
contemporary oncology

współczesna **onkologia**

Indexed in: ISI Master Journal List, ISI Science Citation Index Expanded (Sci-Search), PubMed Central/PubMed, EMBASE, Chemical Abstracts CAS, Scopus, Index Copernicus (IC), MNiSW, Directory of Open Access Journals (DOAJ), OpenMed Database and Polish Medical Library (GBL).

TERMEDIA Publishing House

contemporary oncology

współczesna onkologia

Editorial Board

Andrea Ardizzoni (Italy)	Sergiusz Markowicz (Warsaw)
Magdalena Chechlińska (Warsaw)	Andrzej Marszałek (Poznan)
Thierry Le Chevalier (France)	Jan P. van Meerbeeck (Holland)
Tanja Cufer (Slovenia)	Piotr Milecki (Poznan)
Angus Dalglish (UK)	Paweł Murawa (Poznan)
Andrzej Deptała (Warsaw)	Dawid Murawa (Poznan)
Michał Drews (Poznan)	Jacek Nikliński (Białystok)
Soldano Ferrone (USA)	Andrzej Nowicki (Bydgoszcz)
Pere Gascon (Barcelona, Spain)	Janusz Pawłęga (Krakow)
Wojciech Golusiński (Poznan)	Marek Pawlicki (Krakow)
Fred R. Hirsch (USA)	Stanisław Radowicki (Warsaw)
Jerzy Hołowiecki (Katowice)	Czesław Radzikowski (Wroclaw)
Paul Van Houtte (Belgium)	Jacek Roliński (Lublin)
Iwona Hus (Lublin)	Giovanni Rosti (Italy)
Jacek Jassem (Gdansk)	Domenico Rubello (Italy)
Wiesław W. Jędrzejczak (Warsaw)	Pravin Sehgal (USA)
Leszek Kaczmarek (Warsaw)	Branimir I. Sikic (USA)
Claudine Kieda (Orleans, France)	Janusz Skowronek (Poznan)
Zygmunt Kopczyński (Poznan)	Marek Spaczyński (Poznan)
Maciej Krzakowski (Warsaw)	Stanisław Szala (Gliwice)
Włodzimierz Krzyżosiak (Poznan)	Cezary Szczylik (Warsaw)
Zbigniew Kwias (Poznan)	Andrzej Szkaradkiewicz (Poznan)
Andrzej Lange (Wroclaw)	Maurizio Tonato (Italy)
Janusz Limon (Gdansk)	Maciej Ugorski (Wroclaw)
Marek Los (Sweden)	Maciej Wiznerowicz (Poznan)
Jan Lubiński (Szczecin)	Marek Wojtukiewicz (Białystok)
Jacek Łuczak (Poznan)	Theresa Whiteside (USA)
Bogusław Maciejewski (Gliwice)	Piotr J. Wysocki (Poznan)
Julian Malicki (Poznan)	Jan Żeromski (Poznan)

Editor-in-Chief

Andrzej Mackiewicz
e-mail: andrzej.mackiewicz@wco.pl

Publisher

Termedia sp. z o.o. Wydawnictwo Medyczne
e-mail: termedia@termedia.pl

Editors

Leszek Kaczmarek,
Włodzimierz Krzyżosiak,
Cezary Szczylik

Warsaw office

tel./fax +48 22 827 75 14
e-mail: biuro.warszawa@termedia.pl

Associate Editors

Sun Zhi-Gang, Zhu Di, Xuemei Ji,
Mirosław Kiedrowski

President of the Management Board

Editor-in-Chief of the Publishing House

Janusz Michalak
e-mail: j.michalak@termedia.pl

Language Editor

Richard Ashcroft

Director of the Publishing House

Andrzej Kordas
e-mail: a.kordas@termedia.pl

Statistics Editor

Małgorzata Misztal

Editorial Office

Termedia sp. z o.o.
Kleeberga 2, 61-615 Poznań
tel./fax +48 61 822 77 81, ext. 604
e-mail: contemporaryoncology@termedia.pl

*Journal published under the auspices
of the Association for Fight Against Cancer
"Genes for Life" (Poznan)
and the Foundation of Experimental
and Clinical Oncology (Warsaw)*

Marketing and Advertising

tel./fax +48 61 822 77 81 ext. 507
e-mail: m.pretka@termedia.pl



www.termedia.pl
www.onkologia.termedia.pl

Distribution and Subscriptions

Iwona Kempa
tel./fax +48 61 656 22 00
e-mail: prenumerata@termedia.pl

Circulation of 2,500 copies

layout
_studio termedia

*The advertisers shall be liable for the contents
of advertisements placed
in Contemporary Oncology.
Advertisements of prescription drugs are
intended only for physicians licensed
to prescribe them*

contemporary oncology
współczesna **onkologia**

Volume 18, Supplement 3, February 2014

**VI Congress of
*Contemporary Oncology***

NEXT GENERATION

Poznan, 27–29 March 2014

**VI Kongres
*Współczesnej Onkologii***

NEXT GENERATION

Poznań, 27–29 marca 2014

Otwarcie Kongresu

[1]

Terapie komórkowe w transplantacji twarzy

Maria Siemionow

Otwarcie Kongresu

[2]

Inducible pluripotent stem cells as a tool in articular cartilage regeneration**Wiktoria Suchorska**Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland
Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska**Abstract**

The main objective of the study was to understand the molecular mechanisms and signal transduction pathways involved in the differentiation process of the stem cells (embryonic human stem cells – hES, and induced pluripotent stem cells – iPS) into chondrocytes.

Specific objectives include:

1. Analysis of the molecular mechanisms involved in differentiation hES cells, and iPS cells into chondrocytes by analysis of global gene expression profiles at various stages of cell differentiation.
2. Comparison of the mechanisms and signal transduction pathways involved in differentiation process of hES, and iPS cells to chondrocytes.
3. Multidimensional comparative analysis *in vitro* of mature chondrocytes differentiated from both hES, and iPS cells.
4. Demonstration the functionality of the hES, and iPS cells-derived chondrocytes in the regeneration of damaged articular cartilage *in vivo* in an animal experimental model.

The possibility of maintaining *in vitro* full-featured iPS cells was confirmed. In addition, we have established a line of human embryonic stem cells (hES). Up to the date it was proved that hES have the capacity to differentiate directly toward chondrocytes under defined cell culture conditions. During this process we controlled the morphology of the cells, and the level of gene expression typical for embryonic cells (OCT4, SOX2, NANOG), for mesoendoderm (MIXL1), for mesoderm (PDGFR β), for endoderm (SOX17, GATA4) and for mature chondrocytes (SOX9, CD44, collagen type II). Moreover at the entire process of reprogramming and the differentiation of the cells culture the population of differentiated cells was examined using immunofluorescence, and immunohistochemistry (safranin O, collagen type II). We are going to perform a global analysis of gene expression at different stages of hES, and iPS cells differentiation. These analyzes based on RNA microarray technology will be made in collaboration with the Institute of Applied Cancer Center, MD Anderson, University of Texas. The experience gained by the project manager in the TCGA (Tumor Cancer Genome Atlas) Researches enable the validation of the most important genes involved in the molecular mechanisms controlling stem cells differentiation using RT-PCR. In a further step we are going to study the protocol for differentiation iPS cells toward chondrocytes. Obtained chondrocytes will be used as a transplants for repairing cartilage damage *in vivo* according to the previously developed methodology. The model of *in vitro* analysis of regeneration the articular cartilage has been developed. Animal study are performed in collaboration with team of Dr Trzeciak from Department and Clinic of Orthopedics and Traumatology, Poznan University of

Streszczenie

Cel pracy: Celem ogólnym projektu jest poznanie mechanizmów molekularnych i szlaków przekaźnictwa sygnału zaangażowanych w proces różnicowania komórek macierzystych (hES) do chondrocytów. Opracowanie wydajnego protokołu różnicowania hES będzie podstawą do badań nad wykorzystaniem zróżnicowanych chondrocytów w medycynie regeneracyjnej u chorych z nowotworami głowy i szyi.

Materiał i metody: W badaniach wstępnych, w ściśle określonych warunkach hodowli, przeprowadzono różnicowanie komórek hES linii BG01V do chondrocytów. Komórki linii BG01V hodowano zgodnie z zaleceniami ATCC. W celu uzyskania różnicowania komórek BG01V kolejno dodawano rekombinowane czynniki wzrostu do pożywki hodowlanej. Protokół różnicowania ludzkich komórek hES do chondrocytów obejmuje trzy fazy hodowli. W pierwszym etapie komórki są utrzymywane w medium do hodowli komórek hES wzbogaconym WNT3a, bFGF i aktywiną A, której stężenie było stopniowo zmniejszane. W tych warunkach zachodzi różnicowanie hES do komórek mezoendodermi. Następnie do pożywki dodawano w określonych stężeniach czynniki warunkujące różnicowanie się komórek do mezodermy: BMP4, follistatyna, neurotrofina 4. W celu uzyskania dojrzałych chondrocytów w ostatnim etapie różnicowania stopniowo dodawano do pożywki GDF5, zmniejszając jednocześnie stężenie BMP4. Fenotyp otrzymanych chondrocytów potwierdzono, wykonując barwienie kwasem alcjanowym.

Wyniki: W czasie całego cyklu kontrolowano morfologię komórek, a także poziom ekspresji genów charakterystycznych dla komórek zarodkowych (OCT4, SOX2, NANOG), komórek mezoendodermi (MIXL1), mezodermy (PDGFR β), endodermi (SOX17, GATA4) oraz dla chondrocytów (SOX9, CD44, kolagen typu II). Dodatkowo w poszczególnych etapach hodowli komórki oceniano za pomocą immunohistochemii i immunofluorescencji (safranina O, kolagen typu II).

Wnioski: Wykazano potencjał ludzkich embrionalnych komórek macierzystych do różnicowania się w komórki chrząstki *in vitro*. W ostatnim etapie badań otrzymane komórki będą wykorzystane do wypełnienia ubytków w chrząstce stawowej *in vitro* z zastosowaniem wcześniej opracowanego modelu zwierzęcego uszkodzenia chrząstki stawowej królika.

Słowa kluczowe: komórki iPS, medycyna regeneracyjna.

Medical Sciences. We are going to examine the mechanism of repair of so-called full thickness cartilage damage which penetrates subchondral bone.

The results of the experiments will form the basis for the development of regenerative medicine and may contribute to the development of clinical protocols for future acquisition of chondrocytes from the patient's somatic cells.

Key words: iPS cells, regenerative medicin.

Session 1. Oncogenesis

Sesja 1. Onkogeneza

[3]

Epidemiology of ovarian cancer in Western Pomerania: a comparison of 1999–2001 and 2008–2010. Evaluation of the effectiveness of population screening and prevention program*Epidemiologia raka jajnika w województwie zachodniopomorskim: porównanie lat 1999–2001 i 2008–2010. Ocena efektywności przesiewu populacyjnego i programu profilaktycznego***Gronwald J.¹, Menkiszak J.², Chudecka-Głaz A.², Domagała W.³, Urańska E.³, Symonowicz H.⁴, Majdanik E.⁵, Waloszczyk P.⁶, Sycz K.⁷, Maria M.⁸, Huzarski T.¹, Byrski T.¹, Górski B.¹, Cybulski C.¹, Dębniak T.¹, Oszurek O.¹, Lubiński J.¹**¹Department of Genetics and Pathology, International Hereditary Cancer Center, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland²Department of Gynecological Surgery and Gynecological Oncology of Adults and Adolescents, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland³Department of Pathology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland⁴Department of Clinical Oncology, District Hospital, Koszalin, Poland⁵Department of Pathology and Forensic Medicine, District Hospital, Koszalin, Poland⁶NZOZ „Zdunomed”, Szczecin, Poland⁷Department of Pathology, Independent Public District Hospital, Szczecin, Poland⁸Department of Clinical Oncology, West Pomeranian Center of Oncology, Szczecin, Poland¹Zakład Genetyki i Patomorfologii, Międzynarodowe Centrum Nowotworów Dziedzicznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska²Katedra i Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologii Ginekologicznej Dorosłych i Dziewcząt, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska³Zakład Patomorfologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska⁴Oddział Onkologii Klinicznej, Szpital Wojewódzki w Koszalinie, Polska⁵Zakład Patomorfologii i Medycyny Sądowej, Szpital Wojewódzki w Koszalinie, Polska⁶NZOZ „Zdunomed” w Szczecinie, Polska⁷Zakład Patomorfologii, Samodzielny Publiczny Wojewódzki Szpital Zespolony w Szczecinie, Polska⁸Oddział Onkologii Klinicznej, Zachodniopomorskie Centrum Onkologii w Szczecinie, Polska**Abstract**

Aim of the study: Evaluation of the effectiveness of population screening and implemented prevention program by comparison of the incidence of ovarian cancer and the incidence of BRCA1 mutations among patients with ovarian cancer diagnosed in the region in the years 1999–2001 and 2008–2010.

Material and methods: In the period 1999–2001 in Western Pomerania, in collaboration with family physicians, there was conducted a survey on the incidence of cancer in families of patients registered in GP practices. We obtained 1,258 million questionnaires/1.7 million inhabitants. On the basis of survey data, patients with indications for an in-depth genetic-oncology consultation and genetic testing were invited and examined. As a result, up to now 1198 BRCA1 gene mutation carriers were diagnosed and 11980 patients in whose mutation has not been found, but clinical and pedigree data showed a high risk of developing breast or ovarian cancer. Both groups of patients were included into appropriate prevention program and BRCA1-carriers were offered preventive gynecological operations. In this context, the efficacy of prophylactic program was measured by determining the incidence of ovarian cancer in the period immediately preceding the commencement of the program – 1999–2001 and after 8 years of prevention program use – from 2008 to 2010.

Streszczenie

Cel pracy: Ocena efektywności populacyjnego badania przesiewowego i wdrożonego programu profilaktycznego poprzez porównanie zachorowalności na raka jajnika oraz częstości mutacji genu BRCA1 wśród pacjentek z rakiem jajnika zdiagnozowanych w województwie zachodniopomorskim w latach 1999–2001 oraz 2008–2010.

Materiał i metody: W latach 1999–2001 w województwie zachodniopomorskim we współpracy z lekarzami rodzinnymi przeprowadzono badania ankietowe dotyczące zachorowań na nowotwory w rodzinach pacjentów zarejestrowanych w praktykach lekarzy rodzinnych. Uzyskano 1,258 mln ankiet/1,7 mln mieszkańców. Na podstawie danych ankietowych wyselekcjonowano pacjentów, u których występowały wskazania do przeprowadzenia pogłębionej konsultacji onkologiczno-genetycznej oraz wykonania testów genetycznej predyspozycji do nowotworów. W efekcie tych działań dotychczas zdiagnozowano 1198 nosicielek mutacji genu BRCA1 oraz 11 980 pacjentek, u których mutacji nie stwierdzono, ale dane rodowodowo-kliniczne wskazywały na wysokie ryzyko rozwoju raka piersi lub jajnika. Obie grupy pacjentek objęto odpowiednią profilaktyką, a nosicielkom mutacji genu BRCA1 proponowano profilaktyczną operację narządu rodowego. W powyższym kontekście w niniejszej pracy określono skuteczność programu profilaktycznego poprzez określenie za-

Results: In the period 1999–2001 in Western Pomerania 470 (approximately 157/y.) women were diagnosed with ovarian cancer. Material for DNA testing was obtained from 392 (83.4%) patients. In this group 49 *BRCA1* mutation carriers were diagnosed (12.5%). Between 2008–2010, 371 patients (approximately 124/y.) were diagnosed with ovarian cancer. Genetic material was obtained from 328 (88.4%) women. In this group 22 *BRCA1* mutation carriers (6.7%) were diagnosed. In the same periods of time in Poland average 3167 women per year were diagnosed with ovarian cancer between 1999–2001 vs. 3262 per year between 2008–2010. The average frequency of *BRCA1* mutation observed among patients with ovarian cancer is about 13% in Poland.

Conclusions: Population screening for a strong predisposition to ovarian cancer associated with consequent preventive program in a few years reduces the incidence of ovarian cancer by approximately 20%, and between *BRCA1* mutation carriers by 55%.

Key words: ovarian cancer, *BRCA1*, screening program.

chorowalności na raka jajnika w okresie bezpośrednio poprzedzającym rozpoczęcie programu profilaktycznego, tj. w latach 1999–2001, oraz po 8 latach jego stosowania, tj. w okresie 2008–2010.

Wyniki: W latach 1999–2001 w województwie zachodniopomorskim raka jajnika zdiagnozowano u 470 kobiet (średnio u ok. 157/rok), materiał do badania DNA uzyskano od 392 (83,4%) pacjentek, w tej grupie zdiagnozowano 49 nosicielek mutacji genu *BRCA1* (12,5%). W latach 2008–2010 zdiagnozowano raka jajnika u 371 kobiet (u ok. 124/rok), materiał do badania genetycznego uzyskano od 328 (88,4%) pacjentek, w tej grupie zdiagnozowano 22 nosicielki mutacji genu *BRCA1* (6,7%). Dane ogólnokrajowe wskazują, że w Polsce raka jajnika diagnozowano u średnio u 3167 pacjentek/rok w latach 1999–2001 vs 3262/rok w latach 2008–2010. Średnia częstość mutacji genu *BRCA1* obserwowana w naszym kraju wśród pacjentek z rakiem jajnika wynosi ok. 13%.

Wnioski: Przesiew populacyjny w kierunku diagnozy silnej predyspozycji do raka jajnika połączony z konsekwentnym programem profilaktycznym umożliwia po kilku latach stosowania obniżenie zachorowalności na ten nowotwór o ok. 20%, a wśród nosicielek mutacji genu *BRCA1* o ponad 55%.

Słowa kluczowe: rak jajnika, *BRCA1*, programu badań przesiewowych.

Session 1. Oncogenesis

Sesja 1. Onkogeneza

[4]

Postępy w poznaniu genomu raka (projekt TCGA)

Maciej Wiznerowicz

Session 1. Oncogenesis

Sesja 1. Onkogeneza

[5]

Profile molekularne krążących komórek nowotworowych (CTC) u chorych na raka piersi**Anna Żaczek¹, Aleksandra Markiewicz¹, Marzena Wetnicka-Jaśkiewicz², Jacek Jassem²**¹Chair of Medical Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology of Gdańsk University and the Medical University of Gdańsk, Gdansk, Poland²Department of Oncology and Radiotherapy, Medical University of Gdansk, Poland¹Katedra Biotechnologii Medycznej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk, Polska²Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska**Abstract**

Background: Metastatic spread still remains the main cause of deaths in breast cancer. There are two main routes of cancer cells dissemination in breast cancer: lymphatic and hematogenous. An important stage in the development of invasive cancer is epithelial-mesenchymal transition (EMT), during which cancer cells gain mesenchymal phenotype. Knowledge of the biology of this phenomenon and its clinical significance is still incomplete. In our study we attempted to determine the gene expression profile characteristic of the cells disseminated through the blood or lymphatic vessels, which can be detected before the development of distant metastases. For this purpose, we compared the expression of selected genes associated with mesenchymal and invasive phenotypes in primary tumors, circulating tumour cells (CTC) and lymph node metastases in patients with operable breast cancer, and related those profiles to clinical data.

Material and methods: Clinical material was collected from the group of 126 prospectively collected, stage I-III, cancer patients, half of which had lymph node metastases. Circulating tumour cells were detected by developed by our team method based on negative selection of blood-derived cells. Molecular profiles associated with mesenchymal (TWIST1, SNAI1, SNAI2, VIM) and invasive (HER2, CXCR4, uPAR) phenotypes were assessed by real time PCR in primary tumors, CTC and metastatic lymph nodes. The resulting profiles were correlated with each other and with clinicopathological data and patients outcome.

Results: Mesenchymal phenotype of CTC showed increased expression of invasion-associated markers (CXCR4, uPAR), which correlated with adverse clinical features (higher T status, lymph node involvement). Expression of TWIST1, SNAI1 and SNAI2 was significantly higher in lymph node metastases compared with corresponding primary tumors samples. Increased expression of TWIST and SNAI1 in lymph nodes metastases was associated with shorter overall survival and disease-free survival.

Conclusions: Breast cancer cells with mesenchymal phenotype disseminated either by hematogenous or lymphatic route show particular aggressiveness. The clinical significance of these findings requires further study.

Key words: breast cancer, circulating tumor cells, lymph node metastasis, epithelial-mesenchymal transition.

Streszczenie

Wstęp: Przerzuty odległe są główną przyczyną zgonu z powodu raka piersi. Istnieją dwie główne drogi rozszewu komórek nowotworowych: limfatyczna i krwionośna. Ważnym etapem w rozwoju inwazyjności nowotworów jest przemiana epitelialno-mezenchymalna (*epithelial-mesenchymal transition* – EMT), prowadząca do powstania fenotypu mezenchymalnego. Wiedza na temat biologii tego zjawiska i jego klinicznego znaczenia, szczególnie w kontekście obu dróg przerzutowania, jest wciąż niepełna. W naszych badaniach podjęliśmy próbę określenia profilu ekspresji genów charakterystycznego dla komórek rozszewanych drogą krwionośną lub limfatyczną, który może zostać wykryty przed pojawieniem się przerzutów odległych. W tym celu porównaliśmy ekspresję wybranych genów związanych z fenotypem mezenchymalnym i inwazyjnym w guzach pierwotnych, krążących komórkach nowotworowych (*circulating tumor cells* – CTC) i przerzutach do węzłów chłonnych u chorych na operacyjnego raka piersi, a następnie oznaczone profile molekularne odnieśliśmy do charakterystyki klinicznej.

Materiał i metody: Materiał do badań pochodził od 126 chorych w stopniu I-III, spośród których połowa miała przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Krążące komórki nowotworowe wykrywano metodą opracowaną przez nasz zespół, polegającą na selekcji negatywnej komórek krwiopochodnych. Profile molekularne związane z fenotypem mezenchymalnym (TWIST1, SNAI1, SNAI2, VIM) i inwazyjnym (HER2, CXCR4, uPAR) ocenione zostały techniką PCR w czasie rzeczywistym w guzach pierwotnych, CTC i przerzutowych węzłach chłonnych. Uzyskane profile porównano ze sobą i odniesiono do danych kliniczno-patologicznych oraz czasu przeżycia chorych.

Wyniki: Krążące komórki nowotworowe o fenotypie mezenchymalnym wykazywały podwyższoną ekspresję markerów inwazyjności (CXCR4, uPAR). Cechy te były związane równocześnie z niekorzystnymi cechami klinicznymi (wyższy stopień T, przerzuty w węzłach chłonnych). Ekspresja TWIST1, SNAI1 i SNAI2 była istotnie wyższa w próbkach pobranych z przerzutowych węzłów chłonnych w porównaniu z odpowiadającymi im próbkami z guzów pierwotnych. Podwyższona ekspresja TWIST i SNAI1 w przerzutach do węzłów chłonnych wiązała się z krótszym czasem całkowitego przeżycia i przeżycia wolnego od nowotworu.

Wnioski: Komórki raka piersi o fenotypie mezenchymalnym rozszewane zarówno drogą krwionośną, jak i limfatyczną

wykazują szczególną agresywność. Kliniczne znaczenie tych obserwacji wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: rak piersi, krążące komórki nowotworowe, przerzuty do węzłów chłonnych, przemiana epitelialno-mezenchymalna.

Session 1. Oncogenesis

Sesja 1. Onkogeneza

[6]

KAP1/Trim28 transcriptional corepressor regulates tumor growth*Białko KAP1/Trim28 reguluje tempo wzrostu guza***Patrycja Czerwińska^{1,2}, Anna Kowalik³, Weronika Jackowiak³, Maciej Wiznerowicz^{1,4}**¹Laboratory of Gene Therapy, Department of Cancer Immunology, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland²Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland³Department of Medical Physics, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland⁴Department of Cancer Immunology and Diagnostics, Chair of Medical Biotechnology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland¹Pracownia Terapii Genowej, Zakład Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska²Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska³Zakład Fizyki Medycznej, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska⁴Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska**Abstract**

Introduction: Epigenetic modifications play a crucial role in the maintenance of Cancer Stem Cells (CSCs) population, which is largely responsible for metastases and relapse and contribute to cancer resistance to chemotherapy and radiotherapy. KAP1/TRIM28 protein as an epigenetic modulator regulates expression of large group of genes through local DNA heterochromatization and may represent novel anti-cancer target.

Aim of the study: The main aim of the project is evaluate the role of KAP1 protein in regulation of breast cancer stem cell properties and tumorigenesis.

Materials and methods: KAP1 gene knockdown was achieved with lentiviral vectors encoding specific shRNA. The efficiency of gene silencing was confirmed by RT-qPCR, Western blot analysis and immunohistochemistry. FACS analysis was performed to evaluate percentage and morphology of CD44⁺/CD24^{-/low} CSCs population in the KAP1^{ko} and WT breast cancer cells. Chemotherapy (doxorubicin), as well as radiotherapy, was conducted in dose-dependant manner. Cell proliferation *in vitro* was examined by proliferation assays (such as H³-thymidine incorporation assay). The impact of KAP1 downregulation on kinetics of tumor growth was evaluated in Athymic nude mice. High-throughput transcriptome studies are also in progress.

Results: Significant knockdown of KAP1 gene in selected breast cancer cell lines was achieved. KAP1 downregulation lead to enhanced proliferation in MDA-MB-231 cell line *in vitro*. We did not observe the sensitization to chemo- and radiotherapy after KAP1 knockdown. Results obtained so far suggests that KAP1 knockdown lead to inhibition of tumor growth *in vivo* in MDA-MB-231 cell line.

Conclusions: Our current work is focused on investigating molecular mechanisms that mediates KAP1-dependent proliferation and tumor growth. Ultimately, our findings may pave the way to novel and more effective therapies for breast tumors.

Key words: epigenetic, breast cancer, cancer stem cells.

Streszczenie

Wstęp: Modyfikacje epigenetyczne odgrywają znaczącą rolę w regulacji nowotworowych komórek macierzystych (NKM), którym przypisuje się odpowiedzialność za przerzuty i wznowy choroby nowotworowej, jak również chemio- i radiooporność. Białko KAP1/TRIM28 jako epigenetyczny czynnik modulujący heterochromatyzację, reguluje ekspresję wielu genów i może stanowić nowy przeciwnowotworowy cel terapeutyczny.

Cel pracy: Charakterystyka roli białka KAP1 w procesie nowotworzenia i regulacji komórek NKM.

Materiały i metody: Wyciszenie ekspresji genu uzyskano za pomocą wektorów lentiwirusowych kodujących shRNA, a wydajność wyciszenia oceniono za pomocą technik RT-qPCR, Western Blot i immunohistochemii. Metodą FACS oceniono odsetek komórek NKM o fenotypie CD44⁺/CD24^{-/low}. W warunkach *in vitro* oceniono również chemio- i radiooporność w zależności od podanej dawki leku bądź promieniowania. Proliferację oceniono w warunkach *in vitro* (m.in. z wykorzystaniem testu z inkorporacją H³-tymidyny) oraz *in vivo* po podaniu podskórnym myszom nude. W toku są również szerokoprzestawowe badania transkryptomowe.

Wyniki: Uzyskano wydajne wyciszenie ekspresji genu KAP1 w wybranych liniach raka piersi. W linii MDA-MB-231 obniżenie ekspresji genu KAP1 znacząco zwiększyło potencjał proliferacyjny komórek w warunkach *in vitro*. Nie zaobserwowano wpływu wyciszenia KAP1 na chemio- bądź radiooporność testowanych linii. Uzyskane dotychczas wyniki wskazują na zahamowanie tempa wzrostu guza *in vivo* w przypadku podania podskórnego komórek MDA-MB-231 myszom nude.

Wnioski: Dane literaturowe oraz uzyskane wyniki wskazują na udział białka KAP1 w regulacji procesu nowotworzenia. Obecnie badamy molekularne mechanizmy odpowiedzialne za KAP1-zależną proliferację i wzrost guza. Nasza praca może wzbogacić strategię terapeutyczne w bardziej efektywne rozwiązania w przypadku nowotworu piersi.

Słowa kluczowe: epigenetyka, rak piersi, nowotworowe komórki macierzyste.

Session 1. Oncogenesis

Sesja 1. Onkogeneza

[7]

SK053 an inhibitor of enzymes involved in allosteric disulphide bond formation induces differentiation of human acute myeloid leukemia cells

Justyna Chlebowska

Session 2. Oncogenesis and drug resistance

Sesja 2. Onkogeneza i lekooporność

[8]

Molekularny mechanizm chemiooporności komórek niedrobnokomórkowego raka płuca z mutacją w TP53

Zuzanna Tracz-Gaszewska

Session 2. Oncogenesis and drug resistance Sesja 2. Onkogeneza i lekooporność

[9]

Rola syntazy galaktozyloceramidu (UGT8) i galaktozyloceramidu (GalCer) w odpowiedzi na stres komórkowy i lekooporność komórek raka gruczołu piersiowego

Tomasz B. Owczarek¹, Jarosław Suchański¹, Bartosz Puła², Alicja Kmieciak³, Marek Chadalski³, Bartosz Kocbach¹, Piotr Dziągiel², Maciej Ugorski¹

¹Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland

²Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

³L. Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wrocław, Polish Academy of Sciences, Poland

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Polska

²Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

³Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirsfelda we Wrocławiu, Polska Akademia Nauk, Polska

Abstract

Introduction: It was shown on the level of gene expression that galactosylceramide synthase (UGT8) is one of six genes whose elevated expression correlated with a significantly increased risk of lung metastases in breast cancer patients. The UGT8 is enzyme responsible for the synthesis of galactosylceramide (GalCer) which is known mostly as the constituent of myelin. Our recent studies with the use of immunohistochemistry suggest that UGT8 is a significant index of tumour aggressiveness and a potential marker for the prognostic evaluation of lung metastases in breast cancer.

Aim of the study: The role of UGT8 and GalCer in breast cancer progression.

Material and methods: Control MDA-MB-231 cells (MDA/LUC) and MDA-MB-231 cells (MDA/LUC-shUGT8) with decreased expression of UGT8 and GalCer after stable expression of shRNA directed against UGT8 mRNA was studied *in vivo* in athymic nu/nu mice. Apoptotic cells were analyzed by Western blot using antibody directed against caspase-3.

Results and conclusions: Control MDA/LUC cells formed tumors and metastatic colonies much more efficiently in comparison to MDA/LUC-shUGT8 cells with suppressed synthesis of GalCer after their, respectively, orthotopic and intracardiac transplantation. These findings indicate that UGT8 and GalCer have a profound effect on tumorigenic and metastatic properties of breast cancer cells. In accordance with this finding, immunohistochemical staining of tumor specimens revealed that high expression of UGT8 accompanied by accumulation of GalCer in MDA-MB-231 cells is associated with a much higher proliferative index and a lower number of apoptotic cells in comparison to the MDA/LUC-shUGT8 cells. These data suggest that accumulation of GalCer in tumor cells inhibits apoptosis, which would facilitate metastatic cells to survive in the hostile microenvironment of tumor in target organ. In addition, it was found that expression of UGT8 in MDA-MB-231 cells increased their resistance to apoptosis induced by doxorubicin *in vitro*, suggesting that UGT8 can be involved also in multidrug-resistance (MDR) of cancer cells.

Key words: UGT8, breast cancer, drug resistance, apoptosis.

Streszczenie

Wstęp: Analiza ekspresji genów w przerzutach raka piersi do kości, wątroby, płuc i mózgu wykazała, że tylko w przerzutach do płuc obserwuje się ekspresję genu UGT8 kodującego syntazę galaktozyloceramidu (UGT8). UGT8 jest enzymem biorącym udział w syntezie galaktozyloceramidu (GalCer), galaktolipidu znanego dotychczas głównie jako składnik osłonek mielinowych. Ostatnio w badaniach własnych wykazano, że UGT8 może mieć udział w potencjale przerzutującym komórek raka piersi i jego progresji do bardziej złośliwego fenotypu.

Cel pracy: Określenie roli UGT8 i GalCer w progresji raka piersi.

Materiał i metody: Komórki MDA-MB-231 z wyciszoną za pomocą shRNA ekspresją UGT8 (MDA-MB-231/LUC-shUGT8) oraz kontrolne komórki MDA-MB-231/LUC przeszczepiano s.c. lub i.c. myszom nu/nu. W testach *in vitro* oba typy komórek analizowano pod kątem oporności na apoptozę indukowaną doksorubicyną.

Wyniki i wnioski: Komórki MDA-MB-231 z zahamowaną ekspresją UGT8 i GalCer charakteryzowały się niższą zdolnością do tworzenia guzów nowotworowych oraz niższym potencjałem przerzutującym w porównaniu z komórkami o wysokiej ekspresji tego enzymu i jego produktu. W zgodzie z tymi wynikami w guzach nowotworowych utworzonych przez komórki MDA-MB-231/LUC stwierdzano z jednej strony znacznie większą liczbę komórek proliferujących, z drugiej wyraźnie mniejszą liczbę komórek apoptotycznych w porównaniu z guzami MDA-MB-231/LUC-shUGT8. Wykazano także, że komórki raka piersi z zahamowaną syntezą GalCer stają się podatne na apoptozę przy mniejszych stężeniach doksorubicyny w stosunku do komórek kontrolnych.

Podsumowując – przeprowadzone badania pokazały, że UGT8 i GalCer odgrywają istotną rolę w progresji raka piersi, co prawdopodobnie jest związane z ich większą opornością na stres, którego źródłem jest mikrośrodowisko guza nowotworowego. Co więcej, mogą one także odgrywać ważną rolę w lekooporności komórek raka gruczołu piersiowego i tym samym w oporności na chemioterapię tych pacjentek, u których stwierdza się wysoki poziom UGT8.

Słowa kluczowe: UGT8, rak piersi, lekooporność, apoptoza.

Session 2. Oncogenesis and drug resistance

Sesja 2. Onkogeneza i lekooporność

[10]

Zaburzenia homeostazy reaktywnych form tlenu w klasycznym chłoniaku Hodgkina**Maciej Giefing^{1,2}, Supandi Winoto-Morbach³, Justyna Sosna³, Claudia Döring⁴, Wolfram Klapper⁵, Ralf Küppers⁶, Sebastian Böttcher⁷, Dieter Adam³, Reiner Siebert², Stefan Schütze³**¹Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland²Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts University Kiel & University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany³Institute of Immunology, Christian-Albrechts University Kiel & University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany⁴Senckenberg Institute of Pathology, University of Frankfurt, Medical School, Frankfurt, Germany⁵Department of Pathology, Hematopathology Section and Lymph Node Registry, Kiel, Germany⁶Institute of Cell Biology (Cancer Research), University of Duisburg-Essen, Faculty of Medicine, Essen, Germany⁷Second Department of Medicine, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany**Abstract**

Introduction: The NADPH oxidase is a complex of five proteins encoded by the *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF2* and *NCF4* genes. The enzyme is located in the cellular membrane of phagocytic cells and generates microbicidal superoxide anion in a process called oxidative burst. Mutations in any of the NADPH oxidase genes manifest in chronic granulomatous disease characterized by recurrent and severe infections and a predisposition to cancer. The NADPH oxidase has been described also in other types of cells including B-cell where it produces reactive oxygen species that function as signaling molecules involved in such processes like differentiation or proliferation.

Aim of the study was the identification of NADPH oxidase gene alterations in classical Hodgkin lymphoma and the analysis of their consequences for the enzyme functionality.

Material and methods: We used several molecular techniques including microarrays, FICTION (copy number analyses), sequencing, protein analyses (Western blot and immunophenotyping) and also methylation analysis using the Infinium microarray to identify putative alterations of the NADPH oxidase genes. Moreover, we performed functional analyses to quantify superoxide anion produced in classical Hodgkin lymphoma cell lines as compared to non-Hodgkin lymphoma cell lines.

Results and conclusions: The analyses showed recurrent deletions of the *CYBB* gene in cell lines (2/7 cases) and primary tumors (8/18 cases) of classical Hodgkin lymphoma and also deletions of the other NADPH oxidase genes. Moreover, we have identified epigenetic alterations silencing the *NCF1* gene in 5/5 analyzed cell lines. Using a functional assay we demonstrated loss of superoxide anion synthesis capacity of the NADPH oxidase in all seven classical Hodgkin lymphoma cell lines analyzed.

The presented results suggest that recurrent alteration of the NADPH oxidase genes in classical Hodgkin lymphoma result in an inactivation of the enzyme, disruption of reactive oxygen species homeostasis and possibly contribute to the pathogenesis of this lymphoma.

Key words: classical Hodgkin lymphoma, reactive oxygen species, NADPH oxidase.

Streszczenie

Wstęp: Oksydaza NADPH jest kompleksem złożonym z pięciu białek kodowanych przez geny *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF2* oraz *NCF4*. Enzym zlokalizowany jest w błonie komórkowej fagocytów, gdzie bierze udział w wybuchu tlenowym, podczas którego wytwarzany jest anionorodnik ponadtlenkowy o właściwościach bakteriobójczych. Mutacje któregokolwiek z genów kodujących oksydazę NADPH wywołują przewlekłą chorobę ziarniniakową cechującą się nawracającymi zakażeniami bakteryjnymi, a także zwiększoną predyspozycją do chorób nowotworowych. Oksydaza NADPH występuje również w innych typach komórek, w tym w limfocytach typu B, w których wytwarzane reaktywne formy tlenu pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych zaangażowanych w takie procesy komórkowe, jak różnicowanie czy proliferacja.

Cel pracy: Celem badań była identyfikacja uszkodzeń genów kodujących oksydazę NADPH w klasycznym chłoniaku Hodgkina oraz analiza ich wpływu na enzym.

Materiał i metody: W celu identyfikacji potencjalnych uszkodzeń badanych genów wykorzystaliśmy wyniki z mikromacierzy oraz technikę FICTION (zmiany liczby kopii DNA), sekwencjonowanie, analizę kodowanych białek (Western blot, immunofenotypowanie), a także analizę poziomu metylacji badanych genów za pomocą mikromacierzy Infinium. Przeprowadziliśmy także analizę funkcjonalną mającą na celu określenie ilości wytwarzanego anionorodnika ponadtlenkowego w liniach komórkowych klasycznego chłoniaka Hodgkina w porównaniu z liniami komórkowymi chłoniaków nieziarnicznych.

Wyniki i wnioski: Przeprowadzone badania wykazały częste delecje genu *CYBB* zarówno w liniach komórkowych (2 na 7 przypadków), jak i guzach pierwotnych (8 na 18 przypadków) klasycznego chłoniaka Hodgkina, a także delecje pozostałych genów kodujących oksydazę NADPH. Wykazaliśmy ponadto zmiany epigenetyczne wyciszające gen *NCF1* (5 z 5 badanych linii komórkowych). Analiza funkcjonalna potwierdziła natomiast utratę zdolności do wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego przez oksydazę NADPH we wszystkich siedmiu przebadanych liniach komórkowych klasycznego chłoniaka Hodgkina.

Przedstawione wyniki sugerują, że powtarzające się uszkodzenia genów kodujących oksydazę NADPH w klasycznym

chłoniaku Hodgkina skutkują inaktywacją tego enzymu, co zaburza homeostazę reaktywnych form tlenu i tym samym prawdopodobnie przyczynia się do patogenezy tego chłoniaka.

Słowa kluczowe: klasyczny chłoniak Hodgkina, reaktywne formy tlenu, oksydaza NADPH.

Session 2. Oncogenesis and drug resistance

Sesja 2. Onkogeneza i lekooporność

[11]

Udział insuliny i insulinopodobnych czynników wzrostu w rozwoju i progresji raka jasnokomórkowego nerki**Wojciech Solarek, Anna Czarnicka, Cezary Szczylik**Military Institute of Medicine, Warsaw, Poland
Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa, Polska**Abstract**

Insulin is a peptide hormone and a crucial regulator of carbohydrate and fat metabolism, which is produced by β cells in the pancreas. As insulin is normally linked with metabolism control, the insulin-like growth factors (IGFs), produced mainly in the liver, were identified as a proliferation regulators. This classical view, although in general correct regarding its basic premises, has become more complicated due to recent findings. The IGFs system was shown to play a critical role in cancer development and progression, including renal cell carcinoma (RCC). Today there are convincing evidences of a positive association between overweight, obesity and risk of RCC. Indicated risk factors together with type 2 diabetes are irreversibly connected with circulating insulin and IGFs levels. The interplay between this molecules, their receptors and IGF-binding proteins might be crucial for RCC cell biology and RCC progression. Given the potent activity IGF/IGF-1R inhibitors demonstrate against RCC in basic biology experiments, some type of combination therapy may prove to be beneficial clinically in the management of RCC. As IGF/IGF-1R inhibitors have entered clinical trials with various effects, their therapeutic potential in RCC should be considered.

Key words: renal cell carcinoma, insulin, insulin-like growth factor, IGF, diabetes.

Streszczenie

Insulina produkowana przez komórki β trzustki jest kluczowym regulatorem procesów związanych z metabolizmem węglowodanów i tłuszczów. Jest ona podstawowym hormonem regulującym metabolizm na poziomie całego organizmu, a wytwarzane w wątrobie insulinopodobne czynniki wzrostu uważane są za cząsteczki sygnałowe mające wpływ na takie procesy, jak proliferacja na poziomie komórkowym. Badania naukowe z ostatnich lat zaburzają ten przejrzysty podział funkcji. Udowodniono, że insulinopodobne czynniki wzrostu biorą udział w takich procesach, jak rozwój i progresja nowotworów, w tym raka nerki. Aktualnie istnieje wiele dowodów na pozytywną korelację pomiędzy występowaniem nadwagi i otyłości a ryzykiem raka nerki. Jednocześnie wymienione czynniki ryzyka raka nerki są nieodłącznie związane z cząsteczkami, takimi jak insulina czy insulinopodobne czynniki wzrostu. Wzajemne oddziaływania pomiędzy tymi cząsteczkami, ich receptorami i białkami wiążącymi insulinopodobne czynniki wzrostu mogą znacząco wpływać na biologię raka nerki, a także ryzyko progresji tego nowotworu. Wyniki badań podstawowych pokazujące wpływ insuliny, insulinopodobnych czynników wzrostu i zahamowania ich receptorów na wzrost komórek raka nerki mogą się okazać pomocne w przyszłości przy planowaniu nowych terapii raka nerki. W związku z obecnością inhibitorów insulinopodobnych czynników wzrostu w badaniach klinicznych innych nowotworów, ich przyszłe użycie w leczeniu raka nerki powinno być rozważone przez naukowców i klinicystów.

Słowa kluczowe: rak nerki, insulina, insulinopodobne czynniki wzrostu, IGF, cukrzyca.

Session 3. New technologies *Sesja 3. Nowe technologie*

[12]

Technologia SMARTer® nowe możliwości diagnostyki onkologicznej – analiza transkryptomu krążących komórek nowotworowych

Piotr Guzenda

Biokom s.j., Janki, Poland
Biokom s.j., Janki, Polska

Abstract

The analysis of the transcriptome is widely used to study tissue-specific gene expression associated with a disease state or cell type. Most of the analyzes are performed on samples of tissues or cell populations. This approach makes it impossible to capture the biological differences between cells. Until now, sequencing of RNA from single cells was a major challenge. The analysis of such a small amount of RNA requires a method that ensures, i.e.: equal representation of the 3' and 5' ends.

Single cell RNA analysis is of particular importance in oncology. Especially in the field of diagnostics. It can contribute to a faster detection of metastases and to start appropriate treatment, for example the enumeration of circulating tumor cells is used as a prognostic factor of survival in metastatic prostate cancer patients.

SMARTer® technology has been successfully applied to the synthesis of cDNA directly from single tumor cells. The method consists of a single step, using a single enzyme with reaction in a single tube. The results obtained show a very high correlation with the ERCC and equal representation of the 3' and 5' ends. High correlation of the expression level as determined by the SMARTer® and real-time PCR was showed. SMARTer® technology as the only enables rapid and efficient synthesis of a representative cDNA directly from one cell or as little as 10 pg of RNA.

The lecture will describe SMARTer® technology and a review of selected publications showing the use of SMARTer® for transcriptome analysis of single circulating tumor cells.

Streszczenie

Analiza transkryptomu jest powszechnie stosowana do badania ekspresji genów specyficznej tkankowo, związanej ze stanem chorobowym lub z typem komórki. Większość analiz przeprowadzana jest na próbkach tkanek lub populacjach komórek. Takie podejście uniemożliwia uchwycenie biologicznych różnic między komórkami. Do tej pory ogromnym wyzwaniem było sekwencjonowanie RNA z pojedynczych komórek. Analiza tak niewielkiej ilości RNA wymaga wprowadzenia metody zapewniającej m.in. równą reprezentację końców 3' oraz 5'.

Analiza RNA pojedynczych komórek ma szczególne znaczenie w onkologii, zwłaszcza w dziedzinie diagnostyki. Może się przyczynić do szybszego wykrycia przerzutów i włączenia odpowiedniego leczenia, np. ilość krążących komórek nowotworowych jest stosowana jako czynnik prognostyczny dla przeżycia u pacjentów z przerzutowym rakiem prostaty.

Technologia SMARTer® z powodzeniem została zastosowana do syntezy cDNA bezpośrednio z pojedynczych komórek nowotworowych. Metoda składa się z jednego etapu, wykorzystuje jeden enzym, a reakcja odbywa się w jednej probówce. Otrzymane wyniki wykazują bardzo wysoką korelację z ERCC oraz równą reprezentację sekwencji końców 3' i 5'. Wykazano również wysoką korelację poziomu ekspresji wyznaczonej metodą SMARTer® z metodą real-time PCR. Technologia SMARTer® jako jedyna umożliwia szybką i wydajną syntezę reprezentatywnego cDNA bezpośrednio z jednej komórki lub z zaledwie 10 pg RNA.

Na wykładzie zostanie zaprezentowana technologia SMARTer® oraz przegląd wybranych publikacji opisujących zastosowanie SMARTer® do analizy transkryptomu pojedynczych krążących komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe: RNA, sekwencjonowanie, markery, transkryptom, nowotwory, RNA-seq.

Session 3. New technologies

Sesja 3. Nowe technologie

[13]

Wykorzystanie technologii Luminex® xMAP® do oznaczeń biomarkerów nowotworowych

Karina Błachnio

Session 3. New technologies

Sesja 3. Nowe technologie

[14]

Warunki prowadzenia hodowli somatycznych komórek macierzystych ludzkich i zwierzęcych w odniesieniu do regulacji i dyrektyw Komisji EuropejskiejAgata Borowik¹, Karol Wrzeszcz^{1,2}¹Lower Silesian Centre of the Cellular Transplantation with National Bone Marrow Donor Bank, Wrocław, Poland²L. Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wrocław, Polish Academy of Sciences, Poland¹Dolnośląskie Centrum Transplantacji Komórkowej z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku we Wrocławiu, Polska²Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, Polska Akademia Nauk, Polska**Abstract**

Introduction: Subtension progress was achieved in the last decade in the field of biomedicine, allows elaborate of advanced therapy medical products for new treatment modalities. To optimize mesenchymal stem cells cultures characterization accordance to current state of knowledge and good manufacturing practice advanced therapy medical products guidelines both for human and veterinary use are necessary.

Aim of the study was to elaborate optimal MSC culture conditions and guidelines for product characterization according to EU directives.

Material and methods: Mesenchymal stem cells culture was performed in clean laboratories grades D, C, B purify in accordance with ISO 14644, propagation was performed in three parts – seeding the cells step, medium exchange procedure and finally cells harvest. These steps were performed in class A laminar hood in the class B production clean room. A final product was determined functionally, phenotypically and her quality control parameters including microbiological purity and cells viability.

Results and conclusions: During the culture, cells had fibroblasts-like shape and showed adhesion to plastic surface. The cells were CD73, CD90 and CD105 positive and CD34 and CD45 negative. Karyotype was not altered, although sensitivity at the level of CGH is recommended. Microbiological results at all steps of culture were negative. These results show that is possible to produced advanced therapy medical products for medical or veterinary use, according to the EU regulations and directives.

Key words: mesenchymal stem cells, cells culture, EU regulation and directive, advanced therapy, quality control.

Streszczenie

Wstęp: Obserwowany w ostatniej dekadzie rozwój wiedzy w zakresie biomedycyny umożliwia opracowanie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i nowych metod leczenia. Konieczna jest zatem optymalizacja warunków hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych (*mesenchymal stem cells* – MSC) i charakterystyki produktu zgodnie z aktualnym stanem wiedzy i wytycznymi dobrej praktyki wytwarzania produktów leczniczych terapii zaawansowanej przeznaczonych zarówno dla ludzi, jak i do celów weterynaryjnych.

Cel pracy: Opracowanie optymalnych warunków zapewniających hodowlę MSC i charakterystyka produktu zgodnie z restrykcyjnym uwzględnieniem właściwych regulacji i dyrektyw.

Materiał i metody: Hodowlę MSC prowadzono w czystych laboratoriach z pomieszczeniami o klasie czystości D, C, B zgodnie z normą ISO 14644, w trzech etapach – założenia hodowli, wymiany medium i zakończenia hodowli. Etapy te przeprowadzane były w komorze laminarnej o klasie czystości A w pomieszczeniu technologicznym klasy B. Końcowy produkt określany był czynnościowo i fenotypowo z uwzględnieniem podstawowych elementów jakości, jakimi są czystość mikrobiologiczna i żywotność komórek.

Wyniki i wnioski: Obserwowane komórki miały wrzecionowaty, fibroblastopodobny kształt oraz wykazywały adhezję do naczynia hodowlanego. Komórki posiadały CD73, CD90, CD105, nie posiadały antygenu CD45 oraz CD34. Badanie kariotypu nie wykazało zmian, aczkolwiek czułość na poziomie CGH jest rekomendowana. Wyniki mikrobiologiczne przez cały okres prowadzenia hodowli były ujemne. Przedstawione rezultaty pozwalają stwierdzić, że przy restrykcyjnym uwzględnieniu właściwych regulacji i dyrektyw możliwe jest przygotowanie preparatu terapii zaawansowanej spełniającego kryteria produktu leczniczego przeznaczonego do wykorzystania klinicznego lub weterynaryjnego.

Słowa kluczowe: mezenchymalne komórki macierzyste, hodowla komórek, regulacje i dyrektywy UE, terapia zaawansowana, kontrola jakości.

Session 4. Immunooncology and immunotherapy Sesja 4. Immunoonkologia i immunoterapia

[15]

Involvement of autoreactive T lymphocytes in pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia

Rola autoreaktywnych limfocytów T w patomechanizmie przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej: specyficzna odpowiedź cytotoksyczna przeciwko autoantygenom

Joanna Zaleska¹, Katarzyna Skórka¹, Małgorzata Zajac¹, Agnieszka Karczmarczyk¹, Marta Karp¹, Maciej Grzywnowicz¹, Waldemar Tomczak², Paulina Wlasiuk¹, Anna Dmoszynska², Krzysztof Giannopoulos^{1,2}

¹Department of Experimental Hematooncology, Medical University of Lublin, Poland

²Chair and Department of Hematooncology and Bone Marrow Transplantation, Medical University of Lublin, Poland

¹Samodzielna Pracownia Hematoonkologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

²Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

Abstract

Introduction: Cytoskeletal proteins exposed on the surface of apoptotic cells could represent autoantigens involved in the development of chronic lymphocytic leukemia (CLL) since monoclonal antibodies derived from CLL-specific B-cell receptors (BCR) recognized MYHIIA (non-muscle myosin heavy chain IIA), vimentin, and cofilin-1.

Aim of the study: Definition the role of autoantigens in T-cell immune response in CLL patients.

Material and methods: MYHIIA, VIM, and CFL-1 expression was analyzed using qRT-PCR. HLA-A2-restricted epitopes derived from MYHIIA, VIM, and CFL-1 were selected *in silico* using 2 independent prediction algorithms. Cellular-peptide binding affinity assay utilizing T2 cell line was performed. Mixed lymphocyte peptide cultures (MLPC) were performed to define immunogenicity of synthesized peptides *in vitro*. To detect specific immune response ELISpot assays were evaluated. Finally, we assessed the frequency of the specific T cells along with detailed phenotypical characteristics using dextrameric peptide-specific complexes.

Results: At the RNA level MYHIIA, VIM, and CFL-1 were overexpressed in CLL patients. Nine peptides derived from MYHIIA, VIM, and CFL-1 with the highest affinity to HLA-A2 were identified and synthesized. We detected specific cytotoxic immune responses for peptides derived from MYHIIA in 5/7 (71%), vimentin 7/8 (87.5%) and cofilin-1 5/8 (62.5%) in CLL patients. Additionally, low frequencies of autoreactive T cells were found in 37.5% healthy volunteers. We detected autoreactive, peptide-specific T cells, with the highest level of 3.6% CD8+ cells specific for M3 MYHIIA-derived peptide. Most cells (83%) represented effector-memory phenotype.

Conclusions: The presence of cytotoxic immune responses against 3 autoantigens in CLL patients was for the first time demonstrated. The presence of autoreactive T lymphocytes might indicate the important role of autoimmunity in the pathogenesis of CLL. Our findings might also demonstrate another hallmark of deregulation of immune system in CLL.

Streszczenie

Wstęp: Badania ostatnich lat wykazały obecność przeciwciał monoklonalnych rozpoznających antygeny MYHIIA, wimentyny i kofiliny 1 u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (PBL). Należą one do białek cytoszkieletu występujących na powierzchni komórek apoptotycznych i mogą reprezentować autoantygeny zaangażowane w rozwój PBL.

Cel pracy: Określenie udziału autoreaktywnych limfocytów T w swoistej odpowiedzi cytotoksycznej przeciwko antygenom MYHIIA, wimentyny i kofiliny-1 u pacjentów z PBL.

Materiał i metody: Przy użyciu 2 algorytmów komputerowych zaprojektowano epitopy pochodzące od antygenów MYHIIA, wimentyny i kofiliny 1 z restrykcją MHC i HLA-A2. Od 143 chorych z PBL wyizolowano komórki jednojądrzaste poprzez wirowanie w gradiencie gęstości. Dokonano oceny powinowactwa peptydów do receptora HLA-A2, wykorzystując linię komórkową T2. W badaniach czynnościowych oceniono immunogenność peptydów za pomocy mieszanej hodowli limfocytów z peptydem. Przy użyciu testu ELISpot analizowano swoiste wydzielanie interferonu γ przez stymulowane komórki CD8 pozytywne przy kontakcie z epitopem wywodzącym się z autoantygenów. U 14 chorych przeprowadzono analizę odsetka oraz immunofenotypu swoistych, autoreaktywnych limfocytów T z użyciem epitopowo-specyficznych kompleksów dekstramerów. Dodatkowo oceniono ekspresję genów MYHIIA, VIM i CFL-1 u 100 chorych.

Wyniki: Wykazano występowanie swoistej odpowiedzi cytotoksycznej u chorych na PBL przeciwko zidentyfikowanemu, dominującemu epitopom wywodzącym się z antygenów: MYHIIA u 5/7 (71%), wimentyny 7/8 (87,5%) i kofiliny 1 5/8 (62,5%). Scharakteryzowano swoiste limfocyty T cytotoksyczne skierowane przeciwko peptydowi M3 z antygeny MYHIIA jako komórki o fenotypie limfocytów efektorowych-pamięci.

Wnioski: Obecność swoistych antygenowo autoreaktywnych limfocytów T może świadczyć o znaczącej roli autoimmunizacji w patogenezie PBL.

Session 4. Immunooncology and immunotherapy

Sesja 4. Immunoonkologia i immunoterapia

[16]

Ocena wybranych parametrów immunologicznych u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową z uwzględnieniem zakażenia wirusem Epsteina-Barr**Monika Pieczykolan¹, Agnieszka Bojarska-Junak¹, Iwona Hus², Jacek Roliński¹**¹Chair and Department of Clinical Immunology, Medical University of Lublin, Poland²Chair and Department of Haematology and Bone Marrow Transplantation, Medical University of Lublin, Poland¹Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska²Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska**Abstract**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), is the most common leukemia in the Western world. It is characterized by the accumulation of monoclonal B lymphocytes with phenotype CD5+/CD23+/CD19+, low expression of surface immunoglobulin and heterogeneous course. A question which still remains unanswered is which patients will have a fast and more aggressive course of the disease. Our studies suggests that a latent EBV infection may have a significant impact on the biology and clinical course of this disease, and the presence of this virus may become a new independent prognostic factor for the clinical course of CLL.

The aim of the study was the assessment of the presence of the EBV virus in cells from CLL patients and its influence on the activation of leukemic cells and other immunological parameters. The study was conducted on 50 untreated patients with CLL and 20 healthy subjects. To assess the presence of the virus, DNA Real Time PCR tests were used, and to assess immunophenotype, flow cytometry was used.

The results of work presented that CLL patients had a higher number of activated B CD19+CD25+/CD69+ and T CD3+CD25+/CD69+ lymphocytes than healthy individuals ($p < 0.000$, $p < 0.000$). Chronic lymphocytic leukemia patients with the EBV compared to patients without it showed a statistical significantly higher level of activation of lymphocytes B CD19+CD69+ and T CD3+CD69+ ($p < 0.05$; $p < 0.05$). The percentage of activated B CD19+CD69+ and T CD3+CD69+ lymphocytes also showed positive correlation with a number of the virus DNA copies ($p < 0.05$). In addition, the levels of Treg demonstrated inverse correlation with the activation of T lymphocytes ($p < 0.05$).

Our results suggest that the EBV virus is associated with the activation of leukemic cells and can be a negative prognostic factor in the course of the chronic lymphocytic leukemia.

Key words: CLL, EBV, Treg.

Streszczenie

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęściej występującą białaczką w krajach Europy Zachodniej. Charakteryzuje się akumulacją monoklonalnych limfocytów B o fenotypie CD5+/CD23+/CD19+ o słabej ekspresji immunoglobulin powierzchniowych i heterogennym przebiegiem. Nadal bez odpowiedzi pozostaje pytanie, u których pacjentów choroba będzie miała szybki i bardziej agresywny przebieg. Nasze badania sugerują, że latentne zakażenie EBV może mieć istotny wpływ na biologię i przebieg kliniczny choroby, a obecność tego wirusa może się stać nowym niezależnym czynnikiem rokowniczym pozwalającym przewidzieć przebieg kliniczny PBL.

Celem pracy była ocena obecności wirusa EBV w komórkach pacjentów chorych na PBL, a także wpływ tej obecności na wybrane parametry immunologiczne. Badania przeprowadzono w grupie 50 pacjentów z rozpoznaną PBL i u 20 zdrowych dawców. Obecność wirusa oceniono z zastosowaniem metody *real-time* PCR, a do oznaczenia wybranych populacji komórek użyto cytometrii przepływowej.

Wyniki pracy wykazały, że pacjenci z PBL prezentują zdecydowanie wyższy poziom aktywowanych limfocytów B CD19+CD25+/CD69+ i T CD3+CD25+/CD69+ w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,000$; $p < 0,000$). Chorzy EBV+ w porównaniu z EBV- wykazywali istotnie statystycznie wyższy poziom aktywowanych limfocytów B CD19+CD69+ i T CD19+CD69+ ($p < 0,05$; $p < 0,05$). Odsetek aktywowanych limfocytów B CD19+CD69+ i T CD3+CD69+ u pacjentów z PBL dodatnio korelował z ilością kopii DNA wirusa ($p < 0,05$). Dodatkowo w badaniach wykazano, że poziom limfocytów regulatorowych prezentował odwrotną korelację z aktywacją limfocytów T ($p < 0,05$).

Wyniki pracy sugerują, że wirus EBV ma związek z aktywacją komórek białaczkowych i może być niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w przebiegu PBL.

Słowa kluczowe: PBL, EBV, Treg.

Session 4. Immunooncology and immunotherapy Sesja 4. Immunoonkologia i immunoterapia

[17]

Zastosowanie autologicznych komórek dendrytycznych w immunoterapii przewlekłej białaczki limfocytowej

Justyna Woś¹, Iwona Hus², Agnieszka Bojarska-Junak¹, Jacek Tabarkiewicz¹, Karolina Olszewska-Bożek¹, Monika Pieczykolan¹, Jacek Roliński¹

¹Chair and Department of Clinical Immunology, Medical University of Lublin, Poland

²Chair and Department of Haematology and Bone Marrow Transplantation, Medical University of Lublin, Poland

¹Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

²Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

Abstract

Immunotherapy using dendritic cells (DC) is designed to stimulate and strengthen the anti-tumor immunity in the early stages of chronic lymphocytic leukemia (CLL).

The aim of the study was to assess the clinical and immunological efficacy of immunotherapy using autologous DCs stimulated with tumor lysates in patients with CLL. Ten previously untreated patients with CLL in early stages were included into the study. Eligible patients received 8 injections of DC vaccine at a 2 weeks intervals. Analysis of the clinical and immunological response was made after the planned course of treatment in 278 day from the start of therapy. After each administration of the vaccine, the patients additionally received cyclophosphamide and celecoxib in order to reduce the populations of regulatory cells. In 6/10 patients, there was a clinical response defined as a reduction in the number of peripheral blood lymphocytes for at least 25% (RS group – response). In 2/10 patients stabilization of disease was observed (SD group – stable disease). In 2/10 patients, there was a disease progression, despite the use of immunotherapy (group PD – progressive disease).

The median percentage of CD3+ and CD8+ T cells was significantly higher in peripheral blood of CLL patients from RS group as compared to SD and PD groups ($p < 0.05$). There was also a significant decrease in the percentage and absolute counts of CD19+ B cells in all three groups of patients. Furthermore, after the treatment completion, a significant increase in the average percentage of CD4+CD25+FoxP3+ in patients from RS and SD groups as compared to PD group ($p < 0.05$) and a significantly higher percentage of Th17 lymphocytes in patients from RS group as compared to SD ($p < 0.01$) and PD ($p < 0.05$) groups was noted. There was no effect of cyclophosphamide on the percentage of T regulatory cells.

Achievement of favourable clinical and immune response in some patients justifies further research in immunotherapy using DC in chronic lymphocytic leukemia.

Key words: dendritic cells, immunotherapy, CLL.

Streszczenie

Immunoterapia z wykorzystaniem komórek dendrytycznych (dendritic cells – DC) ma na celu stymulację i wzmocnienie odporności przeciwnowotworowej we wczesnych stadiach przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL).

W przedstawionej pracy przeprowadzono ocenę kliniczną oraz immunologiczną skuteczności immunoterapii przeciwnowotworowej u chorych na PBL z zastosowaniem autologicznych DC stymulowanych lizatami komórek nowotworowych. U 10 chorych zakwalifikowanych do badania przeprowadzono zaplanowany cykl leczenia, obejmujący 8 podań szczepionki w odstępach 2-tygodniowych, i dokonano pełnej analizy uzyskanych wyników klinicznych i immunologicznych w 278. dniu. Po każdym podaniu szczepionki chorzy dodatkowo otrzymywali cyklofosfamid oraz celekoksyb w celu zmniejszenia populacji komórek regulatorowych. U 6 z 10 chorych obserwowano poprawę kliniczną w postaci zmniejszenia liczby limfocytów krwi obwodowej w trakcie immunoterapii co najmniej o 25% (grupa RS – *response*). U 2 z 10 stwierdzono stabilizację choroby (grupa SD – *stable disease*). U 2 z 10 chorych pomimo stosowania immunoterapii obserwowano progresję choroby (grupa PD – *progressive disease*).

Ocena wartości odsetkowych limfocytów krwi obwodowej wykazała znamienne wyższe średnie wartości procentowe limfocytów CD3+ oraz CD8+ w grupie chorych RS w porównaniu z grupą SD i PD ($p < 0,05$). Stwierdzono zmniejszenie wartości odsetkowych oraz wartości bezwzględnych limfocytów CD19+ we wszystkich trzech grupach chorych. Po zakończeniu leczenia wykazano: istotny statystycznie wzrost średniego odsetka subpopulacji CD4+CD25+FoxP3+ w grupie chorych RS i SD w porównaniu z grupą PD ($p < 0,05$), a także istotnie wyższy odsetek limfocytów Th17 w grupie chorych RS w porównaniu z grupą SD ($p < 0,01$) i PD ($p < 0,05$). Nie obserwowano zmniejszenia odsetka limfocytów T regulatorowych pod wpływem cyklofosfamidu.

Uzyskanie u części chorych korzystnej odpowiedzi klinicznej i immunologicznej uzasadnia celowość prowadzenia dalszych badań nad immunoterapią z wykorzystaniem DC w PBL.

Słowa kluczowe: komórki dendrytyczne, immunoterapia, PBL

Session 4. Immunooncology and immunotherapy Sesja 4. Immunoonkologia i immunoterapia

[18]

Wpływ czynników antyangiogennych i immunostymulacyjnych digoksyny i DMXAA na wzrost czerniaka B16-F10 u myszy

Ryszard Smolarczyk, Tomasz Cichoń, Aleksandra Poczka, Magdalena Jarosz, Stanisław Szala

Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Poland
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Polska

Abstract

Introduction: During tumorigenesis cells acquire specific phenotype properties which include the ability of unrestricted formation of tumor blood vasculature. Parts of tumor with insufficient blood supply develop underoxygenated domains (hypoxic regions). HIF-1 transcription factor is the basic hypoxia regulator which controls expression of numerous proteins participating in adaptive cancer mechanisms. Inhibition of blood vasculature formation via digoxin-mediated HIF-1 inhibition appears as an effective anticancer strategy. Moreover, combination of antiangiogenic approach and immunotherapy seems to offer a very promising anticancer approach. Such a combination results in a switch from angiogenic/immunosuppressive phenotype (tumor-promoting) into antiangiogenic and immunostimulatory (which is tumor-inhibiting).

Aim of the study: We examined digoxin and DMXAA, two agents affecting tumor blood vasculature and showing immunostimulatory properties.

Material and methods: Cytotoxic and migratory pattern of digoxin were examined. Antitumoral properties of digoxin and DMXAA were examined using a murine melanoma tumor model. Tumor blood vessel counts and inflammatory condition were both assessed with the help of immunohistochemical staining.

Results and conclusions: It was demonstrated that digoxin does not affect proliferation of cancer cells with the exception of A-172 human glioma cells. On the other hand, its administration inhibits cell migration. An inhibitory effect of digoxin upon HIF-1 α expression in cancer cells was observed. Therapy of mice burdened with experimental B16-F10 murine melanoma tumors resulted in considerable inhibition of tumor growth following DMXAA administration; additional application of digoxin enhanced the therapeutic effect. Following administration of both DMXAA and digoxin we were able to observe (using immunohistochemical approach) both destruction of tumor blood vasculature, as well as extensive tumor infiltration by immune system cells.

Key words: antiangiogenic therapy, antivasular therapy, immunotherapy, hypoxia, HIF1 α .

Streszczenie

Wstęp: W czasie procesu nowotworzenia komórki nabywają specyficznych cech fenotypowych, m.in. zdolności do nieograniczonego rozwoju naczyń nowotworowych. W rejonach niedostatecznie ukrwionych dochodzi do powstawania obszarów niedotlenienia (hipoksji). Podstawowym regulatorem hipoksji jest czynnik transkrypcyjny HIF-1, regulujący ekspresję wielu białek uczestniczących w mechanizmie przystosowawczym nowotworów. Zahamowanie powstawania naczyń krwionośnych poprzez hamowanie czynnika HIF-1.

Cel pracy: W niniejszej pracy postanowiono zbadać działanie dwóch czynników wpływających na naczynia nowotworowe i wykazujących właściwości immunostymulujące – digoksyny i DMXAA (5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid).

Materiał i metody: Zbadano właściwości cytotoksyczne i migracyjne digoksyny. Przeciwnowotworowe właściwości digoksyny i DMXAA zbadano na modelu mysiego czerniaka. Liczbę nowotworowych naczyń oraz stan zapalny oznaczono za pomocą barwienia immunohistochemicznego.

Wyniki i wnioski: Wykazano, że digoksyna nie wpływa na proliferację komórek nowotworowych z wyjątkiem komórek ludzkiego glejaka A-172, ale jej podawanie hamuje migrację komórek. Zaobserwowano hamujący wpływ digoksyny na ekspresję białka HIF-1 α w komórkach nowotworowych. W terapii myszy z guzami czerniaka mysiego B16-F10 zauważono znaczne zahamowanie wzrostu guzów po zastosowaniu DMXAA, a dodatkowe podanie digoksyny wzmacniało uzyskiwane efekty terapeutyczne. Za pomocą immunohistochemii obserwowano proces niszczenia naczyń nowotworowych oraz rozległy naciek komórek układu odpornościowego zarówno po podaniu DMXAA, jak i digoksyny.

Projekt finansowany z grantu MNiSW nr NN 401 587 540.

Słowa kluczowe: terapia antyangiogenna, terapia przeciwnaczyniowa, immunoterapia, hipoksja, HIF1 α .

Session 5. Cancerous stem cells

Sesja 5. Nowotworowe komórki macierzyste

[19]

Komórki macierzyste raka nerki – teoria i praktyka

Anna M. Czarnicka

Session 5. Cancerous stem cells

Sesja 5. Nowotworowe komórki macierzyste

[20]

Tumor initiating cells in primary and metastatic ccRCC

Mohammed Imran Khan

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) is considered to be the most lethal urological tumor that originates in the lining of proximal convoluted tubules. Treatment of renal cancer remains a challenge for clinicians. Traditional chemotherapy and radiotherapy are ineffective, however, immunotherapy and Tyrosine kinase inhibitors (TKI) are beneficial occasionally. One of the hypothesis supports that some specialised cells in heterogeneous population of RCC cells gained resistance over periodically exposure to the above treatments. These specialised cells are termed as tumor initiating cells (TICs) which share the common properties of stem cells. In this research we have analysed the occurrence of TICs in primary and metastatic RCC cells. We used different molecular and cell culture techniques to localize and identify TICs. RCC cells expressing CD105 (Endoglin) and CD133 (Prominin-1) protein were analysed using flow cytometry technique on the basis of different fluorochrome labelling. CD105+ cells that is also a marker for mesenchymal stem cells (MSCs) associated with the prognosis and development of RCC in-vivo studies. However, CD133 contributes to tumor angiogenesis only when co-implanted with RCC cells. These cells are capable of forming tumor until and unless they retain above markers. To better understand RCC pathogenesis, it is important to detect and isolate TICs in several established RCC cell lines and further characterise them. The data will be useful for further signalling pathway studies, and to use TICs as platforms for pre-clinical drug application analysis.

Session 5. Cancerous stem cells

Sesja 5. Nowotworowe komórki macierzyste

[21]

Pharmacological modulation of cancer stem cell functions*Farmakologiczna modulacja funkcji nowotworowych komórek macierzystych***Michał Kloss, Iwona Ciechomska, Bożena Kaminska**

Laboratory of Molecular Neurobiology, Neurobiology Center, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland
Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Centrum Neurobiologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa, Polska

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) are rare tumor cells which share stem cell-like properties such as self-renewal, pluripotency, and in addition are therapy-resistant and highly tumorigenic. However, recent efforts have focused on therapies which target key apoptotic pathways which may confer tumor resistance, such as Akt, p53, Bcl-2 family proteins, caspase family proteases, microRNAs and those that promote cell differentiation. CSCs forced to differentiate, lose their properties, and become more sensitive to chemotherapy. Some targetable pathways capable of re-activating blocked terminal differentiation programs have been identified. Differentiation of glioma-initiating cells could be achieved with BMPs (bone morphogenetic proteins), Wnt ligands or inhibition of Notch signaling. Growing evidence demonstrates a variety of mechanisms (somatic mutations in histone H3 variant *H3.3* and *H3.1* genes, mutations in *IDH1/2*, deregulated expression/activity of epigenetic enzymes) all of which lead to global deregulation in the epigenetic landscape in gliomas. The possibility of “resetting” the abnormal cancer epigenome by applying pharmacological or genetic strategies is an attractive, novel approach. We developed several approaches to isolate GSCs from established glioma cell lines and patients’ tissues. These cells expressed higher levels of stem/progenitor cell transcription factors: *NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2* as compared to parental glioma cell lines, and are more resistant to pro-apoptotic drugs: cyclosporine A, temozolomide and staurosporine than the bulk of tumor cells. A number of compounds targeting epigenetic enzymes were screened for their ability to induce differentiation or to make glioma cell lines and GSC less therapy-resistant. The possibility of re-expression of genes which target key apoptotic pathways which may confer tumor resistance, was evaluated.

Studies supported by grant 2011/03/B/NZ3/04453 from The National Science Centre, Poland.

Streszczenie

Nowotworowe komórki macierzyste stanowią niewielką populację w guzie, mają cechy komórek macierzystych, takie jak zdolność do samoodnowy i różnicowania w komórki różnych typów. Są bardziej odporne na terapię niż większość komórek w populacji i wykazują wysoki potencjał do tworzenia guzów. Rozwijane w ostatnich latach strategie terapeutyczne zostały zogniskowane na kluczowych elementach szlaków sygnałowych sterujących proliferacją, przeżywalnością komórek i zdolnością do indukcji apoptozy, które mogą być odpowiedzialne za oporność nowotworów na terapię, takich jak Akt, TP53, białka z rodziny Bcl2, kaspazy, mikroRNA i inne odpowiedzialne za różnicowanie komórek. Zidentyfikowano szereg ścieżek sygnałowych, które mogą być odpowiedzialne za reaktywację zahamowanych programów różnicowania w nowotworowych komórkach macierzystych. Skierowane na ścieżkę różnicowania nowotworowe komórki macierzyste tracą swoje właściwości i stają się bardziej wrażliwe na chemioterapię. Komórki macierzyste glejaków można skierować na ścieżkę różnicowania za pomocą białek morfogenetycznych kości, ligandów ścieżki sygnałowej Wnt lub poprzez zahamowanie ścieżki sygnałowej Notch. W glejakach zidentyfikowano wiele mechanizmów prowadzących do zmian struktury chromatyny (mutacje wariantów histonu H3, mutacje *IDH1/2*, zmieniona ekspresja/aktywność białek wprowadzających modyfikacje epigenetyczne). Możliwość przywrócenia prawidłowego wzoru modyfikacji epigenetycznych za pomocą strategii genetycznych bądź farmakologicznych stanowi nowe podejście terapeutyczne w walce z glejakami.

Opracowano kilka metod izolacji nowotworowych komórek macierzystych z linii komórkowych oraz materiału klinicznego. Stwierdzono, że takie komórki miały zwiększoną ekspresję czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla komórek macierzystych/progenitorowych: *NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, w porównaniu z komórkami hodowanymi w standardowych warunkach oraz były bardziej odporne na czynniki proapoptotyczne, takie jak: cyklosporyna A, temozolomid i staurosporyna. Określono wpływ związków chemicznych hamujących aktywność enzymów wprowadzających modyfikacje epigenetyczne na ich zdolność do inicjowania różnicowania lub uwrażliwiania komórek macierzystych glejaków na terapię. Analizowano reaktywację genów kluczowych dla ścieżki apoptotycznej, które mogą być odpowiedzialne za oporność glejaka na terapię.

Studies supported by grant 2011/03/B/NZ3/04453 from The National Science Centre, Poland.

Session 6. Personalization of therapy
Sesja 6. Personalizacja terapii

[22]

Cisplatyna w leczeniu raków BRCA1-zależnych

Tomasz Byrski

Session 6. Personalization of therapy

Sesja 6. Personalizacja terapii

[23]

Indywidualizacja leczenia „starymi dobrymi” cytostatykami w zależności od ekspresji β -tubuliny u chorych na zaawansowane miejscowo nowotwory okolic głowy i szyi

Ewa Wasilewska-Teśluk

Session 6. Personalization of therapy

Sesja 6. Personalizacja terapii

[24]

let-7d as a way to personalized therapy of head and neck cancer

Let-7d drogą do personalizacji terapii nowotworów głowy i szyi

Tomasz Kolenda^{1,3}, Weronika Przybyła¹, Anna Teresiak-Mańczak¹, Marta Kapałczyńska¹, Anna Kowalik², Marta Kruszyna², Weronika Jackowiak², Renata Bliźniak¹, Wojciech Golusiński⁴, Katarzyna M. Lamperska¹

¹Cancer Genetic Laboratory, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

²Medical Physics Department, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

³Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, Poland

⁴Department of Head and Neck Surgery, Poznan University of Medical Sciences, Poland

Abstract

Introduction: miRNAs are proposed to be a good candidate as biomarkers for personalization of medicine nowadays. We still don't know if two different over-expression levels of them have the same cellular effect. let-7d can act as tumor suppressor and regulates expression proteins such as C-MYC, K-RAS, HMGA2 proteins or Dicer enzyme and participates in epithelial-to-mesenchymal transition process.

Aim of the study: Influence of different let-7d over-expression levels on behavior of hypopharynx squamous carcinoma cells (FaDu cell line) after irradiation and chemoexposure.

Material and methods: FaDu cell lines with different let-7d over-expression levels have been achieved using lentiviral plasmids. The expression of let-7d and genes characteristic for the phenotypes of the cells, target protein levels and proliferation ratio have been measured in all models by qRT-PCR, western blot and 3H-thymidine incorporation respectively. The models have been irradiated using dose of 2 Gy and clonogenic assays have been done. The influence of 5-FU, cisplatin, doxorubicine and paclitaxel has been measured by MTT assay.

Results: It was observed: 1) changes in expression of genes characteristic for EMT process; 2) correlation of cells survival after irradiation on miRNAs levels; in the case of low over-expression, cell survival fraction (SF) was low (SF about 30%) and increased (SF about 70%) in the case of higher let-7d over-expressions; 3) cell response to chemotherapeutic agents depended on let-7d levels and type of drug.

Conclusions: The different overexpression levels have different cellular effect and cause different cell behavior after irradiation and chemoexposure. We suspect, that some particular miRNA's expression levels influence on cell behaviour in the similar way, but without unequivocal correlation. The mechanism of this phenomenon is probably connected with the changes in expression of genes regulated by let-7d.

Streszczenie

Wstęp: miRNA są uważane za potencjalny biomarker umożliwiający personalizację leczenia. Jednakże nadal nie jest wiadome, czy różne poziomy nadekspresji miRNA mają taki sam efekt komórkowy. Let-7d może działać jako supresor i regulować ekspresję m.in. takich genów jak C-MYC, K-Ras, HMGA2 i enzymu Dicer. Bierze on też udział w przejściu mezenchymalno-epitelialnym komórek (EMT).

Cel pracy: Analiza wpływu różnych poziomów nadekspresji let-7d na zachowanie się komórek linii raka gardła (FaDu) poddanych napromienianiu i działaniu chemioterapeutyków.

Materiał i metody: Nadekspresja let-7d w komórkach linii FaDu została uzyskana za pomocą systemu lentiwirusowego. Otrzymane linie zostały scharakteryzowane pod kątem poziomu: ekspresji let-7d (qRT-PCR), ekspresji białek (Western blot) ekspresji genów charakterystycznych dla procesu EMT (qRT-PCR) oraz proliferacji (3H-tymidyna). Wpływ promieniowania (2Gy) określono za pomocą testu klonogenego, a chemioterapeutyków (5-FU, cisplatyny, doksorubicyny i taksolu) za pomocą testu MTT.

Wyniki: Zaobserwowano: 1) zmianę w ekspresji genów charakterystycznych dla przejścia EMT; 2) zależność między poziomem ekspresji let-7d a odpowiedzią na promieniowanie: niska nadekspresja związana była z mniejszą przeżywalnością komórek (SF ok. 30%), która rosta (do SF ok. 70%) wraz ze wzrostem ekspresji let-7d; 3) różną odpowiedź na chemioterapeutyki w zależności od jego rodzaju i poziomu nadekspresji miRNA.

Wnioski: Różne poziomy nadekspresji let-7d powodują różne efekty komórkowe i różną odpowiedź komórek na promieniowanie i działanie chemioterapeutyków. Podejrzewamy, że pewne określone poziomy ekspresji let-7d mają wpływ na zachowanie komórki w sposób wykazujący podobną tendencję, bez korelacji liniowej. Mechanizm tego zjawiska prawdopodobnie związany jest ze zmianą ekspresji genów regulowanych przez let-7d.

Session 6. Personalization of therapy

Sesja 6. Personalizacja terapii

[25]

Nasilenie ekspresji oraz prognostyczne znaczenie receptorów melatoninowych MT1A w komórkach raka gruczołu piersiowego**Karolina Jabłońska¹, Bartosz Pula¹, Agata Zemla¹, Tomasz Owczarek², Andrzej Wojnar³, Janusz Ryś⁴, Aleksandra Ambicka⁴, Maciej Ugorski^{2,5}, Marzena Podhorska-Okolow¹, Piotr Dziegielel^{1,6,7}**¹Chair and Department of Histology and Embryology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland²Department of Biochemistry, Pharmacology and Toxicology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland³Department of Pathomorphology, Lower-Silesian Oncology Centre, Wrocław, Poland⁴Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Krakow Branch, Poland⁵Laboratory of Glycobiology and Cell Interactions, L. Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wrocław, Polish Academy of Sciences, Poland⁶Chair of Histology and Embryology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland⁷Faculty of Physiotherapy, University School of Physical Education, Wrocław, Poland¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wrocław, Polska²Zakład Biochemii, Farmakologii i Toksykologii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Polska³Zakład Patomorfologii, Dolnośląskie Centrum Onkologii, Wrocław, Polska⁴Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Kraków, Polska⁵Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych, Polska Akademia Nauk, Wrocław, Polska⁶Katedra Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska⁷Wydział Fizjoterapii, Uniwersytet Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, Polska**Abstract**

Introduction: Melatonin, the hormone synthesized primarily by the pineal gland pinealocytes, exhibits potent antiproliferative activity against various types of tumor cells. In numerous *in vitro* and *in vivo* studies was confirmed onkostatyc effect of melatonin on breast cancer cells. It was shown that administration of exogenous melatonin increases the time of the tumor development from the moment of carcinogen activation, reduces the number and size of formed tumors and reduces the risk of their occurrence. Current research suggests the possibility of using antiestrogen melatonin properties in the treatment of estrogen dependent tumors. Melatonin may act on the cell directly, independently of the receptors or through them. Among membrane melatonin receptors of high affinity are distinguished MT1A and MT1B receptors. MT1A receptors are present inter alia in supraciasmatic nucleus, hippocampus, aorta, ovary, duodenum or in the skin. MT1A receptors belongs to the superfamily of G-coupled protein receptors. Through the α subunit of the G protein, MT1A receptors inhibit adenylate cyclase, thereby contributing to a reduction of intracellular levels of cAMP. This mechanism allows the regulation of the expression of genes associated with the process of proliferation.

Aim of the study was to determine the location and the relative level of MT1A receptor in breast cancer cells and to correlate it with selected clinicopathological factors (clinical stage, expression level of ER, PR, Ki-67, HER-2, survival, the patient's age, menopausal status, histologic grade G).

Material and methods: The study was performed using immunohistochemical techniques (immunohistochemistry, immunofluorescence) and molecular techniques (real-time PCR, Western Blot). Immunohistochemistry was performed on the group of 190 cases of invasive ductal carcinoma (IDC).

Streszczenie

Wstęp: Melatonina, hormon syntetyzowany głównie przez pinealocyty szyszynki, wykazuje silne właściwości antyproliferacyjne wobec różnego typu komórek nowotworowych. W licznych badaniach *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzono onkostatyczny wpływ melatoniny na komórki raka gruczołu piersiowego. Wykazano, że podawanie egzogennej melatoniny wydłuża czas rozwoju guza od momentu zadziałania kancerogenu, obniża liczbę i wielkość powstających guzów oraz zmniejsza ryzyko ich powstania. Aktualnie prowadzone badania sugerują możliwość wykorzystania antyestrogenowych właściwości melatoniny w terapii nowotworów estrogenozależnych. Melatonina może działać na komórkę bezpośrednio, niezależnie od receptorów lub za ich pośrednictwem. Wśród błonowych receptorów melatoninowych o wysokim powinowactwie wyróżnia się receptory MT1A oraz MT1B. Receptory MT1A występują m.in. w jądrze nadskrzyżowaniowym, hipokampie, aorcie, jajnikach, dwunastnicy czy w skórze. Receptory MT1A należą do nadrodziny receptorów związanych z białkami G. Za pośrednictwem podjednostki białka G receptory MT1A hamują aktywność cykazy adenylowej, przyczyniając się tym samym do obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP. Mechanizm ten pozwala na regulację ekspresji genów związanych m.in. z procesem proliferacji.

Cel pracy: Celem badania było określenie lokalizacji oraz względnego poziomu receptora MT1A w komórkach raka gruczołu piersiowego, a także skorelowanie go z wybranymi czynnikami kliniczno-patologicznymi (stopień zaawansowania klinicznego, nasilenie ekspresji ER, PR, Ki-67, HER-2, czas przeżycia, wiek pacjentki, status menopauzalny, stopień złożoności histologicznej G).

Materiał i metody: Badania wykonano przy użyciu technik immunohistochemicznych (*immunohistochemia*, *immunoflu-*

Control for the study were 22 cases of fibrocystic breast disease. To determine the relative level of MT1A mRNA were used 29 cases of frozen fragments of the studied tumors. Selected breast cancer cell lines (MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231) vary in malignancy as well as the status of estrogen receptors (ER), progesterone receptor (PR) and HER2 were used to demonstrate the relative differences of MT1A at the protein level (Western Blot) and to determine the location of the MT1A receptor by immunofluorescence.

Results: In most of the examined tumors, immunohistochemical reaction showed membrane-cytoplasmic localization of the MT1A receptor. The higher level expression of MT1A was observed in cases of invasive ductal carcinoma in relation to cases of fibrocystic breast disease ($p < 0.0001$). MT1A expression was higher in the ER+ tumors and HER2+ ($p < 0.005$). In the group of triple negative tumors (ER-, PR-, HER2-) was observed the lowest level of MT1A receptor expression ($p < 0.001$). The lowest level of MT1A receptor protein was also observed in the cell line MDA-MB-231 triple negative (ER-, PR-, HER2-) compared to ER+ lines: MCF-7, SK-BR-3 ($p < 0.05$). It was also showed a weak negative correlation between the expression of MT1A and ER ($r = -0.17$, $p = 0.0429$) and negative correlation of MT1A and the expression of Ki-67 ($r = -0.23$, $p = 0.0013$). Analysis of real-time PCR results showed a decrease of MT1A at the mRNA level with increasing grade (G) of examined IDC cases. In addition, higher MT1A expression was associated with longer survival (OS) of patients in both the ER+ tumors, as well as in tamoxifen-treated patients ($p < 0.05$). Multivariate analysis showed that higher MT1A expression was an independent prognostic factor of longer overall survival of patients (OS) and event-free survival (EFS) in the ER+ tumors ($p < 0.05$).

Conclusions: The higher relative level of MT1A receptors in both IDC with lower grade (G1, G2) and in selected tumor cell lines with less aggressiveness may indicate the potential prognostic and therapeutic significance of melatonin in breast cancer. It can be assumed that melatonin and its MT1A membrane receptors may be in the future promising subject of research in finding alternative and supportive treatment of breast cancer.

Key words: melatonin, melatonin receptors MT1A, breast cancer.

oreoscencja) oraz technik molekularnych (*real-time* PCR, Western Blot). Badania immunohistochemiczne przeprowadzono na 190 przypadkach raka przewodowego gruczołu piersiowego (*invasive ductal carcinoma* – IDC). Kontrolę w badaniach stanowiły 22 przypadki łagodnej dysplazji gruczołu piersiowego. Do określenia względnego poziomu mRNA MT1A wykorzystano 29 przypadków zamrożonych fragmentów badanych guzów. Wybrane linie komórkowe raka gruczołu piersiowego (MCF-7, SK-BR-3 oraz MDA-MB-231), zróżnicowane pod względem złośliwości, jak również statusu receptorów estrogenowych (ER), receptorów progesteronowych (PR) oraz HER2, posłużyły do wykazania względnego zróżnicowania MT1A na poziomie białka (Western blot) oraz określenia lokalizacji receptora MT1A za pomocą immunofluorescencji.

Wyniki: W większości przypadków badanych guzów reakcja immunohistochemiczna wykazała błonowo-cytoplazmatyczną lokalizację receptora MT1A. Wyższy poziom ekspresji MT1A odnotowano w przypadkach IDC względem przypadków łagodnej dysplazji ($p < 0,0001$). Ekspresja MT1A była wyższa w guzach ER+ oraz HER2+ ($p < 0,005$). W grupie guzów potrójnie negatywnych (ER-, PR-, HER2-) zaobserwowano najniższy poziom nasilenia ekspresji receptora MT1A ($p < 0,001$). Najniższy poziom białka receptora MT1A zaobserwowano również w linii komórkowej MDA-MB-231 potrójnie negatywnej (ER-, PR-, HER2-) w porównaniu z liniami ER+: MCF-7, SK-BR-3 ($p < 0,05$). Wykazano także słabą ujemną korelację pomiędzy ekspresją MT1A i ER ($r = -0,17$, $p = 0,0429$), a także ujemną korelację ekspresji MT1A i Ki-67 ($r = -0,23$, $p = 0,0013$). Analiza wyników uzyskanych metodą *real-time* PCR wykazała spadek MT1A na poziomie mRNA wraz ze wzrostem stopnia złośliwości (*grade* – G) w badanych IDC. Co więcej, wyższa ekspresja MT1A była związana z dłuższym przeżyciem całkowitym (*overall survival* – OS) pacjentów zarówno w grupie guzów ER+, jak i w grupie pacjentów leczonych tamoksifenem ($p < 0,05$). Analiza wieloczynnikowa wykazała, że wyższa ekspresja MT1A była niezależnym czynnikiem prognostycznym dłuższych OS pacjentów oraz przeżyć wolnych od wznowy (*event-free survival* – EFS) w grupie guzów ER+ ($p < 0,05$).

Wnioski: Wyższy względny poziom receptorów MT1A zarówno w guzach IDC o niższym stopniu złośliwości (G1, G2), jak i w wybranych nowotworowych liniach komórkowych nowotworów o mniejszej agresywności może świadczyć o potencjalnym znaczeniu prognostycznym oraz terapeutycznym melatoniny w rakach gruczołu piersiowego. Można przypuszczać, że melatonina i jej błonowe receptory MT1A mogą stanowić w przyszłości obiecujący przedmiot badań w poszukiwaniu alternatywnych oraz wspomagających metod leczenia raka gruczołu piersiowego.

Słowa kluczowe: melatonina, receptory melatoninowe MT1A, rak gruczołu piersiowego.

Session 6. Personalization of therapy Sesja 6. Personalizacja terapii

[26]

Kliniczne znaczenie ekspresji mikroRNA (miRNA) u chorych na wczesnego niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) poddanych radykalnej resekcji mięszu płucnego

Marcin Skrzypski¹, Krzysztof Goryca², Michał Marczyk³, Piotr Czapiewski⁴, Joanna Polańska⁵, Jacek Jassem¹

¹Department of Oncology and Radiotherapy, Medical University of Gdansk, Poland

²Department of Genetics, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute of Oncology, Warsaw, Poland

³Faculty of Automatic Control, Electronics and Computer Science, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

⁴Chair and Department of Pathomorphology, Medical University of Gdansk, Poland

⁵Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

¹Klinika Onkologii i Radioterapii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska

²Zakład Genetyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii skłodowskiej-Curie, Warszawa, Polska

³Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

⁴Zakład i Katedra Patomorfologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska

⁵Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

Abstract

Background: About 50% of non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) patients develop distant metastases following pulmonary resection. Currently, there are no reliable factors allowing for individual selection of high-risk patients for adjuvant systemic therapies. New more precise methods of prognostication are being investigated.

Material and methods: We assessed by qRT-PCR microRNA (miRNA) expression in 289 stage I-IIIa NSCLC samples. Expression of 677 miRNAs was screened in fresh frozen tumour samples in the training cohort of 50 squamous cell carcinoma (SCC) patients who underwent curative surgery. Of those, 20 patients subsequently developed distant metastases, and 30 were free of recurrence for > 4 years. In the second step, miRNAs with highest predictive value for distant relapse were validated in formalin-fixed paraffin-embedded material in an independent cohort of 134 stage I-IIIa SCC patients. Additionally, 754 miRNAs were investigated in 110 lung adenocarcinoma (AC) patients, among which 40% developed metastases and the remaining were free of recurrence after at least 4 years follow-up.

Results: In the training cohort of SCC, six miRNAs were differently expressed in the non-recurrent vs. recurrent groups and correlated with distant recurrence-free survival (but none was significant after correction for multiple testing). Of these six miRNAs, miR-662, -192, and -192* were confirmed as prognostic in the independent SCC cohort. Expression of miR-128, -10b, -502-3p, and -192 differed between SCC and AC. In the discovery AC set, the expression of miR-939, -1303 was significantly different between the group with and without metastases after correction for multiple comparisons (Benjamini-Hochberg).

Conclusions: We identified three new miRNAs predictive of distant relapse in operable SCC and AC. Future miRNA studies should account for differences between NSCLC subtypes.

Key words: NSCLC, RT-PCR, microRNA, prognosis.

Streszczenie

Wstęp: U ok. 50% chorych na wczesnego niedrobnokomórkowego raka płuca (*non-small-cell lung carcinoma* – NSCLC) poddanych doszczętniej resekcji mięszu płucnego dochodzi do rozsiewu. Obecnie chorzy są kwalifikowani do uzupełniającej chemioterapii na podstawie stopnia zaawansowania nowotworu. Poszukuje się nowych metod indywidualnej oceny ryzyka nawrotu z użyciem molekularnych technik.

Materiał i metody: U 289 chorych na NSCLC w I-IIIa stopniu zaawansowania zmierzono ekspresję mikroRNA metodą RT-PCR. Ekspresję 677 miRNA zmierzono w 50 mrożonych wycinkach tkankowych (grupa ucząca) pobranych od chorych na wczesnego raka płaskonabłonkowego płuca (*squamous-cell carcinoma* – SCC). U 20 spośród tych chorych rozwinęły się odległe przerzuty po resekcji płucnej, a u pozostałych 30 osób nie stwierdzono nawrotu raka po przynajmniej 4 latach obserwacji. W kolejnym etapie miRNA o najwyższej wartości rokowniczej zweryfikowano w niezależnej kohorcie walidacyjnej chorych na SCC w I-IIIa stopniu zaawansowania (materiał parafinowy). Równoległe przeprowadzono badanie ekspresji 754 miRNA w blokach parafinowych od 110 chorych na gruczolakoraka płuca (*adenocarcinoma* – AC) w I stopniu zaawansowania, spośród których u 40% rozwinęły się odległe przerzuty, a u pozostałych nie obserwowano nawrotu.

Wyniki: W grupie „uczącej” SCC ekspresja 6 miR była związana z DMFS oraz różna pomiędzy chorymi z przerzutami i bez przerzutów ($p < 0,05$). W walidacyjnej grupie (SCC) potwierdzono znaczenie rokownicze ekspresji miR-662, -192 i 192*. Ekspresja miR-128, -10b, 502-3p oraz -192 była różna pomiędzy SCC i AC. W grupie „uczącej” AC miR-939, -1303 były istotnie różne pomiędzy grupą bez przerzutów i z przerzutami po zastosowaniu poprawki na wielokrotne porównania (Benjamini-Hochberg).

Wnioski: Ekspresja wybranych miRNA związana jest z wysokim ryzykiem rozsiewu NSCLC. Z uwagi na odmienną ekspresję miR w SCC i AC podtypy te powinny być rozpatrywane oddzielnie.

Słowa kluczowe: niedrobnokomórkowy rak płuca, mikroRNA, czynnik rokowniczy, rak płaskonabłonkowy płuca, gruczolakorak płuca, RT-PCR.

Session 6. Personalization of therapy

Sesja 6. Personalizacja terapii

[27]

miR-221 and miR-324 as a prognostic factors in melanoma patients treated with a genetic melanoma vaccine*miRNA 221 i 324 jako wskaźniki prognostyczne odpowiedzi na leczenie genetycznie modyfikowaną szczepionką czerniakową AGI-101H*Anna Przybyła¹, Jacek Mackiewicz², Andrzej Mackiewicz^{1,3}¹Department of Cancer Immunology, Chair of Medical Biotechnology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland²Department of Biology and Environmental Protection, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland³Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland¹Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska²Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska³Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska**Abstract**

Introduction: The new opportunity for better understanding of tumor biology came with discovery of microRNAs, a new class of gene regulatory molecules. MicroRNAs are small, non-coding RNAs that negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level and play important role in a number of biological functions including tumorigenesis, cell differentiation, metabolism and apoptosis. The discovery of microRNA in serum and plasma, opens up the possibility of using them as noninvasive biomarkers of disease and response to therapy.

Material and methods: Serum samples originating from 85 melanoma patients were used. All patients were treated with melanoma vaccine AGI-101H. The analyzed samples were collected before and after 2 years of the treatment (non-progressors) and at the time of first progression (progressors). MicroRNA was extracted from serum using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Next, the reverse transcription reactions were performed using the Taq-Man miRNA Reverse Transcription Kit and microRNA-specific stem-loop primers (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR analysis of hsa-miR-7b, hsa-miR-15b, hsa-miR-221 and hsa-miR-324 was done by using a microRNA-specific TaqMan MicroRNA Assay Kit (Applied Biosystems). The fold-differences in microRNAs expression between samples were calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method).

Results: In melanoma patients treated with AGI-101H: 1) patients with high miRNA-221 expression had over 4-fold lower risk of death comparing to patients with low expression; 2) patients with high miRNA-324 expression had over 3-fold lower risk of death than patients with low expression; 3) two variables: baseline micro-RNA 221 and micro-RNA 324 serum level have diagnostic properties for the presence of metastases in treated patients.

Conclusion: High serum level of miRNA 221, 324 might be predictive factors in the treatment of resected melanoma patients with AGI 101H.

Key words: melanoma, miRNA, progression, melanoma vaccine.

Streszczenie

Wstęp: Odkrycie miRNA, nowej klasy cząsteczek regulujących ekspresję genów, pozwoliło na lepsze zrozumienie biologii nowotworów. miRNA to małe, niekodujące cząsteczki RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym, i które odgrywają ogromną rolę w wielu procesach komórkowych takich jak proliferacja, różnicowanie, metabolizm i apoptoza. Na podstawie ostatnich doniesień można przypuszczać, że właśnie obecność konkretnych miRNA w surowicy i odmienny profil ich ekspresji może być skutecznym biomarkerem wskazującym na proces progresji choroby.

Materiały i metody: Do badań wykorzystano surowice od 85 pacjentów chorych na czerniaka i leczonych genetycznie modyfikowaną szczepionką czerniakową AGI101H. Surowica pobierana była: przed rozpoczęciem leczenia (u wszystkich pacjentów), w momencie progresji (u pacjentów ze wznowieniem choroby), oraz dwa lata po włączeniu do badania (dla pacjentów bez przerzutów). Izolację miRNA z surowicy przeprowadzono przy użyciu zestawu do izolacji „miRNeasy Mini Kit” firmy Qiagen, zgodnie z instrukcją producenta. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem Taq-Man miRNA Reverse Transcription Kit firmy Applied Biosystems. qRT-PCR dla hsa-miR-7b, hsa-miR-15b, hsa-miR-221 and hsa-miR-324 przeprowadzono wykorzystując TaqMan MicroRNA Assay Kit (Applied Biosystems). Do porównania wyników uzyskanych w analizie qRT-PCR wykorzystano względną metodę analizy ilościowej - metodę komparatywną ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Wyniki: U pacjentów leczonych szczepionką AGI 101H: 1) pacjenci z wysokim poziomem ekspresji mir-221 wykazują ponad 4 razy niższe ryzyko zgonu w porównaniu z pacjentami z niską ekspresją; 2) pacjenci z wysokim poziomem ekspresji mir-324 wykazują ponad 3-krotnie niższe ryzyko zgonu niż pacjenci z niskim poziomem ekspresji tego miRNA; 3) początkowy poziom miR-221 i miR-324 w surowicy ma znaczenie diagnostyczne dla pojawiania się przerzutów u leczonych pacjentów.

Wnioski: Wysoki poziom mir-221 oraz mir-324 może być czynnikiem predykcyjnym w leczeniu czerniaka u pacjentów leczonych szczepionką AGI 101H.

Słowa kluczowe: czerniak, miRNA, progresja, szczepionka czerniakowa.

Session 7. Tumour microenvironment

Sesja 7. Mikrośrodowisko guza

[28]

Polaryzacja mikrośrodowiska nowotworowego przez szczepionkę DNA skierowaną przeciwko endoglinie**Magdalena Jarosz, Tomasz Cichoń, Ryszard Smolarczyk, Stanisław Szala**

Center for Translational Research and Molecular Biology of Cancer, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Poland

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów; Centrum Onkologii – Instytut im Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Polska

Abstract

Introduction: Cancer cells, as well as tumor microenvironmental cells, influence formation of new tumor blood vasculature and immunosuppressive milieu which in turn allow cancer cells' escape from immune surveillance.

Aim of the study: Elaboration of an anticancer therapeutic approach via decreased of tumor blood vessels and abrogated immunosuppression.

Material and methods: A DNA vaccine was constructed which is directed against endoglin (CD105). The gene encoding endoglin was carried by attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207 (aroA⁻) bacteria. Antitumor potential of this DNA vaccine were examined using a murine melanoma tumor model. Flow cytometry was used to detect the immunophenotype of cells infiltrating experimental tumors. Tumor blood vessels were counted using immunohistochemical staining approach.

Results: The examined DNA vaccine activated both specific and nonspecific immune responses. We observed increased infiltration of T lymphocytes and NK cells in experimental tumors. An immune CTL response was directed specifically against endoglin present on the surface of both endothelial and cancer cells. The vaccine inhibited angiogenesis in immunized mice. When combined with immunomodulatory agents [interleukin 12 (IL-12), cyclophosphamide (CTX)], it led to a decrease in the number of tumor blood vessels and level of Treg lymphocytes in the treated mice. Ca. 30% of mice receiving the vaccine as well as IL-12-mediated gene therapy demonstrated complete tumor regression. Moreover, when combining the proposed immunotherapy with chemotherapy (CTX), a long-term stabilization of tumor growth was noted.

Conclusions: The examined DNA vaccine is a variant of therapy which aims at destroying tumor blood vessels. Suitable combinations of this vaccine with antiangiogenic and immunomodulatory agents, such as IL-12 or CTX, lead to polarization of tumor milieu phenotype in the direction of an antiangiogenic one which abrogates immunosuppression and results in long-term stabilization of the disease, or even complete tumor regression.

Key words: endoglin-based DNA vaccine, immunomodulatory agents, combined antitumor therapy, polarization of tumor microenvironment.

Streszczenie

Wstęp: Komórki nowotworowe i komórki mikrośrodowiska mają wpływ zarówno na powstanie nowych naczyń krwionośnych, jak i środowiska immunosupresyjnego, umożliwiającego ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego.

Cel pracy: Opracowanie metody terapeutycznej pozwalającej zarówno zmniejszać liczbę naczyń nowotworowych (hamować unaczynienie), jak i zahamować immunosupresję.

Materiał i metody: Skonstruowano szczepionkę DNA skierowaną przeciwko endoglinie (CD105). Nośnikiem genu kodującego endoglinę były atenuowane bakterie *Salmonella typhimurium* SL7207 (aroA⁻). Przeciwnowotworowe właściwości szczepionki DNA zbadano na modelu mysiego czerniaka. Do oceny immunofenotypowej komórek naciekających guzy nowotworowe wykorzystano technikę cytometrii przepływową. Liczbę nowotworowych naczyń oznaczono za pomocą barwienia immunohistochemicznego.

Wyniki: Szczepionka DNA aktywowała odpowiedź zarówno swoistą, jak i nieswoistą. Naciek limfocytów T i komórek NK w guzach nowotworowych był zwiększony. Pojawiająca się odpowiedź immunologiczna (CTLs) była skierowana swoiście przeciwko endoglinie, obecnej na komórkach śródbłonnkowych i nowotworowych. Szczepionka hamowała angiogenezę u immunizowanych myszy. W kombinacji z czynnikami immunomodulacyjnymi [interleukina 12 (IL-12), cyklofosfamid (CTX)] zmniejszała liczbę naczyń krwionośnych i poziom limfocytów Treg w guzach nowotworowych leczonych myszy. U ok. 30% leczonych myszy szczepionką DNA z terapią genową z IL-12 zauważono całkowitą regresję guzów. W wyniku skojarzenia immunoterapii z chemioterapią (CTX) uzyskano natomiast długotrwałą stabilizację wzrostu guzów.

Wnioski: Szczepionka DNA jest jednym z wariantów terapii niszczącej nowotworowe naczynia krwionośne. Odpowiednia kombinacja z czynnikami zarówno antyangiogennymi, jak i immunomodulacyjnymi, takimi jak IL-12 czy CTX, powoduje polaryzację fenotypu komórek mikrośrodowiska w kierunku fenotypu antyangiogennego znoszącego immunosupresję, prowadząc do długotrwałej stabilizacji choroby, a nawet całkowitej regresji nowotworu.

Projekt finansowany z grantu MNiSW nr NN 401 587 540.

Słowa kluczowe: szczepionka DNA przeciwko endoglinie, czynniki immunomodulacyjne, przeciwnowotworowa terapia kombinowana, polaryzacja mikrośrodowiska nowotworowego.

Session 7. Tumour microenvironment

Sesja 7. Mikrośrodowisko guza

[29]

Hamowanie odnowy komórek raka jelita grubego preselekcjonowanych 5-fluorouracylem przez inhibitory receptorowych kinaz tyrozynowych w warunkach normoksji i hipoksji**Agnieszka Kotlarz¹, Małgorzata Przybyszewska¹, Joanna Mitoszevska¹, Andrzej Kutner², Sergiusz Markowicz¹**¹Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Warsaw, Poland²Pharmaceutical Research Institute, Warsaw, Poland¹Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa, Polska²Instytut Farmaceutyczny, Warszawa, Polska**Abstract**

Introduction: Hypoxia in tumor microenvironment is a significant factor that promotes mechanisms involved in radio-resistance and drug resistance of tumor cells, tumor invasiveness and angiogenesis. Tyrosine kinase inhibitors (TKI) inhibit cellular pathways involved in therapy resistance, metastasis and tumor progression.

Aim of the study: To evaluate effect of imatinib and sunitinib on the recovery of colon cancer cells following cytoreduction carried out with the classical cytostatic drug 5-fluorouracil (5-FU).

Material and methods: The established human colon cancer cell lines HT-29 and HCT-116 were tested *in vitro*. Cancer cells were cultured with 5-FU in the standard oxygen conditions (20% O₂) or in the moderate hypoxia (5% O₂), and thereafter the recovery of cells resistant to 5-FU was evaluated in the colony formation assay performed in the standard or in the hypoxic conditions, without or in the presence of sunitinib or imatinib. To determine the influence of TKI on cell migration following selection with 5-FU, HCT-116 cells were tested in the monolayer wound healing assay in the presence of 20% or 5% O₂, without or with sunitinib or imatinib.

Results: In comparison to the standard oxygen conditions, hypoxic conditions applied during cell preselection with 5-FU as well as during colony formation assay promoted clonogenic potential of HT-29 and HCT-116 cells. Clonogenicity of colon cancer cells decreased in the presence of sunitinib or imatinib in the standard oxygen conditions as well as in hypoxia. Sunitinib markedly reduced motility of colon cancer cells both in the standard and in the hypoxic conditions.

Conclusions: Recovery potential of colon cancer cells preselected *in vitro* with 5-FU in hypoxic conditions (~5%) which mimic oxygen conditions in tumor microenvironment, is higher than that of cells preselected in the standard *in vitro* culture conditions. Tyrosine kinase inhibitors applied following treatment of cancer cells with cytostatic drug 5-FU are capable to hamper cancer cell recovery in the normoxic and in the hypoxic conditions. Sunitinib also inhibits motility of the invasive colon cancer cell line HCT-116.

Key words: hypoxia, imatinib, sunitinib, clonogenicity, migration.

Streszczenie

Wstęp: Niedotlenienie jest ważnym czynnikiem mikrośrodowiska nowotworu, wzmagającym radio- i lekooporność komórek nowotworowych, ich inwazyjność i oddziaływania proangiogenne. Substancje z grupy drobnocząsteczkowych inhibitorów receptorowych kinaz tyrozynowych (*tyrosine-kinase inhibitor* – TKI) hamują aktywność szlaków komórkowych odpowiedzialnych za progresję i przerzutowanie nowotworu oraz za jego wyższą oporność na leczenie konwencjonalne.

Cel pracy: Zbadanie skuteczności imatinibu i sunitinibu, substancji z grupy TKI, w hamowaniu odnowy komórek raka jelita grubego po selekcji klasycznym cytostatykiem.

Materiał i metody: Badania zostały wykonane *in vitro* na ustalonych ludzkich liniach komórkowych raka jelita grubego HT-29 i HCT-116. Komórki nowotworowe preselekcjonowano 5-fluorouracylem (5-FU) w standardowych warunkach tlenowych (20% O₂) albo w warunkach umiarkowanej hipoksji (5% O₂), a następnie – również w warunkach normoksji lub hipoksji – badano wpływ TKI na klonogenność preselekcjonowanych komórek. Wpływ TKI na migrację komórek po preselekcji 5-FU badano testem zarastania rasy w warunkach standardowych i w hipoksji z użyciem linii HCT-116 o fenotypie inwazyjnym.

Wyniki: Hipoksja zastosowana podczas preselekcji oraz w trakcie odnowy komórek HT-29 i HCT-116 po preselekcji 5-FU zwiększała ich potencjał klonogeny. Imatinib i sunitinib obniżały klonogenność komórek i w normoksji, i w hipoksji. Migracja preselekcjonowanych komórek była znacząco hamowana i w normoksji, i w hipoksji tylko przez sunitinib.

Wnioski: Komórki nowotworowe po selekcji cytostatykiem w warunkach obniżonego stężenia tlenu (~5%), odpowiadającego warunkom panującym w mikrośrodowisku guza, mają większą zdolność do odnowy, wyrażającą się wyższą klonogennością niż komórki preselekcjonowane w warunkach normoksji. Substancje z grupy TKI, zastosowane po klasycznym chemioterapeutyku (5-FU), hamują odnowę preselekcjonowanych komórek raka jelita grubego w normoksji i w hipoksji. Sunitinib ponadto hamuje migrację komórek nowotworowych o fenotypie inwazyjnym.

Słowa kluczowe: hipoksja, imatinib, sunitinib, klonogenność, migracja.

Session 7. Tumour microenvironment

Sesja 7. Mikrośrodowisko guza

[30]

Myeloid cells in the lung cancer microenvironment

Komórki mieloidalne w mikrośrodowisku raka płuca

Mariusz Kaczmarek

Department of Immunology, Chair of Clinical Immunology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland
Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

Abstract

Introduction: The myeloid cells lineage is a major component of the leukocyte infiltration of various tumours. They are determined as a tumor-associated macrophages (TAM) or tumor-associated neutrophils (TAN). In response to the factors presented in the cancer microenvironment they have differentiated phenotype defined as an anti-tumour (M1 for macrophages, and N1 for neutrophils) or pro-tumour (M2 and N2, respectively). In the environment of developing tumour was described a rare population of cells named myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Myeloid-derived suppressor cells are a combination of progenitor cells and immature cells of the myeloid lineage. In this diverse population with a low degree of maturity it has been distinguished granulocytic (GrMDSC) and monocytic cells (MoMDSC). In the tumor microenvironment the MDSC inhibit T cells, dendritic cells, and NK cells. They support the differentiation of Treg cells and protumor activity of TAM and TAN. Their clinical significance in the course of lung cancer is still poorly understood.

Aim of the study was the identification, phenotypic and functional characterization of MDSC, TAM and TAN in patients with lung cancer.

Material and methods: Using a flow cytometer was evaluated immunophenotype of MDSC, TAM and TAN in tumour, in peripheral blood and pulmonary veins blood of patients with non-small cell lung cancer, also in the pleural effusions with different etiologies. Has been evaluated mediators regulating the recruitment and activity of tested cells. Also were assessed the phagocytic function and the ability to intracellular killing dependent on reactive oxygen species.

Results: In the studied material has been demonstrated the presence of MDSC. Also has been demonstrated a reduced functional activity of TAN and TAM in their ability to phagocytosis and intracellular killing dependent on oxidative mechanisms.

Conclusions: Recognition of the pro-tumour activity of myeloid lineage cells may be helpful in understanding the reasons of insufficient efficiency of tumor therapy.

Key words: MDSC, macrophages, neutrophils, cancer microenvironment.

Streszczenie

Wstęp: W nacieku leukocytarnym różnych nowotworów główną składową są komórki linii mieloidalnej. Określa się je makrofagami lub neutrofilami towarzyszącymi nowotworom (*tumor-associated macrophages* – TAM, lub *tumor-associated neutrophils* – TAN). W odpowiedzi na czynniki obecne w mikrośrodowisku nowotworu wykazują zróżnicowany fenotyp określany jako przeciwnowotworowy (M1 dla makrofagów i N1 dla neutrofilów) bądź pronowotworowy (odpowiednio M2 i N2). W środowisku rozwijającego się nowotworu opisano również rzadką populację komórek supresorowych pochodzenia szpikowego (*myeloid-derived suppressor cells* – MDSC). Komórki supresorowe pochodzenia szpikowego są mieszaniną komórek progenitorowych oraz niedojrzałych komórek linii mieloidalnej. W tej różnorodnej populacji o niskim stopniu dojrzałości wyróżniono komórki granulocytarne (GrMDSC) i monocytarne (MoMDSC). W mikrośrodowisku nowotworu hamują one aktywność limfocytów T, komórek dendrytycznych i natural killer (NK). Wspierają różnicowanie limfocytów Treg oraz pronowotworowych TAM i TAN. Ich znaczenie kliniczne w przebiegu raka płuc jest wciąż mało poznane.

Cel pracy: Identyfikacja, charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna MDSC, TAM i TAN u chorych z rakiem płuc.

Materiał i metody: Przy użyciu cytometru przepływowego oceniono immunofenotyp MDSC, TAM i TAN w obrębie guzów, we krwi obwodowej i z żyły płucnej od chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuc oraz w wysiękach opłucnowych o różnej etiologii. Oceniono mediatory regulujące rekrutację i aktywność badanych komórek. Oceniono funkcję fagocytarną i zdolność do wewnątrzkomórkowego zabijania zależnego od reaktywnych form tlenu.

Wyniki: W badanym materiale wykazano obecność MDSC. Wykazano ograniczoną aktywność funkcjonalną TAM i TAN w zakresie ich zdolności do fagocytozy i wewnątrzkomórkowego zabijania zależnego od mechanizmów tlenowych.

Wnioski: Poznanie pronowotworowej aktywności komórek mieloidalnych może być pomocne w zrozumieniu przyczyn niedostatecznej skuteczności terapii nowotworów.

Słowa kluczowe: MDSC, makrofagi, neutrofile, mikrośrodowisko nowotworu.

Session 8. Biomarkers

Sesja 8. Biomarkery

[31]

Ten year survival in BRCA1-negative and BRCA1-positive breast cancer patients

Tomasz Huzarski^{1,2}, Tomasz Byrski^{1,2}, Jacek Gronwald^{1,2}, Bohdan Gorski^{1,2}, Cezary Cybulski^{1,2}, Oleg Oszurek^{1,2}, Jan Lubinski^{1,2}, Pawel Domagala³, Marek Szwiec⁴, Karol Gugala⁵, Malgorzata Stawicka⁶, Zbigniew Morawiec⁷, Tomasz Mierzwa⁸, Hanna Janiszewska⁹, Ewa Kilar¹⁰, Elzbieta Marczyk¹¹, Beata Kozak-Klonowska¹², Monika Siolek¹², Dariusz Surdyka¹³, Rafal Wisniowski¹⁴, Michal Posmyk¹⁵, Ping Sun¹⁶, Steven Narod¹⁶

¹Department of Genetics and Pathology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

²International Hereditary Cancer Center, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

³Chair and Department of Pathomorphology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

⁴Regional Oncology Center, Opole, Poland

⁵Department of Pathomorphology District Specialist Hospital, Olsztyn, Poland

⁶Center of Cancer Prevention and Epidemiology, Poznan, Poland

⁷Regional Oncology Center, Lodz, Poland

⁸Regional Oncology Center, Bydgoszcz, Poland

⁹Department of Clinical Genetics, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

¹⁰Department of Clinical Oncology, District Specialist Hospital, Świdnica, Poland

¹¹Regional Oncology Center, Kraków, Poland

¹²Regional Oncology Center, Kielce, Poland

¹³Medical University of Lublin, Poland

¹⁴Regional Oncology Center, Bielsko-Biała, Poland

¹⁵Regional Oncology Center, Białystok, Poland

¹⁶Women's College Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

¹Zakład Genetyki i Patomorfologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska

²Międzynarodowe Centrum Nowotworów Dziedzicznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska

³Katedra i Zakład Patomorfologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska

⁴Opolskie Centrum Onkologii, Opole, Polska

⁵Zakład Patomorfologii, Szpital Wojewódzki w Olsztynie, Polska

⁶Ośrodek Profilaktyki i Epidemiologii Nowotworów, Poznań, Polska

⁷Regionalny Ośrodek Onkologiczny, Łódź, Polska

⁸Regionalny Ośrodek Onkologii, Bydgoszcz, Polska

⁹Zakład Genetyki Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, Polska

¹⁰Oddział Onkologii Klinicznej, Regionalny Szpital Specjalistyczny, Świdnica, Polska

¹¹Centrum Onkologii, Kraków, Polska

¹²Świętokrzyskie Centrum Onkologii, Kielce, Polska

¹³Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

¹⁴Beskidzkie Centrum Onkologii, Bielsko-Biała, Polska

¹⁵Centrum Onkologii, Białystok, Polska

¹⁶Women's College Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

Abstract

Aim of the study: To estimate ten-year overall survival rates for patients with early-onset breast cancer, with and without a BRCA1 mutation. To identify prognostic factors among BRCA1-positive breast cancer patients.

Material and methods: 3345 women with stage I to stage III breast cancer, at or below age 50 were tested for three founder mutations in BRCA1. Information on tumor characteristics and on treatments received was retrieved from medical records. Dates of death were obtained from the vital statistics registry. Survival curves for the mutation-positive and negative sub-cohorts were compared. Predictors of overall survival were determined using the Cox proportional hazards model.

Results: 3345 patients were enrolled in the study, of whom 233 (7.0%) carried a BRCA1 mutation. The ten-year survival for mutation carriers was 80.9% (95% CI: 75.4% to 86.4%) and for

non-carriers was 82.2% (95% CI: 80.5% to 83.7%). The adjusted hazard ratio associated with carrying a BRCA1 mutation was 1.81 (95% CI: 1.26 to 2.61). Among BRCA1 carriers with a small (< 2 cm) node-negative breast cancer, the ten-year survival rate was 89.9%. Among BRCA1 mutation carriers, positive lymph node status was a strong predictor of mortality (adjusted HR = 4.1; 95% CI: 1.8 to 8.9). Oophorectomy was associated with improved survival in BRCA1 carriers (adjusted HR = 0.30; 95% CI: 0.12–0.75).

Conclusions: The ten-year survival rate of women with breast cancer and a BRCA1 mutation is similar to that of patients without a BRCA1 mutation. Among women with a BRCA1 mutation, survival was much improved after oophorectomy.

Key words: breast cancer, BRCA1.

Session 8. Biomarkers

Sesja 8. Biomarkery

[32]

Stężenia mikroelementów i warianty DNA w genach je metabolizujących jako markery wysokiego ryzyka raków

Anna Jakubowska

Session 8. Biomarkers

Sesja 8. Biomarkery

[33]

Markery wysokiego ryzyka raka prostaty

Cezary Cybulski, Dominika Wokotoczyk, Wojciech Kluźniak, Aniruddh Kashyap, Jan Lubiński

International Hereditary Cancer Center, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland
Międzynarodowe Centrum Nowotworów Dziedzicznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska

Abstract

We have identified a number of DNA changes associated with a genetic predisposition to prostate cancer such as: 1) 657del5 mutation in *NBS1*, 2) IVS2+1G>A mutation of *CHEK2*, 3) del5395 mutation in *CHEK2*, 4) 1100delC mutation in *CHEK2*, 5) I157T mutation of *CHEK2*, 6) G84E mutation in *HOXB13*, 7) Allele A of rs188140481 marker in 8q24. These mutations contribute to 20% of familial aggregations of prostate cancer in Poland. Carriers of these mutations who report family history of prostate cancer (at least one first or second degree relative affected) have a 3 to 8-fold increased risk of prostate cancer in our population. Therefore, the life time risk of prostate cancer in mutation carriers is high (25% to 70%). Development the panel of genetic markers for prostate cancer allows the introduction of individualized – addressed to men at high risk – screening program for prostate cancer in the Polish population.

Key words: prostate cancer, mutations, hereditary susceptibility.

Streszczenie

Zidentyfikowaliśmy szereg zmian DNA związanych z predyspozycją genetyczną do raka prostaty, takich jak: 1) mutacja 657del5 genu *NBS1*, 2) mutacja IVS2 + 1G>A genu *CHEK2*, 3) mutacja del5395 genu *CHEK2*, 4) mutacja 1100delC genu *CHEK2*, 5) mutacja I157T genu *CHEK2*, 6) mutacja G84E genu *HOXB13*, 7) allel A zmiany rs188140481 w regionie 8q24. Mutacje te stanowią przyczynę ponad 20% przypadków rodzinnych agregacji raka stercza w Polsce. Nosicielstwo tych mutacji u mężczyzn z dodatnim wywiadem raka stercza w rodzinie (co najmniej jedno zachorowanie u krewnych I lub II stopnia) wiąże się z 3–8-krotnie zwiększonym ryzykiem raka prostaty w naszej populacji. Tak więc mężczyzna, u którego identyfikuje się jedną z powyższych predysponujących zmian DNA, obarczony jest wysokim, 25–70-procentowym ryzykiem zachorowania na raka prostaty. Opracowanie panelu markerów ryzyka raka prostaty umożliwia wprowadzenie zindywidualizowanego, skierowanego do osób z grupy wysokiego ryzyka, programu badań przesiewowych raka prostaty w polskiej populacji.

Słowa kluczowe: rak prostaty, mutacje, dziedziczna predyspozycja.

Session 8. Biomarkers

Sesja 8. Biomarkery

[34]

miR-205 w diagnostyce i monitorowaniu niedrobnokomórkowego raka płuca

Maria Sromek¹, Maciej Głogowski², Magdalena Chechlińska¹, Michalina Zajdel¹, Mariusz Kulińczak¹, Paweł Swoboda¹, Dariusz Wąsowski², Robert Włodarczyk², Łukasz Talarek², Mariusz Żmijewski²

¹Department of Immunology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Warsaw, Poland

²Department of Lung and Thoracic Tumors, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Warsaw, Poland

¹Zakład Immunologii, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa, Polska

²Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa, Polska

Abstract

Background: Non-small cell lung cancer accounts for 80% of lung cancers, the leading cause of cancer mortality. Over the last decade, microRNAs (miR) have emerged as important components of carcinogenesis and promising biomarkers. miR-205 has been found to be overexpressed in lung cancer tissue.

Aim of the study: We aimed to study the diagnostic utility of circulating miR-205 assessment in patients with NSCLC.

Material and methods: Plasma was collected from 20 healthy donors and from NSCLC patients before and 1 month after surgery ($n = 40$). In 9 cases, blood was also drawn one year after surgery. Patients were diagnosed with adenocarcinoma ($n = 16$), squamous cell carcinoma ($n = 14$), large cell carcinoma ($n = 5$), and with mixed adenocarcinoma/squamous cell carcinoma ($n = 5$).

We optimised a method of RNA isolation from human plasma and selected an appropriate reference miR for RT-qPCR measurements.

Results and conclusions: 1) Plasma miR-205 levels in NSCLC patients were significantly elevated before treatment, as compared to normal levels ($p = 0.019$). 2) Plasma miR-205 levels significantly decreased in NSCLC patients 1 month after surgery ($p = 0.043$) and no more differed from that in normal. 3) One year after surgery, average miR-205 expression did not change although decreased in 4 and increased in 5 patients. Patients are followed-up to interpret these changes. 4) miR-205 expression in tumour tissue has been known to differ between non-small lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. We showed this difference in plasma, with lower miR-205 levels in adenocarcinoma than in squamous cell carcinoma, and we revealed the lowest levels of circulating miR-205 in large cell carcinoma. 5) The results point to the potential of circulating miR-205 assessment for diagnostic purposes, including monitoring of NSCLC patients after treatment.

Key words: lung cancer, circulating miRNA, plasma, biomarkers, miRNA-205, non small cell lung cancer.

Streszczenie

Wstęp: Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) stanowi ok. 80% wszystkich diagnozowanych przypadków raka płuca. W ostatnich latach intensywnie poszukuje się możliwości wczesnej nieinwazyjnej diagnostyki tego nowotworu.

Cel pracy: Celem badań było sprawdzenie przydatności mikro(miR)-205 jako krążącego biomarkera w diagnostyce i monitorowaniu leczenia NDRP.

Materiał i metody: Materiał kliniczny stanowiły próbki krwi obwodowej 40 chorych na NDRP, w tym: na wielkokomórkowego ($n = 5$), gruczołowego ($n = 16$), płaskonabłonkowego ($n = 14$) oraz na raka mieszanego raka płuca ($n = 5$). Próbkę pobierano dzień przed oraz miesiąc po zabiegu usunięcia guza. U 9 chorych materiał do badań pobrano także rok po zabiegu usunięcia guza. Materiał kontrolny stanowiło 20 próbek krwi pobranej od zdrowych, dorosłych dawców. Poziom ekspresji miR-205 oznaczano techniką RT-qPCR z użyciem miR-24, jako genu referencyjnego.

Wyniki i wnioski: 1) Stwierdzono znacznie podwyższony poziom ekspresji miR-205 u chorych na NDRP w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,019$). 2) Zaobserwowano znaczny spadek poziomu ekspresji miR-205 w osoczu krwi chorych po zabiegu usunięcia guza płuca, w porównaniu z poziomem ekspresji tego miR przed zabiegiem ($p = 0,043$). Poziom ekspresji miR-205 w grupie chorych po zabiegu usunięcia guza był porównywalny z poziomem u osób zdrowych. 3) Średni poziom ekspresji miR-205 we krwi chorych na NDRP miesiąc po zabiegu usunięcia guza utrzymuje się na podobnym poziomie po roku od operacji, niemniej u 4 chorych obniżył się, a u 5 chorych doszło do jego wzrostu. Dalsza obserwacja pozwoli na poznanie klinicznego znaczenia tych zmian. 4) Poziom ekspresji miR-205 w osoczu krwi obwodowej wydaje się różnicować podtypy NDRP, najniższy poziom ekspresji stwierdzono w wielkokomórkowym, wyraźnie wyższy niż w gruczołowym, najwyższy w przypadku płaskonabłonkowego raka płuca. 5) Dane te sugerują przydatność krążącego miR-205 jako biomarkera w diagnostyce i monitorowaniu leczenia NDRP.

Słowa kluczowe: rak płuc, krążące miRNA, osocze, biomarkery, miRNA-205, niedrobnokomórkowy rak płuca.

Session 8. Biomarkers

Sesja 8. Biomarkery

[35]

mikroRNA w płynie mózgowo-rdzeniowym w diagnostyce chłoniaków w ośrodkowym układzie nerwowym**Michalina Zajdel, Grzegorz Rymkiewicz, Magdalena Chechlińska, Katarzyna Błachnio, Zbigniew Bystydzieński, Maria Cieślakowska, Maria Sromek, Krzysztof Goryca, Jan Walewski, Jan Konrad Siwicki**Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Warsaw, Poland
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa, Polska**Abstract**

Introduction: Early, fast and precise differential diagnosis of primary and secondary lymphomas and non-cancerous lesions in the central nervous system (CNS) is a prerequisite for effective and safe treatment. Differentiation of CNS lesions is a challenge, in spite of numerous diagnostic possibilities, comprising imaging techniques, cytological and flow cytometry examination of cerebrospinal fluid (CSF), and histological examination of stereotactic biopsy material. In addition, brain biopsy carries risks of neurological complications, and sometimes cannot be performed, eg. due to lesion location.

Aim of the study: To assess the value of miR-21, miR-19b-1 and miR-92a-2 detection in CSF for the differential diagnosis of primary lymphomas vs. neurological lesions in the CNS, and for the early diagnosis of secondary CNS changes in the progression of peripheral lymphomas.

Material and methods: Cerebrospinal fluid leftover samples collected for the routine diagnostic purposes from patients consulted at the Cancer Centre and Institute of Oncology in Warsaw, suspected of the primary or secondary brain lymphomas or neurological lesions in the CNS. Expression levels of miR-21, miR-19b-1, and miR-92a were assessed by RT-qPCR, with miR-24, as a reference level.

Results and conclusions: 1) Higher levels of miR-21, miR-19b-1 and miR-92a-2 characterised CSF from patients with primary CNS lymphomas, than from noncancerous neurological lesions. 2) In patients with secondary lymphomas in the CNS the assessed miR levels in CSF varied and need further studies. 3) Assessment of miR-21, miR-19b-1 and miR-92a-2 levels in the CSF provides a promising, sensitive and less stressful method for differentiation of CNS lymphomas from neurological disorders. 4) Examination of miRs in the CSF emerges as a chance for earlier treatment decisions and improvement of long-term results of treatment.

Key words: microRNA, cerebrospinal fluid, CNS lymphoma, diagnosis.

Streszczenie

Wstęp: Wczesna, szybka i precyzyjna diagnostyka różnicowa pierwotnych oraz wtórnych chłoniaków w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i nienowotworowych chorób neurologicznych jest konieczna do podjęcia skutecznej i bezpiecznej terapii. Różnicowanie chłoniaków w OUN wciąż stanowi wyzwanie, nawet z zastosowaniem technik obrazowania, oceną cytologiczną (CYT), cytometryczną (FCM) płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) i pobieraniem materiału histopatologicznego drogą biopsji stereotaktycznej, która naraża pacjenta na powikłania neurologiczne i czasami nie jest możliwa w wypadku trudno dostępnych lokalizacji.

Cel badań: Ocena przydatności oznaczania miR-21, miR-19b-1 oraz miR-92a-2 w PMR w różnicowej diagnostyce chłoniaków OUN z chorobami neurologicznymi oraz wczesnej diagnostyce wtórnego zajęcia OUN w przebiegu chłoniaków obwodowych.

Materiał i metody: Próbkę PMR, pobrane od pacjentów diagnozowanych w Centrum Onkologii-Instytucie w Warszawie, pozostałe po rutynowej diagnostyce CYT/FCM: 1) pierwotnego lub wtórnego zajęcia OUN, 2) nienowotworowych chorób neurologicznych. Poziom ekspresji miR-21, miR-19b-1, miR-92a oznaczano techniką RT-qPCR z użyciem miR-24, jako genu referencyjnego.

Wyniki i wnioski: 1) Poziom ekspresji miR-21, miR-19b-1 oraz miR-92a-2 w PMR chorych na pierwotnego chłoniaka OUN jest wyższy niż w grupie pacjentów z nienowotworowymi chorobami neurologicznymi. 2) W grupie chorych z podejrzeniem wtórnego zajęcia OUN poziom ekspresji tych trzech badanych mikroRNA jest zróżnicowany i wymaga dalszej obserwacji. 3) Dane te wskazują, że oznaczanie ekspresji miR-21, miR-19b-1 oraz miR-92a-2 w PMR może być bardzo czułą i nieobciążającą pacjenta metodą użyteczną w diagnostyce różnicowej pierwotnego chłoniaka OUN i chorób neurologicznych. 4) Uzupełnienie algorytmu diagnostyki guzów OUN o ocenę ekspresji mikroRNA w PMR stwarza szansę na znacznie szybsze wdrożenie terapii i poprawę odległych wyników leczenia chłoniaków OUN.

Słowa kluczowe: mikroRNA, płyn mózgowo-rdzeniowy, chłoniak, diagnoza.

Session 8. Biomarkers

Sesja 8. Biomarkery

[36]

Wybrane markery angiogenezy w powstawaniu choroby nowotworowej

Anna Thielemann, Zygmunt Kopczyński

Chair and Department of Laboratory Diagnostics, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland
Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and presented on the endothelial surface receptor proteins: VEGFR-1, VEGFR-2 as well as and sVEGFR-1 receptors, and sVEGFR-2 plays an important role in pathological biochemical changes of metastasis. VEGF binding to its receptors leads to the ATP-dependent phosphorylation, and consequently to proliferation and migration of endothelial cells. These processes determine the growth of solid tumors and metastases.

Aim of the study was to assess the concentration of the VEGF and soluble sVEGFR-1 and sVEGFR-2 receptors in women with breast cancer. Commonly recognized prognostic factors were taken into account.

Material and methods: Serum levels of VEGF and receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 were performed in the serum of 103 women with primary breast cancer before surgery, at the age of 29–89 years (mean age 56 years) treated at the Department of Oncology, Poznan University of Medical Sciences. The concentrations of factors examined was assessed using an enzyme-linked immunosorbent assay (R&D System).

Results: The studies demonstrated significantly higher levels of soluble forms of VEGF receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in the serum of women with breast cancer as compared to the value of these substances in the control group. The higher the clinical stage of the disease the higher the achieved level of cytokine receptors of VEGF and sVEGFR-1 and sVEGFR-2. A similar relationship was observed in the group of women with metastatic breast cancer to the lymph nodes and no metastasis. There was also a positive correlation between the average concentration of VEGF, sVEGFR-1 and sVEGFR-2 and the size of the primary tumor.

Conclusions: High levels of VEGF, sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer at an advanced stage of the disease can confirm the participation of these factors in tumour progression and metastasis. Determination of the concentrations of VEGF and its receptors in women with breast cancer may be of value in the assessment of their clinical status.

Key words: angiogenesis, VEGF, receptors, breast cancer.

Streszczenie

W patobiochemii powstawania przerzutów istotną rolę odgrywa naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), obecne na powierzchni śródbłonka białka receptorowe: VEGFR-1 (*vascular endothelial growth factor receptor 1*), VEGFR-2 oraz receptory sVEGFR-1 i sVEGFR-2. Związanie tych receptorów z VEGF prowadzi do jego zależnej od ATP fosforylacji, której następstwem jest proliferacja i migracja komórek śródbłonka. Warunkuje to wzrost guzów nowotworowych litych oraz powstawanie przerzutów.

Cel pracy: Ocena przydatności oznaczania VEGF i rozpuszczalnych postaci receptorów sVEGFR-1 i sVEGFR-2 u kobiet chorych na raka piersi w zależności od wybranych czynników rokowniczych, takich jak: stopień zaawansowania klinicznego choroby, stopień złośliwości histologicznej nowotworu, stan okolicznych węzłów chłonnych pachowych i wielkość guza pierwotnego.

Materiał i metody: Oznaczenia stężenia VEGF i receptorów sVEGFR-1 i sVEGFR-2 wykonano w surowicy 103 kobiet chorych na pierwotnego raka piersi przed zabiegiem chirurgicznym, w wieku 29–89 lat (średnia wieku 56 lat), leczonych na Oddziale Chirurgii Onkologicznej Kliniki i Katedry Onkologii UM w Poznaniu. Stężenie badanych substancji oznaczano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawu firmy R&D System.

Wyniki: Wykazano istotnie większe stężenia VEGF oraz rozpuszczalnych form receptorów sVEGFR-1 i sVEGFR-2 w surowicy kobiet chorych na raka piersi w porównaniu z wartościami tych substancji w grupie kontrolnej. Im wyższy był stopień zaawansowania klinicznego choroby, tym wyższy uzyskano poziom VEGF oraz receptorów sVEGFR-1 i sVEGFR-2. Podobną zależność obserwowano w grupie kobiet chorych na raka piersi z przerzutami do węzłów chłonnych i bez przerzutów. Dodatnia korelacja występowała także między średnim stężeniem VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2 a wielkością guza pierwotnego.

Wnioski: Duże stężenia VEGF oraz sVEGFR-1 i sVEGFR-2 u kobiet chorych na raka piersi w zaawansowanym stadium choroby sugerują udział tych czynników w rozwoju nowotworu i przerzutowaniu. Oznaczanie stężenia VEGF i jego receptorów ma cechy badania uzupełniającego w ocenie stanu klinicznego kobiet chorych na raka.

Słowa kluczowe: angiogeneza, VEGF, receptory, rak piersi.

Session 9. Malignant melanoma

Sesja 9. Czerniak

[37]

Wykorzystanie immunologicznych mechanizmów regulatorowych w terapii czerniaka: od CTLA-4 do PD-1

Jacek Mackiewicz

Session 9. Malignant melanoma

Sesja 9. Czerniak

[38]

Optymalizacja leczenia zaawansowanego czerniaka

Marek Ziobro

Session 10. Breast cancer

Sesja 10. Rak piersi

[39]

Prawidłowe oznaczenie stanu menopauzalnego przed rozpoczęciem leczenia hormonalnego raka piersi

Małgorzata Kuc-Rajca

Session 10. Breast cancer

Sesja 10. Rak piersi

[40]

Czy napromienianie części piersi po operacji oszczędzającej można uznać za standard?

Marta Olszyna-Serementa

Session 10. Breast cancer

Sesja 10. Rak piersi

[41]

Podwójna blokada receptora HER2

Tadeusz Pieńkowski

Session 11. Prostate cancer

Sesja 11. Rak gruczołu krokowego

[42]

Stężenie w surowicy swoistego antygenu sterczowego (PSA) przed radioterapią po wstępnej hormonoterapii jako potencjalny czynnik prognostyczny w radioterapii raka stercza skojarzonej z leczeniem hormonalnym

Anna Rucińska

Streszczenie

Cel pracy: Wyniki szeregu prac retrospektywnych wskazują, że stężenie swoistego antygenu sterczowego przed radioterapią (sPSA) po wstępnej hormonoterapii (HT) jest czynnikiem prognostycznym u chorych na raka stercza (RS). Jednak w przeprowadzonych dotychczas analizach schematy hormonoterapii i dawki radioterapii odbiegały od stosowanych obecnie standardów. Dlatego postanowiliśmy ponownie zweryfikować powyższą hipotezę.

Materiał i metody: Dokonaliśmy analizy retrospektywnej 282 pacjentów z miejscowo zaawansowanym rakiem stercza (RS), ze średnim (37%) i wysokim (63%) ryzykiem wznowy choroby, leczonych w Wielkopolskim Centrum Onkologii w latach 2006–2008. Leczenie wszystkich chorych rozpoczęto od wstępnej HT (analog LHRH ± antyandrogen), stosowanej min. miesiąc (średnio 8 miesięcy). U pacjentów z grupy wysokiego ryzyka HT prowadzono w trakcie RT i po jej zakończeniu. Wszyscy pacjenci otrzymali na okolicę stercza i pęcherzyków nasiennych dawkę biologiczną przekraczającą 80 Gy (telera-dioterapia i boost z brachyterapii). W badaniu przyjęto następujące punkty końcowe: przeżycie do wznowy biochemicznej (bPFS), przeżycie wolne od choroby (DFS), przeżycie zależne od choroby nowotworowej – raka prostaty (CSS) i przeżycie całkowite (OS).

Wyniki: Średni czas obserwacji chorych to 53,5 miesiąca (maks. 79 miesięcy). Dla tego okresu obserwacji uzyskano w grupach średniego i wysokiego ryzyka odpowiednio: bPFS 91% i 68%; DFS 94% i 79%; CSS 95% i 88%; oraz OS 84% w obu grupach. Uzyskano istotnie statystyczną korelację między sPSA a bPFS (p 0,0003) i DFS (p 0,01) w analizie wieloczynnikowej, bez względu na czas trwania neoadiuwantowej HT.

Wnioski: Przeprowadzona analiza materiału własnego wskazuje, że sPSA jest czynnikiem prognostycznym w RS w odniesieniu do bPFS i DFS. Udowodnienie związku z CSS i OS wymagałoby zapewne dłuższego okresu obserwacji. Wskazane jest przeprowadzenie badania prospektywnego.

Session 11. Prostate cancer

Sesja 11. Rak gruczołu krokowego

[43]

Znaczenie czynnika czasu w radioterapii raka stercza

Anna Adamska

Streszczenie

Jednym z najistotniejszych parametrów związanych z radioterapią wpływających na wyniki onkologiczne nowotworów złośliwych jest intensywność dawki radioterapii w trakcie kursu napromieniania. Dla raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, raka szyjki macicy czy raka niedrobnokomórkowego płuca każdy dzień przedłużenia leczenia napromienianiem ma bardzo negatywny wpływ na wyniki leczenia. Jednak w odniesieniu do nowotworów o innym tempie proliferacyjnym powstaje pytanie, w jakim stopniu wydłużenie czasu prowadzenia kursu napromieniania może negatywnie wpłynąć na wyniki leczenia onkologicznego. Przykładem takiego nowotworu jest rak gruczołowy stercza. W przypadku raka stercza przegląd dostępnego piśmiennictwa nie pozwala na jednoznaczne wysunięcie wniosku co do znaczenia wpływu czynnika czasu. Z tego względu postawiono roboczą hipotezę, że wydłużenie czasu napromieniania nie ma wpływu na wyniki leczenia napromienianiem w raku stercza. Do analizy zakwalifikowano 540 chorych z rakiem stercza leczonych w Wielkopolskim Centrum Onkologii w okresie od 2006 do 2009 r.

Słowa kluczowe: rak stercza, radioterapia, czynnik czasu.

Session 11. Prostate cancer Sesja 11. Rak gruczołu krokowego

[44]

Aktywność fizyczna u chorych z rakiem stercza, u których wdrożono leczenie hormonalne

Katarzyna Hojan¹, Piotr Milecki^{2,3}

¹Department of Rehabilitation, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

^{2,1st} Department of Radiotherapy, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

³Chair and Department of Electrocardiology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

¹Oddział Rehabilitacji Diennej, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

²Zakład Radioterapii I, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

³Katedra i Zakład Elektroradiologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

Abstract

Introduction: Androgen deprivation therapy leads to a number of adverse effects including deterioration of the musculoskeletal system and increased risk factors for cardiovascular and metabolic complications. Regular exercise is established for primary and secondary prevention of several chronic diseases including cardiovascular disease, diabetes, and even premature death. Physical activity is an easily accessible lifestyle intervention that may have significant positive impact on the quality of life in men with prostate cancer.

Aim of the study: We conducted a systematic review of the literature regarding the effects of exercise on treatment-related adverse effects in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer.

Material and methods: Eligible study designs included randomized controlled trials as well as uncontrolled trials investigating the effects of exercise on bone health and physical function in men with prostate cancer. Information was extracted regarding participant and exercise intervention characteristics as well as the effects of exercise on bone health, body composition, physical performance, cardiometabolic risk, fatigue, and quality of life and psychological distress.

Results and conclusions: Among patients with prostate cancer treated with androgen-deprivation therapy, appropriately prescribed exercise is safe and may ameliorate a range of treatment-induced adverse effects. This multidisciplinary studies laid the foundation for the development of a prevention and wellness program within a multidisciplinary, comprehensive cancer care program for men with prostate cancer.

Key words: rehabilitation, oncology, androgen deprivation therapy.

Streszczenie

Wstęp: Leczenie hormonalne u chorych z rakiem prostaty pomimo niepodważalnych korzyści może wywoływać wiele działań niepożądanych, w tym pogorszenie w obrębie układu mięśniowo-szkieletowego czy zwiększenie ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych lub metabolicznych. Regularne ćwiczenia są szczególnie istotne dla pierwotnej i wtórnej profilaktyki wielu chorób przewlekłych, w tym chorób układu krążenia, cukrzycy, a nawet przedwczesnej śmierci. Aktywność fizyczna jest łatwo dostępną zmianą stylu życia, która może mieć znaczący, pozytywny wpływ na jakość życia u mężczyzn z rakiem prostaty.

Cel pracy: Systematyczny przegląd literatury dotyczącej wpływu ćwiczeń na działania niepożądane wynikające z hormonoterapii u mężczyzn z rakiem prostaty.

Materiał i metody: Prezentacja obejmuje projekty badań klinicznych z randomizacją oraz niekontrolowanych, oceniających wpływ ćwiczeń na układ kostny i sprawność fizyczną mężczyzn z rakiem prostaty. Dokonano oceny wpływu ćwiczeń na układ kostno-szkieletowy, skład ciała, sprawność fizyczną i psychiczną, ryzyko kardiometaboliczne, zespół zmęczenia i jakość życia.

Wyniki i wnioski: U pacjentów z rakiem prostaty otrzymujących leczenie hormonalne odpowiednio przewidziana aktywność fizyczna jest bezpieczna i może wpłynąć pozytywnie na szereg niepożądanych skutków wynikających z tej formy terapii. Multidyscyplinarne badania kliniczne dają podstawę do rozwoju profilaktyki i programów odnowy biologicznej w ramach kompleksowej opieki nad chorymi z rakiem prostaty.

Słowa kluczowe: rehabilitacja, onkologia, terapia hormonalna.

Session 11. Prostate cancer

Sesja 11. Rak gruczołu krokowego

[45]

Radiochirurgia raka stercza: ocena potencjalnych czynników prognostycznych

Marek Konkol

Streszczenie

Rak stercza należy do najczęstszych nowotworów złośliwych diagnozowanych u mężczyzn w Stanach Zjednoczonych i Unii Europejskiej. Wzrost czułości onkologicznej spowodował powiększenia się puli chorych, u których rozpoznajemy raka stercza głównie we wczesnych stadiach zaawansowania klinicznego. W garniturze metod terapeutycznych mamy obecnie do zastosowania leczenie operacyjne (radykałna prostatektomia) oraz leczenie napromienianiem (radioterapia wiązką intensywnie modulowaną, brachyterapia, radiochirurgia). Wprowadzenie w ostatnich dekadach nowoczesnych technik radioterapii pozwoliło na zwiększenie podawanej dawki całkowitej w objętości guza nowotworowego, co przełożyło się na poprawę wyników leczenia, ale niestety za cenę wydłużenia czasu kursu napromieniania. W ostatnich latach pojawiły się wyniki badań wskazujących, że parametr α/β określający odpowiedź komórek raka stercza na wysokość dawki frakcyjnej jest niższy ($\alpha/\beta = 1,5$) aniżeli dla tkanek narządów zdrowych ($\alpha/\beta = 3,0$) będących w napromienianej objętości (odbytnica, pęcherz moczowy). Powyższe fakty sprawiły, że w wiodących ośrodkach onkologicznych USA i Europy rozpoczęto badania nad radiochirurgią (SBRT) w raku stercza i w związku z tym pojawiła się możliwość zastosowania radiochirurgii w naszym ośrodku. W prospektywnym badaniu CyberProst zainicjonowanym w 2013 roku w Wielkopolskim Centrum Onkologii podjęto się próby oceny przydatności szeregu potencjalnych czynników predykcyjnych dla powikłań jak okresu czasu przeżycia swoistego dla raka stercza. Przedmiotem analizy jest ocena parametrów napromieniania i ich potencjalnych korelacji z poziomem jakości życia (*quality of life*). Kolejnym wątkiem badawczym jest poznanie związku pomiędzy ekspresją badanych genów a skutecznością i toksycznością SBRT.

Słowa kluczowe: rak stercza, radiochirurgia, jakość życia, przeżycie swoiste dla raka stercza

Session 12. Kidney cancer

Sesja 12. Rak nerki

[46]

Problemy z ustaleniem właściwego stopnia histologicznej złośliwości guza u pacjentów z rozsiałym rakiem nerki**Wojciech Solarek, Cezary Szczylik**Military Institute of Medicine, Warsaw, Poland
Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa, Polska**Abstract**

Renal cell carcinoma is the 7th most common cancer in men and the 9th among women. Morbidity and mortality from kidney cancer increases steadily for many years and is currently estimated at about 65 thousand new cases and 13.5 thousand deaths in the United States during the year. Renal cell carcinoma histological differentiation splitting the kidney tumors into different types, including clear cell, papillary or chromophobe. Histological evaluation requires an assessment based on the microscopic morphology of a neoplasm in the Fuhrman system. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) tumors are considered to be less promising in relation to chromophobe renal cell carcinoma (chRCC) and papillary renal cell carcinoma (pRCC), however the worst prognosis is connected with sarcomatoid tumors, collecting ducts of Bellini tumors and unclassified tumors. The presence of mixed types tumors, their histological heterogeneity and the difficulties in microscopic assessment of total tumor volume, significantly affect the availability of modern therapies aimed at inhibiting angiogenesis. The inclusion criteria of the National Health Fund clearly define the percentage of clear cell component in the case of mixed tumor types, which is related to the criteria for inclusion of patients for prospective trials evaluating the effectiveness of the drug. Unfortunately, the comprehensive assessment of the dominant component may prevent the use of modern therapy for patients with borderline clear cell component.

Key words: renal cell carcinoma, Fuhrman grade.

Streszczenie

Rak nerki jest 7. najczęstszym nowotworem u mężczyzn i 9. wśród kobiet. Zachorowalność i śmiertelność z powodu raka nerki wzrastają stale od wielu lat i aktualnie szacowane są na ok. 65 tys. nowych przypadków i 13,5 tys. zgonów w Stanach Zjednoczonych w ciągu roku. Zróżnicowanie histologiczne nowotworów nerki doprowadziło do podziału guzów nerki na różne typy, m.in. jasnokomórkowego, brodawczakowatego czy chromofobowego. W ramach oceny histologicznej każdorazowo poza typem ustalany jest również stopień złośliwości komórkowej wg Fuhrman. Guzy nerki typu ccRCC (*clear cell renal cell carcinoma*) uważa się za gorzej rokujące niż chRCC (*chromophobe renal cell carcinoma*) i pRCC (*papillary renal cell carcinoma*), jednakże z najgorszym rokowaniem mamy do czynienia w przypadku guzów z przekształceniem „mięsakowatym”, guzów z kanalików zbiorczych Belliniego i guzów niesklasyfikowanych. Występowanie typów mieszanych nowotworów, ich heterogenność histologiczna, a także trudności w ocenie mikroskopowej całości guza wpływają znacząco na dostępność nowoczesnych terapii ukierunkowanych na hamowanie angiogenezy. Kryteria programu lekowego Narodowego Funduszu Zdrowia jednoznacznie definiują procent utkania komponentem jasnokomórkowym w przypadku typów guzów mieszanych, co jest związane z kryteriami włączenia pacjentów do prospektywnych badań klinicznych oceniających efektywność danego leku. Niestety rzeczywista ocena dominującego komponentu niekiedy uniemożliwia zastosowanie nowoczesnych terapii u pacjentów z granicznymi wartościami utkania jasnokomórkowego.

Słowa kluczowe: rak nerki, stopień złośliwości histologicznej, program lekowy NFZ, guz mieszany nerki.

Session 12. Kidney cancer

Sesja 12. Rak nerki

[47]

Powikłania ze strony układu oddechowego

Jolanta Korczak

Session 12. Kidney cancer

Sesja 12. Rak nerki

[48]

Optymalizacja leczenia raka nerki

Piotr Tomczak

Session 12. Kidney cancer

Sesja 12. Rak nerki

[49]

Rola prognostyczna i predykcyjna komponentów szlaków PI3K/AKT/mTOR oraz WNT/ β -katenina u chorych na raka nerki leczonych ewerolimusem – wyniki badania II fazy**Lubomir Bodnar¹, Rafał Stec¹, Szczepan Cierniak², Agnieszka Synowiec¹, Marzena Cichowicz², Robert Koktysz², Gabriel Wcisto¹, Wojciech Kozłowski², Cezary Szczylik¹**¹Department of Oncology, Military Institute of Medicine, Warsaw, Poland²Department of Pathomorphology, Military Institute of Medicine, Warsaw, Poland¹Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa, Polska²Zakład Patomorfologii, Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa, Polska**Abstract**

Background: The aim of this work was to search for prognostic and predictive factors in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) treated with everolimus among components PI3K/AKT/mTOR and WNT/ β -catenin pathways.

Material and methods: In a prospective, single arm trial II phase study patients with mRCC received everolimus 10 mg/day in 30-day cycles. We evaluated in a prospectively planned analysis of potential biomarkers in components of PI3K/AKT/mTOR and WNT/ β -catenin pathways, i.e. peripheral blood plasma (VEGF), serum (soluble E-cadherin), and in primary tumor tissues (phosphorylated AKT 473, p70S6, WNT 1, β -catenin, E-cadherin, cyclin D1, p53) and examined 13 single nucleotide polymorphisms (SNP) of four genes: *ACT1*, *ACT2*, *PI3KCA*, *FRAP1*.

Results: The median age of the 58 enrolled patients in the study was 60 years (range 41–78). In multivariate analysis, we found that the adverse independent predictor factors for everolimus therapy were histologic grade G1/2 [HR: 2.68 (95% CI: 1.29–5.58, $p = 0.0082$)], increased level of lactate dehydrogenase (LDH) [HR: 2.55 (95% CI: 1.30–4.99, $p = 0.0064$)] and rs6443624 variant of the *PIK3CA* gene [HR: AC + AA vs. CC = 2.08, 95% CI: 1.11–3.89, $p = 0.0254$]. In multivariate analysis, it was observed that the adverse independent prognostic factors were: elevated corrected calcium levels [HR: 4.17 (95% CI: 1.66–10.51), $p = 0.0024$] and rs6443624 variant of the *PIK3CA* gene [HR: AC + AA vs. CC = 1.97 (95% CI: 1.02–3.79), 95% CI: 1.11–3.89, $p = 0.0254$].

Conclusions: *PI3KCA* gene polymorphism: rs6443624, LDH, and histologic grade could predict effects of everolimus treatment. The concentration of calcium and SNP of *PI3KCA*: rs6443624 may be independent prognostic factors. There is a need for further prospective studies to verify and validate the importance assessed the predictive and prognostic parameters.

Key words: pathway PI3K/AKT/mTOR, pathway WNT/ β -catenin, everolimus, renal cell carcinoma.

Streszczenie

Cel pracy: Poszukiwanie czynników prognostycznych i predykcyjnych u chorych na przerzutowego raka nerki (*metastatic renal cell carcinoma* – mRCC) leczonych ewerolimusem wśród komponentów szlaków PI3K/AKT/mTOR oraz WNT/ β -katenina.

Materiał i metody: W prospektywnym, jednoramiennym badaniu fazy II chorzy na mRCC otrzymywali ewerolimus w dawce 10 mg/dobę w cyklach 30-dniowych. W prospektywnie zaplanowanej analizie oceniano potencjalne biomarkery spośród komponentów szlaków PI3K/AKT/mTOR oraz WNT/ β -katenina, tj. w osoczu krwi obwodowej (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), surowicy (rozpuszczalna E-kadheryna), w tkankach guza pierwotnego (ufosforylowane AKT 473, p70S6, WNT-1, β -katenina, E-kadheryna, cyklina D1, p53) oraz zbadano 13 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów 4 genów: *AKT1*, *AKT2*, *PI3KCA*, *FRAP1*.

Wyniki: Mediana wieku 58 chorych włączonych do badania wyniosła 60 lat (przedział 41–78). W analizie wieloczynnikowej stwierdzono, że niekorzystnymi niezależnymi czynnikami predykcyjnymi dla terapii ewerolimusem były: stopień złośliwości histologicznej G1/2 [HR: 2,68 (95% CI: 1,29–5,58; $p = 0,0082$)], podwyższony wyjściowy poziom dyhydrogenazy mleczanowej (*lactate dehydrogenase* – LDH) [HR: 2,55 (95% CI: 1,30–4,99; $p = 0,0064$)] oraz wariant rs6443624 genu *PIK3CA* [HR: AC + AA vs CC = 2,08, 95% CI: 1,11–3,89; $p = 0,0254$]. W analizie wieloczynnikowej zaobserwowano, że niekorzystnymi niezależnymi czynnikami prognostycznymi były: podwyższony skorygowany poziom wapnia [HR: 4,17 (95% CI: 1,66–10,51); $p = 0,0024$] oraz wariant rs6443624 genu *PIK3CA* [HR: AC + AA vs CC = 1,97 (95% CI: 1,02–3,79), 95% CI: 1,11–3,89; $p = 0,0254$].

Wnioski: Polimorfizm genu *PI3KCA*: rs6443624, stężenie LDH oraz określenie stopnia złośliwości histologicznej mogą pomóc przewidzieć efekty leczenia ewerolimusem. Stężenie skorygowane wapnia oraz polimorfizm genu *PI3KCA*: rs6443624 mogą stanowić niezależne czynniki prognostyczne. Istnieje konieczność przeprowadzenia dalszych prospektywnych badań w celu weryfikacji i walidacji znaczenia ocenionych parametrów predykcyjnych i prognostycznych.

Słowa kluczowe: szlak PI3K/AKT/mTOR, szlak WNT/ β -katenina, ewerolimus, rak nerki.

Session 13. Positron emission tomography (PET) in oncology Sesja 13. Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) w onkologii

[50]

Przydatność badania pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) w diagnostyce guzów mózgu

Paulina Cegła, Witold Cholewiński, Michał Smoleń

Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland
Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

Abstract

A large part of the pathological changes occurring in the central nervous system are malignant lesions. Central nervous system tumors account for about 2% of all cancers in humans. Diagnostic imaging of brain tumors can be divided into two groups: morphological, which allow the accurate determination of the localization, size and the characteristics of a specific tumor, e.g., CT, MRI using the basic sequence T1-and T2-and PD-dependent and functional imaging, which determine the selected parameters / functional aspects of the tumor/ such as radioisotope studies, study, diffusion, MR spectroscopy.

Positron emission tomography scanner was first used by Edward J. Hoffman and Michael Phelps in 1973 at the University of Washington in St. Louis. Since then the method has been officially introduced for use in the medical environment.

Positron emission tomography is a diagnostic technique which uses imaging radioactive isotopes that emit positrons. The big advantage of these radioactive tracers is that they are isotopes of elements which naturally form organic compounds, such as oxygen, carbon, nitrogen, fluorine. This allows the use of PET in a large range of organic compounds such as amino acids, hormones, analogs of the substrates. One of the significant disadvantages of isotopes used in PET technique is their short or very short half-life, which for fluorine (¹⁸F) are 106 min, and for carbon (¹¹C) 20 min.

The gold standard in the evaluation of brain tumors is the magnetic resonance imaging. Although magnetic resonance imaging gives more accurate picture than the CT scan, it has some limitations that make it is not always the best diagnostic tool, particularly following surgery or radiation therapy. The method, which allows a functional assessment of the parameters of the tumor both before and after treatment the patient is PET.

It has been proved that PET can provide a lot of information about various disorders of the central nervous system. In brain tumors, among others, used several markers to assess blood flow, metabolism, or determine the extent of the tumor. Among the various markers ¹⁸F-FDG is the most commonly used marker for assessing the metabolism of brain tumors. Despite the relatively high availability of this method, the clinical experience shows limitations in wide use due to the large tag physiological glucose uptake by the normal brain tissue, which causes problems in the evaluation of tumors of the brain, and low-grade tumor in the case of recurrence. Therefore, for the evaluation of brain tumors, different vectors based on different metabolic functional aspects of a tumor cell such as amino acids are used. Labeled amino acids

Streszczenie

Dużą część zmian patologicznych występujących w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) stanowią nowotwory. Guzy OUN stanowią ok. 2% wszystkich nowotworów występujących u ludzi. Badania obrazowe wykorzystywane do diagnostyki guzów mózgu można podzielić na dwie grupy: morfologiczne, które pozwalają na dokładne określenie położenia i wielkości zmiany oraz cechy typowe dla określonego nowotworu, np. tomografia komputerowa (TK), rezonans magnetyczny (*magnetic resonance* – MR) z zastosowaniem sekwencji podstawowych T1-, T2- i PD-zależnych, oraz badania czynnościowe, które określają wybrane parametry/ aspekty funkcjonalne guza, np. badania radioizotopowe, badania dyfuzyjne, spektroskopia MR.

Skaner pozytonowej tomografii emisyjnej (*positron emission tomography* – PET) po raz pierwszy został użyty przez Edwarda J. Hoffmana i Michaela Phelbsa w 1973 r. na Uniwersytecie w Waszyngtonie w St. Louis. Od tego czasu metoda ta została oficjalnie wprowadzona do użycia w środowisku medycznym.

Pozytonowa tomografia emisyjna jest metodą diagnostyczną, która wykorzystuje do obrazowania izotopy promieniotwórcze emitujące pozytony. Dużą zaletą stosowania tych znaczników promieniotwórczych jest fakt, iż są one izotopami pierwiastków, które w naturze tworzą związki organiczne, np. tlen, węgiel, azot, fluor. Umożliwia to wykorzystanie w badaniu PET dużej gamy związków organicznych, np. aminokwasów, hormonów, analogów substratów. Jedną z istotnych wad izotopów wykorzystywanych w technice PET jest ich krótki bądź bardzo krótki okres półtrwania, który dla fluoru (¹⁸F) wynosi 106 min, a dla węgla (¹¹C) 20 min.

Złotym standardem w ocenie guzów mózgu cały czas pozostaje MR. Pomimo iż MR daje bardziej dokładny obraz aniżeli badanie TK, to ma on jednak pewne ograniczenia, które powodują, że nie zawsze jest najlepszym narzędziem diagnostycznym, szczególnie po zastosowaniu leczenia operacyjnego bądź leczenia promieniami. Metodą, która pozwala w sposób funkcjonalny ocenić parametry guza zarówno przed leczeniem, jak i po podjęciu leczenia przez pacjenta, jest badanie PET.

Dowodzono, że badanie PET może dostarczyć wiele informacji o różnych zaburzeniach OUN. W guzach mózgu stosowano kilka znaczników m.in. do oceny przepływu krwi, metabolizmu bądź określenia stopnia złośliwości guza. Spośród różnych znaczników ¹⁸F-FDG jest najczęściej stosowanym znacznikiem do oceny metabolizmu w guzach mózgu. Pomimo stosunkowo dużej dostępności tej metody, z racji wykorzystywanego wektora metabolicznego, doświadczenia

are frequently used in oncology, neurology and psychiatry. Amino acids are preferred for the diagnosis of brain tumors due to the high uptake in the tumor at the same time low uptake in the normal brain tissue. One of the best amino acids previously used for the study of brain tumors is ¹¹C-methionine. However, because of the short half-life of this isotope (20 min), fluorine-labeled amino acids, e.g. tyrosine (FET), and other fluorine compounds labeled with an isotope ¹⁸F (FDO-PA) were introduced in clinical practice.

- Currently, PET is used for:
- evaluation of the effects of therapy,
- locating pathologic accumulation of tracer,
- confirmation/exclusion of multifocal process,
- help in choosing the most appropriate location for biopsy,
- assistance in determining the GTV in radiotherapy planning,
- differentiating tumor recurrence from necrosis.

Currently used PET tracers used for the evaluation of brain tumours can be considered as complementary methods for morphological studies and, in some cases, they may be crucial to take the most effective treatment.

Key words: oncology, pet, brain tumors.

kliniczne pokazują ograniczenia w szerokim zastosowaniu tego znacznika wynikające z dużego fizjologicznego wychwytu glukozy przez normalną tkankę mózgową, co powoduje problemy w ocenie niskozróżnicowanych guzów mózgu oraz w przypadku wznowy. Dlatego też do oceny guzów mózgu wykorzystuje się inne wektory metaboliczne opierające się na różnych aspektach funkcjonalnych komórki nowotworowej, np. aminokwasy. Znakowane izotopami aminokwasy są często wykorzystywane w onkologii, neurologii i psychiatrii. Aminokwasy są preferowane do diagnostyki guzów mózgu ze względu na duży wychwyt w guzie przy jednocześnie małym wychwycie w zdrowej tkance mózgowej. Jednym z najlepszych dotychczas aminokwasów wykorzystywanych do badania guzów mózgu jest ¹¹C-metionina. Jednak ze względu na krótki okres półrozpadu tego izotopu (20 min) zaczęto wykorzystywać aminokwasy znakowane fluorem, np. tyrozyna (FET), oraz inne związki znakowane izotopem fluoru ¹⁸F (FDO-PA). Obecnie badanie PET jest wykorzystywane do:

- monitorowania efektów terapii,
- zlokalizowania ognisk patologicznego gromadzenia znacznika,
- potwierdzenia lub wykluczenia procesu wieloogniskowego,
- pomocy w wyborze najbardziej odpowiedniej lokalizacji do biopsji,
- pomocy w określeniu GTV (*gross tumour volume*) w planowaniu radioterapii,
- różnicowania wznowy guza od zmian martwiczych.

Współczesne badania radioizotopowe PET zmian ogniskowych mózgu mogą być uznawane za metody komplementarne do badań morfologicznych, a w niektórych przypadkach ich znaczenie może być kluczowe dla podjęcia najbardziej skutecznego leczenia.

Słowa kluczowe: onkologia, PET, guzy mózgu.

Session 13. Positron emission tomography (PET) in oncology
Sesja 13. Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) w onkologii

[51]

Prezentacja przypadków

Łukasz Kwinta, Aleksandra Dziubandowska

Session 14. Personalization and targeted therapies

Sesja 14. Personalizacja i terapie celowane

[52]

Badanie czynników prognostycznych odpowiedzi na chemioterapię warunkującą przeszczepianie komórek macierzystych na podstawie badania profilu SNP genów związanych z odpornością**Emilia Jaskuła**

L. Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wrocław, Polish Academy of Sciences, Poland
Lower Silesian Centre of the Cellular Transplantation with National Bone Marrow Donor Bank, Wrocław, Poland
*Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, Polska Akademia Nauk, Polska
Dolnośląskie Centrum Transplantacji Komórkowych z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku, Wrocław, Polska*

Abstract

To evaluate some biological features as prognostic factors for successful effect of allotransplantation associated chemotherapies two sets of genetic features should be considered:

- these of cancer cells reflecting their susceptibility to chemotherapy,
- those of patients and donors reflecting their immune system potential to combat infections.

At the leukemic cells site the presence of mutations facilitating proliferations and resistance to apoptosis play the main role. FLT3 mutation may serve as a good example of this kind of genetic aberrations.

Genetic features associated with SNPs if analyzed provide some information on patient's immune system potential pointing out on these more or those less susceptible to microbial infections, procedure related toxicity, aGvHD or relapse.

NOD2 gene mutations serve for that as a good example. The presence of NOD2 (i) SNP13 in recipients or donors was more frequently seen in patients having post transplant sepsis (9/48 vs. 33/386, $p = 0.046$). (ii) SNP8 (recipient and/or donor positive) was associated with a higher rate of Herpes viruses reactivation (17/21 vs. 86/173, $p = 0.007$). (iii) SNPs (SNP8, 12 or 13) at the donor site in ATG receiving MUD patients, was significantly associated with a risk of severe grade > II aGvHD (10/38 vs. 24/198, $p = 0.042$).

TNF- α recipient -308 AG genotype was associated with > grade I toxicity in patients on myeloablative conditioning (21/22 vs. 86/118, $p = 0.022$). Interleukin 6 -174 GG recipients genotype, in patients receiving myeloablative conditioning, constituted a risk of severe grade IV toxicity (13/41 vs. 15/98, $p = 0.028$).

Genetic description of leukemic cells and profiling of immune-related genes in recipients and potential donors may optimize the process of selection of donors -recipient pairs. With that a proper balance between the aggressiveness of transplant associated chemotherapy and genetically described susceptibility to the advert effect of conditioning may be achieved.

Key words: polymorphism SNP, immune system potential, hematopoietic stem cells transplantation, NOD2/CARD15, IL-6, susceptibility to chemotherapy.

Streszczenie

W ocenie czynników prognostycznych odpowiedzi na chemioterapię warunkującą przeszczepianie komórek macierzystych należy rozważyć cechy genetyczne:

- komórek nowotworowych odzwierciedlające podatność na chemioterapię,
- biorców i dawców przeszczepu związane z potencjałem układu odpornościowego.

Po stronie komórki białaczkowej najważniejszą rolę odgrywają zmiany genetyczne związane z opornością na apoptozę i ułatwiające proliferację (np. gen FLT3). Nowych informacji w opisie genetycznym komórki białaczkowej dostarcza technologia comparative genomic hybridization (CGH).

Cechy genetyczne związane z wystąpieniem polimorfizmów SNP genów kodujących białka zaangażowane w proces odpornościowy mogą determinować podatność pacjenta na zakażenia drobnoustrojami, toksyczność procedury, aGvHD lub wznówę choroby podstawowej.

Przykładem takich genów są: NOD2/CARD15, IL-6 czy TNF- α . Obecność mutacji SNP13 w genie NOD2 u biorców lub/i dawców komórek krwiotwórczych związana jest z wyższym ryzykiem wystąpienia sepsy (9/48 vs 33/386, $p = 0,046$). Obecność SNP8 (biorca i/lub dawca) stanowi istotne ryzyko infekcji/reaktywacji wirusami Herpes (17/21 vs 86/173, $p = 0,007$). Z kolei wystąpienie którejkolwiek z mutacji NOD2 kojarzonej z zespołem Crohna (SNP8, 12 lub 13) po stronie niespokrewnionego dawcy stanowi ryzyko ciężkiego aGvHD (\geq II st.) (10/38 vs 24/198, $p = 0,042$) u pacjentów otrzymujących ATG w warunkowaniu przeszczepu.

Genotyp TNF- α -308 AG u biorcy związany jest z wystąpieniem toksyczności (> I st.) u chorych otrzymujących warunkowanie mieloablacyjne (21/22 vs 86/118, $p = 0,022$). W tej grupie chorych genotyp IL-6 -174 GG biorcy stanowi ryzyko wystąpienia ciężkiej toksyczności (IV st.) (13/41 vs 15/98, $p = 0,028$).

Możliwość opisu genetycznego komórek białaczkowych oraz genów białek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną może optymalizować dobór pary dawca-biorca przeszczepu oraz dać wskazówki do postępowania zabezpieczającego słabe ogniwa odporności. Stanowi to nową jakość w medycynie transplantacyjnej.

Słowa kluczowe: polimorfizm SNP, odpowiedź immunologiczna, przeszczepienie komórek krwiotwórczych, NOD2/CARD15, IL-6, podatność na chemioterapię.

Session 14. Personalization and targeted therapies

Sesja 14. Personalizacja i terapie celowane

[53]

Integrin ligands as novel therapeutic targets in malignant gliomas*Ligandy integrzyn jako nowe cele molekularne w terapii glioków***Paweł Wisniewski, Magdalena Kijewska, Aleksandra Ellert-Miklaszewska, Bożena Kaminska**

Laboratory of Molecular Neurobiology/INAGEN, The Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

Laboratorium Neurobiologii Molekularnej/INAGEN, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa, Polska

Abstract

Introduction: Malignant gliomas attract brain resident microglia and peripheral macrophages and re-program these cells into pro-invasive, immunosuppressive cells that support tumor growth, invasion, angiogenesis and cause immunosuppression. Tumor-derived signals involved in recruitment and polarization of microglia/macrophages are mostly unknown.

Results and discussion: Combining functional approach and proteomics of C6 glioma secretome we found that osteopontin (OPN, SPP1) and lactadherin (MGF-E8), highly overexpressed in glioma cells, are essential for activation of the pro-invasive phenotype of microglia. Both proteins are integrin ligands and further studies demonstrated that a short peptide, interfering with integrin binding blocks glioma induced morphological alterations, motility, phagocytosis, and FAK and Akt signaling in microglia cultures. Recombinant osteopontin mimicked most of the glioma-induced functional responses and up-regulated the expression of the pro-invasive phenotype genes in microglia. Knockdown of OPN in glioma cells using specific shRNA reduced both basal and microglia dependent invasion as determined in Matrigel assay using automatic laser scanning cytometry. Knockdown of OPN in glioma cells greatly reduced growth of experimental gliomas in rats. A total number of infiltrating (Iba-1+) microglia/macrophages was not reduced in OPN depleted gliomas, but these cells had ramified morphology and reduced staining for Arginase 1 (the alternative phenotype marker), in contrast to amoeboid, fully activated cells infiltrating control, shNeg tumors. Angiogenesis was completely reduced in OPN-depleted gliomas. The expression of OPN was found to be elevated in all tested human glioma cell lines and glioblastoma samples in comparison to non-transformed astrocytes or normal brain. Increased OPN expression correlates with malignancy grade and poor patient prognosis (the Rembrandt database analysis). OPN expression is up-regulated in many cancers and its increased expression in tumor or serum concentration could be a biomarker of malignant tumors.

Conclusions: We found that OPN is overexpressed in glioma cells and crucial for both tumor invasion and for the alternative activation and differentiation of macrophages infiltrating gliomas. Genetic ablation or application of a short, interfering peptide blocks the pro-invasive activation of tumor infiltrating macrophages. This makes integrin ligands promising targets for glioma therapy.

Studies supported by a grant 2012/04/A/NZ3/00630 from the National Science Center.

Streszczenie

Wstęp: Glioki, poprzez wydzielanie do mikrośrodowiska czynników chemotaktycznych, powodują zwiększony napływ do wnętrza guza komórek mikrogleju oraz obwodowych makrofagów, które następnie ulegają swoistemu przeprogramowaniu do komórek pro-inwazyjnych, z zahamowaną odpowiedzią przeciwnowotworową. Komórki te, wspierają aktywnie wzrost guza, inwazyjność komórek glejaka, angiogenezę, jednocześnie wywołując lokalną immunosupresję. Czynniki wydzielane przez glejaka, które przyciągają komórki mikrogleju/makrofagów i powodują zmianę ich fenotypu na tzw. fenotyp alternatywny pozostają w dużej mierze nieznane.

Wyniki i dyskusja: W wyniku połączenia badań funkcjonalnych z wynikami badań proteomicznych sekretom komórek szczyrzego glejaka C6, zidentyfikowano osteopontynę (OPN, SPP1) i laktadherynę (MGF-E8) jako kluczowe dla aktywacji proinwazyjnego fenotypu komórek mikrogleju. Ekspresja obu genów jest silnie zwiększona w komórkach glejaka C6, jak również w komórkach glejaków ludzkich z linii komórkowych i tkanek operacyjnych od pacjentów w porównaniu do prawidłowych astrocytów i zdrowego mózgu. Zidentyfikowane białka są ligandami integrzyn. Dalsze badania wykazały, że krótki peptyd, interferujący z ich wiązaniem do receptorów integrzynowych, blokuje indukowane przez glejaka zmiany morfologiczne, ruchliwość, fagocytozę, a także szlaki sygnałowe FAK i Akt w komórkach mikrogleju. Jednocześnie rekombinowana osteopontyna indukowała zmiany funkcjonalne podobne do zmian indukowanych przez komórki glejaka, oraz zwiększała poziom ekspresji genów związanych z proinwazyjnym fenotypem komórek mikrogleju. Wyciszenie ekspresji OPN w komórkach glejaka zmniejszało ich autonomiczną i stymulowaną przez mikroglej inwazyjność w modelu in vitro. Wyciszenie ekspresji OPN w komórkach glejaka zmniejszało również w sposób znaczący wzrost guzów w szczyrim modelu glejaka. Obniżenie ekspresji OPN nie powodowało zmniejszenia liczby infiltrujących komórek mikrogleju/makrofagów (Iba-1+), jednak komórki te cechowała morfologia charakterystyczna dla komórek spoczynkowych (nieaktywowanych) oraz zmniejszona produkcja arginazy 1 (markera fenotypu alternatywnego), w porównaniu z komórkami infiltrującymi guzy kontrolne – z niezmiennym poziomem ekspresji OPN. Jednocześnie, w guzach ze zmniejszoną ekspresją OPN obserwowano całkowite zahamowanie procesów angiogenezy, w porównaniu z guzami kontrolnymi. Analiza wyników zdeponowanych w bazie danych „Rembrandt” wykazała, że zwiększona ekspresja OPN koreluje pozytywnie ze stopniem złośliwości glejaka oraz negatywnie z prognozą przeżycia pacjentów.

Wnioski: Podwyższona ekspresja OPN w komórkach glejaków jest czynnikiem kluczowym regulującym inwazyjność glejaków, jak również indukującym alternatywną aktywację i różnicowanie makrofagów infiltrujących guz. Usunięcie OPN z mikrośrodowiska guza metodami inżynierii genetycznej, jak również użycie krótkiego peptydu interferującego blokuje proinwazyjną aktywację makrofagów infiltrujących guz. To czyni ligandy integrzyn obiecującymi celami w terapii glejaków.

Badania finansowane z grantu 2012/04/A/NZ3/00630 Narodowego Centrum Nauki.

Session 14. Personalization and targeted therapies

Sesja 14. Personalizacja i terapie celowane

[54]

Epigenetic dysfunctions in gliomas and its therapeutic targeting*Zaburzenia epigenetyczne w glejakach oraz ich znaczenie w terapii***Aleksandra Steranka, Marta Maleszewska, Magdalena Śmiech, Paweł Nauman, Tomasz Tykocki, Wiesława Grajkowska, Katarzyna Kotulska, Janusz Siedlecki, Mateusz Bujko, Bożena Kamińska**Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland
*Institut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa, Polska***Abstract**

Introduction: Glioblastomas are considered to be one of the most difficult human malignancies to treat due to frequent dysfunctions of tumor suppressors and oncogenes. Besides genetic alterations, epigenetic modifications are critical to the development and progression of cancer. The contribution of epigenetic changes to glioma carcinogenesis has been broadly studied in terms of aberrant promoter methylation-induced gene silencing. Recent findings emphasize the interplay between mutations in genes encoding metabolic enzymes, epigenomic changes and gliomatogenesis. Recurrent mutations in the genes coding for IDH1 and IDH2 have broad implications for DNA and histone demethylases, which use α -ketoglutarate. Deregulation of the histone modifying enzymes in glioblastomas and aberrant histone modifications are implicated in cancer pathobiology, therefore histone modifying enzymes are emerging targets for anti-cancer therapy. Epigenetic-based mechanisms are reversible and can be targeted by pharmacological interventions, for example using histone deacetylase/methyltransferase inhibitors. The results of evaluation of cytotoxic potential of common histone deacetylase/methyltransferase inhibitors against cultured glioma cells will be presented and their potential therapeutic value will be discussed.

Material and methods: The effect of selected inhibitors on epigenetic modifications and survival of glioma C6 cells was studied using immunofluorescence and MTT metabolism test. Exon 4 of the *IDH1/2* genes was amplified by a polymerase-chain-reaction (PCR) assay and sequenced from the patients' tumor.

Results: We found that VPA and TSA increase histone H4 acetylation in glioma cells, while chaetocin and BIX01294 reduce H3K9me3, and 3DZnep decreases H3K27me3. Treatment with some epigenetic inhibitors affects viability of glioma cells. Somatic mutations affecting the IDH1(R132) residue were detected in 3/54 patients' samples.

Conclusions: Selected inhibitors inhibit epigenetic enzyme activities and reduce viability of glioma cells. IDH1 mutation is frequent in secondary glioblastomas that have progressed from low-grade or anaplastic astrocytomas.

Key words: glioblastoma, epigenetics, IDH1/2, therapy.

Streszczenie

Wstęp: Złośliwe glejaki są jednymi z najtrudniejszych do leczenia nowotworów ludzkich ze względu na często występujące mutacje w genach supresorowych bądź onkogenach. Oprócz zmian genetycznych, kluczową rolę dla rozwoju i postępu nowotworu odgrywają modyfikacje epigenetyczne. Udział mechanizmów epigenetycznych w patogenezie glejaka, zwłaszcza rola modyfikacji histonów oraz metylacji DNA prowadzącej do wyciszenia ekspresji genu, jest szeroko badana. Zmiany epigenetyczne towarzyszące rozwojowi glejaków są związane również z występowaniem mutacji w genach metabolizmu podstawowego. Mutacje w genach IDH1 oraz IDH2 hamują działanie demetylaz DNA/histonów zależnych od α -ketoglutaranu. Zmiany epigenetyczne są odwracalne i mogą stanowić potencjalny cel terapii farmakologicznej z udziałem inhibitorów deacetylaz lub metylotransferaz histonów. Dlatego enzymy modyfikujące histony są potencjalnym celem w terapii przeciwnowotworowej. Zaprezentowane zostaną wyniki doświadczeń oceniających cytotoksyczność wybranych inhibitorów deacetylaz i metylotransferaz histonów w hodowlach glejaka *in vitro* oraz ich potencjalne działanie terapeutyczne.

Materiał i metody: Zbadano wpływ wybranych inhibitorów na modyfikacje epigenetyczne i żywotność komórek glejaka C6 wykorzystując metody immunofluorescencji oraz biochemiczne. Obecność mutacji IDH1/2 w próbkach pochodzących od pacjentów z glejakiem identyfikowano za pomocą sekwencjonowania egzonu 4 po uprzedniej amplifikacji materiału DNA metodą PCR.

Wyniki: Stwierdzono, że kwas walproinowy (VPA) i trichostatyna A (TSA) podwyższają poziom acetylacji histonu H4 w komórkach glejaka C6, podczas gdy chaetocina i BIX01294 w niskich stężeniach obniżają poziom H3K9me3. H3K27me3 spada w komórkach traktowanych 3DZnep. Traktowanie komórek C6 niektórymi inhibitorami przez 24 h obniża przeżywalność komórek glejaka. W 3/54 próbkach pochodzących od pacjentów wykazano obecność mutacji genu IDH1 (R132) i mutacje te występowały w glejakach złośliwych (stopień WHO IV); nie wykryto żadnej mutacji w glejakach łagodnych (stopień WHO I).

Wnioski: Wykazano, że wybrane inhibitory hamują aktywność enzymów epigenetycznych w komórkach glejaka C6 oraz ograniczają jego żywotność. Wysoka częstość mutacji genu IDH1 jest charakterystyczna dla glejaków wtórnych.

Słowa kluczowe: glejak, epigenetyka, IDH1/2, terapia.

Session 14. Personalization and targeted therapies

Sesja 14. Personalizacja i terapie celowane

[55]

Functionalized spider silk for targeted cancer therapy

Anna Florczak^{1,2,3}, Katarzyna Kaźmierska^{1,2,3}, Andrzej Mackiewicz^{1,3}, Hanna Dams-Kozłowska^{1,3}¹Department of Cancer Immunology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland²NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland³Department of Diagnostics and Cancer Immunology, Greater Poland Cancer Center, Poznan, Poland¹Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska²Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska³Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

Abstract

The main challenge in chemotherapy in cancer is to enhance therapeutic and minimize adverse effects of an anti-cancer drug. As silk biomaterial combines superb mechanical properties, biocompatibility and biodegradability, it can be used as a drug carrier. Moreover, the bioengineered silk protein may be functionalized by fusion of tumor homing peptides.

The aim of the study was to obtain a novel system based on two functionalized silk proteins and their blends for a specific delivery of therapeutic agents. The bioengineered silk proteins (MS1 and MS2 based on the proteins from *Nephila clavipes*) and theirs Her2-directing hybrid variants were designed. Obtained proteins were processed into spheres by salting out process. The MS1/MS2 blends were produced in different weight ratios. Spheres were characterized in terms of morphology, size (scanning electron microscopy), Zeta potential (ZP), stability (spectrophotometry). The binding (flow cytometry and confocal microscopy) and drug delivery potential (MTT assay) of silk particles to cancer cells were investigated.

Particles based on MS1 and MS2 proteins demonstrated differences in morphology, stability, zeta potential and binding to targeted cells. The increasing MS2 concentration into MS1/MS2 blend improved physical properties of spheres, however lowered their cell binding efficiency. For 80/20% blends (functionalized MS1/MS2), the binding efficiency was maintained with greatly improved sphere stability. The functionalized silk spheres loaded with doxorubicin significantly higher reduced the cell viability of Her2-overexpressing cells comparing with Her2-negative cells and comparing to control spheres without the targeting domains. The obtained results confirmed the potential for the delivery of a therapeutic agent confined in silk spheres to the specific tumor microenvironment.

Key words: targeted therapy, bioengineered spider silk, drug carriers, doxorubicin.

Streszczenie

Głównym wyzwaniem w terapii nowotworów jest zwiększenie efektów terapeutycznych i zminimalizowanie skutków ubocznych stosowanych leków. Jedwab pajęczy ze względu na swoje unikalne właściwości mechaniczne, biokompatybilność i biodegradowalność może znaleźć zastosowanie jako nośnik leków. Ponadto bioinżynierowany jedwab pajęczy można funkcjonalizować poprzez dołączenie domen rozpoznających receptory na powierzchni komórek nowotworowych.

Celem badań było otrzymanie nowego systemu opartego na dwóch funkcjonalizowanych białkach jedwabiu i ich mieszankach do celowanego dostarczania leków. Skonstruowano bioinżynierowane białka jedwabiu (MS1 i MS2 oparte na białkach naturalnych pająka *Nephila clavipes*) i ich hybrydowe warianty rozpoznające Her2. Z otrzymanych białek wyprodukowano sfery poprzez wysolenie jonami fosforanowymi. Stosowano mieszanki MS1/MS2 w różnych stosunkach wagowych. Sfery scharakteryzowano pod względem morfologii, rozmiaru (skaningowa mikroskopia elektronowa), potencjału zeta (*Zeta potential* – ZP) oraz stabilności (spektrofotometria). Następnie badano wiązanie funkcjonalizowanych sfer *in vitro* (cytometria przepływowa i mikroskopia konfokalna) oraz potencjał dostarczania leków (test MTT) do komórek nowotworowych.

Cząsteczki oparte na MS1 i MS2 różniły się pod względem morfologii, stabilności, ZP oraz wiązania do komórek. Większa ilość białka MS2 w mieszance wywoływała poprawę fizycznych właściwości sfer, jednak zmniejszała skuteczność wiązania do komórek. Dla mieszanki 80/20% (funkcjonalizowane białka MS1/MS2) poziom wiązania był zachowany przy jednocześnie znacznym zwiększeniu stabilności sfer. Funkcjonalizowane sfery załadowane doksorubicyną powodowały spadek żywotności komórek z nadekspresją Her2 w porównaniu z komórkami Her2-negatywnymi oraz kontrolnymi sferami bez domeny funkcyjnej.

Uzyskane wyniki potwierdzają potencjał jedwabnych sfer w dostarczaniu środka terapeutycznego do specyficznego mikrośrodowiska guza.

Słowa kluczowe: terapia celowana, bioinżynierowany jedwab pajęczy, nośniki leku, doksorubicyna.

Session 14. Personalization and targeted therapies

Sesja 14. Personalizacja i terapie celowane

[56]

Oksygenaza hemowa 1 jako potencjalny cel molekularny w leczeniu mięsaka prążkowanokomórkowego**Maciej Ciesla, Marta Seczyńska, Mateusz Jeż, Józef Dulak, Alicja Józkowicz**Department of Medical Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland
Zakład Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska**Abstract**

Rhabdomyosarcoma (RMS) is one of the commonest forms of soft tissue sarcomas in children. Rhabdomyosarcoma is usually derived from primitive mesenchymal cell, however it can be found virtually anywhere in the body, including sites where striated muscles are not normally found. Two main groups of RMS may be distinguished: embryonal (eRMS) and alveolar (aRMS) subtypes of RMS. Alveolar RMS are characterized by higher metastatic potential and malignancy.

We have recently shown that heme oxygenase-1 (HO-1), which is key anti-oxidant enzyme within the cell can act as inhibitor of muscle differentiation. Heme oxygenase-1 action is possibly mediated by SDF1, p38 kinase pathway and inhibition of MyoD and muscle specific microRNAs (myo-miRNAs), which are a novel class of particles involved in regulation of gene expression. myo-miRNAs were shown to promote myocyte differentiation.

Given its effect in muscle differentiation, we speculated that HO-1 can also affect aggressiveness of RMS. Indeed, according to the data obtained from *in vitro* experiments aRMS are characterized by higher expression of HO-1. This effect may be also observed in tumor samples from patients with different subtypes of RMS. Moreover blockade of HO-1 activity leads to better response of RMS to chemotherapeutics and increased myocyte-like phenotype in *in vitro* culture of RMS cell lines, as indicated by higher expression of myosin and other markers of myogenesis.

Here we indicate that HO-1 can be one of proteins of great interest for novel approaches toward treatment of myoblast derived tumors such as rhabdomyosarcoma.

Key words: rhabdomyosarcoma, heme oxygenase-1, microRNAs.

Streszczenie

Mięsak prążkowanokomórkowy (*rhabdomyosarcoma* – RMS) jest najczęstszym mięsakiem tkanek miękkich występującym u dzieci. Wywodzi się z prymitywnej komórki o pochodzeniu mezenchymalnym, jednak nowotwór ten może powstać w wielu miejscach ciała, w tym niezwiązanych z tkanką mezenchymalną.

Wyróżnia się dwie główne grupy RMS: embrionalne (eRMS) i pęcherzykowe (aRMS). Pęcherzykowe RMS charakteryzują się wyższą złośliwością i wyższym potencjałem do przerzutowania. Wykazaliśmy, że oksygenaza hemowa-1 (HO-1) będąca kluczowym enzymem przeciwutleniającym hamuje różnicowanie komórek mięśniowych. Ta niekanoniczna aktywność HO-1 jest związana ze szlakami SDF1, kinazy p38 czy też mięśniowo specyficznych miRNA (miomirów).

Postulowaliśmy, że ze względu na rolę HO-1 w różnicowaniu mięśni, enzym ten może odgrywać rolę również w patogenezie RMS, nowotworu związanego z tkanką mięśniową. Wykazaliśmy, że agresywniejsza forma RMS jest związana z wyższą ekspresją HO-1 oraz z niższym poziomem czynników promujących zróżnicowany, łagodniejszy fenotyp RMS. Zahamowanie HO-1 prowadzi również do przywrócenia potencjału miogenego i obniżenia proliferacji RMS. Użycie drobnocząsteczkowych związków hamujących aktywność HO-1 prowadzi również do zahamowania wzrostu guzów w mysim modelu *in vivo*.

Podsumowując – HO-1 wydaje się intrygującym celem molekularnym w badaniach nad terapiami mającymi na celu przywrócenie równowagi pomiędzy proliferacją i różnicowaniem komórek RMS.

Słowa kluczowe: *rhabdomyosarcoma*, oksygenaza hemowa 1, mikroRNA.

Session 14. Personalization and targeted therapies
Sesja 14. Personalizacja i terapie celowane

[57]

Personalizacja terapii czerniaka

Andrzej Mackiewicz

Session 15. Supportive treatment in oncology
Sesja 15. Leczenie wspomagające w onkologii

[58]

Lipegfilgrastym – nowa opcja terapeutyczna leczenia neutropenii

Marek Ziobro

Session 15. Supportive treatment in oncology
Sesja 15. Leczenie wspomagające w onkologii

[59]

Neutropenia – limiting factor in the systemic treatment for malignancies in elderly patients

Neutropenia – czynnik limitujący w leczeniu systemowym nowotworów złośliwych u pacjentów w zaawansowanym wieku

Jakub Kucharz^{1,2}

¹Department of Clinical Oncology, University Hospital in Krakow, Poland

²Department of Experimental and Clinical Surgery, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

¹Oddział Kliniczny Onkologii, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Polska

²Zakład Chirurgii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Polska

Abstract

The ageing of the population, increasing life expectancy and cancer morbidity make the systemic treatment of patients over the age of 65 common issue in medical oncology. Older patients constitute a very heterogeneous group due to the differences in their general condition, organ reserves, comorbidities and the polypharmacy as its consequence. The comprehensive geriatric assessment (CGA) seems to be a useful tool in the treatment planning in geriatric oncology as it helps to select those patients who are able to tolerate intensive treatment eg. induction chemotherapy or adjuvant treatment (in those with expected long survival) and patients in whom less aggressive treatment or best supportive care is the most beneficial approach.

The ageing process has been associated with changes in pharmacodynamics and pharmacokinetics of the cancer medications resulting in their higher toxicity in elderly. Myelotoxicity is very common and older age is one of the most important risk factors for severe neutropenia and febrile neutropenia. It has been exhibited that comorbid conditions in elderly independently increase the risk of febrile neutropenia. It should also be noticed that in case of curative treatment myelosuppression and its complications may result in chemotherapy dose reductions, treatment interruptions, decreasing overall treatment efficacy. For these reasons the assessment of risk of myelotoxicity and its complications as well as the appropriate use of G-CSF in elderly patients is very important in clinical practice.

Streszczenie

Wraz ze starzeniem się społeczeństwa, wydłużeniem średniej długości życia oraz wzrostem zapadalności na nowotwory złośliwe coraz częstszym problemem w praktyce onkologa klinicznego staje się leczenie systemowe osób powyżej 65. roku życia. Ze względu na różnice w stanie biologicznym, rezerwach narządowych, występowaniu chorób współistniejących oraz wynikającej z nich polipragmatyzacji pacjenci w zaawansowanym wieku stanowią grupę niezwykle heterogenną. W związku z tym w kwalifikacji do leczenia pomocna jest tzw. całościowa ocena geriatryczna (CGA), pozwalająca na wyselekcjonowanie pacjentów, u których możliwe jest zastosowanie leczenia analogicznego do prowadzonego u osób młodszych, takiego jak np. chemioterapia indukcyjna czy leczenie uzupełniające w przypadku pacjentów z długim przewidywanym okresem przeżycia, oraz pacjentów, u których należałoby rozważyć postępowanie mniej agresywne lub wyłącznie objawowe.

Wraz z procesami starzenia dochodzi do zmian w farmakodynamice oraz farmakokinetyce leków, stąd leczenie systemowe u osób w wieku podeszłym wiąże się z występowaniem toksyczności o znacznym nasileniu. Szczególnie często obserwuje się istotną mielotoksyczność, a wiek powyżej 65. roku życia jest jednym z głównych czynników predysponujących do głębokiej neutropenii, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia gorączki neutropenicznej. Wykazano również, że szereg chorób przewlekłych, występujących w populacji osób starszych niezależnie zwiększa ryzyko wystąpienia gorączki neutropenicznej. Ponadto w przypadku leczenia o założeniu radykalnym mielosupresja oraz powikłania z nią związane mogą wiązać się z koniecznością redukcji dawek stosowanych cytostatyków, przerwami w leczeniu, a tym samym wpływać na skuteczność prowadzonej terapii. W związku z powyższym oszacowanie ryzyka powikłań związanych z mielotoksycznością chemioterapii oraz właściwe zastosowanie G-CSF w tej grupie pacjentów ma szczególnie istotne znaczenie kliniczne.

Session 15. Supportive treatment in oncology
Sesja 15. Leczenie wspomagające w onkologii

[60]

Molekularny mechanizm „podwójnego” blokowania receptora HER2 u chorych na rozsialego raka piersi

Piotr Wysocki

Session 16. Lung cancer

Sesja 16. Rak płuca

[61]

Immunoterapia chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca – fikcje i fakty**Łukasz Spychalski**

Wielkopolska Center of Pulmunology and Thoracosurgery, Poznan, Poland

Oddział Onkologii Klinicznej z Pododdziałem Diennej Chemioterapii, Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii, Poznań, Polska

Abstract

Lung cancer is responsible for the largest number of deaths caused by cancer in the world. Diagnosed annually 1.6 million new cases of cancer, including non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 85% of cases. Currently used methods of treating lung cancer, depending on the stage of the disease at diagnosis include surgery, radiotherapy and/or chemotherapy. Despite advances in treatment, which occurred in the last decade, the prognosis, especially distant survival rates still remain unsatisfactory. Currently, research is subjected to various new therapeutic approaches, whose task is to improve the results of treatment. As a result of many years of research with the use of immunotherapy in NSCLC, managed to get some positive results in phase II clinical trials, but large randomized phase III clinical trials showed no statistically significant treatment results, but nevertheless, it is still an area of interest of researchers dealing with this subject. In particular, some new paradigms have their source in the results of clinical trials in both the treatment associated with the use of more advanced specific vaccines as well as analysis of end points arising from the study design. Various immunotherapy approaches were tested in the course of NSCLC, both in early and in advanced stages of the disease. The best results are seen in the case of the use of immunotherapy as adjuvant therapy in locally advanced NSCLC. This presentation provides an overview of the major clinical trials in several different cancer vaccines for the treatment of early and advanced stage NSCLC.

Key words: non-small cell lung cancer, immunotherapy, vaccines

Streszczenie

Rak płuca odpowiedzialny jest za największą liczbę zgonów spowodowanych chorobą nowotworową na świecie. Rocznie rozpoznaje się 1,6 miliona nowych przypadków tego nowotworu, w tym niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) stanowi ok. 85% przypadków. Obecnie stosowane metody leczenia raka płuca, uzależnione od stopnia zaawansowania nowotworu w chwili rozpoznania, obejmują chirurgię, radioterapię i/lub chemioterapię. Mimo postępu w leczeniu, jaki nastąpił w ostatniej dekadzie, rokowanie, zwłaszcza odsetki przeżyć wieloletnich, nadal pozostają niezadowolające. Aktualnie badaniom poddaje się różnorakie nowe podejścia terapeutyczne, których zadaniem jest poprawa wyników leczenia. W wyniku wielu lat badań z zastosowaniem immunoterapii w NDRP udało się uzyskać pozytywne rezultaty niektórych badań II fazy, jednakże duże badania III fazy z randomizacją nie wykazały istotnych statystycznie wyników leczenia, niemniej jednak ciągle stanowi ono obszar zainteresowania badaczy zajmujących się tą tematyką. W szczególności kilka nowych paradygmatów ma swoje źródło w wynikach badań klinicznych zarówno dotyczących leczenia skojarzonego z użyciem bardziej zaawansowanych swoistych szczepionek, jak i w analizie punktów końcowych wynikających z projektu badania. Różne podejścia immunoterapeutyczne przebadano w przebiegu NDRP – we wczesnym oraz w zaawansowanym stadium choroby. Najlepsze wyniki stwierdzono w przypadku zastosowania immunoterapii jako leczenia uzupełniającego w miejscowo zaawansowanym NDRP. Niniejsza prezentacja zawiera przegląd głównych badań klinicznych z udziałem kilku różnych szczepionek przeciwnowotworowych w leczeniu wczesnego i zaawansowanego stadium NDRP.

Słowa kluczowe: niedrobnokomórkowy rak płuca, immunoterapia, szczepionki.

Session 16. Lung cancer

Sesja 16. Rak płuca

[62]

**Leczenie antyangiogenne chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc –
pułapki diagnostyczne i terapeutyczne**

Katarzyna Szyszka-Barth

Session 16. Lung cancer

Sesja 16. Rak płuca

[63]

Kontrowersje w leczeniu chirurgicznym chorych na złośliwego grasiczaka

Piotr Gabryel

Session 16. Lung cancer

Sesja 16. Rak płuca

[64]

Czy jesteśmy przygotowani do leczenia działań ubocznych wywołanych stosowaniem nowych cząsteczek ukierunkowanych molekularnie

Paulina Gulbicka

Session 17. Colon cancer
Sesja 17. Rak jelita grubego

[65]

**Therapeutic programme – the treatment of advanced colorectal cancer.
A guide or a trap?**

„Program lekowy – leczenie zaawansowanego raka jelita grubego” – bezpieczny drogowskaz czy pułapka?

Jakub Kucharz^{1,2}, Krzysztof Krzemieniecki^{1,3}

¹Department of Clinical Oncology, University Hospital in Krakow, Poland

²Department of Experimental and Clinical Surgery, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

³Department of Oncology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

¹Oddział Kliniczny Onkologii, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Polska

²Zakład Chirurgii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska

³Klinika Onkologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the most common malignancy in Europe and one of the leading causes of cancer death worldwide. According to the European epidemiologic studies metastatic disease is diagnosed in 50% of the colorectal cancer patients (at the diagnosis or in the course of the disease).

In patients with the metastatic CRC (mCRC) chemotherapy is the primary treatment with sequential or combined use of the cytotoxic chemotherapy and the targeted therapies. In Poland the use of the targeted drugs is regulated by the treatment programme formulated by the National Health Fund. According to this programme, FOLFOX4 regimen combined with the bevacizumab can be used as the second line treatment in the patients who progressed on the fluoropyrimidine with irinotecan. Moreover in the patients with *wt k-ras* gene the anti-EGFR antibody can be used as the third line treatment.

Among the mCRC patients those with the oligometastatic disease limited to liver and/or lungs require special concern. In some patients with initially unresectable lesions, R0 resection may become possible after intensive induction treatment, giving them a chance for a long term disease-free survival. In induction treatment most active regimen should be used including targeted therapies. Unfortunately this approach is not considered in the National Health Fund programme, making it a source of claims submitted by patients. It should be noticed that the programme inclusion and exclusion criterias are different from the guidelines published by medical oncology societies and the drug characteristics limiting its availability. Moreover the programme is not adjusted to the current state of medical knowledge (eg. does not require *n-ras* mutation testing prior to the anti-EGFR treatment).

Streszczenie

Rak jelita grubego (RJG) jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym w Europie oraz jedną z głównych przyczyn zgonów związanych z chorobą nowotworową na świecie. Według europejskich danych epidemiologicznych chorobę w stadium pierwotnego lub wtórnego uogólnienia rozpoznaje się u ok. 50% pacjentów.

Podstawową metodą terapii u takich chorych jest leczenie systemowe polegające na sekwencyjnym lub skojarzonym zastosowaniu chemioterapii oraz leków celowanych. W warunkach polskich zastosowanie leków ukierunkowanych molekularnie finansowane przez NFZ regulowane jest programem lekowym „Leczenie zaawansowanego raka jelita grubego”. Przewiduje on zastosowanie schematu FOLFOX4+bevacizumab w II linii po zastosowaniu fluoropirymidyny w skojarzeniu z irynotekaniem. Ponadto w ramach programu pacjenci bez mutacji genu *k-ras* mogą otrzymać w III linii leczenia przeciętnie anty-EGFR.

Szczególną grupę pacjentów z RJG stanowią chorzy z pojedynczymi, pierwotnie nieresekcyjnymi przerzutami w wątrobie lub płucach, którzy po intensywnej chemioterapii indukcyjnej mają szansę na przeprowadzenie resekcji R0, co pozwala u części z nich uzyskać wieloletnie przeżycia bezobjawowe. W chemioterapii indukcyjnej należy stosować schematy o największej aktywności, w tym również zawierające leki celowane. Postępowania takiego nie przewiduje program lekowy, co może być przedmiotem roszczeń ze strony pacjentów. Z kolei w grupie, którą program obejmuje, narzucone kryteria kwalifikacji do leczenia, odmienne od zaleceń towarzystw onkologicznych oraz zaleceń producentów, dodatkowo ograniczają możliwości zastosowania terapii celowanych. Należy również podkreślić, że zapisy programu nie są na bieżąco aktualizowane wraz z postępem wiedzy medycznej (np. konieczność oznaczania mutacji genu *n-ras* w przypadku leczenia anty-EGFR).

Session 17. Colon cancer
Sesja 17. Rak jelita grubego

[66]

Przerzuty raka jelita grubego do wątroby. Uszkodzenia wątroby w trakcie chemioterapii

Anna Kliwicka

Session 18. Rare tumors

Sesja 16. Nowotwory rzadkie

[67]

Terapie personalizowane w mięsakach kości

Iwona Ługowska
