielloński

Background: Methylation of MGMT (O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase) gene promoter in glioblastoma multiforme is regarded as an indicator of susceptibility of the tumour to alkylating agents (temozolomide). However, according to some authors further investigations on validation and standardization of protocols is necessary.

Aim of the study: To assess the frequency of MGMT promoter methylation in malignant gliomas in patients diagnosed and treated in the Medical College in Kraków.

Material and methods: Twenty-three consecutive cases of glioblastoma multiforme (W – 11, M – 12, average age 56 y). The methylation status of the MGMT promoter was determined by methylation-specific PCR (MS-PCR). Before MS-PCR, genomic DNA was treated with sodium bisulphite, purified, denatured, precipitated and eluted. MS-PCR was performed with two pairs of primers – dedicated for methylated and non-methylated templates.

Results: Methylation of the MGMT promoter was found in 10 of 23 cases of glioblastoma multiforme (in 7 women, and 3 men), which makes 43.5% of the investigated set. No differences in Ki67 LI and expression of GFAP between tumours with and without MGMT methylation were found, though tumours without methylation featured significantly more extensive necroses.

Conclusions: These preliminary results of investigations of MGMT promoter methylation indicate a relatively high ratio (almost a half) of tumours with that feature in our region, which entails their potential susceptibility to temozolomide. In our opinion the study of MGMT methylation status may be a first step to “personalized” treatment of patients with glioblastoma based on rational premises.

Financial support by Grant No K/ZDS/001044 Jagiellonian University

Sesja 7.

Mikrośrodowisko guza i nowe cele terapii

[25]

Interleukin-6 in the host-tumour interaction

Pravin B. Sehgal

Depts. of Cell Biology & Anatomy, and of Medicine, New York Medical College, Valhalla, USA

Already in 1988-1989 we discovered, using immunohistochemistry, that interleukin-6 (IL-6) was an almost invariant presence at the host-tumour interface in a variety of human solid tumours (including primary squamous cell carcinomas, adenocarcinomas of mammary, colonic, ovarian and endometrial origin, and adenocarcinomatous metastases to lymph nodes) with both the tumour cells and stroma showing strong-to-moderate IL-6 immunoreactivity. The early studies also showed that oestradiol-17 β inhibited the IL-6 promoter and circulating IL-6 was commonly increased in cancer patients. Today, the contribution of IL-6, and thus STAT3, in the interplay between infection and cancer and in promoting cancer metastasis (breast, colon, liver) and explaining gender bias or obesity-related bias in cancer incidence (e.g. of hepatocellular carcinoma) has become evident. Our data showing that transforming mutants of p53 upregulated the IL-6 promoter but that wt p53 and wt Rb inhibited the IL-6 promoter suggested one possible mechanism for dysregulated autocrine production of IL-6 by cancer cells in an individual tumour-specific manner. Moreover, wt p53 and its mutants exhibited differential effects on the ability of IL-6 to activate the C/EBP and STAT3 signaling pathways in hepatoma cells. In the context of breast cancer, Tamm and colleagues showed that IL-6 increased motility, cell-cell and cell-substrate dyshesion and epithelial-to-mesenchymal transformation in tumour cells. This change likely underlies the ability of IL-6 (produced either by stromal cells, macrophages or tumour cells) to enhance the invasiveness and metastatic ability of tumour cells, which is now clearly established. Finally, the recent observation that exposure of p53-free hepatocellular carcinoma cells (Hep3B) to IL-6 leads to the sequestration of activated PY-STAT3 in cytoplasmic endosomal structures points to novel IL-6-activated functions of STAT3 in the cytoplasm of cancer cells. The regulation of microtubule dynamics, mitochondrial respiration and ras-mediated cell transformation by non-phosphorylated STAT3 provide a further focus on the functions of the STAT pathways in the cytoplasm. Overall, the effects of IL-6 on the "social behaviour" of tumour cells, first suspected 20 years ago, are now firmly established at the host-tumour interface *in vivo*.

[26]

Tumour microenvironment as a new therapeutic target

Pere Gascon

Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Cancer can be considered as an independent organ composed of specific cells: cancer cells and the so-called tumour microenvironment composed of supportive cells: fibroblasts; immune cells: macrophages, dendritic cells, lymphocytes; blood vessels made by endothelial cells and pericytes during tumoural angiogenesis and elements of the extracellular matrix (ECM). Interestingly, recently a new role for fibroblasts and macrophages has been found. Fibroblasts can help tumour growth by inducing proliferation (Cancer Associated Fibroblasts – CAF). Polarization of resident macrophages (M1) induces phenotype and functional changes to a point where the so-called TAM (tumour associated macrophages – M2) develop a synergistic cross-talk with tumoural cells, expressing and producing EGF, SDF-1, M-CSF, PDGF and TGF- β among other factors. EGF induces tumour cell proliferation and cancer cells produce SDF-1 to induce macrophage proliferation. CAF and MAC can be then considered, in a way, co-conspirator cells. Cells that have switched roles in favour of the tumour. It has been shown in pre-clinical models that CAF are associated with tumour progression and invasion. It is also well known that the number of macrophages infiltrating a tumour is associated with a patient's poor prognosis. Anti-angiogenic therapies target endothelial cells and pro-angiogenic factors. Targeting CAF and TAM is being pursued already by several laboratories, as well as against certain ECM elements.

Traditionally, cancer treatments have focused on tumour cells. However, since the different components of the tumour microenvironment participate in tumour growth, invasion and metastasis, new treatment strategies contemplate targeting many of these same elements. In the future we will target cancer cells together with elements of their microenvironment. In fact, we are already doing so with the anti-angiogenic therapies, a pioneering strategy using this dual targeting strategy: the cancer cell and elements of its surroundings.

Bibliography

1. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-44.
2. Ono M. Molecular links between tumour angiogenesis and inflammation: Inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci* 2008; 99: 1501-6.
3. McLean K, Buckanovich RJ. Myeloid cells functioning in tumour vascularization as a novel therapeutic target. *Translational Res* 2008; 151: 59-67.
4. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis *Nature Rev Cancer* 2008; 8: 618-31.

5. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta Ch, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biol* 2008; 18: 349-55.
6. Zumsteg A, Christofori G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumour angiogenesis. *Current Opinion Oncol* 2008; 21: 60-70.
7. Lorusso G, Rüegg C. The tumour microenvironment and its contribution to tumour evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 1091-1103.
8. Hanna E, Quick J, Libutti SK. The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy. *Oral Diseases* 2009; 15: 8-17.

[27]

The endothelium in the tumour microenvironment: its normalization and use to target therapeutic genes

Claudine Kieda

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR CNRS 4301,
Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France

Most tumours develop their blood supply via angiogenesis because hypoxia is a critical regulator of tumour growth and invasion. Angiogenesis leads in the tumour to a network of leaky, disorganized vessels that are facilitating metastatic spreading. The status of the endothelial cells developing in a tumour site differs from the normal vessels. Angiogenesis results from both the vicinal vessels sprouting and developing toward the tumour site and from the recruitment of bone marrow derived endothelial precursors that are able to reach the hypoxic tumour site in a very specific homing manner. This is highly regulated by hypoxia-dependent locally secreted factors such as VEGFs and chemokines as well as chemokine presenting glycosaminoglycans, which all contribute to the tumour microenvironment.

Antiangiogenic strategies are now known to be deleterious to the anticancer therapeutic approaches by increasing the resistance and tumour cell aggressivity [1].

The new attempts are aimed at vessel normalization [2] in order to increase the conventional therapies' efficacy.

Here we shall develop the recent advancements of these normalization attempts by changing the tumour microenvironmental conditions. This is exemplified by counteracting hypoxia towards normoxia using a new allosteric effector of haemoglobin, that enhances oxygen release, once taken up by red blood cells, counteracts the effects of hypoxia and inhibits angiogenesis *in vitro* [3].

Such a strategy in a mouse model contributes to reduced lung artificial metastasis induced by intravenous injection of mouse melanoma cells. In the case of subcutaneously implanted tumours in Matrigel™ to favour angiogenesis and metastatic spreading, this treatment, associated with chemotherapeutic agents, inhibited primary melanoma growth and lung metastases. The induced reoxygenation reduced tumour neoangiogenesis and resulted in

reorganisation of tumour vasculature, causing a switch from anarchic to well-organized, non-leaky, mature vessels. This contributes to better chemotherapeutic effects in the primary tumours and spread metastases. Vasculature normalization correlates with increased tumour oxygenation and suppressed hypoxia-inducible factor HIF-1 α and the subsequent gene cascade. We show that this effect prevents the selection of high multidrug resistance-expressing cells by a hostile hypoxic/acidic microenvironment.

The elevated level of oxygen was also able to contribute efficiently to the radiotherapeutic efficacy.

Normalization can be improved at the level of recruitment of precursor cells that can be treated for site-directed delivery of selected genes the expression of which is hypoxia/normoxia restricted. Such treatment opens new ways to increase anticancer therapy efficiency.

Bibliography

1. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumour angiogenesis. *Cancer Cell* 2009; 15: 232-9.
2. Mazzone M, Dettori D, Leite de Oliveira R, Loges S, Schmidt T, Jonckx B, Tian YM, Lanahan AA, et al. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumour oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* 2009; 136: 839-51.
3. Kieda C, Greferath R, Crola da Silva C, Fylaktakidou KC, Lehn JM, Nicolau C. Suppression of hypoxia-induced HIF-1 α and of angiogenesis in endothelial cells by myo-inositol trispyrophosphate-treated erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 15576-81.

[28]

Angiogenesis and tumours: new mechanisms and therapeutic targets, significance for personalized oncology

Jozef Dulak

Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University

Chemotherapies can be combined with substances inhibiting the growth of blood vessels. Accordingly, the survival of patients with breast, lung, intestine and kidney cancer was recently improved by introduction of Avastin, an antibody specifically binding the vascular endothelial growth factor. Underway are clinical studies on the small molecular weight tyrosine kinase inhibitors. Improvement in the efficacy of such therapies may require the pharmacogenomic approach, taking into account the dependence of tumour growth on specific subsets of angiogenic mediators and personal genetic traits of the patients.

Meanwhile, of importance for the development of efficient treatments are further studies on the mechanisms of tumour growth and angiogenesis. Of particular inte-

rest may be the role of the Nr2/haem oxygenase-1 pathway, which can influence tumour growth, angiogenesis, metastasis and resistance to chemotherapy. Interestingly, the effect of HO-1 can be tumour dependent: in melanoma it accelerates tumour cell proliferation, increases their angiogenic potential and promotes metastasis. In contrast, in experimental human non-small cell lung cancer HO-1 overexpression prevents tumour growth, angiogenesis, inflammation and metastasis. The data indicate the role of microRNA in mediating the effect of HO-1.

Therefore, the role of HO-1 in tumours may vary in different types. The significance of the cell-specific and potentially patient-specific role of HO-1 will be discussed.

Bibliography

1. Jozkowicz A, Was H, Dulak J. Heme oxygenase-1 in tumours: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 2099-118.
 2. Loboda A, Was H, Jozkowicz A, Dulak J. Janus face of Nrf2-HO-1 axis in cancer – friend in chemoprevention, foe in anticancer therapy. *Lung Cancer* 2008; 60: 1-3.
 3. Nowis D, Bugajski M, Winiarska M, Bil J, Szoklaska A, Salwa P, Issat T, Was H, et al. Zinc protoporphyrin IX, a heme oxygenase-1 inhibitor, demonstrates potent antitumour effects but is unable to potentiate antitumour effects of chemotherapeutics in mice. *BMC Cancer* 2008; 8: 197; doi:10.1186/1471-2407-8-197.
 4. Nowis D, Legat M, Grzela T, Niderla J, Wilczek E, Wilczyński GM, Głodkowska E, Mrówka P, et al. Heme oxygenase-1 (HO-1) protects tumour cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 2006; 25: 3365-74.
 5. Was H, Cichon T, Smolarczyk R, Rudnicka D, Stopa M, Chevalier C, Leger JJ, Lackowska B, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumour cells, decreased survival of mice. *Amer J Pathol* 2006; 169: 2181-98.
-

Sesja 8.

Podstawy molekularne terapii celowanych

[29]

Szlaki sygnałowe regulujące interakcje glejak–makrofagi i ich udział w rozwoju nowotworu

Bożena Kamińska

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Instytut im. Nenckiego, Warszawa

Makrofagi związane z guzem nowotworowym (obecne w glejakach) wydzielają liczne cytokiny o działaniu immunomodulatorowym, promującym proliferację komórek nowotworowych, angiogenezę i inwazyjność. Analiza ekspresji genów i szlaków sygnałowych w makrofach mózgowych współhodowanych z glejakiem ujawniła, że glejaki wydzielają substancje indukujące przeciwwzpalny fenotyp M2 makrofachów oraz stymulujące inwazyjność. Analiza globalnej ekspresji genów w ludzkich glejakach o niskiej i wysokiej złośliwości ujawniała zahamowanie odpowiedzi odporności wrodzonej zależnej od receptorów TLR w guzach złośliwych. Analiza proteomiczna substancji wydzielanych przez glejaka doprowadziła do identyfikacji 2 białek zawierających motyw RGD i oddziałujących receptory integrynowe. Blokowanie interakcji z integrynami blokowało transformację makrofachów *in vitro*. Akumulację aktywnych makrofachów mózgowych stwierdzono też w guzach po implantacji komórek EGFP-GL261 do myszy C57BL/6. Po izolacji populacji komórek CD11b⁺ z mózgu i analizie cytometrycznej z przeciwciałami stwierdzono ~2,6-krotne zwiększenie rezydentnych makrofachów (mikrogleju) i ~30-krotne zwiększenie liczby napływających makrofachów. Wykazano zwiększone stężenie cytokin IL-10 i GM-CSF w mózgu myszy z guzem, a w wysortowanych komórkach populacji CD11b⁺ zidentyfikowano zmiany w ekspresji *arg-1*, *cxcl14*, *ifn-1*, *cox-2* i *mt1-mmp* potwierdzające przeciwwzpalny fenotyp M2 makrofachów związanych z guzem nowotworowym. Redukcja infiltracji guza przez makrofagi i zahamowanie aktywacji fenotypu M2 poprzez iniekcję cyclosporyny A (CsA) zmniejszały wielkość guza, obniżając poziom IL-10 i GM-CSF w mózgu myszy z guzem i podwyższając ekspresję *ifn-β1* w komórkach CD11b⁺. Wyniki naszych badań wskazują na wspierającą rozwój nowotworu rolę naciekających guzy złośliwe makrofachów oraz pokazują, że blokowanie interakcji glejak–makrofagi może być nową, efektywną strategią w terapii złośliwych glejaków.

Badania finansowane przez grant P-N/024/2006 z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Innate immunity and tumour cross-talk: signaling pathways controlling macrophage function in tumour progression

Tumour-associated macrophages (TAMs) are abundant in the stromal compartment of many malignant tumours (including gliomas) and release a variety of molecules that support tumour growth, angiogenesis and invasion. Global gene expression profiling and analysis of signaling pathways in cultured brain macrophages challenged with glioma cells demonstrate that glioma-derived factors induce anti-inflammatory M2 phenotype and metalloproteinase activities. Bioinformatic analysis of gene expression in low versus high grade gliomas revealed blockade of innate immunity signaling pathways in malignant gliomas. Proteomic analysis of glioma conditioned medium led to identification of factors stimulating macrophages. Two activating proteins with RGD motifs known to interact with integrins were discovered and interference with integrin binding abolished transformation of macrophages and downstream signaling. We found accumulation of amoeboid microglia/macrophages within tumours developing after implantation of EGFP-GL261 glioma cells to C57BL/6 mice. After magnetic separation of CD11b-positive cells and identification of microglia or macrophages, we found ~2.6-fold increase in a number of microglia and ~30-fold in macrophage number after tumour implantation. Elevated levels of IL-10 and GM-CSF found in tumour-bearing brain and significantly altered expression of *arg-1*, *cxcl14*, *ifn-1*, *cox-2*, *mt1-mmp* in sorted CD11b-positive cells confirmed anti-inflammatory M2 phenotype of glioma-associated macrophages. Reduction of infiltration/activation of these cells in experimental gliomas by a systemic injection of cyclosporin A (CsA) greatly reduced tumour volume, IL-10 and GM-CSF levels in brains of tumour-bearing mice, and significantly elevated of *ifn-β1* expression in sorted CD11b-positive cells. Our findings demonstrate that counteracting interactions microglia/macrophages with glioma cells could be a novel, effective strategy to reduce glioma growth and invasion.

Supported by grant P-N/024/2006 from the Ministry of Science and Higher Education.

[30]

Hijacking cell survival pathways and redirecting them to induction of cell death – apoptin as an example

Marek Los¹, Saeid Ghavami², Thomas Klonisch³, Andrew J. Halayko^{2,4}, Joerg Stetefeld⁵, Frank Schweizer⁵, Klaus Schulze-Osthoff¹

¹Interfaculty Institute of Biochemistry, Univ. Tübingen, 72076 Tübingen, Germany

²Department of Physiology, National Training Program in Allergy and Asthma, Univ. Manitoba, and Biology of Breathing Group, Manitoba Institute of Child Health, Winnipeg, MB, Canada

³Department of Human Anatomy and Cell Science, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

⁴Department of Internal Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

⁵Departments of Chemistry & Med. Microbiolog., Univ. Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

The discovery of cancer stem cells and their preliminary characterization, in recent years, opens new ways for their selective targeting. Using apoptin, a viral protein that selectively kills cancer cells, we have investigated pathways changed in breast-, prostate-, and haemathological malignancies. We have employed a variety of molecular tools such as shRNA-gene silencing, gene-knock-out model cell lines, dominant-negative and dominant active forms of studied proteins, adenoviral transduction, specific inhibitors, synthetic peptides mimicking active domains, and other tools. In our model, cancer cells were killed by apoptin through cooperation of various pathways: (i) interaction of apoptin with PI3-K and Akt led to nuclear translocation of Akt and phosphorylation of numerous nuclear substrates (Maddika et al., Cell Prolif., 2007; Maddika et al., Oncogene, 2008, Maddika et al., J. Cell Sci., 2008), (ii) activation of the Akt->Nur77 led to cytoplasmic translocation of the latter one, with subsequent activation of the mitochondrial death pathway (Maddika et al., Oncogene, 2005), (iii) apoptin triggered activation of CDK2 via Akt-mediated phosphorylation and Akt mediated inhibition of its inhibitor p27^{Kip} (Maddika et al., Mol. Cell. Biol., 2008). These cellular changes together lead to deregulation of mitosis, and activation of the mitochondrial apoptotic pathway, selectively in cancer cells. Thus, in our experimental model, the pro-survival PI3-K/Akt signaling pathway that is upregulated in the majority of cancers, could efficiently be “hijacked” and redirected towards selective induction of cell death in cancer cells. Various, potential experimental treatment strategies will be discussed.

[31]

Co-signalling molecules in cancer

Daniel Olive

Marsilia

We have addressed the functions of the ligand BTLA in cancer patients and during viral infection. BTLA is found on naive CD8+ T cells and is progressively downregulated in memory and differentiated effector-type cells. During primary CMV infection, BTLA was highly induced on CMV-specific CD8+ T cells immediately following their differentiation from naive cells. After control of CMV infection, BTLA expression went down on memory CD8+ cells. Engagement of BTLA by monoclonal antibodies blocked CD3/CD28-mediated T cell proliferation and Th1 and Th2 cytokine secretion. Finally, in vitro blockade of the BTLA pathway augmented, as efficiently as anti-PD-1 mAbs, CMV-specific CD8+ T cell proliferation. Thus, our results suggest that like PD-1, BTLA provides a potential target for enhancing the functional capacity of CTLs in viral infections (Serriari et al., submitted). In melanoma patients, in marked contrast, tumour antigen-specific differentiated effector CD8 T-cells persistently expressed high levels of BTLA in vivo and remained susceptible to functional inhibition by its ligand HVEM (Herpes Virus Entry Mediator). Such persistence of BTLA expression was also found in tumour antigen-specific CD8 T-cells from melanoma patients with spontaneous immune responses and after conventional peptide vaccination. Remarkably, the addition of CpG (PF-3512676) to the vaccine formulation led to progressive downregulation of BTLA in vivo in those cells, and consequent resistance to BTLA-HVEM mediated inhibition. Thus, BTLA inhibits human cancer-specific T-cells, and appropriate immunotherapy may partially overcome this barrier (Derre et al., J of Clin. Inv., 2010).

[32]

Intracellular metabolic pathways as novel therapeutic targets

Piotr J. Wysocki

Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

The relation between obesity, metabolic syndrome, diabetes and cancer has been recognized for many years. Multiple studies conducted in the last two decades have identified molecular mechanisms responsible for this phenomenon. Elucidation of the important role of insulin, IGFR, mTOR and AMPK in breast cancer biology has led to development and subsequent clinical evaluation of novel targeted therapies including IGF1R-specific antibodies tyrosine kinase inhibitors and inhibitors of mTOR. There is also a growing interest in the use of metformin, which has been shown to possess antitumour activity resulting

from activation of AMPK and subsequent inhibition of mTOR, as well as from decreased circulating insulin levels. Metformin has been shown to inhibit proliferation, invasion and angiogenesis of neoplastic cells and to overcome resistance of breast cancer to chemotherapy, hormonal therapy and HER2 inhibition. Recently, metformin has been demonstrated to inhibit breast cancer stem cell growth and to synergize with chemotherapy in suppression of tumour growth and prolongation of survival of breast tumour-bearing animals. Several currently ongoing phase II and III clinical studies are evaluating the therapeutic efficacy of metformin in treatment of early and advanced breast cancer patients.

[33]

Metabolic dysfunction and resistance to tyrosine kinase inhibitors

Pierre Formstecher

Sesja 10.

Postępy rozwoju klinicznego terapii spersonalizowanych

[34]

Biologically individualized radiotherapy – where do we stand?

Michael Baumann

Dept. of Radiation Oncology and OncoRay Center for Radiation Research in Oncology, Medical Faculty and University Hospital Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Germany

The last decades have seen unprecedented progress in molecular biology and technological developments important for radiation oncology. Several broad avenues with important potential for biologically individualized radiotherapy are currently under intense preclinical and clinical investigation. Three examples, which all relate to tumour response, will briefly be reviewed in this lecture.

Molecular imaging for prediction of radiation response, for modifying total dose and dose distribution in individual patients, and for treatment monitoring in individual patients is a promising concept under investigation. For determination of the target volume molecular imaging using the PET tracer FGD has become a clinical standard in many departments. More specific tracers such as the hypoxia marker FMISO, as well as other biomarkers of hypoxia, have shown considerable promise in preclinical studies and in observational clinical trials and are now on the verge of prospective clinical intervention trials.

Sensitization of tumour by molecular targeted drugs is another important field of research to individualize radiotherapy. First successful examples of molecular targeting in radiotherapy, most importantly inhibition of the EGFR by antibodies, have been translated into clinical practice. However the results of preclinical and clinical studies indicate vast interindividual heterogeneity of such approaches, calling for predictive tests, which currently are not available for combined treatment approaches.

Recent experiments support that cancer stem cells are a specific subpopulation of all cancer cells, while the vast majority of cancer cells are non-tumourigenic. The question whether cancer stem cells may respond differently to radiotherapy or combined modality treatment compared to the bulk of non-stem tumour cells is of high importance for the field. Recurrent tumours after radiotherapy originate by definition from at least one surviving cancer stem cell while permanent local tumour control requires inactivation of all cancer stem cells. Local tumour control assays therefore functionally measure survival of the subpopulation of cancer stem cells, and can be considered as a gold standard in this respect. In contrast changes in tumour volume after therapy, i.e. tumour response, are governed by the changes in the mass of tumour cells, i.e. primarily by the non-stem cells. Today the vast majority of preclinical studies in cancer research use volu-

me dependent parameters such as tumour regression or tumour growth delay as experimental endpoints. This carries the risk that new treatments may be optimized for their effect on the bulk of non-stem cancer cells, with no improvement in the curative potential. Experimental and clinical data provide evidence for the importance of cancer stem cell number and density for local tumour control after radiotherapy. Experiments suggest that the response of cancer stem cells and non-tumourigenic cells to radiation and combined treatment may dissociate. It is currently not clear whether this is caused by differences in the intrinsic radiation sensitivity between cancer stem cells and non-tumourigenic cells or whether other factors cause this effect.

[35]

Współczesne wyzwania odkryć leków onkologicznych i rozwoju klinicznego

Giulio Draetta

Boston

The Cancer Genome Atlas (TCGA) and similar large-scale efforts will generate a complete compendium of all cancer-associated genomic alterations with the goal of identifying the most promising therapeutic targets. However, these efforts are uncovering a staggering level of genome complexity, making it clear that the effective translation of our new-found genomic knowledge into cancer therapeutics and diagnostics will require sophisticated computational analyses and, more importantly, experimental systems that inform about the functional activity of targets in the relevant biological context. The challenge goes beyond culling “bystander” from “driver” alterations – the key issue is “target biology and context”. Our experience in cancer gene discovery and drug development has taught us that an annotation of functionality alone is not sufficient to make informed decisions in cancer drug development. Rather, a productive drug development effort requires mechanistic understanding of a target’s cancer-relevant activity, the specific biological and genotypic context in which it operates, and the clinical context in which to test the ultimate hypothesis. Therefore, a new paradigm in cancer target discovery and drug development is needed that takes into account not only comprehensive genomic knowledge, but also the biological context and the clinical picture of specific tumours.

The Belfer Institute for Applied Cancer Science at Dana Farber Cancer Institute is a novel academic construct which integrates the best attributes of academic science and industry execution and thus effectively bridges the gap between academic and pharmaceutical research in order to accelerate and improve the discovery and development of efficacious therapeutics for human cancer. It is designed to reduce the high rate of failure in cancer drug development (~95% overall; 56% failure in Phase III) by addressing the lack of operational and organizational integration between cancer biology and drug develop-

ment. Established in 2004 with philanthropic support, this strategic centre brings together a robust industry-like goal-oriented pipeline from target identification to drug discovery with compelling target biology and cancer genetics of academic research. The presentation will focus on describing examples of activities conducted at the Belfer Institute.

[36]

Design of clinical trials to evaluate personalized treatment for cancer

Ian Tannock

Princess Margaret Hospital and University of Toronto, Toronto, Canada

Systemic treatment for cancer differs fundamentally from treatment of infectious disease. For a patient with an infection, a culture is taken to identify the responsible bacterium or other infectious agent and to evaluate its sensitivity to available antibiotics. A treatment is then selected that has a high chance of eradicating the disease. In contrast, chemotherapy drugs to treat cancer have been selected for group effects, i.e. from knowledge that a particular drug or combination has activity against some patients with a particular type of cancer. Drug development depends on large randomized controlled trials (RCTs) which compare new versus standard treatment; this is expensive and inefficient since many of the patients participating in such trials have little or no chance of benefit. The potential advantage of a predictive assay for drug sensitivity has long been recognized. However, RCTs designed to compare standard treatment with a drug selected by such an assay have not shown improved outcome, although that has not inhibited attempts to market chemosensitivity assays.

Molecular targeted agents are used increasingly in oncology, and for a few drugs (e.g. hormonal agents and anti-HER2 drugs for breast cancer) there is evidence that these agents will only benefit the subgroup of patients that express their target. This has led to more efficient trials directed at defined subgroups of patients: for example trastuzumab has led to important improvements in outcome for women with HER2-positive breast cancer (about 20% of the total), but would have undetectable effects against an unselected population. Two trials are in progress (TAILORx and MINDACT) which ask whether molecular profiling of breast cancer will assist in selecting adjuvant therapy. While these trials will give useful information, they are evaluating a prognostic assay (i.e. how bad is the disease and should we use aggressive therapy or not?) rather than a predictive assay (i.e. which are the best drugs to use for this patient?).

Most studies that have evaluated the influence of molecular properties of a cancer on outcome from different treatments have been applied retrospectively to results of completed trials. For example, it has been shown that the presence of an EGFR mutation in non-small cell lung

cancer (NSCLC) may increase responsiveness to erlotinib or gefitinib by post-hoc analysis of RCTs for unselected patients with this disease; and that the absence of Kras mutation in colorectal cancer is associated with benefit from cetuximab. In one recent trial of chemotherapy versus gefitinib for NSCLC, the survival curves crossed over, consistent with there being two populations with and without EGFR mutation who benefited from different treatments. Although an important result, the trial was analysed inappropriately using a Hazard Ratio for the entire population, despite obvious violation of the assumption of proportional hazards.

Future RCTs to evaluate treatments that are likely to benefit subgroups of patients should be designed differently. Initial rigorous evaluation of these treatments still requires comparison to an unselected group receiving the current standard treatment, but the experimental arm should evaluate different potential treatments (A, B, C, etc.) where each treatment is selected by a predictive assay, depending on molecular characterization of each tumour.

[37]

Recent Results of Approved Personalized Targeted Therapies: Monoclonal Antibodies

Christoph C. Zielinski

Clinical Division of Oncology and Chairman, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Austria

Background: Targeted therapy in malignant diseases aims at influencing pathways which are decisive for the proliferation or uncontrolled spread of the underlying malignancy. An alternative approach lies in the influence on neoangiogenesis which plays a decisive role in the development of malignant tumours of a meaningful size.

When considering targeted treatment with antibodies, we currently continue to have three widely accepted targets which include:

- erB receptor family,
- VEGF, and
- antibodies directed against various antigens on the tumour cell surface.

Efficacy and limitations: As has been presented by a multitude of clinical trials, antibodies directed against the various targets can be of solid or even impressive efficacy: Thus, adjuvant treatment with the anti-erB-2 antibody trastuzumab in the adjuvant setting of erB-2 overexpressing early breast cancer has reduced recurrence consistently and across trials by env. 50% and significantly reduced mortality when administered for one year. Shorter durations of antibody administration have been of only limited efficacy when patients were observed for a prolonged period.

Conversely, the use of bevacizumab directed against VEGF, has been shown to be unsuccessful in the adjuvant setting in the treatment of patients with colon cancer. Thus, the efficacy obtained by the use of certain antibod-

ies in the metastatic setting cannot always be translated into a benefit in the treatment of early disease.

Metastatic disease has been shown to be an ideal ground for the assessment of the efficacy of various antibodies mainly directed against the erB family of receptors as well as angiogenesis-inducing molecules: Thus, cetuximab, panitumumab (both directed against erB-1), trastuzumab (directed against erB-2) and bevacizumab (directed against VEGF) have been shown to almost unequivocally prolong progression-free survival and in the majority of clinical models also overall survival. Limitations are the necessity of combination of these antibodies with chemotherapies, but also limited duration of treatment efficacy obviously due to the emergence of resistance mechanisms including molecular escape pathways and alternative intracellular routes of signal transduction. Thus, the major endeavours in the laboratory and the clinic are currently directed against the discovery and subsequent clinical application of drugs which would block either or both of these escape mechanisms.

Summary: Monoclonal antibodies directed against various structures on the tumour cell or within the stroma have led to significant advances in a multitude of malignant diseases, but are limited in their continuing efficacy by a series of biological escape mechanisms. Thus, the attempt to target certain molecules associated with the development and spread of tumour cells continues through the attempt to appropriately block escape mechanisms associated with the limitation of continuing efficacy of this very promising treatment approach.

[38]

Personalized medicine for BRCA1 carriers: lessons from Poland

Steven Narod

[39]

Personalized Health Care in Oncology: A Pharmaceutical Perspective

Christian Meisel

Penzberg

It is still a clinical reality that patients who have been diagnosed with the same type of cancer and who receive the same kind of chemotherapy can respond very differently. Whereas some patients experience cure or considerable improvement under therapy, others may benefit only briefly and progress, or do not even respond at all. Although apparently diagnosed with the same disease, patients can today be characterized further by individual traits which are linked to the underlying disease or to individual patient characteristics.

The goal of personalized medicine is to identify and define these individual differences in order to be able to

optimize therapy, to make healthcare better, safer and more cost-effective. In essence, personalized healthcare (PHC) can be viewed as an attempt to target the right treatment to the right patient in the right manner.

Despite today's molecular insights and technologies to better adjust treatment to patients, fitting a particular treatment to patients is still an ambitious goal, and discovering and developing novel medicines and diagnostic markers (biomarkers) is still a very complex and time-consuming undertaking.

In this respect Roche is uniquely positioned as a combined pharmaco-diagnostic company to deliver clinically differentiated medicines. Consequently, the concept of personalized medicine has been adopted to become an integral part of Roche's pharma-diagnostic strategy and has been named Personalized Health Care.

To effectively accomplish PHC it is necessary that the clinical development of new drug candidates be carried out in a way which leverages our molecular understanding of the cancer, as compared to classical development which simply directed therapy to general cancer types. PHC is a core element of the drug development strategy at Roche and is being implemented across the whole portfolio from early to late stage. A PHC and biomarker strategy, integrated in the clinical development plan, is the foundation of successful PHC implementation. To fully realize PHC, close disease monitoring of cancer patients before and during treatment needs to be consistently applied through the non-invasive (functional imaging) as well as invasive (e.g. blood, biopsies) evaluation of the patient, using a vast array of technologies.

PHC and companion diagnostics examples from the Roche Oncology pipeline, as well as lessons learnt, will be shared in the presentation.

Sesja 12.

Niedrobnokomórkowy rak płuca – model zindywidualizowanego leczenia w praktyce klinicznej

[40]

Non-small-cell lung cancer – a model for personalised treatment in clinical practice Introduction

Maciej Krzakowski

The Maria Skłodowska-Curie Institute of Oncology, Warsaw, Poland

Lung cancer is one of the most frequent malignancies and represents the leading cause of cancer-related deaths. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) accounts for 80-85% of all primary lung neoplasms. Although surgery remains the mainstay of treatment for early disease, systemic treatment (chemotherapy and molecular-oriented therapy) constitutes essential elements of a multimodality approach in NSCLC – it includes postoperative use of adjuvant chemotherapy in patients with stage II and III disease after complete resection. Chemotherapy should be used either sequentially or simultaneously in combination with thoracic irradiation in locally advanced disease. Unfortunately, about 50% of patients present with metastatic disease and relapse is common after primary treatment of early NSCLC – palliative administration of cytotoxic and/or targeted agents is well established management in patients with stage IV disease. The progress in systemic treatment of NSCLC is directed at developing and incorporating into practice more potent anticancer agents, but it should be accompanied by or even preceded by a search for prognostic and predictive factors. The development of biomarkers for several newly-approved therapies in NSCLC has been encouraging, but still few are accepted in clinical practice (e.g. *EGFR* gene mutation for prediction of benefit from tyrosine kinase inhibitors). Ongoing and future prospectively planned studies are needed to explore and validate the predictive and prognostic performances of biomarkers in NSCLC. Patients should be encouraged to participate in clinical trials with mandatory tissue collection for further analyses.

[41]

Anti-EGFR in non-small cell lung cancer

Federico Cappuzzo

Ospedale Civile di Livorno, Livorno-Italy

Worldwide, lung cancer is responsible for more than one million deaths per annum and is the leading cause of

cancer mortality. Most patients with lung cancer are not cured and the overall 5-year survival rate is approximately 15%. Recent advances in the knowledge of cancer biology have led to the identification of several potential molecular targets that play a key role in cancer development and progression. The Epidermal Growth Factor Receptors (EGFRs) stand at the origin of a major signaling pathway involved in the growth of lung cancer. Erlotinib and gefitinib are selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors (EGFR-TKIs) with demonstrated activity in pre-treated NSCLC in early phase I and II trials. Several studies have investigated the activity of gefitinib and erlotinib in patients with advanced NSCLC. In those trials, EGFR-TKIs were given to patients unselected for any clinical or biological characteristic. When given in a first-line setting, both drugs produced a response rate exceeding 10% only in studies including or enriched for patients with particular clinical characteristics, such as Asian origin or never smokers. Similar activity emerged in studies conducted in a second or third-line setting. Overall, all studies showed that the activity of both agents was marginally influenced by previous therapies, with high activity in specific subgroups, including Asian ethnicity, adenocarcinoma histology, female gender and never smoking status. Large phase II and III trials evaluated the activity of EGFR-TKIs as a single agent or in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone. Those trials demonstrated three relevant conclusions: (1) the addition of EGFR-TKI to standard chemotherapy is not more effective than chemotherapy alone, (2) EGFR-TKIs are equally effective as single agent chemotherapy in both first and second-line settings, and (3) gefitinib and erlotinib treatments are inferior to standard first-line platinum-based chemotherapy in unselected NSCLC. Recent data have demonstrated that testing patients for EGFR mutation is critical for proper selection when choosing a first-line therapy. Four large phase III trials compared the EGFR-TKI gefitinib versus standard platinum-based chemotherapy in first-line metastatic NSCLC. All trials demonstrated that in NSCLC patients with EGFR mutation gefitinib produces a higher response rate and longer PFS than standard chemotherapy, further supporting the use of EGFR-TKI in a first-line setting in selected patients. A similar approach is currently being explored in Europe by investigators of the EURLAC trial, a randomized phase III study of erlotinib versus chemotherapy in chemo-naïve patients with EGFR-mutant NSCLC. Two additional large phase III trials using erlotinib in the maintenance setting (the SATURN and ATLAS trials) recently demonstrated that the drug is particularly effective in patients with EGFR mutations. Importantly, at present there is no phase III study demonstrating a survival benefit for EGFR mutated NSCLC patients treated with erlotinib or gefitinib, and in trials with erlotinib a consistent survival benefit was observed also in the EGFR wild type population. These data indicate that other predictors play a role in EGFR-TKI sensitivity, with consistent data supporting a role for EGFR gene copy number.

[42]

VEGF inhibition in NSCLC therapy

Natasha Leigh

Toronto

VEGF remains an important prognostic factor in NSCLC, and VEGF inhibition has led to advances in treatment outcome for advanced NSCLC patients. The initial phase III studies of bevacizumab plus first-line platinum-based chemotherapy, in patients with predominantly non-squamous histology without significant haemoptysis, demonstrated significant improvements in response rates, progression-free survival, and overall survival in the E4599 trial, with a median survival improvement of 2 months over chemotherapy alone [1, 2]. More recently, a pre-planned subgroup analysis of patients with adenocarcinoma in the E4599 trial demonstrated that patients who received bevacizumab had a median survival of 14.2 months, compared to 10.3 months for those who received chemotherapy (HR 0.69, 95% CI 0.67-0.92) [3]. The safety profile of bevacizumab with chemotherapy is well characterized in NSCLC as well as other solid tumours, with low rates of bleeding, hypertension and proteinuria, with rates approaching 1% or less in large registry cohorts (SAiL, ARIES) [4, 5]. Pulmonary haemorrhage has been reported with decreasing frequency as investigators gain experience with clinical selection, and currently the risk of severe haemoptysis is estimated at 1% or less. Expanded indications in NSCLC include patients with treated CNS metastases, where an intracranial response may be seen, and the risk of spontaneous CNS bleeding is low (1.17%) [6].

Other compounds are currently in clinical development first-line, including aflibercept (soluble VEGF receptor), and multiple VEGF receptor tyrosine kinases. Recently the ESCAPE trial, a first-line trial of sorafenib with chemotherapy, demonstrated no improvement with the addition of the VEGFR TKI to first-line chemotherapy, and a potential adverse outcome in those with squamous histology [7]. Cediranib has shown promise in a small randomized phase II trial in combination with first-line chemotherapy, and has been expanded to a phase III trial (NCIC CTG BR.29) [8].

There are multiple trials of these agents ongoing in the second- and third-line setting, and as maintenance therapy. Recent studies of bevacizumab with erlotinib, combining VEGF and EGFR inhibition, have demonstrated better PFS but not OS in studies of second-line therapy (BETA Lung) [9], and maintenance therapy (ATLAS) [10].

Our understanding about NSCLC patient selection for safe VEGF inhibitor therapy has improved significantly. However, we have not yet identified a reliable biomarker to predict enhanced efficacy of benefit from VEGF inhibition, with the potential exception of adenocarcinoma histology and bevacizumab/chemotherapy first-line. Candidate biomarkers under exploration include the early development of hypertension during therapy, which has been associated with better survival in a landmark analysis of the E4599 study with bevacizumab, and also seen in studies of cediranib and axitinib [11]. Exploration of VEGF

levels may predict better response with bevacizumab (E4599) [12], and those with high bFGF levels may have better PFS with bevacizumab (AVAIL) [13]. Similar to findings in breast cancer studies with bevacizumab, VEGF genotypic variants or single nucleotide polymorphisms (SNPs) may be associated with differential benefit from VEGF inhibitors such as bevacizumab. Investigators from the E4599 trial have identified a 3 SNP profile associated with response and better progression-free and overall survival in bevacizumab-treated patients, which appears to be predictive, not prognostic [14]. Further validation of this and other potential biomarkers is required, in studies such as ABIGAIL.

Additional studies with VEGF inhibitors are combining advances in chemotherapy, for example pemetrexed/platinum/bevacizumab (JMHD), and even chemotherapy with bevacizumab and cetuximab, including maintenance therapy with both monoclonal antibodies (SWOG 0819).

With advances in molecular profiling and emerging novel agents in NSCLC therapy, it will be important to define the value of VEGF inhibition in different molecular subtypes of NSCLC.

Bibliography

1. Sandler A, et al. *N Engl J Med* 2006.
2. Reck M, et al. *J Clin Oncol* 2009.
3. Sandler A, et al. *J Thorac Oncol* 2008; 3(Suppl 4): S283 (abstr 133).
4. Crino L, et al. *Proc ASCO* 2009.
5. Fischbach, et al. *Proc ASCO* 2009.
6. Srivastava, et al. *J Thorac Oncol* 2009.
7. Scagliotti G, et al. *J Clin Oncol* 2010.
8. Goss G, et al. *J Clin Oncol* 2010.
9. Hainsworth JD, et al. *Proc IASLC/ASTRO, Chicago, October 2008*.
10. Cappuzzo F, et al. *Proc WCLC* 2009.
11. Dahlberg, et al. *J Clin Oncol* 2010.
12. Dowlati A, et al. *Clin Cancer Res* 2008.
13. Leigh N, et al. *Proc ESMO, Berlin, September 2009*.
14. Zhang W, et al. *Proc ASCO* 2009.

[43]

Personalized chemotherapy for non-small cell lung cancer (NSCLC)

Rafał Dziadziuszko

Department of Oncology and Radiotherapy, Medical University of Gdansk, Poland

The benefit of chemotherapy in patients with early or advanced NSCLC is relatively modest at the expense of significant toxicity. Numerous preclinical and clinical studies have focused on identification of molecular features of the tumour associated with activity of agents commonly used in NSCLC. Sensitivity to chemotherapy inversely correlates with the activity of several enzymes responsible for DNA damage repair and nucleotide metabolism. Low level of excision repair cross-complementing-1

(ERCC1), a rate-limiting enzyme of the nucleotide excision repair pathway, is associated with sensitivity to alkylating agents in vitro and in samples from patients treated with platinum-based chemotherapy. Low level of human MutS homologue 2 (MSH2), a mismatch repair enzyme, was linked with sensitivity to cisplatin. Low expression of regulatory subunit of ribonucleotide reductase (RRM1) was associated with sensitivity to gemcitabine in cell lines as well as in clinical studies. Low expression of BRCA1 appears to predict sensitivity to cisplatin, whereas high expression may be associated with sensitivity to antimicrotubule drugs such as taxanes and vinorelbine. Low level of thymidylate synthase (TS) appears to associate with sensitivity to pemetrexed.

Many of the studies with predictive markers for chemotherapy were done with quantitative immunohistochemistry, whereas other studies evaluated gene expression with quantitative RT-PCR in fresh-frozen or paraffin-embedded tumour samples. Tests based on both platforms are being explored in prospective clinical studies aiming at individualizing chemotherapy according to the sensitivity profiles of the tumours. Several of the currently ongoing trials with prospective marker assessment will be discussed during the conference. The endpoints of these trials are feasibility of molecular marker testing (phase II studies) or superiority of customized versus non-customized chemotherapy (phase III studies). It is hoped that the results of these trials will provide further evidence for more efficient use of chemotherapy in NSCLC.

Sesja 14.

Postępy w radioterapii

[44]

Radioterapia śródoperacyjna stosowana jako boost w leczeniu oszczędzającym raka gruczołu piersiowego

Dawid Murawa, Andrzej Roszak,
Aldona Karczewska-Dzionk, Marcin Litoborski,
Sebastian Adamczyk, Paweł Murawa

Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wstęp: Liczne prospektywne badania naukowe udowodniły brak różnic w przeżyciach całkowitych u chorych na wczesnego raka piersi poddanych leczeniu oszczędzającemu (BCT) czy mastektomii. Analiza histopatologiczna udowodniła, że największe subkliniczne natężenie komórek nowotworowych występuje w rejonie do 4 cm od makroskopowej granicy guza. Dlatego łoża po usuniętym nowotworze stanowi miejsce największego ryzyka wznowy miejscowej – 65–80% zdarzeń. Nieodzowną częścią leczenia oszczędzającego jest zatem pooperacyjna radioterapia z dodatkową dawką 10–16 Gy na łożę.

Cel pracy: Przedstawienie metody i wstępnych wyników śródoperacyjnej radioterapii w postaci boostu w leczeniu oszczędzającym raka gruczołu piersiowego.

Materiał i metody: Od maja 2008 r. do marca 2010 r. u 148 kobiet z rakiem gruczołu piersiowego przeprowadzono leczenie oszczędzające, ze śródoperacyjną radioterapią w postaci boostu na łożę po wyciętym guzie w dawce 10 Gy. Do tego celu wykorzystano akcelerator liniowy Mobetron (Intraop. Medical Corporation, Sunnyvale, CA). Do procedury kwalifikowano chore w stopniu zaawansowania T1 (guz do 2 cm). Średni wiek pacjentek wyniósł 55,7 roku (35–73 lat). Po wygojeniu rany pooperacyjnej pacjentki zostały poddane radioterapii zewnętrznej na całą pierś w ciągu 5 tyg. Zależnie od indywidualnych wskazań stosowano uzupełniającą chemo- i/lub hormonoterapię.

Wyniki: Sama procedura śródoperacyjnego naświetlania jest stosunkowo prosta. Średnio wpłynęła na wydłużenie zabiegu chirurgicznego o zaledwie 30 min. W krótkim okresie obserwacji u chorych nie stwierdzono istotnej klinicznie skórnej toksyczności. Pacjentki nie zgłaszały szczególnych dolegliwości bólowych, a efekt kosmetyczny oceniono jako dobry. U 4 chorych obserwowano przedłużone gojenie rany spowodowane zakażeniem.

Wnioski: Przeprowadzone badanie pokazuje, że zastosowanie śródoperacyjnej radioterapii elektronami na łożę po guzie może stanowić dobrą alternatywę dla standardowej radioterapii pooperacyjnej. Takie postępowanie ma kilka zasadniczych korzyści. Bezpośrednia wizualizacja łoży umożliwia dokładniejsze naświetlenie pojedynczą efektywną dawką miejsca związanego z największym ryzykiem wznowy miejscowej. Oszczędzenie w trakcie naświetlania skóry pozwala na uniknięcie toksyczności i poprawę efektu kosmetycznego. Poza tym dzięki technice śródopera-

cyjnej radioterapii skraca się okres pooperacyjnych naświetlań o 1–2 tyg. Analiza chorych w dalszym okresie pozwoli na ocenę ewentualnych wznów miejscowych.

Intraoperative radiotherapy applied as a boost in breast conserving therapy in breast cancer

Background: Numerous prospective scientific studies have proved the absence of differences in overall survivals between patients suffering from early breast cancer subjected to breast conserving therapy (BCT) or mastectomy. The histopathological analysis has proved that the biggest subclinical concentration of neoplastic cells takes place in the area ranging up to 4 cm away from the macroscopic border of the tumour. Therefore the site of the resected tumour is the place of the highest risk of local relapse – 65-80% of cases. Thus, postoperative radiotherapy with an additional dose of 10-16 Gy applied to the site is a necessary part of breast conservative therapy.

Aim of the study: To present the method and initial results of intraoperative radiotherapy as a boost in breast conserving therapy in breast cancer.

Material and methods: From May 2008 to March 2010 148 women with breast cancer underwent breast conserving therapy with intraoperative radiotherapy in the dose of 10 Gy applied as a boost to the site after the resected tumour. A Mobetron linear accelerator was used for the purpose (Intraop. Medical Corporation, Sunnyvale, CA). Patients with T1 progression (tumour not larger than 2 cm) were qualified for the procedure. Patients' average age was 55.7 years (35-73). After healing of the postoperative wound the patients underwent external radiotherapy applied to the whole breast during a period of 5 weeks. According to individual recommendations they were subjected to supplementary chemotherapy and/or hormone therapy.

Results: The procedure of intraoperative radiotherapy is relatively simple. On average it extended the time of surgery only by 30 minutes. During the short period of observation no clinically significant dermal toxicity was diagnosed. The patients did not complain much about pain and the cosmetic effect was evaluated as good. In 4 patients prolonged wound healing was observed due to infection.

Conclusions: The research shows that the application of intraoperative electron radiotherapy to the post-tumour site may be an alternative treatment to the standard postoperative radiotherapy. This procedure has several fundamental advantages. The direct visualisation of the site enables more precise radiation with a single effective dose applied to the place related to the highest risk of local relapse. The conservation of skin during radiation gives a possibility to avoid toxicity and improves the cosmetic effect. Besides, due to the technology of intraoperative radiotherapy the postoperative radiation time is reduced by 1-2 weeks. An analysis of patients over a further period will enable evaluation of possible local relapses.

[45]

Tomoterapia – nowe możliwości radioterapii

Joanna Kaźmierska

Zakład Radioterapii II, Wielkopolskie Centrum Onkologii
w Poznaniu

Współczesna radioterapia koncentruje się na zapewnieniu maksymalnych korzyści terapeutycznych przy jednoczesnym zminimalizowaniu możliwych działań niepożądanych. Zaplanowanie i optymalna realizacja leczenia stanowią wyzwanie szczególnie w trudnych sytuacjach klinicznych, takich jak napromienianie kilku zmian jednocześnie, bliskie sąsiedztwo struktur krytycznych czy powtórne napromienianie. Nowoczesne systemy radioterapii, takie jak tomoterapia, łączą możliwość napromieniania oraz obrazowania przy użyciu jednego urządzenia, w oparciu o platformę tomografu komputerowego. Skany MVCT wykonane przed każdą frakcją napromieniania i ich fuzja z podstawowymi obrazami CT uzyskanymi w czasie planowania leczenia pozwalają na bardzo dokładne pozycjonowanie pacjenta, a co za tym idzie, precyzyjną realizację skomplikowanych planów leczenia. Dodatkowo, unikalna koncepcja planowania i realizacji leczenia pozwala na uzyskanie optymalnych rozkładów dawki m.in. w wyżej wymienionych trudnych sytuacjach klinicznych. Planowanie i realizacja planu leczenia z tak wysoką dokładnością wymagają jednocześnie stałej kontroli warunków anatomicznych narządów zdrowych i morfologii zmiany nowotworowej, ponieważ nawet stosunkowo niewielkie ich zmiany mogą powodować nieakceptowalne zmiany w pierwotnie zaplanowanym rozkładzie dawki. Duża liczba i charakter danych gromadzonych w trakcie leczenia za pomocą tomoterapii przyczyniają się także do poszerzenia wiedzy na temat m.in. regresji nowotworów, a także zmian geometrycznych i objętościowych narządów zdrowych podczas radioterapii. Pozwoli to ustalić rzeczywisty błąd podczas radioterapii i podjąć próbę ustalenia optymalnego PTV dla różnych nowotworów oraz PRV dla narządów zdrowych.

Tomotherapy – new opportunities in modern radiotherapy

Modern radiotherapy focuses on maximizing therapeutic benefits while minimizing treatment-related side effects. Treatment planning and delivery poses a special challenge in difficult clinical cases such as simultaneous irradiation of more than one target, close vicinity of organ at risk or re-irradiation. Modern radiotherapy systems such as tomotherapy combine irradiation and imaging capabilities in one compact device based on a CT platform. Matching MVCT scans performed before every fraction of radiotherapy with basic CT images taken during treatment planning allow one to achieve accurate positioning and very precise treatment delivery, even for very complex treatment plans. Additionally, the unique idea of treatment planning and irradiation makes it possible to obtain an optimal dose distribution in the difficult clinical cases men-

tioned above. Planning and treatment delivery with such high accuracy require constant control of anatomical changes of healthy tissues surrounding the tumour and changes in tumour morphology, as even small alterations may influence the basic dose distribution and make the primary treatment plan unacceptable. The large amount and character of data collected during tomotherapy treatment will also help to get better insight into tumour regression patterns and geometric and volumetric changes of organs at risk. These measurements may have a significant impact on estimation of daily error in radiotherapy as well as setting up optimal PTV for different tumour sites and establishing PRV for healthy organs.

[46]

Paliatywna radioterapia chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc

Marta Rogowska, Marian Reinfuss

Zakład Radioterapii, Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie w Krakowie

[47]

Brachyterapia 3D z zastosowaniem nowych technik obrazowania – wyzwanie dla przyszłości

Janusz Skowronek

Zakład Brachyterapii, Wielkopolskie Centrum Onkologii
w Poznaniu

Dwuwymiarowe planowanie leczenia nowotworów złośliwych oparte na 2 zdjęciach RTG nie umożliwia oceny przestrzennej obszaru planowania (*planning target volume – PTV*) oraz narządów ryzyka (*organs at risk – OARs*). Ponadto, tradycyjna dozymetria dostarcza danych do raportowania dawek na bazie geometrii implantu, a nie objętości targetu (PTV). Planowanie leczenia oraz ocena planu leczenia w nowoczesnej brachyterapii powinny uwzględniać rzeczywiste objętości PTV i OARs.

Wykorzystanie obrazowania trójwymiarowego (3D) w brachyterapii (BRT) różnych nowotworów umożliwi klinicznie istotne podwyższenie dawki w PTV przy skutecznej ochronie zdrowych tkanek. Rozważając obrazowanie oparte na obrazach 3D, uważa się, że badanie rezonansu magnetycznego (RM) ma kilka zalet w porównaniu z innymi metodami. Zalety RM są dwojakie: (1) optymalna ocena położenia aplikatorów wewnątrz targetu oraz (2) optymalna jakość oceny targetu i OARs. Nawigacja za pomocą obrazów RM ułatwiająca założenie aplikatorów może być wykonana przed zabiegiem lub w jego trakcie. Planowanie przedoperacyjne opiera się na integracji obrazów RM oraz danych klinicznych lub obrazów USG/TK. W wielu przypadkach RM może być zastosowany jedynie po

implantacji aplikatorów, co ogranicza możliwość korekty założenia. Wykonanie RM przed zabiegiem aplikacji może ułatwić prawidłowe założenie aplikatorów. Najczęstsze wskazanie do BRT z nawigacją RM śródoperacyjną polega na weryfikacji ułożenia i kierowaniu przy aplikacji.

Obrazowanie przy użyciu USG w brachyterapii jest łatwo dostępne i nie wymaga ochronności radiologicznej, jest tanie i może być stosowane na sali zabiegowej. Otrzymujemy obrazy wysokiej jakości w czasie rzeczywistym w trakcie aplikacji i kontroli położenia aplikatorów. Brachyterapię z nawigacją USG stosuje się przede wszystkim w leczeniu raka gruczołu krokowego oraz narządów ginekologicznych. Ultrasonografia transrektalna (TRUS) w zabiegach BRT raka gruczołu krokowego jest dzisiaj standardem zarówno w technice implantów stałych, jak i HDR. Badanie TRUS dostarcza dokładnych informacji o wielkości i kształcie gruczołu w trzech przekrojach, ułatwia właściwe ułożenie ziaren lub igieł do HDR. Brachyterapia wewnątrzmaciczna wymaga dodatkowo USG przezskórnego w celu oceny jamy macicy.

W nowotworach ginekologicznych BRT konformalna z nawigacją 3D za pomocą RM jest uznawana za najbardziej dokładną metodę obrazowania PTV oraz OARs. Niemniej jednak, z powodu małej dostępności RM te zalecenia są często niewykonalne. W takich przypadkach stosuje się przekroje tomografii komputerowej (TK) (do oceny dawek w OARs, np. odbytnicy, esicy czy pęcherza). Tomografia komputerowa ma jednak pewne ograniczenia w przypadku oceny PTV.

Istnieje niewiele klinicznych doniesień opisujących rutynowe wykorzystanie TK lub RM w planowaniu leczenia nowotworów głowy i szyi (np. jamy ustnej i podstawy języka). Zmiana położenia narządów (guza) podczas implantacji ogranicza możliwe korzyści z przedimplantacyjnego obrazowania, zwłaszcza oceny PTV. Badanie kliniczne (palpacyjne) pozostaje często podstawowym badaniem oceniającym wielkość i położenie targetu w tej grupie. Obrazowanie TK ma istotne znaczenie w przygotowaniu planu leczenia i ocenie rozkładu dawek, np. w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia martwicy żuchwy.

Implantacja aplikatorów pod kontrolą przezodbytniczego USG jest standardem w leczeniu raka gruczołu krokowego. W dozymetrii po implantacji ziaren promieniotwórczych na stałe i BRT czasowej (HDR) wykorzystuje się jednak obrazowanie TK (lub RM). Umożliwia to dokładną ocenę rozkładu dawek.

W brachyterapii raka piersi wykorzystuje się obrazowanie TK po implantacji aplikatorów do łoża guza w celu weryfikacji rozkładu dawki, zwłaszcza w PTV, oceny homogenności i konformalności dawki. To samo dotyczy narządów ryzyka (OARs), np. płuc, skóry, i serca w lokalizacji guza po lewej stronie. Wyniki dozymetrii potwierdzają, że planowanie brachyterapii sterowanej obrazowo poprawia rozkład oraz homogenność dawki w targecie, co przekłada się na lepsze wyniki kliniczne.

Duże nadzieje budzą możliwości zastosowania czynnościowych badań obrazowych w planowaniu terapii. W tym procesie guz jest oceniany metodami fizykalnymi za pomocą najlepszego zestawienia badań (RTG, USG, TK, RM), a następnie metodami biologicznymi za pomocą: *magnetic resonance spectroscopy* (MRS), *positron emis-*

sion tomography (PET), technik radioimmunofluorescencyjnych. Zastosowanie tych technologii powinno umożliwić realizację koncepcji biologicznego obszaru leczonego (*biologic treatment volume*) niezależnie od obecnego anatomicznego (PTV). Prowadzone są badania nad możliwością molekularnego obrazowania guza. Przykładem jest identyfikacja molekuł powierzchniowych i stosowanie ligandów połączonych z ferromagnetyczną cząstką w celu stworzenia biologicznego obrazu RM. Inne techniki bada się pod kątem obrazowania efektów terapii genowej. Szczegółowym przykładem w brachyterapii jest użycie powierzchniowych lub wewnątrzjamowych cewek (*coils*) o wysokiej rozdzielczości w celu poprawienia jakości i rozdzielczości obrazu.

3D image-guided brachytherapy with new imaging methods – a challenge for the future

A two-film typical localization technique does not allow the definition of the three-dimensional (3D) extensions of the planning target volume (PTV) and organs at risk (OARs). Furthermore, using traditional dosimetry systems the dose report is related to the geometry of the implant and not to the target volume. In modern BT both treatment planning and plan evaluation have to be based on real 3D volume of the PTV and OARs.

Use of 3D sectional imaging in brachytherapy (BT) planning of different tumour sites allows for a clinically meaningful dose escalation in the target, while respecting normal tissue tolerance. As far as the method of sectional imaging is concerned, there are some important advantages afforded by MRI compared to other imaging modalities. The rationale behind MRI guidance in BT is twofold: (1) to assure an optimal position of BT catheters within the target volume by controlling their insertion and (2) to assist the process of detection and contouring of the target volume and organs at risk (OAR). MRI guidance of insertion can be accomplished preoperatively or during an intraoperative procedure. The standard preoperative strategy is based on integration of initial MRI findings and clinical and/or ultrasound findings at BT. Planning MRI is in this case most commonly performed only after the procedure, limiting the ability to correct an eventually sub-optimal implantation. Obtaining an additional pre-planning MRI just a few days before the application can facilitate the ability for an accurate insertion. The most common approach to intraoperative MRI guided BT still consists of temporal interruptions of the application procedure to acquire MRI for verification and guidance. An overview of the current approaches in MRI guided BT is presented.

Ultrasound imaging in brachytherapy provides a simple non-ionising modality which is readily available, can be used in the operating theatre and is relatively cheap. It provides high quality real time images for insertion and verification of source or afterloading catheter placement and verification. The main applications of ultrasound in image guided brachytherapy are in prostate implantation and gynaecological brachytherapy. Transrectal ultrasound

(TRUS) guided transperineal implant techniques are now standard and widespread for prostate brachytherapy whether using low dose rate seeds or high dose rate afterloading catheters. TRUS provides accurate information on the size and shape of the prostate gland to be implanted in the volume study and using both transverse and sagittal images accurate placement of seeds or afterloading catheters is achieved. Intrauterine brachytherapy is aided by transabdominal ultrasound to identify the uterine cavity.

In gynaecological tumours image-guided 3D conformal BT planning MRI has been suggested as the most appropriate method for imaging both the PTV and OARs. However, due to the limited availability of MRI equipments in BT departments, there is an existing barrier to the widespread implementation of MRI-guided GYN BT. In such cases postimplant CT images are useful to control and report the dose to OARs (e.g. for rectum, sigmoid, and bladder). However, CT has an obvious limitation for the exact 3D delineation of the PTV.

There is limited clinical evidence supporting the routine use of CT (or MR) image guidance for BT planning of interstitial implants in the H&N region (e.g. oral cavity and base of tongue). Organ (and tumour) motion during implantation limits the possible advantages of preimplant cross-sectional imaging in PTV definition. Thus, clinical examination (palpation) remains the basic element for definition of the target volume for H&N implants. However, CT images are useful to control the dose to OARs for example to avoid radionecrosis of the mandible.

Real-time rectal US guidance has been accepted as a standard technique for prostate BT. However, post-implant CT (and MR) imaging has also been implemented for 3D treatment planning for temporary HDR implants and for the verification of postimplant dose distribution of permanent seed implants.

In breast BT, CT-based PTV definition and implant simulation can be effectively used to obtain improved dose distribution regarding PTV coverage, dose homogeneity and conformality, and dose to OARs (e.g. skin, lung, and heart for left sided tumours). Much better PTV coverage can be achieved with a CT image-based implant technique than with a conventional one. These dosimetric results reinforce that image-guided BT planning for breast implants can be effectively used to improve dose delivery regarding both target coverage and dose homogeneity, which may turn into improved clinical results.

[48]

Indywidualizacja postępowania terapeutycznego w raku stercza o bardzo małym/dużym ryzyku progresji

Piotr Milecki

Oddział Radioterapii Onkologicznej I, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Rak stercza (RS) jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych u mężczyzn w krajach wysoko rozwiniętych. Rozpoznanie oraz leczenie RS podlegają ciągłej ewolucji. Obecnie rozpoznanie RS jest ustalane częściej dzięki oznaczeniu stężenia PSA lub wykryciu odchyłeń w badaniu przezodbytniczym, aniżeli na podstawie obecności objawów klinicznych. Chirurgia i radioterapia są podstawowymi metodami radykalnego leczenia, ale z powodu wykrywania RS w bardzo wczesnym stopniu zaawansowania klinicznego oraz szczególnej naturalnej historii tego nowotworu, inne podejście terapeutyczne do RS, takie jak aktywny nadzór (*watchful waiting* – WW, *active surveillance* – AS) zyskuje coraz większą popularność w praktyce klinicznej. Według najlepszych modeli opisujących naturalną historię RS 23–42% spośród wszystkich raków wykrytych podczas badań skriningowych jest niepotrzebnie leczonych (*overtreatment*). Znacząca liczba pacjentów, u których doszło do *overtreatment*, zwiększa koszty opieki medycznej, narażeni są oni także na wystąpienie powikłań. Główną zaletą AS jest uniknięcie objawów ubocznych związanych z leczeniem chirurgicznym i napromienianiem. Historia naturalna raka stercza pozostaje nadal względnie nieznaną, a wiele aspektów progresji RS niewiadomych. Obecnie żaden z dostępnych modeli prognostycznych nie pozwala na precyzyjne prognozowanie miejscowego niepowodzenia, a tylko niektóre oceniają ryzyko wystąpienia przerzutów czy zgonów z powodu raka. Dlatego poszukiwanie nowych czynników prognostycznych opierających się na biologii molekularnej staje się niezwykle istotnym kierunkiem badań nad RS, który może doprowadzić do ich wdrożenia do praktyki klinicznej po ich walidacji.

Słowa kluczowe: rak stercza, czynniki prognostyczne.

Individualization of therapeutic approach to low/high risk of prostate cancer progression

Prostate cancer (PC) is one of the most common non-cutaneous cancers among males in developed countries. The clinical stage of diagnosed PC and treatment approach to PC continue to evolve. Nowadays one of the main reasons for this is that most patients are diagnosed because of abnormality in PSA level or the digital rectal examination rather than because of symptoms. This situation, according to the best models of PC detection and progression, is associated with a high percent (23–42% of all screen-detected cancers) of over-treatment.

The significant level of over-treatment leads to increase of economic costs of medical care and patient morbidity. Surgery and radiotherapy are the main radical methods of treatment, but because of the particular biology of PC another approach, watchful waiting (WW), also referred to as active surveillance (AS), is becoming more popular. The main advantage of AS is avoiding the side effects of surgery and radiotherapy. However, this strategy is associated with the risk of delaying radical treatment. The natural history of PC even for very low-risk PC patients is still relatively unknown and many aspects related to prediction of clinical progression of disease should be resolved. Prostate cancer is characterized by considerable heterogeneity in its aggressiveness and natural history. To date none of the current models predict risk of local failure and only some predict distant metastases or cancer-related death. Thus, other independent prognostic factors for PC progression based on molecular markers should be developed and validated.

Key words: prostate cancer, prognostic factors, low/high risk of progression.

Sesja 15.

Postępowanie z chorym na raka przewodu pokarmowego

[49]

Strategia leczenia chorych z przerzutami raka jelita grubego do wątroby – rekomendacje eksperta

Marek Wojtukiewicz

Białostockie Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie

[50]

Chirurgiczne leczenie chorych z przerzutami raka jelita grubego do wątroby – rekomendacje eksperta

Paweł Nyckowski

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej Transplantacyjnej i Wątroby, Warszawski Uniwersytet Medyczny

[51]

Rola terapii anty-EGFR w potencjalnie resekcyjnych przerzutach raka jelita grubego do wątroby

Marzena Wetnicka-Jaśkiewicz

Oddział Onkologii Klinicznej i Radioterapii, Klinika Onkologii i Radioterapii, Gdański Uniwersytet Medyczny

[52]

Rola terapii antyangiogennej w potencjalnie resekcyjnych przerzutach raka jelita grubego do wątroby

Andrzej Deptała

Centralny Szpital Kliniczny MSWiA w Warszawie, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Przerzuty do wątroby są najczęstszą manifestacją kliniczną rozsiewu raka jelita grubego (RJG), a więc mogą stanowić główny powód zgonu w przebiegu tej choroby. Współczesna praktyka kliniczna zaleca wykonanie operacji w przypadku przerzutów resekcyjnych i podawanie chemioterapii chorym, u których przerzuty do wątroby są pierwotnie nieresekcyjne. Celem takiego postępowania

jest umożliwienie usunięcia (pierwotna resekcja lub wtórna resekcja po wyindukowaniu za pomocą chemioterapii) wszystkich przerzutów, a zwłaszcza wykonanie resekcji RO, ponieważ takie postępowanie wydłuża życie chorym. W ciągu ostatniego dziesięciolecia odkrycie substancji, których celem stała się ingerencja w angiogenezę nowotworową, znacznie powiększyło możliwości terapii chorych na rozsianego RJG. Dodanie do chemioterapii pierwszej i drugiej linii bewacyzumabu, rekombinowanego, humanizowanego przeciwciała monoklonalnego hamującego szlak przekazywania sygnałów poprzez naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), spowodowało u chorych na rozsianego RJG wydłużenie przeżycia całkowitego (OS) i przeżycia wolnego od progresji (PFS). Zastosowanie bewacyzumabu z chemioterapią (FOLFOX, XELOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI) częściej niż sama chemioterapia powodowało uzyskanie resekcji RO przerzutów z wątroby u chorych na rozsianego RJG, niezależnie od obecności mutacji *K-RAS* i *B-RAF*. Największe perspektywne, badanie bez randomizacji – First BEAT, które objęło 1965 chorych na rozsianego RJG z pierwotnie nieoperacyjną chorobą przerzutową, wykazało, że w podgrupie 102 pacjentów z przerzutami wyłącznie w wątrobie, leczonych wg schematów zawierających bewacyzumab, resekcję RO osiągnięto u 81 osób (79%). Dodatkowym argumentem za stosowaniem bewacyzumabu z chemioterapią w celu indukcji resekcji przerzutów z wątroby jest zmniejszenie częstości występowania i ciężkości uszkodzenia wątroby po oksaliplatynie.

The role of antiangiogenic therapy of potentially resectable liver metastases in metastatic colorectal cancer (mCRC)

Liver metastases are the most prevalent representation of CRC dissemination, and therefore can be the main cause of death in the course of the disease. Current treatment practice recommends surgery for resectable liver metastases and palliative chemotherapy for those patients with initially unresectable disease. The aim of the strategy is to remove surgically (primary resection or secondary resection after induction chemotherapy) all metastases, especially to perform RO resection, because such an approach prolongs survival of the patients. In the last decade, the development of agents that target cancer angiogenesis has greatly expanded treatment options for patients with mCRC. Bevacizumab, a recombinant, humanized monoclonal antibody that inhibits the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway, has improved overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients with mCRC when it is added to first- and second-line chemotherapy regimens. Bevacizumab plus chemotherapy (e.g. FOLFOX, XELOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI) renders initially unresectable metastases resectable in patients with mCRC more frequently than combination chemotherapy alone, irrespective of *K-RAS* and *B-RAF* mutational status. The largest prospective non-randomized trial First BEAT, which included 1965 patients with mCRC with primarily inoperable metastatic disease revealed that in a subgroup of 102 patients with liver

metastases only, treated with bevacizumab-based regimens, R0 resection was achieved in 81 patients (79%). An additional objective for adding bevacizumab to chemotherapy in induction of resectability of liver metastases is to lower the incidence and severity of oxaliplatin-dependent hepatic injury.

[53]

Trastuzumab – nowy lek w terapii zaawansowanego raka żołądka

Piotr J. Wysocki

Zakład Immunologii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

W latach 90. standardowym postępowaniem w zaawansowanym raku żołądka był schemat chemioterapii wielolekowej ELF oparty na kombinacji etopozydu 5-fluorouracylu (5FU) i leukoworyny. Pod koniec lat 90. wykazano, że skojarzenie cisplatyny, epirubicyny i 5FU istotnie wydłuża czas przeżycia chorych i zwiększa odsetek odpowiedzi klinicznych. W ostatniej dekadzie w leczeniu paliatywnym zaawansowanego raka żołądka nawet pomimo wprowadzenia do arsenału substancji czynnych docetakselu nie udało się istotnie poprawić skuteczności terapii systemowych. Rozwój biologii molekularnej i biotechnologii umożliwił jednak zidentyfikowanie kluczowych receptorów i szlaków transdukcji sygnału warunkujących złośliwy fenotyp komórek raka żołądka oraz zaproponowanie strategii leczenia celowanego. Uważa się, że receptor HER2 należący do rodziny receptorów ErbB ulega nadekspresji w około 20% przypadków raka żołądka. W przypadku raka piersi zastosowanie przeciwciała monoklonalnego (trastuzumabu) u chorych z nadekspresją HER2 umożliwiło istotne wydłużenie czasu przeżycia całkowitego zarówno w leczeniu paliatywnym, jak i radykalnym. W 2009 r. wykazano istotną skuteczność trastuzumabu w leczeniu paliatywnym zaawansowanego raka żołądka. W badaniu III fazy (ToGA) oceniano skuteczność trastuzumabu dodanego do chemioterapii (5FU/kapecytabina + cisplatyna). W badaniu tym wykazano, że dodanie trastuzumabu istotnie wydłużyło czas całkowitego przeżycia o 2,4 miesiąca (13,5 vs 11,1 miesiąca, $p = 0,0048$; HR 0,74; 95% CI 0,60–0,91) oraz odsetek obiektywnych odpowiedzi klinicznych – 47,3% w ramieniu H + CHT w porównaniu z 34,5% w ramieniu CHT ($p = 0,0017$). W grudniu 2009 r. trastuzumab uzyskał akceptację EMEA i został zarejestrowany w Unii Europejskiej jako pierwszy lek celowany w raku żołądka.

Sesja 16.

Obecnie stosowane strategie terapii celowanej w praktyce klinicznej

[54]

Leczenie celowane raka nerkowokomórkowego jako postępowanie standardowe i dalszy rozwój

Cezary Szczylik

Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie

[55]

Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju

Jacek Mackiewicz^{1,2}, Andrzej Mackiewicz^{1,2,3}

¹Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytetu Medyczny im. Karola Marcinkowego w Poznaniu

²Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

³BioContract Sp. z o.o.

Istnieją coraz liczniejsze dowody potwierdzające ważną rolę układu odpornościowego w powstawaniu i rozwoju nowotworów. Coraz lepsze zrozumienie molekularnych i komórkowych mechanizmów funkcjonowania układu immunologicznego stworzyło podstawy dla rozwoju wielu innowacyjnych i obiecujących strategii terapeutycznych polegających na modulacji nieswoistej i swoistej immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Największym osiągnięciem immunoterapii nowotworów ostatniego 20-lecia jest opracowanie technologii oraz wprowadzenie szeregu swoistych przeciwciał monoklonalnych do praktyki klinicznej. Pierwszą zarejestrowaną cytokiną do leczenia nowotworów był interferon α , następnie liczne badania kliniczne nad interleukiną 2 doprowadziły do jej rejestracji w leczeniu raku nerki. Prężnie rozwijającą się gałęzią biernej swoistej immunoterapii jest terapia adoptywna, w której wykorzystuje się autologiczne komórki naciekające guzy lub autologiczne limfocyty izolowane z krwi obwodowej. Nieswoiste immunostymulatory i immunomodulatory nie znalazły trwałego miejsca w rutynowej praktyce klinicznej, jednak zawiesina uśmierconych *Mycobacterium vaccae* okazała się skuteczna w badaniu III fazy w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc (gruczolakoraka) w porównaniu z chemioterapią. W licznych badaniach klinicznych analizuje się skuteczność terapeutyczną różnych typów tzw. terapeutycznych szczepionek rakowych, m.in. peptydowych, wirusowych, DNA, szczepionek opartych na białkach szoku cieplnego (HSP) oraz komórkach, w tym gene-

tycznie modyfikowanych komórkach dendrytycznych (DC) czy komórkach guza (GMTV). Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań są nadal niesatysfakcjonujące. Dotąd w Kanadzie i w Rosji zarejestrowano po jednej szczepionce rakowej. Lekiem bliskim zatwierdzenia przez FDA (*Food and Drug Administration*) w USA, oczekiwanego w maju 2010 r. w leczeniu hormonoopornego raka stercza, jest Sipeleucel-T, składający się z autologicznych DC, inkubowanych *ex vivo* z białkiem fuzyjnym składającym się PAP (*prostatic acid phosphatase* – antygen obecny na komórkach gruczołu krokowego) połączonego z GM-CSF.

Bioimmunoterapeutyki, przeznaczone szczególnie dla celów aktywnej immunoterapii nowotworów, stanowią unikalną grupę produktów medycznych. Wykazują one zupełnie inną farmakodynamikę oraz mechanizm działania niż chemioterapeutyki czy tzw. małe cząsteczki (*small molecules*) w niszczeniu komórek nowotworowych. Nadal jednak agencje regulatorowe aprobują tylko standardowe metody oceny efektywności tych preparatów (przeznaczone dla chemioterapeutyków), w tym dobór chorych, planowanie protokołów badań klinicznych, cele (*end points*) czy systemy oceny efektywności terapii. W końcu, podobnie jak w przypadku innych rodzajów terapii nowotworów, konieczna jest personalizacja leczenia z wykorzystaniem biomarkerów, których nadal się poszukuje. Obecnie na świecie toczy się burzliwa dyskusja na temat istotnych zmian w zakresie planowania i realizacji badań klinicznych aktywnej immunoterapii. Bez tych zmian możemy przeoczyć produkty medyczne, które potencjalnie mogą przynieść zysk terapeutyczny chorym.

Immunotherapy of cancer and perspectives of its development

There is increasing evidence supporting the important role of the immune system in growth and progression of cancer. A better understanding of molecular and cellular mechanisms governing the immune system formed the basis for development of a number of innovative and promising cancer therapies modulating non-specific and specific anti-cancer immune responses. In the last 20 years the most impressive achievement in tumour immunotherapy has been the development of technology for production of various specific monoclonal antibodies for human use and their approval for clinical practice.

Interferon- α was the first approved cytokine for the treatment of cancer. Subsequently many clinical trials evaluating interleukin-2 led to its approval for treatment of kidney cancer. Adoptive immunotherapy is a dynamically developing field of passive specific immunotherapy, where autologous tumour infiltrating or autologous peripheral blood lymphocytes are used. Non-specific immunostimulators and immunomodulators have not found wide approval in routine clinical practice; however, a suspension of heat-killed *Mycobacterium vaccae* seemed to be effective in a phase III study in the treatment of non-small cell lung cancer (adenocarcinoma), when compared to chemotherapy. In a number of clinical trials the efficacy of various types of so-called therapeutic cancer vaccines

have been tested. They included peptide vaccines, viruses, DNA, heat-shock protein vaccine and cellular vaccines including genetically modified dendritic cells (DC) or tumour cells (GMTV). So far only in Canada and Russia have cancer vaccines been registered. A drug which is near FDA (*Food & Drug Administration*) approval in the USA, expected in May 2010, is Sipuleucel-T, which consists of autologous DC, incubated *ex vivo* with a fusion protein consisting of PAP (prostatic acid phosphate) conjugated with GM-CSF.

Bioimmunotherapeutics particularly designated for active specific cancer immunotherapy form a unique group of medicinal products of advanced technology. They display completely different pharmacodynamics and mode of action than chemotherapeutic agents or so-called small molecules in destruction of cancer cells. However, regulatory authorities approve only methods adopted from clinical trials of chemical agents for assessment of the effectiveness of these drugs, including design of clinical trials, patient selection, end points and assessment of tumour clinical responses. Finally, similarly to other cancer treatment strategies, personalization of specific active immunotherapy with employment of new biomarkers is necessary. Currently an intensive discussion is in process regarding the needs of immunotherapy clinical trial design and execution modification. Without these changes we may overlook medicinal products which could bring a therapeutic benefit for patients.

[56]

Indywidualizacja leczenia w czerniakach skóry

Zbigniew I. Nowecki

Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich i Kości, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

[57]

Leczenie ukierunkowane mięsaków

Piotr Rutkowski, Zbigniew I. Nowecki

Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich i Kości, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Pierwotne złośliwe nowotwory tkanek miękkich i kości, czyli mięsaki, to heterogenna grupa rzadkich, złośliwych nowotworów pochodzenia mezenchymalnego. W każdym przypadku chorego na mięsaka obowiązuje zasada wielospecjalistycznego zaplanowania leczenia z uwzględnieniem ewentualnego leczenia uzupełniającego (przed- lub pooperacyjnego napromienianiem i/lub chemioterapią), co stanowi o konieczności leczenia chorych w wyspecjalizowanych ośrodkach przez zespoły diagnostyczno-

-terapeutyczne, których minimalny skład stanowią: patolog, radiolog, chirurg onkolog, radioterapeuta, onkolog kliniczny i rehabilitant. Największy obecnie postęp w leczeniu systemowym mięsaków wiąże się z pracami nad tzw. leczeniem celowanym molekularnie, czyli opracowaniem nowych leków nakierowanych na specyficzne uszkodzone w komórkach mięsaków szlaki przemian molekularnych, które w świetle badań stanowią podstawowe etiopatogenetyczne przyczyny powstawania i progresji danego nowotworu. Ten sposób terapii jest szczególnie istotny w przypadku mięsaków, gdyż – jak obecnie wiadomo – poszczególne typy mięsaków są związane z występowaniem specyficznych zaburzeń molekularnych, część z nich dotyczy specyficznych dla danych typów nowotworów translokacji chromosomalnych [np. EWSR1-FL11; t(11;22)(q24;q12) w mięsaku Ewinga czy t(X;18) w *sarcoma synoviale*; choć czynniki transkrypcyjne stanowią z reguły słabe cele terapeutyczne, z wyjątkiem – dotychczas – genu fuzyjnego *COL1A1-PDGFB* w *dermatofibrosarcoma protuberans* (DFSP) powodującego nadekspresję PDGF, co z kolei stanowi cel działania imatynibu o wysokiej skuteczności w warunkach klinicznych] czy mutacji prowadzących do aktywacji specyficznych receptorów czynników wzrostu (np. *KIT* w nowotworach podścieliskowych przewodu pokarmowego – GIST) lub też mutacji w obrębie szlaków sygnałowych. Najbardziej znanym przykładem jest zastosowanie imatynibu, będącego inhibitorem BCR-ABL, *KIT* i PDGFR, w leczeniu zaawansowanych GIST. Obecnie metanosulfonian imatynibu jest zarejestrowany do leczenia dwóch mięsaków tkanek miękkich: nieoperacyjnego i/lub rozlanego GIST oraz nieoperacyjnego/rozlanego DFSP. Liczne badania kliniczne określiły jego dużą i długotrwałą skuteczność terapeutyczną; co więcej, dla tego pierwszego, skutecznego w leczeniu nowotworów litych inhibitora kinaz tyrozynowych, potwierdzono zależność między obecnością specyficznych zaburzeń molekularnych a odpowiedzią na leczenie i doбором dawki. U chorych na GIST z obecnością mutacji w eksonie 11 genu *KIT* (stanowiących ok. 70% przypadków) odsetek odpowiedzi na leczenie imatynibem wynosi około 85%, a w przypadkach nowotworów związanych z obecnością innych zaburzeń molekularnych imatynib jest mniej skuteczny (z kolei w przypadku obecności mutacji w eksonie 9 *KIT* dawka imatynibu powinna być podwojona do 800 mg dziennie). Sugerowana jest również potencjalna aktywność imatynibu w leczeniu *fibromatosis aggressiva*, *pigmented villonodular synovitis/tenosynovial giant cell tumour* (PVNS/TGCT, gdzie występuje gen fuzyjny *COL6A3-CSF1*), struniaków (*chordoma*). W przypadku GIST opornych na imatynib wprowadzono już również do leczenia lek drugiego rzutu – sunitynib, który jest multiinhibitorem kinaz tyrozynowych, działającym m.in. na kinazy tyrozynowe receptora *KIT*, PDGFR, naczyniowoskróbnikowego czynnika wzrostu (VRGFR) i FLT3. Dostępne dane wskazują na możliwość uzyskania długotrwałych odpowiedzi u ok. 40% chorych na GIST opornych na imatynib, zwłaszcza w obecności mutacji w eksonie 9 lub przy braku mutacji w genie *KIT*. Obecnie w badaniach klinicznych znajduje się kilka leków, których skuteczność jest testowana w przypadkach GIST opornych na leczenie imatynibem/sunitynibem, m.in.: AMN 107 – nilotinib, AMG706,

RAD001, PKC412, PTK787, sorafenib, dasatynib. GIST jako model terapii celowanej molekularnie w nowotworach litych pozwolił na określenie, że ten rodzaj leczenia cechuje odmienna ocena odpowiedzi i przewlekłe stosowanie, a sam efekt terapeutyczny może wynikać nie ze zmniejszenia guza nowotworowego, ale zahamowania jego progresji.

Trwają zaawansowane prace nad wprowadzeniem nowych leków celowanych molekularnie również w innych typach mięsaków. Najistotniejsze jest określenie potencjalnego celu molekularnego w danym podtypie mięsaka, który ma znaczenie biologiczne. Najbardziej zaawansowane prace dotyczą substancji o działaniu antyangiogennym (np. bewacyzumabu, sunitynibu, sorafenibu w mięsaku Kaposiego czy *hemangioendothelioma/angiosarcoma* czy *alveolar soft-part sarcoma*), trabectedyny w *myxoid/round-cell liposarcoma*, leków nakierowanych na szlak PI3K/AKT, MET (np. w *alveolar soft part sarcoma* czy *clear cell sarcoma*), Mek, *mdm2/CDK*, kinazę Raf (np. sorafenib), inhibitorów mTOR (np. szczególnie w mięśniakomięsaku prążkowanokomórkowym lub PEC-oma), inhibitorów receptora 1 insulinopodnego czynnika wzrostu (IGFR1R; w szczególności w mięsaku Ewinga i mięśniakomięsaku prążkowanokomórkowym), przeciwciał anty-RANKL (denosumab w guzie olbrzymiokomórkowym kości) inhibitorów wielokinazowych, inhibitorów metaloproteinaz macierzy komórkowej (MMP), leków działających na szlak apoptozy, na białko szoku termicznego 70 lub 90 (hsp70; hsp90) czy inhibitorów deacetylazy histonowej.

Targeted therapy of sarcomas

Primary malignant tumours of soft tissues and bone (sarcomas) constitute a rare heterogeneous group of mesenchymal neoplasms. Multidisciplinary therapy in centres with high expertise is the crucial point in sarcomas' management. A recent development in sarcoma treatment is introducing molecular targeted therapy. It is well known that several sarcoma types are characterized by specific molecular abnormalities [such as chromosomal aberrations in Ewing's sarcoma – (11;22)(q24;q12); or synovial sarcoma – t(X;18)], and although transcriptional factors are weak therapeutic targets we have a fine example of dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) characterized by the presence of fusion gene *COL1A1-PDGFB*, where dramatic clinical activity of imatinib targeting PDGF was confirmed. The most striking example of targeted therapy of sarcomas is activity of imatinib mesylate (targeting BCR-ABL, KIT and PDGFR) in inoperable and/or metastatic GIST (gastrointestinal stromal tumour). Imatinib is currently approved for therapy of 2 soft tissue sarcomas: advanced GIST and DFSP. Several clinical trials have been conducted that confirmed high efficacy of imatinib in the treatment of GIST for the majority of patients with inoperable/metastatic disease. The association between mutational status and the response to imatinib is well documented – tumours containing the most common exon 11 *KIT* mutation have the highest response rate (>80%). Moreover, the response of patients with GIST with

exon 9 *KIT* is dependent on the dose of the drug and these patients have been identified as needing higher dosages of imatinib (800 mg/d). The activity of imatinib has also been observed in treatment of aggressive fibromatosis, pigmented villonodular synovitis/tenosynovial giant cell tumour (PVNS/TGCT, with presence of fusion gene *COL6A3-CSF1*) and chordoma. In the case of GIST resistant to imatinib, second line therapy with sunitinib malate is registered. Sunitinib malate is an oral multi-targeted tyrosine kinase inhibitor of KIT and PDGFRs, as well as vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs), FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3), colony-stimulating factor 1 receptor (CSF-1R), and glial cell-line-derived neurotrophic factor receptor (REarranged during Transfection; RET). Sunitinib has demonstrated clinical activity with durable responses/stabilizations in approximately 40% of imatinib-resistant GIST cases (especially in exon 9 *KIT* mutants or wild-type GISTs). If sunitinib therapy fails, clinical trials with novel agents (e.g. AMN107 - nilotinib, AMG706, RAD001, PKC412, sorafenib, dasatinib) are ongoing.

There are also investigations on molecular targeted therapy in other sarcoma subtypes, e.g.: antiangiogenic therapy (bevacizumab, sunitinib, sorafenib in Kaposi sarcoma, haemangioendothelioma/angiosarcoma and alveolar soft-part sarcoma), trabectedin in myxoid/round-cell liposarcoma, agents targeting PI3K/AKT, MET (e.g. in alveolar soft part sarcoma or clear cell sarcoma), Mek, *mdm2/CDK*, RAF kinase pathways, mTOR inhibitors (especially in rhabdomyosarcoma or PEComa), insulin-like growth factor receptor 1 inhibitors (IGFR1R; especially in Ewing's sarcoma and rhabdomyosarcoma), anti-RANKL antibodies (denosumab in giant-cell tumour of bone), multi-kinase inhibitors, metalloproteinase inhibitors (MMP), proapoptotic drugs, heat shock protein inhibitors and histone deacetylase inhibitors.

[58]

Terapie celowane w leczeniu raka wątrobowokomórkowego

Piotr J. Wysocki

Zakład Immunologii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma* – HCC) to piąty w kolejności najczęściej występujący nowotwór złośliwy na świecie, stanowiący trzecią przyczynę zgonów z powodu nowotworów. Jest oporny na działanie standardowych terapii systemowych, a rokowanie dla chorych na HCC jest złe. Identyfikacja szlaków transdukcji sygnału odpowiedzialnych za wzrost i progresję HCC, takich jak RAS/RAF/MEK/ERK, czy też PI3K/AKT/mTOR wyznaczyła cele molekularne, których zahamowanie przez nowoczesne terapie może poprawić rezultaty leczenia. W 2007 r. w oparciu o wyniki badania klinicznego III fazy, sorafenib został zarejestrowany do

leczenia chorych na zaawansowanego HCC. Inne leki molekularnie ukierunkowane: przeciwciała monoklonalne (bewacizumab, cetuksymab), inhibitory kinazy tyrozynowej (sunitinib, erlotinib, briwanib) i inhibitory kinazy serynowo-treoninowej (temsirolimus, ewerolimus) zostały przebadane w badaniach klinicznych II fazy u chorych na HCC. Obecnie trwają badania III fazy oceniające skuteczność tych preparatów. Celem niniejszego artykułu jest przegląd mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za rozwój i progresję HCC, a także roli i skuteczności nowych terapii celowanych w leczeniu tego nowotworu.

[59]

Hormonoterapia w raku piersi z nadekspresją HER2

Piotr Potemski

[60]

Powikłania sercowo-naczyniowe po terapii celowanej w onkologii

Sebastian Szmit

I Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie

Patomechanizm uszkodzenia serca i naczyń podczas terapii celowanej nie jest w pełni zdefiniowany, ale można określić czynniki ryzyka takich zdarzeń. Problemem jest również jednoznaczna definicja rozpoznania tzw. kardiotoxyczności. Nadal kryteria kardiologiczne różnią się od algorytmów onkologicznych postępowania w powikłaniach sercowo-naczyniowych u chorych na nowotwory.

Terapia anti-HER2 może prowadzić do rozwoju niewydolności serca, ale stopień dysfunkcji skurczowej/rozkurczowej serca oraz pojawianie się objawów klinicznych cechują się bardzo dużą różnorodnością i wydają się całkowicie niezależne od dawki leków anti-HER2. Czy można dysfunkcję serca zależną od terapii anti-HER2 traktować jako ogłuszenie bądź zamrożenie mięśnia sercowego? Jaką terapię kardiologiczną stosować? Jaki jest rzeczywisty stopień odwracalności tego zdarzenia? Podczas wykładu będzie prezentowane stanowisko ekspertów kardiologicznych towarzystw naukowych dotyczących rozpoznawania i leczenia niewydolności serca indukowanej anti-HER. Omówiona zostanie kwestia przerywania terapii anti-HER2 z przyczyn kardiologicznych.

Leczenie inhibitorami szlaku VEGF-VEGFR wiąże się z ryzykiem wystąpienia takich powikłań, jak nadciśnienie tętnicze, białkomocz, epizody zakrzepowo-zatorowe oraz niewydolność serca. Omówiona zostanie kwestia postępowania w nadciśnieniu tętniczym indukowanym terapią anti-VEGF oraz inhibitorami kinaz tyrozynowych. Które leki hipotensyjne powinny być stosowane i dlaczego, a które są przeciwwskazane? Do jakich wartości ciśnienia

powinniśmy dążyć, aby dalsza terapia inhibitorami angiogenezy była bezpieczna. Przybliżona będzie problematyka bezpieczeństwa kardiologicznego terapii anti-mTOR.

Hormonalne leczenie raka piersi oraz raka stercza jest również obarczone pewnym ryzykiem wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych. Wykład będzie próbą odpowiedzi, czy są one rzeczywistym problemem w praktyce onkologa.

Wykład będzie również próbą podsumowania, jaką rolę powinny odgrywać w onkologii takie badania, jak EKG, echokardiografia, scyntygrafia serca, koronarografia, oraz markery biochemiczne (troponiny, BNP/NTproBNP).

Cardiovascular complications induced by targeted therapy in oncology

Pathophysiology of cardiovascular damage induced by targeted therapy is not fully defined, but we can identify the specific risk factors for such events. The problem is the lack of so clear definition of diagnosis of cardiotoxicity in oncology. Cardiac criteria still differ from the oncologic algorithms of cardiovascular complications in patients with cancer.

Anti-HER2 therapies may lead to the development of heart failure, but the degree of systolic/diastolic dysfunction and the appearance of clinical symptoms are characterized by very high diversity and seem to be completely independent of the dose of anti-HER2. Heart failure related to anti-HER2 therapy don't seem to be analogous to stunning or hibernation and don't recovers without specific cardiac treatment. Which cardiac therapy to use? What is the actual degree of reversibility of this event? Opinions of Experts of international cardiology societies will be presented: how to recognize and treat heart failure induced by anti-HER2 therapy. The question of interrupting anti-HER2 therapy due to cardiac events will be discussed.

The management with inhibitors of VEGF-VEGFR pathway is associated with real risk of cardiovascular complications such as hypertension, proteinuria, thromboembolic events and heart failure. The discussion will be focused on the problem of hypertension-induced by anti-VEGF antibody or tyrosine kinase inhibitors. Which anti-hypertensive drugs should be used and which are contraindicated? Which blood pressure level is safe for patients treated with angiogenesis inhibitor. Cardiac safety of anti-mTOR therapy will be presented.

Hormonal treatment of breast cancer and prostate cancer also involve the risk of cardiovascular events. The lecture will attempt to answer whether they are a real problem in the daily practice of oncology.

The presentation will try to summarize the role in oncology for ECG, echocardiography, cardiac scintigraphy, angiography, and biochemical markers (troponin, BNP / NTproBNP).

Sesja 17.

Francusko-polski wspólny projekt w dziedzinie badań nad rakiem

[61]

Translational *in vivo* imaging strategies to boost therapy innovation in cancer research

Alain Le Pape

INSERM U618, Medical University, Tours-France
Centre for Small Animal Imaging, CNRS, CIPA-TAAM,
UPS n 44, Orléans, France

Together with the increasing availability of transgenic mice models for a variety of tumours and cell lines expressing bioluminescence or fluorescence reporter genes, non-invasive *in vivo* imaging modalities prove to be extremely valuable tools for biomedical research, discovery and development of new therapy strategies in oncology.

Among these, biophotonic and nuclear imaging are likely the most powerful resources to quantitatively assess gene expression, specific functions, *in vivo* molecular targeting, efficacy and actual delivery of a labelled drug to the target. This process can be extended to document the structure/activity relationship for any therapy including drugs, radiation, microwaves, plasmas etc...

Bioluminescence is based on the non-invasive detection of photons emitted by luciferase expressing cells in the living animal. This modality is a unique tool for experimental oncology and is routinely used for a variety of tumour cells to achieve screening or efficacy assessment of new treatments. In addition to tumour burden determination with the usual luciferin, specific pro-substrates sensitive to *in vivo* processing by caspases allows convenient and early quantitative imaging of apoptosis even for deep foci.

Near-infrared fluorescence with a variety of fusion proteins for gene expression imaging and fluorochromes for labelling molecules or cells is quite operational for 2D imaging but still under development to achieve reliable quantitative 3D functional or molecular explorations with great perspectives for enzymatically activatable probes such as MMPs and cathepsins. Examples of applications on orthotopically implanted or disseminated tumours will be presented as well as short-term perspectives for *in situ* examinations in humans by fibroscopy and per-operative imaging.

Nuclear imaging with Scintigraphy and Positron Emission Tomography is a clinical molecular imaging modality with satisfactory sensitivity and quantization, even for deep sites thanks to its 3D capabilities. It offers the most reliable strategy to determine the pharmacokinetic profile of drugs, to assess the *in situ* expression of a given receptor or to explore specific biomarkers such as apoptosis, angiogenesis and hypoxia. The availability of a variety of radiotracers with complementary chemistry and

half-lives makes these nuclear modalities of great value for translational research on peptides and monoclonal antibody based therapies.

Due to recent technological improvements, 3 other major modalities from medical imaging, MRI, CT X and Echography, are now of use to explore mice models with the same accuracy as the corresponding examinations in humans.

Depending on the problematics, all these technologies can be combined as multimodality explorations with superimposition of images to provide complementary information such as anatomical location or physiological, biochemical or molecular process at a given time of examination. Some recent significant contributions of *in vivo* imaging to the development of an inhaled vaccine against papillomavirus, a loco-regional chemotherapy for lung cancer or pharmacodynamic-pharmacokinetic explorations in anti-CD20 MAb treatment of lymphoma will be presented to illustrate how translational *in vivo* imaging can be used as a strategy to boost therapy innovation in cancer research according to the 3B concept: from Bench to Bedside and Back.

[62]

Microenvironmental control of the reactive oxygen species (ROS) level in leukaemic cells

O. Herault

Faculty of Medicine and University Hospital of Tours, France

Genes and pathways that determine the self-renewal of leukaemic stem cells remain poorly characterized. With the laboratory of Molecular Genetics of Hematopoietic Stem Cells of the Institute for Research in Immunology and Cancer of Montreal (Guy Sauvageau), we described a series of Hoxa9+Meis1 overexpressing acute leukaemias which display a wide range of leukaemic stem cell (L-HSC) frequencies, from ~1 in 50 to ~1 in 1.4. Expression profiling revealed that the reactive oxygen species scavenging enzyme GPX3 is amongst the few differently expressed genes detected between these leukaemias. Consistent with this observation, Gpx3 is hypomethylated in high frequency leukaemia and hypermethylated in low frequency ones. L-HSC engineered to express decreased Gpx3 levels are much less competitive *in vivo* than control cells, however, they are not altered in their survival, differentiation capacity or ability to home to the bone marrow suggesting that this enzyme may regulate the process of self-renewal itself. Interestingly, a good inverse correlation was observed between the frequency of leukaemic stem cells and the level of reactive oxygen species and p38 MAPK activation, all these studies suggesting that the GPX3/ROS/p38 MAPK axis is a potent regulator of self-renewal of leukaemic stem cells. L-HSC located in the bone marrow interact with a specific microenvironment referred to as the leukaemic niche. Data derived from *ex vivo* cocul-

ture systems using mesenchymal stromal cells (MSCs) as a feeder cell layer suggest that cell-to-cell contact has a significant impact on hematopoietic stem cells expansion, migratory potential and stemness. Therefore, we investigated the effects of MSCs on the GPX3/ROS/p38 MAPK axis in leukaemic cells using an in vitro co-culture system. Human leukaemic cells (KG1a) adhering to the surface of human primary bone marrow MSCs presented an overexpression of GPX3 and a concomitant decrease in ROS level and p38 MAPK activation. Altogether, these results suggest that the GPX3/ROS/p38 MAPK axis in leukaemic cells is under microenvironmental control.

[63]

Mechanism of anti-melanoma action of lumican

Yanusz Wegrowski

UMR CNRS 6237, Medical Faculty, URCA, Rims, France

In its vertical growth, metastatic melanoma crosses the dermo-epidermal basement membrane and starts to grow in the extracellular matrix environment, which is normally inaccessible to melanocytes. Matrix and its degraded products, the matrikines, influence the transformed cells to inhibit tumour progression, a phenomenon called 'stromal reaction'. Small proteoglycans containing leucine-rich repeats (SLRP), including decorin and lumican, are ubiquitous components of extracellular matrices. There is a body of epidemiological information suggesting that they may control tumour progression. We previously showed that lumican inhibits the subcutaneous growth of experimental melanoma and melanoma metastasis. Presently, we have elucidated the mechanism of its action. Lumican inhibits cell migration and increases cell adhesion to the substratum. Melanoma cells expressing lumican formed smaller metastatic nodules in the lungs, less vascularised, and showed apoptosis induction. The migration inhibition of melanoma cells is mediated by integrins among which $\alpha 2\beta 1$ is the most important. The inhibition is accompanied by a rearrangement of actin network and a decrease of 125FAK phosphorylation. The anti-migratory properties of lumican are conserved in leucine-rich repeat 9 fragment lumcorin. This matrikine is as efficient as the whole molecule. Lumcorin may constitute a non-immunological pharmacological approach for inhibition of melanoma progression and metastasis.

[64]

Studies on the molecular mechanisms of rituximab-mediated cytotoxicity in non-Hodgkin lymphoma cells

Jakub Gołęb

Medical University of Warsaw

[65]

TP53 as a confounding factor in biomarker discovery

Jolanta Kupryjańczyk

Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute of Oncology, Warsaw

[66]

Molecular prognostic and predictive factors in lung cancer

Jacek Jassem, Rafał Dziadziuszko, Marcin Skrzypski

Medical University of Gdansk

[67]

Repair of lipid peroxidation induced DNA damage: new proteins and therapeutic targets

Barbara Tudek

Institute of Biochemistry and Biophysics, PAS, Warsaw

[68]

Combining high throughput experimental methods to elucidate molecular aspects of cancer development

Michał Mikula

Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute of Oncology, Warsaw

Sesje plakatowe

Sesja 1.

Plakatowa

[1]

Wpływ zróżnicowania raka i stężenia PSA na dokładność diagnostyki dynamicznego badania rezonansu magnetycznego w ocenie zaawansowania raka stercza

Ewelina Błaszczuk¹, Piotr Błaszczuk²,
Gabriela Karczewska², Krzysztof Roszkowski²

¹Zakład Radiologii, Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

²Oddział Radioterapii II, Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

Wstęp: Rezonans magnetyczny (MR) z dynamiczną aplikacją środków kontrastowych jest badaniem diagnostycznym umożliwiającym dokładne określenie stopnia zaawansowania raka gruczołu krokowego. Dokładność tej metody wg różnych źródeł wynosi od 60 do ponad 90%. Prezentowana praca analizuje wpływ zróżnicowania raka ocenianego wg skali Gleasona oraz wartości stężenia swoistego antygenu sterczowego (PSA) w surowicy na dokładność wyników badania dynamicznego MR gruczołu krokowego w zakresie diagnostyki przekraczania torebki stercza i naciekania pęcherzyków nasiennych.

Materiał i metody: Materiał obejmuje 64 chorych na raka stercza przed kwalifikacją do leczenia operacyjnego. Z badania wyłączone chorych, u których badanie MR wykonano po radioterapii lub w trakcie hormonoterapii raka stercza. Badania MR przeprowadzono od stycznia 2006 r. do końca grudnia 2009 r. włącznie. Do badania włączono 64 chorych w wieku 49–87 lat (mediana 67 lat).

Badania prowadzono aparatem firmy Siemens, typ Symphony o indukcji 1,5 T. Wykorzystano cewki powierzchniowe stosowane podczas obrazowania narządów miednicy. Nie analizowano badań z użyciem cewki doodbytniczej. Obszar objęty badaniem z kontrastem był ograniczony do gruczołu krokowego, pęcherzyków nasiennych i narządów sąsiadujących. Badanie MR zostało wykonane przed kwalifikacją do leczenia operacyjnego. Wyniki badania MR zweryfikowano na podstawie badania histopatologicznego wykonanego po radykalnej prostatektomii.

Wyniki: Stopień zróżnicowania raka stercza oceniano na podstawie wyników opisu obrazu mikroskopowego preparatów pochodzących z badania histopatologicznego preparatów gruczołu krokowego, uzyskanych po operacyjnym wycięciu stercza. W grupie chorych, u których badanie dynamiczne nie wykazało ognisk raka w gruczole krokowym lub pokazało niższy niż rzeczywisty obraz zaawansowania nowotworu, stopień zróżnicowania raka wynosił od 4 do 6. Stopień złośliwości raka, określony w skali Gleasona, nie miał istotnego wpływu na zgodność wyników badania dynamicznego z rozpoznaniem histopatologicznym. W grupie chorych, u których maksymalne stężenie PSA w surowicy było mniejsze od 10 nmol/l,

wyniki błędnie oceniające zaawansowanie raka gruczołu krokowego uzyskano u 26,3% chorych, a wśród chorych z maksymalnym stężeniem PSA większym od 10 nmol/l różnice pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym i badaniem dynamicznym dotyczyły jedynie 6,3% badanych. Dokładność badania dynamicznego w identyfikacji zajęcia torebki stercza wynosiła dla chorych o stężeniu PSA w surowicy 10 ng/ml lub mniej 83,7%, a dla stężenia PSA większego od 10 ng/ml 94,4% ($p = 0,04$). Dla dokładności badania MR w ocenie nacieku pęcherzyków nasiennych nie wykazano istotnej zależności od stężenia PSA.

Wnioski: Dynamiczne badanie MR pozwala na dokładną ocenę stopnia zaawansowania raka stercza. Stopień złośliwości raka oceniany w skali Gleasona pozostaje bez wpływu na dokładność diagnostyki stopnia zaawansowania raka stercza w badaniach MR. Rozpoznanie przekraczania torebki stercza w badaniu MR jest bardziej precyzyjne u chorych z dużym stężeniem PSA.

Impact of the differentiation of cancer and concentration of PSA on the accuracy of dynamic MR in the diagnosis of prostate cancer staging

Background: Magnetic resonance (MR) with the dynamic application of contrast is a diagnostic test that is able to determine the precise stage of prostate cancer. The accuracy of the method according to various sources ranges from 60% to over 90%. The presented work examines the impact of the degree of differentiation of cancer in Gleason grading and concentration of prostate specific antigen (PSA) in serum on the accuracy of the results of the dynamic MR test of the prostate in the diagnosis of prostate extra-capsular extension and seminal vesicles infiltration.

Material and methods: The material included 64 patients with prostate cancer prior to qualification for surgical treatment. The study excluded patients in whom MR examination was performed after radiotherapy or during hormonal therapy of prostate cancer. MR examination was conducted from January 2006 to the end of December 2009. The study included patients aged from 49 to 87 years (median 67 years).

The study was conducted using a scanner (Siemens Symphony) of induction 1.5 T. We used surface coils during pelvic imaging. No studies were analysed using a rectal coil. The examination area with contrast media was limited to the prostate, seminal vesicles and adjacent organs. MR imaging results were verified on the basis of histopathological examination performed after radical prostatectomy.

Results: Degree of diversity of prostate cancer was evaluated on the basis of the description of the microscopic image from the preparation of the histopathological examination of the prostate, obtained after operative resection of the prostate. In the group of patients with a dynamic test that showed no outbreaks of cancer in the prostate gland or showed less than a true picture of tumour progress, degree of differentiation of cancer ranged

from 4 to 6. Grade of malignancy of cancer, in Gleason grading, had no significant effect on the compliance of dynamic test results with the histopathological diagnosis. In the group of patients whose maximum serum PSA was less than 10 nmol/l, results incorrectly assessing advanced prostate cancer were achieved in 26.3% of patients, and among patients with a maximum concentration of PSA above 10 nmol/l, a difference between histopathological diagnosis and the dynamic test concerned only 6.3% of patients. The accuracy of the dynamic test in the identification of infiltration of the prostate capsule for patients with serum PSA concentrations of 10 ng/ml or less was 83.7% and for PSA above 10 ng/ml was 94.4% ($p = 0.04$). For the accuracy of MR examination of seminal vesicles there was not found a statistically significant dependence on PSA level.

Conclusions: Dynamic MR test allows for accurate assessment of the progress of prostate cancer. The degree of malignancy of cancer in Gleason grading does not affect the accuracy of the diagnosis of prostate cancer stage in the clinical MR test. Concentrations of PSA above 10 nmol/ml suggest a major possibility of identification of infiltration of the extra-capsular extension in dynamic MR imaging.

[2]

Duże stężenie TGF- β w surowicy związane jest z większym ryzykiem wystąpienia anemii w trakcie choroby nowotworowej

Dawid Lipski, Ewa Leporowska, Andrzej Mackiewicz, Dariusz W. Kowalczyk

Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów,
Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu
Katedra Biotechnologii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Wstęp: Anemia jest często występującym powikłaniem choroby nowotworowej, dotyczącym ok. 50% chorych. Może ona być następstwem obecności nowotworu (tzw. anemia towarzysząca nowotworom) i/lub rozwijać się pod wpływem stosowanych metod terapeutycznych. Jednym z czynników silnie hamujących erytropoezę jest TGF- β , który produkowany jest przez wszystkie komórki nowotworowe.

Cel pracy: Analiza zależności między stężeniem TGF- β w surowicy a ryzykiem wystąpienia anemii w trakcie choroby nowotworowej.

Materiał i metody: Badaniem objęto 43 chorych w momencie rozpoznania choroby nowotworowej. Stężenie hemoglobiny oceniono, używając analizatora hematologicznego Cell Dyn 3700 (Abbott), a stężenie TGF- β w surowicy metodą ELISA (R & D Systems). Wartości referencyjne hemoglobiny: M: 7–10,20 mmol/l; K: 7,45–9,30 mmol/l. W zależności od stężenia TGF- β chorych podzielono na trzy grupy, po czym w każdej z grup oceniono częstość występowania anemii (zob. tabela).

Grupa	TGF- β 1 [pg/ml]	Chorzy z anemią	Średnie stężenie Hb u chorych z anemią [mmol/l]
A $n = 10$	42,270–65,100	60% $n = 6$	5,85 (4,79–7,26)
B $n = 23$	24,060–41,400	35% $n = 8$	6,98 (6,14–7,57)
C $n = 10$	14,250–23,790	20% $n = 2$	7,01 (6,95–7,07)

Wniosek: Chorzy z dużym stężeniem TGF- β są obarczeni większym ryzykiem pojawienia się anemii. Co więcej, poziom anemii skorelowany jest ze stężeniem TGF- β w surowicy.

High TGF- β level in serum correlates with increased risk of anemia during neoplastic disease

Background: Anaemia is a serious problem in cancer patients. It is very important to find mechanisms underlying it and new potential strategies to overcome it. We show that elevated concentrations of TGF- β 1 correlate with the occurrence of anaemia. TGF- β inhibition could help cure the anaemia, if the causative nature (not only the correlation) of TGF- β 1 was proved. As many researchers hold that TGF- β inhibition can be advantageous to the treatment of cancer, antagonists of TGF- β can potentially help fight the cancer and anaemia together.

Material and methods: 43 patients with a variety of cancers were investigated. Blood samples were collected from the patients before any treatment. Haemoglobin concentration in blood was assessed by the haematological analyser Cell Dyn 3700 (Abbott, USA). Reference values of haemoglobin were for males 7.60-10.20 mmol/l, females 7.45-9.30 mmol/l. TGF- β 1 concentration in blood serum was analysed using Human TGF- β 1 ELISA Kit (R & D Systems, USA).

Results: Patients were subdivided into three groups depending on the TGF- β 1 concentration. Thresholds were 42,000 pg/ml and 24,000 pg/ml. The percentage of patients with anaemia in each group was established and mean value of Hb concentration was calculated. Results are shown in the table below.

Group	TGF- β 1 [pg/ml]	Patients with anemia	Mean Hb value in patients with anemia [mmol/l]
A $n = 10$	42.270-65.100	60% $n = 6$	5.85 (4.79-7.26)
B $n = 23$	24.060-41.400	35% $n = 8$	6.98 (6.14-7.57)
C $n = 10$	14.250-23.790	20% $n = 2$	7.01 (6.95-7.07)

Conclusion: Cancer patients with elevated TGF- β 1 concentrations show higher risk of developing anaemia. Furthermore, the degree of anaemia is correlated with the level of TGF- β 1 in serum.

[3]

Rola poszerzonego badania histologicznego w ocenie wznowy miejscowej nowotworów dna jamy ustnej i języka

**Bartosz Szybiak¹, Magdalena Kordylewska²,
Jakub Pazdrowski², Piotr Pieńkowski², Anna Wegner²,
Wojciech Golusiński²**

¹Oddział Chirurgii Głowy i Szyi i Onkologii Laryngologicznej, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

²Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wstęp: Spośród nowotworów jamy ustnej nowotwory języka stanowią 40%. Zachorowalność na nowotwory złośliwe języka i dna jamy ustnej wzrasta i wg *National Cancer Institute* w 2006 r. wyniosła odpowiednio dla języka 2,9 i dla dna jamy ustnej 0,5 na 100 tys. Wśród mężczyzn raki języka występują częściej (4,2 na 100 tys.) niż wśród kobiet (1,7 na 100 tys.). Związane jest to ze stylem życia, nadużywaniem alkoholu i tytoniu oraz infekcją HPV.

Cel pracy: Odpowiedź na pytanie, dlaczego pomimo radykalności leczenia chirurgicznego skojarzonego z leczeniem radiochemioterapeutycznym w tak dużym odsetku przypadków występują wznowy miejscowe raka języka i dna jamy ustnej.

Materiał i metody: Badaniem objęto grupę 56 chorych na raka języka i dna jamy ustnej leczonych chirurgicznie na Oddziale Chirurgii Głowy i Szyi i Onkologii Laryngologicznej Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu w latach 2007–2009. W określeniu stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu posłużono się, obok badania przedmiotowego, badaniem obrazowym: USG przezskórnym i endooralnym, tomografią komputerową oraz rezonansem magnetycznym. U 9 chorych, u których wystąpiła wznowa miejscowa, wykonano poszerzone badanie histologiczne, na podstawie materiału pooperacyjnego zgromadzonego w Zakładzie Patologii Wielkopolskiego Centrum Onkologii w postaci bloczków parafinowych oraz preparatów rutynowo barwionych (H + E). Histologicznie preparaty oceniano na podstawie wytycznych konsensusu patologów brytyjskich. Zwracano uwagę głównie na naciekanie naczyń, nerwów i mięśni.

Wyniki: W grupie 9 chorych, u których wystąpiła wznowa miejscowa, przeważali mężczyźni (78%). W 5 przypadkach rozpoznano raka płaskonabonkowego rogowaciejącego G2, a w 3 G3. Raka płaskonabonkowego nierogowaciejącego G3 stwierdzono natomiast w 1 przypadku. U 5 chorych (56%) w guzach pierwotnych zaznaczała się histologiczna agresywność wyrażona naciekaniami naczyń, nerwów i mięśni. W 2 przypadkach (22%) rak naciekał zarówno naczynia, jak i nerwy i mięśnie, a w 2 przypadkach (22%) tylko jedną z ocenianych struktur. Klasyfikację TNM zastosowano zarówno w celu oceny zaawansowania zmiany pierwotnej, jak i wznowy. Stopień zaawansowania nowotworowego guza pierwotnego w 7 przypadkach oceniano jako T2. Patologiczne powiększenie węzłów chłonnych towarzyszące zmianie pierwotnej stwierdzono u 8 pacjentów. Badanie histologiczne potwierdziło przerzuty do węzłów chłonnych szyi w 5 przypadkach (N1 w 3, a N2 w 2 przypadkach). Stopień

zaawansowania nowotworowego wznowy guza – rT4 stwierdzono w 6 przypadkach. Tak wysokie zaawansowanie wznowy miejscowej w przypadku niektórych pacjentów wynikało z braku regularnych wizyt kontrolnych. W 7 przypadkach wznowie miejscowej towarzyszyły zmienione przerzutowo węzły chłonne na szyi. Zaawansowanie N1 odnotowano w 1, N2 w 2, N3 w 1, a Nx w 3 przypadkach. Przerzuty do narządów odległych (płuca, kości) współistniejące z wznową miejscową wystąpiły w 2 przypadkach. Średni czas, po jakim obserwowano wznowę miejscową, wyniósł 8 miesięcy (od 2 do 14 miesięcy). W badaniu histologicznym wznowy miejscowej stwierdzono raka płaskonabonkowego rogowaciejącego G2 w 3, a G3 w 1 przypadku. Raka płaskonabonkowego nierogowaciejącego G3 odnotowano natomiast w 2 przypadkach. U 2 chorych ze względu na skąpy materiał biopsyjny ustalono rozpoznanie histologiczne: rak płaskonabonkowy, a w 1 przypadku rozpoznano raka płaskonabonkowego G1.

Wnioski: Dynamika rozwoju choroby nowotworowej w znacznej mierze zależy od cech histologicznych. Szczegółowe badanie histologiczne, uwzględniające ocenę naciekania nerwów, naczyń i mięśni, pozwala na ocenę ryzyka wystąpienia wznowy miejscowej, co może mieć decydujący wpływ na wybór leczenia uzupełniającego.

[4]

Weryfikacja przydatności oceny ekspresji genów HPN i MTA do prognozowania odpowiedzi na radioterapię

**Ewa Matusecka¹, Michał Jarząb²,
Małgorzata Kowalska³, Anna Fiszer-Kierzkowska¹,
Marzena Gawkowska-Suwińska⁴,
Justyna Rembak-Szynkiewicz⁵,
Barbara Bobek-Billewicz⁵, Barbara Jarząb³,
Bogusław Maciejewski¹**

¹Zakład Radioterapii, Centrum Onkologii

– Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

²Klinika Onkologii Klinicznej i Doświadczalnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

³Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

⁴II Klinika Radioterapii, Centrum Onkologii

– Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

⁵Zakład Radiodiagnostyki, Centrum Onkologii

– Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Wstęp: Badane białka związane są z przerzutowaniem i progresją nowotworu. U chorych operowanych z powodu raka gruczołu krokowego ekspresja tych genów wiąże się z niekorzystnym rokowaniem, nie ma natomiast weryfikacji ich znaczenia w radioterapii.

Cel pracy: Ocena ekspresji na poziomie RNA i białka genów *HPN* i *MTA* i ich znaczenia w leczeniu promieniami.

Materiał i metody: Ekspresję genów kodujących hepsynę oraz białko *MTA* (ilościowy PCR) oraz białka *HPN*

i MTA (immunohistochemia) oceniono w materiale biopsyjnym. Biopiat został pobrany w czasie rutynowo wykonywanej biopsji diagnostycznej. Analizie poddano 32 biopiaty pochodzące od pacjentów, u których nie zdiagnozowano raka, oraz 33 biopiaty pochodzące od chorych, u których rozpoznano raka.

Wyniki: Ekspresja genu kodującego hepsynę była statystycznie ($p < 0,001$) niższa w łagodnym przerzucie prostaty niż w raku. Immunohistochemicznie oceniane białko hepsyna wykazywało lokalizację jądrową i cytoplazmatyczną o takim samym nasileniu w komórkach gruczolowych i w komórkach podstawnych cewek. Pozytywna reakcja immunohistochemiczna nie występowała nigdy w komórkach podścieliska. Ekspresja genu MTA nie różniła się statystycznie ($p = 0,06$) w obu grupach. Białko MTA wykazywało lokalizację jądrową. Reakcja immunohistochemiczna występowała wyłącznie w komórkach gruczolowych cewek i w komórkach podścieliska, nigdy zaś w komórkach podstawnych. Ekspresja badanych genów nie była związana z odpowiedzią na leczenie promieniami.

Wnioski: Jakkolwiek ekspresja genu HPN różniła się statystycznie między grupą z łagodnym przerostem gruczołu a grupą z nowotworem złośliwym, to jej ekspresja nie jest czynnikiem predykcyjnym w grupie chorych leczonych promieniami.

Background: HPN and MTA are proteins connected with metastasis and disease progression. Expression of HPN and MTA proteins is a known unfavourable predictive factor for radical prostatectomy treated patients. There is no verification of their utility for radiotherapy treatment.

Aim of the study: Our goal was HPN and MTA expression testing (RNA and protein level) and assessment of their predictive utility for radiotherapy treatment.

Material and methods: Expression of HPN and MTA was assessed by quantitative PCR and immunohistochemistry in biopsy material. A biopsy specimen was taken during routine diagnostic biopsy. Thirty-two benign and 33 cancerous specimens were analysed.

Results: Gene expression coding for hepsin was statistically lower ($p < 0,001$) in benign than cancerous specimens. By immunohistochemistry hepsin was localized in cell nuclei and cytoplasm. An immunohistochemical reaction, with the same intensity, was visualized in acinar and basal cells, but never in stroma. There was no difference in MTA gene expression between groups ($p = 0,06$). MTA protein was localized in cell nuclei of acinar and stromal cells. An immunohistochemical reaction was never observed in basal cells. Expression of analysed genes/proteins was not connected with radiotherapy treatment.

Conclusions: Although HPN gene expression was statistically higher in the malignant group it seems that its expression is not a predictive factor in the group of radiotherapy patients.

[5]

Ekspresja genu *TopBP1* w sporadycznym i rodzinnym raku piersi

Ewa Forma¹, Magdalena Bryś¹, Magdalena Bernaciak¹, Hanna Romanowicz-Makowska², Wanda M. Krajewska¹

¹Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

²Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Wstęp: Białko *TopBP1* uczestniczy m.in. w naprawie DNA i regulacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego. W czasie uszkodzenia DNA białko *TopBP1*, oddziałując z czynnikiem transkrypcyjnym E2F1, hamuje jego aktywność transkrypcyjną, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania przejścia komórki w fazę S oraz procesu apoptozy. W strukturze białka *TopBP1* wyróżnia się 8 domen BRCT zidentyfikowanych w strukturze białka BRCA1. Ponadto, białko *TopBP1* wykazuje liczne funkcjonalne podobieństwa z białkiem BRCA1 i sugeruje się jego udział w rodzinnym raku piersi. Zaburzenia ekspresji genu *TopBP1* mogą prowadzić do niestabilności genetycznej i rozwoju nowotworu.

Cel pracy: Analiza ekspresji genu *TopBP1* na poziomie mRNA w sporadycznym i rodzinnym raku piersi.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły preparaty 64 sporadycznych i 94 rodzinnych raków piersi, otrzymanych z Zakładu Patomorfologii Klinicznej Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Po resekcji preparaty utrwalano w formalinie i zatapiano w parafinie. Całkowity RNA izolowano z bloczków parafinowanych przy użyciu TRI Reagentu wg wskazań producenta. cDNA syntetyzowano w reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem oligo(dT) jako starterów. Ilościową oceną ekspresji *TopBP1* i *GAPDH* jako genu referencyjnego prowadzono techniką *real-time* PCR przy użyciu komercyjnie dostępnych sond TaqMan.

Wyniki: Ekspresja *TopBP1* na poziomie mRNA w średnio i słabo zróżnicowanych histologicznie sporadycznych i rodzinnych rakach piersi okazała się być niższa niż w preparatach o wysokim stopniu zróżnicowania ($p < 0,01$). Poziom mRNA dla *TopBP1* był znacząco niższy w preparatach sporadycznych raków piersi pochodzących od pacjentek, u których wykryto obecności przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych, w porównaniu z pozostałymi ($p < 0,01$). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu *TopBP1* w zależności od statusu receptorów estrogenowych i progesteronowych sporadycznych i rodzinnych raków piersi.

Wniosek: Otrzymane wyniki sugerują, że zmniejszony poziom ekspresji genu *TopBP1* wydaje się związany z progresją zarówno sporadycznego, jak i rodzinnego raka piersi.

Expression of *TopBP1* gene in sporadic and hereditary breast cancer

Background: *TopBP1* is involved in DNA repair and regulation of cell cycle checkpoints. *TopBP1* interacts with E2F1

during DNA damage and can lead to repression of multiple activities of E2F1, including transcriptional activity, induction of S phase entry, and apoptosis. TopBP1 possesses eight BRCT, a motif which was first described in BRCA1 protein. Furthermore, TopBP1 displays functional similarities with BRCA1 and may play an important role in susceptibility to breast cancer. Aberrant expression of *TopBP1* may lead to genetic instability and cancer development.

Aim of the study: In this study we analysed expression of *TopBP1* mRNA in sporadic and hereditary breast cancers.

Material and methods: The study group was comprised of 64 samples of sporadic breast cancer and 94 samples of hereditary breast cancer. Samples were obtained from the Department of Clinical Pathomorphology, Polish Mother's Memorial Hospital, Lodz, Poland. After resection tissue samples were fixed in formalin and embedded in paraffin blocks. Total RNA from the block was isolated using TRI Reagent according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized in reverse transcription reaction with oligo(dT)-adaptor primer. Quantitative evaluation of *TopBP1* and *GAPDH* as reference in real-time PCR was performed with commercially available TaqMan probes.

Results: Expression of *TopBP1* mRNA level in moderately and poorly differentiated sporadic and hereditary breast cancer appeared to be lower than in the case of well differentiated tumours ($p < 0.01$). *TopBP1* mRNA level was significantly lower in sporadic breast cancer from patients with metastasis in auxiliary lymph nodes compared to remaining cancer samples ($p < 0.01$). There were no statistically significant differences in the mRNA level of the examined *TopBP1* gene in the context of oestrogen and progesterone receptor status of sporadic and hereditary breast cancers.

Conclusion: The obtained results suggest that a decreased level of *TopBP1* mRNA expression seems to be associated with breast cancer progression both in sporadic and hereditary cases.

opracowaniu nowych metod terapeutycznych. Wcześniej-
sze badania autorów wykazały, że – podobnie jak szereg
guzów różnego pochodzenia – nowotwory kobiecych narzą-
dów płciowych charakteryzuje zdolność syntezy wolnej
podjednostki α ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej –
CGB. Obserwowanej ekspresji genu *CGB* w rakach i rozro-
stach endometrium z atypią towarzyszyła aktywność genu
czynnika uwalniającego gonadoliberyny typu I (*GNRH1*).

Cel pracy: Analiza obecności CTC we krwi pacjentów z
nowotworami na podstawie ekspresji genów *CGB* i *GNRH1*.

Materiał i metody: W badaniach wykorzystano RNA izo-
lowany z krwi 58 pacjentów z nowotworami. Grupę kontro-
lną stanowił RNA uzyskany z krwi 35 zdrowych wolontariu-
szy. Ekspresję analizowanych genów badano na drodze
amplifikacji z zastosowaniem matrycy cDNA oraz genuwo
specyficznych starterów metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Wyniki: Aktywny gen *CGB* znaleziono we krwi 18 z 58 pa-
cjentów z nowotworami. Podwyższony, względem grupy
kontrolnej, poziom ekspresji *GNRH1* stwierdzono u 10 z 28
badanych.

Wnioski: Analiza ekspresji genów *CGB* i *GNRH1* tech-
niką RT-PCR w czasie rzeczywistym pozwala na wykrycie
komórek rakowych we krwi pacjentów z nowotworami.

*Badania sfinansowano z grantu MNiSW nr: NN 407 109
533.*

CGB and GNRH1 as markers of circulating tumor cells in cancer patients

Background: Circulating tumour cells (CTC) are an
important element in development of metastasis. The detec-
tion of CTC in peripheral blood of cancer patients is used
in risk assessment, tailoring of treatment, monitoring of
response and development of novel therapeutic agents.
Our previous study showed that gynaecological cancer,
like various tumours of different origin, secreted human
chorionic gonadotropin beta subunit. This study shows
that in case of endometrial cancer and atypical hyper-
plasia the presence of CGB correlated with expression of
gonadotropin-releasing hormone GNRH1.

Aim of the study was to detect CTC using qRT-PCR
assay for *CGB* and *GNRH1* gene expression.

Material and methods: RNA isolated from 58 samples
of peripheral blood of cancer patients and from 35 healthy
donors was used for cDNA synthesis followed by real time
amplification of analysed genes.

Results: The expression of *CGB* was demonstrated in
blood of 18 out of 58 cancer patients. The activity of
GNRH1 in 10 out of 28 patients was found to be higher
than in the control group.

Conclusions: The expression of *CGB* and *GNRH1*
analysed by quantitative RT-PCR can be used as a method
to identify CTC in peripheral blood of cancer patients.

*The research was supported by MNiSW grant: NN
407 109 533.*

[6]

CGB i GNRH1 jako markery komórek raka krążących we krwi pacjentów z nowotworami

Anna Jankowska¹, Anna Szczerba¹,
Mirosław Andrusiewicz¹, Krystyna Adamska²,
Ewa Nowak-Markwitz³, Jerzy B. Warchoł¹

¹Katedra i Zakład Biologii Komórki, Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Oddział Radioterapii, Wielkopolskie Centrum Onkologii
w Poznaniu

³Klinika Onkologii Ginekologicznej, Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: Uważa się, że obecność komórek raka krążących we krwi (CTC) jest istotnym wyznacznikiem rozsi-
ewu nowotworu z ogniska pierwotnego. Stwierdzenie ich
obecności ma istotne znaczenie prognostyczne zarówno
w ocenie dynamiki rozwoju nowotworu, wyboru odpo-
wiedniej terapii, monitorowaniu okresu remisji choroby
w trakcie i po zakończonym leczeniu, jak i ewentualnym

[7]

Ocena wybranych parametrów charakteryzujących mikrokrążenie przy użyciu rezonansu magnetycznego

Mieczysława Jurczyk

Katedra Zdrowia Matki i Dziecka, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: Ilościowe określenie stanu obwodowej sieci naczyniowej tkanek i narządów jest metodą często stosowaną w diagnostyce histoonkologicznej, jako niezależny czynnik rokowniczy o coraz bardziej ustalonej wartości diagnostycznej. Angiogeneza określa zjawisko rozrostu sieci naczyń krwionośnych obserwowane m.in. w tkankach nowotworów złośliwych. Dotyczy ono najmniejszych naczyń krwionośnych o średnicach rzędu kilkunastu do kilkuset μm . Wewnątrz ich światła naczynia te są wystlane komórkami nabłonkowymi, których rozrost uważa się za wykładnik morfologiczny angiogenezy. Badania te opisano w licznych doniesieniach. Trójwymiarowa struktura sieci mikrokrążenia w nowotworach złośliwych wskazuje, że jest ona w dużej części niewydolna z reologicznego punktu widzenia. Prawidłowa funkcja naczyń mikrokrążenia zapewnia wymianę dyfuzyjną gazów i metabolitów między krwią a wodną przestrzenią pozanaczyniową oraz sprawną regulację hormonalną i termiczną. Mikrokrążenie jest miejscem najwcześniejszej manifestacji schorzeń układu sercowo-naczyniowego, szczególnie tych z procesem zapalnym.

Cel pracy: Wyznaczenie niektórych parametrów opisujących właściwości reologiczne krwi i osocza badanych pacjentów za pomocą techniki rejestracji widma rezonansu magnetycznego.

Materiał i metody: Badano zmiany mikrolepkości krwi przy użyciu techniki rejestracji widma wysokiej zdolności rozdzielczej dla 31-P NMR oraz techniki EPR ze znacznikiem spinowym TEMPO. Oceniano procesy dyfuzji zachodzące przez błonę komórkową badanego erytrocytu.

Wyniki: Analiza widma wysokiej zdolności rozdzielczej 31-P NMR oraz widma EPR pozwala na uzyskanie wyników określających koncentrację hemoglobiny w komórce, ocenę pH oraz procesów dyfuzyjnych zachodzących przez błonę komórkową. Osmotycznie indukowane nietrwałe zmiany objętości były mierzone przy użyciu znacznika spinowego TEMPO.

Wnioski: Okazuje się, że u chorych na anemię dochodzi do zaburzeń odkształcalności erytrocytów, co jest przyczyną zwiększonej lepkości. Również komórki śródbłonna przyczyniają się do pomniejszenia lepkości krwi przez wytwarzanie tlenu azotu i prostacykliny, zapobiegając agregacji płytek krwi.

Evaluation of selected parameters of microcirculation by magnetic resonance

Background: Angiogenesis is a physiological process involving the growth of new blood vessels, although it is

a fundamental state in the transition of tumours from a dormant state to a malignant one. It relates to the smallest circulatory vessels with a diameter in μm . The inside of those vessels is covered by epithelial cells, which are considered as a morphological indicator of angiogenesis. Three-dimensional structure of the microcirculatory network in malignant tumours shows that it is in major part rheologically insufficient. Proper function of the microcirculatory vessels enables the diffusion exchange of gas and metabolites between blood and aqueous extracellular space and sufficient hormonal and thermal regulation. Microcirculation is the place of the earliest manifestation of diseases of the cardiovascular system, in particular those with an inflammatory process.

Aim of the study was to evaluate certain parameters describing the rheological blood and plasma properties by the technique of registration of the magnetic resonance spectrum.

Material and methods: Changes in microviscosity were examined by the technique of registration of the high-resolution magnetic resonance spectrum of 31-P NMR and EPR technique with spin label TEMPO. Moreover the diffusion process through the cellular membrane of the erythrocyte was observed.

Results: The analysis of the high-resolution spectra of 31-P NMR and EPR enabled us to obtain results describing the concentration of haemoglobin in the cell, and to evaluate the pH and the diffusion process occurring through the membrane. Osmotically induced, unstable volumetric changes were measured using spin label TEMPO.

Conclusions: In patients with anaemia, we observe a disorder in the deflection of erythrocytes, which results in higher viscosity. The endothelial cells also contribute to the reduction of blood viscosity through the production of nitrogen oxides and prostaglandins, which prevent the aggregation of platelets.

[8]

Przydatność kliniczna oznaczania urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA) u kobiet chorych na raka piersi

Anna Thielemann, Zygmunt Kopczyński,
Aldona Korzeniewska, Aleksandra Baszczuk,
Sylwia Grodecka-Gazdecka

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: System aktywacji plazminogenu odgrywa ważną rolę w procesie przerzutowania. Aktywatory plazminogenu uwolnione z komórek nowotworowych katalizują proteolityczną konwersję nieaktywnego plazminogenu do aktywnej plazminy. Plazmina wywołuje degradację białek błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej, co ułatwia inwazję komórek rakowych do otaczających tkanek i narządów.

Cel pracy: Ocena aktywności urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA) w surowicy kobiet chorych na

raka gruczołu piersiowego. W ocenie tej uwzględniono takie czynniki rokownicze, jak: wiek badanych kobiet, zaawansowanie kliniczne choroby, stopień złośliwości histologicznej, stan węzłów chłonnych pachowych oraz wielkość guza pierwotnego.

Materiał i metody: Badaniem objęto 103 chore na pierwotnego raka gruczołu piersiowego, leczone na Oddziale Chirurgii Onkologicznej Katedry Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Grupę kontrolną stanowiły surowice 40 zdrowych kobiet w przedziale wiekowym 24–75 lat (średnia wieku 47 lat). Oznaczania aktywności urokinazowego aktywatora plazminogenu dokonano w surowicy przy użyciu zestawu uPA Activity Assay Kit firmy CHEMICON.

Wyniki: Wyniki badań wykazały istotnie wyższe wartości aktywności uPA u kobiet chorych na raka gruczołu piersiowego w porównaniu z wartościami w grupie kontrolnej. Wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego choroby wzrastała istotnie aktywność uPA. Znamiennej wyższą aktywność urokinazowego aktywatora plazminogenu obserwowano także w grupie kobiet chorych na raka piersi z przerzutami i bez przerzutów do węzłów chłonnych. Wyniki badań wykazały różnicę statystycznie istotną pomiędzy aktywnością uPA w grupie kobiet o wielkości guza 20–50 mm, a z wielkością powyżej 50 mm.

Wnioski: Uzyskane wyniki badań wskazują na przydatność oznaczania aktywatora plazminogenu typu urokinazowego w ocenie stanu klinicznego u kobiet chorych na raka piersi. Niezbędne są dalsze badania w celu określenia związku systemu aktywacji plazminogenu w procesie powstawania przerzutów nowotworowych oraz określenia klinicznych korzyści wynikających z oceny aktywności innych jego składników.

The clinical value of assessment of urokinase plasminogen activator (uPA) in female breast cancer patients

Background: The plasminogen activation system plays an important role in metastasis. Plasminogen activators released from cancer cells catalyze the proteolytic conversion of the inactive plasminogen to the active plasmin. The plasmin causes the degradation of proteins in basement membranes and extracellular matrix and thus facilitates cancer cell invasion of the surrounding tissue.

The aim of the study was the determination of urokinase plasminogen activator (uPA) in serum of women with primary breast cancer. The following prognostic factors were taken into account for the evaluation: age of examined women, stage of clinical progression of disease, status of axillary lymph nodes and size of tumour.

Material and methods: 103 women, suffering from primary breast cancer and surgically not treated, aged from 29 to 89 years (average age 56), took part in this research. These women have been placed and treated in the Oncological Surgery Department, Poznań University of Medical Sciences. Forty healthy women aged from 27 to 75 (average age 47) formed a control group. Detection of activity of urokinase plasminogen activator has been con-

ducted in serum by the colorimetric method and using the uPA Activity Assay Kit purchased from CHEMICON company.

Results: The results of the study suggested that the activity of urokinase plasminogen activator in serum of women with breast cancer was significantly higher than that in serum of the control group. The higher stage of disease clinical progression was in patients in whom higher values of uPA activity were observed. What is more, higher uPA activity was noted in the group suffering from breast cancer with metastases to the lymph nodes than in the group of women without metastases. The analysis of the outcomes proves a statistical difference between uPA activity in women suffering from breast cancer with primary tumour of a diameter from 20 to 50 mm and above 50 mm.

Conclusions: The obtained results indicate that the detection of activity of uPA plays a significant role in evaluation of clinical state of disease.

[9]

Liczba naczyń limfatycznych w guzie u kobiet chorych na raka szyjki macicy

Marta Biedka^{1,2}, Roman Makarewicz¹, Andrzej Marszałek³, Jan Sir⁴

¹Katedra i Klinka Onkologii i Brachyterapii, *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Oddział Radioterapii 1, Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

³Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

⁴Prywatna praktyka lekarska

Wstęp: Angiogeneza to proces tworzenia się nowych naczyń na bazie już istniejących kapilar. Ma ona decydujący wpływ na wzrost guza, progresję oraz powstawanie przerzutów odległych. Rola limfoangiogenezy nie została do końca poznana, angiogeneza i limfoangiogeneza prawdopodobnie odgrywają inną rolę w rozwoju choroby nowotworowej i progresji. Rak szyjki macicy jest jednym z najczęstszych nowotworów wśród kobiet. Udowodnionymi czynnikami prognostycznymi są stopień zaawansowania, stan regionalnych węzłów chłonnych, typ histologiczny nowotworu i stężenie hemoglobiny. Do tej pory mało wiadomo o wartości prognostycznej i/lub predykcyjnej procesów limfoangiogenezy w raku szyjki macicy.

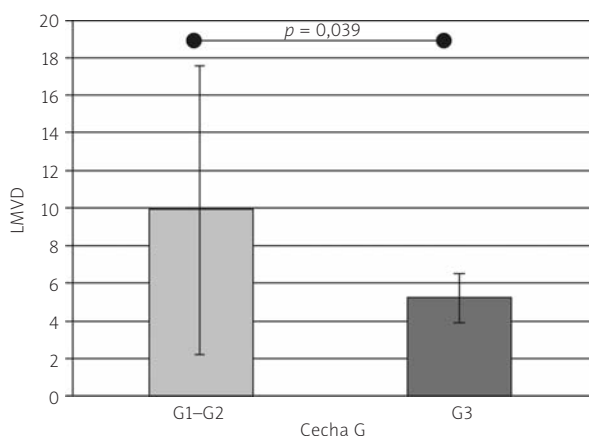
Cel badania: Celem tego prospektywnego badania była ocena liczby naczyń limfatycznych (LMVD) w raku szyjki macicy i ocena korelacji z innymi czynnikami kliniczno-patologicznymi.

Materiał i metody: Materiał do badania stanowił wycinek histopatologiczny pobrany podczas pierwszego zabiegu brachyterapii od 34 kobiet z rakiem szyjki macicy w stopniu zaawansowania choroby I–IV wg FIGO. Wszystkie kobiety były pacjentkami Katedry i Kliniki Onkologii i Brachyterapii *Collegium Medicum* w Bydgoszczy UMK w Toru-

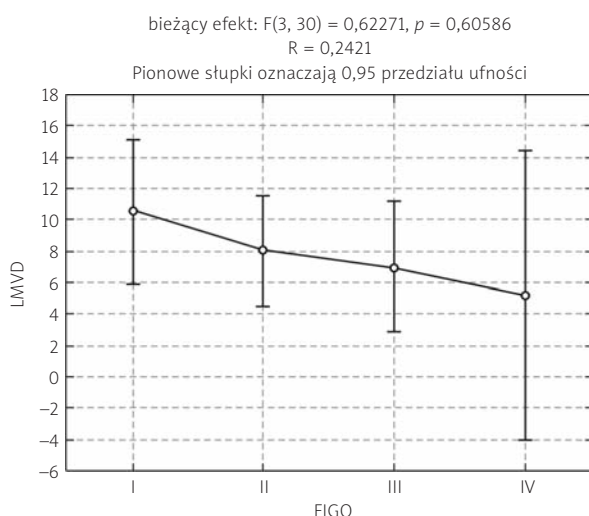
niu. Oznaczanie naczyń limfatycznych (LMVD) wykonano za pomocą metod immunohistochemicznych, stosując przeciwciała skierowane przeciwko podoplaninie. Oznaczanie odbywało się zgodnie z zaleceniami Weidnera. W mikroskopie świetlnym pod małym powiększeniem poszukiwano obszarów o dużej gęstości naczyń limfatycznych zwanych *hot spots*, następnie pod dużym powiększeniem zliczano naczynia limfatyczne w 3 obszarach *hot spots*.

Analiza statystyczna: Wszystkie dane oceniono za pomocą programu do analizy statystycznej (Statistica 6.0). Wyniki istotne statystycznie uznawano dla $P < 0,05$.

Wyniki: Odnotowano większą liczbę naczyń limfatycznych (LMVD) w guzie u pacjentek ze stopniem zróżnicowania nowotworu G1, G2 w porównaniu z pacjentkami z cechą G3, gdzie liczba naczyń była niższa $p = 0,0398$ (ryc. 1). Ponadto, nie stwierdzono statystycznie istotnej korelacji pomiędzy liczbą naczyń limfatycznych a innymi czynnikami kliniczno-patologicznymi, takimi jak wielkość guza, status węzłów chłonnych, stężenie hemoglobiny czy wiek (ryc. 2). Nie wykazano, aby liczba naczyń limfatycznych miała wartość predykcyjną, w wieloczynnikowej analizie Coksa tylko stopień zaawansowania wg FIGO był niezależnym czynnikiem prognostycznym u chorych na raka szyjki macicy.



Ryc. 1. Porównanie liczby naczyń limfatycznych (LMVD) w grupie chorych ze stopniem zróżnicowania nowotworu G1, G2 vs stopniem zróżnicowania nowotworu G3



Ryc. 2. Liczba naczyń limfatycznych (LMVD) w zależności od stopnia zaawansowania choroby wg FIGO u chorych z rakiem szyjki macicy

Wnioski: Liczba naczyń krwionośnych w guzie może odgrywać ważną rolę we wzroście guza i progresji raka szyjki macicy. Należy jednak przeprowadzić badania na dużych grupach celem ustalenia potencjalnej wartości predykcyjnej i lub prognostycznej limfatycznych naczyń w guzie.

Lymphatic vessel density (LMVD) in tumour in patients with cervical cancer

Background: Angiogenesis, which is the formation of a new blood vessel from the existing vascular network, is essential for tumour growth, progression and metastasis. However, the role of lymphangiogenesis is not fully understood, and angiogenesis and lymphangiogenesis probably can play different roles in cancer development and progression. It is tempting to suggest that cervical cancer is one of the most common malignancies in a woman's life. Its prognostic factors are: tumour stage, lymph node status, histological type, and level of haemoglobin. However, little is known about the prognostic and/or predictive significance of lymphangiogenesis in cervical cancer.

The aim of the study was to evaluate the potential use of lymphatic vessel density as a predictive and/or prognostic factor in patients with cervical cancer.

Material and methods: Material for analysis comprised histopathological samples taken during the first brachytherapy from 34 patients affected by FIGO I-IV stage cervical cancer, who were admitted to the Department of Oncology and Brachytherapy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University. All patients in stage I-IIa underwent preoperative brachytherapy and radical hysterectomy. All other patients received primary irradiation. The samples were examined by immunohistochemical studies with podoplanin antibody. Counting of lymphatic vessel density was performed according to Weidner's standards. Immunostained sections were scanned by light microscopy at low magnification and area of tissue with the highest number of lymphatic vessels were selected as hot spots. Lymphatic vessel density (LMVD) was determined by counting, using a high magnification, in 3 different hot spots.

Statistical analysis: All data were assessed with the statistical analysis program Statistica. Differences were considered significant at a P value of less than 0.05.

Results: We found significantly higher lymphatic vessel density in patients with G1 or G2 grade of differentiation than in those with G3 ($p = 0.0398$). There were no significant associations between lymphatic vessel density (LMVD) and other clinicopathological characteristics including: tumour stage, lymph node status, haemoglobin level or age. We did not find a statistically significant association between LMVD and response to treatment. Multivariate Cox regression showed that only FIGO stage is an independent prognostic factor for patients with cervical cancer.

Conclusions: In conclusion, our study suggested that lymphatic vessel density (LMVD) may play an important role in tumour growth and progression in cervical cancer. Nonetheless, further studies with large cohorts would be necessary to explore the underlying mechanism and to define the role of LMVD as a predictive and/or prognostic factor.

[10]

Lekooporność wybranych szczepów *Enterobacteriaceae* spp. izolowanych od chorych hospitalizowanych i ambulatoryjnych z bakteriurią znaną

Zefiryn Cybulski

Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wstęp: Pateczki okrężnicy oraz Gram-ujemne pateczki z rodziny *Enterobacteriaceae* spp. określane jako bakterie typu *coli* są głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń dróg moczowych (ZUM), występujących zarówno jako zakażenia szpitalne, jak i u chorych leczonych ambulatoryjnie.

Cel pracy: Prześledzenie lekooporności pateczek typu *coli* na antybiotyki doustne stosowane w leczeniu ZUM w południowo-wschodniej Jutlandii (Dania) oraz aktualizacja rekomendacji antybiotykoterapii.

Materiał i metody: Badania retrospektywne były prowadzone od 1.01.2000 r. do 31.12.2008 r. Analizowano drobnoustroje wyhodowane z moczu z bakteriurią 10^4 cfu/ml lub wyższą. Izolowane bakterie diagnozowano na podstawie standardowych metod biochemicznych. Lekooporność 16 048 szczepów pateczek typu *coli* badano metodą dyfuzyjno-krążkową. Do badania użyto krążków z następującymi środkami przeciwbakteryjnymi: ampicyliną, cefuroksymem, ciprofloksacyną, mecillinamem, trimetoprimem i sulfonamidem. Badania dotyczyły jednego (pierwszego) szczepu izolowanego od chorego w danym roku. Przeprowadzono analizę statystyczną lekooporności wyhodowanych pateczek.

Wyniki: Wykazano wzrost oporności na ampicylinę i ciprofloksacynę zarówno *E. coli*, jak i innych pateczek typu *coli* w latach 2000–2008. W 2008 r. 1,8% pateczek okrężnicy i 21,4% innych pateczek typu *coli* wykazywało oporność na cefuroksym, podczas gdy 33,5% i 21,4% *E. coli* oraz 15,4% i 14,9% innych pateczek typu *coli* było opornych na sulfonamid i trimetoprim, odpowiednio. Stwierdzono znamienne statystycznie spadek oporności na mecillinam z 6,9% szczepów pateczek okrężnicy opornych w 2000 r. do 4,2% w 2008 r. i z 20,5% do 12,8% innych pateczek typu *coli*.

Wnioski: Mecillinam zaleca się jako lek pierwszego rzutu w empirycznym leczeniu ZUM. Ampicylina i sulfonamidy nie powinny być stosowane w empirycznym leczeniu ZUM.

Praca była częściowo publikowana w *Int J Antimicrob Agents* 2010, 35, 516–517.

Resistance to antibiotics in urinary coliform strains isolated from in- and outpatients with significant bacteriuria

Background: Coliform organisms are the predominant cause of both community and nosocomial urinary tract infections (UTIs).

The aim of the study was to examine antimicrobial resistance of urinary coliform isolates to oral antimicrobial agents and to update the recommendations for empirical therapy of UTIs in a well-defined geographical area of the south-west part of Denmark.

Material and methods: The retrospective study was conducted between January 1, 2000 and December 31, 2008. The analysis was based on all urine specimens with bacteriuria 10^4 cfu/ml or higher. Microorganisms were identified according to standard biochemical tests. The susceptibility of 16 048 coliforms was determined by agar diffusion method for ampicillin, cefuroxime, ciprofloxacin, mecillinam, trimethoprim and sulphonamide. Data for the analysis include only information of the first isolate for each patient per year. The trend for antimicrobial resistance over the studied period was examined and 95% confidence intervals were computed for differences in proportion between 2000 and 2008.

Results: During 2000–2008 there was increased resistance to ampicillin and ciprofloxacin both for *E. coli* and other coliforms. In 2008, 1,8% of *E. coli* and 21,4% of other coliforms were resistant to cefuroxime while 33,5% and 21,4% of *E. coli* and 15,4% and 14,9% of other coliforms were resistant to sulphonamide and trimethoprim, respectively. The resistance to mecillinam decreased statistically significantly from 6,9% of resistant *E. coli* isolates in 2000 to 4,2% in 2008 and for other coliforms from 20,5% to 12,8%.

Conclusions: Mecillinam should be advised as the first antimicrobial choice for empirical treatment of UTI. Ampicillin and sulphonamides should not be recommended for empirical treatment in our area due to the high rate of resistance of coliforms to these antimicrobial agents.

[11]

Analiza czynników ryzyka rozwoju raka płaskonabłonkowego głowy i szyi

The analysis of the risk factors of HNSCC development

Paweł Golusiński, Katarzyna Lamperska, Andrzej Mackiewicz

Zakład Immunologii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Oddział Chirurgii Głowy i Szyi i Onkologii Laryngologicznej, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wstęp: Obecność mutacji w obrębie genu supresorowego TP53 stwierdza się u 30–60% chorych na raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Udowodniono istotny związek między obecnością mutacji a środowiskowymi czynnikami ryzyka – paleniem tytoniu i piciem alkoholu. W ostatnich latach wiele badań wskazuje na fakt, że u chorych mających dziki typ genu p53, niepijących alkoholu i niepalących tytoniu również rozwija się rak płaskonabłonkowy, zwłaszcza w obrębie gardła środkowego i jamy ustnej. Może się to wiązać z obecnością infekcji onkogennymi typami wirusa HPV.

Celem pracy było określenie udziału mutacji w TP53 oraz infekcji onkogennymi typami HPV w rozwoju raka

płatkonabłonkowego głowy i szyi, a także określenie relacji pomiędzy występowaniem infekcji wirusem HPV oraz częstością mutacji w obrębie genu TP5.

Materiał i metody: Materiał stanowiła tkanka nowotworowa i krew pochodząca od 50 chorych na raka płatkonabłonkowego głowy i szyi. Mutacji w obrębie genu p53 poszukiwano, stosując technikę PCR-SSCP. U wszystkich chorych wykonano barwienia IHC dla p16, a następnie poszukiwano DNA onkogennych typów wirusa HPV przy użyciu metody GP5+/6+ PCR z następczym genotypowaniem hybrydyzacją RLB (*reverse line blot*).

Wyniki: Mutacje w obrębie genu p53 wykryto u 8 chorych i wykazano ich istotny związek z paleniem tytoniu ($p = 0,004$) oraz z równoczesnym paleniem i nadużywaniem alkoholu ($p = 0,008$). Pozytywne wybarwienie dla p16 obrębie grupy badanej stwierdzono w 21 przypadkach, ale tylko w 4 liczba wybarwionych komórek przekraczała 50%. Obecności DNA onkogenego typu wirusa techniką PCR nie stwierdzono w żadnym przypadku.

Wnioski: Mutacje w TP53 w grupie badanej stanowią istotną przyczynę rozwoju raka płatkonabłonkowego. Potwierdzono związek występowania mutacji z paleniem tytoniu i nadużywaniem alkoholu. Badanie immunohistochemiczne stanowi cenne badanie przesiewowe w celu wykrycia obecności wirusa. W przypadkach wątpliwych wymaga jednak weryfikacji. Nieobecność wirusa w badanej grupie może świadczyć o stosunkowo niewielkim udziale wirusów HPV w patogenezie tych nowotworów w Polsce.

[12]

Pooperacyjna bronchoskopia autofluorescencyjna jako metoda wczesnego wykrywania zmian przedinwazyjnych u chorych operowanych z powodu raka niedrobnokomórkowego

Piotr Donat, Elżbieta Nowak, Aleksander Barinow-Wojewódzki, Rodryg Ramlau

Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu

Ponowne zachorowanie na raka płuca występuje u ok. 1–3% chorych w ciągu roku po całkowitej resekcji z powodu raka niedrobnokomórkowego. Bronchoskopia autofluorescencyjna jest czułą metodą w identyfikacji zmian przedinwazyjnych. Chorzy po całkowitej resekcji z powodu raka niedrobnokomórkowego zostali zakwalifikowani do bronchoskopii autofluorescencyjnej w ramach kontroli onkologicznej. Wykonano 86 bronchofiberoskopii u 84 chorych. Wszyscy chorzy aktualnie palili tytoń, a średni czas badania po zabiegu wynosił 12 miesięcy. Rozpoznanie zmian przedinwazyjnych uzyskano u 6 chorych. W badaniu histopatologicznym rozpoznano 4 zmiany o charakterze dysplazji stopnia średniego oraz 2 zmiany odpowiadające dysplazji stopnia ciężkiego. Zmiany dysplastyczne dotyczyły tylko okolicy kikuta pooperacyjnego. Wykorzystanie wyłącznie bronchoskopii autofluorescen-

cyjnej pozwoliło rozpoznać 5 zmian dysplastycznych, natomiast jedna zmiana była widoczna zarówno w autofluorescencji, jak i w świetle białym. Dwoch chorych z dysplazją stopnia ciężkiego pozostało w dalszej obserwacji endoskopowej. W badaniu kontrolnym po 6 miesiącach u jednego chorego wystąpiła progresja w kierunku raka inwazyjnego. Bronchoskopia autofluorescencyjna jest badaniem, które przynosi wymierne korzyści u chorych po zabiegu jako narzędzie monitoringu, umożliwiając wczesną detekcję zmian patologicznych i podjęcie skutecznego leczenia.

Słowa kluczowe: rak płuca, leczenie operacyjne, autofluorescencja, dysplazje.

Postoperative autofluorescence bronchoscopy as a method of early diagnosis preinvasive lesions in patients operated due to non-small cell lung cancer

Recurrence of lung cancer occurs in about 1-3% of patients within a year after complete resection due to non-small cell lung cancer. Autofluorescence bronchoscopy is a sensitive method of identifying pre-invasive lesions. Patients after complete resection due to non-small cell lung cancer were allocated to autofluorescence bronchoscopy within the scope of oncological control. Eighty-six bronchofibroscopy procedures were performed in 84 patients. All patients were or still are active smokers, and average time of the study after the procedure was 12 months. Pre-invasive lesions were diagnosed in 6 patients. Histopathological examination enabled diagnosis of 4 lesions revealing the character of middle dysplasia and 2 lesions corresponding to severe dysplasia. Dysplasia lesions concerned only the area of the post-operative stub. Using only autofluorescence bronchoscopy enabled diagnosis of 5 dysplasia lesions, whereas 1 lesion was visible both in autofluorescence and in white light. Two patients with severe dysplasia remained under further endoscopic observation. A control study performed after 6 months revealed progression towards invasive cancer only in one patient. Autofluorescence bronchoscopy is an examination which brings measurable advantages in patients after the procedure, as a monitoring tool enabling early detection of pathological lesions and implementation of effective treatment.

Key words: lung cancer, operational treatment, autofluorescence, dysplasia.

[13]

Opracowanie trójwymiarowego modelu guza

Hanna Dams-Kozłowska¹, Anna Kicińska-Jakubowska²,
Edyta Bogacz², Maria Wołuń-Cholewa³, Anna Florczak¹,
Andrzej Mackiewicz¹

¹Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów,
Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

²Zakład Metrologii Surowców i Wyrobów Włókienniczych,
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

³Katedra i Zakład Biologii Komórki, Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: Hodowla komórkowa jest bardzo ważną metodą wykorzystywaną w poznawaniu biologii nowotworów i testowaniu nowych leków przeciwnowotworowych. Popularnie stosowana hodowla dwuwymiarowa (2D) ma jednakże wiele ograniczeń: komórki charakteryzują się zmienionym metabolizmem, ekspresją genów czy wzrostem. Zastosowanie przestrzennych rusztowań wykazało, że komórki hodowane w trójwymiarze (3D) bardziej odzwierciedlają te występujące *in vivo*.

Cel pracy: Opracowanie technologii trójwymiarowej hodowli komórkowej w celu wynżynierowania trójwymiarowego modelu guza *in vitro*.

Materiał i metody: Roztwór jedwabiu naturalnego przygotowano poprzez ekstrakcję kokonów jedwabników mrowych *Bombyx mori*. Przestrzenne zręby wykonano z wodnych roztworów jedwabiu naturalnego za pomocą metody wyptukiwania soli (NaCl). Fibroblasty 3T3 oraz nowotworowe linie komórkowe SKOV3, MDA-MB-231, MCF7 wykorzystano do badań komórkowych *in vitro*. Zręby przed posianiem i po posianiu komórek obserwowano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, mikroskopii konfokalnej oraz mikroskopii skaningowej. Proliferację komórek mierzono za pomocą reagentu MTT.

Wyniki: Z ekstrakcji 5 g kokonów otrzymano 6-procentowy roztwór jedwabiu naturalnego. Stosując NaCl o różnych zakresach wielkości kryształków (100–250 µm, 250–500 µm, 500–710 µm), otrzymano zręby różniące się wielkością porów. Mikroskopowo analizowano trójwymiarową hodowlę komórkową fibroblastów i ustalonych linii nowotworowych. Każda z testowanych linii komórkowych bardzo dobrze zasiedlała i dzieliła się w obrębie zrębu, wykazując różną morfologię i kinetykę wzrostu.

Wnioski: Jedwab naturalny jest niedrogim, wolno degradującym się, biokompatybilnym, naturalnym biomateriałem. Zręby wykonane z jedwabiu naturalnego mogą być z powodzeniem zastosowane do wynżynierowania trójwymiarowego modelu guza *in vitro*. Celem ostatecznym jest opracowanie heterologicznego modelu guza. Jednoczesna hodowla komórek endotelialnych, fibroblastów i komórek nowotworowych wygeneruje warunki najbardziej zbliżone do mikrośrodowiska guza *in vivo*.

Developing a three-dimensional cancer model

Background: Cell culture is the most important method used in cancer biology and drug screening study.

However, two dimensional (2D) cell culture modifies cell metabolism, gene expression and growth. Recent advances in three-dimensional (3D) culture indicated that cancer cells growing in 3D behave much more like those *in vivo*.

Aim of the study: To apply the technology of 3D cell culture to develop a 3D cancer model *in vitro*.

Material and methods: Cocoons of *Bombyx mori* were extracted in order to prepare silk fibroin solution. Aqueous-based silk fibroin scaffolds were produced using the salt leaching method. Fibroblast 3T3 and cancer cell lines SKOV3, MDA-MB-231, and MCF7 were used in an *in vitro* cell study. The cell-free and cell-seeded scaffolds were examined by fluorescent microscopy, confocal laser microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The proliferation of cells was measured using MTT reagent.

Results: 6% silk solution was prepared from 5g silkworm cocoons. Silk scaffolds of different pore size were formed by adding granular NaCl (particle size: 100–250 µm, 250–500 µm, 500–710 µm) to silk solution. The microscopic study of cell-seeded silk scaffolds indicated very good seeding and expansion of all tested cells. Cells differed in terms of morphology and kinetics of growth.

Conclusions: Silkworm silk is inexpensive, slowly biodegradable, biocompatible and natural biomaterial. Silk scaffolds support the attachment and expansion of cancer cells. The final aim is to develop a heterologous 3D cancer model. The co-culture of epithelial cells, fibroblasts and cancer cells will provide a micro-environment closely mimicking the *in vivo* situation within tumours.

[14]

Identyfikacja komórek supresyjnych pochodzenia szpikowego u chorych z wysiękami opłucnowymi

Mariusz Kaczmarek¹, Joanna Budna¹,
Łukasz Szychalski², Halina Batura-Gabryel², Jan Sikora¹

¹Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

²Katedra i Klinika Pulmonologii, Alergologii
i Onkologii Pulmonologicznej, Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: Komórki supresyjne pochodzenia szpikowego (*myeloid-derived suppressor cells* – MDSC) stanowią różnorodną populację składającą się ze szpikowych komórek progenitorowych oraz niedojrzałych komórek linii mieloidalnej. Łączy je niski stopień dojrzałości oraz duża zdolność do hamowania odpowiedzi komórek układu odpornościowego. Fizjologicznie, MDSC stanowią ok. 0,5% krwinek jednojądrzastych krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cell* – PBMC). U chorych z różnymi typami nowotworów odnotowano prawie dziesięciokrotny wzrost ich liczby we krwi obwodowej. W zaawansowanym stanie wielu nowotworów często dochodzi do powstania wysięku do jamy opłucnej. W tym wysoce

immunosupresyjnym mikrośrodowisku MDSC mogą pełnić nadrzędną rolę w stosunku do komórek układu odpornościowego, jak i wspomagającą rozwijający się nowotwór.

Cel pracy: Wykazanie obecności MDSC u chorych z wysiękami opłucnowymi i porównanie częstości występowania MDSC w nowotworowych i nienowotworowych wysiękach opłucnowych oraz we krwi obwodowej badanych pacjentów.

Materiał i metody: Przebadano 20 płynów wysiękowych z jamy opłucnej (8 nienowotworowych i 12 nowotworowych) uzyskanych drogą torakocentezy i 20 próbek krwi obwodowej pochodzącej od badanych pacjentów. Materiał ten poddano cytometrycznej ocenie immunofenotypowej pod kątem obecności MDSC.

Wyniki: W odniesieniu do markerów określających ludzkie MDSC (CD11b⁺CD33⁺HLA-DR⁻Lin-1⁻) w badanych materiałach wykazano obecność tych komórek zarówno w wysiękach opłucnowych, jak i krwi obwodowej. Wstępna analiza wykazała wyższy odsetek MDSC w wysiękach nowotworowych w porównaniu z wysiękami nienowotworowymi. Z kolei ilość MDSC we krwi obwodowej badanych chorych przewyższała ilość MDSC w wysiękach opłucnowych, zarówno w odniesieniu do wysięków nowotworowych, jak i nienowotworowych.

Wnioski: Gromadzenie się MDSC w miejscu rozwoju nowotworu, podobnie jak limfocytów T-reg oraz makrofagów TAM, może być jedną z przyczyn niedostatecznej skuteczności immunoterapii nowotworów, zwłaszcza w tak ciężkich stanach, jakimi są wysięki do opłucnej towarzyszące rozwijającym się nowotworom.

Identification of myeloid-derived suppressor cells in patients with pleural effusions

Background: Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) comprise a diverse population consisting of myeloid progenitor cells and immature cells from the myeloid line. They are coupled in their low level of maturity and high ability to inhibit a response of the immune system cells. Physiologically, MDSC make up about 0.5% of PBMC and may increase almost tenfold in the peripheral blood of patients with various types of cancer. Pleural effusions are often present in the advanced state of many malignant cancers. In this most immunosuppressive microenvironment MDSC can play a superior role for immune system cells as well as support the development of cancer.

Aim of the study was to indicate the presence of MDSC in patients with pleural effusions and correlation of frequency of MDSC in malignant and non-malignant pleural effusions as well as peripheral blood of studied subjects.

Material and methods: Pleural effusions obtained by thoracocentesis and peripheral blood samples from 20 patients (8 non-malignant and 12 malignant) were studied. This material was tested by cytometric immunophenotyping to identify the presence of MDSC.

Results: The presence of MDSC (defined by surface cellular markers: CD11b⁺CD33⁺HLA-DR⁻Lin-1⁻) was evaluated both in pleural effusion and in peripheral blood. This pre-

liminary analysis showed a higher percentage of MDSC in malignant pleural effusions compared to non-malignant effusions. Moreover, the percentage of MDSC in peripheral blood of the patients exceeded the amount of MDSC in pleural effusions, in both non-malignant and malignant effusions.

Conclusions: MDSC accumulation in-situ, in the site of cancer development, similarly like T-reg lymphocytes and tumour associate macrophages, can be one of the causes of insufficient efficacy of a cancer immunotherapy particularly in severe conditions such as pleural effusions associated with developing cancers.

[15]

Aktywowane limfocyty modyfikowane genem interferonu jako forma immunoterapii nowotworów

Urszula Kazimierzczak, Eliza P. Kwiatkowska, Andrzej Mackiewicz, Dariusz W. Kowalczyk

Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

W ostatnich latach powstało wiele form immunoterapii nowotworów. Niektóre z nich oparte są o immunizację przeciwko swoistym antygenom nowotworowym, inne wykorzystują nieswoiste czynniki stymulujące odpowiedź immunologiczną. Jedną z form immunoterapii raka stanowi adoptywny transfer komórek układu odpornościowego. Ich aktywność przeciwnowotworowa zależy od dwóch kluczowych elementów: i) cytotoksyczności komórkowej oraz ii) produkcji cytokin o działaniu przeciwnowotworowym. Brak jednego z tych elementów może prowadzić do niepełnej odpowiedzi, a co za tym idzie, do progresji nowotworu. Komórki układu immunologicznego wydzielają spontanicznie niewielkie ilości cytokin, przez co są niezdolne do efektywnego niszczenia guza. Celem naszych badań była modyfikacja limfocytów genem IFN- γ , aby zwiększyć ich aktywność przeciwnowotworową w warunkach *in vivo*. Przy użyciu wektora lentiwirusowego uzyskano cytotoksyczne komórki o nadekspresji IFN- γ , które nazwane zostały komórkami GMK (*gene modified killers*). Efekt przeciwnowotworowy *in vivo* tych komórek sprawdzany był w teście Winna. W badaniu tym podawano myszom zmieszane ze sobą terapeutyczne komórki GMK oraz komórki rakowe, a następnie obserwowano wzrost guza. W grupie zwierząt, którym podano szczepionkę terapeutyczną, guzy rozwijały się znacząco wolniej niż u myszy nieleczonych. Aktywność przeciwnowotworową GMK sprawdzano również po transferze adoptywnym tych komórek u myszy z nowotworem. Średni okres przeżycia zwierząt leczonych i nieleczonych był podobny, jednak myszy, którym podano GMK, wykazywały mniejsze objawy kacheksji. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają niezbędną rolę terapeutycznych cytokin w odpowiedzi na nowotwór i wskazują

na potencjał komórek GMK w immunoterapii adoptywnej nowotworów.

Słowa kluczowe: immunoterapia nowotworów, GMK, IFN- γ .

Interferon- γ gene modified activated lymphocytes as an effective tool for cancer immunotherapy

Many attempts have been made to develop immunotherapies for cancer treatment. Some approaches are based on immunization against specific tumour antigens, while others use non-specific factors to stimulate the general immune response. An alternative cancer immunotherapy approach is the adoptive transfer of immune cells. Their antitumour activity depends on two crucial elements: cytotoxic cell activity and production of tumouricidal cytokines. The lack of one may lead to suboptimal response and tumour progression. Frequently, immune cells produce cytokines at very low levels. Those cells are not able to effectively kill a tumour even after stimulation. In our studies, using lentiviral vector we modified with the IFN- γ gene previously activated lymphocytes in order to increase their antitumour activity *in vivo*. The resultant cells were named gene modified killers (GMK) as they have demonstrated increased antitumour activity in tumour bearing mice compared to non-modified lymphocytes. The antitumour effect was tested in Winn's assay after injection of mice with mixed tumour and effector cells. In this experiment tumour growth inhibition was observed. Although tumour growth was observed after both GMK and LAK transfer, mice treated with GMK were protected from tumour growth for longer. In another experiment we tested antitumour activity of adoptively transferred GMK in tumour bearing mice. Although the survival rate was similar in both groups, mice treated with GMK were significantly less cachectic than the LAK-treated group. Our results demonstrate that cytokine production plays an essential role in antitumour activity, thus indicating the potential of GMK as a form of cancer adoptive immunotherapy.

Key words: cancer immunotherapy, gene modified killers, IFN- γ .

[16]

Ścieżka sygnałowa JAK/STAT w regulacji funkcji komórek śródbłonka naczyń

Katarzyna Kulcenty, Katarzyna Gryska,
Andrzej Mackiewicz, Dariusz Iżycki

Zakład Immunologii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów,
Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wstęp: Komórki śródbłonka umożliwiają migrację limfocytów z krążenia do przestrzeni pozanaczyniowej oraz

tkanek nielimfoidalnych. Proces ten jest podstawowym zjawiskiem warunkującym utrzymanie nadzoru immunologicznego i wytworzenie prawidłowej odpowiedzi na toczący się proces zapalny czy nowotworowy. Cytokiny, takie jak TNF, IL-1 i IL-6, wpływają na komórki endotelialne, zwiększając ich możliwość do wiązania limfocytów. Wiadomo, że cytokiny należące do rodziny cytokiny IL-6 przekazują sygnał do wnętrza komórki poprzez ścieżkę sygnałową JAK/STAT.

Cel badania: W badaniach starano się wykazać wpływ ścieżki sygnałowej JAK/STAT aktywowanej przez H6 (genetycznie modyfikowaną IL-6, związaną z jej rozpuszczalnym receptorem gp80) na funkcjonalną aktywację komórek śródbłonka.

Materiał i metody: W eksperymentach wykorzystano komórki śródbłonka izolowane z ludzkiej pępowiny (HUVEC). W celu oceny wpływu ścieżki JAK/STAT na stężenie ufosforylowanego białka STAT3, a także na ekspresję antygenów powierzchniowych CD54, CD62E i CD106 używano H6 i kukurbitacyny jako aktywatora i inhibitora badanej ścieżki.

Wyniki: W wyniku inkubacji komórek HUVEC z hiperinterleukiną 6 zaobserwowano zwiększenie stężenia ufosforylowanego białka STAT3. Osiemnastogodzinna inkubacja komórek HUVEC z aktywatorem ścieżki sygnałowej JAK/STAT spowodowała zwiększenie stężenia badanych cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka naczyń. Inhibitor tej ścieżki spowodował zmniejszenie stężenia badanych cząsteczek, co potwierdza udział ścieżki JAK/STAT w aktywacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych.

Wniosek: Otrzymane wyniki potwierdzają udział ścieżki sygnałowej JAK/STAT w regulacji funkcji komórek śródbłonka naczyń poprzez wpływ na ekspresję cząsteczek adhezyjnych na jego powierzchni.

JAK/STAT signaling pathway in the regulation of functional activity of endothelial cells

Background: Activation of the endothelium plays an important role in the transmigration of lymphocytes from the intravascular cavity, across the endothelium, to the underlying tissue. This process plays a crucial role in the inflammatory response. Cytokines such as tumour necrosis factor, IL-1 and IL-6 act on endothelial cells to enhance their adhesiveness for lymphocytes. The family of IL-6 cytokines signal through the gp130/JAK/STAT pathway.

Aim of the study: In our study, we aimed to evaluate the effect of the JAK/STAT pathway activated by H6 (genetically modified IL-6, conjugated with its soluble receptor) on the functional regulation of endothelial cells.

Material and methods: We used HUVEC cells isolated from human umbilical vein to evaluate the role of the JAK/STAT pathway on the expression of three endothelial antigens important for lymphocyte transmigration – CD54, CD62E and CD106. To show the influence of the JAK/STAT pathway on endothelial antigen expression we investigated the changes in vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and

selectin E (SelE) expression (flow cytometry) with H6 stimulation and cucurbitacin inhibition. We also evaluated the role of H6 in STAT3 phosphorylation.

Results: The flow cytometry analysis confirmed that the number of VCAM-1, ICAM-1 and SelE positive cells increased with H6 treatment. Incubation both with cucurbitacin and after inhibition of the JAK/STAT pathway with H6 resulted in a decrease of positive VCAM-1, ICAM-1 and SelE cells compared with cells treated only with H6. Flow cytometry analysis also showed that treatment of HUVEC cells with H6 increases the phosphorylated STAT-3 positive cells. Incubation with cucurbitacin resulted in reduction of phosphorylated STAT-3 positive cells, which confirms cucurbitacin as an inhibitor of the JAK/STAT pathway.

Conclusion: Our results show that the JAK/STAT pathway has an impact on the expression of VCAM-1, ICAM-1 and SelE antigens, which are crucial in lymphocyte transmigration across the endothelium.

[17]

PPAR α agonists fail to induce apoptosis in α -irradiated colon cancer cells

Piotr Pierzchalski¹, Małgorzata Pierzchalska², Jolanta Jaworek¹, Jan Gawetko³, Maciej Gonciarz³

¹Department of Medical Physiology, Faculty of Health Sciences, Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland

²Department of Food Biotechnology, Faculty of Food Technology, Agricultural University, Krakow, Poland

³Unit of Gastroenterological Endoscopy, St. Barbara District Hospital, Sosnowiec, Poland

Nadmierna aktywność białek szoku cieplnego, w szczególności HSP70, w komórkach guza może stanowić jedną z przyczyn niepowodzeń w zwalczaniu nowotworów. Komórki ze zwiększoną ekspresją i aktywnością białek szoku cieplnego są odporne na chemioterapię i prezentują złośliwy fenotyp. Jednocześnie proapoptotyczne działanie PPAR α w wielu typach nowotworów okazuje się być coraz bardziej kontrowersyjne

Komórki modelowej linii Caco-2 poddano działaniu agonistów PPAR α (ciglitazon i kwas retinowy) i promieniowania α w dawce terapeutycznej 2,5 Gy. Wykazano że, aktywność PPAR α ulegała zahamowaniu. Powodem było powstawanie kompleksów PPAR α /AKT-1, w których – pod wpływem promieniowania – PPAR α pozostawał niewrażliwy na indukcję ciglitazonem i kwasem retinowym. Natomiast w warunkach tych silnie indukowane były białka szoku cieplnego, w szczególności HSP70. Skutkiem opisanych zjawisk było całkowite zahamowanie apoptozy w komórkach napromieniowywanych, w których indukowano PPAR α jego agonistami.

PPAR α agonists fail to induce apoptosis in α -irradiated colon cancer cells

Radiotherapy when combined with chemotherapy is classified as the basic treatment of the majority of colorectal tumours. A beneficial effect of PPAR agonists on cancer cell elimination through apoptosis is a generally accepted fact. But some reports indicate that the PPAR α agonists' dependent activation of PPAR α might be directly answerable for carcinogenesis, especially in the colon, which renders the physiological role of the PPAR α system a very controversial issue. It is well known that the high level of heat shock proteins (HSPs) in cancer cells is associated with metastasis, poor prognosis and resistance to radio- as well as chemotherapy.

Caco-2 cell line used as a model of colorectal cancer was subjected to chemical activation of PPAR α (ciglitazone and retinoic acid) and α -irradiation with a therapeutic dose of 2.5 Gy. Here we report the anti-apoptotic action of activated PPAR α in α -irradiated human colon cancer cells. Based on experimental data we propose a model according to which α -irradiation of the cells abolishes nuclear translocation of PPAR α and conserves PPAR α /AKT-1 complexes in which PPAR α remains insensitive to treatment with its agonists. Meanwhile, PPAR α agonist dependent HSP 70 activation – undisturbed by the α -irradiation – renders the colon cancer cells resistant to apoptosis. This highlights the unexpected consequences of the combined use of the well known and accepted in the literature anti-cancer agents – agonists of PPAR α and α -radiation.

[18]

Akumulacja rezydujących i obwodowych makrofagów w glejakach oraz ich rola w rozwoju guza nowotworowego

Małgorzata Sielska¹, Konrad Gabrusiewicz¹, Joanna Kucharska², Małgorzata Zawadzka¹, Eliza Kwiatkowska³, Dariusz Kowalczyk³, Aleksandra Ellert-Miklaszewska¹, Bożena Kamińska¹

¹Pracownia Regulacji Transkrypcji, Zakład Biologii Komórki, Instytut im. Nenckiego w Warszawie

²Pracownia Mikroskopii Konfokalnej, Instytut im. Nenckiego w Warszawie

³Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wstęp: Glejaki charakteryzują się silnym naciekaniami tkanki guza przez makrofagi, które mogą stanowić nawet 30% jego masy, stwarzając specyficzne środowisko wspierające inwazyjność glejaka, angiogenezę i wzrost guza. Udział mózgowych makrofagów oraz monocytów/makrofagów napływających do guza z obwodu jest obecnie słabo zdefiniowany.

Cel pracy: Określenie, czy i jak intensywnie obwodowe makrofagi migrują do guza i uczestniczą w patogenezie glejaka.

Materiał i metody: Stworzono myszy chimerowe, które po wcześniejszym napromienieniu miały zrekonstruowany szpik kostny komórkami krwiotwórczymi z myszy transgenicznych GFP. Szesnastotygodniowym myszom chimerowym C57BL/6 zaimplantowano do mózgowi komórkę glejaka dsRed-GL261. Dwa tygodnie po implantacji półkuli z guzem wyizolowano, a następnie za pomocą cytometru przepływowego oceniono liczbę komórek mikrogleju CD11b⁺CD45^{low} i makrofagów CD11b⁺CD45^{high}. W celu zbadania funkcjonalnego udziału mikrogleju/makrofagów w patogenezie glejaka wykorzystano model myszy osteopetrotycznych (*op/op*), które mają spontaniczną mutację w genie czynnika wzrostu kolonii makrofagowych (M-CSF/CSF-1) i o 40% obniżoną zawartość makrofagów.

Wyniki i wnioski: Zaobserwowano zwiększenie liczby mikrogleju i makrofagów w półkuli z guzem oraz silną akumulację obwodowych komórek GFP⁺ w centrum i na obrzeżu guza. Za pomocą mikroskopu konfokalnego zaobserwowano kolokalizację komórek Iba-1⁺ (makrofagów/mikrogleju) z komórkami GFP⁺, a następnie policzono komórki GFP⁺Iba-1⁺ oraz Iba-1⁺. Oszacowano, iż obwodowe makrofagi stanowią ok. 50% komórek Iba-1⁺.

Myszy homozygotyczne *op/op* są zdolne do życia, ale wykazują niedobór makrofagów, monocytów oraz upośledzoną odpowiedź układu immunologicznego. Badania autorów ukazują znaczną migrację obwodowych makrofagów pochodzących ze szpiku kostnego do guza i intensywną akumulację mózgowych makrofagów (mikrogleju) w glejaku.

Badania finansowane z funduszu P-N/024/2006 ministra nauki i szkolnictwa wyższego.

Accumulation and role of resident and bone-marrow derived macrophages in gliomas

Background: Gliomas are characterized by infiltration of tumour tissue with brain macrophages that may constitute up to 30% of the tumour mass, forming a specific microenvironment and contributing to tumour progression. Involvement of brain resident and peripheral monocyte/macrophages is poorly defined.

The aim of the study was to evaluate whether peripheral macrophages migrate and contribute to glioma development.

Material and methods: We have generated chimeric mice with the immune system reconstituted after irradiation with haematopoietic GFP-bone marrow cells. The dsRed-GL261 glioma cells were implanted into the brains of 16-week old C57BL/6 chimeric mice. Two weeks after implantation, tumour bearing hemispheres were isolated and the number of CD11b⁺CD45^{low} microglial cells or CD11b⁺CD45^{high} macrophages was determined by flow cytometry. To study the functional contribution of microglia/macrophages to glioma growth, we employed osteopetrotic mice (*op/op*) which have a spontaneous mutation in the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1) gene.

Results and conclusions: The percentage of microglial cells and macrophages increased in tumour-bearing hemispheres. Peripheral GFP⁺ cells accumulated inside and around tumours. Co-localization of Iba-1⁺ cells (macrophages/microglia) with GFP⁺ cells was detected by confocal microscopy. Counting of double-stained cells revealed that > 50% of Iba-1⁺ cells are peripheral macrophages. Homozygous *op/op* mice are viable but exhibit a generalized macrophage deficiency, monocytopenia, deficient microglia/macrophage responses and defective bone remodelling. Our studies demonstrate that in addition to accumulation of brain resident macrophages (microglia), also blood-borne macrophages migrate to the tumour and consist of a significant population of tumour-associated macrophages.

The research was supported by grant P-N/024/2006 from the Ministry of Science and Higher Education

[19]

Analiza ilościowa komórek T-regulatorowych w wysiękach opłucnowych u chorych na raka płuca

Łukasz Sychalski¹, Joanna Budna², Agata Nowicka¹, Magdalena Kozłowska², Halina Batura-Gabryel¹, Mariusz Kaczmarek², Jan Sikora²

¹Katedra i Klinika Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

³Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu

Wstęp: Komórki T-regulatorowe (Treg) stanowią 5–10% populacji obwodowych limfocytów T CD4⁺. Specyficzną cechą tych komórek jest obecność czynnika transkrypcyjnego Foxp3. Rola, jaką odgrywają Treg w układzie immunologicznym, jest ambiwalentna. Z jednej strony zabezpieczają przed autoagresją, wytwarzają tolerancję pokarmową, tolerancję na przeszczepy alogeniczne oraz hamują reakcje nadwrażliwości, jednocześnie jednak uczestniczą w procesach, które mają skutki niepożądane dla organizmu, tj. hamują eliminację mikroorganizmów oraz biorą udział w rozwoju tolerancji na antygeny związane z nowotworem. Obecnie wysuwane hipotezy sugerują, że Treg mają duży wpływ na rozwój i progresję procesu nowotworowego.

Cel pracy: Ocena rozpowszechnienia limfocytów Treg w mikrośrodku wysięku nowotworowego w przebiegu raka płuca w porównaniu z wysiękiem nienowotworowym.

Materiał i metody: Wysięki pochodzące od 25 chorych na wysiękowe zapalenie opłucnej i 12 chorych na raka gruczołowego płuca. Cytometryczny pomiar odsetka komórek wykazujących ekspresję CD4, CD25 i Foxp3.

Wyniki: W wysiękach nowotworowych odsetek Treg wśród komórek T CD4⁺ jest średnio dwukrotnie wyższy

w porównaniu z wysiękami nienowotworowymi. O wzroście liczebności Treg w środowisku wysięku nowotworowego w porównaniu z nienowotworowym świadczy też stosunek odsetka limfocytów do odsetka Treg i odsetka komórek T CD4⁺ do Treg.

Wniosek: Wykazano różnice w zakresie odsetka komórek T regulatorowych w badanych środowiskach.

Quantitative analysis of Treg cells in pleural effusion patients with lung cancer

Background: T regulatory cells (Tregs) constitute 5–10% of the population of peripheral T CD4⁺ lymphocytes. The core feature of these cells is expression of the transcription factor Foxp3. The role of Tregs in the immunology system is ambiguous. On the one hand they limit the potential for autoreactivity, produce nutritional tolerance and tolerance to allogenic graft, and inhibit hypersensitivity reactions. At the same time they take part in processes with adverse events; they inhibit elimination of pathogens and limit immune responses to tumours. Recent studies suggest that Tregs have a major impact on tumour development and progression.

Aim of the study: The analysis of Tregs' frequencies in the microenvironment of neoplastic pleural effusion in the course of lung cancer and inflammatory pleural effusion.

Material and methods: Pleural effusion from: 25 patients with exudative pleuritis, 12 patients with adenocarcinoma of the lung. Cytometric analysis cells with CD4, CD25 and Foxp3 expression.

Results: In neoplastic exudates the Tregs ratio among CD4⁺ T cells was on average two times higher than in non-neoplastic. Increased number of Tregs in the environment of pleural effusion in the course of lung cancer is shown by lymphocytes/Tregs and CD4⁺ T cells/Tregs ratio.

Conclusion: A difference was found in Treg frequencies in the studied environments.

rów u nosicielek mutacji BRCA1. Hipotezy te zostały potwierdzone w badaniach klinicznych. Hiperinsulinemia (typowa u chorych na cukrzycę typu 2) jest istotnym czynnikiem ryzyka w diagnostyce nowotworów piersi. Rozpoznanie nowotworu u chorych z otyłością i hiperinsulinemią związane jest z gorszą prognozą przeżycia niż u chorych z prawidłową masą ciała i metabolizmem. Metformina (dimetylowa pochodna biguanidu) jest powszechnie stosowanym lekiem doustnym w terapii cukrzycy typu 2. Wydaje się, że metformina ma właściwości przeciwnowotworowe, które wynikają z hamowania glikogenezy w wątrobie, hamowania insulinooporności w tkankach obwodowych przez stymulację kinazy AMP-zależnej przez LKB1. W komórkach, zarówno normalnych, jak i nowotworowych, prowadzi to do hamowania aktywności mTOR, inhibicji proliferacji komórek oraz zahamowania produkcji czynników wzrostu. Doświadczenia przeprowadzone z udziałem dużej grupy chorych wskazują, że terapia metforminą jest związana ze znacznym spadkiem ryzyka zachorowania na nowotwór oraz ze zmniejszeniem śmiertelności u chorych na cukrzycę typu 2, u których zdiagnozowano guz. Wykazano, że metformina hamuje proliferację komórek nowotworowych (także komórek raka piersi) zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ponadto, udowodniono, że metformina poprawia efektywność chemioterapii neoadjuwantowej (odpowieź całkowita, pCR) u chorych na cukrzycę, ze zdiagnozowanym rakiem piersi.

Cel badań: Ocena wpływu metforminy na skuteczność napromieniania komórek z nieaktywnym genem BRCA1 i opracowanie modelu do dalszych doświadczeń.

Metody:

1. Linia komórkowa raka piersi: MCF-7, MDA-MB-157, MBA-MB-231.
2. Plazmid kodujący siRNA-BRCA1 i plazmid kontrolny (pRS-GFP, promotor U6).
3. Mammosfery otrzymywano przez promocję agregacji komórek w sferoidy poprzez hodowlę w naczyniach hodowlanych opłaszczonych cienką warstwą 1-procentowej agarozy.
4. Western blot prowadzono wg standardowego protokołu z wykorzystaniem przeciwciał antyludzkich: BRCA1 i α -aktyny.
5. Analizy cytometryczne prowadzono z zastosowaniem przeciwciał anty-CD44 (FITC), anty-CD24 (PE) i ALDH.
6. Komórki napromieniano w GammaCell 1000 (Cs 137), moc dawki 3,55 Gy/min.

Wyniki:

1. pRS-GFP siRNA BRCA1 hamuje ekspresję genu BRCA1 w badanych liniach komórkowych.
2. Utrata ekspresji BRCA1 promuje proliferację linii komórkowych raka piersi w porównaniu z liniami z prawidłową ekspresją BRCA1.
3. Utrata ekspresji BRCA1 promuje tworzenie mammosfer przez komórki linii MCF-7 i MDA-MB-23.
4. Wyciszenie ekspresji genu BRCA1 zwiększa efektywność działania promieniowania jonizującego na komórki.
5. Metformina hamuje wzrost i proliferację komórek nowotworu piersi z wyłączoną ekspresją BRCA1 *in vitro*.

Wnioski:

1. Metformina zwiększa radiowrażliwość komórek linii raka piersi z wyłączoną ekspresją genu BRCA1.

[20]

Wpływ siRNA BRCA1 na fenotyp i radiowrażliwość linii komórkowej raka piersi – współdziałanie metforminy i wyciszenia

Wiktoria Suchorska^{1,2}, Piotr J. Wysocki³

¹Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

³Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: Rak piersi jest nowotworem najczęściej występującym u kobiet w krajach rozwiniętych. Dziedziczny rak piersi stanowi 5–10% wszystkich diagnozowanych przypadków. Nowotwory u chorych z mutacją w genie *BRCA1* zwykle są bardziej agresywne (*basal-like*). Istnieje wiele doniesień na temat większej radiowrażliwości nowotwo-

2. Metformina i siRNA BRCA1 mogą oddziaływać na populację komórek macierzystych raka piersi.

Przedstawione wyniki są obiecujące, jednak wymagają dalszych badań. Zaplanowano rozszerzenie eksperymentów o:

1. Identyfikację i charakteryzację komórek macierzystych raka piersi w badanych liniach.
2. Analizę właściwości metforminy jako radioculacza w połączeniu z wyłączeniem ekspresji BRCA1.
3. Opracowanie modelu mysiego umożliwiającego przeprowadzenie badań *in vivo*.

The influence of siRNA BRCA1 on breast cancer cell line phenotype and radiosensitivity – synergic effect of BRCA1 knockdown and metformin

Background: Breast cancer is the most frequent neoplasm in women from developed countries. Hereditary breast cancers accounts for 5–10% of all breast cancers. BRCA1 mutation carriers develop usually highly aggressive, basal-like breast cancers, which are associated with poor prognosis. Several studies suggest that tumors carrying BRCA1 gene mutation might be more sensitive to ionizing radiation. The hypothesis that BRCA1 mutation is associated with increased radiosensitivity has been supported by experimental and clinical data.

Hyperinsulinemia (characteristic for type 2 diabetes) is an important risk factor for breast cancer, and breast cancer patients suffering from obesity and hyperinsulinemia may have worse outcomes than their healthy counterparts. Metformin (N,N-dimethylimidodicarbonimidic diamine hydrochloride) is a widely prescribed oral medication used as first line therapy for type 2 diabetes. Metformin seems to possess antitumor properties which result from inhibition of liver gluconeogenesis, inhibition of insulin resistance within peripheral tissues via stimulation of AMP-dependent kinase via LKB1. In normal and neoplastic cells this process leads to (i) inhibition of mTOR activity, (ii) inhibition of cellular proliferation, (iii) inhibition of growth factor production.

Population studies have suggested that metformin treatment was associated with reduced cancer risk and decreased cancer-related mortality in type 2 diabetic patients. In addition, metformin has been shown to inhibit growth of cancer cells, including breast cancer, *in vitro* and *in vivo*. Moreover, metformin was demonstrated to increase the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy (increased frequency of complete pathological responses pCR) in diabetic breast cancer patients.

Aim of the study: Assessment of the influence of BRCA1 silencing and metformin on the efficacy of irradiation in *in vitro* and *in vivo* breast cancer models

Methods:

1. Cell culture: MCF-7, MDA-MB-231.
2. siRNA-BRCA1 expression plasmids and control plasmid were constructed in pRS-GFP under U6 promoter control.
3. Mammospheres have been obtained by promoting aggregation of cells in spheroids via culture of cell suspension in dishes coated with a thin layer of agarose.

4. Western blot was performed with anti-BRCA1 antibody and anti-human β -actin antibody.

5. Flow cytometry analysis was performed with FITC conjugated anti-CD44, PE conjugated anti-CD24, and ALDH Kit.

6. Gamma radiation (ionizing irradiation, IR) was delivered by a Gamma Cell 1000 (Cs137 unit) at a dose rate of 3,55 Gy/min.

Results:

1. pRS-GFP siRNA BRCA1 down regulates BRCA1 expression in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.
2. Loss of BRCA1 expression promotes proliferation of both MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.
3. Loss of BRCA1 expression promotes mammosphere formation in both MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.
4. BRCA1 silencing increases efficacy of ionizing radiation
5. Metformin suppresses growth of BRCA1-silenced breast cancer cells *in vitro*.

Conclusions:

1. Metformin increases radiosensitivity of breast cancer cells with BRCA1 knockdown.
2. Metformin and siRNA BRCA1 may influence population of breast cancer stem cells.

Based on this conclusions our future experiments will focused on:

1. Identification and characterization of breast cancer stem cells population *in vitro* (MCF-7, MCF-7 siRNA BRCA1, MDA-MB-231 and MDA-MB-231 siRNA BRCA1 cell lines).
2. Analysis the radiosensitizing properties of metformin and BRCA1 silencing.
3. Development of a murine breast cancer model for *in vivo* studies.

[21]

Ocena przeciwnowotworowej aktywności nowego inhibitora ścieżki sygnałowej JAK/STAT w komórkach ludzkich złośliwych glejaków

Karolina Świętek-Machado¹, Anna Chaudhuri¹, Aleksandra Ellert-Miklaszewska¹, Wiesław Szeja², Waldemar Prieb³, Grzegorz Grynkiewicz⁴, Bogdan Lesyng⁵, Bożena Kamińska¹

¹Pracownia Regulacji Transkrypcji, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

²Syntex w Gliwicach

³Department of Experimental Therapeutics, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

⁴Instytut Farmaceutyczny w Warszawie

⁵Wydział Biofizyki, Uniwersytet Warszawski

Wstęp: Szlaki przekazywania sygnału angażujące białka z rodziny JAK (Janus kinase)/STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) pełnią ważną rolę w regulacji podstawowych procesów życiowych, a ich konstytutywna aktywność, w szczególności STAT3 i STAT5, przyczynia się do transformacji nowotworowej. Farmakologiczna modu-

lacja ścieżki JAK/STAT może stać się podstawą do opracowania nowej strategii w terapii nowotworów.

Cel badania: Ocena przeciwnowotworowej aktywności nowego inhibitora ścieżki sygnałowej JAK/STAT3 (INHIBITOR 2), będącego analogiem tyrfostyny AG490, w komórkach ludzkiego glejaka linii T98G, LN18 i U87-MG.

Metody: Żywotność komórek ludzkiego glejaka po traktowaniu INHIBITOREM 2 oceniano za pomocą testu metabolizmu MTT. Zahamowanie przekazywania przez ścieżkę JAK/STAT oraz indukcję apoptozy badano za pomocą analizy Western blot. Ocenę cyklu komórkowego wykonano metodą cytometrii przepływowej z barwnikiem jodek propidyny.

Wyniki: Po podaniu INHIBITORA 2 obserwowano indukcję zmian morfologicznych oraz znaczący spadek żywotności komórek. Uzyskane wartości IC_{50} wynosiły 26 μ M, 23 μ M, 40 μ M odpowiednio dla komórek linii T98G, LN18 i U87-MG. Dokonano oceny wpływu INHIBITORA 2 na poziom fosforylacji białek ścieżki JAK/STAT i stwierdzono, że w sposób zależny od dawki hamuje on przekazywanie sygnału poprzez czynnik STAT3. W ciągu 24 godz. od traktowania obserwowano akumulację ciętej formy kaspazy 3 i PARP, białek charakterystycznych dla procesu apoptozy. Analiza cyklu komórkowego potwierdziła apoptotyczny rodzaj śmierci.

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują na wzmożoną aktywność czynnika STAT3 w komórkach glejaka oraz na zdolność INHIBITORA 2 do hamowania przekazywania sygnału poprzez białko STAT3, co indukuje apoptozę komórek ludzkiego glejaka złośliwych.

Evaluation of anti-tumor activity of the novel inhibitor of the JAK/STAT signaling pathway in human malignant glioma cells

Background: The JAK (Janus kinase)/STAT (signal transducers and activators of transcription) signaling pathway is crucial for regulation of cell growth, differentiation and apoptosis. Constitutive activation of STATs, in particular STAT3 and STAT5, is observed in many human tumors and may contribute to oncogenesis by stimulating cell proliferation and preventing apoptosis. Thus it is emerging as a promising target for anticancer therapy.

Aim of the study was to test antitumor efficacy of a newly designed and synthesized JAK/STAT3 inhibitor (INHIBITOR 2), structurally related to tyrphostin AG490 (known JAK2 inhibitor) in three human glioma cell lines – T98G, LN18 and U87-MG.

Methods: Cell viability after treatment with INHIBITOR 2 was determined by the MTT metabolism test. Inhibition of the JAK/STAT pathway and induction of apoptotic markers were evaluated by Western blotting. Cell cycle analysis using propidium iodide and flow cytometry was performed. Morphology of the cells was visualized using light microscopy.

Results: Treatment with INHIBITOR 2 resulted in induction of rapid morphological changes (cell shrinkage and detachment) and decrease of cell viability. The IC_{50} values were 26 μ M, 23 μ M, 40 μ M for T98G, LN18, U87-MG cells,

respectively. After 3 hours of treatment, INHIBITOR 2 significantly reduced the level of pSTAT3 in a dose-dependent manner in all tested cell lines. Cleaved caspase 3 and PARP, hallmarks of apoptosis, were detected after 24 hours of treatment. Cell cycle analysis confirmed apoptotic cell death.

Conclusions: These findings provide evidence of constitutive activation of STAT3 in glioma cells and demonstrate that the selected, newly synthesized compound inhibits STAT3 phosphorylation, affects cell attachment and induces apoptosis in malignant human glioma cells.

[22]

Czy TGF- β wpływa na populację leukocytów naciekających guz u pacjentów z NDRP?

Jacek Tabarkiewicz¹, Paweł Rybojad², Mariusz Kędra², Marek Sawicki², Jacek Roliński¹

¹Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²Katedra i Zakład Chirurgii Klatki Piersiowej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wstęp: TGF- β jest cytokiną odgrywającą jedną z głównych ról w immunosupresji związanej z nowotworem. TGF- β indukuje wiele mechanizmów prowadzących do osłabienia bądź wygaśnięcia odpowiedzi przeciwnowotworowej. Należą do nich indukcja limfocytów Treg, aktywacja tolerogennych limfocytów Th17, zahamowanie migracji komórek dendrytycznych do węzłów chłonnych, indukcja apoptozy komórek dendrytycznych, indukcja angiogenezy poprzez stymulację sekrecji VEGF, zahamowanie proliferacji, różnicowania się i aktywacji limfocytów efektorowych. TGF- β odgrywa także ważną rolę w patogenezie niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP).

Cel pracy: Określenie wpływu lokalnego stężenia TGF- β na populację leukocytów naciekających guz.

Materiał i metody: Badaniem objęto 90 mężczyzn operowanych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej UM w Lublinie z powodu NDRP. Populację leukocytów naciekających guz badano za pomocą cytometrii przepływowej i przeciwciał monoklonalnych. Lokalne stężenie TGF- β oznaczano metodą ELISA.

Wyniki: Wykazano istotny wpływ stężenia TGF- β na liczbę plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych (DC) naciekających guz. Rosnąca liczba plazmacytoidalnych DC prowadziła do zmniejszenia stosunku pomiędzy populacją mieloidalnych DC i plazmacytoidalnych. Dodatkowo lokalne stężenie TGF- β ujemnie korelowało z ekspresją ZAP-70 w limfocytach CD3⁺ naciekających guz.

Wnioski: Wyniki badań autorów sugerują, że lokalna produkcja TGF- β w guzie prowadzi do promocji zmian w profilu leukocytów naciekających guz. Zmiany mają charakter zmian immunosupresyjnych: wzrost liczby plazmacytoidalnych DC w stosunku do mieloidalnych DC, obniżenie ekspresji molekuł odpowiadających za aktywację w limfocytach CD3⁺.

Does TGF- β orchestrate tumour infiltrating lymphocytes in NSCLC patients?

Background: TGF- β is a cytokine crucial for tumour-induced immunosuppression. TGF- β induces a variety of mechanisms which lead to downregulation of the immune response: induction of regulatory T lymphocytes, activation of tolerogenic Th17 lymphocytes, blockade of dendritic cells' (DC) migration to lymph nodes, induction of DC apoptosis, stimulation of angiogenesis through VEGF release, and suppression of effector cells' proliferation and maturation. TGF- β is also important for formation of metastases in the clinical course of NSCLC.

The aim of the study was to investigate the influence of local TGF- β concentration on the tumour infiltrating leukocyte population.

Material and methods: The study group consisted of 90 males with NSCLC, treated in the Thoracic Surgery Department of MU of Lublin. Populations of tumour infiltrating leukocytes were investigated using flow cytometry and monoclonal antibodies. Local concentration of TGF- β was examined with the ELISA method.

Results: Our results showed a significant influence of local concentration of TGF- β on the percentage of plasmacytoid DC infiltrating tumour. Increasing count of plasmacytoid DC led to a lower ratio between myeloid and plasmacytoid DC. Additionally we noted a negative correlation between concentration of TGF- β and ZAP-70 expression in tumour infiltrating CD3⁺ lymphocytes.

Conclusions: Our results suggest that local production of TGF- β in NSCLC tumour leads to promotion of changes in populations of tumour infiltrating leukocytes. These changes induce an immunosuppressive profile of leukocytes: decreased ratio between plasmacytoid and myeloid DC, and decreased expression of molecules conducting activation signals in CD3⁺ lymphocytes.

Celem badań było porównanie wrażliwości komórek jednojądrzastych (MNC) wydzielonych z krwi pacjentów z PBL na kladrybinę i cyklofosfamid (CC) lub fludarabinę i cyklofosfamid (FC) w warunkach *in vivo* i *ex vivo* oraz analiza wpływu na komórki MNC R-roskowityny (R) użytej samodzielnie lub w kombinacji z mafosfamidem.

Materiał i metody: Badania *in vivo* prowadzono na komórkach wyizolowanych z krwi chorych pobranej przed leczeniem, w jego trakcie oraz po 2 tygodniach od podania ostatniej dawki leków. Doświadczenia *ex vivo* prowadzono na komórkach otrzymanych z krwi pacjentów pobranej przed leczeniem, eksponowanych wyłącznie na pochodne purynowe i mafosfamid oraz ich kombinacje. Proapoptotyczny efekt związków oceniano cytometrycznie i techniką Western blot na podstawie analizy ekspresji kilku białek związanych z apoptozą. Dodatkowo przeprowadzono analizę fragmentacji DNA i ocenę zawartości DNA w komórkach eksponowanych na badane czynniki.

Wnioski:

1. Terapia CC i FC indukuje apoptozę komórek białaczkowych *in vivo*, której poziom jest niższy niż *ex vivo*.
2. R-roskowityna wykazuje wyższą proapoptotyczną aktywność niż pozostałe związki *ex vivo* przy mniejszej toksyczności względem komórek MNC zdrowych dawców, co sugeruje jej użyteczność w leczeniu PBL.
3. Analiza ekspresji białek związanych z regulacją i przebiegiem apoptozy w komórkach traktowanych badanymi związkami *ex vivo* może okazać się przydatna w wyborze skutecznej formy terapii PBL.

Proapoptotic activity of purine analogues combined with cyclophosphamide in chronic lymphocytic leukaemia cells

Background: Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is considered as a haematological cancer involving deregulated apoptosis and over-proliferation of a small subset of malignant lymphocytes. Despite advances in therapy of this cancer, CLL still remains incurable with standard approaches. Thus there remains a need for more effective forms of therapy in both the upfront and relapsed setting.

The aim of the study was to compare *in vivo* and *ex vivo* response of mononuclear cells (MNC) obtained from blood of CLL patients to CC or FC treatment, and to evaluate the proapoptotic activity of a cyclin-dependent kinase inhibitor, R-roscovitine, applied *ex vivo* alone or along with mafosfamide in MNC.

Material and methods: For the *in vivo* study we used MNC isolated from blood of CLL patients before and during CC or FC therapy, and two weeks after the last drug administration. For the *ex vivo* research MNC were obtained from CLL patients before therapy and exposed to purine analogues and mafosfamide used solely, and their combinations. Cell viability was assessed cytometrically. Moreover, the expression of several apoptosis-related proteins by Western blot and the fragmentation and content of DNA in the cells treated with tested agents were analysed.

[23]

Proapoptotyczna aktywność analogów purynowych w kombinacji z cyklofosfamidem w komórkach przewlekłej białaczki limfocytowej

Jolanta D. Żołnierczyk¹, Arleta Kaźmierczuk¹, Jerzy Z. Błoński², Małgorzata Rogalińska¹, Tadeusz Robak², Józefa Węsierska-Gądek³, Zofia M. Kiliańska¹

¹Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

²Katedra Hematologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

³Katedra Medycyny I, Uniwersytet Medyczny w Wiedniu

Wstęp: Przewlekłą białaczkę limfocytową (PBL) cechuje defekt w apoptozie nowotworowych limfocytów B oraz nadmierna proliferacja niewielkiej populacji komórek zlokalizowanych w ośrodkach namnażania limfocytów. Brak skutecznego sposobu leczenia PBL skłania do poszukiwania nowych terapii, m.in. zastosowania inhibitorów kinaz cyklu komórkowego, np. R-roskowityny.

Conclusions:

1. Both CC and FC regimens induce apoptosis in leukaemic MNC *in vivo*, but its rate is lower than that under *ex vivo* conditions.
2. *R*-roscovitine seems to be a very useful agent in CLL treatment. It shows higher proapoptotic activity in leukaemic MNC but lower cytotoxic effect in normal MNC than other purine analogues.
3. Analysis of apoptosis-related protein expression and susceptibility of MNC to used agents *ex vivo* may serve as a tool for choosing therapy individually fitted to the patient

[24]

Zróźnicowana wrażliwość komórek nowotworowych i prawidłowych na elektroporację

Nina Skořucka¹, Małgorzata Daczevska²,
Jolanta Saczko¹, Julita Kulbacka¹,
Agnieszka Chwiłkowska¹, Anna Choromańska¹,
Małgorzata Kotulska³

¹Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej,
Akademia Medyczna we Wrocławiu

²Zakład Biologii Rozwoju Zwierząt, Instytut Zoologiczny,
Uniwersytet Wrocławski

³Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej,
Politechnika Wroclawska

Wstęp: Elektroporacja (EP) to tworzenie w błonie komórkowej elektroporów, dzięki którym więcej cząstek może wnikać do wnętrza komórki. Elektroporacja zachodzi podczas oddziaływania na komórki polem elektrycznym w zakresie 100–2000 V/cm. Zjawisko to ma duże zastosowanie w biologii i medycynie, chociaż mechanizm ten nie został dobrze poznany. Coraz częściej elektroporacja znajduje zastosowanie przy wspomaganiu chemioterapii, jako elektrochemioterapia, która indukuje zwiększone wchłanianie leków cytostatycznych.

Cel pracy: Sprawdzenie wpływu elektroporacji o różnych parametrach na przeżywalność i ultrastrukturę komórek.

Materiał i metody: Do badań użyto ludzkiej linii komórek czerniaka Me-45 oraz prawidłowe fibroblasty z hodowli pierwotnej izolowane z skóry ludzkiego. W doświadczeniach zastosowano następujące parametry elektroporacji: 100, 400, 700, 1000, 1300 i 1600 V/cm; 50 i 100 μ s przy 5 impulsach dla każdego przypadku. Przeżywalność komórek po elektroporacji oceniano testem MTT, natomiast ultrastrukturę komórek obserwowano w mikroskopie elektronowym (Zeiss EM 900).

Wyniki i wnioski: Wrażliwość obu linii komórkowych jest zależna od zastosowanych parametrów elektroporacji. Efekt cytotoksyczny był zależny od warunków elektroporacji. Nie stwierdzono istotnych zmian w obrazie ultrastrukturalnym. Dobór właściwych warunków EP jest niezwykle istotny przy zastosowaniu elektrochemioterapii.

Different sensitivity of malignant and normal cells on electroporation (EP)

Background: A high electric field applied to the plasma membrane affects organization of the lipid molecules, generating transient hydrophilic electropores, which are capable of conducting various non-permeant molecules into the cell. The new pathway into the cytoplasm is non-selective and only controlled by the electric field parameters. Therefore, their geometry, conduction properties, and dynamic characteristics still have not been fully characterized. Nevertheless, electroporation (EP) is widely used in biology and medicine. Recently, a new application of electroporation has been developed – electrochemotherapy (ECT). In ECT, cellular absorption of a poorly transported drug can be greatly enhanced following induction of electropores by local application of electric pulses to tumour tissue.

The aim of the study was to assess the influence of electroporation on malignant and normal cells.

Material and methods: Two cell lines were used: human malignant melanoma Me-45 and normal human gingival fibroblast from primary culture. In our study different parameters of electroporation were applied: 100, 400, 700, 1000, 1300 and 1600 V/cm; 50 and 100 s in 5 impulses for every case. The viability of cells after electroporation was estimated by MTT assay. The ultrastructural analysis was performed by electron emission microscope (Zeiss EM 900).

Results and Conclusion: The sensitivity of the two lines and the cytotoxicity effect were dependent on the electroporation conditions. Significant ultrastructural changes were not observed. The selection of electroporation parameters is very important in proper application of electrochemotherapy.

[25]

Wpływ promotorów wchłaniania na tworzenie związków porfirynowych w skórze myszy po miejscowym stosowaniu estru metylowego kwasu 5-aminolewulinowego, naturalnego prekursora związków porfirynowych stosowanego w terapii fotodynamicznej nowotworów – badania metodami bezpośredniej fluorescencji *in vivo* i ekstrakcji z tkanek

Andrzej M. Bugaj¹, Asta Juzeniene¹, Petras Juzenas¹,
Vladimir Iani², Li-Wei Ma¹, Johan Moan^{1,2}

¹Department of Radiation Biology, Institute for Cancer Research, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center, Montebello N-0310, Oslo, Norway

²Department of Physics, University of Oslo, Oslo N-0316, Norway

Badano wpływ promotorów wchłaniania, takich jak dimetylosulfotlenek (DMSO), 1-[2-(decylotio)etylo]-

azacyklopentan-2-on (HPE-101) oraz Labrafac® CC, Labrafil®, Labrasol® i Transcutol® (mieszanki triglicerydów kwasu kaprylowego i kaprynowego) w stężeniu 10-procentowym, na powstawanie związków porfiryńowych w skórze zdrowych myszy po zewnętrznym stosowaniu maści na podłożu Unguentum M, zawierających ester metylowy kwasu 5-aminolewulinowego (MAL), naturalnego prekursora związków porfiryńowych, stosowanego w terapii fotodynamicznej nowotworów. Stężenie związków porfiryńowych w skórze myszy oznaczano metodą bezpośredniego pomiaru fluorescencji *in vivo*. Uzyskane wyniki dowodzą, że wszystkie badane promotory wchłaniania zwiększają tworzenie związków porfiryńowych w skórze myszy poprzez promowanie wchłaniania MAL jedynie w przypadku maści 2-procentowej, podczas gdy w przypadku maści 10- i 20-procentowej tylko DMSO, HPE-101 i Labrafac® CC nasilały powstawanie związków porfiryńowych. W przypadku wszystkich badanych stężeń MAL, DMSO wykazywał najsilniejsze działanie promujące, podobnie jak HPE-101. Metodą ekstrakcji z tkanki skórnej wykazano, że 10-procentowa maść MAL zawierająca 10% DMSO po 4 godz. pozostawienia na skórze zwiększa stężenie związków porfiryńowych czterokrotnie w porównaniu z 10-procentową maścią MAL niezawierającą DMSO. Dodatek 10% HPE-101 lub 10% Labrafac® CC powodował zwiększenie stężenia porfiryń w skórze w miejscu działania maści odpowiednio 2,5-krotnie i 2-krotnie w porównaniu z działaniem maści niezawierających promotorów wchłaniania. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy działaniem 10-procentowej maści MAL zawierających 10% HPE-101 lub Labrafac® CC. Wyniki uzyskane po upływie 24 godz. przy zastosowaniu tych samych maści wykazały znaczne zmniejszenie tworzenia związków porfiryńowych w porównaniu z wynikami uzyskanymi po upływie 4 godz. W tym przypadku stężenia tych związków w skórze myszy były podobne dla wszystkich badanych maści. Otrzymane wyniki sugerują, że nowy promotor wchłaniania Labrafac® CC może być dodawany do maści MAL w celu zwiększania penetracji tego związku z maści o stężeniu 2–20% na podłożu Unguentum M, co powoduje zwiększenie tworzenia związków porfiryńowych w skórze.

The effect of skin permeation enhancers on the formation of porphyrins in mouse skin during topical application of the methyl ester of 5-aminolevulinic acid, natural precursor of porphyrins applied in cancer photodynamic therapy: a fluorescence and extraction study

The influence of skin permeation enhancers, such as dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1-[2-(decylthio)ethyl]azacyklopentan-2-one (HPE-101), Labrafac® CC, Labrafil®, Labrasol® and Transcutol® (mixtures of caprylic and capric acid triglycerides) in a concentration of 10% (wt./wt.) on the formation of porphyrins in normal mouse skin from topical application of Unguentum M cre-

ams with methyl 5-aminolevulinic acid (MAL), ester of 5-aminolevulinic acid, natural precursor of porphyrins, applied in photodynamic therapy of cancer, was studied. The concentration of porphyrins in mouse skin was determined by direct fluorescence measurements. The results show that the studied permeation enhancers increase the formation of porphyrins, and, therefore, also the skin penetration of 2% MAL, whereas for 10% and 20% (wt./wt.) MAL concentrations only DMSO, HPE-101 and Labrafac® CC increased the porphyrin formation. At all studied MAL concentrations DMSO gave the largest enhancing effect, similarly to that of HPE-101. It was found by an extraction method that a 10% MAL cream with 10% DMSO for 4 h increased the concentration of porphyrin about four-fold compared with 10% MAL cream alone. The presence of 10% HPE-101 or 10% Labrafac® CC in the 10% MAL cream increased the porphyrin concentration in the area of application about 2.5- and 2-fold, respectively, as compared with MAL cream without enhancers. No statistically significant difference was found between the effects of the creams containing 10% MAL with 10% HPE-101 or 10% Labrafac® CC. The results obtained after 24 h of mouse skin treatment with the same creams showed a large decrease of porphyrin formation in comparison with results obtained after 4 h. All porphyrin concentrations measured after this time of MAL cream application were similar. This suggests that the new penetration enhancer Labrafac® CC in creams with MAL may be used to increase the penetration of MAL through the skin from 2–20% with Unguentum M creams, and at the same time increase production of porphyrin in the skin.

[26]

Ekspresja osteopontyny w nowotworowych komórkach macierzystych glejaków

Magdalena Kijewska¹, Renata Polakowska²,
Zbigniew Korwek³, Bożena Kamińska¹

¹Pracownia Regulacji Transkrypcji, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie

²Universite Lille 2, Faculte de Medecine, Lille, France

³Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie

Wstęp: Glejaki złośliwe należą do najczęstszych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego i tworzą rozległe guzy. Wykazano, że jednym z białek o podwyższonym stopniu ekspresji w guzie w stosunku do zdrowej tkanki jest osteopontyna (OPN), a ponadto, że stopień ekspresji OPN koreluje ze stopniem złośliwości glejaka i gorszym rokowaniem dla pacjentów. Postuluje się, że glejaki wywodzą się z nowotworowych komórek macierzystych (*cancer stem cells* – CSC), które mogą być odpowiedzialne za powstawanie nowotworu, jego rozwój i oporność na terapię.

Cel pracy: Opracowanie metod izolacji CSC z linii T98G, U87, LN18 glejaków i określenie poziomu ekspresji OPN w tych komórkach.

Materiał i metody: CSC izolowane były dwiema niezależnymi metodami. W pierwszej metodzie komórki inkubowano z roztworem rhodaminy 123 (test wyrzucania rhodaminy), następnie komórki były sortowane za pomocą sortera FACS Aria na frakcje pozytywne i negatywne pod względem obecności rhodaminy. Frakcję rhod(-) traktowano jako wzbogaconą w populację CSC. Kolejną metodą izolacji CSC zakładano, że CSC wykazują obniżoną ekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (Polakowska i wsp., 2009). Komórki inkubowano z przeciwciałem na EGFR i sortowano na frakcje EGFR(+) i EGFR(-). Z uzyskanych frakcji komórek izolowano RNA i za pomocą real-time PCR oceniano ilościowo ekspresję genów markerowych *Nanog* i *Oct3/4* oraz osteopontyny.

Wyniki i wnioski: Uzyskane frakcje komórkowe EGFR(-) i rhod(-) charakteryzowały się podwyższoną ekspresją genów *Nanog*, *Oct3/4* w porównaniu z frakcjami odpowiednio EGFR(+) i rhod(+), co potwierdza obecność CSC w tych frakcjach. We frakcjach EGFR(-) i rhod(-) wykazano kilkudziesięciokrotnie lub kilkasetkrotnie wyższą ekspresję OPN. Wzmożona ekspresja OPN w CSC wskazuje na nieznaną dotąd rolę tego białka w patologii gliaków.

Osteopontin expression in glioma cancer stem cells

Background: Malignant gliomas are the most common primary brain tumours, forming large, infiltrative tumour bulks. It was shown that one of the proteins, expressed in the tumour mass, but not in the healthy tissue, is osteopontin, OPN. Furthermore, it was demonstrated that expression of osteopontin correlates with malignancy grade of gliomas and poor patient prognosis. It is believed that cancer stem cells (CSC) are tumour-initiating cells for gliomas and that these cells are responsible for gliomas' resistance to chemotherapy.

Aim of the study: The goal of the project is isolation of CSC from T98G, LN18 and U87 human cell lines and determination of OPN expression in these cell populations.

Material and methods: Two independent methods for identification of glioma CSC were employed. Firstly, the rhodamine 123 (rhod123) exclusion assay was performed. Cells were incubated with rhod123 and sorted for a cell population negative or positive for rhod123 staining using FACS Aria. The negative fraction was considered as enriched in CSC. The second method for CSC identification was based on staining with anti-EGFR antibody, as it has been shown that cells which are EGFR negative are enriched in CSC (Polakowska et al., 2009). Cells negative or positive for EGFR expression were isolated using sorting with FACS Aria. RNA from isolated cell populations was collected and expression of stem cell markers *Nanog* and *Oct3/4*, as well as OPN, was determined by RT-qPCR.

Results and Conclusions: Cells from EGFR(-) and rhod(-) fractions display high expression of *Nanog* and *Oct3/4*, which confirms the presence of CSC in these cell populations. Furthermore, these cells can also be characterized by many-fold higher expression of OPN, when compared to EGFR(+) and rhod(+) fractions. Elevated expression of

OPN in CSC suggests a novel and interesting role of OPN in glioma pathology.

[27]

Analiza niestabilności mikrosatelitarnej w sporadycznych rakach jelita grubego oraz ocena przydatności markera BAT26 w wykrywaniu fenotypu MSI-H

Agnieszka Klimkowska, Piotr Wójcik, Krzysztof Okoń, Romana Tomaszewska, Dariusz Adamek

Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum w Krakowie

Wstęp: Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) jest markerem fenotypu mutatorowego. Występuje w 15% sporadycznych raków jelita grubego. Wciąż poszukuje się markera, który umożliwiłby jednoznacznie ocenę fenotypu MSI. Ocena statusu MSI może służyć jako marker diagnostyczny w celu określenia rokowania w rakach jelita grubego. Raki MSI-H są częściej prawostronne, mają zwiększoną produkcję śluzu do podścieliska, niższy stopień zróżnicowania, mniejsze ryzyko wystąpienia przerzutów oraz lepsze rokowanie. Pacjenci z rakiem MSI-H nie odnoszą korzyści z leczenia 5FU, ale odnoszą większe korzyści z terapii skojarzonej z irynotekanem.

Cel pracy: Ocena statusu MSI-H i przydatności markera BAT26 w celu wykrywania MSI-H w sporadycznych rakach jelita grubego.

Materiał i metody: Oceny MSI dokonano w 163 przypadkach raków jelita grubego z użyciem markerów: APC, TP53, BAX, BTRII i BAT26. Produkty PCR rozdzielono na żelu poliakrylamidowym. Przypadki z co najmniej jednym niestabilnym *locus* analizowano w sekwenatorze ABI310 z użyciem markerów: APC, TP53 dimer, TP53 pentamer, DCC, NM23, MLH1, MSH2, HPC1 i MET. Wyniki analizowano, porównując prążki i krzywe dla markerów z DNA z tkanki nowotworu oraz z DNA z tkanki spoza guza.

Wyniki: MSI-H wykryto w 15 przypadkach (9,2%); 93,3% raków MSI-H miało niestabilność w markerze BAT26. Raki te w porównaniu ze stabilnymi mikrosatelitarnie wykazywały różnice w wielu cechach. Częściej były związane z lokalizacją prawostronną (66,7% MSI-H vs 20,4% MSS), obecnością komponenty śluzowej (40% MSI-H vs 16,8% MSS), niższym stopniem zróżnicowania (20% MSI-H vs 10,1% MSS) i brakiem przerzutów odległych w momencie wykrycia.

Wnioski: Raki MSI-H są odrębną grupą sporadycznych raków jelita grubego, a marker BAT26 wydaje się najlepszym kandydatem do określania tej grupy.

Microsatellite instability analysis in sporadic colorectal cancer and evaluation of the usefulness of BAT26 marker for the detection of MSI-H

Background: Microsatellite instability (MSI) is a hallmark of mutator phenotype. About 15% of sporadic colorectal cancers show MSI. There is still a need to find a marker which would enable the unequivocal detection of MSI. MSI might be a useful predictive and prognostic marker in colorectal cancer. MSI-H colorectal tumours are usually right-sided, have a mucinous histology, poor differentiation, lower frequency of metastases and better prognosis. Patients with MSI-H tumours do not benefit from 5FU treatment, but may benefit from adjuvant therapy with irinotecan.

Aim of the study: Evaluation of MSI-H status and the usefulness of BAT26 as a marker for the detection of this group of tumours.

Material and methods: MSI status was examined in 163 sporadic colorectal cancers with a panel of markers: *APC*, *TP53*, *BAX*, *BATRII* and *BAT26*. PCR products were separated on a polyacrylamide gel. All the cases with any, even a single unstable locus were subjected to analysis in an ABI310 sequencer using markers: *APC*, *TP53* dimer, *TP53* pentamer, *DCC*, *NM23*, *MLH1*, *MSH2*, *HPC1* and *MET*. The results were analysed for a given tumour in comparison to normal tissue.

Results: MSI was found in 15 cases (9.2%). 93.3% of MSI-H cases had an instability in BAT26 marker. MSI-H tumours differed from microsatellite stable tumours in different aspects. Of all MSI-H tumours 66.7% were right-sided, in contrast to MSS, of which only 20.4% were right-sided. 40% of MSI-H and 16.8% of MSS had a mucinous component. 20% of MSI-H and 10.1% of MSS were poorly differentiated. Moreover, MSI-H did not show distant metastases.

Conclusions: MSI-H tumours form a distinct group of sporadic colorectal cancer. BAT26 seems to be the best candidate to identify MSI-H cancers.

dukt transgeny. Warunki, w jakich produkt obcego genu wprowadzonego do HSC zaindukują lub zablokują odpowiedź immunologiczną, nie zostały jednak dobrze poznane.

Cel pracy: Analiza spontanicznej oraz zaindukowanej odpowiedzi immunologicznej na produkt transgeny w mysim modelu terapii genowej.

Materiał i metody: Macierzyste komórki hematopoetyczne wyizolowane od myszy Balb/c i zmodyfikowane lentiwirusem kodującym EGFP były przeszczepiane do napromienionych myszy F1 C57BL/6J × Balb/c. Dwanaście tygodni po przeszczepie myszy były swoiście lub nieswoiście immunizowane, a następnie badano odpowiedź immunologiczną na produkt transgeny.

Wyniki: Po przeszczepie ekspresję EGFP wykazywało 5–15% leukocytów krwi obwodowej. Ekspresja transgeny u nieimmunizowanych myszy utrzymywała się na tym poziomie do końca trwania eksperymentu. U żadnego z badanych zwierząt nie wykryto spontanicznej, swoistej, komórkowej ani humoralnej odpowiedzi przeciw EGFP. Swoista immunizacja adenowirusem Ad.EGFP oraz nieswoista adenowirusem Ad.LacZ spowodowały częściową eliminację komórek wykazujących ekspresję EGFP. Zjawisku temu towarzyszyła obecność przeciwciał anty-EGFP oraz rozwój odpowiedzi typu komórkowego. Mimo takich wykładników odpowiedzi immunologicznej na produkt transgeny myszy były niezdolne do odrzucenia syngenicznych komórek nowotworowych wykazujących ekspresję EGFP.

Wnioski: Mimo mierzalnej odpowiedzi immunologicznej w postaci redukcji liczby komórek EGFP⁺, obecności przeciwciał i swoistych limfocytów T przeszczep genetycznie zmodyfikowanych HSC indukuje stan funkcjonalnej tolerancji na produkt transgeny. Wyniki te mogą mieć znaczenie przy projektowaniu przedklinicznych oraz klinicznych badań w terapii genowej oraz do zrozumienia mechanizmów autoagresji, a także aloreaktywności w transplantologii.

Gene-modified haematopoietic stem cell transplant induces functional tolerance to the transgene product

Background: Introduction of genes encoding foreign antigens into haematopoietic stem cells may result either in a tolerant state or induction of immune responses. However, the exact conditions for products of foreign genes introduced into haematopoietic stem cells to induce or block host immune responses is not well understood.

Aim of the study: We sought to evaluate spontaneous and vaccine-induced immune responses to the transgene product in a gene therapy model.

Material and methods: Haematopoietic stem cells isolated from female Balb/c mice and genetically modified with EGFP were transplanted into lethally irradiated female C57BL/6J × Balb/c mice. Twelve weeks post-transplantation, mice underwent specific or unspecific immunization and immune responses to EGFP were examined.

Results: Following transplantation levels of EGFP expressing cells peaked at 5% to 15% of all blood

[28]

Przeszczep genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych indukuje funkcjonalną tolerancję na produkt transgeny

Eliza P. Kwiatkowska, Jerzy Kierzkowski, Andrzej Mackiewicz, Dariusz W. Kowalczyk

Zakład Immunologii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wstęp: Wprowadzenie genów kodujących obce białka do macierzystych komórek hematopoetycznych może prowadzić do rozwinięcia się stanu tolerancji immunologicznej lub indukcji odpowiedzi układu immunologicznego na pro-

circulating cells 12 weeks after transplantation and were stable thereafter. None of the animals studied demonstrated any spontaneous anti-EGFP specific cytotoxic T lymphocyte or antibody responses. Specific antigen immunization with Ad.EGFP recombinant or sham vaccination with control Ad.LacZ vector led to partial elimination of EGFP positive cells, associated with appearance of anti-EGFP humoral and cellular immune responses. Despite the markers of specific immune reactions these immune responses appeared to be impaired, as demonstrated by host inability to reject syngeneic tumours expressing EGFP antigens.

Conclusions: Despite observed features of antigen responses such as reduced numbers of EGFP positive cells, presence of specific antibodies and T-cells, gene-modified HSC transplant induces functional tolerance to the transgene derived product. These findings are important for the design of future preclinical and clinical gene therapy trials as well as for understanding mechanisms leading to autoimmunity and/or alloreactivity in transplantation protocols.

[29]

Efektywność leczenia systemowego złośliwego międzybłoniaka opłucnej w materiale Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii

Maciej Bryl, Łukasz Szychalski, Rodryg Ramlau, Aleksander Barinow-Wojewódzki, Wojciech Dyszkiewicz

Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu

Wstęp: Złośliwy międzybłoniak to najczęstszy pierwotny złośliwy nowotwór opłucnej. Wywodzi się z komórek międzybłonka i oprócz opłucnej występuje w innych, ale dużo rzadszych lokalizacjach, tj. otrzewnej, osierdziu i ostonce pochwowej jądra. Dane pochodzące z Krajowego Rejestru Nowotworów mówiące o zachorowaniach: 1999 r. – 132 (K: 59, M: 73), 2006 r. – 195 (K: 73, M: 122), 2007 r. – 211 (K: 68, M: 143), oraz o zgonach: 1999 r. – 58 (K: 16, M: 42), 2006 r. – 115 (K: 48, M: 67), 2007 r. – 144 (K: 53, M: 91). Ponad 95% tych przypadków stanowi złośliwy międzybłoniak opłucnej, gdyż w pozostałych lokalizacjach występuje on w kilku przypadkach na rok. Do czynników etiologicznych zalicza się przede wszystkim azbest (głównie krocydolit) oraz palenie tytoniu, ponadto wirus SV 40 (występował on w szczepionkach przeciw *polio*).

Cel pracy: Wykazanie, że leczenie systemowe złośliwego międzybłoniaka opłucnej jest postępowaniem wartościowym.

Materiał i metody: Praca powstała na podstawie analizy retrospektywnej 36 przypadków leczonych na Oddziale Onkologii Klinicznej Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu. Chorzy byli włączani do oceny w latach 1999–2008, prowadzono na bieżąco obserwację efektów leczenia, zarówno wczesnych, jak

i odległych. Na podstawie zebranych danych określona zostanie efektywność wczesna postępowania systemowego, poprzez oszacowanie odsetka odpowiedzi i korzyści klinicznej (CR + PR + SD > 3 miesięcy), i ocena odległych wyników leczenia, poprzez ocenę mediany przeżycia całkowitego i odsetków przeżyć rocznego i dwuletniego i porównanie ich z historycznymi wynikami leczenia raka płuca, żołądka, nerki.

Wyniki analizy zostaną zaprezentowane na Kongresie.

Effectiveness of systemic treatment of malignant pleural mesothelioma in files of the Greater Poland Centre of Pulmonology and Thoracic Surgery

Background: Malignant pleural mesothelioma is the most common primary malignant neoplasm of pleura. It is derived from mesothelial cells and besides pleura it can appear in other but much rarer locations, i.e.: peritoneum, pericardium and tunica vaginalis testis. Data from the Polish National Cancer Registry show morbidity as follows: 1999 – 132 cases (F: 59, M: 73) 2006 – 195 (F: 73, M: 122), 2007 – 211 (F: 68, M: 143) and mortality: 1999 – 58 (F: 16, M: 42), 2006 – 115 (F: 48, M: 67), 2007 – 144 (F: 53, M: 91). More than 95% of those cases are malignant pleural mesothelioma, because all other locations occur in several cases a year. Aetiological factors are mainly asbestos (crocidolite), tobacco smoking and SV40 virus (found in some polio vaccines).

Material and methods: This is retrospective analysis of 36 cases treated in the Oncology Department of the Greater Poland Centre of Pulmonology and Thoracic Surgery. Patients were included in the evaluation between 1999 and 2008 and observation of the effectiveness of treatment outcomes, both early and remote, were performed on an ongoing basis. Early treatment effectiveness will be evaluated by estimating the objective response rate and clinical benefit rate (CR + PR + SD > 3 months). Remote outcomes will be evaluated by median overall survival and one- and two-year survival rates compared with historical data concerning lung, stomach and kidney cancer.

Results will be presented at the Congress.

[30]

Rak jelita grubego u chorych geriatrycznych – analiza sposobu wykrycia nowotworu, przebiegu i wczesnych wyników leczenia operacyjnego

Renata Chrzan, Tomasz Kulpa

Oddział Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej, Okręgowy Szpital Kolejowy we Wrocławiu

Wstęp: Rak jelita grubego (RJG) jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u ludzi powyżej 75. roku życia. Ocenia się, że średni wiek chorych w momencie usta-

lenia rozpoznania raka okrężnicy wynosi 72 lata, w chwili rozpoznania raka odbytnicy 70 lat, a 18–25% chorych ma więcej niż 80 lat. W latach 30. XX w. pojawiły się pierwsze doniesienia o leczeniu operacyjnym chorych w wieku powyżej 70 lat, wykazujące, że tacy chorzy mogą być operowani z akceptowalnym ryzykiem. Liczba chorych w wieku powyżej 70 lat operowanych z powodu RJG wzrosła w czasie kolejnych dziesięcioleci. Odsetek chorych z tej grupy wiekowej operowanych w latach 40. XX w., wynoszący 15%, zwiększył się do 41% w latach 70. XX w., do 49% w roku 1986 i do 60% w 1997 r. W pracach z ostatnich 15 lat dotyczących chorych na RJG powyżej 80. roku życia odsetek operowanych pacjentów waha się w granicach 57–91%. U tych chorych występują często schorzenia kardiologiczne, powodując zwiększenie ryzyka okołoperacyjnego.

Cel pracy: Analiza sposobu wykrycia nowotworu, przebiegu i wczesnych wyników leczenia operacyjnego raka jelita grubego u chorych geriatrycznych.

Materiał i metody: Analizowano dokumentację medyczną 103 pacjentów (51 kobiet i 52 mężczyzn) hospitalizowanych na tutejszym oddziale chirurgii ogólnej i onkologicznej od stycznia 2008 r. do stycznia 2010 r. z powodu raka jelita grubego. Średnia wieku wyniosła 65,5 roku.

Wyniki: Przed zabiegiem operacyjnym kolonoskopię wraz z badaniem histopatologicznym potwierdzającym obecność RJG wykonano u 82 chorych (40 kobiet i 42 mężczyzn). U pozostałych chorych 15 kobiet i 6 mężczyzn RJG został wykryty podczas zabiegu operacyjnego z powodu niedrożności. Najczęstszym wskazaniem do wykonania badania endoskopowego były: krwawienie i niedokrwistość u ok. 50% badanych, podejrzenie guza w badaniu ultrasonograficznym u ok. 10% skierowanych. Żaden chory nie był skierowany na badanie przesiewowe. Liczba kobiet i mężczyzn poddanych zabiegowi operacyjnemu z powodu RJG w badaniu autorów jest taka sama. U 45% chorych RJG występował w prawej połowie okrężnicy. U 83% pacjentów występowały schorzenia kardiologiczne. Resekcję leczącą wykonano u 68% chorych, resekcję paliatywną u 6%, a zabieg odbarczający u 26% chorych. Śmiertelność wśród chorych poddanych zabiegom operacyjnym wyniosła 14%. Wśród innych obserwowanych powikłań wystąpiły: niewydolność oddechowa – 13%, nieszczelność zespolenia – 8%, zakażenia ogólne – 9%.

Wnioski: Sposób wykrycia nowotworu, przebiegu i wczesnych wyników nie odbiega od danych polskich. Rozpoznanie w późniejszych stadiach choroby spowodowane jest niechęcią i trudnym dostępem do badań diagnostycznych oraz obawami pacjentów przed leczeniem chirurgicznym. Obserwacja po leczeniu w jednostce specjalistycznej jest utrudniona ze względu na wiek, warunki socjoekonomiczne i schorzenia współistniejące.

age age of patient is 72 years at the time of diagnosis of colon cancer, 70 years at the time of diagnosis of rectal cancer, and 18–20% of patients are older than 80 years. In the 1930s appeared the first reports about operative treatment in patients aged over 70 years, showing that such patients can be operated on with acceptable risk. The number of patients aged over 70 years operated on because of colon cancer grew during the next decades. The percentage of patients from this age group treated surgically rose from 15% in the 1940s to 41% in the 1970s, 49% in 1986, and 60% in 1997. In papers from the last 15 years concerning colon cancer patients aged over 80 years the percentage of patients operated on varies from 57 to 91%. Such patients often have cardiologic diseases raising operation risk.

Aim of the study is to evaluate the way of cancer detection and course and early results of operative treatment in geriatric patients.

Material and methods: Medical documentation of 103 patients (51 women and 52 men) operated on in our ward in the period from January 2008 to January 2010 were analysed. Average age was 65.5 years.

Results: Colonoscopy with histopathological examination confirming presence of cancer was performed in 82 patients (40 women and 42 men) before the operation. In the others (15 women and 6 men) colon cancer was discovered during the operative procedure because of ileus. The most frequent indications for endoscopic examination were: bleeding and anaemia in approximately 50% of patients, suspicion of tumour in ultrasonography in approximately 10% of patients. Nobody had screening before. The numbers of women and men operated on because of colon cancer in our study are equal. In 45% of patients the cancer was located in the right half of the colon. In 83% of patients cardiologic diseases were present. Curative resection was performed in 68% of patients, palliative resection in 6%, and decompressed procedure in 26%. Surgical mortality was 14%. We observed such complications as: respiratory failure – 13%, leak of anastomosis – 8%, general infections – 9%.

Conclusions: Methods of cancer detection, course and early results are similar to other Polish data. Diagnosis in the late stage of disease confirms distaste and fears of patients because of surgical treatment and also difficult access to diagnostic examinations. Observation after the treatment is difficult because of age, social and economic conditions and co-existing diseases.

Colon cancer in geriatric patients – evaluation of way of cancer detection, course and early results of operative treatment

Background: Colon cancer is the most frequent cancer in people aged over 75 years. It is evaluated that the aver-

[31]

Ocena manualnej mobilizacji tkanek miękkich u chorych po zabiegach onkologicznych na szyi z wykorzystaniem badań USG

Magdalena Kordylewska¹, Sławomir Marszałek^{1,2},
Wojciech Golusiński¹

¹Oddział Chirurgii Głowy i Szyi i Onkologii Laryngologicznej, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu; Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Zakład Lekkiej Atletyki, Akademia Wychowania Fizycznego w Poznaniu

Wstęp: W wyniku zabiegów chirurgicznych wykonywanych w obrębie szyi obserwuje się wiele zaburzeń funkcjonalnych szyi, tułowia i kończyn górnych. Najczęściej występuje zwiększenie spoczynkowego napięcia i osłabienie mięśni okolicy szyi i obręczy barkowej. Objawy te są związane z bliznami powstałymi po operacji. Mają one istotny wpływ na zwiększenie napięcia w obrębie powięzi tułowia, szyi, barków i kończyn górnych. Blizny zmniejszają również fizjologiczne zakresy ruchów w odcinku szyjnym kręgosłupa oraz stawach obręczy barkowej. Są odpowiedzialne za powstanie obrzęków limfatycznych, zespołów bólowych i parestezji.

Cel pracy: Ultrasonograficzna oraz fizjoterapeutyczna ocena manualnych mobilizacji tkanek miękkich u chorych po operacjach onkologicznych na szyi.

Materiał i metody: Analizie poddano chorych po zabiegach chirurgicznych na szyi, zgłaszających objawy bólowe w okolicy blizn pooperacyjnych. Przed zastosowaniem i po zastosowaniu manualnych technik rozluźniania tkanek miękkich związanych pośrednio i bezpośrednio z blizną pooperacyjną wykonywano badanie ultrasonograficzne, ocenę skali bólu VAS oraz pomiar zakresów ruchów w odcinku szyjnym kręgosłupa. W badaniu sonograficznym oceniano lokalizację i rozległość powstałych zmian tkankowych, kierunek ich penetracji do tkanek głębszych.

Wyniki: W wyniku zastosowania terapii tkanek miękkich w obrazie ultrasonograficznym wykazano istotne zmniejszenie się obszarów zmienionych bliznowato. Zaobserwowano zmniejszenie się objawów bólowych związanych z powstałymi bliznami pooperacyjnymi oraz z towarzyszącymi im restrykcjami tkankowymi. Wykazano także poprawę zakresów ruchów w odcinku szyjnym kręgosłupa.

Wnioski: Zastosowanie manualnych technik rozluźniania tkanek miękkich zmienionych bliznowato ma istotny wpływ na zmniejszenie dolegliwości związanych z przebytym zabiegiem. Wykonane przed terapią oraz po niej badanie ultrasonograficzne pozwala obiektywnie ocenić rozległość zmian bliznowatych po operacjach onkologicznych i radioterapii oraz zobiektywizować wynik zastosowanych technik manualnych.

The evaluation of manual techniques of soft tissues in neck cancer patients by US examination

Background: We can observe many functional disorders of the neck, trunk and upper extremities as the result of operational procedures on the neck. The most common are: increase of resting tension and strength reduction of muscles in the neck area and shoulder girdle. These symptoms are connected with the post-operational scars. They have a significant influence on tension in the trunk fascia, neck, shoulders and upper extremities. The scars can reduce the scope of physiological movement in the neck segment and shoulder girdle joint. They are also responsible for lymphatic oedema, pain syndrome and paraesthesia.

Aim of the study: Ultrasonographic and physiotherapeutic evaluation of manual techniques of soft tissue mobilization in neck cancer patients after neck operation.

Material and methods: The material comprised patients after surgical procedures on the neck with pain symptoms in the area of post-operational scars. Before and after the implementation of soft tissue manual relaxation techniques, ultrasonography (US) examination, assessment of pain using the VAS scale, and movement scope measurement in the neck segment were done. During the US examination the scope, location and direction of deep tissue penetration of tissue changes were estimated.

Results: As a result of soft tissue therapy a significant decrease of scar area was revealed in the US examination. Additionally a decrease of pain symptoms connected with post-operational scars and accompanying tissue restrictions was observed. An improvement of movement scope in the neck segment was also demonstrated.

Conclusions: Use of manual techniques of soft tissue relaxation has a significant influence on decreasing ailments connected with the operational procedure. US examination done before and after the operation can objectively estimate the scope of scars after oncological procedures and in radiotherapy. It can also objectify the result of manual techniques.

[32]

Ocena wyników badania klinicznego I/II fazy genetycznej leczniczej szczepionki czerniakowej modyfikowanej genami Hyper-IL-6 i GM-CSF

Jacek Mackiewicz^{1,2}, Aldona Karczevska-Dzionk¹,
Piotr J. Wysocki^{1,2}, Dariusz Iżycki^{1,2}, Maria Łaciak¹,
Małgorzata Kapcińska¹, Renata Bliźniak¹,
Maciej Wiznerowicz¹, Julian Malicki¹,
Andrzej Mackiewicz^{1,2}

¹Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

²Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Cel badania: Ocena wpływu immunizacji GMTV-H6/GM-CSF, GMTV-H6 oraz szczepionki składającej się z komórek genetycznie niemodyfikowanych na odpowiedzi kliniczne u chorych na czerniaka z mierzalnymi przerzutami; ocena toksyczności i całkowitych przeżyć (OS) chorych.

Materiał i metody: Do pięciu ramion badania zrandomizowano 63 chorych: 1) immunizacja GMTV – H6/GMCSF w dawce: 1×10^7 komórek; 2) 5×10^7 ; 3) $2,5 \times 10^8$; 4) immunizacja szczepionką składającą się z komórek niemodyfikowanych (5×10^7) oraz 5) GMTV-H6 (5×10^7). Odpowiedzi kliniczne oceniano wg kryteriów RECIST, OS przy użyciu metody Kaplana-Meyera, toksyczność za pomocą kryteriów CTC.

Wyniki: Spośród 23 chorych otrzymujących GMTV-H6/GMCSF obiektywne odpowiedzi kliniczne (CR + PR) zaobserwowano u 21%. Na leczenie (CR + PR + SD) odpowiedziało 65% chorych. Mediana OS w grupie GMTV-H6/GM-CSF była dłuższa (436 dni) niż w kontrolnej grupie historycznej (230 dni). Spośród 32 chorych leczonych GMTV-H6, CR + PR obserwowano u 21%, CR + PR + SD u 56% chorych. Przeżycie całkowite w grupie GMTV-H6 wynosiło 319 dni. Odpowiedź na leczenie (CR + PR) w grupie otrzymującej szczepionkę składającą się z komórek niemodyfikowanych obserwowano u 10% chorych. Wśród wszystkich chorych biorących udział w badaniu CR + PR zanotowano u 20%, podczas gdy SD u 42%. Przeżycie całkowite chorych leczonych GMTV było wydłużone o 161 dni. Przeżycie całkowite chorych, których odpowiedzi na leczenie, było dłuższe w porównaniu z niereagującymi na leczenie (692 vs 263 dni). Tolerancja leczenia była dobra.

Wnioski: (i) Immunoterapia GMTVH6/GMCSF chorych na zaawansowanego czerniaka wywołuje obiektywne odpowiedzi kliniczne i wydłuża OS. (ii) GMTVH6/GMCSF jest bezpieczna. (iii) Dawka GMTVH6/GMCSF 5×10^7 komórek jest optymalna. (iv) Niemodyfikowana GMTV wywołuje sporadyczne odpowiedzi kliniczne, więc nie powinna być wykorzystana w ramieniu kontrolnym badania. (v) Chorzy, którzy odpowiedzieli na leczenie, żyją dłużej w porównaniu z niereagującymi na leczenie.

Results of phase I/II clinical trial of therapeutic cellular vaccine modified with Hyper-IL-6 and GM-CSF genes (GMTV-H)

Aim of the study: To evaluate the effect of immunization with GMTV-H6/GM-CSF, GMTV-H6 and genetically unmodified vaccine on clinical response in melanoma patients with measurable metastases; evaluation of toxicity and effect on overall survival (OS).

Material and methods: 63 patients randomized into five arms: 1) immunized with GMTV – H6/GMCSF at doses: 1×10^7 cells; 2) 5×10^7 ; 3) 2.5×10^8 ; 4) immunized with non-modified vaccine (5×10^7) and 5) with GMTV-H6 (5×10^7). Clinical responses were evaluated using RECIST, OS using Kaplan-Meier method, toxicity using CTC criteria.

Results: Of 23 patients receiving GMTV-H6/GMCSF, objective responses (CR+PR) were noted in 21%. 65% of

patients responded to therapy (CR+PR+SD). The median OS in the GMTV-H6/GM-CSF group was significantly longer (436 days) than in the historical control group (230 days). Of 32 patients receiving GMTV-H6, CR+PR were recorded in 21%, CR+PR+SD in 56% of patients. The mean OS in the GMTV-H6 arm was 319 days. In patients receiving non-modified vaccine CR+PR were seen in 10% of patients. CR+PR were seen in 20% of all cases studied, SD in 42%. The OS in GMTV treated patients was extended by 161 days. OS rates of responders and non-responders were significantly different (692 v 263 days). All vaccines were safe.

Conclusions: (i) Immunotherapy with GMTV-H6/GMCSF of advanced melanoma patients causes objective responses and extends the OS. (ii) GMTV-H6/GMCSF is safe. (iii) GMTV-H6/GMCSF 5×10^7 cells dose is optimal. (iv) Non-modified GMTV induces occasional clinical responses and thus should not be used in the control arm. (v) Responders live significantly longer than non-responders.

[33]

Hipotermia 13 MHz skojarzona z radiochemioterapią w leczeniu chorych na raka szyjki macicy w stopniu IIb i IIIb. Wyniki wstępne oraz ocena tolerancji leczenia

Norbert Piotrkowicz, Krzysztof Bujko, Ryszard Krynicki, Jagna Stanciaszek, Bogusław Lindner, Edward Skrocki, Joanna Jońska-Gmyrek

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Wstęp: Wyniki doświadczenia holenderskiego uodowodniły przewagę leczenia skojarzonego z hipertermią nad wyłączną radioterapią u chorych na zaawansowanego raka szyjki macicy. Podczas 12-letniej obserwacji wykazano 12-procentowe zwiększenie przeżyć całkowitych po zastosowaniu hipertermii w porównaniu z chorymi podawanymi wyłącznie radioterapii.

Materiał: Od 30.10.2008 r. do 31.12.2009 r. w Zakładzie Teleradioterapii Centrum Onkologii w Warszawie przeprowadzono radykalną radiochemioterapię u 179 chorych na raka szyjki macicy w stopniu IIb i IIIb wg FIGO. Wiek chorych wynosił 28–78 lat (mediana 54 lata).

Metoda: Każda z chorych otrzymała konformalne napromienianie fotonami X o energii 9–15 MeV w dawce frakcyjnej 1,8–2 Gy do dawki całkowitej 46–60 Gy wraz z chemioterapią cisplatyną 40 mg/m² oraz z czterema zabiegami hipertermii 13 MHz. Polem nagrzewanym obejmowano obszar analogiczny do poddawanego napromienianiu. Skóra i tkanka podskórna chorych były zabezpieczone przed przegrzaniem bolusem wodnym o temperaturze 23°C. Stosowano moc w zakresie 110–150 W. W każdym z przypadków uzyskiwano temperaturę 38,5–41,5°C, mierzoną w pochwie. Po zakończeniu powyższego podawano 4 frakcje brachyterapii HDR w dawce 7,5 Gy na podstawie planowania 3D.

Wyniki: Nie stwierdzono konieczności przerwania leczenia ze względu na jego nietolerancję. Podczas obserwacji trwającej 3–13 miesięcy (mediana 6 miesięcy) niepowodzenie leczenia stwierdzono u 25 chorych (14%), w tym u 14 chorych progresję miejscową, u 3 przerzuty do wątroby, u 2 przerzuty do płuc, u 2 chorych zajęcie węzłów chłonnych nadobojczykowych, u 2 węzłów chłonnych biodrowych i okotoaortalnych, a u 2 wtórne zmiany kostne.

Wnioski: Radiochemioterapia wspomagana hipertermią u chorych na raka szyjki macicy jest postępowaniem bezpiecznym i dobrze tolerowanym. Możliwe jest uzyskanie terapeutycznych wartości temperatur. Do ostatecznej oceny zastosowanego sposobu leczenia konieczne jest przeprowadzenie badania z losowym doбором chorych.

13 MHz hyperthermia-assisted chemoradiation in the treatment of IIb-IIIb FIGO stage cervical cancer patients. Treatment tolerance and assessment of preliminary results

Background: Long-term results of the Dutch Trial proved the advantage of hyperthermia-assisted treatment over radiation alone of advanced cervical cancer patients. After 12 years a 12% benefit in overall survival was observed among patients who received hyperthermia during irradiation.

Material: From 30 November 2008 to 31 December 2009 a group of 179 IIb-IIIb FIGO stage cervical cancer patients underwent hyperthermia-assisted chemoradiation treatment at the Radiation Department of the Centre of Oncology in Warsaw. Patients' age was from 28 to 78 years (median 54).

Method: Every patient received external beam, conformal irradiation with 9-15 MeV photons together with cisplatin of 40 mg/m². Total dose was 46-60 Gy in 1.8-2 Gy per fraction. During this a total of four hyperthermia sessions were performed in every case. Heated volume was similar to irradiated one. The temperature of 38.5-41.5°C, measured in the vagina, was maintained in every case. A water bolus with temperature of 23°C was used to prevent over-heating of the skin and sub-cutaneous tissue. Average power level was from 110 to 150 W. After completion of external beam treatment HDR brachytherapy was performed with 4 fractions of 7.5 Gy per fraction according to 3D dose distribution planning.

Results: No need for treatment interruption was detected due to patient's intolerance. During follow-up time of 3 to 13 months (median 6 months) treatment failure in 25 patients was detected (14%), including 14 local relapses, 3 patients with liver metastases, 2 with lung metastases, 2 with supraclavicular and 2 with iliac and para-aortic lymph node involvement. In 2 patients secondary bone lesions were found.

Conclusions: Hyperthermia-assisted chemoradiation in advanced cervical cancer patients is a safe and well tolerated procedure. Therapeutic values of temperature are obtainable. A randomized trial is needed for final assessment of the treatment pattern.

[34]

Ciężkie powikłania infekcyjne po chemioterapii fludarabiną i alemtuzumabem u chorych na przewlektą białaczkę limfocytową (PBL) na przykładzie trzech przypadków

Agnieszka Porowska¹, Anna Dawidowska¹, Andrzej Deptała^{1,2}

¹Klinika Onkologii i Hematologii, Centralny Szpital Kliniczny MSWiA w Warszawie

²Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wstęp: Nowoczesna chemioterapia (CTH) może nasilić zaburzenia odporności u chorych na przewlektą białaczkę limfocytową (PBL), których skutkiem są ciężkie powikłania infekcyjne.

Opis przypadków: Trzech mężczyzn (KM, KZ i ZZ – wiek 38, 64 i 64 lata) z objawową PBL i obecnością niekorzystnych czynników cytogenetycznych/molekularnych było leczonych za pomocą CTX + FLU ± alemtuzumab (A) w ramach badania klinicznego HOVON 68 CLL. Wszyscy pacjenci otrzymywali profilaktykę przeciwko zakażeniom wirusowym i *Pneumocystis*.

Dwa tygodnie po zakończeniu chemioterapii u chorego KM pojawiła się uporczywa biegunka, która ustąpiła dopiero po doustnym podaniu metronidazolu. Dwa tygodnie później wystąpiło ciężkie zapalenie płuc oraz masywna opryszczka wargowa. Prawie 2 lata po zakończeniu chemioterapii, będąc w stanie PR PBL, pacjent zachorował na różę podudzia lewego, powikłaną ropniem stopy lewej.

Pacjent KZ uzyskał odpowiedź całkowitą (CR) po 6 cyklach CTH + A. Trzy miesiące później u pacjenta rozwinęło się zapalenie płuc *Pneumocystis jiroveci*, a następnie *pneumonia Mycobacterium kansasii*. Po ustąpieniu obu infekcji płucnych u chorego techniką PCR wykryto reaktywację CMV oraz HBV. Zakażenie CMV zostało skutecznie wyleczone, natomiast infekcja HBV nie ustąpiła po terapii lamiwudyną, co doprowadziło do rozwoju ostrej niewydolności wątroby, którą skutecznie leczono za pomocą transplantacji wątroby.

U pacjenta ZZ po 6. cyklu CTH + A doszło do wystąpienia gorączki neutropenicznej powikłanej zakażeniem dróg moczowych, które skutecznie leczono za pomocą dożylnych antybiotyków. Dwa tygodnie później u chorego rozwinęło się obustronne zapalenie płuc, które nie poddawało się terapii antybiotykami i lekami przeciwgrzybicznymi. Wykonano BAL, w którym wykryto *Mycobacterium tuberculosis*. Nie uzyskano poprawy po leczeniu przeciwprątkowym i chory zmarł.

Wnioski: Ciężkie powikłania infekcyjne pojawiające się po chemioterapii zawierającej FLU ± A mogą zagrażać życiu chorego. Profilaktyka przeciwważna i uważne monitorowanie nie zawsze zmniejszają ryzyko wystąpienia zgonu wynikające z tych ciężkich zakażeń.

Serious infections after fludarabine and alemtuzumab chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukaemia – report of three cases

Background: A new chemotherapy (CTH) regimen in CLL can augment immunodeficiency that may cause severe infectious complications.

Case reports: Three males (KM, KZ, and ZZ – age 38, 64, and 64) suffering from symptomatic CLL with unfavourable cytogenetic/molecular profile were treated with CTX + FLU ± alemtuzumab (A) in the clinical trial HOVON 68 CLL. All of the patients received oral prophylaxis against viral and *Pneumocystis* infections. Two weeks after completion of CTH patient KM acquired severe diarrhoea, resolved by oral therapy with metronidazole. Two weeks later he developed severe bacterial pneumonia and HSV infection. Almost two years after the completion of CTH, while continuing PR of CLL, he suffered from erysipelas of the left lower limb complicated by abscess of the left foot.

Patient KZ achieved CR of CLL after 6 cycles of CTH + A. Three months later he developed *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, and then *Mycobacterium kansasii* pneumonia. After resolution of those pulmonary infections, CMV and HBV reactivation were diagnosed by PCR. CMV infection was successfully treated, but HBV infection did not respond to lamivudine and led to acute liver failure, which was successfully treated by liver transplantation.

Patient ZZ was diagnosed with fever neutropenia during the 6th cycle of CTH + A. Simultaneously urinary tract infection was recognized and effectively treated with i.v. antibiotics. Two weeks later he developed multilobular pneumonia not responding to antibiotics and antifungal agents. BAL examination revealed *Mycobacterium tuberculosis* infection. There was no improvement after anti-tuberculous therapy and the patient died.

Conclusions: Severe infectious complications related to FLU ± A chemotherapy can be life-threatening. Prophylaxis and careful monitoring do not always reduce the risk of mortality from such severe infections.

[35]

Myelolipoma – rzadka postać płucna. Czy zawsze wymaga ona radykalnej interwencji chirurgicznej?

Adam Rzechonek¹, Jerzy Kołodziej¹, Jarosław Adamiak², Marek Lubicz³, Aleksandra Kamińska¹

¹Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

²Zakład Patologii, Dolnośląskie Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu

³Wydział Informatyki i Zarządzania, Politechnika Wrocławska

Myelolipoma (ML) jest łagodnym nowotworem, zbudowanym głównie z dojrzałych komórek tłuszczowych. Jego głównym umiejscowieniem są nadnercza. Jeżeli masa

guza jest duża, może dawać objawy uciskowe. W przypadku *myelolipoma* z krwakiem może wystąpić niedokrwistość.

Przedstawiono rzadki przypadek wewnątrzoskrzelowej *myelolipoma*, współistniejącej z rakiem prostaty.

Mężczyzna, 73 lata, po prostatektomii w 1999 r. i radioterapii z powodu przerzutów do kości. W tomografii komputerowej wykryto niedrożność oskrzela do płata górnego płuca lewego. W bronchoskopii stwierdzono prawie całkowitą obturację oskrzela przez gładki, różowawo-żółtawy guz.

Histopatologicznie rozpoznano *myelolipoma*. Chorego nie zakwalifikowano do resekcji. Wdrożono paliatywną, bronchoskopową elektrokoagulację argonową. Uzyskano częściowe udrożnienie oskrzela; chory bez duszności i incydentów zapalnych płuc jest w trakcie 14-miesięcznej obserwacji.

Wnioski: Przy braku cech miejscowej i ogólnej złośliwości resekcja *myelolipoma* płucnej nie jest konieczna.

Intrapulmonary myelolipoma. Does it always require radical resection?

Myelolipoma (ML) is a benign tumour composed mainly of adult adipocytes. It is located commonly in the adrenal gland. If its volume is large, it could lead to pressure syndrome. In cases of ML with haematoma, anaemia could appear.

We present a rare, interesting case of intrapulmonary myelolipoma that coexisted with carcinoma prostate.

A 73-year-old man after prostatectomy in 1999 and recently after radiotherapy due to metastases to bones was diagnosed by CT. Obstruction of the upper left bronchus was detected. In bronchoscopic findings subtotal obstruction of the bronchus through a smooth rose and yellow tumour was found.

The histopathological finding of disease was myelolipoma. The patient was disqualified for resection. Three times bronchoscopic argon plasma coagulation therapy for bronchial obstruction was used. We obtained partial restoration of bronchus patency. During 14 months of observation the patient had no dyspnoea or pneumonia.

Conclusions: In case of lack of regional or haematological malignancy the surgical resection of myelolipoma is unnecessary.

[36]

Odległe wyniki leczenia chorych na przerzutowego raka jelita grubego (MCRC), należących do grupy wysokiego ryzyka za pomocą chemioterapii opartej na irinotekanie (CPT11)

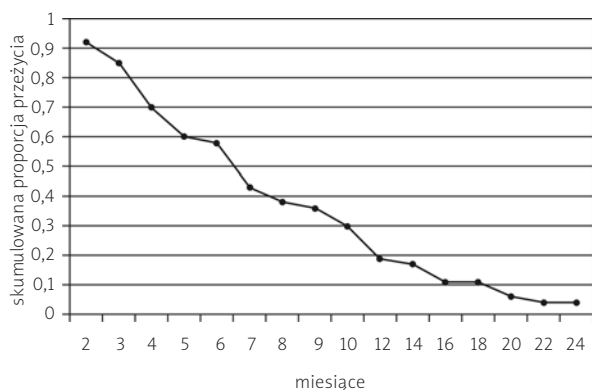
Agnieszka Krzysztoń¹, Małgorzata Magoń¹,
Joanna Omyła-Staszewska¹, Alicja Asendryk-Woźniak¹,
Andrzej Deptała^{1,2}

¹Klinika Onkologii i Hematologii, Centralny Szpital Kliniczny MSWiA w Warszawie

²Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wstęp: Niektóre wcześniejsze publikacje wskazywały, że chemioterapia oparta na CPT11 może nie przynosić korzyści odnośnie do dłuższego przeżycia chorych na przerzutowego raka jelita grubego (MCRC) z grupy wysokiego ryzyka. W celu zrewidowania tej tezy przeprowadzono retrospektywną analizę.

Materiał i metody: Z grupy 197 chorych na MCRC leczonych w latach 2002–2009 w ośrodku autorów, zidentyfikowano 53 pacjentów należących do grupy wysokiego ryzyka (HiR) (tj. spełniających ≥ 2 kryteria: PS > 1 ; i/lub podwyższona aktywność LDH; i/lub > 1 lokalizacja przerzutów; i/lub poprzedzająca chemioterapia adiuwantowa) i poddano ich retrospektywnej analizie porównawczej z grupą pacjentów standardowego ryzyka (StR). Grupę HiR stanowiło 17 kobiet i 36 mężczyzn w wieku 40–81 lat (mediana 64,7 roku). Wszyscy pacjenci leczeni byli chemioterapią opartą na CPT11, wg schematu de Gramonta lub AIO.



Ryc. 1. Czas do progresji (TTP) w grupie chorych na MCRC wysokiego ryzyka, leczonych chemioterapią opartą o irinotekanie

Wyniki: W grupie HiR odsetek odpowiedzi (RR = CR + PR) ukształtował się na poziomie 21,3% i był niższy niż w grupie pacjentów StR (RR = 50%, $p = 0,05$). W grupie HiR mediana TTP wyniosła 7,1 miesiąca, mediana PFS 7,3 miesiąca, a mediana OS 15 miesięcy; w grupie StR wartości te ukształtowały się odpowiednio: mediana TTP 9,3 miesiąca, mediana PFS 9,9 miesiąca, mediana OS 16 miesięcy, i nie różniły się statystycznie od tych w grupie HiR. Chemioterapia z CPT11 była bezpieczna dla pacjentów i nie zaobserwowano toksyczności w stopniu 4. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi (AE) były biegunka (28,3%

– 15 chorych) i neutropenia (11,3% – 6 chorych), ale toksyczność w stopniu 3. zaobserwowano odpowiednio tylko u 3 i 2 osób. Wszyscy pacjenci otrzymali terapię drugiej linii.

Wnioski: Analiza wykazała, że chemioterapia w oparciu o CPT11 jest skutecznym i bezpiecznym sposobem leczenia MCRC, również dla pacjentów z grupy wysokiego ryzyka. Pomimo że RR w grupie HiR było niższe niż w grupie ze standardowymi czynnikami rokowniczymi, różnica ta nie przełożyła się na znaczący spadek długości TTP i PFS. Przeżycie całkowite nie różniło się między obu grupami z uwagi na wpływ na przeżycie następnym linii terapii.

Background: In the past some data have indicated that patients suffering from high risk MCRC might not benefit from longer survival with CPT11-based chemotherapy. To evaluate whether CPT-11-based chemotherapy could be suitable for such MCRC patients, we performed a retrospective analysis.

Material and methods: Out of 197 CRC patients treated in our department between 2002 and 2009, 53 poor risk MCRC patients were chosen for the analysis (poor risk group was defined as ≥ 2 criteria being fulfilled, i.e. PS > 1 , and/or elevated serum LDH, and/or > 1 metastatic site, and/or prior adjuvant chemotherapy), and the results compared (retrospectively) to respective standard risk MCRC cases. The poor risk arm included 17 females and 36 males, median age 64.7 [range 40-81]. All the patients were treated with 1st-line CPT11-based chemotherapy, according to either de Gramont or AIO regimen.

Results: In the analysed poor risk group the confirmed RR (CR + PR) was 21.3%, which was lower than in the standard risk group (RR = 50%, $p = 0.05$). The poor risk group median TTP was 7.1 months, median PFS was 7.3 months, and median OS 15 months. The standard risk group median TTP, PFS and OS were not statistically different from the poor risk group (9.3 months, 9.9 months, and 16 months respectively). CPT11-based chemotherapy was safe. No G4 toxicity was observed. The most common adverse events (AE) were diarrhoea (28.3% – 15 pts) and neutropenia (11.3% – 6 pts), but G3 AE were noted only in 3 and 2 persons respectively. All patients received 2nd line chemotherapy.

Conclusions: Our analysis showed that CPT11-based chemotherapy was an effective and safe treatment option even for poor risk MCRC patients. Although the RR was lower in comparison to standard risk cases it did not translate into significantly shorter TTP and PFS. OS did not differ between the two groups, because it was affected by subsequent therapy.

[37]

Synchroniczne wystąpienie chłoniaka ziarniczego i mięsaka o wysokim stopniu złośliwości (*neoplasma malignum mesenchymale high grade*) – problemy diagnostyczne

Bożena Cybulska-Stopa, Marek Ziobro, Ida Cedrych

Klinika Nowotworów Układowych i Uogólnionych,
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Krakowie

Jednoczesne wystąpienie różnych nowotworów pierwotnych może prowadzić do mylnego rozpoznania jednego z nich jako ogniska przerzutowego i w następstwie do podjęcia błędnych decyzji terapeutycznych.

Zaprezentowano opis przypadku 36-letniej chorej leczonej z powodu chłoniaka ziarniczego (stopień zaawansowania IVA z zajęciem węzłów chłonnych, naciekami w wątrobie i śledzionie oraz naciekiem w ścianie klatki piersiowej z destrukcją żeber). Weryfikacji histopatologicznej dokonano z węzłów chłonnych nadobojczykowych, a następnie pacjentka otrzymała 6 serii chemioterapii ABVD z całkowitą remisją zmian węzłowych oraz w narządach miękkich i jedynie stabilizacją zmiany w ścianie klatki piersiowej. Po 4 miesiącach od zakończenia leczenia nastąpiła progresja zmiany w ścianie klatki piersiowej. Chora została zakwalifikowana do ratującej chemioterapii ESHAP. W przypadku remisji planowano wysokodawkową chemioterapię pod osłoną przeszczepu autologicznych komórek macierzystych z krwi obwodowej. Po 2 seriach chemioterapii ESHAP stwierdzono dalszą progresję zmiany w ścianie klatki piersiowej. Ze względu na młody wiek pacjentki podjęto próbę kolejnej chemioterapii – eskalowany BEACOPP. Równolegle dokonano dwukrotnej weryfikacji histopatologicznej zmiany. Drugie badanie wykazało obecność utkania o charakterze nowotworu mezenchymalnego o dużym stopniu złośliwości. W związku z tym zmieniono rozpoznanie kliniczne na: chłoniak ziarniczny w IV stopniu zaawansowania z całkowitą remisją po chemioterapii oraz równocześnie występujący mięsak ściany klatki piersiowej. Wykonano radykalną resekcję mięsaka, a następnie uzupełniającą radioterapię. W 2 miesiące po zakończeniu radioterapii wystąpiła wznowa miejscowa i rozsiew choroby do płuc. Mimo podejmowanych prób leczenia systemowego pacjentka zmarła.

W przypadku spektakularnych odpowiedzi na leczenie systemowe większości ognisk nowotworowych przy równoczesnej oporności jednej ze zmian, w pierwszej kolejności należy rozważyć wykonanie weryfikacji histopatologicznej zmiany odpornej na leczenie, gdyż można mieć do czynienia z jednoczesnym wystąpieniem nowotworu o innym utkaniu histologicznym.

Simultaneous Hodgkin lymphoma and high degree sarcoma (*malignant mesenchymal neoplasm – high grade*) – diagnostic problems

Simultaneous appearance of two different primary tumours can lead to erroneous qualification of one as a metastatic lesion, leading to an incorrect (incomplete) diagnosis and incorrect therapeutic decisions.

We present a case of a 36-year-old woman with Hodgkin lymphoma (stage IVA with lymph node involvement, focal infiltration in the liver and spleen and in chest wall inclusive of costal destruction). Histological verification was made from supraclavicular lymph node and the patient received 6 cycles of ABVD chemotherapy that led to a complete remission in the lymph node, liver and spleen but only stabilization of the chest wall lesion. After four months, progression of the lesion in the chest wall occurred, and the patient was qualified for ESHAP chemotherapy. However, after two chemotherapy cycles, there was a fast progression of the lesion for which BEACOPP chemotherapy was prescribed. In the meantime two biopsy specimens were taken, with the first one inconclusive but the second one showing sarcoma. This led to diagnosis of Hodgkin lymphoma (with complete remission after chemotherapy) and simultaneously occurring sarcoma of the chest wall. The chest wall lesion was resected and irradiated but after two months recurrence (of the chest wall sarcoma) was evident. In spite of systemic treatment attempts the patient died.

In case of a spectacular remission of a majority of lesions in response to systemic treatment – with resistance of one of the lesions – histological verification of the resistant lesion needs to be considered early, since different primary tumours can appear simultaneously.

[38]

Erytrodyzestezja dłoniowo-podeszwowa (zespół ręka–stopa) w następstwie leczenia pegylowaną liposomalną doksorubicyną – studium przypadku

Bożena Cybulska-Stopa, Marek Ziobro, Ida Cedrych

Klinika Nowotworów Układowych i Uogólnionych,
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Krakowie

Erytrodyzestezja dłoniowo-podeszwowa (*palmar-plantar erythrodysesthesia – PPE*), inaczej zespół ręka–stopa, jest charakterystycznym powikłaniem dermatologicznym mogącym wystąpić po zastosowaniu niektórych leków cytotoksycznych. Opisywano ją po zastosowaniu pegylowanych postaci doksorubicyny, po długotrwałych ekspozycjach na pochodne fluoropirymidynu, doksorubicynę, arabinozyd cytozyny czy interleukinę 2. Objawy zespołu ręka–stopa to najczęściej dyzestezja, mrowienie dłoni i stóp, plamiste zaczerwienienia z sinyimi i obrzęk-

niętymi obszarami na dłoniach. Czasami może dochodzić do powstania pęcherzy i owrzodzeń oraz martwicy naskórka. Dyzestezje i rumień mogą się pojawiać także w innych okolicach ciała – zwłaszcza w miejscach narażonych na zwiększony ucisk lub wyższą temperaturę (np. na pośladkach, w pachwinach, fałdach podskórnyczych czy pachach).



Przedstawiono przypadek 56-letniej pacjentki leczonej pegylowaną liposomalną doksorubicyną z powodu rozsiewu raka sutka, u której w trakcie leczenia wystąpiła skórna postać zespołu ręka–stopa. Zmiany o charakterze zaczerwienienia, złuszczenia naskórka i owrzodzeń były zlokalizowane w okolicach pachowych, pachwinowych, a także na skórze pleców oraz brzucha i utrzymywały się przez ok. 4 tyg. Ze względu na nasilenie zmian (G3 w skali powikłań NCI CTC) po czwartym cyklu przerwano chemioterapię i stosowano wyłącznie leczenie objawowe w celu złagodzenia dolegliwości, zwłaszcza bólowych. Po zmniejszeniu nasilenia objawów do stopnia G1 (jedynie miejscowy rumień oraz parestezje) wznowiono chemioterapię w dawkach zredukowanych o 25%. Leczenie kontynuowano przez kolejne cztery kursy, po których, ze względu na ponownie narastające objawy skórne, chemioterapię zakończono. Zmiany wycofały się po ok. 3 tyg.

od zakończenia leczenia, pozostawiając po sobie brązowe przebarwienia, które utrzymywały się jeszcze przez kilka miesięcy.



Erytrodyzestezja dłoniowo-podeszwowa jest uciążliwym powikłaniem po chemioterapii, pogarszającym jakość życia chorego, często uniemożliwiającym mu codzienną aktywność i nierzadko ograniczającym możliwość efektywnego prowadzenia leczenia pacjenta.

Palmar-plantar erythrodysesthesia (PPE) during pegylated liposomal doxorubicin treatment – case report

Palmar-plantar erythrodysesthesia (PPE), also called hand-foot syndrome (HFS), is a distinct and relatively frequent dermatological toxic reaction associated with certain chemotherapeutic agents such as pegylated liposomal doxorubicin, capecitabine, a long-circulating formulation of doxorubicin, cytosine arabinoside, or interleukin-2. HFS typically presents with dysaesthesia and tingling in the hands and feet. Dysaesthesia and erythema may occur on several other body surfaces, especially in areas where pressure or increased warmth occur, such as on the buttock, groin, under pendulous breasts, and in the axillae.

We present a case of a 56-year-old woman with HFS in the axillae, inguen and on the skin of the back and abdomen that occurred during treatment with pegylated liposomal doxorubicin for metastatic breast cancer. After

four cycles of chemotherapy, the treatment was interrupted because of HFS (G3 according to NCI CTC). Four weeks later chemotherapy was continued with doses reduced by 25%, but after a further four cycles of chemotherapy the treatment was stopped due to aggravating symptoms of HFS.

Palmar-plantar erythrodysesthesia is a severe complication of chemotherapy; it often makes normal daily activity impossible, deteriorating quality of life and frequently limiting the possibility of effective treatment.

[39]

Nowotwory mnogie w polu napromienianym – opis przypadku

**Bożena Cybulska-Stopa¹, Marcin Hetnał²,
Marek Ziobro¹, Magdalena Derejska³**

¹Klinika Nowotworów Układowych i Uogólnionych, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Krakowie

²Zakład Radioterapii, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Krakowie

³Klinika Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Krakowie

Nowotwory mnogie (synchroniczne i metachroniczne) stanowią łącznie 5–8% wszystkich nowotworów złośliwych. Najczęściej opisywane są dwa pierwotne nowotwory o różnym umiejscowieniu, występowanie trzech albo czterech należy do rzadkości.

Przedstawiono opis przypadku pacjentki leczonej z powodu pięciu nowotworów o różnej budowie histologicznej i odmiennej lokalizacji. Pacjentka, lat 11 (1974 r.), była napromieniana polami płaszczowymi z powodu rozpoznania chłoniaka ziarnicznego, a następnie z powodu wznowy choroby po 4 latach otrzymała leczenie systemowe. Po 10 latach (1988 r.) od zakończenia leczenia w polu napromienianym pojawił się guz, który został usunięty radykalnie. W badaniu histopatologicznym stwierdzono mięsak (*neurofibrosarcoma*). Dwa miesiące później w tej lokalizacji pojawił się kolejny guz, który został usunięty w całości, wówczas rozpoznano *leiomyosarcoma*. Po kolejnych 2 latach nastąpiła wznowa miejscowa mięsaka (*leiomyosarcoma*) na szyi, która została radykalnie usunięta. Pacjentka pozostawała w kontrolach przez kolejne 18 lat. Po tym czasie u pacjentki rozpoznano raka przewodowego naciekającego piersi prawej i lewej. Wykonano obustronną radykalną mastektomię z jednoczesnym usunięciem dwóch owrzodziałych zmian skórnych okolicy podstawy szyi i grzbietu (2009 r.). W badaniu histopatologicznym zmiany na szyi stwierdzono raka z przydatków skóry (*carcinoma adnexoidale* G3), a na grzbiecie raka podstawnomórkowego.

Obecnie pacjentka nie ma objawów i pozostaje pod kontrolą Centrum Onkologii w Krakowie.

Wszystkie opisywane nowotwory znajdowały się w polu napromienianym.

Występowanie mnogich pierwotnych nowotworów o różnej budowie histologicznej i odmiennej lokalizacji należy do rzadkości, należy jednak brać pod uwagę taką

możliwość w trakcie badań kontrolnych, szczególnie u chorych po przebytym leczeniu dużymi polami radioterapii.

Infield multiple malignant secondary tumours after irradiation – case study

Multiple primary malignant tumours (synchronous and metachronous) represent 5–8% of malignant tumours. Most commonly two primary tumours coexist in different locations; three or more tumours are rare. constitute constitute

We present a case study of a woman treated for five malignancies of different location with histology verification. At the age of 11 years (1974) the patient was diagnosed with Hodgkin lymphoma and was irradiated using mantle field technique. Four years later she was given chemotherapy for recurrence. After a symptom-free period of 10 years, she underwent radical resection of a tumour (neurofibrosarcoma) located in the previously irradiated field (neck). Two months after the neurofibrosarcoma resection, a new tumour occurred in the same location – radical surgery was performed and pathological examination showed leiomyosarcoma.

After another four years, recurrence of leiomyosarcoma was detected and resected with margins. After a further 18-year symptom-free period, synchronous bilateral breast cancer was diagnosed and bilateral breast amputation was performed (2009) together with excision of ulcerated skin lesions on the neck and back. Pathological examination revealed basal cell carcinoma (back) and adnexal skin carcinoma (neck).

The patient is under close surveillance of the Centre of Oncology in Krakow and currently shows no symptoms of malignancy.

Coexistence of multiple malignant tumours is rare but improvement of treatment results and potential carcinogenic activity of the treatment itself may both underlie a growing incidence.

[40]

Ocena przeżycia chorych na NDRP w 10-letniej obserwacji w zależności od ekspresji genu i białka surwiwiny

**Bożenna Karczmarek-Borowska¹, Agata Smoleń²,
Agata Filip³**

¹Zakład Onkologii Wydziału Medycznego, Uniwersytet Rzeszowski

²Zakład Matematyki i Biostatystyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³Katedra Genetyki Medycznej z Zakładem Genetyki Nowotworów i Pracownią Cytogenetyczną, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wstęp: Prowadzone są badania nad wyodrębnieniem markerów, które byłyby pomocne do oceny czynników rokowniczych niedrobnomórkowego raka płuca (NDRP).

Surwiwina jako inhibitor apoptozy zastępuje na szczególną uwagę w raku płuca, ze względu na zwiększoną ekspresję w tkance nowotworowej i związek z krótszym czasem przeżycia.

Cel pracy: Ocena wpływu ekspresji białka i genu surwiwiny na 5-letnie i 10-letnie przeżycia chorych na NDRP.

Materiał i metody: W Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej i Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej AM w Lublinie w latach 1993–1997 leczono kolejnych 60 chorych na NDRP. Ustalono stopień zaawansowania IIB u 26 chorych (43,3%), a u 36 chorych (56,7%) IIIA. Wszyscy chorzy otrzymali przedoperacyjną chemioterapię 2–3 cykle: cisplatyna + etopozid (PE). Ekspresję białka oceniano metodą immunohistochemiczną (przyjęto za punkt odcięcia – 10% komórek wykazujących odczyn dodatni) i genu metodą hybrydyzacji in situ z materiału uzyskanego w trakcie zabiegu operacyjnego. Oceniano 10-letnie rzeczywiste przeżycia chorych od dnia podania 1. cyklu chemioterapii. Do oceny przeżyć całkowitych zastosowano metodę Kaplana-Meiera i test log-rank.

Wyniki: Zaobserwowano ekspresję białka i genu surwiwiny odpowiednio w 90 i 58,3% przypadków. Mediana czasu przeżycia w 10-letniej obserwacji wynosiła 22 miesiące (zakres od 5–120 miesięcy). W badanej grupie stwierdzono 33,3% 5-letnich przeżyć (20 chorych) i 26,7% 10-letnich przeżyć (16 chorych) ($p = 0,13$). Oceniając przeżycia u chorych z dodatnią i ujemną ekspresją białka odnotowano większy odsetek przeżyjących 5 lat z dodatnią ekspresją białka (35,2 vs 16,7%; $p = 0,96$) i 10 lat (29,6 vs 0%; $p = 0,72$). W ocenie ekspresji genu stwierdzono natomiast istotnie wyższy odsetek przeżyć 5-letnich w grupie chorych z ujemną ekspresją w porównaniu z dodatnią (60 vs 14,3%; $p = 0,00003$) oraz 10-letnich (48 vs 11,4%; $p = 0,00008$).

Wnioski: Nadekspresja genu surwiwiny w komórkach raka jest ważnym czynnikiem rokowniczym w NDRP.

Assessment of NSCLC patients' survival in a 10-year observation period depending on SURVIVIN gene and protein expression

Background: Extensive research is being performed for markers that would be helpful for the assessment of prognostic factors in NSCLC. The apoptosis inhibitor SURVIVIN merits special mention in lung cancer because of increased expression in tumour cells and its correlation with shorter survival.

Aim of the study: To assess the relationship between SURVIVIN gene and protein expression and 5- and 10-year survival of NSCLC patients.

Material and methods: The examined group included 60 consecutive patients with NSCLC hospitalized in the Oncology Centre of Lublin Land and the Department of Thoracic Surgery, Medical University of Lublin in 1993–1997. Twenty-six (43.3%) patients were diagnosed with stage IIB and 36 patients (56.7%) with stage IIIA. All patients were treated with 2–3 cycles of chemotherapy prior to surgery (cisplatin + etoposide, PE). SURVIVIN protein expression was examined by means of immunohis-

tochemistry (the cut-off was 10% of positive cells), and gene expression by in situ hybridization (ISH) on tumour samples collected during surgery. 10-year real survival was assessed counting from the first day of the first chemotherapy cycle. To assess overall survival Kaplan-Meier method and log-rank test were used.

Results: The expression of SURVIVIN protein and gene was observed in 90% and 58.3% of cases, respectively. Median survival in 10-year observation was 22 months (range 5–120 months). In the examined group 33.3% 5-year survival was observed (20 patients) and 26.7% 10-year survival (16 patients) ($p = 0.13$). When comparing the survival of patients with and without SURVIVIN protein expression, a higher percentage surviving 5 years was found in the group with positive expression (35.2% vs. 16.7%; $p = 0.96$); the same applies to patients surviving 10 years (29.6 vs. 0%; $p = 0.72$). In SURVIVIN gene expression assessment a significantly higher percentage of 5-year survival was found in the group with no expression as compared to patients with positive expression (60% vs. 14.3%; $p = 0.00003$). The same relationship was found for 10-year survival (48% vs. 11.4%; $p = 0.00008$).

Conclusions: SURVIVIN gene overexpression in tumour cells is an important prognostic factor in NSCLC.

[41]

Porównanie przeżyć i ocena czynników prognostycznych u chorych na wczesnego raka piersi po leczeniu oszczędzającym w Centrum Onkologii w Warszawie w latach 1995–1998 i 1999–2002

Jacek Gatecki¹, Monika Nagadowska²,
Tadeusz Pieńkowski², Wojciech Michalski³,
Małgorzata Grudzień-Kowalska¹,
Joanna Hicer-Grzenkiewicz¹, Anna Niwińska²,
Robert Chmielewski², Zbigniew Mentrak²,
Jacek Piechocki², E. Towpik²

¹Zakład Teleradioterapii II, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

²Klinika Nowotworów Piersi i Chirurgii Rekonstrukcyjnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

³Zakład Biostatystyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Wstęp: W celu poprawy dostępności chorych na wczesnego raka piersi po leczeniu oszczędzającym do radioterapii, w 1999 r. w Centrum Onkologii w Warszawie skrócono schemat napromieniania pooperacyjnego z 5 do 3,5–4 tyg. i zgodnie z zaleceniami międzynarodowymi częściej stosowano systemowe leczenie uzupełniające, m.in. z użyciem antracyklin i taksanów.

Cel pracy: Porównanie przeżyć i ocena czynników prognostycznych we wczesnym raku piersi po leczeniu oszczędzającym w dwóch okresach: w latach 1995–1998 i 1999–2002.

Materiał i metody: Badaniem objęto kolejno leczone metodą oszczędzającą w Centrum Onkologii w Warszawie 552 chore na wczesnego inwazyjnego raka piersi. Chore leczone w latach 1995–1998 w porównaniu z leczonymi w latach 1999–2002 nie różniły się istotnie pod względem cech klinicznych i histopatologicznych. W I okresie stosowano napromienianie pooperacyjne 5-tygodniowe, w II okresie 3,5-tygodniowe. Leczenie systemowe uzupełniające w I okresie otrzymało 50%, a w II okresie 82% chorych. W modelu proporcjonalnego ryzyka Coksa zbadano wpływ następujących czynników na ryzyko wystąpienia nawrotu lub zgonu z powodu raka piersi: wiek, stan hormonalny, czas wywiadu, lokalizacja raka, postać kliniczna, pT, objętość guza, pN – indeks węzłowy, typ histopatologiczny, G, EIC, marginesy, receptory steroidowe i HER2, okres leczenia, dawka frakcyjna. Mediany obserwacji dla I i II grupy wyniosły odpowiednio: 104 i 58 miesięcy.

Wyniki: Pięcioletnie i 10-letnie DFS, OS i LRF dla wszystkich chorych wyniosły odpowiednio: 89% (86–92) i 84% (80–88), 95% (93–97) i 89% (85–94), 95% (93–97) i 93% (90–96). W modelu Coksa okazało się, że typ histopatologiczny: ductale vs inne dobrze rokujące (HR 2,3; CI: 1,3–4,4), G3 vs G2 + G1 (HR 2,0; CI: 1,2–3,4), negatywne receptory steroidowe (HR 10,1; CI: 4,5–22,4), amplifikacja HER2 (HR 7,4; CI: 3,1–17,6) są czynnikami istotnymi statystycznie i niezależnie związanymi ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nawrotu raka piersi. Indeks węzłowy > 20% (HR 1,5; CI: 1,0–2,1) i postać raka kliniczna vs subkliniczna (HR 2,0; CI: 0,95–4,1) również wydaje się, że mają wpływ na ryzyko nawrotu – wynik na granicy istotności statystycznej. Czynniki niezależnie wpływającymi na zwiększenie ryzyka wystąpienia zgonu z powodu raka piersi okazały się ponownie typ histopatologiczny ductale vs inne dobrze rokujące (HR 4,1; CI: 1,6–10,6), G3 vs G2+G1 (HR 3,2; CI: 1,6–6,4), negatywne receptory steroidowe (HR 9,4; CI: 3,1–28,5) i amplifikacja HER2 (HR 4,1; CI: 1,2–15,2). Nie wykazano istotnego wpływu na wystąpienie nawrotu, okresu leczenia ($p = 0,4$) i dawki frakcyjnej napromieniania ($p = 0,5$). Stwierdzono jednakże, że chore leczone w latach 1999–2002 miały blisko trzykrotnie wyższe ryzyko wystąpienia zgonu niż chore leczone wcześniej w latach 1995–1998 (HR 2,9; CI: 1,1–7,4).

Wnioski: Rokowanie chorych leczonych w latach 1999–2002 w porównaniu z okresem 1995–1998 okazało się nieznacznie gorsze pomimo agresywniejszego leczenia systemowego. Nie można wykluczyć, że w II okresie leczenia rozszerzono wskazania do kwalifikacji, czego jednak nie potwierdzono w porównaniach obu grup chorych opierających się na zasadach TNM i badając objętość guza pT. Uzupełniające leczenie systemowe u chorych na wczesnego raka piersi powinno być głównie oparte o histologiczne i biologiczne cechy nowotworu, a w mniejszym stopniu o TNM.

Survival and prognostic factors in patients with early breast cancer after conservation therapy: a comparison of two time periods before and after shortening radiotherapy and increasing use of adjuvant chemotherapy

Background: To improve the access of patients with early breast cancer after conserving surgery to radiother-

apy, in 1999 the standard 5 weeks of whole breast irradiation was shortened to a 3.5-4 weeks regimen and since then, according to international recommendations, more often adjuvant chemotherapy regimens have been used.

Aim of the study: To compare disease-free and overall survival and prognostic factors in patients treated in two periods of time: 1995-1998 and 1999-2002.

Material and methods: The retrospective analysis included 552 early breast cancer patients consecutively treated during 1995-2002. During that time patients were entered into conservative treatment according to the same protocol. There were no differences in clinical or pathological characteristics between the two compared groups. Systemic treatment was given in the older and newer group in 50% and 82% of patients respectively. Cox regression survival analysis was used to study the effects of clinical, histological and some biological factors on disease-free and overall survival.

Results: 7-year disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) for all patients were 0.86% (0.82-0.89) and 0.92% (0.90-0.95) respectively. The Cox regression model by stepwise selection showed some parameters such as ductal carcinoma (HR 2.3; CI 1.3-4.4), G3 (HR 2.0; CI 1.2-3.4), negative steroid receptors (HR 10.1; CI 4.5-22.4), and HER2 amplification (HR 7.4; CI 3.1-17.6) as independent significant predictors for DFS. Nodal index (HR 1.5; CI 1.0-2.1) and palpation of the tumour (HR 2.0; CI 0.95-4.1) appeared to have an effect on DFS as well, but at the limit of statistical significance ($p > 0.05$). The significant independent predictors of OS on multivariate analysis were ductal carcinoma (HR 4.1; CI 1.6-10.6), G3 (HR 3.2; CI 1.6-6.4), negative steroid receptors (HR 9.4; CI 3.1-28.5) and HER2 amplification (HR 4.1; CI 1.2-15.2). Neither regimen of irradiation ($p = 0.5$) nor period of treatment ($p = 0.4$) was a significant predictor of DFS. However, the risk of death for patients treated during 1999-2002 was nearly three times higher than for patients treated during 1995-1998 (HR 2.9; CI=1.1-7.4).

Conclusions: The prognosis of patients treated during 1999-2002 compared with 1995-1998 appeared worse in spite of more aggressive systemic management. Adjuvant treatment in early breast cancer should be based mostly on histological and biological features of malignancy because TNM classification is less useful in this group of patients.

[42]

Śluzak lewego przedsionka jako przyczyna przewlekłego kaszlu u 60-letniej kobiety – opis przypadku

Barbara Rybacka-Chabros¹, Elżbieta Starostawska², Paweł Chabros¹

¹Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej w Lublinie

Wstęp: Śluzak jest najczęściej występującym pierwotnym guzem serca. W około 75% przypadków dotyczy on kobiet, przy czym około 70% śluzaków jest zlokalizowanych w lewym przedsionku. Śluzak lewego przedsionka

może powodować wiele niespecyficznych objawów klinicznych.

Opis przypadku: Kobieta, lat 60, zgłosiła się do poradni przyklinicznej z powodu napadowej duszności nocnej, suchego kaszlu, skąpego krwiopłucia i bólów w klatce piersiowej. Chora od 10 lat była leczona z powodu atopowej, IgE-zależnej astmy oskrzelowej oraz nadczynności tarczycy w poradni internistycznej lekarza rodzinnego. W badaniu fizykalnym stwierdzono ponadto żylaki kończyn dolnych. W badaniach podstawowych nie stwierdzono istotnych odchyłań od normy. Stężenie hormonów tarczycy wskazywało na eutyreozę, parametry układu krzepnięcia i stężenie *D*-dimerów w surowicy był prawidłowy. Z uwagi na utrzymujące się krwiopłucie wykonano tomografię komputerową w opcji naczyniowej, nie stwierdzając cech zatorowości płucnej. W badaniu ultrasonograficznym żył kończyn dolnych nie zaobserwowano cech świeżej zakrzepicy. Badanie spirometryczne wykazało średniego stopnia ograniczenie rezerw wentylacyjnych płuc typu mieszanego z przewagą obturacji. Włączono 20 mg prednizonu doustnie, kontynuowano steroidoterapię wziewną, długo działające β -2-mimetyki, leki antycholinergiczne i ksantyny w dawkach należnych. Stosowano także leki uszczelniające ścianę naczyń krwionośnych. Użytko poprawę kliniczną w postaci ustąpienia krwiopłucia i bólów w klatce piersiowej, ale nadal utrzymywała się napadowa duszność nocna. Wykonano wówczas badanie echokardiograficzne serca, które wykazało obecność śluzaka lewego przedsionka. Pacjentkę zakwalifikowano do zabiegu kardiochirurgicznego i zoperowano z dobrym efektem klinicznym.

Podsumowanie i wnioski: Współistnienie choroby układu oddechowego, w tym wypadku astmy oskrzelowej, znacznie opóźniło właściwe rozpoznanie i leczenie śluzaka lewego przedsionka. Dodatkowym utrudnieniem w diagnostyce było współistnienie nadczynnego wola tarczycy, które także mogło być przyczyną suchego kaszlu.

[43]

Odczyny skórne u pacjentów z HNSCC leczonych cetuksymabem w skojarzeniu z radioterapią – prezentacja 3 przypadków

Tomasz Maksimowicz, Anna Trochimczuk

Oddział Radioterapii II, Białostockie Centrum Onkologii

Wstęp: Nowotwory nabłonkowe regionu głowy i szyi (*head and neck squamous cell carcinomas* – HNSCC) stanowią ok. 5% wszystkich zarejestrowanych w Polsce nowotworów złośliwych. Teleradioterapia jest podstawową metodą nieoperacyjnego leczenia chorych na zaawansowane lokoregionalnie nowotwory HNSCC. Stwierdzono, że dodanie do radioterapii przeciwciała monoklonalnego klasy IgG (cetuksymabu) skierowanego przeciwko receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) w porównaniu z wyłącznym napromienianiem skutkowało poprawą kontroli miejscowej i wydłużeniem mediany czasu przeżycia u tych chorych, co jest statystycznie znamien-

ne. Najczęstszymi objawami niepożądanymi stosowania cetuksymabu są reakcje skórne o charakterze trądziku o różnym stopniu nasilenia. Obserwuje się pozytywną korelację pomiędzy nasileniem zmian skórnych a skutecznością leczenia.

Cel pracy: Przedstawienie reakcji skórnych zaobserwowanych u trzech chorych, u których stosowano radioterapię w połączeniu z cetuksymabem z powodu zaawansowanego lokoregionalnie HNSCC, leczonych w BCO w latach 2007–2008.

Materiał i metody: Pacjenci napromieniani byli fotoni X 6 MV dawką 66–72 Gy/ref. Otrzymywali cetuksymab raz w tygodniu w należnych dawkach.

Wyniki i wnioski: U wszystkich pacjentów zaobserwowano wystąpienie odczynu skórno 2. stopnia w ostatnim tygodniu leczenia w obrębie napromienianej okolicy. Po miesiącu zaobserwowano ustąpienie odczynu skórno u 2 chorych, natomiast u 1 pacjenta, obciążonego cukrzycą, nastąpiło nasilenie reakcji skórnej do stopnia 3. U wszystkich pacjentów reakcje skórne były odwracalne. Tolerancja leczenia skojarzonego była dobra.

Skin reactions in hnscc patients treated with cetuximab in combination with radiotherapy – presentation of 3 cases

Background: Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) account for approximately 5% of all malignant neoplasms recorded in Poland. Teleradiotherapy is the basic method of non-surgical treatment of patients with locoregionally advanced HNSCC. Radiotherapy combined with IgG monoclonal antibody (cetuximab) directed against epidermal growth factor receptor (EGFR) was found to improve local control and to prolong median survival time, as compared to radiation used alone, the differences being statistically significant. Acne-type skin disorders varying in intensity were the most common side effects of cetuximab administration. A positive correlation was observed between intensity of skin disorders and treatment efficacy.

Aim of the study was to present skin reactions observed in 3 patients undergoing radiotherapy in combination with cetuximab due to locoregionally advanced HNSCC, treated in BOC in the years 2007–2008.

Material and methods: The patients were irradiated with 6 MV X-ray photons at a dose of 66–72 Gy/ref and received cetuximab once a week in due doses.

Results and Conclusions: All the patients developed a second degree skin reaction in the last week of therapy within the radiated region. After a month, the skin reaction subsided in 2 patients, whereas in the third patient, who was burdened with diabetes, the reaction was enhanced to the third degree. All the skin reactions were reversible. The tolerance of combination therapy was good.

[44]

Analiza występowania kardiotoxyczności u chorych na raka piersi leczonych uzupełniająco trastuzumabem w materiale Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu

Joanna Załuska¹, Wojciech Melerowicz¹, Agnieszka Rutkowska², Jerzy Załuski¹, Piotr J. Wysocki¹

¹Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

²Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp: Od kilku lat trastuzumab stanowi kluczowy lek w leczeniu uzupełniającym chorych na raka piersi z nadekspresją receptora HER2. W 4 ważnych badaniach klinicznych udowodniono, iż jego stosowanie przez 12 miesięcy wydłuża znamienne czas do progresji. Poważnym działaniem niepożądanym leku jest jego kardiotoxyczność, która może prowadzić do niewydolności krążenia. W pracy oceniono kardiotoxyczność trastuzumabu u chorych leczonych w Wielkopolskim Centrum Onkologii.

Materiał: Przeanalizowano historie chorób 63 osób (mediana 54 lata) z miejscowo zaawansowanym rakiem piersi, które w leczeniu pooperacyjnym otrzymywały trastuzumab. Badanie ECHO serca z oceną frakcji wyrzutowej lewej komory wykonywano w odstępach 3-miesięcznych.

Wyniki: Średnia LVEF przed rozpoczęciem leczenia trastuzumabem wynosiła 60,06%, w trakcie leczenia (miesiące 3. i 6.) – 58%, natomiast w 9. miesiącu – 56%. Średnio obniżenie wartości LVEF w trakcie terapii wyniosło 10%. Tylko 5 chorych (8,9%) przerwało leczenie z powodu utrzymującego się (> 4 tyg.) obniżenia wartości LVEF poniżej 45%, bez objawów jawnej niewydolności mięśnia sercowego. Trzy chore przerwały leczenie z powodu progresji choroby.

Wnioski: Stosowanie trastuzumabu w leczeniu uzupełniającym u chorych na miejscowo zaawansowanego raka piersi jest leczeniem stosunkowo bezpiecznym i obciążonym niewielką kardiotoxycznością.

[45]

Kardiotoxyczność 5-fluorouracylu u młodej chorej na raka odbytnicy – opis przypadku

Joanna Załuska, Wojciech Melerowicz, Jerzy Załuski, Piotr J. Wysocki

Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wstęp: Analogi pirymidyny, takie jak 5-FU, są szeroko stosowane w leczeniu wielu nowotworów złośliwych. Spośród wielu działań ubocznych tych leków kardiotoxyczność jest relatywnie rzadkim zdarzeniem niepożądanym.

W pracy przedstawiono przypadek kardiotoxyczności związanej ze stosowaniem 5-FU u młodej kobiety z rakiem odbytnicy.

Materiał: Dwudziestoosmioletnia kobieta, bez obciążonego wywiadu kardiologicznego, z rakiem odbytnicy pT3N1cM0 po przedoperacyjnej radioterapii (25 Gy/T) oraz uzupełniającej chemioterapii (8 kursów kapecytabiny). Po 7 miesiącach usunięto u niej pojedynczy przerzut w wątrobie i rozpoczęto chemioterapię schematem FOLFOX-6. W trakcie pierwszego kursu pojawił się silny, spoczynkowy ból zamostkowy, który trwał 6 godz. po zakończeniu wlewu 5-FU. Przed drugim kursem wykonano EKG i ECHO serca – bez zmian. Chora otrzymała premedykację – 5 mg antagonisty kanału wapniowego (amlodypina) doustnie. Ponownie pojawił się ból zamostkowy w trakcie wlewu, w EKG – niewielkie obniżenie odcinka ST. W trakcie następnym kursów otrzymywała 40 mg mononitratu izosorbidu oraz 5 mg amlodypiny – sporadycznie jeszcze zgłaszała wysiłkowy ból zamostkowy, ale o mniejszym nasileniu. Łącznie otrzymała 12 kursów FOLFOX-6.

Wnioski: Kardiotoxyczność 5-FU jest rzadkim powikłaniem o niejasnej etiologii, które może występować u chorych bez wcześniejszej choroby serca. W opisanym przypadku skojarzenie dwóch leków – antagonisty kanału wapniowego oraz nitratu – skutecznie zniwelowało objawy oraz pozwoliło dokończyć leczenie.

[46]

Ekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) w raku krtani – korelacja z cechami kliniczno-morfologicznymi

Katarzyna Starska¹, Olga Stasikowska², Iwona Lewy-Trenda²

¹Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wstęp: Stymulacja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) odgrywa kluczową rolę w aktywacji szlaku wewnątrzkomórkowych przekaźników sygnału i aktywatorów transkrypcji (STATs), kinaz aktywowanych mitogenem (MAPKs) oraz transkrypcyjnego czynnika jądrowego (NF-κB), mediatorów istotnych dla procesu kancerogenezy.

Cel pracy: Analiza immunoekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) w komórkach nowotworowych raka płaskonabłonkowego krtani oraz ocena związku z cechami kliniczno-morfologicznymi guza, określonymi na podstawie kryteriów klasyfikacji zmian we froncie naciek nowotworowego (*tumour front grading* – TFG).

Materiał i metody: Przeprowadzono analizę ekspresji EGFR (uwzględniając odczyn błonowy EGFR-m oraz cytoplazmatyczny EGFR-c) w utkaniu nowotworowym 45 chorych na raka płaskonabłonkowego krtani leczonych chirurgicznie. W badaniach morfologicznych zastosowano metodę immunohistochemiczną IHC.

Wyniki: Potwierdzono pozytywną immunoekspresję EGFR w badanych przypadkach raka krtani: w 93,3% dla odczynów błonowych EGFR-m oraz w 37,8% dla odczynów cytoplazmatycznych EGFR-c. Potwierdzono istotną korelację ekspresji EGFR-m z cechą pT, głębokością i typem inwazji nowotworowej, jak również ekspresji EGFR-c z sumą punktów wg kryteriów klasyfikacji TFG.

Wnioski: Przeprowadzona analiza potwierdziła związek poziomu immunoekspresji EGFR ze stopniem agresywności zmian nowotworowych w raku płaskonabłonkowym krtani. Ocena odczynów dla EGFR może być wartościową metodą oceny zaawansowania choroby nowotworowej w zaawansowanych przypadkach raka krtani.

Praca finansowana z funduszy projektu naukowo-badawczego KBN/ MNiSW nr N403 04332/2326.

Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in laryngeal carcinoma – connection with clinicopathological features

Background: Stimulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) plays a pivotal role in the activation of signal transducers and activators of transcription (STATs), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappaB (NF-κB) mediators critical for cancerogenesis.

The aim of the study was to analyse EGFR immunopression in tumour tissues and parameters of tumour front grading (TFG) and to assess the relationship between pathological results and aggressiveness of laryngeal carcinoma.

Material and methods: The analysis of EGFR expression (membranous EGFR-m and cytoplasmic EGFR-c) in neoplasm cells in 45 patients treated surgically due to squamous cell laryngeal carcinoma was performed. The EGFR level in tumour tissues was estimated by immunohistochemistry.

Results: The expression of EGFR-m in 93.3% of cases and EGFR-c in 37.8% of cases was confirmed. Significant correlations between EGFR-m IHC expression with pT feature, depth and type of invasion, as well as EGFR-c IHC staining with total TFG score, were disclosed.

Conclusions: This study confirms interconnections between EGFR immunopression and growth of laryngeal carcinoma as well as their importance in determining proliferative and aggressive potential of squamous cell carcinoma of the larynx.

This work was supported by grants from the National Science Council (KBN N403 04332/2326).

[47]

Wstępna ocena efektywności organizacyjnej w opiece onkologicznej w opinii lekarzy onkologów

Hanna Saryusz-Wolska

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wstęp: Efektywność organizacyjna w opiece zdrowotnej stanowi pojęcie złożone, dynamiczne, trudne do zdefiniowania i zmierzenia. Największą popularność oceny efektywności zdobyła koncepcja Kaplana i Nortona – zrównoważona karta wyników (*balanced scorecard* – BSC) – analizująca zadowolenie klientów, procesy wewnętrzne, uczenie się i rozwój oraz skutki finansowe.

Cel pracy: Analiza procesów wewnętrznych występujących w organizacji.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono w grupie 25 lekarzy onkologów różnych specjalności pracujących w ROO w Łodzi, w grudniu 2008 r. i styczniu 2009 r. Zastosowano metodę dialogową (jakościową) – wywiad poznawczy (pogłębiony, częściowo strukturalizowany).

Wyniki: Badania wskazują na trudne warunki pracy: złe warunki lokalowe, braki sprzętu biurowego, brak sekretarek medycznych oraz utrudniony dostęp do badań diagnostycznych. Pracę lekarzy cechuje znaczna i narastająca uciążliwość, bardzo duża odpowiedzialność i zła organizacja czasu pracy, głównie w zakresie planowania zadań. Lekarze krytycznie oceniają wysokość wynagrodzeń oraz brak systemu motywacyjnego, natomiast wysoko oceniają stosunki międzyludzkie zarówno z kolegami, jak i przełożonymi. W badaniach ujawniono powszechne występowanie nieformalnych wewnętrznych procesów podstawowych, pomocniczych i zarządczych. Generowanie wewnętrznych procesów nieformalnych stanowi strategię kompensacyjną i adaptacyjną, wynikającą z niedostatecznych zasobów organizacji, której celem jest sprostanie oczekiwaniom pacjentów i wymaganiom pracodawcy. W pracy przedstawiono najczęściej stosowane przez lekarzy strategie oraz wpływ procesów nieformalnych na efektywność organizacyjną zakładu opieki zdrowotnej.

Wnioski: Procesy nieformalne, oprócz korzystnego efekty kompensacyjnego, mogą niekorzystnie wpływać na warunki pracy lekarzy, powodując dodatkowe obciążenie pracą i niezadowolenie i wywołując tym samym efekt „błędnego koła”. Ocena efektywności organizacyjnej w opiece zdrowotnej wymaga analizy procesowej, określenia standardów pracy oraz minimalnych zasobów organizacyjnych.

Preliminary assessment of organizational effectiveness in oncology care in the opinion of oncologists

Background: Organizational effectiveness in health care is a complex and dynamic concept, hard to define or measure. The most popular concept used in effectiveness

assessment is that of Kaplan and Norton – the balanced scorecard (BSC), which assesses patient/customer satisfaction, internal processes, learning and growth as well as financial effects.

Aim of the study was to analyse the organization's internal processes.

Material and methods: The study was carried out in December 2008 and January 2009 in a group of 25 oncologists of different specialties employed in the Regional Cancer Centre in Lodz. A qualitative dialogue method was used: a cognitive interview (in-depth, partly structured).

Results: The study pointed to difficult working conditions: low quality premises, shortage of office equipment, lack of medical secretaries and difficult access to diagnostic services. Doctors' work is excessively and increasingly laborious, as well as highly responsible. Working time is badly organized, especially as regards task management. Doctors are critical about their pay level and lack of a motivation system but express positive opinions about interpersonal relationships with both their colleagues and superiors. The study shows frequent incidence of informal internal processes: basic, auxiliary and managerial. Generation of such processes is a compensation and adaptation strategy resulting from insufficient resources of an organization whose aim is to meet patients' expectations and employer's requirements. The work presents strategies most commonly used by doctors and the effect of informal processes on the organizational effectiveness of a health care institution.

Conclusions: Informal processes, in spite of their positive compensation effect, may have a negative influence on doctors' working conditions by causing additional workload and dissatisfaction, resulting in a "vicious circle" effect. The assessment of organizational effectiveness in health care requires process analysis and establishment of working standards and minimum organizational resources.

[48]

Model pracy socjalnej z pacjentami onkologicznymi w Wielkopolskim Centrum Onkologii

Arkadiusz Spychała

Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Praca socjalna z pacjentami onkologicznymi opiera się przede wszystkim na założeniach indywidualnej oraz grupowej metody prowadzenia przypadków. To nie tylko prowadzenie pacjenta przez gąszcz przepisów, ale również wskazanie możliwości, jakie pojawiają się w momencie zdiagnozowania choroby. Ideą jest pomoc quasi-prawna, która ułatwia postępowanie zarówno w czasie terapii, jak i po leczeniu. Są to przede wszystkim informacje związane z orzecznictwem rentowym (Zakład Ubezpieczeń Społecznych) – zasiłek chorobowy, świadczenie rehabilitacyjne, renta z tytułu niezdolności do pracy, emerytura; orzecznictwem pozarentowym (Powiatowe Zespoły ds. Orzeka-

nia o Niepełnosprawności) – orzekanie stopnia niepełnosprawności w celu zapewnienia ulg i uprawnień osobie niepełnosprawnej; pomoc w zaopatrzeniu pacjenta w przedmioty ortopedyczne i środki pomocnicze w Narodowym Funduszu Zdrowia; pomocą społeczną – dla osób o niskim statusie materialnym oraz pomoc w umieszczeniu pacjenta w hospicjum lub na oddziale długoterminowym. Prócz wyżej wymienionych działań, które są podstawą pracy socjalnej w Wielkopolskim Centrum Onkologii, należy wymienić również zagospodarowanie czasu wolnego pacjentów. Jest to organizowanie na terenie szpitala koncertów, wyświetlanie filmów, a także organizowanie spotkań tematycznych. Dzięki współpracy z instytucjami publicznymi Wielkopolskiego Centrum Onkologii pacjenci mają dostęp zarówno do fachowych porad, jak i rozrywki.

[49]

Specyfika pomocy udzielanej pacjentom przez pracowników Pracowni Psychologii Klinicznej w ramach Dziennego Oddziału Rehabilitacji w Wielkopolskim Centrum Onkologii

Małgorzata Stańczyk, Karolina Mostowska, Arkadiusz Spychała, Mariusz Pawlukiewicz

Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Działalność Pracowni Psychologii Klinicznej w ramach Dziennego Ośrodka Rehabilitacji Wielkopolskiego Centrum Onkologii jest ściśle określona warunkami kontraktu podpisanego z Narodowym Funduszem Zdrowia. Zgodnie z jego ustaleniami pacjenci mają możliwość rozmów indywidualnych oraz udziału w spotkaniach grupowych z psychologiem, pracownikiem socjalnym i muzykoterapeutą. Na spotkaniach z pacjentkami po mastektomii omawiane są aspekty radzenia sobie w sytuacjach trudnych. Sytuacje stresowe u kobiet, które przebyły operację raka piersi, wywołują niepewność co do skuteczności przeprowadzonego leczenia, powodującą z kolei lęk przed wznową nowotworu i zagrożeniem życia, niesprawność fizyczną będącą następstwem zabiegu chirurgicznego, trudne do rozwiązania problemy osobiste, rodzinne i zawodowe bezpośrednio lub pośrednio związane z wynikiem zabiegu chirurgicznego. Głównym celem rehabilitacji psychicznej po operacji raka piersi jest mobilizacja zasobów psychicznych, mająca na celu kompensację fizyczną i psychiczną niekorzystnych następstw tego zabiegu. Istotne jest wytworzenie u kobiet właściwego stosunku do zaistniałego faktu utraty piersi oraz uświadomienie pacjentkom, że w nowej sytuacji mają pełną szansę przystosowania społecznego i zawodowego. Z powyższego wynika, że postępowanie psychoterapeutyczne powinno pobudzać chęć do życia, korygować sferę motywacyjną oraz strukturę osobowości, które zostały zaburzone przez sytuacje stresowe wywołane chorobą nowotworową i następstwami jej leczenia.

[50]

Muzykoterapia w rehabilitacji onkologicznej

Małgorzata Stańczyk

Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Doniesienia naukowe i badania empiryczne potwierdzają zasadność zastosowania muzykoterapii w procesie kompleksowego leczenia i rehabilitacji. W różnych dyscyplinach medycyny mogą być wykorzystywane techniki terapeutyczne w zależności od celu, któremu mają służyć. Muzykoterapia w onkologii stosowana jest jako metoda kompleksowego leczenia pacjentów, wspomagająca i uzupełniająca inne formy leczenia. W odniesieniu do pacjentów onkologicznych stosowana jest głównie muzykoterapia w formie receptywnej, nastawiona na odbiór muzyki wybranej przez pacjenta lub przez terapeutę. W celu pogłębienia doznań muzykę łączy się z rysunkiem lub tekstem literackim. Muzyka towarzyszy wizualizacji, technikom oddechowym, terapii zajęciowej. Muzyka jako czynnik, który stymuluje i porządkuje ruch, wykorzystywana jest również w przebiegu zajęć muzyczno-ruchowych. Kompilacja technik terapeutycznych, elementów muzycznych i ruchowych zwiększa efektywność procesu terapeutycznego. Muzyka w terapii stosowana jest w celu łagodzenia negatywnych – głównie psychologicznych – skutków choroby: odczuwanego lęku, niepokoju i smutku. Muzykoterapia ukierunkowana jest na dostarczanie dodatnich przeżyć, poprawę nastroju pacjenta oraz zaspokojenie potrzeby bezpieczeństwa i akceptacji. Stosowane techniki terapeutyczne sprzyjają uwalnianiu i ekspresji tłumionych emocji, dają poczucie spokoju i wyciszenia. Wielokierunkowe oddziaływanie muzykoterapii na sferę psychiczną i somatyczną człowieka sprawia, iż coraz częściej znajduje ona zastosowanie w wielu dyscyplinach medycyny, a tym samym w ramach holistycznie rozumianego systemu opieki nad pacjentem.

[51]

Odpowiedź na powtórny reindukcję leczenia z użyciem genetycznie modyfikowanej szczepionki komórkowej u chorych na czerniaka złośliwego

Aldona Karczewska-Dzionk, Julian Malicki, Andrzej Mackiewicz

Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Materiały i metody: W okresie od 12.12.1996 r. do 23.06.2005 r. do badania II fazy oceny skuteczności leczenia adiuwantowego z użyciem genetycznie modyfikowanej szczepionki komórkowej włączono 283 pacjentów. U 114 chorych stwierdzono IIIB, u 119 IIIC, u 50 IV stopień zaawansowania klinicznego choroby. Genetycz-

nie modyfikowana szczepionka początkowo składała się z 2 oryginalnie wyprowadzonych linii komórkowych czerniaka złośliwego z dodatkiem genów interleukiny 6 i jej rozpuszczalnego receptora w ilości 5×10^7 komórek. W kolejnej fazie badań wprowadzono powyższe linie modyfikowane genem GMCSF oraz bez modyfikacji. Pacjenci byli randomizowani do leczenia różnymi rodzajami szczepionki. Chorzy otrzymywali szczepionkę 4 razy co 2 tyg., następnie raz w miesiącu. Średni okres obserwacji wyniósł 8 lat. W przypadku progresji choroby u części pacjentów zastosowano powtórny indukcję leczenia, czyli immunizację co 2 tyg.

Wyniki: W trakcie obserwacji progresję stwierdzono u 70% pacjentów. W 60% przypadków zastosowano reindukcję szczepionki, uzyskując odpowiedź kliniczną u 30% pacjentów niezależnie od wyjściowego stopnia zaawansowania choroby. Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w przeżyciach pacjentów, u których w wypadku progresji zastosowano reindukcję, w porównaniu z pacjentami, u których z różnych przyczyn z niej zrezygnowano.

Wnioski: Intensyfikacja immunizacji w przypadku progresji u pacjentów chorych na czerniaka złośliwego leczonych adiuwantowo wydłuża istotnie statystycznie okres przeżycia chorych niezależnie od wyjściowego stopnia zaawansowania choroby.

[52]

Białka transportujące wybrane cytostatyki u chorych na nowotwory złośliwe. Doniesienie wstępne

Barbara Kozakiewicz¹, Monika Kaczmarczyk²

¹Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

²Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

Zachorowalność na raka jajnika wciąż jest znaczna i wynosi 11 nowych zachorowań na 100 tys. kobiet rocznie. Spośród tych kobiet 70% umrze przed upływem 5 lat. Statystyki te nie zmieniają się od wielu lat. Przyczyny tak złych wyników leczenia, pomimo stosowania leków coraz nowszych generacji, są ciągle nieznane. Za tak małą skuteczność leczenia mogą być odpowiedzialne komórki nowotworowe odporne na cytostatyki, powstałe podczas leczenia lub istniejące przed jego rozpoczęciem. Lekooporność wielolekowa (*multidrug resistance* – MDR) może także wynikać z własności biologicznych guzów nowotworowych. Działania zmierzające do przetamania lekooporności polegały dotąd na: eskalacji dawek cytostatyków, stosowaniu chemioterapii wysokodawkowej z przeszczepieniem komórek macierzystych szpiku, stosowaniu chemioutuczalaczy, hamowaniu angiogenezy, stosowaniu terapii genowej z funkcjami uzyskania i utraty funkcji genu oraz stosowaniu modulatorów, czyli substancji farmakologicznych, których rola polega na zwiększeniu skuteczności chemioterapii konwencjonalnej poprzez oddziaływanie na geny oporności wielolekowej (*multidrug resistance-associated protein* – MRP1, *lung resi-*

stence related protein – LPR, *breast cancer related protein* – BCRP). Próby różnorodnego sposobu wpływu na zjawisko MDR świadczą dobitnie o jego skomplikowanej naturze i trudnościach napotykanym przez badaczy w jej przełamaniu.

Modulatory lekooporności wielolekowej oddziałują poprzez różne mechanizmy. Jednym z nich jest zaburzenie transportu leków poprzez błonę komórkową polegające na utrudnieniu wchłaniania leków do wnętrza komórki lub na zwiększonym usuwaniu cytostatyku już obecnego we wnętrzu komórki nowotworowej. Udowodniono, że aktywny udział w usuwaniu leków biorą białka transportowe z rodziny ABC (*ATP-binding cassette*). Białka te transportują leki poza komórkę wbrew gradientowi stężeń. Wyodrębnienie takich białek, specyficznych dla raka jajnika, poznanie ich natury, powinowactwa obecności lub braku w komórkach nowotworowych może wpłynąć na znaczące podniesienie skuteczności leków w procesie niszczenia komórek nowotworowych.

Określenie obecności białek ABC w surowicy u chorych przed rozpoczęciem podawania cytostatyków oraz w trakcie ich podawania mogłoby stać się jedną z ważnych metod selektywnego eliminowania lekooporności.

W omawianym, rozpoczętym badaniu, prowadzonym w grupie chorych na nowotwory złośliwe leczonych cisplatiną (DDP), podjęto próbę określenia istnienia specyficznego białka, które uczestniczy w transporcie związków platyny w surowicy.

W tym celu zbadano surowice uzyskane od 11 chorych będących w trakcie leczenia różnymi dawkami DDP. Krew pobierano dobę po dożylnym podaniu cytostatyku. Wykorzystując metodę elektroforezy żelowej oraz techniki ablacji laserowej połączonej ze spektrometrią mas (LA ICP MS), oznaczono i wyodrębniono białka transportowe.

1. Dotychczas opracowano metody analityczne służące stwierdzeniu obecności związków platyny w surowicy chorych otrzymujących nawet minimalne dawki (20 mg/dobę) cisplatinę w toku jednego kursu chemioterapii.
2. Spośród kilkunastu białek mogących brać udział w transporcie DDP, z przeprowadzanych przez autorki analiz wynika, że najbardziej prawdopodobne są białka o masie 72–190 kDa.
3. Poznawane są pierwsze białka łączące się ze związkami platyny, których naturę próbujemy zaliczyć do białek wypierających (*efflux proteins*) bądź białek wychwytujących (*uptake proteins*).

Prezentowane wyniki są jedynie wstępnym etapem badania, próbą wyodrębnienia białek transportowych w surowicy chorych otrzymujących platynę. Na obecnym etapie badań, nie uzyskano wyników, które określiłyby grupę białek ABC biorących udział w transporcie DDP z dostatecznie wysokim poziomem czułości oraz specyficzności. Badanie jest kontynuowane.

Transport proteins for chosen cytostatic drugs. Preliminary report

Ovarian cancer morbidity is still high and its current level is 11 new cases per 100 women per year. Among 70% of them will die within 5 years. Despite of using the new generations drugs reasons for this statistic have been unchangeable for many years and still have been unknown. Well know factors which overcome drug resistance are: an escalation of cytostatic doses, a high dose chemotherapy with stem cell transplant, use of chemosensitizer, an angiogenesis prevention, a gene therapy with a gene function gain or loss, or use of modulators, substances that enhance conventional chemotherapy effectiveness through influence on multidrug resistance genes. Various attempts to investigate an influence on MDR phenomenon are clear proof because of its complex nature and problems with suppressing.

Current presented ongoing research, carried on group of malignant tumors patients treated with Cisplatin (DDP), attempts to determine existence of specific platinum transporting protein.

Serum from 11 patients treated with different doses of DDP was obtained day after intravenous drug administration. Transport proteins was isolated and identified with using of gel electrophoresis and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA ICP MS).

1. The analytical method for detecting presence of platinum in serum of the sick given even minimal doses (20 mg per day) of cisplatin during one course of chemotherapy so far has been developed.
2. Among proteins able to transport DDP, according to our research, the most likely are proteins weighing from 29 kDa to 120 kDa.
3. First proteins connecting with cisplatin have been examined. According to their nature, these proteins are considered to be either efflux proteins or uptake proteins.

Presented results are just preliminary stage of research. It is a trial to isolate transport proteins in serum of platinum treated patient. At the current stage no result identifying group of ABC proteins taking role in DDP transport with high enough sensibility and specificity was obtained. Research is being continued.